

氏 名(本籍)	おさ 長	だ 田	かず 和	み 実				
学位の種類	農	学	博	士				
学位記番号	農	博	第	406号				
学位授与年月日	平	成	2	年	3	月	28	日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当							
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻							
学位論文題目	変異原物質の極微弱発光に関する研究							
論文審査委員	(主 査)							
	教授 木村 修一			教授 山内 文男				
				教授 目黒 熙				

論文内容要旨

序 論

生体機構の極微弱発光は生物学的に興味ある現象として古くから多くの科学者を魅了してきた。それらの現象は広範に見られ、様々な組織の脂質成分の過酸化、免疫細胞の活性化、細胞分裂、それに酸化剤と生体成分の接触等報告は様々である。これらは、生命活動の本質的な現象であり、またいずれもラジカル等の化学的ポテンシャルの高い活性種が関与している現象である。

発癌の過程において、化学物質の代謝活性化にともない発生する究極変異原物質や、酸素ラジカルが主要原因であることは周知の事実である。これらの生成物は、いずれも化学的ポテンシャルが高いと考えられ、これらの物質からの極微弱発光の検出は可能であろうと考えられる。

ミクロゾーム系を用いて変異原物質の極微弱発光の報告は幾つかあり、ベンツピレンに関してはかなり詳しい観察が成されている。しかし他の変異原物質でも極微弱発光は検出されるのか、その発光強度と変異原性の間には相関関係があるのか、発光の機作はどうなっているのか、等の疑問に対する答は未だ明らかではない。

近年、環境汚染の問題が深刻になる一方、変異原物質の測定法も種々考案されている。生物学的検出法の代表は Ames test に代表される細菌による突然変異試験、および *in vivo* の染色体異常試験である小核試験などがある。Ames test は適応範囲の広さおよび特異性の点では優れているが、菌体の保存、手法の繁雑さ、および高等動物への結果の外挿の困難さなどの難点がある。小核試験は *in vivo* の変異原性試験としては短期間で簡便にできる方法であるが、結果の判別に少なくとも 48 時間程度はかかり、薬物の種類によって小核形成にかかる時間が様々であり、正確な判定を損ねる可能性もある。一方、感度の高さ、および判定の迅速さでは GC/MS や蛍光を用いた HPLC などによる化学的測定法が優れている、しかしこれらの方法の最大の欠点は、生物学的方法の様に未知の変異原物質を検出することができないことである。

極微弱発光測定系は生物学的検出法と化学的検出法の間位置する方法であり、双方の利点を兼供えた検出法となるばかりでなく、代謝活性化にともなう諸現象を明らかにすることができる可能性を秘めている。本研究では、これらの可能性を探求すると共に、発光機作を明らかにする目的で以下の実験を行なった。

第一章 変異原物質の極微弱発光の検出。

第一節 OX-71 による多環芳香族炭化水素の極微弱発光の検出

OX-71 は 400nm に最大感度波長をもつ極微弱発光測定装置である。本実験ではこの測定装置を用いて 10 種類の多環芳香族炭化水素 (Fig.1) についてその極微弱発光を検出した。極微弱発光測定系としては S9 mix 系を用い、レシチンコレステロールベシクルに変異原物質を組込み、暗所で混合し極微弱発光を検出した。

Fig.2 に代表的変異原物質である benzo(a)pyrene (BP) と 3-methylchoranthrene (MC) の極微弱発光の経時的变化を示す。BP では、12 分後に最大発光を示したが、MC では 25-30 分後に最大発光を示した。発光積算値の dose dependence は Fig.3 に示す。いずれも 100 nmol 付近で plateau となった。10 種類の芳香族炭化水素の極微弱発光積算値を Fig.4 に示す。Ames test 等で変異原性の存在が明らかなものにおいてのみ強い発光値を示した。

第二節 S P C による多環芳香族炭化水素の極微弱発光の検出

S P C は最大感度波長が 600-700nm であり、赤色光の検出に適している。この領域は二分子の一重項酸素による発光を検出する領域であり、OX-71 の観察と合わせて極微弱発光の全体像の観察が期待できる。

BP の S P C による極微弱発光の経時的变化を Fig.5 に示す。OX-71 の場合と違い、反応開始後 5 分後には最大発光を示しその後速やかに減衰した。この現象は他の多環芳香族炭化水素においても見られた (Fig.6 Fig.7)。発光積算値を Table1 に示した。この結果、S P C においても極微弱発光は観察されたが、変異原性の弱いものではほとんど検出されないことが明らかになった。

第三節 アフラトキシン類での極微弱発光の検出

アフラトキシン (AF) B1、B2、G1、G2 について極微弱発光の測定を行なった。添加濃度と OX-71 による極微弱発光強度の関係を Fig.8 に示す。AFB1、AFG1 において強い発光が示された。特に AFB1 はその発光が強烈で、200nmol の添加においても尚発光

