

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

脂質過酸化により生成する変異原の同定

分担研究者：葛西宏 産業医科大学、職業性腫瘍学、教授

研究要旨

脂質過酸化のモデル反応により生成する物質を deoxyguanosine (dG) 付加体として分離、分取、同定した。dG 付加体を形成した物質は、glyoxal、glyoxylic acid、ethylglyoxal、4-oxo-2-hexenal (4-OHE) であった。4-OHE は S9 による代謝活性化無しでサルモネラ菌 TA100 および TA104 に対し変異原性を示した。4-OHE は焼き魚の様な熱処理された ω -3 不飽和脂肪酸を含む食品中から、GC/MS によって検出された。

A. 研究目的

食事は発癌の主な原因の一つと言われており、癌予防の目的で食品中の変異原物質を同定し除去する事は重要な事である。疫学的研究によって、高脂肪食、肉食が乳癌、大腸癌、前立腺癌等、様々な癌の危険因子だといわれている。食品中には様々な多価不飽和脂肪酸が、また赤身の肉にはヘム鉄が含まれているため、私達は、多価不飽和脂肪酸がヘム鉄によって酸化されて生じる過酸化脂質の変異原性に興味を持った。多くの変異原物質は、DNA 構成物質 2'-デオキシグアノシン (dG) と付加体 (アダクト) を形成する事が知られている。そこで脂質過酸化反応のモデル実験を行い、生成される物質を dG アダクトとして分離、分取、同定して、その dG に付加した物質について調べる事を目的とした。

B. 研究方法

リノール酸、リノレン酸、サラダ油の 3 種類の油をそれぞれ、ヘミン及び dG と混合し、空气中で室温にて振盪し、酸化反応させ、その 3 種類の反応液を高速液体クロマトグラフィーによって分析した。そして、これらの酸化反応によって生成した dGuo 付加体 (アダクト) を採取し、NMR、紫外線吸収スペクトル、質量分析によって構造解析を行った。これらの dG に付加している物質の 1 つである 4-OHE について、サルモネラ菌 TA100, TA104 を使い Ames 試験を行った。食品中の 4-OHE の検出は GCMS により行った。

C. 研究結果

dG 付加体を形成した物質は、glyoxal、glyoxylic acid、ethylglyoxal、4-oxo-2-hexenal (4-OHE) であった。又、脂質過酸化反応による dG の酸化によって生成した 8-OH-dG も同定された。

これらの dG 付加体は dG だけの反応やヘミンと油だけの反応からは、高速液体クロマトグラフィーでは検出されなかった。これらのアダクトの種類と量はリノール酸よりリノレン酸の反応生成物中でより多く検出された。又、4-OHE のサルモネラ菌 TA100 および TA104 に対する変異原性は、S9 による代謝活性化を行わない状態で、それぞれ 78 および 67 復帰変異コロニー/μg であった。その後の研究で、4-OHE は焼き魚の様な熱処理された ω-3 不飽和脂肪酸を含む食品中から、GC/MS によって多量に検出された。

D. 考察

食品中の変異原物質を同定し、分離、除去する事は癌予防にとって重要な事であるが、今まであまり多く同定されていない。微量の変異原物質を分離、同定するため、変異原物質は DNA に結合して付加体を形成し易いという前提の基に、高脂肪食、肉食に関連した脂質過酸化のモデル実験の研究をする事が、より有効であると考えた。そして、混合物質中より glyoxal、glyoxylic acid、ethylglyoxal、4-OHE の様な変異原物質を同定する事が出来た。α-リノレン酸やドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) の様な ω-3 不飽和脂肪酸は、癌予防に重要な役割を持つ脂肪酸として知られているが、それらの酸化分解産物である 4-OHE についてはこれまでほとんど研究されていなかったため、この物質の変異原性等について検討した。これらは食品の保存、調理中に生じる他、肉食 (ヘ

ミン) と高脂肪食の同時摂取により消化管で生じる可能性がある。また 4-OHE は揮発性のため油脂の製造、食品の加工、調理に携わる労働者のがん発生に関わる可能性もある。

E. 結論

脂質過酸化モデル反応中に新規変異原物質 4-OHE を発見した。4-OHE は様々な食品中に検出された。この物質の発癌性に関しては現在検討中である。

F. 健康危険情報

本研究により見い出された新規変異原 4-OHE は調理食品中に検出されるため健康に影響を及ぼす可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasai, H., Maekawa, M., Kawai, K., Hachisuka, K., Takahashi, Y., Nakamura, H., Sawa, R., Matsui, S. and Matsuda, T., 4-Oxo-2-hexenal, a mutagen formed by ω-3 fat peroxidation, causes DNA adduct formation in mouse organs. *Ind Health*, 43:699-701(2005).
- 2) Maekawa, M., Kawai, K., Takahashi, Y., Nakamura, H., Watanabe, T., Sawa, R., Hachisuka, K., Kasai, H., Identification of 4-oxo-2-hexenal and other direct mutagens formed in model lipid peroxidation reactions as dG-adducts, *Chem. Res. Toxicol.*, 19:130-138(2006).
- 3) Kawai K, Matsuno K, Kasai H. Detection of 4-oxo-2-hexenal, a novel mutagenic product of lipid peroxidation, in human diet and cooking vapor. *Mutat. Res.*, 603:186-92 (2006).

2. 学会発表

- 1) 河井 一明、前川 宗之、松田 知成、松井 三郎、葛西 宏 過酸化脂質由来変異原によるマウス臓

大腸発がん感受性および抵抗性要因の解明

分担研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所生化学部長

研究要旨

加熱魚肉食品中に含まれる変異原性物質ヘテロサイクリックアミン類 (HCAs) の中で最も含量が多い 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)とデキストラン硫酸ナトリウム塩 (DSS) による腸炎併発によるマウス大腸発がんモデルを用いて、腸炎及び大腸発がんに対する感受性遺伝子を同定することを目的とした。PhIP+DSS による大腸発がんに対して感受性を示す C57BL/6J 系統では、抵抗性の MSM/Ms 系統に比較して DSS 投与後の腸炎が遷延することが分かった。さらに、PhIP+DSS による大腸がんの誘発は、PhIP の投与量及び DSS による炎症の程度に依存して増加することが分かった。

A. 研究目的

加熱魚肉食品中に含まれる変異原性物質ヘテロサイクリックアミン類(HCAs)の中で最も含量が多い 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)はヒト大腸がんの原因物質である可能性が示唆されている。本研究では、PhIP とデキストラン硫酸ナトリウム塩 (DSS) による腸炎併発によるマウスの大腸発がんモデルを用いて、腸炎及び大腸発がんに対するマウス系統間での感受性差を利用し、DSS 腸炎に対する感受性及び PhIP 大腸発がんの感受性を規定する遺伝的要因を解明することを目的とする。

