

## 16-7 新規化学発がん要因の検索とその生物活性

主任研究者 京都薬科大学 渡辺徹志

### 研究成果の要旨

強い変異原性を示した大阪府内および愛知県内の表層土壌中の主要な変異原物質が類似の化合物である可能性が高いことを明らかにした。3,6-dinitro[e]pyrene (DNBeP)が大気粉じんおよび表層土壌から検出され、環境中に広く分布していることが示唆された。生体内メイラード反応を想定した、L-トリプトファン、グルコースおよびフェントン試薬の反応液から変異原物質を単離し、X線解析を行った。また、この化合物をヒト尿中などから LC-ESI-MS 法を用い高感度に定量する分析法を開発した。炎症部位で生成する窒素種であるパーオキシナイトライトと核酸塩基の反応性が著しく大きく、シトシンとグアニンからニトロ誘導体と考えられる化合物が生成することがわかった。Ames試験において極めて強い活性を示す 3,6-DNBeP がヒト肝がん由来細胞株 HePG2 に対し強く姉妹染色分体交換を誘発することを明らかにした。

### 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
渡辺徹志	京都薬科大学 助教授	新規ニトロアレーン化合物の検索と生物活性
糠谷東雄	静岡県立大学薬学部 助教授	生体内メイラード反応モデル系で生成する変異原物質の検索
高村岳樹	国立がんセンター研究所 研究員	生体内メイラード反応で生成する変異原物質の生物活性
寺尾良保	静岡県立大学環境科学研究所 教授	新しい変異原・発がん物質の構造証明と発生メカニズムの解明
鈴木利典	就実大学薬学部 助教授	内因性窒素酸化物の検索
川西優喜	大阪府立大学 助手	新規変異原物質の変異誘発機構

### 総括研究報告

#### 1 研究目的

ヒト発がんの多くが環境因子および内因性因子によるものであることが指摘されており、これまでに多数の変異・がん原物質が食品中や環境中から単離・同定されてきた。しかし、環境中の主要な変異・がん原物質の多くは未だ構造が明らかにされていないと考えられている。

また、生体内において生成する未知の内因性発がん物質の存在も示唆されている。本研究の目的は、食品などを含め、環境中に存在したり生体内において生成したりする主要な新しい変異・がん原物質を検索し、分離・同定するとともにそれらの生物活性や発生機構等を解明する

ことである。また、それらの発生や曝露を防止するための基礎的資料を得ることで、ヒトがん発生の予防に貢献する。

## 2 研究方法

大阪府および愛知県において採取した表層土壌のソックスレー抽出法物について変異原性を指標として、Sephadex LH-20 カラム、シリカゲル中圧カラムおよびODS中圧カラムを用い分画後、HPLCにより変異原物質を単離した。表層土壌中および大気分じん中の 3,6-DNBeP をカラムクロマトグラフィーにより精製する条件ならびにオンライン還元後HPLC分析する条件を検討した。本精製法および分析法を用い 3,6-DNBeP の定量分析を行った。(渡辺) L-トリプトファンおよびD-グルコースの溶液にフェントン試薬を加え、一週間、37°Cの条件で反応させた反応液から液々分配法および各種カラムクロマトグラフィーにより変異原物質を単離した。単離した変異原物質から単結晶を得、X線結晶解析を行った。本変異原物質の各種試料からの抽出・精製条件ならびにエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (ESI/MS/MS) での分析条件を検討した。(高村) フェントン試薬存在下、L-トリプトファンとD-グルコースから生成する変異原物質だと予想されたpydoacridine誘導体合成のため、その基本骨格の合成ルートを検討するとともに、さらに臭素化および臭素置換基のカルボキシル基への変換により目的化合物を合成する条件について検討した。(寺尾) 中性条件下、37°CでL-トリプトファンと4種類のカルボニル化合物を一定時間反応させた後、反応物をCHCl<sub>3</sub>あるいはブルーコットンにより抽出し、抽出物の*S. typhimurium* TA98 およびTA100 に対する変異原性を試験した。(糠谷) 種々の核酸構成分子とパーオキシナイトライドとの反応性について解析するとともに反応生成物についてHPLC等により検討した。仔牛胸腺DNAをリン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解後、亜硝酸イオンの存在下および非存在下で太陽光照射による核酸塩基の脱離およびマロンジアルデヒド生成について定量的検討を行った。(鈴木) 3,6-DNBePのgenotoxicity について明らかにするため、ほ乳類細胞培養細胞に対する姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発性を指標に調べた。試験細胞としてSCE試験に一般的に用いられるチャイニーズハムスター野生型細胞 (CHO AA8) とそのヌクレオチド除去修復欠損細胞 (CHO UV135 (ERCC1 欠損)) を用いた。また代謝活性能が高く、薬物代謝研究や変異原性試験などで一般的に使用されるヒト肝がん由来細胞株HepG2 も実験に供した。(川西)

