

2. 学会発表

横平政直；山川けいこ；中野裕子；沼野琢旬；岸宗佑；二宮芙美子；竿尾光祐；今井田克己、
Immunohistochemical characteristics of surfactant protein A, B, C and D in the lung of F344 rats.、
第72回日本癌学会学術総会、2013.10

横平政直；山川けいこ；木内茂巳；中野裕子；二宮芙美子；岸宗佑；竿尾光祐；今井田克己、
Immunohistochemical characteristics of the lung proliferative lesions in F344 rats.、第71回日本癌学会総会、2012.09

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1、実験2および3で用いた抗体

Antibody	Product code	Dilution	Company
(Cell proliferation)			
PCNA(PC10)	sc-56	1:100	Santa Cruz Biothechnology, Inc., CA, USA
Ki67	NCL-Ki67p	1:2000	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
EGF-R	M 3563	1:200	Dako North America, Inc., CA, USA
(Cell cycle)			
Cyclin D1	413531	1:100	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan
p27	M 7202	1:400	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
p53	M 7001	1:50	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
p16	CINtec p16	fully diluted	Roche mtm laboratories AG, Heidelberg, Germany
(Tumor producing)			
CEA	A 115	1:100	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
(Alveolar epithelium)			
Napsin A	NCL-L-Napsin A	1:100	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
TTF-1	M 3575	1:200	Dako North America, Inc., CA, USA
SP-A	M 4501	1:500	Dako Japan Co., Ltd., Kyoto, Japan
(Cell membrane)			
Cytokeratin 7	NCL-CK7-OVTL	1:500	Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
Cytokeratin 20	NCL-CK20	+	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
(Endocrine receptor)			
Estrogen receptor α	NCL-ER-6F11	1:100	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
Progesterone receptor	NCL-PGR-312	1:600	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
(Neuroendocrine)			
Chromogranin A	A 0430	1:100	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Synaptophysin	NCL-SYNAP-299	1:100	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
(Squamous cell)			
Cytokeratin 34 β E12	M 0630	1:50	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Cytokeratin 5/6	M 7237	1:50	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark

表 2, 実験 5 で用いた抗体

	SP-A	SP-B	SP-C	SP-D
Antibody	H-148		FL-197	Original*
	sc-13977	bs-1034R	sc-13979	
Company	SANTA CRUZ	Bioss	SANTA CRUZ	
Dilution	1:50	1:100	1:50	
Incubation	30min	overnight	30min	

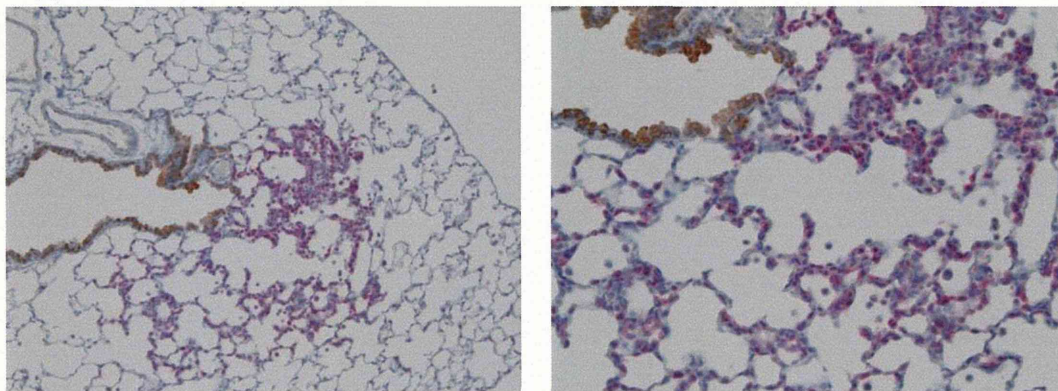
*DIMS Inst. Med. Sci.

表 3, SP 発現のまとめと Napsin A との比較

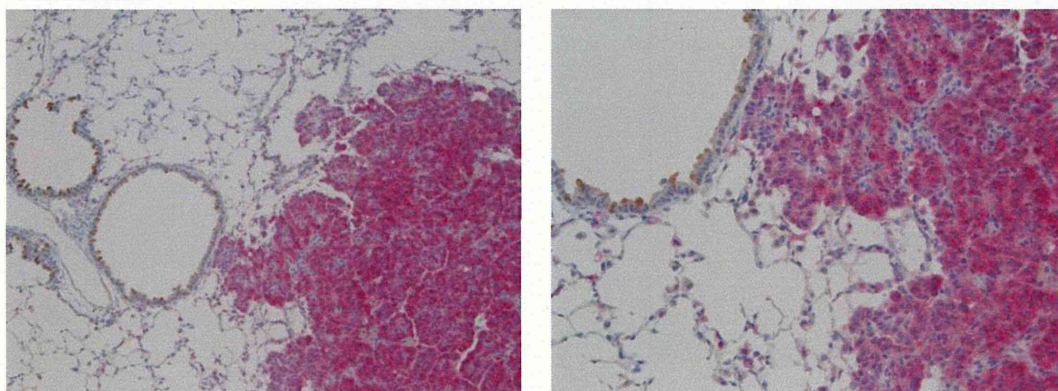
	SP-A	SP-B	SP-C	SP-D	Napsin-A
Inflammatory lesions					
mucus in the alveoli	+++	+	+	+++	++
alveolar cells	-	+	+++	+	-
broncial epithelial cells	+	+++	+	+	+
macrophages	++	+	+	++	++
Proliferative lesions					
hyperplasia	-	++	+++	-	+++
adenoma	-	++	+++	-	+++

図1, NNK誘発マウス肺におけるCCSPとSP-Cの発現

Hyperplasia

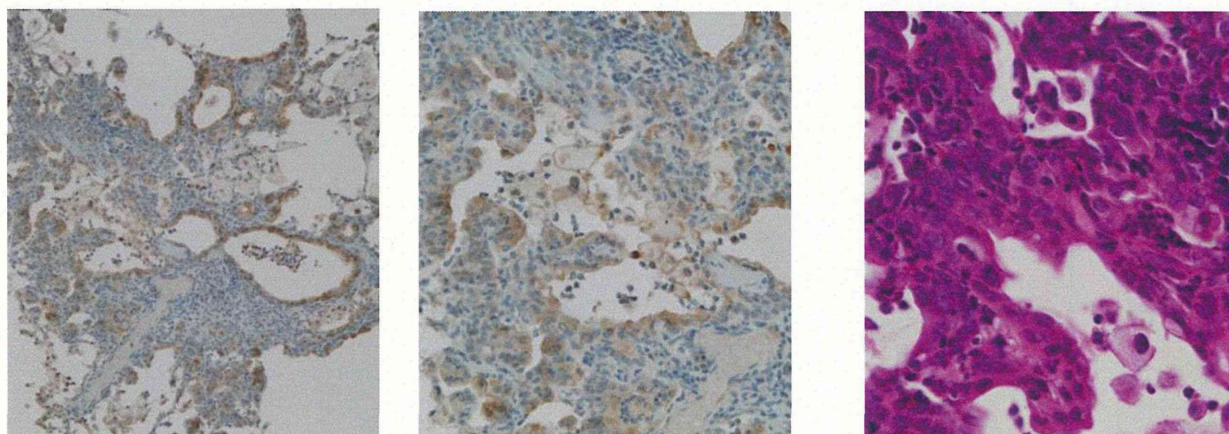


Adenoma



CCSP+SP-C (brown;CCSP, red; SP-C)

