

平成11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

総括研究報告書

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、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 と、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 Harman Norharman と MeIQx を同時投与すると MeIQx の発がん促進作用を減弱することが明らかとなった。一方、MeIQx と食品添加物である亜硝酸を同時投与すると CYP1A1 の発現上昇が認められ、MeIQx の発がん作用を強く増強した。また、農薬である Fenbendazole は、MeIQx を代謝活性化する CYP1A2 を誘導する事が報告されているが、MeIQx との同時投与でもその発がん性を修飾しないことが明らかとなった。食品添加物である亜硝酸と α -tocopherol は複合投与によりラット前胃に発がんプロモーション作用を示し、*t*-butylhydroquinone、propyl gallate でも亜硝酸との複合により弱いながら同様の作用のあることが明らかにされた。ギャップ結合細胞間連絡(GJIC)とともにアポトーシスを指標に加えた発がんプロモーター検出系の確立のため、肝発がんプロモーター pentachlorophenol (PCP)を用い、*v*-myc 遺伝子導入によりアポトーシス亢進系とした培養肝細胞(WB-MYC 細胞)での解析の有用性を検討した結果、PCP によりアポトーシス阻害性ならびにそれに先行する GJIC 阻害性が検出された。従って、GJIC 及びアポトーシスの双方を指標とした本解析系は、複数の化学物質による発がんプロモーター作用の評価系として有用であると考えられた。農薬等食品中化学物質相互のアレルギー増強作用の有無を検討するための *in vitro* モデル系を用いて、フェントエート(PAP)、クロロニトロフェン(CNP)及びバラコートについて肥満細胞からの脱顆粒反応への影響について検討した結果、CNP および PAP で、IgE 感作されたマスト細胞の抗原刺激に伴う脱顆粒促進活性が観察された。また、NC/Nga マウスを用いた実験では、I 型アレルギー状態においてフェニトロチオン(FTN) 投与により、脾細胞培養上清中の総 IgM 濃度および IL-10 濃度に影響が認められ、これらの系で複数の化学物質の相互作用によるアレルギーの増悪作用を捉えられる可能性が示唆された。ゴム保存剤である Mercaptobenzimidazole (MBI)、その類縁化合物 2-Mercapto-4-methylbenzimidazole (4-MMBI)と 2-Mercapto-5-methyl-benzimidazole (5-MMBI)および多くのフラノクマリン類は薬物代謝酵素を誘導あるいは阻害するため、薬物相互作用を起こす可能性が示された。*in vivo* 薬物間相互作用の予測に関しては、肝臓入口における阻害剤濃度を用いることによりある程度定量的な予測が可能であり、循環血中濃度のみを用いた場合には大きく過小評価される可能性があることが示唆された。

調査研究では、一斉分析法を用いて輸入農作物7337検体について221農薬の複数汚染実態を調査した結果、輸入農作物のプロッコリーから6種農薬、イチゴから3~5種農薬、アスパラガスから4種農薬、ブドウから3~4種農薬、大葉、ハーリーバジル、桜桃、オレンジ、グレープフルーツ、サヤエンドウ、メロン、チャニーズケール、オオバコエンドロ、ウーロン茶及びディルから3種農薬、また小麦から2種農薬が同時に検出されることが明らかとなり、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、残留農薬等食品中に含まれる化学物質の曝露評価の精密化を図るため、米国のEPAが開発している“DEPM (Dietary Exposure Potential Model)”における食物摂取データベース部分の日本版の構築を行った。

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薬野研究所

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暴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】4週にわたりsodium erythorbic acid (EA)あるいはhydroquinone (HQ)と亜硝酸ソーダ(以下亜硝酸)をそれぞれ単独あるいは同時投与して得られた前胃切片について抗 iNOS、COX-2 およびN-tyrosine 抗体を用い免疫染色を行った。また、ラットに1%EAあるいは1%HQと0.2%亜硝酸の単独、あるいは複合投与を4週間行い、経時的に尿中の8-OHdGを測定した。短期スクリーニング試験として、それぞれ1%のphenylalanine (PHA)、nicotinamide (NAM)、N-acetylcysteine (NAC)、di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)、0.1% p-phenylenediamine (PPD)、0.1% benzyl isothiocyanate (BITC)の混餌食をそれぞれ単独、あるいは0.2% 亜硝酸と複合で4週間投与し、諸臓器に対する影響を検索した。中期実験としてN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)ラット胃発がん2段階胃発がん試験法を用いて、イニシエーション終了後から1%の α -tocopherol (TP)、*t*-butylhydroquinone (TBHQ)あるいはpropyl galate (PG)と0.2%の亜硝酸をそれぞれ単独あるいは複合で35週間投与し、前胃及び腺胃に及ぼす影響を検討した。

【白井】動物はF344雄ラット6週令を用い、DEN2 00mg/kgを腹腔内投与2週間後MeIQx (0.03%)とHarman (0.05%), Norharman (0.05%)または亜硝酸(0.1%)を6週間同時投与し、実験開始3週後に肝部分切除を行い、実験期間8週で剖検屠殺を行い肝の前癌病変巢マーカーであるGST-Pの単位面積あたりの数と面積を計測した。同様に、MeIQx (0.03%)とFenbendazole (0.02, 0.06%)との同時投与の影響を検索した。また、これらの複合投与を2週間行ったラット肝からmRNAを抽出し、定量的RT-PCR法にて各種のCYPの発現を検索した。

【井上】本解析には、血清除去によりアポトーシスを亢進する特徴のある、*v*-mycを遺伝子導入したラット肝由来のWB細胞(WB-MYC細胞)を用い、アポトーシスに対するPCP処理の阻害効果を検討した。血清存在下でconfluentまで培養したWB-MYC細胞を、無血清培養液に置き換え、同時にPCP処理を開始して、GJIC阻害とアポトーシスについて解析を行っ

た。GJICについては、scrape loading dye transfer法により、アポトーシスの指標としては、形態的变化、DNA切断等によって解析した。またそれぞれの阻害要因を考察するため、GJICについてはconnexin 43 (Cx43)の発現・局在性、また、アポトーシス阻害要因について、特にp53の発現変化の可能性について検討した。

