

ん性を示唆する新たな知見が得られた。[実験2] アミトロール投与による甲状腺重量の増加、甲状腺濾胞上皮の増殖性病変の発生は、インドメタシン併用で有意に減少したが、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。下行結腸ではDSSにより腺腫及び腺癌が高頻度に発生し、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。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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. *Cancer Lett.* 178:19-24, 2002.

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 (PhIP)-induced colon carcinogenesis by 1-*O*-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) after initiation with 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in F344 rats. *Carcinogenesis* 23: 283-287, 2002.

Futakuchi M, Cheng JL, Hirose M, Kimoto N, Cho YM, 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.

Yamagishi M, Natsume M, Osakabe N, Nakamura H, Furukawa F, Imazawa T, Nishikawa A, Hirose M. Effects of cacao liquor proanthocyanidine on PhIP-induced mutagenesis in vitro, and mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.* 185: 123-130, 2002.

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.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

**Table 1 Final body and relative organ weights**

Treatment	No. of rats	Body weight(g)	Liver (%)	Kidneys (%)
Control	18	310 ± 20	2.78 ± 0.09	0.61 ± 0.05
NaNO <sub>2</sub> (0.1%)	18	305 ± 20	2.83 ± 0.14	1.70 ± 4.53
NaNO <sub>2</sub> (0.2%)	20	293 ± 16	2.80 ± 0.12	0.67 ± 0.08
IQ (300 ppm)	11	258 ± 27 <sup>a)</sup>	4.91 ± 0.56 <sup>a)</sup>	0.94 ± 0.67 <sup>b)</sup>
NaNO <sub>2</sub> (0.1%) + IQ	13	225 ± 34	5.66 ± 2.20	0.85 ± 0.09
NaNO <sub>2</sub> (0.2%) + IQ	12	202 ± 30 <sup>c)</sup>	5.48 ± 0.75	0.97 ± 0.13

a): p<0.001; b): p<0.05; Significantly different from Control

c): p<0.001; Significantly different from IQ (300 ppm)

**Table 2 Final incidence, multiplicity and histological classification of liver tumors**

Treatment	No. of rats	Hepatocellular Adenoma		Hepatocellular Carcinoma		Total	
		Incidence (%)	Multiplicity (no./rat)	Incidence (%)	Multiplicity (no./rat)	Incidence (%)	Multiplicity (no./rat)
Control	18	4 (22)	0.22 ± 0.43	6 (33)	0.39 ± 0.61	7 (39)	0.61 ± 0.92
NaNO <sub>2</sub> (0.1%)	18	1 (6)	0.06 ± 0.24	2 (11)	0.17 ± 0.51	2 (11)	0.22 ± 0.73
NaNO <sub>2</sub> (0.2%)	20	3 (15)	0.15 ± 0.37	2 (10)	0.15 ± 0.49	4 (20)	0.30 ± 0.73
IQ (300 ppm)	15	6 (40)	1.40 ± 2.26 <sup>a)</sup>	11 (73) <sup>a)</sup>	1.67 ± 1.50 <sup>b)</sup>	12 (80) <sup>a)</sup>	3.07 ± 3.41 <sup>b)</sup>
NaNO <sub>2</sub> (0.1%) + IQ	19	15 (79) <sup>c)</sup>	2.74 ± 2.77	17 (89)	2.26 ± 1.56	18 (95)	5.00 ± 3.92
NaNO <sub>2</sub> (0.2%) + IQ	20	16 (80) <sup>c)</sup>	1.70 ± 1.49	15 (75)	2.65 ± 2.46	17 (85)	4.35 ± 3.47

a): p<0.05; b): p<0.01; Significantly different from Control

c): p<0.05; Significantly different from IQ (300 ppm)

