

20132705/B

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～25年度 総合研究報告書

研究代表者 石井 雄二

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総合研究報告

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	-----	47
--------------------	-------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	48
------------------	-------	----

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）
総合研究報告書

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 *in vivo* 変異原性の包括試験」を構築し、その有用性の評価<実験 1>と、本法によるフェニルプロペノイド系化合物の評価<実験 2>を実施した。また、ヘプタノンエテノ (Hε) 付加体による酸化的 DNA 損傷評価法の構築と有用性の検討<実験 3>を実施した。<実験 1>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) を被験物質として、網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験による評価を実施した結果、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った。<実験 2>網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験によりラット肝発がん性を有するエストラゴール (ES) 及びメチルオイゲノール (MEG) と、発がん性を示さないオイゲノール (EG) を評価した結果、ES 及び MEG 投与群の肝臓では、それぞれから生じる種々の DNA 付加体が検出され、A:T-G:C transition の増加を伴う *gpt* 変異体頻度の有意な上昇が認められた。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又は推定が可能であった。*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認められた。一方、EG 投与群の肝臓及び腎臓では DNA 付加体形成、*gpt* 及び Spi⁻ MFs 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 3>Hε 付加体の測定のための定量解析法を構築し、アリザリン (Alz) 投与群の腎臓と、対照群の腎臓における Hε 付加体を測定した結果、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たことから、今後、これらの付加体生成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 ³²P 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、平成 24 年度において DNA アダクトーム解析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。また、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中からラット肝発がん性を有するエストラゴール(ES)³⁾及びメチルオイゲノール(MEG)⁴⁾と、発がん性を示さないオイゲノール(EG)⁵⁾の評価を実施した。

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(LPO)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、脂質過酸化物 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。平成 25 年度は、Hε付加体による酸化的 DNA 損傷評価の有用性を確認するため、平成 24 年度に実施

した DNA 損傷評価において 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

IQ は Toront Research Chemicals 社から、Alz は Sigma-Aldrich 社から、SFO, 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 付加体である ES-3' - N^2 -dG, ES-3' -C8-dG 及び ES-3' - N^6 -dA の標準品及びルシジン (Luc) 特異的 DNA 付加体である Luc- N^2 -dG 及び N^6 -dA は合成したものを使用した^{6, 7}。

B-2. 網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験

B-2-1. 動物実験操作

動物は 6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラット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。

IQ, SAF 及び Alz を用いた網羅的 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、*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。

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化合物の評価では、*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°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⁸⁾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 µl の DW 水に溶解後、Nano Drop[®] 1000 を用いて DNA 濃度を測定し、100 µg/150 µl 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, 20 min) した。得られた試料から 100 µl ずつを各群 (n=5) でまとめ、450 µl 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 µl 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 µm) 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 V 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、(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⁻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。

B-3. Hε 付加体による酸化的 DNA 損傷評価の確立

B-3-1. 標準品及び安定同位体の合成

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、HPLC による分取によって Hε dG、Hε dA 及び Hε dC の分析用標準品を獲た。また、内標準物質として使用する各付加体の安定同位体は、4 ml の DW 水に溶解した [¹⁵N₅]-dG (25 mg)、[¹⁵N₅]-dA (25 mg) 及び [¹⁵N₃]-dC (25 mg) に、ONE (32 mg) を 240 μl 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、HPLC による分取を行った。

B-3-2. 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 μl に [¹⁵N₅]-Hε dG、[¹⁵N₅]-Hε dA、及び [¹⁵N₃]-Hε 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 μl 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 μ 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 ϵ dG の測定には、Cone Voltage を 22 V, Collision energy を 12 V ととし、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 ϵ dA の測定には、Cone Voltage を 24 V, Collision energy を 22 V ととし、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 ϵ dC の測定には、Cone Voltage を 22 V, Collision energy を 20 V ととし、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)

投与実験は混餌投与もしく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 損傷解析法の構築

C-1-1. 網羅的 DNA 損傷解析法の最適化

ES の DNA 付加体 ES-3' -N²-dG, C8-dG 及び N⁶-dA と、Luc の DNA 付加体 Luc-N²-dG 及び N⁶-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' -N²-dG, C8-dG 及び N⁶-dA は 16.6 分、11.5 分及び 18.7 分に、Luc-N²-dG 及び N⁶-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. 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

C-2-1. 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。SFO 投与群では肝臓及び腎臓の相対重量の有意な高値（肝臓： $p < 0.01$ ，腎臓： $p < 0.01$ ）が認められ、実重量においても有意な高値（肝臓： $p < 0.01$ ，腎臓： $p < 0.01$ ）が認められたことから、これらは SFO の毒性に起因する変化と考えられた。Alz 投与群では投与に起因する変化は認められなかった。

C-2-2. 酸化 DNA 損傷解析

酸化 DNA 損傷の指標である 8-OHdG レベルを Figure 2 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-2-3. 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 3 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 4-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⁹⁾。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 4-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^6 -dG と考えた⁹⁾。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. 5-A)。

