

総合研究報告書

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 glutathione S-transferase placental form (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，これまでに開発したレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による検索を実施した。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 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。初年度は野生型 F344 ラットを用いた 28 日間反復経口投与実験を実施し，中期遺伝毒性・発がん性試験法の 1,3-DCP の投与用量を最大耐量である 50 mg/kg 体重に決定した。次年度から最終年度にかけては，F344 系 *gpt delta* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法を実施した。切除した肝および腎組織を用いた *gpt assay* では，1,3-DCP 投与群における *gpt* 変異体頻度が増加し，シークエンス解析では AT:GC および GC:TA transition が顕著に増加した。1,3-DCP 投与群の残存肝組織における GST-P 陽性細胞巢の数および面積は対照群と同程度であった。残存腎組織では 1,3-DCP 投与により尿細管異型過形成の数が増加した。また，

残存腎組織では糸球体および尿細管障害を示唆する所見がみられ、さらに尿細管における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。

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。

しかしながら、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、遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる検討として、レポーター遺伝子導入動物を用いて、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。

A-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

食品中の化学物質による健康影響で発

がん性は最も懸念すべきハザードの一つである。発がん性は主にげっ歯類を用いた長期間の試験で判断されるが、ヒトへの外挿性やリスク管理等の観点から、発がん機序、特に発がん過程に遺伝毒性が関与したかを明らかにすることは極めて重要である。一方、発がん性試験は多大な時間・動物数を必要とするため、迅速かつ効率的な評価の必要もある。このような背景のもと、我々はレポーター遺伝子導入動物を用いて遺伝毒性や発がん性を個体レベルで包括的に評価する試験法や一つの試験で迅速に検出する評価系を開発してきた。

本研究では、遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる検討として、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、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。

A-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

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ける中期遺伝毒性・発がん性試験法を開発した (GPG および GNP モデル)。これらの試験法では被験物質の投与後に *gpt assay* のための組織採材を目的とした部分肝切除もしくは片側腎摘出を施した後、発がんイニシエーション処置として diethylnitrosamine (DEN) を単回腹腔内投与し、残存肝あるいは残存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。本試験法では肝臓あるいは腎臓において変異原性の検出に加えて発がんプロモーション作用も評価することができるため、肝臓および腎臓における発がん機序を詳細に解析することが可能となる。

本研究では、この *gpt delta* ラットを用いた中期試験法を用いて 1,3-DCP の発がん機序を明らかにすることを目的とした。初年度には野生型 F344 ラットを用いた 28 日反復経口投与実験を実施して、中期遺伝毒性・発がん性試験法の至適投与用量を決定するとともに、1,3-DCP の毒性プロファイルを検討した。次年度から最終年度にかけて肝臓および腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法を実施し、1,3-DCP の発がん標的臓器における変異原性および発がんプロモーション作用について検討した。

A-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

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、剖検日前日より一晩絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、血液学的検査および血清生化学的検査を実施した。剖検時に全身諸器官・組織を摘出し、脳、肺、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣に関しては重量の測定を行った。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。摘出した全身諸器官・組織については定法に従い病理組織学的検査を実施した。

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、Dunnnett 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

初年度に行った動物実験の概要を以下に示す。6週齢雄性 F344 ラットを 4 群 (n=5) に配し、1,3-DCP を 25, 50 および 100 mg/kg 体重の用量で 28 日間強制反復経口投与し、対照群には蒸留水を同様に投与した。実験期間中に死亡が確認された動物については発見後速やかに解剖し、明らかな一般状態の悪化を示した動物についてはイソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より放血安楽殺した。計画屠殺例については最終投与日の翌日にイソフルラン深麻酔下にて腹部大動脈から採血した後、腹部大動静脈より放血安楽殺し、血液サンプルは血液学的検査および血清生化学的検査に供した。全例について剖検時に全身諸臓器を採材して 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、さらに計画屠殺例の肝臓の一部を液体窒素で瞬間凍結して -80°C で保存した。ホルマリン固定サンプルを用いて定法に従いパラフィン包埋・薄切し、HE 染色標本作製して病理組織学的検査を行った。計画屠殺群の肝臓については細胞増殖マーカーである Ki67、アポトーシスマーカーである cleaved-caspase 3 (c-Casp3) およびラット肝前腫瘍性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た。また、同群の肝臓における細胞周期関連遺伝子および *gstp1* の mRNA 発現を定量 PCR 法

(qPCR) にて解析するとともに、GST-P のタンパク発現をウェスタンブロッティング法にて解析し、さらに酸化的 DNA 損傷を検索するため、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の定量解析を実施した。

次年度から最終年度にかけて実施した肝臓および腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法の概要を以下に示す。肝臓における中期試験法では、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°C にて保存した。さらに部分肝切除の 16 時間後に 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。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°C 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 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 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。

腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法では、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 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。また、遺伝子組み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、遺伝子組換え実験計画書を作成し、承認を得た後に使用した。

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 µL 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 µm) 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 µg/ml の Calf thymus DNA に epichlorohydrin 20 µL 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 µL 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 µL を遠心濃縮装置 SpeedVac (Thermo Fisher 社製) を用いて乾固し、30 µL 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

実験期間中、何れの群においても死亡動物は認められず、一般状態の変化も認められなかった。実験期間中の体重推移について、1,3-DCP 投与群と対照群間に有意な変化は見られなかった (Figure 1)。

投与終了後の器官重量を測定した結果、肝臓の絶対及び相対重量は用量依存的に増加し、何れの用量の投与群においても統計学的に有意な高値を示した。また、腎臓においても絶対及び相対重量の用量依存的な増加がみられ、80 mg/L 以上の投与群において有意に増加した。肝臓及び腎臓以外の器官重量に関して有意な変化は認められなかった (Table 1)。

血液学的検査の結果、80 mg/L 以上の投与群におけるヘマトクリット値及び 240 mg/L 投与群における赤血球数、ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積、平均赤血球色素量は対照群に比して統計学的に有意に低下した。また、240 mg/L 投与群において、血小板数の有意な増加が認められた (Table 2)。血清生化学的検査の結果、27

mg/L 以上の投与群において、アルカリホスファターゼの有意な低値が認められた。また、240 mg/L 投与群の総タンパク、アルブミン、グルコース及びカルシウムは対照群に比して有意に上昇した (Table 3)。

病理組織学的検査の結果、240 mg/L 投与群の 4 例において小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。また、鼻腔において移行上皮の壊死が対照群 2 例 (ごく軽度 1 例、軽度 1 例)、27 mg/L 投与群 2 例 (ごく軽度 2 例)、80 mg/L 投与群 6 例 (ごく軽度 4 例、軽度 2 例)、240 mg/L 投与群 10 例 (ごく軽度 1 例、軽度 9 例) で、ごく軽度の呼吸上皮の配列不整が 80 mg/L 投与群 2 例、240 mg/L 投与群 10 例で、ごく軽度の粘膜上皮の過形成が 80 mg/L 投与群 1 例、240 mg/L 投与群 5 例で認められ、これら所見の 240 mg/L 投与群における発生頻度は対照群に比して統計学的に有意に高かった。

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 (Table 4)。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 5)。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 (Table 6)。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 7)。