【小野】*in vitro*アレルギーモデルの検討ではRBL-2H3細胞、または分化させたBMMC、SCF (80ng/ml)及びヒト臍帯血由来肥満細胞をマイクロタイタープレートに1mlずつ加え、CO₂インキュベータ中で培養した。RBL-2H3細胞、BMMCについてはDNP特異的マウスモノクローナルIgE抗体溶液5 μ gを培養液中に加えた。ヒト肥満細胞については、ヒトIgE (1mg/ml)、IL-4 (20ng/ml)を培養液に加えて細胞の感作を行った。上清を除き、細胞をPIPES緩衝液で洗浄した後、各種濃度のフェントエート(PAP)、クロロニトロフェン(CNP)、パラコートを加え37℃で30分培養し、次いで抗原(DNP-BSA、10mg/ml)または、抗ヒトIgE抗体(2mg/ml)を加え刺激を開始した。刺激開始35分後に上清を分取し、上清中に放出された β -hexosaminidase活性を基質を用いて比色法にて測定し、脱顆粒の程度の指標とした。*in vivo*アレルギーモデル系の検討では4週齢の雄NC/Ngaマウスを使用し、DEX 0.5mg/kgを週5回、3週間経口投与することにより免疫抑制状態とした動物及び0.075% トルエンジイソシアネート(TDI)を週1回、3週間塗布することによりI型アレルギー状態とした動物を作製した。これらの物質を単独あるいは複合的に作用させた動物に対するフェニトロチオン(FTN) 6mg/kg投与の影響を検討した。最終感作投与の7日後に解剖し、脾臓および胸腺重量の測定、脾細胞の分泌するIgM、サイトカイン(IL-10, IFN- γ)濃度の測定(マウスIL-10, IFN- γ ELISAキット:バイオソース)を行った。腹部下大静脈より採血して得た血清を用いて、血清中総IgE濃度をマウス IgE ELISA キットヤマサを用いて測定した。

【大野】ゴム保存剤として広く使用されているMercaptobenzimidazole (MBI)およびその類縁化合物2-Mercapto-4-methylbenzimidazole (4-MMBI), 2-Mercapto-5-methyl-benzimidazole (5-MMBI)の肝薬物代謝活性に対する影響をラットを用い検討した。また、キョウカツやハクジュツ(共にセリ科)を中心とする薬用植物に含まれるフラノクマリン誘導体のヒトチトクロームP450、とくにCYP3A4に対する阻害作用を検討した。さらに薬物の血中濃度、肝臓中濃度、および肝臓中の酵素活性を直接測定することが可能な動物実験を行うことにより、Mechanis

m-based inhibitionに基づく薬物間相互作用のin vitroからin vivoへの予測法の妥当性について検討した。

【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、国産及び輸入農作物中の複数農薬の残留実態を調査した。本年度は輸入農作物7337検体を調査対象とし、24種有機塩素系農薬、18種ピレスロイド系農薬、69種有機リン系農薬及び84種含窒素系農薬等はECD、FPDまたはFTDを装着したクロマトグラフを用いて測定し、15種N-メチルカルバメート系農薬はポストカラム高速液体クロマトグラフで測定した。

【吉池】農薬等暴露量試算のための農作物群別摂取量データベースの構築では1995～97年国民栄養調査のデータファイル“食品摂取量単品票”を用い、性・年齢階級別あるいは妊婦をサブグループとして、体重kg当たりの当該農産物摂取量を求めた。学校給食における農作物の摂取量に関する検討では、4地域の小学校給食における献立データを用いて、国民栄養調査における食品番号に基づき、各食品の使用重量をデータベース化した。農作物の加工・調理形態別摂取量割合に関する検討では、1995年国民栄養調査の栄養摂取状況調査票について、通常データ入力となされる食品番号、純使用量および案分比率に加えて、被調査者が記録した料理名や食品名を原票に記載された通りにテキストデータを全件入力し、1次データベースとした。それもとに栄養士が料理名の整理・分類を行い2次データベースとした。このようにしてリストアップされた各料理および食品について、調理形態別に19群に分類し、3次データベースとした。3次データベースを用いて、農作物およびそれを材料として製造されている食品毎に、主要な調理形態別の摂取重量割合を求めた。急性暴露評価のための体重kg当たりの1日摂取量分布に関する検討では、triazophosによる幼小児に対するコリンエステラーゼ抑制に関する急性暴露影響のモデルとして、英国ですでに検討が行われているリンゴおよびニンジンについて、摂取量の分布を検討した。

C. 研究結果

【広瀬】いずれの標本についてもiNOSおよびN-tyrosineは前胃上皮細胞中には染色されず、EAあるいはHQと亜硝酸を同時投与して発生した潰瘍性病変に浸潤している炎症性細胞にのみ陽性であった。一方、COX-2は炎症性細胞以外にも潰瘍周囲部の上皮細胞にわずかに染色された。尿中8-OHdGの増加は経過中いずれの群にも認められなかった。短期スクリーニング試験ではPHA及びNAC群で亜硝酸

との複合で腎尿細管の円柱が増加する傾向が認められた。胃2段階発がん試験法では、TP投与群で亜硝酸の複合で乳頭腫の発生頻度及び平均個数が有意に増加し、前胃発がんのプロモーション作用が認められた。TBHQ、PGでも軽度ながら同様な傾向が観察された。

【白井】加熱した肉魚類にふく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と食品添加物である亜硝酸を同時投与するとMeIQxの発がん性が強く亢進することが明らかとなり、MeIQxを代謝するとされるCYP1A1の顕著なmRNAの上昇が見られた。MeIQxと食品中に存在するHarmanまたはNorharmanの同時投与を行うと、これらは逆にMeIQxの発癌性を減弱させた。また、ラットに農薬であり、かつMeIQxを代謝活性化するCYP1A2を誘導するFenbendazoleはMeIQxとの同時投与でもその発がん性を修飾しないことが明らかとなった。

