

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

レポーター遺伝子導入動物を用いた
クロロプロパノール類の発がん機序の解明

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高須 伸二

令和3年（2021）年 5月

I. 総括研究報告

レポーター遺伝子導入動物を用いた クロロプロパノール類の発がん機序の解明	-----	1
---	-------	---

高須伸二

II. 分担研究報告

1. <i>gpt delta</i> ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる 1,3-DCPの肝発がん機序の解明	-----	12
--	-------	----

高須伸二

2. <i>gpt delta</i> ラットを用いた中期発がん評価系による 1, 3-dichloro-2-propanolの遺伝毒性および発がんプロモーション作用の 検索	-----	20
---	-------	----

松下幸平

3. LC-MS/MSによる網羅的DNA損傷解析を用いた1,3-DCPの遺伝毒性機序の 検索	-----	30
---	-------	----

石井雄二

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	43
---------------------	-------	----

総括研究報告書

レポーター遺伝子導入動物を用いた
クロロプロパノール類の発がん機序の解明

研究代表者： 高須 伸二 （国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官）

研究要旨

1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)は主に酸加水分解植物性たん白を原材料としたしょうゆ等の調味料の原材料やチーズ、穀物加工品など種々の食品に含まれる汚染物質である。1,3-DCPは肝臓および腎臓等に明確な発がん性を示すものの、遺伝毒性を含む発がん機序に関する情報は限定的である。本研究では、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデル及び中期発がん評価系を用いて、1,3-DCPの発がん機序の解明を目指す。

遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルでは、6週齢の雄性 *gpt delta* ラットに 1,3-DCP を 27, 80 及び 240 mg/L の用量で 13 週間飲水投与し、発がん標的臓器である肝臓および腎臓の *gpt assay* および肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。その結果、肝臓および腎臓の *gpt* 変異体頻度は低用量群から対照群に比して有意な高値を示し、用量依存的に増加した。変異スペクトラム解析の結果、肝臓では G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が、腎臓では G:C-A:T transition 変異頻度の有意な増加が認められた。一方、GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果、何れの投与群においても GST-P 陽性細胞巢の数および面積に統計学的に有意な変化は見られなかった。以上より、1,3-DCP のラット肝および腎臓発がん性には遺伝毒性機序が関与するものと考えられた。一方、本実験条件下において、肝前がん病変の形成を指標とした発がん性評価では 1,3-DCP 投与の影響が認められなかったことから、1,3-DCP の肝臓発がんプロモーション作用は乏しい可能性が示唆され、肝前がん病変の形成に影響する因子の検索が必要であると考えられた。

gpt delta ラットを用いた中期発がん評価系による 1,3-DCP の遺伝毒性および発がんプロモーション作用の検索では、昨年度に肝臓における中期試験法を実施し、1,3-DCP 投与により切除肝組織において *gpt* 変異体頻度が上昇することを示した。本年度は残存肝組織を用いて GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。その結果、1,3-DCP 投与群における GST-P 陽性細胞巢の数および面積に対照群との差はみられなかった。本年度ではさらに、腎臓における中期試験法を実施した。1,3-DCP 投与により切除腎組織における *gpt* 変異体頻度が上昇し、さらに残存腎組織における尿細管異型過形成の形成が促進されていた。また 1,3-DCP 投与群の残存腎組織では、糸球体障害を示唆する所見や尿細管上皮における Ki67 陽性細胞の増加が認められた。以上より、1,3-DCP による肝および腎臓発がん機序には遺伝毒性が関与していることが示唆された。また、1,3-DCP の肝臓における発がんプロモーション作用は限定的であることに対し、腎臓では糸球体障害に続発する尿細管の細胞増殖活性の亢進により発がんプロモーション作用を示すことが示唆された。

本研究において明らかになった 1,3-DCP の突然変異誘発性について、その機序の解明を目的として突然変異の原因となる DNA 損傷の検索を行った。遺伝毒性・発がん性包括試験における対照群及び 1,3-DCP 240 mg/L 投与群のラット肝臓について、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた網羅的 DNA 損傷解析を行った結果、DNA

アダクトームマップにおいて1,3-DCPに特異的なDNA付加体に由来するスポットは検出されなかった。In vitroにおいて1,3-DCPとdeoxyguanosineの反応を検討した結果、1,3-DCPの代謝物と考えられているepichlorohydrinから生じる7-(3-chloro-2-hydroxypropyl) guanine (CHP-N7-Gua)の生成が確認された。In vivoにおける同付加体の形成を確認するため、LC-MS/MSによる分析法を構築し、DNAの前処理法を検討した。対照群及び1,3-DCP 240 mg/L投与群のラット肝臓から抽出したDNAを95°C、15分でインキュベーション後、脱離したCHP-N7-GuaをLC-MS/MSで測定した結果、同付加体のピークは検出されなかった。以上より、1,3-DCPの突然変異誘発機序においてepichlorohydrinを介して生じるCHP-N7-Guaの関与は乏しいと考えられた。

研究分担者：

松下 幸平（国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部・主任研究官）、石井 雄二（国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部・室長）

A. 研究目的

食品に含まれる可能性のあるクロロプロパノール類の一つである1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)は、主に酸加水分解植物性たん白を原材料としたしょうゆ等の調味料の原材料やチーズ、穀物加工品などに含まれることが知られている。1,3-DCPはラットにおいて、肝臓、腎臓、甲状腺、舌などで発がん性を示すことが報告されており、FAO/WHO合同食品添加物専門家会議(JECFA)では限られたデータながら肝毒性、腫瘍発生の増加が認められ、重大な健康影響は発がん性であるとしている。一方、摂取量推計の結果、高摂取群の推定摂取量とベンチマーク法を基にした暴露マージンの検討から、ヒトの健康への懸念は低いと評価している。また、食品安全委員会でも高摂取群における摂取量を比較した結果、日本人における健康への懸念は低いとしている。

しかし、1,3-DCPはin vitro遺伝毒性試験で明確な遺伝毒性を示すことが知られており、in vivo遺伝毒性試験（ラット骨髄小核試験及びラット肝UDS試験）では陰性であるものの知見は限定的であり、腫瘍

発生部位の作用機序に関する知見が不足していることから、JECFAでは遺伝毒性による発がん作用機序を排除できないとしている。

本研究では、我々がこれまで開発してきたレポーター遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性・発がん性試験モデルを用いて、1,3-DCPの発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する。さらに、得られた結果に基づき分子病理学的な機序を検討し、1,3-DCPの発がん機序の解明を目指す。

令和元年及び2年において本研究で実施したgpt deltaラットを用いた中期発がん評価系による1,3-DCPの遺伝毒性及び発がんプロモーション作用の検索において、1,3-DCPがラット肝臓で突然変異を誘発することが明らかとなり、肝発がん過程における遺伝毒性機序の関与が明らかになった。そこで本研究では、1,3-DCPの遺伝毒性機序について検討した。

DNA損傷は化学発がん課程における最も早期のイベントであり、原因となるDNA損傷の解明は、発がん課程の理解だけでなく、バイオマーカーとしての応用も期待される^{文献 1)}。DNA損傷の研究には放射性同位体を用いたポストラベル法が使用されていたが^{文献 2,3)}、近年では検出感度の向上に伴い質量分析計を用いた検出例が数多く報告されている^{文献 4,5)}。また、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた網羅的DNA損傷解析は、deoxynucleosideがMS/MSのフラグメンテーションにおいて容易にdeoxyriboseを脱離する特徴を利用し、

deoxyribose に由来する m/z 116 の差を生じる分子を網羅的に検出することから、未知の DNA 損傷の検索に有用である^{文献6,7)}。本年度は *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験において 1,3-DCP を 13 週間投与したラット肝臓について、LC-MS/MS を用いた網羅的 DNA 損傷解析を行った。また、*in vitro* における 1,3-DCP と deoxyguanosine (dG) の反応で生じる DNA 付加体を検索し、生成が確認された 7-(3-chloro-2-hydroxypropyl) guanine (CHP-N7-Gua) について、分析法の構築とラット肝臓での検出を試みた。

B. 研究方法

B-1. *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる 1,3-DCP の発がん機序の解明

B-1-1. 試薬及び動物

1,3-DCP は Sigma-aldrich から購入した。動物は 5 週齢の雄性 Wistar Han 系 *gpt delta* ラットを日本エスエルシー株式会社から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1℃、湿度 55±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、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 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、試験期間中は基礎食として固形 CRF1 を自由摂取させた。

B-1-2. 動物試験

6 週齢の雄性 *gpt delta* ラット各群 10 匹に配し、1,3-DCP を発がん性試験における投与用量である 27, 80 及び 240 mg/L の用量で 13 週間飲水投与した。対照群には蒸留水を同様に投与した。投与期間中は一般状態を観察するとともに、体重を週 1 回測定

した。投与終了後、イソフルラン麻酔下で全身諸器官・組織を摘出した。肝臓及び腎臓については、一部をレポーター遺伝子変異頻度解析のために -80℃ で保存した。

In vivo 変異原性評価として肝臓および腎臓の *gpt assay* を、発がん性評価として肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。

何れの項目についても統計学的解析は Bartlett 検定により分散の均一性を確認し、均一である場合は One-way ANOVA により、均一でない場合は Kruskal-Wallis 検定により群間差を解析した。群間差が認められた項目については、Dunnett の多重比較検定または steel 検定により各群の有意差を解析した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者が実施し、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。

B-2. *gpt delta* ラットを用いた中期発がん評価系による 1,3-dichloro-2-propanol の遺伝毒性および発がんプロモーション作用の検索

昨年度に実施した肝臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法の動物実験の概要を以下に示す。6 週齢雄性 F344 系 *gpt delta* ラットを対照群、1,3-DCP 投与群および陽

性対照群の3群 (n=15) に配した。1,3-DCP 投与群には初年度の用量設定実験の結果に基づき、1,3-DCP を最大耐量である 50 mg/kg 体重の用量で1日1回強制経口投与した。対照群には媒体である蒸留水、陽性対照群には遺伝毒性肝発がん物質であるエストラゴール (ES) を 150 mg/kg 体重の用量で同様に投与した。それぞれの物質を4週間投与した後に2週間の休薬期間を設け、休薬後に部分肝切除を行った。摘出した肝臓組織を採材して液体窒素にて瞬間凍結し、-80℃にて保存した。さらに部分肝切除の16時間後にイニシエーション処置として diethylnitrosamine (DEN) を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、その1週間後から被験物質の投与を再開した。休薬期間は被験物質と DEN の相互作用を回避するために設定した。試験開始13週間後に剖検を行い、残存肝組織を採材して一部を10%中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定し、残りの組織を液体窒素により瞬間凍結して-80℃に保存した。凍結保存した切除肝組織よりゲノム DNA を抽出して *gpt* assay を実施し、*gpt* 変異体を用いたシーケンス解析により、変異スペクトラムを解析した。また、ホルマリン固定した残存肝組織を用いて定法に従いパラフィン包埋・薄切し、HE 標本作製した。さらに肝前がん病変マーカーである glutathione S-transferase placental form (GST-P) の免疫染色を実施し、画像解析ソフト (HALO) を用いて単位面積当たりの GST-P 陽性細胞単の数および面積を算出した。さらに Ki67 免疫染色を実施し、1000 個以上の肝細胞の核をカウントして Ki67 陽性細胞率を算出した。また凍結保存した残存肝組織を用いて定量 PCR (qPCR) 解析を実施し、細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現を検索した。

本年度ではさらに、腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法を以下の概要で実施した。6週齢雄性 F344 系 *gpt delta* ラットを対照群、1,3-DCP 投与群および陽性対照群の3群 (n=15) に配した。1,3-DCP 投与

群には1,3-DCP を 50 mg/kg 体重の用量で1日1回投与し、対照群には蒸留水、陽性対照群には遺伝毒性腎発がん物質である aristolochic acid (AA) を 0.3 mg/kg 体重の用量で同様に投与した。それぞれの物質を4週間投与し、2週間の休薬後に片側腎摘出を施して摘出した腎組織を液体窒素にて瞬間凍結し、-80℃にて保存した。さらに片側腎摘出の48時間後に DEN を 40 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、DEN 投与の1週間後から被験物質の投与を再開した。実験開始19週後に剖検を行い、残存腎組織を採材して一部を10%中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定し、残りの組織を液体窒素により瞬間凍結して-80℃に保存した。凍結保存した摘出腎組織を用いて同様に *gpt* assay およびシーケンス解析を実施した。またホルマリン固定した残存腎組織から同様に HE 標本作製し、前腫瘍性病変である尿細管異型過形成の数をカウントし、画像解析ソフト (HALO) で求めた腎臓の皮質および髄質外帯外層の面積で除して単位面積当たりの前腫瘍性病変の数を算出した。さらに PAS 染色および Ki67 免疫染色を実施して糸球体障害および尿細管の細胞増殖活性を検索した。Ki67 免疫染色では尿細管上皮の核を1000 個以上カウントし、陽性細胞率を算出した。また凍結保存した残存腎組織を用いて同様に qPCR 解析を実施し、細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現を検索した。

(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。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。

B-3. LC-MS/MS による網羅的 DNA 損

傷解析を用いた 1,3-DCP の遺伝毒性機序の検索

B-3-1. 材料及び試薬

1,3-DCP, dG 及び deoxyribonucleic acid from calf thymus は sigma-aldrich (東京) から購入した. Epichlorohydrin は東京化生工業(東京)から購入した. LC-MS 用蒸留水, acetonitrile 及び formic acid は関東化学 (東京) から入手した.

