

令和元年度 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: 気管内投与による化学物質の有害作用とくに発癌性の効率的評価手法の開発に関する  
研究: 迅速化かつ国際化に向けて

分担研究課題名: 化学物質毒性評価のための酸化ストレス由来代謝物の網羅的解析

分担研究者 伴野 勸 愛知医科大学 医学部 感染・免疫学講座

## 研究要旨

経気管肺内噴霧投与(TIPS)による試験法を用いた空気中の化学物質の吸入曝露に伴う毒性評価のための *in vitro* 毒性試験について質量分析計を用いた活性カルボニル化合物(RCs)の網羅的解析によって評価した。ヒト肺がん細胞 A549 に試行検体として 1,4-dioxane(dxn)を曝露させた結果、対照群と比較して dxn 曝露による酸化ストレス由来の RCs の生成が確認された。Dxn 曝露によって高値を示した RCs には、強い細胞傷害性が報告されている glyoxal や crotonaldehyde、2-hexadecenal が含まれていた。RCs の生成を測定することで、酸化ストレスを評価することが出来、また、化学物質曝露による毒性評価に利用することが出来ると考えられた。

### A. 研究目的

ラットによる経気管肺内噴霧投与(TIPS)による試験法を用いた空気中の化学物質の吸入曝露に伴う毒性評価に関して、化学物質曝露に伴い産生される活性酸素種(ROS)や活性窒素種(RNS)に着目した。しかし、ROS や RNS は半減期が非常に短く、それ自体を安定的に測定することは難しい。そこで本研究では、ROS や RNS と脂質やタンパク質、アミノ酸、核酸などの生体構成成分が反応し、生成された代謝物であるアルデヒドやケトン基を有する種々の活性カルボニル化合物(Reactive carbonyl species; RCs)生成を質量分析計を用いて測定することで、化学物質の酸化ストレスによる毒性評価を行った。本年度は培養細胞を用いた *in vitro* における RCs 産生を測定した。

### B. 研究方法

ヒト肺がん由来培養細胞 A549 に 1,4-Dioxane (dxn)

を 0, 100, 500, 1000 ppm になるように曝露し、24 時間後に培養上清および細胞を回収した。そのうち、200  $\mu$ L の培養上清から RCs を含む脂溶性画分を抽出した。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。得られた RCs-DH 誘導体を 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 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)

本研究では、培養細胞を用いており、倫理面で配慮が必要となるヒト検体や動物等は使用していない。

### C. 研究結果

試行検体として dxn の A549 に対する *in vitro* 毒性試験を酸化ストレスに伴う RCs 生成解析によって評価

した結果、培養上清中の RCs は dxn 0 ppm で 406 peaks、100 ppm で 377 peaks、500 ppm で 408 peaks、1000 ppm で 396 peaks 検出された。また、dxn 曝露群と対照群を比較すると、100 ppm では 377 peaks 中 142 peaks、500 ppm では 408 peaks 中 200 peaks、1000 ppm では 396 peaks 中 205 peaks と dxn 曝露濃度依存的に高値を示していた。対照群と比較して dxn 曝露によって高値を示した RCs には、強い細胞傷害性が報告されている glyoxal や crotonaldehyde、2-hexadecenal が含まれていた。また、dxn 1000 ppm 曝露群では benzaldehyde が有意に増加していた。

#### D. 考察

A549 細胞において Dxn 曝露依存的な酸化ストレスによって RCs の生成が確認できた。このことから、化学物質曝露による酸化ストレスを RCs の網羅的解析によって評価することができると考えられる。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し、突然変異を誘導することで発がんを誘発することが知られている。今後は、化学物質そのものの代謝物や DNA 付加体も含めて、*in vitro*、*in vivo* における毒性を評価する。

#### E. 結論

本研究では、*in vitro* 毒性試験の評価方法として酸化ストレスに伴う脂質やアミノ酸酸化分解物である活性カルボニル化合物 (RCs) の網羅的解析法を用いた。試行検体として dxn を用いた評価では、曝露によって生じた RCs 生成を測定することが出来た。今後、*in vitro*、*in vivo* 検体を用いて RCs 生成や DNA 付加体などその他代謝物を測定することで、毒性発現機序の一部が明らかとなることが期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamazaki T., Inui Masanori., Hiemori K., Tomono S., Itoh M., Ichimonji I., Nakashima A., Takagi H., Biswas M., Izawa K., Kitaura J., Imai T., Sugiura N., Tateno H., Akashi-Takamura S.  
Receptor-destroying Enzyme (RDE) From *Vibrio*

*cholerae* Modulates IgE Activity and Reduces the Initiation of Anaphylaxis. *J. Biol. Chem.*, 294 (17), 6659-6669 (2019).

2. Hagihara M., Kuroki Y., Ariyoshi T., Higashi S., Fukuda K., Yamashita R., Matsumoto A., Mori T., Mimura K., Yamaguchi N., Okada S., Nonogaki T., Ogawa T., Iwasaki K., Tomono S., Asai N., Koizumi Y., Oka K., Yamagishi Y., Takahashi M., Mikamo H. *Clostridium Butyricum* Modulates the Microbiome to Protect Intestinal Barrier Function in Mice With Antibiotic-Induced Dysbiosis. *iScience*, 23(1):100772 (2020).
3. Nakashima A., Tomono S., Yamazaki T., Inui M., Morita N., Ichimonji I., Takagi H., Nagaoka F., Matsumoto M., Ito Y., Yanagishita T., Miyake K., Watanabe D., Akashi-Takamura S. Phospholipase A2 From Bee Venom Increases Poly(I:C)-induced Activation in Human Keratinocytes. *Int Immunol*, dxaa005 (2020).
4. Kurokawa Y, Fujii G, Tomono S, Miyamoto S, Hamoya T, Takahashi M, Narita T, Komiya M, Kobayashi M, Higami Y, Mutoh M. The Radical Scavenger NZ-419 Suppresses Intestinal Polyp Development in Apc-Mutant Mice. *J. Clin. Med.*, 9(1):270 (2020).

##### 2. 学会発表

1. 伴野勸、長岡史晃、一文字功、山崎達也、乾匡範、高木秀和、伊藤誠、高村祥子。「Ceramide phosphoethanolamine による Arginase-1 発現誘導」第 92 回日本生化学会大会、横浜、2019 年 9 月 19 日
2. Tomono S., Yamazaki T., Inui M., Akashi-Takamura S. 「Ceramide phosphoethanolamine, a sphingomyelin analog prevents NO production in bone marrow-derived macrophages」第 48 回日本免疫学会学術集会、浜松、2019 年 12 月 11 日

#### G. 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