

フラーレンC60のチャイニーズ・ハムスターの肺組織由来の線維芽 (CHL/IU) 細胞を用いる in vitro 小核試験による変異原性の検討

関 良子 柳澤裕之 須賀万智

東京慈恵会医科大学環境保健医学講座

(受付 2023年10月4日 / 受理 2023年11月15日)

STUDY OF THE MUTAGENICITY OF FULLERENE C60 USING A CHINESE HAMSTER LUNG CELL LINE

Yoshiko SEKI, Hiroyuki YANAGISAWA, and Machi SUKA

Department of Public Health and Environmental of Medicine, The Jikei University School of Medicine

The Working Party on Manufactured Nanomaterials of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) has selected 14 substances as priority targets for further study of their biological safety. Fullerene C60 is one such product which is used in industrial materials, pharmaceuticals, cosmetics, and medical devices, but the International Agency for Research on Cancer (IARC) has not evaluated its carcinogenicity. In this study, an in-vitro micronucleus test was conducted to evaluate the mutagenicity of fullerene C60 using Chinese hamster lung tissue-derived fibroblasts. There was no significant increase in micronucleus induction compared with a negative control group in either the continuous or the short-time (metabolically and nonmetabolically activated) treatments. The results of the present study, along with the existing studies of mutagenicity tests, suggest that fullerene C60 may not be mutagenic.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2023;138:75-81)

Key words : Fullerene C60 , Micronucleus assay, CHL/IU cell , mutagenicity

I. 緒 言

ナノテクノロジーはおよそ20年前から注目されはじめ、その後の基礎研究・開発を経てナノマテリアルは国内外を問わず広く製造されるようになりその安全性についても注目され、生体や環境への影響に関する調査・研究および安全性についての試験などが行われるようになった。各国が独自に安全性について評価を進めていく中、2007年11月にOECD（経済協力開発機構）の工業ナノ材料作業部会（Working Party on Manufactured Nanomaterials: WPMN）は、生体への安全性について優先的に検討を進める対象として14物質（フラーレンC60, 単層カーボンナノチューブ (SWCNT), 多層カーボンナノチューブ (MWCNT), 銀ナノ

粒子, 鉄ナノ粒子, カーボンブラック, 二酸化チタン, 酸化アルミニウム, 酸化セリウム, 酸化亜鉛, 二酸化ケイ素 (シリカ), ポリスチレン, デンドリマー, ナノクレイ) を選定した。

これを機に日本国内においても厚生労働省, 経済産業省, 環境省および文部科学省は, おのおの安全性・使用実態に関する調査および安全性に関する試験・研究を進め, また製造や加工等にかかわる各企業も, 「労働安全衛生法」に基づく「粉じん障害防止規則」および「じん肺法」等が適用される物質に関しては, 安全性試験等を行ってきた。経済産業省は, 14物質のうち生産量が一定程度以上であるか, 今後生産量が増加する可能性の高い6物質 (カーボンブラック, 二酸化ケイ素 (シリカ), 二酸化チタン, 酸化亜鉛, カーボンナ

ノチューブ (CNT), フラーレン C60) について情報収集を行い, 情報提供シートを公開している (2022年6月更新)。

これら6物質の中のカーボンブラック, カーボンナノチューブ, フラーレン C60 の3物質は炭素のみで構成された炭素系ナノマテリア (Fig. 1)¹⁾²⁾で, そのうちカーボンブラックおよび多層カーボンナノチューブ (MWCNT-7) は, 国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) の発がん性の評価において, グループ2B (ヒトに対して発がん性があるかもしれない) に分類されている。

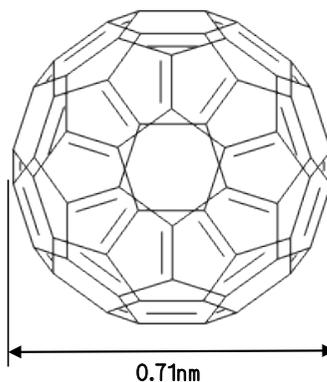
一方, 同じく炭素系ナノマテリアルであるフラーレン C60 については発がん性の評価はされていない。今回我々は炭素原子60個で構成される代表的なフラーレン C60 の変異原性の評価を検討するために, チャイニーズ・ハムスター雌新生仔の肺組織由来の線維芽 (CHL/IU) 細胞を用いる *in vitro* 小核試験を行った。