B-3-2. 網羅的 DNA 損傷解析

令和元年度及び 2 年度に実施した *gpt delta* ラットを用いた 1,3-DCP の包括的毒性試験において採取した肝臓を解析に供した. 対照群及び 240 mg/L 投与群の肝臓から, 和光純薬社製 DNA エキストラクター WB キットを用いて抽出した DNA を 100 µg に調整し, Tris-HC (pH7.4) 及び DNase I を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) した. 次に, Sodium acetate (pH4.2), ZnCl₂ 及び nuclease P1 を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) した. Tris-HCl buffer (pH9.0) を加えた後, alkaline phosphatase 及び phosphodiesterase I を加えインキュベーション (37°C, 16~18 hr) し, Vivacon 500R (10 kDa; Sartorius 社製) 及び Ultrafree (0.22 µm; Millipore 社製) でフィルトレーション後, LC-MS/MS による測定に供した.

LC-MS/MS は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima Pt mass spectrometry system (Waters 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% formic acid 添加) と溶液 B: acetonitrile (0.001% formic acid 添加) の混液を流速 0.2 ml/min で送液し, カラムを溶液 A/B=99/1 で安定させた. グラジエント条件は以下に記す. 0-5 min: 溶液 A 99%, 5-10 min: 溶液 A 99% > 90%, 10-35 min: 溶液 A 90% > 10%, 35-45 min: 溶液 A 10%. MS/MS のイオン化にはエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のポジティブイオ

ンモードを用いた. その他の条件は以下に記す. Capillary voltage: 3 kV, cone voltage: 15 V, Collision energy: 15 eV, Source temperature: 120 °C, Desolvation temperature: 400°C, Cone gas flow: 60 L/hr, Desolvation gas flow: 600 L/hr. 検索質量範囲は m/z 250 ~ 650 とした.

B-3-3. 1,3-DCP と dG の *in vitro* 反応

10 mg/mL に調製した dG 溶液を Tris HCl (pH7.4), Sodium acetate (pH4.2) または Tri HCl (pH9.0) で 5 mg/mL に希釈し, 1 mL に 1,3-DCP を 20 µL 加えて 37°C, 60 時間インキュベーションした. 反応後, Ultrafree (0.22 µm; Millipore 社製) でフィルトレーションし, LC-MS/MS による測定に供した.

液体クロマトグラフィー/ダイオードアレイ検出器/タンデム質量分析計 (LC-DAD-MS/MS) は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima Pt mass spectrometry system (Waters 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, 移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.1% formic acid 添加) と溶液 B: acetonitrile (0.1% formic acid 添加) の混液を流速 0.2 ml/min で送液し, カラムを溶液 A/B=99/1 で安定させた. グラジエント条件は以下に記す. 0-5 min: 溶液 A 99%, 5-10 min: 溶液 A 99% > 90%, 10-35 min: 溶液 A 90% > 10%, 35-45 min: 溶液 A 10%. DAD の検出波長は 254 nm 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及びネガティブイオンモードを用い, MS スキャン及び MS/MS スキャンを行った. イオン化条件は以下に記す. Capillary voltage: 3 kV, cone voltage: 15 V, Collision energy: 5~30 eV, Source temperature: 120°C, Desolvation temperature: 400°C, Cone gas flow: 60 L/hr, Desolvation gas flow: 600 L/hr. 測定質量範囲は m/z 50~600 とした.

B-3-4. 7-(3-chloro-2-hydroxypropyl) guanine (CHP-N7-Gua) の合成と分析

10 mg/mL の deoxyguanosine 溶液に epichlorohydrin を 20 μ L 添加し、37°C で 6 時間インキュベーションした。反応後、HPLC を用いて CHP-N7-Gua を分取し標準品を得た。

LC-MS/MS は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima Pt mass spectrometry system (Waters 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 μ m) を用いた。移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.1% formic acid 添加) と溶液 B: acetonitrile (0.1% formic acid 添加) の混液を流速 0.2 mL/min で送液し、カラムを溶液 A/B=98/2 で安定させた。グラジエント条件は以下に記す。0-10 min: 溶液 A 98% > 80%, 10-15 min: 溶液 A 80% > 10%, 15-17 min: 溶液 A 10% > 98%, 17-30 min: 溶液 A 98%。MS/MS のイオン化には ESI のポジティブイオンモードを用いた。その他の条件は以下に記す。Capillary voltage: 3 kV, cone voltage: 25 V, Collision energy: 12 eV, Source temperature: 120°C, Desolvation temperature: 400°C, Cone gas flow: 60 L/hr, Desolvation gas flow: 600 L/hr。マルチリアクションモニタリング (MRM) で m/z 244 > 152 を検出した。

CHP-N7-Gua の DNA からの脱離条件を検討するため、100 μ g/ml の Calf thymus DNA に epichlorohydrin 20 μ L を添加し、37°C、6 時間インキュベーションした。得られた DNA を①37°C で 12, 24 及び 48 時間、②70°C で 0.5, 1, 2, 4 及び 6 時間、③95°C で 0.25, 0.5, 1 及び 2 時間インキュベーションし、Amicon Ultra (3K, Millipore 社製) でフィルトレーション後、LC-MS/MS による測定に供した。測定結果から CHP-N7-Gua 量が最大となるインキュベーション温度及び時間を設定した。

令和元年度及び 2 年度に実施した *gpt* delta ラットを用いた 1,3-DCP の包括的毒性試験において採取した肝臓を DNA 中 CHP-N7-Gua の測定に供した。和光純薬社製 DNA エキストラクター WB キットを使

用して抽出した DNA を 1 mg/ml に調整し、400 μ L を 95°C、15 分インキュベーションした。反応後、フィルトレーションし、ろ液 300 μ L を遠心濃縮装置 SpeedVac (Thermo Fisher 社製) を用いて乾固し、30 μ L の蒸留水に再溶解し、LC-MS/MS による測定に供した。

C. 研究結果

C-1. *gpt* delta ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる 1,3-DCP の発がん機序の解明

肝臓の *gpt* assay の結果、*gpt* 変異体頻度 (MF) は低用量群から対照群に比して有意な高値を示し、用量依存的に増加した。変異スペクトラム解析の結果、G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が有意に増加した。腎臓の *gpt* assay の結果、*gpt* MF は低用量群から対照群に比して有意な高値を示した。変異スペクトラム解析の結果、中間用量群から G:C-A:T transition 変異頻度の有意な増加が認められた。GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果、何れの投与群においても GST-P 陽性細胞巢の数および面積に統計学的に有意な変化は見られなかった。

C-2. *gpt* delta ラットを用いた中期発がん評価系による 1,3-dichloro-2-propanol の遺伝毒性および発がんプロモーション作用の検索

昨年度までに、切除肝組織を用いた *gpt* assay およびシーケンス解析を行い、1,3-DCP 投与群において *gpt* 変異体頻度が有意に上昇していること、さらに GC:AT および AT:GC transition が顕著に増加していることを示した。本年度ではさらに、残存肝組織における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施した。その結果、1,3-DCP 投与群では小葉中心帯の肝細胞が GST-P

に陽性を示したものの、GST-P 陽性細胞集の数および面積はともに対照群と同程度であった。陽性対照群である ES 投与群では、GST-P 陽性細胞の数および面積ともに対照群と比して有意に増加していた。Ki67 免疫染色では、1,3-DCP 投与群において Ki67 陽性肝細胞数の有意な増加が認められ、特に小葉中心帯の肝細胞において高率に陽性反応を認めた。qPCR 解析では、Cyclin A2 および Cyclin B1 の mRNA 発現が 1,3-DCP 投与群において対照群と比して有意に増加していた。

腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法では、摘出腎組織を用いた *gpt* assay において、1,3-DCP 投与により *gpt* 変異体頻度が対照群と比して有意に増加した。陽性対照群である AA 投与群においても、*gpt* 変異体頻度の有意な増加を認めた。シーケンス解析では、1,3-DCP 投与群では GC:AT および AT:GC transition, AA 投与群では AT:TA transversion および single bp deletion が対照群と比して有意に増加していた。残存腎組織では、尿細管異型過形成の数が 1,3-DCP 投与群および AA 投与群において対照群と比して有意に増加していた。PAS 染色の結果、1,3-DCP 投与群の糸球体および尿細管上皮に PAS 陽性顆粒が認められ、尿細管腔内には硝子円柱が認められた。Ki67 免疫染色では、1,3-DCP 投与群の尿細管における Ki67 陽性細胞率が対照群と比して有意に増加していた。qPCR 解析では、1,3-DCP 投与群において Cyclin E1 および Cyclin A2 の mRNA 発現が有意に増加しており、Cyclin B1 の mRNA 発現が増加傾向を示した。

C-3. LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析を用いた 1,3-DCP の遺伝毒性機序の検索

C-3-1. LC-MS/MS を用いた網羅的 DNA 損傷解析

対照群及び 240 mg/L 投与群の肝臓の網

羅的 DNA 損傷解析の結果から作製した DNA アダクトームマップにおいて、対照群、1,3-DCP 投与群ともに複数の DNA 塩基に由来するスポットが検出されたものの、1,3-DCP 投与群に特異的なスポットは検出されなかった。

C-3-2. 1,3-DCP と dG の *in vitro* 反応

1,3-DCP と dG を *in vitro* において種々の条件下で反応させた後、反応液を LC-DAD で測定した結果、pH7.4 及び pH9.2 の条件下において約 18.5 分に未知のピークを検出した。同ピークについて LC-MS/MS を用いてポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードで MS スキャン及び MS/MS スキャンを実施した。MS スペクトラムでは ESI+ で m/z 244, ESI- で m/z 242 のイオンが認められたことから、その質量数は 243 と考えられた。また、MS/MS スペクトラムでは ESI+ で m/z 152 のプロダクトイオンが、ESI- で m/z 150 のプロダクトイオンが検出された。これらの結果から、unknown adduct は 1,3-DCP から Cl が脱離して guanine の N7 位に付加した CHP-N7-Gua と考えられた。

C-3. CHP-N7-Gua の分析

Epichlorohydrin と dG の反応によって CHP-N7-Gua の標準品を合成し^{文献⁸⁾}、前項で示した未知ピークと一致することを確認した。標準品を用いて LC 及び MS/MS 条件を検討し、同付加体の分析法を構築した。さらに、CHP-N7-Gua の DNA からの脱離条件を検討するため、epichlorohydrin と DNA を反応させた後、種々の条件下でインキュベーションを行った結果、95°C、15 分のインキュベーションによって脱離した CHP-N7-Gua のピーク面積が最大となった。

構築した LC-MS/MS による分析法を用いて、対照群及び 1,3-DCP 投与群のラット肝臓 DNA の測定を行った結果、CHP-N7-Gua のピークは検出されなかった。

D. 考察

D-1. *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる 1,3-DCP の発がん機序の解明

本研究では、1,3-DCP についてレポーター遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性・発がん性試験モデルを用い、その発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する目的で、*gpt delta* ラットに発がん用量の 1,3-DCP を 13 週間反復投与し、1,3-DCP の発がん標的臓器である肝臓および腎臓の *gpt assay* を実施した。その結果、両臓器共に *gpt* 変異体頻度は用量依存的に増加したことから、1,3-DCP は *in vivo* において変異原性を示すことが明らかになった。さらに、変異スペクトラム解析の結果、肝臓では G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が、腎臓では G:C-A:T transition の変異頻度が増加したことから、1,3-DCP のラット肝および腎臓発がん過程には、これらの遺伝子突然変異が関与する可能性が示唆された。

一方、GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果、1,3-DCP の投与は GST-P 陽性細胞巢の形成に影響を与えなかった。本研究課題の分担研究においても、1,3-DCP 投与による GST-P 陽性細胞巢の形成促進作用は認められず、1,3-DCP の肝発がんプロモーション作用は限定的である可能性が示唆された。さらに、これまでに 1,3-DCP の長期間投与は肝逸脱酵素 (AST, ALT, ALP および γ -GTP) の上昇や肝紫斑症の増加など肝障害が認められると報告されている。昨年度までの結果から、本試験条件下では小葉中心性肝細胞肥大が認められたものの、その程度は軽度であり傷害性の変化は認められなかった。このことから、本実験条件下では肝臓に顕著な毒性影響はみられないことも GST-P 陽性細胞巢の形成促進作用が見られなかった一因である可能性が

考えられ、今後、肝前がん病変の形成に関与する因子の検索が必要であると考えた。

D-2. *gpt delta* ラットを用いた中期発がん評価系による 1,3-dichloro-2-propanol の遺伝毒性および発がんプロモーション作用の検索