は上昇した。しかし、SPCにおいては極微弱発光はほとんど見られなかった (Fig.9)。

第四節 ニトロアレンの極微弱発光の検出

ニトロアレンは大気汚染物質の主要成分である。本節では二種類のニトロアレン (Fig. 10) を取り上げ極微弱発光測定系により検出し得るか否かを検討した。OX-71 における測定結果を Fig.11 に示す。陽性対照の BP では顕著な極微弱発光が検出されたが、ジニトロピレン (NP) 3-ニトロフルオランテン (3NF) とともに発光はほとんど観察されなかった。一方 SPC による測定では NP, 3NF とともに顕著な発光が観察された (Fig.12)。

第五節 その他の変異原物質の極微弱発光の検出

芳香族アミンであるフルオレニルアセトアミド (FAA) ヘテロサイクリックアミンの代表的変異原物質であるトリップ-P-1 (TP1), さらにアゾ化合物の一種である 3'-メチル-ジメチルアミノアゾベンゼン (DAB), 等今までに実験に供していない芳香族化合物について極微弱発光を試みた。さらに有機過酸化物、脂肪族化合物の一種であるジメチルニトロソアミン (DMN), についても合わせて検討した。それらの発光積算値のデータを Table2 に示す。この結果、DAB 以外の芳香族化合物では有意に高い極微弱発光が検出され、極微弱発光は芳香族化合物に広範に見られることが明らかとなった。一方、有機過酸化物でも極微弱発光は観察されたが、発光の検出には他の化合物群に比べ、50 倍もの多量の試料を必要とした。また脂肪族化合物の代表的変異原物質である DMN はその変異原性の強さにもかかわらず、極微弱発光は検出されなかった。

第六節 総括

変異原物質の極微弱発光はアゾ色素以外の芳香族化合物で広範に検出された。それらの極微弱発光は化合物の種類により様々なパターンを示した。この性質を利用すれば未知の変異原物質の定性分析としても応用できる可能性がある。一方、有機過酸化物でも発光は見られたものの、脂肪族化合物の代表的変異原物質である DMN で発光が検出されなかったことから、本測定系は脂肪族化合物の変異原物質測定には有効で

ないことが示唆された。

第二章 変異原物質の極微弱発光の発光機作

第一節 OX-71により検出される多環芳香族炭化水素の極微弱発光の発光機作

多環芳香族炭化水素の極微弱発光機作を明らかにするために、代表的変異原性物質である BP と MC について発光機作を比較検討した。その結果、これらの極微弱発光は逆相 HPLC により分離された中間代謝物の生成にともなって現われるものであることがわかった (Fig.13-15)。次に発光代謝中間体を推定する目的でエポキシドヒドラーゼ阻害剤の TCPO を用いて発光強度の変化を検討した結果、反応開始から 20 分付近までの反応初期において、その主要発光種はジオール体を介して生成されることが明かとなった (Fig.16)。BP と MC のスペクトル分析の結果を Fig.17 に示す。どちらも 500nm 付近に broad なピークを持つ類似したパターンを示した。このピークは、ジオールジオキセタン体の解裂に伴う発光と考えられる。これらの結果、OX-71 により検出される BP と MC の極微弱発光は、ジオール体の生成にともなう物で、発光活性種はジオールジオキセタン体であることが示唆された。一方これらの発光には一重項酸素の関与も示唆された (Fig.18)。この事実は次節で合わせて考察する。

第二節 SPC により検出される多環芳香族炭化水素の極微弱発光の発光機作

多環芳香族炭化水素では、代謝中間体の一種であるジオール体の生成にともなって極微弱発光が生成することが明らかになり、また一重項酸素の関与も示唆された。そこで、SPC により検出される発光が一重項酸素によるものであることを確認する意味で 67% 重水系、および一重項酸素のクエンチャーによる発光強度の変化を観察した。その結果、重水系で発光が上昇しクエンチャーの投与で発光の低下が見られ、本実験で検出された極微弱発光は一重項酸素によるものであることが示された (Fig.19, 20)。この結果、多環芳香族炭化水素における極微弱発光は、反応開始直後に検出される一重項酸素による赤色の極微弱発光と、それに続く代謝中間体由来の青緑色の極微弱発光の二相性を呈し、発光に関与する代謝中間体の生成には一重項酸素が関与していることが示唆された。以上の結果より推定される極微弱発光機構を Fig.21

に示す。

第三節 ニトロアレンとアフラトキシンの極微弱発光の発光機作

3-NF の SPC により検出された極微弱発光の性質を明らかにするため、67% 重水系、および一重項酸素のクエンチャーによる発光強度の変化を観察した。その結果、この発光は一重項酸素に由来するものであることが明かとなった (Fig.22,23)。次に AFB1 の極微弱発光のスペクトル分析、および一重項酸素のクエンチャーであるβ-カロチンの添加による発光への影響を検討した。その結果、AFB1 においてはその発光に一重項酸素は関与しないことが示唆された (Fig.24,25)。

第四節 総括

変異原物質の極微弱発光は一重項酸素に由来するものと、代謝中間体に由来するものの二種類に大別されることがわかった。多環芳香族炭化水素は二相性を示し、ニトロアレンは前者、アフラトキシンは後者のみが見られる单相性の極微弱発光を示した。これらのことは変異原物質の種類により代謝活性化の機構や、それにともなう活性種の種類や延いては発癌機作の違いを反映するものと考えられる。

