

新規変異原・がん原物質の検索

研究分担者 若林 敬二 国立がんセンター研究所 所長

研究要旨

胆汁酸の逆流は胃切除手術後の残胃がんの発生等に関与していることが示唆されている。胆汁酸はそのほとんどがグリシンやタウリン抱合体として存在している。そのニトロソ化合物である、N-ニトロソグリココール酸(NO-GCA)及びN-ニトロソタウロコール酸(NO-TCA)は変異原性及び発がん性を示すことが報告されている。また、これらニトロソ胆汁酸抱合体由来のDNA付加体である、O⁶-CMdGや3-ESA-dCが、ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNA中から偽手術群よりも高いレベルで検出され、チオプロリンの投与によりそれら付加体レベルが偽手術群に近い値まで低下する事がわかった。本研究では、ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNAを用いて、もう一つのNO-TCA由来のDNA付加体であるN⁴-cholyI-dCの生成の有無を調べた。その結果、今回解析した全てのラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNA中からコール酸由来のDNA付加体であるN⁴-cholyI-dCが検出された。このことから、十二指腸液逆流モデルラットの胃内で胆汁酸のニトロソ化が起り、O⁶-CMdGや3-ESA-dC、N⁴-cholyI-dC等の内因性のDNA付加体の生成に関与する事が示唆された。

A. 研究目的

胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成され、そのほとんどがグリシンやタウリン抱合体として存在している。胆汁酸抱合体は、酸性条件下で亜硝酸ナトリウムにより、N-ニトロソ化され、N-ニトロソグリココール酸(NO-GCA)及びN-ニトロソタウロコール酸(NO-TCA)を生成し、これら化合物は変異原性および発がん性があることが報告されている。また、これらニトロソ胆汁酸抱合体由来のDNA付加体である、β-カルボキシメチルデオキシグアノシン(β-CM

dG)や3-エタンスルホン酸デオキシシチジン(3-ESA-dC)が、ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNA中から偽手術群よりも高いレベルで検出され、チオプロリンの投与によりそれら付加体レベルが偽手術群に近い値まで低下する事がわかった。このことから、胆汁酸は生体内でN-ニトロソ化され、ニトロソ胆汁酸抱合体由来のDNA付加体の形成を介して発がんに関与する事が推測される。本研究では、ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNAを用いて、もう一つのNO-TCA由来のDNA付加体であるN⁴-コー

ル酸デオキシシチジン (N^4 -choly1-dC)の生成の有無を調べた。

B. 研究方法

一群各3匹のラット十二指腸液逆流モデルおよび偽手術ラットの腺胃よりDNAを抽出し、核酸分解酵素で消化した後、HPLCで分離し、 N^4 -choly1-dCを含む画分を分取し、 ^{32}P -ポストラベル法で解析し、付加体の生成について調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験を実施する場合には、所属する研究機関の倫理委員会の承認を得たのち行っている。

C. 研究結果

今回解析した全てのラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNA中からコール酸由来のDNA付加体である N^4 -choly1-dCが検出された。その付加体レベルは、 10^{11} ヌクレオチドあたり0.2, 0.5および1.8個であり、 β -CMdGや3-ESA-dCと比較すると少ない事がわかった。一方、解析した全ての偽手術群の腺胃DNA中からは N^4 -choly1-dCに相当する付加体スポットは検出されなかった。

D. 考察

昨年度の研究で、ラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNAから、ニトロソ胆汁酸抱合体由来のDNA付加体である、 β -CMdGおよび3-ESA-dCが検出された。これら付加体のレベルは、偽手術群に検出されたものよりもそれぞれ、21及び4.5倍高かった。更に、亜硝酸のスカベンジャーであるチオプロリンを投与した場合には、 β -CMdGおよび

3-ESA-dCのレベルが偽手術群に近い値まで低下した。しかしながら、 β -CMdGおよび3-ESA-dCの生体内生成には、グリシンやタウリンのニトロソ化合物の関与も示唆されている。

一方、本研究において、コール酸由来のDNA付加体である N^4 -choly1-dCを初めて生体試料から検出することに成功した。このことから、十二指腸液逆流モデルラットの胃内で胆汁酸のニトロソ化が起こり、 β -CMdG、3-ESA-dC および N^4 -choly1-dCの生成にニトロソ胆汁酸抱合体の生成が関与している事が示唆された。

E. 結論

今回解析した全てのラット十二指腸液逆流モデルの腺胃DNA中からコール酸由来のDNA付加体である N^4 -choly1-dCが検出された。このことから、十二指腸液逆流モデルラットの胃内で胆汁酸のニトロソ化が起こり、内因性のDNA付加体の生成に関与し、胃発がんを誘発することが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takasuka N, Takahashi M, Hori Y, Kitahashi T, Iigo M, Imai T, Yoshimi N, Sugimura T, Wakabayashi K, Promotion of mouse two-stage skin carcinogenesis by diacylglycerol-rich edible oil. *Cancer Lett.*, 275: 150-157 (2009).
2. Kawanishi M, Nishida H, Totsuka Y, Nishimura K, Wakabayashi K, Yagi T, Mutagenic specificity of

- N-nitrosotaurocholic acid in supF shuttle vector plasmids. *Genes Environ.*, 31: 9-14 (2009).
3. Matsuda Y, Takeuchi H, Yokohira M, Saoo K, Hosokawa K, Yamakawa K, Zeng Y, Totsuka Y, Wakabayashi K, Imaida K, Enhancing effects of a high fat diet on 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Mol. Med. Rep.*, 2: 701-706 (2009).
 4. Ohe T, Suzuki A, Watanabe T, Hasei T, Nukaya H, Totsuka Y, Wakabayashi K, Induction of SCEs in CHL cells by dichlorobiphenyl-derivative water pollutants, 2-phenylbenzotriazole (PBTA) congeners and river water concentrates. *Mutat. Res.*, 678: 38-42 (2009).
 5. Ozeki M, Muroyama A, Kajimoto T, Watanabe T, Wakabayashi K, Node M, Synthesis of a new mutagenic benzoazepinoquinolinone derivative. *Synlett*, 11: 1781-1784 (2009).
 6. Yamamoto M, Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Totsuka Y, Takahashi-Nakaguchi A, Matsumoto Y, Sugimura T, Wakabayashi K, Molecular cloning of apoptosis-inducing Pierisin-like proteins, from two species of white butterfly, *Pieris melete* and *Aporia crataegi*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 154: 326-333 (2009).
 7. Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinase N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K, Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part. Fibre. Toxicol.*, 6: 23 (2009).
 8. Nishigaki R, Watanabe T, Kajimoto T, Tada A, Takamura-Enya T, Enomoto S, Nukaya H, Terao Y, Muroyama A, Ozeki M, Node M, Hasei T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Isolation and identification of a novel aromatic amine mutagen produced by the Maillard reaction. *Chem. Res. Toxicol.*, 22: 1588-1593 (2009).
 9. Nishimura K, Totsuka Y, Higuchi T, Kawahara N, Sugimura T, Wakabayashi K, Analysis of an RNA adduct formed from aminophenylnorharman. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)*, 53: 211-212 (2009).
 10. Mutoh M, Komiya M, Teraoka N, Ueno T, Takahashi M, Kitahashi T, Sugimura T, Wakabayashi K, Overexpression of low-density lipoprotein receptor and lipid accumulation in intestinal polyps in

