

新しいDNA損傷試験法によるDNA損傷を抑制する化学物質の検索

研究期間（平成13年度～14年度）

世良暢之¹，江藤良樹¹，梶原淳睦¹，千々和勝己¹，高田 智¹，
中西洋一²，内海英雄³，常盤 寛⁴，嵯峨井 勝⁵，若林敬二⁶

要 旨

ニトロフェナンスレン，ニトロアザフェナンスレンをラット初代肝臓細胞に接種して生成される8-OH-Gua を測定し，ニトロ基の還元のされやすさとよく相関することを見いだした．また，マウス腹腔マクロファージにおける黄色ブドウ球菌やネズミチフス菌の殺菌，マウス気管内におけるインフルエンザウイルスの不活化においても8-OH-Gua が生成されていることが分かった．この8-OH-Gua 試験系を用いて，DNA 損傷を抑制する食品成分を検索するため，野菜類，柑橘類，緑茶類及び魚類について検討した．その結果，野菜類ではグリーンアスパラ，サツマイモ及びパセリ，柑橘類ではダイダイ，ポンカン，魚類ではウナギ，マグロが高い DNA 損傷抑制作用を示した．これらの食品群が実際に有効かどうかを確かめるため，焼き肉や焼き魚を摂食したボランティアに同時に摂食させ，尿中に排泄される8-OH-Gua を測定したところ，約50%程度抑制することが分かった．

〔キーワード：活性酸素，8-hydroxyguanine，DNA 損傷抑制食品〕

1 はじめに

発がん物質や微生物が生体に作用した場合，生体内で発生したスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$)，過酸化水素 (H_2O_2) やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) などの活性酸素により，DNA 損傷が生じる場合がある．本研究ではDNA 損傷産物の1つである8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) に着目し，活性酸素による DNA 損傷を抑制する食品成分を検索することを目的として研究を進めた．

2 研究方法

2.1 生体における8-OH-Gua 生成について

活性酸素は生体にとって敵（化学物質の毒性）にも味方（微生物の殺菌・不活化）にもなりうることが報告されている．ここでは化学物質，微生物の暴露時に生体内で生成される8-OH-Gua を測定した．

① 化学物質による8-OH-Gua 生成について

活性酸素生成能を有する化学物質の構造と8-OH-Gua

生成との関連を明らかにするため，ニトロフェナンスレン24種類，ニトロアザフェナンスレン19種類を用いて検討した．ここでは上記物質をラット初代肝臓細胞に接種したときに産生される8-OH-Gua を測定した．さらに物性予測や構造解析のために広く利用されている半経験的分子軌道計算プログラム (MOPAC) を用いて，ニトロ基の結合角度，ニトロ基の還元 of のされやすさの指標として最低空軌道 (Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO) を算出し，8-OH-Gua との関連を検討した．

② 微生物感染における8-OH-Gua 生成について

微生物の殺菌・不活化過程における活性酸素の関与を明らかにするため，細菌とウイルス感染モデルにおいて8-OH-Gua を測定した．黄色ブドウ球菌，ネズミチフス菌をマウス腹腔マクロファージに作用させたときの生残数と8-OH-Gua 生成との関連，インフルエンザウイルスをマウス気管内接種したときの生残数と8-OH-Gua 生成，8-OH-Gua 修復酵素活性との関連について検討した．

1 福岡県保健環境研究所	(〒818-0135 福岡県太宰府市大字向佐野39)
2 九州大学医学部	(〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1)
3 九州大学薬学部	(〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1)
4 九州女子大学	(〒807-0867 北九州市八幡西区自由ヶ丘1-1)
5 青森県立保健大学	(〒030-8505 青森県青森市大字浜館字間瀬58-1)
6 国立がんセンター研究所	(〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1)

