

199900110A

厚生科学研究費補助金研究報告書(1999)

(H10-がん-004)

胆嚢がんの分子生物学的特異性の解明と
早期診断法の確立に関する研究

新潟県立がんセンター新潟病院 小越和栄

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

胆嚢がんの分子生物学的特異性の解明と
早期診断法の確立に関する研究

主任研究者 小越 和栄 県立がんセンター新潟病院 副院長

研究要旨

胆嚢がんは地域特異性と固体特異性を持っており、その固体特異性の一つとして、胆汁組成と発がんとの関連についての研究を行ってきた。いままでに胆嚢がん患者中にグリコウルソデオキシコール酸(GUDC)が有為に増加していることが判明した。このGUDC上昇の意義として、突然変異原性物質の修飾作用があることに注目し、本年度の研究は各変異原性物質毎の作用を解明した。既知の変異原物質である芳香属アミン類（2AAなど）に対しては助変異原性を示すが、胆汁中に検出されるヘテロサイクリックアミンなど（IQやMeIQ）、さらに人に発がん作用の見られるニトロソ化合物（NMU）に対しては変異原抑制に働くことが解明された。また、ブルーキチン吸着ヒト胆汁に対しても変異原性抑制流働くことから、胆汁中のGUDCは取り入れられた胆嚢の発がん物質に対して抑制的、すなわち防御的に働く可能性強く示唆された。またこの上昇したGUDCはがん切除4カ月後でも変化はなかった。

胆嚢がんの好発因子である膵・胆管合流異常例の胆嚢がん症例では膵がんに見られるK-ras遺伝子の変異が高率にみられており、通常型の胆嚢がんとは明らかに異なって膵がんに近い遺伝子の変化を示した。また合流異常症例で発がんのない症例でも、p53免疫染色で異常が見られた。

齋藤 征史 新潟県立がんセンター
新潟病院 内科部長
土屋 嘉昭 " 外科部長
澁谷 範夫 新潟医療技術専門学校
助教授
山本 正治 新潟大学医学部
衛生学教室教授
渡辺 英伸 新潟大学医学部
第一病理学教室教授

A. 研究目的

1)胆汁中のグリコウルソデオキシコール酸(GUDC)の発がんとの関連；

胆嚢がんの発生因子に地域特異性と固体特性がある。そのうち、個体特性の一つである胆汁成分にも大きく関与することがと今までの研究に明らかになっている。

この胆汁に関する、今までの我々の研

究では、胆嚢がん患者より採取した純粋胆汁には胆汁酸の抱合体であるグリコウルソデオキシコール酸(GUDC)が有為の差で高いことも判明した。このGUDCは既知の変異原物質である芳香属アミンに対しては変異原性の促進に働くが、他の物質にたいしては抑制的に働くことが判明している。したがって本年度の研究の目標は、変異原性の作用がどの物質に対してどのように作用するかを、ヒトに発がんの可能性のある物質に対してそれぞれ解明を行い、最終的な働きとともにGUDCの持つ役割を発がんとの関連で解明することとした。またGUDC増加はその意義、すなわち原因か結果を明確にするために、胆嚢がん症例で、術前術後の組成の検討を行った。

2)胆管・膵管合流異常の症例についての遺伝子異常；

過去の研究で胆管・膵管合流異常症例ではK-ras遺伝子変異の出現が高率に見られており、通常型の胆嚢がん症例とは異なった様式を示していた。本年は最終的に腺腫由来の胆嚢がん、de novo発生の通常型胆嚢がんおよび膵管・胆管合流異常症例についてK-ras遺伝子とP-53遺伝子異常について検索を行い、その発生の違いを明確にする。

B. 研究方法

1) GUDCと胆嚢がんの関連について；

a) 胆汁酸の経時的組成変化の検討には胆嚢がんで胆嚢切除を行った症例の術後のERCPによる経過観察時に胆汁を採取し、術前との比較を行う。また対照症例としては胆石などで経過観察を行っている症例に対しても経時的な胆汁採取を行って組成の変化の有無についての検討を行う。

b) 胆嚢がん症例に増加しているGUDCの

突然変異原作用への抑制作用の研究には、採取された純粋胆汁で高い突然変異原性が確認された胆汁をプールし、水で希釈しブルーキチンで個相抽出を行なう。この抽出物質をセップパックC18でカラム分離し、Ames法により変異原性を指標にGUDCを加えてその抑制度を測定する。同様な実験を胆嚢がん症例では増加しない他の二次胆汁酸等についての比較を行った。

c) 既知変異原物質は1,8-ジニトロピレン(1,8-D),4-ニトロキノリン-N-オキシド(4NQO),2-アミノアントラセン(2AA),2-アミノフルオレン(2AF),ベンゾピレン(BaP),2-アセトアミノフルオレン(AAF),Trp-P-1,Trp-P-2,IQ,MeIQ,MeIQx,N-ニトロソウレア(NMU)を用い、*Salmonella typhimurium* TA98およびTA100菌株を用いたエームス試験のプレート法で行った。