肝臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法では、残存肝組織において 1,3-DCP 投与による GST-P 陽性細胞巢の形成促進作用は認められなかった。一方、1,3-DCP 投与群では GST-P 陽性反応が小葉中心帯の肝細胞に認められ、同細胞では Ki67 の陽性反応が高率にみられた。過去の報告では、非肝発がん物質である hydroxyanisole (BHA) をラットに投与した結果、小葉辺縁帯の肝細胞において GST-P が誘導され、さらに同細胞の細胞増殖が亢進することが示されている (Makino et al., Toxicol. Pathol. 36(3), 420-427)。GST-P は第二相酵素 glutathione S-transferase のサブタイプの一種であること、さらに BHA は第二相酵素を誘導して種々の肝発がん物質に対する抗腫瘍効果を示すことから、この報告における GST-P 発現および細胞増殖活性の亢進は発がんに関連するものではなく、酵素誘導に関連するものと結論されている。よって、本研究でみられた小葉中心帯の肝細胞における GST-P 発現も酵素誘導に関連するものであると推察された。また、第二相酵素誘導に伴う細胞増殖活性の亢進は、肝発がんプロモーション作用には寄与しないことが示唆された。

腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法では、1,3-DCP 投与群の摘出腎組織において *gpt* 変異体頻度の上昇が認められた。よって、1,3-DCP の腎臓発がんには遺伝毒性機序が関与していることが示唆された。シーケンス解析では、肝臓と同じく GC:AT および AT:GC transition といった特徴的な変異スペクトラムを示した。陽性対照群である AA 投与群においても *gpt* 変異体の上

昇が認められ、シーケンス解析では、AA に特徴的にみられる AT:TA transversion が顕著に増加していた。残存腎組織においては、1,3-DCP 投与群において前腫瘍性病変である尿細管異型過形成の形成が促進されていたことから、1,3-DCP は腎臓において発がんプロモーション作用を有していることが示唆された。また PAS 染色標本より得られた所見から、1,3-DCP 投与により糸球体が障害され、高分子タンパクが尿原中に過剰に排出・蓄積されていることが示唆され、その結果として二次的に尿細管障害が生じていることが考えられた。1,3-DCP 投与群の尿細管では Ki67 陽性細胞が増加していたことから、糸球体障害に続発する尿細管障害に起因する代償性の細胞増殖活性の亢進が発がんプロモーション作用に寄与しているものと考えられた。

D-3. LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析を用いた 1,3-DCP の遺伝毒性機序の検索

LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析は deoxyribose に由来する m/z 116 の差を生じる分子を網羅的に検出する方法である。従って、本法において 1,3-DCP による DNA 損傷が検出されなかったことは、1,3-DCP による DNA 損傷が酵素処理過程において分解又は DNA から脱離することを示唆するものと考えられた。

1,3-DCP と dG の *in vitro* における反応を検討した結果、中性又は塩基性条件下において epichlorohydrin から生じる DNA 付加体 CHP-N7-Gua の生成が確認された。生体では 1,3-DCP の一部が代謝され epichlorohydrin を生じることが報告されている^{文献9)}。一方、*in vitro* 条件下においても CHP-N7-Gua が生成したことは、1,3-DCP の分解によって epichlorohydrin が生じることを示唆していると考えられた。また、dG の N7 位のアルキル化は、Gua と deoxyribose

の結合を減弱させることから、これらの付加体は容易に DNA から脱離する^{文献10)}。それ故、網羅的 DNA 損傷解析において CHP-N7-Gua を検出することは困難と考えられた。

一方、構築した LC-MS/MS による CHP-N7-Gua の分析法を用いて 1,3-DCP を投与したラット肝臓から抽出した DNA を分析した結果、CHP-N7-Gua のピークは検出されなかった。このことから、1,3-DCP の突然変異における CHP-N7-Gua の関与の可能性は乏しいと考えられた。

一般的に CHP-N7-Gua のように DNA から塩基が脱離すると DNA 鎖には AP-site が形成され、G:C-T:A transversion や欠失変異を生じることが知られている^{文献11,12)}。一方、本年度の研究結果において、1,3-DCP を投与した *gpt delta* ラットの肝臓及び腎臓では G:C-A:T transition が高頻度に認められた。これら変異スペクトラムの違いは 1,3-DCP の突然変異の原因が CHP-N7-Gua ではないことを支持するものと考えられた。一方、1,3-DCP の誘発する変異が G:C-A:T transition であったことは、dG に生じる付加体が突然変異の主な原因であることを示唆している。1,3-DCP の突然変異機序の解明には、dG を中心とした損傷塩基のさらなる検索が必要と考えられた。

E. 結論

gpt delta ラットに発がん用量の 1,3-DCP を 13 週間反復投与し、発がん標的臓器である肝臓および腎臓の *gpt assay* を実施した。その結果、両臓器ともに *gpt* 変異体頻度は用量依存的に増加した。変異スペクトラム解析の結果、肝臓では G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が、腎臓では G:C-A:T transition の変異頻度が増加した。以上より、1,3-DCP のラット肝および腎発がん性は遺伝毒性機序によるものと考えられた。

gpt delta ラットを用いた肝臓および腎臓

における中期遺伝毒性・発がん性試験を実施した。その結果、1,3-DCP は肝臓および腎臓において変異原性を示したことから、1,3-DCP による肝および腎臓がんには遺伝毒性機序が関与していることが示唆された。また、肝臓における 1,3-DCP の発がんプロモーション作用は限定的であるものの、腎臓においては糸球体を障害して二次的に尿細管の障害および細胞増殖活性の亢進を誘発し、発がんプロモーション作用を発揮するものと考えられた。

網羅的 DNA 損傷解析を用いた 1,3-DCP から生じる DNA 付加体検索において特異的 DNA 付加体の形成は認められなかった。*In vitro* では 1,3-DCP と dG の反応において CHP-N7-Gua が生成したものの、1,3-DCP を投与したラット肝臓において同 DNA 付加体の生成は認められず、1,3-DCP の突然変異への寄与は乏しいと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

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

参考文献

1) Rundle A. Carcinogen-DNA adducts as a

biomarker for cancer risk. *Mutat. Res.* 600, 23-36 (2006).

2) Singh R, Gaskell M, Le Pla R C, Kaur B, Azim-Araghi A, Roach J, Koukouves G, Souliotis V L, Kyrtopoulos S A, and Farmer P B, Detection and quantification of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts in mouse liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with 32P-postlabeling. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 868-878 (2006).

3) Pfau W, Brockstedt U, Söhren K D, and Marquardt H. 32P-post-labelling analysis of DNA adducts formed by food-derived heterocyclic amines: Evidence for incomplete hydrolysis and a procedure for adduct pattern simplification. *Carcinogenesis* 15, 877-882 (1994).

4) 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 doses. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 532-541 (2011).

5) 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.* 24, 1112-1118 (2012).

6) Kanaly RA, Hanaoka T, Sugimura H, Toda H, Matsui S, Matsuda T, Development of the adductome approach to detect DNA

7) damage in humans. *Antioxid Redox Signal* 8, 993-1001 (2006).

8) Ishii Y, Takasu S, Kuroda K, Matsushita

- K, Kijima A, Nohmi T, Ogawa K, Umemura T, Suzuki Y, 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).
- 9) Singh US, Decker-Samuelian K, Solomon JJ, Reaction of epichlorohydrin with 2'-deoxynucleosides: characterization of adducts. *Chem. Biol. Interact.* 99, 109-128 (1996).
- 10) Waidyanatha S, Gaudette NF, Hong Y, Fennell TR, Formation of epichlorohydrin, a known rodent carcinogen, following oral administration of 1,3-dichloro-2-propanol in rats. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1787-1795 (2014).
- 11) Ishii Y, Matsushita K, Kuroda K, Yokoo Y, Kijima A, Takasu S, Kodama Y, Nishikawa A, Umemura T, Acrylamide induces specific DNA adduct formation and gene mutations in a carcinogenic target site, the mouse lung. *Mutagenesis*, 30, 227-245 (2015).
- 12) Randall SK, Eritja R, Kaplan BE, Petruska, J and Goodman, MF, Nucleotide insertion kinetics opposite abasic lesions in DNA. *J. Biol. Chem.*, 262, 6864-6870 (1987).
- 13) Kokoska RJ, McCulloch SD and Kunkel TA, The efficiency and specificity of apurinic/apyrimidinic site bypass by human DNA polymerase eta and *Sulfolobus solfataricus* Dpo4. *J. Biol. Chem.*, 278, 50537-50545 (2003).

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）

レポーター遺伝子導入動物を用いたクロロプロパノール類の発がん機序の解明

分担研究報告書

*gpt delta*ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる
1,3-DCPの肝発がん機序の解明

研究代表者： 高須 伸二（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官）

研究要旨

食品中に含まれる可能性のあるクロロプロパノール類の一つである1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)は、主に酸加水分解植物性たん白を原材料としたしょうゆ等の調味料の原材料やチーズ、穀物加工品などに含まれることが知られており、ラットにおいて肝臓、腎臓、甲状腺、舌などで発がん性を示すことが報告されている。また、1,3-DCPは *in vitro* 遺伝毒性試験で遺伝毒性を示すことが知られているものの、*in vivo* における遺伝毒性試験の知見は限定的であり、発がん標的臓器における発がん機序、特に遺伝毒性の関与についてはあまり検討されていない。本研究では、1,3-DCP についてレポーター遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性・発がん性試験モデルを用いて、発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する。6週齢の雄性 *gpt delta* ラットに1,3-DCPを27, 80及び240 mg/Lの用量で13週間飲水投与した。投与終了後、*in vivo* 遺伝毒性評価として肝臓および腎臓の *gpt assay* を、発がん性評価として肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。*gpt assay* の結果、肝臓および腎臓の *gpt* 変異体頻度は低用量群から対照群に比して有意な高値を示し、用量依存的に増加した。変異スペクトラム解析の結果、肝臓では G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が、腎臓では G:C-A:T transition 変異頻度の有意な増加が認められた。GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果、何れの投与群においても GST-P 陽性細胞巢の数および面積に統計学的に有意な変化は見られなかった。以上より、1,3-DCP のラット肝および腎臓発がん性は遺伝毒性機序によるものと考えられた。一方、本実験条件下において、肝前がん病変の形成を指標とした発がん性評価では1,3-DCP投与による変化が認められなかったことから、1,3-DCP の肝発がんプロモーション作用は乏しい可能性が示唆され、肝前がん病変の形成に影響する因子の検索が必要であると考えられた。

A. 研究目的

食品中に含まれる可能性のあるクロロプロパノール類の一つである1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)は、主に酸加水分解植物性たん白を原材料としたしょうゆ等の調味料の原材料やチーズ、穀物加工品などに含まれることが知られている。1,3-DCP はラットにおいて、肝臓、腎臓、甲状腺、舌などで発がん性を示すことが報告されており、FAO/WHO 合同食品添

加物専門家会議(JECFA)では限られたデータながら肝毒性、腫瘍発生の増加が認められ、重大な健康影響は発がん性であるとしている。一方、摂取量推計の結果、高摂取群の推定摂取量とベンチマーク法を基にした暴露マージンの検討から、ヒトの健康への懸念は低いと評価している。また、食品安全委員会でも高摂取群における摂取量を比較した結果、日本人における健康への懸念は低いとしている。

しかし、1,3-DCP は *in vitro* 遺伝毒性試

験で明確な遺伝毒性を示すことが知られており、*in vivo* 遺伝毒性試験（ラット骨髄小核試験及びラット肝 UDS 試験）では陰性であるものの知見は限定的であり、腫瘍発生部位の作用機序に関する知見が不足していることから、JECFA では遺伝毒性による発がん作用機序を排除できないとしている。

本研究では、我々がこれまで開発してきたレポーター遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性・発がん性試験モデルを用いて、1,3-DCP の発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する。さらに、得られた結果に基づき分子病理学的な機序を検討し、1,3-DCP の発がん機序の解明を目指す。

B. 研究方法

B-1. 試薬及び動物

1,3-DCP は Sigma-aldrich から購入した。動物は 5 週齢の雄性 Wistar Han 系 *gpt delta* ラットを日本エスエルシー株式会社から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリヤー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、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 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、試験期間中は基礎食として固形 CRF1 を自由摂取させた。

B-2. 動物試験

6 週齢の雄性 *gpt delta* ラット各群 10 匹に配し、1,3-DCP を発がん性試験における投与用量である 27, 80 及び 240 mg/L の用量で 13 週間飲水投与した。対照群には蒸留水を同様に投与した。投与期間中は一般状態を観察するとともに、体重を週 1 回測定した。投与終了後、イソフルラン麻酔下で全身諸器官・組織を摘出した。肝臓及び腎臓については、一部をレポーター遺伝子変

異頻度解析のために -80°C で保存した。

In vivo 遺伝毒性評価として肝臓および腎臓の *gpt assay* を、発がん性評価として肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。

いずれの項目についても統計学的解析は Bartlett 検定により分散の均一性を確認し、均一である場合は One-way ANOVA により、均一でない場合は Kruskal-Wallis 検定により群間差を解析した。群間差が認められた項目については、Dunnett の多重比較検定または steel 検定により各群の有意差を解析した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

（倫理面への配慮）

投与実験は熟練者が実施し、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

gpt assay および *gpt* 変異体スペクトラム解析の結果をそれぞれ Table 1~4 に示す。肝臓の *gpt assay* の結果、*gpt* 変異体頻度は低用量群から対照群に比して有意な高値を示し、用量依存的に増加した (Table 1)。変異スペクトラム解析の結果、G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が有意に増加した (Table 2)。腎臓の *gpt assay* の結果、*gpt* 変異体頻度は低用量群から対照群に比して有意な高値を示し

た (Table 3). 変異スペクトラム解析の結果, 中間用量群から G:C-A:T transition 変異頻度の有意な増加が認められた (Table 4).

GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果を Table 5 に示す. GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果, 何れの投与群においても GST-P 陽性細胞巢の数および面積に統計学的に有意な変化は見られなかった.

D. 考察

gpt delta ラットに発がん用量の 1,3-DCP を 13 週間反復投与し, 1,3-DCP の発がん標的臓器である肝臓および腎臓の *gpt* assay を実施した. その結果, 両臓器共に *gpt* 変異体頻度は用量依存的に増加したことから, 1,3-DCP は *in vivo* において変異原性を示すことが明らかになった. さらに, 変異スペクトラム解析の結果, 肝臓では G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が, 腎臓では G:C-A:T transition の変異頻度が増加したことから, 1,3-DCP のラット肝および腎発がん過程には, これらの遺伝子突然変異が関与する可能性が示唆された.

一方, GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果, 1,3-DCP の投与は GST-P 陽性細胞巢の形成に影響を与えなかった. 本研究課題の分担研究においても, 1,3-DCP 投与による GST-P 陽性細胞巢の形成促進作用は認められず, 1,3-DCP の肝発がんプロモーション作用は限定的である可能性が示唆された. さらに, これまでに 1,3-DCP の長期間投与は肝逸脱酵素 (AST, ALT, ALP および γ -GTP) の上昇や肝紫斑症の増加など肝障害を引き起こすと報告されている. 昨年度までの解析結果から, 本試験条件下では小葉中心性肝細胞肥大が認められたものの, その程度は軽度であり, 血清生化学的検査および病理組織学的検査において傷害性の変化は認められなかった. このことから, 本実験条件下では肝臓に顕著な毒性影響はみられていないことも GST-P 陽性

細胞巢の形成促進作用が見られなかった一因である可能性が考えられ, 今後, 肝前がん病変の形成に関与する因子の検索が必要であると考えた.

E. 結論

gpt delta ラットに発がん用量の 1,3-DCP を 13 週間反復投与し, 発がん標的臓器である肝臓および腎臓の *gpt* assay を実施した. その結果, 両臓器ともに *gpt* 変異体頻度は用量依存的に増加した. 変異スペクトラム解析の結果, 肝臓では G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が, 腎臓では G:C-A:T transition の変異頻度が増加した. 以上より, 1,3-DCP のラット肝および腎発がん性は遺伝毒性機序によるものと考えられた.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

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

Table 1. *gpt* mutant frequencies in the liver of *gpt* delta rats treated with 1, 3-DCP.

Dose	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	1	3.1	3	0.97	0.73 ± 0.37
	2	2.6	2	0.77	
	3	0.2	0 ^a	-	
	4	2.8	2	0.71	
	5	4.3	2	0.47	
27 mg/L	12	3.2	7	2.19	2.21 ± 1.03*
	13	0.6	0 ^a	-	
	14	3.0	6	2.00	
	15	1.0	2	2.00	
	18	3.0	8	2.67	
80 mg/L	22	1.8	3	1.67	3.46 ± 1.67*
	23	2.4	14	5.83	
	24	3.2	12	3.75	
	25	2.9	6	2.07	
	27	3.0	12	4.00	
240 mg/L	31	1.0	6	6.00	6.01 ± 2.45*
	34	1.1	3	2.73	
	35	2.8	27	9.64	
	36	2.4	14	5.83	
	40	1.2	7	5.83	

a: No mutant colonies were detected on the plate, with this data being excluded from the calculation of mutant frequency. * $p < 0.05$ vs. control.

Table 2. Mutation spectra of *gpt* mutant in the liver of *gpt* delta rat treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

	Control		27 mg/L		80 mg/L		240 mg/L	
	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)
Base substitution								
Transversion								
G:C-T:A	3 (33.3)	0.23 ± 0.16	2 (8.7)	0.33 ± 0.47	1 (2.1)	0.07 ± 0.15	0 (0.0)	0 0
G:C-C:G	1 (11.1)	0.09 ± 0.18	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0
A:T-T:A	0 (0.0)	0	1 (4.3)	0.08 ± 0.16	3 (6.4)	0.21 ± 0.20	10 (17.5)	1.07 ± 1.15 *
A:T-C:G	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0
Transition								
G:C-A:T	1 (11.1)	0.10 ± 0.19	17 (73.9)	1.56 ± 0.58 *	33 (70.2)	2.46 ± 0.86 *	36 (63.2)	3.91 ± 1.73 *
A:T-G:C	1 (11.1)	0.06 ± 0.12	2 (8.7)	0.16 ± 0.19	9 (19.1)	0.66 ± 0.62	9 (15.8)	0.88 ± 1.03
Deletion								
Single bp	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	2 (3.5)	0.15 ± 0.21
Over 2 bp	1 (11.1)	0.10 ± 0.19	1 (4.3)	0.08 ± 0.17	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0
Insertion	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0
Complex	2 (22.2)	0.16 ± 0.32	0 (0.0)	0	1 (2.1)	0.07 ± 0.15	0 (0.0)	0
Total	9	0.73 ± 0.37	23	2.21 ± 1.03 *	47	3.46 ± 1.67 *	57	6.01 ± 2.45 *

Table 3. *gpt* mutant frequencies in the kidney of *gpt* delta rats treated with 1, 3-DCP.

Dose	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	1	5.5	2	0.36	0.55 ± 0.18
	2	4.3	2	0.47	
	4	3.7	3	0.81	
	9	2.2	1	0.45	
	10	4.5	3	0.67	
27 mg/L	11	1.4	0 ^a	-	1.42 ± 0.70*
	14	4.6	7	1.52	
	15	1.9	2	1.05	
	18	3.1	4	1.29	
	19	2.2	4	1.82	
80 mg/L	21	4.0	3	0.75	1.72 ± 1.21*
	24	4.5	5	1.11	
	25	2.8	4	1.43	
	27	2.7	4	1.48	
	28	2.1	8	3.81	
240 mg/L	31	1.0	8	8.00	3.48 ± 2.66*
	33	2.1	4	1.90	
	34	3.5	6	1.71	
	35	5.3	20	3.77	
	36	2.0	4	2.00	

a: No mutant colonies were detected on the plate, with this data being excluded from the calculation of mutant frequency. * $p < 0.05$ vs. control.

Table 4. Mutation spectra of *gpt* mutant in the kidney of *gpt* delta rat treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

	Control		27 mg/L		80 mg/L		240 mg/L	
	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)
Base substitution								
Transversion								
G:C-T:A	6 (54.5)	0.29 ± 0.31	2 (11.8)	0.13 ± 0.47	7 (29.2)	0.54 ± 0.79	7 (16.7)	0.32 ± 0.44
G:C-C:G	1 (9.1)	0.05 ± 0.10	0 (0)	0	0 (0)	0	3 (7.1)	0.11 ± 0.25
A:T-T:A	0 (0)	0	0 (0)	0	1 (4.2)	0.07 ± 0.17	0 (0)	0
A:T-C:G	0 (0)	0	1 (5.9)	0.13 ± 0.26	0 (0)	0	0 (0)	0
Transition								
G:C-A:T	3 (27.3)	0.18 ± 0.25	8 (47.1)	0.61 ± 0.42	12 (50.0)	0.79 ± 0.24 *	23 (54.8)	2.40 ± 2.62 *
A:T-G:C	1 (9.1)	0.04 ± 0.08	1 (5.9)	0.05 ± 0.11	1 (4.2)	0.07 ± 0.16	7 (16.7)	0.57 ± 0.44
Deletion								
Single bp	0 (0)	0	3 (17.6)	0.25 ± 0.19	1 (4.2)	0.10 ± 0.21	1 (2.4)	0.04 ± 0.08
Over 2 bp	0 (0)	0	1 (5.9)	0.13 ± 0.26	1 (4.2)	0.04 ± 0.10	1 (2.4)	0.04 ± 0.08
Insertion	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
Complex	0 (0)	0	1 (5.9)	0.11 ± 0.23	1 (4.2)	0.10 ± 0.21	0 (0)	0
Total	11	0.55 ± 0.18	17	1.42 ± 0.70	24	1.72 ± 1.21 *	42	3.48 ± 2.66 *

Table 5. Number and area of GST-P positive foci in the liver of *gpt* delta rats treated with 1, 3-DCP.

		Control		27 mg/L	80 mg/L		240 mg/L
No. of foci	(No./cm ²)	0.13	± 0.29	0	0.16	± 0.39	0
Area of foci	(μm ² /cm ²)	890.8	± 2190.3	0	551.3	± 1225.5	0

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）

レポーター遺伝子導入動物を用いたクロロプロパノール類の発がん機序の解明

分担研究報告書

*gpt delta*ラットを用いた中期発がん評価系による1,3-dichloro-2-propanolの
遺伝毒性および発がんプロモーション作用の検索

研究分担者： 松下 幸平（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官）

研究要旨

1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)は主に酸加水分解植物性たん白を原材料とした外国産しょうゆ等の調味料やチーズ、穀物加工品など種々の食品に含まれる汚染物質である。1,3-DCP はラット発がん性試験において肝臓および腎臓等に明確な発がん性を示すものの、遺伝毒性を含む発がん機序に関する情報は限定的である。我々はこれまで、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いて、中期遺伝毒性・発がん性試験法を開発した。この中期試験法では、被験物質投与後に部分肝切除あるいは片側腎摘出を行い、切除した肝あるいは腎組織を用いて *gpt assay* を行う。術後に diethylnitrosamine (DEN) によるイニシエーション処置を行い、残存肝あるいは腎組織において前腫瘍性病変の形成を病理組織学的に解析する。これにより、被験物質の肝臓あるいは腎臓における変異原性および発がんプロモーション作用を同時に検出することが可能となる。本研究では、これらの中期遺伝毒性・発がん性試験法を用いて 1,3-DCP の肝臓および腎臓における発がん機序を明らかにすることを目的とした。

昨年度に肝臓における中期試験法を実施し、1,3-DCP 投与により切除肝組織において *gpt* 変異体頻度が上昇することを示した。本年度は残存肝組織を用いて glutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性細胞巢の定量的解析を行った。その結果、1,3-DCP 投与群における GST-P 陽性細胞巢の数および面積に対照群との差はみられなかった。

本年度ではさらに、腎臓における中期試験法を実施した。1,3-DCP 投与により切除腎臓組織における *gpt* 変異体頻度が上昇し、さらに残存腎臓組織における尿細管異型過形成の形成が促進されていた。また 1,3-DCP 投与群の残存腎臓組織では、糸球体障害を示唆する所見や尿細管上皮における Ki67 陽性細胞の増加が認められた。

以上より、1,3-DCP による肝および腎発がん機序には遺伝毒性が関与していることが示唆された。また、1,3-DCP の肝臓における発がんプロモーション作用は限定的であることに対し、腎臓では糸球体障害に続発する尿細管の細胞増殖活性の亢進により発がんプロモーション作用を示すことが示唆された。

A. 研究目的

1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)はクロロプロパノール類に属する食品汚染物質であり、酸加水分解植物性たん白を原材料とした国外産しょうゆ等の調味料の原材料、チーズ、穀物加工品など種々の食品に含まれることが知られている。1,3-DCP

はラット発がん性試験において肝臓および腎臓など複数の臓器において明らかな腫瘍の発生増加を示すものの、その発がん機序に関する情報は限定的である。遺伝毒性については、Ames 試験および染色体異常試験などの *in vitro* 遺伝毒性試験において明確な陽性を示すものの、ラット肝 UDS 試験およびラット骨髄小核試験においては陰性を示し、*in vitro* 試験と *in vivo* 試験に

において矛盾した結果が得られている。この様な背景から、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)および食品安全委員会では、1,3-DCP の発がん機序における遺伝毒性の関与は否定できないとし、一日摂取許容量を設定せず暴露マージンに基づいた評価手法を採用している。よって、1,3-DCP の発がん機序、特に遺伝毒性の関与の有無を詳細に検討することにより、1,3-DCP の安全性評価の基礎となる科学的根拠をより強固にすることができると考えられる。

gpt delta ラットはレポーター遺伝子が全身の体細胞および生殖細胞に導入された遺伝子改変動物であり、変異原性物質の暴露によってレポーター遺伝子上に生じた遺伝子突然変異を直接的に検出することができる。本動物では任意の臓器において、化学物質の生体内における動態あるいは代謝といった要素を考慮に入れた変異原性の検出が可能となる。さらに、本動物を用いた変異原性試験は一般毒性試験と同様の動物実験条件下で実施されるため、変異原性の検出に加えて、DNA 損傷や細胞増殖活性といった発がんに関連する種々のパラメータも同時に解析することが可能となる。よって、本動物は既知発がん物質の発がん機序を解明するためのツールとしても、非常に有用な動物モデルとなる。