第三章 極微弱発光強度と変異原性との相関関係について

第一節 多環芳香族炭化水素の代謝中間体由来の極微弱発光と変異原性との相関

OX-71 により検出した極微弱発光測定値と Ames test (TA100) と小核試験 (マウス) の結果との相関性を示す (Fig.26,27)。Ames test との比較では $r=0.789$ と有意な正の相関が得られた。一方、小核試験との比較でも相関する傾向が見られた。これらの結果より代謝中間体の極微弱発光強度は変異原性と相関することが明かとなった。

第二節 多環芳香族炭化水素の一重項酸素生成による極微弱発光と変異原性との相関

SPC により検出した極微弱発光測定値と Ames test (TA100) と小核試験 (マウス) の結果との相関性を示す (Fig.28,29)。その結果、両試験系との比較において有

意な正の相関が見られた。

第三節 ニトロアレンの極微弱発光と変異原性との相関

NP,NF.を用いてそれらの変異原性と極微弱発光強度について検討した。なおニトロアレンの性質を明らかにする意味で、対照としてそれぞれのニトロ化されていない化合物即ちピレンとフルオランテンを同時に実験に供した。極微弱発光の積算値、Ames test (TA98)による変異原性の強度および小核試験の結果をそれぞれ Table 3.4,5 に示す。いずれもニトロアレン群において有意に高い値が得られた。小核試験においては統計的に有意な値が得られたがその値は低いものであり、この化合物群が生体に与える変異原性はむしろ小さいものであることが示唆された。

第四節 アフラトキシン類の極微弱発光と変異原性との相関

四種類のアフラトキシン AFB1,AFB2,AFG1,AFG2.について極微弱発光積算値、Ames test (TA100) さらに小核試験(ラット)を実施し、極微弱発光積算値とそれぞれの変異原性試験との相関性を検討した。その結果、いずれの場合も有意な正の相関関係が明らかになった(Fig30,31)。

第五節 総 括

変異原物質の極微弱発光は化合物の種類により発光の性質も違うため単純に相互比較することは避けたが、同系列の化合物間ではいずれも他の変異原性検出法との間に正の相関が示された。これらの事実より極微弱発光測定系は Ames test や小核試験と併用しうる変異原物質測定系であることが示された。

第四章 総合的考察

変異原物質の極微弱発光は芳香族化合物に広く見られ、それらの代謝にともない一重項酸素に由来する発光と代謝中間体による発光の二種類が存在することが分かった。また、化合物の種類により極微弱発光のパターンが異なることが明かとなった。

これらの事実より各変異原物質種による代謝活性化にともなう活性種の生成のパタ

ーンが明らかになり、多環芳香族炭化水素、ニトロアレン等では代謝活性化の初期に一重項酸素が発生することが示された。これらの極微弱発光強度は、Ames test や小核試験により検出される変異原性の強さと正の相関があることが明かとなり、極微弱発光測定系が変異原性試験として応用が可能であることが示唆された。

この試験法は、芳香族化合物以外では応用が困難であることや、他の化学的検出法に比べ感度はそう高くはないことなど検討の余地が残されているが、簡便で迅速に結果を得ることができる方法である。また、*in vitro* とはいえ、高等動物の生体成分での反応を直接検出していることから、Ames test の様な細菌を用いた突然変異試験と小核試験や培養細胞での突然変異試験との中間的な方法として位置づけられると考えられる。また化学的検出法と生物学的検出法の中間としても位置づけられ、化学的検出法の迅速性、と簡便性を持ち、一方生物学的方法に見られるような変異原性の強度の検出能や、未知の変異原物質の同定能等をおね供えた理想的な変異原物質検出法として応用可能であることが明かとなった。

Figure 1 Polyaromatic hydrocarbons

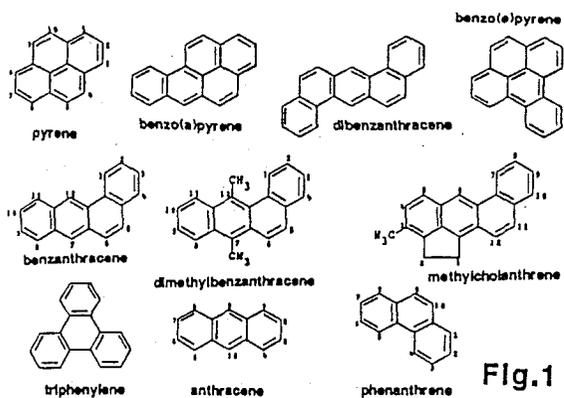


Fig.1

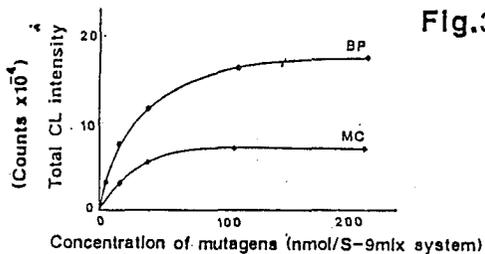


Fig.3

Concentration dependence of integral CL emission for 20 minutes from initiation stage of (●) BP and (◊) MC in an 6-9 mix system. The CL reaction was initiated at 37°C.

