

ラトキシシン B1 の曝露をしたラットの変異型 *Lacl* DNA では、おもに GC から TA の置換により突然変異が発生した。ラットの G から T への置換は 71%が CpG 領域であった。

ヒトの小腸で発現する *CYP3A7* 遺伝子と、変異を起こすターゲットとする *Escherichia coli* の *rspL* 遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作成した。これらのトランスジェニックマウスの小腸からマイクロソームを作成すると、*Salmonella* TA 98 を用いた Ames 試験でアフラトキシシンは高い変異原性を示す物質に変換された。

肝臓以外の臓器から作った S9 が代謝活性を示すことも知られている。

(b) TP mutations in animal tumours

ヒトでは高用量のアフラトキシシンに曝露されている地域の HCC 患者から突然変異が観察されるが、動物の腫瘍ではコドン 249 の G から T への置換がみられない。

メス AC3F1 マウスにアフラトキシシン B1 を腹腔内投与 (3 回/週、8 週間) し、6 と 14 ヶ月後に解剖を行った。71 匹に肺腫瘍がみつき、79%に p53 染色陽性が認められた。SSCP を測定するとエクソン 5、6、7 の異なるコドンに突然変異がみられた。ダイレクトシーケンシングを行うと G:C から A:T への置換と A:T から G:C への置換などが認められた。高い突然変異発生率とヘテロ染色パターンは TP53 変異がアフラトキシシン誘発性肺腫瘍形成の後の段階で起こっていることを示唆した。

Sprague-Dawley ラットにアフラトキシシン B1 (37.5 μ g、5 回/週、8 週間) を投与した。さらに一部肝切除を行ったあとに 20 週間にわたり実験を続けた。17 匹中 13 匹に病変がみられ、肝細胞腫瘍 (5)、肝臓に結節形成 (7)、両方 (1) が認められた。すべてのラットは 60 週間後に解剖を行い、肝腫瘍と結節形成について検討した。病変がみられたマウスについて PCR SSCP を行い、TP53 遺伝子をスクリーニングした。29%のマウスの肝臓に異常がみられたが、TP53 突然変異は検出できなかった。コドン 247 にサイレント突然変異を起こした例が 1 例あった。

アフラトキシシン B1 を BL9 ラット上皮細胞にトランスフェクトしたウズラの肝臓マイクロソームにより活性化した。しかしながら腫瘍が形成されても TP53 遺伝子の 242 から 244 コドンに突然変異は起こらなかった。

ヒト HBV を感染させたトガリネズミについてアフラトキシシン B1 誘発性突然変異発生の有無について検討した。8 匹中 4 匹に 12 週齢で HBV に感染させ、残りをコントロールとした。コントロールの半分と、HBV 感染個体にアフラトキシシン B1 (400 μ g/kg b.w.6 日間) 投与した。2 から 3 年齢で 5 匹に肝腫瘍 (HBV+アフラトキシシンで 4 匹、アフラトキシシンのみで 1 匹) が発生したが、TP53 突然変異はみられなかった。

アフラトキシシン誘発性の肝外腫瘍で TP53 突然変異が起こるかを検討した。サルを用いて胆管腫瘍、肝臓上皮の肉腫、頸骨骨原生腫瘍発生について検討した。これらの病変が形成されたにもかかわらず、コドン 249 突然変異は起こらなかった。ラットでは肺腫瘍を形成した個体に TP53 突然変異がみられた。

AC3F1 マウスのクララ細胞の Ki-ras 遺伝子に突然変異が起こるか検討したところ、アフラトキシン B1 誘発性の肺腫瘍ではクララ細胞の Ki-ras 遺伝子の変異が早期に起こることが分かった。

(c) Sequence-specific binding to DNA and induction of mutations

アフラトキシン B1 が代謝され、8,9 エポキシドになると、DNA と複合体を形成し、AFB1-N7-Gua を形成する。アルカリ環境下では AFB1-N7-Gua 複合体のイミダゾール環が開き、安定化する。アフラトキシンによる変異原性物質形成の前駆物質となる。

アフラトキシン B1 は DNA のグアニンと結合し、G から T へと置換する。しかし、DNA の修復機構に異常を起こすことにより他の突然変異を起こすことも知られている。GC 塩基部分に突然変異の発生がみられることが多い。50~70%は G から T への置換であったが、G から C の置換、G から A への置換もみられた。

E.coli の *Incl* 遺伝子でアフラトキシンによる変異について検討したところ大部分は GC 塩基に起こった。GC から TA の置換がほとんどであった。

ヒト CYP1A1 酵素を発現するヒトリンパ球芽細胞では、HPRT 遺伝子のエクソン 3 の 209 コドンに GC から TA の変異がみられた。

AFB1-N7-Gua 複合体による変異は G から T への置換が大部分 (74%) であり、G から A (13~18%)、G から C (1~3%) が続いた。置換は主に複合体の 5 末端側で起こり、全体の 13%を占めた。

過去の研究ではアフラトキシン B1 の結合は、グアニンと 5 末端部分のシトシンであることを示唆した。3 末端では G 塩基の修復が起こるため、反応性は乏しかった。しかしシトシンのメチル化がアフラトキシン B1 の結合に影響を及ぼさないかが不明であった。そこで CpG メチル化がアフラトキシン-8,9-エポキシドと TP53 遺伝子のコドン 248 と 249 を含むオリゴヌクレオチドの結合に影響を与えるかを検討した。さらにヒト HPRT 遺伝子のメチル化と非メチル化部分への結合について検討した。その結果シトシンのメチル化は、アフラトキシンがグアニンに結合することと関係ないことが明らかになった。一方で TP53 遺伝子 CpG 部分のメチル化がアフラトキシンの結合を促進することを示唆する実験もあった。この 2 の実験の違いは、標的塩基のシーケンスと方法、DNA 複合体検出方法の違いを反映したと考えられた。

p.242

4、5 Mechanistic consideration

4.5.1 Specificity of 249^{ser} mutation in the TP53 gene

アフラトキシン誘発性の DNA 損傷と、アフラトキシン汚染地域のヒト HCC 患者が TP53 遺伝子のコドン 249 で AGG から AGT で突然変異がみられることは多くの研究者が明らか

