

V79細胞および正常ヒトアストロサイトに対する フラレンとカーボンナノチューブおよびその誘導体の細胞毒性

山越葉子*, 石川 烈, 石川 格,
山田貴史, ~~鄭一連~~, 土屋利江, 松岡厚子[#]

Cytotoxicity of fullerene [60], carbon nanotube, and their derivatives in V79 cells and cultured normal human astrocytes

Yoko Yamakoshi, Tsuyoshi Ishikawa, Itaru Ishikawa,
Takashi Yamada, ~~Yoon Suk Jung~~, Toshie Tsuchiya, and Atsuko Matsuoka[#]

Fullerenes are a family of carbon allotropes, molecules composed entirely of carbon. Fullerenes have been developed in various forms and functions and are expected to be used for novel medical materials targeting on brain. Information on cytotoxicity of fullerenes on brain function, however, is few; thus we examined the effect of fullerenes on the brain astrocytes in this study. We used fullerene[60], hydroxylated-fullerene[60], carboxylated-fullerene[60], dimalonilated-fullerene[60], carboxylated-carbon nanotube and amino-carbon nanotube. At first, we examined cytotoxicity of fullerenes by V79 colony assay. Fullerenes inhibited the cell growth in a concentration-dependent manner, but 50 percent growth inhibition concentrations were different among fullerene derivatives, which we used. Cytotoxicity of carbon nanotubes was stronger than that of fullerenes. Secondly, we performed the microtiter tetrazolium assay of normal human astrocytes and measured the effects of fullerenes on cell activity. Fullerenes and carbon nanotubes decreased mitochondrial activity. In addition to this, it was observed that fullerenes and nanotubes adhered to cells. These results suggest that fullerenes and carbon nanotubes have cytotoxicity and the effects are different from each other due to their side chain and steric forms. We expected that fullerenes and carbon nanotubes gave physical stress to cells and caused cytotoxicity. In conclusion, it was suggested that safety evaluation is needed for fullerenes and carbon nanotubes individually.

Keywords: fullerene, carbon nanotube, nanomaterial, cytotoxicity, human astrocyte

1. 緒言

フラレンは、炭素原子60個からなるサッカーボール状のナノ粒子のクラスターである。規則正しい面心立方構造をとっており、ドラッグデリバリーを目的とした生体機能プローブや医療基盤としての多糖呈示化合物の合成が注目されている。近年では、フラレンと同様に、六員環で構成されたような平面のグラファイトを丸めて円筒状にしたカーボンナノチューブの研究も進められており、このカーボンナノチューブにフラレンを内包した医療用フラレン化合物なども作成されている¹⁾。フラレンに関する多くの生理作用、薬理作用も報告されている。フラレンのラジカルスポンジ作用は、ラジカルをトラップし、無害化すること²⁾、また、DNAを切断する作用があり、フラレンの側鎖の構造に依存し、標的となるDNAの破壊や、制限酵素のような働きをする³⁾。

一方で、光刺激に反応し、活性酸素種を発生する⁴⁾。HIV 逆転写酵素の活性部位に結合し、この酵素を失活させるなどの報告もされている⁵⁾。このように、フラレンは生体に様々な影響を及ぼす可能性が示唆され、生体への多くの利用価値があると考えられるが、それと同時に適切かつ安全に利用する必要がある。そこでまず第一に、本研究ではフラレンやフラレン誘導体およびカーボンナノチューブの細胞毒性を検討した。

また、近年フラレンを脳神経再生や脳疾患治療に応用するための研究が盛んに行われはじめている。例えば、ヘキサスルホブチルフラレンは、虚血ストレスによる脳細胞死を抑制する効果が期待され、フラレノール-1 はβアミロイドタンパクのアミノ酸配列のうち、疎水性部分に結合し、ベータシート化することを抑えることで、βアミロイドの会合阻害をする⁶⁾。このように、フラレン誘導体を中枢神経の治療に導入することで、神経細胞死の抑制または神経疾患の回復に利用できるのではないかと考えられている。しかしながら、フラレンの中枢神経に対する毒性または安全性評価に関する報告は現在ほとんどなく、その安全性が疑問視される一面もある。

