

201234050A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

(H24-食品-若手-018)

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 石井 雄二

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究	-----	1
石井雄二		

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 24 年度総括研究報告書

食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

研究代表者 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

研究要旨

本研究では網羅的 DNA 損傷解析と酸化的 DNA 損傷評価をレポーター遺伝子導入動物に応用した「網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験」の構築と、その有用性評価を行った。網羅的 DNA 損傷解析の構築では、試料とする DNA 量、HPLC の分離条件、MS/MS のイオン化条件を検討し最適化した。酸化的 DNA 損傷評価法の構築では、脂質過酸化物 4-oxo-2-nonenal から生成する heptanone-etheno (Hε) -dG, dA 及び dC 付加体の分析用標準品及び内標準物質を合成し、LC-MS/MS による定量解析法を構築した。また、本法を無処置群のラット肝臓及び腎臓 DNA に適用し、各付加体が検出できることを確認した。網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験の有用性評価では、被験物質として遺伝毒性物質である 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoxaline (IQ) 及びサフロール (SFO) と非遺伝毒性物質であるアリザリン (Alz) を選定し、雄性 6 週齢の *gpt delta* ラットに 200, 5000 及び 800 ppm の濃度で 4 週間混餌投与した。投与後、肝臓及び腎臓について網羅的 DNA 損傷解析、酸化的 DNA 損傷評価及び *in vivo* 変異原性の検索を実施し、本法の有用性を評価した。DNA アダクトーム解析による網羅的 DNA 損傷解析では IQ 及び SFO から生じる種々の DNA 付加体が検出され、MS スペクトラム解析から得られる構造情報から付加体の構造同定または推定が可能であった。また、SFO 及び Alz では 8-OHdG レベルの上昇が認められ、SFO の遺伝毒性への酸化的 DNA 損傷の寄与も示唆されたことから、酸化的 DNA 損傷評価の重要性が示された。さらに、DNA 損傷の生成パターンと変異パターンを組み合わせた考察が可能であり、各 DNA 付加体が有する変異ポテンシャルの特徴についても推測することが可能であった。これらの結果から、本法は化学物質のより詳細な遺伝毒性情報を得ることができ、これらのデータを蓄積することで環境化学物質の遺伝毒性予測やそのメカニズム解明に有用なツールになると考えられた。

A. 研究目的

化学物質の安全性評価において、遺伝毒性の有無は閾値の設定が可能か否かを定める重要な評価である。近年開発されたレポーター遺伝子導入トランスジェニック動物を用いた *in vivo* 変異原性試験は動物個体に起こる遺伝子突然変異を任意の組織において定量的に測定し、誘発された突然変異

を塩基レベルで解析できる特徴を持っている。また、これまでの毒性試験や発がん性試験と同一条件で試験を実施でき、同一個体の同一組織において遺伝毒性機序の探索ができることから、発がん機序の解明や発がん予測の有力なツールとして期待されている。本研究では能美ら¹⁾によって開発されたレポーター遺伝子導入動物 *gpt delta*

ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験に、DNA 損傷の評価を加えることで、化学物質の DNA 傷害性と変異原性を評価可能な「網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験」を構築する。

化学物質によって生じる DNA 損傷解析には、古くから放射性同位体 ^{32}P によるポストラベル法が用いられてきた。本法は高感度かつ網羅的な損傷塩基の検出が可能な手法であるが、①定量的解析ができない、②特殊な設備を必要とする、さらに、③実験者の安全性が確保できない、といった問題点が挙げられる。また、新たに質量分析計を用いた検出も試みられているが、本法では①測定対象物質以外の未知の付加体を検出できない、②測定対象物質の標準品や内標準物質(安定同位体)の合成が必要である、といった欠点を有する。このような背景から、ポストラベル法のような DNA 付加体形成を網羅的に検索可能な新たな手法の構築が求められている。近年、松田ら²⁾は液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた DNA アダクトーム解析を提案した。本法は、修飾されたデオキシヌクレオシドがエレクトロスプレーイオン化(ESI)法によってプラスイオンを生じ、容易に質量 116 のデオキシリボースの開裂を引き起こすことに着目し、質量数 200 から 600 までの親イオンと、それぞれから 116 を差し引いたフラグメントイオンを設定することで、検出されるピークを網羅的に解析する手法である。松田らは本法をヒト組織に適用しアダクトームマップを作製することで、非喫煙者と喫煙者における付加体量の違いや未知の DNA 付加体の存在を示し、その有用性を報告している。本研究

ではこの DNA アダクトームを用いて網羅的な化学物質特異的 DNA 損傷評価法を構築した。一方、化学物質によって引き起こされる DNA 損傷には、活性酸素種(ROS)生成を介して生成する 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)や脂質過酸化物質(LPO)由来の DNA 付加体も知られている。これらは無処置の DNA 中にも存在していることから定量解析による評価が必要であり、本法では網羅的 DNA 損傷解析と分けて評価することとした。8-OHdG は既に広く用いられている液体クロマトグラフィー/電気化学検出器(HPLC/ECD)により定量的に解析することとした。また、LPO 由来の DNA 損傷は、4-oxo-2-nonenal(ONE)から生成するヘプタノンエテノ(H ϵ)付加体を指標として、新たにこれらの定量解析法を構築し本試験法に加えることとした。

「網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括的試験」では、6 週齢の雄性 *gpt* delta F344 ラットに OECD のガイドラインに従い被験物質を 4 週間投与し、主要臓器である肝臓及び腎臓について点突然変異を検出する *gpt* assay 及び欠失変異を検出する Spi⁻ assay による *in vivo* 変異原性の評価と、構築した網羅的 DNA 損傷解析及び酸化的 DNA 損傷評価法による DNA 損傷解析を行う。本年度は本法の有用性を評価するため、遺伝毒性物質である 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoxaline (IQ) 及びサフロール(SFO)と非遺伝毒性物質であるアリザリン(Alz)を選定し、本試験法による評価を実施した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

IQ は Toront Research Chemicals 社から、Alz は Sigma-Aldrich 社から、SFO は東京化成工業株式会社から購入した。エストラゴール (ES) の DNA 付加体 ES-3' - A^2 -dG、C8-dG 及び A^6 -dA と、ルシジン (Luc) の DNA 付加体 Luc- A^2 -dG 及び A^6 -dA は過去に合成したものを使用した。

