

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）  
分担研究項目：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・予防研究分野 ユニット長

### 研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法(DNA アダクトーム法)の構築に取り組んできた。本年度は、肝発がん性検出評価系の再現性確認と施設間バリデーション試験の実施に用いたラット肝臓サンプルを用い、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価を、アダクトーム法により検討した。遺伝毒性ラット肝発がん物質として、2-Nitropropane (2-NP；陽性対照) o-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 4,4' -Thiodianiline (TDA)、非遺伝毒性非肝発がん物質：Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI)をそれぞれラットに投与し、24 時間後に肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。得られたデータを主成分解析(PCA)解析により分類したところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性非発がん物質の3つのグループに分離できた。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々に PCA した結果、両者ともコントロールと分離されてはいるものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいことが予測された。今後、これら付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう予定である。

### 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。これまで我々は、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) を用い、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てきた。これまでに、遺伝毒性を示すマグネタイトナノ粒子を気管内投与したマウス肺の解析を行ない、マグネタイトナノ粒子が誘発する G:C->A:T 及び G:C->T:A 変異の基となる付加体 (エテノデオキシシチジン、 $-dC$ ) を含む複数の付加体を確認することを報告した。この結果は、アダクトーム法による化学物質の DNA 損傷性評価が有用であることを示唆するものである。今年度は、ラットを用いた *in vivo* モデルに用い、肝臓をターゲットとした複数の遺伝毒性/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓における DNA 損傷を LC-MS を用いたアダクトーム解析により検討し、DNA 付加体の生成を指標とした有害性評価の検証を行なう。

### B . 研究方法

雄性 SD ラット (各群それぞれ 5 匹) に遺伝毒性肝発がん物質；2-Nitropropane (2-NP；陽性対照)、

o-Aminoazotoluene (AAT), Dimethylnitrosamine (DMN), 4,4' -Thiodianiline (TDA)、非遺伝毒性非肝発がん物質；Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TLB), Aspirin (ASA), Triamterene (TRI) を各種濃度 (表 1 参照) で投与を行った後 24 時間後に肝臓を摘出した。DNA を抽出後、DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、LC-TOF MS に供し DNA 付加体の網羅解析を行った。得られたデータは SCIEX 社が提供するバイオインフォマティクス解析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオチドに特徴的なニュートラルロス (-116.04736) 及び各種核酸に特異的なニュートラルロス (-152.0572; dG, -136.0623; dA, -112.0511; dC, -127.0508; dT) を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系をデザインした。得られたデータを主成分 (PCA) 解析により解析した。

(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

各種化学物質を投与したラット肝臓 DNA のアダクトー

△解析を行なった結果を図1に示す。PCA解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の3つのグループに分離されることがわかった。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性非肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々にPCAした結果、両者ともコントロールと分離されていないものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された(図2)。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいことが予測された(図3)。つまり、遺伝毒性肝発がん物質由来のDNA付加体が生成していることが推測される。更に、これら投与化学物質に由来する特徴的な付加体の探索をバイオインフォマティクス解析により実施した。その結果、ボルケーノプロットより、遺伝毒性肝発がん物質に特徴的な付加体をいくつかスクリーニングした(図4、5)。我々が構築した in-house DNA adduct database との比較により、これら付加体の同定を試みたが、類似する m/z 値を持つ付加体はほとんど見つからなかった。引き続き今後、これら投与化学物質に由来する特徴的な付加体の探索を行うと同時に、別の化学物質を投与したラット肝臓についても同様に検討を行う予定である。

表1 使用した化学物質

Group	Chemical Name	Category	LD50 mg/kg (Rat, Oral)	投与量 (1/3 of LD50)
Group 1	α-Aminozetoluene (AAT)	遺伝毒性肝発がん物質	1500	500
Group 2	Dimethylnitrosamine (DMN)	遺伝毒性肝発がん物質	37	10
Group 3	4,4'-Thiodianiline (TDA)	遺伝毒性肝発がん物質	900	300
Group 4	2-Nitropropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質(陽性対照群)	720	240
Group 5	Diazepam (DZP)	非遺伝毒性非肝発がん物質	249	80
Group 6	Disulfiram (DSF)	非遺伝毒性非肝発がん物質	500	170
Group 7	Phenoin (PHE)	非遺伝毒性非肝発がん物質	1635	550
Group 8	Rotenone (ROT)	非遺伝毒性非肝発がん物質	60	20
Group 9	Talbutamide (TB)	非遺伝毒性非肝発がん物質	2490	830
Group 10	Aspirin (ASA)	非遺伝毒性非肝発がん物質	200	70
Group 11	Triamterene (TR)	非遺伝毒性非肝発がん物質	400	130
Group 12	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml/kg b.w.

