

26620981

別添2

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

食品中化学物質の毒性評価に及ぼす諸要因に関する調査研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広瀬雅雄

平成15(2003)年4月

目 次

I. 総括研究報告書	
食品中化学物質の毒性評価に及ぼす諸要因に関する調査研究	1
広瀬雅雄	
II. 分担研究報告	
1. 食品中化学物質の発がん評価に及ぼす諸要因の検討	14
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作用の影響に関する研究	20
白井智之	
3. 生体防御因子としての酸化ストレス感受性の偏倚による食品中残留農薬等の毒性発現 の修飾に関する研究	23
菅野 純	
4. 農薬等の複合投与による免疫系並びにアレルギーへの影響に関する研究	27
小野 宏	
5. 肝及び小腸における食品中化学物質の代謝及び吸収の変動と相乗毒性に関する研究	34
大野泰雄	
6. 農薬及びその他の化学物質による動物性食品の複合汚染に関する調査研究	42
佐々木久美子	
7. 食品からの残留農薬の暴露量に影響を及ぼす食事行動因子に関する調査研究	51
吉池信男	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	56
IV. 研究成果の刊行物・別冊	57

厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)

総括研究報告書

食品中化学物質の毒性評価に及ぼす諸要因に関する調査研究

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】【実験1】ヘテロサイクリックアミンであるIQ及び食品添加物でもあるNaNO₂の併用投与による肝臓あるいは大腸における発がん効果をF344ラットを用いて検討した。DEN及びDMHでイニシエーション処理したF344系雄ラットに、IQ 300 ppm(混餌)及びNaNO₂ 0.1%あるいは0.2%(飲水)を単独または複合で27週間投与した。その結果、IQ及びNaNO₂併用投与により、1個体当たりの腫瘍発生数が肝臓で増加傾向、また大腸で有意に高く、ジンバル腺では癌の発生率が用量相関性に増加し、0.2% + IQ 300 ppm併用投与群では70%と、IQ投与群の13%に比べて有意に高かった。従って、NaNO₂がIQの肝、大腸及びジンバル腺の発がんを増強させることが示された。また、イニシエーションの有無に関わらず、肺腫瘍が高率に認められ、IQが肺に発がん標的性を示す可能性が新たに判明した。【実験2】除草剤として用いられ、抗甲状腺物質としても知られているアミトロールの消化管障害時における甲状腺発がん修飾作用をDHPN誘発ラット二段階発がんモデルにより検討した。小腸及び大腸傷害物質として各々インドメタシンとデキストラン硫酸(DSS)を用い、アミトロールとの併用投与を行った。その結果、インドメタシン併用では腺癌の発生頻度及び個数がアミトロール単独群に比べ有意に減少した。DSS併用による甲状腺発がんへの影響は認められなかった。下行結腸ではDSSにより腺腫及び腺癌が高頻度に観察されたが、インドメタシンの併用で著明に減少した。【実験3】臓器障害の一端として、第2相解毒酵素群の発現誘導能を欠いたNrf2欠損マウスを用いたIQの発がん実験を開始し、現在経過観察中である。【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と、異なった性質をもつ薬物代謝酵素誘導物質であるPhenobarbital(PB), Clofibrate, Diethylnitrosamine(DEN)あるいはCaffeineとを同時投与した場合、MeIQxの発がん性がいかに変化するかを検索した。DENはMeIQxの発がん性を相乗的に促進し、逆にClofibrateは抑制した。CaffeineはMeIQxの活性化に重要なCYP1A2を誘導するにも関わらず明らかな修飾作用は示さなかった。代表的な発がんプロモーターであるPBはMeIQxの肝発がん性を明らかに修飾しなかった。【菅野】農薬の中には、標的とする細胞を傷害する機構として酸化的ストレスや生体内エネルギー生成阻害を引き起こすものが少なくない。本研究では酸化的ストレス誘導剤や生体内活性酸素種の最大の生成源でもあるエネルギー代謝系の阻害剤が複合的に作用した事例をモデルとして網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、より高精度の毒性評価・解析手法の構築を行う。平成14年度は実際に複合曝露下に於いて相殺効果を呈する毒性の機序をAffymetrix社 GeneChipシステムを用いて解析し、基本的な解析手法の構築と検証を行った。【小野】農薬の複合投与によるアレルギー反応への影響を、アレルギーモデルを用いてin vitro及びin vivoでのアレルギー促進活性の有無を検討した。アレルギー促進活性を網羅的に解析するための手法の導入を試みた。in vitroモデル系であるマスト細胞からの脱顆粒およびサイトカイン産生の促進のみられたクロロニトロフェン(CNP)について、マスト細胞における遺伝子発現への影響をDNAチップを用いて解析したところ、ケモカインMCP-1、転写活性化因子Egr-1およびストレス応答遺伝子GADD45aの有意な上昇がみられた。一方、in vivoの免疫毒性試験では、有機リン系農薬であるフェニトロチオンと2種類の含窒素系農薬の併用投与における作用をI型およびIV型アレルギー状態のマウスで検討した。その結果CNP、ニトロフェンともにフェニトロチオンの免疫系に対する作用を抑制する傾向が認められた。【大野】プロメトリンの代謝はヒト及びラット肝細胞のいずれにおいてもS原子の酸化体、N-脱アルキル化体、グルタチオン抱合体およびこれに由来すると考えられる代謝物が生成した。また、この代謝反応はチクロピジンやケトコナゾールで阻害され、CYP2C19やCYP3A4で代謝されることが示唆された。HepG2細胞にヒトCYP3A4プロモーター領域を含むレポーター遺伝子を導入することにより、再現性よくしかも高感度に農薬によるCYP3A4誘導評価が可能なヒト由来培養細胞を樹立した。ヒト胎児由来のHEK293細胞にRST (renal specific transporter) を安定発現した細胞を用いることにより、2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D)の腎近位尿管の側底膜側の取り込み過程にはOat1が、排泄側はRSTであることが示唆された。【佐々木】平成13年度は、動物性食品中のGC/MSを用いた残留農薬スクリーニング分析法として、超臨界流体抽出(SFE: Supercritical fluid extraction)法を国立医薬品食品衛生研究所で、また、有機溶媒抽出法を兵庫県立健康環境科学研究所で開発し、SFE法については、平成13年度は肉類(牛、豚及び鶏)の分析法を開発したが、14年度は適用食品をレバー(牛、豚及び鶏)及び魚類(筋肉及び内臓)に拡大するための検討を行い、新たにレバーに対するSFE法を開発した。また、平成14年度は、開発したSFE法及び有機溶媒抽出法を用いて、市販動物性食品(肉類、動物内臓、魚介類、くじら及び乳製品)について汚染実態調査を行った。SFE法では、肉類17検体、内臓10検体、魚(筋肉)15検体及び魚(内臓)4検体について分析したところ、ほとんどの検体からDDT類が痕跡量~33 ppb検出された。このほか、一部の検体からヘキサクロロベンゼン、シラフルオフェン、ディルドリン、α-BHC及びヘプタクロ

ルエポキシドが検出された。有機溶媒抽出法では、輸入えび15検体中8検体から飼料由来のものと思われるエトキシキン（酸化防止剤）が検出された。また、たい及びすずきからDDT類及びクロルデン類の痕跡量が検出されたほか、くじら5検体中1検体からもDDT類が痕跡量検出された。【吉池】2001年（平成13年）より新しい食品番号体系となった国民栄養調査について、食品番号及び調理コード等の再整理を行い、残留農薬の暴露評価の対象となる各農作物において加工・調理係数を実際に適用した場合、どの程度の暴露量が推定されるかについて試算を開始した。また、残留農薬の暴露評価の対象となる各農作物の摂取量を求めるために現在使用されている「食品番号の分類及び処理係数（材料比、重量比、他の係数）」の見直しのための基礎データを得るために、既存資料を用いて、代表的と考えられる食品の原材料構成、使用量、調理・加工に関する情報を整理し、データベース化した。

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
菅野 純 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
佐々木久美子 国立医薬品食品衛生研究所
食品部室長
吉池信男 国立健康・栄養研究所 健康・栄養調
査研究部 研究企画・評価主幹

A. 研究目的

現在、残留農薬や食品添加物のADI評価は、個々の化合物を対象としており、化合物の複合毒性や個体の病的状態は考慮されておらず、不確実係数は個体差、種差を考慮して100と設定されている。平成10-12年度の「食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究班」によって、食品中化学物質の複合による相互作用や残留農薬の複合汚染の一端が解明されてきた。本研究では、種々の毒性発現における個体差、種差以外の要因について実験的研究を行うとともに、残留農薬等の複合汚染の実態を明らかにし、ADI評価上重要なデータを得ることを目的としている。個々の研究者の研究目的は以下の通りである。

【広瀬】〔実験1〕亜硝酸と加熱調理した肉類などに含まれるヘテロサイクリックアミンであるIQとの複合投与の肝・大腸発がんおよび影響及び〔実験2〕Amitrol甲状腺発がんおよび病的状態（消化管障害）の影響を検討した。〔実験3〕臓器障害の一端として、第2相解毒酵素群の発現誘導能を欠いたNrf2欠損マウスを用いたIQの発がん実験を開始した。

【白井】ヘテロサイクリックアミンであるMeIQxと、異なった性質をもつ薬物代謝酵素誘導物質であるPhe nobaribital, Clofibrate, Diethylnitrosamineあるいはcaffeineとを同時投与した場合、MeIQxの発がん性がいか

に変化するかを検索した。

【菅野】毒性評価に使用されている安全係数に含まれる宿主要因（種差、個体差等）の指標の、より科学的メカニズムに基づいた設定に向けて、残留農薬等、外来性化学物質の曝露による毒性反応を分子生物学的知識に基づき検討することを究極の目的とし、そのための基本的な技術である宿主要因と複合曝露効果の検出・評価方法を構築する。

【小野】農薬等食品中化学物質相互のアレルギー増悪作用を検討するためのモデル系を確立することを目的としている。今年度は、12年度にマスト細胞からの脱顆粒反応およびサイトカイン産生を増強する作用が明らかになったクロロニトロフェン(CNP)をとりあげ、DNP（ジニトロフェノール）特異的IgEで感作をされたラット肥満細胞からの抗原刺激に伴う遺伝子発現への影響を検討した。また、in vivoの系としては、フェニトロチオン（MEP）と、CNP、ニトロフェン（NIP）との併用投与による免疫機能への影響を、即時型アレルギー状態およびトリニトロクロロベンゼン（TNCB）投与による遅延型アレルギー状態としたBALB/cマウスを用いて検討した。