**Table 3 Final incidence, multiplicity and histological classification of colon tumors**

Treatment	No. of rats	Adenoma		Adenocarcinoma		Total	
		Incidence (%)	Multiplicity (no./rat)	Incidence (%)	Multiplicity (no./rat)	Incidence (%)	Multiplicity (no./rat)
Control	18	7 (39)	0.44 ± 0.62	2 (11)	0.11 ± 0.32	7 (39)	0.56 ± 0.78
NaN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.1%)	18	5 (28)	0.33 ± 0.59	3 (17)	0.28 ± 0.67	7 (39)	0.61 ± 0.92
NaN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.2%)	20	3 (15)	0.20 ± 0.52	7 (35)	0.40 ± 0.60	10 (50)	0.60 ± 0.68
IQ (300 ppm)	15	6 (40)	0.73 ± 1.33	14 (93) <sup>b)</sup>	4.73 ± 2.91 <sup>b)</sup>	14 (93) <sup>a)</sup>	5.47 ± 3.78 <sup>b)</sup>
NaN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.1%) + IQ	19	12 (63)	0.95 ± 0.97	18 (95)	4.47 ± 2.91	18 (95)	5.42 ± 3.19
NaN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.2%) + IQ	19	15 (79) <sup>c)</sup>	1.47 ± 1.02	19 (100)	7.68 ± 3.77 <sup>c)</sup>	19 (100)	9.16 ± 4.25 <sup>c)</sup>

a): p<0.01; b): p<0.001; Significantly different from Control

c): p<0.05; Significantly different from IQ (300 ppm)

**Table 4 Incidence of other tumors**

Organs/Findings	Group	No. of animals					
		Control	NaNO <sub>2</sub> (0.1%)	NaNO <sub>2</sub> (0.2%)	IQ (300 ppm)	NaNO <sub>2</sub> (0.1%) + IQ	NaNO <sub>2</sub> (0.2%) + IQ
<b>Kidney</b>							
Renal adenocarcinoma		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7%)	0 (0%)	0 (0%)
Renal mesenchymal tumor		2 (11%)	3 (16%)	6 (30%)	1 (7%)	3 (16%)	2 (10%)
Nephroblastoma		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7%)	0 (0%)	1 (5%)
<b>Lung</b>							
Alveolar epithelial hyperplasia		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (33%) <sup>a)</sup>	2 (11%)	7 (35%)
Adenoma		0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	7 (47%) <sup>b)</sup>	6 (32%)	4 (20%)
Adenocarcinoma		0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	11 (73%) <sup>c)</sup>	8 (42%)	8 (40%)
Carcinoma, squamous cell		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)
Zymbal's gland							
Carcinoma		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (13%)	6 (32%)	14 (70%) <sup>d)</sup>
<b>Small intestine</b>							
Adenoma		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)
Adenocarcinoma		0 (0%)	1 (6%)	0 (0%)	1 (7%)	3 (16%)	3 (15%)
<b>Oral cavity</b>							
Carcinoma, squamous cell		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)
Leukemia/malignant lymphoma		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)

a): p<0.05; b): p<0.01; c): p<0.001; Significantly different from Control  
d): p<0.001; Significantly different from IQ (300 ppm)

Table 5 Chemical consumption of amitrole

Treatment	Amitrole (-)			Amitrole (+)		
	Control	DSS	IND	Control	DSS	IND
Group	1	2	3	4	5	6
Chemical consumption (mg/kg B. W./day)	-	-	-	13.0	13.6	14.9

DSS; dextran sulfate sodium, IND; indomethacin

Table 6 Final body weight and organ weights in rats treated with amitrole after DHPN-initiation

Treatment	Amitrole (-)			Amitrole (+)		
	Control	DSS	IND	Control	DSS	IND
Group	1	2	3	4	5	6
No. of animals	20	20	13	18	18	13
Final Body weight	319.5±24.6	315.5±20.5	207.7±18.2**	154.5±22.0**	162.2±54.7**	141.0±12.4**
<b>Thyroids</b>						
Absolute (mg)	20.4±4.2	23.1±5.0	21.0±5.1	223.5±34.5**	226.6±38.7**	211.4±43.2**
Relative (mg/100g b.w.)	6.4±1.3	7.3±1.6	10.7±3.2**	147.7±35.2**	142.2±32.7**	151.5±39.3**
<b>Pituitary</b>						
Absolute (mg)	13.4±4.4	13.9±2.4	11.9±2.4	14.6±2.9	14.5±3.0	13.7±2.4