図1 遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

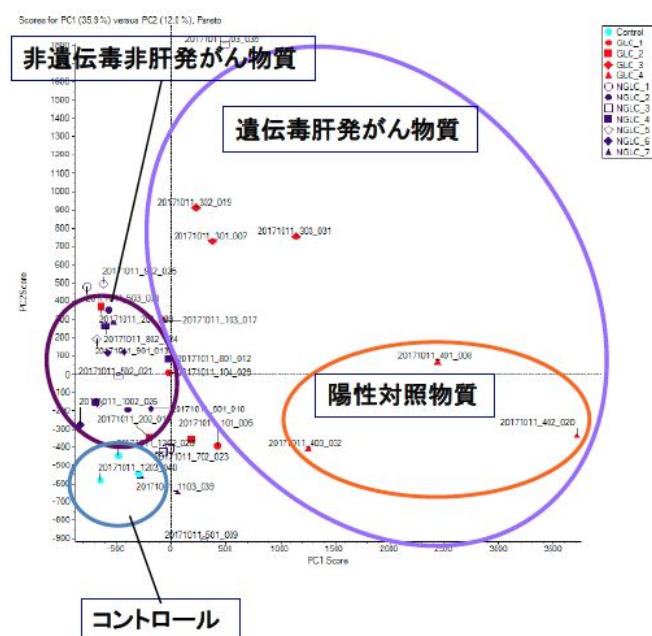


図2 非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

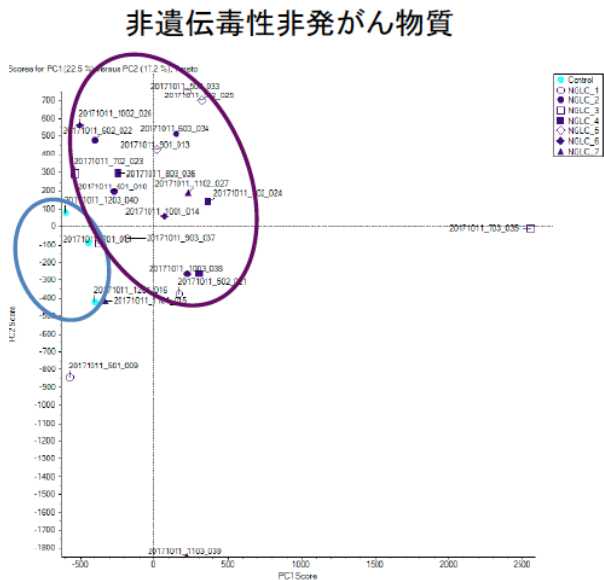


図3 遺伝毒性肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

遺伝毒性発がん物質

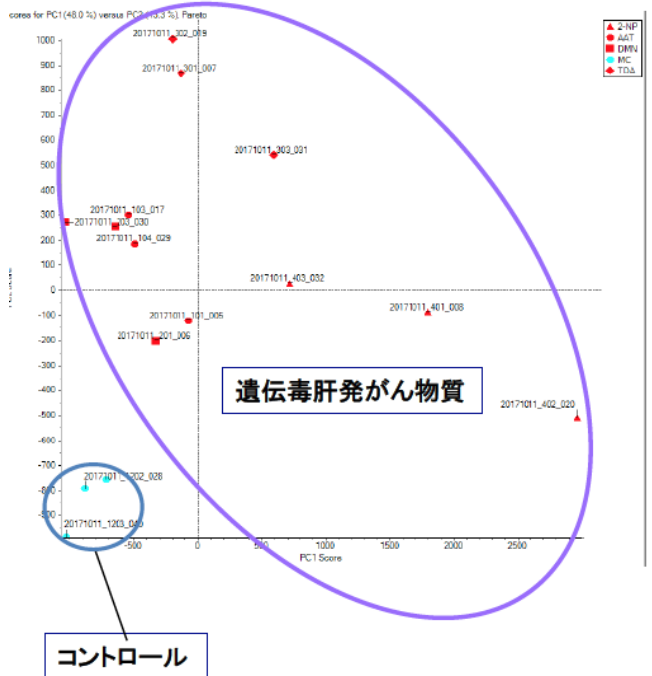


図4 ボルケーノプロットによる遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質のグルーピングに寄与する付加体の探索