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 (Table 8)。

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

28 日間反復経口投与毒性試験の結果を以下に示す。投与開始 2 日後 (2 回目投与

前)に 100 mg/kg 体重群の 4 例が死亡, 1 例が切迫屠殺となった. 25 および 50 mg/kg 体重群では実験期間を通して体重および摂餌量に对照群と比して差はみられなかった (Figure 2). 血液学的検査では 25 および 50 mg/kg 体重群において赤血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 平均赤血球容積, 平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度の有意な減少がみられ, 網状赤血球数の有意な増加が認められた (Table 9). 血清生化学的検査では 50 mg/kg 体重群においてアルブミン (ALB) およびアラニントランスアミナーゼ (ALT) の有意な上昇がみられ, 中性脂肪 (TG) の有意な低下が 25 および 50 mg/kg 体重群において認められた (Table 10). その他の 1,3-DCP 投与群にみられた有意な変化は, 用量依存性を欠くか毒性影響とは反対の変動であったため, 毒性学的意義は乏しいと考えられた. 臓器重量の検索では, 25 および 50 mg/kg 体重群において肝臓の絶対および相対重量の有意な上昇が認められた (Table 11). その他の 1,3-DCP 投与群にみられた有意な変化は, 用量依存性を欠くか関連する病理組織学的変化を伴わないため, 毒性学的意義は乏しいと考えられた.

病理組織学的検索では, 100 mg/kg 体重群の途中死亡および切迫屠殺例において, 肝臓における重度な小葉中心性肝細胞壊死, 心臓における心内膜および心外膜下出血, 鼻腔における重度な嗅上皮および呼吸上皮の壊死ならびに腎臓における尿細管の壊死および空胞化が認められた (Table 12 および Figure 3). 心臓の変化は死亡例にのみみられたことから, 死戦期に生じた変化であると考えられた. 計画屠殺例の病理組織学的検索の結果を Table 13 に示す. 肝臓における小葉中心性肝細胞の単細胞壊死, 鼻腔における呼吸上皮の配列不正および空胞化が 25 および 50 mg/kg 体重群で認められた (Figure 4A および B). 肝細胞の単細胞壊死は c-Caps 3 に陽性を示し, 50 mg/kg 体重群において c-Casp 3 陽性細胞の

有意な増加が認められた (Figure 4C および D). 8-OHdG 形成については, 对照群と 1,3-DCP 投与群との間に差は認められなかった (Figure 4E). GST-P 免疫染色の結果, 典型的な前腫瘍性病変である GST-P 陽性細胞巢の形成は全群において認められなかったが, 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 (Figure 4F). qPCR 解析およびウェスタンブロッティング法にて GST-P の遺伝子およびタンパク発現を確認した結果, とともに 25 および 50 mg/kg 体重群において増加傾向あるいは有意な増加が認められた (Figure 4G および H). また, 25 および 50 mg/kg 体重群では Ki67 陽性肝細胞が小葉中心帯において増加しており (Figure 4I および J), qPCR 解析では Cyclin A2 および Cyclin B1 の mRNA 発現が増加傾向あるいは有意な増加を示した (Figure 4K).

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 およびシーケンス解析の結果をそれぞれ Table 14 および 15 に示す. 1,3-DCP 投与群および ES 投与群において *gpt* 変異体頻度の有意な上昇を認めた. シーケンス解析では, 1,3-DCP 投与群においては GC:AT および AT:GC transition ならびに AT:TA transversion が, ES 投与群においては GC:TA および GC:CG transversion が有意に増加していた. 残存肝組織における GST-P の免疫染色では, 1,3-DCP 投与群における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 5A 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 5B). 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 5C and 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 5E).

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 およびシーケンス解析の結果を Table 16 および 17 に示す. 1,3-DCP 投与群および AA 投与群において *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 が, 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 (Figure 6A 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 6C and 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 6E 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 6G).

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を Figure 7 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-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 (Fig. 8). 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. 9). 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. 10). 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. 11).

C-3-3. 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 週間反復投与した。その結果、肝臓及び腎臓の器官重量は 1,3-DCP 投与群において有意に増加し、用量依存的な変化が認められたことから、投与に起因する変化である可能性が考えられた。肝臓の病理組織学的検索の結果、240 mg/L 投与群において、小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。昨年度の肝臓重量の解析において、1,3-DCP 投与群における肝重量は用量依存的に増加しており、1,3-DCP はラット肝臓において肝肥大を惹起することが明らかとなった。さらに、病理組織学的検査の結果、鼻腔において毒性影響が認められたことから、本実験条件下では 1,3-DCP は肝臓、腎臓および鼻腔を標的とすることが明らかとなった。

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、これまでに長期間の 1,3-DCP 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。しかし

ながら、本試験条件下では肝臓において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おいて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

28 日間反復経口投与毒性試験における 100 mg/kg 体重群の死因は急性肝障害であると考えられた。その他、100 mg/kg 体重群においては、鼻腔および腎臓が 1,3-DCP の毒性標的臓器あることが明らかとなった。25 および 50 mg/kg 体重群では、血液学的検査の結果から、発生機序は不明であるものの貧血が生じているものと考えられた。血清生化学的検査で 1,3-DCP 投与群にみられた ALB, ALT および TG の変動は肝障害に関連するものと考えられた。

病理組織学的検査では肝臓および鼻腔に 1,3-DCP 投与の影響がみられた。肝臓では肝細胞のアポトーシスがみられ、この発現機序には酸化ストレス以外の因子が関与していると考えられた。また、肝臓において前腫瘍性病変は認められなかったが、小葉中心帯の肝細胞が GST-P に陽性を示し、Ki67 陽性細胞も主に小葉中心帯に位置していたことから、GST-P 発現と細胞増殖活性の亢進との関連が示唆された。

肝臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法では、切除肝組織を用いた *gpt assay* の結果、1,3-DCP 投与群において明らかな *gpt* 変異体頻度の上昇が認められたことから、1,3-DCP の肝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。 *gpt* 変異体

を用いたシーケンス解析においては、GC:AT および AT:GC transition の顕著な増加という特徴的な変異スペクトラムを示した。ES 投与群においては、対照群と比して *gpt* 変異体頻度が上昇し、変異スペクトラム解析において GC:TA および GC:CG transversion の増加を示した。これらの結果は、過去の *gpt* delta ラットを用いた実験の結果と一致していた。残存肝組織における前腫瘍性病変の解析では、ES 群においては GST-P 陽性細胞巢の顕著な増加を認めたものの、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、28 日間反復経口投与毒性試験と同様に、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 の腎発がん機序には遺伝毒性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・蓄積し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ことから, 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. さらに, *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.

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.

以上の研究成果より, 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. これらの結果は 1,3-DCP の安全性評価における重要な知見になると考えられる.

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

1) 松下幸平, 豊田武士, 森川朋美, 山田 貴 宣 , 小 川 久 美 子 .

1,3-Dichloro-2-propanol の F344 ラットを用いた 28 日間反復強制経口投与による毒性プロファイルの検索. 第 35 回日本毒性病理学会学術集会, 2019/02/01.

2) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Yamada T, Ogawa K : The toxicological profiles of 1,3-dichloro-2-propanol determined by a repeated-dose 28-day oral toxicity study in F344 rats. 15th IUTOX International Congress of Toxicology. 2019. 7. 17.

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 foodderived 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 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).

