

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合分担研究報告書

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）
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

研究代表者 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。本研究班では、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。まずは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。さらに遺伝毒性ラット肝発がん物質として、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; 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。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。次に、同データを用いて遺伝毒性/肝発がん性の予測モデルを開発することを試みた。得られたデータの一部を使用して、遺伝毒性、肝発がん性、遺伝毒性/肝発がん性を付加体から予測するモデルを、教師あり機械学習手法を用いて試作した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレストを使用した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いてテストデータに対して予測を行ったところ、93%以上の正解率が得られた。また、Leave-One-Out 交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、わずかに正答率が減少した。更に化学物質の数を増やし、予測精度の向上について検討を行うことが、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を評価する上で必要である。

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、ε-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

① 平成29年度

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、スクレアーゼ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。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スクリーニングし、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。

② 平成30年度

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), 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; Indomethacin(IM), Phenylbutazone(PhB), Promethazine(PMZ), Sulindac(SUL), Tetracycline(TC), Ethionamide(ETH), Theophylline(TEO), Caffeine(CAF), Chloramphenicol(CMP)を各種濃度(表2参照)で投与を行った後24時間後に肝臓を摘出し、前年度と同様の方法でDNAを抽出し、DNAアダクトーム解析を実施した。

③ 令和1年度

前年度までにアダクトームで得られたデータを用い、対照群である2-NPおよびMCを除いた、146サンプルのデータを用いて遺伝毒性/肝発がん性予測モデルの開発を試みた。各曝露群について、全データの3/4を訓練データに、残りの1/4をテストデータに、それぞれ分配し、機械学習の訓練データおよびテストデータの作成を行った。遺伝毒性、肝発がん性、遺伝毒性/肝発がん性を付加体から予測するモデルを、教師あり機械学習手法を用いて試作した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレストを使用した。さらに、実際に予測モデルを使用する場合には遺伝毒性/肝発がん性の情報がない化学物質に対して実施することを想定して、Leave-One-Out交差検証により予測結果の精度評価を行った。Leave-One-Out交差検証は、ある曝露物質のデータをテスト用とし、他の曝露物質のデータを用いて学習したモデルの精度を評価することを、物質を変え

ながら繰り返す検証方法であり、毒性が未知の物質に対する予測を模擬した精度評価方法である。

(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 平成29年度

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(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幾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。

表1 使用した化学物質

			LD50 mg/kg (Rat, Oral)	投与量(1/3 of LD50)
Group 1	o-Aminoazobenzene (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	Phenytoin (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	Tolbutamide (TLB)	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 (TRI)	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.

② 平成30年度

平成29年度に試験した化学物質に加え、新たに被験物質を追加しラット肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった。使用した化学物質を表2に、アダクトームデータを用い解析した結果を図6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7)。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8)。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。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いく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9, 10)。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(図11)。