## 3 研究成果

大気中には多種類の変異・がん原物質が存在するが、それらはやがて地表面に降下することから、変異・がん原物質による大気汚染が進行している地域では表層土壌もそれらによる汚染が進んでいると考えられる。今年度は強い変異原性を示した大阪府及び愛知県の表層土壌について含まれる主要な変異原物質を比較するとともに、それらの分離・同定を試みた。また、最近、極めて強い変異原性を有する 3,6-dinitrobenzo[*e*]pyrene (DNBeP) が表層土壌中からはじめて検出されたことから、3,6-DNBePの分布状況および発生源の解明を最終的な目的として、3,6-DNBePの分析法の開発を試みた。大阪府(高槻市、泉大津市) および愛知県(名古屋市、碧南市) において採取した表層土壌の抽出物は*S. typhimurium* TA98 に対し、S9 mix非存在下において抽出物 1 mgあたり 12,800、5,280、14,460 及び 1,240 revertantsの変異原性を示した。各土壌抽出物をSephadex LH-20 カラムおよびシリカゲル中圧カラムにより分画して得た強変異原性画分をODS中圧カラムにより分画した。その結果、各土壌抽出物の溶出液は類似した変異原性強度のパターンを示し、それぞれをFr. 1~5に分画できた。各土壌抽出物より得たFr. 1およびFr. 2の土壌抽出物の変異原性に対する寄与率は40~53%および7~15%であった。各Fr. 1をCOSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-IIカラムを用いてHPLC分画した結果、1,6-dinitropyrene (DNP) および 1,8-DNPの保持時間に相当する画分のみ非常に強い変異原性が認められた。これらの強変異原性画分をさらにLuna 5  $\mu$  Phenyl-Hexylカラムにより分画した結果、1,8-DNPが単一ピークとして検出された。Fr. 2をCOSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-IIカラムを用いてHPLC分画した結果、保持時間25~35分の画分に強い変異原性が認められた。この変異原性画分をPhenyl-Hexylカラム次いでCOSMOSIL 5PYEを用い分画することにより強い変異原物質を単離した。また、表層土壌および大気分じん中の 3,6-DNBePの精製法および分析法について検討した結果、各抽出物中の 3,6-DNBePをカラムクロマトグラフィーで精製後、オンライン還元し、蛍光-HPLCを用いることにより高感度で分析可能であることがわかった。本分析法を用い京都府および大阪府の表層土壌を分析したところ、すべての試料から検出され (355~5,004 pg/g) であり、それら抽出物の変異原性に対する 3,6-DNBePの寄与率は17~31%であった。また、京都市、大阪市および東京で採取した大気分じんすべてから検出され、137~1,238 fg/m<sup>3</sup>であった。(渡辺)

メイラード反応はタンパク質またはアミノ酸のアミノ

基と還元糖のカルボニル基が非酵素的に反応し、シッフ塩基を経由してアマドリ転位生成物に至る反応であり、生体内でも同様の反応が起こることが知られている。そこで、生体内におけるメイラード反応に由来する変異原物質の検索を行う目的で、アミノ酸、グルコースおよびラジカル発生試薬の混合液中に生成する変異原物質の単離・同定を試みた。フェントン試薬存在下でのL-トリプトファンとD-グルコースの反応液から変異原性の強い化合物Iを単離した。各種機器分析の結果、化合物Iはpyridoacridine誘導体であると予想された。構造決定のため、各種条件下で単結晶生成を試みた。その結果、ジメチルホルムアミド-トリエタチルアミン-水系に溶解させた場合に微小な単結晶を得ることができた。得られた単結晶をX線解析装置により解析を行ったところ、推定分子量より18 dalton大きい4-phenylquinoline誘導体の解析結果が得られた。本単結晶の質量分析を行ったところ、推定分子量より18大きい質量数が得られたこと、さらにHPLCによる分析において化合物Iと異なる保持容量に溶出したことから、本単結晶は化合物Iが加水分解したものであると考えられた。今後、さらに別途合成により化合物Iの構造確認を行う必要がある。また、ヒト尿中などの化合物Iの分析法の開発を試みた。精製条件検討のため、化合物Iの標準水溶液からブルーレーン法により抽出し、ODS-80Tsを固定相とし、アセトニトリル-25 mM リン酸緩衝液 (pH2.0) およびアセトニトリル-0.05% ジエチルアミン/酢酸 (pH6.0) を移動相とする二段階のHPLCにより精製後、ESI/MS/MSを用いることにより、非常に高感度で化合物Iを定量分析できることがわかった。(高村)

