

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22510075

研究課題名(和文) 環境化学物質と紫外線の複合作用により生成する変異原の解析とその抑制法

研究課題名(英文) Mechanism of photomutagenicity of UV-irradiated environmental chemicals

研究代表者

太田 敏博(Ohta, Toshihiro)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：10266893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：タバコタールに紫外線(UVA)を照射する事で新たに現れる変異原性について解析を行った。この光変異原性は、主流煙タールよりも副流煙タールのほうが強く現れた。タバコのタール含量との相関はなかった。菌株に対する特異性の解析からA:T塩基対での置換変異が起きていると推定された。活性酸素種の関与は少ないと考えられた。タバコ特異的ニトロソアミンとの関連で研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：Photomutagenic activity of cigarette smoke condensate (CSC) with UVA-irradiation was investigated. Sidestream CSC was more photomutagenic than mainstream CSC. Photomutagenic potency was not related to the tar contents of cigarette. No significant increase of 8-OHdG was detected under the conditions used. Tobacco specific nitrosamines (TSNA) may be responsible for the photomutagenicity.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：光遺伝毒性 変異原性 紫外線 環境化学物質 たばこタール

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究テーマの1つとして、環境化学物質と紫外線との複合作用で新たに生じる変異原性について研究を進めている。農薬および食品添加物については、変異原性を含む各種毒性試験が適切な手法で行われ評価を受けているが、これらは原体の有効成分単独についてのものである。また、光分解や安定性については化学的な分析に基づく評価が行われているが、光分解物などの生物影響に関しては全く調べられていないのが現状である。近年オゾン層破壊による紫外線(UVB, UVA)の増大が懸念されており、光照射による遺伝毒性の発現の簡易試験法の開発やメカニズム解明は、益々重要になってきている。

これまでの申請者の研究で、ポストハーベスト農薬であるチアベンダゾール(TBZ)が、それ自体には変異原性はないが、近紫外光(波長 320 nm 以上)の照射で強力な変異原性を示すようになることを見だし、そのメカニズムの一部を明らかにしてきた。また、香料として用いられている食品添加物のマルトールにも近紫外光照射による変異原性の出現を見だした。香料マルトールのUVA活性化体は水溶液中で数時間も変異原性の活性を失わないことから、かなり安定した物質である。活性化体の同定にはいたっていないが、その作用メカニズムはTBZの場合とはまったく異なるものであると考えられる。これらの光活性化メカニズムを明らかにして、必要な対策を考える必要があると考えられる。

2. 研究の目的

タバコタールには多環芳香族炭化水素やニコチンなど生体内で代謝されて変異原性を示す物質が存在することはすでに報告されているが、副流煙タールに近紫外光(UVA)照射することでこれまで知られていなかった変異原性が現れることを見だした。そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。(1) 各種のタバコ製品から採集したタールでの光活性化の比較検討 (2) 8 ヒドロキシデオキシグアノシンの生成の解析 (3) タバコ特異的ニトロソアミンの分析

3. 研究の方法

(1) 各種のタバコ製品から採集したタールでの光活性化の比較検討

タバコタールの捕集方法(国際標準モードのISO法とカナダ保健省が推奨しているHCI法)を変えて、採取したタールの変異原性の強さを比較した。さらにたばこの銘柄による違いについても比較検討した。タールの変異原性はサルモネラ菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験で、代謝活性化を行わない条件下で調べた。

(2) 8 ヒドロキシデオキシグアノシンの生

成の解析

活性酸素種が関与していると推定し、ゲノムDNA中の8 ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の生成量を定量することを試みた。UVA照射したタバコ副流煙タール存在下でUVA照射した大腸菌からゲノムDNAを抽出し、ヌクレアーゼ P1 処理、アルカリホスファターゼ処理を行ってヌクレオシドに分解した。このサンプルをHPLC-ECD分析により8-OHdGの定量を行った。

