

ニトロ化合物の変異原性・発癌性と腸管内細菌による不活化の研究

Studies on mutagenicity and carcinogenicity of nitro compounds and their inactivation in intestinal bacteria

- 代表研究者 徳島大学医学部教授 大西 克成
Prof., School of Med., The Univ. of Tokushima
Yoshinari OHNISHI
- 協同研究者 徳島大学医学部助手 木内 武美
Res. Assoc., School of Med., The Univ. of Tokushima
Takemi KINOUCHI
- 徳島大学医学部大学院生 真鍋 芳樹
Graduate Student, School of Med., The Univ. of Tokushima
Yoshiki MANABE
- 徳島大学歯学部大学院生 筒井 英士
Graduate Student, School of Dentistry, The Univ. of Tokushima
Hideshi TSUTSUI
- 福岡県衛生公害センター課長 常盤 寛
Chief of Epidemiology Division, Fukuoka Environmental Research Center
Hiroshi TOKIWA
- 徳島大学医学部教授 大塚 久
Prof., School of Med., The Univ. of Tokushima
Hisashi OTSUKA

Since 1978, mutagenic nitroaromatic compounds have been detected in environmental mixtures such as the urban atmosphere, automobile exhaust and wastewater. The purposes of our research projects were to measure the mutagenic and carcinogenic activity of nitropyrenes (NPs) found in the environment and to study the metabolism of NP in rats and their normal intestinal microflora. The results obtained in the last three years are summarized as follows.

1. 1-NP, and 1,3-, 1,6-, and 1,8-diNP were purified with 70% acetonitrile and 70% methanol by high performance liquid chromatography (HPLC). The purity of these chemicals was 99.9, 97.8, 99.9, and 85.2%, respectively, and they were used in the mutagenicity and carcinogenicity experiments. The mutagenicity of 1-NP, 1,6-diNP, and 1,8-diNP showed 417, 8.2×10^4 , and 10^5 His⁺ revertants/plate/nmol.

2. Nitroreductases (NRases) in bacterial cells are important for the biological activation of nitroarenes, especially NPs. The 1-NP-NRase activity of aerobic bacteria was low, but crude extracts from the anaerobic bacteria *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *Fusobacterium mortiferum*, *F. nucleatum*, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *Eubacterium lentum*, *E. limosum*, and *Peptostreptococcus anaerobius* all easily converted 1-NP to 1-aminopyrene (1-AP) and proportionally decreased the mutagenic activity of 1-NP.

3. Four NRases were purified from *B. fragilis* strain GAI0624. The substrate specificity, the effect on the mutagenicity of mutagenic nitro compounds, of NRases, I, III, and IV was relatively high for 1-NP, diNPs, and 4-nitroquinoline 1-oxide, respectively, but NRases II had broad speci-

city.

4. A new method of measuring the 1-NP or 1,6-diNP content of complex mixtures was established by using 1-NP-specific NRase I or 1,6-diNP-specific NRase III purified from *B. fragilis*. The 1-NP- or 1,6-diNP-corresponding fraction eluted from a Zorbax ODS column in HPLC was collected and reduced in the dark by the NRase I or III, respectively, to produce fluorescent 1-AP or 1,6-diAP. The extract of the reaction mixture was again applied to the ODS column, and the 1-AP or 1,6-diAP was measured quantitatively by using a fluorescence detector.

5. By this method, the amounts of 1-NP and 1,6-diNP in diesel particles exhausted from a small engine or truck were measured and found to be 60 to 70 and 1 ng per mg of extract, respectively, accounting for 3.6 and 8%, respectively, of the total mutagenicity of the extracts assayed for *Salmonella typhimurium* strain TA98 in the absence of S9 mix. This suggests that the total NPs may account for about 30% of the total mutagenicity of diesel exhaust particles.

Since people live indoors for more than 80% of a day, the effects of indoor air on human health are also important. Kerosene heaters are widely used in Japanese residences because of their efficiency and low cost. The particles from a room containing emissions at the beginning of burning of a kerosene heater for 20 min showed very high mutagenicity and a considerable amount of 1-NP and 1,6-diNP, suggesting that lighting the heater creates mutagenic substances such as NPs.

The majority of cancer deaths are attributed to diet or life-style and cigarette smoking. Pieces of raw chicken with or without a sauce were grilled above a city gas flame and extracted by sonication with benzene-ethanol. The diethyl-ether-soluble neutral fraction of the chicken grilled with the sauce for 3, 5, and 7 min contained 3.8, 19, and 43 ng, respectively, of 1-NP per gram of grilled chicken, accounting for 3.0, 2.7, and 1.3%, respectively, of the total extract mutagenicity. The neutral fraction of the chicken grilled without the sauce for 7 min contained only 1.4 ng of 1-NP per gram of grilled chicken.

6. [³H]1-NP or [³H]1,6-diNP bound to DNA, poly(G), and poly(dG) in the presence of NRase I or III, respectively, and NADPH. The main DNA adduct of 1-NP appeared to be N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene on the basis of its retention time in HPLC.

7. 1-NP NRase activity in the various organs of Sprague-Dawley rats and in intestinal bacteria was assayed in the presence of NADPH or NADH under nitrogen gas. NRase activity of the liver and of the small and large intestine was relatively high, but that of the lung and alveolar macrophages was very low. Intestinal contents had high activity, which was proportional to the number of bacteria in the intestine. The activity of the normal bacterial flora, mainly anaerobic bacteria, was very high.

8. [³H]1-NP was orally administered to conventional and germfree rats. Its absorption to various organs and excretion into feces and urine are more rapid in the conventional than germfree rats. Metabolites in the feces and urine of conventional rats are different from those in germfree rats on the basis of HPLC and mass spectrum analysis. The following metabolites were detected in the feces of conventional rats: 1-AP, 1-acetylamino-6-hydroxypyrene (1-AA-6-HP) and 1-AA-8-HP, with each metabolite being formed in nearly equal quantity. Urinary metabolites detected after treatment with β -glucuronidase were 1-AA-6-HP and 1-AA-8-HP, with 6-hydroxylation occurring to a greater extent than 8-hydroxylation. The major metabolites detected in both the feces and urine from the germfree rats were 1-nitro-3-hydroxypyrene (1-N-3-HP), 1-nitro-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene, 1-N-6-HP, and 1-N-8-HP. 1-AP was not found as a metabolite in germfree rats. These results suggest that the intestinal microflora contributes to the overall metabolism of 1-NP.

