

平成30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:カーボンナノチューブ等の肺、胸腔及び全身臓器における有害性並びに発癌リスクの
新規高効率評価手法の開発

分担研究課題名:MWCNTs 肺内投与によって生成される活性カルボニル化合物および DNA
付加体の網羅的解析

分担研究者 伴野 勸 愛知医科大学・医学部感染・免疫学講座・助教

研究要旨

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)曝露による発がんメカニズムの解明を目的として、MWCNT 肺内投与されたラット肺組織中の活性カルボニル化合物(RCs)およびDNA付加体の網羅的解析を高解像質量分析計UHPLC/Triple TOF/MSを用いて行った。その結果、対照群と比較して形状の異なる3種のMWCNTを曝露した群で、既知、未知を含めてRCs、DNA付加体の数、濃度が増加することがわかった。そのうち、glyoxalや4-hydroxy-2-nonenalなど脂質過酸化由来の活性カルボニル化合物(RCs)、およびその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

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の発がん機構については、慢性炎症に伴う酸化ストレスや炎症関連遺伝子群の発現変動の関与が示唆されているが詳細な機序は明らかとなっていない。本研究では、MWCNTsの発がん機序の解明を目的として、MWCNTsを肺内噴霧投与されたラット肺組織において、酸化ストレスによって生成・増加する活性カルボニル化合物(Reactive Carbonyl species:RCs)やそのDNA付加体の網羅的解析を行った。

B. 研究方法

10週齢の雄性F344ラットに0.5mLの0.5%PF68 saline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3種のMWCNT(MWCNT-L、MWCNT-S、MWCNT-7)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、RCsを含む脂溶性画分およびDNAを抽出した。脂溶性画分はRCsと特異的に反応するdansyl hydrazine(DH)で誘導体化した。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RCs-DH誘導体、DNA加水分解物をLC/MS解析試料とした。RCs-DH誘導体は、DH誘導体に特徴的なフラグメントイオン m/z 236.1、DNA付加体においては、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UHPLC/Triple TOF/MSにより網羅的解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は名古屋市立大学動物実験委員会の承認を受け、規定に則り、適切に行われた。

C. 研究結果

形状の異なる3種類のMWCNTs (MWCNT-L、-S、-7)を2週間肺内噴霧投与したラットおよびその対照群の肺組織中RCs、そのDNA付加体の網羅的解析を行った。

その結果、肺組織中のRCsは対照群 158 peaks、MWCNT-L 168 peaks、MWCNT-S 186 peaks、MWCNT-7 160 peaks 検出された。また、MWCNT投与群と対照群を比較するとMWCNT-Lでは168 peaks中75 peaks、MWCNT-Sでは186 peaks中129 peaks、MWCNT-7では160 peaks中69 peaks高値を示していた。対照群と比較して高値を示したRCsには、強い細胞傷害性が報告されている formaldehyde や glyoxal、4-hydroxy-nonenal (4-HNE)、4-hydroxy-hexenal (4-HHE) が含まれていた。これら高値を示したRCsに着目して肺組織中のDNA付加体量を測定すると、4-HNE-dGや4-HNE-dC付加体が対照群ではほとんどの個体で検出限界に近いピーク強度であったが、MWCNTs曝露群では高値を示し、特にMWCNT-L、MWCNT-7で対照群と比較して約100倍のピーク強度を示した。その他にもMWCNTs曝露群において対照群ではみられない未知のDNA付加体が検出された。

D. 考察

MWCNTs肺内投与ラットの肺組織において、MWCNTsを貪食して活性化した肺胞マクロファージが活性酸素を過剰に産生することで脂質過酸化分解物であるRCs量が増加したと考えられた。また、RCsは化学構造にアルデヒド基やケトン基などDNAのアミノ基に容易に付加反応することが知られている。その特徴からDNA付加体量が増加したと考えられた。

E. 結論

MWCNTs曝露によって生成・増加した4-HNEはこれまでにp53遺伝子のcodon 249のdG残基に優先的に付加することで突然変異を誘導することが知られている。MWCNTs曝露による発がん機構として、4-HNEに代表される種々のRCsによるDNA傷害や炎症性サイトカイン産生亢進によって発がんを誘導

する可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

MWCNTsを曝露することで、肺組織での酸化ストレスが増悪し、DNA傷害、炎症を惹起することが考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当項目なし
2. 学会発表
該当項目なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当項目なし
2. 実用新案登録
該当項目なし
3. その他
該当項目なし