II. 変異原性試験について

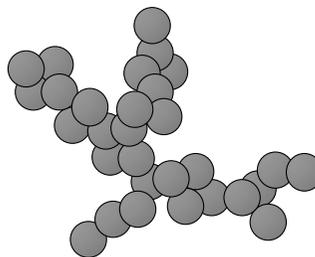
化学物質の発がん性は, 実験動物を用いた2年間の長期反復曝露試験を行い評価されるが, 長い期間と多大な費用を要する為, 発がん性予測のスクリーニングとして短期間で予測可能な変異原性試験が多数考案された。

変異原性試験は「比較的簡便な短期間の試験により被験物質の遺伝毒性を検出し, それに基づくがん原性及び次世代への遺伝的影響について予測すること」を目的に行われる³⁾。化学物質のヒトへの健康影響を評価するための方法について OECD がガイドラインを定めており, その中で遺伝毒性に関して13の試験法があげられている。

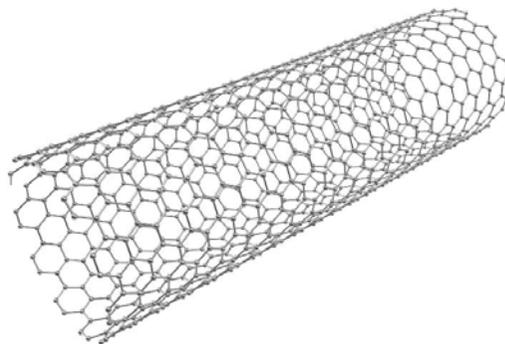
主な試験法として今回の研究で用いた *in vitro* 小核試験を含め, 以下の4つの試験がある (Table 1)。



A フラーレン C60



B カーボンブラック



C カーボンナノチューブ

Fig. 1. 炭素系ナノマテリアルの構造

Table 1 *in vitro* 変異原性試験

試験	使用する細胞	検出方法	指標
小核試験	CHL/IU細胞, チャイニーズハムスター株細胞 (CHO, V79), ト脾臓由来リンパ芽球細胞 (TK6) などの哺乳類細胞	分裂間期の細胞に出現した小核を観察	染色体異常
染色体異常試験	小核試験と同様	分裂中期の細胞に見られる構造異常, 数的異常等を観察	染色体異常
復帰突然変異試験 (Ames試験)	<i>S.typhimurium</i> (TA100,TA98,TA1535,TA1537) <i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i> の5菌株 (すべて)	寒天培地上のコロニー数を計測	遺伝子突然変異
コメットアッセイ	真核細胞	細胞に生じたDNA損傷量を電気泳動により検出	DNA損傷

1. in vitro 小核試験

哺乳類の分裂間期の細胞(樹立細胞株または初代培養細胞)の細胞質内における小核(Micronucleus)を検出する。小核は、異数性誘発や構造異常誘発が生じた場合、通常の分裂を行うことができずに細胞分裂後期から終期に無動原染色体断片が娘核に入らなかったり、分裂後期にすべての染色体が両極に分かれることができなかつた場合などに、通常の核とは別に細胞質内に形成され存在する小型の核⁴⁾である。汎用される細胞株としてはCHL/IU細胞のほかに、チャイニーズハムスター細胞株由来CHOおよびV79などがある。

染色体異常試験は染色体解析に手間がかかり、染色体の観察に熟練を要する等の理由から、欧米を中心に比較的簡便で低コストで実施できる小核試験が多用されている。(Fig. 2)

2. in vitro 染色体異常試験

培養細胞(小核試験と同様)の分裂中期にみられる染色体の形態と数の異常を検出する。染色体異常

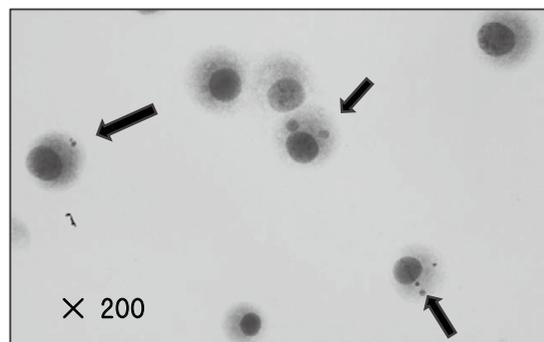


Fig. 2. 小核を有するCHL/IU細胞 陽性対照物質(MMC 0.04 µg/ml)