[#] To whom correspondence should be addressed: Atsuko Matsuoka; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9268 ext.232, Fax: 03-3707-6950; E-mail: matsuoka@nihs.go.jp

[#] Department of Radiology and Department of Chemistry, University of Pennsylvania

Sato^ら⁷⁾は、フラレンを100 mg/kg body weightでマウスに腹腔投与し、痛覚感受性試験、筋力試験、回避試験や情動試験を行ない、急性の影響について評価したが、対照群との差はみられなかったと報告している。また、フラレンを30 mg/kg body weightでマウスの腹腔に投与し、4週間後の長期的な暴露での影響についても観察したが、対照群との差は観察されなかった。脳への物質の取り込みは血液脳関門に制御されているが、フラレンが中枢神経に取り込まれるのか、また、取り込まれた場合その量はどの程度なのかは明らかになっていない。さらに、フラレンを脳神経用医療フラレン化合物として使用する場合、外科的手術や、化合物埋め込み後に生じた脳障害などからおこる血液脳関門の損傷により、化合物が脳組織へ直接接触し、脳神経活動に作用する可能性が考えられる。脳内環境は、非常に厳密に恒常性が保たれており、フラレンが作用する事で神経活動などに非常に重篤な影響をおよぼす可能性も考えられる。したがって、我々はフラレンの中枢神経への影響を詳細に評価する必要があると考えた。そこで本研究では、正常ヒトアストロサイト細胞を用い、フラレンおよびその化合物が脳細胞に及ぼす影響についても検討した。

2. 実験方法

2.1 フラレン化合物

フラレン、フラレン誘導体およびカーボンナノチューブは次の6種類を用いた。①fullerene C60 (C60; フロンティアカーボン株式会社: C60を懸濁するために、C60 5%に対し、2% tween 80を加えた。), ②hydroxylated-fullerene (C60(OH)₂₄; 株式会社昌新), ③carboxylated-fullerene (C60CHCOOH; 株式会社昌新), ④dimalonilated-fullerene (C60(C(COOH)₂)₂; 当研究所山越博士合成品), ⑤single wall amino-carbon nanotube (SW-CN-NH₂; Nanostructured & Amorphous Materials Inc.), ⑥single wall carboxylated-carbon nanotube (SWCN-COOH; Nanostructured & Amorphous Materials Inc.).

2.2 V79コロニーアッセイ

チャイニーズハムスター繊維芽細胞株(V79; Japanese Cancer Research Resources Bank)を用い細胞毒性試験を行った。実験は『Guidelines for Basic Biological Tests of Medical Materials and Devices-Part III: Cytotoxicity tests』に基づいて行った。培地は、5% fetal bovine serum (FBS) と1%ペニシリン・ストレプトマイシンを加えたEagle's MEM培地を用いた。V79細胞を24-wellプレートに50 cells/well播種した。24時間後に、6種類のフラレン化合物をそれぞれ、0.1, 1, 10, 100, 1000 µg/mlの濃度で各wellに添加した (n=4)。添加後、1週間培養し、10%ホル

マリンで固定、5%ギムザ液で染色後、コロニー数をカウントした。フラレン化合物を入れていない対照群のコロニー数を100%として処理群の相対コロニー形成率を算出し、添加したフラレン化合物の細胞毒性を評価した。50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀)はプロビット法で算定した。