- Min mice. *Int. J. Cancer*, 125: 2505-2510 (2009).
11. Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Kurahashi N, Mutoh M, Yamamoto S, Suzuki M, Moriyama N, Wakabayashi K, Tsugane S, Visceral fat volume and the prevalence of colorectal adenoma. *Am. J. Epidemiol.*, 170: 1502-1511 (2009).
 12. Wakabayashi K, Chemical and biological approaches for detecting environmental causes of cancer. *Genes Environ.*, 31: 87-96 (2009).
 13. Murakami Y, Imai N, Miura T, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y, Hada N, Yokoyama Y, Suzuki H, Mitsunaga K, Chemical confirmation of the structure of a mutagenic aminophenylnorharman, 9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole: An authentic synthesis of 9-(4'-nitrophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole as its relay compound. *Heterocycles*, 80: 455-462, (2010).
2. 学会発表
1. 寺岡直哉、武藤倫弘、高橋真美、上野俊也、荒木智子、杉村 隆、若林敬二、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 Pitavastatin の Min マウス腸ポリープ生成に対する抑制作用、がん予防大会 2009 (第 16 回がん予防学会)、2009 年
 2. 武藤倫弘、飯郷正明、寺岡直哉、高橋真美、北橋 宗、上野俊也、杉村 隆、若林敬二、窪田直人、門脇 孝、Azoxymethane 誘発マウス大腸発がんに対する adiponectin 遺伝子欠損の影響、がん予防大会 2009 (第 16 回がん予防学会)、2009 年
 3. 山本健一、小林昌彦、塩谷文章、若林敬二、NBS1 は ATR 活性化に直接関わる、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年
 4. 戸塚ゆ加里、今井俊夫、西川秋佳、能美健彦、川西優喜、八木孝司、市瀬孝道、杉村 隆、若林敬二、ナノ粒子により誘発される遺伝毒性：in vitro 小核、in vivo コメットおよび変異原性の解析、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年
 5. 山本真史、日比谷優子、戸塚ゆ加里、中野 毅、中口 梓、杉村 隆、若林敬二、メソテリンプロモーターを用いたピエリシン-1 遺伝子発現による抗がん活性、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年
 6. 武藤倫弘、飯郷正明、寺岡直哉、上野俊也、高橋真美、高須伸二、堀 美香、杉村 隆、若林敬二、アディポネクチンの腸発がんにおける役割、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年
 7. 樋口 孝、戸塚ゆ加里、西村興一、杉村 隆、若林敬二、内因性変異原・がん原物質アミノフェニルノルハルマンの RNA 付加体形成による miRNA 機能の修飾、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年
 8. 西村興一、戸塚ゆ加里、川原信夫、杉村 隆、若林敬二、アミノフェニルノルハルマン由来の DNA リン酸付加体の解析、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年

9. 寺岡直哉、武藤倫弘、上野俊也、高橋真美、杉村 隆、若林敬二、肥満マウスにおけるアゾキシメタン誘発大腸発がんの促進、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年
10. 北橋 宗、武藤倫弘、杉村 隆、若林敬二、今井俊夫、小動物用 X 線 CT を用いたシリアンハムスターの BOP 誘発膵臓腫瘍の画像化、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年
11. 上野俊也、北橋 宗、武藤倫弘、寺岡直哉、谷中昭典、杉村 隆、若林敬二、ウレタン誘発マウス肺腫瘍生成に対するインドメタシンの影響と micro-CT を用いた評価、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年
12. Wakabayashi K. Causes and Mechanisms of Colon Cancer Development, and Strategies for Its Prevention, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 2009
13. Totsuka, Y., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Biological activities of endogenous mutagens/carcinogens, aminophenyl orhartman and N-nitroso bile acid conjugates, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 2009
14. Totsuka Y, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinae N, Kawanishi M, Yagi T, Sugimura T, Wakabayashi K., Genotoxicity of nanoparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 2009
15. 小林沙衣、西崎真理奈、小関 稔、梶本哲也、野出 學、長谷井友尋、渡辺徹志、戸塚ゆ加里、若林敬二、メイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝子毒性評価、日本環境変異原学会 第 38 回大会、2009 年
16. 松本陽子、戸塚ゆ加里、増田修一、加藤竜也、能美健彦、後藤純雄、杉村 隆、若林敬二、ナノ粒子により誘発される in vivo 遺伝毒性、日本環境変異原学会 第 38 回大会、2009 年
17. 桐谷 英昌、西村 興一、戸塚 ゆ加里、川原 信夫、矢島 博文、杉村 隆、若林 敬二、アミノフェニルノルハルマン (APNH) 由来の DNA リン酸付加体の構造解析、日本環境変異原学会 第 38 回大会、2009 年
18. 尾後早耶佳、川西優喜、戸塚ゆ加里、若林敬二、八木孝司、微細粒子状物質の DNA 損傷性の評価、日本環境変異原学会 第 38 回大会、2009 年
19. 加藤竜也、増田修一、市瀬孝道、長谷井友尋、渡辺徹志、戸塚ゆ加里、若林敬二、木苗直秀、In vivo における 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene の遺伝毒性、日本環境変異原学会 第 38 回大会、2009 年
20. 西村 興一、戸塚 ゆ加里、川原 信夫、杉村 隆、若林 敬二、ニトロソ胆汁酸抱合体由来タンパク質付加体の解析、日本環境変異原学会 第 38 回大会、2009 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシン A の
遺伝子傷害性の比較

