

4-1) 「発がん性物質」かつ「Tg dataあり」128物質のうち、Ames positiveかつTg negative 18物質

Chemical	Chemogenicity targets	Tg	Targets performed in Tg
1,2-Dichloroethane	liver, lung	-	
Hydrazine sulphate	liver, lung	-	
Phenobarbital	liver	-	
3'-Ochloro-4'-chloromethyl-5-hydroxy-2'(5H)-furanone (MX)	liver, lung	-	
Decl tar	liver	-	
3-Nitrobenzanthrone	lung	-	
Chrysene	lung	-	
Methyl bromide	stomach	-	
3-Amino-1-methyl-5-Hydroxy(4,3-b)Indole (Trp-P-2)	small intestine	-	
1,2,4-Diacybutane	nasal mucosa, lung, skin, Harderian gland (-)		Tg negative in bone marrow, ovarian granulosa
1,2-Dichloroethane	stomach, subcutaneous tissue, vasculature (-)		Tg negative in liver, testis
Acrylonitrile	salivary gland, nervous system, no (-)		Tg negative in bone marrow, brain, lung, spleen lymphocytes, testicular germ cells
Cocaine	uterus	no (-)	Tg negative in heart, mammary gland
Malic acid	thyroid	no (-)	Tg negative in liver
Metronidazole	pituitary gland, testes, liver, mammary (-)		Tg negative in stomach

4-2) 「発がん性物質」かつ「Tg dataあり」128物質のうち、Ames negativeかつTg positive 18物質

Chemical	Chemogenicity targets	Tg	Targets performed in Tg
4-chloro-6-(2,5-pyridinediyl)nicotinic acid(AKA V)liver		+	
Benzene	lung, haematopoietic (bone marrow), b+	+	
Doxepam	liver	+	
Procaine HCl(Naluba)	lung, haematopoietic (bone marrow), b+	+	
Uracil	bladder	+	
Demifrey	liver	+	
Cyproterone acetate	liver	+	
Dicyclanil	liver	+	
Tamoxifen	liver	+	
Amosite asbestos	lung	+	
Crocidolite asbestos	lung	+	
Ferric nitrosulfate	kidney	+	
Hexachlorobutadiene	kidney	+	Tg positive in kidney, negative in bone marrow, liver
Acrylamide	nervous system, peritoneal cavity, thymus (-)		Tg positive in bone marrow, negative in liver, testicular germ cell
DD-1085	lung	no (-)	Tg positive in liver

2014.02 sensitivity, specificity, concordanceまとめ
 total 267 (Carcinogen 128, noncarcinogen 23, carcinogenicity unknown 68, combined exposure 48)

1-1) 「発がん性物質」かつ「発がん標的組織でのTg dataあり」
 105件

		Tg positive	Tg negative
	128	87	41
carcinogen	105	79	26
non-carcinogen	23	8	15

(%)
 sensitivity $79/105 = 75.2$
 specificity $15/23 = 65.2$
 concordance $(79+15)/128 = 73.4$

1-2) 「発がん性物質」かつ「Tg dataあり」
 128件
 (= 105件 + Tg解析組織が発がん標的でない19件 + 発がん標的不明4件)

		Tg positive	Tg negative
	151	102	49
carcinogen	128	94	34
non-carcinogen	23	8	15

(%)
 sensitivity $94/128 = 73.4$
 specificity $15/23 = 65.2$
 concordance $(94+15)/151 = 72.2$

2) 「発がん性物質」かつ「Tg dataあり」
 128件

		Tg positive	Tg negative	
	128	94	34	sensitivity 0.734375
Ames positive	91	76	15	
Ames negative	32	15	17	
Ames nd	5	3	2	
sensitivity	0.7109375			concordance 0.726563

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

分担研究課題名：In vivo遺伝毒性試験の低用量リスク評価法に関する研究

分担研究者： 鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長

研究協力者： スレッシュティルパッティ 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部

研究要旨

遺伝毒性の定量的リスク評価に向けて、特に低用量でのヒトに対するリスク評価モデルの構築は重要な課題となっている。ヒトが通常曝露される用量において、実際のヒトサンプルを用いた曝露評価を可能とし、動物モデルを併用したリスク評価法の確立をめざすため、我々はヒト試料を用いた遺伝毒性物質に対する新たな曝露指標として、LC-MS を用いたプロテオーム解析によるタンパク質の遺伝毒性物質による付加体の検出法の確立を行った。遺伝毒性物質に対する付加体としてはすでに DNA 付加体の研究が先行しているが、DNA までの到達性を含めた反応性の低さと、DNA 修復の存在により、低用量の遺伝毒性物質に関する感度は十分であるとはいえない。これに対し、ヘモグロビンやアルブミン等の血清タンパクは、直接血中の遺伝毒性物質と接触し、DNA のような修復のメカニズムも存在しないため、より高感度に付加体を検出できる可能性がある。実際にアクリルアミドやグリシドールといった食品由来の微量な遺伝毒性物質に対する付加体の検出が、ヒトのサンプルを用いて可能であることが報告されている。我々は、より網羅的にタンパク質に対するアダクトを検出するという目的から、「タンパク質アダクトーム解析」を提唱し、LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析によるアプローチを開始した。今年度は、グリシドールをモデルケースとして、ラットおよびヒトのヘモグロビンおよび血清アルブミンに対するアダクトの検出を、すでに報告されているエンドマン分解法と比較して報告する。

A. 研究目的

従来変異原性試験は発がん性の短期予測として用いられ、その相関性が議論されてきたが、そこでは主に陽性か陰性かという定性的な観点からの議論が中心であった。元来、変異原性試験の結果をヒトへのリスク評価へと応用する場合には、規制値の設定など定量的な評価が必要とされる

局面が多い。にも関わらず、変異原性試験の評価において、定量的な試験結果の取り扱いが少ないため、新たなアプローチが必要とされている。遺伝子傷害性発がん物質には閾値はないという概念から低用量でのリスク評価には直線性に基づいた外挿による評価がなされているが、低用量における用量反応性の評価が難しいことから、実験的な根拠がないまま使われている状態である。

特にヒトでのリスク評価においては低用量での曝露評価が重要となるため、より現実に近い定量的評価法として低用量での用量反応性の予測が重要な課題となっている。本研究においては、定量性という概念からよりヒトにおける曝露状況およびリスクをきちんと評価するために、実際のヒトサンプルを用いた評価系の確立をめざした。低用量の曝露影響の評価のためには、その用量においても検出が可能となるようなバイオマーカーの利用が必要であり、そうした観点から、従来用いられてきた DNA ではなく、より反応性の高いと考えられる血中タンパク質に着目し、これらに対する遺伝毒性物質の付加体の検出を試みた。すでに一部の研究において、食品中の化学物質によるヘモグロビン等の付加体の形成が知られている(図1)が、これらはタンパク質上の特定の位置の特定の種類の付加体の測定に限定される(図2)。我々は、未知の付加体を含めて、さらに網羅的にタンパク質への付加体反応物を検索することを可能とする目的で、ナノ LC-MS/MS を用いた高感度なショットガンプロテオミクス解析を応用し、「タンパクアダクトーム」解析という新たなアプローチを行った。これらにより、食品等に含まれて人が摂取する化学物質の発がんリスクに対して、定量的に評価し、必要な基準値等の設定に有効な理論的根拠を提供することが可能となる。

