

氏 名（本籍） 佐 井 君 江  
学位の種類 博 士（医 学）  
学位記番号 医 第 2460 号  
学位授与年月日 平 成 4 年 9 月 9 日  
学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当  
最 終 学 歴 昭 和 62 年 3 月 25 日  
北海道大学大学院薬学研究科薬学専攻修士  
課程修了  
学位論文題目 臭素酸カリウムによる酸化的DNA傷害に関する  
研究

（主 査）

論文審査委員 教授 鈴木 磨 郎 教授 名 倉 宏  
教授 小 野 哲 也

## 論文内容要旨

酸化剤である臭素酸カリウム ( $\text{KBrO}_3$ ) は、変異原性を有するラット腎発癌剤である。 $\text{KBrO}_3$  による腎発癌機構としては、DNA の酸化的傷害が起こり、それが DNA の複製段階で読み間違いを引き起こし、突然変異が生じるためと考えられている。実際にラットに  $\text{KBrO}_3$  を投与すると、活性酸素種による DNA 傷害産物である 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) が、標的臓器腎において特異的に生成することが確認され、 $\text{KBrO}_3$  の発癌に 8-OH-dG の生成が重要であることが示唆されてきた。しかし、 $\text{KBrO}_3$  は生体内での半減期が短い上に、DNA を直接酸化しないことが認められていることから、 $\text{KBrO}_3$  の発癌標的臓器における DNA の酸化的傷害機構については解明されていない。そこで、本研究では  $\text{KBrO}_3$  による腎発癌機構の第一段階と考えられる 8-OH-dG の腎における生成機構について解析を行った。

第一章では、ラットに  $\text{KBrO}_3$  を単回投与した場合の腎における 8-OH-dG 生成と過酸化脂質レベルとの関連性について検討した。その結果、腎臓中の 8-OH-dG 生成は、過酸化脂質レベルの上昇に引き続いて起こることを明かにし、この結果から、 $\text{KBrO}_3$  投与による 8-OH-dG の生成は  $\text{KBrO}_3$  の直接酸化によるものではなく、脂質過酸化反応を介して生成することが示唆された。

第二章では、ラットへの  $\text{KBrO}_3$  投与による酸化的 DNA 傷害発現において、その抑制に関与する因子を調べるため、GSH 等の抗酸化剤の効果について検討した。その結果、GSH やシステイン (Cys) 及びビタミン C (VC) の処置は、 $\text{KBrO}_3$  投与による腎臓での酸化的傷害 (8-OH-dG, 過酸化脂質の生成) の抑制に有効であり、特に腎細胞内 GSH が重要であることを示した。GSH による抑制機序としては、 $\text{KBrO}_3$  やそれに由来する活性酸素種、または生成した脂質過酸化物やそのラジカル種を処理することにより、腎の過酸化脂質レベルの上昇を抑制し、最終的に酸化的 DNA 傷害の防御に関与するものと推測される。

第三章では、 $\text{KBrO}_3$  による 8-OH-dG 生成における脂質過酸化の役割を調べるため、腎ホモジネートを用いての細胞レベルでの解析を行った。腎ホモジネートまたは腎核画分に  $\text{KBrO}_3$  を作用させた結果、8-OH-dG の生成が確認された。腎ホモジネートと反応させた場合は、核画分のみとの反応よりも 8-OH-dG 生成率が高くなったが、これは小胞体等の膜状成分で生じた脂質過酸化反応が核膜での過酸化を促進し、その結果酸化的 DNA 傷害が促進されたものと推測された。さらに、核画分を  $\text{KBrO}_3$  以外の酸化反応系で処理することによっても、脂質過酸化とともに 8-OH-dG レベルが上昇したことから、8-OH-dG の生成は核膜の脂質過酸化を介して生じる可能性が強く示唆された。

第四章では、 $\text{KBrO}_3$  と腎細胞との相互作用により生ずる活性酸素種を調べるために、*in vitro*

で ESR 及びケミルミネッセンス測定を行い検討した。スピントラップ剤 DMPO 及び TEMP を用いた ESR 測定により、腎細胞またはそのホモジネートと  $\text{KBrO}_3$  との反応において、一般に OH ラジカルにより生成することが知られる DMPO-OH 及び  $^1\text{O}_2$  由来の TEMPO の生成がみられた。さらにケミルミネッセンスの測定で  $^1\text{O}_2$  の産生が確認された。また、DMPO-OH は  $^1\text{O}_2$  発生系からも生成することが確認されたことから、 $\text{KBrO}_3$  と腎との反応による DMPO-OH 生成には  $^1\text{O}_2$  が関与していることが示された。このことから  $\text{KBrO}_3$  と腎細胞との反応によって生成する活性酸素種は  $^1\text{O}_2$  である可能性が最も高いことが明かとなった。

