

## 変異・癌原性物質の产生・代謝とその活性抑制に関する研究

大西 克成\*

徳島大学大学院医学研究科プロテオミクス医科学専攻生体制御医学講座分子細菌学分野  
〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

### Studies on production and metabolism of mutagenic and carcinogenic substances and inhibition of their activities

Yoshinari Ohnishi

Department of Molecular Bacteriology, Graduate School of Medicine,  
The University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan

#### Summary

Dr Bruce Ames developed a simple procedure for assaying bacterial mutation, i.e. the Ames test, using *Salmonella Typhimurium his*<sup>r</sup> mutant strains. We have used this procedure to measure mutagenicity of complex mixtures such as those in airborne particulates, automobile exhaust, small engine exhaust, wastewater, kerosene-heater exhaust and yakitori as well as nitroarenes in the mixtures, especially 1-nitropyrene (1-NP) and dinitropyrenes (diNPs). We measured the amounts of 1-NP and diNPs by a new procedure in which specific nitroreductases are used to convert NP to aminopyrene (AP) and the fluorescent AP is assayed efficiently and sensitively by high-pressure liquid chromatography. Metabolism of 1-NP in germ-free and conventional rats was elucidated: it appears that the liver is primarily responsible for ring hydroxylation and *N*-acetylation of 1-NP and for *O*-glucuronide conjugation, while intestinal bacteria play a dominant role in nitroreduction of 1-NP and its metabolites and in glucuronide cleavage. In addition, we showed that glutathione conjugates of 1-NP oxides produced in the liver were excreted into the bile and those in the upper intestine were metabolized to the corresponding cysteinylglycine and cysteine conjugates by  $\gamma$ -glutamyltransferase and aminopeptidase of pancreatic juice. The cysteine conjugates were then metabolized by  $\beta$ -lyase of the normal bacterial flora in the lower intestine to the reactivated metabolites and reabsorbed, partly producing DNA adducts in the intestinal mucosa. We observed in vivo formation of mutagens induced by intraperitoneal administration of pyrene in animals during exposure to nitrogen dioxide, and we concluded that 1-hydroxypyrene is nitrated in the body when the animal is exposed to NO<sub>2</sub> gas after hydroxylation of pyrene in the liver. We studied the carcinogenicity of 1,6-diNP, which is stronger than that of benzo[a]pyrene, the augmenting effect of a nonmutagenic fraction in soy sauce on mutagenicity of 3-diazotyramine produced in nitrite-treated soy sauce, the antimutagenicity and anticarcinogenicity of spices and medicinal plants, lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf), roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) and *Murdannia loriformis*, and the interaction among drugs, antibiotics and intestinal bacteria. We developed new bacteria that produce lycopene or human lactoferrin, which are chemopreventive substances.

**Keywords :** mutagens, 1-nitropyrene, intestinal bacteria, chemoprevention, antimutagenicity and anticarcinogenicity

\* E-mail : ohnishi@basic.med.tokushima-u.ac.jp

受付：2002年6月10日 受理：2002年6月10日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第30回大会において発表された2001年度学術賞受賞講演である。  
This paper is the lecture of the JEMS Award (2001) presented at the 30th JEMS annual meeting, 2001.

## 緒 言

Ames ら (1973 a,b) が *Salmonella Typhimurium his-* 株による高感度で代謝活性化を加えた変異原性試験の改良法を発表して以来、殺菌性物質が入っていないければ混合物でもその変異原性を細菌の His<sup>+</sup>復帰変異集落数で測定することが容易になった。しかも変異原性が強ければ化学的測定限界を超えて、変異原性物質の存在を証明できるようになった。我々はこのAmes 法を利用することによって環境中の混合物の変異原性を測定し、その中のニトロ化合物の変異原性を測定し、新しい化学的測定法を開発して含有量を明らかにした。1-nitropyrene (1-NP, CAS : 5522-43-0) をモデル化合物としてその生体内代謝経路を明らかにした。特に、1-NP oxides の glutathione 抱合体は臍液中の  $\gamma$ -glutamyltransferase と aminopeptidase によってラット小腸内で分解され、生じた cysteine 抱合体は大腸内の腸内菌によって分解されてチオール化合物になることを明らかにした。自動車排ガスや石油ストーブ中の NO<sub>2</sub>によって多環芳香族炭化水素 (PAH) がニトロ化されることを追試し、さらに生体内でも NO<sub>2</sub>暴露によって pyrene (CAS: 198-55-0) がニトロ化を受ける機序を明らかにした。また、1,6-dinitropyrene (1,6-diNP, CAS: 42397-64-8) の発癌性は benzo [a]pyrene (CAS: 50-32-8) より強いことを示した。食品に関しては醤油の亜硝酸処理後の変異原性について、ethanol やいろいろな食品との相互作用について、さらに香辛料や医薬用植物の抗変異・抗発癌作用について調べた。また、癌治療薬の副作用と腸内菌の関係についての研究も行った。腸内菌の大腸発癌促進と抑制作用を調べ、最近では抗発癌作用をもつ生理活性物質を産生する腸内菌を作製して、癌の化学予防を試みている。過去27年間に多くの共同研究者とともに以上のようなことを研究してきたのでその要点について述べる。

### 1. ニトロアレーンの検出と定量

大気中の浮遊粒子状物質をハイボリュームサンプラーでガラス纖維濾紙上に集め、methanol でソックスレー抽出を行い、S9画分を加えてネズミチフス菌 TA98 株を使った Ames 法で変異原性を測定すると、大気 1m<sup>3</sup>当たり工場地帯 (1974-75 年の大牟田市) で 22-445 His<sup>+</sup> revertants/m<sup>3</sup>、都市・住宅地帯 (福岡市) で 7-78 His<sup>+</sup> revertant/m<sup>3</sup> の変異原性を示した (Tokiwa et al., 1977)。中に含まれる化学物質として benzo[e]pyrene (CAS: 192-97-2), chrysene (CAS: 218-01-9), fluoranthene (CAS: 206-44-0), benzo[ghi]perylene (CAS: 191-24-2), benz[a]anthracene (CAS: 56-55-3), benzo[a]pyrene, pyrene (CAS: 129-00-0), coronene (CAS: 191-07-1), perylene (CAS: 198-55-0) などの polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) 以外に S9(-) で測定される直接変

異原物質もあることを明らかにした (Tokiwa et al., 1980)。また、自動車排ガス中の粒子状物質の変異原性を Ames 法で測定し、ガソリンエンジンの乗用車の排ガス 1m<sup>3</sup>当たり TA98 株 S9(+) で 500 revertants, TA100 株 S9(+) で 960 revertants を示したが、ディーゼルエンジンバスの排ガスではそれぞれ 19,600, 5,780 revertants/m<sup>3</sup> を、ディーゼルエンジントラックでは 9,140, 3,780 revertants/m<sup>3</sup> を示した (Ohnishi et al., 1980; Ohnishi, 1988)。さらに、発電気用の小型ガソリンエンジンで 1000W 発電させると排出粒子状物質の変異原性は TA98 株 S9(+) で 20,500 His<sup>+</sup> revertants/plate/m<sup>3</sup> を示した (Ohnishi et al., 1982)。これらの大気やエンジン排出粒子状物質を抽出分画すると中性画分に S9 画分による代謝活性化を必要としない直接変異原性を認め、ニトロ化合物の存在が推定された。その中の高変異原性物質である 1-NP と 1,6-diNP (Tokiwa et al., 1981b) の定量法を確立するために、まず、腸管内に常在する嫌気性細菌である *Bacteroides fragilis* の 4 種のニトロ還元酵素 nitroreductase (NRase) を精製した (Kinouchi et al., 1982; Kinouchi and Ohnishi, 1983)。それぞれ基質特異性が異なっており、NRase I は 1-NP を還元して蛍光性の 1-aminopyrene (1-AP, CAS: 1606-67-3) に、NRase III は 1,6-diNP を 1,6-diAP に変換した。高速液体クロマトグラフィーでこれらのアミノ体を高感度に定量する方法を確立した (Kinouchi and Ohnishi, 1983; Manabe et al., 1984; Manabe et al., 1985)。1-NP と 1,6-diNP の検出感度は、それぞれ  $1.1 \times 10^{-2}$  と  $1.3 \times 10^{-2}$  pmol であった (Manabe et al., 1984; 大西, 1985)。