フェントン試薬存在下、L-トリプトファンとD-グルコースとの反応により生成した化合物Iの別途合成経路を確立するため、その基本構造であるpyridoacridine誘導体の全合成法について検討するとともにその6位へカルボキシル基の導入法について検討を行った。Pyridoacridine誘導体の合成ルートの検討では、3,5-dinitroacetanilideの部分還元による3-amino-5-nitroacetanilide合成段階で $\text{Fe}_3(\text{CO})_{10}$ 還元を採用することにより、3-amino-5-nitroacetanilideが効率よく得られることがわかった。Pyridoacridine誘導体の臭素化法として、ジオキサンに臭素を加えて生成する臭素-ジオキサン複合体による臭素化を検討したところ、 $-70^\circ\text{C}$ 以下で反応させることにより一臭素置換体が効率よく生成することがわかった。また、各種機器分析により、5-amino-6-bromo誘導体が生成したことを確認した。

5-Amino-6-bromo誘導体の遊離アミノ基をアセチルアミノ基としたのち、 $\text{CO} / \text{Pd}(\text{OAc})_2 / \text{MeOH}$ の系によりカルボキシルへの変換を試みた。LC-MS分析の結果、メトキシカルボニル置換体の存在が確認されたことから、さらにアルカリ加水分解を行った。しかし、L-トリプトファンとD-グルコースとのメイラード反応によって生成した化合物Iに相当する化合物の存在をLC-MSで確認できなかった。今後、他の合成方法を確立する必要がある。(寺尾)

生体内メイラード反応で生成する変異原物質の構造を解明するため、モデル反応系として、リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、 $37^\circ\text{C}$ でL-トリプトファンと4種類のカルボニル化合物について反応を行った。カルボニル化合物としては、糖尿病などの高血糖状態において生体内で高濃度となりD-グルコースよりも反応性が高く糖尿病の合併症との関係が示唆されているD-フルクトース、糖代謝物であり糖尿病や炎症部位などで生成することが報告されているDL-グリセルアルデヒド、グリコールアルデヒド、メチルグリオキサールを使用した。反応後は反応混合物を直接 $\text{CHCl}_3$ で抽出するか、或いは水で希釈した後にブルーコットンを使って抽出を行い、反応生成物を捕集した。いずれの反応においても、反応が進行し、DL-グリセルアルデヒドとグリコールアルデヒドのL-トリプトファンとの反応物は*S. typhimurium* TA98 およびTA100 に対しS9 mix非存在下で変異原性を示し、その強さは64~323 revertants/ $\mu\text{mol}$ であった。今後は、反応により生成した変異原物質の分離と構造の決定を進める。(糠谷)

慢性炎症は、様々な器官で発がんのリスクを高めることが知られている。炎症部位では各種免疫細胞が活性化され、一酸化窒素合成酵素やNADPH オキシダーゼなど様々な酵素が誘導される。その結果、炎症部位では活性酸素種に加え、一酸化窒素やパーオキシナイトライドなど種々の活性酸素種が生成する。これら活性酸素種は生体内に存在する種々のアミノ化合物と反応するため慢性炎症による発がんリスク増加の一因であると考えられる。本年度は、これまでに明らかにされていない発がん機構を見出すことを目的とし、種々の活性酸素種と生体内に存在する低分子化合物の反応を解析した。その結果、ヌクレオシドや核酸塩基など種々の核酸構成分子とパーオキシナイトライドの反応を解析したところ、核酸塩基の反応性が著しく大きいことがわかった。そこで、核酸塩基であるシトシン、ウラシル、チミン、アデニン、ヒポキサンチン、グアニン、キサンチンとパーオキシナイトライドの反応について検討した。また、これら核酸塩基とニトロ化剤である混酸との反応生成物と比較した。そ

