

15 - 22 環境化学発がん物質の曝露評価法の開発及び疫学研究への応用による発がんリスク評価に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 花岡 知之

研究成果の要旨

LC/MS/MS を用いた DNA 付加体の網羅的分析法の開発に着手した。尿中 8-OH-dG/Cre 値または 8-OH-dG/7-MG 値を迅速に評価できる分析法を開発した。アミノフェニルノルハルマンは全ての 24 時間尿サンプルから検出され、喫煙者で 49-449 pg、非喫煙者で 21-594 pg であった。DNA 付加体量の体内分布の検討のために解剖遺体の臓器各部位を系統的に保存し DNA を採取した。尿中 8-OH-dG と尿中エテノ dA との間に相関がみられた。毛髪中 PhIP 量と食事調査から把握した焦げの摂取とは良く相関していた。多環芳香族炭化水素高濃度曝露集団において CYP1A1 酵素活性が高い群で白血球 DNA 付加体量が多くなることを観察した。代謝酵素遺伝子など 47 遺伝子の SNPs について、日本人での頻度、地域差、環境要因との関連を確認した。OGG1 遺伝子 Ser326Cys 多型が胃炎と胃癌との関連を修飾することを観察した。MYH の新たなスプライス部位の多型 IVS10-2A > G を発見した。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
花岡 知之	国立がんセンターがん予防・検診研究センター 室長	多環芳香族炭化水素曝露の体内曝露指標および DNA 付加体による評価
市場 正良	佐賀大学医学部 助教授	多環芳香族炭化水素 DNA 付加体の検討
河井 一明	産業医科大学産業生態科学研究所 助教授	酸化 DNA 付加体の検討
戸塚 ゆかり	国立がんセンター研究所 研究員	生体試料中のヘテロサイクリックアミンの定量
梶村 春彦	浜松医科大学 教授	環境発がん物質の内部曝露を修飾する感受性要因の検討
井之上 浩一 ^{*1}	星薬科大学 助手	生体試料中の環境発がん性物質および発がん抑制物質の微量分析

*1：平成15年4月1日～平成16年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、多環芳香族炭化水素、ヘテロサイクリックアミン、酸素ラジカルなど重要な化学発がん物質・要因について、体内内部曝露量や DNA 付加体量を指標とする曝露評価の妥当性を検討し、がん疫学への応用可能性をさぐることである。がん疫学研究において環

境要因と発癌との関係をみえにくくしている代謝活性化・解毒・DNA 修復などの酵素活性の個人差を、このような曝露評価のアプローチで克服できるかどうかを確かめるために、酵素活性などの個人差についても考慮しながら検討を行う。

2 研究成果

LC/MS/MS を用いた DNA 付加体の網羅的分析法の開発に着手した。今後、この方法を確立し、最終的にはヒト体内における付加体データベースの作成をめざす。また、この方法を利用して、付加体の出来方を総合的にとらえて癌との関係を検討することが可能かどうかについても検討を行なう（花岡、研究協力者：京都大学松田）。

尿中 8-OH-dG と同時にクレアチニンおよび RNA の分解物である 7-メチルグアニン(7-MG)を分析することに成功した。8-OH-dG/Cr 値または 8-OH-dG/7-MG 値を迅速に評価することが可能となった（河井）。

尿中のアミノフェニルノルハルマン（APNH）ならびに、その前駆体であるノルハルマンおよびアニリンが分析可能であることを確認した。検出限界は 5 pg/L、3 pg/L、10 pg/L であった。18 名のボランティアについて 24 時間蓄尿サンプルを用い、これらの定量を行った。その結果、全てのサンプルから APNH が検出された。24 時間尿あたりの APNH の量は、喫煙者で 49 - 449 pg、非喫煙者で 21 - 594 pg であり、喫煙者と非喫煙者の間に明確な差異は認められなかった。ノルハルマンおよびアニリンも全てのサンプルから検出され、喫煙者と非喫煙者の間に差は認められなかった。（戸塚）

