

19980582

平成10年度厚生科学研究費補助金
生活安全総合研究事業報告

「食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究」
(H10—生活—025)

主任研究者 広瀬 雅雄
国立医薬品食品衛生研究所病理部

食品中化学物質等の相互作用に関する調査研究

主任研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨

実験的研究では、亜硝酸とアミンの複合投与は発がん性を示し、抗酸化剤はその発がんを阻害する。一方、亜硝酸と抗酸化剤は新たな発がん物質を生成する可能性が示された。肝培養細胞のギャップ結合細胞間連絡阻害作用及びその構成蛋白の発現を検討することにより、これらの結果を短期に予測できる可能性がある。アレルギーに関しては複数の化学物質の相互作用による増悪作用を捉えられる可能性が示唆された。また、相互作用による毒性発現を、*in vitro*試験から定量的に予測できる方法論を確立し、さらに多くの農薬等化学物質が、薬物代謝酵素を誘導・阻害し、その結果他の化学物質の毒性発現に関して重大な影響を及ぼす可能性が示された。調査研究では、一斉分析法を用いて、国内産農作物356検体について、197農薬の複数汚染実態を調査した結果、171検体（48%）から農薬、98検体（28%）から複数農薬が検出され、今後の農薬の安全性評価において相互作用を検討することの重要性が指摘された。また、残留農薬基準設定の基本となる曝露評価の精密化を図るため、曝露評価に特化した新たな食品摂取量データベースを開発した。

分担研究者

井上 達 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長
大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長
豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長
小野 宏 食品薬品安全センター 秦野研究所 所長
白井智之 名古屋市立大学医学部 第一病理学 教室 教授
吉池信男 国立健康・栄養研究所 成人健康 栄養部 主任研究官

A. 研究目的

我々は、食品、化粧品や飲料水を通じて長期間にわたり低濃度、かつ多様な天然・合成の化学物質に同時に暴露されている。これらの中には、発がん性・発がんプロモーション作用のみでなく種々の毒性、アレルギーさらにホルモン様作用を有するものがある事実も明らかにされてきた。本研究班では食品添加物、残留農薬など食品中化学物質の複合曝露や相互作用の実態を総合的に調査、研究する目的で以下の研究を行った。

B. 研究方法

【広瀬】ラット中期多臓器発がん試験法を用いて亜硝酸（N）、アミノピリン（AP）、アスコルビン酸（AS）の単独あるいは併用投与による影響を検討し、さらに短期実験で亜硝酸と、食品添加物として用いられている抗酸化剤の複合作用についても検討した。

【白井】F344雄ラットに、ヘテロサイクリックアミンであるMeIQxとHarman, NorharmanまたはNaNO₂を2週間同時投与し、肝P450アイソザイムの誘導を免疫組織学的に検索した。また、コネクシン32の染色性の変化も蛍光抗体法で検索した。さらに、Dethylnitrosamine (DEN)をイニシエーターとした8週間の中期肝発がん試験法を用いて、MeIQxとHarmanあるいはNorharmanを同時に投与し肝発がんへの影響を検討した。

【井上】肝発がんプロモーターであるpentachlorophenol (PCP) 及びその代謝産物であるtetrachlorohydroquinone (TCHO) を用いて、培養肝細胞を用いるscrape lading/dye transfer法により、検体処理後のGJIC時間経過を調べた。またその阻害機序の解析のため、ギャップ結合構成蛋白（コネクシン）の発現量の変

化及びそのリン酸化に対する修飾を、western blottingにより、またコネクシン分子の細胞内局在性への影響はimmunostaining法により検討した。

【小野】アレルギー増悪作用の有無を調べる目的で、ラットがん化好塩基球（RBL-2H3細胞）、および骨髓由来マスト細胞（BMMC）からの脱顆粒反応を指標としたin vitroのアレルギーモデル系を用い、マラチオン、マラオキシソンの影響を、NC/Nga マウスを用いたin vivo即時型アレルギーモデルでOVAおよびすぎ花粉抽出物の影響、また遅延型アレルギー反応モデルでDNCBの影響について検討した。さらにFTNの複合投与による影響についても検討した。

【大野】1. ラットでCYP3A阻害剤であるケトコナゾールの、有機リン系農薬IBPの代謝に及ぼす影響を検討した。2. mechanism-based inhibitionによるin vivoの相互作用をin vitro試験から定量的に予測することを目的に、CYP3Aによるtriazolam代謝におよぼすerythromycin（EM）の阻害を例に、kinactとK_{app}に表される阻害のkinetic parameterを求めた。これらの値と文献情報より得られたtriazolamとEMの薬物動態パラメータを用いて、生理学的フローモデルによりin vivoの相互作用を定量的に予測した。3. 農薬による薬物代謝酵素誘導を調べる系を確立する目的で、CYP3Aの誘導に参与する核内レセプター（PXR）のcDNAを単離し、アミノ酸配列の相同性を比較した。【豊田】厚生省通知の迅速スクリーニング法または一斉分析法を用いて、国内産農作物356検体について、197農薬の複数汚染実態を調査した。

【吉池】国民栄養調査データを用いた農産物摂取量分布等に関するデータベースの構築、総務庁家計調査データを用いた農作物摂取量の季節変動の検討、農作物などの標準的食品重量（ポーションサイズ）に関するデータベース構築と基準値の設定、および農作物などの食品の調理・加工状態に関するデータベース化について検討を行った。

C. 研究結果

【広瀬】N + A Pで肝細胞がんの増加がみられたが、A Sを加えると有意に減少した。N + A Sによる前胃腫瘍の増加は認められなかった。従って、低用量のA Sはニトロソアミンの生合成を抑制し、かつ前胃

腫瘍発生に対しては影響を与えないことが明らかになった。また、10種類の抗酸化物質についてNと同時に4週間投与し、毒性発現の有無を検討した結果、 α -トコフェロール、エリソルビン酸、ヒドロキノン、茶カテキン、*o*-フェニルフェノールで前胃の過形成、*p*-アミノフェノールで強い腎毒性の発現が認められた。このようにNは2級アミンのみならず種々の食品添加物の毒性発現、発がんに大きな影響を及ぼす可能性が示された。

【白井】加熱した肉類魚類に含まれる発がん性ヘテロサイクリックアミンの1つであるMeIQxはF344ラットにおいてCYP2B1とCYP3A2を肝に誘導することがあきらかとなり、食品中に含まれそれ自体は変異原性、発がん性を持たないNorharmanとMeIQxを同時投与するとCYP2B1の誘導は抑制されるが、CYP3A2の誘導が亢進することが観察された。また、ハルマン、ノルハルマンはギャップジャンクション蛋白のコネクシン32の発現を抑制する事から、肝発がんのプロモーターである可能性が示唆された。肝発がんへの影響は現在検討中である。

