

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
平成 30 年度分担研究報告書

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)、N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), N-Nitrosopyrrolidine (NNP), 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA)、遺伝毒性非発がん物質 ; Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT)、非遺伝毒性肝発がん物質 ; Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB)、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), Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TC), Ethionamide (ETH), Theophylline (TEO), Caffeine (CAF), Chloramphenicol (CMP)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-DA)解析により分類したところ、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の 4 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られる。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* モデルにを用い、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), N-Nitrosodiethylamine(NDEA), N-Nitrosodiethanolamine(NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine(NEMA), Nitrosodibutylamine(NB), N-Nitrosopyrrolidine(NNP), 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene(MDA)、遺伝毒性非発がん物質 ; Cyclophosphamide(CPA), Nitrofurantoin(NFT), Phenacetin(PCT)、非遺伝毒性肝発がん物質 ; Monocrotaline(MCT), Phenobarbital(PB)、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), Indomethacin(IM), Phenylbutazone(PhB), Promethazine(PMZ), Sulindac(SUL), Tetracycline(TC), Ethionamide(ETH), Theophylline(TEO), Caffeine(CAF), Chloramphenicol(CMP) 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ー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シ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-DA）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のアダクトーム解析を行なった結果を図1に示す。PCA-DA解析を行なったところ、コントロール及び非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。前回の報告と同じく、非遺伝毒性非発がん物質及びコントロール、遺伝毒性肝発がん物質でPCA-DA会席を行ったところコントロールと非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の2つのグループに分離できた（図2）。非遺伝毒性非発がん物質ではあまりコントロールと分離が出来ていないことから、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、その差が大きいたことが予測された。遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質では距離があまり離れていないプロットが存在した。そこで、遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質においてコントロールとともにPCA-DA解析を行ったところコントロールと遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質それぞれで分離することができた（図3）。そのため、非遺伝毒性物質と遺伝毒性非発がん物質は本来であれば、別の物質として区別することは出来るが、コントロールや非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質と比較すると比較的差が小さいため分離が出来なかったと予測された。しかし、非遺伝毒性肝発がん物質は遺伝毒性非発がん物質と比べ比較的遺伝毒性肝発がん物質よりプロットしている傾向があることから、プロットにおいて、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。これらのことから、発がんに関与する物質であるDNA付加体が生成していることが推測される。

一方、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幾つかスクリーニングした。In-house databaseとの比較から、adduct\_545(*m/z* 282.1185)はホルムアルデヒド、アルキル化剤、マロンジアルデヒドのいずれかに由来する付加体である可能性が示唆された（図4, 5）。また、adduct\_75(*m/z* 569.1211)はその*m/z*値及びフラグメンテーションのデータから、d

Aを含む付加体であることが示唆された（図6）。

表1 使用した化学物質

	遺伝毒性	発がん性	投与量(mg/kg b.w.)
α-Aminoacetone (AA7)	+	+	500
Dimethylsiloxane (DMSO)	+	+	10
4,4'-Thiobis(maleimide) (TDA)	+	+	300
2-Nitropropane (2-NP, 硝基烷醇)	+	+	240
N-Nitrosodimethylamine (NDEA)	+	+	70
N-Nitrosodimethylamine (NDMA)	+	+	2000
N-Nitrosodimethylamine (NMA)	+	+	30
Nitrosodimethylamine (NDB)	+	+	400
N-Nitrosopyrrolidine (NDP)	+	+	300
3-Methyl-4-dimethylaminosulfonamide (M4DA)	+	+	500
Cyclophosphamide (CPA)	+	-	30
Nitrosamine (NF7)	+	-	200
Phenacetin (PC7)	+	-	550
Methacrylonitrile (MCT)	-	+	20
Phenobarbital (PB)	-	+	50
Diazepam (DZP)	-	-	80
Diazepam (DZF)	-	-	170
Phenacetin (PAB)	-	-	550
Barbitone (BCT)	-	-	20
Tetrahydrozole (TLB)	-	-	830
Arginine (ASA)	-	-	70
Tetrahydrozole (TH)	-	-	130
Indomethacin (ID)	-	-	7
Phenylbutazone (PAB)	-	-	80
Phenylbutazone (PAB)	-	-	150
Indomethacin (ID)	-	-	90
Tetrahydrozole (TH)	-	-	270
Ethionazine (ETA)	-	-	440
Thiophylline (TEO)	-	-	80
Caffeine (CAF)	-	-	80
Chlorzoxazone (CZP)	-	-	830
0.2% Methylcellulose (M.C. 増粘剤)	-	-	5ml/kg