我々はこれまで、*gpt delta* ラットを用いて肝臓あるいは腎臓において変異原性に加えて発がんプロモーション作用の検出が可能となる中期遺伝毒性・発がん性試験法を開発した。本研究では、この *gpt delta* ラットを用いた中期試験法により 1,3-DCP の発がん機序、特に発がん標的臓器における遺伝毒性作用の有無を検索することを目的とした。

昨年度までに *gpt delta* ラットを用いた肝臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法の動物実験を行い、*in vivo* 変異原性試験を実施した。本年度では引き続き、肝臓における発がんプロモーション作用を検索す

るとともに、腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法の動物実験を実施して、腎臓における変異原性および発がんプロモーション作用を検索した。

B. 研究方法

昨年度に実施した肝臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法の動物実験の概要を以下に示す。6週齢雄性 F344 系 *gpt delta* ラットを対照群、1,3-DCP 投与群および陽性対照群の 3 群 (n=15) に配した。1,3-DCP 投与群には初年度の用量設定実験の結果に基づき、1,3-DCP を最大耐量である 50 mg/kg 体重の用量で 1 日 1 回強制経口投与した。対照群には媒体である蒸留水、陽性対照群には遺伝毒性肝発がん物質であるエストラゴール (ES) を 150 mg/kg 体重の用量と同様に投与した。それぞれの物質を 4 週間投与した後に 2 週間の休薬期間を設け、休薬後に部分肝切除を行った。摘出した肝臓組織を採材して液体窒素にて瞬間凍結し、-80℃にて保存した。さらに部分肝切除の 16 時間後にイニシエーション処置として diethylnitrosamine (DEN) を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、その 1 週間後から被験物質の投与を再開した。休薬期間は被験物質と DEN の相互作用を回避するために設定した。試験開始 13 週間後に剖検を行い、残存肝組織を採材して一部を 10% 中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定し、残りの組織を液体窒素により瞬間凍結して -80℃に保存した。凍結保存した切除肝組織よりゲノム DNA を抽出して *gpt assay* を実施し、*gpt* 変異体を用いたシークエンス解析により、変異スペクトラムを解析した。また、ホルマリン固定した残存肝組織を用いて定法に従いパラフィン包埋・薄切し、HE 標本を作製した。さらに肝前がん病変マーカーである glutathione S-transferase placental form (GST-P) の免疫染色を実施し、画像解析ソフト (HALO) を用いて単位面積当たりの GST-P 陽性細胞

巢の数および面積を算出した。さらに Ki67 免疫染色を実施し、1000 個以上の肝細胞の核をカウントして Ki67 陽性細胞率を算出した。また凍結保存した残存肝組織を用いて定量 PCR (qPCR) 解析を実施し、細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現を検索した。

本年度ではさらに、腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法を以下の概要で実施した。6 週齢雄性 F344 系 *gpt delta* ラットを対照群、1,3-DCP 投与群および陽性対照群の 3 群 (n=15) に配した。1,3-DCP 投与群には 1,3-DCP を 50 mg/kg 体重の用量で 1 日 1 回投与し、対照群には蒸留水、陽性対照群には遺伝毒性腎発がん物質である aristolochic acid (AA) を 0.3 mg/kg 体重の用量で同様に投与した。それぞれの物質を 4 週間投与し、2 週間の休薬後に片側腎摘出を施して摘出した腎組織を液体窒素にて瞬間凍結し、-80°C にて保存した。さらに片側腎摘出の 48 時間後に DEN を 40 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、DEN 投与の 1 週間後から被験物質の投与を再開した。実験開始 19 週後に剖検を行い、残存腎組織を採材して一部を 10% 中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定し、残りの組織を液体窒素により瞬間凍結して -80°C にて保存した。凍結保存した摘出腎組織を用いて同様に *gpt assay* およびシーケンス解析を実施した。またホルマリン固定した残存腎組織から同様に HE 標本を作製し、前腫瘍性病変である尿細管異型過形成の数をカウントし、画像解析ソフト (HALO) で求めた腎臓の皮質および髄質外帯外層の面積で除して単位面積当たりの前腫瘍性病変の数を算出した。さらに PAS 染色および Ki67 免疫染色を実施して糸球体障害および尿細管の細胞増殖活性を検索した。Ki67 免疫染色では尿細管上皮の核を 1000 個以上カウントし、陽性細胞率を算出した。また凍結保存した残存腎組織を用いて同様に qPCR 解析を実施し、細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現を検索した。

(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

昨年度までに、切除肝組織を用いた *gpt assay* およびシーケンス解析を行い、1,3-DCP 投与群において *gpt* 変異体頻度が有意に上昇していること、さらに GC:AT および AT:GC transition が顕著に増加していることを示した (Table 1 および 2)。本年度ではさらに、残存肝組織における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施した。その結果、1,3-DCP 投与群では小葉中心帯の肝細胞が GST-P に陽性を示したものの、GST-P 陽性細胞巢の数および面積はともに対照群と同程度であった (Figure 1A および B)。陽性対照群である ES 投与群では、GST-P 陽性細胞の数および面積ともに対照群と比して有意に増加していた (Figure 1B)。Ki67 免疫染色では、1,3-DCP 投与群において Ki67 陽性肝細胞数の有意な増加が認められ、特に小葉中心帯の肝細胞において高率に陽性反応を認めた (Figure 1C および D)。qPCR 解析では、Cyclin A2 および Cyclin B1 の mRNA 発現が 1,3-DCP 投与群において対照群と比して有意に増加していた (Figure 1E)。

腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法では、摘出腎組織を用いた *gpt assay* において、1,3-DCP 投与により *gpt* 変異体頻度が対照群と比して有意に増加した (Table 3)。陽性対照群である AA 投与群においても、*gpt* 変異体頻度の有意な増加を認めた (Table 3)。シーケンス解析では、1,3-DCP 投与群では GC:AT および AT:GC transition, AA 投与群では AT:TA transversion および single bp deletion が対照群と比して有意に増加していた (Table 4)。残存腎組織では、尿細管異型過形成の数が 1,3-DCP

投与群および AA 投与群において対照群と比して有意に増加していた (Fig 2A および B). PAS 染色の結果, 1,3-DCP 投与群の糸球体および尿細管上皮に PAS 陽性顆粒が認められ, 尿細管腔内には硝子円柱が認められた (Figure 2C および D). Ki67 免疫染色では, 1,3-DCP 投与群の尿細管における Ki67 陽性細胞率が対照群と比して有意に増加していた (Figure 2E および F). qPCR 解析では, 1,3-DCP 投与群において Cyclin E1 および Cyclin A2 の mRNA 発現が有意に増加しており, Cyclin B1 の mRNA 発現が増加傾向を示した (Figure 2G).

D. 考察

肝臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法では, 残存肝組織において 1,3-DCP 投与による GST-P 陽性細胞巢の形成促進作用は認められなかった. 一方, 1,3-DCP 投与群では GST-P 陽性反応が小葉中心帯の肝細胞に認められ, 同細胞では Ki67 の陽性反応が高率にみられた. 過去の報告では, 非肝発がん物質である hydroxyanisole (BHA) をラットに投与した結果, 小葉辺縁帯の肝細胞において GST-P が誘導され, さらに同細胞の細胞増殖が亢進することが示されている (Makino et al., Toxicol. Pathol. 36(3), 420-427). GST-P は第二相酵素 glutathione S-transferase のサブタイプの一つであること, さらに BHA は第二相酵素を誘導して種々の肝発がん物質に対する抗腫瘍効果を示すことから, この報告における GST-P 発現および細胞増殖活性の亢進は発がんに関連するものではなく, 酵素誘導に関連するものと結論されている. よって, 本研究でみられた小葉中心帯の肝細胞における GST-P 発現も酵素誘導に関連するものであると推察された. また, 第二相酵素誘導に伴う細胞増殖活性の亢進は, 肝発がんプロモーション作用には寄与しないことが示唆された.

腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試

験法では, 1,3-DCP 投与群の摘出腎組織において *gpt* 変異体頻度の上昇が認められた. よって, 1,3-DCP の腎発がんには遺伝毒性機序が関与していることが示唆された. シーケンス解析では, 肝臓と同じく GC:AT および AT:GC transition といった特徴的な変異スペクトラムを示した. 陽性対照群である AA 投与群においても *gpt* 変異体の上昇が認められ, シーケンス解析では, AA に特徴的にみられる AT:TA transversion が顕著に増加していた. 残存腎組織においては, 1,3-DCP 投与群において前腫瘍性病変である尿細管異型過形成の形成が促進されていたことから, 1,3-DCP は腎臓において発がんプロモーション作用を有していることが示唆された. また PAS 染色標本より得られた所見から, 1,3-DCP 投与により糸球体が障害され, 高分子タンパクが原尿中に過剰に排出・蓄積されていることが示唆され, その結果として二次的に尿細管障害が生じていることが考えられた. 1,3-DCP 投与群の尿細管では Ki67 陽性細胞が増加していたことから, 糸球体障害に続発する尿細管障害に起因する代償性の細胞増殖活性の亢進が発がんプロモーション作用に寄与しているものと考えられた.

E. 結論

gpt delta ラットを用いた肝臓および腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験を実施した. その結果, 1,3-DCP は肝臓および腎臓において変異原性を示したことから, 1,3-DCP による肝および腎発がんには遺伝毒性機序が関与していることが示唆された. また, 肝臓における 1,3-DCP の発がんプロモーション作用は限定的であるものの, 腎臓においては糸球体を障害して二次的に尿細管の障害および細胞増殖活性の亢進を誘発し, 発がんプロモーション作用を発揮するものと考えられた.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

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

Table 1. 肝臓の中期遺伝毒性・発がん性試験法における切除肝組織を用いた *gpt* assay

Group	Animal No.	CmR colonies (x 10 ⁵)	6-TGR and CmR colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SDs
Control	101	4.3	0 ^a	-	0.36 ± 0.26
	102	5.0	2	0.40	
	103	5.0	1	0.20	
	104	4.5	3	0.67	
	105	5.9	1	0.17	
1, 3-DCP	201	3.4	26	7.65	6.44 ± 1.17**
	202	6.2	35	5.65	
	203	3.5	26	7.43	
	204	3.8	25	6.58	
	205	5.3	26	4.91	
Estragole	301	4.9	5	1.02	2.13 ± 0.81**
	302	5.3	12	2.26	
	303	7.4	12	1.62	
	304	5.3	15	2.83	
	305	5.5	16	2.91	

a: No mutant colonies were detected on the plate, with this data being excluded from the calculation of mutant frequency.

***p* < 0.01 versus control.

Table 2. 肝臓の中期遺伝毒性・発がん性試験法における変異スペクトラム解析

	Control		1, 3-DCP		Estragole	
	No. (%)	Mutation frequency (x10 ⁻⁵)	No. (%)	Mutation frequency (x10 ⁻⁵)	No. (%)	Mutation frequency (x10 ⁻⁵)
Transversion						
GC-TA	1 ^a (14.3)	0.06 ± 0.11 ^b	4 (2.9)	0.18 ± 0.16	10 (16.7)	0.37 ± 0.19*
GC-CG	0 (0)	0	1 (0.7)	0.06 ± 0.13	7 (11.7)	0.24 ± 0.08*
AT-TA	0 (0)	0	10 (7.2)	0.43 ± 0.33*	8 (13.3)	0.27 ± 0.21
AT-CG	0 (0)	0	3 (2.2)	0.12 ± 0.16	3 (5.0)	0.11 ± 0.17
Transition						
GC-AT	4 (57.1)	0.20 ± 0.02	84 (60.9)	3.92 ± 1.04**	11 (18.3)	0.40 ± 0.25
AT-GC	0 (0)	0	33 (23.9)	1.58 ± 0.84**	18 (30.0)	0.64 ± 0.20
Deletion						
Single bp	1 (14.3)	0.06 ± 0.11	0 (0)	0 ± 0	0 (0)	0 ± 0
Over 2 bp	0 (0)	0	1 (0.7)	0.06 ± 0.13	0 (0)	0 ± 0
Insertion	0 (0)	0	0 (0)	0 ± 0	1 (1.7)	0.04 ± 0.08
Complex	1 (14.3)	0.05 ± 0.10	2 (1.4)	0.10 ± 0.14	2 (3.3)	0.06 ± 0.09

a: Number of colonies with independent mutations. b: Mean ± SDs.

*, **: $p < 0.05, 0.01$ versus control.

Table 3. 腎臓の中期遺伝毒性・発がん性試験法における摘出腎組織を用いた *gpt* assay

Group	Animal No.	CmR colonies (x 10 ⁵)	6-TGR and CmR colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SDs
Control	11	3.7	0 ^a	-	0.53 ± 0.25
	12	1.7	1	0.59	
	13	4.7	2	0.43	
	14	3.8	2	0.53	
	15	3.4	2	0.59	
1,3-DCP	21	2.7	8	2.99	2.90 ± 1.18**
	22	2.3	11	4.83	
	23	3.0	6	2.02	
	24	4.0	11	2.78	
	25	3.7	7	1.89	
Aristolochic acid	31	2.8	16	5.77	3.37 ± 1.99**
	32	3.2	7	2.21	
	33	1.9	10	5.18	
	34	4.1	5	1.22	
	35	3.7	9	2.46	

a: No mutant colonies were detected on the plate, with this data being excluded from the calculation of mutant frequency.