にした。アフラトキシン B1 によって引き起こされた TP53 突然変異を検出して明らかになったことは、G から T への塩基の置換が起こっているということである。DNA の損傷や TP53 遺伝子の突然変異で起こりうる特異的变化を調べた研究がいくつか報告されている。これらの研究は、アフラトキシン B1 が DNA 損傷とコドン 249 の 3 番目のヌクレオチドで突然変異を起こすことを示唆している。しかしながらヒト HCC でコドン 249 が標的となる頻度ははっきりしない。アフラトキシン B1-DNA 複合体が TP53 遺伝子の他の部位に結合しても、アミノ酸の変化や、p53 蛋白質の機能変化を起こして G から T への置換が起こる。しかしこれらの機序で突然変異が起こることはめったにない。

コドン 249^{ser} 突然変異が P53 蛋白質の機能に与える影響と、肝細胞に与える影響は重要である。TP53 遺伝子に 249^{ser} 突然変異が起こると *in vitro* で肝細胞が増殖し続けるとした。これらの細胞培養実験は 249^{ser} 突然変異により肝細胞に特異的増殖能を与えることを示しているが、ヒト HCC の TP53 遺伝子でこの突然変異を起こす頻度が高いのか十分な説明は出来ていない。また、これらの *in vitro* 試験では HBV 感染が起こったときや、TP53 遺伝子の 249^{ser} 突然変異が特異的に起こる理由は明らかにできなかった。Sohn らは HBx 遺伝子をトランスフェクトしたヒト肝臓上皮細胞は、アフラトキシン B1-8,9-エポキシド^oの細胞毒性とコドン 249 の突然変異とアポトーシス発生が起こりやすいとした。アフラトキシン B1-DNA 複合体の修復機構が変化する結果と考えられる。

p.243

4.5.2 Modulation of the effects of aflatoxin with chemopreventive agents

動物実験によってアフラトキシン B1 誘発性の腫瘍を予防する方法が研究されている。特に、ラットで肝臓 GST とアフラトキシンアルデヒドレダクターゼ (AFAR) を引き起こす薬品は、アフラトキシン-DNA と蛋白質複合体形成を減少させ、アフラトキシン誘発性の肝細胞ガンを抑制する。ヒトにおけるアフラトキシンの活性化と解毒化のバランスを調節する薬品は oltipraz と chlorophyllin である。

Oltipraz の解毒作用は、CYP1A2 を抑制し、アフラトキシン B18,9-エポキシド^oとアフラトキシン M1 の形成を抑制し、GST 酵素を誘導して、8,9-エポキシド^oグルタチオン複合体を増加させる。実際に oltipraz を摂取するとメルカプツール酸が増加し、尿中のアフラトキシン M1 濃度と血中アフラトキシン-アルブミン複合体量が低下した。

クロロフィリンは *in vitro* と *in vivo* で抗変異原性があることが示されている。アフラトキシン誘発性の肝細胞ガン発生の機序を検討すると、クロロフィリンはアフラトキシンと分子の結合を抑制することが明らかになった。実際にクロロフィリンを摂取させると、尿中の AFB1-N 7-グアニン複合体量が減少した。

4.5.3 Interactions of hepatitis B virus and aflatoxin

HCC 発生の多い地域では、HBV 感染とアフラトキシン曝露が同時に起こっていること

が多い。アジアのコホート研究では慢性的な HBV 感染とアフラトキシン摂取が HCC 発生を増加させることを示している。(セクション2) また、HBV トランスジェニックマウスとウッドチャックは HBV 発生に 2 つの要因が相乗作用を示すことを明らかにしている。この相乗効果の分子学的機序を解明することは HCC 発生を減少させることに役立つであろう。

ウイルスと発ガン性化学物質が相乗効果を示すメカニズムの 1 つとして、HBV 感染がアフラトキシン代謝酵素の発現を変化させることがあげられる。HBsAg の遺伝子を持つと CYP1A と 2A5 の発現が起こるが、肝臓障害にとどまる。CYP 酵素の誘導による肝障害が細菌や寄生虫の感染と関係することは他にも報告されており、HBV 特有の作用というよりは一般的な作用と考えられる。HBV による影響は CYP だけでなく、GST 酵素にも及ぶ。ヒトで CYP2A6 と CYP3A4 が活性化するのは肝炎ウイルス感染と関係する。HBV 感染では、GST 活性が顕著に低下している。

HBV 感染した個体のアフラトキシン代謝について検討した報告もある。コルチゾル代謝を CYP3A4 活性のマーカーとして測定し、アフラトキシン-アルブミン複合体との関係を検討した。CYP3A4 活性は、HBV 感染状態や複合体量と関係がみられなかった。さらに複合体と肝障害のマーカーであるトランスアミナーゼの間にも関係がなかった。ガンビアで成人の HBV 感染者と非感染者について尿中アフラトキシン-DNA 複合体量を測定したところ、両者の間に違いはみられなかった。これらのことから、アフラトキシン-アルブミン量と尿中のアフラトキシン-DNA 複合体は HBV 感染によって影響を受けないことが明らかになった。一方で、HBV に感染したガンビアの子供はアフラトキシン-アルブミン複合体の量が、非感染者に比べて高く、アフラトキシン代謝が変化することがわかった。中国でもこれらと類似したことが報告されている。

従って、HBV 感染はアフラトキシン代謝に強く影響を及ぼすことが明らかになったが、この影響は活性化と解毒に及ぼす複雑な機序であることがわかった。

HBV 感染とアフラトキシン曝露が相互作用を示す機序は発ガン性物質がウイルス感染と増殖に変化を及ぼすことによる。アヒルに肝炎ウイルスを感染させ、アフラトキシンを曝露させると肝臓や血清中のウイルス増殖のマーカーが増加した。アフラトキシンが、ヘパドナウイルス遺伝子発現を亢進させるという仮説を裏付けるものである。HBV をトランスフェクトしたヒトヘパドナ HepG2 細胞は HBV 発現に影響する転写因子を増加させる。

アフラトキシン曝露と HBV 感染が相互作用を示す機序はいくつか考えられるが、最も関係がある機序はわかっていない。

p.245

5、Summary of data report

5.1 Exposure data

アフラトキシンは *Aspergillus* 種が主に産生するカビ毒であり、暑く、湿度が高い地域で

産生がみられる。*Aspergillus flavus* は B アフラトキシンを産生する。*A. parasiticus* は B と G アフラトキシンを産生し、限局された分布を示す。アフラトキシンが産生される主な作物は、ピーナッツ、トウモロコシ、綿実などであり、*A. flavus* の汚染と関係する。ヒトがアフラトキシンに曝露される量は ng~mg/日程度であり、トウモロコシやピーナッツを摂取することによる。トウモロコシはフモニシンにもよく汚染されている。アフラトキシン M1 はアフラトキシン B1 の代謝産物である。ヒトはミルク（母乳を含む）を介してアフラトキシン M1 に ng/日程度曝露されている。バイオマーカーを測定することはアフラトキシンの曝露とその程度を知るために用いられている。

