環境中の発がん性トリプトファン熱分解物 に関する研究の現状と今後の問題

Present and Future of Carcinogenic Tryptophan Pyrolysis Products in the Environment

東京大学医学部衛生学教室

真 鍋 重 夫・和 田 攻

Shigeo Manabe and Osamu Wada

Department of Hygiene and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo

Food has been considered an important factor for the genesis of cancer in man, as important as cigarette smoking. Diet influences the incidence of human cancer in many ways, directly and indirectly. Various kinds of carcinogens such as polynuclear aromatic hydrocarbons, N-nitro compounds and mycotoxins have been reported to be present in various foods. During the last decade, a new series of heterocyclic amines has been isolated as potent mutagens and later shown to be potent carcinogens in animals. Among them, carcinogenic tryptophan pyrolysates have been investigated from various points of view and useful pieces of information about them have been collected. Now, it is a matter of urgency to evaluate the effects of these carcinogens on humans. From this aspect, this review describes the information about carcinogenic tryptophan pyrolysates which has been collected and also future problems, especially those the hygienist will have to solve.

Key words: Carcinogenic heterocyclic amines, Tryptophan pyrolysis products, Environmental carcinogen

発がん性複素環状アミン, トリプトファン熱分解物, 環境発がん物質

はじめに

ヒトにおけるがんの原因としては、喫煙、環境中の化学物質、ウィルス、ホルモン、放射線や紫外線などが挙げられている。Doll らの疫学的研究によると、特に食品、喫煙がヒト発がんに関与しているとされる¹⁾。食品中には種々の発がん物質の存在が確認されており、例えば N-ニトロソジメチルアミンに代表される N-ニトロソ化合物、ベンズ [a] ピレンに代表される多環芳香族炭化水素、アフラトキシン B₁ に代表される発がん性マイコトキシン、その他植物（ソテツ、ワラビ）に含まれるサイカシンやプタキロシドなど多数の発がん物質が知られている²⁾。1977 年より現在までに、主として国立がんセンター杉村らにより上記の発がん物質とは異なる一群の強い変異原性を有する物質が、アミノ酸や蛋白の熱分

解物中に存在することが見出され、化学構造上、複素環状アミンであることが確認された³⁻⁵⁾。これらの物質はマウスやラットに対して発がん性を有することが確認され、変異原性発がん性複素環状アミンあるいは発がん性複素環状アミンと呼ばれる。これらの化学構造を Fig. 1 に示した (Fig. 1)。最近図中になく新しい変異原性複素環状アミンも報告されているが発がん性が確認されているものは Fig. 1 に示したものである⁶⁾。発がん性複素環状アミンは通常省略名が用いられ、発がん性トリプトファン熱分解物は Trp-P-1, Trp-P-2, 発がん性グルタミン酸熱分解物は、Glu-P-1, Glu-P-2 などと呼ばれる (Fig. 1)。これらの物質は、アミノ酸や蛋白の熱分解物中に検出されたことや、これまでにいずれも魚や肉などの加熱処理した食品中に検出されたため、加熱などの調理過程で生ずるものと考えられ食品由来発がん物質 (Dietary

Chemical Name	Abbreviation	Structure
3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b] indole	Trp-P-1	
3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole	Trp-P-2	
2-amino-6-methylpyrido [1,2-a:3',2'-b] imidazole	Glu-P-1	
2-aminodipyrido [1,2-a:3,2-d] imidazole	Glu-P-2	
2-amino-9H-pyrido [2,3-b] indole	AαC	
2-amino-3-methyl-9H-pyrido [2,3-b] indole	MeAαC	
2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline	IQ	
2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f] quinoline	MeIQ	
2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline	MeIQx	

Fig. 1 Structures and abbreviations of carcinogenic heterocyclic amines used.

Carcinogen) と呼ばれてきた³⁻⁵⁾。

上記の発がん性複素環状アミンのうち、最初に検出、同定された発がん性トリプトファン熱分解物 (Trp-P と略す) は、その強力な変異原性のため直ちに化学合成され⁶⁾ ず、動物における発がん性が確認された⁷⁾。Trp-P は化学構造上 r-カルボリン誘導体であり、5-ハイドロオキシトリプタミン (セロトニン) と類似構造を有し、他の発がん性複素環状アミンとは異なった構造をもつ。種々の薬理作用が見出され、比較的幅広く研究されており、数々の知見が集積されつつある。最近、Trp-P が大気粉塵や雨水などの一般環境中にも存在していることが確認され⁸⁾ この物質に関しては食品由来発がん物質 (Dietary Carcinogen) ではなく環境発がん物質 (Environmental Carcinogen) であると言える状況となった。また腎不全患者をモデルとした研究において、腎不全透析患者の透析液中に Trp-P を含む発がん性複素環状ア