【大野】薬物動態の関係する農薬等生活関連物質の相乗毒性をin vitroで予測するために、農薬の代謝に関係するヒト代謝酵素を明らかにすること、また、そのような活性をin vitroでスクリーニングする方法の開発及びin vitroの結果をin vivoに外挿する方法を開発することを目的とし、1) トリアジン系農薬の一つプロメトリンの代謝をヒト及びラット肝細胞とP450の特異的阻害剤を用いて検討し、肝ミクロソームや遺伝子発現型酵素を用いた場合と比較検討、さらにラットに投与したときの血中濃度やin vivo代謝における薬物相互作用の可能性を予測する。2)簡便で安定的にヒト薬物代謝酵素CYP3A4誘導をスクリーニング可能なヒト由来培養細胞を樹立する。3) 化学物質のヒトにおける動態を予測することを目的として、肝臓・腎臓などの消失臓器ならびに吸収部位である消化管における化学物質の膜透過・代謝メカニズムについて検討を加える。

【佐々木】先に我々は、農作物の残留農薬汚染実態調査を実施し、同一検体中に複数農薬が残留する野菜・果実の例を報告した。食を介した農薬及びその他の化学物質による複合曝露の可能性を更に明らか

にするためには、より多くの種類の食品中の汚染実態を明らかにする必要がある。農作物以外の主要食品である動物性食品については残留農薬の調査はほとんど行われていない。そこで、動物性食品についても同様の調査をすることによって、食を介した農薬による複合曝露の可能性を明らかにするとともに、農薬以外の化学物質との複合汚染の可能性についても検討することを目的とした。

【吉池】食品流通の国際化が加速する中で、codex、WHO等の国際機関が提唱するモデル等を参考としながら、各国がより科学的に妥当なリスク評価を行うことが時代の要請となってきた。本研究では、1995年より国民栄養調査に導入された個人別食物摂取量調査について、従来利用されていなかったデータを最大限活用し曝露評価に特化した新たなデータベースの開発を継続的に行っている。本年度は、特に2001年(平成13年)より新しい食品番号体系に切り替えられた国民栄養調査に対応するために必要な基本データの集積を目指して、検討を行った。

B. 研究方法

【広瀬】〔実験1〕5週齢のF344系雄ラットにイニシエーションとしてDEN 200 mg/kgを1回腹腔内投与と、そのDMH 40 mg/kgを4回皮下投与した。イニシエーション後、8週齢時よりIQ 300 ppmを混餌投与する群、あるいは基礎飼料のみを与える群を各3群ずつ設けた。また、それぞれについてNaNO₂を0%、0.1%及び0.2%の濃度で飲水投与する群を各1群ずつ設けた。全生存動物は、実験開始後第29週時にエーテル麻酔下で放血致死後、剖検した。諸器官・組織については肉眼的に観察後摘出し、肝臓及び腎臓については器官重量を測定した。また、肝臓、腎臓、胃、小腸、大腸、ジンバル腺及びその他肉眼的異常部位については、リン酸緩衝10%ホルマリン液で固定後、保存した。実験中に死亡あるいは瀕死状態につき屠殺した動物についても、上記器官・組織を採取後固定し保存した。保存した臓器は、パラフィン包埋後薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本を作製した。病理組織学的検索は全ての動物について行った。〔実験2〕6週齢のF344系雄ラットに*N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN, 2800 mg/kg体重)を単回皮下投与し、その1週後からアミトロールを300ppmの濃度で混餌投与した。また、消化管障害物質として、小腸傷害作用のあるインドメタシンを100ppmの濃度で混餌、あるいは大腸炎誘発物質であるデキストラン硫酸(DSS)を1%の濃度で飲水に混じて間歇併用投与した。また、それぞれの単独投与群も設けた。アミトロール投与開始20週後にエーテル麻酔下にて動物を屠殺し、甲状腺、下垂

体、小腸及び大腸を採取し、甲状腺及び下垂体重量を測定した後、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し病理組織学的に検索した。〔実験3〕各群20匹の8週齢Nrf2欠損マウス各遺伝子型(*nrf2* +/+, *nrf2* +/-, *nrf2* -/-)雌雄にIQ 300 ppmを52週間混餌投与する。基礎飼料のみを与える群も設けた。

【白井】F344雄ラット6週齢を用い、DEN200mg/kgを腹腔内投与2週間後MeIQx(0.03%)とDEN(0.01%)、Phenobarbital(0.05%)、clofibrate(0.3%)あるいはcaffeine(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週で剖検屠殺を行った。MeIQx、Phenobarbital、clofibrate、DENは混餌で投与した。Caffeineは飲水に混じて投与した。また、それぞれの化合物の単独投与群も対照群として設けた。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。

【菅野】BALB/3T3細胞を用い、パラコート(活性酸素を生み出す残留農薬)、NaCN(ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤)及び2-deoxyglucose(以下、2-DG、解糖系阻害剤)について、アポトーシス誘発を指標にそれぞれの用量-細胞傷害作用関係を求めた。これを基にパラコートとNaCN、パラコートと2-DG、NaCNと2-DGの複合曝露影響を、アポトーシス誘発を指標にフローサイトメトリによって解析した。さらに各曝露条件下に於いて毒性評価の為により詳細なパラメータを得るべく、生体反応を偏り無く網羅的に取得・評価する手段であるAffymetrix社のGeneChipを用いて、各複合曝露条件にて調整したRNAを測定する。得られた遺伝子発現データは独自に開発した絶対値化手法により標準化し、SiliconGenetics社 GeneSpringにて解析を行って、特徴的な発現変動を示す遺伝子群を調査する。

【小野】1. *in vitro*アレルギーモデル系の検討:

遺伝子発現の測定: DNP特異的マウスモノクローナルIgE抗体を培養液に加え、RBL-2H3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、CNPを加え培養、次いで抗原(DNP₇-BSA)を加え、刺激を開始した。開始後1、3時間後に細胞を回収し、total RNAを抽出した。T7プロモータを付加したオリゴdTプライマーを用い二本鎖cDNAを精製し、DEPC処理水に溶解した。12μLのうち3.3μLを用いてBioArray HighYieldにより37℃、7時間の*in vitro*転写反応を行い、ビオチン標識されたcRNAを増幅した。RNAを精製し、濃度を測定した。20μgのRNAに5倍濃縮のRNA Fragmentation Bufferを8μL加え、DEPC処理水により全量を40μLにして94℃、35分間処理を行った。断片化の前後におけるRNAのサイズを電気泳動により確認した。非標識体の混入を補正したうえ

で、ビオチン標識cRNAを用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションに用いたアレイはRat Genome U34A arrayで、コントロール遺伝子および断片化したcRNAをハイブリダイズした。アレイの染色および洗浄を行い、蛍光を増幅し、アレイスキャナにより、染色したRG-U34Aの蛍光画像を取得した。解析には、Microarray Suite、GeneSpringおよびMicrosoft Excelを用いた。

2. in vivo アレルギーモデル系での検討：

(1) BALB/cマウスを用いたI型アレルギー状態での免疫機能の変化

雄BALB/cマウスに、OVAを水酸化アルミニウムゲルとともに0.2 mL/匹で4日ごとに3回腹腔内投与し、血清中抗OVA抗体価を測定し、感作成立を確認した。その2日後から、各種農薬を1日おきに計5回皮下投与した。最終投与2日後にOVAを静脈内投与し、全身症状を観察した。静脈内投与の20分後に、採血し脾臓と胸腺を摘出、重量を測定した。また、ELISAによる血漿中総IgG1、IgG2a濃度および総IgE濃度、抗OVA IgGおよびIgE抗体価の測定を行った。血漿中ロイコトリエンC4濃度をELISAキットを用いて測定した。

(2) BALB/cマウスを用いたIV型アレルギー状態での免疫機能の変化

6週齢の雄BALB/cマウスに、TNCBを腹部に塗布し、その1週間後に左耳にTNCB、右耳に溶媒を塗布し、24時間後に耳介の厚さを測定し、感作成立を確認した。その翌日から、各種農薬を1日おきに計6回皮下投与した。最終投与直後に左耳にTNCB、右耳に媒体20 μ Lを塗布し、24時間後に耳介の厚さを測定した。測定後、採血、脾臓と胸腺を摘出し、重量を測定した。ELISAによる血漿中総IgG1、IgG2a濃度および総IgE濃度の測定を行った。

【大野】1. 農薬の代謝に関与する酵素に関する研究：

ラットの単離肝細胞は、雄SDラットよりコラゲナーゼ灌流法で調製した。ヒト凍結肝細胞は、XenoTech(米国)およびTTT(米国)またはBIOPREDIC(仏)から購入した。単離肝細胞 3×10^5 cell/mlを37 $^{\circ}$ Cで培養後、細胞外に放出された代謝物の濃度を、逆相系カラムInertsil ODS-3(15cm x ϕ 4.6mm)で水、アセトニトリルの溶媒を用いたグラジエントのHPLC(LC-10A、UV検出器)で分析した。また、各P450分子種の特異的阻害剤を用いて代謝に関与するP450分子種の推定を行った。

2. ヒト型CYP3A4誘導検索系の開発：

(2)-1 ヒトCYP3A4遺伝子上流を含むレポーター遺伝子の構築

CYP3A4レポーターベクターはCYP3A4プロモータ

ー領域をプライマーを用いてヒトゲノムDNAよりPCRにより単離し、ルシフェラーゼベクターのBgIII、HindIII切断部位に挿入後、更にCYP3A4エンハンサー領域をプライマーを用いてPCRにより単離し、pGLCYP3A4-362のBgIIIおよびMluIサイトに挿入し作成した。

(2)-2 CYP3A4遺伝子コンストラクト安定発現株の作製

pGLCYP3A4-362-7.7k及びネオマイシン耐性遺伝子を有するpQBI 50-ICをリン酸カルシウム法によって、それぞれHepG2細胞にトランスフェクトした。

(2)-3 細胞の薬物処理

CYP3A4-362-7.7k安定発現株を用いる実験は、細胞を24-well plateに播き、翌日薬物含有培地を処置した。処置時間は基本的に48時間としたが、各実験では必要に応じて適宜調節した。サンプルとして細胞、細胞溶解液、培地を採取し、ルシフェラーゼ活性の測定に用いた。0.1% DMSO処理細胞の平均活性を100%とし、薬物処理細胞の活性を百分率で表した。