2.3 正常ヒトアストロサイト(NHA)の細胞増殖に及ぼす影響

正常ヒトアストロサイト(NHA)は、三光純薬株式会社より購入した。NHAを5% FBSとepidermal growth factor, インシュリン, GA-1000, アスコルビン酸, L-グルタミン酸を加えたABM培地(ANGブレッドキッド; 三光純薬株式会社)で培養した。培養は、5%二酸化炭素濃度の37°C加湿状態のインキュベーターで行った。96-wellプレートに1000 cells/wellのNHAを播種し、ABM培地で24時間培養した。6種類のフラレン化合物をそれぞれ、0.1, 1, 10, 100 µg/mlの濃度で各wellに添加した (n=3)。細胞を4日間培養した後、細胞数を測定した。また、10µg/mlのフラレン化合物を添加し4日間の培養を行った細胞については、各wellをphosphate-buffered saline (-)で2回洗った後、フラレン化合物を含まないAGM培地を加え、デジタルマイクロスコープ(KEYENCE VH-8000C)にて細胞を撮影した。

2.4 アストロサイトMTTアッセイ

NHAを24-wellプレートに1x10⁴ cells/well播種した。播種24時間後に、6種類のフラレン化合物をそれぞれ、0.1, 1, 10, 100 µg/mlの濃度で各wellに添加した (n=4)。添加後、1週間インキュベーターで培養した後にMTTアッセイを行った。培地を5% TetraColor ONE溶液(生化学工業株式会社)を含む新しいABM培地に置換し、インキュベーターで2時間培養した。プレートリーダーを用い、上澄液の吸光度(450nm/630nm)を測定した。

2.5 統計解析

統計解析は、Tukey-Kramer testを用いた。それぞれの実験の測定結果は平均で示し、one-way ANOVAを行った。すべての場合において、P < 0.05を統計的な有意差があるとした。

3. 結果および考察

V79コロニーアッセイの結果、細胞毒性は、SWCN-COOH (IC₅₀ = 0.26 µg/ml) とSWCN-NH₂ (IC₅₀ = 0.98 µg/ml)の2種類のカーボンナノチューブで高く、次いで、水溶性を増したフラレン誘導体であるhydroxylated-fullerene (IC₅₀ = 1.74 µg/ml), carboxylated-fullerene (IC₅₀

= 3.36 $\mu\text{g/ml}$), dimalonilated-fullerene (IC_{50} = 11.7 $\mu\text{g/ml}$)の順に毒性が高く, fullereneC60 (IC_{50} = 1620 $\mu\text{g/ml}$)は上述のフラーレン誘導体やカーボンナノチューブに比べると非常に低い毒性を示した (Fig. 1). また近年の報告で

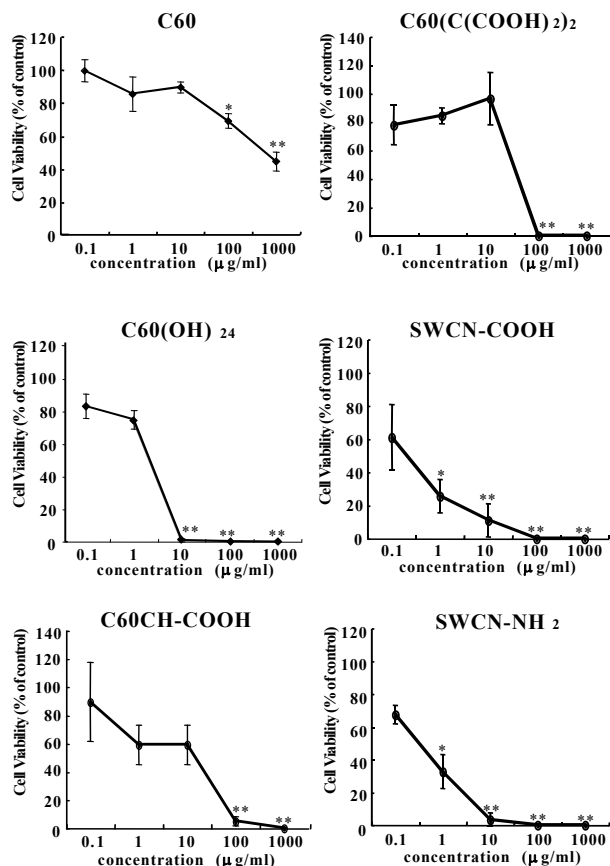


Fig. 1 The V79 colony assay of fullerene, its derivatives and carbon nanotubes

V79 cells were treated with fullerene, its derivatives and carbon nanotubes, and cultured for seven days. Data are expressed as mean \pm SD (n=4). Experimental data showed significant difference from control group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