ミンの存在が証明され⁹⁻¹³⁾、ヒトが実際にこれらの物質に暴露されていることが示唆された。さらに Trp-P は正常人血漿中にも存在が確認され¹⁴⁾、ヒトが Trp-P に暴露されていることが確実となった。このような現状から、Trp-P をはじめ他の発がん性複素環状アミンのヒト健康に及ぼす影響について本格的に検討されるべき時期に達していると考えられる。発がん性複素環状アミンに関する研究は、その発見以来10年間経過しているがいまだにこれらの発がん物質がヒト健康に対して影響を有するかどうかは全く不明の状況にある。衛生学的見地からの研究がほとんどなされていない現状を踏まえて、本稿では比較的知見が集積されている Trp-P に関して概説し、最近のデータを加えて今後の研究の方向性についても述べた。

環境中の分布

Trp-P は前述のごとくトリプトファンの熱分解物中に強力な変異原性物質として分離、同定された。Trp-P の存在は、最初に加熱処理食品において検討され、Table 1(a)に示すごとく、加熱処理した鰯および牛肉中にその存在が示された^{15,16)}。食品を加熱処理すれば Trp-P が形成されると仮定すると、他の多数の食品中にも Trp-P が存在すると考えられるが、Table 1 に示した加熱処理食品以外に報告はない。従って日常食品中にどの程度含有されているか明らかでない以上、各種食品の摂取量から Trp-P の一日摂取量を推定することは現状では困難である。

一方、大気や水などの一般環境における Trp-P の含量は Table 1(b) (c) に示した通りである。試料の採取時期は1988年7月から11月の期間であり、採取場所は東京、札幌、前橋（群馬）、大井沢（山形）の計4ヶ所である。大気粉塵はハイボリュームエアサンプラー（紀本電子、

大阪）を用いて採取した。Trp-P が大気および雨水中に検出され⁹⁾、この事実はこの物質が単に食品中に存在するばかりでなく環境中に広く分布していることを示しており、従来から呼ばれている食品由来発がん物質（Dietary Carcinogen）との呼称³⁻⁵⁾は、環境発がん物質（Environmental Carcinogen）と呼ぶべきである。Table 1 に示した Trp-P の分布において興味あることは、Trp-P-1 濃度（含量）の方が Trp-P-2 濃度よりもやや高いことである。この理由は不明であるが、環境中での Trp-P-1 の形成量が Trp-P-2 のそれよりも多い可能性が考えられる。しかし Trp-P の発生源や形成機序の解明を待つ必要があるだろう。

試料の採取時期や場所により Trp-P の濃度が変化するので、他の発がん物質の濃度と単純に比較することはできないが、現在までに得たデータを基に大気中の Trp-P 濃度を、環境発がん物質の代表であるベンズ [a] ピレン濃度と比較すると Trp-P-1, Trp-P-2 の濃度はベンズ [a] ピレン濃度の約千分の1位と考えられる¹⁷⁾。現在の Trp-P に関するデータは経年的なものでないので、更にデータを積み重ねる必要があるだろう。

ベンズ [a] ピレンに代表される多環芳香族炭化水素は、物質が燃焼する過程で生じ、広く一般環境中に分布することが明らかにされているが¹⁸⁾、Trp-P も同様に物質の燃焼過程で生ずる可能性が考えられる。しかし、前述のごとく結論を得るためには、Trp-P の発生源や形成機序を解明することが必要である。

遺伝毒性および発がん性

Trp-P の発見された当時、そのあまりにも強い変異原性のために、強力な発がん性物質ではないかと考えられ、変異原性複素環状アミンの中では最初に動物実験による発がん性が検討された⁷⁾。また発がん性試験と並行して種々の遺伝毒性も検討され、現在までに通常行われるべき遺伝毒性試験は全て実施されている（Table 2）。変異原性に関しては、Ames 試験にて詳細に検討されている。Trp-P は、それ自体に変異原性はなく、代謝活性化を受け初めて強力な変異原性を示す。この点については、次項で説明を加えるが、遺伝毒性試験においては、代謝活性化を受けた Trp-P を用いて検討されている点に注意されたい。Table 2 に示すごとく、染色体異常¹⁹⁾、姉妹染色分体交換²⁰⁾、トランスフォーメーション²¹⁾において、全て陽性の結果が得られている。またトランスフォームした細胞は、動物に移植可能であり²¹⁾、Trp-P の発がん性と合致する内容となっている。発がん性は経口投与し

Table 1 Distribution of tryptophan pyrolysis products in the environment.

a) Amounts of Trp-P-1 and Trp-P-2 in cooked foods (15, 16)

Foods	Tryptophan Pyrolysates (ng/g)	
	Trp-P-1	Trp-P-2
Sun-dried sardine	13.3	13.1
Beef	53.5	—

b) Concentrations of Trp-P-1 and Trp-P-2 in the air (8) Each value represents the mean $\pm$ S.D.

Sampling		Tryptophan Pyrolysates (pg/m ³ air)	
Location	Sample No.	Trp-P-1	Trp-P-2
Tokyo	5	0.34 $\pm$ 0.25	0.29 $\pm$ 0.19
Sapporo	5	0.25 $\pm$ 0.10	0.09 $\pm$ 0.07
Maebashi	4	0.17 $\pm$ 0.07	0.15 $\pm$ 0.17
Oizawa	4	0.15 $\pm$ 0.13	0.11 $\pm$ 0.07
Mean $\pm$ S.D.		0.23 $\pm$ 0.17	0.16 $\pm$ 0.15

c) Concentrations of Trp-P-1 and Trp-P-2 in rain water (8) Each value represents the mean $\pm$ S.D.