5.2 Human carcinogenicity data

IACA Monographs Volume 56 ではアフラトキシンがヒトの発ガン性物質として分類されている。

中国上海で行われた大規模なコホート研究は、肝細胞腫瘍のリスクが、尿中のアフラトキシン代謝産物や、B 型肝炎ウイルス抗体が陽性であると増加することを示唆した。日々のアフラトキシン摂取量は肝細胞腫瘍のリスクに関係しないことがわかった。

中国と台湾を対象とした疫学調査では、B 型肝炎ウイルス抗原陽性で肝ガンのリスクが増すことがわかった。また、アフラトキシン代謝産物と複合体をバイオマーカーとして測定したところ肝ガン発生患者でこれらの量が高いことがわかった。

中国キートンで行われたコホート研究では、アフラトキシンバイオマーカーとしての肝炎 B ウイルスのキャリアー状態と肝細胞ガン発症について検討した。アフラトキシン代謝産物と肝ガン罹患率には関係がみられることがわかった。

アフラトキシンの曝露量と肝炎ウイルスとアフラトキシンの影響を単独で評価することが難しいので、ヒトでの研究が容易にならない。

5.3 Animal carcinogenicity data

過去の IACA Monographs で明らかにされているアフラトキシンの発ガン性は以下の通りである。アフラトキシン B1、G1、M1>アフラトキシン B2>アフラトキシン G2。主な腫瘍は肝腫瘍である。

1993 年以降の実験動物を用いた発ガン性試験は、ラット、ニジマス、マウス、トガリネズミ、ウッドチャックに限定されている。ある条件下ではアンモニアにより飼料のアフラトキシン含有量を低下させ、ラットの肝腫瘍発生頻度を抑制することがわかった。牛の乾燥無脂肪乳を与えたニジマスではアンモニアを与えることにより肝腫瘍が低下することが明らかになった。アフラトキシン M1 は B1 に比べて腫瘍の発生がなかった。アフラトキシコールはアフラトキシン B1 に比べて腫瘍発生率がやや高かった。

TGF- β をトランスフォームしたトランスジェニックマウスでは、アフラトキシン B1 曝露後の肝細胞腺腫とガン発生率が増加した。アフラトキシン B1 による肝細胞腫瘍は TP53

遺伝子のヘテロ型と B 型肝炎ウイルス抗原をもつトランスジェニックマウスで顕著に増加した。TP53249^{ser} 突然変異は、B 型肝炎ウイルスとアフラトキシン B1 の相互作用によって増加するだけでなく、アフラトキシン曝露だけでも腫瘍の増加がみられる。

トガリネズミではアフラトキシン B1 曝露と B 型肝炎ウイルス感染を受けた個体で肝細胞腫瘍の発生率増加と発生までの時間短縮が認められた。

動物実験によるアフラトキシンの発ガン性検討は現在も続いている。

5.4 Other relevant data

ヒトのアフラトキシン B1 代謝について研究は進んでおり、アフラトキシン B18,9-エポキシ-ε-ポキシドに活性化して DNA 複合体を形成することが知られている。CYP1A2、3A4、3A5、3A7 と GSTM1 酵素が代謝を促進する。これらの酵素の発現が薬品によって DNA 複合体の形成と肝細胞腫瘍を抑制することが知られている。Oltipraz はグルタチオン結合を増加させ、チトクローム P450 酵素を阻害する。中国で oltipraz の臨床試験を行ったところ、アフラトキシン曝露後の代謝と DNA 複合体形成量が低下することが明らかになった。

アフラトキシン B1 は動物で免疫抑制をおこす。特に細胞性免疫反応に強く影響する。アフラトキシン曝露の結果、バクテリアと寄生虫感染に対する感受性が低下することが知られている。アフラトキシン B1 をヒト単球に曝露させると食食、殺菌活性やサイトカイン産生が低下した。

アフラトキシンはヒトの胎盤を通過する。アフラトキシン曝露は子供の成長抑制と関係がある。高用量のアフラトキシンを腹腔内に投与したマウスでは、奇形や胎児の体重減少がみられた。ラットでは、低用量の暴露で子供の体重が減少し、行動異常が認められた。雄雌ラットや雄ウサギでは、受胎能力の低下が起こることも知られている。

In vitro 試験により、アフラトキシン B1 が原核動物や真核動物の細胞に遺伝子毒性を起こすことが知られている。DNA やアルブミン複合体の形成と遺伝子突然変異、染色体異常などが起こりうる。

TP53 遺伝子のコドン 249 の G から T への置換はアフラトキシン曝露と関係がある。アフラトキシン B1-N7-グアニン複合体形成と G から T への変異が細胞や、モデル動物でみられる。コドン 249 突然変異はヒトの肝細胞腫瘍で検出されることが多いが、アフラトキシン B1 が結合して起こるのか、p53 蛋白質機能変化によって起こるのかははっきりしない。

近年では、分子レベルでの研究により B 型肝炎ウイルスとアフラトキシンの相互作用が肝細胞腫瘍発生を起こす機序が明らかになってきた。B 型肝炎ウイルスの感染はアフラトキシン代謝を亢進させる。B 型肝炎ウイルス-トランスジェニックマウスでは、肝障害がチトクローム P450 酵素発現と関係する。また、ヒトではグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性は、B 型肝炎ウイルス感染により低下する。しかしながら、アフラトキシンがガンを発症させる他の分子学的機序も考えられる。

5.5 Further research needs

*分子学的研究やバイオマーカーを発展させて利用する。

*アフラトキシン B1 と B 型肝炎ウイルスの相互作用や、両要因が肝細胞腫瘍を起こす機序について研究を進める。

*アフラトキシンと肝細胞腫瘍の関係を評価するバイオマーカーを疫学的研究に利用する。

*ヒトが摂取したアフラトキシンの動態を明らかにする。

*新たな疫学的研究を進める。例、肝炎ウイルスワクチン接種、アフラトキシン曝露と（制限した）B 型肝炎の感染を受けたヒトについてラテンアメリカを対象に進める。また、アフラトキシン B1 と C 型肝炎の相互作用が肝ガン発生に与える影響について検討する。