9. Of the NPs, 0.1 mg of 1-NP or 1,6-diNP was inoculated subcutaneously into male BALB/c mice once a week for 20 weeks. In the group injected with 1,6-diNP the first tumor appeared on day 112, and 10 of the 20 mice developed tumors at the site of injection by 60 weeks after the first injection. However, no tumors were induced in any of the mice injected with 1-NP. All of the tumors induced were transplantable for five generations in male BALB/c mice. Histologically, most of the tumors showed the characteristic features of malignant fibrous histiocytoma.

研究目的

自然環境や生活環境が年々悪化しているといわれている。その原因物質にはいろいろあるが、なかでも環境変異原、環境発癌物質、環境催奇性物質は、人々の遺伝病、癌、奇形の原因になるため、それらの物質による汚染の実体を把握し、人々との接触が起こらないように除去することは早急に要求されていることである。代表研究者らは、約10年間、サルモネラ菌・マイクロゾームによる突然変異試験 (Ames 法) によって、気圏および水圏の環境変異原の検索を行なって来た。気圏、特に大気中の粒子状物質を抽出分画することにより、diethyl ether 溶性中性画分の変異原性は、全画分の35~50%を占めていた。しかもその中には、ラット肝マイクロゾームによる代謝活性化を必要としない直接変異原が含まれており、それらは多環芳香族炭化水素のニトロ化合物であることを明らかにした。なかでも pyrene がニトロ化すると、その変異原性は強く、特に dinitropyrene (diNP) 類は Ames 法で文献上の最高値を示した。したがってこれらの物質の発癌性を調べることを第一の目的とした。

さらに、これらの nitropyrene (NP) 類が、環境中の混合物や食物中にどの程度含有されているのか、人の体内に入った場合にどのような物質に

代謝されるのかを知ることは、人への作用を明らかにする上で重要である。腸管内の常在細菌、特に偏性嫌気性菌が NP の代謝にどのように関与しているのか、どのような DNA 付加物が形成されるのかも明らかにしたいと考えた。

研究経過および成果

1. 1-NP と diNP の精製と変異原性

市販の 1-NP には、diNP が約 1% 含まれており、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分取した diNP 画分の変異原性が、全体の約 50% も占めることがわかった。研究には純品が必要なので、これらの NP 類の精製方法を確立した (図1)。逆相の Zorbax ODS カラム (4.6 mm i.d. × 250 mm) を使用し、移動相として 70% acetonitrile を用いた HPLC (50°C, 1 ml/min) では、1,6- と 1,8-diNP との混合物、1,3-diNP, 1-NP がこの順序で溶出してきた。また、移動相として 70% methanol を使用した HPLC (50°C, 2 ml/min) では、1,6-diNP, 1,8-diNP, 1,3-diNP, 1-NP の順序で溶出してきた。前者の移動相によって、純度 99.9% の 1-NP と 97.8% の 1,3-diNP を、後者の移動相によって、99.9% の 1,6-diNP と 85.2% の 1,8-diNP (14.8% は 1,6-diNP) を得ることができた。発癌実験のための 1,6-diNP は、順相のシリカゲルを使用した薄層クロマトグ

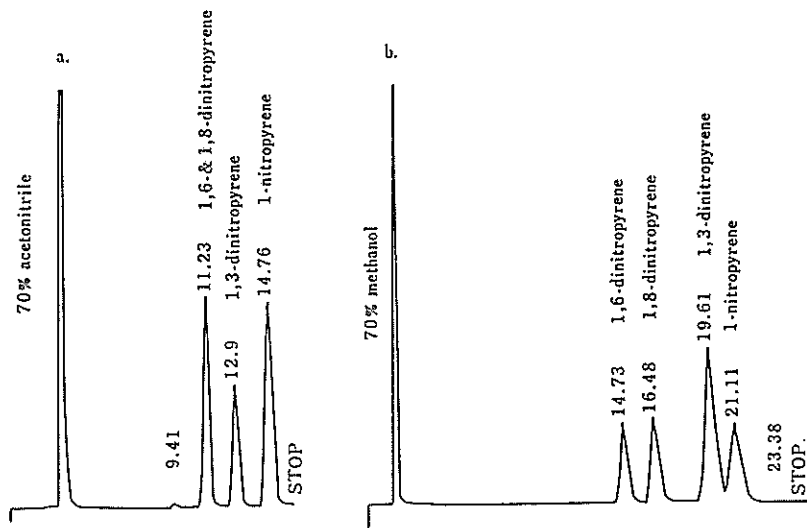


図1 Zorbax ODS カラムによるニトロピレン類の分画, 移動相として a. 70% アセトニトリル, b. 70% メタノールを使用した。

ラフィー (TLC) も用いた。このようにして精製した NP 類および Mermelstein から分与された 1,3,6-triNP, 1,3,6,8-tetraNP, さらに市販の他のニトロ化合物の変異原性を, preincubation 法を用いた Ames 法で測定したところ, 1,8-diNP の変異原性が最も強く, サルモネラ菌 TA98 株 (-) S9 に対して, 10^6 His⁺ 復帰変異集落数/プレート/nmol という高い値を示した。これは, 今までに発見された変異原の中で最強のものの一つである。1,6-diNP では, 8.2×10^4 His⁺/プレート/nmol, 1-NP では 417 His⁺/プレート/nmol であった。

2. 細菌による 1-NP の代謝

1-NP は, 大気中の粒子状物質に吸着して存在している場合には, 吸気とともに人の肺に入っていく。しかし, 肺機能が良い人は, それらを痰として出したり, 自然に飲み込んでしまうことが考えられる。粒子状物質中の 1-NP は比較的水に溶けにくいので, 大腸まで行き, そこで体内に吸収される前に, 常在細菌と接触するものと思われる。調理上, 油類が不完全燃焼して pyrene が生じると, 都市ガスの燃焼によって生じる NO₂ によってニトロ化され, 1-NP が生じ, それを摂取することも考えられる。実際に, 直火で焼いた焼鳥には 1-NP が含まれている (後述)。下水にも 1-NP が存在していることがあるので, 1-NP が直接または間接に, 口の中に入り, 口腔内や腸管内の常在細菌と接触する場合は考えられる。