【井上】PCPによる培養肝細胞のGJIC阻害作用が2相性で、かつ可逆性であることを見出し、後半の阻害には、コネクシン発現量の減少が寄与していることが示唆された。GenotoxicなTCHQではこのような効果は認められず、GJIC阻害はいわゆるepigeneticな作用でおきる現象であるといわれるこれまでの知見と一致するものであった。PCPの場合、GJIC阻害の見られる時点で、リン酸化はみられなかったが、24時間後ではtotalの蛋白レベルの減少が認められた。従って、late phaseで見られる阻害にはコネクシン発現の減少が関与している可能性が考えられた。また、阻害の見られる4時間及び24時間後において、コネクシンの膜状での発現には影響が見られなかったが、24時間後にはスポットサイズの明らかな減少がみられ、これは先の蛋白レベルの減少と対応していた。このような可逆的な阻害作用が発がんプロモーター機序に深く関与しているものと推測された。

【小野】in vitroの系ではマラチオンはRBL-2H3細胞からの脱顆粒を軽度抑制したが、マラオキシソンは逆に弱い増強効果を示した。BMMCを用いた抗原刺激に伴う脱顆粒実験においても同様な結果が得られた。

BMMCからのTNF- α の遊離に関しては、マラチオンは、ほとんど無影響であったが、マラオキシソンの場合、10 μ g/mL前後で、弱い増強効果がみられた。一方、in vivoのNC/Ngaマウスを用いた実験では、OVAの感作投与により、脾臓重量の増加、血清IgE濃度の上昇が認められた。一方、スギ花粉抽出物の感作投与では、脾臓および胸腺細胞のLTTのうち、脾臓細胞のPHAおよびLPSに対する反応と胸腺細胞のLPSに対する反応の増大が認められた。このLTTの反応はFTNの複合投与により抑制された。脾臓細胞を抗原刺激のもとに7日間培養したときの培養上清中のIL-4とIFN- γ を測定した結果、OVA感作投与群ではIFN- γ の産生が認められ、スギ花粉抽出物感作投与群ではIL-4の産生が認められた。これらの変化は、FTNの複合投与により抑制された。遅延型アレルギー反応モデルでは、脾臓重量の増加および胸腺重量の減少が認められた。Ear Swelling Testでは、DNCBの感作により明らかに耳厚が肥厚した。これらの変化はFTNの複合投与に影響されなかった。従って、RBL-2H3細胞、およびBMMCからの脱顆粒およびTNF- α の測定、NC/Ngaマウスを用いた種々の免疫機能の測定はアレルギーモデルとして有用であると考えられた。

【大野】1.ラットでCYP3A阻害剤ケトコナゾールを前投与すると有機リン系農薬IBPのAUCおよび血中半減期(t_{1/2})の上昇が認められた。このようなCYP3A阻害剤は環境中に多く存在し、これらが農薬の代謝を阻害し、その毒性を増強する可能性が明らかになった。また、ラット尿中代謝物として、脱ベンジル化したDITP、脱チオベンジル化したDIHP、および脱イソプロピル化したTBIPを同定し、IBPのトリエステル切断箇所が三種類あることを示した。従って、IBPの代謝にはエステラーゼ等CYP3A以外の酵素の作用も考慮する必要があると考えられた。2.予測の結果、in vitroの予測値はin vivoにおける報告値とよく一致した。この結果を基に、重篤な薬物相互作用を起こす可能性のあるmechanism-based inhibitionに基づく薬物間相互作用をin vitro試験から定量的に予測する方法論を確立し、これを医薬品と生活関連物質との相互作用の予測に利用する。3.アミノ酸配列の相同性を比較した結果、すでに明らかとな

っているマウスのmPXRに対してrPXRは、DNA結合領域と考えられている部分で100%、リガンド結合領域と考えられている部分で97%の高い相同性が認められた。一方hPXRに対しては、それぞれ95.5%および77%の相同性を示し、リガンド結合部位の相同性がマウスおよびラットと比べ低い値であった。

3.ラットにCYP3A阻害剤ケトコナゾールを前投与するとIBPのAUCおよび血中半減期(t_{1/2})の上昇が認められ、尿中に脱ベンジル化、脱チオベンジル化及び脱イソプロピル化が代謝物同定され、農薬と医薬品の相互作用により血中濃度が上昇することが確認された。

【豊田】その結果最近3年間に検査した国産農作物356検体中、171検体(48%)から農薬が検出され、98検体(28%)から複数農薬が検出された。米、馬鈴薯、きゅうり、トマト、ピーマン、レタス、食用菊、およびみかん、スイカ、くり以外果実ではいずれも複数農薬の検出率が高い。複数検出農薬としてはクロルピリホス、アセフェート等有機リン系殺虫剤、ベルメトリン等ピレスロイド系殺虫剤とイプロジオン、トリフルミゾール等含窒素系殺菌剤の組み合わせ例が多い。食品衛生法では現在179農薬の残留基準値が定められているが、残留基準値設定に際しては複数農薬を同時使用した場合の影響はほとんど評価されておらず、今後の課題として残されている。

【吉池】残留農薬の曝露評価の精密化を図るため、曝露評価に特化した新たな食品摂取量データベースを開発した。すなわち、国民栄養調査の個人別食物摂取量データ(磁気テープ)を用い、食品群および個々の食品別摂取量(性・年齢階級別、重量[g/kg体重])の分布等に関するデータベースを作成した。また、総務庁家計調査のデータベースを用いて食品摂取量の季節変動を検討し、野菜や果物については季節的偏りが大きいため、国民栄養調査のデータを用いる際には、それによる制限事項に留意する必要があると思われる補正係数を用いる必要があることを示した。

