

## O-7

**Investigation for mechanism of DNA adduct formation by 2,4- and 2,6-diaminotoluene using DNA adductome analysis**

Shigeharu Muto, Katsuya Yamada, Kyoko Kato,  
Tatsuya Kato, Yumiko Iwase, Koji Takekawa,  
Yoshifumi Uno

Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation

Two structural isomers, 2,4- and 2,6-diaminotoluene (DAT) differ in their genotoxic and carcinogenic properties. Both isomers were mutagenic in the Ames test, however, only 2,4-isomer was mutagenic and carcinogenic in rat livers. In this study, their ability to induce DNA adducts in SD rat liver was evaluated by *in vivo* DNA adductome analysis using LC-MS/MS.

As a results, although both isomers induce DNA adducts, the estimated amount were approximately 50 times larger in 2,4-DAT than 2,6-DAT.

Interestingly, the presumed structures of the DAT-derived DNA adducts from their *m/z* were monoacetyl DAT-dG, which are differed from the estimated structures from the metabolic activation pathway of usual aromatic amines. Also, this finding consists with the fact that the major metabolites of DATs in rat are their *N*-acetylated form.

These results suggested that the differences in the metabolism between these isomers might cause the differences in the amount of DNA adducts.

**DNA アダクトーム解析法による 2,4- および 2,6- ジアミノトルエンの DNA アダクト形成メカニズム検討**

武藤 重治、山田 勉也、加藤 杏子、加藤 竜也、  
岩瀬 裕美子、竹川 晃司、宇野 芳文

田辺三菱製薬株式会社

構造異性体である 2,4- および 2,6- ジアミノトルエン (DAT) は、遺伝毒性およびがん原性が異なることが知られている。両化合物とも Ames 試験で陽性となるが、2,4-DAT のみがラット肝において変異原性およびがん原性を示すことが報告されている。本研究では、これら二つの異性体の SD ラット肝における DNA アダクト形成能につき、LC-MS/MS を用いる *in vivo* DNA アダクトーム解析法にて検討した。

その結果、両化合物ともラット肝に DNA アダクトを形成したが、推定される生成量は 2,4-DAT が 2,6-DAT の約 50 倍であった。

興味深いことに、分子量から推定された DAT 由来の DNA アダクトの構造 (monoacetyl DAT-dG) は、一般的な芳香族アミンの代謝活性化経路から予想されるものとは異なっていた。また、この事実は、ラットにおける DATs の主要な代謝物が、*N*-アセチル体であることと一致した。

以上の結果より、両化合物のラット肝における代謝経路の違いが、DNA アダクト形成量の違いを生むことが示唆された。

## O-8 (P-039)

**Toxic evaluation of silver nanoparticles using side scattered light in flow cytometry and phosphorylation of histone H3**

Xiaoxu Zhao, Yuko Ibuki

Graduate Division of Nutritional and Environmental Sciences,  
University of Shizuoka

With the expansion of use of nanoparticles, the development of a technique that can easily evaluate the safety has been required. In this study, we tried to establish a method to evaluate the safety of silver nanoparticles (AgNPs), focusing on the intracellular uptake of AgNPs and the phosphorylation of histone H3 (p-H3S10).

Human skin keratinocytes cell (HaCaT) and human alveolar adenocarcinoma cell (A549) were exposed to AgNPs. Remarkable p-H3S10 was observed immediately after the treatment and last up to 24 h. The intensity of side-scatter light (SS) in flow cytometry (FCM), was enhanced by uptake of AgNPs, which was strongly dependent on the p-H3S10. p-H3S10 was suppressed by removal of Ag ions, and increased in the cells treated with AgNPs which exposed to ultraviolet light and hydrogen peroxide. We expected that the Ag ions released from AgNPs taken-up in cells were required for p-H3S10. These results suggested that both intensity of SS in FCM (cellular uptake of AgNPs) and p-H3S10 are important indicators for evaluation of AgNPs.

**フローサイトメーターの側方散乱光と Histone H3 のリン酸化を利用した銀ナノ粒子の生体影響評価**

趙 曉旭、伊吹 裕子

静岡県立大学 食品栄養環境科学研究所

ナノ粒子の利用拡大に伴い、その安全性を簡単に評価できる手法の開発が求められている。我々は、ナノ粒子の細胞内取り込みと、クロマチン凝集や遺伝子の転写活性化に重要な役割をはたすヒストン H3 のリン酸化を指標とし、近年多用されている銀ナノ粒子 (AgNPs) の生体影響評価を試みている。

ヒト皮膚角化細胞 HaCaT、ヒト肺腺癌細胞 A549 に、AgNPs (Size: <100nm) を作用すると、H3 のリン酸化が強く、持続的に (~24h) 誘導された。フローサイトメトリー (FCM) の側方散乱光 SS 強度を用いて、細胞内の粒子の取り込み量を調べたところ、取り込み量と H3 のリン酸化は相関していた。また、H3 のリン酸化は、 $\text{Ag}^+$  を除去することによって抑制されたので、細胞内に取り込まれること以外に、細胞内に取り込まれた粒子から  $\text{Ag}^+$  が放出すること、その誘導には重要であると考えられた。そこで、紫外線及び過酸化水素処理により、AgNPs の表面を酸化し、AgNPs からの  $\text{Ag}^+$  のリリース量を増加させたところ、H3 のリン酸化の誘導の上昇が確認された。以上の結果から、FCM の SS 強度を指標とした粒子の細胞内への取り込みと H3 のリン酸化、両方を測定することにより、AgNPs の効果的な影響の指標となる可能性が考えられた。