まず, 健康人の糞便と 1-NP とを混合し, 35°C 4日間, 嫌気チャンパー内で保温したところ, 1-NP の変異原性は 6.1% に減少した。次に, 腸管内の常在細菌である *Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *Escherichia coli* それぞれと 1-NP とを混合し, 37°C, 15 時間保温したところ, 前二者では変異原性が減少したが, *E. coli* とではそれほど減少しなかった。加熱殺菌した菌では, 1-NP の変異原性に影響を与えなかった。

1-NP と *B. fragilis* との反応液を酢酸エチルで抽出し, TLC で分画して, 生成物は, その蛍光スペクトルから 1-aminopyrene (1-AP) と同定した。さらに, 菌体粗抽出液との反応生成物も, HPLC の保持時間, マススペクトルから 1-AP

と同定した。これらのことから, *B. fragilis* による 1-NP の主要代謝産物は 1-AP であることがわかった。

この 1-NP nitroreductase (NRase) が細菌細胞内のどこに存在しているのかを, 分別遠心して調べたところ, 100,000×g, 2時間遠心の上清すなわち S-100 画分に活性があった。この NRase は 100°C, 10 分間の加熱で失活した。

次に, 常在細菌叢を形成している嫌気性菌や好気性菌をはじめ, 34株の実験室保存株, および排水から分離した好気性菌13株について粗抽出液を作り, 9,000×g, 10分間遠心の上清の NRase 活性を, 1-NP を基質として大気中で測定した (表 1)。NRase の比活性が高いのは, 嫌気性菌である *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *Fusobacterium mortiferum*, *F. nucleatum*, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *Eubacterium lentum*, *E. limosum*, *Peptostreptococcus anaerobius* であり, 好気性菌では, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* を除いて, すべて低い比活性であった。上記の嫌気性菌のうち, *F. nucleatum*, *B. adolescentis*, *P. anaerobius* は, 口腔内常在細菌である。また, *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. adolescentis*, *E. lentum* は, 腸管内常在細菌の主要構成菌である。表 1 では, NRase の比活性が高い菌株が, 同時に反応後の変異原性を低下していることを示している。つまり, TA98株, (-)S9 での 1-AP の変異原性が低いので, 1-NP から 1-AP が生成されるにつれて変異原性が低下するのである (図 2)。

B. fragilis については, 保存株および臨床分離株 5 株の NRase 比活性を測定したところ, 2.36 ± 0.14 nmol/h/mg 蛋白で, 菌株による差はほとんどなかった。

3. *Bacteroides fragilis* の 4 種の NRase の精製とそれらの基質特異性

NP 類が消化管に入る可能性が高いことや, NRase 活性が腸内常在嫌気性細菌で最も高いことなどの理由によって, *Bacteroides fragilis* GAI0624 株の NRase の精製を試みた。一夜培

表 1 各種細菌粗抽出液の 1-nitropyrene nitroreductase 活性と変異原性の減少

菌 種	酵 素 活 性		変異原性* (%)
	I-AP 生成量 (nmol)	比 活 性 (nmol/h/mg タンパク質)	
(-) 粗抽出液	0	0	100*
嫌 気 性 菌			
<i>Bacteroides fragilis</i>	44.2	2.27	33.8
<i>B. melaninogenicus</i> ss <i>intermedius</i>	5.6	0.27	74.1
<i>B. melaninogenicus</i> ss <i>melaninogenicus</i>	8.5	0.63	66.2
<i>B. oralis</i>	6.4	0.47	73.3
<i>B. thetaiotaomicron</i>	69.0	2.59	16.6
<i>B. vulgatus</i>	54.3	2.35	28.5
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	41.0	2.11	37.3
<i>F. nucleatum</i>	37.8	1.99	27.2
<i>F. varium</i>	17.5	0.93	45.5
<i>Clostridium perfringens</i>	41.0	1.89	33.8
<i>C. sporogenes</i>	35.0	1.83	31.8
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	14.0	1.68	54.6
<i>B. difidum</i>	31.3	2.47	31.9
<i>B. breve</i>	4.6	0.42	75.1
<i>B. infantis</i>	<0.4	<0.08	93.3
<i>Eubacterium lentum</i>	27.6	1.59	45.9
<i>E. limosum</i>	19.8	1.02	46.1
<i>Lactobacillus brevis</i>	<0.4	<0.04	80.7
<i>L. casei</i> ss <i>casei</i>	1.7	0.12	81.3
<i>Propionibacterium acnes</i>	<0.4	<0.04	80.7
<i>Veillonella alcalescens</i>	4.8	0.84	73.2
<i>Peptococcus magnus</i>	<0.4	<0.04	76.0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	36.8	2.73	34.7
<i>Streptococcus intermedius</i>	<0.4	<0.04	77.0
好 気 性 菌			
実験室保存菌株			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15.7	0.84	54.6
<i>Escherichia coli</i>	7.2	0.38	74.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21.2	1.09	56.2
<i>Proteus morganti</i>	10.6	0.71	60.7
<i>Salmonella typhimurium</i>	3.0	0.19	72.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.6	0.27	75.1
<i>Micrococcus luteus</i>	7.3	0.44	75.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.3	0.17	74.6
<i>S. epidermidis</i>	10.4	0.58	68.3
<i>Streptococcus faecalis</i>	5.3	0.35	74.6
環境分離菌株			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1.7	0.22	76.8
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.8	0.27	79.8
<i>Enterobacter</i> sp.	14.4	1.01	56.1
<i>Proteus mirabilis</i>	11.8	0.79	68.6
<i>P. rettgeri</i>	26.5	1.17	54.2
<i>P. vulgaris</i>	32.2	1.34	44.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.1	0.34	75.9
<i>P. alcaligenes</i>	2.8	0.30	80.0
<i>P. fluorescens</i>	4.7	0.34	79.1
<i>P. putida</i>	3.3	0.34	80.2
<i>P. stutzeri</i>	4.3	0.46	76.6
<i>Bacillus</i> sp.	13.8	0.65	57.8
<i>Micrococcus</i> sp.	2.2	0.19	86.2

