

別添 2

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広瀬雅雄

平成 13 (2001) 年 4 月

別添 3

目 次

I. 総括研究報告書	
食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究	—— 1
広瀬雅雄	
II. 分担研究報告	
1. 食品中化学物質の相互作用による発がんリスクの検討	—— 15
広瀬雅雄	
2. 肝中期発がん試験法を用いた食品中化学物質の複合投与の影響に関する研究	—— 30
白井智之	
3. 残留農薬等の内分泌系臓器に対する相互作用	—— 36
井上 達	
4. アレルギーモデルを用いた食品中化学物質の相互作用に関する研究	—— 45
小野 宏	
5. 食品中化学物質の相互毒性に関する酵素の分子種レベルでの検討、ヒト組織での検討	—— 58
大野泰雄	
6. 複数農薬等の残留実態に関する調査研究	—— 76
豊田正武	
7. 残留農薬等暴露量推定のための食物摂取データ・ベースの開発に関する研究	—— 86
吉池信男	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—— 102
IV. 研究成果の刊行物・別冊	—— 104

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

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

【広瀬】亜硝酸と食品中化学物質の複合作用を検討する目的で以下の実験を行った。亜硝酸と芳香族化合物である *p*-aminophenol (PAP)、*p*-aminobenzoic acid (PABA)、acetaminophen (AAP) の複合による諸臓器に対する影響をラット多臓器発がん試験法を用いて検討した結果、PABA 単独で甲状腺腫瘍の増加が認められた。一方、NaNO<sub>2</sub> の複合ではいずれの臓器においても腫瘍発生の増加は認められなかった。次に亜硝酸とアスコルビン酸の複合効果における前胃及び腺胃発癌の用量相関性を MNNG ラット 2 段階胃発がんモデルにより検索した。その結果、前胃発癌の促進には、亜硝酸 0.1% 以上及びアスコルビン酸 1.0% 以上の用量が必要であった。一方、腺胃発癌においては亜硝酸及びアスコルビン酸の複合影響は明らかでなかった。さらにヘテロサイクリックアミンの一つである PhIP と亜硝酸の乳腺発癌に対する作用を検討した結果、亜硝酸を複合投与すると、乳腺発癌が抑制された。

【白井】食品中化学物質の相互作用として、食品中に含まれ、唾液中からも多く分泌される亜硝酸 (NaNO<sub>2</sub>) とタバコや加熱食品中に多くみられる Harman、Norharman あるいは残留農薬の Amitrole との相互作用をラット肝中期発がん試験法を用いてラット肝腫瘍発生に対する修飾作用を指標に検討した。その結果いずれの複合投与も肝発がんを促進するような働きは無く、相互作用が無いことが判明した。

【井上】残留農薬などのエストロジェニックな複合および相互作用の実態を総合的に把握することを目的とし、すでに確立されつつある *in vivo* 高感度内分泌作用検出系である子宮肥大試験を用い、*o,p'*-DDT および Methoxy chlor のエストロジェニック相互作用を検討した。その結果、陽性対照物質 E2 と *o,p'*-DDT、あるいは E2 と Methoxy chlor との組み合わせでは、相加性がみられたが、*o,p'*-DDT と Methoxy chlor との組み合わせでは、拮抗性がみられた。

【小野】農薬等の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、含窒素系農薬であるクロロニトロフェン (CNP) 及びニトロフェン (NIP) と環境化学物質であるジブチルフタレート (DBP) との複合作用について、マウス由来肥満細胞からの脱顆粒反応への影響について検討した。その結果、単独作用の他に複合作用による脱顆粒促進活性の増強作用が観察された。一方、それらの物質間の免疫系における複合作用を NC/Nga および BALB/c マウスを用いた *in vivo* の実験系で調べた結果、一部の測定項目で NIP および CNP 単独で免疫抑制作用が認められた他に、DBP との複合作用が認められた。以上の結果から、本研究で開発した試験法を用いることにより、含窒素系農薬とフタル酸エステルの免疫系における相互作用を明らかにできることが示唆された。

【大野】ゴムの老化防止剤として使用されている 2-mercaptobenzimidazole (MBI) は長期投与のラットで甲状腺障害の他、肝臓、腎臓等への障害が認められているが、その代謝との関連性を解明し、またヒトでの影響を推定するため主にヒト肝ミクロソーム酵素系を用いて MBI の代謝とその阻害作用を検討した結果、MBI のヒト肝ミクロソームでの代謝におけるフラビンモノオキシゲナーゼ (FMO) の寄与が示唆された。一方、MBI の代謝に対応して CYP3A4 等が関与する Testosterone の代謝活性を強く阻害した。これらのことからこの化合物はヒトにおいても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。また、漢方抽出物画分が CYP3A 活性を阻害すること、およびそれがインペラトリンを含むフラノクマリングラニル誘導体であることが明らかにした。更に、不可逆的阻害により CYP3A を阻害することが知られているマクロライド系抗生物質を用い *in vitro* の阻害試験結果から *in vivo* での相互作用を予測し、実際の結果と比較した。即ち、ヒト肝ミクロソームを用いて、阻害形式を考慮した代謝阻害試験を行い、CYP3A による midazolam の  $\alpha$  位および 4 位水酸化代謝に対する阻害の kinetic parameter を算出した。この parameter と各薬物の体内動態 parameter の報告値を生理学的フローモデルに代入し、*in vivo* の相互作用をシミュレーションした結果、midazolam の AUC は erythromycin の併用により約 3.0 倍、clarithromycin の併用では約 2.1 倍上昇するのに対し、azithromycin の併用ではほとんど変化がないことが予測され、*in vivo* における報告値とほぼ一致した。

【豊田】複数農薬の検出率の高かった個別の国産及び輸入農産物等について、代謝物も含め 242 種農薬の残留実態調査を実施した。その結果、未成熟えんどうから 6～10 種農薬、大葉から 4 種農薬、きゅうり、ケール、小松菜、ネクタリン及びおうとうから 3 種農薬、ピーマンから 5 種農薬、ぶどうから 4～5 種農薬、日本なしから 3～4 種農薬、りんごから 3～9 種農薬、いちごから 3～8 種農薬、レモン及びグレープフルーツから 3～4 種農

菜、オレンジから3～5種農薬が同時に検出されることが明らかとなった。

【吉池】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。本年度は特に、国民栄養調査からは十分な情報が得られない事項について、補完的なデータを収集するとともに、今後の調査において考慮すべき食品等に関する検討を行った。すなわち、(1)国民栄養調査では一律の食品コードとして取り扱われている学校給食に関して、複数地域からデータを収集するとともに、学校給食以外からの農作物の摂取量に関するデータを検討した。また主要な農作物について季節変動に関する予備的検討を行った。(2)2001年(平成13年)より食品番号体系が全面改定される国民栄養調査において、“暴露評価”という観点からどのような食品項目を把握すべきかの検討を行った。(3)わが国における摂取実態に照らして、個々の農作物(特に果実)について、廃棄される部位及び廃棄率(重量比)に関する系統的なデータベースを作成した。

#### 分担研究者

白井智之 名古屋市立大学医学部 第一病理学  
教室 教授  
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  
小野 宏 食品薬品安全センター秦野研究所  
所長  
豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長  
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】〔実験1〕N-diethylnitrosoamine (DEN)、N-methylnitrosourea (MNU)、1,2-dimethylhydrazine (DMH)、0.05%のN-butyl-N-(hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)で4週間の間にイニシエーションを行った各群15匹の6週令F344系雄ラット(日本チャールズリバー社より購入)に、0.05% PAP(混餌投与)、0.5% PABA(混餌投与)、0.5% AAP(混餌投与)、0.2% NaNO<sub>2</sub>(飲料水投与)、PAP+NaNO<sub>2</sub>、PABA+NaNO<sub>2</sub>、AAP+NaNO<sub>2</sub>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。28週で屠殺剖検し、肝臓および腎臓は重量測定後、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。

〔実験2〕6週令F344系雄ラットに、イニシエーション処置としてN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)を0.01%の濃度で10週間飲水投与(腺胃のイニシエーション)し、更に、9週目には100mg/kg体重で1回胃内強制投与(前胃のイニシエーション)した。イニシエーション処置終了後に動物を各群15匹に分け、0.1もしくは1% アスコルビン酸(AsA)の混餌投与及び0, 0.05, 0.1もしくは0, 0.2% NaNO<sub>2</sub>の飲料水投与、更にはそれぞれ各濃度のAsA及びNaNO<sub>2</sub>を組み合わせる32週間投与した。42週でエーテル麻酔下で放血後、剖検した。現在、胃の他、採取した臓器について肉眼的な異常所見を確認した。今後、胃について病理組織標本作製し、腫瘍性病変及び増殖性病変について解析する予定である。

〔実験3〕生後6週令のSD系雌性ラットを用い、イニシエーション処置として、最初の4週間にコーン油に溶解したPhIP(Toronto Research Chemicals Inc.)を週2回、計8回強制経口投与(100mg / b.w. kg)し、同時期に0.2% NaNO<sub>2</sub>を飲料水投与にて与え、PhIP単独(PhIP)群、PhIPとNaNO<sub>2</sub>併用(PhIP+NaNO<sub>2</sub>)群、NaNO<sub>2</sub>単独(NaNO<sub>2</sub>)群、対照(Control)群の4群を設けた。飼料は、実験期間中5%コーン油を添加した粉末基礎飼料(オリエンタルCRF-1)を用いた。イニシエーション期間終了後、週1回、乳腺腫瘍を触診にて観察した。

