

アルデヒドによるハイブリッド型付加体の形成

研究分担者 中村 純 大阪府立大学

研究要旨

加熱式および電子たばこのエアロゾルにはプロピレングリコール（PG）およびグリセロール（VG）の加熱によって生ずるカルボニル化合物が含まれる。これまでの研究からそのエアロゾルに含まれるカルボニル化合物の中に既知ヒト発癌物質であるホルムアルデヒド（FA）およびヒトの発癌物質の可能性のあるアセトアルデヒド（AA）が相当量含まれていることが明らかになっている。そのため、FAおよびAAの健康におよぼす影響についての懸念が広がっている。また、エアロゾル中にはカルボニル化合物の香料がさらに加わる。エアロゾル中のカルボニル化合物やラジカルは呼吸器組織の酸化ストレスを高め、マロンジアルデヒド（MDA）などの脂質過酸化に由来する内因性カルボニルを産生する。すなわち、加熱式および電子たばこのエアロゾルを吸引した場合、ヒトの呼吸器中にはこれらエアロゾル由来のカルボニル化合物とそれによって生体内で産生される内因性カルボニル化合物が混在していることになる。カルボニル化合物はお互いに結合して新たな化合物ができることが知られているが、その健康への影響はほとんど知られていない。FAあるいはAAはMDAと結合して新たなハイブリッド型リジン付加体を作ることのわれわれはこれまでに報告してきた。これらの付加体は炎症性反応を引き起こす可能性が非常に高い。2019年度の研究では、加熱式および電子たばこのエアロゾルに含まれるFA/AA以外のカルボニル化合物がMDAと反応してリジン側鎖のアミノ基にハイブリッド型付加体を作るか否かを検討した。さらに、DNA塩基の環外アミノ基にFAあるいはAAがMDAの存在下で同様のハイブリッド型付加体を作る可能性についての研究を実施した。また、FAにより生ずるDNA-蛋白クロスリンク体の質量解析結果とFAの発癌との関連性について最近総説を発表したのでその成果についても報告する。

A. 目的

電子タバコと加熱タバコ製品は、燃焼の必要性がないため、従来のタバコの煙よりも毒性物質の生成が少ないと考えられている。しかし、最近、本研究班の研究によって第3世代の加熱タバコ製品のエアロゾルから種々のカルボニル化合物が検出されることが明らかになった[1]。これらのカルボニル化合物はプロピレングリコール

（PG）およびグリセロール（VG）が加熱分解、脱水および酸化反応によって産生される。カルボニル化合物は、DNAおよびタンパク質に直接反応し付加体を形成したり、間接的にグルタチオンの枯渇を介し酸化ストレスを引き起こしたりすることで毒性を示す。また、電子タバコと加熱タバコ製品のエアロゾルに含まれるフリーラジカルが直接酸化ストレスを引き起こすことも考えら

れる。これらの機序で誘導される酸化ストレスはさらに、マロンジアルデヒド (MDA) を含む内因性の反応性アルデヒドの形成をもたらす。すなわち、電子タバコと加熱タバコ製品から発生するエアロゾルを吸い込んだ肺にはこのような種々のカルボニル化合物が混在している条件で炎症などの健康障害が発生すると考えられる。

われわれはこれまでに、MDA とホルムアルデヒド (FA) が複雑に反応することによってリジンの側鎖にあるアミノ基に抗原性の高い炎症性 1,4-ジヒドロピリジン (DHP) タイプの付加体の M2FA が作られることを発見した (図 1) [2]。このハイブリッド型付加物は、MDA の 2 つの分子、FA とリジンの 1 つの分子で構成される。電子タバコと加熱タバコ製品からのエアロゾルには、FA 以外にもアセトアルデヒド (AA) などの様々なアルデヒドが含まれており、肺の組織内で MDA と反応しリジン付加体や DNA 付加体の形成につながる可能性がある (図 1)。そこで、電子タバコと加熱タバコ製品のエアロゾル中に存在するアルデヒドが MDA の存在下で複雑なリジン付加物を生成するかどうかを検討した。今回の研究では、FA、AA に加え、メチルグリオキサール (MGO) およびグリオキサール (GO)、さらに香料由来の 2,3-ブタンジオン (ジアセチル) およびシナムアルデヒドを使用した。MGO および GO は PG および VG のエアロゾル化に伴って産生される α -ジカルボニル化合物である [1]。また、ジアセチルは E-液体に含まれる α -ジカルボニル化合物の香料である。これら α -ジカルボニル化合物は吸入暴露によって有毒な影響を呼吸器にもたらす可能性がある。中でもジアセチルについては最も研究されている。約 20 年前にバター風味の蒸気にさらされた電子レンジ用ポップコーン工場の労働者に重症の閉塞性細気管支炎が発症した [3]。最近の研究では、ジアセチルのエアロゾルの吸入がラットに閉塞性細気管支炎様病変を引き起こすことも実証されている [4]。これらの結果から、揮発性の α -ジカルボニル化合物、特にジアセチルがポップコーン肺疾

患の原因物質であることが特定された。最近の研究では、類似の α -ジカルボニル化合物である 2,3-ペンタンジオンが吸入暴露によりラットとマウスに重大な呼吸器毒性を引き起こすことが示された [5,6]。さらに、ラットにジアセチルを暴露することにより生じる気道上皮壊死は、MGO でも認められ、炭素鎖が短い MGO の方がジアセチルより肺毒性が強いことが明らかになった (肺毒性: MGO > ジアセチル > 2,3-ペンタンジオン) [4]。MGO およびジアセチルが炎症性のある DHP 型リジン付加体をつくるか否かを明らかにすることは α -ジカルボニル化合物に起因する肺毒性を理解するために重要と考えられる。