Location	Sample No.	Tryptophan Pyrolysates (pg/l)	
		Trp-P-1	Trp-P-2
Tokyo	3	468 $\pm$ 260	174 $\pm$ 104
Maebashi	3	145 $\pm$ 57	66 $\pm$ 19
Mean $\pm$ S.D.		307 $\pm$ 245	120 $\pm$ 89

Table 2 Genotoxicity and carcinogenicity of tryptophan pyrolysis products.

Toxicity tested	Result	Remarks
Mutagenicity	(+)	Strongly mutagenic toward <i>Salmonella typhimurium</i> tester stains (3, 6).
Chromosome aberration	(+)	Human and Chinese hamster cells <i>in vitro</i> (19).
Chromatid exchange	(+)	Cultured human cells (19, 20).
Cell transformation	(+)	Hamster fibroblast cells. The transformed cells can be transplanted into animals, forming fibrosarcomas (21).
Carcinogenicity	(+)	Hepatocellular carcinoma in mice (7). Hepatocellular carcinoma and some adenoma in the intestine in rats (22). TD ₅₀ * calculated on the basis of mice experiments for Trp-P-1 and Trp-P-2 were 8.8 and 2.7 mg/kg/day, respectively (5).

*TD₅₀ values are the doses needed to develop cancer in 50% of animals fed on carcinogens for their lifetime.

たマウス、ラットにおいて確認され、主として肝がんを生ずるが、変異原性の強さに反して TD50 値は、Trp-P-1 で8.8, Trp-P-2 では2.7 mg/kg/日と比較的大きい値が報告されている⁵⁾。これらの値から Trp-P は比較的弱い発がん性物質と考えられる。この結果は、変異原性の強さが発がん性の強さとは相関しないことを示す代表的な結果となっている。しかし、逆説的には変異原性物質として発がん物質の検索を行うことは誤りでないことを支持している⁵⁾。更に、もう一点、考慮しておくべきことは、動物における発がん性試験成績をヒトに外挿し得ないことである。従来から指摘されているように、ヒトにおける発がん性の有無は、適切な疫学的調査以外には結論が得られないと考えられる。

Trp-P による DNA 傷害機序

現在、化学物質による発がんの機序として一般に受け入れられているのは、発がん物質が DNA と付加体を形成すること^{23,24)}が、発がんの第一段階であるとの考え方である。多くの化学発がん物質は、代謝活性化されることにより、求電子種を生じ、その代謝型が DNA と共有結合し、結果として発がん物質 DNA 付加体を生ずる。この一連の発がん物質による DNA 修飾過程は、ベンズ [a] ピレン、アセチルアミノフルオレン、4-アミノピフェニル、4-ニトロキノリンなどで詳しく研究されており、一般的に Fig. 2 で示した経過にて DNA 修飾が行われる²⁴⁾。前発がん物質 (Procarcinogen) は、チトクローム P-450 あるいは P-448 に酸化され、近接発がん物質 (Proximate Carcinogen) となり、更に代謝活性化を受けて究

Fig. 2 The pathway of detoxication, activation and DNA modification by carcinogens.

極発がん物質 (Ultimate Carcinogen) となる。究極発がん物質は、DNA と共有結合にて付加体を形成する。近接発がん物質や究極発がん物質は、反応性に富んでおり、各種の蛋白や組織構成成分とも共有結合を生じ、ある場合にはこれによって細胞毒性を示す²⁴⁾。一般的には前発がん物質から究極発がん物質まで代謝活性化が行われる過程で、大部分が極性基を賦与され抱合体などの形で尿や胆汁へ排泄されるので、DNA と結合する量は、暴露された前発がん物質のごく一部である。

Trp-P に関する DNA の修飾過程は、橋本らにより明らかにされた²⁵⁾。Fig. 3 に示したように Trp-P-2 の場合、アミノ基がチトクローム P-448 にて水酸化される²⁴⁾。試験管内においては、N-OH-Trp-P-2 は直接 DNA と付加体を形成しうるが、その量は少なく、更に代謝され O-エステル化された代謝物が、DNA のグアニン

Fig. 3 The pathway of DNA modification by Trp-P-2.