(2)-4 ルシフェラーゼ活性の測定

細胞をPBSで回収してReporter Lysis Buffer 100 μ lで溶解し、サンプル20 μ lに35 μ lのルシフェラーゼ基質を加え、ルミノメーターによりルシフェラーゼ活性を測定した。なお、測定は室温で30秒間行った。得られた値はタンパク濃度により補正し、薬物無処置群の平均に対する百分率で表した。タンパク濃度はBradford法により測定した。

(3) 農薬の腎排泄に関する研究：

ラット腎臓から、厚さ300 μ mの組織切片を調製し、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)ならびに、Oat1、Oat3のそれぞれのリファンレンス化合物として、*p*-aminohippurate (PAH)ならびにpravastatinの切片への取り込みを測定した。マウスRST (renal specific transporter)をマウス腎臓から単離し、ヒト胎児腎臓由来のHEK293細胞を宿主細胞として安定発現系を構築した。この安定発現系を用いて、輸送実験を行った。その際に、通常のバッファー条件のほか、Na⁺イオンをK⁺イオンに置換したバッファー (High K⁺バッファー)で同様の輸送実験を行った。

【佐々木】超臨界流体抽出法では、平成13年度に肉類を対象とした分析法を開発したが、平成14年度は適用食品をレバー(牛、豚及び鶏)及び魚類(筋肉及び内臓)に拡大するための検討を行い、新たにレバーに対するSFE法を開発した。開発した方法は魚内臓へも適用可能であった。また、確立した方法を用いて市販食品(肉類、動物内臓及び魚類)の汚染調査を行った。有機溶媒抽出法では、平成13年度に開発した分析法を用いて、市販食品(乳製品、魚介類及びくじら)の汚染調査を行った。

【吉池】1. 国民栄養調査の新しい食品番号に対応

した、残留農薬暴露量試算のためのデータベースの構築：

2001年から導入された新しい食品番号体系では、家庭で通常消費されている食品を掲載している。また、学校給食における主食・副菜・牛乳の各摂取量について、ある程度の把握ができるように、細分化されたコードが設けられた。さらに、家庭での調理による食品の重量や栄養成分の変化を考慮するために、「調理コード」が導入された。

このような改訂により、国民栄養調査データから、各農作物についてどのような調理形態がとられているかを詳細に分析することが可能となった。本年度は、2001年11月実施のデータセットについて、実際の解析を行うための準備として、同時期に、ある農村で無作為に抽出した170世帯を対象として実施した国民栄養調査方式による調査データを用いて、農作物別の調理形態に関する予備的な分析を実施した。2. 農作物摂取量推定に必要な「食品の分類及び処理係数」見直しのための食品原材料等に関するデータベース化：

国民栄養調査において行われている食物摂取状況調査(=食事調査; diet survey)は、エネルギーや栄養素の摂取量を評価するためのものである。残留農薬の暴露評価を行うためには、diet surveyによって得られた個々の食品の摂取量データをもとに、暴露評価の対象となる各農作物の摂取量に換算していく必要がある。今回、“変換式”の全面的な見直しを行うための基礎資料を得るために、既存資料(五訂日本標準食品成分表、四訂日本標準食品成分表、新編日本食品事典、新訂原色食品図鑑、食品添加物実務要覧、新・食品辞典、調理と理論、食材図鑑、醸造・発酵食品の事典等)を用いて、国民栄養調査の食品番号として出現頻度が高く、しかもその原材料として農作物が比較的多く使用されていると予想されるものを優先して、加工食品等に使用されている原材料構成比、調理加工の内容等に関してデータベース化を継続実施した。

C. 研究結果

【広瀬】[実験1]肝細胞腺腫及び肝細胞癌の合計では、腫瘍発生率及び1個体当たりの腫瘍発生数ともに、IQ投与群はIQ非投与群に比べて高値を示し、IQ 300 ppm投与群の値(発生率:80%、発生数:3.07±3.41)は対照群の値(発生率:39%、発生数:0.61±0.92)に比べて有意に高かった。また、IQ投与群においてNaNO₂投与による1個体当たりの腫瘍発生数に高値傾向がみられた。大腸では、腺腫及び腺癌の合計は、腫瘍発生率及び1個体当たりの腫瘍発生数とも

に、IQ投与群はIQ非投与群に比べて高値を示し、IQ 300 ppm投与群の値(発生率:93%、発生数:5.47±3.78)は対照群の値(発生率:39%、発生数:0.56±0.78)に比べて有意に高かった。また、IQ投与群において1個体当たりの腫瘍発生数は、NaNO₂ 0.2% + IQ 300 ppm併用投与群の値(9.16±4.25)はIQ 300 ppm投与群の値(5.47±3.78)に比べて有意に高かった。肺では、肺胞上皮過形成、腺腫及び腺癌の発生率が、IQ投与群ではIQ非投与群に比べて高値を示し、IQ 300 ppm投与群の値(肺胞上皮過形成:33%、腺腫:47%、腺癌:73%)は対照群の値(肺胞上皮過形成、腺腫及び腺癌:0%)に比べて有意に高かった。但し、NaNO₂併用投与による上記腫瘍発生率の増加は認められなかった。[実験2]アミトロール投与によりいずれの処置群(アミトロール単独群を含む)においても明らかな体重増加抑制がみられた。また、アミトロール投与の有無に関わらずインドメタシン処置群では各対照群と比較して明らかな体重増加抑制を示した。甲状腺重量は、アミトロール投与により顕著に増加したが、インドメタシン及びDSSのいずれの処置による影響も認められなかった。病理組織学的観察では、インドメタシン投与群で小腸の潰瘍、DSS投与群で下行結腸における粘膜萎縮がアミトロール投与の有無に関わらず観察された。DSS単独群においては17/20例に、アミトロールとDSS併用群については2/18例に大腸腺癌がみられた。甲状腺において、アミトロール投与群はいずれの群においても濾胞上皮細胞の増殖性病変(巣状過形成、腺腫、腺癌)がみられ、インドメタシン併用投与群において腺癌の発生頻度と発生個数が有意に(p<0.05)減少した。アミトロールとDSSの併用群とアミトロール単独群との間に差はみられなかった。[実験3]実験開始第40週の時点では、雌雄とも、体重及び摂餌量いずれのパラメータにおいても、IQ投与あるいは遺伝子型に起因する推移の変化はみられていない。現在実験を継続中である。

【白井】MeIQx単独投与群では、GST-Pの単位面積あたりの数と面積は10.1±3.4個/cm²と0.6±0.3mm²/cm²であり、MeIQxとDENの同時投与群では70.5±15.5個/cm²、7.0±2.4 mm²/cm²と相乗的にGST-P陽性前癌病変数を増加させた。しかし、Phenobarbitalでは13.6±4.3個/cm²、0.9±0.3mm²/cm²と増加傾向はあるものの有意差は無く、MeIQxの代謝活性化酵素であるCYP1A2を誘導するCaffeineの同時投与では9.4±2.8個/cm²、0.6±0.2mm²/cm²と明らかな発がん修飾作用はみられなかった。一方、Clofibrateとの同時投与では3.8±1.6個/cm²、0.4±0.3mm²/cm²とMeIQxの肝発がんに対する有意な抑制効果がみられた。

【菅野】平成13年度に行ったフローサイトメトリ

の実験結果を基に曝露用量を設定し、BALB/3T3細胞に於いてNaCN及び、2-DGの単独及び複合作用の詳細をAffymetrix社のGeneChip (MU74Av2)により解析した。その結果、2-DG単独作用の解析に於いては、その毒性発現に小胞体ストレス応答機構が関与していることが確認された。また一方、複合作用の解析に於いては、a) 複合曝露時の相殺効果(アポトーシス抑制)にBcl-XLの発現変動が関与している可能性が高いこと、b) 複合曝露時による各遺伝子の発現変動修飾は単純平均、ドミナントアクティブ、ドミナントネガティブの他、単独曝露条件に於ける発現レベルでは説明の出来ないもの(他の遺伝子により制御されていると推測される)に分類できること、c) 各遺伝子の発現変動修飾の総合として、複合曝露時の毒性機序が説明され得ること、が確認された。

またパラコートは毒性が強く、酸化的ストレスを中心とした毒性機序を有するため遺伝子発現レベルでの解析があまり進んでいないことを考慮し、本年度はパラコート曝露応答反応のGeneChipによる解析方法の基礎検討を行った。曝露後3, 6, 12時間において経時的な遺伝子発現解析を試行したところ、曝露後早期にグルタチオン系やチオレドキシシン系など抗酸化的ストレス分子の活性化など、活発な生態応答を検出した。

【小野】1. *in vitro*アレルギーモデル系の検討:

CNP単独の処理で、発現の上昇した遺伝子としては、転写因子の1つであるearly growth response gene (Egr-1, 別名krox24, NGF1-A)、ケモカインであるMCP-1をコードする遺伝子、ストレス応答遺伝子GADD45aが主なものであった。Egr-1、GADD45aの遺伝子発現は、1時間の方が、3時間より高く、MCP-1の遺伝子発現は、1時間より3時間の方が高かった。これら遺伝子発現は、抗原による刺激により、いずれも上昇するものであったが、抗原とCNPを共存させることにより、相加的な遺伝子発現の増加がみられた。

2. *in vivo* アレルギーモデル系の検討:

(1) BALB/cマウスを用いたI型アレルギー状態での免疫機能の変化

有機リン系農薬(MEP)と、2種の含窒素系農薬(CNPとNIP)との併用投与による即時型アレルギーマウスの免疫系への影響としては、体重とIgG2a濃度、IgE濃度以外の測定項目で、多くの群でcontrol群との間に有意差が認められた。さらに、IgG1濃度は、NIP単独群に比べ、CNP単独群、MEP-NIP併用群およびNIP-CNP併用群で有意な低値を示した。また、IgE濃度は、MEP単独群に比べ、CNP単独群、MEP-NIP併用群およびMEP-CNP併用群で有意な高値を示した。他には、併用投与による有意な変化は認められなかった。

(2) BALB/cマウスを用いたIV型アレルギー状態での免疫機能の変化

MEPと、CNPとNIPとの併用投与による遅延型アレルギーマウスの免疫系への影響は、(1)と同様に、IgE濃度と耳介浮腫反応(MEST)以外の測定項目では、多くの群でcontrol群との間に有意差が認められた。さらに、脾臓重量は、MEP単独群に比べてMEP-NIP併用群およびMEP-CNP併用群で有意な高値を示した。胸腺重量は、MEP単独群に比べてCNP単独群、MEP-NIP併用群およびMEP-CNP併用群で有意な高値を示した。また、NIP単独群に対してMEP-NIP併用群で有意な高値を示した。IgG1濃度は、MEP単独群に比べ、NIP単独群およびMEP-NIP併用群で有意な高値を示した。また、IgG1/IgG2a比は、control群に対してMEP単独群で有意な低値を、また、MEP単独群に対してNIP単独群で有意な高値を示した。他には、併用投与による有意な変化は認められなかった。