D. 結論 実験的研究では、P450の阻害・誘導など種々のメカニズムにより化学物質相互による毒性、

発がん性やアレルギーの相加、相乗、新たな発現あるいは逆に抑制がおこることが明らかにされてきた。これらの予測は種々のin vivoあるいはin vitroの手法により可能となってきた。調査研究においては、一斉分析法により複数農薬の亜硝酸とアミンの複合投与は発がん性を示し、抗酸化剤はその発がんを阻害する。一方、亜硝酸と抗酸化剤は新たな発がん物質を生成する可能性が示された。肝培養細胞のギャップ結合細胞間連絡阻害作用及びその構成蛋白の発現を検討することにより、これらの結果を短期に予測できる可能性がある。アレルギーに関しては複数の化学物質の相互作用による増悪作用を捉えられる可能性が示唆された。また、相互作用による毒性発現を、in vitro試験から定量的に予測できる方法論を確立し、さらに多くの農薬等化学物質が、薬物代謝酵素を誘導・阻害し、その結果他の化学物質の毒性発現に関して重大な影響を及ぼす可能性が示された。調査研究では、一斉分析法を用いて、国内産農作物356検体について、197農薬の複数汚染実態を調査した結果、171検体(48%)から農薬、98検体(28%)から複数農薬が検出され、今後の農薬の安全性評価において相互作用を検討することの重要性が指摘された。また、残留農薬基準設定の基本となる曝露評価の精密化を図るため、曝露評価に特化した新たな食品摂取量データベースを開発した。

F. 発表論文

1) 論文発表

1. Ito, N., Imaida, K., Hagiwara, A., Tamano, S., Shirai, T. Effects of ingesting a combination of 20 or 40 pesticides at ADI levels on carcinogenesis in rats. *Reviews in Toxicology* 2, pp. 85-92: IOS Press, 1998.
2. Ito, N., Imaida, K., Hirose, M., Shirai, T.: Medium-term bioassays for carcinogenicity of chemical mixtures., *Environ. Health Perspect.*, 106: 1331-1336, 1998.
3. Sai, K., Upham, B. L., Kang, K.-S., Hasegawa, R., Inoue, T., Trosko, J.E. (1998) Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vit

ro. *Cancer Lett.*, 130, 9-17.

4. Y. Ohno, M. Sunouchi, A. Miyajima, Y. Ogawa, T. Umemura, T. Inoue, K. Nagamatsu. Lack of preneoplastic changes and induction of CYP2B11 in the liver of dogs treated with CNP. *Reviews in Toxicology* 2, 47-51 (1998)
5. K. Ito, T. Iwatsubo, S. Kanamitsu, Y. Nakajima, Y. Sugiyama. Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism together with binding and transport. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 461-499 (1998)
6. K. Ito, T. Iwatsubo, S. Kanamitsu, K. Ueda, H. Suzuki, Y. Sugiyama. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: Metabolic interaction in the liver. *Pharmacol. Rev.* 50 (3), 387-411 (1998)
7. Y. Akiyama, N. Yoshioka, M. Tsuji. Studies on pesticide degradation products in pesticide residue analysis, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 39(5), 303-309 (1998)

2) 学会発表

1. 宮内 慎、西川秋佳、古川文夫、中村英明、広瀬雅雄：抗酸化剤と亜硝酸の併用投与によるラット前胃への影響、第26回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集、208、1999.
2. 広瀬雅雄、宮内 慎、古川文夫、中村英明、西川秋佳：亜硝酸と抗酸化剤の複合投与によるラット前胃上皮に対する細胞増殖作用、第58回日本癌学会総会発表予定、1999.
3. Kang, K.-S., Sai, K., Inoue, T.: PCP-induced apoptosis is related to the inhibition of gap junctional intercellular communication through p53-dependent manner. 第8回国際トキシコロジー学会 (1998.7.)
4. Sai, K., Upham, B.L., Kang, K.-S., Hasegawa, R., Inoue, T., Trosko, J.E.: Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. 第8回国際トキシコロジー学会 (1998.7.)

5. 佐井君江、Kyung-Sun Kang, 黒川雄二、井上達：ペンタクロロフェノールによる培養肝細胞のアポトーシス誘導 - ギャップ結合細胞間連絡阻害及び酸化的ストレスの関連 - 第25回日本トキシコロジー学会 (1998.6.)
6. 佐井君江、長谷川隆一、黒川雄二、井上達：ペンタクロロフェノールのギャップ結合細胞間コミュニケーション阻害に対するエピガロカテキンガレートの効果。第57回日本癌学会総会(1998.10.)
7. 紅林秀雄、小澤正吾、宮島敦子、篠内桃子、韓晶、引間知広、酒見和枝、津田充宥、大野 泰雄：ジフェニルのラットおよびBDF1マウスでの代謝(1)。日本薬学会第118年会 (1998.3)
8. Y. Ohno, A. Miyajima, and M. Sunouchi, Alternativemethods for mechanistic studies in toxicology. (Evaluation of hepatotoxicity of insecticide by using hepatocytes), International Congress on Toxicology, (1998.7)
9. 紅林秀雄、大野泰雄：IBP (iprofenfos)の代謝(1)ラット及びヒト肝ミクロソームを用いた代謝。日本薬学会第119年会 (1999.3.30)
10. 金光真一、伊藤清美、奥田晴宏、小倉健一郎、C. E. Green、C. A. Tyson、島田典招、室 圭、渡部 烈、杉山雄一：薬物間相互作用の定量的予測：Mechanism-based inhibition に基づいた薬物代謝阻害。第13回日本薬物動態学会年会 (1998.11)
- G. 知的所有権の取得状況
該当せず

食品中化学物質の相互作用による発がんリスクの検討

主任研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨

食品添加物として使用されている亜硝酸とフェノール系抗酸化剤による複合作用を検討する目的で、ラットに抗酸化剤としてそれぞれ1%の α -トコフェロール (TP)、エリスルビン酸 (EthA)、 β -カロテン、ケルセチン、茶カテキン (GTC)、*o*-フェニルフェノール (OPP)、*p*-アミノフェノール (PAP)、クルクミン、ビスフェノールAあるいは陽性対照としてヒドロキノンの混餌食をそれぞれ単独で、あるいは0.2%亜硝酸（飲料水投与）と複合で4週間投与した。亜硝酸、基礎飼料のみを与えた群も設けた。屠殺1時間前にbromodeoxyuridine (BrdU)を腹腔内投与した。その結果、亜硝酸とエリスルビン酸、ヒドロキノンを与えた群で前胃に強い炎症を伴う過形成が発生し、TP、GTC、OPPでも複合投与により過形成が発生した。次に、ラット中期多臓器発がん試験法を用い、亜硝酸 (0.05%)、2級アミンであるアミノピリン (0.05%)、および新規の抗酸化剤であるアスコルビン酸 (0.25%) あるいは1-O-hexyl-1,2,5-trimethylhydroquinone (HTHQ, 0.25%) を単独あるいは複合で与え、それぞれ亜硝酸と2級アミンによる発がん、亜硝酸と2級アミンによる発がんに対するアスコルビン酸とHTHQの抑制効果、ならびに亜硝酸とアスコルビン酸あるいはHTHQの複合による発がんの危険性について検討した。その結果、AP+亜硝酸群では肝細胞腺腫、肝細胞がんおよび肝血管肉腫発生頻度が増加したが、これにAsAあるいはHTHQを加えた群ではこれらの発生頻度が減少した。AsA+亜硝酸群で前胃腫瘍発生頻度の増加はみられなかったが、HTHQ+亜硝酸群ではHTHQ単独群に比較して扁平上皮癌の発生頻度が10から40%に増加した。従って、亜硝酸と多くのフェノール系抗酸化剤の複合投与は、ラット前胃に細胞障害、細胞増殖や発がん促進を来す一方、亜硝酸とアミンによる肝腫瘍に発生に対しては抑制効果を示した。