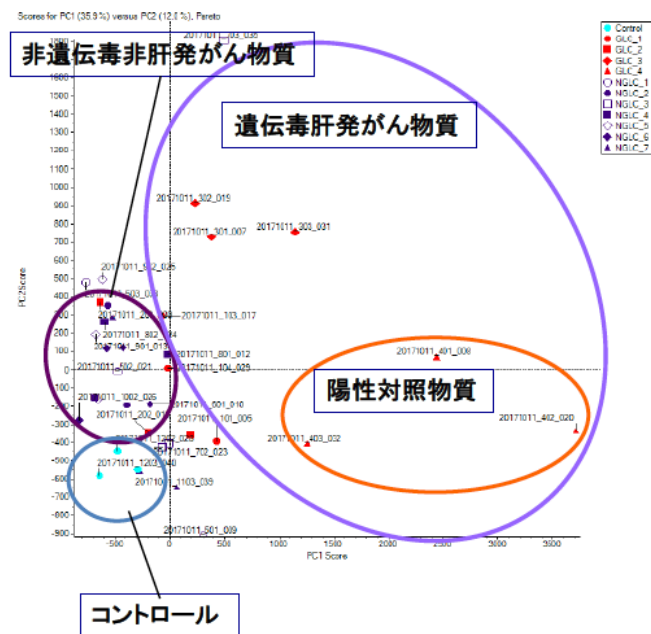


図1 遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

非遺伝毒性非発がん物質

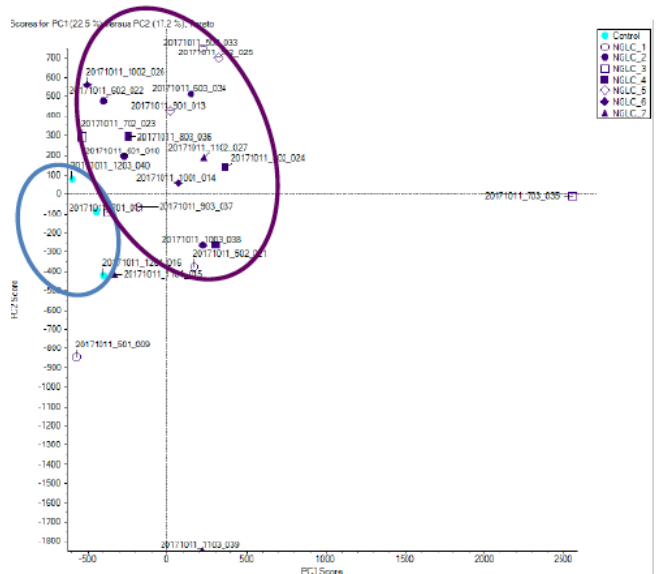


図2 非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

遺伝毒性発がん物質

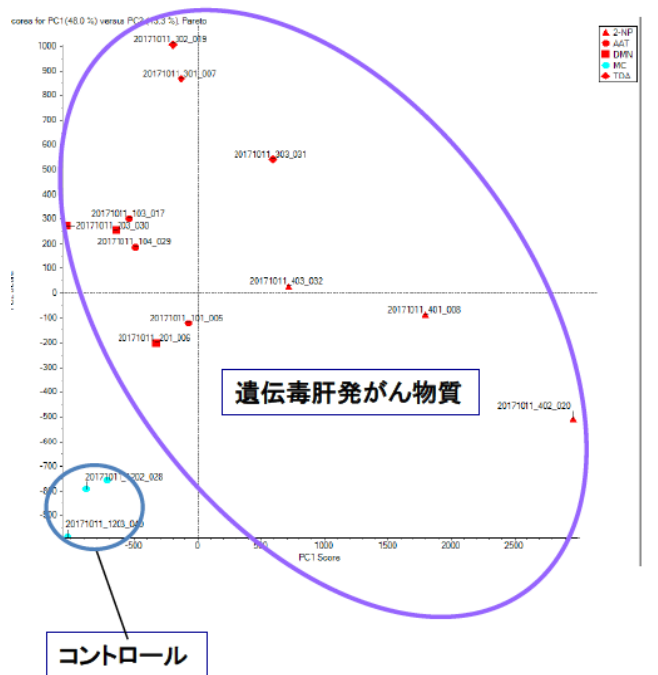


図3 遺伝毒性肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)