【大野】1. 農薬の代謝に関与する酵素に関する研究:

ヒトおよびラット肝細胞は、prometrynを代謝し、S原子が酸化された代謝物およびN-脱アルキル化された代謝物、またグルタチオンが結合したと考えられる代謝物やこれに由来すると考えられる代謝物の生成がみられた。ラットより調製した単離肝細胞をPm(またはAm)とインキュベートしたときの代謝物の生成速度は非常に速く、約30分-1時間まで直線性を示すことが判明した。この代謝反応はP450の特異的阻害剤のチクロピジン、オメプラゾール、トラニルシプロミンやケトコナゾールで阻害された。一方、解凍ヒト肝細胞をPmと培養した場合、代謝物の生成速度はラットと比べて1/100程度に低く、また4時間まで直線性を示すことが判明した。この代謝反応はP450の特異的阻害剤の中ではチクロピジンやケトコナゾールで阻害され、CYP2C19やCYP3A4の酵素で代謝されることが示唆された。Pmの脱アルキル化反応はCYP1Aの特異的阻害剤の α ナフトフラボンで阻害された。

2. ヒト型CYP3A4誘導検索系の開発:

スクリーニングの結果、ルシフェラーゼ活性を示すコロニーは得られたが、その誘導剤に対する応答は低かった。コンストラクトをタンデムに複数個連結することによってルシフェラーゼ遺伝子発現の強化を試みた結果、CYP3A4遺伝子コンストラクトあたりのネオマイシン耐性遺伝子の割合は少なくなったが、前節と変わらずコロニー形成状況は良好であった。形成したコロニーは個別に培養後、誘導剤無処置の条件でルシフェラーゼ活性を測定した。その結果活性を示すコロニーの割合が若干ではあるが増加した。トランスフェクション及びゲネチシンによるセレクションを数回繰り返すことで最終的に14個

のルシフェラーゼ活性を示すコロニーを得た。活性を示した細胞について更に培養を続け、誘導剤（リファンピシン、クロトリマゾール）を2日間処置し、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。その結果、リファンピシンに対してより強い応答を示したものの、クロトリマゾールでより強い誘導応答を示したものの、あるいは二つの薬物に対して同程度の応答性を示したものが見られた。これらのコロニーのなかで特に高い誘導率を示した細胞は、リファンピシン処置で約15倍、クロトリマゾール処置で約80倍の誘導率を示した。また、リファンピシンでより高い誘導応答を示した細胞では、リファンピシン処置で約60倍、クロトリマゾール処置で約20倍の誘導率を示した

3. 農薬の腎排泄に関する研究：

本年度は、腎クリアランスを安定発現系から予測するための方法論として、Oat1、Oat3のそれぞれのリファレンス化合物の輸送活性を安定発現系ならびに、腎組織切片において測定し、その輸送活性比を補正項として用いた（RAF解析）。その結果、Oat3基質となるものについては、ほぼ1：1の相関を得たが、2,4-Dについては予測値よりも実測値の方が低かった。mRST発現細胞の2,4-Dの取り込みは、Na⁺バッファーでは宿主細胞との間に有意な差はみられないが、High K⁺バッファーに置換すると顕著に増加した。mRST発現細胞で有意な取り込みが検出できたp-aminohippurate (PAH)の取り込みに対して、非標識体の2,4-Dによる阻害実験を行った。その結果、IC₅₀値は50 μMであった。

【佐々木】1. 超臨界流体抽出法

SFE法では、肉類17検体（豚肉7検体、牛肉5検体、鶏肉5検体）、動物内臓10検体（豚レバー2検体、牛レバー2検体、鶏レバー3検体、豚及び牛の内臓3検体）、魚（筋肉）15検体及び魚（内臓）4検体について分析した。肉類では豚肉、鶏肉のそれぞれ1検体で不検出であった以外は、いずれの検体からもDDT類が痕跡量～2 ppb検出された。DDT類以外では、牛肉からシラフルオフエン及びヘキサクロロベンゼン(HCB)が検出された。肉類中の残留農薬は、シラフルオフエン及びHCBが検出された牛肉2検体以外は、すべてDDT類であり、複数農薬の残留は認められなかった。動物内臓では、豚レバー及び鶏レバーのそれぞれ1検体で不検出となった以外は、いずれの検体からもDDT類が痕跡量～2 ppb検出された。動物内臓では、DDT類以外の農薬は検出されなかった。魚（筋肉）では、調査した全ての検体からDDT類が痕跡量～33 ppb検出されたほか、15検体中11検体からHCBが痕跡量～10 ppb検出された。このほかの農薬では、ディルドリンが3検体から、α-BHCが2検体から、ヘ

プタクロルエポキシドが1検体から検出された。アラスカ産のカラスカレイ1検体からは5種類の農薬が検出されたが、他の魚（筋肉）の多くでは、DDT類単独かDDT類とHCBとの組合せで検出された。魚（内臓）は、4検体のみの分析であるが、全ての検体からDDT類及びHCBが、それぞれ痕跡量～16 ppb及び痕跡量検出された。このほかの農薬では、α-BHCがサンマ1検体から検出されたが、この検体では筋肉からもα-BHCが検出された。

2. 有機溶媒抽出法

乳製品については、牛乳及びヨーグルト各10検体ずつを分析したが、農薬の残留は認められなかった。魚介類については、えび、たい及びすずきを、水棲哺乳類としてくじらについて分析した。輸入えび15検体中、8検体からエトキシキンが検出された。エトキシキンは酸化防止剤として、動物の飼料への添加が認められている国もある。したがって、今回、輸入えびから検出されたエトキシキンは飼料由来のものと予想される。たい及びすずきは、1検体のみの分析であるが、DDT類及びクロルデン類の痕跡量が検出された。また、くじらでは5検体中、1検体にp,p'-DDEの痕跡量が検出された。

【吉池】1. 国民栄養調査の新しい食品番号に対応した、残留農薬暴露量試算のためのデータベースの構築：

主な農作物について、調理形態別の割合を表1に示した。これは、家庭において調理されたものに対して付加された調理コードに関する情報を集約したものである。例えば、キャベツでは、家庭での摂取形態として、「生」「炒め」「ゆで（“煮る”を含む）」等、多様であることが予想されたが、このような検討により初めて定量的に示すことが可能となった。

2. 農作物摂取量推定に必要な「食品の分類及び処理係数」見直しのための食品原材料等に関するデータベース化：

273食品（大豆類 49食品、小麦粉類 86食品、菓子類 129食品、嗜好飲料・その他 1食品、酒類 8食品）に関して、食品原材料の構成及び代表的と思われる使用料、調理・加工に関する情報を整理し、データベース化した

D. 考察

【広瀬】〔実験1〕我々はイニシエーション期にPhIPとNaNO₂を併用投与することにより、乳腺腫瘍体積が抑制されることを既に報告している。一方、ラット中期肝発がん試験法においてMeIQx及びNaNO₂を6週間併用投与することによりGST-P positive fociの形成が促進されるという結果も得ている。今回報告

したIQによる肝・大腸発がん促進効果はMeIQxと同様の結果である。IQ及びMeIQxはNaNO₂処理によって変異原性の高い代謝物に変換されるが、一方同じHCA化合物でもGlu-P-1及びTrp-P-2は変異原性の低いあるいは非変異原性の化合物に変換されることがエイムス試験の結果より確認されている。IQ及びNaNO₂を併用投与することにより生体内では、酵素学的あるいは化学的に、IQのニトロ代謝物であるnitro-IQの生成が予想される。nitro-IQは突然変異性を有する他、*in vitro*系においてCu²⁺及びNADH存在下で酸化的ストレスの指標である8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)を含むDNA傷害性を持つことが示されている。従って、本実験結果から活性酸素分子種を介して、肝及び大腸における腫瘍発生が促進された可能性も考えられる。今回、IQ投与による肺への発がん性が認められた。げっ歯類ではCDF1マウスで肺を標的臓器にもつことが確認されているが、ラットでの報告はない。HCAの中においてもラット肺に発がん性を示すという報告はない。今回、イニシエーターとして用いたDENはマウスで肺がんも誘発することが知られているが、ラットでのイニシエーション作用は弱いため、IQ自体に肺に対する強い発がん性があるものと考えられる。〔実験2〕前年度に、除草剤として用いられ、抗甲状腺物質としても知られているamitroleの腎及び甲状腺障害時における甲状腺発がんに対する影響を検討した。今年度はamitroleの消化管障害時における甲状腺発がんへの影響について検討した。アミトロール投与により明らかな体重増加抑制がみられ、特に小腸障害を誘発する目的で設けたインドメタシン処置群では顕著であった。しかし、甲状腺障害を誘発する各々の処置による体重あたりの平均アミトロール摂取量に対する影響はみられなかった。従って、本実験における甲状腺発がん修飾作用あるいは毒性作用に対する各処置の影響の評価は可能であると考えられた。アミトロール投与により、甲状腺重量は顕著に増加し、濾胞上皮細胞の増殖性病変（巣状過形成、腺腫、腺癌）の発生頻度及び発生個数が明らかに増加したが、小腸傷害処置として行ったインドメタシン投与において、増殖性病変の発生頻度及び個数が有意に減少した。従って、インドメタシンは、アミトロールによる甲状腺発がんを抑制することが示唆されたが、インドメタシンの甲状腺に対する直接作用あるいは小腸障害に伴う間接作用のいずれによるものかは明らかではなかった。一方、甲状腺以外においては、DSS単独群で下行結腸部に腺癌が高頻度に見られたのに対しアミトロールとの併用群では腺癌の発生頻度が減少していたのが確認された。しかし、アミトロールを投与することにより体重の著明な増加抑制がみられ、DSSを混