A. 研究目的

亜硝酸は、胃内の酸性条件下において食品などに存在する2級アミンと反応し、発がん性のニトロソ化合物を生成することはよく知られており、これらの反応により生成されたニトロソ化合物が、重要なヒトがん発生要因であるといわれている。一方、アスコルビン酸 (AsA) やフェノール系抗酸化剤はニトロソ化合物の生成を阻害するため、すぐれた発がん抑制物質であるとされてきた。しかし、近年我々は、アスコルビン酸や多くのフェノール系抗酸化剤を亜硝酸と同時にラットに与えると、前胃に強い細胞増殖作用に加え、長期では腫瘍が発生することを見いだした。今回の実験では、食品添加物として用いられている亜硝酸と、数種類のフェノール系抗酸化剤を複合投与し、ラット前胃病変発生に対する影響を短期間でスクリーニ

ングするとともに、ラット中期多臓器発がん試験法を用い、亜硝酸、2級アミンであるアミノピリン、および新規の抗酸化剤であるアスコルビン酸あるいは1-O-hexyl-1,2,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) を単独あるいは複合で与え、それぞれ亜硝酸と2級アミンによる発がん、亜硝酸と2級アミンによる発がんに対するアスコルビン酸とHTHQの抑制効果、ならびに亜硝酸とアスコルビン酸あるいはHTHQの複合による発がんの危険性について検討した。

B. 研究方法

短期実験では、各群5匹の6週令F344雄ラット（日本チャールズリバー社より購入）に、抗酸化剤としてそれぞれ1%の α -トコフェロール (TP)、エリスルビン酸ソーダ (NaEA)、 β -カロテン (BC)、ケルセ

チン (QC)、茶カテキン (GTC) (ポリフェノン70 S[®]、エピガロカテキン;17.4%, エピカテキン;8.6%, エピガロカテキン ガレート;33.5%, エピカテキン ガレート;10.1%, ガロカテキン ガレート;3.2%, カテキン ガレート;0.6%)、*o*-フェニルフェノール (OPP)、*p*-アミノフェノール (PAP)、クルクミン (CUR)、ビスフェノールA (BPA) あるいは陽性対照としてヒドロキノン (HQ) の混餌食をそれぞれ単独で、あるいは0.2% 亜硝酸ソーダ (NaNO₂) と複合で4週間投与した。NaNO₂、粉末基礎飼料 (CRF-1) のみを与えた群も設けた。TP、HQ、NaEA、NaNO₂は和光純薬工業、BC、QC、BPAはシグマアルドリッチジャパン、OPP、PAP、CURは東京化成工業より購入し、GTCは三井農林より供与された。試験期間中、全動物の一般状態を毎日観察し、体重、摂餌量の測定を週1回行った。摂水量の測定は、週2回行った。4週間の投与期間後、エーテル麻酔下で放血し、剖検した。肝臓および腎臓は重量測定後、胃については、大弯に沿って開き、濾紙に張り付けて、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。固定した胃は6切片に切り、通常の方法に従ってパラフィン包埋後、薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色および抗増殖細胞核抗原 (PCNA) 抗体 (ダコ・ジャパン、京都) による免疫染色を行った。PCNA標識率については、各個体で約600の扁平上皮細胞を測定し、100細胞あたりの陽性細胞率を算出した。また、舌、食道、気管、甲状腺、脾臓、膵臓および大腸についても、同様に病理組織学的に検索した。

中期多臓器発がん試験法は、各群20匹の6週令F344系雄ラットにイニシエーターとして100mg/kg体重のN-diethylnitrosamine (DEN) を1回腹腔内投与、20mg/kg体重のN-methylnitrosourea (MNU) を週2回合計4回腹腔内投与、0.05% N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 飲料水投与2週間、40mg/kg体重の1,2-dimethylhydrazine (DMH) を週2回合計4回皮下投与、0.1% 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine (DHPN) 飲料水投与2週間の4種類の処置を実験開始4週の間に行った。イニシエーション処置終了後、各群20匹のラットに0.25% AsA (混餌投与)、0.25% HTHQ (混餌投与)、0.05% NaNO₂ (飲料水投与)、0.05% アミノピリン

(AP、混餌投与)、AsA+NaNO₂、HTHQ+NaNO₂、AP+NaNO₂、AP+AsA+NaNO₂、AP+HTHQ+NaNO₂ あるいは粉末基礎飼料 (オリエンタルMF) のみを合計24週間与えた。発がん物質、AsAおよびAPは東京化成工業より購入し、HTHQは日本ハイボックス社より提供された。体重および摂餌量はイニシエーション終了後週2回の割合で測定した。28週で屠殺剖検し、肝臓および腎臓は重量測定後、また食道、胃、大腸、小腸、肺については10%中性緩衝ホルマリンを注入し固定した。これら全身主要臓器および肉眼的異常病変の病理組織標本を作製し、腫瘍性病変および増殖性病変について解析した。統計学的処理にはStudent t 検定およびFisherの直接検定法を用いた。

C. 研究結果

短期試験において、体重はNaNO₂の投与で減少傾向を示し、さらにOPPおよびBPA投与で減少した。一方、肝比重量はCUR、OPP、HQ投与で有意に増加した。前胃過形成の発生率をTable 1に示した。抗酸化剤とNaNO₂の複合投与により、炎症、びらん、潰瘍および角化の亢進を伴った前胃の過形成が認められた。境界縁および前胃中間部の過形成を、軽微、軽度、中等度、強度の4段階に分類した。TP、NaEA、GTC、HQまたはOPPとNaNO₂複合投与により、境界縁および前胃中間部における過形成の発生率が増加した。この変化は、特にNaEAとHQで強かった。各抗酸化剤単独投与群およびNaNO₂単独投与群には、変化は認められなかった。PCNA標識率をTable 2に示した。NaEA、GTC、HQまたはOPPとNaNO₂複合投与により、基礎飼料のみの対照に比べPCNA標識率の有意な増加が認められた ($p < 0.05$ または $p < 0.01$)。TPとNaNO₂複合投与群では、有意差は認められないものの、NaNO₂単独群に比べてPCNA標識率の増加傾向が認められた。NaEAまたはHQとNaNO₂複合投与群では、NaNO₂またはHQ単独投与群に比べても、PCNA標識率の有意な増加が認められた ($p < 0.05$ または $p < 0.01$)。各抗酸化剤単独投与群およびNaNO₂単独投与群には、変化は認められなかった。なお、PAPとNaNO₂を同時に投与した群では1匹のみが実験終了まで生存し、死亡動物では組織学的に腎皮髄境界部の尿