2.2 DNA 損傷を抑制する食品成分の検索

活性酸素による DNA 損傷を抑制する食品群を明らかにするため、野菜類23種類、柑橘類9種類、緑茶類5種類及び魚類12種類の合計49種類について検討した。緑茶類を除くすべての食品は十分に乾燥させた後、野菜類、緑茶類及び魚類については蒸留水で、柑橘類についてはメタノールでソックスレー抽出、濃縮精製した。有効成分はトリニトロフェナンスレン8種類（表1）とラット初代肝臓細胞に同時接種し、8-OH-Gua 抑制率を測定した。

2.3 食品成分を用いた実証試験

ボランティア1人に米飯とハンバーグ（牛豚合挽）を3日間毎朝摂食してもらい（昼夜は米飯と野菜類のみ）、尿中に排泄される8-OH-Gua を経時的に観察した。さらに「2.2」において最も強い DNA 損傷抑制作用を示したボンカン、サツマイモ及び煎茶の効果を確かめるため、ボランティア10人にハンバーグ、焼き肉（牛肉）あるいは焼き魚（サンマ）と同時に摂食してもらい、尿中に排泄される8-OH-Gua の変化を観察した。

3 結果及び考察

3.1 生体における8-OH-Gua 生成について

① 化学物質による8-OH-Gua 生成について

ニトロフェナンスレン、ニトロアザフェナンスレンによって産生される8-OH-Gua は、ニトロ基の結合角度との間にほとんど関連は認められず（表1）、ニトロ基の還元のされやすさの指標の1つである LUMO との間に良い相関が認められた（図1）。この結果はニトロ基がラジカルアニオンに還元された後、酸素分子に電子を渡して活性酸素を生成し、結果的に8-OH-Gua を生成したというメカニズムを示唆するものと考えられる。またこれら化合物による8-OH-Gua 生成はスーパーオキシドジスムターゼ（Super Oxide Dismutase, SOD）、カタラーゼなどの抗酸化酵素の投与によって抑制されたことから、スーパーオキシドラジカル、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素を介していることが示唆された。

② 微生物感染における8-OH-Gua 生成について

好中球やマクロファージは、生体内に侵入した細菌やウイルスを殺すことが知られている。そこで ddY マウス腹腔マクロファージに細菌を感染させ、生残数について検討した。その結果、ネズミチフス菌では生残数が減少し、黄色ブドウ球菌ではむしろ増加傾向にあった（図2）。このとき細胞内で生成された8-OH-Gua は生残数と逆に前者で増加し、後方で減少した。またインフルエンザウイルスを ddY マウスに気管内接種し、肺胞洗浄液中のウイルス数、肺組織中の8-OH-Gua 及び8-OH-Gua 修