DHP 型付加体はリジン側鎖のアミノ基のみならず DNA の環外アミノ基にも産生される可能性がある。DHP 型の付加体の構成要素である MDA は単独でグアニン塩基と反応して Exocyclic な付加体 (M1G) を作ることをわれわれを含むいくつかの研究グループが報告している [7-10]。M1G は脂質過酸化によって生じる主要な DNA 付加体であり、変異原性を示す [11]。FA および AA もまた DNA 塩基の環外アミノ基と反応し、不安定な DNA 付加体や DNA-蛋白クロソリンクを作ること報告してきた [12-14] (図 2)。後述するが、われわれは最近、外因性 FA によるメチレン架橋により生ずる DNA-蛋白付加体 (dG-CH₂-シスチン) とその発癌性についての総説を発表した [14]。その総説の中で MDA と FA が相互に反応し、塩基の環外アミノ基に DHP 型付加体をつくる可能性があることを記述した (図 3)。実際、Kronberg らの研究グループが塩基と MDA、AA/FA を酸性下で反応させ、DHP 型の塩基付加体ができることをこれまでに報告している [15-17]。本研究では、Kronberg らの研究結果が再現できるかをまず確認することを目的とし、グアニンあるいはアデニンを MDA の存在下で FA あるいは AA と反応させた後に HPLC-DAD で精製し、LC-MS で質量解析を行った。

B. 方法

FA/AA 以外のカルボニル化合物による DHP-リジン付加体の形成

FA、AA、MGO および GO、さらに香料由来のジアセチルおよびシナムアルデヒドをカルボニル化合物として反応に使用した。各カルボニル化合物を、37 で PBS 中の MDA とリジンアナログである 6-ACA とを反応させた (図 1)。反応後、HPLC-DAD 法を用い、いくつかのピークを分離し、さらに UV 吸収スペクトルと蛍光特性の両方をもとに DHP 型付加体と思われるピークを精製した。最終的にノースキャロライナ大学の質量解析研究室にて LC-MS 法を用い質量を定量した。

FA/AA に由来する DHP-DNA 塩基付加体の形成

FA および AA を 37、弱酸性リン酸緩衝液 (pH 5.8) 中で MDA の存在下で、グアニンあるいはアデニンと反応させた。反応液から HPLC-DAD 法を用いいくつかのピークを分離し、UV 吸収スペクトルと蛍光特性の両方から DHP 型付加体および他のハイブリッド型付加体と思われるピークを精製した。さらに上述のようにノースキャロライナ大学の質量解析研究室にて質量を定量した。

C. 結果および D. 考察

FA/AA 以外のカルボニル化合物による DHP 型リジン付加体の形成

FA および AA に加え、MGO、GO、ジアセチルおよびシナムアルデヒドを MDA の存在下でリジンアナログの 6-ACA と反応させた (図 4 A)。その結果、M2FA および M2AA 以外に、MGO との反応液中に DHP 型リジン付加体に特有の蛍光吸収スペクトルを検出し (図 4 B)、質量解析において M2MGO (図 4 C) に相当する質量が検出できた。このことから、MGO、MDA およびリジンの反応で DHP 型のリジン付加体を作られることが明らかとなった。その他のカルボニル化合物では検出可能に十分量な

DHP 型付加体は検出されなかった。-ジカルボニル化合物のジアセチルは吸入暴露によって有毒な影響を呼吸器にもたらす[3]。さらに、ラットに MGO を吸入暴露した場合、ジアセチルより低い濃度で肺毒性が認められている[4]。今回明らかとなった MGO 由来の DHP 型リジン付加体 (M2MGO) と FA/AA 由来の M2FA および M2AA が電子タバコや加熱式タバコの呼吸器毒性の発現に關与しているかさらに研究する必要がある。

タバコ煙の暴露による肺の炎症に DHP 型リジン付加体が關与しているという報告がこれまでにいくつかある[18-20]。野生型マウスにタバコ煙とエタノールを暴露することによって DHP 型リジン付加体が肺の蛋白中に検出されている (抗体を用いたプロット法) [18]。これまでの報告から、肺サーファクタント D (SPD) のような肺の蛋白に DHP 型付加体が付加している可能性が高いと考えられている。付加体が付いてない SPD は自然免疫の一環として生体防御作用がある。一方、DHP 型付加体が付加した SPD (SPD-DHP) が肺に暴露されることでケモカイン CXCL1 および CXCL2 の分泌を特徴とする炎症反応を誘発する[19]。さらに、SPD-DHP の鼻腔内注入により気管支肺胞洗浄液の好中球の増加が認められ、肺の白血球浸潤が觀察されている。それに対し、付加体が付いてない SPD ではそのような影響は認められていない。これらの反応は scavenger receptor A (SR-A1/CD204) 欠損マウスでは認められないことから、pattern recognition receptors (PRRs) が DHP 型付加体を認識し、炎症反応を引き起こしている可能性がある[20]。今後、電子タバコあるいは加熱タバコ製品の使用者から気管支肺胞洗浄液などのサンプルが得られれば、そのサンプル中の SPD に DHP 型付加体 (M2FA/M2AA/M2MGO など) が存在することを質量解析で確認することが可能となるであろう。さらにその結果から、エアロゾル中のどのカルボニル化合物が肺組織で大きな影響を及ぼしているかを理解することができると思われる。

DHP 型 DNA 付加体の検出

グアニンおよびアデニンを MDA の存在下で FA あるいは AA と反応させた。その後、HPLC-DAD 法でいくつかの物質を精製し、LC-MS で質量解析を行った。我々の実験も Kronberg らと同様に DHP 型付加体が産生されやすい弱酸性環境で反応を行った。その結果、M2FA-アデニン (図 5) および M2AA-グアニン付加体 (図 6) が産生されることが明らかになった。しかし、今回の質量解析において検出された M2AA-グアニン付加体は DHP 型付加体 M2AA-グアニン II なのか Exocyclic 型付加体 M2AA-グアニン I (図 6) なのかを区別することはできなかった。また、DHP 型付加体以外にもハイブリッド型の付加体として M1FA-グアニン (図 7) および M1AA-グアニン付加体 (図 8) が検出された。これら DHP 型塩基付加体および Exocyclic な塩基付加体は生理的条件下でかなり安定と考えられる。今後中性環境下でこれらの塩基付加体が産生されるかを検討するとともに、細胞内でこの DHP 型の安定な塩基付加体が生じることが明らかになれば、電子タバコおよび加熱式タバコの喫煙による新たなバイオマーカーとして使える可能性があり、生物学的重要性を含めて今後も研究される必要がある。