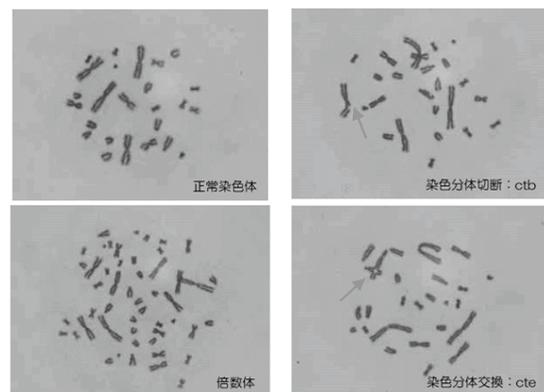


Fig. 3. 染色体の顕微鏡写真(株式会社UBE化学分析センター ホームページより)

には、構造異常(染色分体切断および染色分体交換など)と数的異常(倍数体など)がある(Fig. 3)⁵⁾。

3. 細菌復帰突然変異試験(Ames試験)

アミノ酸要求性のサルモネラ菌と大腸菌の株を用いて復帰細菌株の出現により点変異を検出する。復帰細菌株は、点変異により親試験株が要求するアミノ酸(サルモネラ菌についてはヒスチジン、大腸菌についてはトリプトファン)非存在下で増殖する能力を獲得する⁶⁾。

4. in vitro コメットアッセイ(単細胞ゲル電気泳動試験)

培養細胞に生じたDNA鎖の切断を電気泳動によって検出する。動物の組織より単離した細胞を用いて行うin vivo コメットアッセイも行われる⁷⁾。

III. 方 法

in vitro 小核試験はOECDガイドラインに従いCHL/IU細胞を用いて、連続処理法および短時間処理法(代謝活性系および非代謝活性系)について行った⁸⁾。

1. 細胞

CHL/IU細胞は、Eagle's minimum essential medium(GIBCO(東京都港区))に、非働化(56°C, 30分)した仔牛血清(Life Technologies社(United States of America, Commonwealth of Massachusetts))を10%添加した培養液中で、37°C, CO₂濃度5%の条件にて培養した。試験には解凍後10継代以内の細胞を用いた。

2. 被験物質および被験物質の調整

フラーレンC60(富士フィルム和光純薬株式会社、(大阪府大阪市))は、分子量720.64、黒色結晶~粉末で、水、エタノールに難溶。含ハロゲン系などの特定の有機溶媒に溶解する。水溶性でないため、dimethyl sulfoxide(DMSO)(SIGMA-ALDRICH社(東京都目黒区))を溶媒に用いて調整した。また、難溶性であるため超音波処理にて分散液を作製した。細胞生存曲線から導かれたおよそ50%細胞増殖抑制濃度の5 mg/mLを最高濃度とし、公比2で8濃度を設定した。用いた被験物質の含有量は99.95%であったので、純度補正は行わなかった。

3. S9mix

in vitro 試験では、内因性の薬物代謝能が不十分であるため外因性の代謝活性化酵素S9を用いる必要がある。代謝活性化系で使用するS9mixは、フェノバルビタールおよび5, 6-ベンゾフラボンにて酵素誘導を行った雄のラットの肝臓から調整したホモジネートの9000 X g 上清画分 (S9) (家田貿易株式会社 (東京都文京区)) に、補酵素を添加した。S9mixの組成はTable 2に示す。

4. 陰性対照および陽性対照

陰性対照は溶媒対照 (DMSO) とした。陽性対照は、連続処理法および短時間処理法の非代謝活性化系にはMitomycin C (MMC) (SIGMA-ALDRICH社 (東京都目黒区)) を、短時間処理法の代謝活性化系にはBenzo[a]pyrene (BaP) (富士フィルム和光純薬株式会社, (大阪府大阪市)) を用いた。