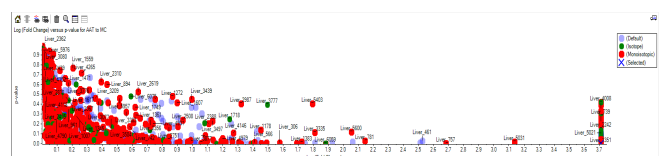


図4 ボルケーノプロットによる遺伝毒性/非遺伝毒性非肝発がん物質のグルーピングに寄与する付加体の探索

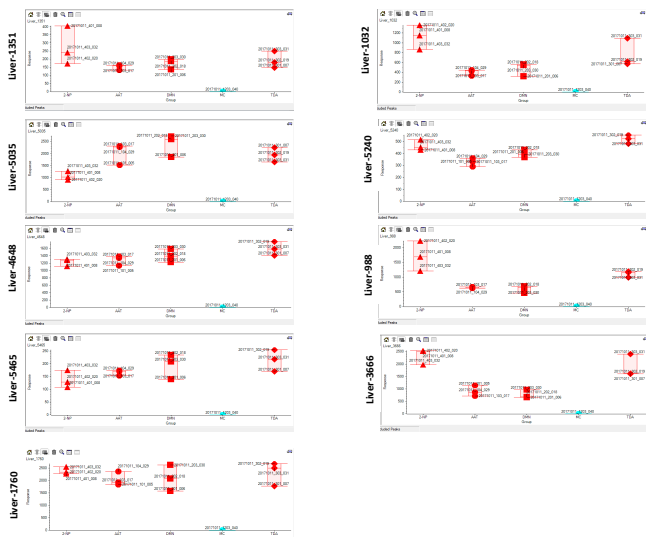


図5 ボルケーノプロットで抽出された付加体存在量（遺伝毒性化学物質に特徴的なもの）

表2 使用した化学物質

	遺伝毒性	発がん性	投与量 (mg/kg b.w./d)
p-Aminosalicylic acid (AAS)	+	+	500
Dimethylsulfoniopropionamide (DMSP)	+	+	10
4,4'-Thiobis(6-methyl-2-pyridinol) (TDA)	+	+	300
2-Nitropropene (2-NP, 陽性対照物質)	+	+	240
N-Nitrosodimethylamine (NDEA)	+	+	70
N-Nitrosodimethylamine (NDMA)	+	+	2,000
N-Nitrosodimethylamine (NEMA)	+	+	30
N-Nitrosodimethylamine (ND)	+	+	400
N-Nitrosopropylamine (NPP)	+	+	300
3-(3-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene) (MDA)	+	+	300
Cyclophosphamide (CPA)	+	+	80
Nitrofurantoin (NFT)	+	+	200
Phenacetin (PCT)	+	+	580
Mesna (MCT)	-	-	20
Phenobarbital (PB)	-	+	80
Diazepam (DZP)	-	-	80
Diazepam (DSF)	-	-	170
Phenacetin (PHE)	-	-	580
Rofenone (ROT)	-	-	20
Telluramide (TEL)	-	-	830
Arginine (ASA)	-	-	70
Tenoxicam (TR)	-	-	130
Indomethacin (IM)	-	-	1
Phenylbutazone (PMB)	-	-	80
Propylthiouracil (PTU)	-	-	190
Sulfindac (SUL)	-	-	90
Tetracycline (TC)	-	-	270
Ethionamide (ETA)	-	-	440
Theophylline (TEO)	-	-	80
Caffeine (CAF)	-	-	80
Chloramphenicol (CMP)	-	-	830
0.5% Methylcellulose (MC, 増粘剤)	-	-	5ml/kg

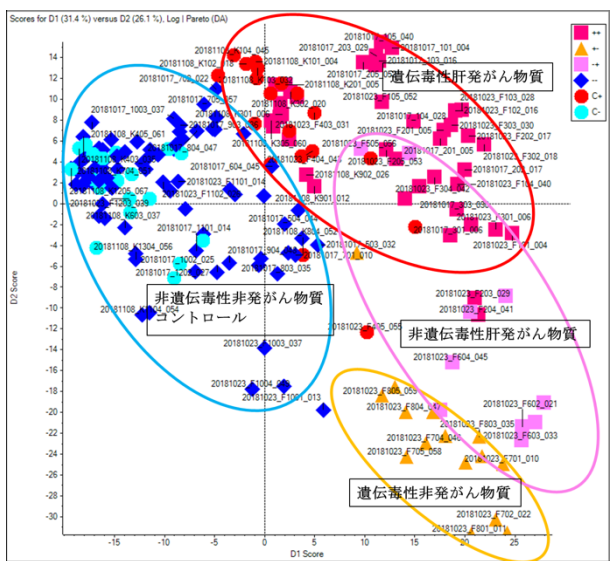


図6 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓におけ

るDNA損傷性の評価(PCA-DA解析による)