FA に由来する DNA-蛋白クロスリンク体と発癌について

最近われわれが発表した FA に関する総説について報告する[14]。FA の吸入暴露は国際がん研究機関 (IARC) によってヒトおよび動物の既知発がん性物質として分類されている[21-23]。電子タバコや加熱式タバコのエアロゾルにも含まれる FA がヒト体内に吸入された場合、最初に接触する上部気道の粘膜上皮細胞が FA の主たるターゲットとなると考えられる。興味あることに、FA は外因性に暴露されるだけでなく、内因性にも作られるためヒトの体内には FA が恒常的に存在する。炎症などの病的条件下では FA の

産生がさらに増加する[2,24]。外因性 FA の吸入暴露による発癌機序については DNA-蛋白クロスリンク体 (DPC) に加え、FA の細胞毒性、炎症および再生性細胞増殖が相まって発癌に結び付くことが考えられている[25]。ラットを用いた研究では、外因性の FA 吸入暴露が上咽頭扁平上皮癌 (SCC) の発生率を 6 ppm 以上 で増加させることが示されている (図 9A) [21,26]。外因性の FA に暴露された場合、内因性と外因性の FA が体内に共存することになる。そのため、内因性および外因性 FA 誘発 DPC を区別して定量化する高感度な LC-MS / MS 法が最近開発された[27-29]。これまでの DPC の定量法は質量解析を使わないことで簡便ではあるが FA 由来の DPC か否かが不明で、しかもその正確な数を定量できなかった。新たに確立された質量解析法によって、外因性 FA への暴露によって外因性 FA 由来の DPC の増加を引き起こし、動物組織に長期間蓄積するという重要な結果が明らかになってきている。具体的には、ラットおよびサルに安定同位体で標識された外因性 FA ($[^{13}\text{CD}_2]$ -FA) を吸入暴露後、鼻組織および他の臓器/組織内の内因性 (非標識) DPC (dG-CH₂-シスチン) および外因性 DPC (dG- $^{13}\text{CD}_2$ -シスチン) が LC-MS / MS を用いて測定された [27-29]。15 ppm の $[^{13}\text{CD}_2]$ -FA に連続 4 日間 (6 時間/日) 暴露されたラットの鼻上皮には、外因性 DPC が蓄積し、4 日目に 1.8 クロスリンク / 10^7 dG に達した。一方、内因性 DPC 形成は蓄積傾向は示さなかった (0.37 クロスリンク / 10^7 dG) (図 5B)。同様に、2 ppm の外因性 FA を 4 週間 (6 時間/日) 曝露した場合、外因性 DPC の蓄積を誘発したが、その外因性 DPC 量は 4 週間の暴露後も内因性 DPC 量を超えることはなかった (図 5C)。外因性 DPC レベルは、4 週間の曝露後の回復期間中に最大 1 週間持続した (図 5C)。一方、6 ppm の外因性 FA に 2 日間連続して曝露されたサルも、ラットのデータと非常に類似した結果を示した (図 5E)。曝露期間中の外因性 FA 由来 DPC の蓄積および回復期間中の DPC の持続性は、外因性の FA により誘発

される DPC の修復効率が低いことを強く示唆している。FA が引き起こす DPC はメチレン橋を介したクロスリンクだけではなく、付加体自体にカルボニル基を持つ M2FA-アデニン、M1FA-グアニン（図 5 および 7）を介した DPC も作られる可能性がある。メチレン橋を介した DPC に比べ、これらハイブリッド型付加体を作る DPC は構造的により安定であることが容易に想像されることから蓄積性も高いと考えられる。これらのことから、電子タバコや加熱式タバコのエアロゾルにも含まれる FA のリスクを考える上で FA に由来する様々な DNA 障害の質量解析を用いたバイオモニターリングが重要と考える。

加熱式および電子たばこのエアロゾルの欧米での毒性研究の最近の知見

今年 3 月上旬に米国、アナハイムで開催される予定であった米国毒性学会の要旨集から、加熱式および電子たばこのエアロゾルの欧米での毒性研究の最近の知見を得たのでその一部を報告する。

内因性リポイド肺炎：米国 CDC および FDA は最近、電子タバコ製品の使用後に肺損傷の症例が増加していることを報告している。マウスでの研究によると、ニコチンとは関係なく、電子タバコの蒸気への慢性暴露が肺上皮細胞の生理機能に影響を及ぼし、脂質代謝の恒常性の変化をもたらすことが示されている。初期の臨床報告では、エアロゾルを吸入することで肺への脂質蓄積が認められた。この脂質蓄積は当初外因性リポイド肺炎によるものと提案された。しかし最近では、肺損傷は吸入毒性物質に起因する内因性リポイド肺炎の可能性が高いことが提唱されている。しかし、現在までのところ、原因物質は特定されていない。電子液に含まれる様々な物質が加熱過程で熱分解、酸化および脱水反応することにより予期せぬ化合物（例：Ketene など）が産生されてしまうことで内因性リポイド肺炎が発

症するのではないかと警戒している（Ab#3589）。

電子タバコの妊婦への影響：多くの妊婦は電子タバコのエアロゾルを吸引することがあたかも安全であると思い込んでいるようである。しかし、電子タバコエアロゾルへの出生前暴露による新生児あるいは幼児期の健康リスクについてはほとんど知られていない。妊娠中のマウスが電子タバコエアロゾルに曝露され、その親から生まれたマウス（6 週齢時）の肺組織について検査したところ、性依存的ではあるが肺疾患を発症しやすくなることを示唆する所見が得られている。これらの結果は、妊娠中の電子タバコの使用は安全ではなく、子供の間質性肺疾患の傾向を高める可能性があることを示唆している（Ab#2444）。

電子タバコ由来のカルボニル化合物による心血管障害：短鎖の有毒なアルデヒドを含むカルボニル化合物が電子タバコ由来のエアロゾル中に検出されている。しかし、ヒトにおける電子タバコの慢性暴露の心血管毒性は評価されていない。12 週間に渡りニコチン、アクロレイン、またはクロトンアルデヒドを含む電子タバコのエアロゾールを動脈硬化感受性マウスである ApoE 欠損マウスに曝露することにより、フィルター処理された空気対照群と比較して動脈硬化が著しく増加した。これらの結果は、アルデヒドを含むニコチン供給電子タバコのエアロゾールに曝露されたヒトの心血管疾患リスクを高める可能性を示唆している（Ab#1766）。