残基の8位に結合することにより、Trp-P-2-DNA付加体が形成される。従って Trp-P-2 は前発がん物質、N-OH-Trp-P-2 は近接発がん物質であり、更にO-エステル化されたものが究極発がん物質であると言える。

一方、以前から指摘されているようにプロモーター作用を有する物質（例えばホルボール）は活性酸素を発生する能力を持ち²⁶⁾、多くの完全発がん物質（すなわちイニシエーター作用とプロモーター作用を合わせ持つ発がん物質）では活性酸素を発生させる²⁶⁾。Trp-P は少なくとも動物に対して完全発がん物質であるので、活性酸素を発生しうると考えられるが、早津らは最近この点を検討し、N-OH-Trp-P-2 はDNAと付加体を形成する事によりDNAの傷害を引き起こす以外に、酸素ラジカルにより、DNA鎖の切断障害が生ずる可能性を示した²⁷⁾。さらに早津らはマウスFM3A培養細胞を用いてN-OH-Trp-P-2が細胞内で活性酸素を生ずることを示した⁴²⁾。したがってTrp-PによるDNA傷害は、(1) DNAとの付加体形成。(2) 活性酸素によるDNA鎖の切断損傷。以上の2つの異なった様式で生じうると考えられる。

代謝および組織分布

Trp-Pの代謝や組織分布に関しては動物実験による報告しかみられない^{28,29)}。その要約をTable 3に示した。Trp-Pの組織分布はマウスにおいてのみ検討されている²⁹⁾。放射性Trp-P-1を静注したマウスにおいては、4時間以内に肝、腎髄質、脳、種々の内分泌系器官およびリンパ系組織へ取り込まれ、6時間から24時間においては肝に放射活性が認められるのみで、他の組織からは著しい減少を示した。この報告ではTrp-P-1が急速に排泄されることが示され、ラットにおいてTrp-P-1の排泄を検討した結果と一致している²⁹⁾。ラットにおいては放射性Trp-P-1を経口投与した場合の胆汁、尿中への排泄が検討されており、Table 3に示した通り、胆汁中排泄量の方が尿中排泄量よりも多い²⁹⁾。またTrp-P-1の代謝物の1つは、N-アセチル型であることが明らかにされている²⁹⁾。現在までに変異原性発がん性複素環状アミンの中では、Glu-P-1、CLu-P-2についてのみヒトが代謝していることが明らかにされており³⁰⁾、Trp-Pのヒトにおける代謝も同様に予想され、早急に検討すべき課題である。

Table 3 Tissue distribution, metabolism and excretion of Trp-P-1 (28, 29)

- a) Tissue distribution in mice dosed intravenously with 14 C-labeled Trp-P-1
 - A pronounced uptake of radioactivity in
 - 1) the lymphatic system (thymus, lymph nodes, bone marrow and spleen)
 - 2) the endocrine system (hypophysis, thyroid and adrenal medulla)
 - 3) the liver, kidney medulla and brain
- b) Metabolism and excretion in rat dosed with single oral dose of 14 C-labelled Trp-P-1
 - 1) Excreted from the body via urinary and fecal routes, the fecal route being the major one.
 - 2) One of the metabolites was identified as N-acetyl-Trp-P-1.

薬理作用

Trp-Pの薬理作用の研究は、動物への投与実験における毒性の強さから、その中毒作用機序の解明のために検討されたものと、その化学構造の特徴から推定される薬理作用を検討したものに分けることが可能である。痙攣誘発作用は、前者の観点より、他の薬理作用は主として後者の観点より研究されたものである。

Trp-Pをマウスやラットに非経口的投与すると、間代性痙攣の後に強直性痙攣を生じて死亡する³¹⁾。マウスの場合、投与量に比例して痙攣を生ずるまでの時間は短くなるが、投与量で比較すると痙攣誘発作用はTrp-P-2の方がTrp-P-1よりも数倍強い^{31,32)}。加藤らはTrp-Pなどの痙攣誘発作用を生化学的に検討した³¹⁾。ベンゾジアゼピンの代表であるジアゼパムやGABA (γ-アミノ酪酸) Aリセプターに結合することが明らかにされている。ムシモルを用い、Trp-PのベンゾジアゼピンリセプターやGABA_Aリセプターへの結合を解析しTrp-PのGABA_Aリセプターへの結合の役割は不明であるがTrp-Pによる痙攣誘発作用はベンゾジアゼピンリセプターを介する可能性を指摘した (Table 4(a))。一方、我々

は、電気生理学的にTrp-PのGABA_Aリセプターに対する作用を検討し、Trp-PはGABA_Aリセプターに対するアンタゴニストであることを明らかにし、Trp-Pによる痙攣誘発作用はGABA_Aリセプターに対するアンタゴニストとしての作用で説明できる可能性を示した³³⁾。我々の結果はTrp-PがGABA_Aリセプターに結合し、アンタゴニストとして作用することで、抑制性GABAシナプスの機能抑制を介して痙攣が誘発されると解釈できるのである。

Trp-PはFig. 1に示した通りインドール環を基本骨格としており、5-ハイドロオキシトリプタミン(セロトニン)と類似した化学構造を持ち、5-ハイドロオキシトリプタミンによる薬理作用を阻害する可能性が考えられる。この観点より、5-ハイドロオキシトリプタミンのヒト血小板に対する作用を利用して、Trp-Pの薬理作用を検討した³⁴⁾。Trp-Pは、それ自体は血小板凝集を生じないが、5-ハイドロオキシトリプタミンによるヒト血小板凝集を強力に阻害した (Table 4(b))。またTrp-Pは、ヒト血小板の5-ハイドロオキシトリプタミンの取り込みをも阻害した³⁴⁾。一方、予想外にもアラキドン酸によるヒト血小板凝集の強力な阻害やアラキドン酸カスケード