5. *in vitro* 小核試験

プラスチックシャーレ (直径60 mm) にCHL/IU細胞を播種し、前培養を行った。

各濃度あたり3枚のシャーレを用い、3つの方法について評価した。連続処理法では前培養後、培地交換を行いフラーレンC60溶液を加えて24時間、48時間、72時間処理を行った。短時間処理法では培地交換後、S9mixを添加した場合 (代謝活性化系) および添加しない場合 (非代謝活性化系) の各々にフラーレンC60溶液を加えて6時間処理を行い、その後、新しい培養液で18時間、42時間、66時間培養を行った。

6. 生細胞数の確認

0.02 % EDTAを含む0.05 % トリプシン溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社, (大阪府大阪市)) を用いて細胞を回収し、細胞増殖数の測定を行った。

Table. 2 S9mixの標準的組成
S9mixの標準的組成 (10ml中)

S9 分画	3 ml
20 mM HEPES 緩衝液 (pH7.2)	2 ml
50 mM MgCl ₂	1 ml
330 mM MgCl ₂	1 ml
50 mM グルコース 6-リン酸	1 ml
40 mM NADP(Na)	1 ml
精製水	1 ml

7. 標本作製

生細胞数の確認後、細胞懸濁液を0.075 M塩化カリウム (富士フィルム和光純薬株式会社, (大阪府大阪市)) 溶液にて37 °C, 15分間低張処理した。処理後、25 % 酢酸 (富士フィルム和光純薬株式会社, (大阪府大阪市))・メタノール (富士フィルム和光純薬株式会社, (大阪府大阪市)) 溶液を加え半固定した。

その後、2 % 酢酸メタノール溶液による固定操作を3回行い、遠心後、固定液にて細胞を懸濁させ、細胞浮遊液を作製した。浮遊液はスライドガラス上に滴下した。

8. 染色および観察

作製した標本は乾燥後、3.5 % ギムザ溶液 (MERCK社 (東京都目黒区)) で核を染色し、光学顕微鏡下 (200倍) にて1シャーレあたり1000個、合計3000個の分裂間期細胞を観察し、小核を有する単核細胞の出現数を記録した。

9. 統計学的判定

小核誘発頻度についてはFisher's exact test (Extended) にて比較し、用量依存性については、Cochran-Armitage 傾向検定にて評価した。

IV. 結 果

小核試験の結果および生存曲線をFig. 4-Fig. 6に示した。

連続処理法 (Fig. 4) では溶媒対照群と比較して小核誘発頻度の有意な増加は見られなかった。短時間処理法においても、代謝活性化系 (Fig. 5) および非代謝活性化系 (Fig. 6) で溶媒対照群と比較して小核誘発頻度の有意な増加は見られなかった。

陽性対照物質処理群では、連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても小核誘発頻度の有意な増加が見られたことから、試験法の検出性能も代謝活性化系の活性も妥当なものであった。

V. 考 察

フラーレンC60の変異原性について、今回行ったCHL/IU細胞を用いる*in vitro* 小核試験では連続処理法および短時間処理法 (代謝活性化系および

非代謝活性化系) のいずれにおいても、溶媒対群と比較して小核誘発頻度の有意な増加は見られなかった。

1. 先行研究との比較

フラーレンC60の *in vitro* 変異原性試験に関する先行研究の概要をTable 3にまとめた⁹⁾¹⁰⁾。小核

試験が1件、染色体異常試験が2件、復帰突然変異試験 (Ames 試験) が2件、コメットアッセイが1件あった。そのうち本試験結果と同様に陰性となったのは、今回の試験と同じくCHL/IU細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験2件、Ames試験2件および *in vitro* コメットアッセイ1件であった。唯一A549細胞を用いた *in vitro* 小核試験では陽性となった。A549細胞はヒト由来株化培養肺胞上皮細胞で、ヒト肺胞上皮II型細胞モデルとして汎用されているが、OECDテストガイドラインではその使用が推奨されていない。A549細胞とCHL/IU細胞を用いて比較した研究はほぼ報告されていない。A549細胞との比較については今後の課題として我々も検討を行う予定である。