表1 ニトロフェナンスレン及びニトロアザフェナンスレンのニトロ基の結合角度、LUMO及び8-OH-Gua生成能について

化学物質	ニトロ基の結合角度	LUMO	8-OH-Gua ($/10^5$ dG/nM)
1-NPh	16.9	-1.345	1.4
2-NPh	0.3	-1.300	1.4
3-NPh	11.1	-1.367	1.5
4-NPh	2.5	-1.065	1.4
9-NPh	85.4	-1.413	1.3
1,5-diNPh	125.0	-1.644	1.8
1,6-diNPh	19.1	-1.937	1.8
1,10-diNPh	127.5	-1.767	2.1
2,6-diNPh	2.8	-1.836	1.7
2,9-diNPh	17.9	-1.908	1.9
2,10-diNPh	15.7	-1.901	1.9
3,5-diNPh	87.3	-1.735	1.7
3,6-diNPh	1.0	-1.955	1.8
3,10-diNPh	18.5	-2.006	1.9
4,9-diNPh	112.7	-1.883	2.1
4,10-diNPh	109.4	-1.850	2.0
1,5,9-triNPh	151.6	-2.345	2.3
1,5,10-triNPh	191.8	-2.228	2.2
1,6,9-triNPh	51.7	-2.528	2.4
1,7,9-triNPh	57.8	-2.422	2.6
2,5,10-triNPh	174.3	-2.186	2.2
2,6,9-triNPh	35.7	-2.432	2.5
3,5,10-triNPh	122.1	-2.394	2.6
3,6,9-triNPh	22.4	-2.643	2.5
8-N-1-Aph	31.5	-1.429	1.8
6-N-4-Aph	0.1	-1.401	1.8
8-N-4-Aph	32.2	-1.372	1.7
4-N-9-Aph	62.6	-1.326	1.5
5-N-9-Aph	61.7	-1.219	1.6
6-N-9-Aph	0.2	-1.508	1.9
7-N-9-Aph	0.0	-1.436	2.1
5-N-1-AphO	61.0	-1.505	1.8
6-N-1-AphO	0.1	-1.663	2.2
8-N-1-AphO	33.3	-1.623	2.2
5-N-4-AphO	not found	-0.772	1.4
6-N-4-AphO	0.7	-1.583	1.7
8-N-4-AphO	31.7	-1.545	1.8
1-N-9-AphO	26.5	-1.674	2.5
2-N-9-AphO	0.1	-1.696	2.4
3-N-9-AphO	0.1	-1.733	2.4
5-N-9-AphO	60.3	-1.494	1.8
1,5-diN-4-AphO	not found	-1.643	3.1
1,8-diN-4-AphO	58.2	-2.214	2.3

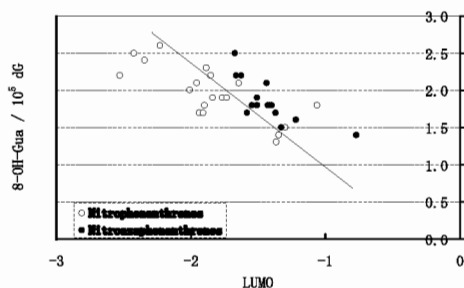


図1 ニトロフェナンスレン、ニトロアザフェナンスレンのLUMOと8-OH-Gua生成量との関連

復酵素活性について検討した。その結果、ウイルス数は接種後4日目をピークに、8-OH-Gua は8日目をピークに減少した。（図3）。また修復酵素は6日目から産生され始めていることが分かった（図4）。さらに「3.2」で最も

化学物質による暴露や微生物による感染により生体内で発生した活性酸素は、8-OH-Gua を指標とする試験系により検出可能であった。ニトロフェナンスレン、ニトロアザフェナンスレンの8-OH-Gua 生成能は、ニトロ基の還元されやすさと相関することが分かった。また、

この試験系を用いることにより、野菜類ではグリーンアスパラ、サツマイモ及びパセリ、柑橘類ではダイダイ、ポンカン、魚類ではウナギ、マグロなどに含まれる抗酸化成分が、8-OH-Gua を有効に抑制することが明らかとなった。そこで、ボランティアにハンバーグ、焼き肉及び焼き魚などと、ポンカン、サツマイモ及び煎茶などを同時に摂食してもらったところ、確かに尿中に排泄される8-OH-Gua は減少することが分かった。

これらの知見から、8-OH-Gua 試験系は生体内で発生した DNA 損傷の検出、抑制成分の検索に有効であることが示された。

5 行政的意義、貢献

DNA 損傷を抑制する食品成分を検索するにはできるだけ数多くのものをスクリーニングする必要がある。このためには、できるだけ簡易でしかも信頼できる試験法が望ましい。本試験法によって得られた DNA 損傷を抑制する食品成分はがんを抑制する食品群として、また生活習慣病予防の一環として情報提供することができる。