2)胆嚢がん症例での遺伝子異常の検討；

検討症例は胆嚢腺腫51個、腺腫内がん16個、de novo発生胆嚢がん164個、膵管・胆管合流異常17個について、Ki-67, p53の免疫染色,K-ras とAPC変異の解析を行った。また同時にそれらの症例について発生母地との関連についての組織学的検討を行った。また、がんを発生していない膵管・胆管合流異常6症例に対してもp53免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

上記の研究を行う際に倫理的な問題となることは胆汁採取の方法である。特に経時的に胆汁採取のためのERCP施行である。ERCPは臨床的に必要な場合にのみ施行するが、胆汁採取は患者の利益に直接の関連を持たない。その為に本研究は県立がんセンター新潟病院の倫理規定に沿って倫理委員会での承認を得て行っており、ERCP施行時の胆汁採取については患

者へのインフォームドコンセントを行い、承諾書にて了承を得て行った。

C. D. 結果と考察

1) 胆汁中のグリコウルソデオキシコール酸 (GUDC) の発がんとの関連

我々の過去(第1期)の研究で、胆嚢がん患者より採取した純粋胆汁には胆汁酸の抱合体であるグリコウルソデオキシコール酸 (GUDC) が有為の差で高いことも判明した。

このGUDCの作用の解明を行い、まず既知の変異原性物質である芳香属アミンに対しては*in vitro*で濃度勾配的に助変異原性を持つことが判明した。しかし、変異原性物質を変えると逆に抑制作用を示すことが判明した。さらに人胆汁中に含まれるヘテロサイクリックアミン(HCA)に対しては突然変異原性抑制に働き、また人への発がん性が確認されている N-メチルニトロソウレアなどにも同様に突然変異原性抑制作用を有することが判明した。さらに、GUDCはヒト胆汁のブルーキチンカラム吸着試料に対してもその変異原性を抑制した。このことからGUDCはチトクロムP450酵素群による代謝反応に関連しているものと思われる。また、胆汁中の遊離脂肪酸もヒト胆汁ブルーキチンカラム吸着試料に対しての変異減抑制作用があり、その濃度は胆嚢がんの好発地区の新潟県と高知県の胆汁で明らかな差を認めた。

このGUDCは胆嚢がん切除後の2カ月以内では組成に変化はなく、胆嚢がん発症の結果ではなく、原因の一つと考えられている。また、GUDCは、持続する発がん物質に対して生態防御機構を持つものと考えられ、そのターゲットとなる物質はチトクロムP450による代謝される物質である可能性が高いと考えられる。胆汁

中の遊離脂肪酸は食事などにも関連し、その増加の理由は明らかではないが、地域的な食物習慣にも関連するものと考えられる。

さらに、このGUDCの増加は他の良性疾患には殆ど見られないことから、胆汁中のGUDCの測定で早期胆嚢がんの発見にも有用と考えられる。

2) 胆嚢がんの発生は腺腫を起源として発生する通常胆嚢がんと膵管・胆管合流異常で発生する*de novo*がんとがある。この両者の遺伝子異常についての検索を行った結果、腺腫からの発生ではp53異常やK-ras変異は見られなかった。それに反し、通常胆嚢がん*de novo*発生するがんではp53異常を認めるがK-ras変異はなかった。一方、膵管・胆管合流異常症例の*de novo*発生例ではp53異常とK-ras変異が高率に見られ、それぞれの発生機序の違いを示した。このことより合流異常症例ではK-ras遺伝子およびP-53遺伝子ともに通常型とは異なった発がん経路を示唆している。このK-ras変異は通常の胆嚢がんには見られないもので、膵がんの場合に類似しており、その発生にも膵液などを含む、膵との関連性が示唆され、従来よりの仮説である胆汁中への膵液混入説を支持するものと考えている。

がんを発生していない膵管・胆管合流異常症例6例のp53胆嚢粘膜免疫染色でも2例に陽性例がみられ、またLabeling Indexも正常者より高く(表3)がん発生母地をうかがわせる所見であった。