B-2. DNA 抽出

DNA 損傷解析のための DNA 抽出は既法³⁾を参考にした。DNA 抽出に使用する肝臓及び腎臓はそれぞれ 180 及び 80 mg とし、DNA の抽出には和光純薬社製 DNA エキストラクター WB キットを使用した。Deferoxamine mesylate を加えた Lysis buffer で組織をホモジナイズした後、遠心分離 (10,000 rpm, 1 min, 4°C) し、沈殿物を Enzyme reaction solution で再懸濁した。RNase を加えインキュベーション (50°C, 10 min) 後、さらに Protease K を加えインキュベーション (50°C, 60 min) した。反応後、NaI buffer 及び 2-プロパノールを加えて DNA を析出させ、遠心分離 (10,000 rpm, 10 min, 4°C) によってペレット状の DNA を得た。ペレットは 2-プロパノール及び 70%エタノールで洗浄後、乾燥させた。ペレットを 100 μ l の DW 水に溶解後、Nano Drop[®] 1000 を用いて DNA 濃度を測定し、100 mg/150 μ l に調整した。DNA の消化には和光純薬社製 8-OHdG Assay Preparation Reagent Set[®]を利用し、Acetic acid buffer 及び Nuclease P1 を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) した。さらに Tris buffer 及び Alkaline phosphatase を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) し、100,000 NMWL Filter Unit で遠心分離 (10,000 rpm, 5 min) した。得

られた試料 (計 200 μ l) のうち 50 μ l は 8-OHdG 測定に使用した。網羅的 DNA 損傷解析には、残った試料から 100 μ l ずつを各群 (n=5) でまとめ、450 μ l をエバポレーターで乾固後、メタノールで再溶解し、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min, 4°C) した。メタノール層をエバポレーターで再度乾固した後、30% DMSO 溶液 150 μ l で再溶解し測定試料とした。

B-3. 網羅的 DNA 損傷解析システム

LC-MS/MS は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ (G1322A, Degasser; G1312A, Bin Pump; G1316A, COLCOM; G1329A, ALS) 及び Micromass Quattro Ultima mass spectrometry system (Micromass 社製) を用いた。カラムは関東化学社製 Mightysil RP-18GP (2.0 x 150 mm, 5 mm) を用いた。移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.001%ギ酸添加) と溶液 B: アセトニトリル (0.001%ギ酸添加) の混液を流速 0.2 ml/min で送液した。カラムを溶液 A/B=95/5 で安定させ、グラジエント機能を用いて測定開始 30 分後に溶液 A/B=10/90 とした。MS/MS のイオン化にはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用い、Cone voltage 及び Collision energy はそれぞれ 35 V 及び 15 eV とした。検索質量は DNA を構成する dG, dA, dC 及び dT の各分子量 (267.2, 251.2, 227.2 及び 242.2) の平均値 247.0 に被験物質の分子量を加え、その ± 50 の範囲とした。すなわち IQ (M.W. 198.2) は m/z 395 から 495 を、SFO (M.W. 162.2) は m/z 358 から 458 を、Alz (M.W. 240.2) は m/z 437 から 537 を検索範囲とした。

B-4. H ϵ 付加体の合成と測定

4-hydroxy-2-nonenal (1.97 g) をジクロロメタン (50 ml) に溶解し、活性化酸化マンガン (24 g) を加え室温で72時間インキュベーションした。反応液を濾過し、ジクロロメタンで洗浄後、ろ液をエバポレーターで乾固し ONE を得た。

20 ml の DW 水に溶解した dC (120 mg), dG (141 mg) 及び dA (132 mg) に、ONE (160 mg) を 1.2 ml のエタノールに溶解後添加し、72°C で24時間インキュベーションした。反応後、LC-MS/MS を用いて H ϵ 付加体のピークを確認し、HPLC による分取によって精製した。各付加体の分析には LC-MS/MS を用い、LC の分離条件ならびに MS/MS のイオン化条件は DNA アダクトーム解析と同一条件とした。H ϵ -dG, dA 及び dC はそれぞれ m/z 404>288, 388>272 及び 364>248 で検出した。本測定法を用いて、本年度の動物実験における対象群のラット肝臓及び腎臓サンプルから抽出した DNA 中の各付加体の測定を行い、検出感度の確認を行った。

B-5. 動物実験操作

動物は6週齢のF344系 *gpt delta* ラット20匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、CRF-1粉末基礎飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）と水道水で飼育した。動物の飼育はバリアーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18回/時（オールフレッシュ）、12時間蛍光灯照明/12時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに2又は3匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週

2回交換を行った。また、飼料及び水道水は試験期間中自由に摂取させた。*gpt delta* ラット20匹を各群5匹に配し、対照群とIQ, SFO 及びAlz投与群の計4群を設けた。IQ, SFO 及びAlzはそれぞれ200, 5000及び800 ppmの濃度で粉末飼料に混じて4週間投与した。対照群には水道水と基礎飼料を自由摂取させた。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週1回、一般状態観察を連日実施した。体重は開始から試験終了までは毎週1回測定した。

4週間の投与後、動物はイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓及び腎臓を採取し、重量を測定した。肝臓の外側左葉及び右腎の半分は10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、残りは *gpt assay* 用およびDNA損傷を評価するためのサンプルとして液体窒素により凍結し、測定まで-80°Cで保存した。

B-6. 8-OHdG 測定

DNA 中の8-OHdG測定は梅村ら⁴⁾の方法を参考にし、紫外・可視急行高度検出器 (UV) 及び電気化学検出器 (ECD) を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システムを用いた。HPLC ポンプは Gynkotek 480 (Gynkotek 社製)、カラムは Wakosil-5C18 (4.6 x 250 mm, 5 mm, 和光純薬社製)、UV は GILSON 118 (GILSON 社製)、ECD は Coulochem II® (ESA 社製) を使用した。移動相には 10 mM リン酸一ナトリウム溶液/メタノール=92/8 (v/v) を流速 1.0 ml/min の速度で送液した。UV 290 nm で dG を、ECD 300 mV で 8-OHdG を検出し、8-OHdG 値は 8-OHdG/10⁵dG 量として算出した。

B-7 *in vivo* 変異原性の検索

gpt assay では回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MF) を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコロニーの *gpt* 遺伝子配列を決定して変異部位を同定した。

Spi⁻欠失変異の検出では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA (P2) 株) に感染させ、Spi⁻プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の Spi⁻プラークを検出した。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の Spi⁻プラーク数を回収した総プラーク数で除して Spi⁻ MF を算出した。