B. 研究方法

PhIP は単独投与ではマウスには通常大腸がんを誘発しないが、デキストラン硫酸ナトリウム塩 (DSS) の飲水投与による腸炎の併発により、マウスにも高率に大腸がんを誘発できる。最近、国立遺伝学研究所において、MSM/Ms 系統の各染色体を C57BL/6J 系統に導入したコンソミック系統が樹立されたことから、MSM/Ms 系統及び C57BL/6J 系統間で PhIP+DSS 誘発腸炎の併用による大腸がん誘発性の差異を調べることににより、コンソミック系統を用いた感受性及び抵抗性遺伝子同定の可能性について検討した。実験方法は以下に従った。

- ① C57BL/6J 系統と MSM/Ms 系統を用いて両系統間の飲水量 (DSS 摂取量) を比較し、各系統における DSS の至適濃度を検討した。
- ② 至適濃度 (1-2%) の DSS を用いて、PhIP+DSS 誘発腸炎の併用により誘発される大腸発がんの感受性の差異を検討した (図 1)。
- ③ C57BL/6J 系統を用いて、種々の実験プロ

トコールにより大腸発がん性を検討し、有効な PhIP 及び DSS 投与法を検討した (図 2)。

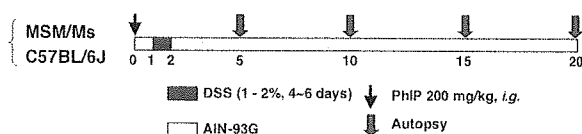


図 1 C57BL/6J 及び MSM/Ms マウス系統を用いた PhIP+DSS による大腸発がん性検討のための実験プロトコール

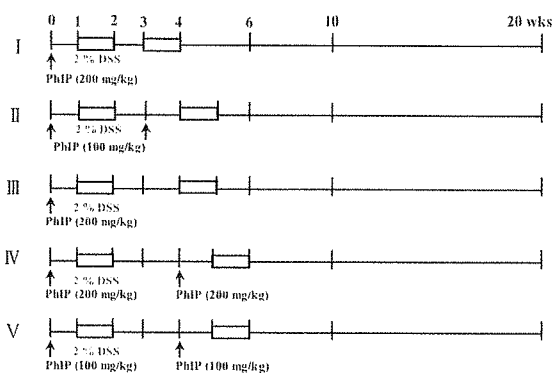


図 2 PhIP+DSS による大腸発がん実験の至適条件の検討

C. 研究結果

① DSS により誘発される腸炎の程度は、DSS 濃度により大きく影響されることから、各系統の飲水量の違いを把握する必要がある。MSM/Ms 系統は、体は小柄で体重も C57BL/6J 系統に比較して有意に小さいが、運動量が多く、飲水量も多い。従って、同濃度の DSS を投与すると MSM/Ms 系統の方が結果的に多くの DSS を摂取することが予想された。

C57BL/6J と MSM/Ms 系統では、一日当たりの飲水量は C57BL/6J 系統の方が約 20% 程度多かった。体重も約 20% 程度、C57BL/6J 系統の方が大きいことから、DSS の総摂取量としては、MSM 系統での 1.0% 及び 1.5% DSS が、C57BL/6J 系統の 1.5% 及び 2.0% DSS に相当することが分かった (図 3)。

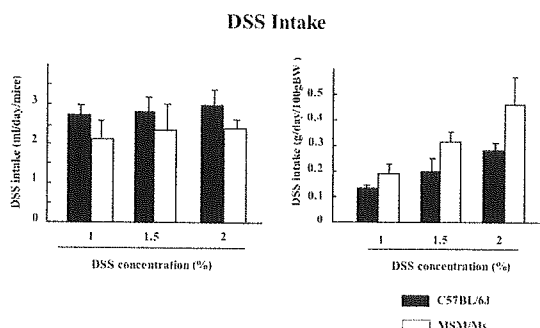


図 3 C57BL/6J 及び MSM/Ms における飲水量と DSS 摂取量

② C57BL/6J (1.5% DSS) では、実験開始後 20 週時において 3/18 (17%) のマウスに大腸腫瘍が誘発されたのに対し、MSM/Ms (1.0% DSS) では 0/14 (0%) であった。C57BL/6J (2.0% DSS) 及び MSM/Ms (1.5% DSS) では、それぞれ 3/6 (50%), 0/5 (0%) であったことから (表 1)、PhIP+DSS 投与による大腸発がん性において C57BL/6J 系統の方が MSM/Ms 系統に比較してより高い感受性を示すことが分かった。

Strain	DSS treatment	5 wks	10 wks	15 wks	20 wks
C57BL/6J	2.0% (6 days)	1/4 (0.25±0.50)	2/2 (2.50±0.71)	1/2 (0.50±0.71)	3/6 (1.00±1.55)
	1.5% (4 days)	0/2	—	—	3/18 (0.17±0.38)
	1.0% (4 days)	0/2	—	—	1/17 (0.06±0.24)
MSM/Ms	2.0% (5 days)	0/2 (at 2 wks)	—	—	—
	1.5% (5 days)	—	0/1	—	0/5
	1.0% (4 days)	—	—	—	0/14

表 1 PhIP+DSS 誘発大腸発がんに対するマウス系統差

③ DSS 投与による腸炎のスコア化

DSS を 4 日間投与した後に通常飲水に切り換え、DSS により誘発される大腸炎の程度をスコア化し、炎症の変化を経時的に観測した。その結果、MSM/Ms 系統の一部では、DSS 投与直後に劇症の腸炎を引き起こして死亡したが、炎症は一過的なものであり、DSS の投与終了後 2 週および 4 週目では腸炎は軽微なものであった。これに対し C57BL/6J 系統では、DSS

投与終了後 2 週目において炎症は極期を迎え、その後 4 週目においても強い炎症所見が認められた。部位的には、盲腸が最も炎症スコアが高く、次いで、遠位大腸、中位大腸、近位大腸の順であった。

④ PhIP+DSS 併用による大腸腫瘍の発生が、PhIP 或いは DSS のいずれの曝露量に相関するののかについて検討した (図 2 及び表 2)。

	No. of mice	Incidence (%)	Multiplicity
I	12	8/12 (67%)	0.75 ± 0.50
II	6	4/6 (67%)	1.33 ± 0.50
III	10	6/10 (60%)	0.9 ± 0.99
IV	10	7/10 (70%)	1.7 ± 1.70
V	9	5/9 (56%)	1.0 ± 1.12

表 2 PhIP, DSS の種々の投与法による大腸腫瘍の発生率とマウス 1 個体当たりの平均腫瘍数

I 群及び III 群 (図 2) において、DSS 投与を反復することにより投与量依存的に大腸腫瘍の発生数が増加した (表 2)。興味深いことに、PhIP の 200 mg/kg の単回投与 (I 群及び III 群) に比較して、100 mg/kg x 2 回の分割投与 (II 群及び V 群) のほうが 1 個体当たりの平均腫瘍数が有意に増加することが分かった。PhIP 200 mg/kg の 2 回投与群 (IV 群) では、さらに顕著に腫瘍の誘発数が増加した。以上のことから、PhIP+DSS 併用による大腸腫瘍の誘発では、PhIP 及び DSS が付加的な役割を果たしていることが分かった。