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

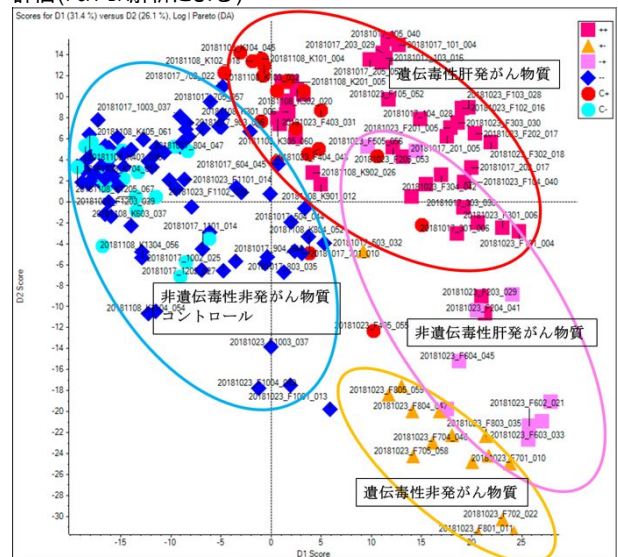


図2 コントロール/非遺伝毒性非発がん物質/遺伝毒性発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA-DA解析による)

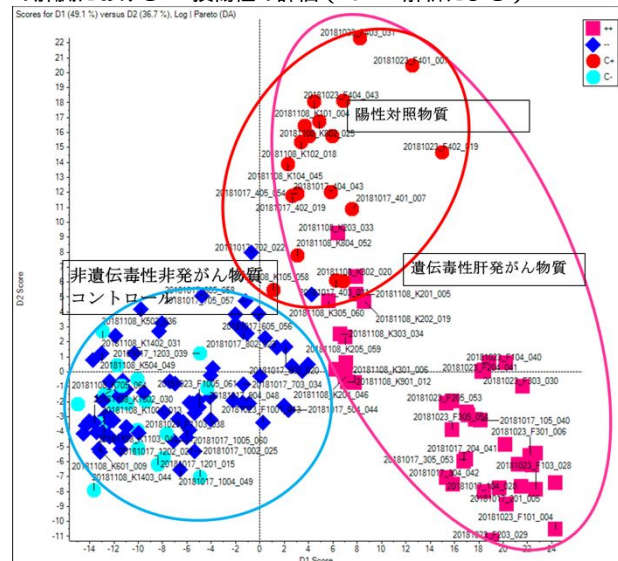


図3 非遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非発がん物質/の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA-DA解析による)