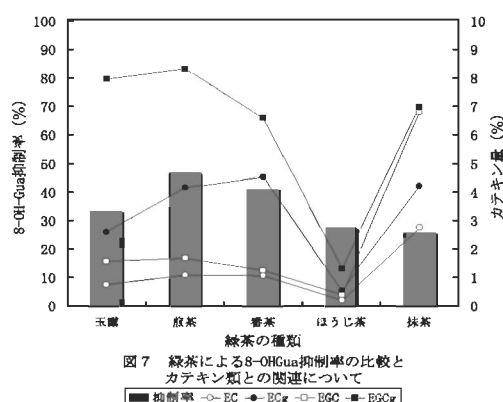


図7 緑茶による8-OH-Gua抑制率の比較とカテキン量との関連について

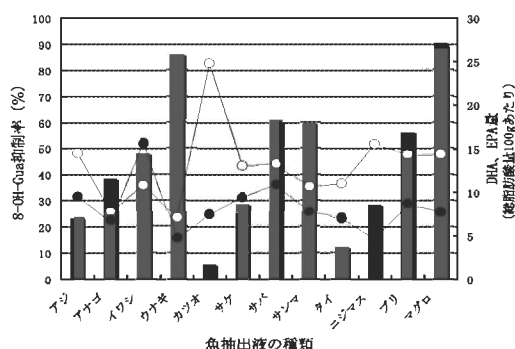


図8 魚抽出液による8-OH-Gua抑制率の比較

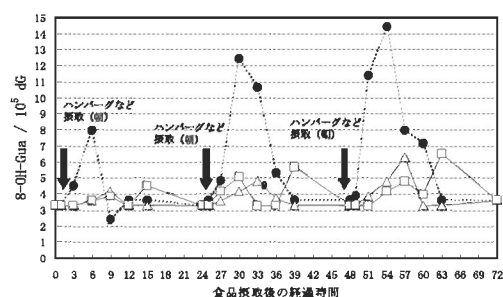


図9 摂食する食品が尿中の8-OH-Guaに与える影響について

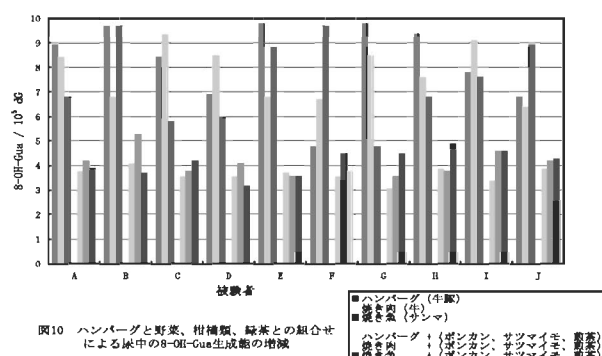


図10 ハンバーグと野菜、柑橘類、緑茶との組合せによる尿中の8-OH-Gua生成量の増減

文献

Kasai H. and Nishimura S. , Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, Nucleic Acids Res. , 12, 2137-2145, 1987.

世良暢之, 志水信之, 塚谷裕子, 田中義人, 北森成治, 内海英雄, 新しい試験菌株を用いたエームス試験の有用性について, 保環研年報, 287, 72-76, 2001.

世良暢之, 志水信之, 塚谷裕子, 田中義人, 北森成治, 内海英雄, 簡易生物評価法の開発と問題点, 保環研年報, 287, 77-82, 2001.

Sera N. , Tanaka Y. , Tsukatani H. , Shimizu N. , Kitamori S. and Utsumi H. , Genotoxicity of 255 chemicals in the *Salmonella* microsome assay (Ames test) and 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) assay for the detection of carcinogens, Water Environ. Tech. , 1, 25-30, 2003.

Sera N. , Tanaka Y. , Tsukatani H. , Shimizu N. , Kitamori S. and Utsumi H. , Sensitive Ames test for specific compounds, Bioassay for genotoxicity, in press.

Sera N. , Tanaka Y. , Tsukatani H. , Shimizu N. , Kitamori S. and Utsumi H. , Generation of 8-hydroxyguanine, Bioassay for genotoxicity, in press.