B. 研究方法

1. ヘモグロビンサンプルの LC-MS/MS によるプロテオーム解析

今回実験に使用したグリシドール処理したラットヘモグロビンおよびヒトヘモグロビンサンプルは、花王株式会社の笠松俊夫博士よりご恵与いただいた。用いたヘモグロビンの調製法を図3に示す。

プロテオーム解析に関しては、以下の方法に従った。(図4)

1) タンパク質の溶解および消化条件

ヘモグロビンサンプル 1mg を 1ml の超純水に

溶解し、このうち 40 μ l を GL-Tip SDB (GL サイエンス) を用いて精製し、溶出したヘモグロビンを真空乾固後、15 μ l のタンパク溶解液 Rapigest(Waters)0.1% に溶解させた。

タンパクの溶解後、トリプシンによる消化を促進するために、以下の条件にてタンパク質 S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。タンパク溶液 30 μ l に、30 μ l の 10mM DDT を加え、60 $^{\circ}$ C 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 μ l の 30mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液 (Trypsin Gold, Promega) を 4.6 μ l (0.25 μ g/ μ l) 加え、37 $^{\circ}$ C で一晩消化した。消化液を、ZipTip C18-P10 (Millipore)にて精製後、LC-MS 解析に用いた。

2) LC-MS 測定条件

ナノ LC として、ADVANCE S Nano LC System (Michrome)を使用した。オートサンプラーにて試料を導入し、配管には内径 50 μ m のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (AMR, ZAPOLOUS) およびトラップカラム (CERI, L-column micro)を使用した。移動相は A (2% アセトニトリル、0.1% ギ酸) ,B(80% アセトニトリル、0.1% ギ酸)の2種類の組成の溶媒を用い、A100%から B100%へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。サンプルの必要量、最適なグラジエント組成、流速等の測定条件について検討を行なった。

質量分析装置としては、当研究所にて共同利用機器として使用可能な四重極/FT 型のタンデム質量分析装置 Q-Exactive (Thermo Scientific)を用い、前述のナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブモードを使用した。逆相 C18 カラム (AMR 製 Zaplous Column α 0.1 mm x 50 mm) にてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェース (Captive Spray, AMR)にて質量分析装置へと導入した。

質量分析装置の設定に関しては、基本的に以下

の項目に関して最適な MS 測定条件を検討した。

(MS 測定)

•MS 質量範囲	300-2000 m/z
•Total Analysis Time	110 min
•Resolution	70,000
•Accumulation time	250 ms
•Spray Voltage	1400-1800 V
•Automatic Gain Control	5e6

(MS/MS 測定)

•Resolution	17,000
•Accumulation time	50 ms
•Automatic Gain Control	5e5
•MS/MS 測定条件	上位 3 ペプチドを自動 選択。

(LC 測定)

•LC 流速	150-300 nl/min
•LC グラジエント	A 溶媒 (2%アセトニ トリル, 0.1%ギ酸) と B 溶媒 (80%アセトニ トリル, 0.1%ギ酸) によりグラジエント。

3) データ解析ソフトウェアによるノンラベル定
量解析

Q-Exactive による質量分析データ (RAW 形式)
は、基本的に付属のソフトウェアである Xcalibur
を用いて解析し、基本的にデータ依存的 MS/MS
測定を同時に行った。また、定量比較のための解
析ソフトウェアとして“Progenesis LC-MS”

(Nonlinear Dynamics) を採用し、比較プロテ
オーム解析に利用した。

本ソフトウェアは、二次元電気泳動のゲルスポ
ットの定量比較のために開発されたソフトウェ
アを基本とし、LC-MS 用に開発されたものであ
る。Q-Exactive からの生データである Raw 形式
のファイルを直接読み込むことができ、3D グラ
フ化が可能である。この画像化されたデータを元
に、異なるサンプル間のリテンションタイムの補
正を行うことにより、ペプチドスポットのマッ
チングを行い、複数のサンプル間の定量比較および、
統計解析を行うことが可能である。また、MS/MS
データを含む複数の Raw データを統合して

MASCOT 検索を行う機能もあり、同定結果を取
り込んで、タンパクレベルでの解析を行うことも
できる。

4) データベース検索によるタンパク質の同定

MS/MS 測定から得られたフラグメントイオン
パターンより、ペプチドマスフィンガープリンテ
ィング法によるタンパク質の同定を行うための
解析ソフトである MASCOT(Matrix Science)を
用いて、SwissProt プロテインデータベースを検
索した。MASCOT の検索パラメーターとしては
デフォルト値を用い、固定修飾としてシステイン
のカルバミドメチル化を、可変修飾として、メチ
オニンの酸化、およびセリン、スレオニン、チロ
シンのリン酸化に加えて、N 末端およびアルギニ
ン (R)、リジン (K)、ヒスチジン (H) とシステイ
ン (C) 残基のグリシドール修飾

(1,2-dihydroxypropyl)

を設定した。同定の信頼性には、MASCOT のデ
フォルト値である、 $p < 0.05$ を用い、切断ミス許
容数 1 にて検索を行った。

2. 血清中のアルブミン付加体の解析

既に我々の研究室にて得られている市販ヒト
血清からの LC-MS データを用い、上記のグリシ
ドール修飾を付加したデータベース検索により、
血清アルブミンのグリシドール付加体の検索を
行った。そして、グリシドール修飾ペプチドおよ
び非修飾ペプチドの溶出位置を、Progenesis
LC-MS による解析データ上で確認した。

3. 異なるアルキル化剤によるヘモグロビンの修 飾と N 末端付加体の検出

通常解析におけるトリプシン消化に先立つ
還元アルキル化反応において用いられているア
ルキル化剤であるヨードアセトアミド (IA
Amide)の代わりに、同じくアルキル化剤であるグ
リシドールに加え、ヨード酢酸 (IA Acid)、アク
リルアミドを同一濃度 330mM にて処理した。こ
の際、ヘモグロビンサンプルとして、市販のヒト

ヘモグロビン (Sigma, USA)を用い、4mg を 1ml の超純水に溶解後、その 100 μ l に 400 μ l の 1.3%HCL-アセトンを加えてタンパクを沈殿後、50 μ l の RapiGest 溶液に溶解させ、濃度測定後、12 μ g のタンパクを用いて、還元アルキル化以降の操作を行った。

C. 研究結果

1. ラットおよびヒトヘモグロビンサンプル中のグリシドールアダクトの検出

まず、グリシドール処理をしたラットより得られたヘモグロビンをトリプシン消化後 LC-MS にて解析し、得られた MS/MS スペクトラムを Mascot によるデータベース検索に供した。この際、グリシドール付加から予想される質量数の増加分として、反応性の予想される塩基性アミノ酸である、アルギニン(R)、リジン(K)、ヒスチジン(H) とシステイン(C) およびフリーのアミノ基を持つ N 末端のバリン(V) 残基に対して、 $m/z=+74.036$ を考慮して、データベース検索を行った。これにより、標的としたどのアミノ酸に修飾が起こっていても検出可能となるが、グリシドール修飾ヘモグロビンとして同定されたのは、125 番目のシステイン残基を含むペプチドフラグメント (EFTPCAQAQAFQK) のみであり (図 5)、エドマン分解法で検出できていた N 末端のバリンアダクトは検出されなかった。図 5 に示したように、システイン残基に対する修飾は、還元アルキル化の際にシステイン残基はヨードアセトアミドによるカルバミドメチル化を受けているため、非修飾のペプチドからの質量差は 8.508 にて観察され、これら二つのピークがほぼ同じリテンションタイムで溶出していることから、同定の信頼性が支持された。また、MS/MS スペクトルの内容からも、理論値と比較的きれいな一致が得られていることより、同定されたペプチドがグリシドールによる修飾を持つものであると結論付けた。一方で、非修飾の N 末端ペプチドフラグメントも検出されていたため、クロマト上近傍の位置に想定される質量差の修飾ペプチドの存在を目