細管に壊死が認められたが、前胃に変化はなかった。

中期多臓器発がん試験法では5種類のイニシエーターの投与により、舌、食道、前胃、大腸、小腸、肝、腎、膀胱、肺、鼻腔、甲状腺などに腫瘍あるいは増殖性病変が発生した。AsA、NaNO₂およびAPそれぞれの単独投与群では基礎食のみの対照に比べ、有意な腫瘍あるいは増殖性病変の発生増加は認められなかったが、HTHQの単独群で前胃乳頭腫が有意に増加した。AP+NaNO₂群では肝細胞腺腫、肝細胞がんの発生頻度がそれぞれ95、25%と、基礎食のみの対照5、5%に比較して増加した。また、肝の血管肉腫の頻度も対照の0%に対し35%と有意に増加した。一方、これにAsAあるいはHTHQを加えた群では肝細胞腺腫、肝細胞癌がそれぞれAsAで80、0%；HTHQで55%、0%と減少し、血管肉腫もそれぞれ15、15%に減少した。腎細胞腫の発生頻度もAP+NaNO₂群で増加したが、AsAあるいはHTHQを加えることによる抑制効果は観察されなかった。他の臓器においてAP+NaNO₂投与による腫瘍発生増加は認められなかった。なお、AsA+NaNO₂群で前胃腫瘍発生頻度の増加はみられなかったが、HTHQ+NaNO₂群ではHTHQ単独群に比較して扁平上皮癌の発生頻度が10から40%に増加した (Table 3ab, 4ab)。

D. 考察

短期試験では、新たにTP、GTC、EThA、OPPにもさほど強くはないものの、亜硝酸との複合による前胃上皮の炎症や過形成所見が認められた。

NaNO₂とAPをラットに複合投与すると、N-dimethylnitrosamineが胃内で生成され、肝(腎)に腫瘍が発生することは古くから知られていたが、今回の実験でもそれが確認された。また、AsAがAPと亜硝酸による肝発がんを抑制したことも以前の報告を裏づける結果である。我々はすでにN-nitroso-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) でイニシエーションを行ったラットに1% AsAと0.3% 亜硝酸を同時に51週間投与すると前胃発がんが促進され、かつイニシエーションを行わずにAsAと亜硝酸を投与した群においても前胃腫瘍が発生したことから、これらの複合に発がん性があることを指摘し

ている。今回の実験で発がん性を疑わせる結果が得られなかったことは、APの毒性が強いため、AsAおよびNaNO₂の投与量をそれぞれ0.25%、0.05%と、約4分の1まで下げざるを得なかったことによると考えられる。しかしこの用量で肝発がんが抑制され、前胃や他の臓器に何らの発がん促進が認められなかったことは、低用量であればAsAは発がん抑制にのみ作用するのかもしれない。HTHQは、新規に開発された脂溶性の抗酸化物質で、細胞内で脂質過酸化を強力に抑制する。我々はこの化学物質がcytochrome P450を阻害することにより、加熱食品中に含まれる発がん物質であるヘテロサイクリックアミンの発がん性や突然変異原性を強く抑制することを報告している。本実験では、HTHQもAsA以上に強いニトロソ化阻害作用を有することが明らかにされた。一方、HTHQは前胃発がんを促進することがすでに知られており、今回の実験でもそれが再確認された。さらに、新たにNaNO₂の存在下では、単独よりも明らかに強い発がん促進作用が示されることが明らかになった。HQ、カテコールやピロガロールなどのフェノール系化合物とNaNO₂の同時投与によるラット前胃上皮の細胞増殖作用の発現は、我々がすでに報告しておりHTHQの場合もその一連の変化であると考えられる。ただ、発がん促進の認められる臓器がヒトには存在しない前胃であるため、BHAですでに議論されたように、HTHQのヒトに対する危険性は極めて少ないものと考えられる。しかし、今後、前胃以外の臓器に対する影響、細胞増殖ならびに発がん促進機構、他の物質とNaNO₂との複合作用などについても検討する必要がある。

E. 結論

亜硝酸と多くのフェノール系抗酸化剤の複合投与は、ラット前胃に細胞障害、細胞増殖や発がん促進を来す一方、亜硝酸とアミンでによる肝腫瘍に発生に対して抑制効果を示す可能性が示された。

F. 発表論文

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

宮内 慎、西川秋佳、古川文夫、中村英明、広瀬雅雄：抗酸化剤と亜硝酸の併用投与によるラット前胃への影響、第26回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集、208、1999.

広瀬雅雄、宮内 慎、古川文夫、中村英明、西

川秋佳：亜硝酸と抗酸化剤の複合投与によるラット前胃上皮に対する細胞増殖作用、第58回日本癌学会総会発表予定、1999.

G. 知的所有権の取得状況
該当せず

Table 2 PCNA labeling indices in the forestomach epithelium

Treatment		No. of	PCNA labeling
NaNO ₂	Test chemicals	rats	indices
+	α -Tocopherol	5	24.6 \pm 4.6 ^{b)}
-	α -Tocopherol	5	15.9 \pm 8.3
+	Sodium erythorbate	5	43.2 \pm 4.5 ^{**, ##}
-	Sodium erythorbate	5	11.2 \pm 3.2
+	β -Carotene	5	13.2 \pm 8.0
-	β -Carotene	5	28.0 \pm 20.5
+	Quercetin	5	16.3 \pm 8.5
-	Quercetin	5	15.7 \pm 8.5
+	Green tea catechins	5	32.2 \pm 11.3 [*]
-	Green tea catechins	5	16.8 \pm 13.1
+	Hydroquinone	5	45.7 \pm 10.2 ^{**, #}
-	Hydroquinone	5	24.3 \pm 14.2
+	<i>o</i> -Phenylphenol	5	30.9 \pm 9.6 [*]
-	<i>o</i> -Phenylphenol	5	15.4 \pm 12.5
+	Curcumin	5	12.3 \pm 3.8
-	Curcumin	5	17.3 \pm 6.5
+	Bisphenol A	5	18.1 \pm 11.9
-	Bisphenol A	5	22.0 \pm 16.0
+	Basal diet	5	14.5 \pm 8.6
-	Basal diet	5	9.4 \pm 4.8

a): Mean \pm S.D

*: P<0.05 vs respective basal diet groups, **: P<0.01 vs respective basal diet groups
#: P<0.05 vs respective NaNO₂(-) groups, ##: P<0.01 vs respective NaNO₂(-) groups