4 8 週でエーテル麻酔にて屠殺、剖検した。

【白井】動物はF344雄ラット6週令を用い、対照群、亜硝酸群、亜硝酸+Harman群、亜硝酸+Norharman群、亜硝酸+Amitrole群、Amitrole単独群の6群に分けた。亜硝酸は0.1%で飲料水に、Harman、Norharmanはいずれも0.05%で飼料に、Amitroleは0.01%で飼料に混じて投与した。DEN 200 mg/kgを腹腔内投与2週間後からHarman、Norharmanまたは亜硝酸をそれぞれの計画に沿って6週間同時投与し、実験開始3週後に肝部分切除を行った、実験期間8週で終了し、屠殺剖検を行った。屠殺剖検時に肝を取り出し、アセトン固定後、パラフィン包埋切片を作製し、肝の前癌病変巣マーカーであるGST-Pの免疫染色を行い、その単位面積あたりの数と面積を計測した。本研究における倫理面への配慮については、本大学における実験動物倫理委員会の承諾を得たものであり、動物愛護の精神を十分に考慮に入れ行われたものである。

【井上】雌性5週齢のC57BL/6CR(日本S L C)を購入し、1週間の馴化期間後6週齢で卵巣摘出手術を行った。術後3週目に陰スミア検査を実施し、性周期が静止期にある動物を体重層別無作為化割り付けにより群分けし、化学物質の投与を開始した。群構成は、対照群は16匹、化学物質投与群は1群8匹で、13群の構成とした投与量は、溶媒対照群(コーン油)、17  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) は0.175、0.35および0.7  $\mu$ g/kg、o,p'-DDT は40、80および160mg/kg、Methoxychlor は17.5、35および70mg/kgを7日間反復投与した。投与経路は、 $E_2$ は皮下投与し、o,p'-DDTおよびmethoxychlorは強制経口投与をおこなった。最終投与から24時間後に屠殺し、子宮重量を測定した。

【小野】1. *in vitro*アレルギーモデル系の検討：

(1) 試薬の調製； CNP、NIP、DBP(和光純薬)は、100mg/mLの濃度でDMSOに溶解し、PIPES緩衝液(10mM PIPES (pH7.4)、0.14M NaCl、5mM KCl、0.1% BSA、5.5mM glucose、1.0mM  $CaCl_2$ 、0.6mM  $MgCl_2$ )を用いて所定の薬物濃度になるように調製し、DMSO濃度は、0.5%として細胞に作用させた。

(2) 脱顆粒反応の測定；24ウェルのマイクロタイタープレートに、10% FCSを含むDMEMに $1 \times 10^5$  cc

11s/mLの濃度に浮遊させたRBL-2H3細胞を1mLずつ加え、37°Cで16時間、CO<sub>2</sub>インキュベータ内で培養した。その際、DNP特異的マウスモノクローナルIgE抗体溶液5  $\mu$ gを培養液に加え、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、各種濃度の農薬を加え、37°Cで30分培養し、次いで抗原(DNP-BSA、10  $\mu$ g/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 $\beta$ -hexosaminidase活性を比色法にて測定し、脱顆粒の程度の指標とした。なお、細胞に残った酵素は、0.2%Triton-X100処理で溶出させ、比色法にて同様に測定し、IgE受容体架橋形成に伴って放出された酵素の割合を計算した。

2. *in vivo* アレルギーモデル系の検討：

(1) NC/Ngaマウスを用いた非アレルギー状態での免疫機能の変化；

動物は、6週齢の雄NC/Ngaマウスを使用した。動物を対照群(コーン油投与群)、0.05% NIP投与群および0.05% CNP投与群の3群に分け、それぞれ0.2mLを3~4日毎に1回、計4回皮下投与した。各群をさらに2群に分け、そのうちの1群にはコーン油を、他の1群には5%DBPを、上記農薬の皮下投与と同期間に連日経口投与した。最終感作投与の3日前に各群(6群)の3匹に1%SRBCを静脈内投与した。最終感作投与の翌日に採血および脾臓、胸腺の摘出を行い、脾臓および胸腺重量の測定、脾細胞浮遊液を用いたPFC assay、LPSをmitogenとし、BrdUを用いたリンパ球幼若化反応試験(LTT)、蛍光色素を用いたNK assay、ELISAによる血清中総IgM濃度、総IgG濃度および総IgE濃度、抗SRBC IgM抗体価の測定を行った。

(2) BALB/cマウスを用いたI型およびIV型アレルギー状態での免疫機能の変化；

動物は、6週齢の雄BALB/cマウスを使用した。各農薬は3~4日毎に1回、計5回皮下投与した。DBPは上記農薬の皮下投与と同期間、連日経口投与した。I型アレルギーの誘導には、1%OVAのFCA乳化物を0.2mL、各農薬投与の第2回~第4回に合わせて皮下投与した。OVA感作の2日前と各OVA感作の2日後に尾静脈より採血した。I型アレルギーの誘導には、0.1%DNCBのFCA混合物を各農薬投与の第2回に合わせて皮下投与し、そ

の5日後に0.1%DNCBを腹部に塗布して感作した。感作終了6日後に1%DNCB 10 $\mu$ Lを右耳に、アセトン・オリーブ油(4:1)を左耳に塗布し、24時間後に耳の厚さをダイヤルシックスネージ(三豊製作所)を用いて測定した。IV型アレルギーの実験では含窒素系農薬としてCNPのみを用いた。最終DBP投与の翌日に、採血および脾臓と胸腺の摘出を行い、脾臓および胸腺重量の測定、血清中総IgM濃度、総IgG濃度および総IgE濃度、OVA感作動物については、途中採血分を含めて抗OVA IgG抗体価の測定を行った。

統計学的処理にはStudentの t-検定およびDunnetの多重比較検定を用いた。

#### 【大野】1. in vitro代謝活性の測定：

マイクロソームは雄性ラット肝マイクロソーム、ヒト肝マイクロソーム(米国IIAM社)、ヒトP-450ないしFMO-3発現系マイクロソーム(住化分析センター及び第一化学より購入)を用いた。代謝活性測定マイクロソーム溶液は通常MBI 0.1mM、NADPH 5mM含有0.1M磷酸緩衝液(pH=7.4)、総量0.2mlで、37 $^{\circ}$ C 30分インキュベート後、メタノール0.4mlを添加し、その遠沈上清をODS系カラム(Waters, radial pack C18)(溶媒：水、MeCN、酢酸)のHPLC(Shimadzu, LC-6A)、検出器はMBIの減少はUV及びBenzimidazole(BI)の生成は蛍光検出器(Ex265、Em350nm)を用いて測定した。

#### 2. Testosteroneの代謝活性への影響：

Testosteroneの代謝活性の測定はMBIの共存および非共存下のヒト肝マイクロソームで0.2mM Testosterone、2mM NADPH全体を1 mlとなるようにして37 $^{\circ}$ C 15分インキュベートした。生成した代謝物は酢酸エチルで抽出後、逆相系カラム(ODS-80Ts)を用いたHPLC(Shimadzu LC-10A)、検出器はUVで測定した。

#### 3. 生理学的モデルに基づく in vivo相互作用の予測：

NADPH存在下ヒト肝マイクロソームを種々の濃度のerythromycin、clarithromycinあるいはazithromycinと共に37 $^{\circ}$ Cでpreincubationした後、midazolamを添加し、3分間incubationを行った。生成したmidazolamの $\alpha$ 位および4位水酸化代謝物をHPLCにより定量し、酵素に対する阻害のkinetic parameterを求めた。

In vitro試験より得られたkinetic parameterと、文献情報より得られたmidazolamとマクロライド系抗生物質の薬物動態parameter(スライドNo. 8)を門脈、肝臓、循環血の3つのcompartmentから成る生理学的モデル(スライドNo. 6)に代入した。肝臓中活性型CYP3A量は、酵素のturnoverとマクロライド系抗生物質の肝臓中濃度によって経時的に変動し、midazolamの肝代謝におけるVmax(最大代謝速度)は肝臓中CYP3A量に比例するものとした。微分方程式(スライドNo. 7)を数値的に解くことにより、マクロライド系抗生物質を前投与したときのマクロライド系抗生物質血中濃度、肝臓中活性型CYP3A量、midazolam血中濃度の経時変化をシミュレーションした。

【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、平成10年から12年までの3年間にわたり農作物186試料中の複数農薬の残留実態を調査した。26種有機塩素系農薬、19種ピレスロイド系農薬、65種有機リン系農薬及び117種含窒素系農薬等はECD、FPDまたはFTDを装着したガスクロマトグラフを用いて測定し、確認はGC/MSで行った。15種N-メチルカー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】1. 学童の学校給食及び家庭における農作物の摂取量と季節変動に関する検討：

全国5地域(兵庫3、東京1、山形1)の学校給食データ(1995年)を収集し、これらの献立データを、国民栄養調査における食品番号体系に基づき、各食品の使用重量をデータベース化した。その際、季節変動を考慮するため、主要な食品の日間変動が10%未満となる調査日数を求めて、5、9、11、2月の計79日の献立データを用いた。また、独自調査(調理現場での実測による)に基づき廃棄率を定めて可食部重量を求めた。その上で、旧厚生省食品化学課における農作物の分類(最終的に129農作物に変換)に従い、1日当たりの摂取量の平均値を求めた。一方、国民栄養調査データより、7~11歳の小児における摂取量データを抽出し、昼食と昼食以外の食事に区分し、1日当たりの摂取量の平均値を算出し、5地域の学校給食から試算したデータと比較した。さらに、学校給食以外からの農作物の摂取量に関するデータを得るために、兵庫県A市の公立小学校5年生全児童78