じた飲水の摂取量もDSS単独群に比べて明らかに少なかったことからアミトロールが腺癌発現に対して抑制的に作用したとは断定することができなかった。

【白井】MeIQxの発がんに対して同時に投与した化学物質による修飾作用は、昨年度に報告したFenbendazoleの場合と同様に単に代謝活性化酵素の誘導のみでは説明できないことが明らかとなった。DENはその自体が強力な肝発がん物質であるが、MeIQxとの同時投与により相乗的に肝前がん病変を誘導した。一方、Phenobarbitalは肝発がん促進物質の代表例であるが本実験ではMeIQxとの同等投与では有意差のある影響はみられず、薬物代謝酵素などの相互的複合作用の緩和の結果と考えられる。Clofibrateは、ペルオキシゾーム増殖剤であり肝発がん物質であるが、GST-Pの発現抑制作用も有する。本実験でもMeIQxとの同時投与によりGTS-Pの数・面積とも減少したが、存在するGTS-P陽性細胞果ははっきりと染色され、Clofibrateの作用をGTS-P発現抑制のみでは説明できない。またCaffeineではMeIQxを活性化するCYPIA2の誘導物質であるが、同時投与によってもMeIQxの発がん性を修飾しなかった。従って、物質の相互作用を考える際には、単に発がんへの代謝経路のみではなく、総合的に代謝酵素・解毒酵素を考える必要性が示された。今後そのメカニズムの解明をマイクロアレイの技術を用いて行っていきたい。

【菅野】本年度行ったNaCN及び2-DGの単独または複合曝露をモデルとした毒性作用の遺伝子発現解析結果から、GeneChipを用いた評価系により毒性に関与する各種遺伝子の発現変動を効率よく測定・解析できることを確認した。特にBel-XLの遺伝子発現変動はNaCN及び2-DGに於ける相殺効果機序を直接説明し得るデータとして注目に値する。また複合毒性評価という観点に於いても、各遺伝子を相乗的な発現変動を示すものと示さないものに明瞭に分類することができることが実証され、このような複合曝露条件下での遺伝子発現データを蓄積したデータベースシステムが構築されれば、複合毒性評価のみならず、ある程度の*in silico*複合毒性実験が可能になることが示唆された。

さらに遺伝子発現変動を介さない毒性反応は、原理的に遺伝子発現解析手法では検出できないとする仮説もあったが、パラコートにより惹起される酸化的ストレス反応のような急性反応に於いても、二次的な遺伝子発現変動を捉えることにより、十分に解析を行うことが可能であることが示唆された。

【小野】1. *in vitro*アレルギーモデル系の検討：

すでにTNF- α 、MCP-1の産生が顕著にみられているCNP 30 μ g/mLの濃度でのマスト細胞における遺伝子発現への影響をDNAチップを用いて解析した。そ

の結果、MCP-1、初期転写活性化因子Egr-1遺伝子、ストレス応答遺伝子GADD45aの有意な発現上昇がみられた。Egr-1は、別の細胞系で、TNF- α の転写活性化因子として働くという報告があり、マスト細胞においても、刺激を受けて早い時間(1時間以内)に発現上昇がみられることから、TNF- α 等のサイトカインの転写活性化因子として働いている可能性が考えられた。RBL-2H3細胞のIgE受容体を介する遺伝子発現に対する影響に関しては、MCP-1、Egr-1、GADD45aともにCNPの共存で、抗原刺激に伴う遺伝子発現に対し、相加的に働くことが示された。

2. in vivoアレルギーモデル系の検討：

2種類の含室素系農薬は、すでに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た。また、アレルギー状態と非アレルギー状態では、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。今年度は昨年度の実験の確認実験も行ったが、有意な変化は認められなかった。さらに、昨年度は農薬投与後にアレルギー状態を作製する方法を用いたのに対し、今年度は先にアレルギー状態とした動物に農薬を投与して変化を調べた。その結果、control群の挙動が他の群と異なり、有意な変化として認められた。今までのNIPやCNPを用いた研究結果から、多くの測定項目で一様に有意な変化が認められるとは考えにくく、群間の動物のばらつきによるものと推測した。Control群との比較は難しかったが、単独群と併用投与群との比較では、有機リン系農薬の免疫抑制作用を含室素系農薬で抑制する傾向が認められた。これは、農薬の投与量を単独、併用とも合算して同用量を投与したため、併用群では、結果的に1/2量の有機リン系農薬を投与したこととなる。従って、併用群でMEPの作用が弱くなっているのは、NIPあるいはCNPの作用に加え、MEPの濃度が低く、反応が弱くなっている可能性も考えられる。いずれにしてもNIPやCNPと言った含室素系農薬には、有機リン系農薬の作用を増悪する作用はないことが示された。

【大野】1. 農薬の代謝に関与する酵素に関する研究：

ヒト肝細胞を用いたPmの代謝実験ではP450の特異的阻害剤の中のチクロピジンやケトコナゾールで阻害され、肝細胞でもCYP2C19やCYP3A4で代謝されることが示唆された。これはヒト肝ミクロソームで

の代謝阻害実験や遺伝子発現型酵素を用いて検討した場合、Pmの代謝に於いてはヒト肝ミクロソーム含量の高いCYP3A4または代謝活性が高いCYP2C19が働き、ついでN-脱アルキル化の特異性が高いCYP1A2等で代謝されると推定した結果と良い一致が見られた。

ヒトおよびラット肝細胞におけるPm代謝反応で生成する代謝物はその代謝物によってチクロピジン、オメプラゾール、トラニルシプロミンやケトコナゾール等のP450の特異的阻害剤の感受性がヒトおよびラット肝細胞の動物種により微妙に異なることが判明した。これらはP450分子種の違いに基因すると考えられた。ラットより調製した単離肝細胞をPmの代謝物の生成速度は非常に速く、一方、凍結ヒト肝細胞を用いたPm代謝速度は上記ラットの場合と比べて1/100程度に低かった。この原因としては、もともとの活性に差があった可能性と凍結による影響が考えられる。今後、ラットでの場合も凍結肝細胞を用いて検討する必要がある。

2. ヒト型CYP3A4誘導検索系の開発：

安定発現株の作成法として、広く一般的に用いられているゲネチシン耐性細胞の選択による方法を用いた。この方法を用いるにあたり細胞にネオマイシン耐性遺伝子を同時に導入する必要があるが、始めにこれをpGLCYP3A4-362-7.7kと1：1の割合で導入した。その結果、耐性コロニーは多数できるものの、ルシフェラーゼ活性を示す細胞がわずかしかなく、また、この細胞にリファンピシン、クロトリマゾールを処置させたところ誘導応答は得られなかった。これはネオマイシン耐性遺伝子とpGLCYP3A4-362-7.7kのコンストラクトを連結させていなかったため、ネオマイシン耐性遺伝子のみが取り込まれた可能性や、細胞に取り込まれたネオマイシン耐性遺伝子の割合に対するCYP3A4遺伝子コンストラクトの割合が少なかったためであると考えられる。従って、次にCYP3A4遺伝子コンストラクト：ネオマイシン耐性遺伝子の割合を5：1にし、それをタンデムに連結させたものをトランスフェクトした。その結果、薬物無処置の条件でルシフェラーゼ活性を示す細胞の割合も多少であるが増加し、誘導剤に対する応答も高くなった。薬物無処置の条件でのルシフェラーゼ活性と誘導剤処置に対するルシフェラーゼ活性の倍率に相関関係が見られなかったが、これは薬物無処置での活性が高いと薬物未処置によるルシフェラーゼ値がバックグラウンドとして非常に高くなるためであると考えられる。

我々のCYP3A4-362-7.7kのコンストラクトを用いた一次的な発現によるHepG2における誘導実験の結果では、リファンピシンよりもクロトリマゾール処置の方がより高い誘導率を示していた。今回構築した安

定発現株においてもこのパターンを示す細胞がいくつか得られたが、一方で反対にリファンピシンでより強い誘導率を示すような細胞も得られた。この原因の一つとしてDNAの挿入により細胞の形質の変化や、取り込まれる染色体の位置などの要因が関連している可能性が考えられる。ヒト初代培養細胞や、ヒト小腸モデル細胞として用いられているLS174T細胞にAdCYP3A4-362-7.7kを感染させた場合では、クロトリマゾールよりもリファンピシン処置の方がより高い誘導率を示すことから、リファンピシンでより強い誘導応答を示す細胞も評価系として興味深く、この細胞も合わせて以後の検討を行う必要があると考えられる。

3. 農薬の腎排泄に関する研究：

Oat1、Oat3のリファンピシス化合物をもちいたRAF解析では、予測値よりも実測値の方が小さかった。一方で、組織への取り込みクリアランスが小さいところでは、ほぼ1：1の相関がなりたっていることから、組織内への拡散が律速段階になっているものと推測される。Oat1ならびにOat3の相対輸送活性を考慮すると、2,4-Dの腎臓への取り込みにはOat1が主として働いているものと考えられる。

High K⁺バッファで、mRST発現細胞のみで有意な取り込みが観察された。High K⁺では、脱分極が生じているために、負電荷を有する2,4-Dの取り込みが増加したのと考えている。従来から、腎臓の刷子縁膜には膜電位依存性の有機アニオントランスポーターの存在が示唆されてきたことから、RSTがその候補遺伝子であると期待される。

【佐々木】今回調査した動物性食品から検出された農薬は、DDT類やHCBなどの有機塩素系農薬がほとんどであり、野菜・果実で見られたような極性の高い農薬の残留は認められなかった。また、野菜・果実では、1つの検体から多数の農薬が検出されることがあるが、動物性食品では多数検出例はほとんど見られなかった。輸入えびからエトキシキンが検出されたが、エトキシキンは酸化防止剤として、動物の飼料への添加が認められている国もある。したがって、今回、輸入えびから検出されたエトキシキンは飼料由来のものと予想される。魚類及びくじらから検出された微量のDDT類やクロルデン類は、生物濃縮により蓄積されたものと考えられるが、内分泌かく乱化学物質の疑いがあるものとしてリストされており、継続的な調査が必要と思われる。

【吉池】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”の採用を提唱しているが、その中で一つの課題としてとりあげられているのが、可食部

の取扱いと調理・加工係数の検討である。これらのことを暴露評価の過程において勘案することは、その精密化に資するのみならず、国際的な流れでもある。しかし、現実的には、個々の食品における残留量等に関する実験的データが十分でないこと、また摂取量及びその形態（食事行動因子）に関しても現時点で利用可能なデータは少ない。そこで本研究課題では、各農作物について、家庭における“調理”や“食べ方”（特に可食部をどのように定義するか）、及び食品の製造過程における加工の状況等に関する情報収集を継続的に行っている。

今年度は主に、2002年の国民栄養調査から導入された「調理コード」、すなわち家庭において各食材がどのように加熱調理されたかに関する付加情報を、今後、残留農薬の暴露評価において有効活用するための予備的な検討及び準備を行った。2003年(平成15年)11月実施予定の調査からは、従来の栄養改善法に基づく調査から、健康増進法に基づく「国民健康・栄養調査」として行われるが、食品の摂取量に関する調査については、これまでの方法が踏襲される予定となっている。