遺 伝 毒 性 関 係 文 献

G-001	EXPRESSION OF THE c-Ha-ras AND c-myc GENES IN AFLATOXIN B1-INDUCED HEPATOCELLULAR CARCINOMAS	Fumio Tashiro , Shigeru Morimura , Kenshi Hayashi , Reiko makino , Hideko Kawamura , Nobuo	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS(1986),138(2),858-64
G-002	Activation of ras oncogene in aflatoxin-induced rat liver carcinogenesis	S.SINHA , C.J.MARSHALL , M.A.KNOWLES , A.PROCTOR , N.C.BARRASS , AND G.E.NEAL	Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1988),85,3673-77
G-003	Susceptibility to Aflatoxin B1-related Primary Hepatocellular Carcinoma in Mice and Humans	Katharine A. McGlynn, Kent Hunter, Thomas LeVoyer, Jessica Roush, Philip Wise, Rita A. Michielli,	CANCER RESEARCH(2003)63,4594-4601
G-004	Forced expression of antisense 14-3-3 β suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo	Akinori Sugiyama, Yohei Miyagi, Yuko Komiya, Mobuya Kurabe, Chifumi Kitanaka, Naoko Kato, Yoji	Carcinogenesis(2003),24(9),1549-1559
G-005	Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas	I.C.Hsu , R.A.Metcalf , T.Sun , J.A.Welsh , N.J.Wang & C.C.Harris	Nature(1991),350,427-28
G-006	Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa	Brigitte Bressac , Michael Kew , Jack Wands & Mehmet Ozturk	NATURE(1991),350,429-31
G-007	Identification of differentially expressed genes in aflatoxin B1-treated cultured primary rat hepatocytes and Fischer 344	Harris, A.J., Shaddock, J.G., Manjanatha, M.G., et al.	Carcinogenesis(1998),19,1451-1458
G-008	Identification of an activated c-Ki-ras oncogene in rat liver tumors induced by aflatoxin B1	McMahon, G., Hanson, L., Lee, J.J. & Wogan, G.	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America(1986),83,9418-9422
G-009	Molecular and cellular events associated with aflatoxin-induced hepatocarcinogenesis	Gerald N. Wogan	Pure & Appl. Chem.(1989),61(1),1-6

論文番号	G-001
タイトル	Expression of the c-Ha-ras and c-myc genes in aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma
雑誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications
巻	138
最初のページ～最後のページ	pp858-864
発行年	1986
著者名(姓.名)	Tashio, F., Morimura, S., Hayashi, K., et al.

要約

アフラトキシンB1(5週令から8週間以上に亘って同量ずつ40回ほどアフラトキシンB1を経口投与し、ラット当たりの投与総量は1.5mg)で処理された7匹のフィッシャー雄ラットから得られた肝細胞由来の7つの癌細胞に対してc-ガン遺伝子群の発現と活性化を調べた。その結果、c-Ha-rasとc-mycガン遺伝子はすべてのガン細胞で高い発現を示していた。さらに供試した癌細胞のうちの一つであるT2-1ガン細胞では、c-myc遺伝子が肝細胞の腫瘍部分で再構成もなく、増幅していた。しかしながら、N-ras遺伝子に特異的な転写は供試したガン細胞では認められなかった。またc-fos遺伝子の転写もガン細胞および対照肝細胞で認められなかった。以上のことから、c-mycとc-Ha-ras遺伝子の発現増加あるいは制御不可はアフラトキシンB1で誘導されたガン細胞の発達に重要な役割を演じていることが示唆された。

論文番号	G-002
タイトル	Activation of ras oncogene in aflatoxin-induced rat liver carcinogenesis
雑誌名	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
巻	85
最初のページ~最後のページ	p3673-3677
発行年	1988
著者名(姓.名)	Sinha, S., Webber, C., Marshall, C.J., et al.

要約

フィッシャー雄ラットで4つの初代アフラトキシン誘導ラット肝腫瘍細胞、この腫瘍細胞から派生した2つの細胞株、肝上皮細胞由来の非形質転換細胞株、およびin vitroでアフラトキシンB1で形質転換した肝上皮細胞株を用いて、活性化した形質転換遺伝子の存在を調べた。なお、アフラトキシン処理群はアフラトキシンをラットの餌に混ぜ、最終濃度でAFB1が1ppm、AFG1が0.3ppm与えられた。この処理は生後3週間目から始めて8週目まで続けられた。これらの細胞から抽出したDNAをNIH 3T3細胞に移入したが、フォーカス(単層で増殖する細胞が重層的に増殖する細胞からなるコロニー:ガン化のマーカー)は形成しなかった。抗生物質G418耐性となる遺伝子とともに抽出したDNAを共移入し、この抗生物質G418に抵抗性を示した細胞をヌードマウスに移植して腫瘍性を調べたところ、非形質転換細胞株を除いたすべての細胞は腫瘍性を示した。これらの初代のヌードマウス腫瘍細胞から抽出したDNAをNIH 3T3細胞に移入したところ、フォーカスを形成し、その性質は連続的に移入試験を繰り返しても維持された。放射性同位元素でラベルされたプローブを用いて調べると、すべての検体から活性化されたrasガン遺伝子が検出された。N-ras遺伝子の活性化は3つの初代ラット肝腫瘍細胞と肝癌細胞株から検出された。Ki-ras遺伝子の活性化は1つの初代ラット肝腫瘍細胞で認められ、Ha-ras遺伝子の活性化はin vitroでアフラトキシンB1で活性化されて形質転換した細胞株で認められた。さらに活性化されたKi-rasガン遺伝子は合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いた実験から、コドン12の2番目のヌクレオチドでG→Aの遺伝子転位があったことが判明した。

Table 1. Transfection of aflatoxin-activated transforming genes

DNA source	Nude mouse tumors, no./no. examined	Second round focus-forming efficiencies of DNA from nude mouse tumors, foci per 100 µg of DNA	Oncogene detected
Rat liver	1/5	1*	—
BL8	0/5	—	—
BL9	1/5	—	—
L6	5/5 (10 days)	7, 10, 9†	Ha-ras
JB1	3/5 (3-4 weeks)	3, 10, 50	N-ras
BL10	2/3 (3-4 weeks)	4, 7	N-ras
A‡	1/5 (3 weeks)	5	N-ras
B‡	2/5 (3-4 weeks)	3, 10	Ki-ras
C‡	3/5 (2-3 weeks)	6, 2, 12	N-ras
D‡	2/5 (3-4 weeks)	9, 11	N-ras

Information in parentheses indicates time by which all tumors were evident.

*No foci were found in the next round of transfection.

†Only three nude mouse tumors were tested.

‡Primary tumors.