(統計学的処理方法)

体重、腎重量、8-OHdG レベル、遺伝子突然変異頻度及び変異スペクトラム解析の統計学的処理は、一元配置の分散分析と Tukey

の多重比較検定により行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

C. 研究結果

C-1-1. 網羅的 DNA 損傷解析法の最適化

ES の DNA 付加体 ES-3' -*N*²-dG, C8-dG 及び *N*⁶-dA と、Luc の DNA 付加体 Luc-*N*²-dG 及び *N*⁶-dA を用いて HPLC 条件、イオン化条件を検討した。移動相のギ酸濃度を 0 から 0.1% の範囲で検討した結果、0.001% ギ酸において各 DNA 付加体の最大のピーク強度が得られた。移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.001% ギ酸含有) 及び溶液 B: アセトニトリル (0.001% ギ酸含有) を用い、溶液 A:B=95:5 から開始し、グラジエント機能により組成を変更し、30 分後に溶液 A: B=10:90 とし試料を溶出させた。本条件下において ES-3' -*N*²-dG, C8-dG 及び *N*⁶-dA は 16.6 分、11.5 分及び 18.7 分に、Luc-*N*²-dG 及び *N*⁶-dA は 18.4 分及び 22.6 分に溶出され、良好なピーク形状及び分離が得られることを確認した。

C-1-2. 網羅的 DNA 損傷解析の確認

本条件を用いて、ES を 600 mg/kg/day の濃度で 13 週間強制経口投与した F344 ラット肝臓から抽出した DNA を用いて、DNA アダクトーム解析に最適な DNA 量を確認した結果、DNA 量は 300 μ g 以上でノイズの上昇が生じたことから 300 μ g を最適とした。本条件で DNA アダクトームマップを作製した結果、計 4 種の ES 特異的付加体が検出されることを確認した (Fig. 1)。

C-2. H ϵ 付加体の測定法構築

H ϵ -dG, dA 及び dC の標準品の multiple-reaction monitoring (MRM) クロマトグラムとラット肝臓及び腎臓の MRM クロマトグラムを Figure 2 に示す。本実験で設定した LC-MS/MS 条件下において H ϵ -dG, dA 及び dC はそれぞれ 16.0, 17.0 及び 17.2 分に検出された。対照群のラット肝臓及び腎臓を用いて測定を行った結果、肝臓ではすべての付加体が検出され、腎臓では H ϵ -dA 及び dC のピークが検出されたものの、H ϵ -dG は検出限界 (signal/noise; s/n=3) 以下であった。

C-3. 網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験

C-3-1. 被験物質の投与

最終体重及び腎重量を Table 1 に示す。最終体重では IQ 投与群において対照群に比して増加傾向が認められたが、有意な変化ではなかった。臓器実重量では、SFO 投与群で肝臓及び腎臓の有意な高値 ($p < 0.01$) が認められ、相対重量においても有意な高値 ($p < 0.01$) を示した。

C-3-2. 酸化的 DNA 損傷解析

酸化的 DNA 損傷の指標である 8-OHdG レベルを Figure 3 に示す。対照群の 8-OHdG レベルは肝臓が 0.36 ± 0.03 , 腎臓は 0.38 ± 0.09 であった。IQ 投与群では肝臓 (0.46 ± 0.12) 及び腎臓 (0.40 ± 0.07) ともに対照群に比して有意な変化は認められなかった。SFO 投与群では肝臓 (0.60 ± 0.03) において対照群に比して有意 ($p < 0.05$) な上昇が認められたが、腎臓 (0.42 ± 0.05) では変化は認められなかった。Alz 投与群では肝臓 (0.51 ± 0.18) で変化は認められなかったものの、腎臓 (1.40 ± 0.37) では対照群に比して有意 ($p < 0.01$) な上昇が認められた。

C-3-3. 網羅的 DNA 損傷解析

IQ 投与群では m/z 395 から 495 の範囲を検索し、対照群と比較した。肝臓及び腎臓の DNA アダクトームマップを Figure 4 に示す。肝臓では [m/z 464, 12.8 min] の大きなスポットと、 [m/z 486, 12.8 min], [m/z 480, 12.8 min], [m/z 464, 11.2 min] 及び [m/z 448, 12.5 min] に小さなスポットを検出した。 [m/z 464, 12.8 min] の MS スペクトラムを Figure 5-A に示す。MS スペクトラム上には特徴的なフラグメントイオンとして m/z 348 ($[M+H-116]^+$), m/z 303 及び m/z 224 が検出されたことから、IQ と dG の C-8 位の付加体と考えられ、過去に報告されている IQ-C8-dG と同定した⁵⁾。また、同一の保持時間で検出された [m/z 486, 12.8 min] は IQ-C8-dG の Na 付加体 $[M+Na]^+$ と同定した。 [m/z 448, 12.8 min] の MS スペクトラムを Figure 5-B に示す。MS スペ

クトラム上には特徴的なフラグメントイオンとして m/z 332 ($[M+H-116]^+$), m/z 239 及び m/z 224 が検出されたことから, IQ と dA の付加体と考えられ, 過去に *in vitro* での生成が報告されている IQ- N^6 -dA と同定した. $[m/z$ 464, 11.2 min] では明瞭な MS スペクトラムが得られなかったが, その質量数から IQ と dG の付加体と考えられ, 過去に *in vivo* での生成が報告されている IQ- N^2 -dG と考えた⁵⁾. 一方, IQ-C8-dG と同時に検出されたスポット $[m/z$ 480, 12.8 min] は IQ-C8-dG に由来するイオンと考えられたが, 同定には至らなかった. また, m/z 431 から 440 の範囲で 8.0 分付近に複数のスポットが検出されたが, これらのスポットについても同定には至らなかった. 腎臓では, 肝臓で検出されたスポットのうち IQ-C8-dG 及び IQ- N^6 -dA が検出され, それぞれのピーク面積は 1/5 程度であった (Fig. 6-A).