名（男子40名、女子38名）を対象として、1999年7月、11月、2000年2月に、学校給食のある平日1日の朝食、間食、夕食、夜食に関して、児童本人に対する24時間思い出し法による食事調査を実施した。この調査データを、学校給食データと同様に、旧厚生省食品化学課における農作物の分類に従い、1日当たりの摂取量の平均値を求めた。さらに、季節的な変動の傾向をさぐるための予備的な検討として、国民栄養調査実施月と同じ11月の摂取量と、7、11、2月の平均摂取量（これを近似的に年間平均値と考える）との比を求め、季節変動の大小を調べた。

## 2. 国民栄養調査における2001年（平成13年）からの食品番号体系の検討：

今回、五訂成分表を国民栄養調査に導入・活用するに際して、栄養学あるいは生活習慣病予防の観点を中心として種々の検討を行ってきているが、食品中の化学物質の暴露評価という視点からも、より良い食品番号体系について検討を行っている。具体的には、codexの食品番号体系（216食品）に対して、従来の国民栄養調査における食品番号体系では対応できなかったものについて、五訂成分表の食品番号体系を、今後、国民栄養調査において最大限活用したときに新たに対応可能となる食品をリストアップした。そのリストを参考にして、全国の保健所の栄養士が調査を実際に行う際に使用する「食品リスト」を試作した。

## 3. 非可食部の除去に関する系統的なデータベース（廃棄部位及び廃棄率（重量比））の作成：

五訂成分表を策定する際に、個々の食品をどのように前処理（すなわち、非可食部の除去）を行ったかについての基礎（内部）資料をもとに、各農作物（特に果実）について、廃棄される部位及び廃棄率（重量比）に関して系統的な整理を行い、データベース化した。

## C. 研究結果

【広瀬】〔実験1〕イニシエーション処置により、腫瘍は主に腎臓、小腸、大腸、肺及び甲状腺に発生した。腎臓には腺腫、腎芽腫が発生し、腎芽腫の発生率はNaNO<sub>2</sub>の投与により有意な減少が認められたが、芳香族アミンとの複合効果は認められなかった。小腸及び大腸

の腺腫及び腺癌、肺の腺腫及び腺癌の発生率、肝臓のglutathion S-transferase placental form (GST-P) 陽性巢数及び面積は群間に差は認められなかった。甲状腺では腺腫及び腺癌が発生し、腺腫の発生率はPABA単独で有意に増加し、PAPとNaNO<sub>2</sub>の複合では有意に減少した。膀胱ではPABAとNaNO<sub>2</sub>の複合により過形成の発生率が有意に減少した。その他の臓器では、腫瘍性及び非腫瘍性病変の発生率に群間の差は認められなかった。

〔実験2〕採取した臓器について肉眼的に観察した結果、前胃において1%AsA+0.2%もしくは0.1% NaNO<sub>2</sub>投与群で明らかな腫瘍性病変の増加がみられ、特に亜硝酸0.2%投与群で顕著であった。その他の群では、肉眼的に対照群と比べ明らかな増加は認められなかった。また、腺胃では腫瘍性病変が各群0~3例に認められたのみで、アスコルビン酸や亜硝酸による増強はなかったものの、その腺胃発がんに対する影響は明らかでなかった。その他、空腸において1%AsA+0.2%NaNO<sub>2</sub>投与群の1例に腫瘍が認められた。

〔実験3〕イニシエーション期間中のラット1匹あたりの一日平均摂水量は、PhIP群で30.0±1.1、PhIP+NaNO<sub>2</sub>群で18.7±1.1、NaNO<sub>2</sub>群で24.7±0.1、Control群で26.5±0.4 ml だった。NaNO<sub>2</sub>飲料水投与した群では摂水量が有意に減少し、特にPhIPとの併用群で減少した。この期間では、体重増加量においても顕著な低下が見られた。乳腺腫瘍の発生は、PhIP群で14週から観察されたものの、PhIP+NaNO<sub>2</sub>群では46週まで認められなかった。剖検時の体重、主要臓器比重量に、差は見られなかった。肉眼的にPhIP群、PhIP+NaNO<sub>2</sub>群の腫瘍発生率、個数は同程度だったが、併用群の腫瘍体積は小さかった。現在、病理組織学的検索を行っている。

【白井】Amitrole投与群では実験4週以降に体重増加抑制が観察され、肝重量の減少が認められた。複合投与によるそれぞれの化合物摂取量への影響は観察されなかった。亜硝酸単独、亜硝酸+Harman、Amitrole単独はいずれもをGST-P陽性細胞巢の数および面積は対照群と比して何ら変化は認めなかったが、亜硝酸+Norharmanおよび亜硝酸+Amitrole群で、GST-P陽性細胞巢の数はわずかながら上昇が認められた。しかし亜硝酸群とは有意差は無く、亜硝酸とNorharmanあるいはHarman

との相互作用は無いことが明らかとなった。なおHarnanとNorharman単独による作用はすでに行われており、肝発がんには全く影響がないことを確認している (Hagiwara et al., J. Toxicol. Environ. Health, 1990)。Amitroleは甲状腺ホルモンの阻害作用を通して甲状腺刺激ホルモンの分泌を促し、齧歯類の甲状腺の過形成を引き起こすが、本研究においてもAmitrole投与群で甲状腺重量の著明な上昇を認めたが、亜硝酸との併用投与による甲状腺重量の増加や減少は認められなかった。

【井上】E<sub>2</sub>とo,p'-DDTあるいはE<sub>2</sub>とmethoxychlorの組み合わせでは、相加性がみられた。o,p'-DDTとmethoxychlorの組み合わせでは拮抗性がみられた。

【小野】1. in vitroアレルギーモデル系の検討：

CNPは、10 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mLで、農業非存在下の場合に比べ、有意な脱顆粒促進効果を有していた。一方、CNPよりもClの1個少ないNIPの場合は、CNPよりは増強効果が弱く、100 $\mu$ g/mLでのみ、増強効果を有していた。なお、これら2種の農業は、抗原刺激を行っていない細胞からの自発的な脱顆粒反応は促進しないことから、化合物そのものが、脱顆粒反応を促すことはなく、これらの濃度で、細胞傷害性を有していないものと思われる。次いで、PhE類についてRBL-2H3細胞からの抗原刺激に伴う脱顆粒への影響を検討した。調べた3種のPhEすなわちDBP、DIBP (ジイソブチルフタレート)およびDEHP (ジエチルヘキシルフタレート)の中では、DBPが最も脱顆粒促進作用が強く、50 $\mu$ Mで有意な上昇が観察された。そこで、次に、50 $\mu$ M DBP共存下での、RBL-2H3細胞からの脱顆粒反応に及ぼすCNPとNIPの作用について検討した結果、CNP1 $\mu$ g/mLあるいはNIP10 $\mu$ g/mLに50 $\mu$ MDBPをそれぞれ共存させた時、単独の場合より幾分高い増強効果がみられた。

2. in vivo アレルギーモデル系の検討：

(1) NC/Ngaマウスを用いた非アレルギー状態での免疫機能の変化；

脾臓重量は、CNP単独投与により有意に増加した。単位脾臓重量当たりの脾細胞数は、NIP単独投与では、減少傾向を示したが、DBPとの複合投与により、有意に増加した。血清中総IgM濃度は、CNP単独投与により、有意に増加したが、DBPとの複合投与により、逆に有意に

減少した。PFC assayでは、NIPの単独投与では変化は認められなかったが、DBPとの複合投与により、有意な減少が認められた。一方、SRBCを投与しなかった動物では、単位脾臓重量当たりの脾細胞数は、CNP投与により有意に減少した。血清中総IgM濃度は、NIP投与により有意に増加した。脾細胞数は、CNPとDBP投与により、有意に減少した。リンパ球幼若化反応試験では、CNPおよびNIPの投与により、増殖活性が有意に低下した。血清中総IgG濃度は、DBP単独投与により有意に低下した。これら以外の測定項目では、有意な変化は認められなかった。

(2) BALB/cマウスを用いたIおよびIV型アレルギー状態での免疫機能の変化；

血清中総IgM濃度は、CNPおよびNIP投与により、増加傾向を示した。そのうち、CNP単独投与により、有意な増加が認められた。OVA投与による抗体価の変化は、NIPおよびCNPの投与により抑制される傾向が認められた。DNCBで感作し、MESTを行った動物の各免疫機能は、MESTでは、DBP単独投与に比べ、CNPと複合投与を行った群で耳厚の増加が有意に抑制された。これら以外の測定項目では、有意な変化は認められなかった。

【大野】1. MBIのヒトおよびラット肝ミクロソームでのin vitro代謝；

MBIをラットないしヒト肝ミクロソームでインキュベートした場合、NADPH添加により、HPLC上でMBIピークの減少と同時にbenzimidazole (BI)の生成が認められた。また、このBIの生成にはラグタイムlag timeが認められ、その生成機構が関連すると考えられた。

一方、このMBI代謝活性を比較するとヒト肝ミクロソームの活性はラット肝ミクロソームの活性の約5分の1程度で動物種差の可能性も示唆された。

2. MBIのヒト肝ミクロソームでの代謝における阻害剤の影響；

MBIのヒト肝ミクロソームでの代謝速度は、薬物代謝酵素P450の全般的阻害剤SKF525Aの影響を受けず、またCYP3A4の特異的阻害剤ketoconazole (50 $\mu$ M)、CYP1A1/2の阻害剤ANF( $\alpha$ -naphthoflavon)、CYP2C9の阻害剤sulfaphenazole (20 $\mu$ M)並びにCYP2C19の阻害剤omeprazole (20 $\mu$ M)の作用はいずれにおいても対照群に比



べて差は少なく、P450の関与は小さいことが示唆された。一方、フラビンモノオキシゲナーゼ(FMO)の基質阻害剤methimazole 1mMでは50%以上の阻害作用が認められFMOの関与が強く示唆された。