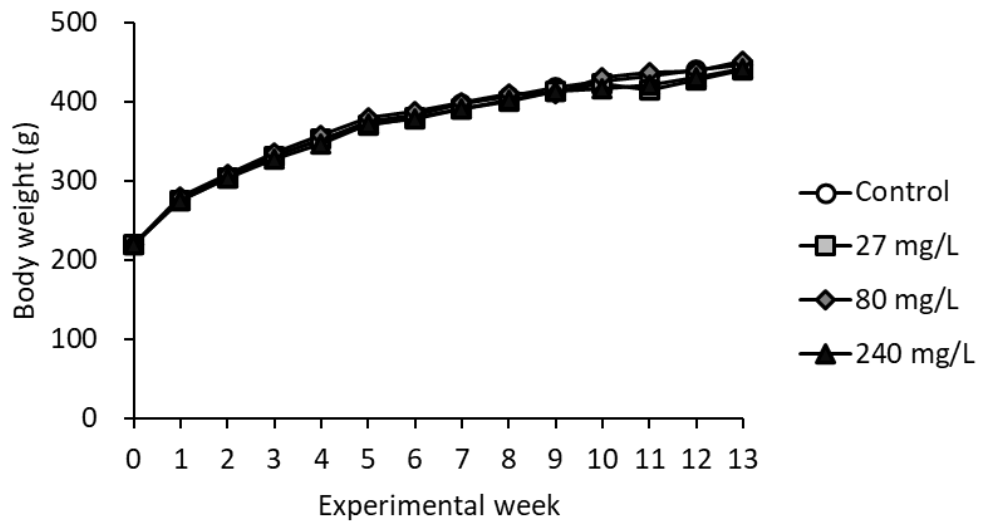


Figure 1. Body weights of male *gpt* delta rats treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

Table 1. Final body weight and organ weight data for male *gpt* delta treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

	Control	27 mg/L	80 mg/L	240 mg/L
Final body weights (g)	437 ± 33	429 ± 30	437 ± 58	431 ± 30
Organ weights				
Absolute weights (g)				
Brain	2.05 ± 0.05	2.05 ± 0.03	2.06 ± 0.05	2.08 ± 0.07
Lungs	1.28 ± 0.10	1.24 ± 0.12	1.28 ± 0.07	1.33 ± 0.14
Heart	1.09 ± 0.10	1.09 ± 0.07	1.08 ± 0.07	1.12 ± 0.10
Thymus	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.26 ± 0.05
Liver	9.27 ± 0.81	10.39 ± 0.80*	11.82 ± 1.47**	14.20 ± 1.22**
Kidneys	2.28 ± 0.15	2.38 ± 0.15	2.52 ± 0.17*	2.75 ± 0.22**
Spleen	0.67 ± 0.08	0.65 ± 0.06	0.73 ± 0.06	0.70 ± 0.09
Adrenals	0.053 ± 0.008	0.051 ± 0.008	0.052 ± 0.005	0.052 ± 0.006
Testes	3.88 ± 0.19	3.90 ± 0.12	3.88 ± 0.48	3.80 ± 0.62
Relative weights (g/100g b.w.)				
Brain	0.47 ± 0.03	0.48 ± 0.03	0.48 ± 0.06	0.48 ± 0.03
Lungs	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.31 ± 0.03
Heart	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.01
Thymus	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Liver	2.12 ± 0.09	2.42 ± 0.09*	2.71 ± 0.12**	3.30 ± 0.18**
Kidneys	0.52 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.58 ± 0.05**	0.64 ± 0.03**
Spleen	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.01
Adrenals	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.002
Testes	0.89 ± 0.05	0.91 ± 0.05	0.90 ± 0.11	0.89 ± 0.16

*, **: Values are significantly different from control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

Table 2. Blood test data for male *gpt* delta treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

		Control	27 mg/L	80 mg/L	240 mg/L
RBC	(10 ⁶ /μL)	9.05 ± 0.33	8.98 ± 0.23	8.89 ± 0.27	8.73 ± 0.22*
HGB	(g/dL)	15.8 ± 0.5	15.5 ± 0.3	15.2 ± 0.4*	14.6 ± 0.4**
HCT	(%)	46.6 ± 1.9	45.7 ± 1.1	45.1 ± 1.7	43.0 ± 1.5**
MCV	(fL)	51.5 ± 1.5	50.9 ± 1.1	50.7 ± 1.5	49.2 ± 1.0**
MCH	(pg)	17.4 ± 0.4	17.2 ± 0.4	17.1 ± 0.4	16.7 ± 0.2**
MCHC	(g/dL)	33.9 ± 0.4	33.8 ± 0.4	33.7 ± 0.4	33.9 ± 0.4
PLT	(10 ³ /μL)	801.3 ± 65.7	838.8 ± 52.6	826.0 ± 83.3	943.9 ± 74.3**
WBC	(10 ³ /μL)	5.25 ± 0.93	6.13 ± 1.66	5.97 ± 1.61	5.29 ± 1.33
<i>Differential cell counts</i>					
Neutrophils	(%)	17.2 ± 9.3	16.7 ± 3.6	15.9 ± 3.7	12.6 ± 7.8
Eosinophils	(%)	1.9 ± 0.7	1.6 ± 0.5	1.6 ± 0.6	1.3 ± 0.4
Basophils	(%)	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.2
Lymphocytes	(%)	75.9 ± 9.8	77.5 ± 3.5	78.3 ± 4.4	81.9 ± 8.1
Monocytes	(%)	4.8 ± 0.6	4.0 ± 0.9	4.0 ± 0.7	4.1 ± 1.1

*, **: Values are significantly different from control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

Table 3. Serum biochemistry for male *gpt* delta treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

		Control	27 mg/L	80 mg/L	240 mg/L
TP	(g/dL)	6.0 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6.2 ± 0.1	6.6 ± 0.3**
A/B		2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.2
Alb	(g/dL)	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.5 ± 0.2**
T-Bil	(mg/dL)	0.068 ± 0.015	0.057 ± 0.013	0.056 ± 0.010	0.059 ± 0.013
Glu	(mg/dL)	135 ± 22	143 ± 18	150 ± 23	161 ± 25*
TG	(mg/dL)	54 ± 21	67 ± 30	81 ± 45	80 ± 50
T-cho	(mg/dL)	64 ± 13	67 ± 7	64 ± 9	86 ± 18
PL	(mg/dL)	107 ± 13	112 ± 8	111 ± 12	141 ± 25
BUN	(mg/dL)	16.3 ± 2.2	16.4 ± 1.3	15.7 ± 2.2	14.7 ± 2.1
CRN	(mg/dL)	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.02
Ca	(mg/dL)	10.0 ± 0.2	10.0 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.3 ± 0.3**
P	(mg/dL)	5.8 ± 0.5	5.5 ± 0.4	5.8 ± 0.5	6.0 ± 0.7
Na	(mEq/dL)	144.0 ± 1.3	143.7 ± 1.1	142.8 ± 1.0	143.4 ± 1.1
K	(mEq/dL)	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.2
Cl	(mEq/dL)	103.3 ± 1.3	103.4 ± 1.6	102.6 ± 0.8	102.4 ± 1.3
AST	(IU/L)	87 ± 15	67 ± 6	70 ± 8	65 ± 8
ALT	(IU/L)	38 ± 6	35 ± 7	28 ± 4	29 ± 3
ALP	(IU/L)	248 ± 58	221 ± 32**	194 ± 48**	171 ± 27**
γ-GTP	(IU/L)	<3	<3	<3	<3

*, **: Values are significantly different from control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

TP, total protein; A/G, albumin/globulin ratio; Alb, albumin; T. Bil, total bilirubin; Glu, glucose; TG, triglyceride; T. Cho, total cholesterol; PL, phospho lipid; BUN, blood urea nitrogen; CRN, creatinine; Ca, calcium; P, inorganic phosphorus; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GT, γ-glutamyl aminotransferase.