研究分担者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長

研究要旨

バルカン半島のドナウ川流域に見られる地域性の腎障害 (Balkan Endemic Nephropathy) の原因物質と考えられていたカビ毒オクラトキシン A、および新たな原因物質として注目されるこの地方に自生するウマノスズクサ科の植物由来のアリストロキア酸の遺伝子傷害性を比較したところ、後者において非常に強い変異原性が認められ、原因物質とし有力であることがわかった。変異体のシークエンス解析から AT から TA のトランスバージョン変異が特徴的に誘発されることをがわかり、その後バルカン地方の腎障害患者の癌組織における *p53* 遺伝子の変異パターンがこれと一致したことから、バルカン腎症におけるアリストロキア酸原因説に有力な分子証拠が得られた。

A. 研究目的

バルカン半島のドナウ川流域では、腎障害 (Balkan Endemic Nephropathy) が地域性に発生しており(図 1)、しばしば癌にまで発展する。従来その原因物質として、図 2 に示した、カビ毒オクラトキシン A (OTA) による穀物汚染の関与が疑われていた。しかし、最近になって、この地方に自生するウマノスズクサ科の植物由来のアリストロキア酸 (AA) が、有力な原因物質としてクローズアップされてきた。そこで、両者の遺伝子傷害性をトランスジェニックマウスを用いた変異原性試験により比較することにより、原因物質の特定に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1. 薬物処理

8-9 週令の Muta™Mouse 雄 (Covance Research Product) に対し、OTA、AA とともに LD₅₀ の約 1/4 量である 15 mg/kg で一週間おきに 4 回強制経口投与した。溶媒として AA は蒸留水、OTA はオリーブオイルを用い、一群あたり 4-5 匹のマウスに対し 10ml/kg で投与した。

2. 小核試験

初回および 2 回目の薬物投与 48 時間後に尾部血管より 5μl の末梢血を採取し、アクリジンオレンジ超生体染色法により小核を有する幼若赤血球を観察し、その出現頻度を比較した。

3. *lacZ* および *cII* 遺伝子の変異頻度解析

最終投与後 7 日目にマウスを頸椎脱臼法により屠殺し臓器を回収し、凍結保存した。

これら組織のホモジネートより、フェノール/クロロホルム法により DNA を抽出し、*in vitro* packaging 法により導入遺伝子をラムダファージへと回収した。*lacZ* 遺伝子の場合にはこれを *E.coli* C *galE*-株へ感染させ、*cII* 遺伝子の場合には、*E.coli* G1225(*hfl*-)株に感染させることにより変異体を選択し、変異頻度を算出した。

4. *cII* 遺伝子のシーケンス解析

変異体プラークより直接 PCR 反応にて *cII* 遺伝子全長(294bp)を含む 446bp の断片を増幅し、カラムにて精製後サイクルシーケンス反応を行い、キャピラリー方式蛍光自動シーケンサー (ABI310) にて塩基配列を決定した。

5. コメットアッセイ

ddY マウスを用い、OTA および陽性対照としてスチレンオキサイド (STO) を投与 3 時間後、及び 24 時間後に動物を頸椎脱臼により屠殺し、腎臓を摘出した。そして組織をホモジナイザーにて破碎後、アガロース溶液と混合し、あらかじめアガロースをコートしておいたスライドグラス上に滴下し、カバーグラスをかけて固めた。その後カバーグラスをはずし、さらに重層用のアガロースを加えて同様にして固化させた。こうして準備したスライドグラスを細胞溶解液に浸けたのち、アルカリ条件下 (PH=13) で電気泳動を行った。中和後エチジウムブロマイドにて染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。結果の判定はコメットの尾の長さにより 5 段階にクラス分けし、500 個当たりの核を観察した。

C. 研究結果

1. 小核試験

薬物投与 48 時間後に末梢血を採取し、小核を有する幼若赤血球の出現頻度を調べた結果、表 1 に示すように OTA、AA ともに小核の誘発性は認められなかった。これより、両化合物の骨髄における染色体異常誘発性は低いことがわかった。

2. *lacZ* および *cII* 遺伝子の変異頻度

OTA および AA を 15mg/kg で週一回、4 週間投与後、7 日目の各種臓器における *lacZ* および *cII* 遺伝子の変異頻度を調べた結果を表 3 および図 1 にまとめた。AA はその標的臓器とされる、腎臓および膀胱を含めて多臓器に非常に強い変異頻度を示した。特徴的であったのは、非常に明瞭な臓器特異性を示す点で、腎臓、膀胱、前胃、大腸においては、その他の臓器に比較して高い変異頻度が得られた。同じ胃でも腺胃では変異頻度の上昇は低く、肺、肝臓、骨髄、脾臓、精巣においても同様の傾向を示した。ただし、これらの臓器においても、変異頻度の上昇は統計学的に有意であった。

これに対して、OTA 処理においては、いずれの臓器においても有意な変異頻度の増加は認められなかった。

以上の結果より、*in vivo* における遺伝子突然変異誘発性は、OTA に比べ AA が明らかに高いことがわかった。また、泌尿器系組織で高い変異頻度が得られたことは、AA の人に対する毒性の標的臓器を反映するものであった。

3. *cII* 遺伝子のシーケンス解析

Muta™Mouse における本来の標的遺伝子である *lacZ* は、その全長が約 3kb と長くシーケンス解析が難しいため、全長 294bp と解析がしやすい *cII* 遺伝子を用いて、AA により腎臓、膀胱および前胃において誘発

された変異体のシーケンス解析を行なった。コントロール群においては、これまで報告されている通り、CpG配列における5メチルシトシンの脱アミノ化に由来すると考えられるGCからATへのトランジション変異が約3割と最も多かったのに対し、AA処理においては、ATからTAへのトランスバージョン変異がいずれの臓器においても最も多く、約半数を占めた。トランスジェニックマウスを用いた試験において観察される突然変異は主にGC塩基対に起こりやすく、AT塩基対をターゲットとするAAによる変異スペクトルは非常に特徴的なものである。

AAは図6に示すように、天然物としては珍しくニトロ基を持つアルカロイドであり、カルボキシフェナンスレン骨格を持ち、メトキシ基を持つI体と持たないII体の混合物である。生体内においては、ニトロ基がまず還元されてヒドロキシアミンが生成し、カルボン酸との間で環化し、サイクリックナイトレニウムイオンを生成する。この際、カチオンは非局在化でき、カルボニウムイオンも生成する。これらはDNAに対して反応性を示し、グアニンおよびアデニンに対して、図に示したような構造のアダクトを生成することが知られている。グアニンに対してはN2位に、アデニンに対してはN6位に、いずれもカルボニウムイオンを介して反応し、付加体を形成する。