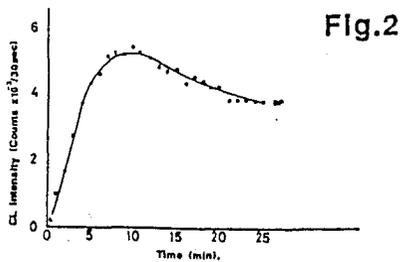
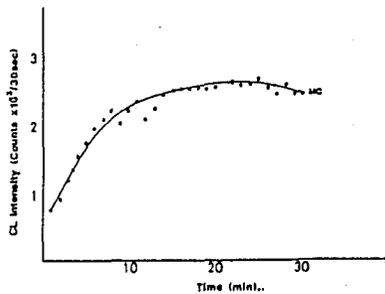


Fig.2

Chemiluminescence assay of BP in an S9mix system



Chemiluminescence assay of MC in an S9mix system

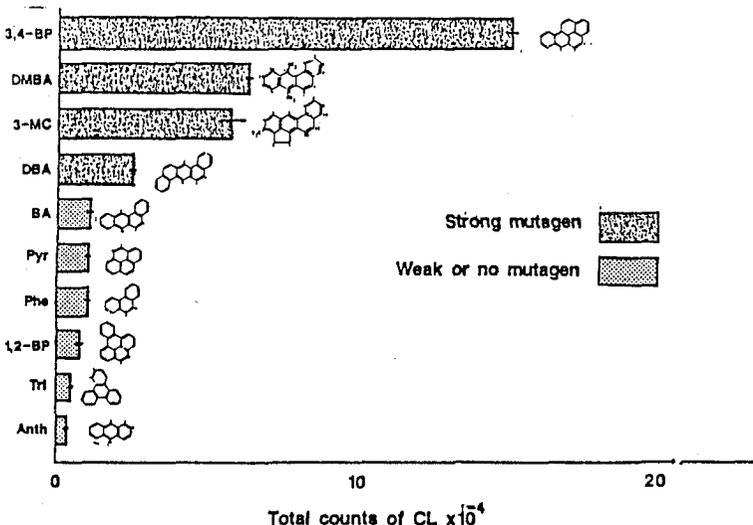


Fig.4 Comparison with total chemiluminescence emission from Polyaromatic hydrocarbons.

Table 1

Integral CL intensity in an S-9 mix system^a

Compounds (200nmol)	S	P	C	OX-71
B(a)P			475336	161870
MC			200697	57424
DMBA			216541	63300
DBA			221823	24781
Pyr			179990	10661
Phe			189899	10041
BA			126756	10584
B(e)P			205978	7465
Ant			133856	2906
Tri			151770	4330
Cont			159567	10400

Every compounds were set in lecithin-cholesterol vesicle and mixed to S-9 mix. SPC is sensitive to the red light around 600nm and OX-71 is sensitive to the blue-green light around 400-500nm. In case of SPC, these data were expressed total counts between 5 min from initiation points and OX-71 was between 20 min.

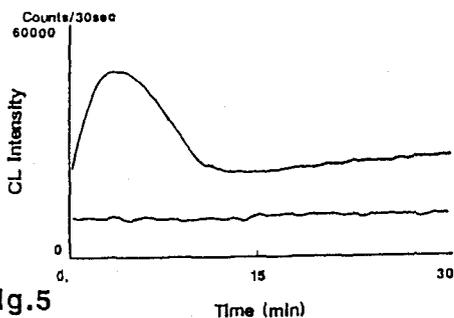


Fig. 5

CL Intensity from BP in an S-9 mix system counted with SPC

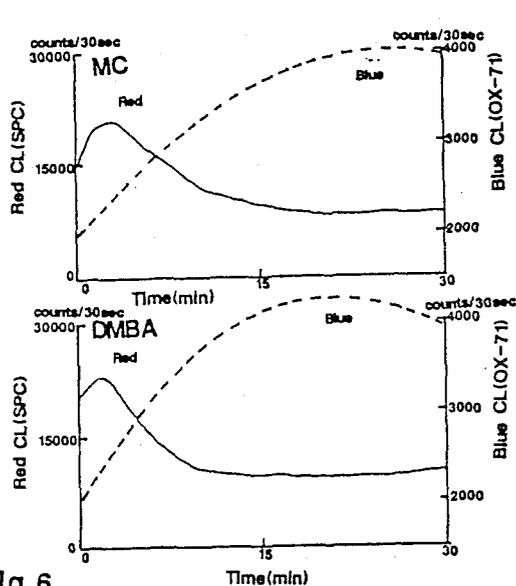


Fig. 6

Change of CL Intensity measured with SPC and OX-71 as a function of time. SPC is sensitive to the red light around 600nm and OX-71 is sensitive to the blue-green light around 400-500nm.