Table 4. *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 5. 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									
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 6. *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 7. 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 8. 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

Table 9. Hematological Data in Preliminary 4-Week Repeated Dose Oral Toxicity Study

	0 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
No. of animals examined	5	5	5
RBC (x10 ⁶ /ul)	8.7 ± 0.1	8.2 ± 0.2**	8.5 ± 0.1*
HGB (g/dl)	15.4 ± 0.1	14.2 ± 0.2**	14.5 ± 0.2**
HCT (%)	45.9 ± 0.4	43.3 ± 0.7**	44.4 ± 0.7**
MCV (fl)	52.6 ± 0.2	52.6 ± 0.8	52.2 ± 0.2
MHC (pg)	17.6 ± 0.2	17.2 ± 0.1**	17.1 ± 0.1*
MCHC (g/dl)	33.5 ± 0.2	32.9 ± 0.4*	32.7 ± 0.3*
RET (%)	3.20 ± 0.23	3.77 ± 0.36*	3.79 ± 0.32*
PLT (x10 ³ /ul)	795.8 ± 43.8	777.4 ± 46.0	784.6 ± 36.9
WBC (x10 ² /ul)	37.2 ± 7.6	31.1 ± 2.9	37.0 ± 6.6
Differential leukocyte counts			
Neutrophils (x10 ² /ul)	7.5 ± 1.8	5.2 ± 0.5	6.2 ± 0.9
Lymphocytes (x10 ² /ul)	28.5 ± 6.6	24.9 ± 2.7	29.6 ± 5.4
Monocytes (x10 ² /ul)	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2
Eosinophils (x10 ² /ul)	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2
Basophils (x10 ² /ul)	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1

Values are mean ± SDs. *, **: $p < 0.05, 0.01$ versus 0 mg/kg, respectively.

Table 10. Serum Biochemical Data in Preliminary 4-Week Repeated Dose Oral Toxicity Study

	0 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
No. of animals examined	5	5	5
TP (g/dL)	6.0 ± 0.1	6.2 ± 0.2	6.3 ± 0.3
ALB (g/dL)	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1*
A/G	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.2
BUN (mg/dL)	19.5 ± 1.5	17.3 ± 0.6*	17.8 ± 1.5
CRE (mg/dL)	0.25 ± 0.02	0.22 ± 0.02*	0.21 ± 0.01*
Na (mEq/L)	144.0 ± 0.0	144.2 ± 1.1	144.0 ± 0.7
K (mEq/L)	4.66 ± 0.18	4.48 ± 0.16	4.56 ± 0.18
Cl (mEq/L)	101.2 ± 1.8	100.2 ± 1.1	101.0 ± 1.7
Ca (mg/dL)	10.0 ± 0.2	10.4 ± 0.2*	10.3 ± 0.2
IP (mg/dL)	6.7 ± 0.3	7.2 ± 0.2	6.8 ± 0.4
AST (IU/L)	101.0 ± 9.1	84.0 ± 12.1	97.0 ± 16.8
ALT (IU/L)	42.4 ± 1.82	38.8 ± 5.07	50.6 ± 5.46*
ALP (IU/L)	785.2 ± 48.3	645.4 ± 42.2**	650.6 ± 31.2*
γ-GTP (IU/L)	3 >	3 >	3 >
T-CHO (mg/dL)	58.8 ± 1.5	61.4 ± 3.4	56.6 ± 5.3
TG (mg/dL)	54.8 ± 5.9	36.0 ± 10.4*	33.8 ± 15.1*
T-BIL (mg/dL)	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.03 ± 0.01
GLU (mg/dL)	111.8 ± 10.0	129.2 ± 20.4	116.8 ± 30.6

Values are mean ± SDs. *, **: $p < 0.05, 0.01$ versus 0 mg/kg, respectively.

Table 11. Organ Weights in Preliminary 4-Week Repeated Dose Oral Toxicity Study

	0 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
No. of animals examined	5	5	5
Final body weight (g)	205.5 ± 4.2	205.5 ± 7.0	196.4 ± 7.1
<i>Absolute</i>			
Brain (g)	1.81 ± 0.03	1.78 ± 0.05	1.77 ± 0.05
Thymus (g)	0.29 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.01
Heart (g)	0.67 ± 0.01	0.66 ± 0.05	0.64 ± 0.04
Spleen (g)	0.47 ± 0.01	0.52 ± 0.02**	0.48 ± 0.03
Liver (g)	5.70 ± 0.12	7.26 ± 0.29**	7.50 ± 0.20**
Adrenals (mg)	33.5 ± 3.75	34.0 ± 0.59	34.3 ± 2.59
Kidneys (g)	1.46 ± 0.08	1.61 ± 0.05	1.57 ± 0.12
Testes (g)	2.53 ± 0.07	2.56 ± 0.12	2.49 ± 0.09
Lungs (g)	0.77 ± 0.03	0.81 ± 0.09	0.78 ± 0.05
Pituitary (mg)	7.56 ± 0.74	8.24 ± 0.50	7.90 ± 0.62
Thyroid (mg)	14.2 ± 1.84	14.2 ± 0.83	13.8 ± 0.97
Salivary gland (g)	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.04
Seminal vesicle (g)	0.54 ± 0.17	0.52 ± 0.05	0.48 ± 0.10
Prostate (g)	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.06	0.36 ± 0.07
<i>Relative</i>			
Brain (g/100g BW)	0.89 ± 0.01	0.87 ± 0.03	0.90 ± 0.02
Thymus (g/100g BW)	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
Heart (g/100g BW)	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.02
Spleen (g/100g BW)	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.02*	0.24 ± 0.01
Liver (g/100g BW)	2.78 ± 0.07	3.53 ± 0.10**	3.82 ± 0.07**
Adrenals (mg/100g BW)	16.3 ± 1.53	16.6 ± 0.68	17.5 ± 1.39
Kidneys (g/100g BW)	0.71 ± 0.03	0.78 ± 0.03**	0.80 ± 0.05**
Testes (g/100g BW)	1.23 ± 0.02	1.25 ± 0.06	1.27 ± 0.02
Lungs (g/100g BW)	0.38 ± 0.01	0.40 ± 0.04	0.40 ± 0.02
Pituitary (mg/100g BW)	3.68 ± 0.31	4.02 ± 0.33	4.02 ± 0.32
Thyroid (mg/100g BW)	6.92 ± 0.82	6.92 ± 0.43	7.02 ± 0.60
Salivary gland (g/100g BW)	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.02
Seminal vesicle (g/100g BW)	0.26 ± 0.08	0.25 ± 0.22	0.24 ± 0.05
Prostate (g/100g BW)	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.03

Values are mean ± SDs. *, **: $p < 0.05, 0.01$ versus 0 mg/kg, respectively.

