

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790132

研究課題名(和文)メイラード反応物 ABAQ 及びその関連物質の糖尿病状態での生成及びその生態影響

研究課題名(英文) Production and biological effects of ABAQ produced from the Maillard reaction and its relative substances in diabetes

研究代表者

長谷井 友尋 (Hasei, Tomohiro)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10388027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 型糖尿病ラット、 型糖尿病ラット及び正常ラットの尿中から新規遺伝毒性物質ABAQを検出し、ABAQ検出量が血糖値と相関していることを明らかにした。健康成人の随時尿中から、ABAQを検出し、ヒト尿中にABAQが含まれることを明らかにした。食品中にABAQが含まれることを明らかにした。グルコース、L-トリプトファン、フェントン試薬の反応物からABAQ以外の変異原性物質を単離し、ABAQ以外の変異原性物質が含まれることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A novel mutagen ABAQ was detected in urine collected from type 1 diabetic model rats, type 2 diabetic model rats, and normal rats. ABAQ was detected from spot urine collected from healthy persons. ABAQ was detected from foods. A mutagens excepting ABAQ was isolated from reaction mixture of glucose, L-tryptophan, and the Fenton reagent.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：栄養化学

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の糖尿病患者数は年々増加し、現在約 890 万人となり、その予備軍と合わせると約 2210 万人と推定されており、40 歳以上では 4 人に 1 人は糖尿病が疑われている。疫学研究によると糖尿病患者は肝臓、膀胱、大腸及び子宮内膜等多くの臓器において健常人より発がんリスクが高いことが報告されており、糖尿病が発がんリスクを高める原因の解明が急がれている。

糖尿病のような高血糖状態においては、グルコースなどの還元糖と生体内のタンパク質が反応するメイラード反応、すなわち糖化（グリケーション）とよばれる反応がおこることが知られている。グリケーションの後期段階には様々な AGEs (advanced glycation end-products) が生成し、それらが神経障害、網膜症、腎症などの糖尿病合併症の原因の一つとなっていると考えられている。また AGEs は老化、慢性炎症、動脈硬化、アルツハイマーなどにも関与していることがこれまでに明らかにされている。

一方、AGEs はグルコースのような糖だけではなく、糖化反応産物、糖酸化物、過酸化脂質及びその他の代謝経路から生成したアルデヒド類からも生成することが明らかになってきた。近年、糖分解物である 3-デオキシグルコソールとリジンの反応生成物であるリジール-ピラリンが変異原性を示すことが報告され、ヒトの血清中及び尿中に存在していることが明らかにされた。リジール-ピラリン以外にも生体内メイラード反応あるいはアミノカルボニル反応により種々の変異・がん原性を有する物質が生成していると予想されるが、それらに関してこれまでほとんど明らかにされていない。

近年、私達は生体モデル条件下におけるグルコース及びトリプトファンメイラード反応系から変異原性物質が生成すること明らかにし、その反応系によって生成した変異原性物質を含む複雑な混合物から主要な新規変異原性物質として 5-amino-6-hydroxy-8H-benzo[6,7]azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one (ABAQ) を見出した (R. Nishigaki, T. Hasei *et al.* 2009)。また、これまでの研究において ABAQ は *in vivo* 及び *in vitro* において加熱食品中で生成する発がん性ヘテロサイクリックアミンである PhIP (2-amino-1-methyl-phenylimidazo[4,5-b]pyridine) と同程度の遺伝毒性を示すことがわかった。糖尿病病態時には生体内でメイラード反応が亢進していることが知られており、糖尿病患者の生体内では ABAQ が生成している可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は生体試料中の ABAQ の分析法を確立し、糖尿病患者あるいは糖尿病にいたる過程での ABAQ の生成について明らかにするとともに糖尿病状態の進行と ABAQ の生