D. 考察

PhIP+DSS 誘発大腸発がんモデルにおいて、C57BL/6J 及び MSM/Ms マウス系統間において、DSS 腸炎の誘発性及び大腸発がんの感受性に系統差があることが分かった。この系統差は、発がんのイニシエーターである PhIP 投与量に加え、炎症の強さ・持続時間の両方に依存することが分かり、PhIP 及び DSS 誘発腸炎が付加的な役割を果たしていることが分かった。

E. 結論

C57BL/6J と MSMS/Sc のマウス系統間において、大腸発がん感受性の差異が認められたことから、C57BL/6J と MSM/Ms から樹立されたコンソミック系統 (C57BL/6J-MSM/Ms) を用いて感受性遺伝子を同定する方法の有効性が示唆された。本研究の成果は、発がん高リスク群の掌握といった予防医学的な観点からも社

会的貢献は大きいと期待される。

F. 健康危惧情報
(特になし)

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Nakagama H, Higuchi K, Tanaka E, Tsuchiya N, Nakashima K, Katahira M, and Fukuda H. Molecular mechanisms for maintenance of G-rich short tandem repeats capable of adopting G4 DNA structures. *Mutat Res* (in press)
- ② Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* (in press)
- ③ Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura Y, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H and Dohi T. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J. Cancer*, 118:2232-2236, 2006.
- ④ Fukuda H, M. Katahira, Tanaka E, Enokizono Y, Tsuchiya N, Higuchi K, Nagao M and Nakagama H. Unfolding of higher DNA structures formed by the d(CG₃) triplet repeat by UP1 Protein. *Genes Cells*, 10:953-962, 2005.
- ⑤ Nakagama H, Nakanishi M, Ochiai M. Modeling human colon cancer in rodents using a food-borne carcinogen, PhIP. *Cancer Sci.*, 96:627-636, 2005.
- ⑥ Ochiai M, Watanabe M, Nakanishi M, Taguchi A, Sugimura T and Nakagama H. Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats. *Cancer Lett*, 220:67-74, 2005.
- ⑦ Ushigome M, Ubagai T, Fukuda H, Tsuchiya N, Sugimura T, Takatsuka J and Nakagama H. Up-regulation of the hnRNPA1 gene in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 26:635-640, 2005.
- ⑧ Shibata A, Kamada N, Masumura K, Nohmi T, Kobayashi S, Teraoka H, Nakagama H, Sugimura T, Suzuki H and Masutani M. *Parp-1* deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements *in vivo* after treatment with an alkylating agent. *Oncogene*. 24:1328-1337, 2005.
- ① Nakagama H, Higuchi H, Tanaka E, Nagao M, Fukuda, H. Maintenance of genomic stability at G/C-rich repetitive DNA sequences. 9th ICEM & 36th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society (San Francisco, CA; 9.03-9.08., 2005)
- ② Shibata A, Nohmi T, Teraoka H, Nakagama H, Sugimura T, Suzuki H, Masutani M. Increased mutations in *Parp-1* knockout mice after treatment with an alkylating agent and with aging. 9th ICEM & 36th Annual meeting of the Environmental Mutagen Society (San Francisco, CA; 9.03-9.08., 2005)
- ③ 落合雅子、渡辺昌俊、杉村 隆、中釜 斉. 分別染色法により検出される異型 ACF と MDF 及び flat dysplastic ACF との関連性の検討. 第 64 回日本癌学会総会 (札幌; 9.14-9.16., 2005)
- ④ 阿部浩一郎、田澤 大、落合雅子、杉村 隆、久山 泰、中釜 斉. 発がん感受性の異なるラット系統間で誘発される PhIP 大腸腫瘍の遺伝子発現における質的違いの検討. 第 64 回日本癌学会総会 (札幌; 9.14-9.16., 2005)
- ⑤ Ochiai M, Nakanishi M, Fujiwara K, Sugimura T, Nakagama H. Toxicogenomic approach to the prediction of carcinogenic potentials of heterocyclic amines in rat colon. 第 34 回日本環境変異原学会大会 (東京; 11.16-11.18., 2005)
- ⑥ 中西雅子、田澤 大、田中卓二、杉村 隆、中釜 斉. PhIP と DSS により誘発されるマウス大腸発がんモデルの病体解析. 第 22 回日本疾患モデル学会総会 (伊香保; 11.24.-11.25., 2005)
- ⑦ 落合雅子、中西雅子、藤原恭子、杉村 隆、中釜 斉. 網羅的遺伝子発現解析によるヘテロサイクリックアミン類の大腸発がん性予測の検討. 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡; 12.07.-12.10., 2005)
- ⑧ 中西雅子、桑村 充、吉田 緑、前川昭彦、中釜 斉. C57BL/6J マウスに認められた肝細胞の顆粒状変性/脂肪化と細胞周囲性繊維化を特徴とする肝病変の 1 例. 第 22 回日本毒性病理学会 (鹿児島; 1.26.-1.27., 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・特許出願
「癌細胞増殖抑制剤」
(特願 2005-15915)
2. 実用新案登録 (特になし)
3. その他 (特になし)

2. 学会発表

分担研究報告書

中国江蘇省の呼吸器消化器がんにおける MYH 遺伝子多型の意義

分担研究者 梶村春彦 浜松医科大学・医学部・教授

研究要旨 酸化的 DNA 障害修復遺伝子、MYH 遺伝子などの多型を、大腸がん、胃がん、多発がんなどを用いて検討し、特に症例対照研究を本邦と中国で行って評価した。MYH には未報告で、アジアの集団にみられる多型が存在し、大腸がんリスクに有意な寄与をする多型もある。これらが中国大腸がんでも同様であるかどうかについて比較検討した。

A. 研究目的

酸化的 DNA 障害の修復遺伝子の多型を、ヒト消化管腫瘍の感受性への影響という点から、国際比較することを目的とする。

B. 研究方法

MYH 遺伝子多型を本邦および、江蘇省の集団の DNA（1999-2000 に鹿児島大嶽崎、愛知がんセンター田島、江蘇省腫瘍防治研究所 Dr.Gao の協力による）を用いてまず、1 塩基多型を 5 種類検索した。その結果、頻度の高い 4 つを選び以下の症例対照 DNA および、ハプロタイプ構築をおこなった。今回の中国例は江蘇省腫瘍防治研究所細胞遺伝研究室の Dr.Chen らが継続中の症例対照研究約 200 対である。また、日本側であつかった、症例対照 DNA は九州大学古野の率いる Fukuoka study と国立がんセンター津金の率いる長野 JA 研究である。