SFO 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 6 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 7-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, SFO 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 SFO-3' - N^2 -dG と同定した¹⁰⁾. また, SFO-3' - N^2 -dG と保持時間が一致する [m/z 450, 15.6 min] は, SFO-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 7-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 ^{32}P -postlabelling 法で報告されている SFO-3' - N^6 -dA と同定した¹⁰⁾. 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 SFO-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, SFO-3' - N^2 -dG と極性が近い [m/z 428, 15.0 min] は SFO-1' - N^2 -dG, 極性が異なる [m/z 428, 12.4 min] は SFO-3' -C8-dG と考えられた¹¹⁾. [m/z 388, 14.9 min] は SFO と dC の付加体と質量数が一致することから, SFO-3' - N^4 -dC と考えられた. 一方, SFO-3' - N^2 -dG と同時に検出されたスポット [m/z 444, 15.6 min] は SFO-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 SFO-3' - N^2 -dG 及び SFO-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. 5-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 8).

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-2-4. *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 G:C-T:A ($p < 0.01$) 及び A:T-T:A 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.

SFO 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 G:C-T:A transversion ($p < 0.05$) と A:T-G:C 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。

C-3. 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

C-3-1. 被験物質の投与

最終体重及び腎重量を Table 8 に示す。ES 投与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-3-2. 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 9 に、multiple-reaction monitoring (MRM) クロマトグラムを Figure 10-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^2 -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 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ と判断した。Peak I から VI の MS スペクトラムを Figure 11 に示す。Peak II [m/z 414, 15.6 min] の MS スペクトラム (Fig. 11-C) 上には、ES-3'- N^2 -dG (Fig. 11-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 ($[\text{M}+\text{H}-116]^+$) 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 と考えられた¹²⁾。Peak IV [m/z 414, 12.9 min] の MS スペクトラム (Fig. 11-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 ($[\text{M}+\text{H}-116]^+$) 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. 11-F) 上には、特徴的なフラグメントイオンとして m/z 258 ($[\text{M}+\text{H}-116]^+$) 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 9)。

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 12 に、MRM クロマトグラムを Figure 10-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 [M+Na]⁺ と判断した。Peak I から III の MS スペクトラムを Figure 13 に示す。Peak I [m/z 444, 14.6 min] の MS スペクトラム (Fig. 13-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' - A²-dG と同定した¹³⁾。Peak II [m/z 428, 16.3 min] の MS スペクトラム (Fig. 13-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' - A²-dA と同定した¹³⁾。Peak III [m/z 404, 13.8 min] の MS スペクトラム (Fig. 13-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 9)。

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 14)。

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 9 に示す。

C-3-3. *in vivo* 変異原性の検索

gpt 及び Spi⁻ assay の結果を Table 10-13 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 0.95 ± 0.28 及び 0.62 ± 0.13 であった。また、腎臓における *gpt* 及び Spi⁻ MF は 1.07 ± 0.46 及び 0.53 ± 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 ± 0.86, p<0.01) と Spi⁻ MFs の上昇傾向 (1.32 ± 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. 15-B)。一方、腎臓において *gpt* 及び Spi⁻ 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 ± 2.02, p<0.05) と Spi⁻ MFs の上昇傾向 (1.30 ± 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 (Fig. 15-C)。一方、腎臓において *gpt* 及び Spi⁻ 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⁻ MFs の変化は認められなかった。

C-4. Hε 付加体による酸化的 DNA 損傷評価の確立

C-4-1. Hε 付加体の測定法構築

Hε dG, Hε dA 及び Hε dC の標準品の 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 16 に示す。本実験で設定した LC-MS/MS 条件下におい

て Hε 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 Hε dA 及び dC のピークが検出されたものの, Hε dG は検出限界 (signal/noise; s/n=3) 以下であった.

C-4-1. Hε 付加体による酸化的 DNA 損傷評価の有用性の確認

Alz 投与群のラット腎臓の MRM クロマトグラムを Figure 17 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 ± 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 (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 ± 0.28 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 損傷解析法の構築

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- N^2 -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. 網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異

原性の包括試験による IQ, SFO 及び Alz の評価

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- N^6 -dA と考えられるスポットが検出され, *gpt* 遺伝子では A:T-T:A transversion の頻度も増加したことから, IQ-C8-dG に加え IQ- N^6 -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 G:C-T:A transversion と特徴的な A:T-G:C 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^2 -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, G:C-T:A 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 G:C-T:A 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 A:T-G:C 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^6 -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 SpiMF 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-3. 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

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。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。

D-4. 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' - N^6 -dG, ES-3' -8-dG, ES-1' - N^6 -dG 及び ES-3' - N^6 -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' - N^6 -dG 及び MEG-3' - N^6 -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' - β -dA 及び MEG-3' - β -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、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用いた SFO は、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の一つである。SFO はラット肝臓において ES 及び MEG と同様に 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した。これらの結果を考慮すると、直接的 DNA 損傷と、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-5. H ϵ 付加体による酸化的 DNA 損傷評価の確立

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 ϵ dA 及び

H ϵ dC レベルは、対照群に比していずれも上昇傾向を示したことから、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。この H ϵ -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¹⁰⁾ことから、今後、本研究で構築した解析法を網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の包括試験に適用することで、化学発がん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、より詳細かつ正確な化学物質の遺伝毒性評価が可能であることを明らかにした。また、フェニルプロペノイド系化合物の評価の結果、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。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。一方、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、これら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. 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
- 2) 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., Okamura, T., Inoue, T., Fukuhara, K., Umemura, T., Nishikawa, A. Chemical structure determination of DNA bases modified by active metabolites of lucidin-3-O-primeveroside. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 134-141, 2010.
- 8) 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.
- 9) 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] quino line in the liver, kidney, and colorectum of the rat. *Chem. Res. Toxicol.* 2, 397-402. 1996.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) Herrmann, K., Engst, W., Meinel, 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.
 - 14) 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 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.