DSS; dextran sulfate sodium, IND; indomethacin

\*\*; p>0.01 (Student's *t*-test, analyzed on groups 2-6 vs. group 1)

Table 7 Incidence of thyroid, colon and small intestinal proliferative lesions in rats treated with amitrole after DHPN-initiation

Treatment	Amitrole (-)				Amitrole (+)			
	Control	DSS	IND	Control	DSS	IND		
Group	1	2	3	4	5	6		
No. of animals	20	20	13	18	18	13		
Thyroids								
Focal follicular cell hyperplasia	0	1	0	18	18	13		
Follicular cell adenomas	0	0	0	16	15	10		
Follicular cell adenocarcinomas	0	0	0	7	7	1*		
Colon								
Mucosal atrophy	0	17	0	0	18	0		
Adenocarcinomas	0	17	0	0	2	0		
Small intestine								
Ulcers	0	0	12	0	0	10		

DSS; dextran sulfate sodium, IND; indomethacin

\*;  $p > 0.05$  (Mann Whitney's *U*-test, analyzed on groups 5-6 vs. group 4)

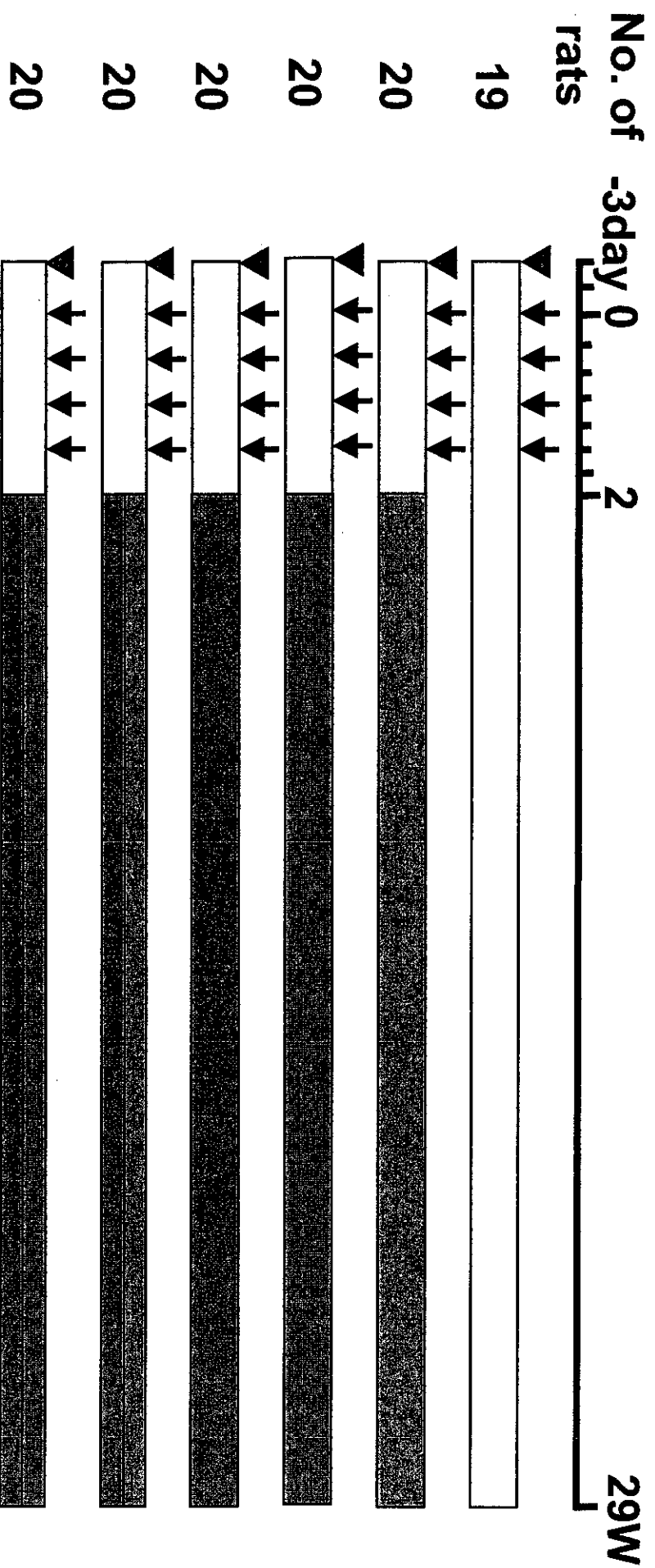


Table 8 Multiplicity of thyroid proliferative lesions in rats treated with amitrole after DHPN-initiation