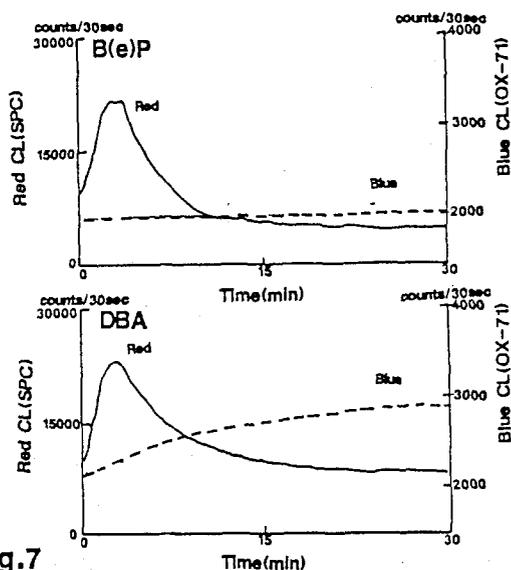


Fig. 7

Change of CL Intensity measured with SPC and OX-71 as a function of time. SPC is sensitive to the red light around 600nm and OX-71 is sensitive to the blue-green light around 400-500nm.

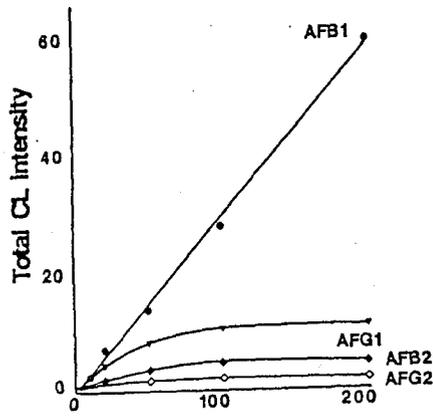


Fig. 8 Concentration of mutagens (nmol/S-9 mix system)

Concentration dependence of integral CL emission for 20 minutes from initiation stage of Aflatoxins in an S9 mix system. The CL reaction was initiated at 37°C

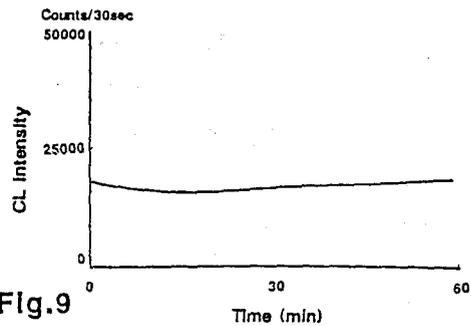


Fig. 9

CL Intensity from aflatoxin B1 counted with SPC

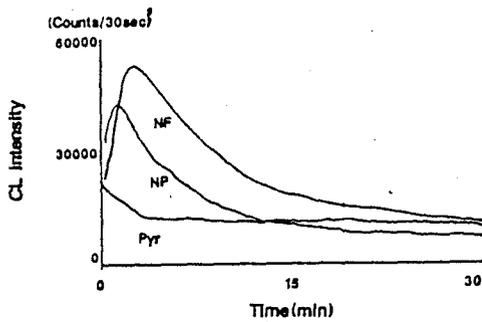


Fig. 12 CL Intensity from nitroarenes measured by SPC

Fig. 10

Dinitropyrenes and 3-Nitrofluoranthene

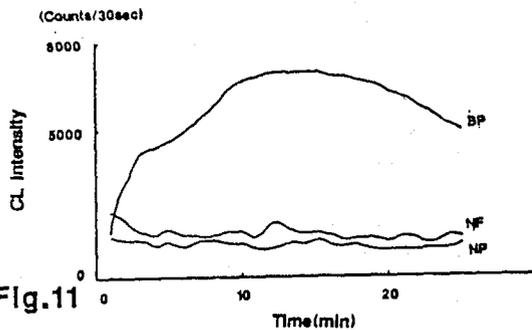


Fig. 11

CL Intensity from nitroarenes measured by OX-71

Table 2

Integral CL intensity in an S-9 mix system

Compound	S P C	O X - 7 1
TP1	236894	21046
FAA	205989	12648
DAB	114305	1569
(tbp)	—	16680
(cp)	—	55131
DMN	130463	3201
Cont	125980	3744

Every compounds were mixed 200nmol or 10 μ mol (in parenthesis) in an S9 mix. SPC is sensitive to the red light around 600nm and OX-71 is sensitive to the blue-green light around 400-500nm. In case of SPC, these data were expressed total counts between 5 min from initiation points and OX-71 was between 20 min.

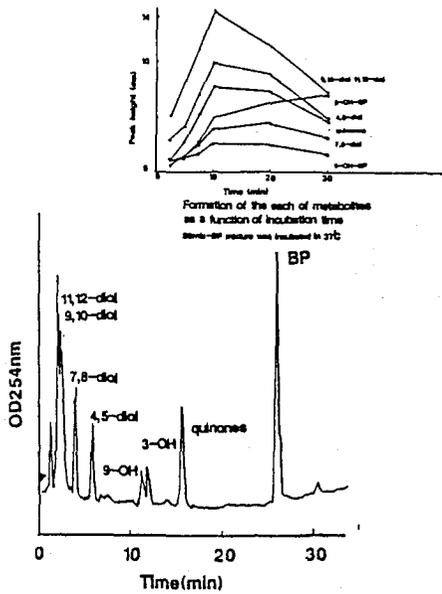


Fig.13 Reverse phase liquid chromatograms of BP and its metabolites after 20min of incubation

Each of peaks were estimated by the method of Jerina et al.