3. ヒトP-450分子種ないしFMO-3発現系マイクロソームでの代謝：

MBIをヒトP-450各分子種発現系マイクロソームとNADPH存在下でインキュベートした場合、HPLC上でMBIおよびBIピークの変化を観察できなかった。

一方、MBIをヒトFMO-3発現系マイクロソームでインキュベートした場合、NADPH添加により、HPLC上でMBIピークの減少と同時にBIの生成が認められ、強い代謝活性が認められた。これらの結果はヒト肝マイクロソームでの代謝における各種阻害剤の結果と一致した。

4. ヒト肝マイクロソームによるTestosteroneのin vitro代謝におけるMBIの影響：

ラット肝マイクロソーム分画におけるTestosteroneのNADPH依存性代謝による代謝物(6 $\beta$ -OH、16 $\alpha$ -OH、2 $\alpha$ -OH、6 $\alpha$ -OH、15 $\beta$ -OH、15 $\alpha$ -OH、7 $\alpha$ -OH、16 $\beta$ -OH、2 $\beta$ -OH体)のうち、MBIの数分間の前処理により、6 $\beta$ -OH、15 $\beta$ -OH、15 $\alpha$ -OH、16 $\beta$ -OH、2 $\beta$ -OH体の生成が抑制され、一方、MBIの代謝産物であるBenzimidazoleでは特に有意な抑制は認められなかった。そこで今回ヒト肝マイクロソームによるTestosteroneの代謝におけるMBIの影響を調べた。MBIの共存ないし数分間の前処理等によってラットの場合と同様に、ヒト肝マイクロソームにおけるTestosteroneのNADPH依存性代謝物、6 $\beta$ -OH、15 $\beta$ -OH、15 $\alpha$ -OH、16 $\beta$ -OH、2 $\beta$ -OH体等の生成が抑制された。このin vitroでのTestosteroneの代謝で最も高い活性の認められた6 $\beta$ -OH体への代謝は拾 $\mu$ M程度のMBIによって50%以上の抑制が認められ、CYP3A4をはじめとする肝マイクロソームP450との相互作用からin vivoでの肝障害との関連性が示唆された。

5. 植物成分の薬物代謝酵素阻害作用：

漢方薬から熱湯およびアルコール抽出物を作成し、それらについてテストステロン6 $\beta$ -水酸化活性をCYP3A4の指標として代謝阻害物質の存在を検討した。その結果、白じゅつときょう活抽出物中に阻害物質の存在を

認めた。煎剤と冷浸剤とで比較すると後者の方が阻害活性が高かった。そこで、それらを液体クロマトグラフで分離し阻害活性を検討したところ、ピーク4-8の画分に強い阻害活性を認めた。この構造を検討したところインペラトリンを含むフラノクマリングラニル誘導体であることが明らかとなった。これら物質はターフェナジンと薬物相互作用を起こしたケトコナゾールとほぼ同等の強さでCYP3AタイプのチトクロームP450に強く結合し、不活性化することがわかった。また不可逆的な機序でCYP3A4を失活させる作用を持つことも明らかとなった。これらの結果からグレープフルーツ由来のフラノクマリールと同様に強い阻害活性を持つことが明らかとなった。さらに漢方処方抽出物の状態でも阻害活性を示し、その阻害はフラノクマリール成分に由来することも明らかとなった。

6. 薬物相互作用の理論的予測：

ヒト肝マイクロソームにおけるmidazolamの代謝は、いずれの抗生物質でもpreincubation時間0分ではほとんど阻害が観察されなかったのに対して、preincubation時間およびマクロライド系抗生物質濃度に依存して阻害が増強された。 $\alpha$ 位および4位水酸化代謝は同程度に阻害され、阻害の程度はerythromycin、clarithromycinに比べazithromycinでは非常に小さいことが明らかとなった。

In vivo相互作用のシミュレーションの結果、erythromycin (500 mg t.i.d. 5 days p.o.)の連続投与により肝臓中活性型CYP3Aは次第に減少し、最大45%が不活性化することが予測された。それに伴いmidazolamの血中濃度はerythromycinの併用により大きく上昇し、midazolam単独投与時と比較してAUC上昇率にして約3.0倍と予測された。Clarithromycin (250 mg b.i.d. 5 days p.o.)の併用の場合、肝臓中CYP3Aは最大約20%不活性化することが予測され、midazolamのAUC上昇率は2.1倍と予測された。また、azithromycin (500mg o.d. 3 days p.o.)においてはCYP3Aの不活性化は最大1%と非常に小さいことが予測され、midazolam血中濃度にはほとんど変化がないと予測された。これらの相互作用の予測結果は、in vivoにおける報告値とほぼ一致した。

【豊田】本研究課題の3年度はこれまでの2年間の調査結果を踏まえ、複数農薬の検出率の高かった個別の国産及び輸入

農産物等 186 試料について、代謝物も含め 242 種農薬の残留実態調査を実施した。未成熟えんどうから 6~10 種農薬、大葉から 4 種農薬、きゅうり、ケール、小松菜、ネクタリン及びおうとうから 3 種農薬、ピーマンから 5 種農薬、ぶどうから 4~5 種農薬、日本なしから 3~4 種農薬、りんごから 3~9 種農薬、いちごから 3~8 種農薬、レモン及びグレープフルーツから 3~4 種農薬、オレンジから 3~5 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、中国産未成熟えんどうから有機リン系農薬のメタミドフォス、オメトエート、ジメトエート、クロルピリホス、有機塩素系農薬のジコホール、含窒素系農薬のトリアジメノール、クロルフェナビル、ピレスロイド系農薬のフェンプロバトリン、シベルメトリン、フェンバレレート等が検出されている。日本産りんごから有機塩素系農薬のジコホール、有機リン系農薬のクロルピリホス、フェニトロチオン、ピレスロイド系農薬のシフルトリン、含窒素系農薬のテブフェンピラド、イブロジオンその他が検出されている。また日本産いちごから有機塩素系農薬のエンドスルファン、含窒素系農薬のトリフルミゾール、プロシミドン、テブフェンピラド、クロルフェナビル等が検出されている。また、レモンからは有機リン系農薬のクロルピリホス、含窒素系農薬のイマザリル、その他オルトフェニルフェノール (2-フェニルフェノール) が検出されている。グレープフルーツ及びオレンジからは同様に有機リン系農薬のクロルピリホス、含窒素系農薬のイマザリルとチアベンダゾール、その他オルトフェニルフェノールが検出されている。

【吉池】1. 学童の学校給食及び家庭における農作物の摂取量と季節変動に関する検討：

兵庫県 A 市、同 B 市、同 C 町、東京都 D 区及び山形県 E 市 (すべて、n=79 日) の学校給食の献立から算出した小学生 (小学 3、4 年生を基準としている) における農作物の摂取量 (旧厚生省食品化学課による分類) あるいは国民栄養調査 (1997 年) における昼食及びそれ以外の食事 (7~11 歳のデータを抽出) からの農作物の摂取量は、特に米と小麦の比率を比較すると、国民栄養調査では、米/小麦=0.51 であったのに対して、今回調査を実施した 5 地域では、0.63~3.05 と大きな幅があったが、どれも 10 年以上前に定められた国民栄養調査における「学校給食」の加重平均食品成分表よりも、米の割合が高かった。また、5 地域の平均値が 1g 以上で、国民栄養調

査の昼食データを基準とした時に 2 倍以上であったもの (すなわち、現行の国民栄養調査においては過小評価している可能性のあるもの) は、さといも類 (含やつがしら)、こんにゃくいも、キャベツ (芽キャベツを含む)、こまつな、レタス (含サラダ菜、チシャ)、ねぎ (含リーキ)、日本なし、ぶどう、バナナ、パイナップルであった。

2. 国民栄養調査における 2001 年 (平成 13 年) からの食品番号体系の検討：

農作物中の残留農薬等の MRLs を算定するために codex が作成した食品番号体系 (216 食品) の内、従来の国民栄養調査の食品番号体系が対応できているものは 103 食品に過ぎず、半数以上の 113 食品についてはデータリネージが困難であった。その内、5 訂成分表に記載されている食品番号を最大限活用したときに、新たに対応できる食品 (57 食品) をリストアップした。また、2001 年 (平成 13 年) 11 月から国民栄養調査において使用するための新しい「食品番号表」の概略を、果実を例として示した。

3. 非可食部の除去に関する系統的なデータベース (廃棄部位及び廃棄率 (重量比)) : 5 訂成分表に記載された果実について、不可食部の部位の詳細及び重量比として表され廃棄率をまとめた。

#### D. 考察

芳香族化合物と亜硝酸の諸臓器に対する複合作用をラット中期多臓器発がんモデルを用いて検索し、PABA 単独で甲状腺腫瘍の発生頻度が増加し、PAPと亜硝酸の複合により甲状腺の腺腫の減少が認められた。また、PABAと亜硝酸の複合により膀胱の過形成の増加が認められた。多くの抗甲状腺剤は甲状腺下垂体軸のネガティブフィードバック機構により甲状腺の過形成や腫瘍を発生させることが知られており、PABAにもこのような作用を示す可能性がある。PAPとの複合による甲状腺腺腫の減少は摂取量の低下によるものが一因として考えられる。PAPは肝臓で代謝されて抱合体になり、腎臓に移行した抱合体が蛋白質に結合し、腎毒性を示すことが報告されている。しかし、今回の実験系では亜硝酸の複合に関わらず、腎腫瘍の発生率は他の群と同等であった。これには摂取量の減少によるものに加えて、今回用いたPAPの投与経路及び用量も関係しているもの