E. 結論

以上の研究より、胆嚢がんの発生に関連する発がん物質は肝のチトクロムP450酵素系代謝に関連する可能性が大きな

り、これらの物質の防御機構として胆汁中にGUDCが増加する可能性を強く示唆する結果を得た。したがって、胆汁中のGUDCを測定することにより、胆嚢がんの早期診断にもつながるものと考えている。また、胆嚢がんを高頻度に発症させる膵管・胆管合流異常症例での胆嚢がんは、通常発生の胆嚢がんと異なってK-ras遺伝子変異が高率にみられる。これはがん発生に膵液が関与しているという仮説を裏付けるものと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto M, Ogoshi K et al, Epidemiology of gallbladder and bile duct cancers. Smith-Goldon and Nishimura, London, 1999
- 2) Hori Y, Nakamura K , Yamamoto M et al, Geographical variation in the concentration of biliary free fatty acids with anti-mutagenic action. Mutation Res 1999; 444:41-7
- 3) Watanabe H et al, Histological and genetic change in malignant transformation of gallbladder adenoma Ann Oncol 1999; 10(suppl 4):S136-9
- 4) 山本正治, 遠藤和男, 中平浩人, 中村和利, 水道水源別にみたがん標準化. 罹患比の生態学的研究. 日衛誌 1999; 54:526-33.
- 5) 中平浩人, 山本正治, 肝内胆管癌の疫学. 肝・胆・膵フロンティア 基礎から臨床まで, 診断と治療社, 東京, 1999.

G. 知的所有権の所得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

胆汁酸組成変化と胆嚢がんの関連に関する研究

分担研究者 齋藤 征史 県立がんセンター新潟病院
内科部長
小越 和栄, 土屋 嘉昭 県立がんセンター

研究要旨

胆嚢がん症例の胆汁組成には二次胆汁酸の抱合体であるグリコウルソデオキシコール酸(GUDA)が有為に増加していることを以前の研究で把握している。このGUDCが増加する現象が、胆嚢がん発生による二次的なものであるのか、またはGUDCの増加症例に胆嚢がんが発生するかで、その意義付けが大きく変わる。本年はその組成の変化を術前、術後の測定をおこない、4カ月までは組成に大きな変化はないことを確認した。

結論としてGUDCはがん由来のものではなく、胆嚢がんの発生に影響する変異原性物質が体内に入った際の抑制作用のため増加するものであろうと考えられる。

A. 研究目的

胆嚢がん患者の胆汁に増加しているGUDCは胆嚢がん体に特異的に増加するものか、または増加している症例に胆嚢がんが発生するかが大きな問題である。

これを解決するために、経時的な変化をみてどう変わるか、また胆嚢がんの切除後の変化を測定比較することで明確になると考える。

B. 研究方法

患者の胆汁組成は一定の濃度(2.0mMOL/L)以上のものを比較の対象とした。胆嚢がん切除術前の胆嚢または胆管より採取した胆汁の胆汁酸組成と、術後にERCPで採取した純粋総胆管内胆汁の組成を8例について比較した。

また術前、術後の胆汁を総胆管胆汁と胆

嚢胆汁と比較し、その組成に差がないことを確かめるために、24例の手術症例(胆石を含む)で検討した。

術後の胆汁採取方法はERCPを行い(患者にはその都度インフォームド・コンセントを行い、了承を得て行った)、胆管内にカニュレを挿入して純粋胆汁を採取した。

採取した胆汁は一端冷凍保存野後、高速クロマトグラフで胆汁酸およびその抱合体を測定した。また、検査を行った全症例にはウルソサンを服用していないことを確認した。

また、渋谷らの報告書にある胆汁の採取も同様にERCP下の純粋胆汁採取を行った。

C. 研究結果

術前と術後の胆汁は8例に測定したが、術後の胆汁採取には乳頭形成術が殆どの症例で行われているために胆汁の自然流失が多く、胆汁の濃度が2.0mMOL/L以上の症例は3例しかなかった。その3例のGUDCの%組成比は術前術後(3カ月～4カ月後)では殆ど変化は見られなかった。また術前にERCPで採取した胆管胆汁と術中採取の胆嚢胆汁のGUDC%組成比は1:1.05と殆ど変化していなかった。このことより、術前の胆嚢内胆汁と術後の総胆管胆汁のGUDCの%組成比の比較は成立すると考えられた。また採取した胆汁の突然変異原修飾作用については渋谷らの報告書に記載した。

D. 考察および結論

GUDCは術前と術中の測定で、平均一カ月の間隔では殆どは変化はしていない。さらに、胆嚢がん切除後3カ月から4カ月後の胆汁成分は変化していないことを3症例で確認することができた。もし胆嚢がん性の増加であれば胆嚢がん切除後は速やかに回復するはずであるが、4カ月経過しても変化がないことは、がんと直接的な関連はないものと考えられる。このことは、胆汁中のGUDCは変異原物質に対し抑制すること、胆嚢がん切除を行っても最小限4カ月間は変化しないことを考慮して、GUDCの増加は体内に入った変異原物質に対しての防衛反応として増加している可能生を強く示唆するものと考えられる。

