

平成27年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

研究課題名:カーボンおよび金属ナノ材料による肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名:多層カーボンナノチューブ肺内投与によって生じるDNA付加体の網羅的解析

分担研究者 三好 規之 静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
食品栄養環境科学研究院 助教

研究協力者 伴野 勸 静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
食品栄養環境科学研究院 客員共同研究員

研究要旨

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)曝露によって生じるがん原性物質の探索を目的として、MWCNT肺内投与されたラット肺組織中のDNA付加体の網羅的解析をLC/ESI-MS/MSを用いて行った。その結果、対照群と比較して直径の異なる2種のMWCNTを曝露した群で、既知、未知を含めてDNA付加体の生成量が増加することがわかった。そのうち、malondialdehydeや4-hydroxy-2-nonenal、4-hydroxy-2-hexenalなど脂質過酸化由来の活性カルボニル化合物(RCs)のDNA付加体が有意に増加していることを確認した。これらのRCsは強い細胞傷害性を有することから、MWCNT曝露による発がん要因の一つである可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでの検討で、MWCNTs曝露ラット肺組織中においてアルデヒドやケトン基を有する活性カルボニル化合物(Reactive carbonyl species; RCs)が生成し、様々な分子種のRCsが増加することがわかってきた。酸化ストレス下で増加するRCsは核酸付加体を形成するがん原性物質であることが示唆されている。そこで本研究では、MWCNTs曝露による発がん機構の解明を目的として、MWCNTs肺内投与ラット肺組織中DNA付加体の網羅的解析を行った。

B. 研究方法

8-9週齢の雄性F344ラットに0.5mLの0.5%PF68salineまたは、250mg/mLになるように0.5%PF68溶液に懸濁した形状の異なる2種の

MWCNT(MWCNT-L; 8 μ m, d=150nm, MWCNT-S; 3 μ m, d=15nm)を2日に1回、14日間(計8回)経気管肺内噴霧投与した。14日後、解剖し、肺組織を採取した。採取した肺組織のうち20mgを取り、DNAを抽出した。次に抽出したDNAを酵素的にヌクレオシドに加水分解した。得られたDNA加水分解物をLC/ESI-MS/MS解析試料とした。それをDNA付加体の分子イオンピーク[M+H]⁺からデオキシリボースの脱離によって生じる[M+H-116]⁺という特徴的なフラグメントを利用したLC/ESI-MS/MS(SRM)により網羅的解析を行った。

調製した試料はLC/ESI-MS/MS〔HPLC: Agilent 1200 (Agilent Technologies), MS: G6410B Triple Quadrupole (Agilent Technologies)〕により測定した。被験試料の注入

量は 10 μ L とした。カラムは TSK-GEL Super-ODS 2.3 μ m (東ソー(株)、100 \times 内径 2.0 mm)、流速は 200 μ L/min、分離・流出は A 液: H₂O (0.1% FA) B 液: ACN (0.1% FA) によるグラジエント方式でおこなった。グラジエント条件は 0 分で A 液 99%、B 液 1%、15 分で A 液 20%、B 液 80%、30 分で A 液 20%、B 液 80%、30.01 分で A 液 99%、B 液 1%で、40 分で A 液 99%、B 液 1%とした。測定モードは SRM モードで m/z [M+H]⁺ (228~727)/ [M-116+H]⁺をモニターした。(倫理面への配慮)

動物実験は、研究者の所属機関における規定に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出して実施承認を得た後、実施機関における実験動物等の実施に関する基本指針に従い、動物へ苦痛を与えないよう留意するとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

DNA 付加体の網羅的解析を行った結果、対照群で 611、MWCNT-L、MWCNT-S 投与ラットでそれぞれ 693、676 ピークが検出され、そのうち MWCNT-L、MWCNT-S 投与ラットで 27、26 ピークが有意に増加していた。そのうち、脂質過酸化由来のアルデヒド化合物である 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) のデオキシグアノシン (dG) 付加体である HNE-dG や malondialdehyde の dG 付加体である M₁-dG が対照群と比較して MWCNT-L、MWCNT-S 曝露ラット共に有意に増加していた。また、MWCNT-S において 2-hexenal と dG の付加体である 2-HE-dG や 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) と dG の付加体である HHE-dG の有意な増加が確認された。また、acetaldehyde、acrolein、crotonaldehyde や長鎖脂肪酸アルデヒド類などの様々な脂質過酸化由来のアルデヒド化合物と dG との付加体の存在を確認した。この付加体は対照群と比較して、MWCNT 投与ラットにおいて有意差は見られなかったが増加傾向を示した。これらの結果より、脂質過酸化物の付加反応によ

って生じる DNA 付加体の増加が発がんに関与する可能性が示唆された。

さら m/z 336.1、343.1、344.1、355.1 などのピークが MWCNTs 曝露によって顕著に増加していた。これらの有意に増加したピークはいずれも化学構造や付加化合物の詳細が決定されていない未知の DNA 付加体であった。

D. 考察

MWCNTs 肺内投与ラットの肺組織ではこれまでにマクロファージの浸潤による炎症惹起や活性酸素種産生による酸化ストレスの亢進により脂質過酸化由来の RCs が増加することが知られている。本研究結果においても脂質過酸化由来 RCs の DNA 付加体が有意に増加したことから、MWCNTs 曝露による DNA 付加体の増加は RCs の生成・増加による DNA の修飾増加が一因であると推察された。

E. 結論

MWCNTs 曝露群で対照群と比較して DNA 付加体が有意に増加していた。このことから、MWCNTs の曝露は 14 日間という比較的短期間においても RCs を含むがん原性物質の生成・増加により、DNA を損傷し、発がん機構に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H, Comprehensive analysis of the lipophilic reactive carbonyls present in biological specimens by LC/ESI-MS/MS. (2015) *J. Chromatogr. B.*, 149-156.

2. 学会発表

- 伴野勸、三好規之、徐結苟、津田洋幸、大島

寛史。多層カーボンナノチューブ肺内投与によって生じる活性カルボニル化合物の網羅的解析。2014年9月4日～5日 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし