

201327051A

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 石井 雄二

平成26(2014)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	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	26
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	27
------------------------	----

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）  
平成 25 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

本研究では平成 24 年度に構築した「網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験」によるフェニルプロペノイド系化合物の評価<実験 1>と、ヘプタノンエテノ (Hε) 付加体による酸化的 DNA 損傷評価の有用性の検討<実験 2>を実施した。<実験 1>雄性 6 週齢の *gpt delta* ラットにエストラゴール (ES), メチルオイゲノール (MEG) 及びオイゲノール (EG) をそれぞれ 300, 100 及び 300 mg/kg/day の濃度で 4 週間強制経口投与し、肝臓及び腎臓について網羅的 DNA 損傷解析及び *in vivo* 変異原性の検索を実施した。網羅的 DNA 損傷解析では、ラット肝発がん性が知られている ES 及び MEG 投与群の肝臓において、それぞれの特異的 DNA 付加体と考えられる複数のスポットが認められ、MS スペクトラム解析から各スポットが示す付加体の構造同定又は推定が可能であった。また、同群の腎臓においても付加体のスポットが認められたものの、その面積から、いずれも肝臓の 1/20 から 1/200 程度の量であると考えられた。一方、発がん性を示さない EG 投与群では肝臓、腎臓ともに付加体の形成は認められなかった。*In vivo* 変異原性の検索では ES 及び MEG 投与群の肝臓において *gpt* 変異体頻度の有意な上昇が認められ、変異スペクトラム解析の結果、A:T-G:C transition の割合の顕著な増加が共通して認められた。一方、ES 及び MEG 投与群の腎臓と、EG 投与群の肝臓及び腎臓では *gpt* MF の変化は認められなかった。以上より、フェニルプロペノイド系化合物の肝発がん性には、直接的 DNA 損傷と、そこから生じる A:T-G:C transition を特徴とした遺伝子突然変異が寄与することが明らかになった。<実験 2>平成 24 年度の試験において 8-OHdG レベルの顕著な増加が認められたアリザリン (Alz) 投与群の腎臓と、対照群の腎臓における Hε 付加体の測定を実施した結果、Hε dA 及び Hε dC レベルは Alz 投与群において上昇傾向が認められ、Alz 投与は脂質過酸化に由来する Hε 付加体の形成を引き起こす可能性が示唆された。今後、これらの付加体と化学発がんとの関連を検討する必要があると考えられた。

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<sup>1)</sup>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。

近年、松田ら<sup>2)</sup>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、平成 24 年度においてこの DNA アダクトーム解析の原理を用いた網羅的な化学物質特異的 DNA 損傷評価法を構築し、その有用性を確認した。さらに、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) を被験物質として、構築した「網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験」の有用性を確認した。平成 25 年度は、本法を用いて、ハーブやスパイス等に含まれる香料成分であるフェニルプロペノイド系化合物の評価を実施した。被験物質にはラット肝発がん性が疑われるエストラゴール

(ES)<sup>3)</sup> 及びメチルオイゲノール (MEG)<sup>4)</sup> と、発がん性が認められないオイゲノール (EG)<sup>5)</sup> を選定した (Fig. 1)。

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) や脂質過酸化由来の DNA 付加体も知られている。これらは無処置動物の 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る。本研究では、平成 24 年度において、脂質過酸化 4-oxo-2-nonenal (ONE) から生成するヘプタノンエテノ (Hε) 付加体の LC-MS/MS による定量解析法を構築した。本年度は、平成 24 年度に実施した DNA 損傷評価において 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの上昇が認められた Alz 投与群の腎臓と、対照群の腎臓における Hε 付加体量の測定を実施した。

## B. 研究方法

### B-1. 材料及び試薬

ES 及び EG は東京化成工業株式会社から購入した。MEG は和光純薬工業株式会社から購入した。ES 特異的 DNA 付加体、ES-3' -A<sup>2</sup>-dG、ES-3' -C8-dG 及び ES-3' -A<sup>6</sup>-dA の標準品は合成したものを使用した<sup>6)</sup>。Hε 付加体、Hε dG、Hε dA 及び Hε dC の分析用標準品ならびに安定同位体 [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-Hε dG、[<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-Hε dA、及び [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-Hε dC は、平成 24 年度に合成したものを使用した。

### B-2 網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験によるフェニルプロペノイド系化合物の評価

### B-2-1. 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。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、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ES、MEG及びEG投与群の計4群を設けた。ES、MEG及びEGはそれぞれ300、100及び300 mg/kg/dayの濃度でコーンオイルに混じて4週間強制経口投与した。対照群には溶媒であるコーンオイルを4週間強制経口投与した。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 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### B-2-2. サンプル調整

DNA損傷解析のためのDNA抽出は既法<sup>7)</sup>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,  $4^{\circ}\text{C}$ ）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（ $50^{\circ}\text{C}$ , 10 min）後、さらにProtease Kを加えインキュベーション（ $50^{\circ}\text{C}$ , 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,  $4^{\circ}\text{C}$ ）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  $\mu\text{l}$ のDW水に溶解後、Nano Drop<sup>®</sup> 1000を用いてDNA濃度を測定し、100  $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$ に調整した。DNAの消化には和光純薬社製8-OHdG Assay Preparation Reagent Set<sup>®</sup>を利用し、Acetic acid buffer及びNuclease P1を加えてインキュベーション（ $37^{\circ}\text{C}$ , 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（ $37^{\circ}\text{C}$ , 3 hr）し、100,000 NMWL Filter Unitで遠心分離（10,000 rpm, 20 min）した。得られた試料から100  $\mu\text{l}$ ずつを各群（ $n=5$ ）でまとめ、450  $\mu\text{l}$ 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,  $4^{\circ}\text{C}$ ）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  $\mu\text{l}$ で再溶解し、網羅的DNA損傷解析測定のための試料とした。

### B-2-3. 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  $\mu$ m) 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) 法のポジティブイオンモードを用い、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  $\pm 50$  の範囲とした。すなわち ES (M.W. 148.2) は m/z 345 から 445 を, MEG (M.W. 178.2) は m/z 375 から 475 を, EG (M.W. 164.2) は m/z 361 から 461 を検索範囲とした。

#### B-2-4 *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はタカラバイオ株式会社にて *gpt* 遺伝子の塩基配列解析を行い、変異部位を同定した。

Spi<sup>-</sup>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<sup>-</sup>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<sup>-</sup>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<sup>-</sup>プラーク数を回収した総プラーク数で除して Spi<sup>-</sup> MF を算出した。

#### (統計学的処理方法)

体重、腎重量及び遺伝子突然変異頻度の統計学的処理は、一元配置の分散分析と Tukey の多重比較検定により行った。

#### B-3. H $\epsilon$ 付加体による酸化的 DNA 損傷評価の確立

##### B-3-1. サンプル調整

DNA 抽出及び消化は B-2-2 と同様の手順で行った。得られた試料 100  $\mu$ l に [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-H $\epsilon$  dG, [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-H $\epsilon$  dA, 及び [<sup>15</sup>N<sub>3</sub>]-H $\epsilon$  dC を一定量添加し、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

50  $\mu$ l で再溶解し，測定試料とした。

### B-3-2. LC-MS/MS 測定条件

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。和光純薬社製 Wakosil II C18 (2.0 x 150 mm, 5  $\mu$ m) 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 ESI 法のポジティブイオンモードを用いた。H $\epsilon$ dG の測定には，Cone Voltage を 22 V, Collision energy を 12 V とし，Precursor ion 及び Product ion はそれぞれ m/z 404 及び m/z 288 に設定した。H $\epsilon$ dA の測定には，Cone Voltage を 24 V, Collision energy を 22 V とし，Precursor ion 及び Product ion はそれぞれ m/z 388 及び m/z 272 に設定した。H $\epsilon$ dC の測定には，Cone Voltage を 22 V, Collision energy を 20 V とし，Precursor ion 及び Product ion はそれぞれ m/z 364 及び m/z 248 に設定した。

#### (倫理面への配慮)

投与実験は熟練者による強制経口投与が主体であり，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，遺伝子組み換え実験計画書を作成し，審査を受けた。

### C. 研究結果

#### C-1. 網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験

##### C-1-1. 被験物質の投与

最終体重及び腎重量を Table 1 に示す。ES 投与群において腎臓の実重量の有意な低値 ( $p < 0.05$ ) と，肝臓 ( $p < 0.01$ ) 及び腎臓 ( $p < 0.05$ ) 相対重量の有意な高値が認められたものの，同群では最終体重の有意な低値 ( $p < 0.01$ ) が認められたことから，これらは体重増加抑制に起因する変化と考えられた。また，EG 投与群において肝臓及び腎臓相対重量の有意な高値 ( $p < 0.01$ ) が認められ，実重量も増加傾向が認められたことから投与に起因する変化と考えられた。

##### C-1-2. 網羅的 DNA 損傷解析

ES 投与群では m/z 345 から 445 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 2 に，MRM クロマトグラムを Figure 3-A に示す。肝臓では m/z 436 に 2 つ (Peak I' 及び II')，m/z 414 に 4 つ (Peak I~IV)，m/z 398 及び 374 にそれぞれ 1 つ (Peak V 及び VI)，計 8 つの DNA 付加体を示すと考えられるスポットが検出された。これらのうち，Peak I (m/z 414, 15.9 min)，Peak III (m/z 414,

15.3 min) 及び Peak V ( $m/z$  398, 17.7 min) は, それぞれ ES-3'- $N^2$ -dG, ES-3'-8-dG 及び ES-3'- $N^6$ -dA の標準品と一致した. また, Peak I' 及び II' の保持時間はそれぞれ Peak I 及び II と一致し, 質量数の差が 22 であったことから, これらは Peak I と II の  $Na^+$ 付加体と判断した. Peak I から VI の MS スペクトラムを Figure 4 に示す. Peak II ( $m/z$  414, 15.6 min) の MS スペクトラム (Fig. 4-C) 上には, ES-3' -  $N^2$ -dG (Fig. 4-A) でも認められた特徴的なフラグメントイオンである  $m/z$  298 ( $[M+H-116]^+$ ) と, ES に由来する  $m/z$  147 及びグアニンに由来する  $m/z$  164 が検出されたことから, ES と dG の付加体と考えられ, 過去に報告されている ES-1' -  $N^2$ -dG と同定した<sup>8)</sup>. Peak IV ( $m/z$  414, 12.9 min) の MS スペクトラム (Fig. 4-D) 上においても, 特徴的なフラグメントイオンである  $m/z$  298 ( $[M+H-116]^+$ ) と, ES に由来する  $m/z$  147 が検出されたことから, ES と dG の付加体と考えられた. Peak VI ( $m/z$  374, 15.2 min) の MS スペクトラム (Fig. 4-F) 上には, 特徴的なフラグメントイオンとして  $m/z$  258 ( $[M+H-116]^+$ ) と, ES に由来する  $m/z$  147 が検出されたことから, ES と dC の付加体と考えられた. また, 腎臓では Peak I~VI のすべてのスポットが検出されたが, その面積はいずれも肝臓の 1/20 から 1/200 程度であった (Table 2).

MEG 投与群では  $m/z$  375 から 475 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 5 に, MRM クロマトグラムを Figure 2-B に示す. 肝臓では  $m/z$  466 に 1 つ (Peak I'),  $m/z$  444 に 1 つ (Peak I),  $m/z$  428 に 1 つ (Peak II),  $m/z$  404 に 1 つ (Peak III), 計 4 つの DNA

付加体を示すと考えられるスポットが検出された. これらのうち, Peak I' の保持時間は Peak I と一致し, 質量数の差が 22 であったことから Peak I の  $Na^+$ 付加体と判断した. Peak I から III の MS スペクトラムを Figure 6 に示す. Peak I ( $m/z$  444, 14.6 min) の MS スペクトラム (Fig. 6-A) 上には, 特徴的なフラグメントイオンとして  $m/z$  328 ( $[M+H-116]^+$ ) と, MEG に由来する  $m/z$  177 及びグアニンに由来する  $m/z$  164 が検出されたことから, MEG と dG の付加体と考えられ, 過去に報告されている MEG-3' -  $N^2$ -dG と同定した<sup>9)</sup>. Peak II ( $m/z$  428, 16.3 min) の MS スペクトラム (Fig. 6-B) 上には, 特徴的なフラグメントイオンとして  $m/z$  328 ( $[M+H-116]^+$ ) と, MEG に由来する  $m/z$  177 及びアデニンに由来する  $m/z$  148 が検出されたことから, MEG と dA の付加体と考えられ, 過去に報告されている MEG-3' -  $N^6$ -dA と同定した<sup>9)</sup>. Peak III ( $m/z$  404, 13.8 min) の MS スペクトラム (Fig. 6-C) 上には, 特徴的なフラグメントイオンとして  $m/z$  288 ( $[M+H-116]^+$ ) と, MEG に由来する  $m/z$  177 及びシトシンに由来する  $m/z$  124 が検出されたことから, MEG と dC の付加体と考えられた. また, 腎臓においても Peak I 及び II のスポットが検出されたが, その面積はいずれも肝臓の 1/100 程度であった (Table 2).

MEG 投与群では  $m/z$  361 から 461 の範囲を検索し, 対照群と比較した. 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 7).

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-1-3. *in vivo* 変異原性の検索

*gpt* 及び Spi<sup>-</sup> 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 Figure 8 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<sup>-</sup> MF は  $0.95 \pm 0.28$  及び  $0.62 \pm 0.13$  であった. また, 腎臓における *gpt* 及び Spi<sup>-</sup> MF は  $1.07 \pm 0.46$  及び  $0.53 \pm 0.32$  であった.

ES 投与群の肝臓では, 対照群に比して *gpt* MFs の有意な上昇 ( $6.70 \pm 0.86$ ,  $p < 0.01$ ) と Spi<sup>-</sup> MFs の上昇傾向 ( $1.32 \pm 0.48$ ) が認められ, *gpt* 変異体の変異スペクトラム解析の結果, A:T-G:C transition の割合が対照群 (5.0%) に比して増加 (18.4%) した (Fig. 8-B). 一方, 腎臓において *gpt* 及び Spi<sup>-</sup> MFs の変化は認められなかった.

MEG 投与群の肝臓では, 対照群に比して *gpt* MFs の有意な上昇 ( $3.31 \pm 2.02$ ,  $p < 0.05$ ) と Spi<sup>-</sup> MFs の上昇傾向 ( $1.30 \pm 0.76$ ) が認められ, *gpt* 変異体の変異スペクトラム解析の結果, A:T-G:C transition の割合が対照群 (5.0%) に比して増加 (15.5%) した. 一方, 腎臓において *gpt* 及び Spi<sup>-</sup> MFs の変化は認められなかった.

EG 投与群では肝臓及び腎臓ともに *gpt* 及び Spi<sup>-</sup> MFs の変化は認められなかった.

#### C-2. Hε 付加体による酸化的 DNA 損傷評価の確立

Alz 投与群のラット腎臓の MRM クロマトグラムを Figure 9 に示す. 対照群のラット 5 例の腎臓において, Hε dA 及び Hε dC は全

例で検出され, そのレベルは  $0.41 \pm 0.23$  及び  $2.55 \pm 0.42/10^8$  塩基であった. 一方, Hε dG は 5 例中 2 例で検出されたものの, 何れも定量限界以下 (signal/noise;  $s/n=3$ ) であった. Alz 投与群のラット 5 例の腎臓において Hε dA 及び Hε dC は,  $0.46 \pm 0.3$  及び  $2.78 \pm 0.69/10^8$  塩基のレベルで検出され, 上昇傾向が認められた.

#### D. 考察

##### D-1. 網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験によるフェニルプロペノイド系化合物の評価

網羅的 DNA 損傷解析の結果, ES は肝臓において 6 種の DNA 付加体形成を形成した. MS スペクトラム解析の結果, 6 種の付加体のうち 4 種は既知の付加体である ES-3' -A<sup>β</sup>-dG, ES-3' -8-dG, ES-1' -A<sup>β</sup>-dG 及び ES-3' -A<sup>β</sup>-dA と同定又は推定が可能であった. また, Peak IV 及び Peak VI は, ES に由来する新規の dG 及び dC 付加体であることが示唆された. MEG は肝臓において 3 種の DNA 付加体を形成し, MS スペクトラム解析の結果, 2 種の付加体は既知の MEG-3' -A<sup>β</sup>-dG 及び MEG-3' -A<sup>β</sup>-dA 付加体と推定された. また, Peak III は, MEG に由来する新規の dC 付加体であることが示唆された. 一方, ES 及び MEG 投与群の腎臓では, 肝臓と同様の付加体形成が確認されたものの, その量はいずれも 1/20 から 1/200 程度であった. さらに, 肝発がん性を示さない EG 投与群では, 肝臓, 腎臓ともに DNA 付加体の形成は認められなかったことから, フェニルプロペノイド系化合物の肝発がん性には直接的な DNA 損傷が寄与することが示唆された.

*in vivo* 変異原性の評価では、ES 及び MEG 投与群のラット肝臓において *gpt* MFs の有意な増加が認められたのに対し、非発がん標的臓器である腎臓と、発がん性を示さない EG 投与群において MF の変化は認められなかった。以上より、フェニルプロペノイド系化合物のラット肝発がん性には特異的 DNA 付加体形成による遺伝子突然変異が寄与することが示唆された。さらに、*gpt* 変異体の変異スペクトラム解析では、ES 及び MEG 投与群において A:T-G:C transition が共通して増加したことから、網羅的 DNA 損傷解析で認められた ES-3' - $N^6$ -dA 及び MEG-3' - $N^6$ -dA は比較的高い変異ポテンシャルを有する可能性が示唆された。

また、平成 24 年度に評価した SFO は、ES 及び MEG と同様にラット肝発がん性を有するフェニルプロペノイド系化合物である。本研究において SFO は肝臓において dG, dA 及び dC との付加体を形成し、A:T-G:C transition の増加を伴う *gpt* MF の有意な増加を引き起こすことを明らかにした。これらの結果を考慮すると、直接的 DNA 損傷による、A:T-G:C transition の増加を伴う遺伝子突然変異は、肝発がん性を有するフェニルプロペノイド系化合物に共通する特徴であることが考えられた。

#### D-2. H $\epsilon$ 付加体による酸化的 DNA 損傷評価の確立

昨年度実施した試験において、8-OHdG レベルの上昇が認められた Alz 投与群のラット腎臓における H $\epsilon$ dA 及び H $\epsilon$ dC レベルは、対照群に比して上昇傾向が認められたことから、Alz は DNA の酸化だけでなく、脂質の過酸化を介した DNA 損傷を引き起こす可

能性が示唆された。H $\epsilon$ dC の対には高頻度に dA 又は dT の誤挿入が生じることが知られている<sup>10)</sup>ことから、今後、化学発がん過程への関与を明らかにする必要があると考えられた。

#### E. 結論

本研究で構築した網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験を用いることで、フェニルプロペノイド系化合物の DNA 傷害性及び変異原性を正確かつ迅速に評価可能であった。発がん性を有するフェニルプロペノイド系化合物の DNA 付加体の形成パターンとレポーター遺伝子における変異パターンは一致したことから、本法を用いることで化学構造に由来した遺伝毒性物質の分類や、遺伝毒性予測の可能性が考えられた。さらに、本法は遺伝毒性評価に加え、その原因となるメカニズムを明らかにすることができることから、ヒトへの外挿を考慮する上での基礎的データを提供できる重要なツールになりうることを示唆された。また、酸化的 DNA 損傷を引き起こす Alz が脂質過酸化に由来する DNA 損傷を引き起こす可能性が示唆されたことから、今後の付加体と化学発がんとの関連を明らかにする必要があると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ishii, Y., Takasu, S., Kuroda, K., Matsushita, K., Kijima, A., Nohmi, T., Ogawa, K., Umemura, T. Combined application of comprehensive analysis for DNA modification and reporter gene mutation assay to evaluate kidneys of *gpt* delta rats given madder color or its constituents. *Anal. Bioanal. Chem.* 406,

2467-2475, 2014.

2. 学会発表

1) Ishii, Y., Takasu, S., Matsushita, K., Kuroda, K., Nohmi, T., Ogawa, K., Umemura, T. Battery examination of DNA adducts and reporter gene mutations to understand alkenylbenzenes-induced hepatocarcinogenesis  
72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2013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) Suzuki, Y., Umemura, T., Hibi, D., Inoue, T., Jin, M., Ishii, Y., Sakai, H., Nohmi, T., Yanai, T., Nishikawa, A., Ogawa, K. Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Arch. Toxicol.* 86, 1593-1601, 2012.
- 4) National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of isoeugenol (CAS No. 93-15-2) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). 491, 1-412, 2000.
- 5) National Toxicology Program. Carcinogenesis studies of eugenol (CAS No. 97-53-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). 223, 1-159, 2013.
- 6) Ishii, Y., Suzuki, Y., Hibi, D., Jin, M., Fukuhara, K., Umemura, T., Nishikawa, A. Detection and quantification of specific DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the livers of rats given estragole at the carcinogenic dose. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 532-541, 2011.
- 7) 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.
- 8) Phillips, D. H., Reddy, M. V., Miller, E. C., and Adams, B., Structure of the DNA adducts formed in mouse liver after administration of the proximate hepatocarcinogen 1'-hydroxyestragole. *Cancer Res.* 41, 176-186, 1981.
- 9) Herrmann, K., Engst, W., Meinl, W., Florian, S., Cartus, A. T., Schrenk, D., Appel, K. E., Nolden, T., Himmelbauer, H., Glatt, H. Formation of hepatic DNA adducts by methyleugenol in mouse models: drastic decrease by Sult1a1 knockout and strong increase by transgenic human SULT 1A1/2. *Carcinogenesis* 35, 935-941, 2013.
- 10) Pollack, M., Yang, I. Y., Kim, H. Y., Blair, I. A., Moriya, M. Translesion DNA synthesis across the heptanone-etheno-2'-deoxycytidine adduct in cells. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1074-1079, 2006.

Fig. 1 Chemical structure of ES (A), MEG (B), and EG (C)

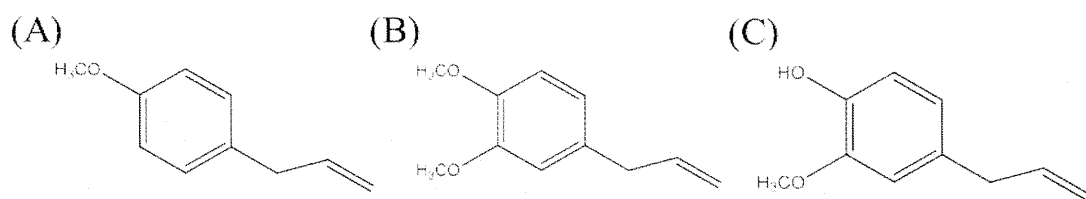


Fig. 2 DNA adductome maps of liver (A) and kidney (B) of rats treated with ES for 4 weeks. Black and blue spots are indicating control and ES-treated rats, respectively. Red spots are indicating putative ES-specific DNA adducts.

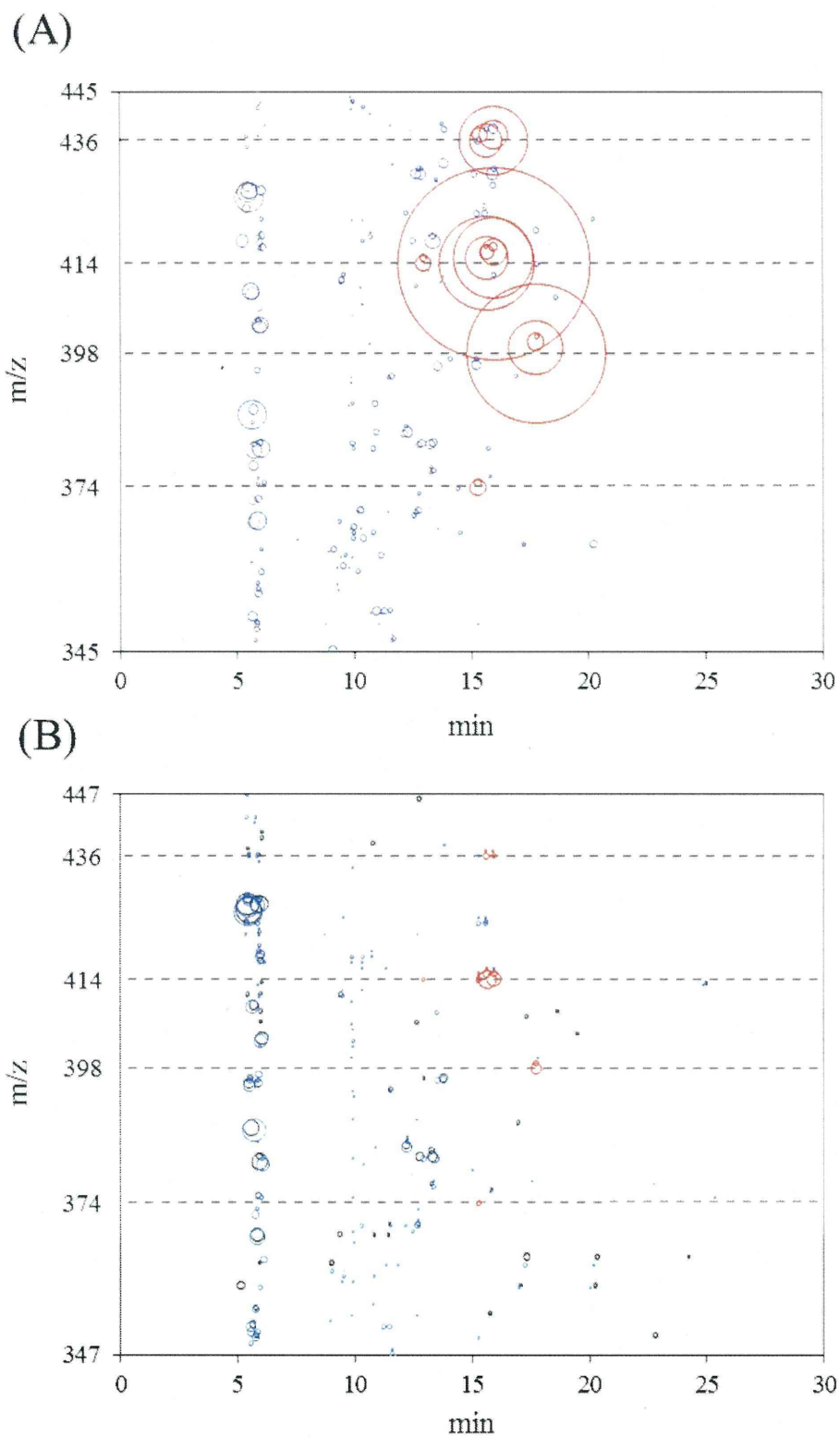


Fig. 3 Representative MRM chromatograms of the ES- (A), MEG- (B) or EG- (C) induced putative DNA adducts in the livers and kidneys of F344 *gpt* delta rats