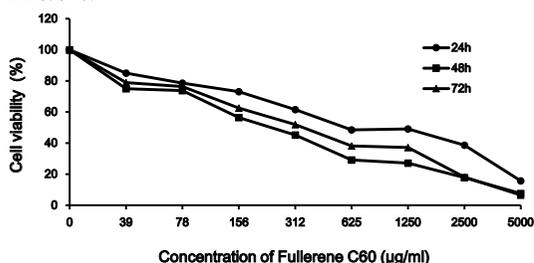
今回の試験結果とこれまでに報告されている変異原性試験の結果と総じて、フラーレンC60は、変異原性を持つ可能性は低いと考えられる。

2. 炭素系ナノマテリアルとの比較

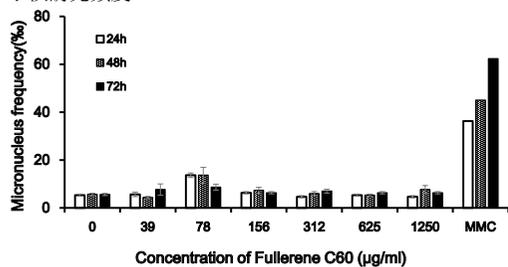
フラーレンC60は経済産業省が一定の生産量を条件に選定した6物質の中の炭素系ナノマテリアルの一つで、今回の試験結果から変異原性は極めて低いと判断された。一方、残り2つのカーボンブラックおよびMWCNT-7はIARCによる発がん性の評価がグループ2Bに分類されている。

カーボンブラックは、粒子状無定形炭素と呼ば

A 生存曲線



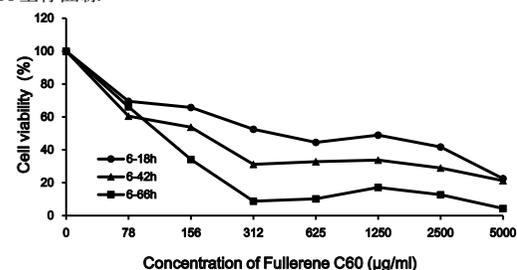
B 小核誘発頻度



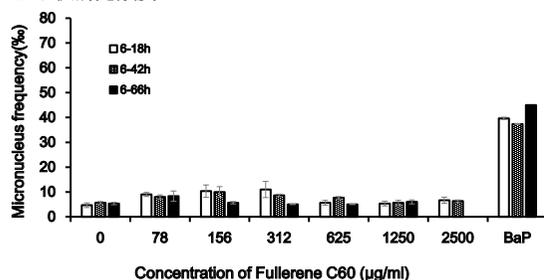
平均値 ± 標準偏差 . MMC 0.04 µg/ml

Fig. 4. 連続処理法の結果

A 生存曲線



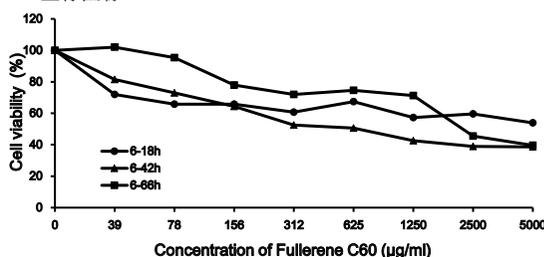
B 小核誘発頻度



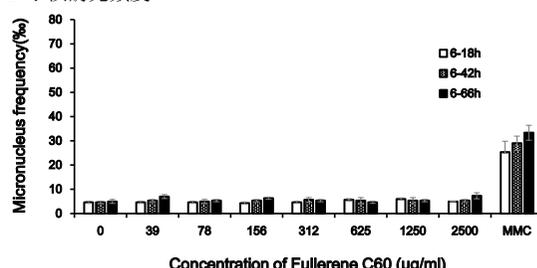
平均値 ± 標準偏差 . BaP 10 µg/ml

Fig. 5. 短時間処理法 (代謝活性化系) の結果

A 生存曲線



B 小核誘発頻度



平均値 ± 標準偏差 . MMC 0.08 µg/ml

Fig. 6. 短時間処理法 (非代謝活性化系) の結果

れ、球状の粒子が複数融着した構造をしている。化学的には単体の炭素として扱われるが、純粋な炭素分子ではなく、最小単位である縮合ベンゼン環の表面にカルボキシル基、水酸基、アルデヒド基などの官能基がある。このような表面の官能基が発がん性を示す原因であろうと考えられている。MWCNT-7は多層の同軸管状の繊維状型で、MWCNTの中でも特に石綿（アスベスト）に硬さや形状（針状など）が類似している。これにより石綿と同様の機序によって、発がん性を示すと考えられている。これに対してフラレンC60は、球状の結晶構造をしており、置換される水素分子が存在しない。このような形状の違いが、発がん性の違いを生じたものと考えられる。