(倫理面への配慮)

これらは各施設の IRB の承認をうけ、とくに遺伝子解析施設では匿名化し、case か control かについても blind で解析している（浜松医大 IRB12-14）。

C. 研究結果

本邦の大腸がん例、胃がん例の検索中にみいだした、IVS10-2A>G 多型は江蘇省の大腸がん例および対照群で同程度みとめられ、われわれの結果と同一であった。本邦の症例では、IVS1+11C>A がリスクを示す多型として抽出された。その機能解析を行う過程で、この多型と連鎖不平衡になっているとおもわれる-146G>A の多型を発見した。この多型は九州大腸がんのリスクに有意に関与することを見いだしており、中国での解析をする予定である。

興味深いことにこの変異型は、TATGACTCCA という配列をつくるが、中央の TGACT という配列は PXR-RXR (Pregnane X receptor と 9-cis-retinoic acid receptor) の結合配列を構成するため、機能差が生じる可能性が生じるので、検証している。

D. 考察

MYH には、現在 data base 上、48 ほどの SNP が載っているが、われわれの、haplotype 構築をおこなった 5 つの内、1 つは依然として含まれていない。MYH は、欧米ではかなりはつきりと、MYH associated polyposis という疾患が同定されつつあるが、アジアではまだ報告がない。また、散発的大腸がんへのリスクについても欧米の 2000 例あまりの検討で、関連が記載されているが、その多型は少なくともわれわれが検索した範囲ではアジアではみつかっていない。EPHB2 など、MYH 遺伝子の存在する 1p36 にはさらに大腸がんの感受性にかかわる候補遺伝子があり、これらの多型の関与、や人種差も興味深い。今後腫瘍組織のセカンドヒットなどサンプルを交換して、さらに解析をすすめたい。

E. 結論

アジアの大腸がん、リスクを約 1.5 倍有意に上昇させる MYH 多型を見いだしたのでその中国の集団での検証確認と、機能解析を行う必要がある。

F.健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Wang J, Sugimura H et al.

Downregulation of EphA7 by hypermethylation in colorectal cancer. *Oncogene* 24:5637-47,2005 など

H. 知的財産権

特願 2006-59424 パラフィン切片保存シート

研究要旨

幾つかの沖縄産薬草の一酸化窒素（NO）合成酵素への作用を検討したところ、ベニバナボロギク（BB）は培養細胞において誘導型 NO 合成酵素（iNOS）の発現を抑制した。また、BB およびその抗酸化成分であるイソクロロゲン酸はガラクトサミン（GalN）・リポポリサッカライド（LPS）投与によるラット肝の iNOS 遺伝子発現およびミトコンドリア iNOS 蛋白の発現の抑制、DNA 断片化の抑制を生じ、GalN/LPS による肝障害を有意に抑制した。これらのことから BB およびイソクロロゲン酸は肝 iNOS 発現抑制、アポトーシス抑制により肝保護作用を有することが示唆された。

A. 研究目的

活性酸素や活性窒素は炎症はじめ種々の病態に係わっており、これらを消去する抗酸化物質は多くの病態を改善することが期待される。著者らは沖縄産薬草類の抗酸化作用をスクリーニングし、強い抗酸化作用を有する幾つかの薬草の抗酸化成分を分離し、病態改善作用を検討してきた。ベニバナボロギク（*Crassocephalum crepidioides* S. Moore）は帰化植物で広く沖縄地方に自生し、民間薬として急性黄疸型肝炎、浮腫、発熱に用いられており、東南アジアでは食用としても利用されている。近年、BB に抗マalaria 活性、抗変異原性が報告されているが、著者らは沖縄産ベニバナボロギク（BB）の抗酸化作用を明らかにし、抗酸化成分としてイソクロロゲン酸を分離した。本研究では BB ならびにイソクロロゲン酸の NO 合成酵素への作用を培養細胞系およびラットを用いて検討した。

B. 研究方法

BB は沖縄県内の薬草会社から提供された葉・茎の乾燥物を粉末化後 1 グラムを 10 ml の精製水で抽出（90℃、30 分）後、ろ紙にてろ過し、ろ液を凍結乾燥したものをを用いた。イソクロロゲン酸は沖縄県工業技術センターにて BB からカラムクロマトにより分離・同定されたものを

用いた。

培養細胞を用いた実験は、J774 細胞を DMEM 培地を用い、37℃で 24 時間培養後、LPS（0.5 μg/ml）、BB 液および抗酸化成分のイソクロロゲン酸を加え、18 時間培養後、細胞を回収し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後抗 iNOS 抗体を用いた Western blot により iNOS 蛋白を検出した。

In vivo の実験では雄性 Sprague-Dawley（300～350 g）ラットをコントロール群、GalN/LPS 群、BB またはイソクロロゲン酸と GalN/LPS 併用群の 3 群に分けた。GalN/LPS 群には GalN（600 mg/kg）を皮下投与、LPS（0.5 μg/kg）を腹腔内投与した。併用群には GalN/LPS を投与する 1、15 時間前に BB 抽出液（20 mg/kg）またはイソクロロゲン酸（10 mg/kg）を腹腔内投与し、GalN/LPS 投与 12 時間後に一夜絶食後断頭した。採血後肝を 1.15% KCl（5 mM ベンズアミジン含有）で灌流後摘出し、常法にてミトコンドリア、ミクロソームを分離した。肝障害の評価は血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）活性、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）活性の測定、肝ホモジネートの過酸化脂質量（LPO）および NO 量、ミクロソーム、ミトコンドリア、サイトソールの GST 活性を測定した。また、アポ

トーシスの評価に肝組織から DNA を抽出し、その断片化をアガロース電気泳動により検出した。NO 合成酵素については、肝組織から RNA を抽出後 RT-PCR 法で iNOSmRNA を、ミトコンドリアの iNOS 蛋白をアクリルアミドゲル電気泳動後 Western blot 法で検出した。実験結果は t-検定を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。なお、動物実験は本学の動物実験委員会の許可を得て行った。

C. 研究結果

ベニバナボロギク (BB, 1 mg/ml) およびその抗酸化成分のイソクロロゲン酸 (200 μ M) は J774 細胞で LPS 刺激による iNOS 蛋白発現を抑制したが、シクロオキシゲナーゼ (COX-2) には影響しなかった。GalN/LPS 投与により引き起こされる血清 AST、ALT、GST 活性の著明な増加は BB およびイソクロロゲン酸前投与により有意に抑制された。また、GalN/LPS による肝過酸化脂質や NO 量の増加、サイトソール GST 活性の低下、DNA 断片化も BB およびイソクロロゲン酸の前投与により抑制された。GalN/LPS 投与により肝 iNOSmRNA の発現、ミトコンドリアの iNOS 蛋白の発現が見られたが、BB およびイソクロロゲン酸の投与によりこれらの発現は抑制された。また、GalN/LPS による血清中の TNF- α の増加も両者の前投与により抑制された。