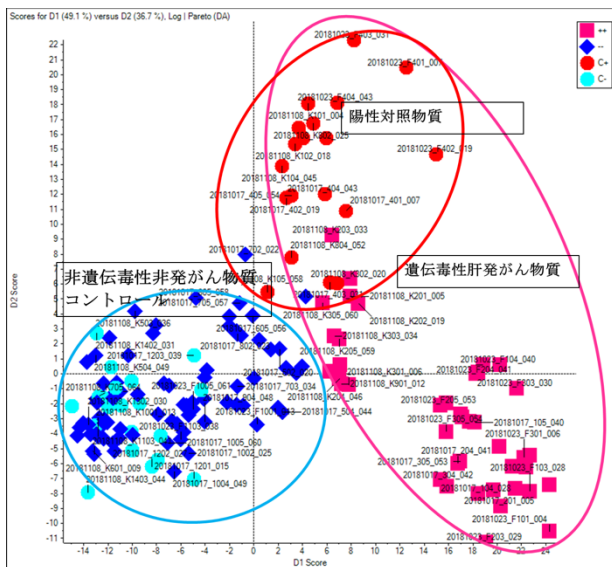


図7 コントロール/非遺伝毒性非発がん物質/遺伝毒性発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA-DA解析による)

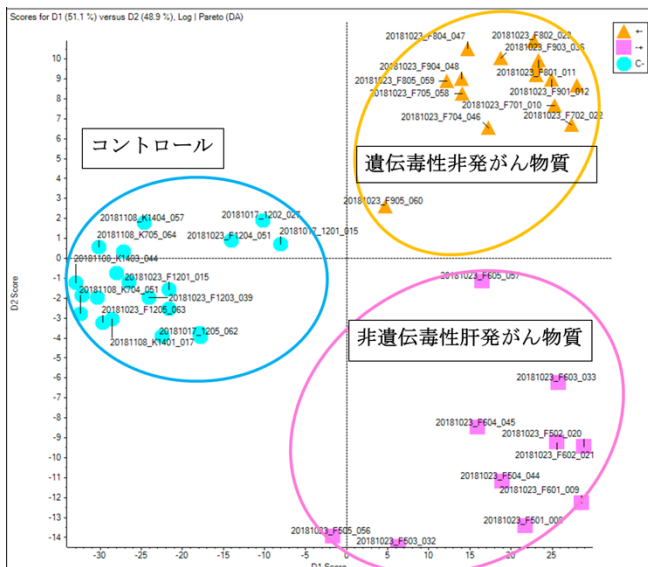


図8 非遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非発がん物質/の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA-DA解析による)

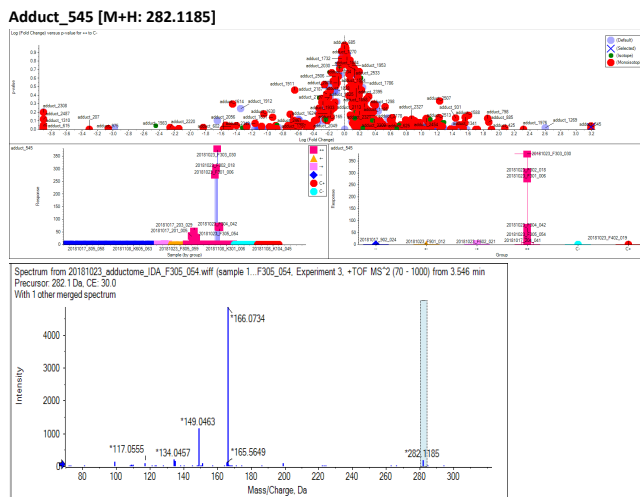
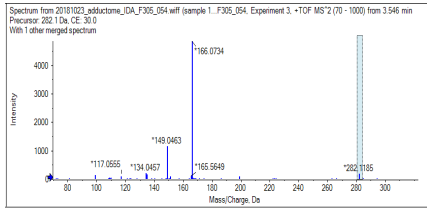