SF0 投与群では m/z 358 から 458 の質量範囲を検索し, 対照群と比較した. 肝臓及び腎臓の DNA アダクトームマップを Figure 7 に示す. 肝臓では $[m/z$ 428, 15.6 min], $[m/z$ 412, 17.5 min] 及び $[m/z$ 450, 15.6 min] に大きなスポットと, $[m/z$ 428, 12.4 min], $[m/z$ 428, 15.0 min], $[m/z$ 388, 14.9 min] 及び $[m/z$ 444, 15.6 min] に小さなスポットを検出した. $[m/z$ 428, 15.6 min] の MS スペクトラムを Figure 8-A に示す. MS スペクトラム上には m/z 312 ($[M+H-116]^+$), 164, 161 及び 135 の特徴的なフラグメントイオンが検出されたことから, SF0 と dG の N^2 位の付加体と考えられ, 過去に *in vivo* でも生成が報告されている SF0-3' - N^2 -dG と同定した⁶⁾. また,

SF0-3' - N^2 -dG と保持時間が一致する $[m/z$ 450, 15.6 min] は, SF0-3' - N^2 -dG の Na 付加体 $[M+Na]^+$ と同定した. $[m/z$ 412, 17.5 min] の MS スペクトラムを Figure 8-B に示す. MS スペクトラム上には特徴的なフラグメントイオンとして m/z 296 ($[M+H-116]^+$), 161, 148 及び 119 が検出されたことから, IQ と dA の N^6 位の付加体と考えられ, 過去に ³²P-postlabelling 法で報告されている SF0-3' - N^6 -dA と同定した⁷⁾. また, $[m/z$ 428, 12.4 min] 及び $[m/z$ 428, 15.0 min] では明瞭な MS スペクトラムが得られなかったが, その質量数から SF0-3' - N^2 -dG の異性体と考えられ, 構造類似物質である ES の付加体生成パターンを考慮した結果, SF0-3' - N^2 -dG と極性が近い $[m/z$ 428, 15.0 min] は SF0-1' - N^2 -dG, 極性が異なる $[m/z$ 428, 12.4 min] は SF0-3' -C8-dG と考えられた⁶⁾. $[m/z$ 388, 14.9 min] は SF0 と dC の付加体と質量数が一致することから, SF0-3' - N^4 -dC と考えられた. 一方, SF0-3' - N^2 -dG と同時に検出されたスポット $[m/z$ 444, 15.6 min] は SF0-3' - N^2 -dG に由来するイオンと考えられたが, 同定には至らなかった. これらのスポットのうち SF0-3' - N^2 -dG 及び SF0-3' - N^6 -dA は腎臓においても検出されたものの, それぞれのピークエリアは 1/600 及び 1/100 以下であった (Fig. 6-B).

Alz 投与群の肝臓, 腎臓で検出されたスポットは対照群のスポットと一致し, 投与に起因する変化は認められなかった (Figure 9).

各投与群の肝臓及び腎臓で検出された特徴的なスポットの m/z , 保持時間及び予想された DNA 付加体を Table 2 に示す.

C-3-4. *in vivo* 変異原性の検索

gpt 及び Spi⁻ assay の結果を Table 3-6 に、*gpt* 変異体の変異スペクトラム解析の結果を Table 7 に示す。対照群の肝臓における *gpt* 遺伝子変異体頻度(MF) 及び Spi⁻ MF は 0.76 ± 0.36 及び 0.43 ± 0.13 であった。また、腎臓の *gpt* 及び Spi⁻ MF は 0.73 ± 0.41 及び 0.26 ± 0.14 であった。

IQ 投与群の肝臓では、対照群に比して *gpt* 及び Spi⁻ MFs の有意な上昇 (23.02 ± 3.60 , $p < 0.01$ 及び 7.41 ± 1.42 , $p < 0.01$) が認められ、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析では GC-TA ($p < 0.01$) 及び AT-TA transversion ($p < 0.01$) と single bp deletion ($p < 0.01$) の頻度の有意な増加が認められた。また、腎臓においても *gpt* 及び Spi⁻ MF の有意な上昇 (7.04 ± 1.34 , $p < 0.01$ 及び 2.39 ± 0.94 , $p < 0.01$) が認められた。

SF0 投与群の肝臓では、対象群に比して *gpt* MF の上昇傾向(約 2.5 倍)が認められ、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析では GC-TA transversion ($p < 0.05$) と AT-GC transition ($p < 0.01$) の頻度の有意な増加が認められた。一方、肝臓の Spi⁻ MF と腎臓の *gpt* 及び Spi⁻ MF において変化は認められなかった。

Alz 投与群では肝臓及び腎臓ともに *gpt* 及び Spi⁻ の有意な変化は認められなかった。

D. 考察

D-1. 網羅的 DNA 損傷解析法

ES を 600 mg/kg/day の濃度で 13 週間投与したラット肝臓では、既知の ES-N⁶-dG, C8-dG 及び dA と、新たに dC の付加体を検

出することができ、そのスポットの大きさは過去に報告した定量値に比例していた。

これらの結果から、網羅的 DNA 損傷解析法を用いることで未知の DNA 付加体の検出とその生成量についての考察が可能であると考えられた。

D-2. Hε 付加体の測定法構築

対照群のラットにおいて Hε-dC は肝臓、腎臓ともに検出され、そのピーク強度から定量解析が十分可能であり、酸化的 DNA 損傷の指標として有用なマーカーになると考えられた。一方、Hε-dG は腎臓において検出限界 ($s/n=3$) 以下であること、Hε-dA は肝臓において定量限界 ($s/n=10$) 以下であることから、両付加体についてはより高感度な検出が可能な測定条件を検討する必要があると考えられた。

D-3. 網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験

遺伝毒性発がん物質である IQ では、発がん標的臓器である肝臓において種々の DNA 付加体形成と *gpt* 及び Spi⁻ MF の有意な上昇が認められた。アダクトームマップのスポットの大きさから IQ-C8-dG の生成が最も多いことが示され、IQ-C8-dG によって生じることが知られている GC-TA transversion が *gpt* 遺伝子において高頻度に認められた。さらに、本法では IQ-N⁶-dA と考えられるスポットが検出され、*gpt* 遺伝子では AT-TA transversion の頻度も増加したことから、IQ-C8-dG に加え IQ-N⁶-dA も IQ の肝発がん性に寄与すると考えられた。また、Spi⁻ MF の上昇から、これら DAN 損傷の蓄積が大型の欠失変異を引き起こすこと

が示唆された。一方、IQの非発がん標的臓器である腎臓においてもIQ-C8-dG及び N^6 -dAのスポットが検出された。そのピーク面積は肝臓の1/5程度であったが、*gpt*及びSpi⁻MFは対照群に比して約10倍の有意な上昇が認められており、IQがラット腎臓においても潜在的な発がん性を有する可能性が示唆された。