図2, NTCU誘発マウス肺扁平上皮異形成におけるCCSPとSP-Cの発現

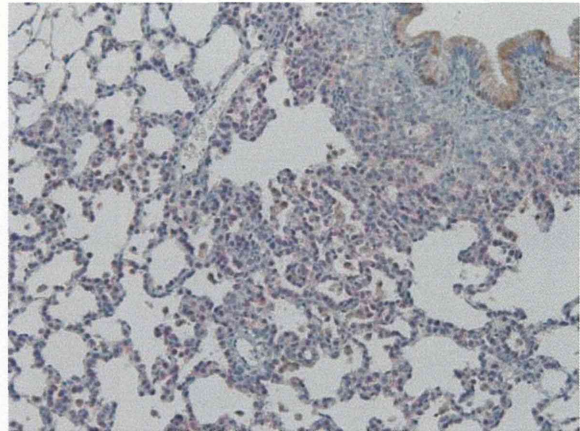
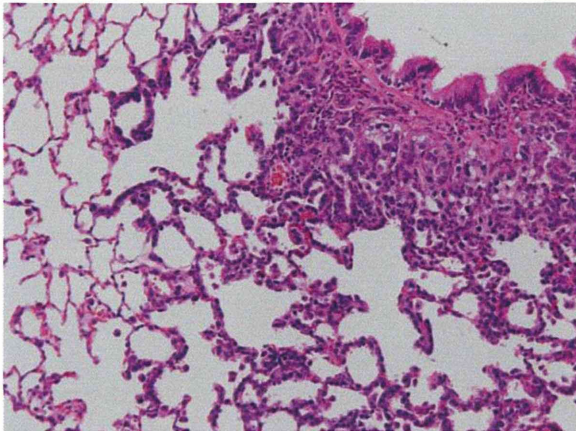


CCSP+SP-C (brown;CCSP, red; SP-C)

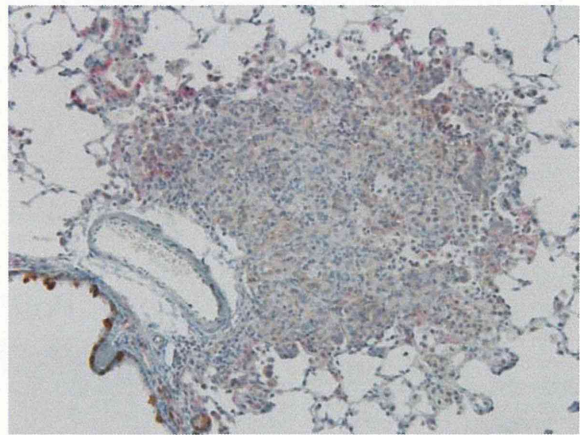
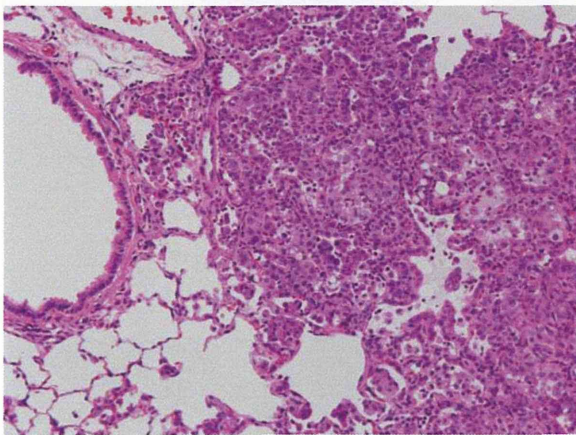
H. E.

図3, DHPN誘発ラット肺におけるCCSPとSP-Cの発現

Hyperplasia



Adenocarcinoma

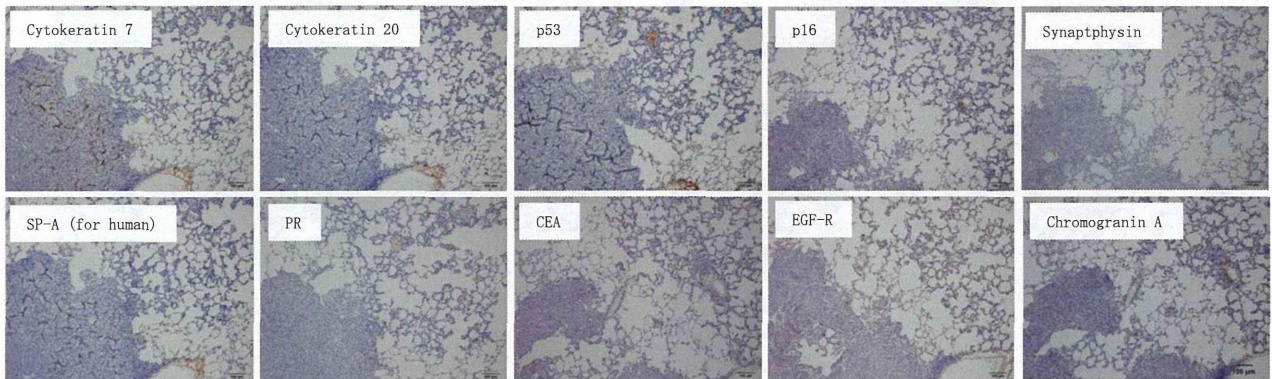


H. E.

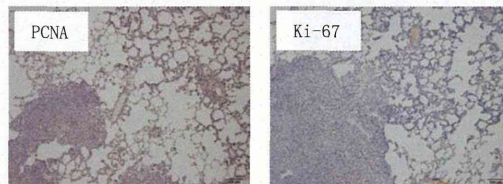
CCSP+SP-C
(brown; CCSP, red; SP-C)

図4, DHPN誘発ラット肺における各種マーカー発現の検討
(候補マーカーの選定)

Negative

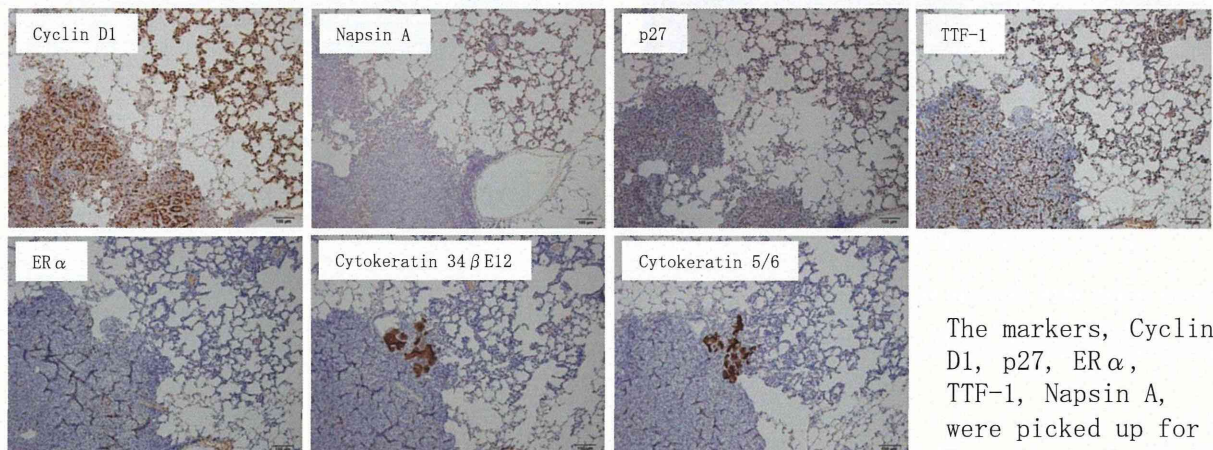


Useless



No difference between tumors and non-tumors.

Positive



The markers, Cyclin D1, p27, ER α , TTF-1, Napsin A, were picked up for Experiment 3.