は, 溶解性の違いによりフラーレンのもつ細胞毒性に違いがみられることが示唆されている⁸⁾. これらのことから, フラーレンの細胞に対する毒性は水溶性が増すほど高くなる事が推察された. その一方で, フラーレンとカーボンナノチューブを比較すると, カーボンナノチューブの方が細胞に対する毒性が高いという結果になった. そして, carboxylated-fullereneとSWCN-COOHの2つのカルボン酸体を比較しても, カーボンナノチューブの方が, 細胞毒性が高かったことから, 物質の溶解性の違いに加え, 炭素結合の形状によっても細胞に与える影響に違いがおこることが示唆された. この結果は, ナノマテリアルの

細胞毒性はそのマテリアルの大きさに依存しているという報告とも一致している⁹⁾. 以上の事から, フラーレンの細胞毒性は, 物質の形状および細胞への接触具合, つまり物理的ストレスがひとつの要因ではないかと考えられた.

次に, フラーレン化合物が脳細胞に及ぼす影響について検討した. 脳内環境は血液脳関門などにより恒常性が厳密に維持されている事から, 他の体細胞と比べ, フラーレンの細胞に対する影響が異なる可能性が考えられた. そこで我々は, 正常ヒトアストロサイトを用い, フラーレンの脳細胞に及ぼす影響について検討した. アストロサイトはグリア細胞の一種で, 神経細胞への栄養の供給や, 神経ネットワークを構築するための足場の構築, また血液脳関門の形成と, 様々な面において脳神経活動を支えている非常に重要な細胞である. 我々は最初に, フラーレン化合物がアストロサイトの細胞増殖におよぼす影響について測定した. その結果, V79コロニーアッセイと同様に, カーボンナノチューブ, 水溶性フラーレン誘導体, フラーレンの順にアストロサイトの細胞増殖を抑制した (Fig. 2). この結果から, 使用した炭素化合

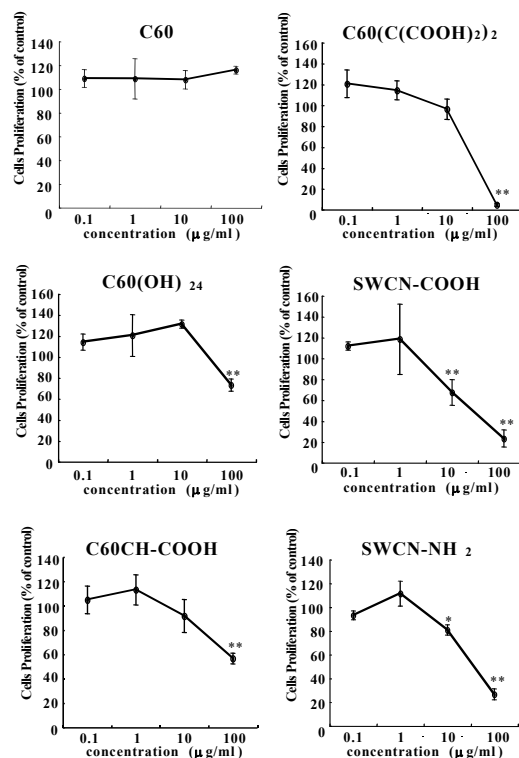


Fig. 2 Effects of fullerene, its derivatives and carbon nanotubes on cell proliferation of normal human astrocytes

Normal human astrocytes were treated with fullerene, its derivatives and carbon nanotubes, and cultured for four days. Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Experimental data showed significant difference between treated groups and control groups except for C60 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