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

膵胆管合流異常症例の胆嚢粘膜p53 免疫染色に関する研究

土屋嘉昭 新潟県立がんセンター新潟病院

研究要旨

胆嚢がんの発生にはde novo 発生・adenomaのがん化・膵胆管合流異常からの発生が知られており、それぞれのがん化の機序は異なっていると考えられている。膵胆管合流異常では胆管非拡張例に胆嚢がんの合併が多いとされている。合流異常症例における胆嚢粘膜の病理組織学的所見について検討を行った。当科で切除された胆道がんを合併しない膵胆管合流異常症例6例を対象とし、p53はパラフィン切片を使って抗p53抗体を用いた胆嚢粘膜の免疫染色を行い陽性細胞のlabering indexを測定した。膵胆管合流異常症例は34歳から72歳(平均51.5歳)で女性4例男性2例であった。膵胆管合流異常症例の6例全例は胆管の拡張を伴い、5例に胆嚢には粘膜のhyperplasiaを合併していた。この胆嚢粘膜のp53免疫染色は6例中2例に陽性であった。陽性例のlabering indexは50%、24.2%であった。この2例はKi-67のlabering indexは18.6%、34.1%とp53陰性例に比べ高値を示し細胞増殖亢進状態が認められた。

また胆嚢粘膜の背景状態を胆石症・膵胆管合流異常と比較すると両者胆嚢粘膜は慢性胆嚢炎の形態を示しているが膵胆管合流異常症ではhyperplasia・fibromusclerosisを伴うものが多く、胆石症の胆嚢炎像とは異なっていた。

膵胆管合流異常でのがんの発生機序としては圧勾配により胆道内に膵液が逆流し、膵液と混ざった胆汁が鬱滞する事が重要な要因となっている。すなわちこの膵液と胆汁の鬱滞により、胆道感染が合併しこれによる慢性炎症・各種発がん物質の活性化・抑制物質の不活化、胆道粘膜の過形成、DNAの損傷、がん化が起こると考えられる。また通常型胆嚢がんでは背景の粘膜に過形成があることは少なく、腸上皮化生が多く見られておりがん発生の母地として重視されている。合流異常症例でがん非合併例で6例中5例は粘膜過形成を伴っておりすでにp53 染色陽性例が2例存在することは合流異常症の胆嚢粘膜はすでにがん発生の母体である可能性を示唆しているものと考えられた。

A. 研究目的

胆嚢がんの発生にはde novo 発生・adenomaのがん化・膵胆管合流異常からの発生が知られており、それぞれのがん化の機序は異なっていると考えられている。膵胆管合流異常では胆管拡張例に胆嚢がんが、非胆管拡張例に胆嚢がんの合併が多いとされている。最近、当科では胆管拡張を伴った膵胆管合流異常症例の胆嚢粘膜の過形成部にp53 over expression 症例を経験した。合流異常症例においてはこの胆嚢粘膜の過形成が胆嚢がんの発生に関与していると考えられるので切除症例の病理組織学的所見について検討を行った。

B. 研究方法

症例は当科で切除された胆道がんを合併しない膵胆管合流異常症例6例・胆石症8例・胆嚢がん23例を対象とした。p53はパラフィン切片を使って抗p53抗体をもちいた胆嚢粘膜の免疫染色を行い陽性細胞のlabering indexを測定した。また同様にKi-67・PCNA・CA-19-9・CEAの陽性率を測定した。この陽性率と胆嚢粘膜の各種病理組織学的所見と比較検討した。膵胆管合流異常症例6例は胆管の拡張を伴う症例で5例に嚢胞状拡張を1例に非嚢胞状拡張を認め、胆管切除・胆摘・胆道再建術が行われていた。

C. 研究結果

膵胆管合流異常症例は34歳から72歳(平均51.5歳)で女性4例男性2例であった。膵胆管合流異常症例の6例全例は胆管の拡張を伴い、5例に胆嚢には粘膜のhyperplasiaを合併していた。この胆嚢粘膜のp53免疫染色は6例中2例に陽性であった。陽性例のlabering indexは50%、24.2%であった。(Table1)この2例はKi-67のlabering indexは18.6%、34.1%とp53陰性例に比べ高値を示し細胞増殖亢進状態

が認められた。(Table2)

胆嚢粘膜の他の背景因子であるAtypical epithelium, non-neoplastic Immature epithelium, surface cell metaplasia, pseudopyloric gland metaplasia, goblet cell metaplasia, chronic cholecystitis, chronic active cholecystitis, Rokitansky-Aschoff sinus (RAS), cholesterosis, fibromusculosis (fms)の有無は特にp53 labering indexとの関連は認められなかった。(Table3, 4, 5, 6)