Ames 法とアミノ体で高感度に定量する方法によって、ディーゼルトラック排ガス (Manabe et al., 1985), ディーゼル小型エンジン排ガス (Ohnishi et al., 1982; 大西と木内, 1983), ディーゼルエンジン内燃焼ガス (大西と木内, 1983; Hayano et al., 1985), 石油ストーブ燃焼中の室内空気 (Ohnishi et al., 1985; Kinouchi et al., 1988), 給油所排水 (Ohnishi et al., 1983; Manabe et al., 1984), 使用済みエンジンオイル (Manabe et al., 1984), さらに食品である焼き魚、焼肉、焼き鳥の変異原性を測定し、NP 類の定量を行った (Ohnishi et al., 1985; Kinouchi et al., 1986a; Ohnishi et al., 1986a)。そして 1-NP が多い試料には diNP 類が含まれており、変異原性に占める割合も大きいことを明らかにした (大西, 1985)。

### 2. 1-NP の生体内代謝

*Bacteroides fragilis* から精製した NRase I と NRase III は in vitro でそれぞれ 1-NP と 1,6-diNP を代謝活性化して DNA, RNA, poly(G), poly(dG) に結合させ付加体を形成した。1-NP の DNA 付加体の酵素的分解産物の主要産物は N(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene であり、哺乳動物の NRase である xanthine oxidase によって形成される

付加体と同じであった。SD ラットの各臓器と腸管内容物の NRase 活性を測定すると、肝臓、小腸、および腸管内容物で高かった。腸管内容物ではその菌数に比例し、特に嫌気性菌数に依存していた (Kinouchi and Ohnishi, 1986)。

次に、1-NP の生体内代謝を明らかにするために、無菌ラットと通常ラットを使用して、<sup>[3]H</sup>1-NP を経口投与後、各臓器の放射能と尿や糞便中の代謝産物を分析した。無菌ラット糞便中の主たる代謝産物は、3-nitropyrenol > 1-NP > 4,5-dihydroxy-4,5-dihydro-1-NP > 6-nitropyrenol > 8-nitropyrenol の順に少なかった。無菌ラット尿中には 1-NP を除いた同様の化合物の glucuronide 抱合体が証明された。通常ラットではニトロ還元反応とアセチル化反応が起こっており、糞便中の代謝産物は 1-NP > 1-aminopyrene > 8-acetylaminopyrenol > 6-acetylaminopyrenol > 3-acetylaminopyrenol であった。尿中の主たる代謝産物は 6-と 8-acetylaminopyrenol の glucuronide 抱合体であった。通常ラットの胆汁中の抱合体を分析すると、4,5-dihydroxy-4,5-dihydro-1-NP、3-, 6-, および 8-nitropyrenol の glucuronide 抱合体であったが、時間がたつと 6-と 8-aminopyrenol、および 6-と 8-acetylaminopyrenol の glucuronide 抱合体が増加した。また、 $\beta$ -glucuronidase に反応しない硫酸抱合体や glutathione 抱合体の存在も推定された。以上の結果から、NRase はあるにも関わらずニトロ還元反応は肝臓では行われず、腸管内細菌によることが明らかになった。また、通常ラットの胆汁中の代謝産物の解析から、肝臓ではピレン環の水酸化反応、N-アセチル化反応、および抱合反応が起こり、腸管内常在細菌ではニトロ還元反応と脱抱合反応とが起こることを明らかにし、1-NP、主として glucuronide 抱合体のラット生体内代謝経路を推定した (Kinouchi et al., 1986b; Ohnishi et al., 1986b)。

### 3. 腸内菌による 1-NP の代謝と第3相反応

肝臓での第1、2相反応に対して、胆汁中に排出された変異原代謝産物の腸管内での主として腸内菌による反応を第3相反応と呼んでいる。この腸内菌の役割を明らかにするために通常の SPF (specific pathogen-free) マウスに比べて腸内生菌数を 0 に近づけるための抗生物質処理法を確立した。bacitracin, neomycin sulfate, streptomycin sulfate の 3 剤を 1 日 2 回 5 日間胃内強制投与すると生菌数が減少するだけでなく、腸内容物中の腸内菌由來の cysteine conjugate  $\beta$ -lyase,  $\beta$ -glucuronidase, nitroreductase 活性が減少した。それに対して、脾液由來の  $\gamma$ -glutamyltransferase や aminopeptidase 活性は減少しなかった。さらに、glucose の腸管からの吸収や肝臓の酵素活性には影響が無かった (Kinouchi et al., 1993)。<sup>[3]H</sup>1-NP をラットに経口投与後 48 時間の胆汁中の代謝産物の 21.4 % は 4,5-epoxy-4,5-dihydro-1-nitropyrene (1-

NP 4,5-oxide) と 1-NP 9,10-oxide の glutathione, cysteinylglycine、および cysteine 抱合体であり、1-NP 4,5-oxide と 1-NP 9,10-oxide との glutathione 抱合体はそれぞれ 2.6 % と 10.4 % であった。胆汁中に排出された 1-NP 4,5-oxide と 1-NP 9,10-oxide の glutathione 抱合体が小腸内において脾液中の  $\gamma$ -glutamyltransferase と aminopeptidase (Ohnishi et al., 1990) によって分解されて cysteine 抱合体となり、さらに大腸内で腸内菌、特に *Peptostreptococcus magnus* と *Eubacterium limosum* の cysteine conjugate  $\beta$ -lyase によって分解されて、再吸収されたり、活性化されて腸管粘膜内で DNA 付加体を形成することを明らかにした (Kinouchi et al., 1990; Kinouchi et al., 1992; Kinouchi et al., 1993; Kataoka et al., 1995)。また、1-NP の代謝産物としてアセチル化体が出現するが、アセチル化には腸内菌はほとんど関与せず肝臓で起こることを示した (Kinouchi et al., 1987)。

1-NP のリスクを動物実験の結果からヒトに外挿するために、肝臓での 1-NP の酸化的活性化と不活性化のヒトと 5 種の動物における差を *in vitro* で調べた。ヒトの 1-NP oxides 生成活性は ICR マウスに似て低く、1-NP 4,5-oxide の epoxide hydrolase による加水分解はヒトで最大であった。1-NP 4,5-oxide からのグルタチオン抱合体生成活性は 9,10-oxide からより高かったが、ヒトとイヌでは極端に低かった。このようにヒトの 1-NP の代謝経路の酵素活性と同じ動物はおらず、種差があることを明らかにした (Kataoka et al., 1991; Ohnishi et al., 1991)。