SFOの発がん標的臓器である肝臓では*gpt* MFの上昇傾向が認められ、*gpt* 遺伝子ではGC-TA transversionと特徴的なAT-GC transitionが高頻度に認められた。DNAアダクトームマップでは、主な付加体であるSFO-3'- N^6 -dGとその異性体であるSFO-3'-C8-dG及び N^2 -dGが検出された。さらに、GC-TA transversionを引き起こすことが知られている8-OHdGも有意に増加したことから、これらdGの直接的及び酸化的修飾の両方がGC-TA transversionに寄与していると考えられた。また、SFOではdAの修飾体であるSFO-3'- N^6 -dAも主なスポットとして検出されており、本修飾体がAT-GC transitionを引き起こす特徴的な変異ポテンシャルを有する可能性が示唆された。一方、非発がん標的臓器である腎臓においてもSFO-3'- N^2 -dG及びSFO-3'- N^6 -dAが検出されたが、その量は肝臓に比べ極めて微量であり、*gpt*及びSpi⁻MFの変化も認められなかったことから、SFOのDNA傷害性及び突然変異誘発性と発がん臓器特異性は一致した。

非発がん物質であるAlzでは肝臓、腎臓ともにDNA付加体は検出されなかったが、腎臓において強い酸化的DNA損傷を引き起こした。しかし、突然変異誘発性は肝臓、腎臓ともに認められなかったことから、Alz

による酸化的DNA損傷は遺伝子突然変異には結びつかないものと考えられた。

D-4. 本法の有用性評価

IQ, SFO, Alzを用いて網羅的DNA損傷解析と*in vivo*変異原性の包括試験の有用性を検討した結果、DNAアダクトーム解析による網羅的DNA損傷解析はIQ及びSFOから生じる種々のDNA付加体の検出が可能で、MSスペクトラム解析から得られる構造情報から付加体の構造同定または推定が可能であった。今後、様々な付加体のMSスペクトラムを得ることで、より正確な構造推定が可能になると考えられた。また、DNA傷害性を有さないAlzのアダクトームマップでは明らかに陰性であることが確認でき、本法ではDNA傷害性の有無の正確な判定が可能と考えられた。一方、SFO及びAlzでは8-OHdGレベルの上昇が認められ、SFOの遺伝毒性への酸化的DNA損傷の寄与も示唆されたことから、直接的DNA損傷の検索に加え酸化的DNA損傷の評価の重要性が示された。今後、LPO由来のHε付加体の解析法を組み合わせることで、より詳細な酸化的DNA損傷の評価が可能になると考えられる。また、本法から得られたデータから、DNA損傷の生成パターンと変異パターンを組み合わせた考察が可能であり、各DNA付加体が有する変異ポテンシャルの特徴についても推測することが可能であった。さらに、非発がん臓器で認められたDNA損傷及び変異原性は、被験物質の潜在的な遺伝毒性や発がん性を示すものと考えられ、これらの情報も化学物質の正確な遺伝毒性評価を行ううえで重要であると考えられた。

E. 結論

本研究で構築した DNA アダクトーム解析による網羅的 DNA 損傷解析を用いることで、化学物質による DNA 傷害性を正確かつ迅速に評価可能であった。また、*gpt delta* ラットを用いた包括的試験法は、化学物質の変異原性の有無と、その原因となる DNA 損傷を評価できることから、より詳細な化学物質の遺伝毒性評価が可能であった。今後、様々な化学物質に本法を適応しデータを蓄積することで、環境化学物質の遺伝毒性予測やそのメカニズム解明に有用なツールになると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

- 1) Ishii, Y., Takasu, S., Matsushita, K., Kuroda, K., Nohmi, T., Ogawa, K., Umemura, T. Combinational assessment of DNA adductome analysis and reporter gene mutation assay for chemical carcinogenesis. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2012年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし。

(参考文献)

- 1) Masumura, K., Horiguchi, M., Nishikawa, A., Umemura, T., Kanaki, K., Kanke, Y., Nohmi, T. Low dose genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in *gpt delta* transgenic mice. *Mutat. Res.* 541, 91-102, 2003.
- 2) Kanaly, R. A., Hanaoka, T., Sugimura, H., Toda, H., Matsui, S., Matsuda, T. Development of the adductome approach to detect DNA damage in humans. *Antioxid Redox Signal.* 8, 993-1001, 2006.
- 3) Ishii, Y., Inoue, K., Takasu, S., Jin, M., Matsushita, K., Kuroda, K., Fukuhara, K., Nishikawa, A., Umemura, T. Determination of lucidin-specific DNA adducts by liquid chromatography with tandem mass spectrometry in the livers and kidneys of rats given lucidin-3-O-primeveroside. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1112-1118, 2012.
- 4) Umemura, T., Kuroiwa, Y., Tasaki, M., Okamura, T., Ishii, Y., Kodama, Y., Nohmi, T., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Hirose, M. Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and in vivo mutagenicity induced by dicyclanil, a non-genotoxic carcinogen, using *gpt delta* mice. *Mutat. Res.* 633, 46-54, 2007.
- 5) Turesky, R. J., Markovic, J., Aeschlimann, J. M. Formation and differential removal of C-8 and N2-guanine adducts of the food carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline in the liver, kidney, and colorectum of the rat. *Chem. Res. Toxicol.* 2, 397-402, 1996.
- 6) Chung, Y. T., Chen, C. L., Wu, C. C., Chan, S. A., Chi, C. W., Liu, T. Y. Safrole-DNA adduct in hepatocellular carcinoma associated with betel quid chewing. *Toxicol. Lett.* 183, 21-27, 2008.
- 7) Wiseman, R. W., Fennell, T. R., Miller, J. A., Miller, E. C. Further characterization of the DNA adducts formed by electrophilic esters of the hepatocarcinogens 1'-hydroxysafrole and 1'-hydroxyestragole in vitro and in mouse liver in vivo, including new

adducts at C-8 and N-7 of guanine residues. *Cancer Res.* 45, 3097-3105, 1985.

Fig. 1 DNA adductome maps of liver of rats treated with ES for 13 weeks. Black and orange spots are indicating control and ES-treated rats, respectively. Red spots are indicating putative ES-specific DNA adducts.