VI. 結 語

フラレンC60は炭素原子のみで構成される炭素系ナノマテリアルで、医療品、化粧品など多くの分野で利用されているが、今日までにIARCによる発がん性に関する評価がなされていない。その為、今回、CHL/IU細胞を用いるin vitro小核試験による変異原性試験を行い、その安全性について検討を行なった。その結果、連続処理法および短時間処理法（代謝活性化系および非代謝活性

化系）のいずれの方法においても溶媒対照群と比較して小核誘発の有意な増加は認められなかった。

今回の結果と先行研究等の結果からと総じて、フラレンC60は、変異原性を持つ可能性は低いと考えられる。

著者の利益相反 (conflict of interest : COI) 開示 :
本論文の研究内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) 富士フィルム和光純薬株式会社 [internet]. フラレンC60, 99.95%. <https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0106-0674.html>. [accessed 2023-09-25]
- 2) ナノ粒子ワールド [internet]. カーボンナノチューブとは. <https://www.ashizawa.com/nanoparticles/archives/1770>. [accessed 2023-09-25]
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター変異遺伝部 [internet]. 遺伝毒性概要. <https://www.nihs.go.jp/dgm/genotoxicitytest2R.html>. [accessed 2023-9-25]
- 4) OECD iLibrary [internet]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health effects. Test No.487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487>

Table. 3 Fullerene C60の有害性情報（2008年以降） 【変異原性試験】

In vitro genotoxicity study (micronucleus assay) of fullerene C60

References	Cells used in assay	Materials	Findings
Totsuka <i>et al</i> , 2009	Human lung cancer cell line (A549 cells)	C60	Positive

In vitro genotoxicity study (chromosomal aberration assay) of fullerenes

References	Cells used in assay	Materials	Findings
Shinohara <i>et al</i> , 2009	Chinese hamster lung cell line (CHL/IU cells)	C60	Negative
Aoshima <i>et al</i> , 2010	Chinese hamster lung cell line (CHL/IU cells)	Mixture of C60 and C70	Negative

In vitro genotoxicity study (gene mutation assay) of fullerene C60

References	Cells used in assay	Materials	Findings
Kato <i>et al</i> , 2009a	Salmonella typhimurium (TA100, TA1535, TA98, TA1537) Escherichia coli (WP2uvrA/pKM101)	C60	Negative
Shinohara <i>et al</i> , 2009	Salmonella typhimurium (TA100, TA1535, TA98, TA1537) Escherichia coli (WP2uvrA/pKM101)	C60	Negative

In vitro genotoxicity study (comet assay) of fullerene C60,

References	Cells used in assay	Materials	Findings
Jacobsen <i>et al</i> , 2008	Human lung cancer cell line (A549 cells)	C60	Negative

- in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en. [accessed 2023-9-26]
- 5) OECD iLibrary [internet]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health effects. Test No.473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-473-in-vitro-mammalian-chromosomal-aberration-test_9789264264649-en. [accessed 2023-09-26]
 - 6) OECD iLibrary [internet]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health effects. Test No.471: Bacterial Reverse Mutation Test. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en. [accessed 2023-09-26].
 - 7) OECD iLibrary [internet]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health effects. Test No.489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en. [accessed 2023-09-26].
 - 8) Yanagisawa H, Seki Y, Yogosawa S, Takumi S, Shimizu H, Suka M. Potential role of mitochondrial damage and S9 mixture including metabolic enzymes in ZnO nanoparticles-induced oxidative stress and genotoxicity in Chinese hamster lung (CHL/IU)cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2018; 834: 25-34.
 - 9) 江馬眞, 小林憲弘, 納屋聖人, 中西準子. フラレン及びその誘導体の遺伝毒性評価. *環境毒性学会誌*. 2011; 14: 69-80.
 - 10) 産業技術総合研究所 [internet]. ナノ材料リスク評価書 フラレン (C60) 最終告知板: 2011. 9.20. <https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/953/>. [accessed 2023-9-26]