同様の代謝活性化を受けるヘテロサイクリックアミン等は、主にグアニンのC8位に反応することが知られているが、これは生成したナイトレニウムイオンが、AAのようにカルボニウムイオンを生じないためであると考えられる。アデニン残基にもアダ

クトを生成する点がAAの特徴であり、これがATからTAへのトランスバージョン変異を誘発したと考えられる。

4. コメットアッセイ

OTAは染色体異常誘発性および遺伝子突然変異誘発性を示さなかったが、初期損傷としてのDNA傷害性を有するかを検討する目的で、ddYマウスの腎臓を用いてコメットアッセイを行なった。コメットアッセイは、組織から分離した核をアルカリ条件下で電気泳動することにより、DNA切断および付加体の検出を行なうものであり、こうした損傷によりDNAが断片化することにより泳動度が上がることにより、彗星(コメット)のような像が観察される。図4に示したようにこの損傷度合いをその泳動像から5段階に分類し、それぞれに対応する核の数を数えた。ここでType5はいわゆるティアードロップ型と呼ばれるもので、アポトーシスに起因すると考えられる。OTA 5mg/kg および10mg/kg処理3時間後に臓器を採取して調べた結果、濃度依存的な損傷細胞の出現が認められた。5mg/kgにおいては陽性対照として用いたスチレンオキシド2mg/kgとほぼ同等、10mg/kgにおいてはそれ以上の活性を示し、OTAは腎臓においてDNAの初期損傷を誘発する可能性が示された。

D. 考察

MutaTMMouseを用いた遺伝子突然変異の解析から、AAは多臓器に非常に強い変異原性を示し、BENの原因物質としては、OTAよりも有力であることがわかった。この変異原活性の強さは、強力な発癌物質であるベンツピレンやジメチルニトロソアミンな

どと同程度もしくはそれ以上であり、遺伝子傷害性は非常に強いことがわかった。一方、OTAについては、従来遺伝子傷害性に関しては議論の分かれるところだったが、今回の結果より、少なくともAAに比べるとその活性は非常に弱く、原因物質としての可能性は低いことがわかった。ただし、突然変異は誘発しなかったが、コメットアッセイの結果より、DNAの初期損傷は誘発する可能性があり、AAと複合的に働いてその遺伝子傷害性を助長しているという可能性もある。

さらに、AA原因説を裏付ける証拠として、我々がトランスジェニックマウスにて得たATからTAへのトランスバージョン変異が、その後他の研究者により、BEN患者に誘発された癌組織のp53遺伝子の変異の特徴と一致することが報告された(図5)。IARCのp53遺伝子突然変異データベースにおいて、通常の膀胱がんではATからTA変異は5%以下であるのに対し、BEN患者では8割近くがこの変異を持っていた。さらに、DNA付加体の解析より、BEN患者にAA由来のアダクトが検出されたことから、暴露および変異誘発に関して、分子レベルでの証拠が得られた。

以上の結果より、BENの主な原因物質はAAであることが判明した。

AAはバルカン地方において地域性の腎障害の原因となっていることが示されたわけであるが、その遺伝子突然変異誘発性の強さは注目に値する。実はAAを含むアリストロキア属の植物は、我々の身近にも存在し、過去には漢方薬に混入して重篤な腎障害を起こした例もある。これを受け、図

7に示したように、厚生労働省からアリストロキア酸を含む生薬・漢方薬に関する安全情報が出されている。防已と広防已のようにと基原植物が似ているために取り間違いをする例や、細辛のように局方に収載されている生薬でも、使われない地上部にはAAを含むという事実もあり、さらには、中国においてはAAを含む植物が生薬原料として用いられている例もあり、こうした薬物の使用には注意が必要である。

また、薬ではないがAAを含む植物であるウマノスズクサは、ジャコウアゲハという蝶の食草になっており、ジャコウアゲハは鳥などの外敵から身を守るためにAAを利用している。本邦においても、ジャコウアゲハは一般的に観察されることから、ウマノスズクサは自生しており、これが農作物等に混入した場合にはBENと同様の作用を示す危険性も考えられるため、注意が必要である。

E. 結論

バルカン腎症は、その地域に自生するアリストロキア酸含有植物である*aristolochia clematitis*が原因である。アリストロキア酸はマウスに対して多臓器に臓器特異性を持って非常に強い変異原性を示し、マウスにて得られた当然変異スペクトルの特徴が、実際のBEN患者のp53遺伝子の変異スペクトルと一致したことから、分子レベルでの証拠が得られた。

こうした結果を受けて、最近IARCではAAのヒトに対する発がん性の評価を、2Aから1へアップグレードした。

H. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe T, Tanaka G, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Nakajima M, Furihata C. Dose-dependent alterations in gene expression in mouse liver induced by diethylnitrosamine and ethylnitrosourea and determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res.* 673: 9-20, 2009.
2. Yamaguchi T, Suzuki T, Arai H, Tanabe S, Atomi Y, Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298: C140-C148, 2010.

2. 学会発表

1. 鈴木孝昌, Suresh Thiruppathi, 押澤正, Ramesh Doss, 田邊思帆里, 佐藤陽治, 鈴木和博 細胞・組織加工医薬品の品質評価および標準化に向けたプロテオーム解析技術の利用, 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会 (2009年7月)
2. T. Suzuki, A. Kohara, A. Ramadan, Y. Kikuchi, M. Honma, M. Hayashi Comparative study on in vivo genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for the Balkan Endemic Nephropathy, 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月)
3. C. Furihata, T. Watanabe, A. Tadakuma, M. Kido, Y. Ishikawa, M. Natsume, M. Nakajima, T. Suzuki, S. Hamada, A.

Koeda, K. Narumi, K. Oshida, A. Maeda, M. Hirayama, T. Sakuma, H. Sanada, I. Hanahara, M. Sakurai, W. Ohyama, E. Okada, H. Honda, S. Sutou
Differential gene expression and gene networks induced with genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in mouse liver examined by quantitative real-time PCR, 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月)

4. H. Takasawa, H. Suzuki, I. Ogawa, Y. Shimada, K. Kobayashi, Y. Terashima, H. Matsumoto, R. Ohta, K. Oshida, J. Tanaka, C. Aruga, N. Ikeda, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, T. Imamura, A. Miyazaki, Y. Saitou, S. Minowa, M. Kawabata, M. Hayashi Summary of collaborative studies of liver micronucleus assay in young rats- JEMS/MMS Collaborative Study Group, 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月)
5. T. Suzuki, Y. Luan, A. Kohara, M. Kogi, S. Tanabe, M. Honma, T. Yamaguchi, K. Suzuki Patterns of c-myc amplification revealed by the CGH array, Workshop: Genomics in Cancer Risk Assessment (2009年8月)
6. C. Furihata, T. Watanabe, K. Suenaga, H. Takasawa, A. Tadakuma, M. Kido, Y. Ishikawa, M. Natsume, M. Nakajima, T. Suzuki, S. Hamada, A. Koeda, K. Narumi, K. Oshida, A. Maeda, M. Hirayama, T. Sakuma, H. Sanada, I. Hanahara, M.