視にて確認したが、該当するシグナルは得られなかった。以上より、ラットヘモグロビンに関しては、これまでに報告されている N 末端の修飾は検出できなかったが、新たな修飾として 125 番目のシステインの修飾が検出できた。

一方で、ヒトヘモグロビンサンプル (グリシドール処理なし) に関しても同様な解析を行ったが、N 末端を含めグリシドール付加体は検出されなかった。このサンプルは、コントロール由来であるものの、食品中のグリシドールによる N 末端バリンの修飾がエドマン分解法にて検出されていることから、今回の LC-MS を用いた方法は、特定のアミノ酸の修飾に的を絞った場合には、従来法に比べて感度が低いことがわかった。

ヒトヘモグロビンに関しても、シーケンスは違うもののシステイン残基を含んでいるため、アダクト形成も期待されたが、グリシドール処理の有無、およびシステイン残基の反応性を反映し、結果に差が見られたと考えられる。

今後、ラットにて得られたシステイン残基の修飾に関しては、そこに的を絞った Selected Ion Monitoring (SIM) 法による同定の確認と定量を行う予定である。

2. 血清中のアルブミン付加体の解析

ヒトヘモグロビンサンプルにはグリシドールアダクトが検出されなかったが、その一つの原因として、ヒトヘモグロビン中のシステイン残基が S-S 結合を形成して反応性が低いことが考えられたため、フリーのシステイン残基を持つことが予想される他のタンパク質として、血液中の主要タンパクであるアルブミンに着目し、既に得られているヒトサンプルでの LC-MS データをもとに、新たにグリシドール修飾を考慮したデータベース検索を行うことにより、付加体の検出を試みた。その結果、図 7 に示すように 34 番目のシステインを含むペプチド

(ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK) にグリシドール付加したピークが Mascot 検索により比較的高い信頼度で同定された。このペプチドは対応す

る非修飾ペプチドとほぼ同じリテンションタイムに溶出し、MS/MS スペクトルの類似性からも、システインのグリシドールアダクトである可能性は高い。今後、*in vitro* でグリシドール修飾実験を行い、目的のピークの増減から付加体であることを確定させる予定である。

3. 異なるアルキル化剤によるヘモグロビンの修飾と N 末端付加体の検出

プロテオーム解析における還元アルキル化の際には通常ヨードアセトアミドが用いられるが、グリシドールもアルキル化剤であるので、タンパク質への反応性の差を検討する目的で、他のアルキル化剤であるアクリルアミドとヨード酢酸も含めて、ヨードアセトアミドと同一濃度で市販のヒトヘモグロビンサンプルへの還元アルキル化を行った。その後トリプシン消化を行い、通常の LC-MS による解析データを取得した後、Mascot によるデータベース検索の際に、表 1 に示した各薬剤から予想される質量数の変化の理論値を元に修飾による質量増加を考慮し検索を行った。

その結果、いずれのアルキル化剤においても、目的とするシステイン残基のアルキル化はほぼ 100%であったのに対し、N 末端アミノ酸であるバリン残基への修飾に関しては、化合物間で反応性に差が見られた (図 8)。N 末に最も高い反応性を示したのはグリシドールであり、次いでヨード酢酸、そしてアクリルアミドとヨードアセトアミドでは、ほとんど付加体の形成が見られなかった。この反応性の差は、各化合物の DNA への反応性の差を反映している可能性もあり、今後さらに化合物の種類を増やして検討していきたい。また、塩基性アミノ酸に対する反応性も併せて検討を行う予定である。

D. 考察

これまで一般的に遺伝子傷害性物質による生体分子の修飾としては、DNA 付加体の検出が行われており、最近では 32P ポストラベル法に加えて、LC-MS を用いた網羅的な解析法が「アダク

トーム解析」として注目を集めている。遺伝子傷害性のエンドポイントとしては理想的なマーカーであるが、DNA への到達性、修復による付加体の除去を考えると必ずしも感度の高いマーカーとはいえず、ヒトが通常曝露されうる低用量レベルでのアダクトの検出は難しいことが予想される。一方で、血中に存在するタンパク質は、外部からの化学物質の曝露に直接さらされ、また DNA の場合のような効率的な修復システムが存在しないため、曝露マーカーとしての感度は高いと予想される。DNA への反応性をもつ物質は一般に求電子物質としてタンパク質への反応性も同様に持つと考えられるので、付加体自体が直接遺伝子傷害には結びつかないものの、そのサロゲートマーカーとしての利用が期待される。

今回例として用いたグリシドール修飾に関しては、すでにヘモグロビンを用いて、その N 末端のバリン残基への修飾が、エドマン分解と GC-MS を組み合わせた方法により解析されており、ヒトサンプルにおいてもおそらく食品由来と考えられるグリシドール曝露により付加体の形成が直接検出されている。この手法では、解析を N 末端のアミノ酸に絞ることで感度を上げていることが、検出につながった要因ではあるが、他にもタンパク質にはシステイン残基や塩基性アミノ酸など反応性の高い部位は存在しており、これらも含めた網羅的なアダクトの解析という観点から、ショットガンプロテオミクスを用いたアプローチの可能性に関して検討を行った。その結果、すでに報告されているヘモグロビンの N 末端のバリンのアダクトに関しては検出できず、エドマン分解法に比べて感度は落ちることが明らかとなったが、グリシドール処理を行ったラットサンプルにおいて、新たに 125 番目のシステインのアダクト形成が確認された。このピークは対応する非修飾ペプチドとほぼ同じリテンションタイムにて溶出しており、この程度の修飾によっては LC のリテンションタイムは影響を受けないことが示唆された。このことは、修飾ペプチドピーク

は一般に非修飾ペプチドと同じ溶出時間で観察されることが、修飾ペプチドである一つの有力な証拠となることを示している。実際に、ヘモグロビン N 末端の糖化修飾のペプチド (A1c) も同時に検出されているが、それらも非修飾ペプチドピークと同時に観察されている。

また、今回得られたペプチドの MS/MS スペクトルの検索からグリシドール修飾と一致し、スペクトルの帰属も非修飾ペプチドとの類似性を含めてよく一致していたことから、目的の修飾ペプチドである確率が高い。今後さらに未知の修飾を含めた網羅的な解析を行う上で、この非修飾ペプチドとの類似性は大きな手がかりにできると予想される。