Table 3a Histopathological changes in major organs of rats treated with AsA, NaNO₂ and aminopyrin either alone or in combination

Organs and lesions	Basal diet	AsA (0.25%)	NaNO ₂ (0.05%)	Aminopyrin (0.05%)	AsA NaNO ₂	Aminopyrin NaNO ₂	Aminopyrin NaNO ₂ AsA
	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
Thyroid							
Adenoma	7 (35)	7 (35)	8 (40)	12 (60)	6 (30)	6 (30)	11 (55)
Carcinoma	6 (30)	3 (15)	7 (35)	9 (45)	6 (30)	4 (20)	5 (25)
Nasal cavity							
Adenoma	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	5 (25)	1 (5)	0
Carcinoma	1 (5)	3 (15)	4 (20)	1 (5)	3 (15)	2 (10)	3 (15)
Lung							
Adenoma	8 (40)	9 (45)	9 (45)	9 (45)	6 (30)	8 (79)	12 (60)
Carcinoma	13 (65)	9 (45)	9 (45)	5 (25)	7 (35)	9 (45)	8 (40)
Tongue							
Hyperplasia	0	0	0	0	1 (5)	0	0
Papilloma	1 (5)	3 (15)	1 (5)	0	0	0	1 (5)
Esophagus							
Papilloma	1 (5)	1 (5)	0	1 (5)	1 (5)	0	1 (5)
Carcinoma	0	0	1 (5)	1 (5)	0	0	0
Forestomach							
Papilloma	1 (5)	1 (5)	4 (20)	2 (10)	1 (5)	2 (10)	0
Carcinoma	0	0	0	0	0	0	0

Table 3b Histopathological changes in major organs of rats treated with AsA, NaNO₂ and aminopyrin either alone or in combination

Organs and lesions	Basal diet		AsA (0.25%)		NaNO ₂ (0.05%)		Aminopyrin (0.05%)		AsA NaNO ₂		Aminopyrin NaNO ₂		Aminopyrin NaNO ₂ AsA	
	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
Liver														
Adenoma	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	19 (95)	16 (80)	16 (80)	16 (80)
Carcinoma	1 (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 (25)	0	0	0
Hamangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7 (35)	3 (15)	3 (15)	3 (15)
Small intestine														
Adenoma	4 (20)	0	0	6 (50)	3 (15)	3 (15)	0	0	0	0	0	0	0	1 (5)
Carcinoma	0	3 (15)	0	0	1 (5)	1 (5)	0	0	1 (5)	0	0	0	0	0
Large intestine														
Adenoma	2 (10)	2 (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Carcinoma	1 (5)	3 (15)	2 (10)	2 (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (5)
Kidney														
Renal cell tumors	5 (25)	13 (65)	11 (55)	11 (55)	10 (50)	10 (50)	10 (50)	10 (50)	11 (55)	12 (60)	12 (60)	16 (80)	16 (80)	16 (80)
Nephroblastoma	12 (60)	8 (40)	10 (50)	10 (50)	13 (65)	13 (65)	10 (50)	10 (50)	10 (50)	15 (75)	15 (75)	16 (80)	16 (80)	16 (80)
TCC	0	1 (5)	3 (15)	3 (15)	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Urinary bladder														
PN hyperplasia	0	4 (20)	0	0	2 (10)	2 (10)	0	0	4 (20)	0	0	1 (5)	0	1 (5)
Papilloma	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (5)	0	0	0	0	0 (20)
Carcinoma	1 (5)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	0	0	0	0	1 (5)	1 (5)	1 (5)	0	0	0

Table 4a Histopathological changes in major organs of rats treated with HTHQ, NaNO₂ and aminopyrin either alone or in combination

Organs and lesions	Basal diet		HTHQ (0.25%)		NaNO ₂ (0.05%)		Aminopyrin (0.05%)		HTHQ NaNO ₂		Aminopyrin NaNO ₂		HTHQ NaNO ₂	
	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
Thyroid														
Adenoma	7 (35)	9 (45)	8 (40)	12 (60)	7 (35)	6 (30)	10 (50)							
Carcinoma	6 (30)	11 (55)	7 (35)	8 (40)	8 (40)	4 (20)	3 (15)							
Nasal cavity														
Papilloma	1 (5)	3 (15)	1 (5)	1 (5)	3 (15)	1 (5)	3 (15)							
Carcinoma	1 (5)	0	4 (20)	1 (5)	1 (5)	2 (10)	1 (5)							
Lung														
Adenoma	8 (40)	7 (35)	9 (45)	9 (45)	9 (45)	8 (79)	9 (45)							
Carcinoma	13 (65)	8 (40)	9 (45)	5 (25)	9 (45)	9 (45)	10 (50)							
Tongue														
Hyperplasia	0	5 (25)	0	0	9 (45)	0	4 (20)							
Papilloma	1 (5)	3 (15)	1 (5)	0	1 (5)	0	3 (15)							
Esophagus														
Papilloma	1 (5)	0	0	1 (5)	0	0	1 (5)							
Carcinoma	0	0	1 (5)	1 (5)	1 (5)	0	1 (5)							
Forestomach														
Papilloma	1 (5)	13 (65)	4 (20)	2 (10)	10 (50)	2 (10)	8 (40)							
Carcinoma	0	2 (10)	0	0	8 (40)	0	5 (25)							

Table 4b Histopathological changes in major organs of rats treated with HTHQ, NaNO₂ and aminopyrin either alone or in combination