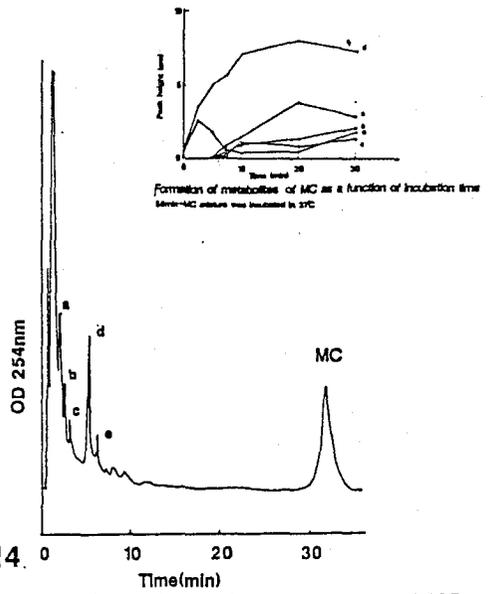


Fig.14 Reverse phase liquid chromatograms of MC and its metabolites after 30min of incubation

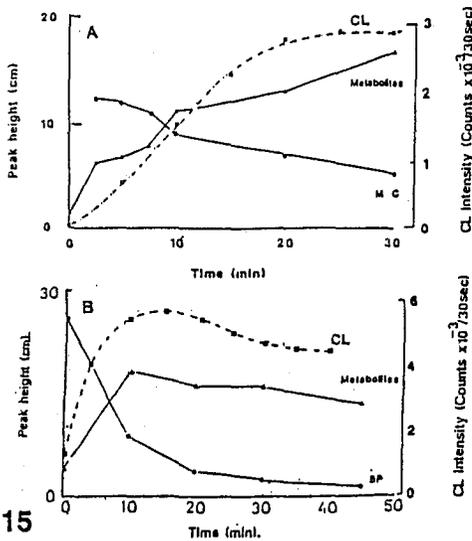


Fig.15 The correlation of CL intensity and formation of intermediate metabolites of MC and BP in an 8-9 mix system. (A) (Δ) Peak height of total metabolites of MC. (●) Peak height of MC. (■) Relative CL intensity from MC. (B) (Δ) Peak height of total metabolites of BP. (●) Peak height of BP. (■) Relative CL intensity from BP.

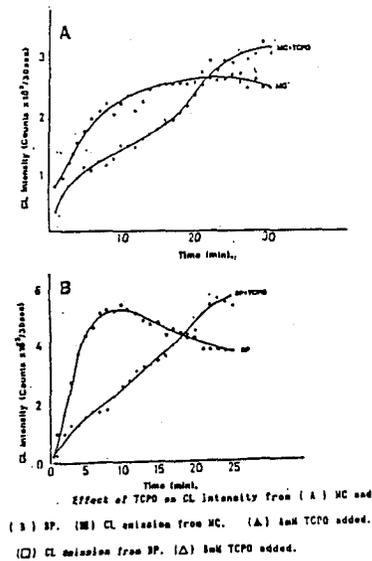


Fig.16 Effect of TCPO on CL intensity from (A) MC and (B) BP. (■) CL emission from MC. (Δ) 8m TCPO added. (□) CL emission from BP. (●) 8m TCPO added.

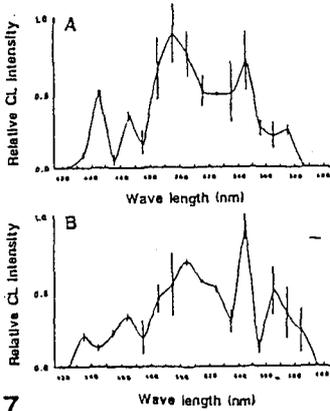


Fig.17

CL emission spectrum from (A) MC and (B) BP in an S-9 mix system. The position of symbols represents the central transmission wave length of the interference filter and the triplicate mean of the relative CL intensity, and the vertical dimension represents the S.D.

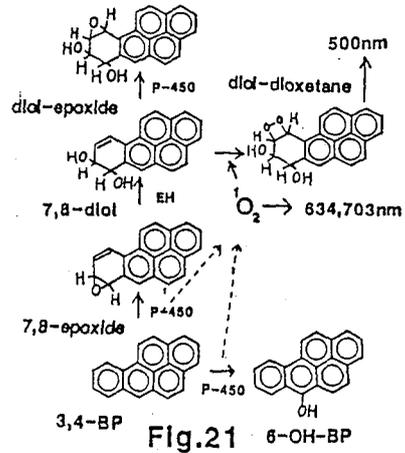


Fig.21

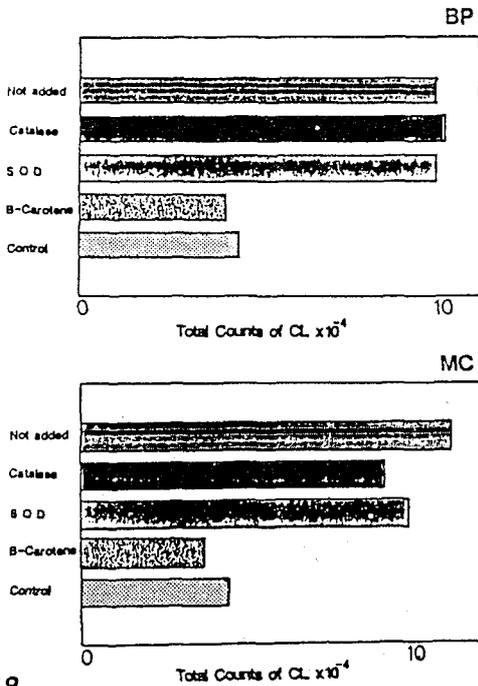


Fig.18

Effect of quenchers and scavengers on total chemiluminescence emission from BP and MC.