今回ヒトのヘモグロビンサンプルにおいては、ラットで観察されたようなシステイン残基のグリシドール修飾は観察されなかったが、これはグリシドール処理の有無が原因とも考えられるが、システイン残基の反応性の差も影響していると考えられる。ラットヘモグロビンの 125 番目のシステイン残基に関しては、ジスルヒド結合に関与しないためフリーの状態が存在し、求電子物質等に対して高い反応性をもつことが報告されており、その反応性はグルタチオンよりも高いとも言われている。これに対し、ヒトヘモグロビンでは、フリーの状態のシステイン残基がないためラットのような反応性を示さず、その点において種差があると考えられる。よって、ラット等の実験動物を用いる際に、ヘモグロビンは良い曝露マーカーになるといえるが、ヒトの場合にはより感度の高いタンパクマーカーが必要であることがわかった。

血清タンパクとしては、アルブミンがその存在量からも主要なタンパク質であり、各種薬剤のアルブミンへの結合も知られていることから、ヘモグロビンに変わる曝露マーカーとしての期待がかかる。そこで、すでに我々の研究室にて解析を行っていたヒト血清プロテオームデータをもとに、グリシドール修飾の可能性のあるペプチドをデータベース検索したところ、アルブミンの 34

番目のシステインのアダクトが新規に同定された。この修飾ペプチドも非修飾ペプチド (この場合はシステインの還元アルキル化によるカルバミドメチル化) と同時に溶出されることから、その信頼性は高いと考えられる。今後、*in vitro* のグリシドール修飾反応でこのピークが増加することにより同定の確認を行う予定である。

一方で、タンパク質への反応性が、DNA への反応性、および遺伝子傷害性と相関するかは重要な課題であるが、この点は今後両者の結果を比較検討することにより明らかにしていきたい。今回、還元アルキル化に用いるアルキル化剤の反応性の検討により、システイン残基に対する反応性には差が見られなかったが (いずれもほぼ 100%) N 末端のアミノ基への反応性に差が見られたことから、この反応選択性の差を利用した遺伝子傷害性の予測ができないかという可能性が示唆された。今後、システインの還元を行う前の状態において典型的な変異原であるエチルニトロソ尿素などのアルキル化剤との反応性を比較することにより、遺伝子傷害性とタンパク付加の反応選択性との相関を調べたい。

最後に、こうしたアプローチを「タンパク質アダクトーム解析」として一般化し、未知の変異原物質を含めたアダクトの網羅的解析へと発展させるとともに、糖尿病におけるヘモグロビン A1c に代表される各種疾患バイオマーカーの検索へと応用してゆきたい。

E. 結論

LC-MS を用いた網羅的タンパクアダクトーム解析により、ラットヘモグロビンにおける新規のグリシドールアダクトとして、125 番目のシステイン残基のアダクトを検出した。一方、ヒトヘモグロビンサンプルにおいては、グリシドール修飾ペプチドが検出できず、ラットとの種差が存在することが示唆された。ヒトサンプルに関しては、血中アルブミンに対する付加体の解析を行ったところ、34 番目のシステイン残基にグリシドール付加したピークが同定された。さらに、還元のア

ルキル化際の異なるアルキル化剤の反応性の検討から、アルキル化剤の種類により、N末端のアミノ基への反応選択性に差があることがわかり、アルキル化剤の遺伝毒性の予測因子としての利用に期待が持たれた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131, 20-24. 2013
- 2) 中村里香, 酒井信夫, 薮島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子 ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131, 50-57. 2013
- 3) T. Suzuki Unconscious Exposure to Radiation. *Genes and Environment*, 35, 63-68. 2013

2. 学会発表

- 1) Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y., Suzuki T. Improvement of Rat Urinary Proteomics by a Differential Precipitation of Proteins. *Human Proteome Organization 12th World Congress* (2013.9) (横浜)
- 2) Suzuki T., Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y. Basic factors that influence the rat urinary proteome. 第13回国際毒性学会 (ソウル)
- 3) 鈴木孝昌, Suresh Thiruppathi, 本間正充, 鈴木和博, 佐藤陽治 次世代 DNA シークエ

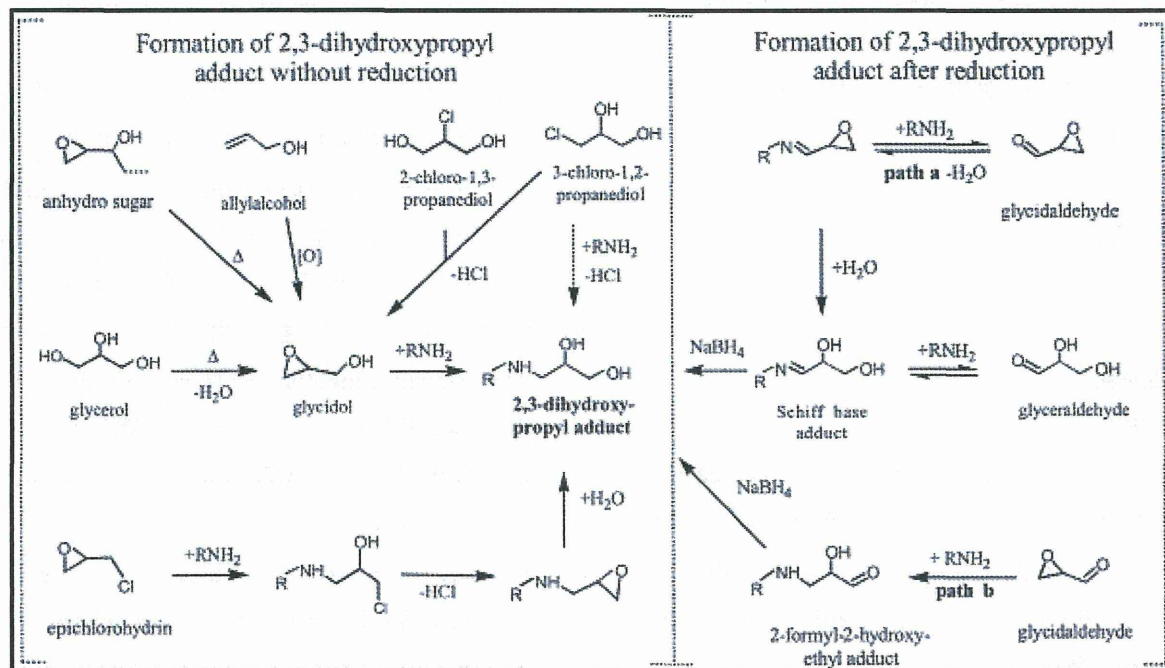
ンサーの染色体異常解析への応用 日本環境変異原学会第42回大会 (2013. 11) (岡山)

- 4) スレッシュ ティルパッティ, 斎藤嘉朗, 本間正充, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 ヘモグロビンアダクトーム; 環境変異原に対する暴露マーカーとしての新しいアプローチ 日本環境変異原学会第42回大会 (2013. 11) (岡山)
- 5) 降旗千恵, 櫻井幹也, 渡辺貴志, 鈴木孝昌 *Toxicogenomics/JEMS・MMS V: クリセン投与 48 時間後までのマウス肝臓における遺伝子発現変化* 日本環境変異原学会第42回大会 (2013. 11) (岡山)
- 6) Suzuki T., Suresh T., Yamada M., Honma M., Suzuki K., Sato Y. Use of the next generation sequencers for the evaluation of genomic integrity of cellular therapy products. 11th International Conference on Environmental Mutagens (2013.11) (Foz do Iguaçu)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 グリシドールによるヘモグロビン N 末端バリン残基 への 2,3-dihydroxypropyl 付加体形成