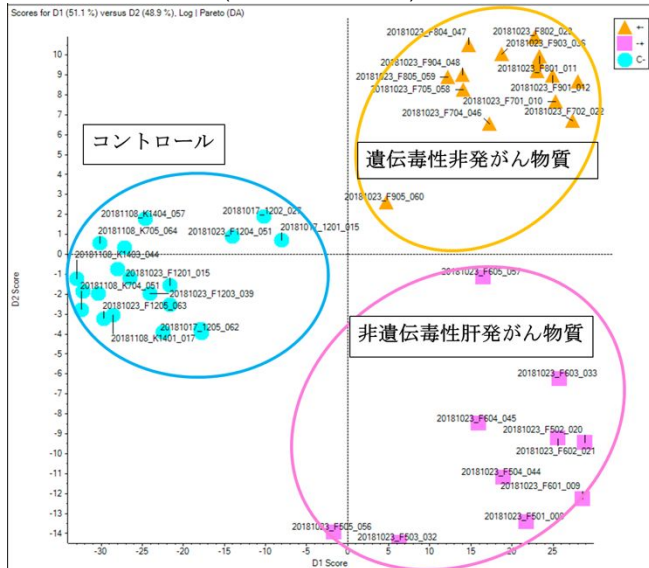


図4 ボルケーノプロットと Adduct 545 の MS fragment data

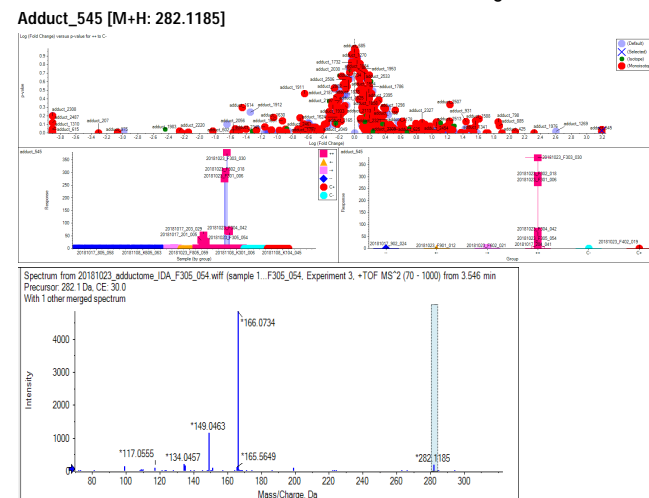
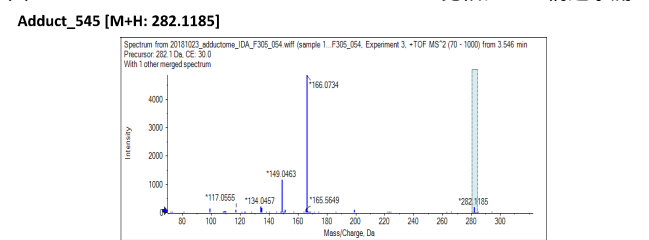


図5 Adduct 545 の in-house database との比較による構造予測



付加体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
Adduct_545	282.1185	N <sup>6</sup> -HmdA (282.1202→166.0728), O <sup>6</sup> -MedG (282.1202→166.0728), MDA-dC (282.1090→166.0616)	Formaldehyde、 アルキル化剤、 MDA

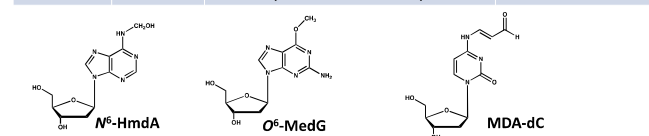
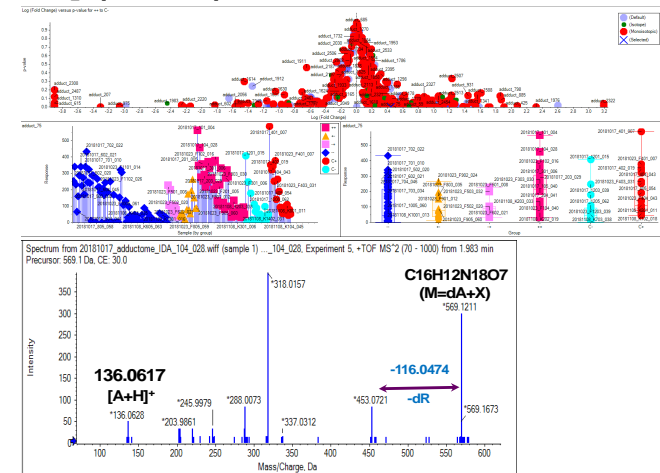


図6 ボルケーノプロットと Adduct 75 の MS fragment data



### 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-DA解析を行なったところ、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。前回の報告と同じく、非遺伝毒性非発がん物質及びコントロール、遺伝毒性肝発がん物質でPCA-DA解析を行ったところコントロールと非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の2つのグループに分離できた。非遺伝毒性非発がん物質ではあまりコントロールと分離が出来ていないことから、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、その差が大きいために予測された。遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質は距離があまり離れていないプロットが存在した。そこで、遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質、コントロールの3つの群のみでPCA-DA解析を行ったところコントロールと遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質それぞれで分離することが出来た。そのため、非遺伝毒性物質と遺伝毒性非発がん物質は本来であれば別の物質として区別することはできるが、コントロールや非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質と比較すると比較的差が小さいため分離できないと考えられる。しかし、非遺伝毒性肝発がん物質は遺伝毒性非発がん物質と比べ比較的遺伝毒性肝発がん物質よりにプロットしている傾向があることから、プロットにおいて、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。これらのことから、発がんに関与する物質であるDNA付加体が生成していることが考えられる。