Organs and lesions	Basal diet n=20	HTHQ (0.25%) n=20	NaNO ₂ (0.05%) n=20	Aminopyrin (0.05%) n=20	HTHQ NaNO ₂ n=20	Aminopyrin NaNO ₂ n=20	Aminopyrin NaNO ₂ HTHQ n=20
Liver							
Adenoma	1 (5)	1 (5)	1 (5)	2 (10)	4 (20)	19 (95)	11 (55)
Carcinoma	1 (5)	0	0	0	1 (5)	5 (25)	1 (5)
Hamangiosarcoma	0	0	0	0	0	7 (35)	2 (10)
Small intestine							
Adenoma	4 (20)	0	6 (50)	3 (15)	0	0	0
Carcinoma	0	0	0	1 (5)	0	0	0
Large intestine							
Adenoma	2 (10)	0	0	0	0	0	1 (5)
Carcinoma	1 (5)	1 (5)	2 (10)	0	0	0	1 (5)
Kidney							
Renal cell tumors	5 (25)	8 (40)	11 (55)	10 (50)	9 (45)	12 (60)	11 (55)
Nephroblastoma	12 (60)	9 (45)	10 (50)	13 (65)	9 (45)	15 (75)	13 (85)
TCC	0	0	3 (15)	4	0	0	1 (5)
Urinary bladder							
PN hyperplasia	0	0	0	2 (10)	0	0	0
Papilloma	0	2 (10)	0	0	0	0	1 (5)
Carcinoma	1 (5)	0	2 (10)	0	1 (5)	1 (5)	1 (5)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

ギャップジャンクション構成分子の消退を指標とした
インビトロ発がんプロモーター検出系の開発と応用

分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長

研究要旨 本年度は肝発がんプロモーターである pentachlorophenol(PCP)を用いて、肝培養細胞のギャップ結合細胞間連絡(GJIC)阻害作用及びその構成蛋白(コネクシン)の発現に対する効果を検討した。その結果、PCPによる GJIC 阻害作用が2相性であることを見出し、後半の阻害には、コネクシン発現量の減少が寄与していることが示唆された。

A. 研究目的

本研究は、発がんプロモーター物質の検出のため、ギャップ結合細胞間連絡(GJIC)阻害作用及びギャップ結合構成分子コネクシンの発現・修飾を指標とし、さらにこれらの指標と諸物質のアポトーシスへの影響を同時に評価するインビトロ検出系の樹立と応用を目的とする。本年度は肝発がんプロモーターである pentachlorophenol(PCP)及びその代謝産物である tetrachlorohydroquinone(TCHQ)をモデル物質として、肝培養細胞の GJIC 阻害作用及びその構成蛋白(コネクシン)の発現に対する効果を解析し、この指標の有用性を検討した。

B. 研究方法

F344 の肝細胞由来の WB 細胞を 5%ウシ胎児血清存在下で confluent まで培養し、その後 PCP およびその代謝産物 TCHQ の添加による細胞毒性(neutral red 法)を解析した(Fig.1)。この結果に基づき、毒性の現れない条件下で、以下の解析を行った。GJIC は、従

来より利用されてきた培養細胞を用いる scrape lading/dye transfer 法により、PCP 処理後の GJIC 時間経過を調べた。またその阻害機序の解析のため、ギャップ結合構成蛋白(コネクシン)の発現量の変化及びそのリン酸化に対する修飾を、western blotting により、またコネクシン分子の細胞内局在性への影響は immunostaining 法により検討した。

C. 研究結果

1) PCP による GJIC の経時変化及び濃度依存的阻害

PCP(40 μ M)の処理により WB 細胞の GJIC は4時間後に約 40%阻害され、6~8時間後に回復が見られたが、16~24時間後に再び約 40%減少した(Fig.2)。

2)PCP の濃度依存的 GJIC 阻害

PCP 処理4時間後には 20 μ M から、24時間処理では 10 μ M から濃度依存的な GJIC 阻害が認められた(Fig. 3)。

3) TCHQ による GJIC への効果

代謝産物の TCHQ は、mutagenic な作用が PCP の発がんに関与するとされているが、このものについても検討した。その結果、この non-cytotoxic な最大濃度においても GJIC 阻害作用が認められなかった。この結果は、GJIC 阻害はいわゆる epigenetic な作用でおきる現象であるといわれるこれまでの知見と一致するものである (Fig.4)。

4) PCP 除去後の GJIC 回復の経時変化

PCP 除去後の GJIC は、4 時間処理の場合には 1~2 時間までに、24 時間処理では 4~6 時間後までにコントロールレベルまで回復した (Fig.5 &6)。この可逆的な GJIC 阻害様式は、プロモーター物質の生物作用特性の一つとされている。

5) PCP による CNX43 のリン酸化、発現量への影響

次に、この PCP による阻害機序として、コネクシン蛋白の発現量、またコネクシンのリン酸化の変化が関与しているかを western blotting で調べた。TPA は PKC の活性化を介して、コネクシンのリン酸化を亢進することが知られており、これが阻害機序に関わると考えられている。一方、PCP の場合には、阻害の見られる時点で、リン酸化の変化はないが、24 時間後では total の蛋白レベルの減少が認められた。従って、late phase でみられる阻害にはコネクシン発現の減少が関与している可能性が考えられる (Fig.7)。

6) PCP による CNX43 の細胞膜局在性への影響

コントロールでは細胞膜状に CNX43 のスポットが観察されるが、ある種の発がんプロ

モーターの投与、oncogene の発現によって、これが細胞質内や、核内に蓄積する例が知られている。しかし、PCP の場合には、阻害の見られる 4 時間及び 24 時間後においても、膜状での発現には影響が見られなかった。しかし、24 時間後にはスポットサイズの明らかな減少がみられ、これは先の蛋白レベルの減少と対応していた (Fig.8)。

D. 考察

以上の結果から、培養肝細胞の GJIC は、代謝産物の処理では影響が見られなかったが、PCP そのものにより可逆的に阻害されることが明らかとなり、この作用がプロモーター機序に深く関与しているものと推測された。またその阻害には、CNX43 のリン酸化および細胞膜上での発現には影響のない機序によることが示唆された。

E. 結論

本年度の肝発がんプロモーター物質を用いた実験により、本研究の基盤となる in vitro での GJIC 解析を指標とした実験系が、発がんプロモーター作用機構の解明において有用であることを示唆する結果が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sai, K., Upham, B. L., Kang, K.-S., Hasegawa, R., Inoue, T., Trosko, J.E. (1998) Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. *Cancer Lett.*, 130, 9-17.

2. 学会発表

1) Kang, K.-S., Sai, K., Inoue, T.: PCP-induced

apoptosis is related to the inhibition of gap junctional intercellular communication through p53-dependent manner. 第8回国際トキシコロジー学会 (1998.7.)

2) Sai, K., Upham, B.L., Kang, K.-S., Hasegawa, R., Inoue, T., Trosko, J.E.: Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. 第8回国際トキシコロジー学会 (1998.7.)

3) 佐井君江、Kyung-Sun Kang,黒川雄二、井上達:ペンタクロロフェノールによる培養肝細胞のアポトーシス誘導 -ギャップ結合細胞間連絡阻害及び酸化的ストレスの関連- 第25回日本トキシコロジー学会 (1998.6.)