論文番号	G-003
タイトル	Susceptibility to Aflatoxin B1-related Primary Hepatocellular Carcinoma in Mice and Humans
雑誌名	Cancer Research
巻	63
最初のページ~最後のページ	pp4594-4601
発行年	2003
著者名(姓.名)	McGlynn, K.A., Hunter, K., LeVoyer, T., et al.

要約

動物モデルや人の疫学的な調査などによる様々な手法から、病気に対する感受性の違いを遺伝学的に説明する研究が行われた。珍しいことに2つの手法が同時に使われたが、それはそれぞれの方法がもつ欠点を補うかたちで進められた。肝細胞のガン化(HCC)へのアフラトキシンB1に関連する感受性を遺伝学的に理解するために両方を試みた。AFB1の摂取はHCCがありふれている世界の多くの地域でHCCへの主要な危険因子である。AFB1の活性中間代謝物であるAFB1-exo-8,9-epoxideを無毒化する能力は人によって様々であることは不確かであるが、なぜその代謝物に暴露された人すべてがHCCになるわけではないことで説明されることと思われる。231例のHCCと256例の対照との研究で、無毒化への人の多様性があるかどうかを明らかにするために、AFB1の無毒化に関与する遺伝子群の2つのグループ、グルタチオン-S-転移酵素(GSTs)とエポキサイド水酸化酵素(EPHX)、で11の遺伝子座を遺伝学的に位置づけた。多数の比較を行ったのち、残ったエポキサイド水酸化酵素ファミリーの2遺伝子座にある1つの多型だけがHCCとの関連性がかなり認められた。さらに感受性の座が存在するかどうかを明らかにするためにアフラトキシンB1で誘導されるHCCを調べるためにマウスモデル系を構築した。2種のありふれた繁殖系マウス(C57BL/6JとDBA/2J)から7日令マウスの感受性を評価した。DBA/2JマウスはC57BL/6JマウスよりアフラトキシンB1で誘導されるHCCに3倍以上感受性があり、さらにアフラトキシンの急性毒性にもより感受性があった。2種の繁殖系における生体異物を新陳代謝させる遺伝子の解析は3つの遺伝子、Gsta4、Gstt1、Ephx1に1つのヌクレオチド多型を明らかにした。GSTT1とEPHX1の座は人の全集団研究においてHCCに関連性は認められないが、GSTA4でのある多型はある群の男性における危険性とおおむね関係があった。マウスモデル実験はp53の欠損と不全がガン化の発達に必要なではないことも明らかにした。以上の結果から、人とアフラトキシンB1感受性マウスモデルの研究から得られた結果の比較は肝ガン化への新たな洞察を与えるかもしれないことを示唆した。

論文番号	G-004
タイトル	Forced expression of antisense 14-3-3 β RNA suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo
雑誌名	Carcinogenesis
巻	24
最初のページ~最後のページ	pp1549-1559
発行年	2003
著者名(姓.名)	Sugiyama, A., Miyagi, Y., Komiya, Y., et al.

要約

14-3-3ファミリータンパク質は多くの生物で見出されるリン酸セリンに特異的に結合するタンパク質で、悪性の形質転換を含む様々なシグナル変換系の鍵的制御因子である。以前、われわれは14-3-3 β 遺伝子の発現はアフラトキシンB1で誘導された肝腫瘍細胞K1とK2ではc-mycガン遺伝子と同様に制御されていないことを発見した。腫瘍細胞増殖での14-3-3 β 遺伝子の関係を説明するために、この論文ではK2細胞の増殖と腫瘍化でのアンチセンス14-3-3 β RNA遺伝子の強制発現の影響を調べた。アンチセンス14-3-3 β cDNA発現ベクターを移入したK2細胞は単層培養で、半固体培地での細胞増殖能が減少した。また、血管上皮生育因子mRNAの発現レベルは移入細胞では減少した。ヌードマウスに移植して形成された腫瘍は大変小さく、親細胞との比較で有糸分裂が減少していたことから、組織学的には良性腫瘍であった。末端デオキシリボ核酸転移酵素を介したdUTPニック端ラベル法(TUNEL法)でアポトーシスの発生頻度を調べると、新脈管形成阻害に伴って移入由来の腫瘍細胞でアポトーシスの頻度は増加していた。さらに14-3-3 β mRNAの過剰発現が様々なマウス由来の腫瘍細胞株で観察された。以上の結果から、14-3-3 β 遺伝子はin vitroおよびin vivoの腫瘍細胞の異常な増殖で中枢的な役割を果たすことが示唆された。

論文番号	G-005
タイトル	Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas
雑誌名	Nature
巻	350
最初のページ～最後のページ	pp427-428
発行年	1991
著者名(姓.名)	Hsu, I.C., Metcalf, R.A., Sun, T., et al.

要約

B型肝炎ウイルスとアフラトキシンB1が危険因子であるため、中国のQidongで肝細胞腫瘍(HCC)の高発生地域のHCC患者らから得たガン細胞で腫瘍抑制遺伝子とされているp53遺伝子の変異を調べた。その結果、16HCCのうち8つでコドン249の3番目の塩基が点変異していた。7つのHCC遺伝子検体でG→Tの遺伝子転換とその他のHCC遺伝子検体でG→Cの遺伝子転換は変異原性試験でアフラトキシンB1で生じた変異の報告と一致していた。エクソン5、6、8あるいはエクソン7の残りで見出された変異はなかった。これらの結果は人の肺、結腸、食道、胸部のガンや肉腫などでこれまで報告されたp53の変異とは異なっていた。変異は主にコドン249を含む進化的に保存された5つのドメインのうち4つで散見できた。以上のことから、変異したp53タンパク質は発ガン時に肝細胞の細胞複製を拡張する選択性に関係していることが示唆された。

TABLE 1 Mutations in p53 in hepatocellular carcinoma

Case	Age	Sex	Grade of HCC	HCC size (cm)	p53 Mutations (codon 249)
84-1	44	M	II	5 × 4	WT
84-2	33	F	II	14 × 10	WT
84-3	49	M	III	11 × 10	AGT
84-4	60	M	II	4 × 4	WT
84-5	58	F	III	10 × 7	AGT
89-12	39	F	II	11 × 8	WT
89-13	35	F	II	5 × 5	AGC
89-14	65	M	II	11 × 5	WT
89-15	54	M	II	13 × 6	AGG/AGT
89-16	37	M	II	10 × 15	AGG/AGT
90-1	31	M	II	3 × 3	AGT
90-2	52	M	II	5 × 4	WT
90-3	35	M	II	6 × 4	AGT
90-4	39	M	III	5 × 5	WT
90-5	40	M	III	9 × 10	WT
90-6	38	M	III	6 × 7	AGG/AGT

Cases 1-5: The liver DNA samples were isolated in 1984 from patients with primary hepatocellular carcinoma. The rest of the samples were collected from patients in 1989 and 1990. The histological grade was determined²³. WT, Wild type with normal codon 249 (AGG); AGG/AGT, heterozygote with both wild-type and mutant bands present for the third base pair of codon 249; AGT or AGC, mutant sequencing phenotypes giving only one band for the third base pair of codon 249. No mutations were observed in exons 5, 6 and 8 and in the codons of exon 7 other than 249. Non-tumour tissue for all cases in which the tumour was mutated at codon 249 were sequenced for exon 7. All of these samples were wild-type.