Lendin et al., Food Chem. Toxicol.38, 963-969 (2000) より

図2 Edman 分解と GC-MS を用いたヘモグロビン N 末端付加体の解析法

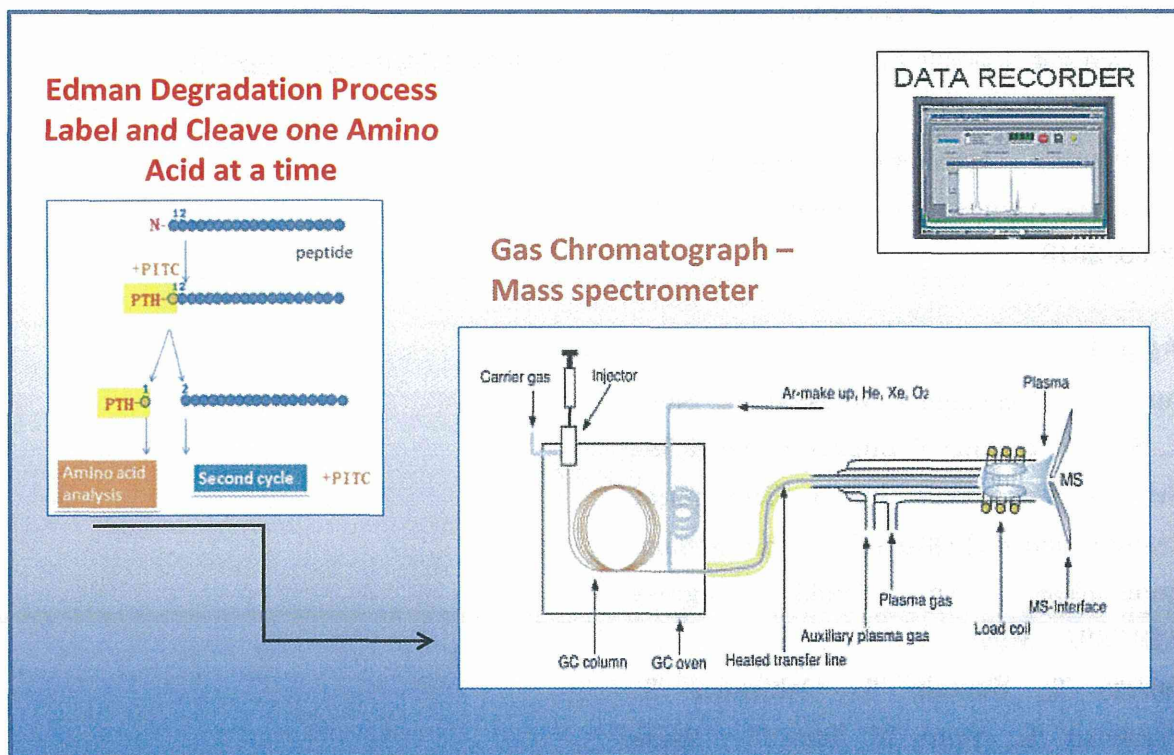


図3 ヘモグロビン(グロビン)サンプル調整法

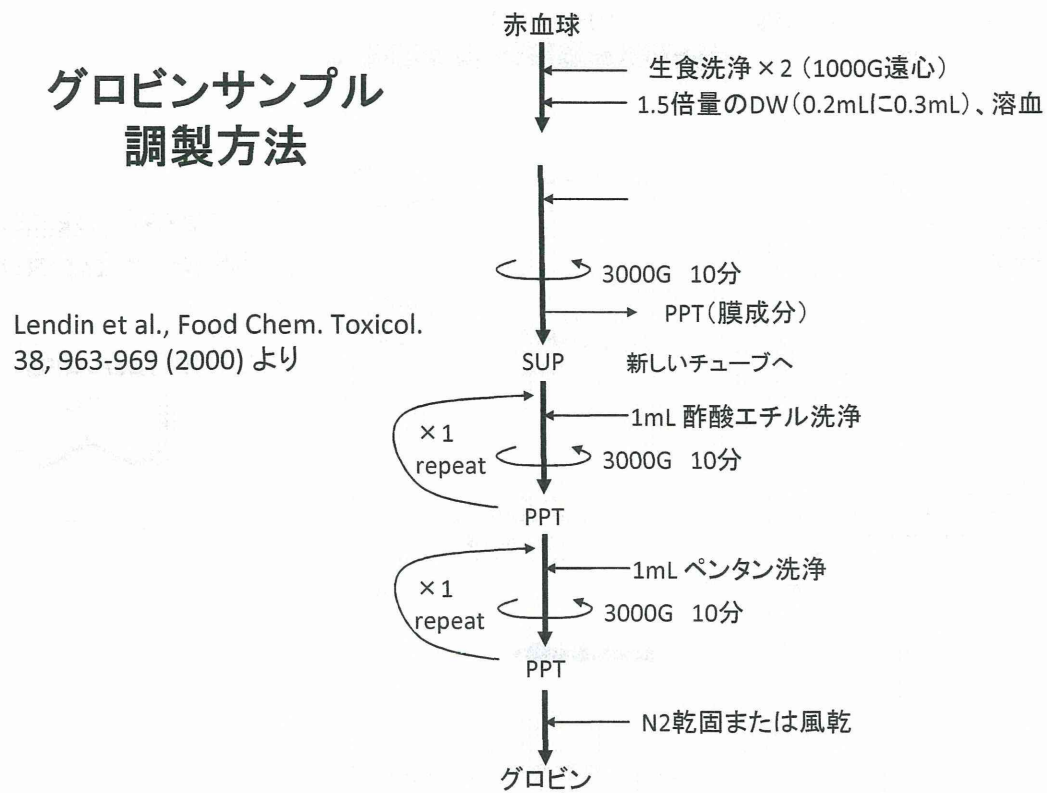
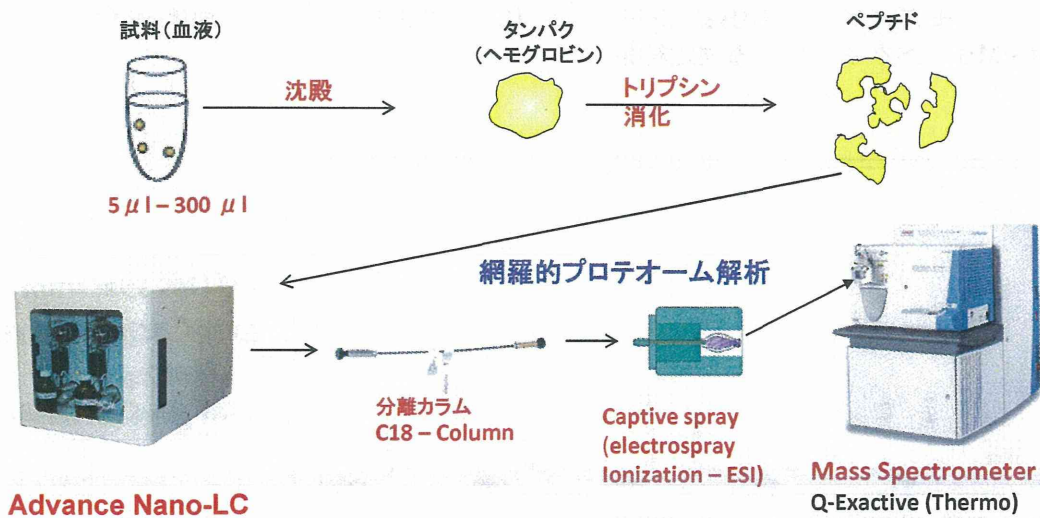


