

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究  
(20KD0101)

分担研究項目：DNA アダクトーム解析による遺伝毒性評価

研究分担者 戸塚 ゆ加里 日本大学薬学部 環境衛生学 教授

## 研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、高分解能精密質量分析装置(HRAM)を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法(HRAM-アダクトーム)を用いた遺伝毒性/発がん性予測モデルの構築に取り組んできた。昨年度は、これまでの2年間で実施したデータセット(2018 データセットおよび2019 データセット)を統合し、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価を、当該研究により構築した HRAM-アダクトーム法により解析し、得られた統合データを用いて Leave-One-Out 交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、50~65%の正答率となり、2018 データセットを単独で用いた場合(88~94%)と比較して精度が低下することがわかった。この結果は、2019 年データセット単独での低い正答率が影響していると推測された。今年度は、2018 年および2019 年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、HRAM-アダクトームの再分析を実施したが、正答率の向上にはつながらなかった。そこで、毒性予測モデルの正答率向上に向け、これまでモデル作成に用いてきたランダムフォレスト(RF)ではなく、線形判別分析(LDA)を用い、かつ毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性・発がん性ともに陰性の物質を予測できればよいのではないかと考え、毒性ラベルを再構成した予測モデルの検討を実施した。その結果、学習アルゴリズムについては RF、LDA の正答率は殆ど同じか若干 LDA の方が良く、毒性ラベルが「++」と「--」のみの物質を使用した場合には、2018 年度測定データで約 100%、2019 年度測定データで 54-73%、2021 年度測定データで 65-89%となり、いずれもラベル変更前のデータより 10-30%増加した。一方、毒性ラベルを「--」と「それ以外」に置き換えた場合は、2018 年度測定データでおおよそ 100%に達し、2019 年度測定データで 66-76%、2021 年度測定データで 74-95%となり、いずれもラベル変更前のデータより 10-50%増加した。

## A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験(変異原性試験)、コメットアッセイ(DNA 損傷試験)、小核試験(染色体異常試験)などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測や有害性発現経路(Adverse Outcome Pathway, AOP)の解析は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を開発することが必要であると考え。我々は、高分解能精密質量分析装置(HRAM)を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法(HRAM-アダクトーム)を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて検討してきた。その結果、トランスジェニックマウスモデルに対して変異原性を示すマグネタイトナノ粒子を気管内投与したマウス肺で、マグネタイトナノ粒子が誘発する G:C→A:T 及び G:C→T:A 変異の基となる付加体(etheno-dC、 $\epsilon$ -dC)を含む複数の付加体形成を確認することを報告した。また、最近では Ames 試験陰性の発がん物質である 1,4-dioxane を投与したラット肝臓に複数の付加体形成が観察され、そのうちの一つは 8-oxodG に相当することを見出した。 $\epsilon$ -dC および 8-oxodG はいずれも酸化ストレス・炎症などに伴って形成される付加体であり、マグネタイトナ

ノ粒子や 1,4-dioxane による変異原性誘発はこれら化学物質の直接的な作用ではなく、宿主反応を介した間接的な作用によることが推測できた。この結果は、アダクトーム法では AOP の取得も可能であり、化学物質の安全性評価手法として有用であることを示唆するものである。そこで本研究では、アダクトーム法を用いた化学物質の安全性評価法の深化と精度向上、および動物実験代替法への応用開発を目的とする。今年度は、ラットを用いた *in vivo* モデルを用い、肝臓をターゲットとした複数の遺伝毒性/非遺伝毒性非発がん物質の肝臓における DNA 損傷を HRAM-アダクトームにより検討し、DNA 付加体の生成を指標とした有害性評価の検証を行なう。

## B. 研究方法

雄性 SD ラット(各群それぞれ 5 匹)に遺伝毒性肝発がん物質(2018 年; 9 種、2019 年; 13 種、計 22 種)、遺伝毒性非発がん物質(2018 年; 3 種、2019 年; 3 種、計 5 種)、非遺伝毒性肝発がん物質(2018 年; 2 種、2019 年; 5 種、計 7 種)、非遺伝毒性非肝発がん物質(2018 年; 16 種、2019 年; 8 種、計 24 種)を投与 24 時間後に肝臓を摘出した。使用した化学物質は以下に示す。