の結果、すべての核酸塩基がパーオキシナイトライドと容易に反応し、1種類から数種類の生成物を生じた。シトシンとグアニンではパーオキシナイトライドと混酸の反応で生成物の HPLC 溶出パターンが類似しており、両者ともニトロ誘導体と考えられる2種類の化合物が生成した。他の核酸塩基の反応はパーオキシナイトライドと混酸で生成物の HPLC 溶出パターンが異なっていた。今後、これら核酸塩基とパーオキシナイトライドの反応生成物の変異原性について検討するとともに生成物を分離・精製し、それらの化学構造および生成機構を明らかにする予定である。亜硝酸イオンは直接食品から摂取されるばかりでなく、一酸化窒素合成酵素により生じた一酸化窒素の自動酸化により生体内で生成される。紫外線に暴露すると皮膚細胞中の一酸化窒素合成酵素が活性化されることが報告されており、ヒトが太陽光を浴びたときには、皮膚細胞中の亜硝酸イオン濃度は上昇していると考えられる。そこで、亜硝酸イオンが太陽光線により引き起こす DNA 分解反応について検討した。仔牛胸腺 DNA のリン酸緩衝液 (pH 7.4) を6時間太陽光に曝した。ヒト皮膚細胞中と同濃度の亜硝酸イオンの添加により、マロンジアルデヒドの生成が非添加時の8倍に増加するとともにアデニンとグアニンの生成は5倍、シトシンとチミンの生成は10倍増加した。これらの結果は、亜硝酸イオンと太陽光の共存が DNA 損傷に関与することを示唆するものである。(鈴木)

強い変異原性を示した大阪府の表層土壌中から、主要な変異原物質として分離・同定された 3,6-DNB<sub>e</sub>P は *S. typhimurium* TA98 に対し、S9 mix 非存在下で 955,000 revertants/nmol と非常に強い変異原性を示し、この活性は既知化合物中最強の変異原物質であり、発がん物質である 1,8-dinitropyrene のそれと同程度であった。3,6-DNB<sub>e</sub>P は新規化合物であり生物活性など全く明らかにされていなかった。そこで、3,6-DNB<sub>e</sub>P の genotoxicity について明らかにするため、3,6-DNB<sub>e</sub>P がほ乳類細胞に染色体異常を誘発するか否かを姉妹染色分体交換 (SCE) を指標に調べた。CHO AA8 では、細胞あたりの SCE 数は、陰性対照が  $9.0 \pm 3.1$  であるのに対し、3,6-DNB[e]P は  $9.2 \pm 3.5$  (3,6-DNB[e]P 濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、 $8.9 \pm 2.7$  (同 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) であった。多環芳香族による DNA 付加体など化学的に大きな構造変化を伴う DNA 損傷は、一般にヌクレオチド除去修復機構により取り除かれることが知られている。CHO UV135 株は、ヌクレオチド除去修復に関わる ERCC1 蛋白を欠損しており、3,6-DNB[e]P が DNA 付加体を生じた場合、これを取り除けないことが期待される。

このため CHO UV135 株では野性株に比べ SCE が起こりやすいと予想される。そこで、CHO UV135 を用いて野性株 CHO AA8 と同様の実験を行った。その結果、SCE 数は、陰性対照が  $12.5 \pm 3.7$  であるのに対し、3,6-DNB[e]P は  $13.5 \pm 3.7$  (3,6-DNB[e]P 濃度 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、 $14.0 \pm 4.6$  (同 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、 $12.0 \pm 4.2$  (同 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) であった。3,6-DNB[e]P のようなニトロ多環芳香族炭化水素は、そのニトロ基が第一相反応系の酵素であるニトロ還元酵素により *N*-ヒドロキシ体に還元され、次いで第二相系の酵素のアセチル転移酵素の働きで *N*-アセトキシ体になり、これら *N*-ヒドロキシ体あるいは *N*-アセトキシ体からニトロレニウムイオンが生じ DNA を攻撃、付加体を生じることが多い。また第一相反応で芳香環がヒドロキシ・エポキシド化をうけ、DNA 付加体を生じる可能性も考えられる。そこで、多くの代謝酵素を発現するヒト肝がん由来細胞株 HepG2 を用いて 3,6-DNB[e]P の SCE 誘発性を試験した。その結果、SCE 数は陰性対照 (DMSO のみ) が 0.347 だったのに対し、3,6-DNB[e]P を処理すると濃度依存的に SCE 数が上昇し、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処理群では 0.471 と陰性対象に比べ 40% 近い上昇が見られた。これらのことから 3,6-DNB[e]P は HepG2 に有意に ( $P < 0.01$ ) 染色体異常を引き起こすことがわかった。今後は *in vivo* での genotoxicity について明らかにするとともに、代謝活性化経路ならびに変異誘発機構について解明する予定である。(川西)