ヒト気液界面（air-liquid-interface）気道モデルを用いた FA の毒性評価：FA は、吸入毒性を惹起することが良く知られている刺激性の高いアルデヒドである。FA の *in vitro* の毒性結果を動物およびヒト（*in vivo*）で観察された結果と比較するために、*in vitro* のヒト気液界面（ALI）気道モデルで FA 蒸気に対する組織反応を体系的に評価した。細胞培養液は、VITROCELL®Spiking システムによって生成された 7.5、15、30 ppm の FA 蒸気に空気界面で連続 4 日間、1 日 4 時間曝露された。30 ppm FA への 2 回の曝

露は有意な細胞毒性を誘発したため、この曝露濃度は研究から除外された。FAへの曝露は、用量依存的に繊毛細胞と杯細胞に機能変化を引き起こし、酸化ストレスが持続し、15 ppmで扁平上皮に分化する可能性が認められた。さらに、炎症性サイトカインであるIL-8、IL-9、およびIL-17Aの分泌は、15 ppmのFA蒸気に繰り返し曝露することで誘発された。15 ppm FAはDNA修復酵素MGMTの発現を減少させた。このことは、電子タバコのエアロゾルに含まれるタバコ特異的ニトロソアミンによって気道上皮細胞に作られるO6-メチルグアニンのMGMTによる修復能力を低下させる可能性を示唆している。以上まとめると、ALI気道モデルを用いたFA蒸気曝露において酸化ストレス、炎症誘発性応答、およびDNA修復機構の抑制などが認められ、*in vivo*で報告されたFA毒性との間の一致性が確認できた。これらの結果は、吸入物質の呼吸器毒性を評価するための*in vitro*アプローチとしてALI培養システムの適用が有用であることを示唆している (Ab#3587)。

E. 結論

加熱式および電子タバコのエアロゾルには種々のカルボニル化合物が含まれる。カルボニル化合物の中でもヒトにおける発癌性が証明されているFAおよび発癌の可能性があると報告されているAAは1ないし2個の炭素からなる反応性が高いアルデヒドである。これらFA/AAは酸化ストレス下で多種多様な炎症性ハイブリッド型 (M2FA/M2AA) リジン付加体を産生することが明らかになっている。今回、吸入曝露により呼吸器毒性が報告されている -ジケトン化合物であるMGOについてもハイブリッド型 (M2MGO) リジン付加体が産生されることが明らかになった。MGOは糖尿病で増加する糖分解物でもあることから、DHP型リジン付加体であるM2MGOの抗原性、炎症性を含めた動物細胞および組織への病態生理学的影響について調べる必要が

ある。また、グアニンやアデニンの環外アミノ基にも試験管内でハイブリッド型付加体ができることが明らかになった。今後、生理学条件下および細胞内で同様の反応物が産生され、検出されるかを検討する必要がある。

引用文献

1. Uchiyama S, Noguchi M, Sato A, Ishitsuka M, Inaba Y, Kunugita N. Determination of Thermal Decomposition Products Generated from E-Cigarettes. *Chem Res Toxicol* [Internet]. American Chemical Society; 2020 [cited 2020 Apr 17];33:576–83.
2. Nakamura J, Shimomoto T, Collins LB, Holley DW, Zhang Z, Barbee JM, et al. Evidence that endogenous formaldehyde produces immunogenic and atherogenic adduct epitopes. *Sci Rep* [Internet]. 2017 [cited 2019 Nov 17];7:10787.
3. Kreiss K, Gomaa A, Kullman G, Fedan K, Simoes EJ, Enright PL. Clinical bronchiolitis obliterans in workers at a microwave-popcorn plant. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 [cited 2020 Apr 17];347:330–8.
4. Hubbs AF, Kreiss K, Cummings KJ, Fluharty KL, O'Connell R, Cole A, et al. Flavorings-Related Lung Disease: A Brief Review and New Mechanistic Data. *Toxicol Pathol* [Internet]. SAGE Publications Inc.; 2019 [cited 2020 Apr 17];47:1012–26. 208
5. Morgan DL, Jokinen MP, Johnson CL, Price HC, Gwinn WM, Bousquet RW, et al. Chemical Reactivity and Respiratory Toxicity of the α -Diketone Flavoring Agents: 2,3-Butanedione, 2,3-Pentanedione, and 2,3-Hexanedione. *Toxicol Pathol* [Internet]. SAGE Publications Inc.; 2016 [cited 2020 Apr 17];44:763–83. [Im.nih.gov/pubmed/27025954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025954)
6. Flake GP, Morgan DL. Pathology of diacetyl and 2,3-pentanedione airway lesions in a rat model of obliterative bronchiolitis. *Toxicology* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2017 [cited 2020 Apr 17];388:40–7.
7. Basu AK, O'Hara SM, Valladier P, Stone