図5, DHPNおよびNNK誘発ラット肺における候補マーカーの検討

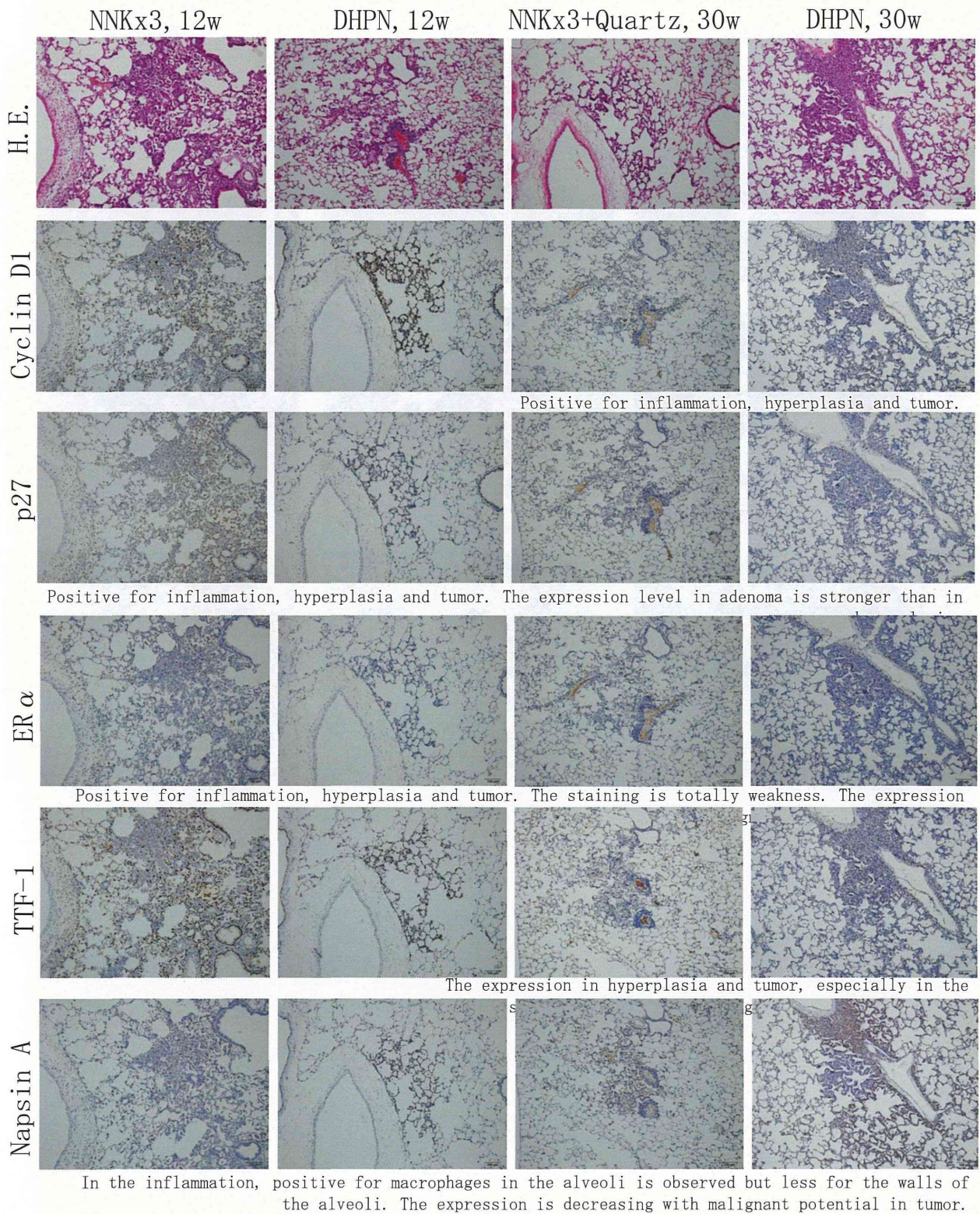


図6, 微粒子気管内投与ラット肺 (炎症性変化) におけるNapsin Aの検討

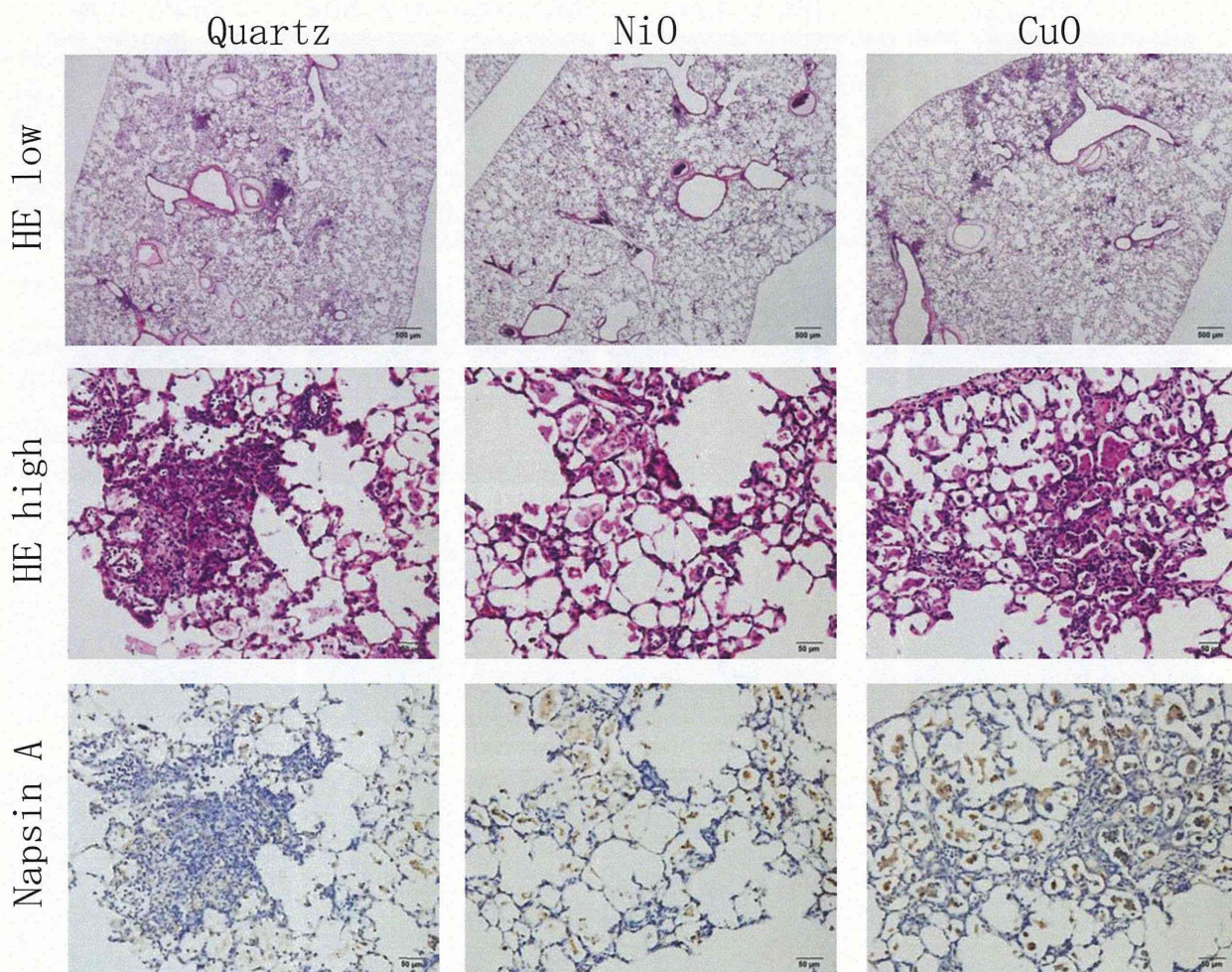
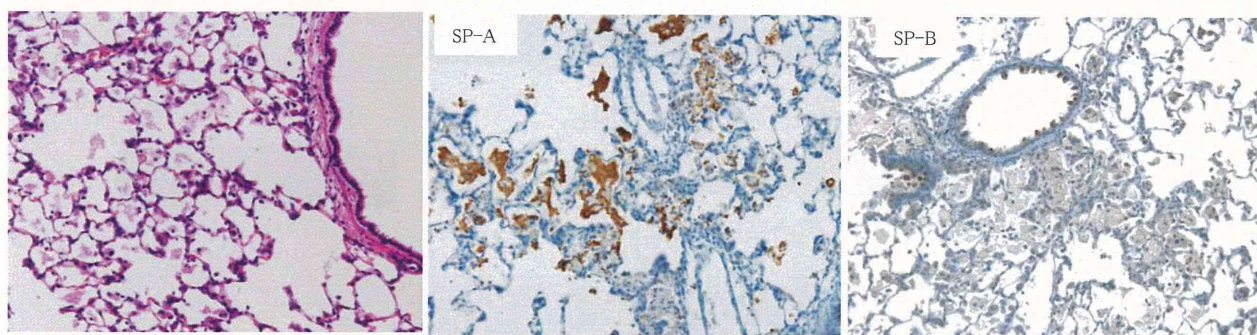


図7, ラット肺 (炎症性変化および腫瘍) におけるSP-A, B, C, Dの検討

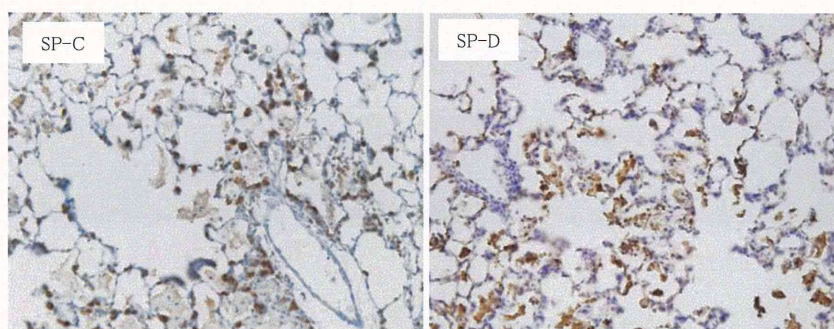
< Quartz微粒子誘発F344ラット肺炎症性変化 >



F344 rat lung, quartz induced (x200).