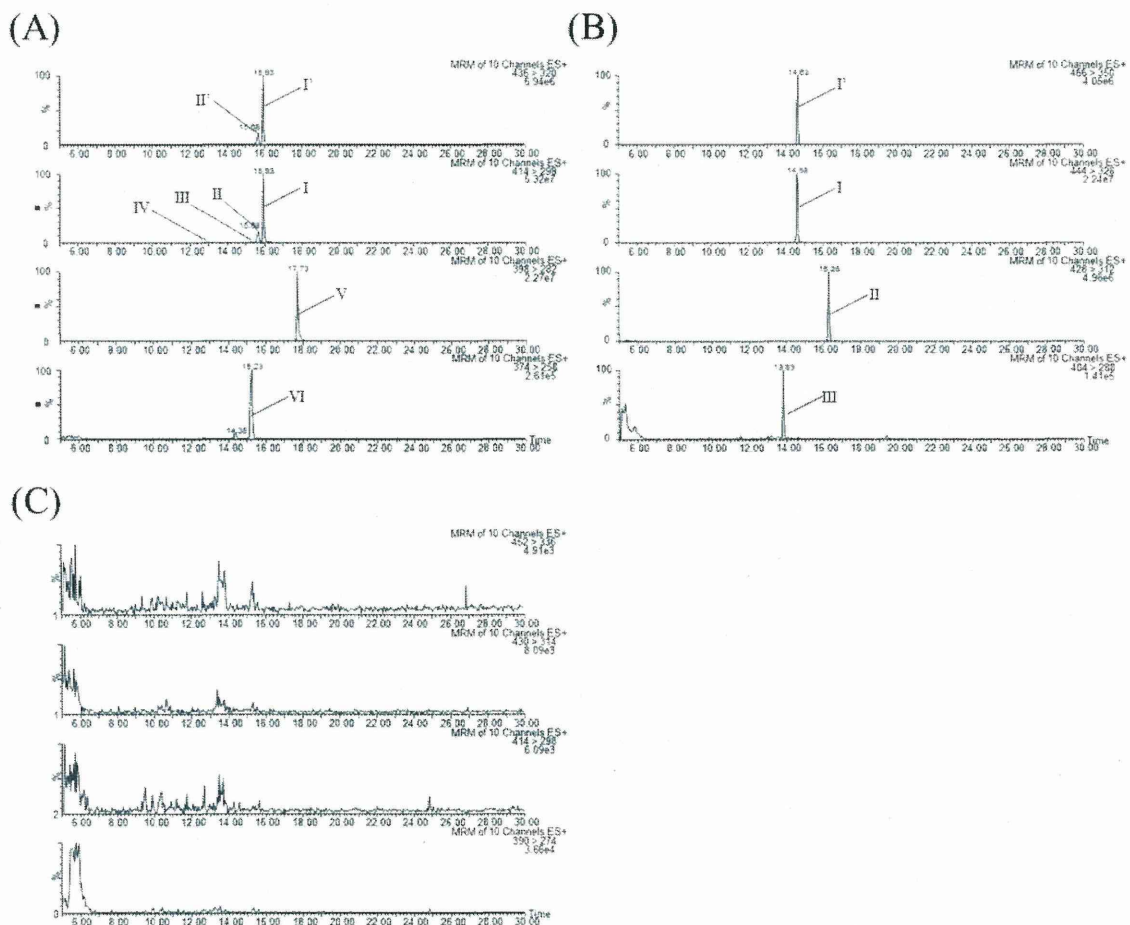
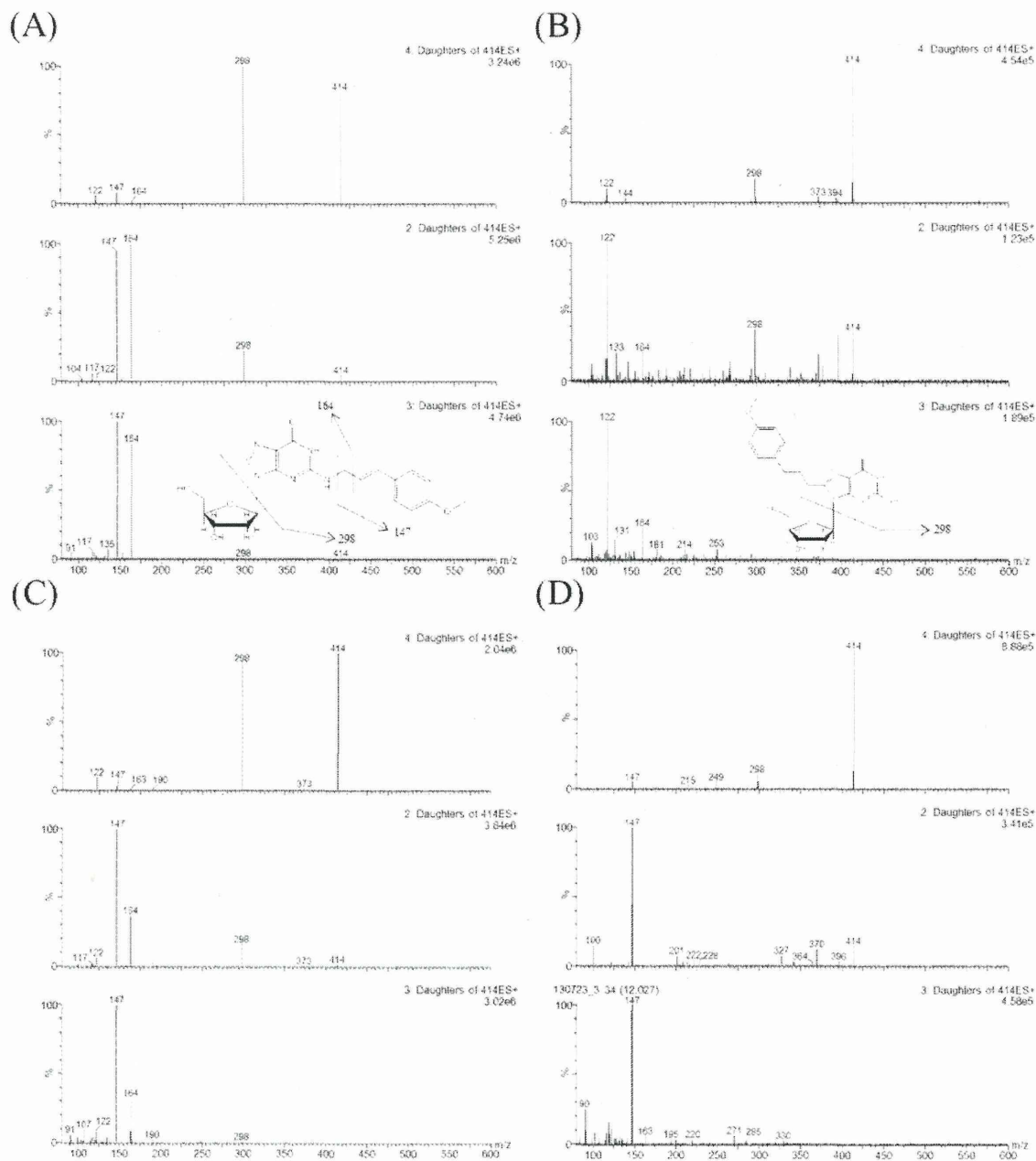
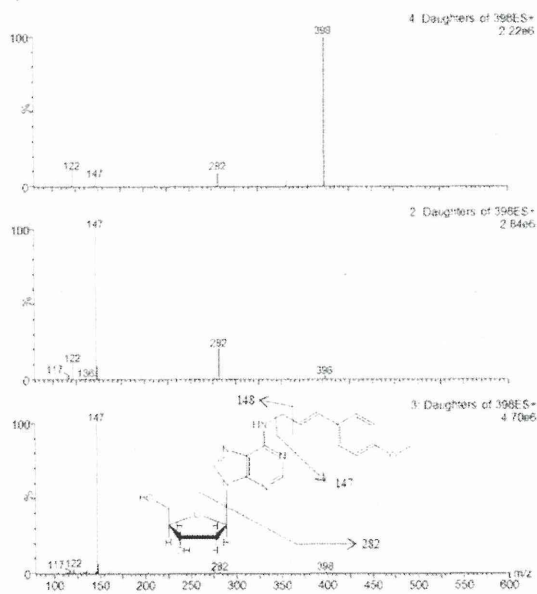


Fig. 4 Product ion spectra of putative Peak I (A) , Peak II (B)., Peak V (C)., and Peak VI (D) detected in the livers of ES-treated rats. The cone voltages and collision energies were set at 15 V and 5-30 eV in the positive ion mode, respectively.



(E)



(F)

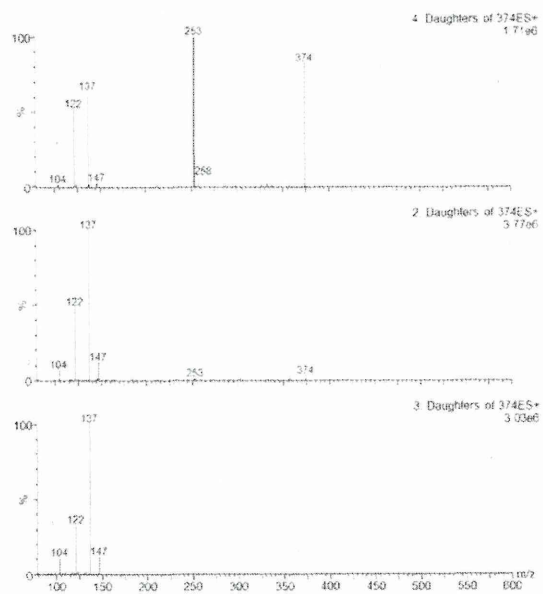
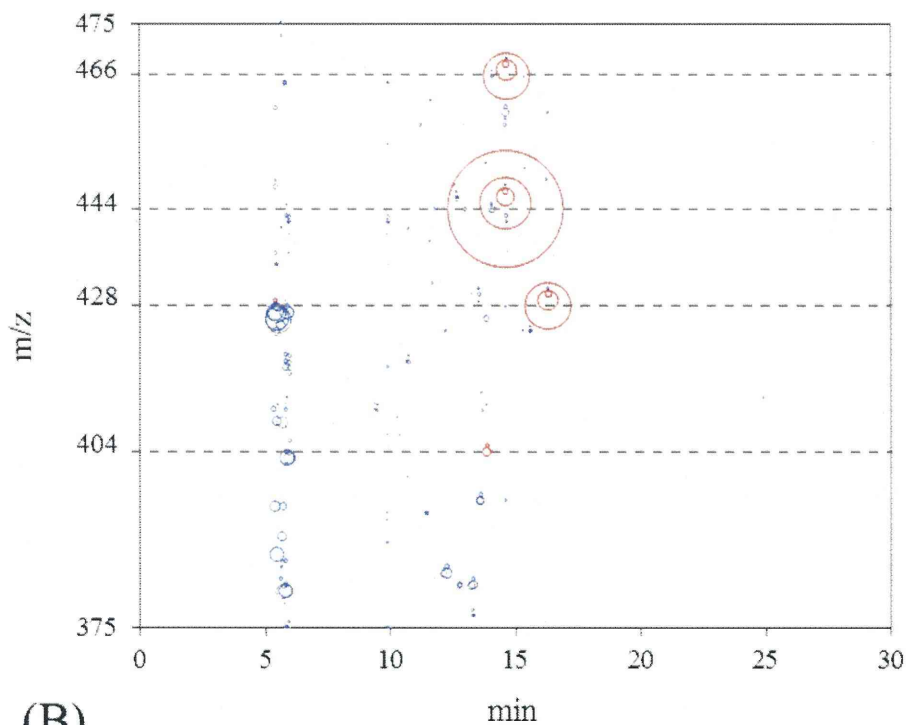