- K, Mols O, Marnett LJ. Identification of adducts formed by reaction of guanine nucleosides with malondialdehyde and structurally related aldehydes. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 1988 [cited 2020 Apr 17];1:53–9.
8. Jeong Y-C, Sangaiah R, Nakamura J, Pachkowski BF, Ranasinghe A, Gold A, et al. Analysis of M1G-dR in DNA by aldehyde reactive probe labeling and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2005 [cited 2019 Nov 17];18:51–60.
9. Mao H, Schnetz-Boutaud NC, Weisenseel JP, Marnett LJ, Stone MP. Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 [cited 2019 Nov 19];96:6615–20.
10. Jeong Y-C, Nakamura J, Upton PB, Swenberg JA. Pyrimido[1,2-a]-purin-10(3H)-one, M1G, is less prone to artifact than base oxidation. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2005 [cited 2020 Apr 17];33:6426–34.
11. Johnson KA, Mierzwa ML, Fink SP, Marnett LJ. MutS recognition of exocyclic DNA adducts that are endogenous products of lipid oxidation. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 [cited 2020 Apr 17];274:27112–8.
12. Lu K, Craft S, Nakamura J, Moeller BC, Swenberg JA. Use of LC-MS/MS and stable isotopes to differentiate hydroxymethyl and methyl DNA adducts from formaldehyde and nitrosodimethylamine. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2012 [cited 2019 Nov 17];25:664–75.
13. Swenberg JA, Lu K, Moeller BC, Gao L, Upton PB, Nakamura J, et al. Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicol Sci* [Internet]. 2011 [cited 2020 Apr 19];120 Suppl 1:S130-45.
14. Nakamura J, Nakamura M. DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. Elsevier B.V.; 2020 [cited 2020 Mar 12];88:102806.
15. Le Curieux F, Pluskota D, Munter T, Sjöholm R, Kronberg L. Formation of a fluorescent adduct in the reaction of 2'-deoxyadenosine with a malonaldehyde-acetaldehyde condensation product. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 1998 [cited 2020 Apr 17];11:989–94.
16. Le Curieux F, Pluskota D, Munter T, Sjöholm R, Kronberg L. Identification of fluorescent 2'-deoxyadenosine adducts formed in reactions of conjugates of malonaldehyde and acetaldehyde, and of malonaldehyde and formaldehyde. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2000 [cited 2019 Nov 17];13:1228–34.
17. Pluskota-Karwatka D, Le Curieux F, Munter T, Sjöholm R, Kronberg L. Identification of conjugate adducts formed in the reactions of malonaldehyde-acetaldehyde and malonaldehyde-formaldehyde with cytidine. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2002 [cited 2020 Apr 17];15:110–7.
18. McCaskill ML, Kharbanda KK, Tuma DJ, Reynolds JD, Devasure JM, Sisson JH, et al. Hybrid malondialdehyde and acetaldehyde protein adducts form in the lungs of mice exposed to alcohol and cigarette smoke. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35:1106–13.
19. Wyatt TA, Kharbanda KK, McCaskill ML, Tuma DJ, Yanov D, DeVasure J, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde-adducted protein inhalation causes lung injury. *Alcohol* [Internet]. 2012 [cited 2020 Apr 18];46:51–9.
20. Sapkota M, DeVasure JM, Kharbanda KK, Wyatt TA. Malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) adducted surfactant protein induced lung inflammation is mediated through scavenger receptor a (SR-A1). *Respir Res* [Internet]. BioMed Central Ltd.; 2017 [cited 2020 Apr 18];18:36.
21. Swenberg JA, Gralla EJ, Kerns WD, Mitchell RI, Pavkov KL. Induction of Squamous Cell Carcinomas of the Rat Nasal Cavity by Inhalation Exposure to Formaldehyde Vapor. *Cancer Res*. 1980;40:3398–402.
22. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2006;88:1–478.
23. Zhang L, Tang X, Rothman N,

Vermeulen R, Ji Z, Shen M, et al. Occupational exposure to formaldehyde, hematotoxicity, and leukemia-specific chromosome changes in cultured myeloid progenitor cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2010 [cited 2019 Nov 17];19:80–8.

24. Yu PH, Wright S, Fan EH, Lun Z-R, Gubisne-Harberle D. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2003 [cited 2020 Apr 18];1647:193–9.

25. Swenberg JA, Moeller BC, Lu K, Rager JE, Fry RC, Starr TB. Formaldehyde carcinogenicity research: 30 years and counting for mode of action, epidemiology, and cancer risk assessment. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2013 [cited 2019 Nov 17];41:181–9.

26. Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Res* [Internet]. 1983 [cited 2019 Nov 17];43:4382–92.

27. Lai Y, Yu R, Hartwell HJ, Moeller BC, Bodnar WM, Swenberg JA. Measurement of Endogenous versus Exogenous Formaldehyde-Induced DNA-Protein Crosslinks in Animal Tissues by Stable Isotope Labeling and Ultrasensitive Mass Spectrometry. *Cancer Res* [Internet]. 2016 [cited 2019 Nov 17];76:2652–61.

28. Leng J, Liu C-W, Hartwell HJ, Yu R, Lai Y, Bodnar WM, et al. Evaluation of inhaled low-dose formaldehyde-induced DNA adducts and DNA-protein cross-links by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Arch Toxicol* [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 17];93:763–73.

29. Liu C-W, Tian X, Hartwell HJ, Leng J, Chi L, Lu K, et al. Accurate Measurement of Formaldehyde-Induced DNA-Protein Cross-

Links by High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Nov 17];31:350–7.

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (3件)

(1) Tian X, Chen Y, Nakamura J. Development of a novel PIG-A gene mutation assay based on a GPI-anchored fluorescent protein sensor. *Genes Environ*. 2019 Dec 10;41:21. PMID: 31867084.

(2) Ridpath JR, Nakamura J. Acid-specific formaldehyde donor is a potential, dual targeting cancer chemotherapeutic/chemo preventive drug for FANCD1/BRCA1-mutant cancer. *Genes Environ*. 2019 Dec 27;41:23. PMID: 31890056.

(3) Nakamura J, Nakamura M. DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites. *DNA Repair (Amst)*. 2020 Apr;88:102806. PMID: 32070903.

2. 学会発表 (1件)

米国毒性学会 (SOT) 年次総会 (COVID-19 により開催中止) J. Nakamura J, Kawanishi M, Yagi T, Okada T, and Kunugita N. Antigenic, Inflammatory DHP-Lysine Adducts Are Induced by Aldehydes in the Vapor of Both Flavored and Unflavored E-cigarettes and Heated Tobacco Products (Ab# 3172).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