論文番号	G-006
タイトル	Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa
雑誌名	Nature
巻	350
最初のページ~最後のページ	pp429-431
発行年	1991
著者名(姓.名)	Bressac, B., Kew, M., Wands, J. & Ozturk M.

要約

肝細胞のガン化(HCC)はサハラ砂漠以南のアフリカと東アジアで主要なガンである。B型肝炎ウイルスとアフラトキシンがHCCの危険因子であるが、人の肝細胞のガン化の分子的機序は明らかにされていない。構造での異常化と腫瘍抑制遺伝子p53の発現がHCC細胞株で頻繁にあり、17p染色体の対立遺伝子欠損が中国と日本由来のHCC細胞で見出されてきた。ここでは南アフリカの初代HCC細胞の50%で見出された17p染色体の対立遺伝子欠損とp53遺伝子の変異を報告する。検出された5つの変異のうち4つはコドン249でのGからTへの置換であった。この変異の特異性は特殊なガン原性物質に暴露されることが影響していると言える。その候補の一つはアフラトキシンB1で、アフリカの食品汚染物質であり、GからTへの置換を誘導し、肝臓に特異的な発がん性物質である。

TABLE 1. Mutations in the p53 gene in hepatocellular carcinomas from southern Africa

Patient	HBV*	Cirrhosis	Tumour†	17p LOH‡	Mutation detected§		
					Codon	Nucleotide	Amino acid
1	No	No	Late	NI			
2	NT	No	Late	No			
3	Yes	No	Early	No			
4	Yes	No	Early	Yes	249	AGG to AGT	Arg to Ser
5	Yes	No	Late	Yes	285	8-bp deletion	Frame shift
6	Yes	No	Late	NT	157	GTC to TTC	Val to Phe
7	Yes	No	Late	NT			
8	Yes	Yes	Early	NI			
9	Yes	Yes	Late	NI	249	AGG to AGT	Arg to Ser
10	Yes	Yes	Late	Yes	249	AGG to AGT	Arg to Ser

* Hepatitis B virus infection as determined by the presence of hepatitis B surface antigen or antibodies against it and/or hepatitis B core antigen in the serum. NT, not tested.

† Tumours were designated as early or late on the basis of tumour size (small, less than 5 cm in diameter; moderately small, 5-10 cm; large, greater than 10 cm) and patient prognosis. Late tumours were large (or massive) and patients died within days or a few weeks after admission to hospital. Early tumours were small or moderately small and surgically resected.

‡ Loss of heterozygosity on chromosome 17p, determined using pYN22.1 probe¹⁴ (Fig. 1) or by the analysis of p53 gene alleles by southern blotting of BamI or ScaI-digested genomic DNA using a human p53 cDNA probe¹⁵ (patient 3). NI, not informative; NT, not tested.

§ Mutations in exons 5 to 8 were determined as described for Fig. 1. To eliminate inconsistencies arising from PCR errors²³, control experiments were included. The absence of mutations in tumours 1, 2, 3, 7 and 8 was demonstrated by the complete sequencing of 5-7 clones individually. The presence of mutations in tumours 4, 5, 6, 9 and 10 was confirmed by direct sequencing of a second PCR product from each tumour DNA. All mutations were somatic and tumour-specific as determined by restriction enzyme analysis using HhaII for patients 4, 8 and 10 (Fig. 2, top). The tumour-specific loss of the 7bp recognition sequence at codon 157 (GCCG + GGGT) for patient 6 was demonstrated by digestion of an F1-R1 primer-PCR product (data not shown; for details of primers, see Fig. 1 legend). Tumour-specific deletion of an 8-bp sequence in patient 5 was demonstrated by analysis of a fragment generated by HhaI digestion of an F3-R2 primer-PCR product, which was 45 bp long in the wild-type and 37 bp in the mutant p53 gene (not shown).

論文番号	G-007
タイトル	Identification of differentially expressed genes in aflatoxin B1-treated cultured primary rat hepatocytes and Fischer 344
雑誌名	Carcinogenesis
巻	19
最初のページ～最後のページ	pp1451-1458
発行年	1998
著者名(姓.名)	Harris, A.J., Shaddock, J.G., Manjanatha, M.G., et al.

要約

アフラトキシンB1 (AFB1)は、ラットや人における変異原および肝発ガン性物質で、特にアフリカとアジアのある地域で人に供給される食糧の汚染物質である。遺伝子発現でAFB1による変化は毒性、免疫抑制および発ガン性を引き起こす役割ををすると思われる。遺伝子制御を変調させるAFB1の役割を知ることはAFB1による発ガン性の仕組みの解明につながる。培養した初代ラット肝細胞由来のRNAでAFB1と反応する遺伝子を同定するために3つのPCR (DD-PCR, RDA, SSH)による消去法を用いた。1つのPCR法以上で分離された個々のcDNAはなかったが、3つの方法のいずれもAFB1で反応する遺伝子を同定した。分離された9つのcDNAはAFB1暴露の結果として特異的に発現した8つの遺伝子と対応していた。AFB1処理後、培養した初代ラット肝細胞で増加したmRNAの遺伝子はコルチコステロイド結合グロブリン (CBG)、チトクロームP450 4F1 (CYP4F1)、アルファ-2-マイクログロブリン、C4b-結合タンパク質、血清アミロイドA-2、およびグルタチオン-S-転移酵素Yb2 (GST)であった。トランスフェリンと小さなCYP3A様cDNAのmRNAレベルは暴露後に減少した。普通の長さのCYP3A mRNAは増加した。アフラトキシン処理したオスF344ラットから得た肝RNAの場合はトランスフェリンmRNAは減少したが、他のmRNA (CBG, GST, CYP3A, CYP4F1)では増加した。以上の結果から、これらの特異的な発現がアフラトキシン暴露と関連した毒性に影響していることが示唆された。

論文番号	G-008
タイトル	Identification of an activated c-Ki-ras oncogene in rat liver tumors induced by aflatoxin B1
雑誌名	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
巻	83
最初のページ~最後のページ	pp9418-9422
発行年	1986
著者名(姓.名)	McMahon, G., Hanson, L., Lee, J.J. & Wogan, G.

