

令和2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曝露による活性カルボニル化合物産生とDNA
付加体形成に関する研究

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*、*in vivo* 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)、DNA 付加体の網羅的解析による評価系の構築を試みた。先ずマウスマクロファージ様細胞RAW264.7に試行検体として種々の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を曝露させた結果、対照群と比較して MWCNT 曝露による酸化ストレス由来の RCsの生成が確認された。また、MWCNT を TIPS によって曝露されたラット肺組織中の DNA 付加体を検出した結果、MWCNT 曝露によって DNA 付加体が増加傾向を示していた。RCsや DNA 付加体の生成を測定することで、酸化ストレスを評価し、また、化学物質曝露による毒性評価に利用することが可能と考えられた。現在、1) 4-ジオキササン、2) グリシドール、3) *N,N*-ジメチルホルムアミド、4) アクリル酸ポリマー、5) アセチルアセトン、6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート、7) *N,N*-ジメチルアセトアミドについて試みている。

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短期毒性評価に関して先ず、それ自体が代謝されないでMφによる活性酸素処理に着目し、さらに他の化合物の代謝による活性酸素産生に応用する戦略をとった。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)生成及びその核酸付加体について、質量分析計を用いて測定することで、MWCNT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、MWCNTのTIPS後のラット肺組織中DNA付加体を測定した。

B. 研究方法

1. マウスマクロファージ様細胞におけるMWCNT曝露と活性カルボニル化合物の解析
マウスマクロファージ様細胞RAW264.7に構造の異なる多層カーボンナノチューブ(MWCNT-A, -B, -7, -N, DWCNT)を10 µg/mLになるように曝露し、24時間後に培養上清を回収した。そのうち、200 µL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。

2. ラット肺組織中 DNA 付加体の解析

DWCNT (0.125, 0.25, 0.5 mg/rat)、MWCNT-7 (0.5 mg/rat) を経気管肺内噴霧投与した 1 か月後のラット肺組織 20 mg から DNA を抽出した。抽出した DNA を酵素的にヌクレオシドに加水分解した。肺組織は津田研究室にて実施されたラットの肺を用いた。得られた DNA 加水分解物を LC/MS 解析試料とした。DNA 付加体は 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 (津田報告書参照)。

C. 研究結果

1. マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 における MWCNT 曝露による活性カルボニル化合物の網羅的解析を行った結果、対照群 143 peaks、MWCNT-A 142 peaks、MWCNT-B 169 peaks、MWCNT-7 152 peaks、MWCNT-N 134 peaks、DWCNT 197 peaks の RCs が検出された。そのうち、対照群と比較して MWCNT-A は 60 peaks、MWCNT-B は 88 peaks、MWCNT-7 は 63 peaks、MWCNT-N は 49 peaks、DWCNT は 100 peaks が増加傾向を示した。増加傾向を示した RCs のうち、有意に増加した RCs はいずれも未知の化合物であった。

2. ラット肺組織における DWCNT 曝露による DNA 付加体の網羅的解析を行った結果、DWCNTs の肺内投与によって Total の Peak 数に大きな変動は見られなかった。対照群と Peak を比較すると、0.125 mg/rat では、73 peaks、0.25 mg/rat では、81 peaks、0.5 mg/rat では、67 peaks、MWCNT-7 0.5 mg/rat では、62 peaks が対照群と比較して増加傾向を示した。ま

た、DWCNT 濃度依存的に増加する付加体も検出できたが、DWCNT と MWCNT-7 を比較すると、MWCNT-7 で高値を示した付加体は DWCNT 0.5mg/rat でも高値を示しており、MWCNT-7 と DWCNT 0.5mg/rat での付加体の差は認められなかった。また、増加傾向を示した DNA 付加体はいずれも未知の化合物であった。

D. 考察

RAW264.7 細胞において MWCNT 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、種々の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、MWCNT 肺内投与ラット肺組織中の DNA 付加体も対照群と比較して増加傾向を示していた。MWCNTs 肺内投与ラットの肺組織においては、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肺組織の傷害を引き起こすことが示唆されている。これらのことから、*in vitro*, *in vivo* での RCs や DNA 付加体を網羅的に検出することは、種々の化学物質の毒性の評価に適していると考えられる。

しかし、マクロファージ様培養細胞 RAW264.7、肺組織ともに MWCNT 曝露によって増加傾向を示した RCs、DNA 付加体はいずれも未知の化合物であったことから、毒性メカニズムの解明のために化学構造の同定をする必要がある。また、肺がん細胞 A549 における MWCNT 曝露による RCs および RCs-DNA 付加体の生成について LC/MS を用いた網羅的解析、及び RCs による毒性評価を試みる。

E. 結論

本研究では、*in vitro*, *in vivo* における化学物質の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) および DNA 付加体の網羅的解析法を用いた。MWCNT を用いた評価では、曝露によって生じた RCs 生成および DNA 付加体の増加を測定することが出来た。しかし、増加した化合物はいずれも未知のもの

であった。対象となっている検体について *in vitro*, *in vivo* における RCs 生成や DNA 付加体、その他代謝物を測定することで、急性毒性の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. 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

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

T. Yamazaki, M. Biswas, K. Kosugi, M. Nagashima, M. Inui, S. Tomono, H. Takagi, I. Ichimonji, F. Nagaoka, A. Ainai, H. Hasegawa, J. Chiba, S. Akashi-Takamura. A Novel Gene Delivery Vector of Agonistic Anti-Radioprotective 105 Expressed on Cell Membranes Shows Adjuvant Effect for DNA Immunization Against Influenza. *Frontiers in Immunology*. 2020. eCollection 2020.

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