高分子素材由来フェノール性エストロゲン活性化学物質であるビスフェノール A の生体試料中のレベルを高感度に分析できる方法を確立した。尿中の定量限界は、10 倍濃縮を行なった場合、0.1 - 0.5 ng/ml 付近であり、疫学研究へ応用可能であると考えられた。

DNA 付加体量の体内分布の検討のために、解剖遺体 25 体の肺、食道、胃、脾臓、結腸、直腸、肝臓、腎臓、膀胱、乳腺、前立腺、血液の各臓器各部位を系統的に保存し DNA を採取し保存した（花岡、研究協力者：東京医科大学中村）。これらの臓器について、ポストラベリン法で芳香族付加体の分析を開始した（市場）。

複合曝露の影響については、ベンゾピレン DNA 加体形成へのエタノール同時曝露の影響を、アセトアルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスを用いて検討している。投与するエタノールとベンゾピレンの投与レベルの組み合わせおよび ALDH2 遺伝子欠損マウスでの影響について検討中である（市場）。

DNA 付加体間の相互関係については、閉経後非喫煙女性 30 名について尿中 8-OH-dG と尿中エテノ dA との関係を観察したところ、相関がみられた（河井）。

LC/MS により毛髪中の PhIP が高い信頼性で検出できる方法を開発した。ボランティアから提供された 1~3 ヶ月間隔の 2 時点の毛髪中 PhIP 量は良い相関を示してい

た。毛髪中 PhIP は食事調査による魚と肉の焦げの摂取とよく相関しており、日常的なヘテロサイクリックアミン曝露のバイオマーカーとなると考えられた。毛髪中ヘテロサイクリックアミンを指標として、大規模疫学研究の食品摂取頻度調査票からの推定摂取量の妥当性の検討を開始した（花岡、研究協力者：昭和学院短大小林）。

個人差を生じる要因として代謝酵素の遺伝子など 47 の遺伝子の 284SNPs について日本人での頻度、地域差を確認し、さらに基本的な環境要因である喫煙、飲酒との関連を検討した。喫煙習慣と OGG1、SLC6A4、EPHX1、ESR1、CYP17A1 の SNPs、飲酒習慣と ALDH2、NUDT1 の SNPs とに相関がみられた（花岡）。

多環芳香族炭化水素の高濃度曝露集団において、ポストラベル法で測定した白血球 DNA 付加体量と CYP1A1 遺伝子多型との関連を調べたところ、酵素活性が高い群で付加体量が多くなることが示された。

胃癌の症例対照研究において、OGG1 遺伝子の Ser326Cys 多型が胃炎と胃癌との関連を修飾していることを観察した。DNA 酸化損傷のマーカーのレベルがこの SNP で修飾される可能性が示された（花岡）。

腫瘍の生物学的性質と相関があると考えられ、かつ RNA やタンパクレベルでの変化を確認した MYH、Neil1、KLK12 遺伝子について、多型の生物学的機能を詳細に解析した。これらの多型やその領域のがんリスク、および環境要因との相互作用を調べるため、既存の症例対照研究のサンプルを利用して検討を行なっている。また、MYH の新たなスプライス部位の多型 IVS10-2A>G を発見した。この多型を、胃癌の症例対照研究で検討したが、ヘテロ型においてはリスクの上昇はみられなかった（梶村）。

Eph-Ephrin 系を対象として、種々の外部あるいは内部の因子、たとえばリガンドなどによる影響および機構を解析し、腫瘍の生物学的多様性を検討した（梶村）。

3 倫理面への配慮

曝露要因に関する研究については疫学研究倫理指針、遺伝子多型の解析については遺伝子解析倫理指針に従って行っている。動物実験は各所属施設の動物実験倫理指針に従い、最小限の犠牲で合理的な実験を行うよう配慮している。