Table 12. Histopathology for Died/Moribund Sacrificed Animals in Preliminary 4-Week Repeated Dose Oral Toxicity Study

Organs	Findings	1,3-DCP (mg/kg)	
		No. of animals examined	100
Liver	Necrosis, hepatocytes, centrilobular	+++	1 (1)
		++++	4 (0)
Nasal cavity	Necrosis, olfactory epithelium	+++	5 (1)
		±	1 (0)
	Necrosis, respiratory epithelium	+	3 (0)
		±	1 (0)
Kidney	Necrosis, proximal tubule	+	3 (0)
		±	1 (0)
	Vacuolation, proximal tubule	±	5 (1)
Heart	Hemorrhage, endocardial/epicardial	+	2 (0)
		++	2 (0)

(): No. of moribund sacrificed animal.

±: Minimal, +: Mild, ++: Moderate, +++: Marked, ++++: Severe.

Table 13. Histopathology for Scheduled Sacrificed Animals in Preliminary 4-Week Repeated Dose Oral Toxicity Study

Organs	Findings	No. of animals examined	1,3-DCP (mg/kg)		
			0	25	50
Liver	Single cell necrosis, hepatocytes, centrilobular	±	2	4	-
		+	-	1	5
Nasal cavity	Disarrangement, respiratory epithelium	±	-	4	3
		+	-	-	1
	Vacuolation, respiratory epithelium	±	-	1	-
		+	-	-	2
		++	-	-	1

±: Minimal, +: Mild, ++: Moderate.

Table 14. *gpt* Mutant Frequencies in the Livers of F344 *gpt* Delta Rats Treated with 1,3-DCP and Estragole in GPG Model

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 15. Mutation Spectra of *gpt* Mutant Colonies in the Livers of F344 *gpt* Delta Rats Treated with 1,3-DCP and Estragole in GPG Model

	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 16. *gpt* Mutant Frequencies in the Kidneys of F344 *gpt* Delta Rats Treated with 1,3-DCP and Aristolochic Acid in GNP Model

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 17. Mutation Spectra of *gpt* Mutant Colonies in the Kidneys of F344 *gpt* Delta Rats Treated with 1,3-DCP and Aristolochic Acid in GNP Model

	Control		1, 3-DCP		Aristolochic acid	
	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.

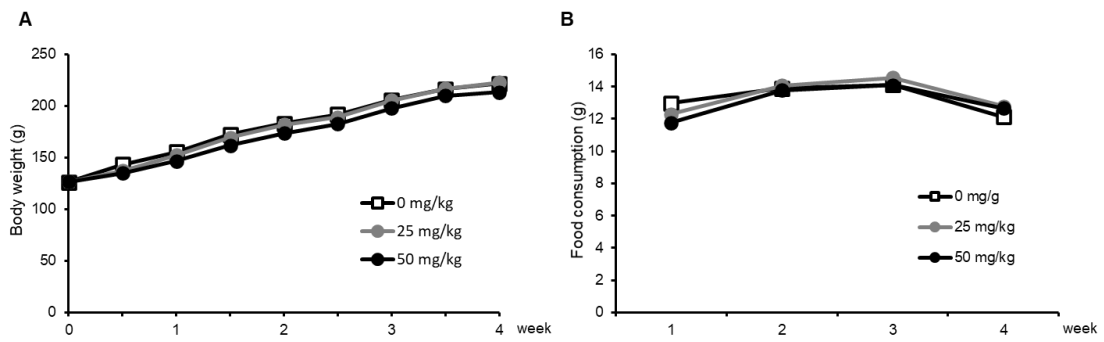


Figure 2. 1,3-DCP の 28 日間反復経口投与毒性試験における体重 (A) および摂餌量 (B) の推移.

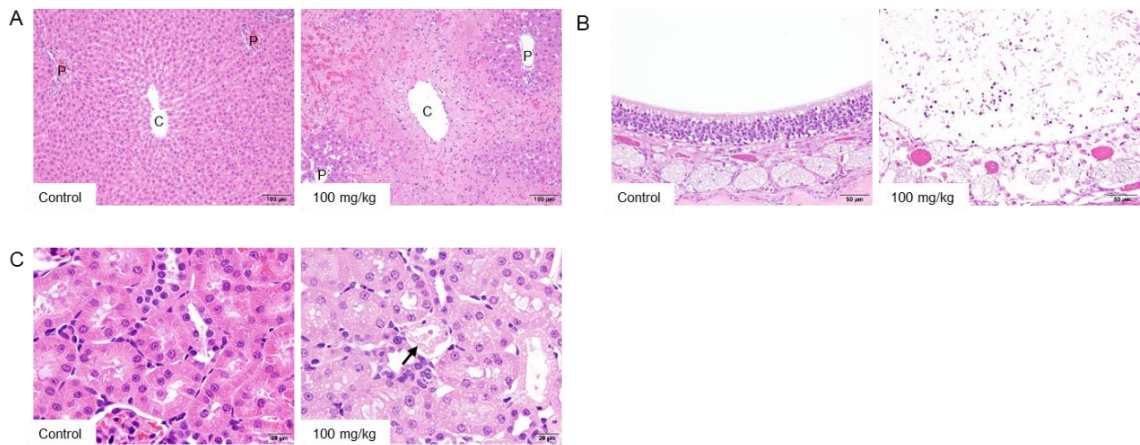


Figure 3. 1,3-DCP の 28 日間反復経口投与毒性試験における途中死亡例および切迫屠殺例の肝臓 (A), 鼻腔 (B) および腎臓 (C) の病理組織学的変化. C : 中心静脈, P : 肝三つ組, 矢印 : 尿細管壊死.