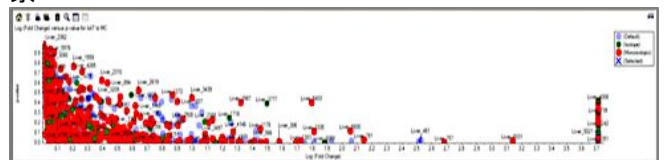


図5 ポルケーノプロットで抽出された付加体存在量（遺伝毒性化学物質に特徴的なもの）

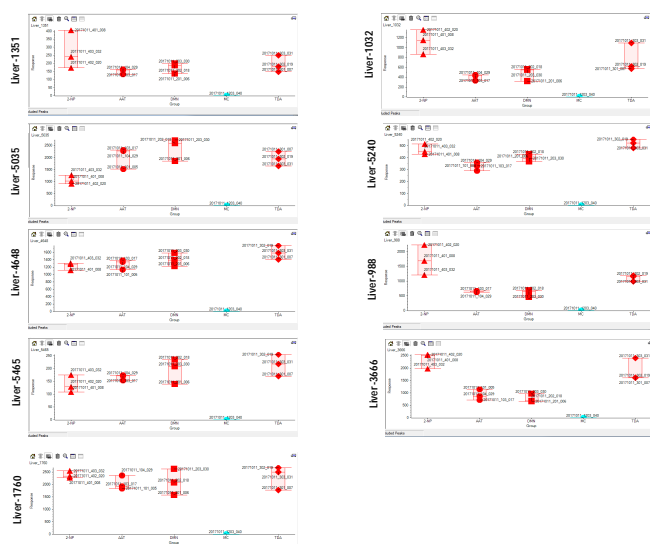


表2 候補付加体のデータベースとの比較による構造探索

Adduct ID	M/Z [M+H]	データベースとの比較 [M+H]	付加体の由来
Liver-1351	300.2686	Sp (300.0944)	酸化dG
Liver-5035	306.1643	5,6-dihydro-M1dG, MDA-dA (306.1202)	MDA
Liver-4648	317.2216	該当なし	
Liver-5465	367.0015	該当なし	
Liver-1760	500.271	該当なし	
Liver-1032	510.2534	該当なし	
Liver-5240	510.2988	該当なし	
Liver-988	483.275	該当なし	
Liver-3666	576.3189	該当なし	

## D. 考察

遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質を投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅解析を行なった。PCA解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の3つのクラスターに分離されることがわかった。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性非肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々にPCAした結果、両者ともコントロールと分離されてはいるものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、コントロールとの差があまり大きくないことが予想された。このことは、非遺伝毒性非肝発がん物質がDNA損傷（付加体）を殆ど作成しないため、その結果、溶媒対照とほとんど変化していないと推測される。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、その差が大きいために予想された。つまり、遺伝毒性肝発がん物質由来のDNA付加体が生成していることが推測される。遺伝毒性肝発がん物質とコントロールとの距離に着目してみたところ、2-NP（陽性対照）とTDAがよりコントロールと離れたクラスターを形成しており、AATとDMNがコントロールにやや近いクラスターを形成している。その理由については未だ分からないが、これら化学物質間でDNA損傷性や発がんメカニズムが異なることを示唆しているかもしれない。更にデータを追加してこれらの点を解明していくことが必要である。今後、これら投与化学物質に由来する特徴的な付加体の探索及び同定を行うと

同時に、別の化学物質を投与したラット肝臓についても同様に検討を行う予定である。

## E. 結論

遺伝毒性ラット肝発がん物質として、2-NP（陽性対照）、AAT, DMN, TDA、非遺伝毒性非肝発がん物質としてDZP, DSF, PHE, ROT, TLB, ASA, TRIをそれぞれラットに投与し、24時間後に肝臓に生成されるDNA付加体を網羅的に解析した。得られたデータをPCA解析により分類したところ、コントロール、非遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の3つのグループに分離できた。遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質から得られたデータをそれぞれ別々にPCAした結果、両者ともコントロールと分離されてはいるものの、非遺伝毒性非肝発がん物質ではあまりコントロールとの距離が離れていないことから、非遺伝毒性非肝発がん物質がDNA損傷（付加体）を殆ど作成しないため、その結果、溶媒対照とほとんど変化していないと予想された。一方、遺伝毒性肝発がん物質ではコントロールとの距離も大きく離れており、遺伝毒性肝発がん物質由来のDNA付加体が生成していることが予測された。今後、これら投与化学物質に由来する特徴的な付加体の探索及び同定を行うと同時に、別の化学物質を投与したラット肝臓についても同様に検討を行う予定である。

アダクトーム法を化学物質のリスク評価へ応用することの妥当性については、更に複数の化学物質について検討をすることが必要である。

## 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. Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D; , Totsuka, Y, Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 2018, 109, 1024-1031.
2. Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology*, 2017, Nov 16.
3. Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 2017, 32:455-462.
4. Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y. Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin. *Genes Environ.*, 2017, 39:12.

### 2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里：DNA 付加体形成と突然変異誘発 第 44 回日本毒性学会（横浜 2017 年 7 月）
2. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ、2017 年 9 月)
3. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第 76 回日本癌学会学術総会（横浜 2017 年 9 月）
4. 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の 3 次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系 第 76 回日本癌学会学術総会（横浜 2017 年 9 月）
5. 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里：マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第 46 回日本環境変異原学会（東京、2017 年 11 月）
6. 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 第 46 回日本環境変異原学会(東京、2017 年 11 月)
7. 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、稲葉一穂、戸塚ゆ加里：モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第 46 回日本環境変異原学会（東京、2017 年 11 月）
8. 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第 46 回日本環境変異原学会（東京、2017 年 11 月）
9. Totsuka Y : Adductomics IWGT 2017（東京、2017 年 11 月）
10. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis 12<sup>th</sup>ICEM-5<sup>th</sup>ACEM（仁川、2017 年 11 月）
11. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017（つくば、2017 年 12 月）
12. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics（コルカタ、2018 年 1 月）

#### 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。