*変異原性は、1-nitropyrene を基質として使用して反応させ、反応後に抽出したものをサルモネラ菌 TA98 株、S9 無添加で測定したものであり、100% は 584 His⁺ 復帰変異集落数/プレートを示した。

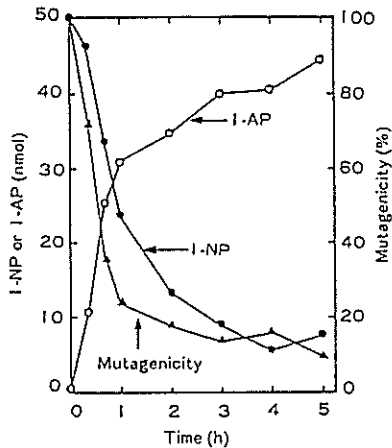


図2 *Bacteroides fragilis* GAI0624 株粗抽出液 (S-100 画分) の 1-nitropyrene nitroreductase による 1-aminopyrene の産生と変異原性の減少

1-nitropyrene 500 nmol を含む反応液 5 ml を 37°C で保温し、経時的に反応液 0.5 ml を採取し、20% NaCl を 0.1 ml 加え、酢酸エチル 2 ml で 3 回抽出した。残存 1-nitropyrene と生成 1-aminopyrene の量は HPLC で測定した。反応後の残存変異原性はサルモネラ菌 TA98 株, S9mix 無添加で測定した。

養菌体を超音波で破壊した粗抽出液を 100,000×g, 2 時間超遠心し、その上清である S-100 画分を硫酸分画 (40~60%) した後、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーにかけ、吸着画分と非吸着画分との二つの NRase 活性画分を得た。吸着画分を Sephadex G-200 のゲル濾過にかけたところ、さらに二つの活性ピークが出現した。大きなピークを NRase I (分子量約 52,000), 小さなピークを NRase III (分子量約 180,000) と命名した。NRase I 画分はさらに hydroxylapatite カラム, chromatofocusing カラムにかけて、416 倍まで精製した。DEAE-cellulose カラムの非吸着画分は、CM-cellulose や hydroxylapatite には吸着しなかったため、Sephadex 2B, 次に Sepharose 6B のゲル濾過を行ない、大小の二活性画分を得た。大きなピークを NRase II (分子量約 320,000), 小さなピークを NRase IV (分子量 680,000) と命名した。NRase II は、再度 Sepharose 6B でゲル濾過して、178 倍まで精製

表 2. *Bacteroides fragilis* の S-100 画分および精製 nitroreductase I, II, III, IV の基質特異性

ニトロ化合物 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	His^+ 復帰変異集落数/プレート (%) ^a					
	(-) 酵素	S-100	NRase I	NRase II	NRase III	NRase IV
1-NP (0.25)	427±4.6 (100)	125±8.3 (29.3)	78±1.6 (18.3)	134±4.6 (31.4)	306±2.9 (71.7)	269±9.0 (63.0)
1,3-diNP (0.002)	477±22.5 (100)	121±7.4 (25.4)	293±14.3 (61.4)	168±8.5 (35.2)	139±10.2 (29.1)	246±11.9 (51.6)
1,6-diNP (0.002)	584±5.3 (100)	151±2.6 (25.9)	577±3.3 (98.8)	303±5.4 (51.9)	212±6.2 (36.3)	581±6.0 (99.5)
1,8-diNP (0.002)	706±12.9 (100)	176±4.9 (24.9)	639±10.6 (90.5)	350±22.9 (49.6)	156±8.3 (22.1)	652±55.3 (92.4)
1,3,6-triNP (0.004)	382±9.6 (100)	115±8.7 (30.1)	317±4.5 (83.0)	300±6.2 (78.5)	200±7.9 (52.4)	349±10.1 (91.4)
1,3,6,8-tetraNP (0.025)	526±3.7 (100)	270±5.3 (51.3)	414±8.1 (78.7)	429±21.5 (81.6)	430±7.8 (81.8)	487±11.4 (92.4)
2-Nitrofluorene (5)	635±26.7 (100)	300±21.9 (47.2)	467±4.2 (73.5)	408±16.0 (64.3)	410±8.7 (64.6)	497±20.9 (78.3)
2-Nitronaphthalene ^b (20)	186±3.6 (100)	90±9.5 (48.4)	268±6.1 (144.1)	221±11.6 (118.8)	200±11.2 (107.5)	182±3.4 (97.9)
4-NQO ^b (0.20)	678±15.4 (100)	73±3.4 (10.8)	483±15.9 (71.2)	335±32.4 (49.4)	662±14.5 (97.6)	66±7.5 (9.7)
Nitrofurantoin ^b (0.5)	440±22.1 (100)	109±13.1 (24.8)	429±10.0 (97.5)	437±24.5 (99.3)	456±7.9 (103.6)	453±15.1 (103.0)
B(a)P ^c (20)	546±19.2 (100)	461±9.2 (84.4)	541±29.5 (99.1)	536±27.5 (98.2)	534±23.8 (97.8)	546±21.3 (100.0)
1-AP ^d (10)	466±11.6 (100)	447±18.2 (95.9)	430±10.7 (92.3)	423±17.7 (90.8)	464±23.2 (99.6)	473±6.8 (101.5)

^a: TA98, (-) S9; ^b: TA100, (-) S9; ^c: TA100, (+) S9; ^d: TA98, (+) S9.