1999年以降、残留農薬の暴露評価のための食物摂取データベースは3年毎に更新されている。国民栄養調査は、毎年独立したサンプリングが行われているが、単年のデータでは3年間のデータをプーリングすることにより、暴露評価において特に重要視されるサブグループである妊婦や幼児についても、ある程度のサンプルサイズを得ることが可能となっている。また、急性暴露評価においては、個々の食品について摂取量の分布データが必要となるが、その際に“多食群”を検出するためにはさらにサンプルサイズが大きい方が望まれる。

従って、「国民健康・栄養調査」として初めて行われる2003年の調査は、新しい食品番号体系としては3年目、すなわち、暴露評価のための次期のデータベース(2005-2007年に使用)を構築するものとなり、この年までの調査データがそろった後に、食品番号の対応（データリンケージ）の全面的見直しが必要となる。本年度は、この見直しに向けての基礎づくりを行ったと言える。

また、国レベルでの栄養調査データを活用し、食品安全施策のための暴露評価を行うことは、各国での重要な課題となっている。2003年1月に、FAO等の主催により行われた発展途上国における国レベルでの栄養調査に関するワークショップにおいて、本研究で行っている国民栄養調査データの2次の活用に関するレクチャーを行ったところ、特に食生活実態が比較的近いアジア諸国の行政担当者等から大きな反響があり、国内あるいは東南アジア地域で行われ

る関連のワークショップ等でのさらなる情報提供の依頼を受けている。このような、アジア諸国とのハーモナイゼーションも視野に入れた、国際的な情報発信も重要と考えられる。

E. 結論

① NaNO_2 は IQ の肝、大腸及びジンバル腺の発がんを増強させる作用があり、さらに IQ が肺に発がん標的性を有する可能性が示唆された。アミトロールによる甲状腺発がんは、インドメタシン投与による小腸障害時に抑制されることが示されたが、インドメタシンの甲状腺に対する直接作用あるいは小腸障害に伴う間接作用のいずれによるものかは明らかではなかった。また、DDS による大腸発がんはアミトロールの併用により著しく抑制されたが、これは体重減少による可能性がある。

② 投与物質の発がん修飾作用を予測するにはその代謝活性化に関わる遺伝子群のみならず、種々の遺伝子の発現変化を網羅的に解析する必要がある事が示唆された。

③ 毒性、特に複合毒性の評価及び分子機序解明に於いて、GeneChip に代表される網羅的遺伝子発現解析手法が非常に有用であることが実際の実験データにより確認された。またパラコートにより惹起されるような酸化ストレス等、新たな遺伝子発現を必要としない急性毒性機序についても、そのストレスに応答した遺伝子発現変動という形で網羅的遺伝子発現解析を行えることが明らかになった。

④ 平成 13 年度の研究で *in vitro* モデル系であるマスト細胞からの脱顆粒、サイトカイン産生の促進が明らかになった含窒素系農薬 (CNP) の、マスト細胞における遺伝子発現への影響を、DNA チップを用いアレルギー促進活性を網羅的に解析するための手法の導入を試みた。その結果、ケモカイン MCP-1、転写活性化因子 Egr-1 およびストレス応答遺伝子 GADD45a の有意な上昇がみられた。一方、*in vivo* の免疫毒性試験では、有機リン系農薬であるフェニトロチオンと 2 種類の含窒素系農薬の併用投与における作用を I 型および IV 型アレルギー状態マウスで検討したが、CNP、ニトロフェンともにフェニトロチオンの免疫系に対する作用を抑制する傾向が認められた。

⑤ ヒト肝細胞におけるプロメトリンの代謝には CYP2C19 や CYP3A4 が働いており、これらの阻害剤により相互作用が起こり得ることが示唆された。また、CYP23A4 レポーター遺伝子を培養細胞 (HepG2) の染色体に組み込み、恒常的に誘導測定可能な (高い再現性と低コスト) 実験系の樹立に成功した。更に、2,4-D の腎取り込みは Oat 1 によりほぼ説明される

ことが示唆された。また、管腔側の排泄メカニズムには mRST が関与していることが示唆された。

⑥ 新たにレバーに対する SFE 分析法を開発し、本法は、魚 (内臓) へも適用可能であった。有機溶媒抽出法及び SFE 法を用いて、市販動物性食品について汚染調査を行った結果、有機溶媒抽出法では、輸入えび 15 検体中 8 検体から飼料由来のものと思われるエトキシキン (酸化防止剤) が検出された。また、たい及びすずきから DDT 類及びクロルデン類の痕跡量が検出されたほか、くじら 5 検体中 1 検体からも DDT 類が痕跡量が検出された。SFE 法では肉類 17 検体、内臓 10 検体、魚 (筋肉) 15 検体及び魚 (内臓) 4 検体について分析したところ、ほとんどの検体から DDT 類が痕跡量 ~ 33 ppb 検出された。このほか、一部の検体から HCB、シラフルオフェン、ディルドリン、 α -BHC 及びヘプタクロルエポキシドが検出された。

⑦ 残留農薬の暴露評価の精密化を目的として、暴露評価に特化した食品摂取量データベースの拡充を図るために以下の検討を行った。

1. 2001 年より新しい食品番号体系となった国民栄養調査について、食品番号及び調理コード等の再整理を行い、残留農薬の暴露評価の対象となる各農作物において加工・調理係数を実際に適用した場合、どの程度の暴露量が推定されるかについて試算を開始した。

2. 残留農薬の暴露評価の対象となる各農作物の摂取量を求めるために現在使用されている「食品番号の分類及び処理係数 (材料比、重量比、他の係数)」の見直しのための基礎データを得るために、既存資料を用いて、代表的と考えられる食品の原材料構成、使用量、調理・加工に関する情報を整理し、データベース化した。

これらの食物摂取に関する基本データの整備を進めることにより、国内外における規格基準案の検討やマーケットバスケットに代表されるモニタリング調査が、より信頼性の高いものとなることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Miyauchi M, Nakamura H, Furukawa F, H-Y Son, Nishikawa A, Hirose M. Promoting effects of combined treatment of antioxidants with sodium nitrite on forestomach carcinogenesis in rats after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Ca

- ncer Lett. 178:19-24, 2002.
2. Yamagishi M, Natsume M, Osakabe N, Nakamura H, Furukawa F, Imazawa T, Nishikawa A, Hirose M. Effects of cacao liquor proanthocyanidine on P hIP-induced mutagenesis in vitro, and mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.* 185: 123-130, 2002.
 3. Yada H, Hirose M, Tamano S, Kawabe M, Sano M, Takahashi S, Futakuchi M, Miki T, Shirai T. Effects of antioxidant 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) or ascorbic acid on carcinogenesis induced by administration of aminopyrine and sodium nitrite in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Jpn J Cancer Res.* 93: 1299-1307, 2002.
 4. Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M., Imai, T., Shirai, T.: Chemoprevention of heterocyclic amine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Environ. Mol. Mutagen.*, 39: 271-278, 2002.
 5. Futakuchi, M., Hirose, M., Imaida, K., Takahashi, S., Ogawa, K., Asamoto, M., Miki, T., Shirai, T.: Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine-induced colon carcinogenesis by 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone after initiation with 1,2-dimethylhydrazine in F344 rats. *Carcinogenesis*, 23: 283-287, 2003
 6. Futakuchi, M., Cheng, J. L., Hirose, M., Kimoto, N., Cho, Y.-M., Iwata, T., Kasai, M., Tokudome, S., Shirai, T.: Inhibition of conjugated fatty acids derived from safflower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Cancer Lett.*, 178: 131-139, 2002.
 7. Shirai, T., Kato, K., Futakuchi, M., Takahashi, S., Suzuki, S., Imaida, K., Asamoto, M.: Organ differences in the enhancing potential of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine on carcinogenicity in the prostate, colon and pancreas. *Mutation Res.*, 506-507: 129-136, 2002.
 8. Suzuki, S., Takahashi, S., Asamoto, M., Inaguma, S., Ogiso, T., Hirose, M., Shirai, T.: Lack of modification of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)-induced hepatocarcinogenesis in rats by fenbendazole - a CYP1A2 inducer. *Cancer Lett.*, 185: 39-45, 2002.
 9. Takeshita, F., Ogawa, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Mechanistic approach of contrasting modifying effects of caffeine on carcinogenesis in the rat colon and mammary gland induced with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine., *Cancer Lett.*, in press, 2003.
 10. Nakamura R., Ishida S., Ozawa S., Saito Y., Okunuki H., Teshima R. and Sawada J.: Gene expression profiling of Ca²⁺-ATPase inhibitor DTBHQ and antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Inflamm. Res.* 51, 611-618 (2002)
 11. Sakemi K, Ito R, Umemura T, Ohno, Y., Tsuda M. Comparative toxicokinetic/toxicodynamic study of rubber antioxidants, 2-mercaptobenzimidazole and its methyl substituted derivatives, by repeated oral administration in rats. *Arch Toxicol.* 76, 682-91 (2002)
 12. Ishida S, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ando M, Ohno, Y., Ozawa S, Sawada J. Characterization of human CYP1A1/1A2 induction by DNA microarray and alpha-naphthoflavone. *Biochem Biophys Res Commun.* 296, 172-177 (2002)
 13. Kurebayashi H, Harada R, Stewart RK, Numata H, Ohno, Y., Disposition of a low dose of bishphenol A in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci.* 68, 32-42 (2002)
 14. M. Ogino, K. Nagata and Y. Yamazoe. Selective suppression of human CYP3A form, CYP3A7, by troglitazone in HepG2 cells. *Drug Metab. Pharmacokin.*, (2002) 17: 42-46
 15. M. Furukawa, T. Okubo, M. Ogino, T. Yamazaki, M. Shimada, K. Nagata and Y. Yamazoe. Adenovirus vector-mediated reporter system for *in vivo* analysis of the human *CYP3A4* gene activation. *J. Biochem.*, (2002) 131: 71-78.
 16. M. Miyata, E. Tamura and Y. Yamazoe. Development of an *in vitro* system detecting pro-embryotoxin. *Jpn. J. Pharmacol.*, (2002) 89: 320-323.
 17. M. Miyata, K. Motoki, E. Tamura, M. Furukawa, F. J. Gonzalez and Y. Yamazoe. Relative importance of maternal and embryonic microsomal epoxide hydrolase in 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced developmental toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, (2002) 63: 1077-1084.
 18. M. Miyata, H. Takano, K. Takahashi, Yu F Sasaki and Y. Yamazoe. Suppression of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine-induced DNA damage in rat colon after grapefruit juice intake. *Cancer Lett.*, (2002) 183: 17-22.
 19. W. Honma, M. Shimada, H. Sasano, S. Ozawa, M. Miyata, K. Nagata, T. Ikeda and Y. Yamazoe. Phenol sulfotransferase, ST1A3, as the main enzyme catalyzing sulfation of troglitazone in human liver. *Drug Metab. Dispos.*, (2002) 30: 94