- Sakurai, W. Ohyama, E. Okada, H. Honda, S. Sutou Comparative analysis of gene expression and network between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in mouse and rat liver examined by quantitative real-time PCR, Workshop: Genomics in Cancer Risk Assessment (2009年8月)
7. T. Suzuki Genomic and Proteomic Approach in Toxicology, International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concerns (2009年9月)
8. T. Suzuki Proteomics approach to find new biomarkers for toxicity International Conference on Molecular Tools in Environmental Toxicology (2009年9月)
9. 鈴木孝昌, 小原有弘, 小木美恵子, 田邊思帆里, 本間正充 8番染色体特異的CGHアレイ解析による各種がん細胞株でのc-myc遺伝子領域増幅形式の解析, 第68回日本癌学会学術総会(2009年10月)
10. 鈴木孝昌 個の医療の実現に向けて必要となる診断技術、第46回全国衛生化学技術協議会年会(2009年11月)
11. 鈴木孝昌, 小原有弘, ラマダンアリ, 菊池裕, 本間正充, 林真 バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシンA, 日本環境変異原学会第38回大会(2009年11月)
12. スレッシュ テイルパッティ, ラメッシュ ドス, 押澤 正, 宮澤明史, 鈴木和博, 鈴木孝昌 ショットガンプロテオミクスによる変異原研究-遺伝子傷害性物質処理したマウス尿を使った検討、日本環境変異原学会第38回大会(2009年11月)
13. 降旗千恵, 渡辺貴志, 末永和也, 高沢博修, 鈴木孝昌, 夏目匡克, 中嶋圓, 濱田修一, 多田隈英未, 小枝暁子, 成見香瑞範, 大信田系裕, 前田晃央, 平山満朝, 佐久間智宏, 真田尚和, 大山ワカ子, 岡田恵美子, 本田大士, 須藤鎮世 トキシコゲノミクスに関するJEMS/MMS共同研究(2009年):ラットとマウス肝臓におけるqPCR法による遺伝子発現比較解析, 日本環境変異原学会第38回大会(2009年11月)
14. 西川可穂子, 山下香織, 石井暁子, 伊藤友美, Thiruppathi Suresh, 鈴木孝昌, 藤原葉子 高脂肪食マウス肝臓におけるプロテオーム解析-食餌性レスベラロトロールの評価-, 日本農芸化学会2010年度大会(2010年3月)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

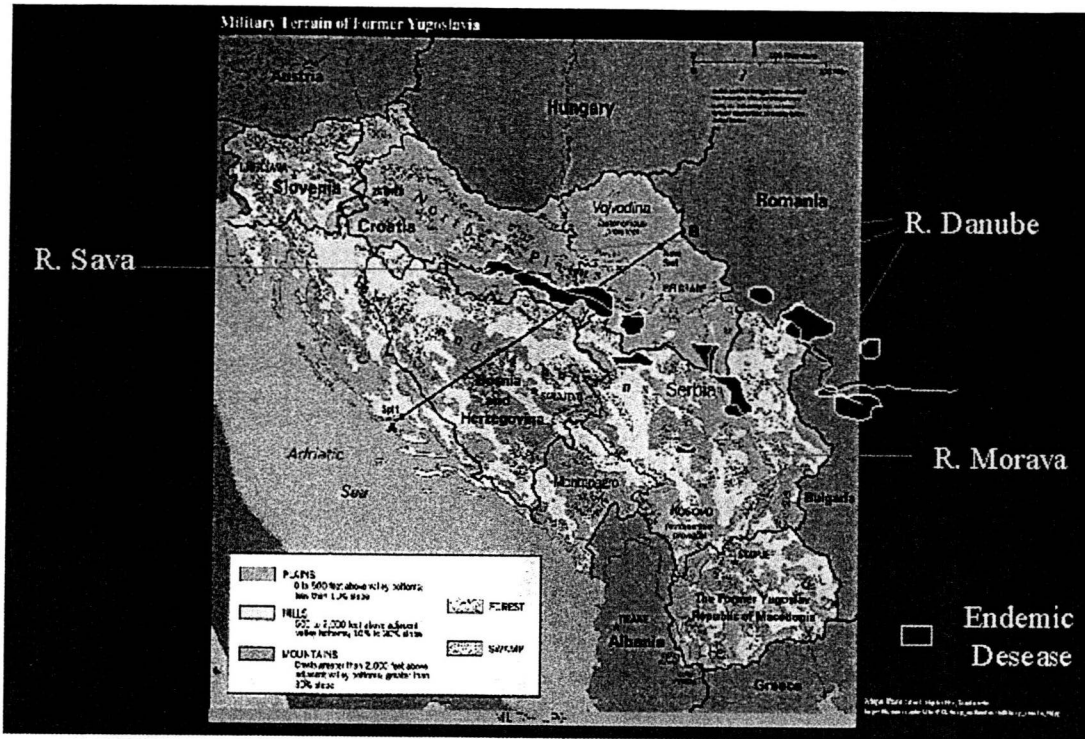
表 1 Muta™Mouse の末梢血を用いた小核試験

Chemical	Micronucleus/1000RETs				Average	SD
Control	1	1	1	2	1.25	0.43
Aristolochic acid	2	3	1	1	1.75	0.83
Ochratoxin A	2	3	2	1	2.00	0.71
MMC	25	24	27	36	28.0	4.74