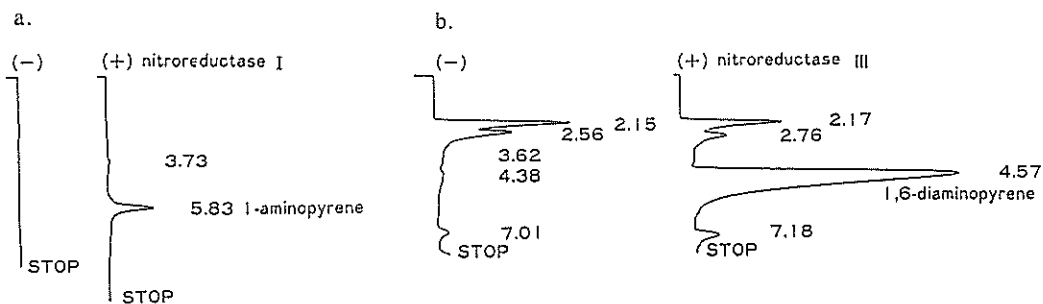


図3 *Bacteroides fragilis* の nitroreductase I および III によって還元されて生じたアミノ体の HPLC パターン

a. nitroreductase I による 1-nitropyrene 相当画分の還元によって生成された 1-aminopyrene のピークを示す。

b. nitroreductase III による 1,6-dinitropyrene 相当画分の還元によって生成された 1,6-diaminopyrene のピークを示す。

した。

これらの精製ないし部分精製した4種のNRaseとS-100画分の基質特異性を調べるために、各種のニトロ化合物と37°C、3時間保温後、酢酸エチルで抽出し、残存している変異原性をAmes法で測定した(表2)。S-100画分は、測定したすべてのニトロ化合物の変異原性を著明に減少させた。NRase Iは、1-NPを還元して変異原性を減少させ、さらに、1,3-diNPにも少し作用したが、1,6-diNPと1,8-diNPとは影響を与えなかった。NRase IIIは、すべてのdiNPの変異原性を減少させた。NRase IVは、4-nitroquinoline 1-oxideに特異的に働き、NRase IIは、広い基質特異性を示した。

4. 混合物中の1-NPおよび1,6-diNPの定量法の確立

環境中の混合物に含有されている1-NPや1,6-diNPを測定する時、benzene-ethanol(4:1)抽出物をHPLCによって分画し、1-NP相当画分や1,6-diNP相当画分を分取しても、それぞれ多種類の化学物質が混ざっており、正確に定量できない。1-NP定量の場合には、その1-NP相当画分を、*Bacteroides fragilis*から精製したNRase I、補酵素NADPH、リン酸緩衝液(pH 6.8)などと、37°C、5時間以上反応させ、酢酸エチルで抽出し、再度HPLCにかけて、還元されて生じた1-APのピーク面積からその蛍光強度を測定し、元の1-NPを定量した(図3)。1,6-diNPの定量

の場合には、1-NP、1,3-diNPおよび1,8-diNPを含まない1,6-diNP相当画分を分取し、NADPH存在下で、NRase IIIを作用させて還元した。還元して生じた1,6-diAPを含む抽出物を、再度HPLCで分画し、その蛍光強度を測定することによって、混合物中に含まれる1,6-diNPを定量した(図3)。1-NPおよび1,6-diNPの検出感度は、それぞれ 1.1×10^{-2} および 1.3×10^{-2} pmolであった。

5. 混合物の変異原性とNP類含有量

肺癌の増加の原因として喫煙の他に大気汚染が考えられており、その大気汚染源の一つとして、ディーゼルエンジンの排出ガスがある。排出ガス中の粒子状物質は多種類の化学物質を含んでいるが、強力な直接変異原であるNP類の含有量が問題になっている。アイドリング中の小型ディーゼルエンジン(排気量269cc)とシャーンダイナモーター上で10モード運転中のディーゼルトラック(排気量5,785cc)の排出粒子状物質の変異原性は、TA98株、S9無添加で、排出ガス1m³当たりそれぞれ、135,000および69,700 His⁺復帰変異集落数/プレート、抽出物1mg当たりで3,240および2,720 His⁺/プレートであった。超音波抽出の溶媒は、benzene-ethanol(4:1)が最もよく、両エンジンとも、抽出物1mg当たり、1-NPは60~70 ng、1,6-diNPは約1 ngであり、それぞれ全直接変異原性の3.6および8%を占めた。1,3-diNPと1,8-diNPも同じ量含まれてい

表 3. 1-nitropyrene および 1,6-dinitropyrene の *in vitro* 活性化酵素反応による DNA への結合

反 応 条 件	結合度 ($\mu\text{mol/mol P}$ ヌクレオチド) (%)	
	1-nitropyrene	1,6-dinitropyrene
完 全 反 応 系	71.2 \pm 8.8 (100)	294.7 \pm 21.3 (100)
(-) nitroreductase I または III	2.0 \pm 1.3 (2.8)	2.1 \pm 1.1 (0.7)
(-) NADPH	1.9 \pm 0.6 (2.7)	5.9 \pm 1.4 (2.0)
(+) <i>p</i> -chloromercuribenzoic acid	19.8 \pm 1.4 (27.8)	73.8 \pm 8.5 (25.0)
(-) DNA, (+) 熱変性 DNA	123.6 \pm 7.5 (173.6)	278.7 \pm 36.0 (94.6)
(-) DNA, (+) 大腸菌 tRNA	56.6 \pm 4.6 (79.5)	272.3 \pm 14.5 (92.4)
(-) nitroreductase III, (+) nitroreductase I	—	26.3 \pm 7.5 (8.9)
(-) nitroreductase I, (+) nitroreductase III	32.9 \pm 4.6 (46.2)	—

完全な反応液には [^3H]1-nitropyrene または [^3H]1,6-dinitropyrene 40 μM , NADPH 4 mM, グルコース-6-リン酸 5 mM, グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ 1 単位/ml, リン酸緩衝液 (pH 6.8) 100 mM, 大腸菌 DNA 10 mMP, および *Bacteroides fragilis* nitroreductase I 21 $\mu\text{g/ml}$ または nitroreductase III 239 $\mu\text{g/ml}$ を含む。