D. 考察

LPS は種々の細胞で iNOS を誘導すること、GalN は DNA 合成阻害、膜蛋白合成阻害により肝障害を起こすことが知られており、GalN/LPS 併用は大量の NO 発生を伴う敗血症モデルとして用いられる。ベニバナボロギクおよびイソクロロゲン酸がマクロファージ由来培養細胞の iNOS 発現を抑制する結果が得られたことから GalN/LPS 肝障害への作用を検討したところ、iNOSmRNA 発現抑制、iNOS 蛋白抑制が見られ、両者は in vivo でも iNOS 誘導を抑制することが確認された。BB

の iNOS 誘導抑制のメカニズムとして、LPS はマクロファージを活性化してサイトカインの TNF- α を遊離して iNOS を誘導することから、BB は GalN/LPS による TNF- α の遊離を抑制することにより iNOS 誘導を抑制したことが示唆された。また、BB は GalN/LPS による DNA 断片化を抑制し、ミトコンドリアの iNOS 発現も抑制していることから、ミトコンドリアの NO を介するアポトーシスを抑制する可能性が示唆された。

E. 結論

BB および抗酸化成分のイソクロロゲン酸は、J774 細胞で LPS 刺激による iNOS 発現を抑制した。また、BB 及びイソクロロゲン酸はラットの GalN/LPS 投与による肝障害を抑制したが、これには TNF- α を介する iNOS 発現の抑制が関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 高松玲佳、安仁屋洋子、吉見直己、沖縄産ベニバナボロギクの誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) に及ぼす影響、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 (2005 年 6 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

器DNA付加体の形成 第64回
日本癌学会学術総会、札幌、2005
年9月

2) 前川 宗之、河井 一明、葛西 宏
過酸化脂質モデル反応により生成
する変異原・dG付加体の構造 第
64回 日本癌学会学術総会、札幌、
2005年9月

3) Kawai, K., Maekawa, M., Hachisuka,
K., Matsui, M., Matsuda, T., Kasai, H.
4-Oxo-2-hexenal in cooked foods and
DNA adduct formation in mouse organs
after oral administration. 9th
International Conference on

Environmental Mutagens. San
Francisco, U.S.A, (Sep. 2005)

4) Maekawa, M., Kawai, K., Hachisuka,
K., Takahashi, Y., Nakamura, H., Sawa,
R., Kasai, H. Identification of 4-
oxo-2-hexenal as adduct in a model
lipid peroxidation reaction and its
mutagenicity to TA 100 and 104. 9th
International Conference on
Environmental Mutagens. San
Francisco, U.S.A, (Sep. 2005)

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe T, Hasei T, Takahashi T, Asanoma M, Murahashi T, Hirayama T, <u>Wakabayashi K.</u>	Detection of a novel mutagen, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, as a major contaminant in surface soil in Osaka and Aichi prefectures, Japan	Chem Res Toxicol.	18	283-289	2005
Totsuka Y, Nishigaki R, Enomoto S, Takamura-Enya T, Masumura K, Nohmi T, Kawahara N, Sugimura T, <u>Wakabayashi K.</u>	Structures and biological properties of DNA adducts derived from N- nitroso bile acid conjugates	Chem Res Toxicol.	18	1553-1562	2005
Takamura-Enya T, Mano N, Kawahara N, Goto J, <u>Wakabayashi K.</u>	Formation of DNA adducts with cholyl adenylate, a putative intermediate for biosynthesis of cholyl-CoA	Chem Res Toxicol.	18	1715-1720	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsui, K., Yamada, M., Imai, M., Yamamoto, K. and <u>Nohmi, T.</u>	Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of Salmonella typhimurium strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens.	DNA Repair		印刷中	
Sato, Y., Takahashi, S., Kinouchi, Y., Shiraki, M., Endo, K., Matsumura, Y., Kakuta, Y., Tosa, M., Motida, A., Abe, H., Imai, G., Yokoyama, H., Nomura, E., Negoro, K., Takagi, S., Aihara, H., Masumura, K., <u>Nohmi, T.</u> and Shimosegawa, T.	IL-10 deficiency leads to somatic mutations in a model of IBD.	Carcinogenesis		印刷中	
Yamada, M., Matsui, K. and <u>Nohmi, T.</u>	Development of a bacterial hyper-sensitive tester strain for specific detection of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons.	Genes and Environ.	28	23-30	2006
Mazaki, M., Kataoka, K., Kinouchi, T., Vinitketkumnuen, U., Yamada, M., <u>Nohmi, T.</u> , Kuwahara, T., Akimoto, S. and Ohnishi, Y.	Inhibitory effects of caraway (<i>Carum carvi</i> L.) and its component on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutagenicity.	J. Med. Invest	53	123-133	2006
Asami, Y., Murakami, M., Shimizu, M., Pisani, F.M., Hayata, I. and <u>Nohmi, T.</u>	Visualization of the interaction between archaeal DNA polymerase and uracil-containing DNA by atomic force microscopy.	Genes to Cells	11	3-11	2006
Totsuka, Y., Nishigaki, R., Enomoto, S., Takamura-Enya, T., Masumura, K., <u>Nohmi, T.</u> , Kawahara, N., Sugimura, T. and Wakabayashi, K.	Structures and biological properties of DNA adducts derived from N-nitroso bile acid conjugates.	Chem. Res. Toxicol.	18	1553-1562	2005
Nishikawa, A., Sai, K., Okazaki, K., Son, H.Y., Kanki, K., Nakajima, M., Kinase, N., <u>Nohmi, T.</u> , Trosko, J.E., Inoue, T. and Hirose, M.	MX, a by-product of water chlorination, lacks in vivo genotoxicity in gpt delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells.	Env. Mol. Mutagen.	47	48-55	2006
Miyazaki, M., Yamazaki, H., Takeuchi, H., Saoo, K., Yokohira, M., Masumura, K., <u>Nohmi, T.</u> , Funae, Y., Imaida, K. and Kamataki, T.	Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung adenomas.	Carcinogenesis	26	1947-1955	2005
Kim, S.-R., Kokubo, K., Matsui, K., Yamada, N.,	Light-dependent mutagenesis by benzo[a]pyrene is mediated	Env. Mol. Mutagen.	46	141-149	2005