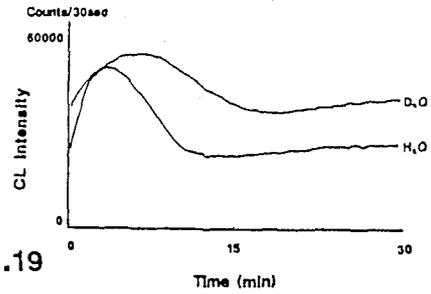


Fig.19

Effect of Deuterium oxide to CL intensity from BP

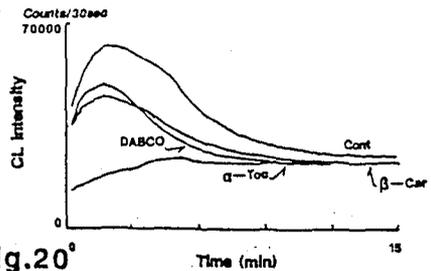


Fig.20

Effect of 1O_2 scavengers to CL intensity from BP

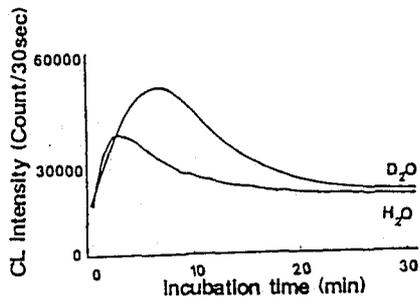


Fig.22 Effect of Deuterium oxide to CL intensity from 3-NF

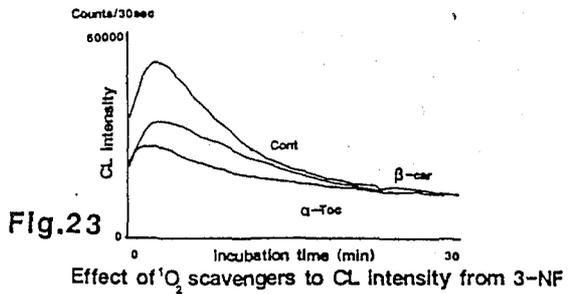


Fig.23 Effect of 1O_2 scavengers to CL intensity from 3-NF

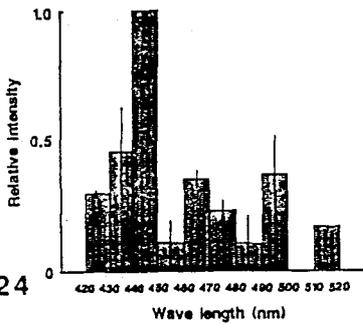


Fig.24 Emission spectra of chemiluminescence from aflatoxin B1 in an S-9 mix

Fig.25 Effect of B-carotene on total chemiluminescence emission from AFB1

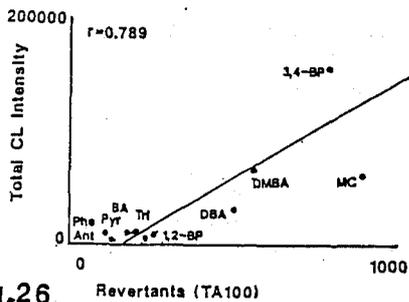
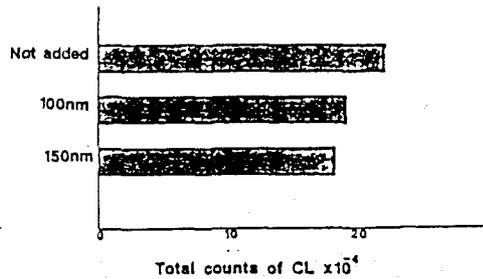


Fig.26 Correlation of mutagenicity and CL yield of polyaromatic hydrocarbons

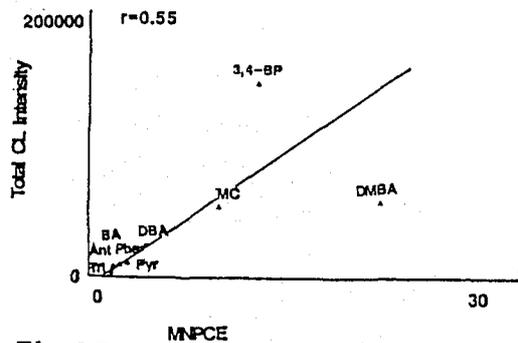
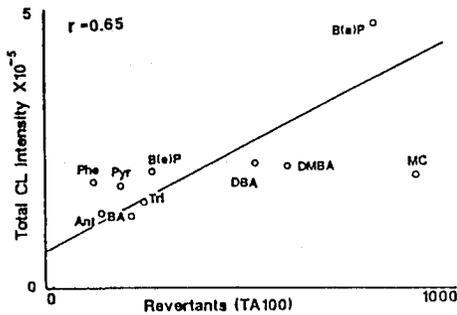
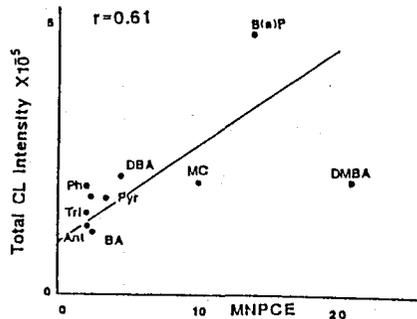