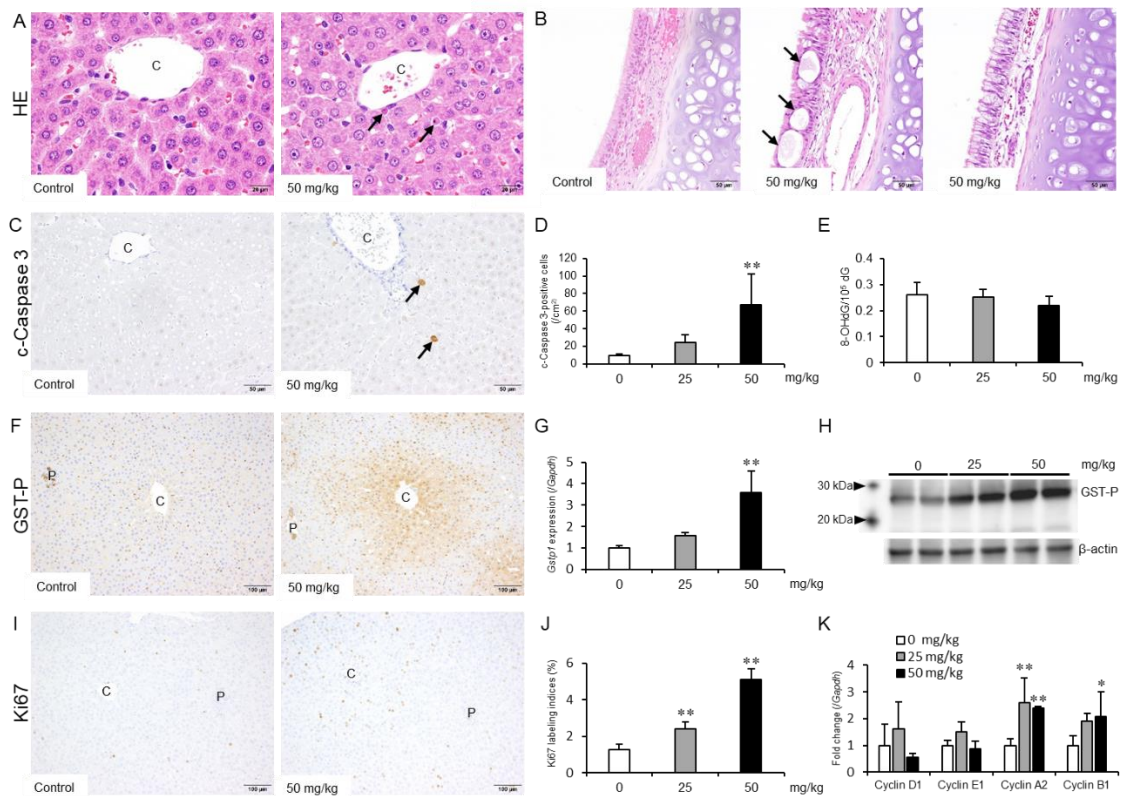


Figure 4. 1,3-DCP の 28 日間反復経口投与毒性試験における計画屠殺例の肝臓 (A) および鼻腔 (B) の病理組織学的変化. 肝臓における c-Casp 3 免疫染色 (C) およびその定量的解析 (D), 8-OHdG 測定 (E), GST-P 免疫染色 (F), *gstp1* の mRNA 発現解析 (G) および GST-P タンパク発現解析 (H), Ki67 免疫染色 (I) およびその定量的解析 (J) ならびに細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現. C : 中心静脈, P : 肝三つ組, 矢印: 肝細胞の単細胞壊死 (A), 呼吸上皮の配列不正 (B) および c-Casp 3 陽性肝細胞 (C).

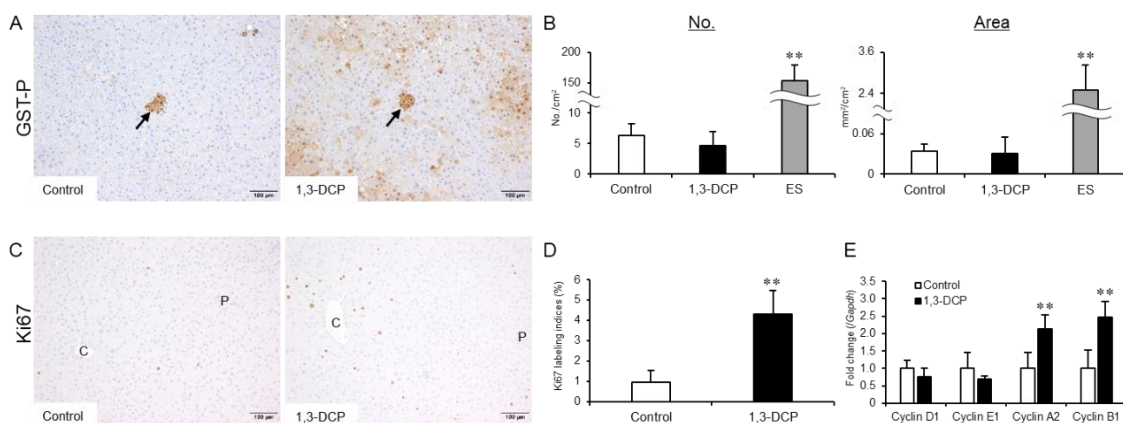


Figure 5. 肝臓の中期遺伝毒性・発がん性試験法における GST-P 免疫染色 (A), 単位面積当たりの GST-P 陽性細胞巢の数および面積 (B), Ki67 免疫染色 (C) およびその定量的解析 (D) ならびに細胞周期関連因子の mRNA 発現 (E). C : 中心静脈, P : 肝三つ組, 矢印: GST-P 陽性細胞巢.

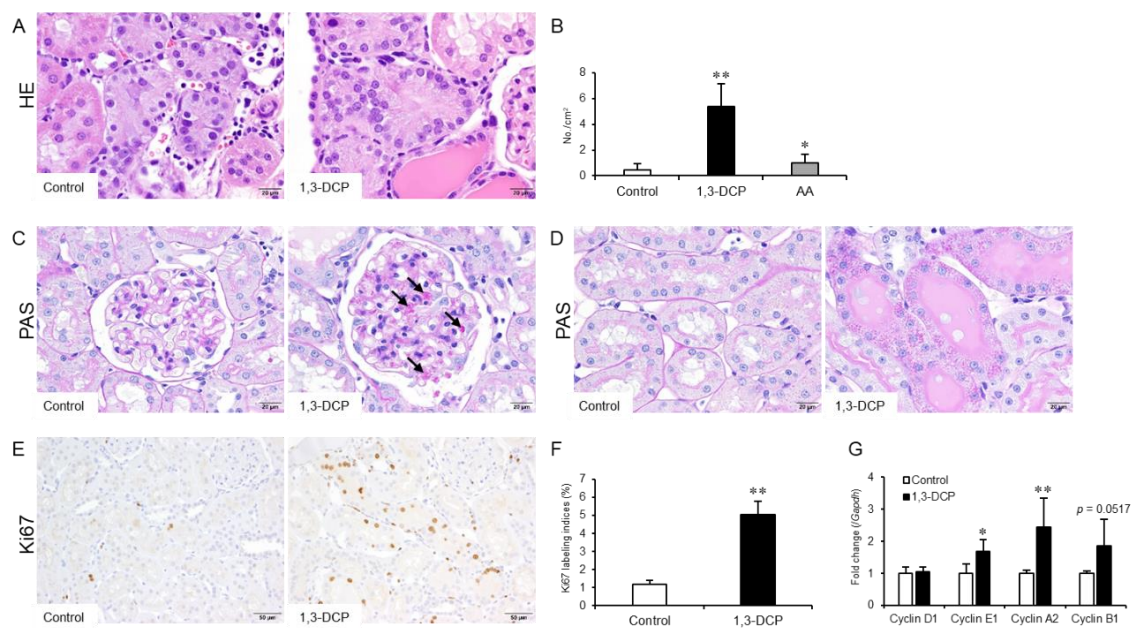


Figure 6. 腎臓の中期遺伝毒性・発がん性試験法における尿細管異型過形成の典型像 (A) およびその定量的解析 (B), 糸球体 (C) および尿細管 (D) PAS 染色像, Ki67 免疫染色 (E) およびその定量的解析 (F) ならびに細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現. 矢印: PAS 陽性顆粒.