と考えられる。酸性条件下においてPAPは亜硝酸との複合により変異原性物質を生成し、PABAは硝酸イオンのスカベンジャーとして働くことが報告されている。今回の実験系ではPAP及びPABAの胃発がんに対する修飾作用は認められなかった。また、亜硝酸とNorharman、HarmanあるいはAmitroleとの相互作用は無いことが判明した。

今回の結果から、芳香族化合物と亜硝酸の複合作用はほとんど認められず、生体に対する影響は少ないものと考えられた。現時点では亜硝酸による複合作用の発現にはかなり化合物との構造相関性があると考えられる。

前胃及び腺胃を対象とした新しいラット2段階胃発がんモデルを用いて亜硝酸とアスコルビン酸の複合効果及び用量相関性を検討した。亜硝酸とアスコルビン酸と複合により前胃発癌の強い促進効果が示されたが、その発現にはアスコルビン酸1%以上、亜硝酸0.1%以上の高用量が必要であった。一方、ヒトの胃に相当する腺胃においては肉眼的に全体の約4%の個体にしか腫瘍が認められず、亜硝酸及びアスコルビン酸の腺胃発がんへの影響は明らかでなかった。我々はすでに中期多臓器発癌試験法を用いて亜硝酸とアスコルビン酸の複合投与は、前胃以外の主要臓器に対しては影響を与えないことを報告している。今回は、まだ病理組織学的検討が終了していないが、亜硝酸とアスコルビン酸による発がん修飾を、直接ヒトへ外挿することは困難であろう。

亜硝酸はPhIPと同じくHCAの一つであるMeIQxとの同時投与により、ラット肝発がんを明瞭に促進させることが本研究班の白井により報告されている。Salmonella typhimurium TA98、TA100を用いたAmes assayでは、亜硝酸はIQやMeIQの変異原性を増強するが、Glu-P-1やTrp-P-2では逆に抑制する。これは、後者では亜硝酸存在下において変異原性に乏しい脱アミノ化合物が生成されるためと考えられている。今回の実験で亜硝酸とPhIPの同時投与により乳腺腫瘍の発生が抑制された結果は、イニシエーション時のPhIP摂取量の減少も要因の一つかもしれないが、亜硝酸の投与により脱アミノ化合物が生じ、その結果発癌が抑制された可能性も十分

と考えられ、in vivoにおいても亜硝酸はHCAの種類によって異なった発がん修飾作用を発現することが示唆された。

子宮肥大試験を用い、o,p'-DDTおよびMethoxychlorのエストロゲン様相互作用を検討した結果では、陽性対照物質E2とo,p'-DDT、あるいはE2とMethoxychlorとの組み合わせでは、相加性がみられたが、o,p'-DDTとMethoxychlorとの組み合わせでは、拮抗性がみられ、本研究により複数の農薬等化学物質による相互作用を検討する一つの方法が得られたと考えられた。

in vitroアレルギーモデル系の検討では、含窒素系農薬の中でもジフェニル-ヒル型農薬であるCNPとNIPに着目し、脱顆粒への影響について検討を行った。含窒素系農薬CNPは、ラット腹腔肥満細胞からの抗原刺激に伴う脱顆粒反応を促進することが、佐藤らにより報告されている農薬<sup>2)</sup>であるが、培養肥満細胞であるRBL-2H3細胞からの、脱顆粒反応の促進がみられた。また、NIPの作用は、CNPよりは弱く、ベンゼン環に結合するハロゲンの数の違いで脱顆粒促進活性に違いのことが示された。なお、これら農薬によるマスト細胞からの脱顆粒促進のメカニズムについては、不明であるが、CNPに関しては、ジフェニル-ヒル型構造を持つため、不飽和脂肪酸の光酸化型過酸化を引き起こし、膜の破壊に到り、脱顆粒を促進する可能性も考えられる。また、DBPとの併用効果の実験では、CNP、NIPとも、それら単独では、有意な脱顆粒促進作用を示さない濃度（CNP1 $\mu$ g/mL、NIP10 $\mu$ g/mL）でDBP50 $\mu$ Mを共存させた時、それぞれ単独の場合より幾分高い増強効果がみられた。DBPは、細胞内カルシウム濃度上昇を促すが、CNPは細胞内カルシウム濃度上昇を促さないことが我々の研究から明らかになりつつあり、DBPとCNPの細胞内の作用部位は、違うことが予想される。今後、細胞の作用機構が違うと思われる有機リン系農薬フェントロチオンと、含窒素系農薬CNPの併用効果による脱顆粒反応への影響についても調べていきたいと考えている。次に、in vivoアレルギーモデル系の検討では、すでにin vitroの実験系で、マスト細胞からの脱顆粒反応を促進することが明らかとなってきた含窒素系農薬2種類について、アレルギー状態および非アレルギー状態における免疫系へ

の影響を調べた。その結果、非アレルギー状態のNC/NaマウスではNIPおよびCNPの投与により、免疫抑制作用が認められた。この作用はNIPよりCNPの方が強い傾向が認められ、物質内のハロゲンの数の違いで反応性に差が認められることが示された。また、SRBC投与や、OVA投与、DNCB投与によるアレルギー状態の動物においても、一部の測定項目で免疫抑制作用が認められた。これらの変化は臓器重量や細胞数、抗体濃度より、PFC assayやLTT assayといった機能変化に強く表れ、一般状態の悪化を伴うような全身性の毒性の結果ではなく、明らかに免疫系への選択的な抑制作用によるものと考えられた。この含窒素系農薬は、*in vitro*の実験系でマスト細胞からの抗原刺激に伴う脱顆粒反応を促進させることが示されたが、*in vivo*の実験系ではアレルギー反応を抑制する傾向が認められており、細胞膜に対する直接作用とは別に全身性の作用が影響しているものと推測される。また、アレルギー状態と非アレルギーじょうたいでは、反応性に違いが認められた。これは、アレルギー状態では免疫系が活性化する方向に傾いているため、免疫抑制傾向を示すCNPやNIPの作用が相殺されたものと考えられた。また、DBPの複合投与により、SRBCを投与した動物の脾臓重量当たりの脾細胞数と血清中総IgM濃度で含窒素系農薬との相互作用が認められた。しかし、これらの変化は、NIPとCNPとに共通して認められてはいないため、今後、用量依存性などさらなる検討が必要と思われる。複合投与の影響を検討してゆく上で、それぞれの投与経路や、投与時期また評価法などについても総合的に検討する必要がある。今後、これらの観点からの検討に加えて、種々の農薬や環境化学物質、食品成分などの複合投与を行って評価法のvalidationを行い、多くの化学物質の評価に役立てたい。さらに、免疫抑制状態あるいはアレルギー状態の動物を用いて種々の化学物質の複合投与による影響を調べることと、*in vitro*アレルギーモデル系の構造活性相関の検討とを合わせて、臨床的にも有用な情報を提供できるようにしたいと考えている。

分子中にS元素を含むMBIは肝ミクロソームの薬物代謝酵素P450並びにフラビンモノオキシゲナーゼ(FMO)の基質となりうる化合物であるが、それぞれの阻害

剤の影響やヒトP-450分子種ないしFMO-3発現系ミクロソームを用いての代謝で、ヒトFMO-3の寄与が高いことが認められた。また、ヒト肝ミクロソームによるTestosteroneの代謝におけるMBIの共存ないし前処理による影響は、昨年度報告したラットの場合と同様、Testosteroneの代謝物、6 $\beta$ -OH、15 $\beta$ -OH、15 $\alpha$ -OH、16 $\beta$ -OH、2 $\beta$ -OH体等の生成の抑制が認められ、中でも6 $\beta$ -OH体への代謝は拾 $\mu$ M程度のMBIの濃度により強い抑制が認められたことなどを考えると、CYP3A4をはじめとする肝ミクロソームCYPとの相互作用から*in vivo*での肝障害との関連性が示唆される。グレープフルーツジュース相互作用はカルシウムチャンネル阻害薬の作用を増強し、過度の血圧低下を招くことが報告されて以来、临床上重要な多くの薬の薬効・動態を変動させることがわかってきている。一方、申請者らは物質と生体影響の両面からグレープフルーツジュースの相互作用を調べ、従来考えられてきたフラボノイドではなく、フラノクマリンが主起因物質であり、新規物質のフラノクマリン2量体、GF-I-1とGF-I-4がCYP3A4と呼ばれるチトクロームP450を強力に阻害することを明らかにしてきた。今回の結果は、漢方薬として広く使用されているものに多くのCYP3A4阻害物質が含まれていることを示した。得られた物質の性質を調べたところフラノクマリン構造を持つ物質に阻害作用の強いことがわかった。これらは既知物質との比較によって、インペラトリンを含むフラノクマリングラニル誘導体であることが明らかとなった。これら物質はターフェナジンと薬物相互作用を起こしたケトコナゾールとほぼ同等の強さでCYP3AタイプチトクロームP450に強く結合し、不活性化することがわかった。また不可逆的な機序でCYP3A4を失活させる作用を持つことも明らかとなった。これらの結果からグレープフルーツ由来のフラノクマリンと同様に強い阻害活性を持つことが明らかとなった。さらに漢方処方抽出物の状態でも阻害活性を示し、その阻害はフラノクマリン成分に由来することも明らかとなった。グレープフルーツやセリ科の植物のような食物中に含まれる成分が肝薬物代謝を抑制した。生薬成分中にも肝薬物代謝を阻害する物質が見いだされた。CYP3Aは肝のみならず、小腸にも多く