さらに胆石症(n=8)での胆嚢粘膜p53 labering indexは

1.3±2.4%,膵胆管合流異常(n=6)では13.3±20.7%,胆嚢がん(n=23)では38.1±35.2%であった。胆石症と胆嚢がん(P=0.037)、膵胆管合流異常と胆嚢がん(P<0.0002)で有意の差を認めた。

また胆嚢粘膜の背景状態を胆石症・膵胆管合流異常と比較すると両者胆嚢粘膜は慢性胆嚢炎の形態を示しているが膵胆管合流異常症ではhyperplasia・fibromusculosisを伴うものが多く、胆石症の胆嚢炎像とは異なっていた。(Table3, 6)

D. 考察

膵胆管合流異常では胆道がんが合併しやすいとされている。がんの発生機序としては圧勾配により胆道内に膵液が逆流し、膵液と混ざった胆汁が鬱滞する事が重要な要因となっている。すなわちこの膵液と胆汁の鬱滞により、胆道感染が合併しこれによる慢性炎症・各種発がん物質の活性化・抑制物質の不活化、胆道粘膜の過形成、DNAの損傷、がん化が起こると考えられる。小越しらは通常の胆嚢がんでは胆汁中のGUDCAが有意に高かったと報告している。杉山らは膵胆管合流異常症の胆汁では一次胆汁酸の増加はな

く、細胞障害作用の強いリゾレシチンの値が有意に高かったと報告している。また通常型胆嚢がんでは背景の粘膜に過形成があることは少なく、腸上皮化生が多く見られておりがん発生の母地として重視されている。合流異常合併胆嚢がんの多くは粘膜に過形成を母体に発生が見られており、通常型胆嚢がんとはその発がん過程が異なっていると考えられる。また胆嚢がんではp53 mutationが60%前後に見られとされている。われわれの合流異常症例でがん非合併例で6例中5例は粘膜過形成を伴っておりすでにp53 染色陽性例が2例存在することは合流異常症の胆嚢粘膜はすでにがん発生の母体である可能性を示唆しているものと考えられた。

E. 結語

膵胆管合流異常症の胆嚢粘膜はがん非合併例ですすでにp53 染色陽性例が存在し、この胆嚢粘膜はすでにがん発生の母体である可能性を示唆しているものと考えられた。

Table 1 膵胆管合流異常の胆嚢

症例性	胆管	胆道癌	その他	p53
1. 65 男	嚢胞状	-		50%
2. 45 女	拡張	-	胆管粘膜過形成	24.4
3. 34 女	嚢胞状	-	総胆管結石	3.2
4. 72 女	嚢胞状	-		0.8
5. 48 女	嚢胞状	-		0.4
6. 45 男	嚢胞状	-		0

Table 2 膵胆管合流異常の胆嚢

胆嚢粘膜免疫染色 Labeling Index(%)

症例性	p53	Ki-67	PCNA	CA-19-9	CEA
1. 65 男	50	18.6	77.8	100	0
2. 45 女	24.4	34.1	61.6	97.4	0
3. 34 女	3.2	12.8	77.4	100	0
4. 72 女	0.8	12.4	61.6	2.4	0
5. 48 女	0.4	16.6	80.5	92.8	0
6. 45 男	0	8.7	82.4	100	0

Table 3 膵胆管合流異常症における胆嚢の病理

症例	性	p53	hyperplasia	Atypical epithelium	non-neoplastic Immature epithelium
1. 65	男	50	+++	+++	-
2. 45	女	24.4	+	-	-
3. 34	女	3.2	++	-	-
4. 72	女	0.8	-	-	+
5. 48	女	0.4	++	-	++
6. 45	男	0	+	-	++
胆石症			1/8	0/8	4/8

Table 4 膵胆管合流異常症における胆嚢の病理

症例	性	p53	surface	Pseudopyloric Gland metaplasia	Goblet Cell metaplasia
1. 65	男	50	-	+	-
2. 45	女	24.4	-	+	-
3. 34	女	3.2	-	+	-
4. 72	女	0.8	-	++	-
5. 48	女	0.4	-	-	-
6. 45	男	0	+	+	-
胆石症			2/8	5/8	1/8

Table 5 膵胆管合流異常症における胆
囊の病理

症例	性	p53	Chronic cholecystitis	Chronic active cholecystitis
1. 65	男	50	+	-
2. 45	女	24.4	+	+
3. 34	女	3.2	+	-
4. 72	女	0.8	+	-
5. 48	女	0.4	+	-
6. 45	男	0	+	-
胆石症			8/8	3/8

Table 6 膵胆管合流異常症における胆
囊の病理

症例	性	p53	RAS	Cholesterosis	fms
1. 65	男	50	+	++	++
2. 45	女	24.4	+	+	+
3. 34	女	3.2	+	+	-
4. 72	女	0.8	-	-	+
5. 48	女	0.4	+	-	++
6. 45	男	0	+	+	++
胆石症			7/8	4/8	1/8