表 2 アリストロキア酸で誘発された突然変異のスペクトル

Mutation Class	Kidney		Bladder	Forestomach
	Control (%)	AA (%)	AA (%)	AA (%)
Total	34 (100)	28 (100)	20 (100)	23 (100)
Base Substitution	25 (74)	24 (86)	18 (90)	22 (96)
Transitions	15 (44)	8 (29)	8 (40)	6 (26)
G:C to A:T	14 (41)	7 (24)	7 (35)	6 (26)
at CpG sites	11 (32)	1 (4)	4 (20)	4 (17)
A:T to G:C	1 (3)	1 (4)	1 (5)	0 (0)
Transversions	10 (29)	16 (57)	10 (50)	16 (70)
A:T to T:A	5 (15)	14 (50)	7 (35)	12 (52)
A:T to C:G	0 (0)	1 (4)	0 (0)	1 (4)
G:C to T:A	5 (15)	1 (4)	3 (15)	3 (13)
G:C to C:G	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
-1 frameshifts	4 (12)	1 (4)	1 (5)	1 (4)
+1 frameshifts	3 (9)	1 (4)	0 (0)	0 (0)
Deletion	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Insertion	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Complex	2 (6)	2 (7)	1 (5)	0 (0)
MF (x10⁶)	45.5	496.4	986.3	667.4

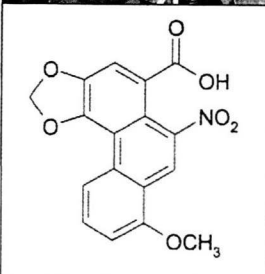
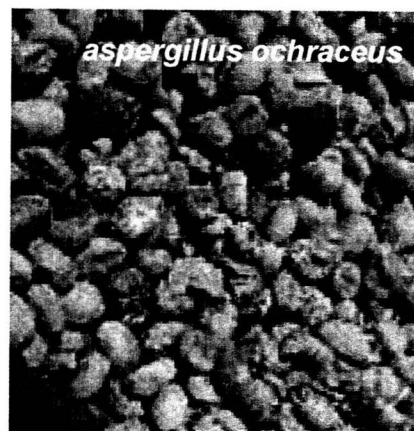
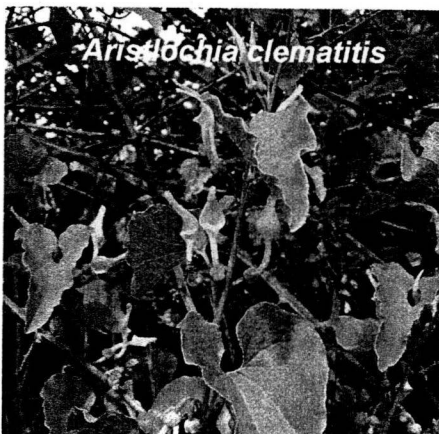
図1 バルカン腎症の発生地域



<http://www.wramc.amedd.army.mil/education/lecture/nephrology/Pages/Balkan.aspx>

図2 バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシンA

ARISTOLOCHIC ACID VS OCHRATOXIN A



- (i) マイコトキシン仮説
BENはこの地域の穀物に発生するカビが産生するカビ毒の混入により引き起こされる。
- (ii) アリストロキア酸(AA)仮説
BENは穀物に混入した *Aristolochia clematitis* の種子の長期摂取により引き起こされる。