存在し、薬物の初回通過効果に重要な役割を持っていることから、農薬等の解毒代謝を抑制し、相互作用を起こす可能性に留意する必要がある。すでに、薬物代謝の競合あるいは非競合阻害に基づくin vivo薬物間相互作用を、阻害剤のIu/Ki値に基づいて予測する方法論を提唱し、tolbutamide/sulfaphenazole (CYP2C9 における相互作用)、triazolam/ketoconazole (CYP3A4 における相互作用) 等の組み合わせについて、定量的予測が可能であったことを報告してきた。臨床上使われる薬剤の約半数がCYP3Aにより代謝を受けるといわれている。これらのなかでもCYP3Aによる消失の寄与が大きいものは、midazolamと同様にマクロライド系抗生物質により相互作用を受ける可能性がある。また、マクロライド系抗生物質の場合、その種類によってCYP3A基質との相互作用の程度は異なる。今回それらいくつかの相互作用をin vitroデータから定量的に予測することに成功した。臨床においての毒性の発現を防ぐために、あらかじめin vitroデータから阻害形式を考慮したモデルを使って、相互作用の程度を定量的に予測し、把握していくことは極めて重要である。

食品別に複数農薬の検出傾向を調べると、中国産未成熟えんどうでは、有機リン系農薬のメタミドフォスとオメトエート、含窒素系農薬のトリアジメノール、ピレスロイド系農薬のシベルメトリンとフェンバレートの同時検出が見られた。日本産大葉で含窒素系農薬のプロシミドン、ピレスロイド系農薬のフェンプロバトリン、その他プロモプロピレートが同時に検出されている。中国産ケールでは有機リン系農薬のクロルピリホスとジクロルボス、ピレスロイド系農薬のシベルメトリンが同時に検出され、一方タイ産ケールではピレスロイド系農薬のシベルメトリンと含窒素系農薬のクロルフェナビルが同時に検出され、国により使用農薬に特徴がある。日本産ぶどうでは、含窒素系農薬のイプロジオンまたはメバニピリム、ピレスロイド系農薬のベルメトリンまたはシフルトリンが同時に検出されている。日本なしでは、有機塩素系農薬のキャプタン、N-メチルカーバメート系農薬のメソミルまたはカルバリルが同時に検出されている。一方いちごでは、日本産、ニュージーランド産あるいは米国産を問わず、

2種以上の農薬が使用されているが、使用農薬の種類には一定の傾向が認められず、各生産者が様々な農薬を使用していることが良く分かる。1998年に「残留農薬基準設定における暴露評価の精密化に関する意見具申」(食品衛生調査会・分科会)が示された。これは、“日本型推定一日摂取量方式”の採用を提唱し、従来の国民平均としての暴露量に加え、幼小児、妊婦、高齢者などのサブグループの暴露量を試算することにより、科学的により妥当な曝露量評価を行おうとするものである。特に、幼少児については、それよりも年長の者と比較して、体重kg当たりの1日当たりの食品摂取重量が多くなる傾向が強く、最大残留基準を用いた暴露量評価において、対ADI比が80%、さらには100%を越えることが少なくない。また、近年、このグループにおいてある特定の農作物を多量に摂取した際におこり得る急性暴露影響に関する科学的検討の必要性がとくに認識されるようになってきた。このような背景から、本年度の研究では、これまでわが国において極めて情報が乏しかった学童期における農作物等の摂取実態を明らかにするために、国民栄養調査以外の新たな調査を行い、補完的なデータの収集を行った。その結果、地域による学校給食の多様性ととも、現行の国民栄養調査で示されているデータとの乖離が大きいことが明らかとなった。対象者、調査時期及び調査方法が異なるため単純に比較対比できるものではないが、兵庫県A市の学校給食における摂取量データと、同じ地区で調査を行った学校給食以外での摂取量データについて、主な農作物に関する対比を試みた。これは1地域での調査結果であり、一般化しにくい事項かもしれないが、少なくとも兵庫県A市においては、ばれいしょ、こんにゃくいも、キャベツ、たまねぎ、にんじん、メロン類については、1日の平均摂取量の50%以上を学校給食からとっている可能性が示唆された。これは、学校給食の調理現場の実態からみても頷けるもので、特に、ばれいしょ、たまねぎ、にんじんは、機械による剥皮や切断が可能(キャベツについては、剥皮はできないが切断は可能)であるとともに、大量調理が用意であること等が大きな要因となっていると考えられる。従って、これらの農作物に使用される農薬

の曝露評価を行うときには、学校給食での実態（摂取実態のみならず、食材調達から洗浄、調理・加工の過程も含む）を把握することも重要であると考えられる。国民栄養調査における学童の学校給食の把握方法に関しては、調査対象日における各対象者での摂取食品に関する情報はなく、「学校給食」という1つのメニュー（料理レシピ）を想定し、複数回数の学校給食の献立から得られた食品の組み合わせによる加重平均を「学校給食」の成分値としている。しかも、残食ないしはおかわり等による摂取量の個人差についても現行では考慮することができない。そこで、2001年からは、学校給食について、個人差をある程度把握できるような新たな調査方法の導入を、現在検討しているところである。国民栄養調査データを食品中の残留農薬等の曝露評価等に、2次的に活用する際には季節変動の問題をはじめとして制限事項も少なくない。しかし、1995年に導入された個人別摂取量調査において、飛躍的にデータの活用範囲が広がり、残留農薬の曝露評価の精密化が進められる契機となった。さらに、2001年から導入されようとしている新しい食品番号体系においては、これまで半数以上対応不可能であったcodex食品番号に対してある程度対応可能となる。また、食材がどのように調理されて食べられたかを把握するために、「調理コード」を新たに導入することも現在検討中である。このように、国民栄養調査が充実・強化されることにより、残留農薬の曝露評価の精密化も次のステップへと向かうことができよう。

## E. 結論

芳香族化合物と亜硝酸の複合作用を検索した結果、PABA単独で甲状腺発癌の促進、PAPと亜硝酸の複合により甲状腺発癌抑制、PABAと亜硝酸の複合により膀胱の細胞増殖作用が認められたのみであり、生体に対する影響は少ないものと考えられる。亜硝酸とアスコルビン酸による発癌促進作用は前胃に特異的であり、高用量が必要である。亜硝酸との複合による毒性発現の相加、相乗作用は、現時点では抗酸化物質に特異的である。また、亜硝酸はPhIPによる乳腺発癌を抑制し、HCAの種類により異なった作用を示すことが明らかにな

った。次にラット肝中期発癌試験法を用いて、亜硝酸とHarman、NorharmanあるいはAmitroleとの相互作用を検討したが、その相互作用は見いだせなかった。

子宮肥大試験を用い、o,p'-DDTおよびMethoxychlorのエストロゲン様相互作用を検討した。その結果、陽性対照物質E2とo,p'-DDT、あるいはE2とMethoxychlorとの組み合わせでは、相加性がみられたが、o,p'-DDTとMethoxychlorとの組み合わせでは、拮抗性がみられ、本研究により複数の農薬等化学物質による相互作用を検討する一つの方法が得られたと考えられる。

含窒素系農薬であるクロロニトロフェン(CNP)及びニトロフェン(NIP)と環境汚染化学物質であるジブチルフタレート(DBP)との複合作用について、マウス由来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、単独作用の他に複合作用による脱顆粒促進活性の増強作用が観察された。一方、それらの物質間の免疫系に対する複合作用をNC/NgaおよびBALB/cマウスを用いたin vivoの実験系で調べた結果、一部の測定項目でNIPおよびCNP単独で免疫抑制作用が認められた他に、DBPとの複合作用が認められた。これらの結果から、本研究で開発された試験法を用いることにより、含窒素系農薬とフタル酸エステルの免疫系における相互作用を明らかにできることが示唆された。

ゴムの保存剤として使用されているMBIは主にヒトFMO-3により代謝され、ヒトP-450薬物代謝酵素活性をも強く抑制し、ヒトにおける他の薬物等の毒性を増強する可能性が示唆された。CYP3Aを阻害する活性はグレープフルーツ以外にもセリ科の植物や漢方薬などに多く含まれており、医薬品や農薬の代謝を不可逆的に阻害し、相乗毒性を起こす可能性がある。薬物代謝阻害に起因するin vivo薬物間相互作用は、阻害剤のIn,u/Ki値に基づいてある程度定量的に予測することが可能であり、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。

食品衛生法では現在214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いない。本年度は農薬使用頻度の高い個別の農作物186試料について242農薬の複数汚染実態を調査した。その結果、輸入

農作物の未成熟えんどうから6~10種農菜、大葉から4種農菜、きゅうり、ケール、小松菜、ネクタリン及びおうとうから3種農菜、ピーマンから5種農菜、ぶどうから4~5種農菜、日本なしから3~4種農菜、りんごから3~9種農菜、いちごから3~8種農菜、レモン及びグレープフルーツから3~4種農菜、オレンジから3~5種農菜が同時に検出されることが明らかとなった。

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。すなわち、1. 学校給食に関して、複数地域からデータを収集するとともに、学校給食以外からの農作物の摂取量に関するデータを検討した。2. 2001年より食品番号体系が全面改定される国民栄養調査において、“暴露評価”という観点からどのような食品項目を把握すべきかの検討を行った。3. 農作物（特に果実）について、廃棄される部位及び廃棄率（重量比）に関する系統的なデータベースを作成した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 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., 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.*, 154, 45-51, 2000.
3. Shirai, T., Imaida, K., Ito, N. Prostate. In: M. Nagao, T. Sugimura (eds.), *Food Born Carcinogenesis*, pp. 270-274. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.
4. Imaida, K., Shirai, T., et al. Degenerative Changes. In: M. Nagao, T. Sugimura (eds.), *Food Born Carcinogenesis*, pp. 275-284. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.
5. Ito, N., Shirai, T., et al.: Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats., *Mutation Res.*, 462: 209-217, 2000.
6. Tiwawech, D., Shirai, T., et al.: Enhancing effects of Thai edible plants on 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-hepatocarcinogenesis in a rat medium-term bioassay. *Cancer Lett.*, 158: 195-201, 2000.
7. Hokaiwado, N., Shirai, T., et al.: Frequent c-Ha-ras gene mutations in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Lett.*, 163: 187-190, 2001.
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., Toxicity 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. L.-Q. Guo, M. Taniguchi, Y.-Q. Xiao, K. Baba, T. Ohta and Y. Yamazoe. 2000 Inhibitory effect of natural furanocoumarins on human microsomal cytochrome P450 3A activity. *Jpn. J. Pharmacol.*, 82: 122-129.
12. W. Tassaneeyakul, W. Tassaneeyakul, S. Vannaprasaht and Y. Yamazoe. 2000 Omeprazole sulfone, but not 5-hydroxyomeprazole, is inhibited by ingestion of grapefruit juice. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 49:

- 139-144.
13. T. Nakamura, K. Okada, K. Nagata and Y. Yamazoe. 2000 Intestinal cytochrome P450 and response to rifampicin in rabbits. *Jpn. J. Pharmacol.*, 82: in press.
  14. 杉山雄一、加藤将夫、金光真一、伊藤清美: 肝臓での代謝および輸送における薬物間相互作用の定量的予測. *薬物動態*15: 235-243 (2000)
  15. 秋山由美、吉岡直樹、辻正彦: 平成10年度に残留基準設定が諮問された農薬の多成分一斉スクリーニング分析法への適用. *兵庫衛研報*, 34, 145-149(1999)
  16. 秋山由美、吉岡直樹、辻正彦: 平成11年度に残留基準設定が諮問された農薬の多成分一斉分析法への適用. *兵庫衛研報*, 35, 123-126(2000)
  17. 伊藤正子、永山敏廣、高野伊知郎、小林麻紀、田村康宏、木村奈穂子、北山恭子、高田智恵子、安田和男: 国内産野菜・果実中の残留農薬実態調査 - 平成10年度 -、*東京都衛研年報*, 50, 138-144(1999)
  18. 高野伊知郎、永山敏廣、小林麻紀、伊藤正子、田村康宏、木村奈穂子、北山恭子、高田智恵子、安田和男: 輸入農産物中の残留農薬実態調査 (有機リン系農薬及び含窒素系農薬) - 平成10年度 -、*東京都衛研年報*, 50, 145-150(1999)
  19. 小林麻紀、永山敏廣、高野伊知郎、伊藤正子、田村康宏、木村奈穂子、北山恭子、高田千恵子、安田和男: 輸入農産物中の残留農薬実態調査 (有機塩素系農薬、N-メチルカーバイド系農薬及びその他) - 平成10年度 -、*東京都衛研年報*, 50, 151-157(1999)
  20. 吉池信男: 残留農薬の暴露量試算のための食品摂取量基準データの検討. *食品衛生研究*, 50:7-27, 2000.
- 2) 学会発表
1. 宮内 慎、西川秋佳、古川文夫、中村英明、孫和永、山岸 恵、広瀬雅雄: 抗酸化剤と亜硝酸の併用投与によるMNNG誘発ラット胃発癌に及ぼす影響、第59回日本癌学会総会記事, p.476, 2000.
  2. 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.
  3. 今井田克己、白井智之、二段階発がんモデル、第16回日本毒性病理学会、平成12年1月、岐阜
  4. 杉浦 諭、白井智之ら、ラット中期肝発がんモデルにおけるharman, norharmanおよびNaNO<sub>2</sub>とMeIQxとの相互作用、第59回日本癌学会、平成12年10月、横浜
  5. 紅林秀雄、大野泰雄、ゴム老化防止剤2-mercaptobenzimidazole(MBI)のヒト肝ミクロソーム酵素系での代謝と阻害作用、日本薬学会第121年会(2001,3)
  6. 萩原加奈子、伊藤清美、金光真一、島田典招、杉山雄一、伊藤智夫: マクロライド系抗生物質による薬物間相互作用の予測. 第10回日本病院薬学会年会 (京都、2000年10月)
  7. 萩原加奈子、伊藤清美、金光真一、清水理桂子、設楽悦久、津田泰之、O. V. Trubetskoy, D. V. Thompson、杉山雄一、伊藤智夫: マクロライド系抗生物質による相互作用の予測 -ヒトCYP発現系を用いて-. 日本薬学会第121年会 (札幌、2001年3月)
  8. 秋山由美、吉岡直樹、辻正彦: 多成分一斉分析法による農産物中の残留農薬実態調査 (1995~1999年度)、第23回残留農薬分析研究会、2000年9月 (神戸)
  9. Yoshiike N, Iwaoka H: Update on Dietary Survey Methodologies -Japan, Third Asian Conference on Food Safety and Nutrition, 2000.10.3, 北京
  10. Kanematsu R, Yoshiike N, Abe T, Yamaguchi H, Matsumura Y: Database development specified for exposure assessment of chemical contaminants in usual Japanese diet, Third Asian Conference on Food Safety and Nutrition, 2000.10.4, 北京
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
なし



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

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

亜硝酸と芳香族アミンである *p*-aminophenol (PAP)、*p*-aminobenzoic acid (PABA)、acetaminophen (AAP) の複合による諸臓器に対する影響をラット多臓器発がん試験法を用いて検討した結果、PABA 単独で甲状腺腫瘍の増加が認められたが、PAP と亜硝酸の複合では甲状腺の腺腫の減少が、また PABA と亜硝酸の複合により膀胱の過形成の増加が認められたのみであり、今回用いたフェノール基あるいはアミノ基を有する芳香族化合物と亜硝酸との複合による生体への影響は少ないものと考えられた。次に亜硝酸とアスコルビン酸の複合による前胃及び腺胃発癌の用量相関性を新たな MNNG ラット 2 段階腺胃・前胃発がんモデルにより検索した。その結果、前胃発癌の複合効果は、亜硝酸 0.1% 以上及びアスコルビン酸 1.0% 以上の用量が必要であった。一方、腺胃においては亜硝酸及びアスコルビン酸の複合影響は明らかでなかった。さらにヘテロサイクリックアミンの一つである 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) と亜硝酸のラット乳腺発癌に対する影響を検討した結果、亜硝酸の複合投与により、乳腺発癌が抑制されることが明らかとなった。

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だし、前年度も  $\alpha$ -tocopherol との複合により明らかな前胃発がん促進作用を有することを報告した。また、亜硝酸は加熱調理の過程で生じるヘテロサイクリックアミン (HCA) の変異原性を増強、あるいは減弱させることも知られている。HCA の一つである 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) は雌性ラットに乳腺がんを、雄性ラットに大腸、前立腺がんを誘発する物質である。

今年度は、亜硝酸とフェノール基あるいはアミノ基を有する芳香族化合物による複合投与の諸臓器に対する影響をラット多臓器発がん試験法を用いて検討し、ま

た、3 用量の亜硝酸と 2 用量のアスコルビン酸を用いて、ラット胃発がんに対する用量相関性を前胃及び腺胃を対象とした新しい 2 段階発がん試験法で検討した。さらに、PhIP 誘発雌性ラット乳腺発がんモデルを用いて、PhIP を投与するイニシエーション期間に亜硝酸を飲水にて併用した場合の乳腺腫瘍発生に対する影響についても検討した。

B. 研究方法

【実験 1】各群 15 匹の 6 週令 F344 系雄ラット（日本チャールズリバー社より購入）に、イニシエーションとして以下の処置を行った。すなわち 100mg/kg 体重の *N*-diethylnitrosoamine (DEN) を 1 回腹腔内投与し、2 日後に 20mg/kg 体重の *N*-methylnitrosoamine (MNU) を 2 または 3 日間隔で 4 回腹腔内投与し、その後 40mg/kg 体重の 1,2-dimethylhydrazine (DMH) を 2 または 3 日間隔で 4 回腹腔内投与した。また、DEN 処置時より 0.05% の *N*-butyl-*N*-(hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) を 2 週間飲料水投与し、その後 0.1% の 2,2'-dihydroxy-di-*n*-propylnitrosoamine (DHPN) を 2 週間飲料水投与した。イニシエーション処置終了後、0.05% PAP（混餌投与）、0.5% PABA（混餌投与）、0.5% AAP（混餌投与）、0.2% NaNO<sub>2</sub>（飲料水投与）、PAP+NaNO<sub>2</sub>、PABA+NaNO<sub>2</sub>、AAP+NaNO<sub>2</sub> 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。イニシエーターを与えないで同様に処置した各群10匹の対照群も設けた（図1）。DEN、DMH、PAPはSigma-Aldrich Japan、BBNは東京化成工業、MNU、DHPNはナカライテスク、PABAおよびAAPは和光純薬工業より購入したものを使用した。体重、摂餌量、摂水量はイニシエーション終了後週1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。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。

【実験2】6週令F344系雄ラットに、イニシエーション処置としてN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)を0.01%の濃度で10週間飲水投与（腺胃のイニシエーション）し、更に、9週目には100mg/kg体重で1回胃内強制投与（前胃のイニシエーション）した。イニシエーション処置終了後に動物を各群15匹に分け、0.1もしくは1% アスコルビン酸（AsA）の混餌投与及び0.05、0.1もしくは0.2% NaNO<sub>2</sub>の飲料水投与、更にはそれぞれ各濃度のAsA及びNaNO<sub>2</sub>を組み合わせる32週間投与した。対照群には、粉末基礎飼料（オリエンタルCRF-1）のみを与えた（図2）。MNNGはSigma-Aldrich Japan、AsA 及びNaNO<sub>2</sub>は和光純薬工業より購入したものをそれぞれ使用した。体重はイニシエーション終了後2週間に1回以上、摂餌量及び摂水量は4週に1回以上の頻度で測定した。42週の時点でエーテル麻酔下で放血後、剖検した。食道、胃及び十二指腸については、10%中性緩衝ホルマリンを注入し固定後、胃の大弯に沿って開き、濾紙に貼り付けて保存した。肝臓及び腎臓は重量測定後、また、小腸及び大腸についてはホルマリンを注入し固定した。現在、胃の他、採取した臓器について肉眼的異常所見を確認した。今後、胃について病理組織標本を作製し、腫瘍性病変及び増殖性病変について解析する予定である。