Table 4 Pharmacological activities of Trp-P-1 and Trp-P-2.

a) Inhibitory effects on receptor binding (31)

	IC ₅₀ or Ki (μM)		Cell sources
	Trp-P-1	Trp-P-2	
[³ H] Diazepam binding to cell membrane	1.9	29.7	rat brain membranes.
[³ H] Muscimol binding to cell membrane	25.3	5.7	rat brain membranes.

b) Inhibitory effects on platelet function (35, 36)

			Cell sources
5-Hydroxytryptamine-induced platelet aggregation	10	50	Human platelets.
Sodium arachidonate-induced platelet aggregation	15	25	Human platelets.
5-Hydroxytryptamine uptake	18*	42*	Human platelets.

c) Inhibitory effects on enzymes (34, 35, 37, 41)

Enzyme	Enzyme sources		
Cytochrome oxidase	310*	—	Bovine heart.
Prostaglandin endoperoxide synthetase	15	25	Human platelets
Monoamine Oxidase Type A	0.45	0.70	Homogenates of human placenta.
Monoamine Oxidase Type B	200	200	Homogenates of human platelets.
Monoamine Oxidase Type A	0.21*	0.043*	Homogenates of rat pheochromocytoma PC12h clonal cells.
Monoamine Oxidase Type B	5.2*	31.0*	Homogenates of mouse brain.

*indicates inhibition constants [Ki]

を介するコラーゲン凝集の阻害も Trp-P に見出した³⁵⁾。この阻害作用は、プロスタグランジンエンドペルオキシド合成酵素阻害によるもので、プロスタグランジン G₂ 以後の代謝が阻害されていることによるものと判明した³⁵⁾。また、この阻害の程度は、抗血小板凝集剤として臨床で使用されているアスピリンとほぼ同程度であり³⁶⁾(Table 4(b))、更に詳細な阻害機構の解明が待たれる。

Trp-P は、化学構造上 α -カルボリン誘導体であり、モノアミノオキシダーゼ (Monoamine oxidase : MAO) の阻害剤として知られている β -カルボリン誘導体と構造が類似している。この点から Trp-P も MAO 活性を阻害するのではないかと検討した³⁴⁾。Table 4(c) に示したごとく、Trp-P は MAO の強力な競合型阻害物質であることが判明した³⁴⁾。永津らは、ほぼ同時期にパーキンソン病を生ずる化学物質として注目を集めている MPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydro-pyridine) と構造が類似していることに着目して Trp-P を含む変異原性発がん性複素環状アミンの MAO およびドーパミン代謝に及ぼす影響を報告した³⁷⁾。Table 4(c) に示した通り、Trp-P の MAO に対する阻害作用は、A 型 MAO ばかりでなく B 型 MAO に対しても強力であった。この点は、我々のデータとは異なるが、使用している酵素源の相違による可能性が考えられる。また Trp-P を脳室内投与したラットにおいて Trp-P は一過性のドーパミンの増加と、持続性のドーパミン代謝物 (ホモバリン酸や 3,4-ジハイドロキシフェニル酢酸) の低下が観察された³⁸⁾。更に Trp-P を腹腔内投与したラットにおいても上記と同様の結果が認められた。この事実は Trp-P が血液-脳関門を通過することを示しているばかりでなく、Trp-P は MAO 阻害を介して脳におけるドーパミン代謝に影響を及ぼしうることを示している³⁷⁾。前述の Trp-P の GABA_A リセプターを介した作用と合わせて考慮すると Trp-P は中枢神経系に作用する薬剤と言える。

以上のごとく環境中に広く分布する Trp-P は種々の薬理作用を有しているが、Trp-P のヒト血漿中濃度は Trp-P が薬理作用を発揮する濃度よりも著しく低く¹⁴⁾、通常の暴露状況下で Trp-P が薬理作用を有する可能性は、現時点では極めて低いと考えられる。しかしながら、Trp-P の組織中レベルの検討がほとんど行われていないため、更に詳細な検討が必要である。

ヒトにおける暴露レベルの評価

Trp-P が食品ばかりでなく大気や雨水など広く環境中に分布していることを述べたが、ヒトの健康に影響を及ぼしているか否かを知るためには、ヒトが実際に暴露されていることを明らかにした上で、ヒトにおける Trp-P の暴露レベルを評価する方法を開発する必要がある。この目的のために、我々は腎不全透析患者を研究対象として選んだ⁹⁾。この理由は透析患者では排尿がほとんどなく (通常 1 日当り数 10 ml 以下)、血液中の低分子物質を透析液として回収できることである。試料には通常の血液透析患者と腹膜透析患者の透析液を用いた。血液透析患者では通常週 2~3 回の透析を行うが、腹膜透析患者では毎日 6 l の透析液を用いて透析するため、透析液 (6 l) 中の Trp-P 含量は全血漿中の Trp-P 量に相当すると考えられ、1 日当りの Trp-P 暴露レベルを反映していると考えられる⁹⁾。これら試料の検討結果、両透析患者の透析液中に Trp-P を検出、同定した。しかも Table 5(a) に示したごとく、腹膜透析患者の透析液中には Trp-P-1 は平均 150 ng, Trp-P-2 は 8 例中半数に検出され、平均値で 34 ng 認められた⁹⁾。以上の事実はヒトが実際に Trp-P に暴露され、消化管などから吸収された Trp-P が血流中に入っていることを示唆するものと考えられた。