さらに、腹腔内に 1-NP を投与した脾管胆道合流異常のモデル犬では、解毒抱合体に脾液中の  $\gamma$ -glutamyltransferase や aminopeptidase と感染細菌の sulfatase が作用して、抱合体の再活性化が胆道内で起こっていることを示し、脾管胆道合流異常症のヒトでの胆道癌の発生率が高い原因の一つを示唆した (Dong et al., 1993)。

### 4. diNP の発癌性

1-NP と 1,6-diNP を精製して各 0.1 mg を週 1 回 20 週間雄 BALB/c マウスの皮下に投与し、45 週後に観察したところ、1-NP 投与群では腫瘍は発生しなかったが、1,6-diNP 投与群では 20 匹中 10 匹に投与部位に悪性線維性組織球腫が生じた (Tokiwa et al., 1984; Tokiwa and Ohnishi, 1986)。雄 F344/DuCrj ラットの左肺に 1.5 mg 1-NP, 0.15 mg 1,6-diNP、または 0.5 mg 3-methylcholanthrene (MCA, CAS: 56-49-5) を含む beeswax-tricaprylin を注入し、72 週後に観察すると、1,6-diNP 投与群では 28 匹中 21 匹 (75%) に扁平上皮癌、2 匹 (7%) に未分化癌、2 匹 (7%) に扁平上皮化生が生じていたが、1-NP 投与群では 32 匹すべて癌も扁平上皮化生も誘発されていなかった。MCA 投与群 19 匹では、1,6-diNP 投与群より早く 100% 扁平上皮癌が誘発された (Maeda et al., 1986)。さらに、用量依存性を調べるために 0.003, 0.01,

0.03, 0.1, 0.15 mg の 1,6-diNP を肺内に投与したところそれぞれ 0/39 (0%), 4/30 (13%), 13/31 (42%), 22/26 (85%), 6/9 (67%) に未分化癌が、0.03, 0.1, 0.3, 1.0 mg の benzo[*a*]pyrene 投与で 1/29 (3%), 7/30 (23%), 22/29 (76%), 9/13 (69%) に扁平上皮癌が用量依存的に誘発されており、同じ用量では benzo[*a*]pyrene より 1,6-diNP の方が発生頻度が有意に高かった (Iwagawa et al., 1989).

## 5. NO<sub>2</sub>暴露によるニトロ化反応

大気中で PAH を NO<sub>2</sub>ガスに暴露すると直接変異原性のニトロ体が生じることを明らかにしていた (Pitts et al., 1978; Tokiwa et al., 1981a) が、20 ppm の NO<sub>2</sub>ガスに暴露している雄 ICR マウスの腹腔内に 800 mg/kg 体重の pyrene を投与し、さらに 24 時間 NO<sub>2</sub>ガスに暴露したところ、生体内でニトロ化反応が起り、 $\beta$ -glucuronidase 处理した尿中に変異原性の 1-NP の水酸化体である 3-hydroxy-1-NP, 6-hydroxy-1-NP, 8-hydroxy-1-NP、および 1-hydroxypyrene を検出した (Kanoh et al., 1987)。また、1-hydroxypyrene 投与の場合にも NO<sub>2</sub>暴露で同様のニトロ化合物を証明した (Kanoh et al., 1990)。400 mg/kg 体重の 5 種類の PAH (pyrene, fluoranthene, fluorene, anthracene, chrysene) をそれぞれ腹腔内に投与した ICR マウス、pyrene、または fluoranthene を投与した Wistar ラット、Syrian golden ハムスター、Hartley モルモットをそれぞれ 20 ppm の NO<sub>2</sub>ガスに暴露し、尿中のグルクロン酸および硫酸抱合体を分析した。脱抱合後の pyrene、または fluoranthene を投与した NO<sub>2</sub>暴露のマウスとハムスターの尿の変異原性はネズミチフス菌 TA98 株と TA100 株に対して非常に高かったが、ラットとモルモットではそれほど高くなかった。5 種類の PAH を混合して与えると NO<sub>2</sub>暴露マウス尿の変異原性は 1.5 倍に増加した。NRase 欠損変異株 TA98NR や acetyltransferase 欠損変異株 TA98/1,8-DNP<sub>6</sub> に対しては変異原性が減少した (Ohnishi et al., 1990; Miyanishi et al., 1996)。

生体内でのニトロ化の機序を明らかにするために、10  $\mu$ g/ml の pyrene、または 1-hydroxypyrene を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、または dichloro-methane 溶液に NO<sub>2</sub>ガスを吹き込んだところ、pyrene は両溶液で NO<sub>2</sub>によってニトロ化されず、1-hydroxypyrene は Tris-HCl 緩衝液中で NO<sub>2</sub>によってニトロ化されたが、有機溶媒中ではニトロ化されなかった。ascorbic acid や  $\alpha$ -tocopherol を加えると 1-hydroxypyrene の水溶液中での NO<sub>2</sub>によるニトロ化反応が阻害された。さらに、ascorbic acid や  $\alpha$ -tocopherol を経口投与したマウスでは pyrene と NO<sub>2</sub>によるニトロ化反応が阻害された。これらの結果から、1-NP は肝臓で水酸化を受けてから、イオン反応で 1-hydroxypyrene がニトロ化されるという機序を明らかにした (Kinouchi et al., 1994; Miyanishi et al., 1996)。

## 6. 亜硝酸処理醤油の変異原性

Nitrate 摂取量と胃癌死亡率は正の相関を示す (Hartman, 1983)。nitrate は口腔内や腸管内で nitrite に還元され、食品中の amines や amides と容易に反応して発癌性の *N*-nitroso 化合物を生成する (Magee et al., 1967)。Wakabayashi et al. (1983) は亜硝酸処理した日本の食品中で醤油が最も高い変異原性を示すこと、および 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (MTCCA) が亜硝酸処理醤油中に生じる変異原の前駆体であることを報告した。また、醤油中の tyramine は亜硝酸処理で強力な変異原になり (Ochiai et al., 1984)，その産物 3-diazotyramine はラット口腔内に扁平上皮癌を誘発することが報告された (Fujita et al., 1987)。そこで共同研究者の Higashimoto et al. (1988) は 25 種類の日本の醤油について 5% の濃度で 50 mM sodium nitrite (pH 2) と 37°C, 1 時間保温したところ、その反応液は TA100 株 S9(-) で 368 ± 228 (34-834) revertants/ $\mu$ l 醤油の変異原性を示すことを報告した。生じた変異原は光に対して不安定であり、黄色灯ないし暗所で安定であった。醤油中の変異原前駆体としては既知の tyramine や MTCCA の他に変異原性が弱い 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline (MTC) が証明された。ところが、これら 3 種類の成分の亜硝酸処理後の変異原性の合計は亜硝酸処理醤油の変異原性の一部しか証明できなかった。さらに分析を進めて、醤油中には亜硝酸処理 tyramine すなわち 3-diazotyramine の変異原性を 9 倍に増強する因子が含まれていることを示した。したがって、tyramine が亜硝酸処理醤油中に產生される変異原の主たる前駆体であり、上記 3 前駆体と 3-diazotyramine の変異原性の増強因子とで亜硝酸処理醤油の全変異原性を説明することができることを明らかにした。この変異原性増強因子は非変異原性であり、亜硝酸処理前後で熱にも光にも安定であった (Higashimoto et al., 1988)。