図9 ボルケーノプロットと Adduct 545 の MS fragment data

Adduct_545 [M+H: 282.1185]



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 ⁶ -HmdA (282.1202→166.0728), O ⁶ -MedG (282.1202→166.0728), MDA-dC (282.1090→166.0616)	Formaldehyde、 アルキル化剤、 MDA

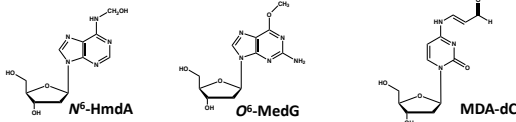


図 1 0 Adduct 545 の in-house database との比較による構造予測

Adduct_75 [M+H: 569.1211]

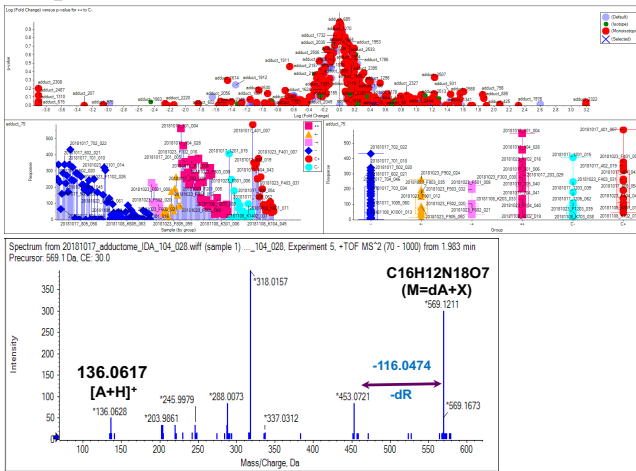


図 1 1 ボルケーノプロットと Adduct 75 の MS fragment data

③ 令和 1 年度

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 2 に示す。LDA解析を行なったところ、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つのグループに綺麗に分離されることがわかった。

1) 遺伝毒性の予測結果

試作されたgenotoxicity予測モデルを用いて、テストデータの29サンプルに対して予測を行った結果、27サンプルに対して正答となった(93%、表3)。

2) 肝発がん性の予測結果

試作された毒性予測モデルを用いて、テストデータの29サンプルに対して予測を行った結果、28サンプルに対して正答となった(97%、表4)。

3) 遺伝毒性/肝発がん性の予測結果

試作された毒性予測モデルを用いて、テストデータの29サンプルに対して予測を行った結果、27サンプルに対して正答となった(93%、表5)。

4) Leave-One-Out 交差検証により予測結果の精度評価

Leave-One-Out 交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施した。なお、訓練データとテストデータは対照群を含まない。結果を表6に示すが、Leave-One-Out 交差検証を用いるとわずかに正答率が減少した。具体的には、genotoxicity/carcinogenicityの予測結果は3%、genotoxicityの予測結果は7%、carcinogenicityの予測結果は7%減少した。

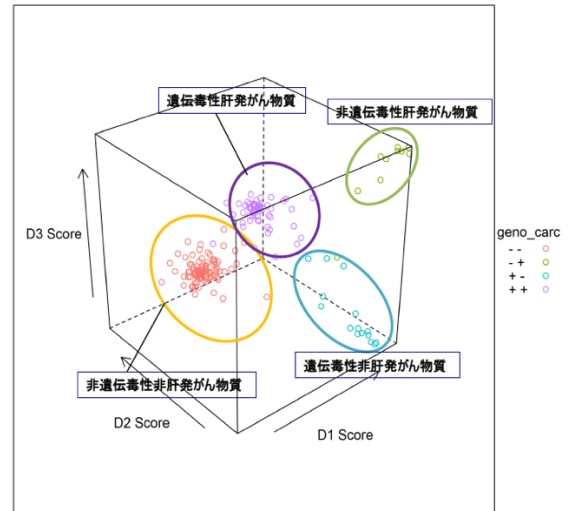


図 1 2 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(LDA解析による)