Kanke, Y., Fukuoka, M., Yamada, M. and <u>Nohmi, T.</u>	via oxidative DNA damage.				
Satou, K., Yamada, M., <u>Nohmi, T.</u> , Harashima, H. and Kamiya, H.	Mutagenesis induced by oxidized DNA precursors: roles of Y-family DNA polymerases in Escherichia coli.	Chem. Res. Tox.	18	1271-1278	2005
Hashimoto, A., Amanuma, K., Hiyoshi, K., Takano, H., Masumura, K., <u>Nohmi, T.</u> and Aoki, Y.	in vivo mutagenesis caused by benzo[a]pyrene instilled into the lung of gpt delta transgenic mice.	Env. Mol. Mutagen	45	365-373	2005
Shibata, A., Kamada, N., Masumura, K., <u>Nohmi, T.</u> , Kobayashi, S., Teraoka, H., Nakagama, H., Sugimura, T., Suzuki, H. and Masutani, M.	Parp-1 deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements in vivo after treatment with an alkylating agent.	Oncogene	24	1328-1337	2005
Kanki, K., Nishikawa, A., Masumura, K., Umemura, T., Imazawa, T., Kitamura, Y., <u>Nohmi, T.</u> and Hirose, M.	In vivo mutational analysis of liver DNA in gpt delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens N-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and di(2-ethylhexyl)phthalate.	Mol. Carcinog.	42	9-17	2005
Kokubo, K., Yamada, M., Kanke, Y. and <u>Nohmi, T.</u>	Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis: mutability of Salmonella typhimurium strains lacking one or all of SOS-inducible DNA polymerases to 26 chemicals.	DNA Repair	4	1160-1171	2005
<u>Nohmi, T.</u> , Kim, S.-R. and Yamada, M.	Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes.	Mutat. Res.	591	60-72	2005
<u>Nohmi, T.</u> and Masumura, K.	Molecular dissection of in vivo DNA rearrangements induced by radiation and chemical mutagens.	International Congress Series (High Levels of Natural Radiation and Radon Areas: Radiation Dose and Health Effects)	1276	25-28	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Kasai, H.</u> , Maekawa, M., Kawai, K., Hachisuka, K., Takahashi, Y., Nakamura, H., Sawa, R., Matsui, S. and Matsuda, T.	4-Oxo-2-hexenal, a mutagen formed by w-3 fat peroxidation, causes DNA adduct formation in mouse organs.	Ind Health	43	699-701	2005
Maekawa, M., Kawai, K., Takahashi, Y., Nakamura, H., Watanabe, T., Sawa, R., Hachisuka, K., <u>Kasai, H.</u>	Identification of 4-oxo-2-hexenal and other direct mutagens formed in model lipid peroxidation reactions as dG-adducts	Chem. Res. Toxicol	19	130-138	2006
Kawai, K., Matsuno, K., <u>Kasai, H.</u>	Detection of 4-oxo-2-hexenal, a novel mutagenic product of lipid peroxidation, in human diet and cooking vapor.	Mutat. Res.	603	186-92	2006

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shibata A, Kamada N, Masumura K, Nohmi T, Kobayashi S, Teraoka H, <u>Nakagama H</u> , Sugimura T, Suzuki H, Masutani M.	Parp-1 deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements in vivo after treatment with an alkylating agent.	Oncogene	24	1328-1337	2005
Ushigome M, Ubagai T, Fukuda H, Tsuchiya N, Sugimura T, Takatsuka J, <u>Nakagama H</u> .	Up-regulation of the hnRNPA1 gene in human colorectal cancer.	Int J Oncol.	26	635-640	2005
Ochiai M, Watanabe M, Nakanishi M, Taguchi A, Sugimura T, <u>Nakagama H</u> .	Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats.	Cancer Lett.	220	67-74	2005
<u>Nakagama H</u> , Nakanishi M, Ochiai M.	Modeling human colon cancer in rodents using a food-borne carcinogen, PhIP.	Cancer Sci.	96	627-636	2005
Fukuda H, Katahira M, Tanaka E, Enokizono Y, Tsuchiya N, Higuchi K, Nagao M, <u>Nakagama H</u> .	Unfolding of higher DNA structures formed by the d(CGG) triplet repeat by UPI Protein.	Genes to Cells	10	953-962	2005
Suzuki R, Kohno H, Sugie S, <u>Nakagama H</u> , Tanaka T.	Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice.	Carcinogenesis	27	162-169	2006
Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura Y, Toyama-Sorimachi N, <u>Nakagama H</u> , Dohi T.	Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers.	Int J. Cancer.	118	2232-2236	2006
<u>Nakagama H</u> , Higuchi K, Tanaka E, Tsuchiya N, Nakashima K, Katahira M, Fukuda H.	Molecular mechanisms for maintenance of G-rich short tandem repeats capable of adopting G4 DNA structures.	Mutat Res.			in press

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kazuya, S., Masanori, Goto, . Hong T., Sin-ichi, S, . Yoshihiro, O, . Hiroshi, K, . Shinichiro, U, . Kazufumi, S, . Toshihiro, T, . and <u>Haruhiko, S, .</u>	A novel STK11 germline mutation in two siblings with Peutz-Jeghers syndome.	Clinical Genetics	67	81-86	2005
Ritsko, N, . Hideki, K, . Naoi, S, . Masao, K, . Megumi, I, . Hisaki, I, . Sanjar, R, . You-Jie, W, . Zhong-You, L, . Takahiro, S, . Toshihiko, K, . Hiroyuki, K, . Kazuya, S, . Masamitsu, T, . and <u>Haruhiko, S, .</u>	EPHA2/EFNA1 expression in human gastoric cancer	Cancer Science	96	42-47	2005
Jiandong, W, . Hideki, K, . Masaya, S, . Naomi, S, . Ritsuko, N, . Hong, T, . Toshio N, . Keiji, M, . Jun, I, . Shigeru, K, . Megumi, I, . Masamitsu, T, . Masao, K, . Kazuya, S, . <u>Haruhiko, S, .</u>	Downregulation of EphA7 by hypermethylation in colorectal_cancer.	Oncogene	24	5637-5647	2005
Hidetaka, Y, . Kazuya, S, . Toshihiro, T, . <u>Haruhiko, S, .</u>	Effect of splice-site polymorphisms of the TMPRSS4, NPHP4, and ORCTL4 genes on their mRNA expression.	J. Genetics	84(2)	131-136	2005

Hisaki, I., Kimihiro, Y., Masaya, S., Yasuhiko, K., Jun, I., Keiji, M., Ken-ichi, S., Hitoshi, T., Takachika, O., Shinichiro, K., <u>Haruhiko,</u> <u>S.,</u>	Simultaneous Imaging of Membrane Antigen and the Corresponding Chromosomal Locus in Pathology Archives.	Pathology Internaional	55	753-756	2005
Takehisa, S., Yasuhiko, K., Hisaki, I., Masaya, S., Fumihiko, T., Kingo, C., Koji, O., <u>Haruhiko, S.,</u>	Chromosomal numerical abnormalities in early stage lung adenocarcinoma.	Pathology International	56	117-125	2006

200500675A (2/2)

厚生労働科学研究費補助金

国際医学協力研究事業

環境中の発がん及び発がん抑制要因の検索とその作用機構の解明に関する研究

(H17 - 国医 - 2)