醤油を 1.25-10% ethanol 存在下で亜硝酸処理した場合には ethanol の濃度に比例して、生じる変異原性が減少した。ethanol の代わりに市販のアルコール飲料である日本酒、ワイン、焼酎、ウイスキー、ブランディーが有効であったが、ビールは効かなかった。醤油成分の tyramine を ethanol, *n*-propanol、または isopropanol 存在下で亜硝酸処理すると変異原性が減少したが、methanol 存在下が最も強く減少した。しかし、glucose や sucrose などの糖存在下では変異原性が 2 倍増強した。この亜硝酸処理 tyramine の変異原性の減少には、tyramine を亜硝酸と ethanol とで同時処理することが必要であった。この減少は tyramine からの変異原性 3-diazotyramine の生成が減少した結果であることを明らかにした (Higashimoto et al., 1995)。

一方、醤油成分の MTCCA を 7.5% ethanol 存在下で

37°C, 60分間, pH 3で50 mM 亜硝酸処理すると, 変異原性がethanol非存在下より強く増加した。この変異原性増強効果はMTCCAを亜硝酸とethanolとで同時処理することが必要であり, methanol, *n*-propanol, isopropanolも増強効果があったが, glucoseやsucroseは無効であった。また, 日本酒と焼酎は強い増強効果があり, ワイン, ウイスキー, ブランディー, ビールにも増強効果があった(Higashimoto et al., 1996)。MTCCAのethanol存在下で亜硝酸処理のときにさらにスダチ(*Citrus sudachi* Shirai), レモン(*C. limon* Burm.), ユズ(*C. junos* Tanaka)などの柑橘類を反応液に入れると生じる変異原性が減少した。特に, 果汁の部分より外皮の部分の方が変異原性減少効果が強かった。このときの柑橘類中の抗変異原性物質としてはlignin, pectin, D-limonene, naringin, hesperidin, ascorbic acid, citric acidが示唆された(Higashimoto et al., 1998)。柑橘類の代わりに緑茶, 紅茶, ウーロン茶の熱湯抽出液, さらにハーブ茶(バナバ, テンチャ, カキノハ, カキドオシ, ヨモギ, トチュウ, センナ)やハーブ抽出液(ジオウ, トウキ, オウバク)を加えても変異原性は減少した。その抗変異原性の有効成分としてカテキン類が考えられた。これらのお茶やカテキン類の抗変異原性はこれらの物質の還元力と正の相関を示した(Higashimoto et al., 2000; Higashimoto et al., 2001)。

## 7. 抗癌剤や発癌予防薬使用時の副作用

1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-5-(E)-(2-bromovinyl)uracil(sorivudine)は抗ヘルペスウイルス剤として開発され, varicella-zoster virusとherpes simplex virus type 1に対して非常に有効であった(Machida et al., 1981; Machida and Sakata, 1984; Machida, 1986)。sorivudineは1993年に日本で抗ウイルス経口薬として認可されたが, fluorouracil系抗癌剤である5-fluorouracil(5-FU)やTegafurで治療していた癌患者に上記のウイルス感染が発症し, sorivudineを併用して副作用として血液疾患がおこり, 5-FUによる骨髄抑制がひどい15人の患者が死に至ったために使用禁止となった(Swinbanks, 1994)。sorivudineが(E)-5-(2-bromovinyl)uracil(BVU)に分解され, BVUが肝臓において5-FUの分解酵素であるdihydropyrimidine dehydrogenaseを不可逆的に阻害して, 5-FUの血中濃度を異常に上昇させて副作用を引き起こすと考えられていた(Desgranges et al., 1986)。そこで我々はsorivudineがどこでBVUに分解されるのかを知るために, その分解酵素pyrimidine nucleoside phosphorylase(PyNPase)活性の分布をSprague-Dawley雄ラットで調べた。肝臓, 腎臓, 胃, 盲腸, 大腸, および胃内容物と小腸内容物の酵素活性は低いか検出されなかつたが, 盲腸内容物と大腸内容物の酵素活性が非常に高いことがわかつた。このことは腸内菌叢が重要な役割をしているこ

とを示唆しているので, 15菌種23株の好気性細菌, 16菌種16株の嫌気性細菌, 1真菌, 合計32菌種40株の粗抽出液のPyNPase活性を測定したところ, 腸内最優勢菌である*Bacteroides*属の*B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*がsorivudineをBVUに分解する高い活性を保有していることがわかつた。ラットに100  $\mu$ mol/kgのsorivudineを投与すると血清中のBVU濃度は8時間後に最高になり, 血清中濃度AUC(area under the curve)は101  $\mu$ M  $\times$  hで, 半減期は約4.2時間であった。in vivoでの腸内菌叢によるBVU産生を調べるために, 3日間抗生物質を投与したラットにsorivudineを投与して血清中のBVUを測定した。好気性菌と嫌気性菌に有効なampicillin, またはbacitracin, neomycin, streptomycinの3剤混合液を前投与したラットにsorivudineを投与すると, 少量のBVUしか血清中に検出されなかつた。また, 嫌気性菌の数を減少させるmetronidazoleで前処理すると血清中のBVU濃度は同様に低かつた。このことはin vivoにおいても, 腸内菌叢の優勢菌である嫌気性菌がBVUを産生していることを示唆している。ところが, 好気性菌に作用するkanamycinで前処理すると血清中のBVU濃度は約3倍に増加し, BVUの半減期も3倍以上に増加した(Nakayama et al., 1997)。このことは5-FUとsorivudine, さらに抗生物質が加わった薬物相互作用によって5-FUの副作用が出現した可能性を示唆している(大西, 1997)。

非ステロイド系抗炎症剤 nonsteroidal antiinflammatory drugs(NSAID)は抗炎症・鎮痛剤として使われるだけでなく, 家族性大腸腺腫症の患者に対して化学予防薬・治療薬として使用される(Marnett, 1992; Weiss and Forman, 1996)。しかし, ヒトに対しては使用者の15%に胃潰瘍, 8.4%に小腸潰瘍を誘発し(Allison et al., 1992), ラットには回腸潰瘍を形成する。NSAIDの一種5-bromo-2-(4-fluorophenyl)-3-(4-methylsulfonylphenyl)thiophene(BFMeT)を使ってラット回腸潰瘍形成と抑制の機序を明らかにした(Uejima et al., 1996; Kinouchi et al., 1998; Shan et al., 1998)。SPFのWistarラットに500-1500 mg/kgのBFMeTを1回胃内投与すると72時間後に28匹中20匹(71%)に回腸潰瘍が形成されたが, 腸内生菌数を抑えるためにbacitracin, neomycin sulfate, streptomycin sulfateの3剤を毎日投与したときには, 26匹中1匹しか潰瘍は形成されなかつた。無菌ラット(10匹)や*Bifidobacterium adolescentis* ATCC15703株のノトバイオートラット(5匹), *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356株のノトバイオートラット(5匹)にBFMeTを投与しても回腸潰瘍は形成されなかつた。ところが, *Eubacterium limosum* ATCC8480株や*Escherichia coli* K12株(その中のW3110株)のノトバイオートラットにBFMeTを投与すると潰瘍が形成された。もちろん,

これらのノトバイオートラットを抗生物質3剤で処理しておくと潰瘍は形成されなかった。これらのこととは、BFMeTによる回腸潰瘍形成に関与している腸内菌と関与しない腸内菌があることを示している。SPFラットで回腸潰瘍が形成されているときには、回腸の優勢菌である *Lactobacillus* が相対的に減少し、グラム陽性菌は 97.4% から 56.4% に減少し、*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacteroides* が増加して、これらのグラム陰性桿菌は回腸内容物の総菌数の 1.2% から 37.3% まで増加した。BFMeTによる回腸潰瘍形成は上記の *Lactobacillus* や *Bifidobacterium* の一夜培養液、または *Bifidobacterium breve* と *Streptococcus thermophilus* を含むヨーグルトを投与すると減少した (Uejima et al., 1996)。*L. acidophilus* や *B. adolescentis* の培養上清を飲料水として与えても潰瘍形成を抑制し、回腸粘膜の過酸化脂質形成を抑制した (Kinouchi et al., 1998)。ascorbic acid, dimethyl sulfoxide, glutathione,  $\beta$ -carotene が潰瘍形成を抑えたので、脂質過酸化の重要性を指摘し、粘膜障害の機序を明らかにした (Shan et al., 1998)。