【井上】WB細胞を用い、GJIC阻害性についてSL/D T法で解析した結果、コントロールでは12時間後までは大きな変化はなかったが、PCP処理では1時間後から有意な阻害効果が見られた。血清除去12時間後に細胞および染色体形態を観察した結果、アポトーシスに伴い認められる離脱細胞の増加、染色体の凝縮を示す細胞の頻度は、PCP処理で非常に減少した。DNAラダーアッセイによってアポトーシスの時間経過を解析した結果でも、PCP処理6時間から12時間にかけて明らかにラダー形成が抑制された。GJIC機能に関わるCx43の発現を、PCPが転写レベルで抑制しているかについてRT-PCRで解析した結果、PCP処理により6時間以降からmRNAレベルでの減少が認められた。さらに、Cx43の細胞膜での局在性の変化について、immunostainingで解析した結果、PCP処理では、細胞膜における発現には影響がないが、プラークの密度、大きさがコントロールより減少していた。アポトーシス阻害の要因として、p53の発現レベル、ならびにアポトーシス抑制因子であるBcl-2の発現に対する影響をWestern blottingにより定量解析した結果、P53レベルはPCP処理により6時間以降より減少傾向が観察された。一方BCL-2の発現レベルには、12時間の処理時間を通しては、処理による有意な影響は見られなかった。P53に対する作用として、PCPがp53の核内移行を抑制する可能性が考えられるので、p53のimmunostainingで細胞内局在性を解析した。血清存在下のコントロールでは細胞質内に局在が見られ、またアポトーシスが進行している細胞では、核内に発現が見られた。また血清除去後では核内に局在した細胞が増加した。一方、PCP処理によってもp53の核内での局在が多く細胞に見られた。

【小野】 *in vitro*アレルギーモデル系の検討では、RBL-2H3細胞からの抗原刺激に伴う脱顆粒(β -hexosaminidase)遊離は、10mg/mLのparaquat及びCNP存在下で有意に上昇した。PAPは、高濃度の1mg/mLで脱顆粒反応を亢進する傾向がみられた。同様の傾向は、BMMCからの抗原刺激に伴う脱顆粒反応でもみられ、paraquat 10mg/mL, CNP 10-100mg/mL, PAP 1mg/mLで増強効果が観察された。CNPについて、ヒト臍帯血由来肥満細胞からのIgE受容体架橋形成に伴う脱顆粒反応への影響を調べた結果、100mg/mlの濃度で上昇させる傾向のあることが確認された。*in vivo*アレルギーモデル系の検討ではDEX投与により脾臓および胸腺重量の低下が認められたが、FTN併用投与による変化は認められなかった。アレルギー物質(TDI)投与によって脾臓および胸腺重量の変化は認められず、FTN併用投与による変化も認められなかった。脾細胞をmitogen (PHA)刺激のもとに7日間培養したときの培養上清中の総IgM濃度は、DEXあるいはTDI単独投与群に比べ併用投与で上昇した。対照群を含め、DEXおよびTDIの単独あるいは併用投与群における総IgM濃度は、FTNの複合投与により抑制される傾向が認められた。IL-10濃度は、DEXおよびTDI投与により上昇したが、FTNの併用投与による変化は認められなかった。本モデルで複数の化学物質の複合作用によるアレルギーの増悪作用を捉えられる可能性が示唆された。

【大野】 1. MBIの反復投与は肝Microsomeの薬物代謝活性を低下させた。一方、MBIの4-あるいは5-位のメチル化体(それぞれ4-MMBI, 5-MMBI)ではこのような抑制は認められず、逆に代謝活性を誘導した。これらに対応してMBIではCYP2C11とCYP3AおよびCYP4A1が大きく低下し、4-MMBIと5-MMBIではCYP1A1/2あるいはCYP2B1/2が大きく増加した。一方、*in vitro*でこれらはいずれもTestosteroneの主代謝経路であるCYP3Aの関与する 6β 水酸化活性を強く阻害した。これらのことから上の三化合物は他の薬物の代謝を阻害あるいは代謝活性の促進によりする薬物相互作用を起こす可能性が示された。2. 食品あるいは生薬中に含まれる成分による薬物代謝酵素阻害活性を検討したところ、多くのフラノクマリン類がCYP3Aの関与するTestosteroneの 6β 水酸化活性を低濃度で強く抑制することを示した。3. *in vivo*薬物間相互作用は、肝臓入口における阻害剤濃度を用いることによりある程度定量的な予測が可能であり、循環血中濃度のみを用いた場合には大きく過小評価される可能性があることが示唆された。

【豊田】 本年度は輸入農作物7337検体について、21農薬の複数汚染実態を調査した結果、輸入農作

物のブロッコリーから6種農薬、イチゴから3~5種農薬、アスパラガスから4種農薬、ブドウから3~4種農薬、大葉、ハーリーバジル、桜桃、オレンジ、グレープフルーツ、サヤエンドウ、メロン、チャイニーズケール、オオバコエンドロ、ウーロン茶及びディルから3種農薬、また小麦から2種農薬が同時に検出されることが明らかとなった。同時検出例として、米国産ブロッコリーから有機リン系農薬のデメトン-S-メチル、デメトン-S-メチルスルホン、クロルピリホス及びピリミホスメチル、ピレスロイド系農薬のベルメトリン及びイプロジオンが検出されている。またタイ産アスパラガスからは有機リン系農薬のピリミホスメチル、ピレスロイド系農薬のシベルメトリン、フルシトリネート及びフルバリネートが検出されている。

【吉池】 暴露量試算のための農作物群別摂取量データベースの構築については、1995年~97年の3カ年の国民栄養調査データを集積し、1歳以上の調査対象者のうち体重データが得られている36,232名について、体重kg当たりの摂取量データの平均値を、性・年齢階級別に示した。そのうち、妊婦は179名、幼児(1~6歳)は2403名であった。この表に基づき、現在、日本国内における残留農薬基準値案に関して、暴露量試算が実施されている。学校給食における農作物の摂取量に関する検討では、1997年国民栄養(n=746人)、兵庫県A市(N=188日の献立)、東京都K区(N=79日)、兵庫県S市(N=79日)、兵庫県S町(N=79日)から算出した結果、小学生(7~11歳)の昼食からの主な農作物の平均摂取量は、はくさい、りんご、だいごんの摂取量が、4校の給食データと比較して際だって高く、キャベツおよびレタスの摂取量が低かった。また、米については、国民栄養調査では最も低かったが、地域(学校)間の差も大きいようであった。農作物の加工・調理形態別摂取量割合に関する検討では、大豆および大豆を原料とする食品について、加工形態別、調理形態別の摂取重量割合を示した。例えば、「豆腐」は、すべての大豆および大豆製品の内、約53%の摂取割合であり、逆に「大豆」としては約33%が「豆腐」から摂取されていると考えられる。さらに、「豆腐」のうち、約44%が「soup」として、また約40%が「stew」として調理されていることが示されている。同様に、トマト、じゃがいも、だいごん、みかん、りんごについて、加工・調理形態別摂取量割合を検討した。急性暴露評価のための体重kg当たりの1日摂取量分布に関する検討では、「りんご(生)」および「ニンジン」の年齢階層別摂取量分布のバ