***p* < 0.01 versus control.

Table 4. 腎臓の中期遺伝毒性・発がん性試験法における変異スペクトラム解析

	Control		1, 3-DCP		Estragole	
	No. (%)	Mutation frequency (x10 ⁻⁵)	No. (%)	Mutation frequency (x10 ⁻⁵)	No. (%)	Mutation frequency (x10 ⁻⁵)
Transversion						
GC-TA	2 ^a (28.6)	0.14 ± 0.16 ^b	6 (14.0)	0.35 ± 0.34	5 (10.6)	0.40 ± 0.38
GC-CG	0 (0)	0	0 (0)	0	4 (8.5)	0.35 ± 0.49
AT-TA	0 (0)	0	3 (7.0)	0.20 ± 0.33	22 (46.8)	1.49 ± 0.66**
AT-CG	0 (0)	0	1 (2.3)	0.09 ± 0.20	2 (4.3)	0.14 ± 0.32
Transition						
GC-AT	2 (28.6)	0.12 ± 0.14	25 (58.1)	1.76 ± 1.05**	5 (10.6)	0.34 ± 0.35
AT-GC	0 (0)	0	6 (14.0)	0.36 ± 0.25*	4 (8.5)	0.31 ± 0.32
Deletion						
Single bp	1 (14.3)	0.05 ± 0.11	0 (0)	0	5 (10.6)	0.34 ± 0.21*
Over 2 bp	1 (14.3)	0.07 ± 0.15	2 (4.7)	0.14 ± 0.20	0 (0)	0
Insertion	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
Complex	1 (14.3)	0.15 ± 0.30	0 (0)	0	0 (0)	0

a: Number of colonies with independent mutations. b: Mean ± SDs.

*, **: $p < 0.05, 0.01$ versus control.

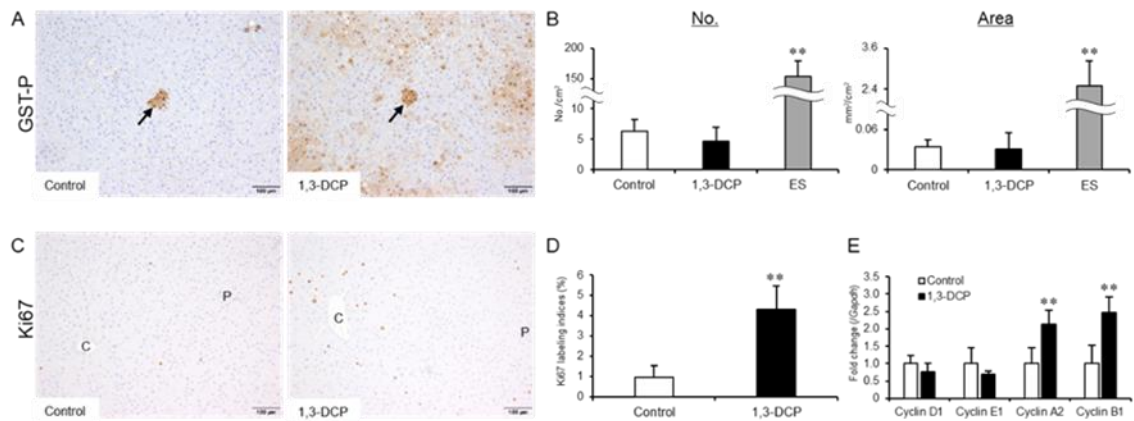


Figure 1. (A) GST-P 陽性細胞巢の典型像 (矢印). (B) 単位面積当たりの GST-P 陽性細胞巢の数および面積. (C) Ki67 免疫染色. (D) Ki67 陽性細胞率. (E) qPCR による細胞周期関連因子の mRNA 発現解析.

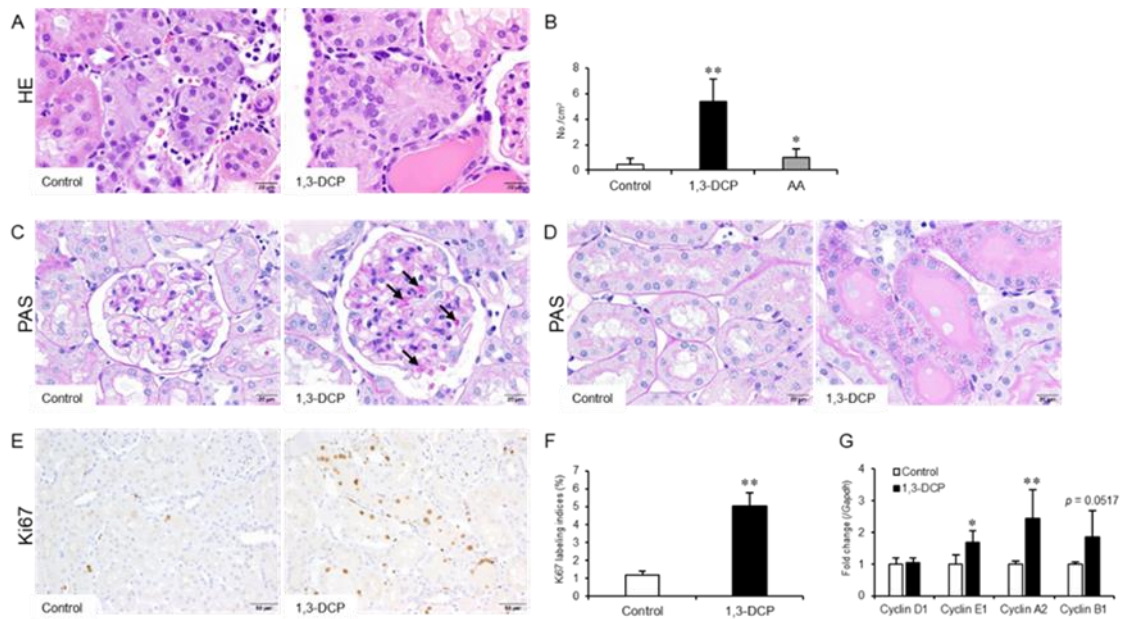


Figure 2. (A) 尿細管異型過形成の典型像. (B) 単位面積当たりの尿細管異型過形成の数. (C) 糸球体の PAS 染色像. (D) 尿細管の PAS 染色像. (E) Ki67 免疫染色. (F) Ki67 陽性細胞率. (G) qPCR による細胞周期関連因子の mRNA 発現解析.

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）

レポーター遺伝子導入動物を用いたクロロプロパノール類の発がん機序の解明

分担研究報告書

LC-MS/MSによる網羅的DNA損傷解析を用いた1,3-DCPの遺伝毒性機序の検索

研究分担者： 石井 雄二（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長）

研究要旨

本研究において明らかになった 1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP) の突然変異誘発性について、その機序の解明を目的として突然変異の原因となる DNA 損傷の検索を行った。遺伝毒性・発がん性包括試験における対照群及び 1,3-DCP 240 mg/L 投与群のラット肝臓について、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた網羅的 DNA 損傷解析を行った結果、DNA アダクトームマップにおいて 1,3-DCP に特異的な DNA 付加体由来するスポットは検出されなかった。in vitro において 1,3-DCP と deoxyguanosine の反応を検討した結果、1,3-DCP の代謝物と考えられている epichlorohydrin から生じる 7-(3-chloro-2-hydroxypropyl) guanine (CHP-N7-Gua) の生成が確認された。in vivo における同付加体の形成を確認するため、LC-MS/MS による分析法を構築し、DNA の前処理法を検討した。対照群及び 1,3-DCP 240 mg/L 投与群のラット肝臓から抽出した DNA を 95°C、15 分でインキュベーション後、脱離した CHP-N7-Gua を LC-MS/MS で測定した結果、同付加体のピークは検出されなかった。以上より、1,3-DCP の突然変異誘発機序において epichlorohydrin を介して生じる CHP-N7-Gua の関与は乏しいと考えられた。

A. 研究目的

1,3-Dichloro-2-propanol (1,3-DCP) は主に植物性たん白の酸加水分解で生じるクロロプロパノール類の一つで、大豆たんぱくを加水分解して製造する調味料や、チーズ、穀加工品などに含まれる。本剤はラットの肝臓、腎臓、甲状腺及び舌等に発がん性を示すことが報告されている。また、in vitro 遺伝毒性試験はいずれも陽性であることから、その発がん性には遺伝毒性機序の関与が疑われるものの、in vivo におけるラット骨髄小核試験及びラット肝 UDS 試験が陰性であることから、決定的な確証は得られていない。一方、令和元年及び2年において本研究で実施した *gpt delta* ラットを用いた中期発がん評価系による 1,3-DCP の遺伝毒性及び発がんプロモーション作用の検索において、1,3-DCP がラット肝臓で突然変異を誘発することが明らかとなり、肝

発がん過程における遺伝毒性機序の関与が明らかになった。そこで本研究では、1,3-DCP の遺伝毒性機序について検討した。

DNA 損傷は化学発がん課程における最も早期のイベントであり、原因となる DNA 損傷の解明は、発がん課程の理解だけでなく、バイオマーカーとしての応用も期待される^{文献 1)}。DNA 損傷の研究には放射性同位体を用いたポストラベル法が使用されていたが^{文献 2,3)}、近年では検出感度の向上に伴い質量分析計を用いた検出例が数多く報告されている^{文献 4,5)}。また、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた網羅的 DNA 損傷解析は、deoxynucleoside が MS/MS のフラグメンテーションにおいて容易に deoxyribose を脱離する特徴を利用し、deoxyribose に由来する m/z 116 の差を生じる分子を網羅的に検出することから、未知の DNA 損傷の検索に有用である^{文献 6,7)}。

本年度は *gpt delta* ラットを用いた包括的

毒性試験において 1,3-DCP を 13 週間投与したラット肝臓について、LC-MS/MS を用いた網羅的 DNA 損傷解析を行った。また、*in vitro* における 1,3-DCP と deoxyguanosine (dG) の反応で生じる DNA 付加体を検索し、生成が確認された 7-(3-chloro-2-hydroxypropyl) guanine (CHP-N7-Gua) について、分析法の構築とラット肝臓での検出を試みた。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

1,3-DCP, dG 及び deoxyribonucleic acid from calf thymus は sigma-aldrich (東京) から購入した。Epichlorohydrin は東京化生工業(東京)から購入した。LC-MS 用蒸留水, acetonitrile 及び formic acid は関東化学 (東京) から入手した。

B-2. 網羅的 DNA 損傷解析

令和元年度及び 2 年度に実施した *gpt delta* ラットを用いた 1,3-DCP の包括的毒性試験において採取した肝臓を解析に供した。対照群及び 240 mg/L 投与群の肝臓から、和光純薬社製 DNA エキストラクター WB キットを用いて抽出した DNA を 100 µg に調整し、Tris-HC (pH7.4) 及び DNase I を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) した。次に、Sodium acetate (pH4.2), ZnCl₂ 及び nuclease P1 を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) した。Tris-HCl buffer (pH9.0) を加えた後、alkaline phosphatase 及び phosphodiesterase I を加えインキュベーション (37°C, 16~18 hr) し、Vivacon 500R (10 kDa; Sartorius 社製) 及び Ultrafree (0.22 µm; Millipore 社製) でフィルトレーション後、LC-MS/MS による測定に供した。

LC-MS/MS は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima Pt mass spectrometry system (Waters 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% formic acid 添加) と溶液 B: acetonitrile (0.001% formic acid 添加) の混液を流速 0.2 ml/min で送液し、カラムを溶液 A/B=99/1 で安定させた。グラジエント条件は以下に記す。0-5 min: 溶液 A 99%, 5-10 min: 溶液 A 99% > 90%, 10-35 min: 溶液 A 90% > 10%, 35-45 min: 溶液 A 10%。MS/MS のイオン化にはエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のポジティブイオンモードを用いた。その他の条件は以下に記す。Capillary voltage: 3 kV, cone voltage: 15 V, Collision energy: 15 eV, Source temperature: 120°C, Desolvation temperature: 400°C, Cone gas flow: 60 L/hr, Desolvation gas flow: 600 L/hr。検索質量範囲は m/z 250 ~ 650 とした。

B-3. 1,3-DCP と dG の *in vitro* 反応

10 mg/mL に調製した dG 溶液を Tris HCl (pH7.4), Sodium acetate (pH4.2) または Tri HCl (pH9.0) で 5 mg/mL に希釈し、1 mL に 1,3-DCP を 20 µL 加えて 37°C, 60 時間インキュベーションした。反応後、Ultrafree (0.22 µm; Millipore 社製) でフィルトレーションし、LC-MS/MS による測定に供した。