Strong positive for the mucus in the alveoli.

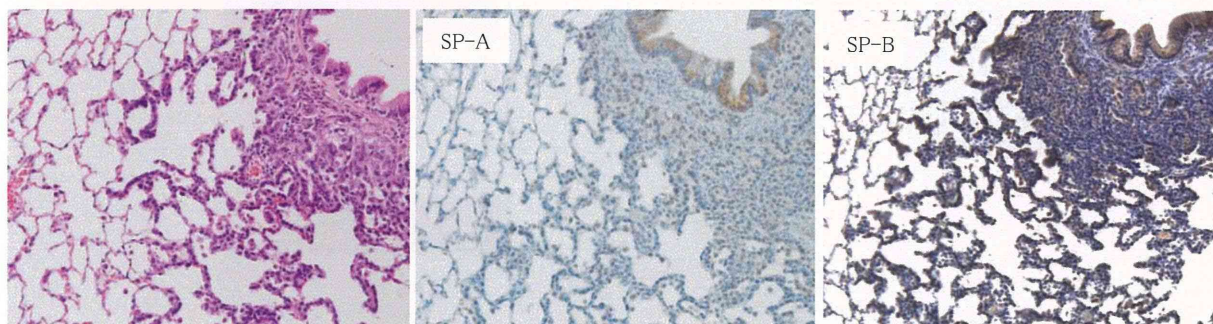
Weak positive for the mucus in the alveoli.
Strong positive for the alveolar epithelial cells and bronchial epithelial cells.



Weak positive for the mucus in the alveoli.
Strong positive for the alveolar epithelial cells.

Strong positive for the mucus in the alveoli.
Partially positive for the alveolar epithelial cells.

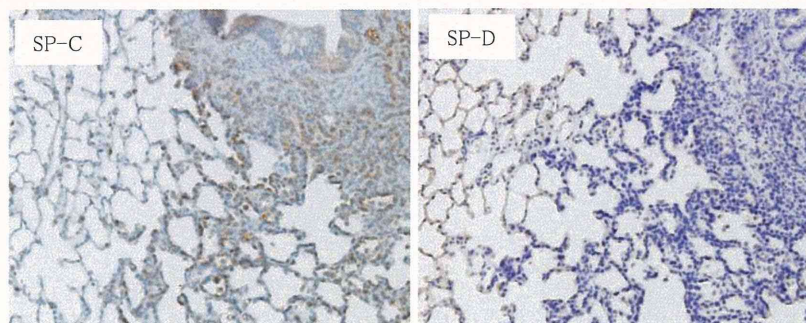
< DHPN微粒子誘発F344ラット肺腫瘍性変化 >



F344 rat lung, DHPN induced (x200).
Hyperplasia and adenoma.

Weak positive (-) for the proliferative lesions.

Strong (++) positive for the proliferative lesions.

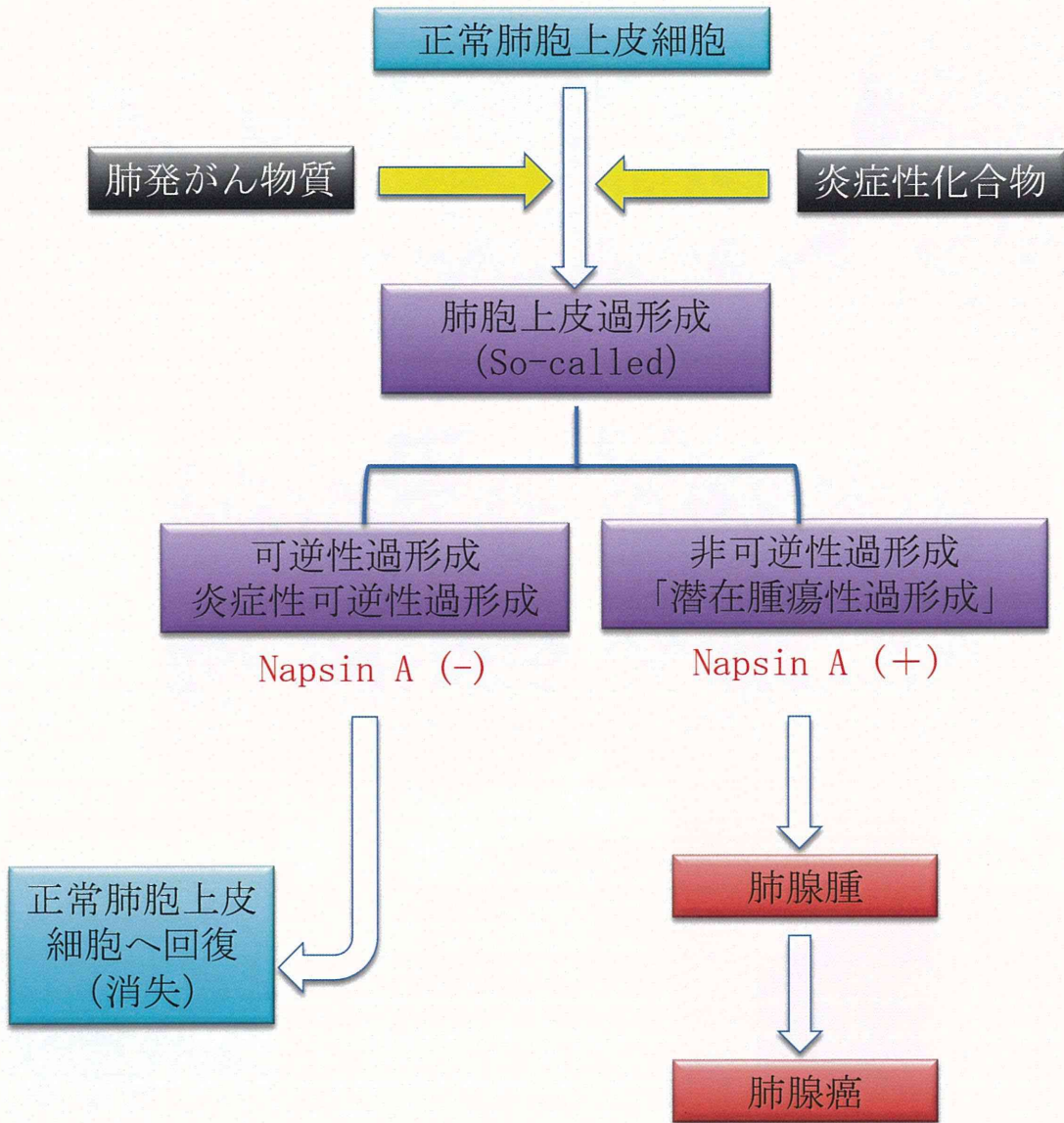


Strong positive (+++) for the proliferative lesions.

Almost negative (-) for the proliferative lesions.

Positive for normal alveolar epithelium.