ターンは、両者ともに1～6歳における“体重kg当たりの高摂取者”の割合が、他の群と比較してきわめて高かった。

D. 結論

前年度に引き続き実験的研究では、P450の阻害・誘導、化学物質相互の反応などにより、亜硝酸と種々の抗酸化剤のみならず、亜硝酸とヘテロサイクリックアミン、ヘテロサイクリックアミンとharman, norharman, 異なった種類の農薬どうしなどで種々の毒性や発がんプロモーションの層化、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。複数の発がんプロモーターによる相互作用のインビトロ評価系として、ギャップ結合細胞間連絡(GJIC)とともにアポトーシスを指標に加えた系は、発がんプロモーター物質による2つの生物作用特性(GJIC阻害、アポトーシス阻害の両事象を評価の対象としている点、両事象を高感度に検出できる培養細胞系である点、迅速で効率的である点さらにメカニズム研究に有用であるなどの利点があり、有用であることが期待される。また、相互作用による毒性発現を、肝臓入り口の阻害剤濃度を指標としてin vitro試験から定量的に予測できる方法論を確立した。

アレルギーに関しては、脱顆粒反応への影響について検討した結果、CNPおよびPAPで、IgE感作されたマスト細胞の抗原刺激に伴う脱顆粒促進活性が観察された。また、NC/Ngaマウスを用いDEX投与による免疫抑制状態およびTDI投与によるI型アレルギー状態における有機リン系農薬(FTN)投与の影響を調べた結果、脾細胞培養上清中の総IgM濃度およびIL-10濃度に影響が認められ、これらのモデルで複数の化学物質の複合作用によるアレルギーの増悪作用を捉えられる可能性が示唆された。

調査研究では、一斉分析法を用いて、輸入農作物7337検体について、221農薬の複数汚染実態を調査した結果、ブロッコリーなど16種類の農作物から2～6種類農薬が同時に検出され、今後の輸入農作物についても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。

F. 発表論文

1) 論文発表

1. Shirai, T., Hirose, M., Ito, N. Medium-term bioassays in rats for rapid detection of the carcinogenic potential of chemicals. In: D. B. McGregory,

J. M. Rice, S. Venitt (eds.), The Use of Short- and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation, Vol. IARC Scientific Publications No. 146, pp. 251-272. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1999.

2. Moore, M. A., Tsuda, H., Tamano, S., Hagiwara, A., Imaida, K., Shirai, T., Ito, N. : Marriage of medium-term liver model to surrogate markers - a practical approach for risk and benefit assessment. *Toxicol. Pathol.* 27: 237-242, 1999.
3. Hirose, M., Takahashi, S., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T., Shibutani, M., Uneyama, C., Toyoda, K., Iwata, H. : Chemoprevention of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats. *Cancer Lett.* 143: 173-178, 1999.
4. Hirose, M., Takahashi, S., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T. : Phenolics: Blocking agents for heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Fd. Chem. Toxic.* 37: 985-992, 1999.
5. Furukawa, F., Nishikawa, A., Ishiwata, H., Takahashi, M., Hayashi, Y. and Hirose, M. Renal carcinogenicity of concurrently administered fish meal and sodium nitrite in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 139-147, 2000.
6. Furukawa, M., Nishikawa, A., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H.-Y. and Hirose, M. Concurrent administration of fish meal and sodium nitrite does not promote glandular stomach carcinogenesis in rats after treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Toxicol. Pathol.*, 12, 171-176, 1999.
7. Furukawa, M., Nishikawa, A., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H.-Y., Yamagishi, M. and Hirose, M. Concurrent administration of fish meal and sodium nitrite does not promote renal carcinogenesis in rats after initiation with N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine. *Cancer Lett.*, 2000, in press.
8. Sakemi K., Usami M., Mitsunaga K., Ohno Y., Tsuda M., Comparative toxicokinetic study of rubber antioxidants. 2-Mercaptobenzimidazole and 2-mercapto-methylbenzimidazole, by single oral administration in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 24, 399-405, 1999.
9. Saitoh M., Umemura T., Ohno Y., Tsuda M., T