【実験3】生後6週令のSD系雌性ラットを用い、PhIP単独（PhIP）群、PhIPとNaNO<sub>2</sub>併用（PhIP+NaNO<sub>2</sub>）群、NaNO<sub>2</sub>単独（NaNO<sub>2</sub>）群、対照（Control）群の4群を設けた。イニシエーション処置として、最初の4週間にコーン油に溶解したPhIP（Toronto Research Chemicals

Inc.）を週2回、計8回強制経口投与（100mg / b.w. kg）し、同時期に0.2% NaNO<sub>2</sub>を飲料水投与にて与えた。飼料は、実験期間中5%コーン油を添加した粉末基礎飼料（オリエンタルCRF-1）を用いた。イニシエーション期間終了後、週1回、乳腺腫瘍を触診にて観察した。48週でエーテル麻酔にて屠殺、剖検した。

## C. 研究結果

【実験1】最終体重は発癌物質、芳香族化合物投与の有無に関わらず、NaNO<sub>2</sub>の投与により有意な減少を示し、肝臓及び腎臓の比重量は発癌物質、芳香族化合物投与の有無に関わらず、NaNO<sub>2</sub>の投与により有意な増加あるいは増加傾向を示した（表1）。イニシエーション処置により、腫瘍は主に腎臓、小腸、大腸、肺及び甲状腺に発生した。腎臓には腺腫、腎芽腫が発生し、腎芽腫の発生率はNaNO<sub>2</sub>の投与により有意な減少が認められたが、芳香族アミンとの複合効果は認められなかった（表2）。小腸及び大腸の腺腫及び腺癌、肺の腺腫及び腺癌の発生率、肝臓の glutathion S-transferase placental form (GST-P) 陽性巣数及び面積は群間に差は認められなかった（表3～5）。甲状腺では腺腫及び腺癌が発生し、腺腫の発生率はPABA単独で有意に増加し、PAPとNaNO<sub>2</sub>の複合では有意に減少した（表6）。膀胱ではPABAとNaNO<sub>2</sub>の複合により過形成の発生率が有意に減少した（表7）。その他の臓器では、腫瘍性及び非腫瘍性病変の発生率に群間の差は認められなかった。なお、イニシエーション処置をしない群では増殖性病変は発生しなかった。

## 【実験2】

投与期間中、1% AsA+0.2% もしくは0.1% NaNO<sub>2</sub>投与群の体重は、対照群をやや下回って推移し、投与終了時の平均体重も有意に低かった（対照群平均と比べそれぞれ15及び6%減）。臓器重量では、腎臓において亜硝酸投与群で軽度な増加傾向がみられた。摂餌量では、明らかな差はみられなかった。摂水量では、1% AsA+0.2% もしくは0.1% NaNO<sub>2</sub>投与群で減少傾向がみられた（表8）。採取した臓器について肉眼的に観察した結果、前胃において1% AsA+0.2% もしくは0.1% NaNO<sub>2</sub>投与群で明らかな腫瘍性病変の増加がみられ、特に亜硝酸0.2%投与群で顕著であった。その他の群では、肉眼的に対照群と比べ明らかな増加は認められなかつ

た。また、腺胃では腫瘍性病変が各群0~3例に認められたのみで、アスコルビン酸や亜硝酸による増強はなかったものの、その腺胃発がんに対する影響は明らかでなかった。その他、空腸において1% AsA+0.2% NaNO<sub>2</sub>投与群の1例に腫瘍が認められた。

【実験3】イニシエーション期間中のラット1匹あたりの一日平均摂水量は、PhIP群で30.0±1.1、PhIP+NaNO<sub>2</sub>群で18.7±1.1、NaNO<sub>2</sub>群で24.7±0.1、Control群で26.5±0.4 ml だった。NaNO<sub>2</sub>飲料水投与した群では摂水量が有意に減少し、特にPhIPとの併用群で減少した。この期間では、体重増加量においても顕著な低下が見られた。乳腺腫瘍の発生は、PhIP群で14週から観察されたものの、PhIP+NaNO<sub>2</sub>群では46週まで見られなかった（図3）。剖検時の体重、主要臓器比重量に、差は見られなかった（表9）。肉眼的にPhIP群、PhIP+NaNO<sub>2</sub>群の腫瘍発生率、個数は同程度だったが、併用群の腫瘍体積は小さかった（表10）。現在、病理組織学的検索を行っている。

#### D. 考察

芳香族化合物とNaNO<sub>2</sub>の諸臓器に対する複合作用をラット中期多臓器発がんモデルを用いて検索し、PABA単独で甲状腺腫瘍の発生頻度が増加し、PAPとNaNO<sub>2</sub>の複合により甲状腺の腺腫の減少が認められた。また、PABAとNaNO<sub>2</sub>の複合により膀胱の過形成の増加が認められた。多くの抗甲状腺剤は甲状腺下垂体軸のネガティブフィードバック機構により甲状腺の過形成や腫瘍を発生させることが知られており、PABAにもこのような作用を示す可能性がある。PAPとの複合による甲状腺腺腫の減少は摂餌量の低下によるものが一因として考えられる。PAPは肝臓で代謝されて抱合体になり、腎臓に移行した抱合体が蛋白質に結合し、腎毒性を示すことが報告されている。しかし、今回の実験系ではNaNO<sub>2</sub>の複合に関わらず、腎腫瘍の発生率は他の群と同等であった。これには摂餌量の減少によるものに加えて、今回用いたPAPの投与経路及び用量も関係しているものと考えられる。酸性条件下においてPAPはNaNO<sub>2</sub>との複合により変異原性物質を生成し、PABAは硝酸イオンのスカベンジャーとして働くことが報告されている。今回の実験系ではPAP及びPABAの胃発がんに対する修飾作用は認められなかった。今回の結果から、

芳香族化合物とNaNO<sub>2</sub>の複合作用はほとんど認められず、生体に対する影響は少ないものと考えられた。現時点ではNaNO<sub>2</sub>による複合作用の発現にはかなり化合物の構造相関性があると考えられる。

前胃及び腺胃を対象とした新しいラット2段階胃発がんモデルを用いて亜硝酸とアスコルビン酸の複合効果及び用量相関性を検討した。亜硝酸とアスコルビン酸と複合により前胃発癌の強い促進効果が示されたが、その発現にはアスコルビン酸1%以上、亜硝酸0.1%以上の高用量が必要であった。一方、ヒトの胃に相当する腺胃においては肉眼的に全体の約4%の個体にしか腫瘍が認められず、亜硝酸及びアスコルビン酸の腺胃発がんへの影響は明らかでなかった。我々はすでに中期多臓器発癌試験法を用いて亜硝酸とアスコルビン酸の複合投与は、前胃以外の主要臓器に対しては影響を与えないことを報告している。今回は、まだ病理組織学的検討が終了していないが、亜硝酸とアスコルビン酸による発がん修飾を、直接ヒトへ外挿することは困難であろう。

亜硝酸はPhIPと同じくHCAの一つであるMeIQxとの同時投与により、ラット肝発がんを明瞭に促進させることが本研究班の白井により報告されている。SalmoneIIa typhimurium TA98、TA100を用いたAmes assayでは、亜硝酸はIQやMeIQの変異原性を増強するが、Glu-P-1やTrp-P-2では逆に抑制する。これは、後者では亜硝酸存在下において変異原性に乏しい脱アミノ化合物が生成されるためと考えられている。今回の実験で亜硝酸とPhIPの同時投与により乳腺腫瘍の発生が抑制された結果は、イニシエーション時のPhIP摂取量の減少も要因の一つかもしれないが、亜硝酸の投与により脱アミノ化合物が生じ、その結果発癌が抑制された可能性も十分に考えられ、in vivoにおいても亜硝酸はHCAの種類によって異なった発がん修飾作用を発現することが示唆された。

#### E. 結論

芳香族化合物とNaNO<sub>2</sub>複合作用を検索した結果、PABA単独で甲状腺発癌の促進、PAPとNaNO<sub>2</sub>の複合により甲状腺発がん抑制、PABAとNaNO<sub>2</sub>の複合により膀胱の細胞増殖作用が認められたのみであり、生体に対す

る影響は少ないものと考えられる。NaNO<sub>2</sub>とアスコルビン酸による発癌促進作用は前胃に特異的であり、高用量が必要である。の複合による毒性発現の相加、相乗作用は、現時点では抗酸化物質に特異的である。また、亜硝酸はPhIPによる乳腺発癌を抑制し、HCAの種類により異なった作用を示すことが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 発表論文

##### 論文発表

0. 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.
1. Furukawa, M., Nishikawa, A., Miyuchi, M., Nakamura, H., Son, H.-Y. Yamagishi, M. and Hirose, M. Concurrent administration of fish mea

l and sodium nitrite does not promote renal carcinogenesis in rats after initiation with N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine. *Cancer Lett.*, 154, 45-51, 2000.

##### 学会発表

- 1) 宮内 慎、西川秋佳、古川文夫、中村英明、孫和永、山岸 恵、広瀬雅雄：抗酸化剤と亜硝酸の併用投与によるMNNG誘発ラット胃発癌に及ぼす影響、第59回日本癌学会総会記事, p.476, 2000.
- 2) Miyuchi, 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.

#### H. 知的所有権の取得状況

なし