## 8. 香辛料や薬用植物の抗変異・抗発癌作用

caraway, coriander, black pepperなどの香辛料の熱水抽出液は、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, dimethylnitrosamine, ICR-170 の変異原性を減少した。しかし、black pepperの熱水抽出液や methanol 抽出液を亜硝酸処理するとネズミチフス菌 TA100 株に対して強い変異原性が出現した (Higashimoto et al., 1993)。タイ王国の薬用植物で食品でもある lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) の 80% エタノール抽出液は抗変異原性であるが、ラット大腸における azoxymethane (AOM) 誘発 DNA 付加体  $O^6$ -methylguanine 形成と前癌病変である aberrant crypt foci (ACF) 形成を発癌初期過程と post-initiation 過程において抑制した。特に、post-initiation 過程において、腫瘍形成と相關している focus 当たり 4 個以上の aberrant crypt をもつ大きな ACF 形成を抑制した (Suaeyun et al., 1997)。さらに、 $\beta$ -glucuronidase を阻害し、抗酸化活性をもっていることを明らかにした。これらのこととは lemon grass 抽出液がラット大腸において glucuronide 抱合体から活性化した aglycon である methylazoxymethanol の放出を阻害し、DNA 付加体形成と ACF 形成を減少させることを示唆している (Suaeyun et al., 1997)。同じくタイ王国の薬用植物である roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) および *Murdannia loriformis* の 80% エタノール抽出液は、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) などのヘテロサイクリックアミンの変異原性を減少させ、AOM 誘発 ACF 形成を発癌初期過程で抑制した (Chewonarin et al., 1999; Chiampanichayakul et al., 2001; Intiyot et al.,

2002)。roselle は PhIP の ACF 形成も抑制した (Chewonarin et al., 1999)。これらの薬用植物の抽出物、および含有成分である citral, geraniol,  $\beta$ -myrcene が大腸発癌の化学予防に使用可能であることを示唆した (Ohnishi et al., 1998)。

## 9. 新機能獲得腸内菌による 大腸発癌初期過程の抑制

腸内菌は (1) 発癌物質の生成、(2) 脱抱合による再活性化、(3) 発癌物質の吸着、(4) 二次胆汁酸の生成、(5) 細胞増殖の調節、(6) 免疫系の賦活などで大腸発癌に影響を与えていているといわれている。たとえば、bacitracin, neomycin sulfate, streptomycin sulfate の 3 剤混合液を前投与したラットの生きた腸内菌数は 0.01% 以下に減少しているが、このラットに大腸発癌物質である 1,2-dimethylhydrazine を投与すると、生じる ACF 数は、抗生物質を投与していない通常ラットに生じる ACF 数の 22.6% であった (木内ら, 1995)。このことからも腸内菌が大腸発癌の初期過程に影響を与えていることがわかる。

数種の腸内菌の培養液または培養上清が AOM 投与 Sprague-Dawley ラットの大腸粘膜 ACF 形成に与える影響を調べ、*Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 株と *Clostridium perfringens* GAI0668 株が ACF 形成を抑制し、前者の培養上清による ACF 形成抑制は、発癌に関係がある DNA 付加体  $O^6$ -methylguanine の半減期が短くなるのが原因であることを明らかにした (Arimochi et al., 1997)。

大腸癌を促進する腸内菌の遺伝子を潰し、その菌株を野生株と入れ替えて定着させれば、ある程度発癌を押さえることができるものと考えられる。その遺伝子の一つとして、発癌物質の代謝産物のグルクロロン酸抱合体を脱抱合する  $\beta$ -glucuronidase の遺伝子が考えられる。AOM 誘発 ACF 数は、 $\beta$ -glucuronidase 欠損大腸菌培養液投与では減少しなかったが、ACF 数は糞便の  $\beta$ -glucuronidase 活性と正の相関を示した (Arimochi et al., 1999)。大腸内の大腸菌数は少ないが、 $\beta$ -glucuronidase 活性は強いので、大腸の大腸菌をすべて  $\beta$ -glucuronidase 欠損大腸菌と交換できればある程度大腸発癌を予防できるかも知れない。

大腸発癌の予防として発癌の化学予防物質を産生する腸内菌を定着させる方法がある。大腸菌が属する腸内細菌科の菌種 *Erwinia uredovora* の lycopene 生合成遺伝子 *crtE*, *crtB*, および *crtI* を組み込んだプラスミド (Misawa et al., 1990; Misawa and Shimada, 1998) 保有の lycopene 产生大腸菌細胞浮遊液 (lycopene 濃度 97.7 ng/ml) を投与すると、AOM 誘発 ACF 数が減少した。lycopene はトマトの赤い色素であるので、トマトが沢山入った野菜ジュース (lycopene 濃度 51,300 ng/ml 大腸菌細胞浮遊液の

525倍) を経口投与しても同じ程度にAOM誘発ACF数を抑制した。糞便中のlycopene濃度はlycopene産生大腸菌細胞浮遊液投与群では177 ng/g fecesであり、野菜ジュース投与群では10,300 ng/g fecesで前者の58倍で、このことを勘案すると、lycopene産生腸内菌投与は効果的に大腸発癌を予防できる可能性を示唆した (Arimochi et al., 1999)。

さらに、新機能獲得腸内菌を作るために、ヒトlactoferrinのcDNAを大腸菌と*Bacteroides uniformis*のシャトルベクタープラスミドpVAL-1 (Valentine et al., 1988)にクローニングしてプラスミドpVLFKを作成し、接合伝達で腸内常在菌の最優勢菌種の一つである*Bacteroides uniformis*のBU1001株 (Shoemaker et al., 1986)に入れてTCTK101株とした。ベクタープラスミドpVAL-1保有*B. uniformis*であるTCTK11株の培養液をラットに投与すると、水投与群よりもAOM誘発ACF数と4個以上のaberrant cryptをもつ大きなACF数を増加させた。しかし、ヒトlactoferrin産生菌であるTCTK101株の培養液投与群では発癌初期過程におけるACF数がTCTK11株の培養液投与群よりも有意に減少した。このことは腸内菌が産生するヒトlactoferrinがラット大腸のACF形成を抑制することを示唆している (Chewonarin et al., 2001)。

## 結 語

以上、主としてnitroareneの研究と癌予防のための研究を行い、腸内常在菌との関係やその利用を考えてきた。我々がlycopene産生腸内菌の大腸癌予防の可能性の論文 (Arimochi et al., 1999) を発表した翌年の2000年1月のScienceに同じcarotenoidでありvitamin Aの前駆体である $\beta$ -caroteneの産生米“golden rice”的論文 (Ye et al., 2000) が発表された。これはvitamin A不足のために約25万人の東南アジアの子供達が毎年失明しているために開発されたものであり、関連する多くの特許が他の企業から放棄されることによって実用化されようとしているものである。したがって、新機能獲得腸内菌としての栄養素産生腸内菌も今後は利用されるようになるものと考えられる。また、interleukin-10分泌性の*Lactococcus lactis*をヒトの炎症性腸疾患であるクローン病や潰瘍性大腸炎の治療に使える可能性が示された (Steidler et al., 2000)。さらに、2001年になると、Vogelsteinらがlethal toxinを持たない偏性嫌気性菌*Clostridium novyi*と通常の抗癌剤を併用することによってcombination bacteriolytic therapy (COBALT)を開発して治験に持って行こうとしている (Dang et al., 2001)。また、*Klebsiella pneumoniae*が産生するmicrocin E492が一部のhuman cell lineでapoptosisを誘発することが示されている (Hetz et al., 2002)。このように新機能獲得腸内菌やある種の細菌が癌予防・治療に応用されようとしており、この分野の研究にこれからも貢献して行きたいと考えている。