- otoxicity study of a rubber antioxidant, mixture of 2-mercapto-methylbenzimidazoles, by repeated oral administration to rats. *Fd. Chem. Toxicol.*, 37, 777-787, 1999.
10. 山添康: "薬物相互作用" 岩波講座「現代医学の基礎」第13巻「薬物動態と薬効」岩波書店 1999
 11. Guo, L.-Q., Taniguchi, M., Xiao, Y.-Q., Baba, K., Ohta, T. and Yamazoe, Y. Inhibitory effect of natural furanocoumarins on human microsomal cytochrome P450 3A activity. *Jpn. J. Pharmacol.*, 82: 122-129, 2000.
 12. Tassaneeyakul, W., Tassaneeyakul, W., Vannaprasaht, S. and Yamazoe, Y. Omeprazole sulfone, but not 5-hydroxyomeprazole, is inhibited by ingestion of grapefruit juice. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 49: 139-144, 2000.
 13. Nakamura, T., Okada, K., Nagata, K. and Yamazoe, Y. Intestinal cytochrome P450 and response to rifampicin in rabbits. *Jpn. J. Pharmacol.*, 82: 2000, in press.
 14. Kanamitsu, S., Ito, K., Okuda, H., Ogura, K., Watabe, T., Muro, K., Sugiyama, Y. Prediction of in vivo Drug-Drug Interaction based on Mechanism-based Inhibition from in vitro Data: Inhibition of 5-Fluorouracil metabolism by (E)-5-(2-Bromovinyl)uracil. *Drug Metab. Dispos.* 2000, in press.
 15. Kanamitsu, S., Ito, K., Green, C. E., Tyson, C. A., Shimada, N., Sugiyama, Y. Prediction of in vivo interaction between triazolam and erythromycin based on in vitro studies using human liver microsomes and recombinant human CYP3A4. *Pharm. Res.* 2000, in press.
 16. Kanamitsu, S., Ito, K., Sugiyama, Y. Quantitative prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data based on physiological pharmacokinetics: Use of maximum unbound concentration of inhibitor at the inlet to the liver. *Pharm. Res.* 2000, in press.
 17. Komatsu, K., Ito, K., Nakajima, Y., Kanamitsu, S., Imaoka, S., Funae, Y., Green, C. E., Tyson, C. A., Shimada, N., Sugiyama, Y. Prediction of in vivo drug-drug interactions between tolbutamide and various sulfonamides in humans based on in vitro experiments. *Drug Metab. Dispos.* 2000, in press.
 18. Akiyama, Y., Yoshioka, N., Tsuji M.: Solid-phase extraction for cleanup of pesticide residues suspected as endocrine disruptors in foods, *J. Health Sci.*, 46, 49-55, 2000.
 19. 根本了、忠田吉弘、長尾影文、佐々木久美子、豊田正武: 農作物中の17種有機塩素系農薬及び9種ピレスロイド系農薬の同時分析法の検討、*Bull. Natl. Health Sci.*, 117,155-162, 1999.
- 2) 学会発表
1. 白井智之: 動物がん予防研究の現状と展望, 第6回がん予防研究会, 1999.
 2. 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. p.208, 1999.
 3. 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回日本癌学会総会記事, p.425, 1999.
 4. Effects Of combined treatment with antioxidants and sodium nitrite on the rat forestomach. M. Miyauchi, A. Nishikawa, F. Furukawa, H. Nakamura, H-Y. Son, T. Ikeda, T. Imazawa and M. Hirose, *Toxicological Sciences*, 54, p.269, 2000.
 5. Pentachlorophenol inhibits gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. 1999 International Gap junction Conference Gwatt, Switzerland (August 28 ~ September 2, 1999)
 6. 佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上 達: Pentachlorophenolの肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連: 第58回日本癌学会総会、広島(平成11年9月29日~10月1日)
 7. K.Sai, J.E.Trosko, T.Inoue: Pentachlorophenol-induced down-regulation of gap junctional intercellular communication was ameliorated by (-)-epigallocatechin gallate in rat liver epithelial cells.

- Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication, Ann Arbor, Michigan (Oct.17-20,1999)
8. 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)
 9. Y. Ohno, A. Miyajima, and M. Sunouchi, Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. (Evaluation of hepatotoxicity of insecticide by using hepatocytes), International Congress on Toxicology, (1998.7)
 10. 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)
 11. 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
なし

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

亜硝酸と抗酸化剤である erythorbic acid、hydroquinone の複合投与により発生するラット前胃粘膜の傷害と強い過形成の発生機構を解明する目的で、前胃標本について iNOS、COX-2、N-tyrosine の免疫染色を行い、また尿中 8-OHdG の経時的観察を行ったが、炎症に関与する COX-2 の弱い発現が上皮内に観察されたのみで、活性酸素が関与する証拠は得られなかった。新たに数種類のアミンおよび非遺伝子傷害性発がん物質について NaNO₂ の複合影響について検討した結果、phenylalanine と N-acetylcysteine で NaNO₂ の複合による腎尿細管の円柱の増加が認められた。また、t-butylhydroquinone (TBHQ)、α-tocopherol (TP) あるいは propyl gallate (PG) と NaNO₂ の複合によるラット胃発がんに対する修飾作用を 2 段階発がん試験法を用いて検討した結果、TP で複合による明らかな前胃発がん促進作用が認められ、TBHQ と PG でも弱いながら同様な作用が認められた。

A. 研究目的

亜硝酸は食品添加物として広く用いられている。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。今年度は、前年度から引き続き亜硝酸と抗酸化剤による前胃細胞増殖作用の発生機構の解析を行う目的で炎症あるいは活性酸素に関する指標を検索するとともに、亜硝酸と数種類の食品中化合物を複合投与し、諸臓器に対する影響を短期間でスクリーニングし、さらに食品添加物である t-butylhydroquinone (TBHQ)、α-tocopherol (TP) 及び propyl gallate (PG) についてはラット胃発がんに対する影響を 2 段階発がん試験法を用いて検討した。

B. 研究方法

【実験1】前年度の実験で、4週にわたり sodium erythorbic acid (EA) あるいは hydroquinone (HQ) と

NaNO₂ をそれぞれ単独あるいは同時投与して得られた前胃切片について抗 iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CF)、COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CF) および N-tyrosine (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) 抗体を用いて免疫染色を行った。また、各群 5 匹の 6 週令 F344 系雄ラットに 1% EA あるいは 1% HQ と 0.2% NaNO₂ の単独、あるいは複合投与を 4 週間行い、0、1、2、4 週目に経時的に採尿し、8-OHdG Check ELISA キット (日研フード株式会社) を用いて尿中 8-OHdG を測定した。

【実験2】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、被験物質としてそれぞれ 1% の phenylalanine (PHA)、nicotinamide (NAM)、N-acetylcysteine (NAC)、di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)、0.1% p-phenylenediamine (PPD)、0.1% benzyl isothiocyanate (BITC) 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。使用した化学物質はいずれも和光純薬工業より購入した。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 回行い、4 週間の投与期間後エーテル麻酔下で放血し剖検した。なお、屠殺 1 時間前に 40mg/kg 体重の Bromodeoxyuridine (BrdU) を腹腔内投与した。肝臓および腎臓は重量測定後、胃に

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.)染色を行った。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。腎尿細管上皮のBrdU標識率については、BrdU抗体(ダコ・ジャパン)による免疫染色を行い、単位面積中の上皮細胞を数え、その中の陽性細胞数を算出した。

【実験3】胃2段階発がん試験法は、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150 mg/kg体重のN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)を1回胃内強制投与し、イニシエーション処置終了後、1% TBHQ(混餌投与)、1% TP(混餌投与)、1% PG(混餌投与)、0.2% NaNO₂(飲料水投与)、TBHQ+NaNO₂、TP+NaNO₂、PG+NaNO₂あるいは粉末基礎飼料(オリエンタルMF)のみを合計35週間与えた。MNNGを与えないで同様に処置した各群15匹の対照群も設けた(図1)。MNNGはSigma-Aldrich Japan、TBHQ、TPおよびPGは和光純薬工業より購入したものを使用した。体重および摂餌量はイニシエーション終了後週1回の割合で測定した。38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。全身主要臓器および肉眼的異常病変の病理組織標本作製し、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