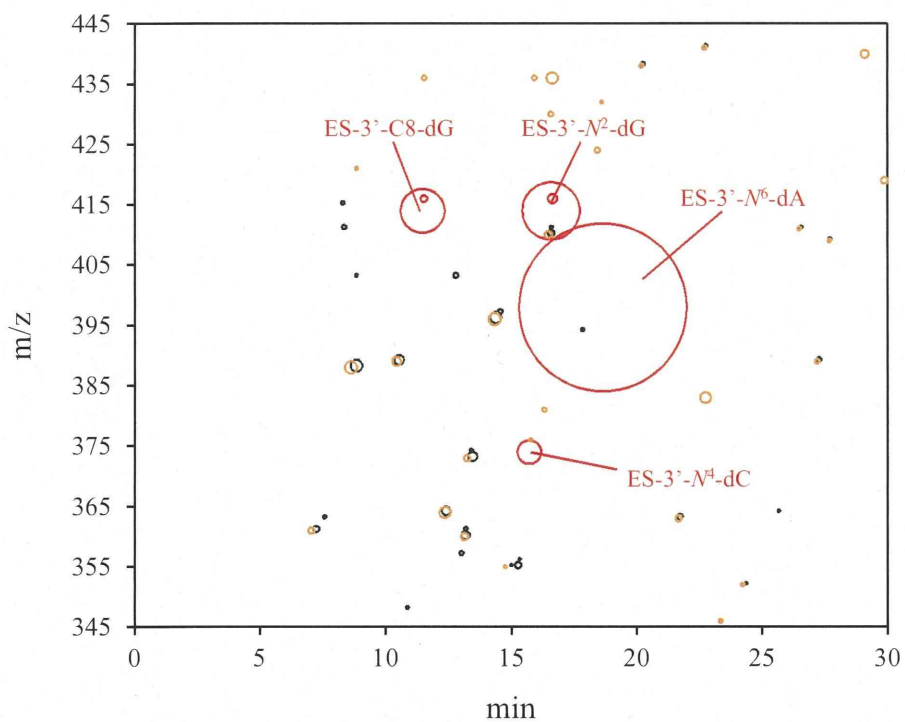


Fig. 2 MRM chromatograms of ONE induced Hε-dG (A), dA (B) and dC (C) adducts at m/z 404>288, 388>272 and 364>248 in the livers and kidneys of non-treated 10-weeks male F344 *gpt* delta rats and analytical standard

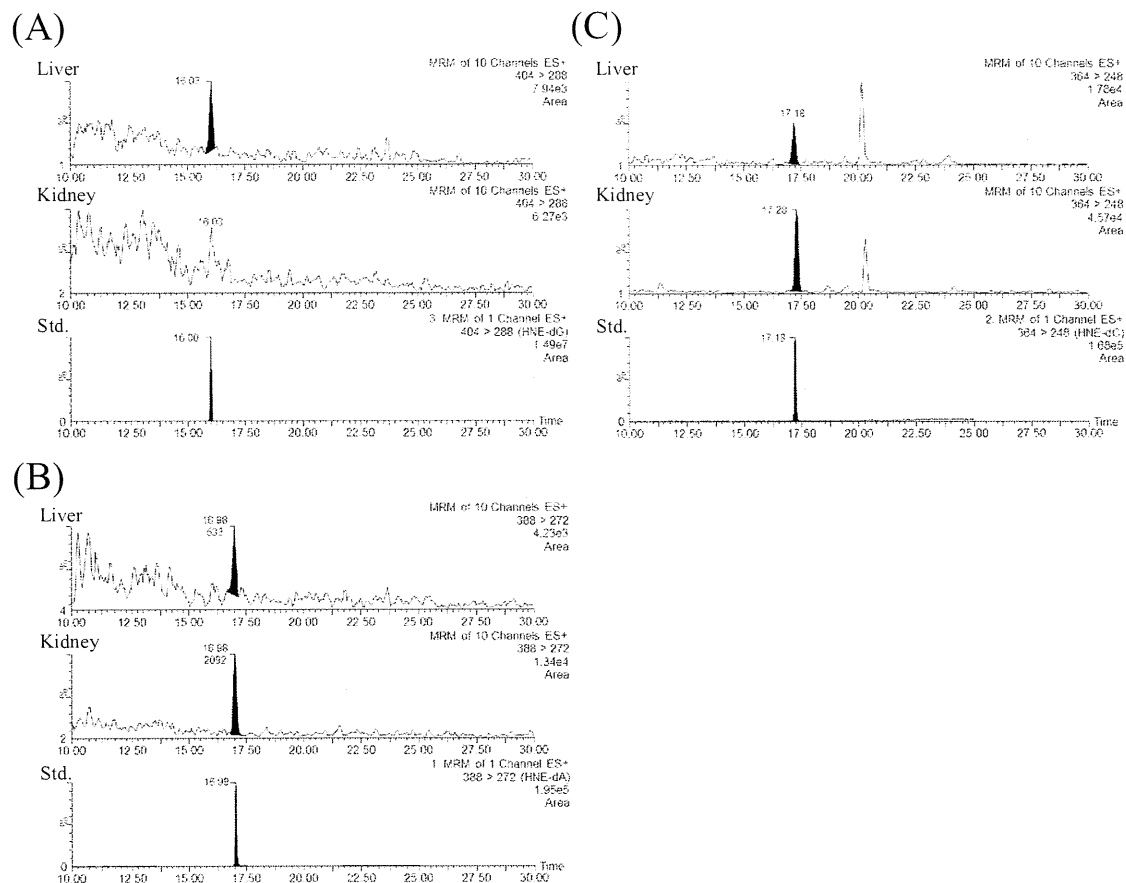
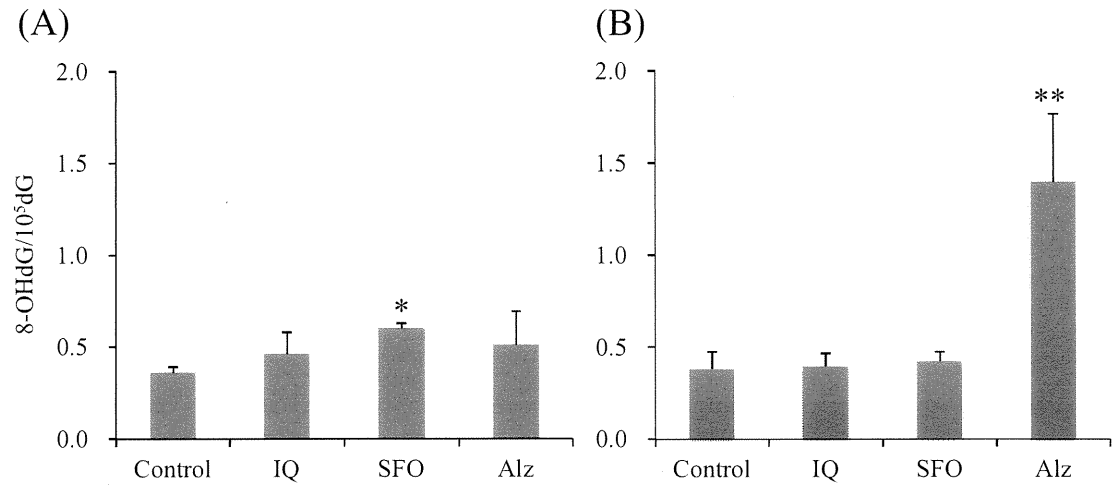