図1 電子タバコおよび加熱タバコ由来のエアロゾル中のカルボニル化合物が作る可能性がある DHP-リジン付加体の産生メカニズム

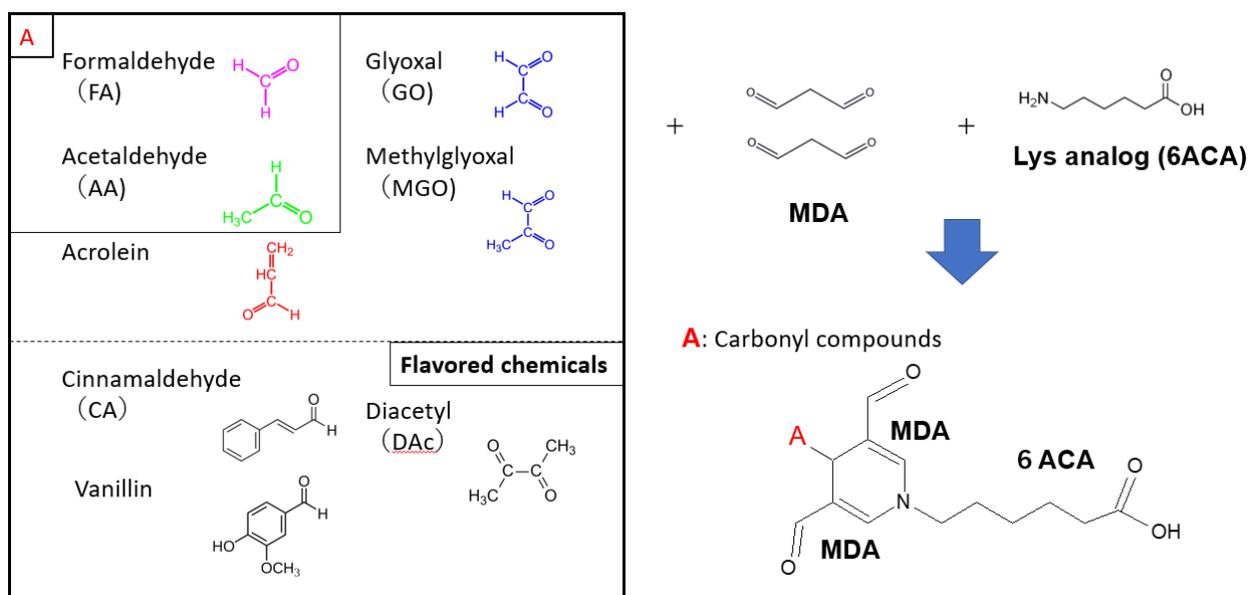


図2 FA由来のDPC産生メカニズム

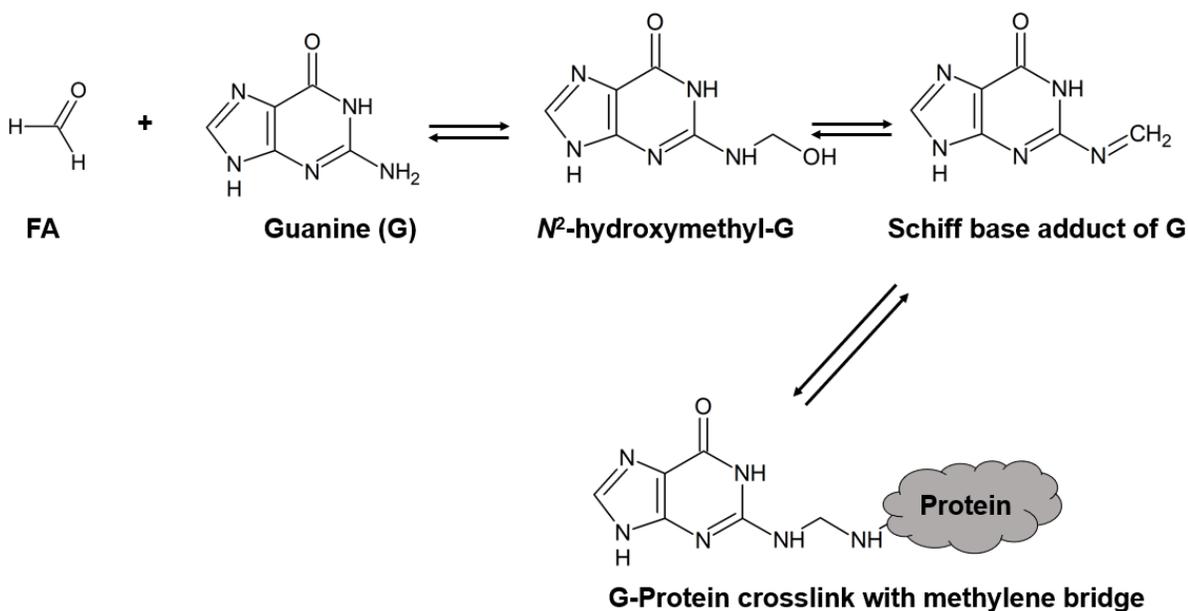


図3 M2FA-アデニン (A) 付加体の産生メカニズム

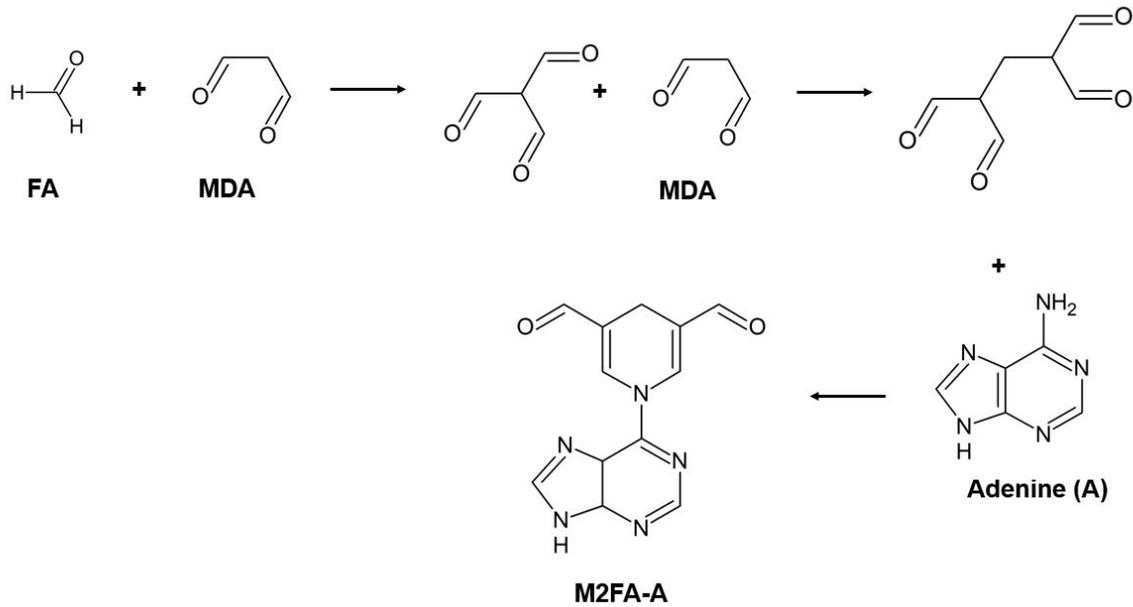
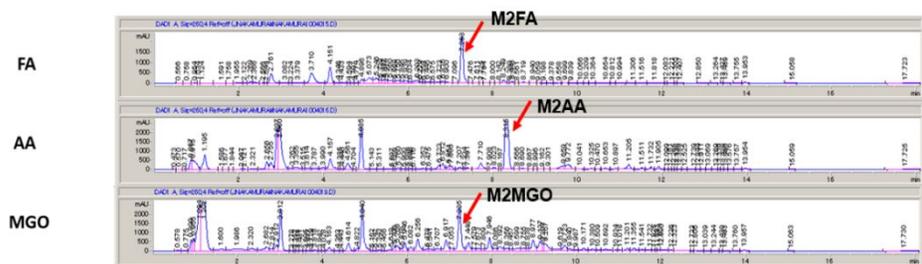
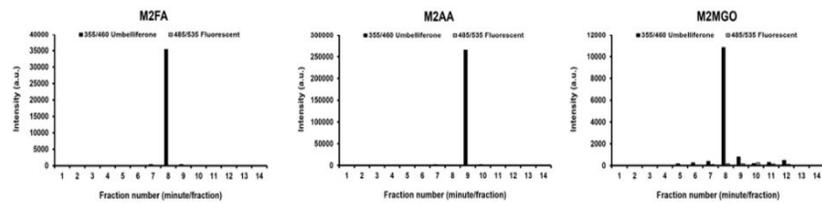