Treatment	Amitrole (-)			Amitrole (+)		
	Control	DSS	IND	Control	DSS	IND
Group	1	2	3	4	5	6
No. of animals	20	20	13	18	18	13
Thyroids						
Focal follicular cell hyperplasia	0	0.05±0.21	0	10.5±4.6	12.0±4.4	11.0±3.9
Follicular cell adenoma	0	0	0	4.9±2.8	5.5±3.5	3.2±2.6
Follicular cell adenocarcinomas	0	0	0	0.6±0.6	0.6±0.6	0.1±0.3*

DSS; dextran sulfate sodium, IND; indomethacin

\*;  $p > 0.05$  (Mann Whitney's *U*-test, analyzed on groups 5-6 vs. group 4)



Animals : F344 male rats, 6 weeks old

▼ : DEN, 200 mg/kg bw, i.p.    ↓ : DMH, 40 mg/kg bw, s.c.

▨ :  $\text{NaNO}_2$ , 0.1% in drinking water    ▨ : IQ, 300 ppm in diet

▨ :  $\text{NaNO}_2$ , 0.2% in drinking water    □ : Basal diet

**Fig.1. Experimental design**

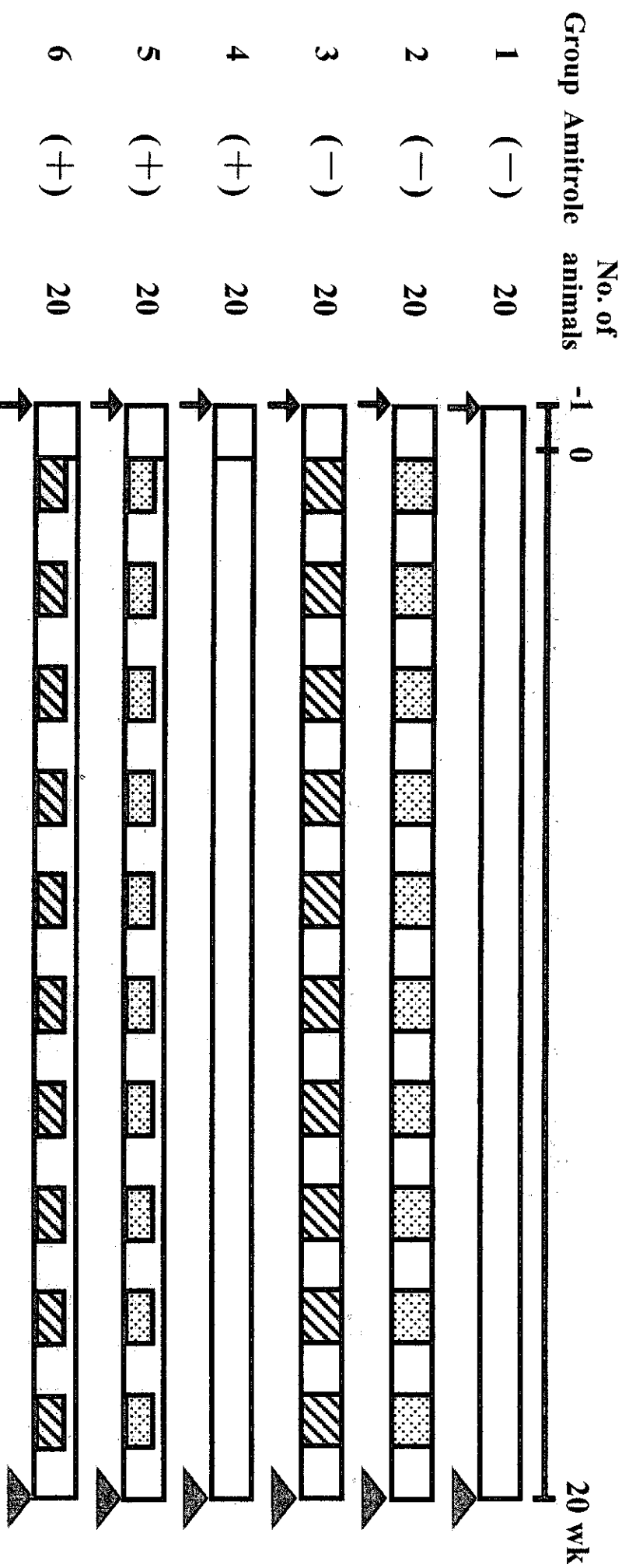
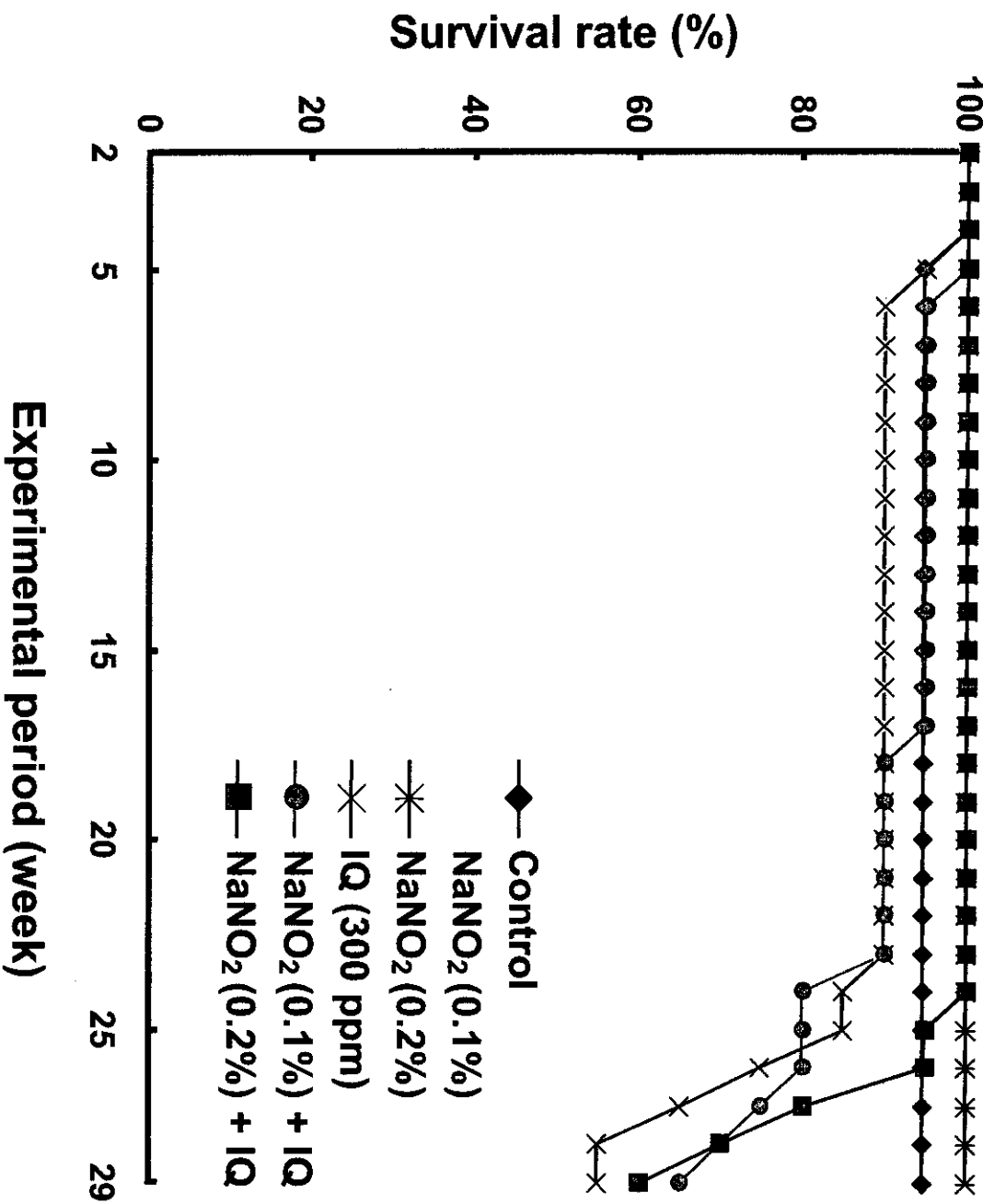
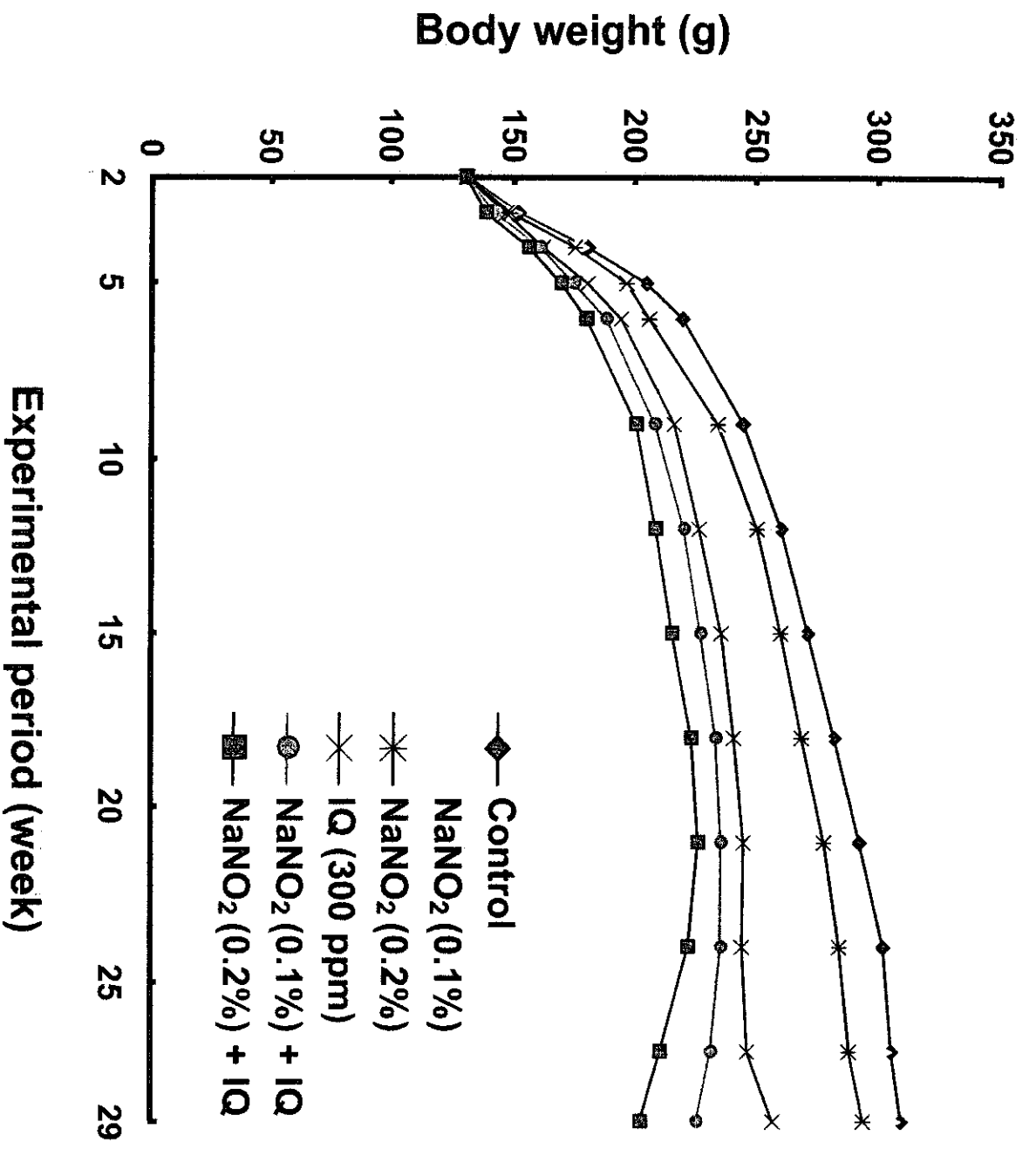