体内での生成状況の関連性及び生成にともなって生じる遺伝毒性について明らかにすることである。また、生理的条件下におけるメイラード反応によって生成する ABAQ 以外の主要な変異原性物質並びに同様にアクロレインとポリアミン類の反応によって生じる変異原性物質についても構造を明らかにし、それら変異原物質のリスク評価のため、*in vitro* 及び *in vivo* における遺伝毒性並びに生体中での生成について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 尿中 ABAQ の分析

I 型糖尿病モデルラットは、ラットに STZ を腹腔内投与し作成した。II 型糖尿病モデルラット及び正常ラットにはそれぞれ GK/Slc 及び Wistar/ST ラットを用い、各ラットから尿を採取した。ラットから採取した尿は ODS 中圧カラムに負荷し、メタノール-ギ酸の混液を移動相として溶出させた。ABAQ 溶出画分を分取し、液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) で分析した。

### (2) メイラード反応によって生成する ABAQ 以外の変異原性物質の検索

グルコースと L-トリプトファンを糖尿病モデル反応系で反応させ、*Salmonella* Typhimurium YG1024 株を用いた S9 mix 存在下で得られた変異原性を指標に分画を行った。

反応生成物を Sephadex LH-20 カラムを用いて分離した。Sephadex LH-20 から溶出した変異原性画分をオクタデシル中圧カラムで分離後、さらに高速液体クロマトグラフ (HPLC) カラムで分離した。

### (3) 糖尿病モデル動物における遺伝毒性発現とその臓器特性の解明

コメットアッセイは投与 3 時間後に、肝、腎、肺及び骨髄を摘出し、各臓器の細胞におけるコメット像を観察した。小核試験は投与前と投与 24、48 及び 72 時間後に末梢血を採取し、網赤血球 1000 個中の小核を持つ赤血球数を調べた。

### (4) アミノカルボニル反応によって生成する変異原性物質の検索

アクロレインとポリアミンのアミノカルボニル反応によって生成する反応生成物を HPLC カラムで分離した。単離した変異原性物質は  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 及び LC-MS を用いて分析し、推定構造を得た。

### (5) 食品中の ABAQ の分析

小売店で購入した乾燥した状態の食品を細切あるいは粉碎し、有機溶媒で抽出した。得られた抽出物をろ過し、中圧カラムに負荷し、メタノール-ギ酸の混液を移動相として溶出させた。ABAQ 溶出画分を分取し、

LC/MS/MS で分析した。

#### (6) ヒト尿中の ABAQ の分析

ヒト尿は健康男性から採取した。ラット及びヒトから採取した尿は ODS 中圧カラムに負荷し、メタノール-ギ酸の混液を移動相として溶出させた。ABAQ 溶出画分を分取し、LC-MS で分析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 尿中 ABAQ の分析

型糖尿病及び型糖尿病ラット並びに正常ラットの尿中から ABAQ を検出した。検出した尿中 ABAQ の量は型糖尿病>>型糖尿病ラット>正常ラットの順に高かった。血糖値を測定したところ、型糖尿病>>型糖尿病ラット>正常ラットの順に高かった。ABAQ 検出量と血糖値の間には正の相関関係が認められており、これらの結果から、ABAQ がラットの血糖値に依存してラット生体内で生成されたことが示唆された。

#### (2) メイラード反応によって生成する ABAQ 以外の変異原性物質の検索

グルコースとトリプトファンを糖尿病モデル系で反応させ、反応生成物を得た。生成物を Sephadex-LH-20 カラムを用いて分画した際、変異原性画分は2画分に認められたが、複数回の反応と分画を続けた際、前の画分の再現性が認められなかった。このため、後ろの画分を中圧カラムに負荷し、引き続き分画した。中圧カラム及び HPLC カラムを用いた分画では、反応物中から ABAQ を検出した。ABAQ 溶出画分以外に強い変異原性が認められた画分が存在したため、本研究におけるメイラード反応において ABAQ 以外の変異原性物質が生成していることが示唆された。さらに分離を続けることで、その変異原性物質を単離した。