4) 佐井君江、長谷川隆一、黒川雄二、井上達:ペンタクロロフェノールのギャップ結合細胞間コミュニケーション阻害に対するエピガロカテキンガレートの効果。第57回日本癌学会総会(1998.10.)

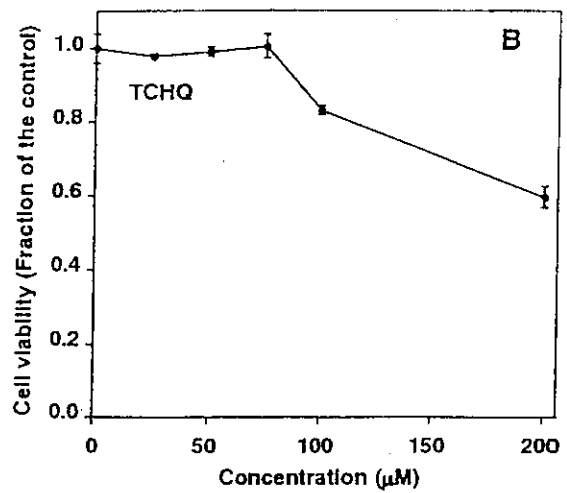
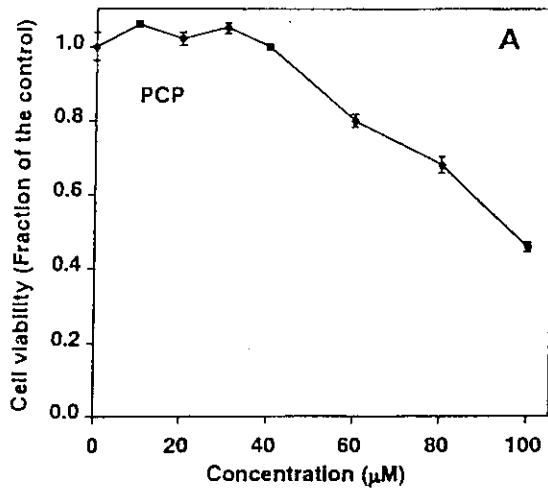


Fig. 1. Cytotoxicity in the WB cells after treatment with various concentrations of PCP or TCHQ. The cells were incubated with PCP for 24 h (A) or TCHQ for 1 h (B). Cell viability was assayed by measuring the uptake of neutral red into living cells. A value less than 1.0 represents cytotoxicity. Each point represents an average of three replicates \pm SD.

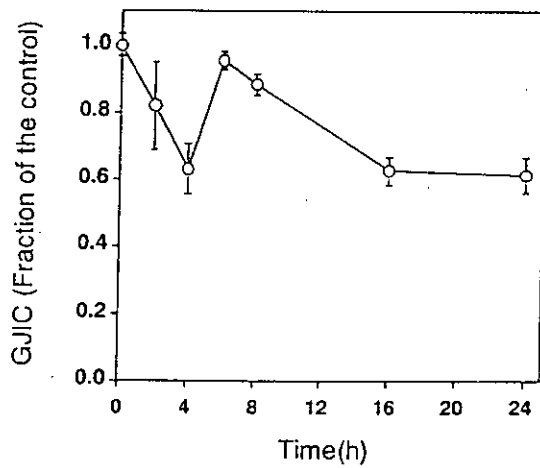


Fig. 2. Time-course of GJIC in WB cells after treatment with 40 μ M PCP for up to 24 h. A value less than 1.0 represents inhibition of GJIC. Each point represents an average of three replicates \pm SD.

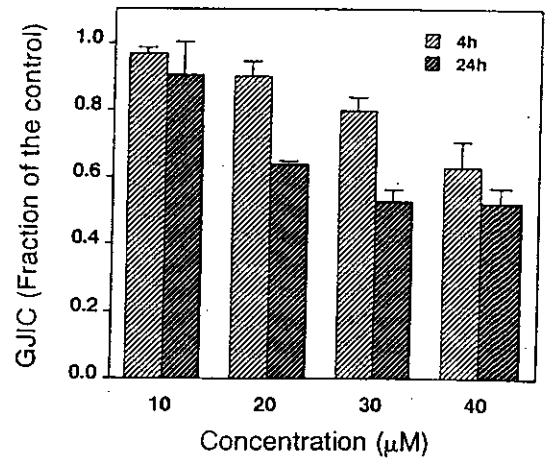


Fig. 3. Dose-related inhibition of GJIC in WB cells after treatment with PCP for 4 and 24 h. A value less than 1.0 represents inhibition of GJIC. Each point represents an average of three replicates \pm SD.

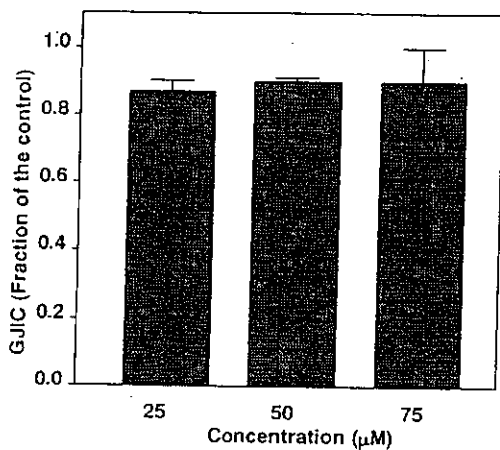


Fig. 4. GJIC in WB cells after treatment with TCHQ for 1 h. Each point represents an average of three replicates \pm SD.

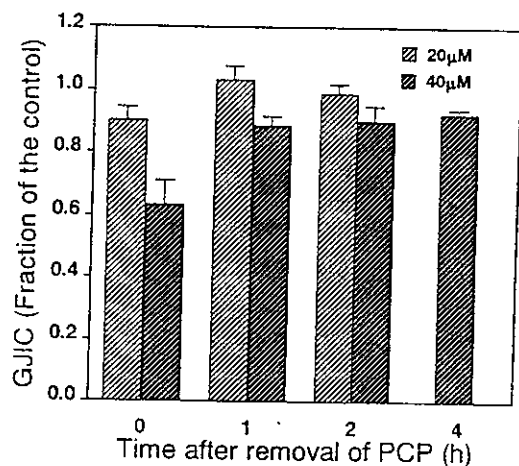


Fig. 5. Time-course for recovery of GJIC in WB cells after treatment with 20 or 40 μ M PCP for 4 h. A value less than 1.0 represents inhibition of GJIC. Each point represents an average of three replicates \pm SD.