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

グリコウルソデオキシコール酸の変異原性修飾作用について

澁谷範夫（新潟医療技術専門学校）

秋山修宏、斎藤征史、土屋嘉昭、佐藤豊二、小越和栄（新潟県立がんセンター）

研究要旨

胆嚢がんの成因、特にイニシエーションに関連して、現在胆汁中物質の変異原性及び変異原性修飾作用について検討中である。今回は胆嚢がん患者の胆汁中に分画比の高いことが判明したグリコウルソデオキシコール酸（GUDCA）の変異原性修飾作用についてエームス法を用いて実験を行った。その結果、GUDCAそれ自体は変異原活性を示さないが、代謝活性化を必要とする既知の変異原物質の変異原活性を修飾することが判明した。興味深いことに、ベンゾ[a]ピレン（BaP）や芳香族アミン類に対しては助変異原性を示すものの、ヘテロサイクリックアミン（HCA）に対しては抗変異原性を示した。また、2-アセトアミドフルオレン（AAF）、ラット大腸ガン発がん物質N-メチルニトロソウレア（NMU）に対してもGUDCAは抗変異原性を示した。更にヒト胆汁（ブルーキチン吸着物質）の変異原性に対してもGUDCAはそれを抑制する傾向がみられた。

A. 研究の目的

我々はこれまで胆嚢がん発生の外的要因として最も可能性の高い胆汁成分について種々の検討加えてきた。特にがんのイニシエーションに関係するといわれる変異原性について焦点をを当て、胆汁自体の変異原性をはじめ、それを修飾する因子について現在研究中である。今回は胆嚢がん患者の胆汁中に分画比の高いことが判明したグリコウルソデオキシコール酸（GUDCA）の変異原性修飾作用についてエームス法を用いて実験を行い、胆嚢がんとの関連について検討する。

B. 研究方法

1) はじめにGUDCAの希釈列溶液をジメチルスルホキシド（DMSO）を溶媒として調製し、それらに一定量の既知変異原物質をそれぞれ添加したものを試料とした。既知変異原物質には1,8-ジニトロピレン（1,8-D）、4-ニトロキノリン-N-オキシド（4NQO）、2-アミノアントラセン（2AA）、2-アミノフルオレン（2AF）、ベンゾ[a]ピレン（BaP）、2-アセトアミドフルオレン（AAF）、Trp-P-1、Trp-P-2、I Q、MeIQ、MeIQx、N-メチルニトロソウレア（NMU）を用い、変異原性試験はSalmo

nella typhimurium TA98菌株及びTA100菌株を用いたエームス試験のプレート法で実施した。

2) ヒト胆汁のブルーキチンカラム吸着試料の中で僅かに変異原性が認められた試料よりDMSO溶媒を用いて希釈列溶液を調製し、これにGUDCA (10 μ mol) を加えた溶液の系と加えない系を変異原性試験に供した。変異原性試験はSalmonella typhimurium TA98菌株を用いたエームス試験のプレインキュベーション法で実施し、ラット肝S9 (PCB誘導) を加えた代謝活性化を行った。

C. 研究結果

1)

・代謝活性化の必要としない1,8-D、4NQOに対してはGUDCAの変異原性修飾作用は認められなかった。

・芳香族アミンの2AA、2AF及び多環芳香族炭化水素のBaPに対してはGUDCAの助変異原性が認められた。

・AAF及びHCAのTrp-P-1、Trp-P-2、IQ、MeIQ、MeIQxに対してはGUDCAの抗変異原性が認められた。

・発がん物質NMUに対してもGUDCAは抗変異原性を示した。

2)

僅かに変異原性を示したヒト胆汁のブルーキチンカラム吸着試料に対してもGUDCAはその変異原性を抑制した。

D. 考察

GUDCAの変異原性修飾作用が認められたのは代謝活性化を必要とする既知変異原物質であることを考えるとこのGUDCAの変異原性修飾作用はシトクロムP450酵素 (P450) 群などによる薬物代謝反応に関与するものと思われる。薬物代謝反応には大きく2つに分けて第1相反応と第2

相反応がある。第1相反応ではP450などによる変異原物質の活性化が行われ、第2相反応では抱合化酵素などによって第1相反応で生成された活性化体の解毒化が行われる。第1相反応の酵素であるP450には多種アイソザイムが存在し、変異原の種類によって活性化に関与する分子種の異なることが明らかになっている。