## 謝 辞

参考文献に引用しました論文の共同研究者、特に筆頭研究者には御協力を感謝申し上げます。なかでも、環境変異原の研究を開始した当初からの共同研究者であり、今回の学術賞の受賞候補者に推薦して下さいました常盤寛博士、長年に渡っての共同研究者でありました故木内武美助教授、片岡佳子博士はじめ現教室員の方々に深謝いたします。また、本学会の初代会長の田島弥太郎先生、第二代会長の杉村隆先生、その後の歴代の会長であられた賀田恒夫先生、松島泰次郎先生、早津彦哉先生、祖父尼俊雄先生、木苗直秀先生、林真先生、さらに、本学会会員の皆様には、いろいろな形で御援助をいただきました。心から感謝申し上げる次第です。多くのタイからの留学生を引き受けるきっかけを作つて下さいました松島泰次郎先生とその後共同研究を続けていますタイのチェンマイ大学医学部のUsanee Vinitketkumnuen準教授、文部(科学)省・厚生(労働)省の研究班の班長、班員の先生方には大変お世話になりました。また、国からはもちろん、各種財団からの研究費の御援助、およびいろいろな分野の方々からの研究材料の御提供なくしては今回の受賞に至ることはなかったものと思っています。心から御礼申し上げる次第です。

## 参考文献

- Allison, M. C., A. G. Howatson, C. J. Torrance, F. D. Lee and R. I. Russell (1992) Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs, N. Engl. J. Med., 327, 749-754.
- Ames, B. N., F. D. Lee and W. E. Durston (1973a) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 782-786.
- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki and F. D. Lee (1973b) Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2281-2285.
- Arimochi, H., T. Kinouchi, K. Kataoka, T. Kuwahara and Y. Ohnishi (1997) Effect of intestinal bacteria on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon, Biochem. Biophys. Res. Commun., 238, 753-757.
- Arimochi, H., K. Kataoka, T. Kuwahara, H. Nakayama, N. Misawa and Y. Ohnishi (1999) Effects of  $\beta$ -glucuronidase-deficient and lycopene-producing *Escherichia coli* strains on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon, Biochem. Biophys. Res. Commun., 262, 322-327.
- Chewonarin, T., T. Kinouchi, K. Kataoka, H. Arimochi, T. Kuwahara, U. Vinitketkumnuen and Y. Ohnishi (1999) Effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), a Thai medicinal plant, on mutagenicity of various known mutagens in *Salmonella typhimurium* and on formation of aberrant crypt foci induced by the colon carcinogens azoxymethane and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in F344 rats, Food Chem. Toxicol., 37, 591-601.
- Chewonarin, T., T. Kuwahara, H. Arimochi, K. Kataoka, H. Nakayama, D.Y. Yu, H. Tsuda, U. Vinitketkumnuen and Y. Ohnishi (2001) Expression of human lactoferrin in *Bacteroides uniformis* and its effect on azoxymethane-induced aberrant crypt

- focus formation in the rat colon, *Anaerobe*, 7, 247-253.
- Chiampanichayakul, S., K. Kataoka, H. Arimochi, S. Thumvijit, T. Kuwahara, H. Nakayama, U. Vinitketkumnuen and Y. Ohnishi (2001) Inhibitory effects of bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) on bacterial mutagenesis and aberrant crypt focus formation in the rat colon, *J. Med. Invest.*, 48, 88-96.
- Dang, L. H., C. Bettegowda, D. L. Huso, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (2001) Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 15155-15160.
- Desgranges, C., G. Razaka, E. De Clercq, P. Herdewijn, J. Balzarini, F. Drouillet and H. Bricaud (1986) Effect of (*E*)-5-(2-bromovinyl) uracil on the catabolism and antitumor activity of 5-fluorouracil in rats and leukemic mice, *Cancer Res.*, 46, 1094-1101.
- Dong, Q., T. Kinouchi, K. Kunitomo, K. Kataoka, M. A. Matin, S. Akimoto, N. Komi and Y. Ohnishi (1993) Mutagenicity of the bile of dogs with an experimental model of an anomalous arrangement of the pancreaticobiliary duct, *Carcinogenesis*, 14, 743-747.
- Fujita, Y., K. Wakabayashi, S. Takayama, M. Nagao and T. Sugimura (1987) Induction of oral cavity cancer by 3-diazotyramine, a nitosated product of tyramine present in foods, *Carcinogenesis*, 8, 527-529.
- Hartman, P. E. (1983) Putative mutagens and carcinogens in foods. I. Nitrate/nitrite ingestion and gastric cancer mortality, *Environ. Mutag.*, 5, 111-121.
- Hayano, S., L. Jang-Ho, K. Furuya, T. Kikuchi, T. Someya, C. Oikawa, Y. Iida, H. Matsushita, T. Kinouchi, Y. Manabe and Y. Ohnishi (1985) Formation of hazardous substances and mutagenicity of PAH produced during the combustion process in a diesel engine, *Atmospheric Environment*, 19, 1009-1015.
- Hetz, C., M. R. Bono, L. F. Barros and R. Lagos (2002) Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 2696-2701.
- Higashimoto, M., K. Matano and Y. Ohnishi (1988) Augmenting effect of a nonmutagenic fraction in soy sauce on mutagenicity of 3-diazotyramine produced in the nitrite-treated sauce, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 79, 1284-1292.
- Higashimoto, M., J. Purintrapiban, K. Kataoka, T. Kinouchi, U. Vinitketkumnuen, S. Akimoto, H. Matsumoto and Y. Ohnishi (1993) Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three spices and a medicinal plant in Thailand, *Mutat. Res.*, 303, 135-142.
- Higashimoto, M., T. Yamamoto, T. Kinouchi, Y. Handa, H. Matsumoto and Y. Ohnishi (1995) Mutagenicity of soy sauce treated with nitrite in the presence of ethanol or alcoholic beverages, *Mutat. Res.*, 345, 155-166.
- Higashimoto, M., T. Yamamoto, T. Kinouchi, H. Matsumoto and Y. Ohnishi (1996) Mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of alcohols, *Mutat. Res.*, 367, 43-49.
- Higashimoto, M., H. Yamato, T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1998) Inhibitory effects of citrus fruits on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of ethanol, *Mutat. Res.*, 415, 219-226.
- Higashimoto, M., Y. Akada, M. Sato, T. Kinouchi, T. Kuwahara and Y. Ohnishi (2000) Inhibitory effects of tea extracts on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid on treatment with nitrite in the presence of ethanol, *Food Chem. Toxicol.*, 38, 7-13.
- Higashimoto, M., Y. Akada, M. Sato, Y. Yamada, T. Kuwahara and Y. Ohnishi (2001) Inhibitory effects of herbal teas and herb extracts on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid upon treatment with nitrite in the presence of ethanol, *Environ. Mutagen Res.*, 23, 1-7.
- Intiyot, Y., T. Kinouchi, K. Kataoka, H. Arimochi, T. Kuwahara, U. Vinitketkumnuen and Y. Ohnishi (2002) Antimutagenicity of *Murdannia loriformis* in the *Salmonella* mutation assay and its inhibitory effects on azoxymethane-induced DNA methylation and aberrant crypt focus formation in male F344 rats, *J. Med. Invest.*, 49, 25-34.
- Iwagawa, M., T. Maeda, K. Izumi, H. Otsuka, K. Nishifuji, Y. Ohnishi and S. Aoki (1989) Comparative dose-response study on the pulmonary carcinogenicity of 1,6-dinitropyrene and benzo[*a*]pyrene in F344 rats, *Carcinogenesis*, 10, 1285-1290.
- Kanoh, T., M. Fukuda, I. Mizoguchi, T. Kinouchi, K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1987) Detection of mutagenic compounds in the urine of mice administered pyrene during exposure to NO<sub>2</sub>, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 1057-1062.
- Kanoh, T., M. Fukuda, E. Hayami, T. Kinouchi, K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1990) Nitro reaction in mice injected with pyrene during exposure to nitrogen dioxide, *Mutat. Res.*, 245, 1-4.
- Kataoka, K., T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1991) Species differences in metabolic activation and inactivation of 1-nitropyrene in the liver, *Cancer Res.*, 51, 3919-3924.
- Kataoka, K., T. Kinouchi, S. Akimoto and Y. Ohnishi (1995) Bioactivation of cysteine conjugates of 1-nitropyrene oxides by cysteine conjugate  $\beta$ -lyase purified from *Peptostreptococcus magnus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3781-3787.
- 木内武美, 片岡佳子, 東元 稔, J. Purintrapiban, 有持秀喜, S. M. Shaheduzzaman, 秋本 茂, 松本久男, U. Vinitketkumnuen, 大西克成 (1995) 香辛料 caraway のアルキル化剤に対する抑制効果, 環境変異原研究, 17, 99-105.
- Kinouchi, T., Y. Manabe, K. Wakisaka and Y. Ohnishi (1982) Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria, *Microbiol. Immunol.*, 26, 993-1005.
- Kinouchi, T. and Y. Ohnishi (1983) Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 596-604.
- Kinouchi, T., H. Tsutsui and Y. Ohnishi (1986a) Detection of 1-nitropyrene in yakitori (grilled chicken), *Mutat. Res.*, 171, 105-113.
- Kinouchi, T., M. Morotomi, M. Mutai, E. K. Fifer, F. A. Beland and Y. Ohnishi (1986b) Metabolism of 1-nitropyrene in germ-free and conventional rats, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 77, 356-369.
- Kinouchi, T. and Y. Ohnishi (1986) Metabolic activation of 1-nitropyrene and 1,6-dinitropyrene by nitroreductases from *Bacteroides fragilis* and distribution of nitroreductase activity in rats, *Microbiol. Immunol.*, 30, 979-992.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1987) *In vitro* intestinal microflora-mediated metabolism of biliary metabolites from 1-nitropyrene-treated rats, *Microbiol. Immunol.*, 31, 1145-1159.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji, H. Tsutsui, S. L. Hoare and Y. Ohnishi (1988) Mutagenicity and nitropyrene concentration of indoor air particulates exhausted from a kerosene heater, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 79, 32-41.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1990) Biliary excretion of glutathione conjugates of 4,5-epoxy-4,5-dihydro-1-nitropyrene and 9,10-epoxy-9,10-dihydro-1-nitropyrene in rats administered 1-nitropyrene orally and their further metabolism in the intestinal tract, *Carcinogenesis*, 11, 1381-1387.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, K. Miyanishi, S. Akimoto and Y. Ohnishi (1992) Role of intestinal microflora in metabolism of glutathione