Fig. 5 DNA adductome maps of liver (A) and kidney (B) of rats treated with MEG for 4 weeks. Black and blue spots are indicating control and MEG-treated rats, respectively. Red spots are indicating putative MEG-specific DNA adducts.

(A)



(B)

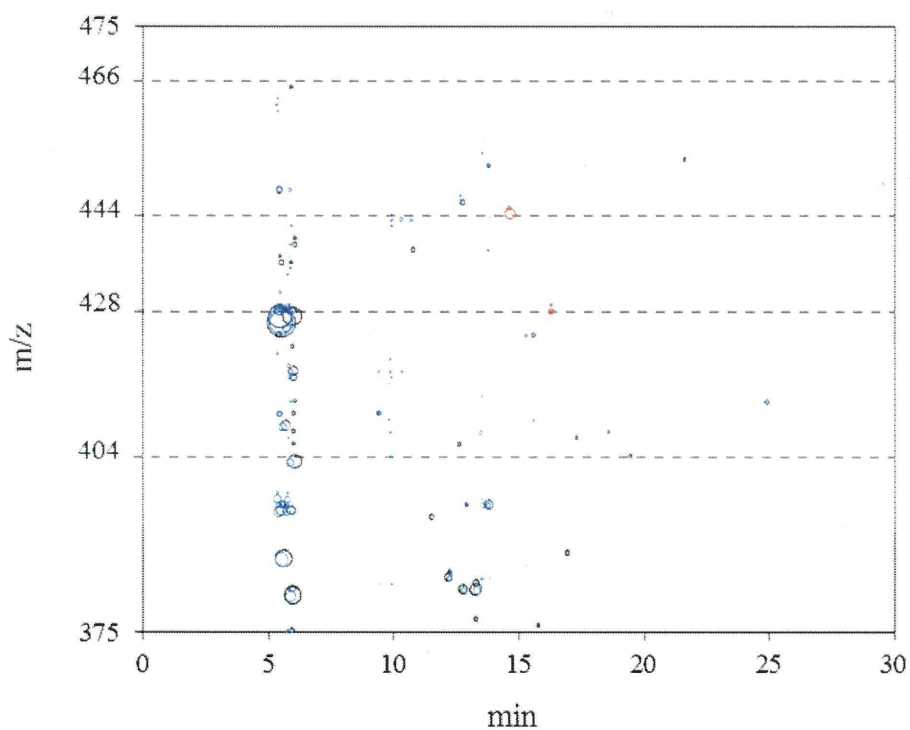


Fig. 6 Product ion spectra of putative Peak I(A) , Peak II (B), and Peak III (C) detected in the livers of MEG-treated rats. The cone voltages and collision energies were set at 15 V and 5-30 eV in the positive ion mode, respectively.