ると仮定すると、全 NP 類の変異原性は全体の約 30% と推定された。

肺癌は女性にも増加しつつあり、必ずしも喫煙や大気汚染とは関係がない場合が考えられる。また、人は1日の80%以上を室内で生活しており、室内空気の変異原性を明らかにすることは重要である。特に日本では、熱効率と低価格のためによく石油ストーブが使われているので、石油ストーブ燃焼中の室内空気の浮遊粒子状物質の変異原性を測定した。28 m³ の部屋で、ハイポリウムサンプラーを使ってテフロンフィルター上に粒子状物質を集め、benzene-ethanol で抽出して、サルモネラ菌を使った Ames 法で変異原性を測定した。TA98 株, S9 無添加では、ストーブ点火直後から 20 分間の変異原性は、室内空気 1 m³ 当たり 237 His⁺/プレートと高く、1,6-diNP 含量は空気 1 m³ 当たり 0.15 ng であり、全変異原性の約 18% を占めた。これに対して、安定に燃焼中の室内空気の変異原性は、9 His⁺/プレートと低かった。勿論、石油ストーブを点火しない時は、1.7 His⁺/プレートであった。これらのことから、石油ストーブは点火時に NP 類を排出し、室内空気を変異原で汚染することがわかった。したがって点火直後には、窓を開くか、換気装置によって、十分に換気をした方がよい。

食物にも NP 類が含有されているのではないかと考え、市販の串刺しの鶏肉を、そのまま、または、市販のたれをつけて、都市ガスの直火で焼き、benzene-ethanol で超音波抽出し、さらに、di-

ethyl ether で3分画して、変異原性を測定した。たれをつけない時の塩基性画分が、TA98 株, (+)S9 で、焼鳥 1 g 当たり 6,880 His⁺/プレートという強い変異原性を示したが、これは、アミノ酸や蛋白質などの pyrolysate などによるものと考えられる。ところが、たれをつけると、この画分の変異原性が 2,170 His⁺/プレートと低下し、かわって、中性画分の変異原性が TA98 株, (-) S9 で 600 から 3,100 に増加していた。この中に 1-NP が含まれているのではないかと予想して定量した。たれをつけない時は、少し焼き過ぎの 7 分後でも、焼鳥 1 g 当たり 1.4 ng の 1-NP しか生成されなかったが、たれをつけると 3, 5, 7 分間で、それぞれ 3.8, 19, 43 ng の 1-NP が生成された。電気コンロで焼いた時には、1-NP は検出されなかったため、たれがついた鳥肉を焼くことによって生じた pyrene が、都市ガスの燃焼によって生じた NO₂ によってニトロ化されて、1-NP が生じたものと考えられる。市販の他の二種類のたれを用いた時には、7 分間焼いても、1-NP はそれぞれ 1.2 または 2.7 ng しか生成されなかった。したがって、たれの種類、成分によって 1-NP 生成程度が異なるものと思われる。

6. 1-NP および 1,6-diNP による DNA 付加物の形成

[^3H]1-NP と [^3H]1,6-diNP とを HPLC によって精製し、それぞれ NRase I と NRase III とによって *in vitro* で DNA 付加物を形成させ

表 4. ラット諸臓器, 消化管内容物および腸管内常在細菌の 1-nitropyrene nitroreductase 活性

臓器または菌種	酵素活性 (生成 1-AP nmol/h/mg タンパク質)		NADPH/NADH
	NADPH	NADH	
脳	<0.01 (<0.002)	<0.01 (<0.004)	
肺 臓	0.11±0.03 (0.025)	0.16±0.01 (0.056)	0.69
心 臓	0.22±0.02 (0.051)	0.10±0.004 (0.035)	2.20
肝 臓	4.35±0.26 (1.000)	2.85±0.36 (1.000)	1.53
脾 臓	0.10±0.01 (0.023)	0.22±0.02 (0.077)	0.46
腎 臓	0.10±0.01 (0.023)	0.15±0.01 (0.053)	0.67
副 腎	0.42±0.03 (0.097)	0.28±0.02 (0.098)	1.50
精 巢	0.85±0.02 (0.195)	0.73±0.02 (0.256)	1.16
筋 肉	0.09±0.01 (0.021)	0.07±0.004 (0.025)	1.29
胃	0.04±0.01 (0.009)	0.05±0.005 (0.018)	0.80
小腸	0.75±0.07 (0.172)	0.39±0.01 (0.137)	1.92
小盲腸	2.38±0.21 (0.547)	1.18±0.18 (0.414)	2.02
大盲腸	0.80±0.18 (0.184)	0.70±0.07 (0.246)	1.14
大腸	1.38±0.06 (0.317)	1.37±0.02 (0.481)	1.01
血液	<0.01 (<0.002)	<0.01 (<0.004)	
血清	<0.01 (<0.002)	<0.01 (<0.004)	
肺胞マクロファージ	<0.03 (<0.007)	<0.03 (<0.011)	
胃内容物	<0.02 (<0.005)	<0.02 (<0.007)	
小腸内容物	1.16±0.16 (0.267)	1.06±0.10 (0.372)	1.09
盲腸内容物	4.79±0.34 (1.10)	4.32±0.28 (1.516)	1.11
大腸内容物	4.24±0.23 (0.975)	3.52±0.20 (1.235)	1.21
<i>Bacteroides fragilis</i>	7.62±0.27 (1.752)	6.09±0.20 (2.137)	1.26
<i>B. thetaiotaomicron</i>	7.62±0.07 (1.752)	7.30±0.18 (2.561)	1.04
<i>Eubacterium limosum</i>	6.01±0.33 (1.382)	5.45±0.59 (1.912)	1.10
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	7.03±0.15 (1.616)	6.90±0.23 (2.421)	1.02
<i>Escherichia coli</i>	0.73±0.14 (0.168)	0.60±0.05 (0.211)	1.22
Aroclor 処理ラットの肝臓	7.00±0.17 (1.609)	3.64±0.23 (1.277)	1.92

た(表3)。前者は一本鎖DNAによく結合したが、後者は一本鎖でも二本鎖でも同程度結合した。共に tRNA にも結合したが、NRase 無添加, または NADPH 無添加では結合しなかった。また, NRase の阻害剤である *p*-chloromercuribenzoic acid 添加では付加物形成が阻害された。NRaseI と III とを入れかえると付加物形成が阻害されることから, NRase はそれぞれ基質特異性を有していることが再確認された。