2018年セット (計30化合物)	2019年セット (計28化合物)
<ul style="list-style-type: none"> <li>遺伝毒性肝発がん物質 (+/+): 9種 o-Aminoazotoluene (AA), Dimethylnitrosamine (DMN), 3-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA), 4,4'-Thiodianiline (TDA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodimethanamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylaniline (NEMA), Nitrosodibutylamine (NB), N-Nitrosopyrrolidine (NNP)</li> <li>遺伝毒性非肝発がん物質 (+/-): 3種 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT)</li> <li>非遺伝毒性肝発がん物質 (-/+): 2種 Monocrotaline (MCT), Phenobarbital (PB)</li> <li>非遺伝毒性非肝発がん物質 (-/-): 16種 Diazepam (DZP), Disulfiram (DSF), Phenytoin (PHE), Rotenone (ROT), Tolbutamide (TB), Aspirin (ASA), Triamterene (TR), Indomethacin (IN), Phenylbutazone (PhB), Promethazine (PMZ), Sulindac (SUL), Tetracycline (TC), Ethionamide (ETH) Theophylline (TED), Caffeine (CAF), Chloramphenicol (CMP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>遺伝毒性肝発がん物質 (+/+): 13種 4,4'-Oxydianiline (44-ODA), Auramine-O (AO), Acid Red 26 (C1-1510)(AR-26), Benzidine (BZ), Dichloroacetic Acid (DCA), Ethylene thiourea (ETU), Hydrazinium Sulfate (HS), Hydrazine (H2), 4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline)(MBOCA), Nitrosodimethylamine (NHMI), Retrosin (RTS), Tris (1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP), Vinyl Bromide (VB)</li> <li>遺伝毒性非肝発がん物質 (+/-): 2種 2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene) (DNT), Isonicotinic Acid Hydrazide (INH)</li> <li>非遺伝毒性肝発がん物質 (-/+): 5種 Carbon Tetrachloride (CCL4), Coumarin (Coumarine), Ethynylestradiol (EE), Gemfibrozil (GFZ), Hexachlorobenzene (HCB)</li> <li>非遺伝毒性非肝発がん物質 (-/-): 8種 Allyl alcohol (AA), Butylated hydroxyanisole (BHA), Chlorpheniramine (CHL), Chlorpropamide (CPP), Furosemide (FUR), Methyldopa (MDP), Methimazole (MTZ), Sulfasalazine (SS)</li> </ul>
陽性対照 2-Nitropropane (2-NP)	陰性対照 Methyl cellulose (MC)

図1. 使用した化学物質

DNA を抽出後、DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、LC-TOF MS に供し DNA 付加体の網羅解析を行った。得られたデータは SCIEX 社が提供するバイオインフォマティクス解析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオシドに特徴的なニュートラルロス (-116.04736) 及び各種核酸に特異的なニュートラルロス (-152.0572; dG, -136.0623; dA, -112.0511; dC, -127.0508; dT) を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系をデザインした。また、今年度は予測精度向上のために、2018 年および 2019 年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し (表1 参照)、HRAM-アダクトームの再分析を実施した。得られたデータを線形判別分析 (LDA) により解析した。

次に、得られたデータから、対照群である 2-NP および MC を除いたデータを用いた。実際に予測モデルを使用する場合には遺伝毒性/肝発がん性の情報がない化学物質に対して実施することを想定して、Leave-One-Out 交差検証により予測結果の精度評価を行った。Leave-One-Out 交差検証は、ある曝露物質のデータをテスト用とし、他の曝露物質のデータを用いて学習したモデルの精度を評価することを、物質を変えながら繰り返す検証方法であり、毒性が未知の物質に対する予測を模擬した精度評価方法である。この方法を用いて、今年度はこれまでの遺伝毒性、肝発がん性、遺伝毒性/肝発がん性を付加体から予測するモデルではなく、毒性ラベルが「++」と「--」または「++」と「それ以外」に分けて予測精度の向上について検討した。学習アルゴリズムとしては、ランダムフォレスト (RF) と線形判別分析 (LDA) を使用した。