#### 4 倫理面への配慮

動物実験を実施する場合やヒト由来試料等を使用する場合には、各研究者が所属する研究機関の倫理委員会の承認を得たのち行った。また、組換え DNA 実験を行う場合には、各研究者が所属する研究機関の委員会の承認を得たのち規定に従って実施した。

#### 研究成果の刊行発表

##### 外国語論文

1. Watanabe, T., et al., 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.
2. T. Watanabe, et al., Mutagenicity of Surface Soils in Urban Areas of Aichi Prefecture, Japan, and Bangkok, Thailand. *J. Health Sci.*, 51, 645-657, 2005.
3. T. Watanabe, et al., Evaluation of Genotoxicity of 3-Amino-, 3-Acetylamino- and 3-Nitrobenzanthrone

- Using the Ames/*Salmonella* Assay and the Comet Assay. *Journal of Health Science*, 51, 569-575, 2005.
4. Umbuzeiro, G. de A., Watanabe, T., Terao, Y., *et al.*, The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River, *Chemosphere*, 60, 55-64, 2005.
  5. Kuruto-Niwa, R., Terao, Y., *et al.*, Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated Derivatives using a GFP expression system, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19, 121-130, 2005.
  6. Takemura, H., Terao, Y., *et al.*, *In vitro* and *in vivo* estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A, *Toxicology*, 207, 215-221, 2005.
  5. Kuruto-Niwa, R., Terao, Y., *et al.*, Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 121-130, 2005.
  6. Takemura, T., Terao, Y., *et al.*, *In vitro* and *in vivo* estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A, *Toxicology*, 207: 215-221, 2005.
  7. Masuda, S., Terao, Y., *et al.*, Changes in the mutagenic and estrogenic activities of bisphenol A upon treatment with nitrite, *Mutation Research*, 585, 137-146, 2005.
  8. Hu, J., Terao, Y., *et al.*, Transformation of pyrene in aqueous chlorination in the presence and presence of bromide ion: kinetics, products and their aryl-hydrocarbon receptor mediated activities, *Environ. Tech. Sci.*, in press.
  9. Mutou, Y., Terao, Y., *et al.*, Chemical change of chlorinated bisphenol A by ultraviolet irradiation and cytotoxicity of their products on Jurkat cells, *Environ. Toxicol. Pharm.*, in press.
  10. Nakamura, H., Terao, Y., *et al.* By-products produced by the reaction of estrogens with hypochlorous acid and their estrogen activities, *J. Health Science*, in press.
  11. Nakano, T., Suzuki, T., *et al.*, Assessment of the genotoxic potential of nitric oxide-induced guanine lesions by *in vitro* reactions with *Escherichia coli* DNA polymerase I, *Mutagenesis*, 20, 209-216, 2005.
  12. Nakano, T., Suzuki, T., *et al.*, Repair activity of base and nucleotide excision repair enzymes for guanine lesions induced by nitrosative stress, *Nucleic Acids Res.*, 33, 2181-2191, 2005.
  13. Suzuki, T., *et al.*, Effects of nitrite and nitrate on DNA damage induced by ultraviolet light, *Chem. Res. Toxicol.* in press.
  14. Takamura-Enya, T., *et al.*, Formation of DNA adducts with cholesteryl adenylate, a putative intermediate for biosynthesis of cholesteryl-CoA. *Chem. Res. Toxicol.*, 18, 1715-1720, 2005.
  15. Totsuka, Y., Takamura-Enya, T., *et al.*, Structures and biological properties of DNA adducts derived from N-nitroso bile acid conjugates. *Chem Res Toxicol.*, 18, 1553-1562, 2005.
  16. Arlt, V., Kawanishi, M., *et al.*, Identification of three major DNA adducts formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in rat lung at the C8 and N2 position of guanine and at the N6 position of adenine, *International Journal of Cancer*, in press.