図4 LC-MSによるヒト血清タンパク(ヘモグロビン)付加体検出のスキーム



・ヒトの曝露マーカーとして有望
・複数の化学物質の曝露プロファイルを一度の分析で取得できる可能性あり

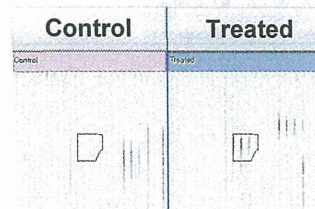
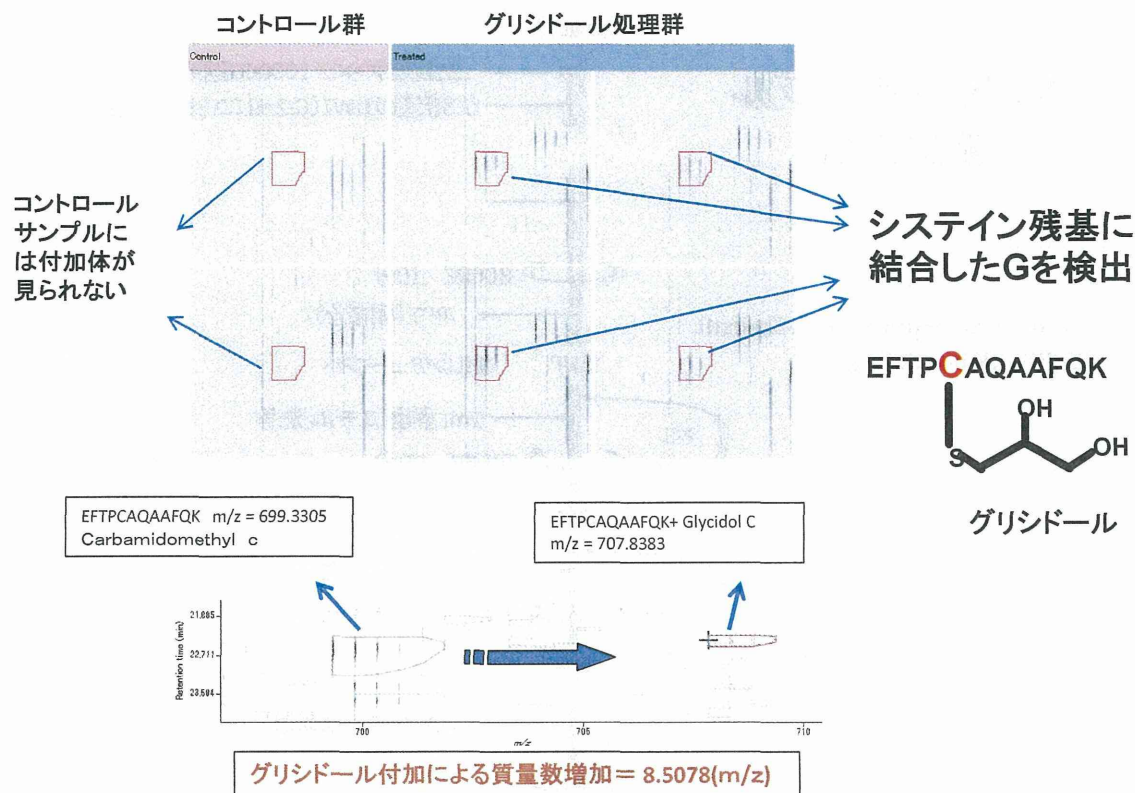


図5 発がん性データとマウス小核試験データの定量的相関



ヒトヘモグロビンではグリシドール付加体が検出できず→種差がある

図6 ラットヘモグロビン (HBB2) システイン 125 へのグリシドール付加体ペプチドフラグメントのMS/MS スペクトルによる同定結果

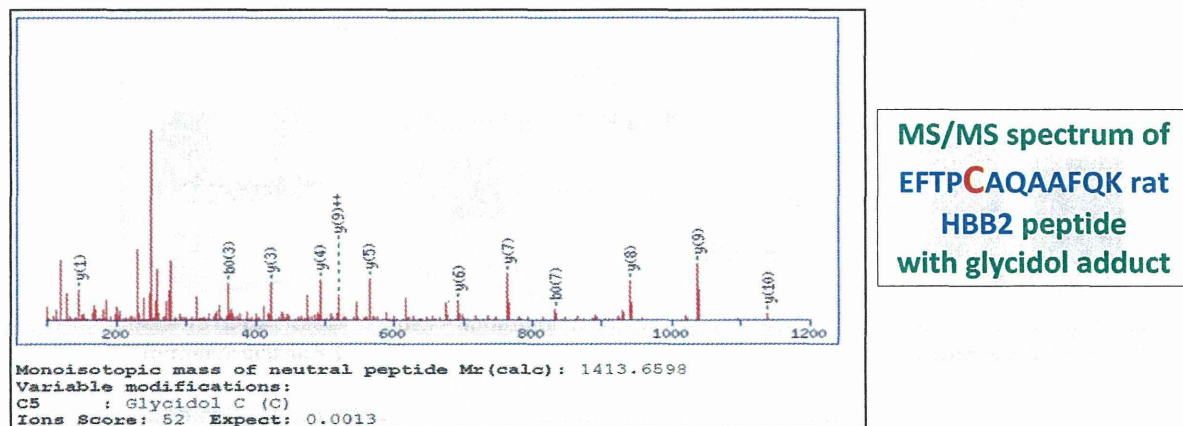


図7 ヒト血清アルブミンのシステイン34へのグリシドール付加体とMS/MSスペクトル

m/z	z	Mass	RT	RT	Abundanc	Intensity	Max MS/	Protein	Peptide Score	Peptide	Modifications
830.7672	3	2489.28	88.26	5.75	4.55E+08	6.55E+07	75.2	ALBU_HUMAN	105	ALVLIAFAQYLQQC ⁺ PFEDHVK	[14] Carbamidomethyl (C)
836.4407	3	2506.3	88.276	2.71	7.28E+06	1.33E+06	60.6	ALBU_HUMAN	28.4	ALVLIAFAQYLQQC ⁺ PFEDHVK	[14] Glycidol C (C)