表 3 遺伝毒性の予測結果

exposure	sample_no	truth	pred	correct
AAT	1	+	+	1
DMN	5	+	+	1
TDA	2	+	+	1
NDEA	2	+	+	1
NDELA	5	+	+	1
NEMA	5	+	+	1
NB	3	+	+	1
NNP	2	+	+	1
CPA	2	+	+	1
NFT	3	+	+	1
PCT	4	+	+	1
MCT	2	-	+	0
PB	2	-	+	0
DZP	4	-	-	1
DSF	3	-	-	1
PHE	1	-	-	1
ROT	5	-	-	1
TLB	5	-	-	1
ASA	2	-	-	1
TRI	5	-	-	1
IM	3	-	-	1
PhB	5	-	-	1
PMZ	3	-	-	1
SUL	5	-	-	1
TC	5	-	-	1
ETH	2	-	-	1
TEO	4	-	-	1
CAF	2	-	-	1
CMP	4	-	-	1

(灰色：誤答)

表4 肝発がん性の予測結果

exposure	sample_no	truth	pred	correct
AAT	1	+	+	1
DMN	5	+	+	1
TDA	2	+	+	1
NDEA	2	+	+	1
NDELA	5	+	+	1
NEMA	5	+	+	1
NB	3	+	+	1
NNP	2	+	+	1
CPA	2	-	-	1
NFT	3	-	-	1
PCT	4	-	-	1
MCT	2	+	-	0
PB	2	+	+	1
DZP	4	-	-	1
DSF	3	-	-	1
PHE	1	-	-	1
ROT	5	-	-	1
TLB	5	-	-	1
ASA	2	-	-	1
TRI	5	-	-	1
IM	3	-	-	1
PhB	5	-	-	1
PMZ	3	-	-	1
SUL	5	-	-	1
TC	5	-	-	1
ETH	2	-	-	1
TEO	4	-	-	1
CAF	2	-	-	1
CMP	4	-	-	1

(灰色：誤答)

表5 遺伝毒性/肝発がん性の予測結果

exposure	sample_no	truth	pred	correct
AAT	1	++	++	1
DMN	5	++	++	1
TDA	2	++	++	1
NDEA	2	++	++	1
NDELA	5	++	++	1
NEMA	5	++	++	1
NB	3	++	++	1
NNP	2	++	++	1
CPA	2	+-	+-	1
NFT	3	+-	+-	1
PCT	4	+-	+-	1
MCT	2	-+	-+	0
PB	2	-+	-+	0
DZP	4	--	--	1
DSF	3	--	--	1
PHE	1	--	--	1
ROT	5	--	--	1
TLB	5	--	--	1
ASA	2	--	--	1
TRI	5	--	--	1
IM	3	--	--	1
PhB	5	--	--	1
PMZ	3	--	--	1
SUL	5	--	--	1
TC	5	--	--	1
ETH	2	--	--	1
TEO	4	--	--	1
CAF	2	--	--	1
CMP	4	--	--	1

(灰色：誤答)

表6 DNAアダクトーム解析の毒性予測結果の精度評価の比較

	訓練データとテストデータに当該曝露物質を含む交差検証			Leave-One-Out 交差検証		
	正答数	合計サンプル数	正答率	正答数	合計サンプル数	平均的な正答率
geno_carc	27	29	93%	131	146	90%
geno	27	29	93%	125	146	86%
carc	28	29	97%	131	146	90%

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。

さらに、平成30年では被験物質の追加を行い同様に検討した。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想された。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。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。