(3) タバコ特異的ニトロソアミンの分析

タバコ特異的ニトロソアミン(TSNA)の測定は、タバコ葉にくえん酸-リン酸緩衝液を添加後振とう抽出し、抽出液を珪藻土カラムで処理後、高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS/MS)に供して行った。また、ニコチン測定は、タバコ葉に超純水、2M NaOH及びn-ヘキサンを添加後振とう抽出し、n-ヘキサン溶液をガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)に供して行った。

4. 研究成果

(1) 各種のタバコ製品から採集したタールでの光活性化の比較検討

受動喫煙として問題となるタバコの副流煙タールを主な材料として、紫外線(UVA)を照射する事で新たに現れる変異原性について解析を行った。WP2uvrA/pKM101株の菌液とタールの混合液にUVA照射(230 μW/cm², 10~30分)することで変異原性が著しく増強された。この光変異原性は、主流煙タールよりも副流煙タールのほうが強く現れた。一方、TA100、TA98株では顕著な増強は認められなかった。タール含量の異なるタバコ(セブンスター、マイルドセブンワン)で較べたところ、その比活性は同程度であったが、低タールタバコのピアニッシモワンでは高い比活性が認められた。タバコの銘柄により比活性は異なっていたが、タール含量との相関はなかった。光変異原性はWP2uvrA/pKM101株で検出されたが、TA100株では見られなかったことからA:T塩基対での置換変異が起きていると推定された。また、あらかじめUVA照射したタールでは変異原性は検出されなかった。タバコ副流煙タールには従来考えられていた変異原以外にも、UVA照射によって変異原性を示す物質が含まれていることが判明した。

(2) 8 ヒドロキシデオキシグアノシンの生成の解析

活性酸素の作用で生じる8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の生成量を定量した結果、生成量にわずかな増加が認められたが、変異原性の強さを説明できる生成量ではなかった。一つの原因として、抽出時における酸化の影響が無視できず、バックグラウンドの値が高くなっていることが考えられた。サンプル調整時に窒素置換するなどの工

夫を加えて検討し、活性酸素種の関与について結論が得られるような実験をする必要がある。一方で、プラスミド DNA に対する DNA 鎖切断活性を詳細に調べた。一本鎖 DNA 切断活性は認められたものの強い活性ではなく、副流煙タールに近紫外光(UVA)照射で生じる変異原性は、活性酸素種ではなく、DNA に付加体を作る作用もあると判断した。

(3) タバコ特異的ニトロソアミンの分析

タバコ葉に含まれる既存変異原性物質からの解析を試みた。国内で販売された製品のタバコ葉中のタバコ特異的ニトロソアミン(TSNA)の測定を行い、さらにニコチン量の分析も行った。特に最近登場した新しいタイプの「嗅ぎたばこ」について注目し研究を実施した。「嗅ぎたばこ」は無煙たばことして開発され、日本国内では2010年から販売されている。本製品はカートリッジに充填されたたばこ葉から放散されるガス成分を、口腔に吸引して使用するたばこである。紙巻たばこ異なって外箱にニコチン量等の表示義務はない。また、使用者が曝露される化学物質及びその濃度についての測定報告は少ないため、嗅ぎたばこの使用による健康影響は不明な点が多い。先行販売2製品(MINT, BITTER)のたばこ葉中ニコチン量及びTSNA量は、1カートリッジあたり、MINTが5.49 mgと737 ng、BITTERが9.12 mgと1,180 ngとなり、両成分ともBITTERの方がMINTより1.6倍多く含まれていた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Sassa, A., N. Kamoshita, T. Matsuda, I. Kuraoka, T. Ohta, T. Nohmi, M. Honma, and M. Yasui, Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalyzed by human DNA polymerases. *Mutagenesis*, 28, 81-88 (2013)

Onodera, T., K. Satoh, T. Ohta, and I. Narumi, *Deinococcus radiodurans* YgjD and YeaZ are involved in the repair of DNA cross-links.

Extremophiles, 17, 171-179 (2013)

Onodera, T., Morino, K., Tokishita, S., Morita, R., Masui, R., Kuramitsu, S., and Ohta, T., Role of alkyltransferase-like (ATL) protein in repair of methylated DNA lesions in *Thermus thermophilus*. *Mutagenesis*, **26**, 303-308 (2011).