Fig. 3 8-OHdG levels in the livers (A) and kidneys (B) of F344 *gpt* delta rats treated with IQ, SFO and Alz for 4 weeks.



***: $p < 0.05, 0.01$ vs. Control

Fig. 4 DNA adductome maps of Liver (A) and kidney (B) of rats treated with IQ for 4 weeks. Black and orange spots are indicating control and IQ-treated rats, respectively. Red spots are indicating putative IQ-specific DNA adducts.

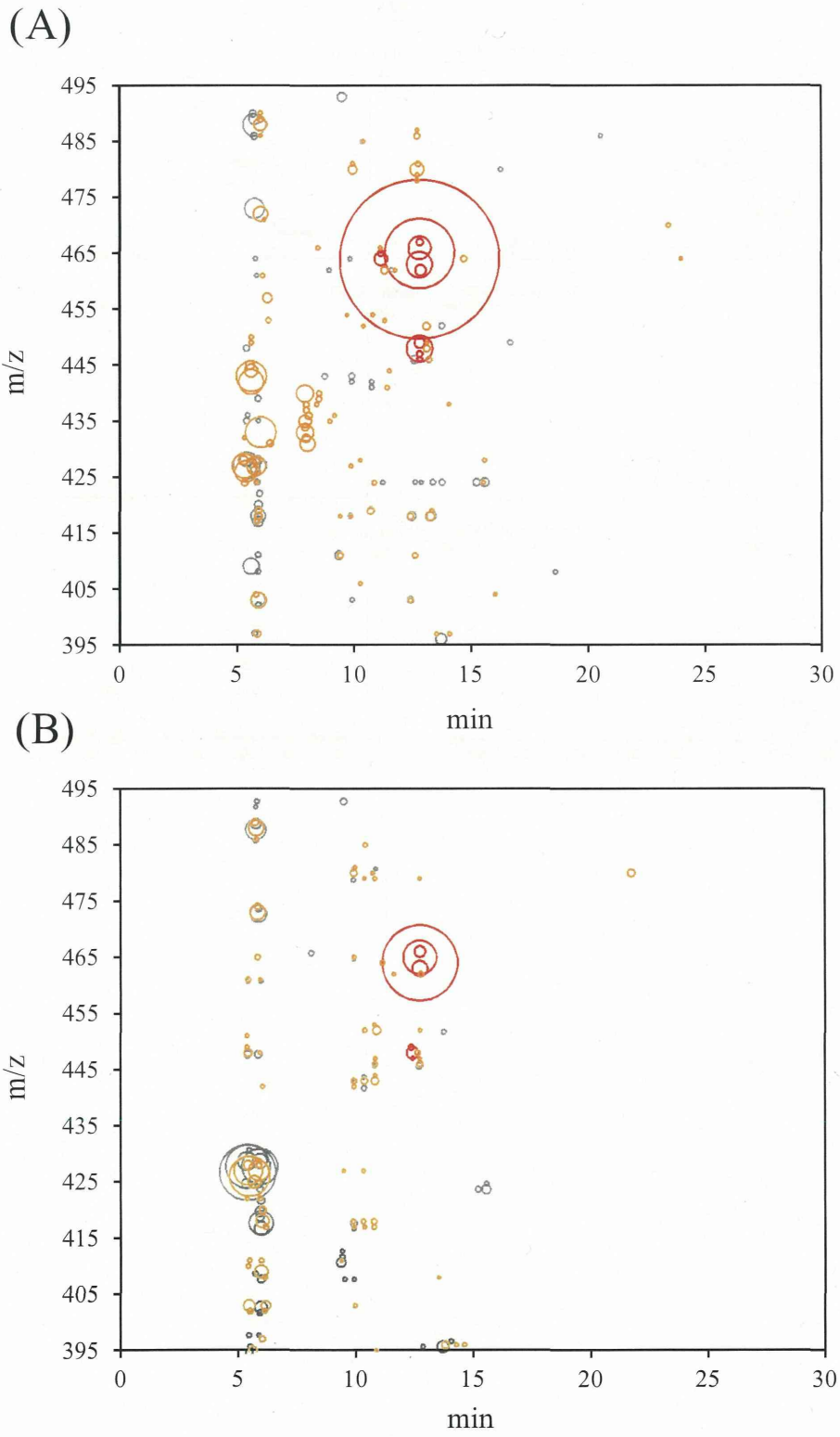


Fig. 5 Product ion spectra of putative IQ-C8-dG (A) and IQ-N⁶-dA (B). The cone voltages and collision energies were set at 15 V and 20-60 eV in the positive ion mode, respectively.