20. T. Ohta, T. Maruyama, M. Nagahashi, Y. Miyamoto, S. Hosoi, F. Kiuchi, Y. Yamazoe and S. Tsukamoto. Paradisin C: a new CYP3A4 inhibitor from grapefruit juice. *Tetrahedron*, (2002) 58: 6631-6635
21. Hasegawa M, Kusuhara H, Endou H, and Sugiyama Y. Contribution of organic anion transporters to the renal uptake of anionic compounds and nucleoside derivatives in rat. *J Pharmacol Exp Ther*, in press (2003)
22. 前田和哉、杉山雄一 ヒト有機アニオントランスポーター-OATP2, OATP8の比較解析 薬理と治療 30(suppl.2), S417-S420 (2002)
23. Kato Y, Kuge K, Kusuhara H, Meier PJ and Sugiyama Y. Gender difference in the urinary excretion of organic anions in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 302, 483-489 (2002)
24. 松島総一郎、前田和哉、設楽悦久、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一 ヒトOATP2とMRP2を同時発現させたダブルトランスフェクタントの評価 - 肝臓におけるcerivastatinの経細胞輸送特性の定量的評価に向けて - 薬理と治療 30(suppl.2), S441-S444 (2002)
- (2) 学会発表
1. 栗林正伯、朝元誠人、鈴木周五、白井智之、薬物代謝酵素誘導物質によるMeIQの肝発がん修飾作用、第19回日本毒性病理学会、東京、2003年1月23、24日。(第19回日本毒性病理学会講演要旨集、p.84)
2. J Kanno. Toxicogenomics. in Pharmacology/Physiology studies by functional genomics technology, The 76th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, March 24-26, 2003, Fukuoka, Japan
3. J Kanno. Reverse toxicology and data normalization/standardization. Toxicogenomics International Forum 2002, Okazaki, 2002
4. J Kanno. Toxicogenomicsの現状. ゲノム創薬フォーラム ゲノム創薬へのパラダイムシフト、東京、2002
5. 紅林秀雄、大野泰雄: 除草剤 prometryn のヒトおよびラット肝ミクロソームにおける代謝 日本薬学会第123年会 (2003.3)
6. Yoshiike N, Kaneda F, Takimoto H: Annual National Nutrition Survey in Japan. FAO-IHLI -INMU Workshop of Food Consumption Surveys in Developing Countries: 2003.1.26: Thailand
7. Kaneda F, Yoshiike N, Takimoto H, Yoshita K: Integrated food consumption database for risk assessment of chemical contaminants in usual Japanese diet. IX Asian Congress of Nutrition: 2003.2.27: New Delhi, India:
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
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

〔実験1〕ヘテロサイクリックアミンの1種である 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)の発がん作用に及ぼす亜硝酸ナトリウム(NaNO₂)の併用投与の影響を、ラット肝・大腸二段階発がんモデルを用いて検討した。その結果、肝臓及び大腸ともに、腫瘍発生率及び1個体当たりの腫瘍発生数は、IQ 投与群では IQ 非投与群に比べて有意に高かった。また、IQ 及び NaNO₂ を併用投与することにより、1個体当たりの腫瘍発生数は肝臓では増加傾向、また大腸では有意な増加を示した。ジンバル腺では、癌の発生率が NaNO₂ の併用投与により、用量相関性に増加し、0.2% + IQ 300 ppm 併用投与群の値 (70%) は IQ 300 ppm 投与群の値 (13%) に比べて有意に高かった。他に、NaNO₂ 併用投与による影響は認められなかったが、肺における腺腫及び腺癌の発生率が IQ 投与群では 20~73%と IQ 非投与群の 0~5%に比べて有意に高かった。従って、NaNO₂ は IQ の肝臓、大腸及びジンバル腺の発がん効果を増強することが明らかとなり、その効果はジンバル腺で最も強かった。また今回、IQ のラット肺に対する発がん性を示唆する新たな知見が得られた。

〔実験2〕除草剤として用いられ、抗甲状腺物質としても知られているアミトロールの消化管障害時における甲状腺発がん修飾作用を DHPN 誘発ラット二段階発がんモデルにより検討した。小腸及び大腸傷害物質として各々インドメタシンとデキストラン硫酸(DSS)を用い、アミトロールとの併用投与を行った。その結果、アミトロール投与により甲状腺重量の増加がみられ、甲状腺濾胞上皮の巣状過形成、腺腫、腺癌が高頻度に発生した。インドメタシン併用では腺癌の発生頻度及び個数がアミトロール単独群に比べ有意に(p<0.05)減少したが、インドメタシンの甲状腺に対する直接作用あるいは小腸障害に伴う間接作用のいずれによるものかは明らかではなかった。DSS 併用による甲状腺発がんへの影響は認められなかった。下行結腸では DSS により腺腫及び腺癌が高頻度に観察されたが、インドメタシンの併用で著明に減少した。この減少は体重減少による可能性がある。

〔実験3〕、臓器障害の一端として、第2相解毒化酵素群の発現誘導能を欠いた Nrf2 欠損マウスを用いた IQ の発がん実験を開始し、現在経過観察中である。

A. 研究目的

残留農薬や食品添加物の ADI 設定にあたっては、それらの複合作用や摂取するヒトの病的状態は考慮されていない。化学物質が生体に及ぼす影響を、より実態に即した条件下で検討するための基礎研究の推進が必要である。

2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)

は、調理した肉あるいはタバコの煙から検出され、突然変異性及びラット肝臓、小腸、大腸、ジンバル腺などに発がん性を有するヘテロサイクリックアミンの1種である。また、IQ のニトロ代謝物である nitro-IQ は、IQ と同様に突然変異性を有することが知られており、酵素学的にはニトロ基還元酵素によって nitro-IQ へ代謝されると考えられている。最近、こ

の nitro-IQ は *in vitro* 系において Cu^{2+} 及び NADH 存在下で酸化ストレスの指標である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を含む DNA 傷害性を持つことが示され、生体内においても活性酸素分子種を介して発がんに影響を及ぼす可能性が示唆されている。一方、化学的には nitro-IQ は IQ を亜硝酸塩(NaNO_2)処理することによって生成されることが知られている。 NaNO_2 は環境中に多く存在し、食品添加物としても使用されている。発がん性は認められていないが、2級アミンとの複合でニトロソアミンを生成することが知られており、MeIQx のラット肝発癌を増強させることが報告されている。そこで今年度は実験1として、diethylnitrosamine (DEN) 及び 1,2-dimethylhydrazine (DMH) で肝臓及び大腸をそれぞれイニシエーション後、IQ 及び NaNO_2 を併用投与して、肝臓あるいは大腸における発がん効果を検討した。

臓器障害に関する研究については、障害臓器における発がんは促進されることが多いが、臓器が障害された場合、その臓器以外における発がんへの影響については不明な点が多い。前年度は除草剤として用いられ、抗甲状腺物質としても知られているアミトロールの肝、腎及び甲状腺障害時における、ラット甲状腺発がんへの影響を検討した。今年度は、実験2として、アミトロールの、インドメタシンによる小腸障害時、及びデキストラン硫酸で惹起した大腸障害時におけるラット甲状腺発がんへの影響を検討した。

Nrf2 欠損マウスは、転写因子であり、抗酸化剤反応性配列/親電子性物質応答配列 (ARE/EpRE) に結合して第2相酵素群の統一的な発現誘導に働く Nrf2 因子を欠失して作成したノックアウトマウスである。従って、このマウスでは第2相解毒酵素群が発現誘導されないため、親電子性発がん物質を効率的に解毒排泄することができず、酸化性ストレスにも感受性が高いとされている。実験3では、

臓器障害の一端として、第2相解毒酵素群の発現誘導能を欠いた Nrf2 欠損マウスを用いて IQ の発がん実験を行った。

B. 研究方法

[実験1] 5週齢の F344 系雄ラットに、イニシエーションとして diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg) の1回腹腔内投与及び 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 40 mg/kg) の4回皮下投与を行った。その後、8週齢時より基礎飼料のみを与える群、IQ 300 ppm (混餌) 及び NaNO_2 0.1% あるいは 0.2% (飲水) をそれぞれ単独あるいは複合で 27 週間投与する群を設けた (Fig. 1)。

体重測定、摂餌量測定及び摂水量測定については、実験開始後第6週までは週1回の割合で測定し、以降は2~3週に1回の割合で測定した。

全生存動物は、実験開始後第29週時にエーテル麻酔下で放血致死後、剖検した。諸器官・組織については肉眼的に観察後摘出し、肝臓及び腎臓については器官重量を測定した。また、肝臓、腎臓、胃、小腸、大腸、ジンバル腺及びその他肉眼的異常部位については、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で固定した。実験中に死亡あるいは瀕死状態につき屠殺した動物についても、上記器官・組織を採取後固定し保存した。保存した臓器は、パラフィン包埋後薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本を作製した。病理組織学的検索は全ての動物について行った。

[実験2] 6週齢の F344 系雄ラットに N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN, 2800 mg/kg) を単回皮下投与し、その1週後からアミトロールを 300ppm の濃度で混餌投与した。また、消化管障害物質として、小腸傷害作用のあるインドメタシンを 100ppm の濃度で混餌、あるいは大腸炎誘発物質であるデキストラン硫酸 (DSS) を 1% の濃度で飲水に混じて間歇併用投与した (Fig. 2)。また、それぞれ

の単独投与群も設けた。アミトロール投与開始 20 週後にエーテル麻酔下にて動物を屠殺し、甲状腺、下垂体、小腸及び大腸を採取し、甲状腺及び下垂体重量を測定した後、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を製作し病理組織学的に検索した。体重及び臓器重量の統計法、病理組織所見についてはマン・ホイットニ検定により発現頻度及び程度の統計学的解析を行った。

[実験 3]

各群 20 匹の 8 週齢 *Nrf2* 欠損マウス各遺伝子型(*nrf2* +/+, *nrf2* +/-, *nrf2* -/-)雌雄に IQ 300 ppm を 52 週間混餌投与する。基礎飼料のみを与える群も設けた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠して行っており、動物の屠殺にあたっては、エーテル深麻酔下大動脈からの脱血により、動物に与える苦痛を可能な限り少なくしている。

C. 研究結果

[実験 1]