上記の事実から正常人の血液中にも Trp-P が存在するのではないかと考え、高速液体クロマトグラフによる測定法を改良し、正常人血漿中 Trp-P 含量を測定した¹⁴⁾。この結果をもとに正常人における血漿量を 3 l と仮定し、血漿中の全 Trp-P 量を算出した結果を Table 5(a) に示した。正常人と腎不全患者の結果とを直接比較することは試料および測定法が異なるので問題があるが、腎不全患者では血漿中 Trp-P 含量が正常人に比し高い傾向が認められる (Table 5(a))。この結果は、血漿中 Glu-P-1, GLu-P-2 濃度が正常人よりも腎不全患者が高値を示した結果と一致している¹¹⁾。Glu-P-1 や Glu-P-2 の場合には腎不全患者では、腎を介した発がん性グルタミン酸熱分解物の排泄が低下し、結果として血漿中の Glu-P-1, Glu-P-2 濃度が上昇すると考えられる¹¹⁾。前述の動物における検討結果でも Trp-P は尿と胆汁中へ排泄されており²⁸⁾、腎不全患者では Trp-P の尿中への排泄低下の結果として正常人よりも Trp-P の血漿中レベルが高くなっていることが予想されるが、今後の検討を要する。

ヒトが実際に Trp-P に暴露されていることが確認されたため、その暴露レベルの推定をする方法の検討をウサギを用いた³⁹⁾。Trp-P-1 をウサギに経口投与し、経時的に血漿および赤血球中の Trp-P-1 レベルを追跡

Table 5 Contents of carcinogenic tryptophan pyrolysis products in human plasma and lens. (9)(14)(39)

a) Total amounts of Trp-P-1 and Trp-P-2 in human plasma. Each value represents the mean.

	N	Tryptophan pyrolysates in plasma (ng)	
		Trp-P-1	Trp-P-2
Uremic patients ^{a)}	8	150	34 ^{b)}
Normal subjects	10	43.5 ^{c)}	22.5 ^{c)}

a) Patients treated with CAPD (continuous ambulatory peritoneal dialysis). b) Trp-P-2 was detected in 4 of 8 patients. c) Total contents of the carcinogens in whole plasma were calculated on the assumption that the plasma volume in normal subjects is 3 l.

b) Amounts of Trp-P-1 and Trp-P-2 in human cataractous lens. Each value represents the mean $\pm$ S.D.

lens type	N	Tryptophan pyrolysates in human lens (pg/lens)	
		Trp-P-1	Trp-P-2
Senile cataract	10	33.0 $\pm$ 7.5	25.2 $\pm$ 8.0
Diabetic cataract	10	33.3 $\pm$ 8.5	29.6 $\pm$ 4.7
Mean $\pm$ S.D.		33.1 $\pm$ 7.8	27.4 $\pm$ 6.7

した。この結果、投与後の血漿および赤血球中の Trp-P-1 レベルは投与量を反映するが、血漿中 Trp-P-1 は赤血球中 Trp-P-1 よりも速く消失することが明らかとなり、Trp-P 暴露レベルの推定には赤血球中の Trp-P 測定が適していると考えられる。現在、赤血球中の Trp-P が暴露指標となりうるか、更に検討を重ねている。

一方、ヒトレンズを用いたヒト組織中の老化色素の研究過程で、幾つかの強力な蛍光物質を検出し^{39,40)}、これらのうち2つは Trp-P-1 と Trp-P-2 であることを確認した³⁹⁾。Table 5(b) に示すようにレンズ中の Trp-P は極めて少量であった。レンズは衆知の通り血管の無い組織であり、血液中の Trp-P の混入は考え難い。レンズ中の Trp-P は血液から眼房水へ移行し、更にレンズに取り込まれるのか、あるいはレンズ蛋白(クリスタリン)の変性過程で生ずるのかは、結論できないが、動物実験の結果より Trp-P-1 は広く各種組織に分布することから血液中の Trp-P がレンズに移行する可能性が高いと思われる。変性レンズ蛋白部分(即ち白内障発生部位)に Trp-P が多いこと³⁹⁾より、変性レンズ蛋白に結合した

Trp-P は、レンズ組織の著しく低い組織修復能から考えて長期停滞するのかもしれないが、老化色素の観点から更に検討を加える余地があると思われる。また実際的ではないが、レンズ中の Trp-P 含量が暴露レベルを反映している可能性はありうると考えられる。

以上のごとく Trp-P のヒトにおける暴露レベルの検討は始められたばかりである。Trp-P のヒトに対する影響は、現時点では正しく評価しえない段階にあり、早期に有用な暴露レベル評価方法の確立が望まれる。