【実験1】いずれの標本についてもiNOSおよびN-tyrosineは前胃上皮細胞中には染色されず、EAあるいはHQとNaNO₂を同時投与して発生した潰瘍性病変に浸潤している炎症性細胞にのみ陽性であった。一方、COX-2は炎症性細胞以外にも潰瘍周囲部の上皮細胞にわずかに染色された。尿中8-OHdGの増加は経過中いずれの群にも認められなかった(図2)。

【実験2】短期スクリーニング試験において、体重はNaNO₂の投与で減少傾向を示し、さらにPHA

の複合で有意に減少した。一方、肝比重量はBITC、PPD単独よりNaNO₂の複合投与で有意に減少し、腎比重量はPHA、NAC、BITCでNaNO₂の複合で増加した。病理組織学的には、PHA及びNAC群でNaNO₂との複合で腎尿細管の円柱が増加する傾向が認められた(表1)が、BrdU標識率ではNaNO₂の複合による影響は認められなかった。なお、BITCではNaNO₂投与の有無に関わらず、標識率の増加が認められた(図3)。

【実験3】最終体重はMNNG、抗酸化剤投与の有無に関わらず、NaNO₂の投与により有意な減少あるいは減少傾向を示した(表2)。屠殺時肉眼的にMNNGを投与したラットの前胃粘膜に結節性病変が認められたが、そのラット1匹あたりの平均発生個数及び平均面積TP及びPG群でNaNO₂の複合で有意に増加したが、TBHQ群では複合により個数が減少した(表3)。病理組織学的に前胃の病変を過形成、乳頭腫及び扁平上皮癌に分類すると、TP投与群でNaNO₂の複合で乳頭腫の発生頻度及び平均個数が有意に増加した。扁平上皮癌も増加傾向を示したが、有意差はみられなかった。腫瘍の浸潤性はいずれの群もNaNO₂の複合で高度になる傾向が認められた(表4)。過形成は全例に認められたが、それをさらに軽度、中等度、高度の3種類に分類すると、TBHQとPG群でNaNO₂の複合により、高度あるいは中等度過形成の発生頻度が有意に増加した(表5)。MNNGを投与しない群ではTBHQ、TP、PGすべての群でNaNO₂の複合により軽度ないし中等度過形成の発生頻度有意に増加した(表6)。腺胃粘膜ではTBHQ投与群でNaNO₂の複合で異型過形成の頻度が増加した(表7)。

D. 考察

EAあるいはHQとNaNO₂複合投与で発生するラット前胃粘膜の細胞障害、細胞増殖の機序として、代謝過程で生成されるジアゾキノン、ニトロソ化合物、NOや活性酸素などのフリーラジカルなどの関与が示唆されているが、まだ不明な点が多い。今回の実験ではiNOSやN-tyrosineは炎症性細胞にのみ染色され、直接NOが前胃病変発生に関与している可能性は少ないものと考えられる。尿中の8-O

HdGレベルの変動も認められなかったが、前胃上皮内の8-OHdGが、必ずしも尿中レベルを反映するとは考えられず、現在他の方法による検討を行っている。COX-2は弱い発現が潰瘍部の上皮内にも観察され、病変の発生に何らかの影響を及ぼしている可能性は否定できない。

新たに数種類の化合物についてNaNO₂との複合投与によるスクリーニング試験を行ったが、1級アミンとの複合ではPHAで腎尿細管円柱の増加がみられたのみであり、明瞭な毒性の相加、相乗作用はみられなかった。活性酸素の関与が示唆されている発がん物質についても複合作用は認められず、現時点ではNaNO₂による複合作用の発現はアスコルビン酸誘導体と、フェノール基を有する化合物に特異的と考えられる。

MNNGでイニシエーションを行った2段階発がん試験法では、新たにTPにNaNO₂との複合による前胃発がん促進作用が見いだされた。TBHQ、PGでも過形成のグレードが増加し、弱いながらもプロモーション作用があるものと考えられる。イニシエーションを行わない群でもTP、TBHQあるいはPGとNaNO₂の複合で過形成が発生した。過形成の発生と発がんプロモーションには密接な相関があることを考慮すると、TBHQとPGでも複合より明瞭な発がんプロモーション作用が認められても不思議ではないが、これは今回の実験期間が従来に比較しかなり短かったためと思われる。同様にラット前胃に細胞障害、細胞増殖、発がん性を示すcaf₂ic acidでは、Cu²⁺の存在下で活性酸素によるDNA傷害を誘発することがin vitroの実験で報告されており、安全性が高いといわれている抗酸化剤はある条件下では、in vivoでもかえってprooxidantとして作用し、生体に悪影響を及ぼす可能性も十分に考えられる。今後、複合効果が強く発現しているアスコルビン酸誘導体については、前胃と腺胃を対照とした新しいモデルで用量相関実験を行う予定である。

E. 結論

EAやHQとNaNO₂との複合投与により発生するラット前胃粘膜の障害と強い過形成の発生に、直

接NOが関与する可能性は少ないが、その過程にCOX-2が何らかの影響を与えている可能性がある。NaNO₂との複合による毒性発現の相加、相乗作用は、現時点ではアスコルビン酸誘導体とフェノール系化合物に特異的である。また、広く用いられているTPで複合による明らかな前胃発がん促進作用が認められ、TBHQとPGでも弱いながら同様な作用が認められた。

F. 発表論文

論文発表

- 1) Furukawa, F., Nishikawa, A., Ishiwata, H., Takahashi, M., Hayashi, Y. and Hirose, M. Renal carcinogenicity of concurrently administered fish meal and sodium nitrite in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 139-147, 2000.
- 2) Furukawa, M., Nishikawa, A., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H.-Y. and Hirose, M. Concurrent administration of fish meal and sodium nitrite does not promote glandular stomach carcinogenesis in rats after treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Toxicol. Pathol.*, 12, 171-176, 1999.
- 3) Furukawa, M., Nishikawa, A., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H.-Y., Yamagishi, M. and Hirose, M. Concurrent administration of fish meal and sodium nitrite does not promote renal carcinogenesis in rats after initiation with N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine. *Cancer Lett.*, 2000, in press.

