

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

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).