液体クロマトグラフィー/ダイオードアレイ検出器/タンデム質量分析計 (LC-DAD-MS/MS) は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima Pt mass spectrometry system (Waters 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、移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.1% formic acid 添加) と溶液 B: acetonitrile (0.1% formic acid 添加) の混液を流速 0.2 ml/min で送液し、カラムを溶液 A/B=99/1 で安定させた。グラジエント条件は以下に記す。0-5 min: 溶液 A 99%, 5-10 min: 溶液 A 99% > 90%, 10-35 min: 溶液 A 90% > 10%, 35-45 min: 溶液 A 10%。DAD の検出波長は 254 nm 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及びネガティブイオンモードを用い、MS スキャン及び MS/MS スキャンを行

った。イオン化条件は以下に記す。Capillary voltage: 3 kV, cone voltage: 15 V, Collision energy: 5~30 eV, Source temperature: 120°C, Desolvation temperature: 400°C, Cone gas flow: 60 L/hr, Desolvation gas flow: 600 L/hr. 測定質量範囲は m/z 50~600 とした。

B-4. 7-(3-chloro-2-hydroxypropyl) guanine (CHP-N7-Gua) の合成と分析

10 mg/mL の deoxyguanosine 溶液に epichlorohydrin を 20 μ L 添加し, 37°C で 6 時間インキュベーションした。反応後, HPLC を用いて CHP-N7-Gua を分取し標準品を得た。

LC-MS/MS は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima Pt mass spectrometry system (Waters 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 μ m) を用いた。移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.1% formic acid 添加) と溶液 B: acetonitrile (0.1% formic acid 添加) の混液を流速 0.2 mL/min で送液し, カラムを溶液 A/B=98/2 で安定させた。グラジエント条件は以下に記す。0-10 min: 溶液 A 98% > 80%, 10-15 min: 溶液 A 80% > 10%, 15-17 min: 溶液 A 10% > 98%, 17-30 min: 溶液 A 98%。MS/MS のイオン化には ESI のポジティブイオンモードを用いた。その他の条件は以下に記す。Capillary voltage: 3 kV, cone voltage: 25 V, Collision energy: 12 eV, Source temperature: 120°C, Desolvation temperature: 400°C, Cone gas flow: 60 L/hr, Desolvation gas flow: 600 L/hr. マルチリアクションモニタリング (MRM) で m/z 244 > 152 を検出した。

CHP-N7-Gua の DNA からの脱離条件を検討するため, 100 μ g/ml の Calf thymus DNA に epichlorohydrin 20 μ L を添加し, 37°C, 6 時間インキュベーションした。得られた DNA を①37°C で 12, 24 及び 48 時間, ②70°C で 0.5, 1, 2, 4 及び 6 時間, ③95°C で 0.25, 0.5, 1 及び 2 時間インキュベーションし, Amicon Ultra (3K,

Millipore 社製) でフィルトレーション後, LC-MS/MS による測定に供した。測定結果から CHP-N7-Gua 量が最大となるインキュベーション温度及び時間を設定した。

令和元年度及び 2 年度に実施した *gpt* delta ラットを用いた 1,3-DCP の包括的毒性試験において採取した肝臓を DNA 中 CHP-N7-Gua の測定に供した。和光純薬社製 DNA エキストラクター-WB キットを使用して抽出した DNA を 1 mg/ml に調整し, 400 μ L を 95°C, 15 分インキュベーションした。反応後, フィルトレーションし, ろ液 300 μ L を遠心濃縮装置 SpeedVac (Thermo Fisher 社製) を用いて乾固し, 30 μ L の蒸留水に再溶解し, LC-MS/MS による測定に供した。

C. 研究結果

C-1. LC-MS/MS を用いた網羅的 DNA 損傷解析

対照群及び 240 mg/L 投与群の肝臓の網羅的 DNA 損傷解析の結果から作製した DNA アダクトームマップを Figure 1 に示す。対照群, 1,3-DCP 投与群ともに複数の DNA 塩基に由来するスポットが検出されたものの, 1,3-DCP 投与群に特異的なスポットは検出されなかった。

C-2. 1,3-DCP と dG の *in vitro* 反応

1,3-DCP と dG を *in vitro* において種々の条件下で反応させた後, 反応液を LC-DAD で測定した結果, pH7.4 及び pH9.2 の条件下において約 18.5 分に未知のピークを検出した (Fig. 2)。同ピークについて LC-MS/MS を用いてポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードで MS スキャン及び MS/MS スキャンを実施した。MS スペクトラムでは ESI+で m/z 244, ESI-で m/z 242 のイオンが認められたことから, その質量数は 243 と考えられた (Fig. 3)。また, MS/MS スペクトラムでは ESI+で m/z 152 のプロダクトイオンが, ESI-で m/z 150

のプロダクトイオンが検出された (Fig. 4). これらの結果から, unknown adduct は 1,3-DCP から Cl が脱離して guanine の N7 位に付加した CHP-N7-Gua と考えられた (Fig. 5).

C-3. CHP-N7-Gua の分析

Epichlorohydrin と dG の反応によって CHP-N7-Gua の標準品を合成し^{文献 8)}, 前項で示した未知ピークと一致することを確認した. 標準品を用いて LC 及び MS/MS 条件を検討し, 同付加体の分析法を構築した. さらに, CHP-N7-Gua の DNA からの脱離条件を検討するため, epichlorohydrin と DNA を反応させた後, 種々の条件下でインキュベーションを行った結果, 95°C, 15 分のインキュベーションによって脱離した CHP-N7-Gua のピーク面積が最大となった.

構築した LC-MS/MS による分析法を用いて, 対照群及び 1,3-DCP 投与群のラット肝臓 DNA の測定を行った結果, CHP-N7-Gua のピークは検出されなかった.

D. 考察

LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析は deoxyribose に由来する m/z 116 の差を生じる分子を網羅的に検出する方法である. 従って, 本法において 1,3-DCP による DNA 損傷が検出されなかったことは, 1,3-DCP による DNA 損傷が酵素処理過程において分解又は DNA から脱離することを示唆するものと考えられた.

1,3-DCP と dG の *in vitro* における反応を検討した結果, 中性又は塩基性条件下において epichlorohydrin から生じる DNA 付加体 CHP-N7-Gua の生成が確認された. 生体では 1,3-DCP の一部が代謝され epichlorohydrin を生じることが報告されている^{文献 9)}. 一方, *in vitro* 条件下においても CHP-N7-Gua が生成したことは, 1,3-DCP の分解によって epichlorohydrin が生じるこ

とを示唆していると考えられた. また, dG の N7 位のアルキル化は, Gua と deoxyribose の結合を減弱させることから, これらの付加体は容易に DNA から脱離する^{文献 10)}. それ故, 網羅的 DNA 損傷解析において CHP-N7-Gua を検出することは困難と考えられた.

一方, 構築した LC-MS/MS による CHP-N7-Gua の分析法を用いて 1,3-DCP を投与したラット肝臓から抽出した DNA を分析した結果, CHP-N7-Gua のピークは検出されなかった. このことから, 1,3-DCP の突然変異における CHP-N7-Gua の関与の可能性は乏しいと考えられた.

一般的に CHP-N7-Gua のように DNA から塩基が脱離すると DNA 鎖には AP-site が形成され, G:C-T:A transversion や欠失変異を生じることが知られている^{文献 11,12)}. 一方, 本年度の研究成果において, 1,3-DCP を投与した *gpt delta* ラットの肝臓及び腎臓では G:C-A:T transition が高頻度に認められた. これら変異スペクトラムの違いは 1,3-DCP の突然変異の原因が CHP-N7-Gua ではないことを支持するものと考えられた. 一方, 1,3-DCP の誘発する変異が G:C-A:T transition であったことは, dG に生じる付加体が突然変異の主な原因であることを示唆している. 1,3-DCP の突然変異機序の解明には, dG を中心とした損傷塩基のさらなる検索が必要と考えられた.

E. 結論

網羅的 DNA 損傷解析を用いた 1,3-DCP から生じる DNA 付加体検索において特異的 DNA 付加体の形成は認められなかった. *In vitro* では 1,3-DCP と dG の反応において CHP-N7-Gua が生成したものの, 1,3-DCP を投与したラット肝臓において同 DNA 付加体の生成は認められず, 1,3-DCP の突然変異への寄与は乏しいと考えられた.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

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

参考文献

- 1) Rundle A. Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. *Mutat. Res.* 600, 23-36 (2006).
- 2) Singh R, Gaskell M, Le Pla R C, Kaur B, Azim-Araghi A, Roach J, Koukouves G, Souliotis V L, Kyrtopoulos S A, and Farmer P B, Detection and quantification of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts in mouse liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with ³²P-postlabeling. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 868–878 (2006).
- 3) Pfau W, Brockstedt U, Söhren K D, and Marquardt H. ³²P-post-labelling analysis of DNA adducts formed by food-derived heterocyclic amines: Evidence for incomplete hydrolysis and a procedure for adduct pattern simplification. *Carcinogenesis* 15, 877–882 (1994).
- 4) 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.* 24, 532-541 (2011).
- 5) 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.* 24, 1112-1118 (2012).
- 6) Kanaly RA, 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).
- 7) Ishii Y, Takasu S, Kuroda K, Matsushita K, Kijima A, Nohmi T, Ogawa K, Umemura T, Suzuki Y, 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).
- 8) Singh US, Decker-Samuelian K, Solomon JJ, Reaction of epichlorohydrin with 2'-deoxynucleosides: characterization of adducts. *Chem. Biol. Interact.* 99, 109-128 (1996).
- 9) Waidyanatha S, Gaudette NF, Hong Y, Fennell TR, Formation of epichlorohydrin, a known rodent carcinogen, following oral administration of 1,3-dichloro-2-propanol in rats. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1787-1795 (2014).
- 10) Ishii Y, Matsushita K, Kuroda K, Yokoo Y, Kijima A, Takasu S, Kodama Y,

Nishikawa A, Umemura T, Acrylamide induces specific DNA adduct formation and gene mutations in a carcinogenic target site, the mouse lung. *Mutagenesis*, 30, 227-245 (2015).

- 11) Randall SK, Eritja R, Kaplan BE, Petruska, J and Goodman, MF, Nucleotide insertion kinetics opposite abasic lesions in DNA. *J. Biol. Chem.*, 262, 6864–6870 (1987).
- 12) Kokoska RJ, McCulloch SD and Kunkel TA, The efficiency and specificity of apurinic/apyrimidinic site bypass by human DNA polymerase η and *Sulfolobus solfataricus* Dpo4. *J. Biol. Chem.*, 278, 50537–50545 (2003).

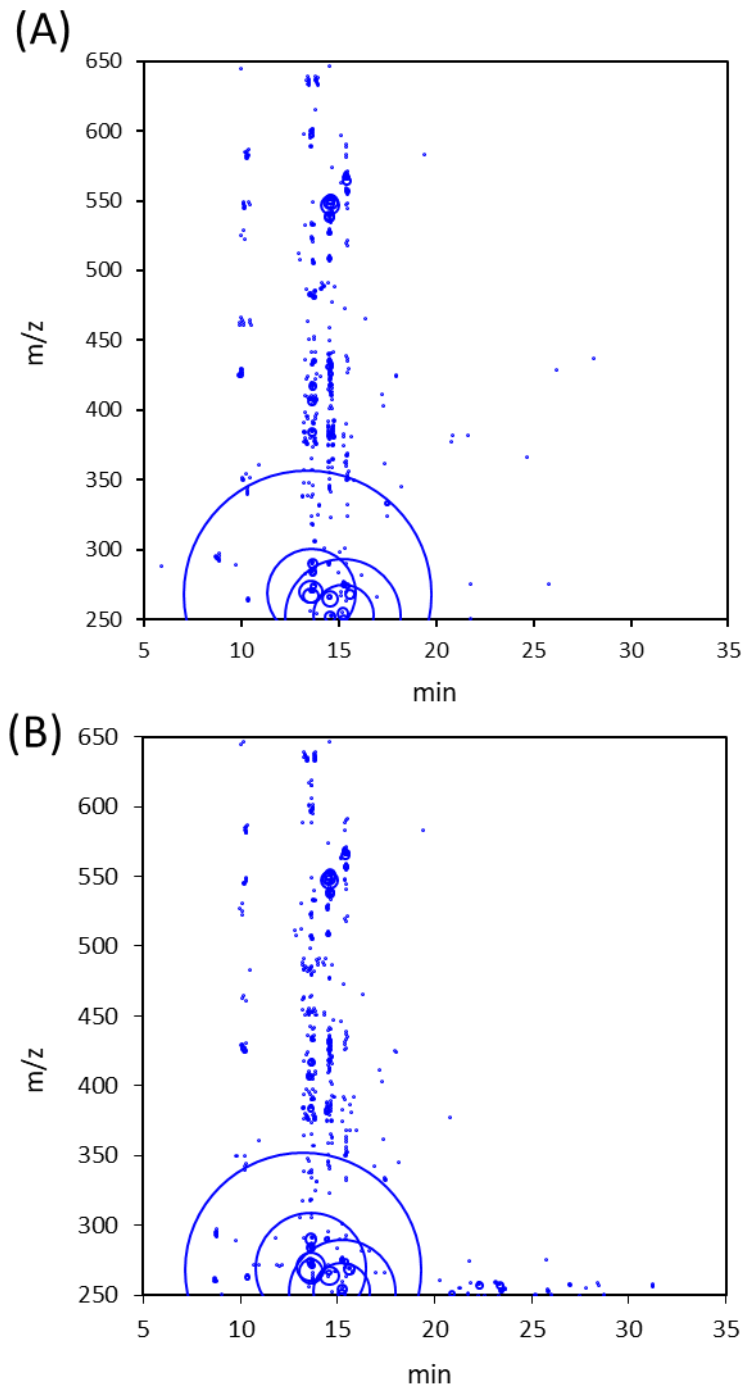


Fig.1 DNA adductome maps of liver of rat in control group (A) and 1,3-DCP group (B).