今回実験に使用した芳香族アミン類やHCA類は主にP450アイソザイムのCYP1A2で活性化され、BaPはCYP1A1で、NMUはCYP2E1でそれぞれ活性化される。当初我々はGUDCAがこのいずれかのアイソザイムの活性を特異的に上げることによって変異原活性を上げたり、またいずれかのアイソザイムの酵素反応を特異的に阻害することによって変異原活性を抑制しているのではないかと考えていた。ところがGUDCAは同じCYP1A2で活性化される芳香族アミン類とHCA類に対して一方では助変異原性を示し、もう一方では抗変異原性を示すという奇妙な結果となった。変異原性修飾作用を考える場合、やはり第1相反応による活性化経路だけでなく、第2相反応による解毒 (不活性化) の経路も検討する必要があると思われる。また、2AFとその代謝経路の1つと考えられるAAFに対するGUDCAの変異原性修飾作用が異なることも考慮に入れ、メカニズムについては更に検討が必要である。

一方UDCAがNMUによるラットの大腸がん発生を抑制することが最近報告され、その中では、UDCAはがん発生のプロモーションあるいはプログレッションに関与しているのではないかと指摘されている。しかし今回の我々の実験からそのグリシン抱合体であるGUDCAがNMUの変異原性を抑制することが判明し、また変異原活性が発がんのイニシエーション活性を意味していることを考えるとUDCAのラット大

腸がん発生の抑制作用はプロモーションあるいはプログレッションの他にイニシエーション段階での修飾作用も考えられる。

ヒト胆汁試料に対するGUDCAの変異原性抑制作用については試料数を増やし、変異原性のあるすべてのヒト胆汁試料にたいして共通するものなのかを確認する必要がある。そうすることによってGUDCAと胆嚢がんとの関連も明らかになるかもしれない。

E. 結論

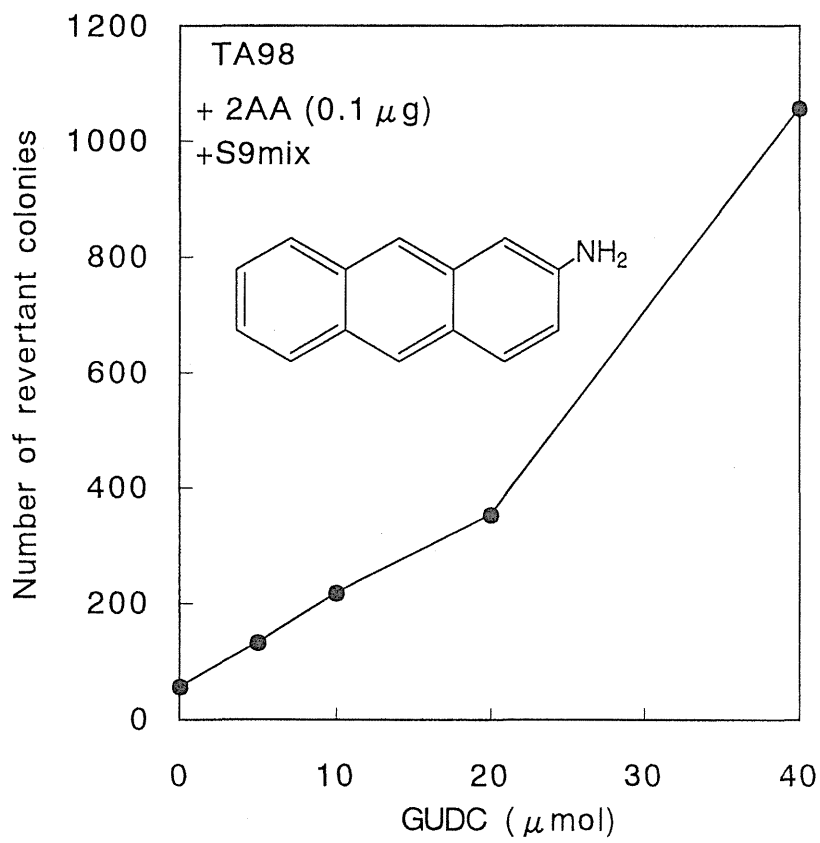
胆嚢がん患者の胆汁中分画比の高いGUDCAは、ヒト胆汁中に検出されるHCA類の変異原性を抑制すること確認された。また、一試料でヒト胆汁変異原性を抑制することも示された。今後試料数を多くし、ヒト胆汁変異原に対するGUDCAの抑制効果を明らかにするとともに胆嚢がんとの関連についても検討していきたい。