一方、第五章では、 $\text{KBrO}_3$  の変異原性発現過程における活性酸素の役割を、*in vivo* 変異原性試験法の 1 つである小核試験により検討した。その結果、 $\text{KBrO}_3$  はラットに対しても小核を誘発することを確認し、また GSH, Cys 及び VC の処置によって、小核誘発が抑制されることを明らかにした。このことから、 $\text{KBrO}_3$  による変異原性発現過程にも、ある種の活性酸素種の関与することが示唆された。

以上の  $\text{KBrO}_3$  のラット腎に対する酸化的傷害の解析結果から、 $\text{KBrO}_3$  による腎での 8-OH-dG 生成に関し、以下のような機構を推測した。まず、 $\text{KBrO}_3$  が腎細胞内に取り込まれると、細胞内成分と反応して活性酸素種を生成する。この活性酸素種または  $\text{KBrO}_3$  自体は、腎細胞内の GSH 等の抗酸化剤により分解処理されると考えられるが、処理しきれなかったものが細胞内の小胞体等の膜成分に作用し過酸化脂質を生成する。これらの過酸化脂質及びその分解産物である脂質ラジカル種は、さらに核膜の過酸化を促進すると考えられる。その結果、核膜で生じた過酸化脂質及びその分解産物が、最終的に DNA を酸化的に傷害して 8-OH-dG を生成するものと推測される。

## 審査結果の要旨

酸化剤である臭素酸カリウム ( $\text{KBrO}_3$ ) は、変異原性を有するラット腎発癌剤である。ラットに  $\text{KBrO}_3$  を投与すると、活性酸素種による DNA 傷害産物である 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) が、標的臓器腎において特異的に生成することから、この発癌過程に 8-OH-dG の生成が重要であることが示唆されてきた。しかし、 $\text{KBrO}_3$  は生体内での半減期が短い上に、DNA を直接酸化しないことから、 $\text{KBrO}_3$  の発癌標的臓器における DNA の酸化的傷害機構については解明されていない。そこで、本研究では  $\text{KBrO}_3$  による腎発癌機構の第一段階と考えられる 8-OH-dG の腎における生成機構について解析を行った。

第 1 章では、ラットに  $\text{KBrO}_3$  を単回投与した場合の腎における 8-OH-dG 生成と過酸化脂質レベルとの関連性について検討した。その結果、腎臓中の 8-OH-dG 生成は、過酸化脂質レベルの上昇に引き続いて起こることが明らかとなった。第 2 章では、 $\text{KBrO}_3$  による 8-OH-dG 生成の抑制に関与する因子を調べるため、GSH 等の抗酸化剤の効果を検討した。その結果、GSH、システイン (Cys) 及びビタミン C (VC) の処置は、酸化的 DNA 傷害の抑制に効果的であり、特に腎細胞内 GSH が重要であった。第 3 章では、 $\text{KBrO}_3$  による 8-OH-dG 生成における脂質過酸化の役割を調べるため、腎ホモジネートを用いた細胞レベルでの解析を行った。腎ホモジネートまたは腎核画分に  $\text{KBrO}_3$  を作用させた結果、8-OH-dG の生成が確認され、また核画分を  $\text{KBrO}_3$  以外の酸化反応系で処理することによっても、脂質過酸化とともに 8-OH-dG レベルの上昇が認められた。このことから 8-OH-dG の生成は核膜の脂質過酸化を介して生じる可能性が強く示唆された。第四章では、 $\text{KBrO}_3$  と腎細胞との相互作用により生ずる活性酸素種を調べるため、*in vitro* で ESR 及びケミルミネッセンス測定を行い検討した。その結果、 $\text{KBrO}_3$  と腎細胞との反応で生成する活性酸素種は  $^1\text{O}_2$  である可能性が最も高いことが明らかとなった。一方、第五章では、 $\text{KBrO}_3$  による小核誘発が抗酸化剤 (GSH, Cys, VC) 処置により抑制されたことより、 $\text{KBrO}_3$  の変異原性発現にも活性酸素種が関与することが示唆された。

以上の  $\text{KBrO}_3$  の腎 8-OH-dG 生成機構の解析結果から、 $\text{KBrO}_3$  は腎細胞内に取り込まれると、細胞内成分と反応して活性酸素種を生成し、膜成分の脂質過酸化を引き起こすことが明らかにされた。これらの過酸化脂質及びその分解産物が、さらに核膜の過酸化を促進し、最終的に DNA を酸化的に傷害し 8-OH-dG を生成すると推測された。

本報は、博士論文に価するものと評価する。