- conjugates of 1-nitropyrene 4,5-oxide and 1-nitropyrene 9,10-oxide, *Tohoku J. Exp. Med.*, 168, 119-122.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, K. Miyanishi, S. Akimoto and Y. Ohnishi (1993) Biological activities of the intestinal microflora in mice treated with antibiotics or untreated and the effects of the microflora on absorption and metabolic activation of orally administered glutathione conjugates of K-region epoxides of 1-nitropyrene, *Carcinogenesis*, 14, 869-874.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, K. Miyanishi, P. C. Howard, T. Kanoh and Y. Ohnishi (1994) Effect of nitrogen-dioxide exposure on formation of nitrated metabolites in animals treated with polycyclic aromatic hydrocarbons, In: S. Sumino, S. Sato, H. P. Lee, C. N. Ong and K. Saioh (Eds), *Environmental and Occupational Chemical Hazards* (2), International Center for Medical Research, Kobe University School of Medicine, Kobe, pp. 285-290.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, R. B. Shan, H. Nakayama, M. Uejima, K. Shimono, T. Kuwahara, S. Akimoto, I. Hiraoaka and Y. Ohnishi (1998) Culture supernatants of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium adolescentis* repress ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug by suppressing unbalanced growth of aerobic bacteria and lipid peroxidation, *Microbiol. Immunol.*, 42, 347-355.
- Machida, H., S. Sakata, A. Kuninaka and H. Yoshino (1981) Antitherpesviral and anticellular effects of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-E-5-(2-halogenovinyl)uracils, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 20, 47-52.
- Machida, H. and S. Sakata (1984) In vitro and in vivo antiviral activity of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-E-(2-bromovinyl)uracil (BV-araU) and related compounds, *Antiviral Res.*, 4, 135-141.
- Machida, H. (1986) Comparison of susceptibilities of varicella-zoster virus and herpes simplex viruses to nucleoside analogs, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 29, 524-526.
- Maeda, T., K. Izumi, H. Otsuka, Y. Manabe, T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1986) Induction of squamous cell carcinoma in the rat lung by 1,6-dinitropyrene, *J. Natl. Cancer Inst.*, 76, 693-701.
- Magee, P. N. and J. M. Barnes (1967) Carcinogenic nitroso compounds, *Adv. Cancer Res.*, 10, 163-246.
- Manabe, Y., T. Kinouchi, K. Wakisaka, I. Tahara and Y. Ohnishi (1984) Mutagenic 1-nitropyrene in wastewater from oil-water separating tanks of gasoline stations and in used crankcase oil, *Environ. Mutagen.*, 6, 669-681.
- Manabe, Y., T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1985) Identification and quantification of highly mutagenic nitroacetoxypyrenes and nitrohydroxypyrenes in diesel-exhaust particles, *Mutat. Res.*, 158, 3-18.
- Marnett, L. J. (1992) Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer, *Cancer Res.*, 52, 5575-5589.
- Misawa, N., M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura and K. Harashima (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 172, 6704-6712.
- Misawa, N. and H. Shimada (1998) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts, *J. Biotechnol.*, 59, 169-181.
- Miyanishi, K., T. Kinouchi, K. Kataoka, T. Kanoh and Y. Ohnishi (1996) *In vivo* formation of mutagens by intraperitoneal administration of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals during exposure to nitrogen dioxide, *Carcinogenesis*, 17, 1483-1490.
- Nakayama, H., T. Kinouchi, K. Kataoka, S. Akimoto, Y. Matsuda and Y. Ohnishi (1997) Intestinal anaerobic bacteria hydrolyse sorividine, producing the high blood concentration of 5-(E)-(2-bromovinyl)uracil that increases the level and toxicity of 5-fluorouracil, *Pharmacogenetics*, 7, 35-43.
- Ochiai, M., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1984) Tyramine is a major mutagen precursor in soy sauce, being convertible to a mutagen by nitrite, *Gann*, 75, 1-3.
- 大西克成, 木内武美 (1983) ディーゼル排出ガスの変異原性, トシキコロジーフーラム, 6, 335-355.
- 大西克成 (1985) 環境中のニトロビレン類の検出および代謝に関する研究, 環境変異原研究, 7, 1-10.
- 大西克成 (1997) 宿主・細菌・薬物の相互関係, 総合臨牀, 46, 2459-2462.
- Ohnishi, Y., K. Kachi, K. Sato, I. Tahara, H. Takeyoshi and H. Tokiwa (1980) Detection of mutagenic activity in automobile exhaust, *Mutat. Res.*, 77, 229-240.
- Ohnishi, Y., H. Okazaki, K. Wakisaka, T. Kinouchi, T. Kikuchi and K. Furuya (1982) Mutagenicity of particulates in small engine exhaust, *Mutat. Res.*, 103, 251-256.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, Y. Manabe and K. Wakisaka (1983) Environmental aromatic nitro compounds and their bacterial detoxification, In: M. D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, N. Chernoff and S. Nesnow (Eds), *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*, Plenum Publishing Corporation, New York and London, pp. 527-539.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, Y. Manabe, H. Tsutsui, H. Otsuka, H. Tokiwa and T. Otofugi (1985) Nitro compounds in environmental mixtures and foods, In: M. D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, G. Strauss and S. Nesnow (Eds), *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV*, Plenum Publishing Corporation, New York and London, pp. 195-204.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, H. Tsutsui, M. Uejima and K. Nishifiji (1986a) Mutagenic nitropyrenes in foods, In: Y. Hayashi, M. Nagao, T. Sugimura, S. Takayama, L. Tomatis, L. W. Wattenberg and G. N. Wogan (Eds), *Diet, Nutrition and Cancer, Proceedings of the 16th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo/VNU Science Press BV, Utrecht, The Netherlands, pp. 107-118.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifiji, E. K. Fifer and F. A. Beland (1986b) Metabolism of mutagenic 1-nitropyrene in rats, In: N. Ishinishi, A. Koizumi, R. O. McClellan and W. Stober (Eds), *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust, Proceedings of the Satellite Symposium of the IV International Congress of Toxicology*, Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, pp. 171-183.
- Ohnishi, Y. (1988) Mutagens and their biological effects, In: O. Hirao and R. K. Pefley (Eds), *Present and Future Automotive Fuels: Performance and Exhaust Clarification*, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 477-485.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifiji, K. Miyanishi, T. Kanoh and M. Fukuda (1990) Metabolism of 1-nitropyrene oxides and effect of nitrogen dioxide on arene activation, In: P. C. Howard, S. S. Hecht and F. A. Beland (Eds), *Nitroarenes: Occurrence, Metabolism, and Biological Impact*, Plenum Press, New York, pp. 85-93.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifiji, E. K. Fifer, F. A. Beland, T. Kanoh, M. Fukuda and I. Mizoguchi (1991) Metabolic formation and inactivation of 1-nitropyrene oxides and the effect of pyrene administration during nitrogen dioxide exposure on the formation of 1-nitropyrene metabolites, In: M. Cooke, K. Loening and J. Merritt (Eds), *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Measurements, Means, and Metabolism*, Battelle Press, Columbus, Ohio,