### 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, NDEA, NDELA, NEMA, NB, NNP, MDA, 遺伝毒性非発がん物質として、CPA, NFT, PCT, 非遺伝毒性肝発がん物質として、MCT, PB, 非遺伝毒性非肝発がん物質としてDZP, DSF, PHE, ROT, TLB, ASA, TR1, IM, PhB, PZ, SUL, TC, ETH, TEO, CAF, CMP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。PCA-DAにより、コントロール及び非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、

遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。前回の報告と同じく、非遺伝毒性非発がん物質及びコントロール、遺伝毒性肝発がん物質でPCA-DA解析を行ったところコントロールと非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の2つのグループに分離できた(図2)。非遺伝毒性非発がん物質ではあまりコントロールと分離が出来ていないことから、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。遺伝毒性非発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質においてコントロールとともにPCA-DA解析を行ったところコントロールと遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質それぞれで分離することができた。そのため、非遺伝毒性物質と遺伝毒性非発がん物質は本来であれば、別の物質として区別することはできるが、コントロールや非遺伝毒性非発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質と比較すると比較的差が小さいため分離が出来なかったと予測された。しかし、非遺伝毒性肝発がん物質は遺伝毒性非発がん物質と比べ比較的遺伝毒性肝発がん物質よりもプロットしている傾向があることから、プロットにおいて、発がん性の有無の要素の関与が大きいと予測された。つまり、発がんに関与する物質であるDNA付加体が生成していることが推測される。一方、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幾つかスクリーニングした。In-house databaseとの比較から、adduct\_545(*m/z* 282.1185)はホルムアルデヒド、アルキル化剤、マロンジアルデヒドのいずれかに由来する付加体である可能性が示唆された。また、adduct\_75(*m/z* 569.1211)はその*m/z*値及びフラグメンテーションのデータから、dAを含む付加体であることが示唆された。今後、これら付加体の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。

## 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*, 2018, 38:537-543.

### 2. 学会発表

1. 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)

2. 戸塚ゆ加里、秋場 望、佐藤春菜、前迫有也、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、十時泰、柴田龍弘、中釜 斉: 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第33回発がん病理研究会(御殿場、2018年8月)
3. 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二: 芳香族アミン類の代謝物分析とDNA付加体 第33回発がん病理研究会(御殿場、2018年8月)
4. Totsuka Y, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Nakagama H: Whole genome sequencing analysis elucidates the interaction between environmental factors and causes of human cancer. 第77回日本癌学会総会(大阪、2018年9月)
5. 斎藤春五、高橋沙奈衣、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第77回日本癌学会総会(大阪、2018年9月)
6. 高橋沙奈衣、斎藤春五、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: Fe<sup>3</sup>O<sub>4</sub>ナノ粒子の曝露された癌細胞におけるmicroRNAsのプロファイリングについて(II) 第77回日本癌学会総会(大阪、2018年9月)
7. 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、遠藤 治: 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第47回日本環境変異原学会(京都、2018年11月)
8. 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47回日本環境変異原学会(京都、2018年11月)
9. 前迫有也、椎崎一宏、高村岳樹、戸塚ゆ加里: 職業性胆管がん発生に関与する1,2-ジクロロプロパンのDNA付加体の網羅的な解析(アダクトーム解析) 第47回日本環境変異原学会(京都、2018年11月)
10. 神尾翔真、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里: ナノマテリアルの表面修飾が及ぼす遺伝毒性への影響 第47回日本環境変異原学会(京都、2018年11月)
11. 斎藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里: ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第47回日本環境変異原学会(京都、2018年11月)
12. 石野孔祐、前迫有也、内藤善哉、戸塚ゆ加里: 質量分析データに基づくDNA付加体データベースの整備 第47回日本環境変異原学会(京都、2018年11月)

## H. 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。