Fig.27 Correlation of formation of the MNPCE and CL yield of polyaromatic hydrocarbons



Correlation of mutagenicity and SPC detected CL yield of polyaromatic hydrocarbons

Fig.28



Correlation of formation of the MNPCE and SPC detected CL yield of polyaromatic hydrocarbons

Fig.29

Table 3

Mutagenicity of nitroarenes using *Salmonella* TA98

Compounds (4nmol/plate)	S-9 added	S-9 not added
3-Nitrofluoranthene	68	3751
Dinitropyrene	249	1148
Pyrene	56.5	42
Fluoranthene	42	71
Control	35	25

Table 5

Integral CL emission from nitroarenes measured with SPC

Compounds	Total counts/5min
3-NF	574141
NP	353521
Flu	117850
Pyr	123257
Cont	80484

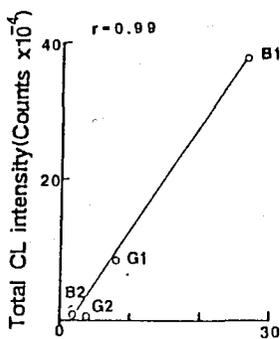
These compounds (200nmol) were set in L-C vesicle and mixed with S9 mix. CL emission was initiated at 37°C. Each of value was expressed by an average in triplicate

Table 4

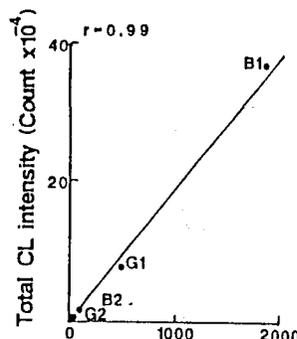
Evaluation of nitroarenes in the micro nucleus test following interperitoneal injection in mice

Compounds (50mg/kg)	PCE/NCE ratio	MNPCE	MNNCE	NO. of mice
3 Nitrofluoranthene	0.33	4.5*	2.5	4
Dinitropyrene	0.32	4.6*	6.3*	4
Pyrene	0.50	3.3	2.3	4
Fluoranthene	0.54	2.7	2.3	4
Control	0.85	2.0	1.5	3

* = Significant difference from control number (p<0.05)



Correlation between MNPCE and CL yield of aflatoxins



Correlation between mutagenicity and CL yield of aflatoxins

審査結果の要旨

生体機構の極微弱発光は、生物学的に興味ある現象として古くから認められてきた。細胞分裂、免疫細胞の活性化、脂質成分の過酸化などの際にもそれは見られ、生命活動にともなう現象として、その生物学的役割を追及する研究が多くなされている。

いずれの場合も、この極微弱発光はラジカルなどの化学的ポテンシャルの高いところに発現している。化学発癌の過程でも、ある種の化学的ポテンシャルの高まりがあることはよく知られており、事実ベンツピレンで発光が観察されている。

本研究は、変異原物質の極微弱発光を検討し、その発光の機作を検討するとともに、これが変異原物質のスクリーニングに応用出来るか否かについて研究したものである。

本論文は3部からなり、第1部では、変異原物質の極微弱発光の検出について検討している。400nmに最大感度波長をもつ検出器と600-700nmに最大感度波長をもつ検出器を組合せて、多環芳香族炭化水素、アフラトキシン類、ニトロアレン、その他の変異原物質の極微弱発光を検討した。その結果、変異原物質の極微弱発光はアゾ色素以外の芳香族化合物で広範に検出され、それらの極微弱発光は化合物の種類によりさまざまなパターンを示し、その定性に応用できる可能性のあること、ただし、脂肪族化合物の変異原物質測定には有効でないことなどが明らかにされた。第2部は変異原物質の極微弱発光の発光機作について検討したものである。すなわち代表的変異原物質であるベンツピレンと3-メチルコラントレンを用い、その中間代謝物の分離精製を試み、それらのスペクトルを検討することにより、変異原物質の極微弱発光は一重項酸素に由来するものと、代謝中間体に由来するものの二種類に大別され、物質により、それらの組合せのパターンが異なることを明らかにした。このことは変異原物質の代謝活性化機構あるいは活性種の差、ひいては発癌の機作の違いを反映している可能性を示唆している。第3部は極微弱発光と変異原性との相関について検討したものである。その結果、同系列の化合物の間ではAmesテストや小核試験とよい相関が示され、変異原物質のスクリーニングに応用出来る可能性が示唆された。

本研究の成果は、生体における極微弱発光の機作ならびにその変異原物質のスクリーニングへの応用に関する領域の研究に新知見を加えたものであり、著者に農学博士の学位を授与するに値すると判定した。