図4 M2FA、M2AA、および M2MGO の構造、特徴および HPLC を用いた精製

A. HPLC Purification



B. Fluorescence detection



C. Adduct structure

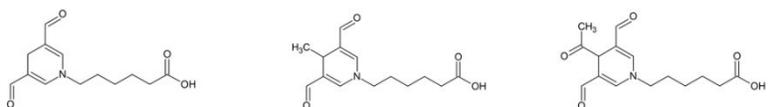


図5 M2FA-Aの質量解析

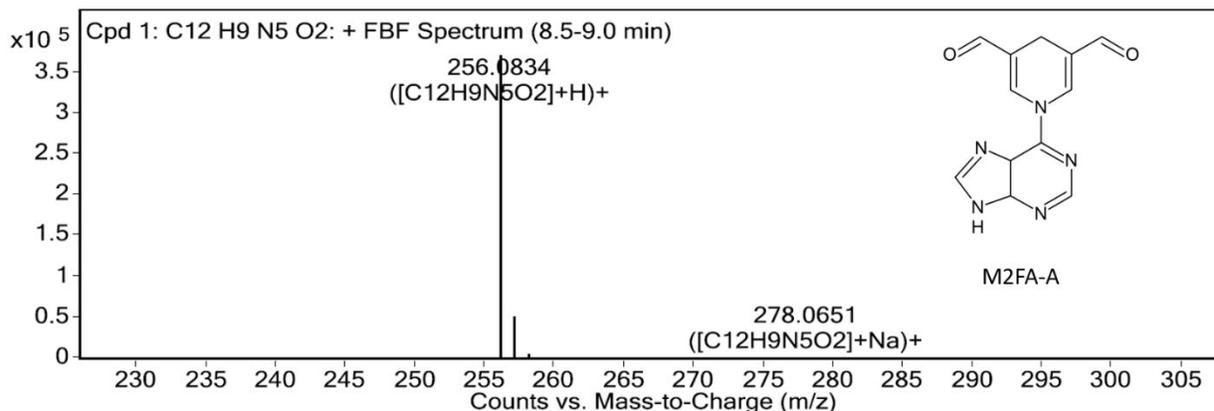


図6 M2AA-GIおよびM2AA-GIIの質量解析

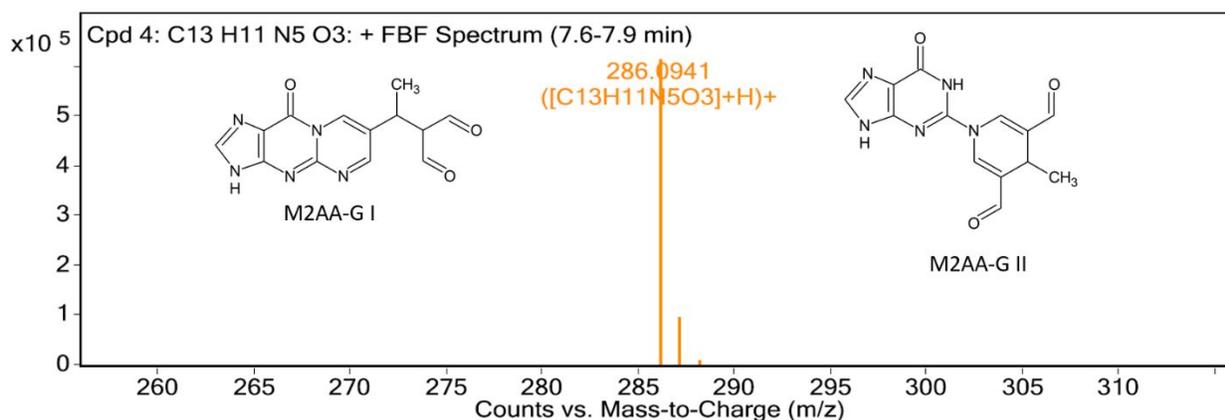


図7 M1FA-Gの質量解析

MS Zoomed Spectrum

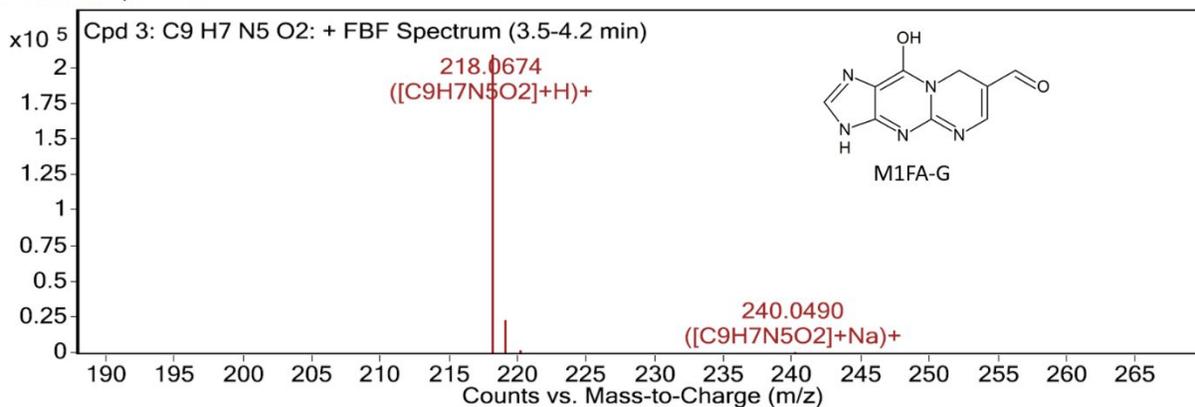


図8 M1AA-Gの質量解析

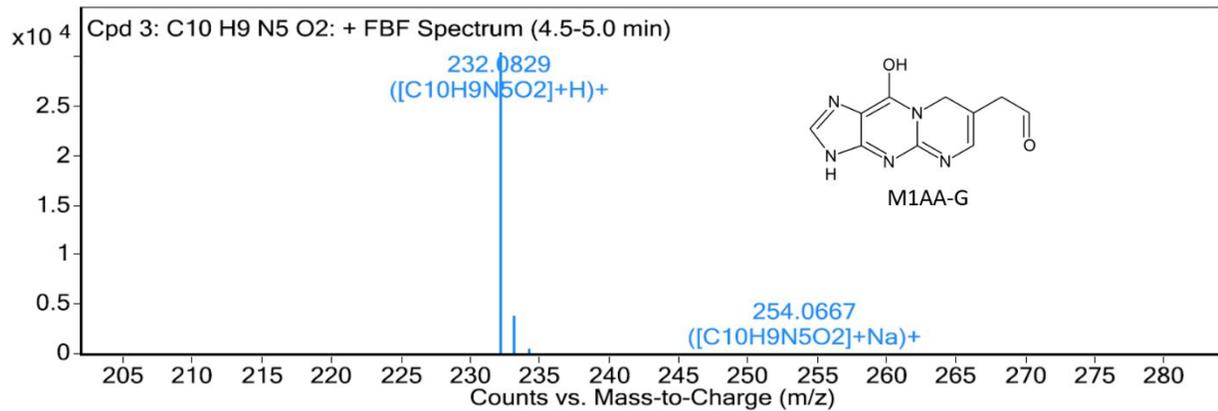