pp. 641-655.

- Ohnishi, Y., K. Kataoka, T. Kinouchi, H. Arimochi, R. Yoshida, T. Kuwahara, R. Suaeyun, T. Chewonarin, Y. Intiyot and U. Vinitketkumnuen (1998) Inhibitory effects of medicinal plants and their components on bacterial mutagenesis and the initiation stage of colon carcinogenesis, In: M. Moraes, R. Brentani and R. Bevilacqua (Eds), 17th International Cancer Congress, Monduzzi Editore, Bologna, pp. 275-279.
- Pitts Jr., J. N., K. A. van Cauwenverghe, D. Grosjean, J. P. Schmid, D. R. Fitz, W. L. Belser Jr., G. P. Knudson and P. M. Hynds (1978) Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives, *Science*, 202, 515-519.
- Shan, R. B., T. Kinouchi, K. Kataoka, T. Kuwahara and Y. Ohnishi (1998) Protective effects of a culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* and antioxidants on ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug, *Microbiol. Immunol.*, 42, 745-753.
- Shoemaker, N. B., C. Getty, E. P. Guthrie and A. A. Salyers (1986) Regions in *Bacteroides* plasmids pBFTM10 and pB8-51 that allow *Escherichia coli-Bacteroides* shuttle vectors to be mobilized by *IncP* plasmids and by a conjugative *Bacteroides* tetracycline resistance element, *J. Bacteriol.*, 166, 959-965.
- Steidler, L., W. Hans, L. Schotte, S. Neirynck, F. Obermeier, W. Falk, W. Fiers and E. Remaut (2000) *Science*, 289, 1352-1355.
- Suaeyun, R., T. Kinouchi, H. Arimochi, U. Vinitketkumnuen and Y. Ohnishi (1997) Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon, *Carcinogenesis*, 18, 949-955.
- Swinbanks, D. (1994) Deaths bring clinical trials under scrutiny in Japan, *Nature* (London), 369, 697.
- Tokiwa, H., K. Morita, H. Takeyoshi, K. Takahashi and Y. Ohnishi (1977) Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants, *Mutat. Res.*, 48, 237-248.
- Tokiwa, H., S. Kitamori, K. Takahashi and Y. Ohnishi (1980) Mutagenic and chemical assay of extracts of airborne particulates, *Mutat. Res.*, 77, 99-108.
- Tokiwa, H., R. Nakagawa, K. Morita and Y. Ohnishi (1981a) Mutagenicity of nitro derivatives induced by exposure of aromatic compounds to nitrogen dioxide, *Mutat. Res.*, 85, 195-205.
- Tokiwa, H., R. Nakagawa and Y. Ohnishi (1981b) Mutagenic assay of aromatic nitro compounds with *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, 91, 321-325.
- Tokiwa, H., T. Otofugi, K. Horikawa, S. Kitamori, H. Otsuka, Y. Manabe, T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1984) 1,6-Dinitropyrene: Mutagenicity in *Salmonella* and carcinogenicity in BALB/c mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, 73, 1359-1363.
- Tokiwa, H. and Y. Ohnishi (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Critical Rev. Toxicol.*, 17, 23-60.
- Uejima, M., T. Kinouchi, K. Kataoka, I. Hiraoka and Y. Ohnishi (1996) Role of intestinal bacteria in ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug, *Microbiol. Immunol.*, 40, 553-560.
- Valentine, P. J., N. B. Shoemaker and A. A. Salyers (1988) Mobilization of *Bacteroides* plasmid by *Bacteroides* conjugal elements, *J. Bacteriol.*, 170, 1319-1324.
- Wakabayashi, K., M. Ochiai, H. Saito, M. Tsuda, Y. Suwa, M. Nagao and T. Sugimura (1983) Presence of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid, a precursor of a mutagenic nitroso compound, in soy sauce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2912-2916.
- Weiss, H. A. and D. Forman (1996) Aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs and protection from colorectal cancer: a review of the epidemiological evidence, *Scand. J. Gastroenterol.*, 31 (Suppl. 220), 137-141.
- Ye, X., S. Al-Babili, A. Kloeti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer and I. Potrykus (2000) Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm, *Science*, 287, 303-305.