図8, 過形成病変の捉え方と鑑別



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発

研究分担者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長

研究要旨

本研究は、短・中期に膀胱を標的とする遺伝毒性を予見できる指標の検索を目的としている。昨年度までに、既知の遺伝毒性物質 *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) 投与ラット膀胱粘膜の正常様粘膜、過形成粘膜および悪性腫瘍組織における各種 DNA 損傷修復関連マーカーの発現を、無処置ラット膀胱粘膜と免疫組織化学的に比較検討した。DNA 二重鎖切断のマーカーである γ H2AX は、無処置粘膜に認められなかった一方、BBN 投与ラットの増殖性病変のみならず、正常様粘膜上皮においても核内に顆粒状陽性巣が観察され、遺伝毒性物質の曝露指標となる可能性が示唆された。平成 25 年度は、膀胱に増殖性病変を誘発する種々の化学物質をラットに投与し、膀胱上皮細胞における γ H2AX の発現を病理組織学的に検討した。6 週齢の雄 F344 ラット各群 10 匹に、0.05% BBN、1.8% 2-nitroanisole (2-NA)、2% 2,2-bis (bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、3%メラミン、または 3%ウラシルを 4 週間混餌 (BBN のみ飲水) 投与し、投与終了時に 5 匹、2 週間の休薬後に 5 匹を解剖した。膀胱を採材し、尿路上皮での γ H2AX の発現を免疫組織化学的に検索した。4 週時には、BBN および 2-NA 群のラット膀胱上皮細胞で γ H2AX の発現が高頻度に認められた。2 週間の休薬後、BBN および 2-NA 群では γ H2AX 発現が残存したが、他の群では過形成の退縮とともに陽性細胞は稀となった。以上より、 γ H2AX は膀胱に対する遺伝毒性/発癌性の指標として利用し得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は、短・中期に膀胱を標的とする遺伝毒性を予見できる指標の検索を目的としている。昨年度までに、既知の遺伝毒性物質 *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) 投与ラット膀胱粘膜の正常様粘膜、過形成粘膜および悪性腫瘍組織における各種 DNA 損傷修復関連マーカーの発現を、無処置ラット膀胱粘膜と免疫組織化学的に比較検討した。その結果、DNA 二重鎖切断のマーカーである γ -H2AX は、無処置粘膜には発現が認められない一方、BBN 投与ラットの増殖性病変および正常様粘膜上皮において核内に顆粒状陽性巣が観察され、遺伝毒性物質の曝露指標となる可能性が示唆された。

近年、発癌過程における DNA 損傷・修復経路の重要性が明らかにされつつあり、特に DNA 二重鎖切断はゲノム不安定性の原因となる深刻な傷害と認識さ

れている。DNA に二重鎖切断が生じると、ヒストン構成タンパクの一種 (H2AX) が速やかにリン酸化され、 γ H2AX を形成する。癌化における γ H2AX の役割には不明な点が多く、中でも膀胱癌との関連についての研究は非常に少ない。平成 25 年度は、膀胱に増殖性病変を誘発する種々の化学物質をラットに投与し、膀胱上皮細胞における γ H2AX の発現を病理組織学的に検討した。

B. 研究方法

6 週齢の雄 F344 ラットに、0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)、1.8% 2-nitroanisole (2-NA)、2% 2,2-bis (bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、3%メラミン、または 3%ウラシルを 4 週間混餌 (BBN のみ飲水) 投

与した。各群 10 匹を用い、投与終了時に 5 匹、2 週間の休薬後に 5 匹を解剖した。膀胱を採材し、尿路上皮での γ H2AX の発現を免疫組織化学的に検索した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

BBN および 2-NA (膀胱発癌性/遺伝毒性あり) を 4 週間投与したラット膀胱上皮細胞には、 γ H2AX の発現が高頻度に認められた一方、対照群にはほとんど観察されなかった (表、図 1)。 γ H2AX は上皮細胞の核内にドット状の foci として観察され、陽性細胞は膀胱粘膜の基底側に多い傾向を示した。BMP (過形成誘発、遺伝毒性±) 投与ラットでは、 γ H2AX 発現は粘膜表層の大型核を有する細胞を中心に観察された。PEITC (過形成誘発、遺伝毒性±)、メラミンおよびウラシル (膀胱発癌性あり、遺伝毒性なし) を投与した膀胱に軽度から高度の過形成性病変が認められ、局所的に γ H2AX 発現を示す部位がみられた。2 週間の休薬後、いずれの群でも γ H2AX 発現は減少し、BBN および 2-NA 群では一定数の残存が認められた一方 (図 2)、他の群では過形成の退縮とともに陽性細胞は稀となった。以上より、 γ H2AX は膀胱に対する遺伝毒性/発癌性の指標として利用し得る可能性が示唆された。今後、定量解析等のさらなる検討を加える予定である。

表. 膀胱粘膜における γ H2AX 発現の免疫組織化学的評価

Group	Bladder toxicity	Genotoxicity	Urothelium 4w	Urothelium 4w+2w
Control	None	None	—	—
BBN	Carcinogenic	Positive	++	±~+
2-NA	Carcinogenic	Positive	+++	±~+
BMP	Hyperplastic	+/- (Equivocal)	+	—~±
PEITC	Hyperplastic/ Carcinogenic?	+/- (Equivocal)	±	—~±
Melamine	Carcinogenic	Negative	±	—~±
Uracil	Carcinogenic	Negative	±	—~±

IHC grade: -, almost negative; ±, focal; +, scattered; ++, diffuse; +++, extensive

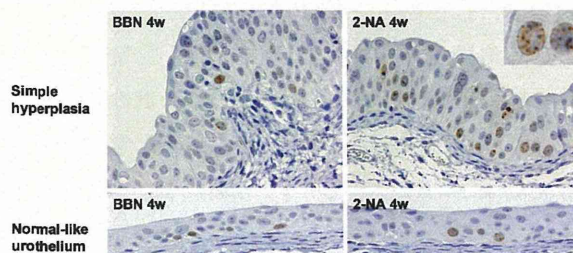


図 1. BBN および 2-NA 4 週間投与後の膀胱粘膜上皮細胞における γ H2AX 発現。上段：単純過形成、下段：正常様上皮

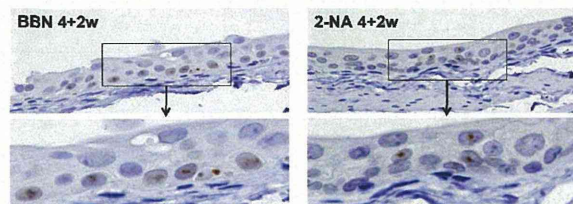


図 2. BBN および 2-NA 4 週間投与+2 週間休薬後の膀胱粘膜上皮細胞における、 γ H2AX 発現の残存

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Toyoda T, Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Onami S, Suzuki I, Ogawa K. Detection of γ -H2AX, a biomarker for DNA double-strand breaks, in urinary bladders of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-treated rats. J Toxicol Pathol, 26: 215-221, 2013

2. 学会発表

1) 豊田武士、曹永暉、赤木純一、水田保子、鈴木勇、小川久美子. 化学物質投与ラット膀胱におけるDNA 二重鎖切断マーカー (γ H2AX) 発現の病理組織学的特徴. 第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、徳島、2014年1月31日