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

～IV. 研究成果の刊行物・別刷～

主任研究者 若林 敬二

平成 18 (2006) 年 4 月

**Detection of a Novel Mutagen,
3,6-Dinitrobenzo[*e*]pyrene, as a Major
Contaminant in Surface Soil in Osaka and
Aichi Prefectures, Japan**

**Tetsushi Watanabe, Tomohiro Hasei, Tomoyuki Takahashi,
Masaharu Asanoma, Tsuyoshi Murahashi, Teruhisa Hirayama, and
Keiji Wakabayashi**

Department of Public Health, Kyoto Pharmaceutical University,
5 Nakauchicho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan,
Nagoya City Public Health Research Institute, 1-11 Hagiya-cho,
Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8615, Japan, and Cancer Prevention
Division, National Cancer Center Research Institute,
1-1 Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

**Chemical
Research in
Toxicology[®]**

Reprinted from
Volume 18, Number 2, Pages 283-289

Detection of a Novel Mutagen, 3,6-Dinitrobenzo[e]pyrene, as a Major Contaminant in Surface Soil in Osaka and Aichi Prefectures, Japan

Tetsushi Watanabe,^{*,†} Tomohiro Hasei,[†] Tomoyuki Takahashi,[†]
Masaharu Asanoma,[‡] Tsuyoshi Murahashi,[†] Teruhisa Hirayama,[†] and
Keiji Wakabayashi[§]

Department of Public Health, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchicho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan, Nagoya City Public Health Research Institute, 1-11 Hagiya-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8615, Japan, and Cancer Prevention Division, National Cancer Center Research Institute, 1-1 Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

Received September 27, 2004

We previously identified 1,3-, 1,6-, and 1,8-dinitropyrene (DNP) isomers as major mutagens in surface soil in three metropolitan areas of Japan. In the present study, an organic extract from surface soil collected at a park in Takatsuki in Osaka Prefecture, which showed extremely high mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 in the absence of mammalian metabolic system (S9 mix), was investigated to identify major mutagens. A new powerful bacterial mutagen, as well as 1,6- and 1,8-DNP isomers, was isolated from the organic extract (1.8 g) of the soil sample (2.2 kg) by column chromatography. On the basis of mass spectra, the new mutagen, which accounted for 15% of the total mutagenicity of the soil extract, was thought to be a dinitrated polycyclic aromatic hydrocarbon with a molecular weight of *m/z* 342. The mutagen was synthesized from benzo[e]pyrene by nitration and was determined to be 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene (DNBeP) based on its ¹H NMR spectrum. The mutagenic potency of 3,6-DNBeP in the Ames/*Salmonella* assay was extremely high, in that it induced 285 000 revertants/nmol in TA98 and 955 000 revertants/nmol in YG1024 without S9 mix and was comparable to those of DNP isomers, which are some of the most potent bacterial mutagens reported so far. In addition to the soil sample from Takatsuki, 3,6-DNBeP was also detected in surface soil samples collected at parks in four different cities, i.e., Izumiotsu and Takaishi in Osaka Prefecture and Nagoya and Hekinan in Aichi Prefecture, and accounted for 22–29% of the total mutagenicity of these soil extracts in TA98 without S9 mix. These results suggest that 3,6-DNBeP is a major mutagen in surface soil and may largely contaminate the surface soil in these two regions in Japan.

Introduction

Numerous chemicals are emitted from municipal incinerators (1), motor vehicles (2, 3), industrial power plants (4, 5), and so forth. Furthermore, many chemicals, such as a class of nitroarenes, have been shown to be formed in the atmosphere (6, 7). These atmospheric pollutants include diverse mutagenic and carcinogenic chemicals (8), and urban air has been shown to contain higher levels of some human carcinogens than rural air (8, 9). Many epidemiological studies have shown that air pollution tends to be associated with the incidence of lung cancer and cardiopulmonary mortality (10–15). Because atmospheric contaminants eventually descend to the ground, the ground surface is thought to be a depository of air pollutants, and airborne mutagens and carcinogens can be accumulated in the surface soil. Indeed, in many studies, the extracts of soil samples collected at forests (16), roadsides (16–21), parks (17, 22), agricultural land (16, 23, 24), and residential sites (17, 22, 25) in urban

districts (26) and industrial areas (18) have been shown to exhibit mutagenicity and/or DNA damaging activity. Mutagenic and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)¹ such as benzo[a]pyrene were detected in soil samples from roadsides in several cities in Japan (18–20), but the contribution of these PAHs to the total mutagenicity of the soil extracts was less than a few percent (19, 20).

In a previous study, we found that surface soils in five geographically different regions of Japan were largely polluted with mutagens (17, 27) and that the contamination level of surface soil was especially high in Osaka Prefecture, which has high age-adjusted mortality rates for lung cancer in both males and females (28), in the Kinki region (22). Moreover, we revealed that the mutagenic potencies of soil samples from the Kinki region toward *Salmonella typhimurium* TA98 without mammalian metabolic system (S9 mix) were significantly correlated with the amount of 1,3-, 1,6-, and 1,8-dinitropyrene (DNP) isomers, and the mean value of the total

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +81-75-595-4650. Fax: +81-75-595-4769. E-mail: watanabe@mb.kyoto-phu.ac.jp.

[†] Kyoto Pharmaceutical University.

[‡] Nagoya City Public Health Research Institute.

[§] National Cancer Center Research Institute.

¹ Abbreviations: DNP, dinitropyrene; DNBeP, dinitrobenzo[e]pyrene; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; NBA, nitrobenzanthrone; IARC, International Agency for Research on Cancer; BeP, benzo[e]pyrene; LPLC, low-pressure liquid chromatography.

percent contributions of these DNP isomers to the mutagenicity of surface soil was about 25% (22). 3-Nitrobenzanthrone (NBA) was also detected in soil samples from the Kinki region, but no significant correlation was found between the mutagenic potency of the soil extracts and the amount of 3-NBA (22). These DNP isomers and 3-NBA are among the most potent bacterial mutagens that have been identified so far in the literature (7, 29) and have been shown to be carcinogenic in experimental animals (30–33). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified 1,6-DNP and 1,8-DNP as possible human carcinogens (group 2B) (33). As described above, several mutagens and carcinogens were detected in surface soil, but a comprehensive investigation of the chemical components responsible for the mutagenicity of surface soil has not been performed, and the major mutagens in surface soil remain unclear.

In our assessment of the mutagenicity of surface soil in Japan, we found that organic extract from the surface soil of a park in Takatsuki in Osaka Prefecture showed a strong mutagenicity toward *S. typhimurium* TA98 in the absence of S9 mix. In this study, we attempted to identify major mutagens in the soil sample and detected three nitroarenes as major mutagens. Two of the three nitroarenes proved to be DNP isomers, and the other was determined to be a novel compound, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene (DNBeP). The distribution of 3,6-DNBeP in the surface soils from other sites and its contribution to the total mutagenicity of the surface soils are also described.