[学会発表](計17件)

宇津木里香、稲葉洋平、内山茂久、太田

敏博、櫻田尚樹、固相抽出を組み合わせた尿中 NNAL の測定、日本薬学会第 134 年回、2014/3、熊本

神田卓哉、時下進一、太田敏博、好気性高度好熱菌における DNA 酸化損傷の防御と修復に関する研究、第 36 回日本分子生物学会、2013/12、神戸

宇津木里香、稲葉洋平、内山茂久、太田敏博、櫻田尚樹、国産無煙たばこに含まれるニコチン及び添加物の測定、第 72 回日本公衆衛生学会、2013/10、津

小野寺威文、中村顕、佐藤勝也、太田敏博、鳴海一成、*Deinococcus* と *Thermus* に共通する新規 DNA 鎖間架橋修復遺伝子の遺伝学的解析、第 13 回極限環境生物学会、2012/12、東京

小野寺威文、佐藤勝也、太田敏博、鳴海一成、DNA 鎖間架橋損傷の修復に関わる *DryjD* および *DryeaZ* 遺伝子の機能解析、第 35 回日本分子生物学会、2012/12、福岡

近藤加奈子、時下進一、太田敏博、好気性高度好熱菌における DNA の酸化損傷の防御と修復に関する研究、第 35 回日本分子生物学会年会、2012/12、福岡

宇津木里香、稲葉洋平、内山茂久、太田敏博、櫻田尚樹、国産メンソールたばこ銘柄の主流煙中の変異原性と化学分析について、日本環境変異原学会第 41 回大会、2012/11、静岡

Onodera, T., S. Katsuya, T. Ohta and I. Narumi, Involvement of universally conserved genes, *yjgD* and *yeaZ* orthologs, in DNA repair of *Deinococcus radiodurans*, 9th International Congress on Extremophiles, Sevilla, Spain, 2012/9

宇津木里香、稲葉洋平、内山茂久、太田敏博、櫻田尚樹、固体捕集法を用いた嗅ぎたばこのガス成分の測定、第 21 回環境化学討論会、2012/7、松山

宇津木里香、稲葉洋平、内山茂久、太田敏博、櫻田尚樹、無煙タバコ使用時に吸引されるガス状成分の測定、日本薬学会第 132 年会、2012/3、札幌

近藤加奈子、時下進一、太田敏博、好気性高度好熱菌における DNA 酸化損傷の防御と修復に関する研究、第 40 回日本環境変異原学会大会、2011/11、東京

小野寺威文、中村顕、佐藤勝也、太田敏博、鳴海一成、放射線抵抗性細菌と高度好熱菌の DNA 修復における *yjgD* および *yeaZ* オルソログの機能解析、第 40 回日本環境変異原学会大会、2011/11、東京

宇津木里香、稲葉洋平、内山茂久、太田敏博、大和浩、櫻田尚樹、無煙タバコの吸引時に放散されるニコチン量の測定、第 70 回日本公衆衛生学会大会、2011/10、秋田

小野寺威文、時下進一、太田敏博、高度好

熱菌における Alkyltransferase-like (ATL) タンパクのメチル化 DNA 損傷修復への関与、第 39 回日本環境変異原学会大会、2010/11、つくば

國元洋之、太田敏博、高度好熱菌のメチル化損傷塩基の修復遺伝子の解析、第 39 回日本環境変異原学会大会、2010/11、つくば

村松美那、豊田尚美、安井由美子、増村健一、高宗万希子、山田雅巳、田中卓二、太田敏博、能美健彦、gpt delta トランスジェニックラットを用いたシリマリンとカプサイシンの化学予防効果の検討、第 39 回日本環境変異原学会大会、2010/11、つくば

小野寺威文、北原一正、中村顕、佐藤勝也、太田敏博、鳴海一成、放射線抵抗性細菌における多種生物間に共通した機能未知遺伝子の解析、第 11 回極限環境生物学会年会、2010/11、京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~lomb-5/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 敏博 (TOSHIHIRO OHTA)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：10266893