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

網羅的な DNA 付加体解析法を用いた化学物質の DNA 損傷性評価

研究分担者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所発がんシステム研究分野 ユニット長

研究要旨

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験を用いた方法では化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要である。本研究は、*in vitro* 系による遺伝毒性物質あるいは毒性の有無が分からない化学物質の DNA 損傷性を試験する新しい評価法の提案を目標としている。ジクロロメタンなどのハロゲン系炭化水素はグルタチオン-S-転移酵素(GST T1-1)によりグルタチオン(GSH)が付加されることで活性化体となり DNA を修飾し、DNA-アルキル-GSH 付加体を形成すると報告されている。ヒト胆道がん発生におけるジクロロメタンの関連を明らかにする目的で、別途合成した既報のジクロロメタン代謝活性化体と DNA あるいは各種デオキシリボヌクレオシドを反応し、生成される DNA 付加体 GSCH₂-dG などの LC-MS/MS による分析系を確立した。また、ジクロロメタンと GST T1-1 を含むヒト肝サイトゾル、GSH、dG を混合した系からも同じ DNA 付加体が生成されることを確認した。しかしながら、GSCH₂-dG はアルカリ性で不安定であることから、安定性の高い、新たなジクロロメタンによる DNA 付加体を探索する必要がある。そこで、LC-MS による DNA 付加体の網羅的解析法 (DNA アダクトーム解析法) を使い、ジクロロメタンにより誘発される DNA 損傷の評価を行った。その結果、未知の DNA 付加体を 2 つ見出した。さらに、それらの付加体から MS/MS フラグメント解析によりジクロロメタン由来のメチル基を含む修飾 dG 由来のフラグメントイオンが検出されたため、ジクロロメタン由来の新規な DNA 付加体であることが示唆された。次に、マウスを用いた *in vivo* モデルにおける DNA 付加体の生成を、LC-MS を用いたアダクトーム解析 (付加体の網羅的解析) により検討した。DCM 及び DCP を 500ppm で連続 3 日間投与したマウスの肝臓から抽出した DNA を用いてアダクトーム解析を行なったところ、DCM 及び DCP 投与群における総付加体数は溶媒対照群に比べて顕著に増加していることがわかった。しかしながら、DCM の既知付加体である GSCH₂-DNA や、DCP 由来と推定される DNA 付加体は検出されなかった。これら付加体の PCA(主成分解析)の結果、DCM 及び DCP 投与との相関が強い付加体がそれぞれ 4 種及び 1 3 種スクリーニングされた。更に、そのうちの多くの付加体は、炎症及び酸化ストレスに由来する付加体であることを、DNA 付加体データベースを用い、*m/z* 値を比較する事により推測した。このことから、これら被検物質の投与で、マウス肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていたことが示唆された。これら被検物質に由来するバイオマーカーの探索の為には、投与量等を工夫し、炎症等を押さえた条件下で行なう事が必要であると考えられた。このような付加体の網羅的解析により、バイオマーカーを見出すことが出来れば、DCM 及び DCP のヒト胆管癌発症との関係が明らかになることが期待される。

A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験 (変異原性試験)、コメットアッセイ (DNA 損傷試験)、小核試験 (染色体異常試験) などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考えられる。そこで昨年は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法 (アダクトーム法) を使い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめた。本年は、昨年度に確立した LC-TOF-MS による DNA アダクトーム法を用いて、ヒトが曝露しうる化学物質が誘発する DNA 損傷性の評価ならびに新規 DNA 付加体の解析を行う。

最近、ジクロロメタンや 1,2-ジクロロプロパン等のハロゲン系炭化水素は職業性胆管がんの原因物質であることが示唆されているが、これらハロゲン系炭化水

素と印刷業者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。そのため、これらヒト胆管がんの発生とジクロロメタン (DCM)、1,2-ジクロロプロパン (DCP) などのハロゲン系炭化水素の関与を判断しうる、安定性が高く、診断に用いることが出来るような信頼性の高い診断マーカーが必要となる。本研究では、遺伝子変異の基となり、バイオマーカーになりうるハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体の解析を、*in vitro* 及び *in vivo* 実験系を用いて試みた。

B. 研究方法

1. *in vitro* 反応

ハロゲン系炭化水素はグルタチオン-S-転移酵素 (GST T1-1) により GSH が付加されることで活性化体となり DNA を修飾し、DNA-アルキル-GSH 付加体を形成すると報告されている。DNA-アルキル-GSH 付加体の生成を *in vitro* 系を検討するために、以下のように研究を実施した。

1) ジクロロメタン由来の DNA 付加体の標準品を化学合成し、分析条件の確立を LC-ESI-MS/MS を用いて行った。

2) これら付加体がハロゲン系炭化水素と GSH の共存下で GSTT1-1 の作用により生成するかについて検討をおこなった。

3) 既報の DNA-アルキル-GSH 付加体以外の未報告の DNA 付加体の生成について、LC-TOF-MS を用いた網羅的解析法 (アダクトーム法) により検討した。

各項目における実験条件を以下に示す。

1) ジクロロメタンの活性化体である S-アセトキシメチルグルタチオン (GSCH2OAc) とウシ胸腺 DNA (CT-DNA) あるいは 4 種のデオキシリボヌクレオシド [2'-デオキシグアノシン (dG)、2'-デオキシシチジン (dC)、2'-デオキシアデノシン (dA)、チミジン (dT)] を 37°C で 1 時間反応させた。CT-DNA サンプルについては反応後 DNA 消化酵素でヌクレオシドレベルまで分解し、LC-ESI-MS/MS (Quattro Ultima Pt) に供した。

2) マウス、ラット及びヒト由来の GSTT1-1 を含む画分である肝 cytosol 存在下で、ジクロロメタン、GSH 及び 4 種のデオキシリボヌクレオシド (dG、dC、dA、dT) を HEPES バッファー (pH 7.0) 中で 37 °C で 1 時間インキュベートした。限界ろ過膜に通し、LC-ESI-MS/MS に供した。

3) 1) のサンプルのうち GSCH2OAc と dG 反応液を LC-TOF-MS に供し、DNA アダクトーム解析法 (詳細な解析方法は前年度分担研究報告書を参照) により解析した。また、検出された未知の DNA 付加体について MS/MS フラグメント解析を実施した。

2. in vivo 反応

DCM 及び DCP のバイオマーカー探索のため、雄性 B6C3F1 マウス (8 週齢) に DCM 及び DCP を 500 ppm の濃度で 3 回連続胃内強制投与を行い、肝臓 DNA 中のバイオマーカーとなり得る DNA 付加体を LC-TOF-MS を用いた網羅的解析法 (アダクトーム法) により検討した。

実験方法を以下に示す。

1) マウスへの被検物質投与と DNA 調整

雄性 B6C3F1 マウス (8 週齢) に DCM を 500 ppm の濃度で 3 回連続胃内強制投与を行なった。コントロール及び被検物質投与同種動物の肝臓から DNA を抽出した後、消化酵素でヌクレオシドレベルまで分解し、LC-ESI-MS/MS (Quattro Ultima Pt) に供した。

2) 得られたデータを主成分 (PCA) 解析により解析し、バイオマーカー探索を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

1. in vitro 反応

各実験項目の結果を以下のように示す。

1) CT-DNA との反応で生成させたジクロロメタン由来の 4 種の GSCH2-DNA 付加体 (GSCH2-dG, GSCH2-dC, GSCH2-dA, GSCH2-dT) の生成について調べたところ、GSCH2-dG がその他の塩基由来の付加体と比べ 40 - 1400 倍も多く生成することがわかった。

2) マウス、ラット及びヒト由来の GSTT1-1 を含む画分である肝 cytosol 存在下で、ジクロロメタン、GSH 及び 4 種のデオキシリボヌクレオシドを反応させたところ、反応混液中に GSCH2-dG に相当するピークのみが観察され、dC、dA および dT に由来する付加体は検出されなかった。このことから、ジクロロメタン由来の GSH 付加体は GSCH2-dG がメジャーな付加体であることが示唆された。

3) 1) のサンプルの GSCH2OAc と dG 反応液を LC-TOF-MS を用いた網羅的解析法 (アダクトーム法) により解析したところ、GSCH2-dG が検出されただけでなく、他にも多数の DNA 付加体が観察されたことから、GSCH2-dG 付加体以外にも多くの未報告の DNA 付加体が生成されていることがわかった (図 1)。それらのうち、図 1 の arrowhead の DNA 付加体について MS/MS フラグメント解析を行った。その結果、メチル基 + dG に由来するものと思われるフラグメントイオンが検出された。

2. in vivo 反応

DCM 及び DCP を投与したマウス肝臓 DNA のアダクトーム解析を行なった結果を図 1 に示す。溶媒対象と比較し、複数の付加体スポットが DCM 及び DCP の投与により観察されることがわかった。しかしながら、DCM の既知付加体である GSCH₂-DNA や、DCP 由来と推定される DNA 付加体は検出されなかった。更に、主成分 (PCA) 解析を行なったところ、DCM 投与では 4 種の付加体 (A1, A2, A3, A8) が、DCP 投与では 13 種の付加体がそれぞれの被検物質投与と相関することが示された。これら付加体の m/z 値を DNA 付加体データベースと比較したところ、そのうちの殆どが酸化ストレス及び炎症に関連する付加体と一致することが分かった (図 2 - 4)。