要約

離乳したオスのフィッシャーラットに2ヶ月以上に亘ってアフラトキシンB1(ラット1日当たり25 μ g)を40回腹腔内に投与した。この長期摂取は供試したすべてのラットに増殖フォーカス、新生物発生前の塊、および肝細胞ガンの連続形成をもたらした。形質転換したDNA配列の存在はNIH3T3マウス線維芽細胞に腫瘍由来のDNAを移入したのち、固定しないフォーカスの形成によって検出した。8匹のラットから得た個々の腫瘍由来のゲノムDNAの移入はDNAの μ g当たり0.05~0.2フォーカスの特異的形質転換活性を示した。初代移入DNAはc-Ha-ras、c-Ki-ras、およびN-rasガン遺伝子と相同なDNAプローブで交雑し、ノーザンプロット法で解析した。ラット由来のc-Ki-rasガン遺伝子がかなり増幅され、8匹中2匹の腫瘍由来の形質転換細胞で検出された。また形質転換細胞のいずれからもc-Ha-ras、N-ras配列の存在を示唆した結果は得られなかった。対照肝臓DNA試料と比較すると、初代肝腫瘍DNAの解析はKi-rasDNAの増幅を示さなかった。c-Ki-ras p21タンパク質レベルの増加は活性化したラットc-Ki-ras遺伝子を含むNIH3T3の形質転換細胞で見出された。形質転換したフォーカスを誘導できるラット由来のc-Ki-ras配列の存在はc-Ki-ras遺伝子が肝腫瘍の初期で活性化されているためである。

論文番号	G-009
タイトル	Molecular and cellular events associated with aflatoxin-induced hepatocarcinogenesis
雑誌名	Pure and Applied Chemistry
巻	61
最初のページ～最後のページ	pp1-6
発行年	1989
著者名(姓.名)	Wogan, G.N.

要約

アフラトキシンB1は強い発ガン性物質で、多くの実験動物の肝臓にガンを形成する。最近、実験データとアフラトキシンに暴露された人の集団に関する疫学的な研究から人の発がん性物質に分類されている。9、10エポキシドに代謝活性された結果、DNAとの共有結合はガン化への明確な出発点である。動物組織での共有結合の全レベルがアフラトキシンB1のガン化力と臓器特異性に定量的に関係している。DNAへの共有結合は動物でのアフラトキシン摂取量と直線的に関係しているため、防御剤の効果はDNA結合を減少させることである。アフラトキシンB1は9、10エポキシドの代謝活性によってグアニンのN7の位置でのみDNAと共有的に付加を形成し、エポキシ化が行われるすべての細胞(哺乳類、微生物、植物)で質的に類似の付加物が見出されている。しかしゲノムDNAにおいてN7グアニン付加体の形成は無作為ではない。付加物の形成は未転写領域と比べ、積極的に転写される遺伝子配列で高い。DNAでのアフラトキシンB1-N7グアニン付加体は不安定で、速やかに浄化されるか、安定なホルムアミド-プリミジル(PAPY)誘導体に転換される。ラット肝臓での付加体形成と除去の動的速度は、アフラトキシンB1の単発暴露か複数暴露かによって決まってくる。付加体レベルが2時間で最大値まで達すると、半減に7.5時間要し、摂取後24時間以内にPAPY誘導体のみが残る。この誘導体は長期間安定で、摂取の繰り返しとともに蓄積する。アフラトキシンB1がDNA付加体を形成する潜在力は前核生物から人を含む様々な哺乳類など広範囲の細胞での変異原性にも関係している。それは他の染色体異常誘発反応と同様に娘染色体交叉、組み換え、染色体異常のような遺伝毒性を誘発する。細菌細胞ではアフラトキシンB1による変異はGからTへの転換、あるいはGからAへの転位である。このことはアフラトキシンB1によって誘発された肝腫瘍でKi-rasガン遺伝子が活性化されたことが最近明らかになったことに関連している。ガン遺伝子活性化の研究から、多くの腫瘍が12番目から14番目のコドンで1個の塩基変異があるKi-ras配列が明らかとなった。GからAへの転位が少し認められたが、その変異は主にGからTへの転換であった。この発見は、アフラトキシンB1とDNAの付加体形成の結果としてガン遺伝子に変異し、腫瘍形成の開始につながるという推測と一致している。現在、新生物発生前の肝臓で変異した対立遺伝子が出現する時期や頻度を明らかにする研究が行われている。