アダクトームデータがPCA-DAで、遺伝毒性/肝発がん性の違いにより綺麗に分離できたことから、同データを用いて遺伝毒性/肝発がん性の予測モデルを開発することを試みた。アダクトームデータの一部を教師データとして化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法(アルゴリズムとしてはランダムフォレストを使用)を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いてテストデータに対して予測を行ったところ、93%以上の正解率が得られた。また、Leave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、わずかに正答率が減少した。予測精度をさらに向上させるためには、説明変数の加工、学習アルゴリズムの変更、チューニングなどの学習方法を改良する必要がある。さらに、訓練データの増加も必要であると思われる。特に、今回、いずれの予測モデルにおいても予測に失敗した化学物質物質(MCT、PB)は、非遺伝毒性発がん物質である。この結果は、データが他の化学物質に比べ極端に少ないことが予測度を低くしている可能性を示唆している。今回、この2種しか非遺伝毒性発がん物質の暴露は行なっておらず、同カテゴリーのサンプルを追加することが、予測精度を上げるためにも重要であると考えられる。

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、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。さらに遺伝毒性ラット肝発がん物質として、NDEA, NDELA, NE MA, NB, NNP, MDA、遺伝毒性非発がん物質として、CPA, NF T, 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IM, PhB, PZ, SUL, TC, ETH, TE O, 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7)。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。

アダクトームデータがPCA-DAで、遺伝毒性/肝発がん性の違いにより綺麗に分離できたことから、同データを用いて遺伝毒性/肝発がん性の予測モデルを開発することを試みた。得られたデータの一部を使用して、遺伝毒性、肝発がん性、遺伝毒性/肝発がん性を付加体から予測するモデルを、教師あり機械学習手法を用いて試作した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレストを使用した。アダクトームデータの一部を教師データとして化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法(アルゴリズムとしてはランダムフォレストを使用)を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いてテストデータに対して予測を行ったところ、93%以上の正解率が得られた。また、Leave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、わずかに正答率が減少した。今回、いずれの予測モデルにおいても予測に失敗した化学物質物質(MCT、PB)は、非遺伝毒性発がん物質である。同カテゴリーのサンプルを追加することが、必要であると考えられた。

現在、アダクトームデータに化学物質構造データを追加し、予測精度の向上について検討中である。また、各グループの予測に重要な付加体の探索を行うと同時に、更に化学物質の数を増やし、予測精度の向上について検討を行うことが、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を評価する上で必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) 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.
- 3) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -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.
 - 4) 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.
 - 5) Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. in press.
 - 6) Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 *gpt* delta transgenic rats. *Mutagenesis*. 2019; 34 (3): 279-287.
 - 7) Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y, Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B. DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China. *Chem Res Toxicol*. 2019; 32 (8): 1515-1527.
 - 8) Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res*. 2019; 847: 403022.
 - 9) Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*. 2020; 850-851: 503148.
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 ¹²th ICEM-⁵th 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)
 - 13) 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)
 - 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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. Fe³O₄ 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 前迫侑也、椎崎一宏、高村岳樹、戸塚ゆ加里. 職業性胆管がん発生に關与する 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)
- 21) 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)
- 22) 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)
- 23) 石野孔祐、前迫侑也、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)
- 24) 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望. 日本毒性学会シンポジウム、徳島 (2019 年 6 月)
- 25) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの遺伝毒性評価の動向 —JRC 会議に参加して—. MMS 定例会、京都 (2019 年 6 月)
- 26) Totsuka Y. How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting, リヨン (2019 年 7 月)
- 27) Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Practice of Cancer Prevention and Control、石家庄 (2019 年 7 月)
- 28) Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 日本癌学会学術総会シンポジウム、京都 (2019 年 9 月)
- 29) Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS、東京 (2019 年 11 月)
- 30) Iwamura K, Shimada H, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Endo O, Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 6th ACEM-48th JEMS、東京 (2019 年 11 月)
- 31) Ono H, Nagai M, Narushima D, Hamamoto R, Totsuka Y., Kato M. Detection of DNA adducts by nanopore sequencing using deep learning. 6th ACEM-48th JEMS、東京 (2019 年 11 月)

G. 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。