#### (3) 糖尿病モデル動物における遺伝毒性発現とその臓器特性の解明

ABAQ の *in vivo* における遺伝毒性をマウスの末梢血を用いた小核試験で評価した。小核試験において、ABAQ の 12.5, 25 及び 50 mg/kg 投与により、投与 48 時間後まで、小核発生頻度は経時的に増加した。投与 48 時間後の各用量における頻度は対照群における頻度のそれぞれ 3.0, 4.2 及び 5.8 倍であった。

ABAQ の *in vivo* 遺伝毒性を、コメットアッセイを用いて評価した際、コメットアッセイにおいて DNA tail extent moment 値はいずれの臓器においても用量依存的に有意に上昇していた。特に ABAQ を 50 及び 100 mg/kg で投与した場合の骨髄における tail extent moment 値は対照群のそれぞれのそれぞれ 1.3 及び 1.4 倍であった。

これらの結果から ABAQ が *in vivo* において遺伝毒性を示すことが明らかになった。

#### (4) アミノカルボニル反応によって生成する変異原性物質の検索

アクロレインとポリアミンのアミノカルボニル反応によって生成する反応生成物を HPLC カラムで分離した。その結果、複数のポリアミンのアミノカルボニル反応物から複数の変異原性物質を単離した。単離した変異原性物質は <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 及び LC-MS を用いて分析し、それぞれの推定構造を得た。

#### (5) 食品中の ABAQ の分析

ABAQ は分析を行った全ての試料から検出された。食品から ABAQ を検出したのは本研究が初めてである。この結果はヒトが日常生活において、経口的に ABAQ に曝露しており、ABAQ の遺伝毒性にさらされていることが示唆された。

#### (6) ヒト尿中の ABAQ の分析

ヒト健康人から採取した尿を  $\beta$ -glucuronidase で加水分解後、精製し、ABAQ を検出した。ヒト尿中から ABAQ を検出したのは本研究が初めてである。また、本研究において、ABAQ は *in vivo* での遺伝毒性を示すことが明らかになっており、本研究の結果から、ヒトはその体内において恒常的に ABAQ の遺伝毒性にさらされていることが示唆された。

### 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1件)

Yukari Totsuka, Tetsushi Watanabe, Souleymane Coulibaly, Sae Kobayashi, Marina Nishizaki, Miho Okazaki, Tomohiro Hasei, Keiji Wakabayashi, Hitoshi Nakagama, *In vivo* genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinoline-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and L-tryptophan, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 査読あり, 760, 2014, 48-55

#### [学会発表](計5件)

長谷井友尋、北野祐香、廣本麻里、川久保慶一、河内麻由美、渡辺徹志、食品中の新規ヘテロサイクリックアミン ABAQ の分析、日本薬学会第 135 大会、2015 年 3 月 28 日、神戸市

北野祐香、隆杉桃子、田村友香、廣本麻里、蟹江静、川久保慶一、スレイマン・クゥリバリ、長谷井友尋、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺徹志、型及び型糖

病ラット並びに正常ラット尿中における新規遺伝毒性物質 ABAQ の分析、2015年3月28日、神戸市

長谷井友尋、川久保慶一、河内麻由美、渡辺徹志、メイラード反応によって生成する新規遺伝毒性物質 ABAQ のヒト尿中からの検出、第3回創薬科学フロンティアシンポジウム、2014年11月22日、京都市

長谷井友尋、クウリバリ・スレイマン、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺徹志、メイラード反応によって生成する新規化合物 ABAQ の *in vivo* 遺伝毒性、フォーラム2013 衛生薬学・環境トキシコロジー、2013年9月13日、福岡市

細田成美、竹中信絵、宮崎千尋、隆杉桃子、長谷井友尋、若林敬二、増田修一、戸塚ゆ加里、渡辺徹志、新規遺伝毒性物質 ABAQ の糖尿病モデルラット体内における生成、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012年10月20日、西宮市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷井友尋 (HASEI, Tomohiro)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10388027