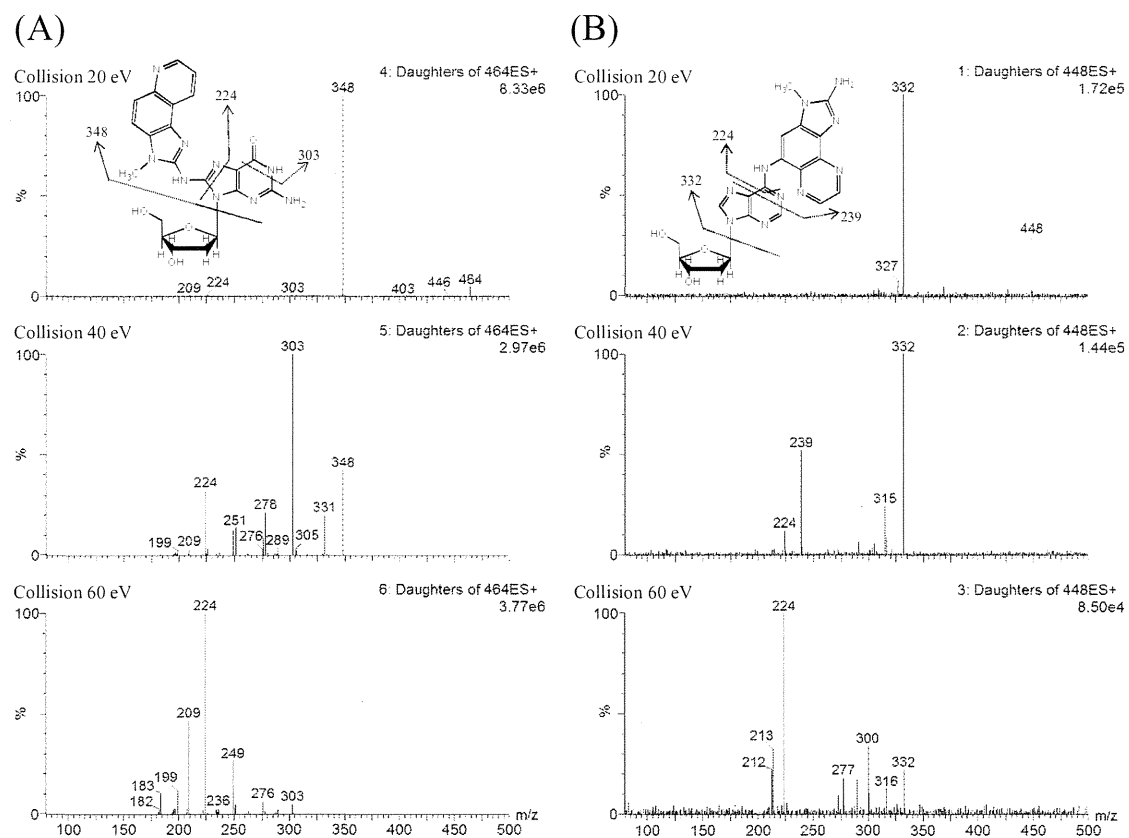


Fig. 6 Representative MRM chromatograms of the IQ- (A) or SFO- (B) induced putative DNA adducts in the livers and kidneys of F344 *gpt* delta rats

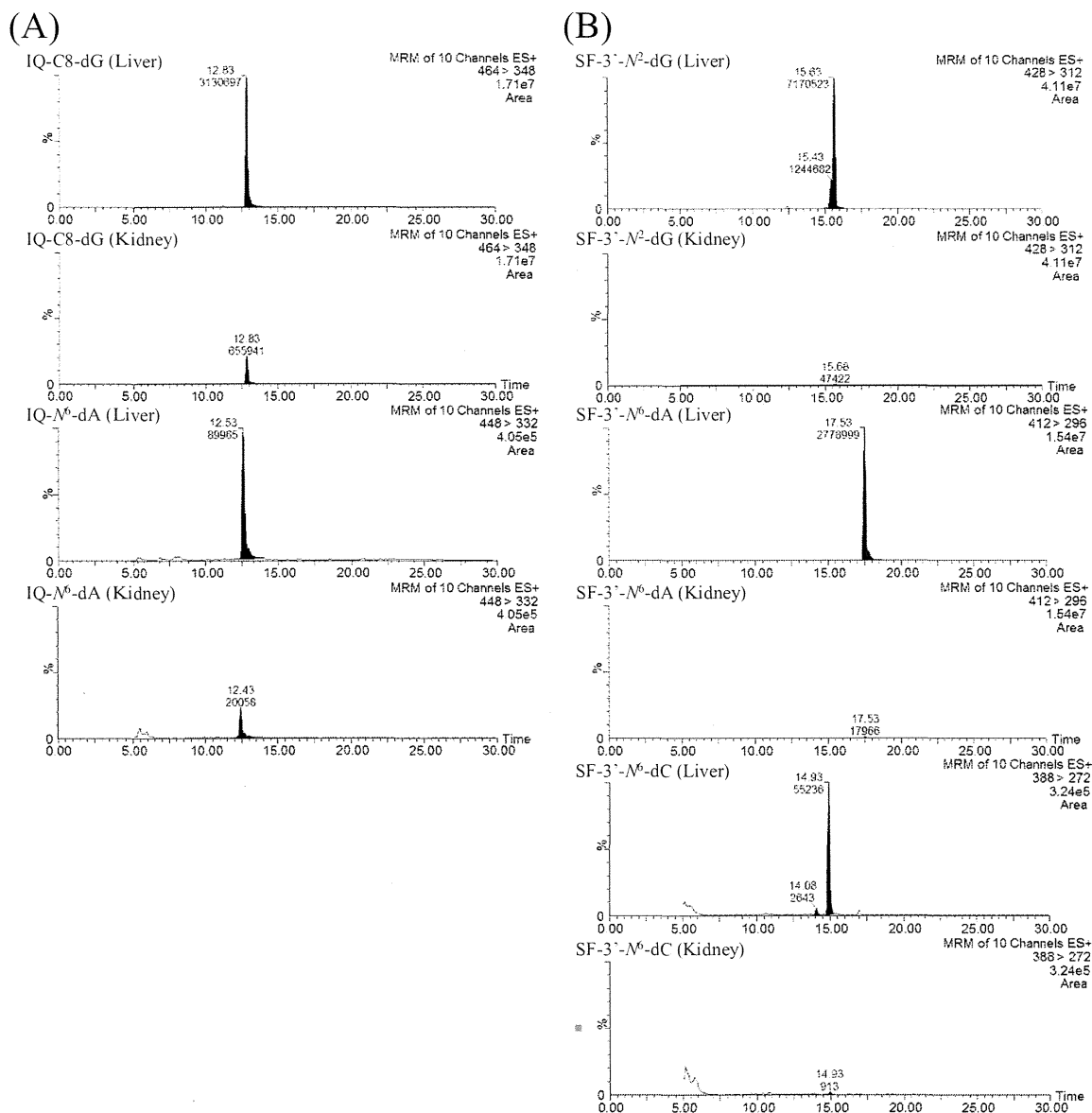


Fig. 7 DNA adductome maps of Liver (A) and kidney (B) of rats treated with SFO for 4 weeks. Black and orange spots are indicating control and SFO-treated rats, respectively. Red spots are indicating putative IQ-specific DNA adducts.