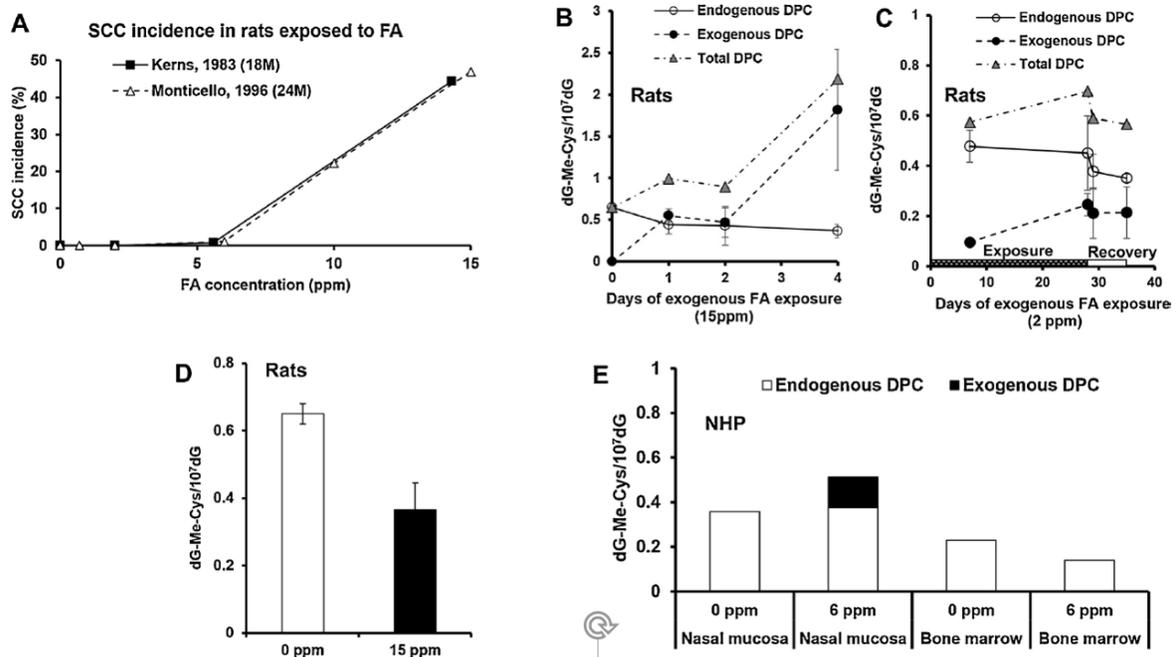


図9 FAに暴露された動物の鼻部における腫瘍発生頻度およびDPCの定量



FAに暴露された動物の鼻部における腫瘍とDPCの形成。A. 18および24ヶ月間のFA吸入暴露（6時間/日、5日/週）によりラットに発生した鼻腫瘍（SCC）の発生頻度。B. 15 ppm [13CD2]-FA（6時間/日）に4日間暴露されたラットの鼻組織における内因性および外因性のFA由来DPC（dG-Me-Cys）[9]。C. 2 ppm [13CD2]-FA（6時間/日、5日/週）に4週間暴露されたラットの鼻組織における内因性および外因性のFA誘発DPC。D. 15 ppmの [13CD2]-FA（6時間/日）に4日間暴露したラットの内因性FA由来DPCに対する影響。E. 6 ppmの [13CD2]-FA（6時間/日）に2日間暴露されたカニクイザルの鼻と骨髄における内因性および外因性のFA誘発DPC。