1. 生存率、体重、摂餌量及び摂水量

生存率を Fig. 3 に示した。幾つかの実験群で、実験開始後第 3 週～第 6 週にイニシエーション投与によると思われる死亡が 1～2 例みられた。また、IQ 投与群では実験開始後第 24 週以降死亡がみられ、実験終了時における生存率は各群とも約 60%と対照群に比べて有意に低かった。NaNO₂ 投与により生存率に変化がみられなかったことから、上記死亡例数の増加は IQ 投与が原因であると考えられた。

体重、摂餌量及び摂水量の結果をそれぞれ Fig. 4～6 に示した。いずれのパラメーターにおいても、IQ 投与群は IQ 非投与群に比べて低値を示して推移した。また、NaNO₂ 濃度依存的に低値を示して推移する傾向がみられた。体重については統計解析の結果、実験終了時に IQ 300 ppm 投与群の値は対照群の値に比べ

て有意に低く、また NaNO₂ 0.2% + IQ 300 ppm 併用投与群の値は IQ 300 ppm 投与群の値に比べて有意に低かった (Table 1)。

2. 臓器重量

臓器重量の結果を Table 1 に示した。肝臓、腎臓ともに IQ 投与群は IQ 非投与群に比べて高値を示す傾向がみられ、IQ 300 ppm 投与群の値は対照群の値に比べて有意に高かった。また、IQ 投与群において NaNO₂ 投与による肝重量の高値傾向がみられたが、有意差のある変化ではなかった。

3. 肝臓での腫瘍発生状況

肝腫瘍の病理組織学的検索結果を Table 2 に示した。肝細胞腺腫及び肝細胞癌の合計では、腫瘍発生率及び 1 個体当たりの腫瘍発生数ともに、IQ 投与群は IQ 非投与群に比べて高値を示し、IQ 300 ppm 投与群の値 (発生率: 80%、発生数: 3.07±3.41) は対照群の値 (発生率: 39%、発生数: 0.61±0.92) に比べて有意に高かった。また、IQ 投与群において NaNO₂ 投与による 1 個体当たりの腫瘍発生数に高値傾向がみられた。

4. 大腸での腫瘍発生状況

大腸腫瘍の病理組織学的検索結果を Table 3 に示した。腺腫及び腺癌の合計では、腫瘍発生率及び 1 個体当たりの腫瘍発生数ともに、IQ 投与群は IQ 非投与群に比べて高値を示し、IQ 300 ppm 投与群の値 (発生率: 93%、発生数: 5.47±3.78) は対照群の値 (発生率: 39%、発生数: 0.56±0.78) に比べて有意に高かった。また、IQ 投与群において 1 個体当たりの腫瘍発生数は、NaNO₂ 0.2% + IQ 300 ppm 併用投与群の値 (9.16±4.25) は IQ 300 ppm 投与群の値 (5.47±3.78) に比べて有意に高かった。

5. その他の臓器における腫瘍発生状況

肝臓及び大腸を除いた臓器で発生した腫瘍の病理組織学的検索結果を Table 4 に示した。

肺では、肺胞上皮過形成、腺腫及び腺癌の発生率が、IQ 投与群では IQ 非投与群に比べて高値を示し、IQ 300 ppm 投与群の値 (肺胞

上皮過形成：33%、腺腫：47%、腺癌：73%) は対照群の値（肺胞上皮過形成、腺腫及び腺癌：0%）に比べて有意に高かった。但し、NaNO₂ 併用投与による上記腫瘍発生率の増加は認められなかった。

ジンバル腺では、癌の発生率が NaNO₂ の併用投与により、用量相関性に増加し、0.2% + IQ 300 ppm 併用投与群の値（70%）は IQ 300 ppm 投与群の値（13%）に比べて有意に高かった。

他に、腎臓、肺、小腸、口腔及び造血系組織（白血病/悪性リンパ腫）において Table に示した所見がみられたが、その発生率に群間での差はなかった。

[実験 2]

1. ~~途中死亡、体重、摂餌量、摂水量~~

アミトロール投与開始 2-12 週目において、アミトロール単独群で 2/20 例、アミトロールと DSS の併用群で 2/20 例、アミトロールとインドメタシン併用群で 7/20 例及びインドメタシン単独群で 6/20 例甲状腺障害あるいは小腸障害により途中死亡したが、これらの動物については甲状腺発がんの評価より除外した。

アミトロール投与によりいずれの処置群（アミトロール単独群を含む）においても明らかな体重増加抑制がみられた。また、アミトロール投与の有無に関わらずインドメタシン処置群では各対照群と比較して明らかな体重増加抑制を示した (Fig. 7)。

摂餌量は、アミトロール投与によりいずれの処置群（アミトロール単独群を含む）においても低下した。また、アミトロール投与の有無に関わらずインドメタシン処置群では各対照群と比較してその投与期間中で低値を示し (Fig. 8)。平均アミトロール摂取量においては、いずれの処置による影響も認められなかった (Table 5)。

摂水量はアミトロール投与によりいずれの処置群（アミトロール単独群を含む）においても低下した。また、DSS 単独投与群では増加した (Fig. 9)。

2. ~~臓器重量~~

甲状腺重量は、アミトロール投与により顕著に増加したが、インドメタシン及び DSS のいずれの処置による影響も認められなかった。(Table 6)。

3. ~~病理組織学的所見~~

インドメタシン投与群で、アミトロール投与の有無に関わらず小腸において潰瘍がみられ、その発生頻度はアミトロール非投与群及び投与群でそれぞれ 12/13 例、10/13 例であった。また、DSS 投与群でアミトロール投与の有無に関わらず下行結腸における粘膜萎縮が観察された。DSS 単独群においては 17/20 例にアミトロールと DSS 併用群については 2/18 例に腺癌がみられた (Table 7)。甲状腺において、アミトロール投与群はいずれの群においても濾胞上皮細胞の増殖性病変（巣状過形成、腺腫、腺癌）がみられ、インドメタシン併用投与群において腺癌の発生頻度が有意に ($p < 0.05$) 減少した。アミトロールと DSS の併用群とアミトロール単独群との間に差はみられなかった (Table 3)。また、アミトロールとインドメタシンの併用投与群で腺癌の発生個数がアミトロール単独群と比較して有意に ($p < 0.05$) 減少した。アミトロールと DSS の併用投与群とアミトロール単独群との間に差はみられなかった (Table 8)。

[実験 3] 実験開始第 40 週の時点では、雌雄とも、体重及び摂餌量いずれのパラメータにおいても、IQ 投与あるいは遺伝子型に起因する推移の変化はみられていない。現在実験を継続中である。

D. 考察

[実験 1] HCA と NaNO₂ の関連について、我々はイニシエーション期に PhIP と併用投与することにより、乳腺腫瘍体積が抑制されることを既に報告している。一方、ラット中期肝発がん試験法において MeIQx 及び NaNO₂ を 6 週間併用投与することにより GST-P

positive foci の形成が促進されるという結果も得ている。今回報告した IQ による肝・大腸発がん促進効果は MeIQx と同様の結果である。IQ 及び MeIQ は NaNO_2 処理によって変異原性の高い代謝物に変換されるが、一方同じ HCA 化合物でも Glu-P-1 及び Trp-P-2 は変異原性の低いあるいは非変異原性の化合物に変換されることがエイムス試験の結果より確認されている。IQ 及び NaNO_2 を併用投与することにより生体内では、酵素学的あるいは化学的に、IQ のニトロ代謝物である nitro-IQ の生成が予想される。nitro-IQ は突然変異性を有する他、*in vitro* 系において Cu^{2+} 及び NADH 存在下で酸化ストレスの指標である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を含む DNA 傷害性を持つことが示されている。従って、本実験結果から活性酸素分子種を介して、肝及び大腸における腫瘍発生が促進された可能性も考えられる。以上から、おそらく PhIP は NaNO_2 処理によって Glu-P-1 及び Trp-P-2 と同様に変異原性の低いあるいは非変異原性の化合物に変換されることが予想され、一方 IQ については同様の処理によって変異原性の高い代謝物に変換されることが、本実験での発がん促進効果の 1 要因を担っている可能性が考えられる。今回、予想に反して IQ 投与による肺への発がん性が認められた。げっ歯類では CDF1 マウスで肺を標的臓器にもつことが確認されているが、一方ラットでの報告はない。HCA 化合物中においてもラット肺に発がん性を示すという報告はない。今回、イニシエーターとして用いた DEN はマウスで肺がんも誘発することが知られているが、ラットでのイニシエーション作用は弱いと見られるため、IQ 自体に肺に対する強い発がん性があるものと考えられる。

〔実験 2〕化学物質による消化管障害が甲状腺発がん修飾作用あるいは毒性作用に対して及ぼす影響を検討する目的で、除草剤として用いられ、抗甲状腺物質としても知られているアミトロールの消化管障害時における

DHPN 誘発ラット甲状腺発がんへの影響を検討した。アミトロール投与により明らかな体重増加抑制がみられ、特に小腸障害を誘発する目的で設けたインドメタシン処置群では顕著であった。しかし、甲状腺障害を誘発する各々の処置による体重あたりの平均アミトロール摂取量に対する影響はみられなかった。従って、本実験における甲状腺発がん修飾作用あるいは毒性作用に対する各処置の影響の評価は可能であると考えられた。

アミトロール投与により、甲状腺重量は顕著に増加し、濾胞上皮細胞の増殖性病変（巣状過形成、腺腫、腺癌）の発生頻度及び発生個数が明らかに増加した。大腸障害処置として行った DSS 投与は増殖性病変の発生頻度及び個数に影響を及ぼさなかったが、小腸傷害処置として行ったインドメタシン投与において、増殖性病変の発生頻度及び個数が有意に減少した。従って、インドメタシンは、アミトロールによる甲状腺発がんプログレッション作用を抑制することが示唆されたが、インドメタシンの甲状腺に対する直接作用あるいは小腸障害に伴う間接作用のいずれによるものかは明らかではなかった。

甲状腺以外においては、DSS 単独群で下行結腸部に腺癌が高頻度にみられたのに対しアミトロールとの併用群では腺癌の発生頻度が減少していたのが確認された。しかし、アミトロールを投与することにより体重の著明な増加抑制がみられ、DSS を混じた飲水の摂取量も DSS 単独群に比べて明らかに少なかったことからアミトロールが腺癌発現に対して抑制的に作用したとは断定することができなかった。

E. 結論

〔実験 1〕 NaNO_2 は IQ の肝臓、大腸及びジンバル腺の発がん効果を増強することが明らかとなり、その効果はジンバル腺で最も強かった。また今回、IQ のラット肺に対する発が