物フラーレン化合物は、脳細胞、特にアストロサイトに対して特異的な毒性は示さず、どのような細胞に対しても、ある一定の濃度以上で細胞毒性を示す事が示唆された。この結果からも、フラーレンが細胞に対し物理的ストレスを与え、細胞毒性を示す事が示唆された。そこで次に、MTTアッセイを用い、アストロサイトのミトコンドリア活性を測定したところ、V79コロニーアッセイやアストロサイトの増殖におよぼす影響と同様の傾向を示し、カーボンナノチューブ、水溶性フラーレン誘導体、フラーレンの順にアストロサイトのミトコンドリア活性を低下させた (Fig. 3)。MTTアッセイの結果も、アスト

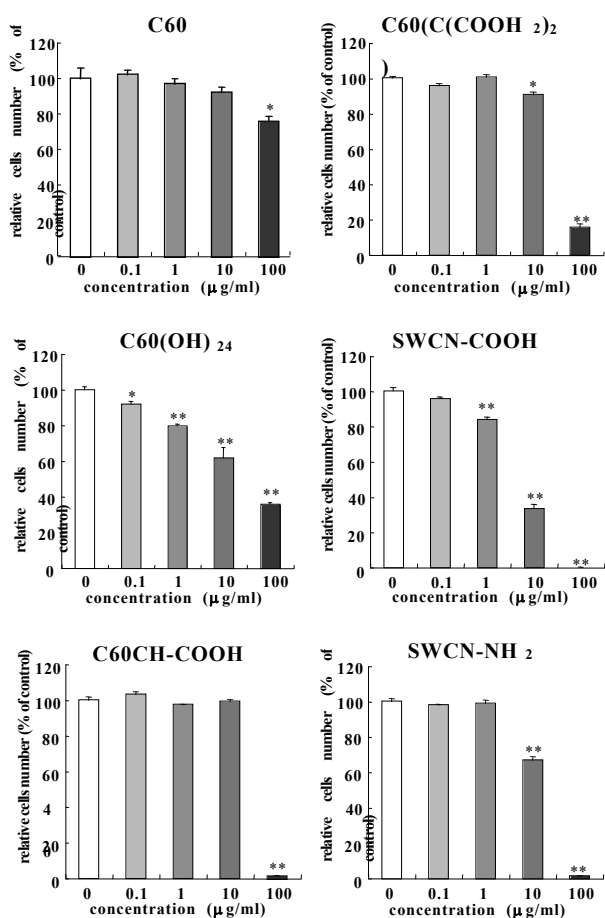


Fig. 3 The MTT assay of normal human astrocytes

Normal human astrocytes were treated with fullerene, its derivatives and carbon nanotubes, and cultured for 7 days. Data are expressed as mean \pm SD (n=4). Experimental data of treated groups showed significant difference from those of control groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