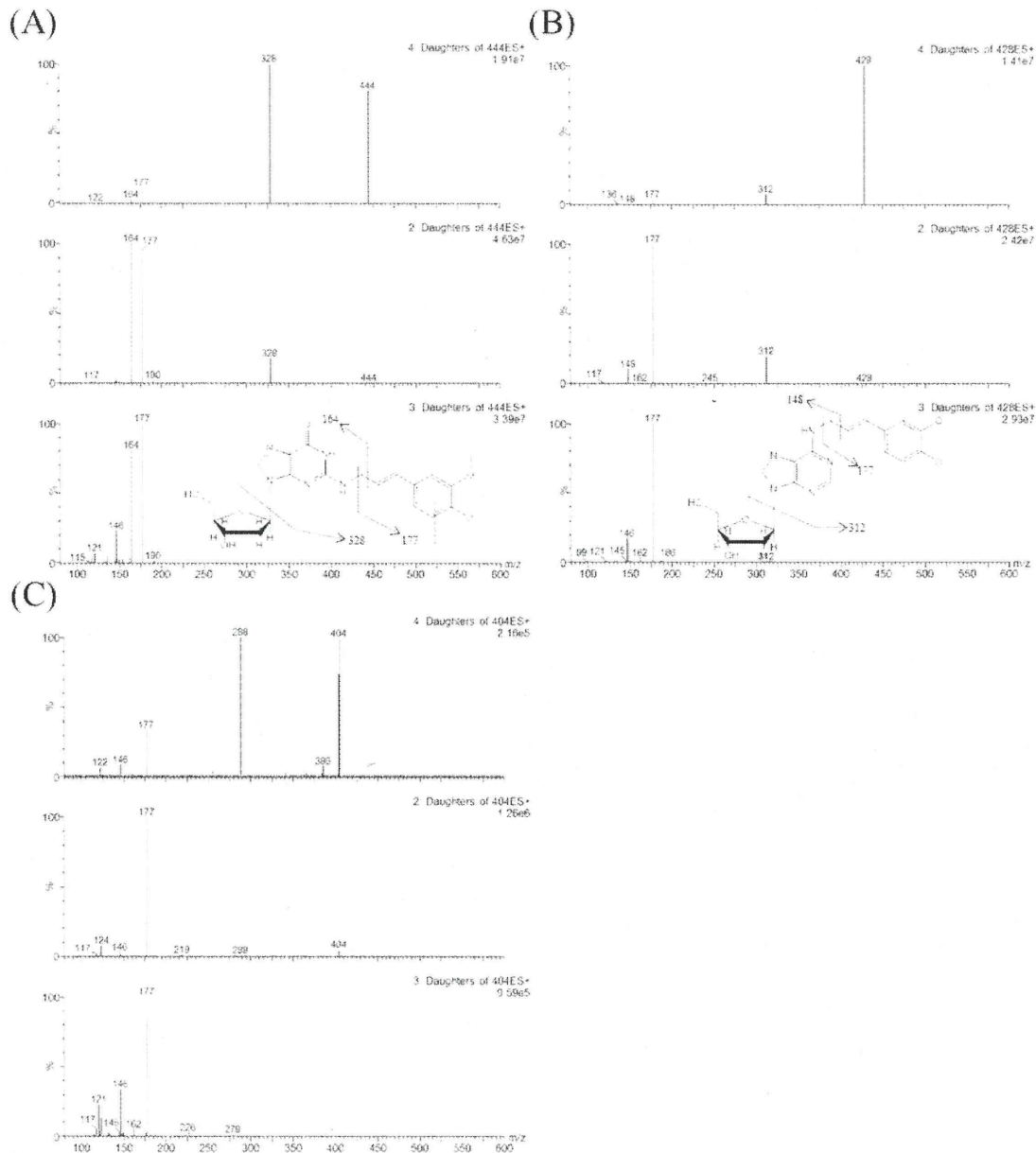
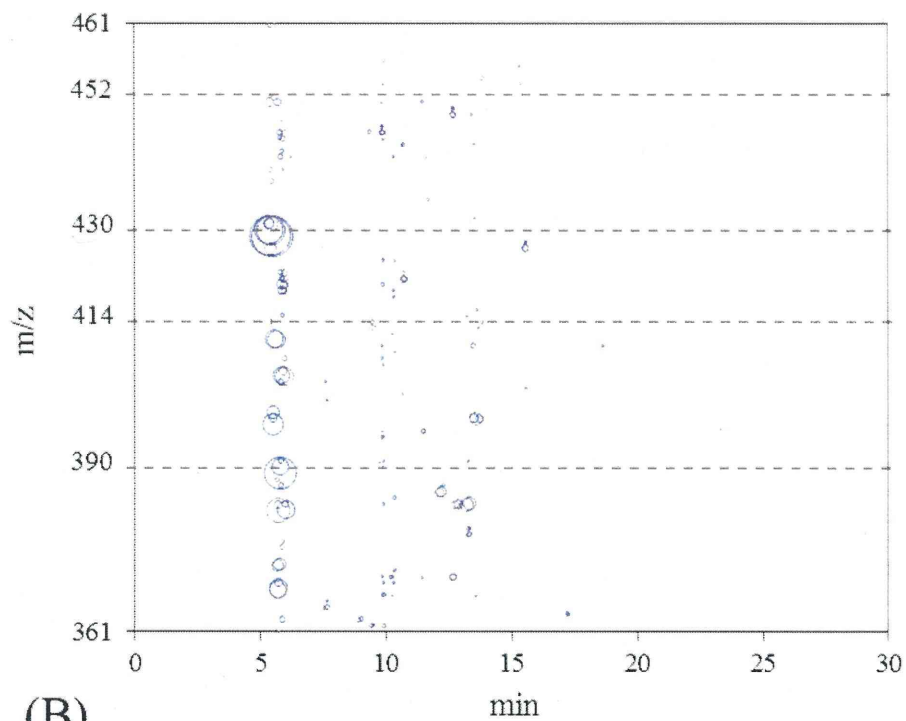


Fig. 7 DNA adductome maps of liver (A) and kidney (B) of rats treated with EG for 4 weeks. Black and blue spots are indicating control and EG-treated rats, respectively.

(A)



(B)

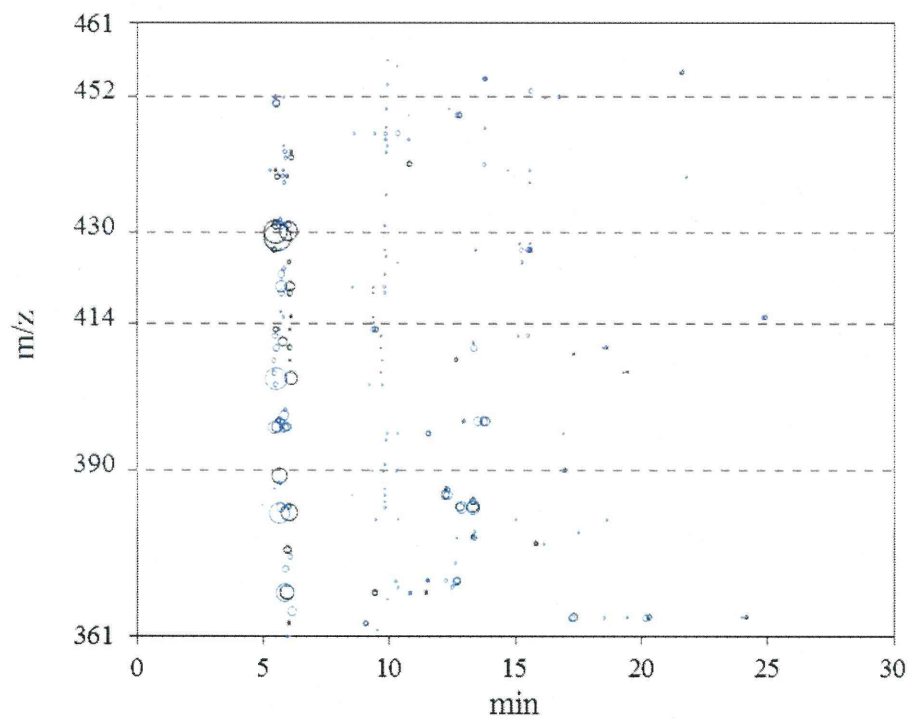


Figure 8 Mutation spectra in the livers of *gpt* delta rats treated with vehicle (A), ES (B), MEG (C), and EG (D) for 4 weeks.