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。p.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回日本癌学会総会記事, p.425, 1999.
- 3) Miyauchi, M., Nishikawa, A., Furukawa, F.,

Nakamura, H., Son, H-Y., Ikeda, T., Imazawa, T. and Hirose, M. Effects of combined treatment with antioxidants and sodium nitrite on the rat forestomach. *Toxicological Sciences*, 54, p.269, 2000.

G. 知的所有権の取得状況
なし

表 1. 腎病変の発生頻度

Treatment	Test chemicals	No. of rats	cast			tubular basophilia	
			-	±	+	±	+
-	Phenylalanine	5	3	2	0	4	1
+	Phenylalanine	5	0	2	3	4	1
-	N-acetylcysteine	5	3	2	0	3	2
+	N-acetylcysteine	5	0	0	5	3	2
-	BITC	5	2	2	1	0	5
+	BITC	5	0	2	3	1	4

--; absent, ±; slight, +; moderate

表 2. 最終体重、相対臓器重量および摂餌量

Treatment		Body Weight (g)	Organ weight (g/100g body wt)		Food consumption (g/rat/day)	
MNNG	NaNO ₂	Test chemicals	Liver	Kidney		
+	-	<i>t</i> -Butylhydroquinone	356 ± 24a)	3.7 ± 0.4***	0.64 ± 0.04***	15.1
+	+	<i>t</i> -Butylhydroquinone	332 ± 19*,##	3.5 ± 0.2***,#	0.68 ± 0.02***,##	14.3
+	-	α-Tocopherol	366 ± 17	2.8 ± 0.1	0.57 ± 0.04	15.2
+	+	α-Tocopherol	345 ± 24#	2.8 ± 0.1**	0.61 ± 0.03##	14.3
+	-	Propyl gallate	337 ± 20***	3.1 ± 0.2***	0.60 ± 0.03**	14.4
+	+	Propyl gallate	327 ± 15**	3.1 ± 0.1***	0.63 ± 0.02***,##	15.6
+	-	Basal diet	363 ± 17	2.9 ± 0.1	0.56 ± 0.03	14.7
+	+	Basal diet	347 ± 21*	2.6 ± 0.1***	0.59 ± 0.02**	14.0
-	-	<i>t</i> -Butylhydroquinone	355 ± 21	3.7 ± 0.2***	0.62 ± 0.04**	14.9
-	+	<i>t</i> -Butylhydroquinone	327 ± 18*,##	3.4 ± 0.2***,#	0.65 ± 0.02*,#	13.8
-	-	α-Tocopherol	361 ± 23	2.7 ± 0.1	0.57 ± 0.03	15.0
-	+	α-Tocopherol	351 ± 20	2.7 ± 0.2	0.59 ± 0.03	14.0
-	-	Propyl gallate	334 ± 22**	3.1 ± 0.2***	0.60 ± 0.04*	14.3
-	+	Propyl gallate	311 ± 12***,#	3.0 ± 0.1***,#	0.63 ± 0.03	14.1
-	-	Basal diet	364 ± 23	2.8 ± 0.1	0.56 ± 0.02	14.2
-	+	Basal diet	353 ± 26	2.7 ± 0.1*	0.60 ± 0.05	14.4

a) Mean ± SD

*, **, ***: p<0.05, p<0.01, p<0.001 vs respective control group.

#, ##: p<0.05, p<0.01 vs antioxidant alone group.

表 3. 屠殺時に観察された前胃肉眼的結節性病変の平均個数および面積

Treatment			Test chemicals	No. of rats	No./animal	Area/animal
MNNG	NaNO ₂					
+	-		<i>t</i> -Butylhydroquinone	15	10 ± 3	0.80 ± 0.56
+	+		<i>t</i> -Butylhydroquinone	15	4 ± 2###	1.11 ± 0.62
+	-		α-Tocopherol	15	3 ± 2	0.30 ± 0.59
+	+		α-Tocopherol	15	8 ± 5##	0.88 ± 0.52###
+	-		Propyl gallate	15	3 ± 3	0.47 ± 1.01
+	+		Propyl gallate	15	7 ± 3###	1.47 ± 1.22###
+	-		Basal diet	15	4 ± 3	0.31 ± 0.48
+	+		Basal diet	15	4 ± 2	0.15 ± 0.11

#, ###: p<0.05, p<0.001 vs respective control group, respectively.

表 4. 前胃病変の発生頻度

Treatment		No. of rats	No. of rats with lesions (%)						
MNNG	NaNO ₂		Test chemicals	Hyperplasia	Papilloma	SCC	Invasion		
						m	sm	pm	
+	-	<i>t</i> -Butylhydroquinone	15	15 (100)	11 (73)**	4 (27)	4 (27)	0	0
+	+	<i>t</i> -Butylhydroquinone	15	15 (100)	14 (93)***	5 (33)	1 (7)	4 (27)	0
+	-	α -Tocopherol	15	15 (100)	3 (20)	5 (33)	4 (27)	1 (7)	0
+	+	α -Tocopherol	15	15 (100)	9 (60)***, #	9 (60)	3 (20)	5 (33)	1 (7)
+	-	Propyl gallate	15	15 (100)	5 (33)	2 (13)	2 (13)	0	0
+	+	Propyl gallate	15	15 (100)	6 (40)**	6 (40)	2 (13)	4 (27)	0
+	-	Basal diet	15	15 (100)	2 (13)	6 (40)	3 (20)	3 (20)	0
+	+	Basal diet	15	15 (100)	0	4 (27)	2 (13)	1 (7)	1 (7)

, *: p<0.01, p<0.001 vs respective control group

#: p<0.05 vs antioxidant alone group

m: mucosa; sm: submucosa; pm: muscular layer

表 5. 前胃過形成の発生頻度

Treatment		No. of rats	No. of rats with hyperplasia (%)		
MNNG	NaNO ₂		Test chemicals	mild	moderate
+	-	15	15 (100)	15 (100)**	7 (47)**
+	+	15	15 (100)	15 (100)**	13 (87)***,#
+	-	15	15 (100)	9 (60)**	1 (7)
+	+	15	15 (100)	12 (80)**	5 (33)**
+	-	15	15 (100)	9 (60)**	2 (13)
+	+	15	15 (100)	15 (100)***,##	8 (53)**,#
+	-	15	15 (100)	1 (7)	0
+	+	15	15 (100)	3 (20)	0