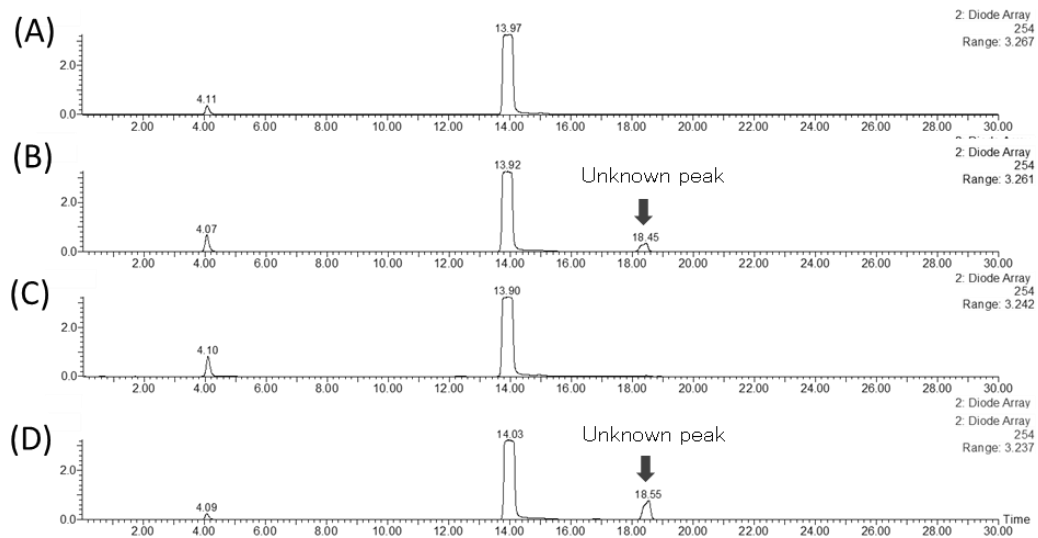


Fig.2 LC-DAD chromatograms (UV: 254 nm) of the reaction of dG with/without 1,3-DCP. (A) dG, (B)dG with 1,3DCP at pH7.4, (C) dG with 1,3-DCP at pH4.2 and (D) dG with 1,3-DCP at pH9.0.

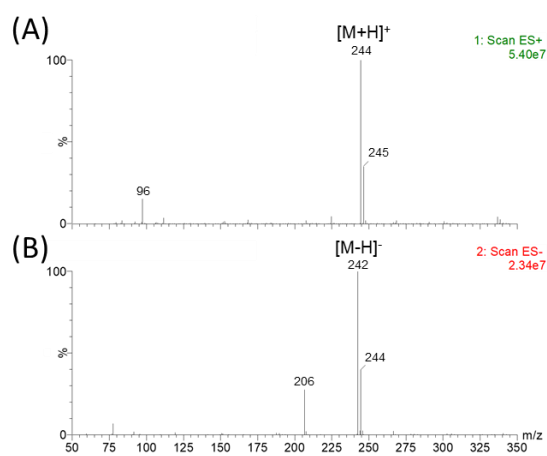


Fig.3 Mass spectra of unknown peak obtained from MS scan analysis using LC-MS for the reaction of 1,3-DCP with dG. Mass analysis was performed in (A) positive ion mode and (B) negative ion mode.

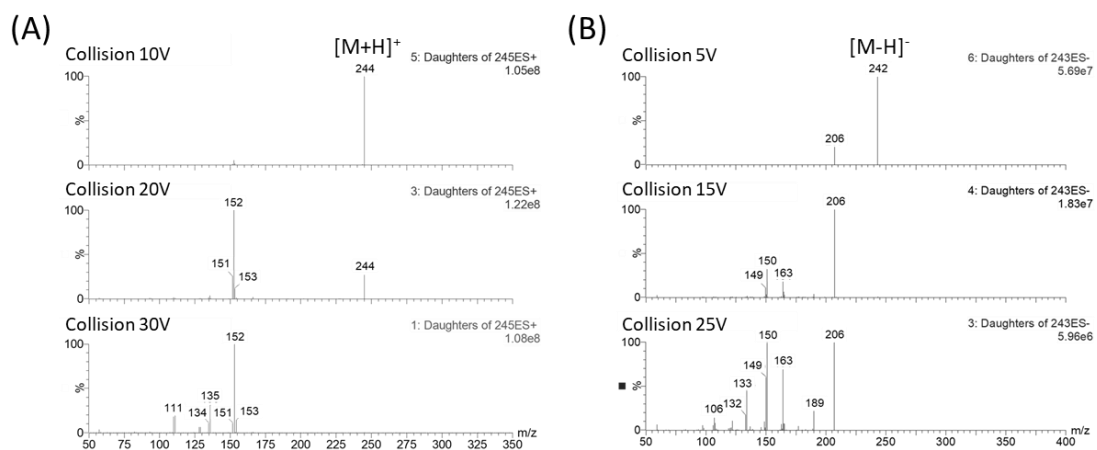


Fig.4 Mass spectra of unknown peak obtained from MS/MS scan analysis using LC-MS/MS for the reaction of 1,3-DCP with dG. Mass analysis was performed in (A) positive ion mode and (B) negative ion mode.

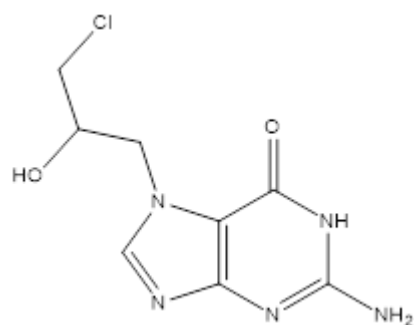


Fig.5 Chemical structure of CHP-N7-Gua

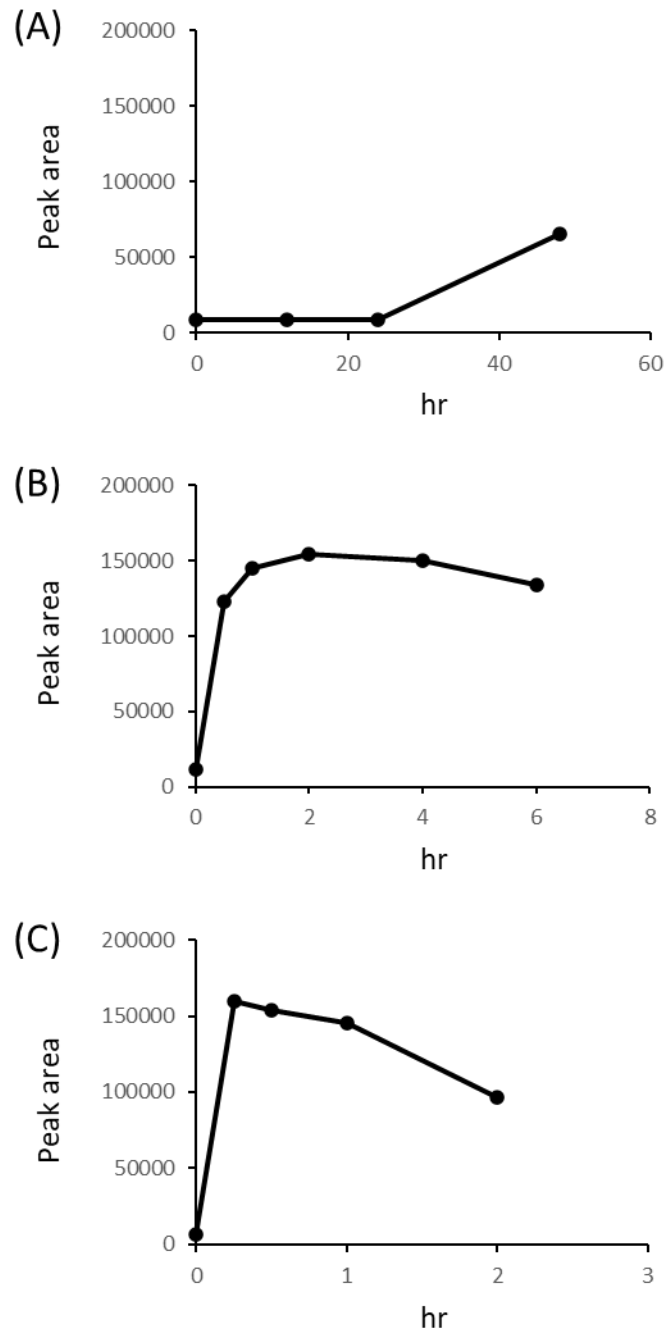


Fig.6 Time dependent changes in peak area of CHP-N7-Gua at (A) 37°C, (B) 70°C and (C) 95°C.

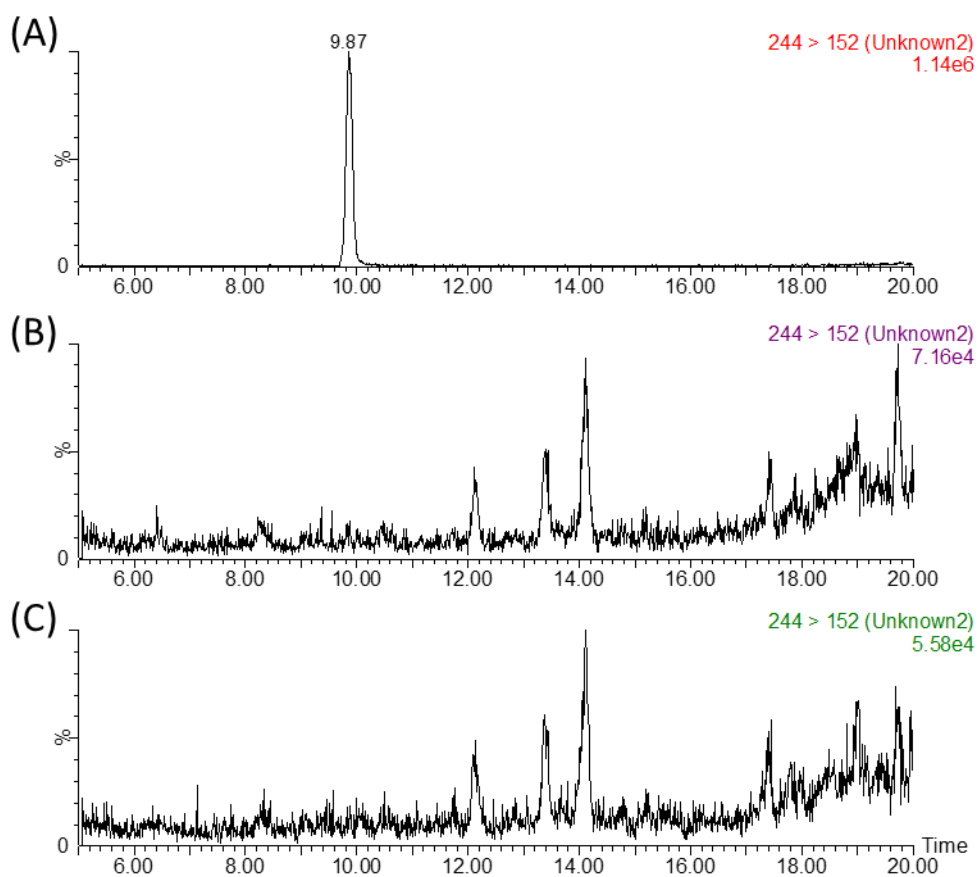


Fig.7 MRM chromatograms of CHP-N7-Gua in rat liver DNA sample. (A) CHP-N7-Gua standard, (B) liver from rat in control group and (C) liver from rat in 1,3-DCP 240 mg/L group.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

令和3年 月 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 レポーター遺伝子導入動物を用いたクロロプロパノール類の発がん機序の解明
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 高須 伸二 ・ タカス シンジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 レポーター遺伝子導入動物を用いたクロロプロパノール類の発がん機序の解明
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・主任研究官
 (氏名・フリガナ) 松下 幸平 ・ マツシタ コウヘイ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
 (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

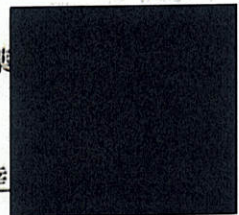
令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 レポーター遺伝子導入動物を用いたクロロプロパノール類の発がん機序の解明
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・室長
(氏名・フリガナ) 石井 雄二 ・ イシイ ユウジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。