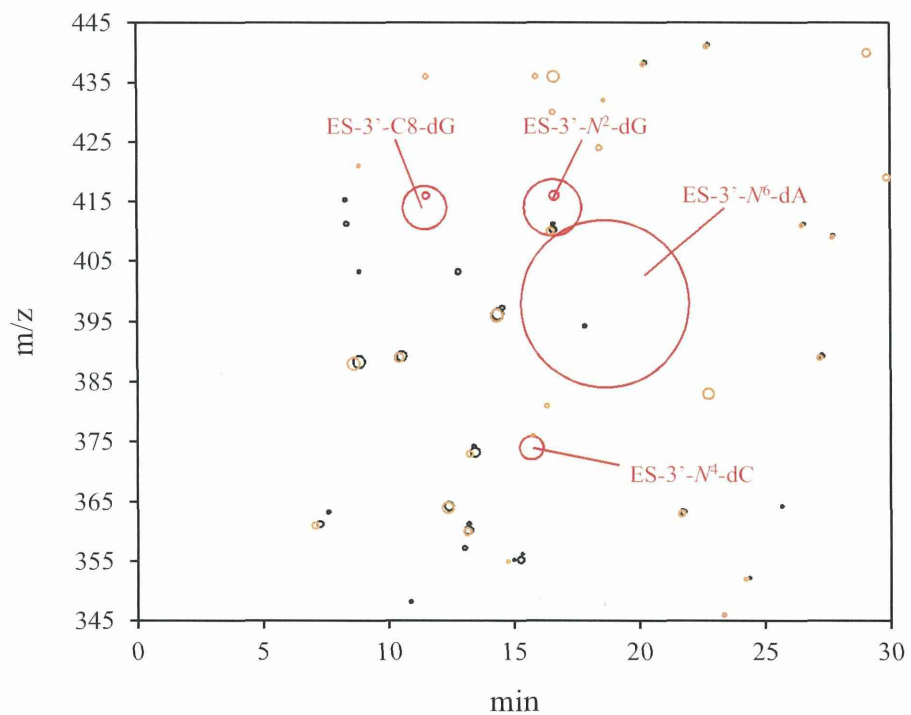
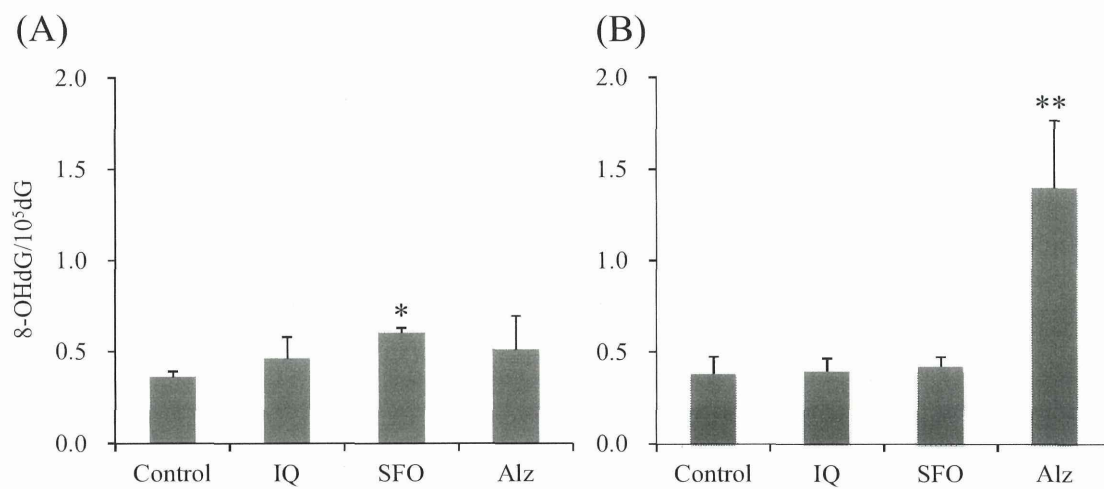


Fig. 2 8-OHdG levels in the livers (A) and kidneys (B) of F344 *gpt* delta rats treated with IQ, SFO and Alz for 4 weeks.



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

Fig. 3 DNA adductome maps of Liver (A) and kidney (B) of rats treated with IQ for 4 weeks. Black and blue spots are indicating control and IQ-treated rats, respectively. Red spots are indicating putative IQ-specific DNA adducts.