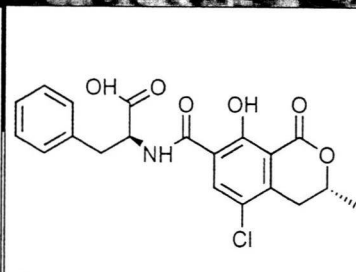


図3 各種臓器における *lacZ* および *cII* 遺伝子の突然変異頻度

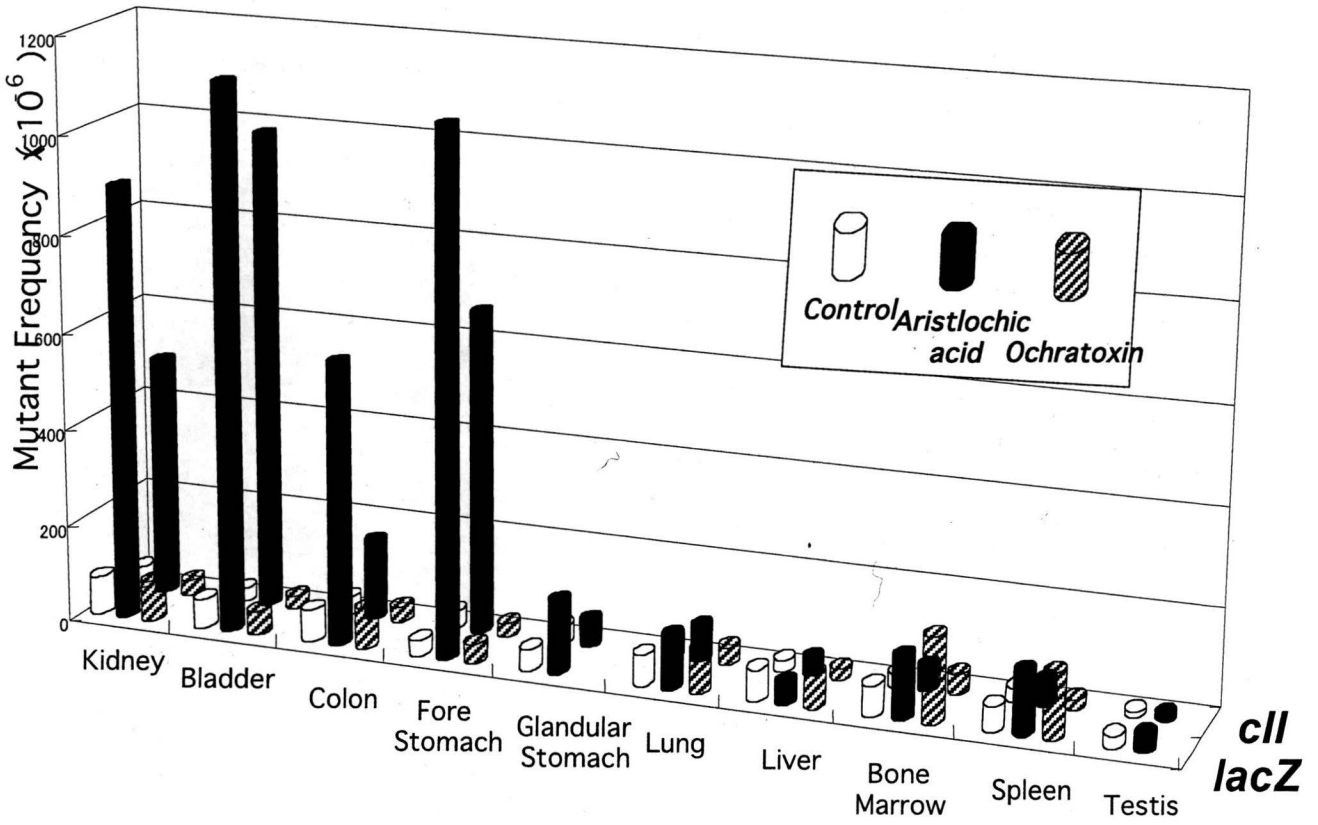


図4 ddY マウス腎臓におけるオクラトキシンによるコメット誘発

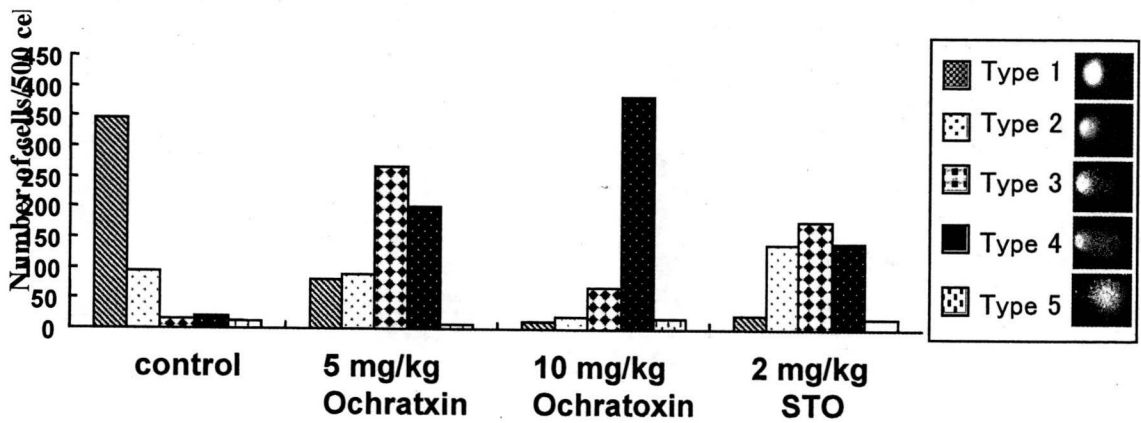


図 5 BEN 患者における AA 暴露の分子証拠

AAによるDNAアダクト生成

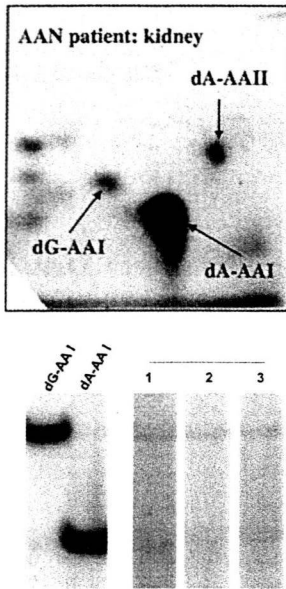
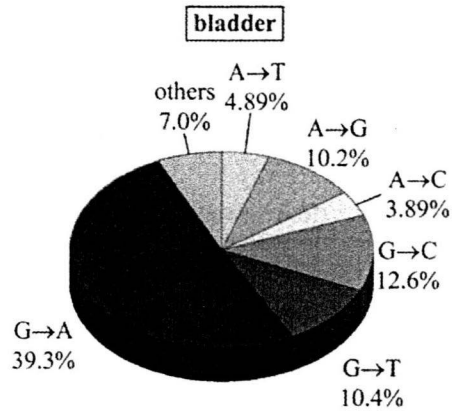


Fig. 4. Identification of AL-DNA adducts in urothelial cancer tissues of patients residing in endemic villages. DNA (10 μ g) extracted from upper urinary tract cancer tissues of patients residing in endemic villages of Croatia was used for quantitative analysis of AL-DNA adducts.

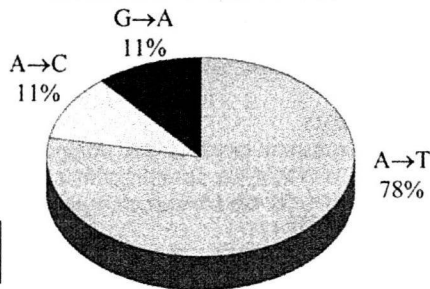
Ref; Grollman et al., PNAS 104, 12129-34 (2007)
Artet et al., Carcinogenesis, 28, 225-31 (2007)

BEN患者がん組織のp53変異スペクトル



IARC TP53 database

transitional cell carcinoma



BEN patients (Croatia)

図 6 アリストロキア酸の代謝活性化と DNA 付加体形成

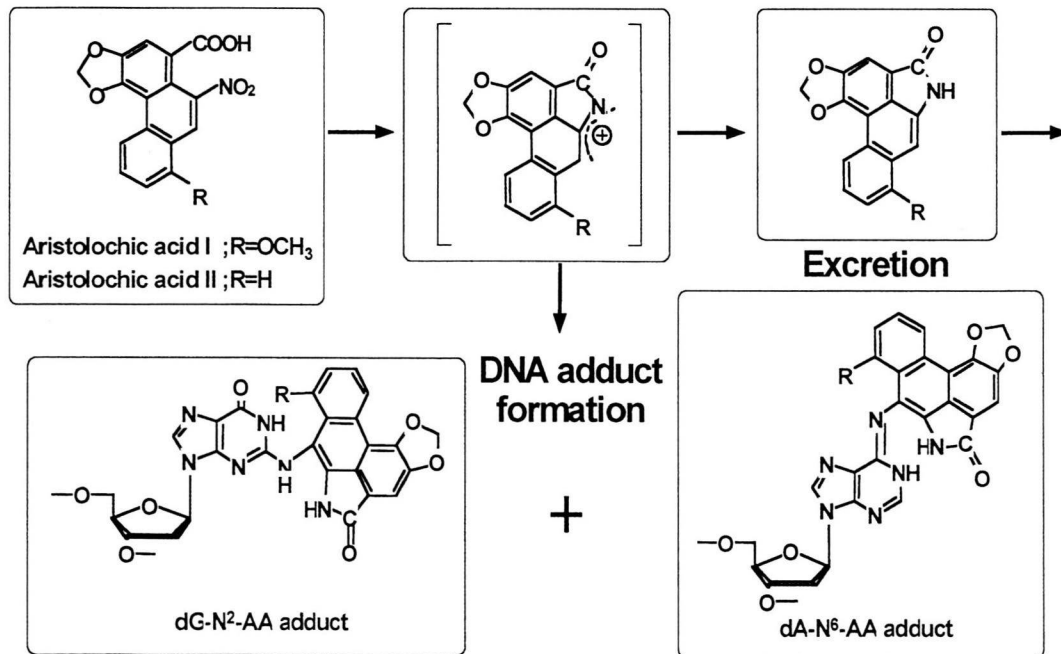


図7 アリストロキア酸に関する安全情報

医薬品・医療用具等安全性情報 No.161

平成12年(2000年)7月
厚生省医薬安全局

4 アリストロキア酸を含有する生薬・漢方薬について

SAISHIN (細辛) Root or Rhizome

ウスバサイシン *Asiasarum sieboldii* F. Maekawa

ケイリンサイシン *Asiasarum heterotropoides* F. Maekawa var. *mandshuricum* F. Maekawa
(Aristolochiaceae) **Shoot contains AA**