ロサイトの細胞増殖抑制の結果と一致したことから、フラーレンは細胞の活性に特異的な作用を及ぼすのではなく、細胞に物理的なストレスを与えている可能性が考え

られた。そこで、フラーレン添加時の細胞の様子を観察したところ、フラーレンの粒子が細胞に付着している事がわかった (Fig. 4)。フラーレンまたはカーボンナノ

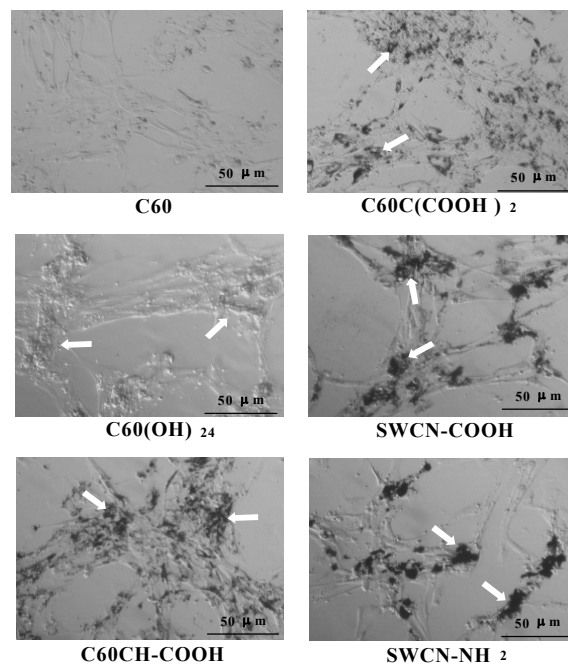


Fig. 4 Adhesion of fullerene, its derivatives and carbon nanotubes to normal human astrocytes

The cells were treated with each material at 10 $\mu\text{g/ml}$ for four days, rinsed with phosphate-buffered saline, and then observed through a digital microscope in AGM medium. The arrow shows cells to which fullerene, its derivatives or carbon nanotubes have adhered.

チューブの細胞への付着は、先の実験でみられた毒性の強さと一致し、毒性の強さに比例して多くなる傾向が観察された。また、化合物が細胞表面に付着しているのか、もしくは細胞膜を貫通し、細胞内に入っているのかを明らかにすることが、これら化合物の細胞におよぼす作用の機序を解明するために必要である。現在、共焦点顕微鏡を用いた細胞の立体画像の解析により、化合物の細胞への付着状態について分析中である。この結果は後続の報告で発表する予定である。

以上の結果から、フラーレンおよびカーボンナノチューブの細胞毒性は、細胞への付着力に依存し、細胞に物理的ストレスを与えるためにおこる事が示唆された。また、細胞への付着は、物質の粒子の大きさおよび培地への溶解度に依存する事が示唆された。神経細胞は、細胞体自身の持つ膜電位を変化させる事で神経活動を行っているため、フラーレンに代表されるナノマテリアルが細胞に付着する事で膜電位の変化に影響を与える事が予想される。したがって、今回細胞毒性がみられなかつ

た濃度においても、フラーレンなどの炭素化合物フラーレン化合物が神経伝達など脳機能に影響をおよぼすことが推察される。最後に、フラーレン、フラーレン誘導体およびカーボンナノチューブなどのナノマテリアルを脳神経用医療フラーレン化合物として利用する場合、細胞毒性だけでなく、細胞の膜電位の変化に及ぼす影響について観察する必要がある事、加えて、実験動物などを用いた、行動試験、記憶学習試験、情動行動試験など、脳の高次機能に及ぼす影響について精査する必要があると考えられた。

文献

- 1) Polizu, S., Savadogo, O., Poulin, P., and Yahia, L.: *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **6**, 1883-1904 (2006)
- 2) He, Y., Hsu, C., Ezrin, A., and Miller, M.: *Am. J. Physiol.*, **265**, 252-256 (1993)
- 3) Tokuyama, H., Yamago, S., and Nakamura, E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7918-7919 (1993)
- 4) Yamakoshi, Y., Umezawa, N., Ryu, A., Miyata, N., Goto, Y., Masumizu, T., and Nagano, T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12803-12809 (2003)
- 5) Sijbesma, R., Srdanov, G., Wudl, F., Gastoro, J.A., Wilkins, C., and Friedman, S.H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6510-6512 (1993)
- 6) Huang, S., Tsai, S., Chih, C., Chiang, L., Hsieh, H., Teng, C., and Tsai, M.: *Free Radical Biol. Med.*, **30**, 643-649 (2001)
- 7) Satoh, M. and Takayanagi, I.: *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 513-518 (2006)
- 8) Sayes, C., Fortner, J., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A., Ausman, K., Tao, Y., Sitharaman, B., Wilson, L., Hughes, J., West, L., and Colvin, V.: *Nano Lett.*, **4**, 1884-1887 (2004)
- 9) Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., Pasquier, N., Seo, J., Celio, M., Catsicas, S., Schwaller, B., and Forro, L.: *Nano Lett.*, **6**, 1121-1125 (2006)