#### (倫理面の配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、日本大学を含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

### C. 研究結果

2018年および2019年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、今年度HRAM-アダクトームの再

分析を実施した結果を図2に示す (2021データ)。LDA解析を行なったところ、非遺伝毒性非肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性肝発がん物質の4つのグループに分離されることがわかった。

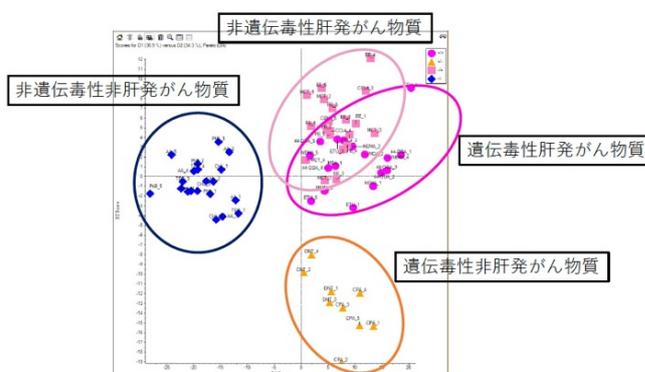


図2. 遺伝毒性肝発がん物質/遺伝毒性非肝発がん物質/非遺伝毒性肝発がん物質/非遺伝毒性非肝発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価 (LDA解析による)

Leave-One-Out交差検証により化学物質の遺伝毒性/発がん性を予測するモデルを機械学習手法 (ランダムフォレストを使用) を用いて試作した。試作された遺伝毒性/発がん性予測モデルを用いて2021年データセットに対して予測を行ったところ、予測結果が低いことがわかった (表1)。

表1. 遺伝毒性の予測結果

物質名	ラベル	測定年度	正答数	回答数	正答率	予測++	予測+-	予測+0	予測--
AA	--	2019	4	5	0.8	0	0	1	4
CHL	--	2019	4	5	0.8	0	0	1	4
PhB	--	2018	5	5	1	0	0	0	5
TEO	--	2018	5	5	1	0	0	0	5
CCL4	++	2019	3	5	0.6	2	0	3	0
EE	++	2019	5	5	1	0	0	5	0
MCT	++	2018	1	5	0.2	2	0	1	2
PB	++	2018	0	5	0	1	0	0	4
CPA	+-	2018	0	5	0	0	0	4	1
DNT	+-	2019	0	4	0	2	0	1	1
44-ODA	++	2019	2	5	0.4	2	0	3	0
ETU	++	2019	0	5	0	0	0	4	1
MDA	++	2018	1	2	0.5	1	0	1	0
NEM A	++	2018	1	5	0.2	1	0	4	0
合計			31	66	0.47				

そこで、毒性予測モデルの正答率向上に向け、これまでモデル作成に用いてきたランダムフォレスト (RF)ではなく、線形判別分析 (LDA) を用い、かつ毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性・発がん性ともに陰性の物質を予測できればよいのではないかと考え、毒性ラベルを再構成した予測モデルの検討を実施した。その結果、学習アルゴリズムについてはRF、LDAの正答率は殆ど同じか若干LDAの方が良く、毒性ラベルが「++」と「--」のみの物質を使用した場合には、2018年度測定データで約100%、2019年度測定データで54-73%、2021年度測定データで65-89%となり、いずれもラベル変更前のデータより10-30%増加した (表2)。

一方、毒性ラベルを「--」と「それ以外」に置き換えた場合では、2018年度測定データでおおよそ100%に達し、2019年度測定データで66-76%、2021年度測定デ

ータで 74-95%となり、いずれもラベル変更前のデータより 10-50%増加した (表 3)。

表2. 毒性ラベルを「++」と「--」に限定した場合の平均的な正答率

学習アルゴリズム	2018 年度データ		2019 年度データ		2021 年度データ	
	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎
RF	0.98	0.99	0.54	0.72	0.65	0.76
LDA	0.97	0.98	0.58	0.73	0.73	0.89