おわりに

アミノ酸や蛋白の熱分解物より分離、同定された発がん性複素環状アミンのうち発がん性トリプトファン熱分解物(Trp-P)の知見について概説すると共に Trp-P の今後の研究課題についても述べた。Trp-P に関する遺伝毒性や発がん性に関する知見、薬理学的見地からの知見は集積されつつあるが、Trp-P のヒト健康に及ぼす影響に関する研究は今後の重要な課題であり、特に衛生学的見地からの研究が望まれる。

謝辞：本研究は文部省科学研究費(一般 A-63440029 および一般 B-63480174)の援助により行われた。

文 献

- 1) Doll, R. and Peto, R.: The causes of cancer; Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J. Natl. Cancer Inst., 66, 1191-1308 (1981).
- 2) Mutagens/carcinogens in foods in Diet, Nutrition and Cancer (Eds, by Hayashi, Y., Nagao, M., Sugimura, T., Takayama, S., Tomatis, L., Wettenberg, L.W. and Wogan, G.N.) p. 57-145, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo (1986).
- 3) Sugimura, T. and Sato, S.: Mutagens-carcinogens in foods. Cancer Res., (suppl.) 43, 2415s-2421s (1983).
- 4) Sugimura, T.: Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan. Science 233, 312-318 (1986).
- 5) Sugimura, T.: Past, present, and future of mutagens in cooked foods. Environ. Health Perspect., 67, 5-10 (1986).
- 6) Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Iitaka, Y. and Itai,

- A.: Mutagenic principle(s) in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products. *Proc. Jpn. Acad.*, **53**, 58-61 (1977).
- 7) Matsukura, N., Kawachi, T., Morino, K., Ohgaki, H., Sugimura, T. and Takayama, S.: Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from a tryptophan pyrolysate. *Science* **213**, 346-347 (1981).
- 8) Manabe, S., Uchino, E. and Wada, O.: Carcinogenic tryptophan pyrolysis products in airborne particles and rain water. *Mutation Res.* (in press)
- 9) Manabe, S., Yanagisawa, H., Guo, S., Abe, S., Ishikawa, S. and Wada, O.: Detection of Try-P-1 and Try-P-2, carcinogenic tryptophan pyrolysis products, in dialysis fluid of patients with uremia. *Mutation Res.*, **179**, 33-40 (1987).
- 10) Yanagisawa, H., Manabe, S., Kitagawa, Y., Ishikawa, S., Nakajima, K. and Wada, O.: Presence of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (MeIQx) in dialysate from patients with uremia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138**, 1084-1089 (1986).
- 11) Manabe, S., Yanagisawa, H., Ishikawa, S., Kitagawa, Y., Kanai, Y. and Wada, O.: Accumulation of 2-amino-6-methyl-dipyrido [1, 2-a : 3', 2'-d] imidazole and 2-aminodipyrido [1, 2-a : 3', 2'-d] imidazole, carcinogenic glutamic acid pyrolysis products, in plasma of patients with uremia. *Cancer Res.*, **47**, 6150-6155 (1987).
- 12) Yanagisawa, H., Manabe, S. and Wada, O.: Detection of IQ-type heterocyclic amines in dialysis fluid of uremic patients treated by peritoneal dialysis. *Jpn. J. Nephrol.*, **29**, 1153-1159 (1987).
- 13) Yanagisawa, H., Manabe, S. and Wada, O.: Carcinogenic glutamic acid pyrolysis product in the dialysate of uremic patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clinical Nephrol.*, **30**, 73-78 (1988).
- 14) Manabe, S. and Wada, O.: Analysis of human plasma as an exposure level monitor for carcinogenic tryptophan pyrolysis products. *Mutation Res.*, **209**, 33-38 (1988).
- 15) Yamaizumi, Z., Shiomi, T., Kasai, H., Nishimura, S., Takahashi, Y., Nagao, M. and Sugimura, T.: Detection of potent mutagens, Trp-P-1 and Trp-P-2, in broiled fish. *Cancer Lett.*, **9**, 75-83 (1980).
- 16) Yamaguchi, K., Shudo, K., Okamoto, T., Sugimura, T. and Kosuge, T.: Presence of 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole in broiled beef. *Gann* **71**, 745-746 (1980).
- 17) Harkov, R., and Greenberg, A.: Benzo [a] pyrene in New Jersey-Results from a twenty-seven-site study. *JAPCA* **35**, 238-243 (1985).
- 18) Baum, E.M.: Occurrence and surveillance of polycyclic aromatic hydrocarbones. Vol. I. *Environ. Chemical Met.* Academic Press, New York, p. 45-70 (1978).
- 19) Sasaki, M., Sugimura, T., Yoshida, M.A. and Kawachi, T.: Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges induced by tryptophan pyrolysates, Trp-P-1 and Trp-P-2, in cultured human and Chinese hamster cells. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **56**, 332-337 (1980).
- 20) Tohda, H., Oikawa, A., Kawachi, T. and Sugimura, T.: Induction of sister chromatid exchanges by mutagens from amino acid and protein pyrolysate. *Mutation Res.*, **77**, 65-69 (1980).
- 21) Takayama, S., Hirakawa, T. and Sugimura, T.: Malignant transformation in vitro by tryptophan pyrolysis products. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **54**, 418-422 (1978).
- 22) Takayama, S., Nakatsuru, Y., Ohgaki, H., Sato, S. and Sugimura, T.: Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole, from tryptophan pyrolysate. *Jpn. J. Cancer Res.*, (Gann) **76**, 815-817 (1985).
- 23) Miller, J.A.: Carcinogenesis by chemicals: An overview-G.H.A. Clows Memorial Lecture. *Cancer Res.*, **30**, 559-576 (1970).
- 24) Ioannides C. and Parke, D.V.: The cytochromes P-448-A unique family of enzymes involved in chemical toxicity and carcinogenesis. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 4197-4207 (1987).
- 25) Hashimoto, Y., Shudo, K. and Okamoto, T.: Deoxy-ribonucleic acid modification by