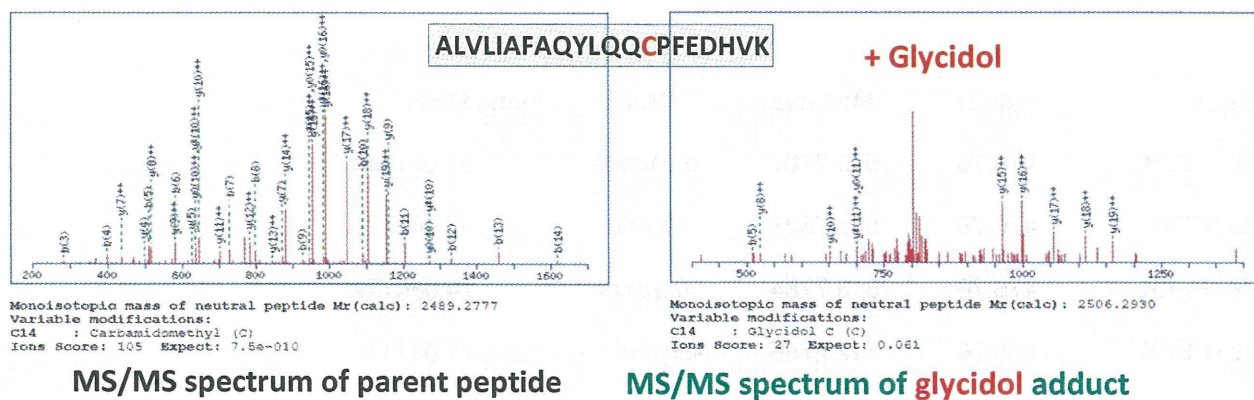
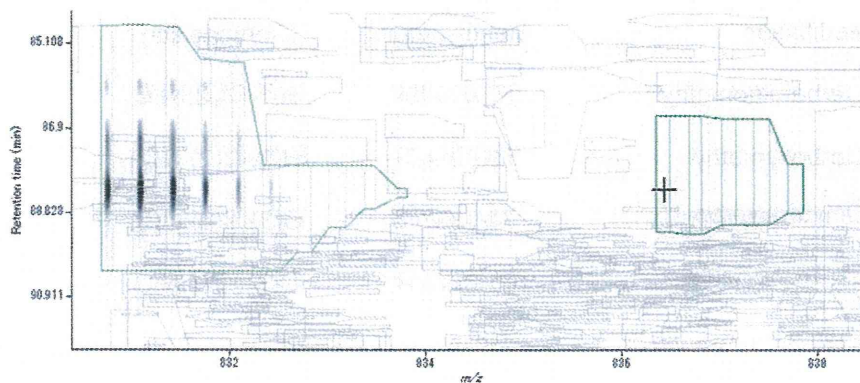


図8 異なるアルキル化剤によるヘモグロビン N 末端付加体形成量の変化

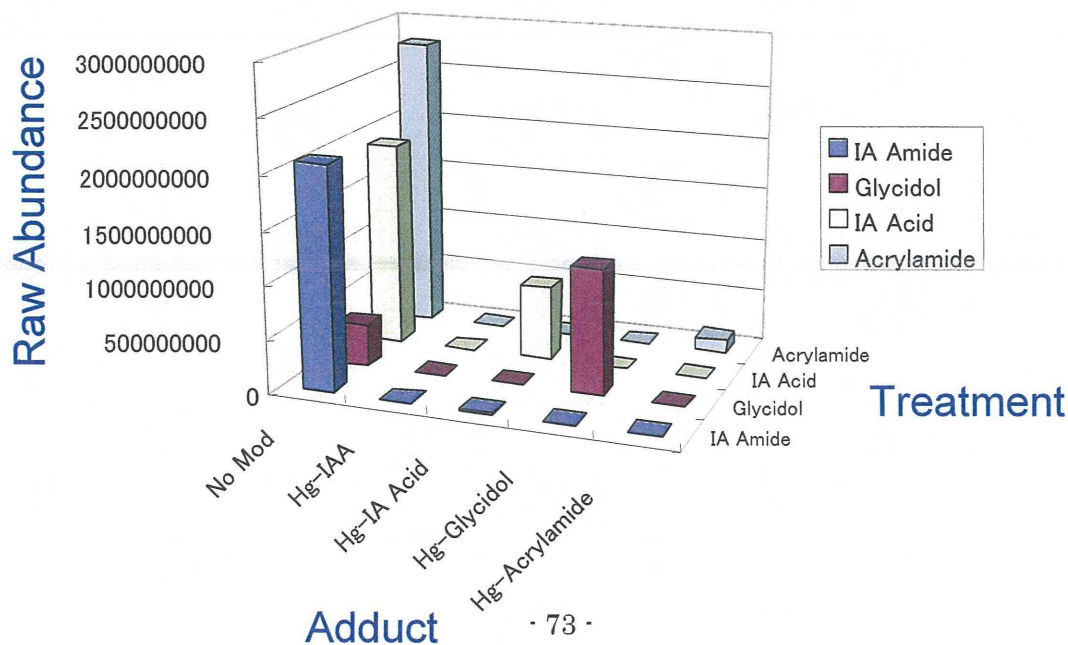


表 1 異なるアルキル化剤による修飾と予想される付加体ペプチドの質量

Alkylating Agents

Chemicals	Modification	Monoisotopic	Composition
Iodoacetamide	Carbamidomethyl	57.021464	H(3) C(2) N O
Iodoacetic acid	Carboxymethyl	58.005479	H(2) C(2) O(2)
Glycidol	Dihydroxypropyl	74.036779	C(3) H(6) O(2)
Acrylamide	Carbamoylethyl	71.037114	C(3) H(5) N O

N Term Peptide

N Term	m/z 2+	Mod m/z	Mod	Mono Mass
VHLTPEEK	476.76	505.2707	IA Amide	57.021464
VHLTPEEK	476.76	505.7627	IA Acid	58.005479
VHLTPEEK	476.76	513.7784	Glycidol	74.036779
VHLTPEEK	476.76	512.2786	Acrylamide	71.037114

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
本間正充	変異原性の予測—医薬品中に存在する不純物の評価—	小島肇夫	In vitro毒性・動態評価の最前線	シーエムシー出版	東京	2013	36-43
本間正充	哺乳類細胞を用いたin vitro小核試験	小島肇夫	動物実験代替安全性試験プロトコル集	シーエムシー出版	東京	2013	169-186

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashi M, <u>Honma M</u> , Takahashi M, Horibe A, Tanaka J, Tsuchiya M, <u>Morita T</u>	Identification and Evaluation of Potentially Genotoxic Agricultural and Food-related Chemicals	Food Safety	1	32-42	2013
Horibata K, Ukai A, Kimoto T, Suzuki T, Kamoshita N, Masumura K, Nohmi T, Honma M.	Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the Pig-a and gpt assays.	Environ Mol Mutagen.	54	747-754	2013
Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Honma M.; Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome.	Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome.	DNA Repair	15	11-20	2014
Sassa A, Suzuki T, Kanemaru Y, Niimi N, Fujimoto H, Katafuchi A, Grúz P, Yasui M, Gupta RC, Johnson F, Ohta T, Honma M, Adachi N, Nohmi T.	In vivo evidence that phenylalanine 171 acts as a molecular brake for translesion DNA synthesis across benzo[a]pyrene DNA adducts by human DNA polymerase κ .	DNA Repair	15	21-28	2014

Piao, J., Nakatsu, Y., Ohno, M., Taguchi, K. and Tsuzuki, T.	Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis.	Int. J. Biol. Sci.	10	73-79	2014
T. Matsuda, M. Takamune, M. Yamada	A pilot study for the mutation assay using a high-throughput DNA sequencer	Genes & Environment	35	53-56	2013
斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌	内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて	国立医薬品食品衛生研究所報告	131	20-24	2013
中村里香, 酒井信夫, 齋島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子	ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析	国立医薬品食品衛生研究所報告	131	50-57	2013
T. Suzuki	Unconscious Exposure to Radiation.	Genes & Environment	35	63-68	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Identification and Evaluation of Potentially Genotoxic Agricultural and Food-related Chemicals