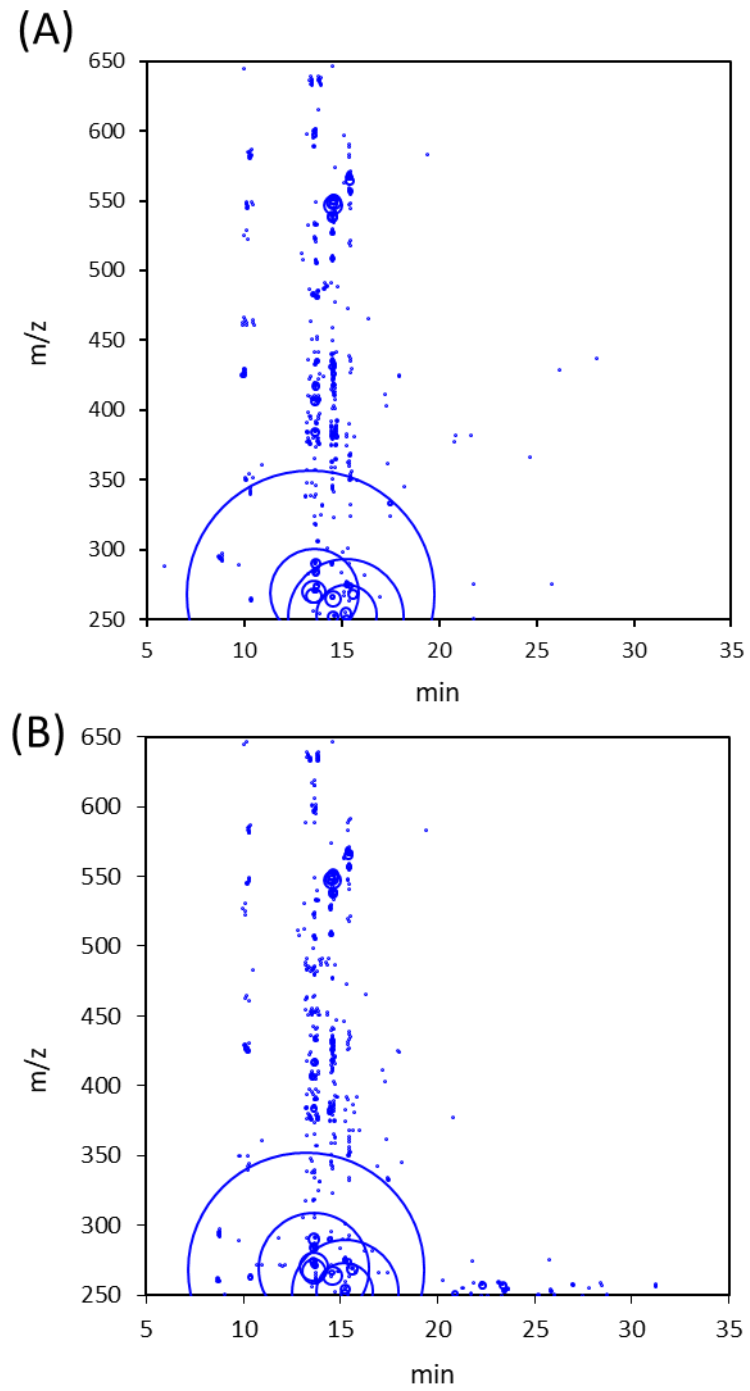


Figure 7. DNA adductome maps of liver of rat in control group (A) and 1,3-DCP group (B).

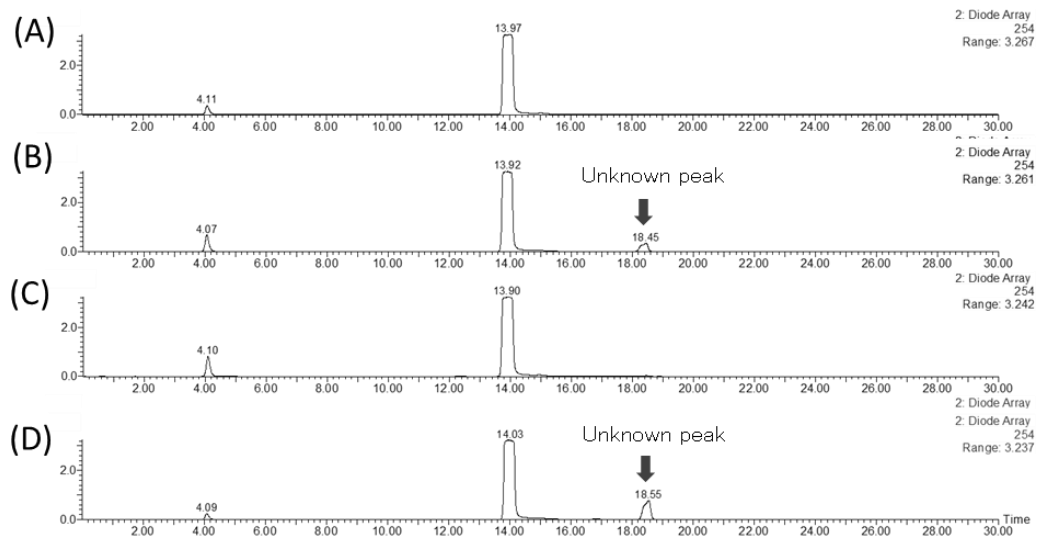


Figure 8. LC-DAD chromatograms (UV: 254 nm) of the reaction of dG with/without 1,3-DCP. (A) dG, (B)dG with 1,3DCP at pH7.4, (C) dG with 1,3-DCP at pH4.2 and (D) dG with 1,3-DCP at pH9.0.

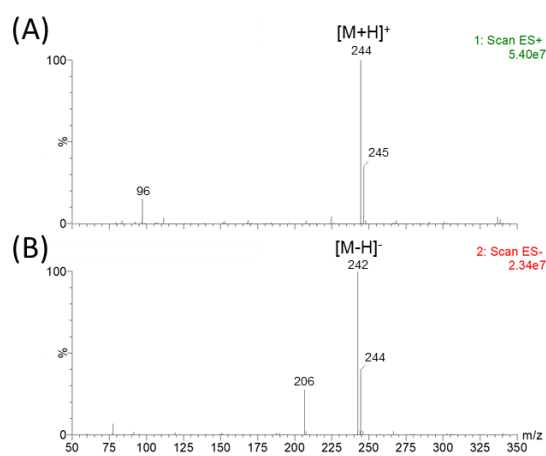


Figure 9. Mass spectra of unknown peak obtained from MS scan analysis using LC-MS for the reaction of 1,3-DCP with dG. Mass analysis was performed in (A) positive ion mode and (B) negative ion mode.

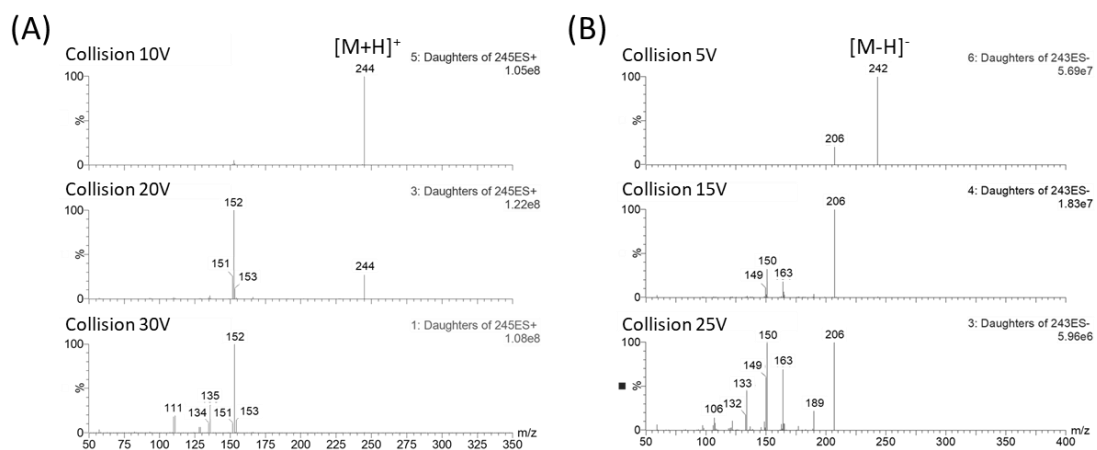


Figure 10. Mass spectra of unknown peak obtained from MS/MS scan analysis using LC-MS/MS for the reaction of 1,3-DCP with dG. Mass analysis was performed in (A) positive ion mode and (B) negative ion mode.