1-NP は poly(G), poly(dG) に, 1,6-diNP は poly(G), poly(X), poly(dG) によく結合した。1-NP の DNA 付加物を酵素で mononucleoside まで分解し, 生成物を HPLC で分析したところ, *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene と同じ保持時間のものと, 他に deoxyguanosine および deoxyadenosine 付加物が生じていた。

7. ラット諸臓器, 消化管内容物, および腸管内細菌の NRase 活性

1-NP は, 1-NP → 1-nitrosopyrene → *N*-hydroxy-1-AP → 1-AP と NRase によって還元され, ヒドロキシアミノ体が活性化された中間代謝産物と考えられている。Sprague-Dawley ラットの諸臓器, 腸内容物, および腸管内細菌の 1-NP 活性化酵素である NRase の比活性を, 表1の時とは違って窒素ガス存在下で測定した(表4)。各臓器を homogenize 後, 9,000×g, 10 分間遠心の上清画分の酵素活性を測定した。大気中で測定すると, 諸臓器の NRase 活性は, 細菌の場合より著しく低下した。補酵素としては NADPH を用いた方が高くなる場合が多かった。諸臓器の中では, 肝臓, 小腸, 大腸の比活性が高く, 肺癌と関係がある肺臓, 肺胞マクロファージや血液, 血清の活性

表 5. 1-nitropyrene および 1,6-dinitropyrene の皮下注射によるマウス発癌実験

投与化学物質	1回投与量 (mg/マウス)	総投与量 (mg/マウス)	有効マウス数	皮下腫瘍発 生動物数
DMSO (溶媒)			20	0
1-nitropyrene	0.1	2.0	20	0
1,6-dinitropyrene	0.1	2.0	20	10

は非常に低かった。消化管、特に盲腸および盲腸を除いた大腸の内容物の NRase の比活性が高かったが、これは内容物の菌数に比例していたので、腸内常在細菌の NRase 活性によるものと思われた。実際に、常在の嫌気性菌である *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Eubacterium limosum*, *Bifidobacterium adolescentis* の比活性は、肝臓の約 1.6 倍も高かった。腸内常在菌の中では 0.1% 以下しか存在していない好気性菌の一つである大腸菌では、嫌気性菌の 1/10 の活性であった。したがって、1-NP が大腸まできた場合には、直ちにこれらの嫌気性細菌の NRase によって活性化され、引き続いて還元されて変異原性の弱い 1-AP になるものと考えられる。

8. 通常および無菌ラットにおける経口投与 [³H] 1-NP の代謝

45日令の雄の Wistar 系通常および無菌ラットにオリーブオイルに懸濁した [³H] 1-NP 30 μmol (3.3 mCi/mmol) を胃ゾンデを用いて投与し、経時的に糞便と尿とを採取するとともに屠殺し、各臓器を摘出した。投与後 12, 24, 48 時間の各臓器の放射能分布を調べると、通常ラットの方が吸収が早く、糞便と尿の放射能では、やはり通常ラットで高く、排泄も早いことがわかった。48 時間で、通常ラットでは投与放射能の 84% 無菌ラットでは 53% が糞便および尿中に排泄された。各臓器の放射能分布では、肝臓、腎臓および消化器が高かった。

通常動物において、共有結合した各臓器の放射能活性を調べると、それらの値と、前述した S.D. ラットの各臓器の NRase 活性とは相関性がなかった。したがって、ラット体内での 1-NP 活性化には、臓器の NRase 以外の酵素が関与しているものと考えられる。

糞便および尿中の代謝産物を benzene-ethanol

で抽出し、HPLC で分画し吸光度、放射能および変異原性で調べると、明らかに通常ラットと無菌ラットとで違いが認められた。通常ラットの糞便中には、1-AP, 1-acetylamino-8-hydroxypyrene (1-AA-8-HP) および 1-AA-6-HP が出現し、尿中には、1-AA-6-HP と 1-AA-8-HP との抱合体が出現した。ところが、無菌ラットの糞便中には 1-AP の抱合体は全く出現せず、多い順に 1-nitro-3-hydroxypyrene (1-N-3-HP), 1-nitro-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene, 1-N-6-HP および 1-N-8-HP の抱合体を、尿中にも全く同じ代謝産物を見いだした。以上のことから、腸内常在の嫌気性菌がニトロ基の還元を、肝臓で水酸化、抱合体形成を行っており、アセチル化は、細菌か肝臓のどちらかが行っているものと考えた。胆汁中の代謝産物の同定を行っていないので、まだ正確な代謝経路は不明であるが、腸管内常在細菌が、1-NP の代謝に重要な役割を果たしていることは明らかである。

9. 精製した 1-NP および 1,6-diNP による発癌実験

6 週令の雄の BALB/c マウス 60 匹を、1 群 20 匹の 3 群に分けて使用した。純度 99.9% 以上まで精製した 1-NP および 1,6-diNP を dimethyl sulfoxide (DMSO) にとかして、各々 0.1 mg/回/週で 20 回、マウス 1 匹当たり合計 2 mg を背部肩甲骨部分に皮下注射し、対照群には、溶媒である DMSO を合計 4 ml 投与した。DMSO 投与群および 1-NP 投与群では、60 週間の観察で腫瘍は発生しなかった (表 5)。しかし、1,6-diNP 投与群では、112 日目に初めて腫瘍が観察され、その後 126, 202, 204, 245, 252, 259, 284, 301 および 315 日目に観察された。60 週間で 50% のマウス (20 匹中 10 匹) の注射局所に悪性線維性組織球腫が発生した (表 5)。また、すべて

の腫瘍は、少なくとも5世代移植可能で、同じ組織像であった。

今後の課題

多環芳香族炭化水素のニトロ化合物が、大気、自動車排ガス、カーボンブラック、フォトコピー、排水などに存在しており、その変異原性が非常に強いことが、1978年頃から明らかになり、注目されてきた。代表的芳香族ニトロ化合物であるNP類について、変異原性・発癌性について、また、生体内での代謝、特に腸管内常在細菌の関与の重要性について明らかにした。