, *: p<0.01, p<0.001 vs respective control group

#, ###: p<0.05, p<0.01 vs antioxidant alone group

表 6. MNNG 非投与群における前胃過形成の発生頻度

MNNG	Treatment	NaNO ₂	Test chemicals	No. of rats	No. of rats with hyperplasia (%)		
					mild	moderate	severe
-	-	-	<i>t</i> -Butylhydroquinone	10	0	0	0
-	+	+	<i>t</i> -Butylhydroquinone	10	10 (100)***,###	10 (100)***,###	2 (20)
-	-	-	α -Tocopherol	10	0	0	0
-	+	+	α -Tocopherol	10	4 (40)*,#	0	0
-	-	-	Propyl gallate	10	3 (30)	0	0
-	+	+	Propyl gallate	10	9 (90)***,###	6 (60)***,###	0
-	-	-	Basal diet	10	0	0	0
-	+	+	Basal diet	10	0	0	0

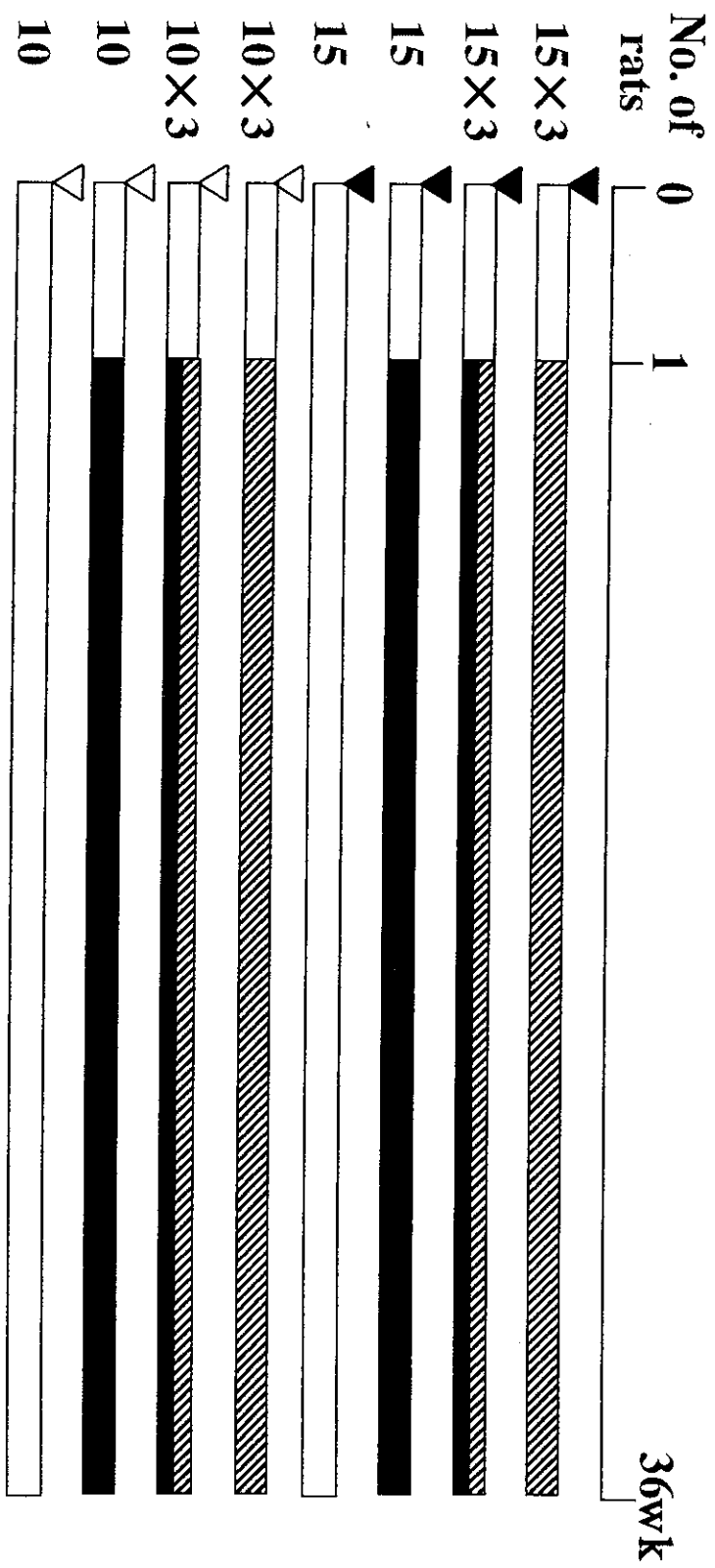
*,**,***: p<0.05, p<0.01, p<0.001 vs respective control group

#,##,###: p<0.05, p<0.01, p<0.001 vs antioxidant alone group

表7. 腺胃異型過形成の発生頻度と発生個数

Treatment			No. of rats	Incidence (%)	No. of lesions/rats
MNNG	NaNO ₂	Test chemicals			
+	-	<i>t</i> -Butylhydroquinone	15	2 (13)	0.1 ± 0.4#
+	+	<i>t</i> -Butylhydroquinone	15	9 (60)#	0.7 ± 0.6
+	-	α-Tocopherol	15	3 (20)	0.2 ± 0.4
+	+	α-Tocopherol	15	6 (40)	0.5 ± 0.7
+	-	Propyl gallate	15	5 (33)	0.5 ± 1.1
+	+	Propyl gallate	15	5 (33)	0.3 ± 0.5
+	-	Basal diet	15	7 (47)	0.5 ± 0.5
+	+	Basal diet	15	5 (33)	0.4 ± 0.6

#: p<0.05 vs antioxidant alone group



Animals : F344 male rats
 ▼ : MNNNG, 150mg/kg i.g.
 ▽ : Vehicle
 ■ : NaNO₂, 0.2% in drinking water
 □ : Basal diet
 ▨ : Antioxidant, 1% each in diet
 tert-Butylhydroquinone
 α-Tocopherol
 Propyl gallate

図 1. 亜硝酸とフェノール系抗酸化剤の複合投与によるラット胃粘膜に対する影響を
 検討するための実験計画