MOKUTSU (木通)

アケビ *Akebia quinata* Decaisne

ミンバアケビ *Akebia trifoliata* Koidzumi (Lardizabalaceae)

KANMOKUTSU (関木通 *Aristolochia manshuriensis* Kom.) is also used with same name as MOKUTSU in China

BOUI (防己)

オオツラフシ *Sinomenium acutum* Rehder et Wilson (Menispermaceae)

KOUBOUI 広防己 (*Aristolochia fangchi* Wu) is also used with same name as BOUI in China

MOKKOU (木香)

モッコウ *Saussurea lappa* Clarke (Compositae)

SEIMOKKOU 青木香 (*Aristolochia contorta* Bge, *Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc)

NANMOKKKOU 南木香 (*Aristolochia yunnanensis* Franch) is also used with same name as MOKKOU in China

外因性及び内因性化学発がん要因の検索とリスク評価

研究分担者 渡辺 徹志 京都薬科大学 教授

研究要旨

黄砂と共に中国大陸から長距離輸送される発がん関連物質の日本の大気に対する影響を明らかにするため、全国で大気粉塵を捕集し、それらの変異原性及び化学成分を調べた。グルコースとトリプトファンの生体内モデルメイラード反応により新規化合物であるアミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体(ABAQ)が生成することを合成化学的に確認するとともに、ABAQがネズミチフス菌 YG1024 株に対し発がん性ヘテロサイクリックアミンである PhIP と同程度の変異原性を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

中国大陸から飛来する発がん関連物質の日本における大気汚染及びヒト発がんに対する影響を明らかにすることを目的とする。また、糖尿病罹患患者の高発がんリスクの原因を明らかにするため、同病態時に生体内で発生する変異原物質の構造を明らかにするとともにそのリスク評価を行う。

B. 研究方法

全国約10か所において1年間を通して大気粉塵を捕集した。夏期、冬期、黄砂期にあたる各1ヶ月分の大気粉塵抽出物の変異原性をネズミチフス菌 YG1024 株及び YG1029 株を用い哺乳類代謝酵素系(S9 mix)の存在下及び非存在下で調べるとともに大気粉塵中の化学成分(金属、イオン類等)の定量分析を行った。また、米国海洋大気庁

(NOAA)のHYSPLITを用い後方流跡線解析を行った。

グルコースとトリプトファンの生体内モデルメイラード反応物から単離された変異原物質を構造決定するため、アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体(ABAQ)を別途合成し、機器分析により解析した。さらに合成標準品のネズミチフス菌に対する変異原性をS9 mix存在下及び非存在下で試験した。

(倫理面への配慮)

動物実験及び組み換え生物を使用する実験は研究機関の倫理委員会の承認を得たのち行った。

C. 研究結果

夏期、冬期及び黄砂期に採取した大気粉塵について、大気粉塵のメタノール抽出物の変異原性試験を行った結果、YG1024 (S9

mix非存在下) > YG1024 (S9 mix存在下) > YG1029 (S9 mix非存在下) > YG1029 (S9 mix存在下)の順に陽性率が高く、YG1024に対してはほぼすべての試料が変異原性を示した。また、多くの試料が、4条件の内、S9 mix非存在下でYG1024を試験菌株とした際に最も強い変異原活性を示した。全国において冬期及び黄砂期に採取した多くの大気粉塵の抽出物が夏期の大気粉塵のそれより強い変異原性を示し、そのS9 mix非存在下でのYG1024株に対する変異原性強度は粉塵濃度と相関する傾向のあることが分かった。また、粉塵抽出物の変異原性の強さは燃焼由来の化学成分であるSO₄²⁻濃度やPb濃度とも正の相関性を示す傾向がみられた。後方流跡線解析の結果、強い変異原性を示した大気粉塵が捕集された日の気塊の多くが96時間以内に中国大陸から移動してきたことが示唆された。

ABAQ標準品を別途合成し、合成標準品と生体内モデルメイラード反応物から得た変異原性物質のHPLCにおける保持時間及びUV吸収スペクトルを比較した。その結果、それらが一致したことから、その変異原性物質をABAQであると同定した。ABAQはネズミチフス菌TA98、TA100、YG1024、YG1029の各株に対しS9 mix存在下で変異原性を示した。特にYG1024に対して強い活性を示し、1 µg当たり 約6000の復帰変異コロニーを誘発した。

D. 考察

燃焼機関より放出された物質が大気粉塵中の主要な変異原物質であり、それらの発生源は大気粉塵を捕集した地域及び中国大陸に存在する燃焼機関であることが示唆さ

れた。

グルコースとトリプトファンが生体内モデルメイラード反応により新規化合物ABAQが生成することがわかった。またそのネズミチフス菌に対する変異原性の強さは変異・がん原性ヘテロサイクリックアミンであるPhIPと同程度であった。

E. 結論

これまでに、1年間を通して捕集した大気粉塵の1/4程度しか変異原性試験及び化学成分分析が行われていないことから、今後更に本研究を継続し長距離輸送発がん関連物質の影響を解明する必要がある。

ABAQの生物活性を調べると共にヒト体内で生成するか、特に糖尿病状態の進行との関係について明らかにする必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hasei, T., Watanabe, T. et al, Determination of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene in surface soil and airborne particles, and its possible sources, diesel particles and incinerator dusts, Journal of Health Science, 55, 567-577, 2009.
2. Kawanishi, M., Watanabe, T. et al, Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells *invitro* and *in vivo*, Mutagenesis, 24, 279-284, 2009.
3. Oda, Y., Watanabe, T. et al, Genotoxic activation of the environmental