糞便や尿中の代謝産物は明らかになったが、経口投与された1-NPの正確な代謝経路はまだ不明である。腸管内に入った1-NPはそのまま吸収されるのか、1-APに還元されてから吸収されるのか。この還元は腸管内だけで起きるのか。胆汁中にはnitrohydroxypyrene抱合体しか見つからないが、aminohydroxypyreneやacetylaminohydroxypyreneの抱合体は排泄されないのか。水酸化はN-アセチル化より先に起きるのか。アセチル化は、腸管内細菌で起こるのか、肝臓だけが行なうのか。 β -glucuronidase抵抗性の抱合体は何か。glutathione抱合体なのか。それらは、1-NP代謝全体でどのような役割を果たしているのか。さらに、1-NPより変異原性が100倍以上も強いdiNPの代謝はどうか。

NP類は、*in vitro*においてNRaseによってDNAのguanineに結合しN-(deoxyguanosin-8-yl)-1-APを形成する。1-NPによるサルモネラ菌の突然変異にはNRaseが必須である。しかし、ラットの肝臓における1-NPの活性化には、NRaseは働いておらず、むしろ酸化系の酵素によると思われる。それでは、この*in vitro*におけるDNA付加物形成には、1-NPのどの代謝産物が主役を演じているのか。付加物は何か。付加物形成の活性化経路はどのようなものなのか。

今回の発癌実験で、1,6-diNPに発癌性があることが明らかになったが、投与された局所に不溶物として1,6-diNPが残っていたので、実際に作用した量はより少なかったのではないと思われる。さらに少量での、しかも肺での発癌性を調べ

る必要がある。今回1-NPの皮下での発癌性は証明されなかったが、代謝実験で明らかになったnitrohydroxypyreneやacetylaminohydroxypyreneなどの代謝産物は発癌性はないのであろうか。最近、ディーゼル排出ガス中に変異原性が非常に強い1-nitro-3-acetorypyreneを発見したが、これも発癌性が強いのであろうか。

以上、沢山の課題が残っており、今後これらの問題を解決していきたいと考えている。

謝 辞

無菌動物の実験では、諸富正己、務台方彦両博士の、また代謝産物同定には、F.A. Beland博士のご協力をいただきました。

日産科学振興財団のご援助により、予想以上の仕事をする事ができました。初年度の研究助成金によってHPLCを入手したことがきっかけとなり、この3年間に次々と研究を発展させる事ができただけでなく、さらに新しい研究への基礎を築く事ができました。同財団に深甚の謝意を表す次第です。

発表論文

- 1) Kinouchi, T., Manabe, Y., Wakisaka, K., and Ohnishi, Y.: Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria. *Microbiol. Immunol.*, **26**, 993-1005 (1982).
- 2) Ohnishi, Y., Kinouchi, T., Manabe, Y., and Wakisaka, K.: Environmental aromatic nitro compounds and their bacterial detoxification. *In Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*, edited by M. D. Waters *et al.*, Plenum Publishing Corp., New York and London, pp. 527-539 (1983).
- 3) Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 596-604 (1983).
- 4) Nakashima, K., Yoshitsugu, K., and Tokiwa, H.: Scanning electron-microscopic and X-ray-microanalytic observation of diesel-emission particles associated with mutagenicity, *Mutation Res.*, **122**, 251-255 (1983).
- 5) Nakagawa, R., Kitamori, S., Horikawa, K., Nakashima, K., and Tokiwa, H.: Identification of dinitropyrenes in diesel-exhaust particles, Their probable presence as the major mutagens. *Mutation Res.*, **124**, 201-211 (1983).
- 6) Manabe, Y., Kinouchi, T., Wakisaka, K.,

- Tahara, I., and Ohnishi, Y.: Mutagenic 1-nitropyrene in wastewater from oil-water separating tanks of gasoline stations and in used crankcase oil, *Environ. Mutagenesis*, **6**, 669-681 (1984).
- 7) Tokiwa, H., Otofujii, T., Horikawa, K., Kitamori, S., Otsuka, H., Manabe, Y., Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: 1,6-Dinitropyrene: Mutagenicity in *Salmonella* and carcinogenicity in BALB/c mice., *J. Natl. Cancer Inst.*, **73**, 1359-1363 (1984).
- 8) Ohnishi, Y., Kinouchi, T., Manabe, Y., Tsutsui, H., Otsuka, H., Tokiwa, H., and Otofujii, T.: Nitro compounds in environmental mixtures and foods. In *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV*, edited by M. D. Waters *et al.*, Plenum Publishing Corp., New York and London, pp. 195-204 (1985).
- 9) Manabe, Y., Kinouchi, T., and Ohnishi, Y.: Identification and quantification of highly mutagenic nitroacetoxypyrenes and nitrohydroxypyrenes in diesel exhaust particles., *Mutation Res.*, in press (1985).
- 10) Kinouchi, T., Morotomi, M., Mutai, M., Fifer, E. K., Beland, F.A., and Ohnishi, Y.: Metabolism of 1-nitropyrene in germfree and conventional rats. in preparation.
- 11) 木内武美, 大西克成: *Bacteroides fragilis* の nitroreductase について—基質特異性及び DNA との結合作用—, 嫌気性菌感染症研究, **13**, 148-153 (1983).
- 12) 大西克成, 木内武美: ディーゼル排出ガスの変異原性. トキシコロジーフォーラム, **6**, 335-355 (1983).
- 13) 大西克成, 木内武美, 真鍋芳樹, 脇坂和美, 田原功, 秋本 茂: 給油所排水中の 1-ニトロピレン, 環境変異原研究, **5**, 54-58 (1983).
- 14) 木内武美, 大西克成: *Bacteroides fragilis* の nitroreductase による変異・癌原物質ニトロピレンの代謝活性化. 嫌気性菌感染症研究, **14**, 112-116 (1984).
- 15) 大西克成, 木内武美, 真鍋芳樹, 筒井英士: ニトロアレーンの重要性, 環境変異原研究, **6**, 29-37 (1984).
- 16) 木内武美, 大西克成: ニトロピレンの腸管内嫌気性菌による代謝, 環境変異原研究, **6**, 57-66 (1984).
- 17) 大西克成, 木内武美: 環境中におけるニトロピレンの存在およびその代謝, 代謝, **22**, 「癌 '85」 23-32 (1985).