F. 研究発表

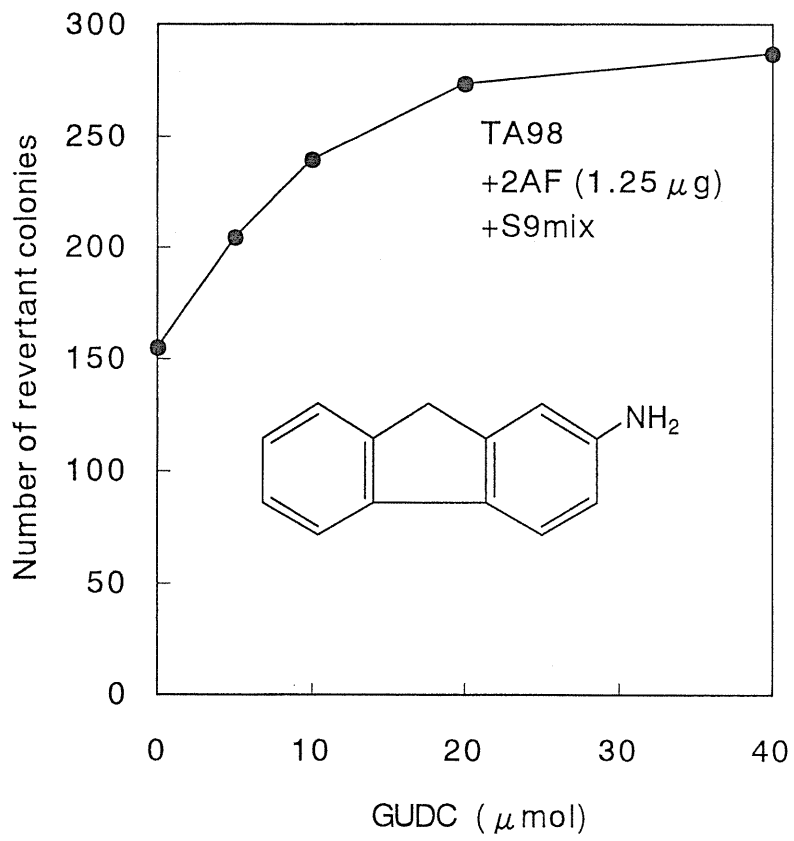
論文発表

1. Shibuya, N., Nakamura, K., Ogoshi, K., Ohota, T., Hori, Y., Kodama, K. and Yamamoto, M. Modification of Mutagenic Activities of Pro-Mutagens by Glyco-Ursodeoxycholic Acid in the Ames Assay. *Tohoku J. Exp. Med.*, 187: 1-9 (1999)

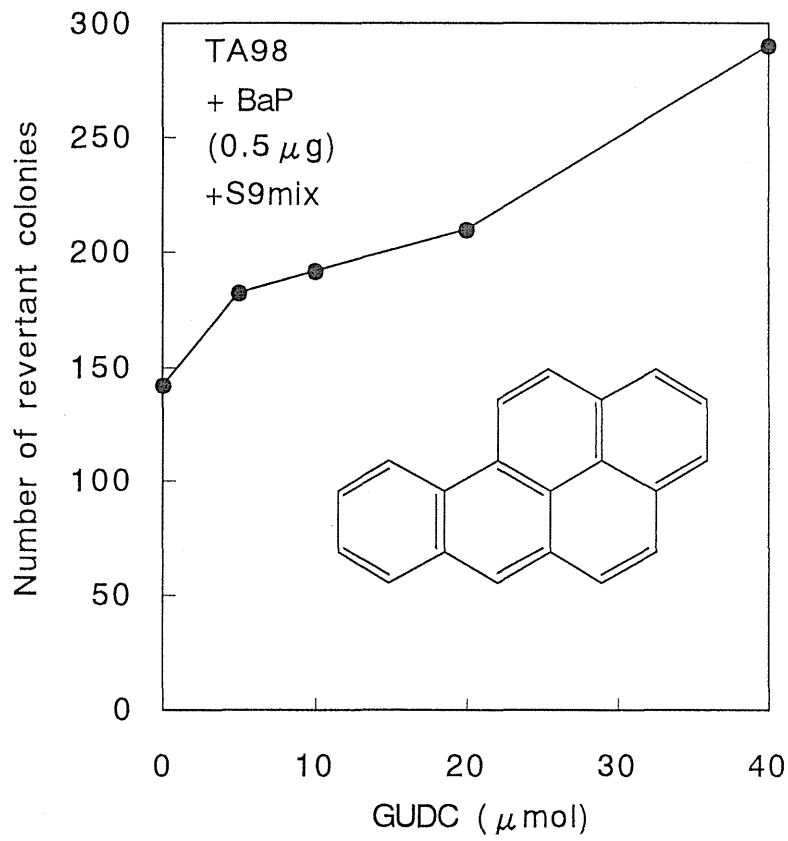
Glycoursodeoxycholic acid with
2AA



Glycoursodeoxycholic acid with
2AF



Glycoursodeoxycholic acid with
BaP



Glycoursodeoxycholic acid with
AAF