表3. 毒性ラベルを「--」と「それ以外」に限定した場合の平均的な正答率

学習アルゴリズム	2018 年度データ		2019 年度データ		2021 年度データ	
	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎	物質毎	サンプル毎
RF	1.00	1.00	0.66	0.76	0.74	0.76
LDA	0.97	0.97	0.70	0.73	0.91	0.95

#### D. 考察

今年度は、2018年および2019年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、HRAM-アダクトームを用いてDNA付加体の網羅解析を行ないLDA解析を行った結果、遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の4つのグループに分離できた。

これらデータ(2021データ)を用いてLeave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、47%の正答率となり、2018データセットを単独で用いた場合(88~94%)と比較して精度が低下することがわかった。この結果は、2019年データセット単独での低い正答率が影響していると推測された。そこで、毒性予測モデルの正答率向上に向け、これまでモデル作成に用いてきたランダムフォレスト(RF)ではなく、線形判別分析(LDA)を用い、かつ毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性・発がん性ともに陰性の物質を予測できればよいのではないかと考え、毒性ラベルを再構成した予測モデルの検討を実施した。その結果、学習アルゴリズムについてはRF、LDAの正答率は殆ど同じか若干LDAの方が良く、毒性ラベルが「++」と「--」のみの物質を使用した場合および毒性ラベルを「--」と「それ以外」に置き換えた場合にラベル変更前のデータより正答率が大きく改善されることがわかった。今後は、更なる正答率向上について検討を行うとともに、正答率に大きく影響する要因について検討する。また、各グループの予測に重要な付加体の探索などについても検討する。

#### E. 結論

2018年および2019年に試験したサンプルからいくつかの化学物質を抽出し、HRAM-アダクトームを用いてDNA付加体の網羅解析を行ないLDA解析を行った結果、遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質の4つのグループに分離できた。

これらデータ(2021データ)を用いてLeave-One-Out交差検証を適用した毒性予測モデルの予測精度評価を実施したところ、47%の正答率となり、2018データセット

を単独で用いた場合(88~94%)と比較して精度が低下することがわかった。この結果は、2019年データセット単独での低い正答率が影響していると推測された。そこで、毒性予測モデルの正答率向上に向け、これまでモデル作成に用いてきたランダムフォレスト(RF)ではなく、線形判別分析(LDA)を用い、かつ毒性予測モデルの実用性の観点から遺伝毒性・発がん性ともに陰性の物質を予測できればよいのではないかと考え、毒性ラベルを再構成した予測モデルの検討を実施した。その結果、学習アルゴリズムについてはRF、LDAの正答率は殆ど同じか若干LDAの方が良く、毒性ラベルが「++」と「--」のみの物質を使用した場合および毒性ラベルを「--」と「それ以外」に置き換えた場合にラベル変更前のデータより正答率が大きく改善されることがわかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient with Colorectal Cancer. *In Vivo*. 2022; 36(2): 628-634.
- 2) Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y. Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids, *Front Genet*. 2021; 12: 768781.
- 3) Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. *In Vivo*. 2021; 35(4):2107-2114.
- 4) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 2021; 34(3):912-919.
- 5) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci*. 2021; 112, 7-15.

##### 2. 学会発表

- 1) 戸塚ゆ加里. 質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析手法(DNAアダクトーム)の現状と将来展望. 第81回分析化学討論会、Web開催(2021年5月)
- 2) 戸塚ゆ加里. DNA付加体の網羅的解析手法(DNAアダクトーム)の現状と将来展望. 第144回日本薬理学

- 会関東支部会、Web開催（2021年6月）
- 3) 戸塚ゆ加里. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development. 第80回日本癌学会学術総会、第80回癌学会、横浜（2021年10月）
  - 4) 戸塚ゆ加里. 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価. 第50回 環境変異原学会、横須賀（2021年11月）
  - 5) 戸塚ゆ加里. ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する. 第95回 日本薬理学会、福岡（2022年3月）
  - 6) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルに特化した新規 in vitro 生体模倣評価系の開発. 日本薬学会 第142年会、Web開催（2022年3月）

**G. 知的所有権の取得状況**

**1. 特許取得**

なし

**2. 実用新案登録**

なし

**3. その他**

なし