D. 考察

本研究では、ヒト胆管がん発症との関係が疑われている DCM 及び DCP のバイオマーカーを探索することを目的として、in vitro 反応による DNA 付加体の解析及びマウスを用いた in vivo モデルにおける DNA 付加体の生成を、LC-MS を用いたアダクトーム解析により検討した。その結果、in vitro 反応では既報の GSCH₂-dG に加え幾つかの DNA 付加体が観察された。一方、in vivo 反応では、DCM 及び DCP に由来する付加体は観察されず、酸化ストレスや炎症に関連した付加体が多く観察された。このことから、これら被検物質の投与で、マウス肝臓に炎症及び酸

化ストレスが誘発されていたことが示唆された。これら被検物質に由来するバイオマーカーの探索の為には、投与量等を工夫し、炎症等を押さえた条件下で行なう事が必要であると考えられた。

図1 GSCH₂OAcとdG反応液のDNAアダクトーム解析

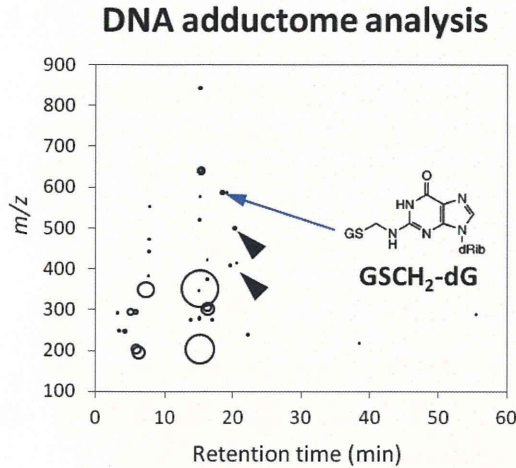


図2 DCM及びDCP投与マウス肝臓におけるDNA付加体の網羅的解析

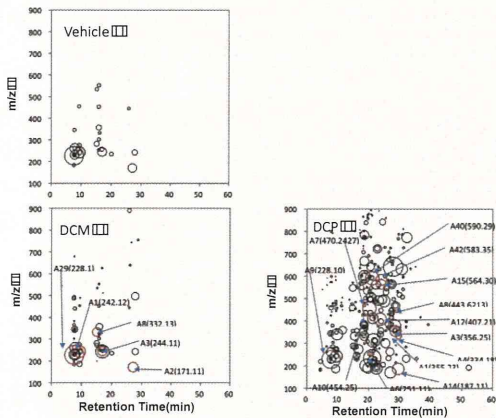


図3 主成分(PCA)解析によるDCM投与に特徴的な付加体の抽出

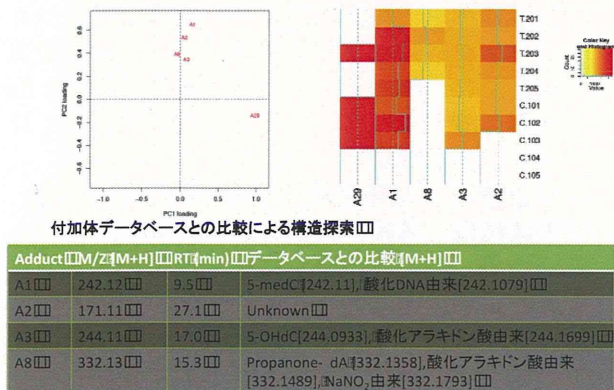
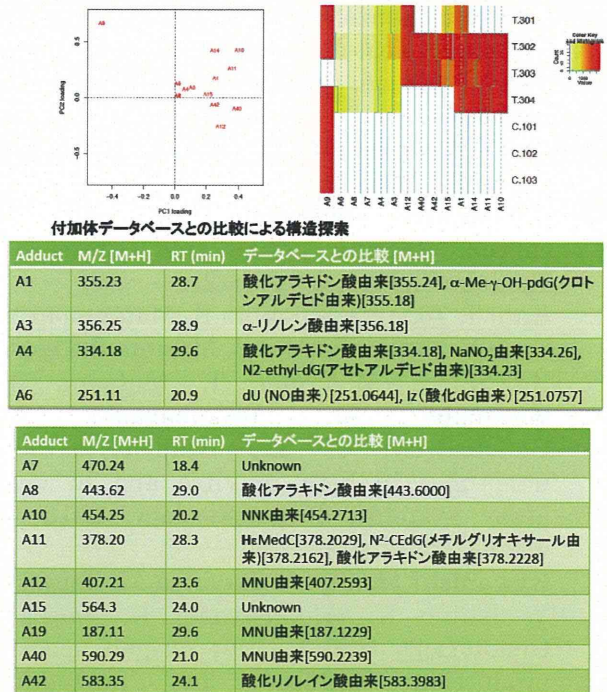


図4

主成分(PCA)解析によるDCP投与に特徴的な付加体の抽出



E. 結論

ヒト胆管がん発症との関係が疑われている DCM 及び DCP のバイオマーカーを探索することを目的として、GSCH₂OAc と DNA あるいは各種デオキシリボヌクレオシドの in vitro 反応サンプルを、DNA アダクトーム法を用いて分析し、既知の DNA 付加体以外に生成される DNA 付加体の探索を行った。その結果、GSCH₂-dG に加え、未知の DNA 付加体が複数検出された。更に、マウスを用いた in vivo モデルにおける DNA 付加体の生成を、LC-MS を用いたアダクトーム解析により検討した。その結果、DCM 及び DCP に由来する付加体は観察されず、酸化ストレスや炎症に関連した付加体が多く観察された。このことから、これら被検物質の投与で、マウス肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていたことが示唆された。今後は、投与量等を工夫し、炎症等を押さえた条件下で行なう事が必要であると考えられた。このような付加体の網羅的解析により、バイオマーカーを見出すことが出来れば、職業性胆管癌の原因候補物質であるハロゲン系炭化水素への曝露状況の把握が可能となり、DCM 及び DCP の胆管癌発症との関係が明らかになると期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T,

- Wakabayashi K, Kinase N, Masuda S, In vivo examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration. *Environ., Toxicol.*, 2013, 28:588-94
2. Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H. Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China. *J Epidemiol.* 2013, 23:233-42.
 3. Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology*, 2013 7: 452-61
 4. Kawanishi M, Ogo S, Ikemoto M, Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Yagi T. Genotoxicity and reactive oxygen species production induced by magnetite nanoparticles in mammalian cells. *J Toxicol Sci.* 2013;38(3):503-511.
 5. Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, Kurioka D, Nittami T, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kawai K, Kasai H, Totsuka Y. Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *Int J Mol Sci.* 2013, 14:15546-60.
 6. Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y., Induction of Glandular Stomach Cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian Gerbils by 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile., *Int J Cancer*, 130: 259-266, 2012.
 7. Wei M, Wanibuchi H, Nakae D, Tsuda H, Takahashi S, Hirose M, Totsuka Y, Tatematsu M, Fukushima S. Low-dose carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21(Cip/WAF1). *Cancer Sci.* 102: 88-94, 2011.
 8. Totsuka Y, Kato T, Masuda S, Ishino K, Matsumoto Y, Goto S, Kawanishi M, Yagi T, Wakabayashi K., In vitro and in vivo genotoxicity induced by fullerene (C60) and kaolin. *Genes Environ.* 33: 14-20, 2011.
2. 学会発表
 1. 石野孔祐、戸塚ゆ加里、松島芳隆、鰐淵英機、魏民、山野荘太郎、中森正二、柴田龍弘、土原一哉、落合淳志、中釜 斉；職業性胆管がんの原因候補物質であるハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体及び変異原性の解析、第 72 回日本癌学会学術総会（横浜、H 2 5 年 1 0 月 3 - 5 日）
 2. 中釜 斉、戸塚ゆ加里、三牧幸代、中森正二、鈴木 穰、柴田龍弘、落合淳志、土原一哉；1,2-DCP, DCM 曝露歴のある印刷工胆管癌に認められた高頻度ゲノム変異、第 72 回日本癌学会学術総会（横浜、H 2 5 年 1 0 月 3 - 5 日）
 3. 戸塚ゆ加里、石野孔祐、中江 大、渡辺昌俊、若林敬二、中釜 斉；マグネタイトナノ粒子は炎症反応を介してマウス肺に遺伝毒性を誘発する、第 72 回日本癌学会学術総会（横浜、H 2 5 年 1 0 月 3 - 5 日）
 4. Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.; Mechanisms of genotoxicity in the lungs by nanomaterials, 11th ICEM (ブラジル、H 2 5 年 1 1 月 3 - 8 日)
 5. Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.; Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in the lung of mice via inflammatory response, NanOEh (名古屋、H 2 5 年 1 0 月 2 8 - 3 1 日)
 6. 後藤 正憲、松島 芳隆、中釜 斉、戸塚 ゆ加里；ジクロロメタン由来の DNA 付加体を含むシヤトルプラスミドを用いたヒト細胞内変異原性試験、第 42 回日本環境変異原学会（岡山、H 2 5 年 1 1 月 2 9 - 3 0 日）
 7. 馬場 明、後藤純雄、松島芳隆、中釜 斉、戸塚ゆ加里；職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び1,2-ジクロロプロパンの変異原性及び変異スペクトラムの解析、第 42 回日本環境変異原学会（岡山、H 2 5 年 1 1 月 2 9 - 3 0 日）
 8. 辻田俊寛、石野孔祐、加藤 護、柴田龍弘、後藤純雄、魏民、松島芳隆、中釜 斉、戸塚ゆ加里；職業性胆管がん発生に關与するハロゲン系炭化水素の DNA 付加体の網羅的な解析（アダクトーム解析）、第 42 回日本環境変異原学会（岡山、H 2 5 年 1 1 月 2 9 - 3 0 日）
 9. Totsuka Y, Kato T, Ishino K, Nakae D, Tada Y, Oyama K, Ogata A, Kawanishi M, Yagi T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H: Genotoxicity induced by