毒性関係文献

T-1	Short-term moderate aflatoxin B1 exposure has only minor effects on the gut-associated lymphoid tissue of Brown Norway rats	Watzl,B.,Neudecker,C.,Hansch,G.M.,Rechkemmer,G.,Pool-Zobel,B.L	Toxicology,138,93-102(1999)
T-2	Immunotoxicity of Aflatoxin B1 in Rats: Effects on Lymphocytes and the Inflammatory Response in a Chronic Intermittent Dosing Study	Hilton,D.M.,Myers,M.J.,Raybourne,R.A.,Francke-Carroll,S.,Sotomayor,R.E.,Shaddock,J.,Warbritton,A.,and CHOU,M.W.	Toxicological Sciences,73,362-377(2003)
T-3	Aflatoxin B1-induced suppression of nitric oxide production in murine peritoneal macrophages	Moon,E.Y.,Han,J.J.,Rhee,D.K.,Pyo,S.	Journal of Toxicological and environmental Health,Part A,55,517-530(1998)
T-4	In vitro suppressive effects of aflatoxin B1 on murine peritoneal macrophage function	Moon,E.Y.,Rhee,D.K.,Pyo,S.	Toxicology,133,171-179(1999)
T-5	Suppression of the interleukin-2 gene expression by aflatoxin B1 is mediated through the down-regulation of NF-AT and AP-1 transcription factors	Han,S.H.,Joen,Y.J.,Yea,S.S.,Yang,K.H.	Toxicology Letters,108,1-10(1999)
T-6	Dose systemic exposure to aflatoxin B1 cause allergic sensitization?	Kocabas,C.N.Sekeral,B.E.	Allergy,58,363-365,(2003)
T-7	Consequence of Aflatoxin B1 Ingestion on the Membrane-Bound Liver Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase of protein-Undernourished Fischer F344 Rats	Adenuga,G.A.	Bioscience Reports,21,873-877(2001)
T-8	The effect of mycotoxins,fumonisin B1 and aflatoxin B1, on primary swine alveolar macrophages	Liu,B.H.,Yu,F.Y.,Chan,m.H.,Yang,Y.L.	Toxicology and applied Pharmacology,180,197-204(2004)
T-9	Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B1 in the Salmonella microsuspension assay	Loarca-Pina,G.,Kizimicky,P.A.,de Mejia,E.G.,Kado,N.Y.	Mutation Research,398,183-187(1998)
T-10	Aflatoxin B1 is an inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity	Bonsi,P.,Augusti-Tocco,G.,Palmeri,M.,Giorgi,M.	General pharmacology,32,615-619(1999)
T-11	Potency of dietary indole-3-carbinol as a promoter of aflatoxin B1-initiated hepatocarcinogenesis: results from a 9000 animal tumor study	Oganesian,A.,Hendricks,J.D.,Pereira,C.B.,Ormer,G.A.,Bailey,G.B.,Williams,D.E	Carcinogenesis,20,453-458(1999)
T-12	Immunobiological effects of AFB1 and AFB1-FB1 mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats.	Theumer,M.G.,Lopez,A.G.,Masih,D.T.,Chulze,S.N.	Toxicology,186,159-170(2003)
T-13	Interaction of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in short-term carcinogenesis model in rat liver	Gelderblom,W.C.A.,Marasas,W.F.O.,Lebepe-Muzur,S.,Swanevelde,S.,Vessey,c.J.,de la M Hall,P.,	Toxicology,171,161-173(2002)
T-14	Toxicity,metabolism,and impact of mycotoxins on humans and animals	H.S.Hussein and J.M.Brasel	Toxicology,167,101-134(2001)
T-15	Mutagenic activity of carcinogens detected in transgenic rodent mutagenicity assays at dose levels used in chronic rodent cancer	Schmezer,P.,Eckert,C.,Liegibel,U.M.,Zelezny,O.,Klein,R.K.	Mutation Research,405,193-198(1998)
T-16	Co-mutagenicity of coumarin(1,2-benzopyrine) with aflatoxin B1 and human liver S9 in mammalian cells	Goeger,D.E.,Hsie,A.W.,Anderson,K.E.,	Food and chemical toxicology,37,581-589(1999)
T-17	Aflatoxin B1 induced hepatic mutations in splenic lymphocytes of Fischer 344 rats. Result of an intermittent feeding study	Morris,S.M.,Aidoo,A.,Chen,J.J.,Chou,N.W.,Casciano,D.A.	Mutation research,423,33-38(1999)
T-18	Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin	Sekijima,M.,Tsumumi,T.,Yoshida,T.,Harada,T.,Tashiro,F.,Chen,G.,Yu,S-Z,Ueno,Y.	Carcinogenesis,20,161-165(1999)
T-19	Acquired tolerance of hepatocellular selenium deficiency: a selective survival mechanism?	Irmak,M.B.,Ince,G.,Ozturk,M.,Cetin-Atalay,R.	Cancer research,63,6707-6715(2003)
T-20	Fumonisin B1 promotes aflatoxin B1 and N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine initiated liver tumors in rainbow trout	Carlson,D.B.,Williams,D.E.,Spitsbergen,J.M.,Ross,P.F.,Bacon,C.W.,Meredith,F.I.and Riley,R.T.	Toxicology and applied pharmacology,172,29-36(2001)
T-21	Review article: synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis	M.c.Kew	Liver international,23,405-409(2003)
T-22	Mycotoxins	RA.Etzel	JAMA,287,425-427(2002)
T-23	Mycotoxins	J.W.Bennett, and M.Klich	Clinical Microbiology reviews,16,497-516(2003)
T-24	Determinants of aflatoxins exposure in young children from Benin and Togo,West Africa: the critical role of weaning	Gong,Y.Y.,Egal,S.,Hounsa,A.,Turner,P.C.,Hall,A.J.,Cardwell,K.F.,and Wild,C.P.	International Epidemiological Association,32,556-562(2003)
T-25	Determination level of serum Aflatoxin B1 adducts in the United Kingdom population: Implications for aflatoxin-B1 exposure in the United Kingdom	Turner,P.C.,Dingley,K.H.,Coxhead,J.,Ressell,S.,Garner,C.R.	Cancer Epidemiology,Biomarkers and Prevention,7,441-447(1998)
T-26	Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing village, Fusui county, people's republic of China.	Wang,J-S.,Huang,T.,Su,J.,Liang,F.,Wei,Z.,Liang,Y.,Luo,H.,Kuang,S-Y,Qian,G-S.,Sun,G.,Thomas,X.H.,Kensler,W.,and Groopman J.	Cancer epidemiology, biomarkers and prevention,10,143-146(2001)
T-27	Oltipraz chemoprevention trial in oidong, people's republic of china: modulation of serum aflatoxin albumin adduct biomarkers	Kensler,T.W.,He,X.,Otieno,M.,Egner,P.A.,Jacobson,L.P.,chen,B.,Wang,J-S.,Zhu,Y-R.,Zhang,B-C.,Wang,J-B.,Wu,Y.,Zhang,Q-N.,Qian,G-S.,Kuang,S-Y.,Fang,X.,Li Y-F.,Yu,L-Y.,Prochaska,H.J.,Davidson,N.E.,Gprdon,G.B.,Gorman,M.B.,Zarba,A,Enger,C.,Munoz,A.,Helzlsouer,K	Cancer epidemiological,biomarkers and prevention,7,127-134(1998)
T-28	Association of plasma aflatoxin B1 adduct level with plasma selenium level and genetiopolymorphisms of glutathione S-transferase M1 and T1	Chen, S-Y.,Chen, C-J.,Tsai, W-Y.,Ahsan, H.,Liu, T-Y.,Lin, J-T.,and Santella, R.M.	Nutrition and cancer,38,179-185
T-29	Variability in Aflatoxin-albumin adduct levels and effects hepatitis B and C Virus infection and glutathione S-transferase M1 and T1 genotype	Ahsan, H., Wang, L-Y., Chen, C-J., Tsai, W-Y.,and Santella, R.N.	Environmental Health Perspective,109,833-837(2001)
T-30	The role of Aflatoxins and Hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: A basis for primary prevention in Guinea-Conakry, West Africa	Turner,P.C.,Sylla,A.,Diallo,M.S.,Castegnaro,J-J.,Hall,A.J.,and Wild, C.P.	Journal of gastroenterology and hepatology,17,S441-S448(2002)