Experimental Procedures

Chemicals. 1,6-DNP (CAS 42397-64-8), 1,8-DNP (CAS 42397-65-9), and benzo[e]pyrene (BeP) (CAS 192-97-2) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sephadex LH-20 was purchased from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). HPLC grade acetonitrile and methanol were purchased from Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan). All other chemicals were of analytical grade.

Instrumentation. UV absorption spectra were measured with a Shimadzu SPD-M10Avp photodiode array detector. Electron impact mass spectra (EI-MS) were measured at 70 eV using a Shimadzu QP5050A mass spectrometer with a direct inlet system. ^1H NMR spectra were recorded for solutions in CDCl_3 with an Oxford NMR AS400 spectrometer operated at 400 MHz, and chemical shifts are reported in parts per million using tetramethylsilane as an internal standard. Melting points were determined on a Yanagimoto hot-stage apparatus and are uncorrected.

Collection of Surface Soil and Preparation of Organic Extracts. The collection of surface soil samples and preparation of organic extracts was performed as described previously (35). Surface soil samples were collected at parks in residential areas in Takatsuki, Izumiotsu, and Takaishi in Osaka Prefecture and Nagoya and Hekinan in Aichi Prefecture. Collected soils were dried at room temperature for 2 days and screened through a 60 mesh sieve. The sieved soils were extracted with acetone using a Soxhlet apparatus for 24 h. The extracts were filtered and evaporated to dryness. The residues were used for the mutagenicity assay and the isolation of mutagens.

Isolation of Mutagens from Soil Extracts. The Soxhlet extract was applied to a Sephadex LH-20 column (27 mm \times 800 mm). The materials were eluted with chloroform/methanol (1/1, v/v) as a mobile phase, and 15 mL fractions were collected. Fractions containing mutagens, which were eluted at elution volumes of 240–330 mL, were combined and evaporated. The residue was applied to a silica gel column (40 μm particle size, 11 mm \times 300 mm) for low-pressure liquid chromatography (LPLC) with 150 mL of *n*-hexane, *n*-hexane/toluene (9/1, v/v),

n-hexane/toluene (2/1, v/v), *n*-hexane/toluene (1/1, v/v), toluene, chloroform, and methanol as the mobile phase, and 15 mL fractions were collected. Fractions at elution volumes of 630–750 mL were combined and evaporated. The residue was applied to an Ultra pack ODS column (50 μm particle size, 11 mm \times 300 mm, Yamazen Corp., Osaka, Japan) for LPLC and then eluted with 270 mL of 85% acetonitrile and 180 mL of acetonitrile. Three milliliter aliquots of eluate were collected. Fractions at elution volumes of 48–84 and 147–186 mL were separately combined and evaporated to dryness.

The fraction with elution volumes of 48–84 mL from the Ultra pack ODS column was dissolved in 50% tetrahydrofuran and applied to a COSMOSIL 5C₁₈ AR-II column (5 μm particle size, 10 mm \times 250 mm, Nacalai Tesque Inc.) for HPLC and then eluted with the following gradient system of methanol in distilled water: 0–60 min, 75%; 60–70 min, a linear gradient of 75–100%; 70–90 min, 100%, at a flow rate of 3 mL/min. Three milliliter aliquots were collected. Fractions with retention times of 33–36 and 43–47 min were separately combined and evaporated. The residues of both fractions, dissolved in 50% tetrahydrofuran, were applied to a Luna 5 μm Phenyl-Hexyl column (5 μm particle size, 10 mm \times 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA) for HPLC. The materials from these fractions were eluted with a gradient system of acetonitrile in distilled water: 0–60 min, 55%; 60–70 min, a linear gradient of 55–100%; 70–90 min, 100%, at a flow rate of 3 mL/min.

The fraction with elution volumes of 147–186 mL from the Ultra pack ODS column was dissolved in 50% tetrahydrofuran and applied to a COSMOSIL 5C₁₈ AR-II column for HPLC. The materials were eluted with the following gradient system of methanol in distilled water: 0–60 min, 87%; 60–70 min, a linear gradient of 87–100%; 70–90 min, 100%, at a flow rate of 3 mL/min. Three milliliter aliquots were collected. Fractions with a retention time of 31–35 min were combined and evaporated. The residue, dissolved in 50% tetrahydrofuran, was finally purified by HPLC on a Luna 5 μm Phenyl-Hexyl column. The materials were eluted with a gradient system of acetonitrile in distilled water: 0–60 min, 62%; 60–70 min, a linear gradient of 62–100%; 70–90 min, 100%, at a flow rate of 3 mL/min. A mutagenic compound was isolated from the fraction with a retention time of 44–48 min. Its purity was confirmed on an Inertsil ODS-3 column (5 μm particle size, 4.6 mm \times 250 mm, GL Science Inc., Tokyo, Japan) with a mobile phase of 75% acetonitrile at flow a rate of 0.7 mL/min. All HPLC procedures were carried out at 30 °C, and eluates were monitored for absorbance at 254 nm. An aliquot of each fraction was used for a mutagenicity assay.

Synthesis of 3,6-DNBeP. Nitric acid ($d = 1.38$) (1 mL) was added dropwise to a stirred solution of BeP (100 mg) in acetic anhydride (5 mL) at room temperature. After the mixture was stirred for 30 min, the reaction mixture was poured into distilled water, and then, insoluble material was obtained by filtration. After the solvent was removed, the insoluble material was subjected to LPLC with a silica gel column (eluent, *n*-hexane/toluene (1:1, v/v)) and then to LPLC with an Ultra pack ODS column (eluent, methanol) to yield a yellow powder (1 mg); mp >300 °C. UV max (75% acetonitrile): 238, 281, 344, and 381 nm. EIMS m/z (%): 342 (100), 312 (30), 296 (11), 282 (17), and 250 (82). ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.95 (sextet, 2H, H = 10, 11), 8.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H = 2, 7), 8.93 (sextet, 2H, H = 9, 12), 9.03 (s, 2H, H = 4, 5), 9.09 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H = 1, 8).

Mutagenicity Assay. All of the samples were dissolved in dimethyl sulfoxide and assayed for mutagenicity by the preincubation method (36) using *S. typhimurium* TA98 (34), TA100 (37), YG1024 (38), YG1029 (38), and TA98/1,8-DNP₆ (39). The S9 mix contained 0.01 mL of S9, prepared from livers of male Sprague-Dawley rats treated with phenobarbital and β -naphthoflavone, in a total volume of 0.5 mL. Mutagenic potencies of samples were calculated from linear portions of the dose-response curves, which were obtained with three or four doses and duplicate plates at each dose. The slope of the dose-response curve was adopted as the mutagenic potency. When