- nanomaterials, The 6th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations (ドーハ、カタール、26-29, March, 2012).
10. 戸塚ゆ加里、石野孔祐、若林敬二、渡辺哲志、中釜 斉；メイラード反応生成物、アミノベンゾアゼピノキノリノン(ABAQ)の in vivo 変異原性と生体内における生成、第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌、H 2 4 年 9 月 1 9 - 2 1 日)
 11. 石野孔祐、戸塚ゆ加里、武藤倫弘、中釜 斉；ヒト白血球を用いた肥満関連 DNA 付加体の網羅的解析、第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌、H 2 4 年 9 月 1 9 - 2 1 日)
 12. Ishino K, Sekine A, Goto S, Nakagama H, Totsuka Y；Analysis of DNA damage induced by nanomaterials using comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis)、3rd Asian Conference on environmental mutagens (杭州、中国、H 2 4 年 1 0 月 2 3 - 2 6 日)
 13. Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Watanabe T, Masuda S, Nakagama H；In vivo mutagenicity and formation of a Maillard reaction product, aminobenzoazepinoquinoline derivative (ABAQ), (杭州、中国、H 2 4 年 1 0 月 2 3 - 2 6 日)
 14. 戸塚ゆ加里；ナノマテリアルの遺伝毒性発言メカニズム、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (静岡、H 2 4 年 1 1 月 2 9 - 3 0 日)
 15. 戸塚ゆ加里、石野孔祐、松島芳隆、中釜 斉；ハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体の解析、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (静岡、H 2 4 年 1 1 月 2 9 - 3 0 日)
 16. 石野孔祐、関根彬弘、後藤純雄、中釜 斉、戸塚ゆ加里；DNA 付加体の網羅的解析による新規付加体の探索、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (静岡、H 2 4 年 1 1 月 2 9 - 3 0 日)
 17. 堺澤絢、後藤純雄、若林敬二、渡辺徹志、中釜 斉、戸塚ゆ加里；トリプトファンとグルコースのメイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の in vivo 変異原性、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (静岡、H 2 4 年 1 1 月 2 9 - 3 0 日)
 18. 大野絢、中野毅、中釜 斉、松島芳隆、布柴達男、戸塚ゆ加里；ゲノム中に存在する DNA 付加体の免疫沈降法を用いた濃縮法、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (静岡、H 2 4 年 1 1 月 2 9 - 3 0 日)
 19. 関根彬弘、石野孔祐、後藤純雄、中釜 斉、戸塚ゆ加里；マグネタイト (MGT) により誘発される DNA 付加体のアダクトーム解析、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (静岡、H 2 4 年 1 1 月 2 9 - 3 0 日)
 20. Yukari Totsuka, Tatsuya Kato, Kousuke Ishino, Dai Nakae, Yukie Tada, Kenichi Oyama, Akio Ogata, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, Masatoshi Watanabe, Keiji Wakabayashi, Hitoshi Nakagama；Genotoxicity induced by nanomaterials, 41th European Environmental Mutagen Society Annual Meeting, (Barcelona, SPAIN, 4-7, July, 2011).
 21. 戸塚ゆ加里；ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性、レドックスシンポジウム (東京、H 2 3 年 3 月 1 0 - 1 1 日)
 22. Yukari Totsuka, Tatsuya Kato, Keiji Wakabayashi, Tetsushi Watanabe, Hitoshi Nakagama；Genotoxicity of aminobenzoazepinoquinoline derivative formed from tryptophan and glucose by Maillard reaction, 日本癌学会第 7 0 回大会 (名古屋、H 2 3 年 1 0 月 3 - 5 日)
 23. Tatsuya Kato, Yukari Totsuka, Kousuke Ishino, Masatoshi Watanabe, Keiji Wakabayashi, Hitoshi Nakagama；Differences in DNA damaging potency of differently-originated kaolins、日本癌学会第 7 0 回大会 (名古屋、H 2 3 年 1 0 月 3 - 5 日)
 24. Kousuke Ishino, Yukari Totsuka, Tatsuya Kato, Hitoshi Nakagama；A comprehensive analysis of DNA adducts in mice exposed to nanomaterials, 日本癌学会第 7 0 回大会 (名古屋、H 2 3 年 1 0 月 3 - 5 日)
 25. Ayaka Morohashi, Akiko Sato, Kazuaki Kawai, Hiroshi Kasai, Yukari Totsuka, Masatoshi Watanabe.；Cytotoxicity and genotoxicity of magnetic nanoparticles in human lung cancer cell line, A549. 日本癌学会第 7 0 回大会 (名古屋、H 2 3 年 1 0 月 3 - 5 日)
 26. Kumi Ootsuka, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Tatsuo Nunoshiba, Tetsushi Watanabe, Hitoshi Nakagama；In vivo mutagenicity of aminobenzoazepinoquinoline derivative (ABAQ) formed from L-tryptophan and glucose by the Maillard reaction, 日本環境変異原学会第 4 0 回大会 (東京、H 2 3 年 1 月 2 1 - 2 2 日)

27. Kousuke Ishino, Tatsuya Kato, Tomonari Matsuda, Yukari Totsuka, Hitoshi Nakagama ; A comprehensive analysis of DNA adducts in lungs of mice exposed to nanomaterials using nanoLC-QToF MS 日本環境変異原学会第40回大会 (東京、H23年11月21-22日)
28. Tatsuya Kato, Kousuke Ishino, Tatsushi Toyooka, Yuko Ibuki, Masatoshi Watanabe, Keiji Wakabayashi, Shuichi Masuda, Yukari Totsuka, Hitoshi Nakagama ; Differences in DNA damaging potency and incorporation rate into cultured mammalian cells of differently-originated kaolins 日本環境変異原学会第40回大会 (東京、H23年11月21-22日)
29. Masanori Yamada, Yuko Shimamura, Yukari Totsuka, Naoyuki Inaba, Souleymane Coulibaly, Yuka Tamura, Tomohiro Hasei, Tetsushi Watanabe, Shuichi Masuda : Formation of a novel mutagen, ABAQ under diabetic condition in vivo. 日本環境変異原学会第40回大会 (東京、H23年11月21-22日)
30. Miho Ikemoto, Masanobu Kawanishi, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Takashi Yagi, ; Contribution of homologous recombination to nanomaterial-induced micronucleus induction. 日本環境変異原学会第40回大会 (東京、H23年11月21-22日)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。