Makoto Hayashi^{1,*}, Masamitsu Honma², Motoko Takahashi³, Atsuko Horibe⁴,
Jin Tanaka¹, Mai Tsuchiya¹, Takeshi Morita²

¹Public Interest Incorporated Foundation, BioSafety Research Center, 582-2, Shiohinden, Iwata, Shizuoka, 437-1213, Japan

²National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya, Tokyo, 158-8501 Japan

³Incorporated Administrative Agency Food and Agricultural Materials Inspection Center, 2-772, Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo, 187-0011, Japan

⁴Food Safety Commission Secretariat, 22nd Fl., Akasaka Park Bld., 5-2-20, Akasaka, Minato-ku, Tokyo, 107-6122, Japan

The Food Safety Commission (FSC) was founded in 2003 to conduct the risk assessment of chemicals in food and food products and also residues of agricultural chemicals. Genotoxicity assessment is one component of the overall risk assessment process. Historically, genotoxicity assessment has been limited mainly to qualitative hazard identification. We are proposing a strategy for when the chemical is classified as a genotoxic carcinogen and the acceptable daily intake (ADI) cannot be set because a worldwide consensus has not been obtained on the existence of threshold for DNA direct-acting genotoxicity. To evaluate the mechanism(s) of carcinogenicity, it is important to make judgment whether genotoxicity, especially genotoxicity/mutagenicity resulting from direct reaction with DNA, is a key event or not in the carcinogenic process. Here, we focus on the residues of agricultural chemicals and discuss the strategy of how to evaluate and interpret genotoxicity, and provide guidance that we can use at the site of assessment. This paper presents the authors' personal opinion and it does not necessarily represent the official opinion of the FSC. There are four independent expert working groups in the Expert Committee for evaluation of agricultural chemicals and the authors hope this paper will help to make evaluation fair and transparent across the working groups. Of course, other strategies to evaluate genotoxicity of food and food related chemicals, including residues of agricultural chemicals may also exist, and they should also be appreciated. The goal is scientifically sound, transparent, and fair evaluation and interpretation of genotoxicity, as an integral part of the risk assessment.

Key words: pesticide and agricultural chemicals, risk assessment on mutagenicity, evaluation and interpretation

Introduction

The Food Safety Commission (FSC) was founded in 2003 to make risk assessment of food and related chemicals, independent from risk management. Before that time, mainly the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW: former Ministry of Health and Welfare) conducted risk assessment in conjunction with risk management of

Received: 1 July 2013; Accepted: 11 July 2013

* Corresponding author: E-Mail: Hayashi@anpyo.or.jp

The contents of this article reflect solely the view of the author(s).

chemicals and covered almost all areas including pharmaceutical drugs, agricultural chemicals, and food and food related chemicals. A principal aim of the FSC was to make risk assessment independent from risk management.

Evaluation and interpretation of chemical safety is generally based on the toxicological tests to identify hazards, including carcinogenicity, mutagenicity, reproductive toxicity, neurotoxicity, and other specified toxicological endpoints. Among them, carcinogenicity, mutagenicity, and reproductive toxicity are regarded as important hazards for assessing human health assessment and called “CMR effects”¹⁾. Generally, CMR effects are well evaluated especially in the case of food and related chemicals, *e.g.*, food additives, pesticides and veterinary drugs²⁾, which are consumed every day unlike pharmaceutical drugs which are used intermittently in most cases.

Mutagenicity is usually defined as induction of a heritable alteration in DNA, usually gene mutation or chromosomal aberration. Mutagens may damage DNA directly or indirectly, or may modify the mitotic apparatus with a resulting infidelity of maintenance of the genome balance in cells. Such damage is often a key initial event of carcinogenicity and termed initiation, and also has the potential to cause heritable adverse events in subsequent generations. When the chemical of interest has not been evaluated for carcinogenicity, then mutagenicity can be used as a predictor of carcinogenic potential. When a chemical is carcinogenic in experimental animals, then assessment of mutagenic activity is an important component of evidence used to determine the mechanism of the carcinogenicity. If the chemical does not show any mutagenic potential, then carcinogenicity must be induced by a non-mutagenic mechanism—and non-mutagenic mechanisms are generally considered to exhibit a threshold exposure level below which carcinogenicity does not occur. Because mutagenesis that results from direct modification of DNA is generally considered to lack a threshold (*i.e.*, low exposures are considered to still carry some level of risk), determination of a mutagenic mode of action is a key element of cancer and reproductive risk assessment. The definition of a genotoxic carcinogen was proposed in the evaluation guideline of the food additive evaluation group of FSC as follows: “A genotoxic carcinogen is a chemical or its metabolite that reacts directly with DNA resulting in gene mutation or chromosomal aberration and the genotoxic effect(s) is considered to be the mechanism, at least a part of the mechanism, of carcinogenicity. It is necessary that genotoxicity is confirmed *in vivo*, preferably at the target organ of carcinogenicity.”

Gene mutations and chromosomal aberrations are fixed lesions in the DNA that can be transmitted to future generations of cells or organisms. The initial event of mutation is the interaction between DNA and the molecule of interest. The interaction is based on a probability that depends on the densities of both molecules. This may be the reason why mutation does not have real threshold concentration below which the event does not occur. DNA damage, adduct formation, DNA repair in relation to the DNA damage, and sister-chromatid exchange may be prior events to the mutation and many times such events are included in the definition of genotoxicity.

Genotoxicity is assessed by many test systems designed to detect specific endpoints. Genotoxic activity can be classified by the endpoint and the test systems, *e.g.*, mutation, chromosomal aberration, DNA adducts, etc. *in vitro* or *in vivo*. *In vitro* assay systems include tests using microbial systems, for example Ames gene mutation (Salmonella/microsome) assay is the most well-known, and is widely used for initial assessment of chemical genotoxicity. The *in vitro* assay is more hazard identification oriented while the *in vivo* assay systems can provide information more relevant to assessment of human safety. Historically, the assessment of genotoxicity has been made qualitatively, just classification as positive or negative regardless of the potency of the effects, and used with the objective of hazard identification. Currently, the field is moving toward a more quantitative risk assessment that uses exposure-response relationships to determine the safety to humans based on the evaluation of exposure in relation to mutagenic potency.

Role of FSC

The FSC prepares dossiers of the safety of food related chemicals based on animal and some *in vitro* studies, and determines the acceptable daily intake (ADI) by voluntary specialists from each field. Risk assessment is conducted by the process of hazard identification, dose-relationship analysis, exposure analysis, and risk characterization. The relationship among FSC, MHLW, and the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) and other related Ministries is described at the following website: http://www.fsc.go.jp/english/aboutus/roleofthefoodsaftycommission_e1.html. The FSC makes the exposure analysis based on, for example, the residue levels of pesticides from the test field and by national investigations of food consumption. After the report of safety information and of the ADI of chemicals to the MHLW, which decides how to manage to use and report back on the intake of the chemical relative to the ADI based on the estimated human consumption, *e.g.*, for infants, adults, and aged people. Therefore, the FSC is able to understand the exposure levels of agricultural chemicals and make risk communications based on the risk characterization.