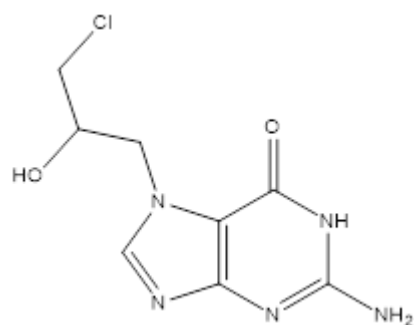


Figure 11. Chemical structure of CHP-N7-Gua

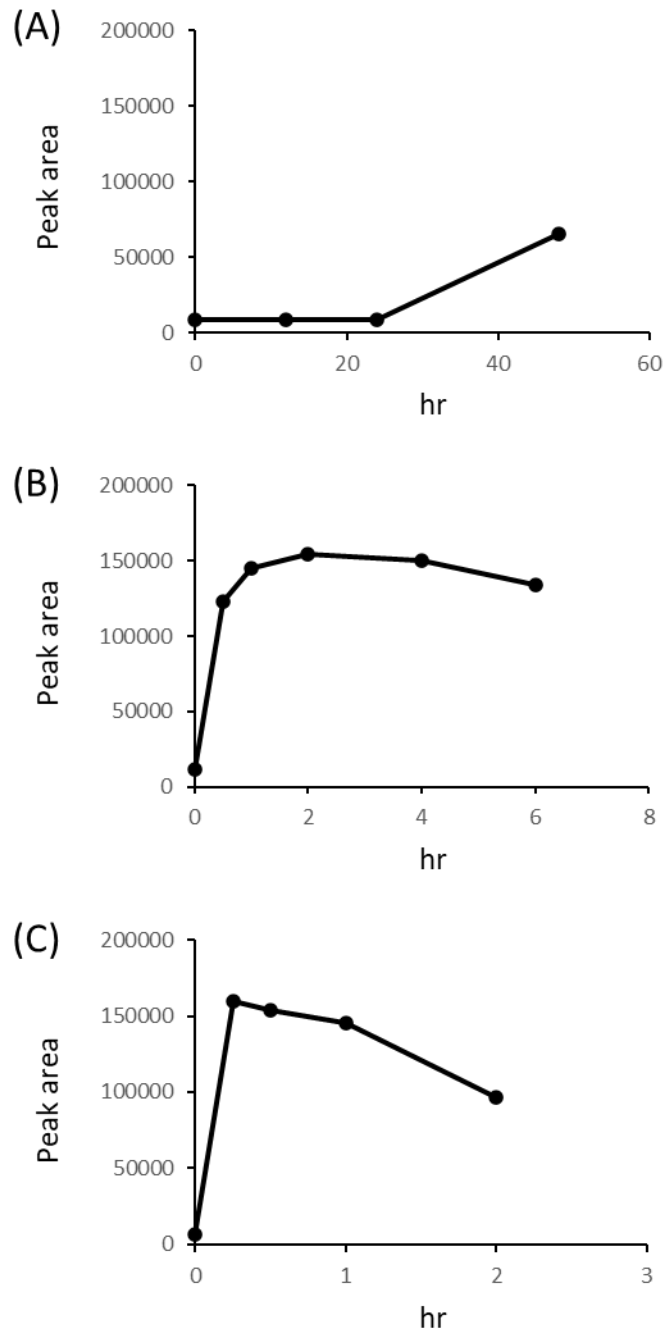


Figure 12. Time dependent changes in peak area of CHP-N7-Gua at (A) 37°C, (B) 70°C and (C) 95°C.

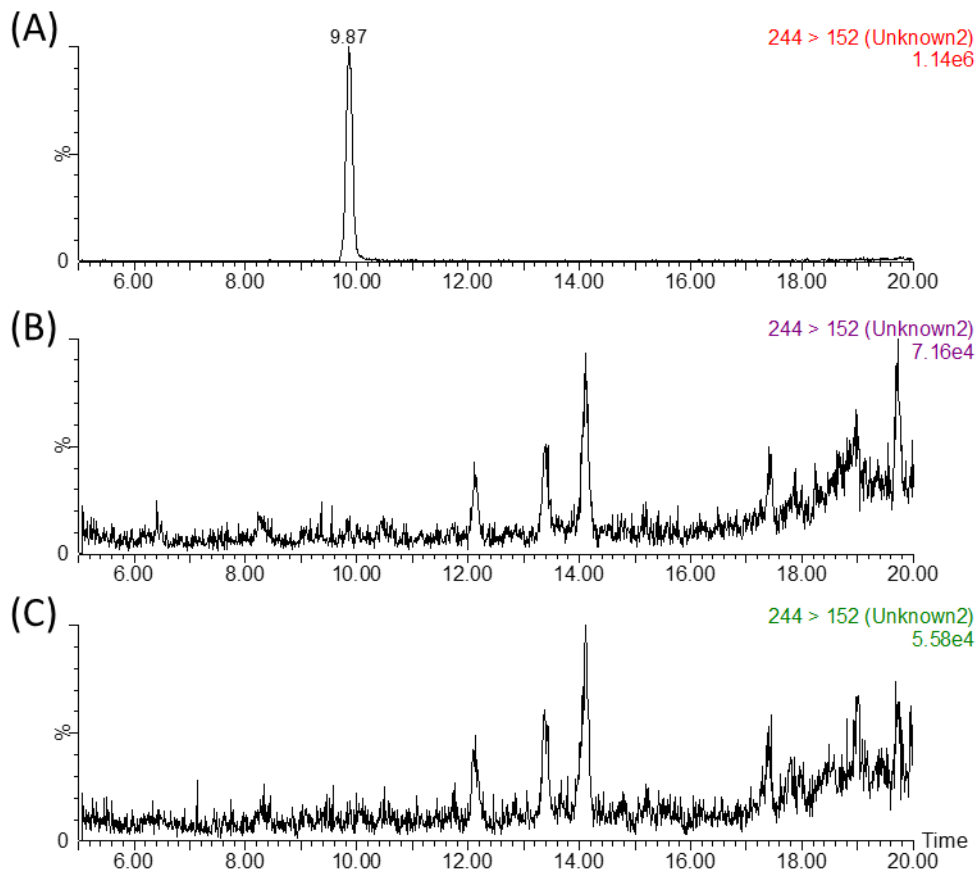


Figure 13. MRM chromatograms of CHP-N7-Gua in rat liver DNA sample. (A) CHP-N7-Gua standard, (B) liver from rat in control group and (C) liver from rat in 1,3-DCP 240 mg/L group.