- mutagenic 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole: The chemical events. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4300-4308 (1984).
- 26) Ames, B.N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* **221**, 1256-1264 (1983).
- 27) Wakata, A., Oka, N., Hiramoto, K., Yoshioka, A., Negishi, K., Wataya, Y. and Hayatsu, H.: DNA strand cleavage in vitro by 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole, a direct-acting mutagen formed in the metabolism of carcinogenic 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole. *Cancer Res.*, **45**, 5867-5871 (1985).
- 28) Brandt, I., Gustafsson, J. and Rafter, J.: Distribution of the carcinogenic tryptophan pyrolysis product Trp-P-1 in control, 9-hydroxy-ellipticine and B-naphthoflavone pretreated mice. *Carcinogenesis* **4**, 1291-1296 (1983).
- 29) Rafter, J. and Gustafsson, J.: Metabolism of the dietary carcinogen Trp-P-1 in rats. *Carcinogenesis* **7**, 1291-1295 (1986).
- 30) Kanai, Y., Manabe, S. and Wada, O.: In vitro and in vivo N-acetylation of carcinogenic glutamic acid pyrolysis products in humans. *Carcinogenesis* **9**, 2179-2184 (1988).
- 31) Muraki, T., Yamazoe, Y. and Kato, R.: Inhibition of benzodiazepine and GABA receptor binding by amino- α -carbolines and other amino acid pyrolysate mutagens. *European J. Pharmacol.*, **98**, 35-44 (1984).
- 32) Kanai, Y., Manabe, S. and Wada, O.: (Unpublished data).
- 33) Kanai, Y., Aosaki, T., Wada, O. and Manabe, S.: Suppression of GABA-induced chloride current by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole (Trp-p-2). *European J. Pharmacol.* (in press)
- 34) Manabe, S., Kanai, Y., Ishikawa, S. and Wada, O.: Carcinogenic tryptophan pyrolysis products-potent inhibitors of Type A monoamine oxidase and the platelet response to 5-hydroxytryptamine. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **26**, 265-270 (1988).
- 35) Ishikawa, S., Manabe, S., Yanagisawa, H., Kitagawa, Y. and Wada, O.: Inhibitory effects of tryptophan pyrolysis products on human platelet aggregation through inhibition of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Fd. Chem. Toxic.*, **25**, 829-835 (1987).
- 36) Manabe, S., Wada, O., Matsui, H., Takada, M., Kobayashi, N. and Maekawa, T.: Triphenyltin fluoride in vitro inhibition of rabbit platelet collagen-induced aggregation and ATP secretion and blockade of arachidonic acid mobilization from membrane phospholipids. *Biochem Pharmacol.*, **32**, 1627-1634 (1983).
- 37) Ichinose, H., Ozaki, N., Nakahara, D., Naoi, M., Wakabayashi, K., Sugimura, T. and Nagatsu, T.: Effects of heterocyclic amines in food on dopamine metabolism in nigro-striatal dopaminergic neurons. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 3289-3295 (1988).
- 38) Manabe, S., Kanai, Y. and Wada, O.: Exposure level monitor of 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole, a dietary carcinogen, in rabbits. *Environ. Molecular Mutagen.*, (in press)
- 39) Manabe, S. and Wada, O.: Carcinogenic tryptophan pyrolysis products in human lens. *Exp. Eye Res.*, **48**, 351-363 (1989).
- 40) Manabe, S., Yanagisawa, H., Kanai, Y. and Wada, O.: Presence of carcinogenic glutamic acid pyrolysis products in human cataractous lens. *Ophthalmic Res.*, **20**, 20-26 (1988).
- 41) Ishikawa, S., Manabe, S., Kitagawa, Y., Yanagisawa, H., Kanai, Y. and Wada, O.: In vitro inhibition of cytochrome C oxidase by the dietary carcinogen 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole (Trp-P-1). *Jpn. J. Hyg.*, **43**, 300 (Abstract) (1988).
- 42) Wataya, Y., Yamane, K., Hiramoto, K., Ohtsuka, Y., Okubata, Y., Negishi, K. and Hayatsu, H.: Generation of intracellular active oxygens in mouse FM3A cells by 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole, the activated Trp-P-2, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 576-579 (1988).
- (受付 1989年2月1日 受理 1989年3月24日)