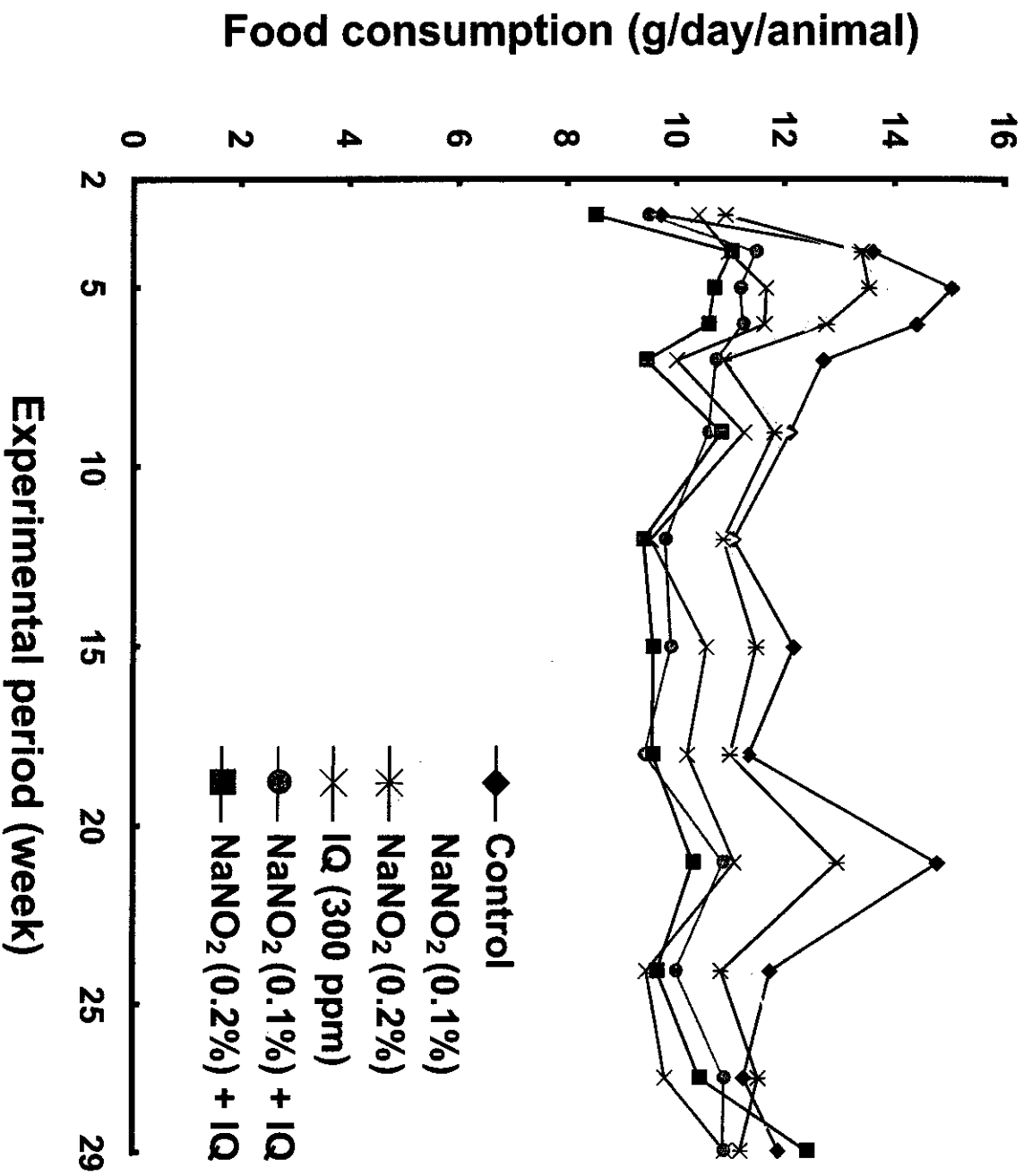
Fig. 2 Experimental design



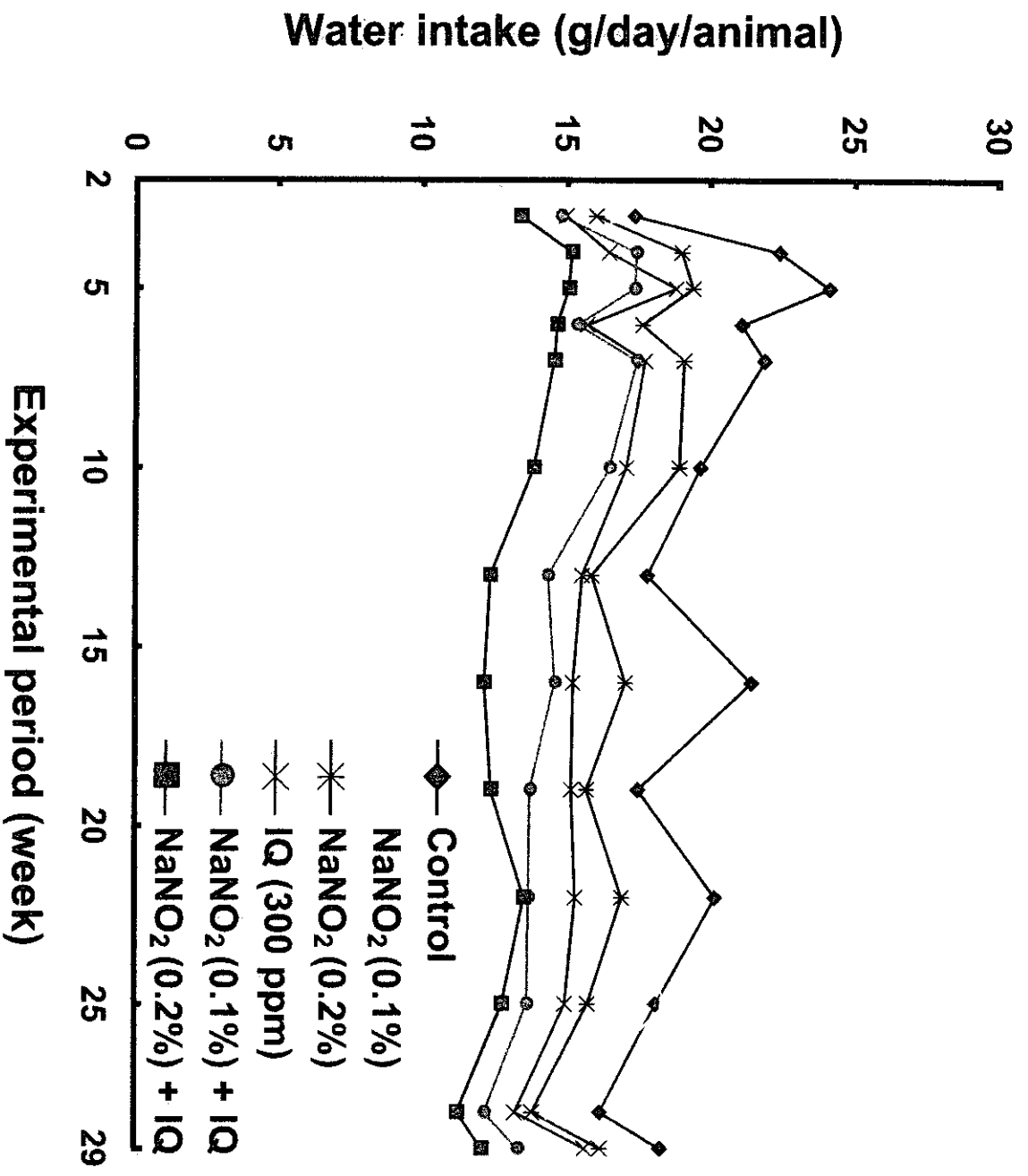
**Fig. 3. Survival rate in the post-initiation period**



**Fig. 4. Sequential changes in the body weight in the post-initiation period**



**Fig. 5. Sequential changes in the food consumption in the post-initiation period**



**Fig. 6. Sequential changes in the water intake in the post-initiation period**

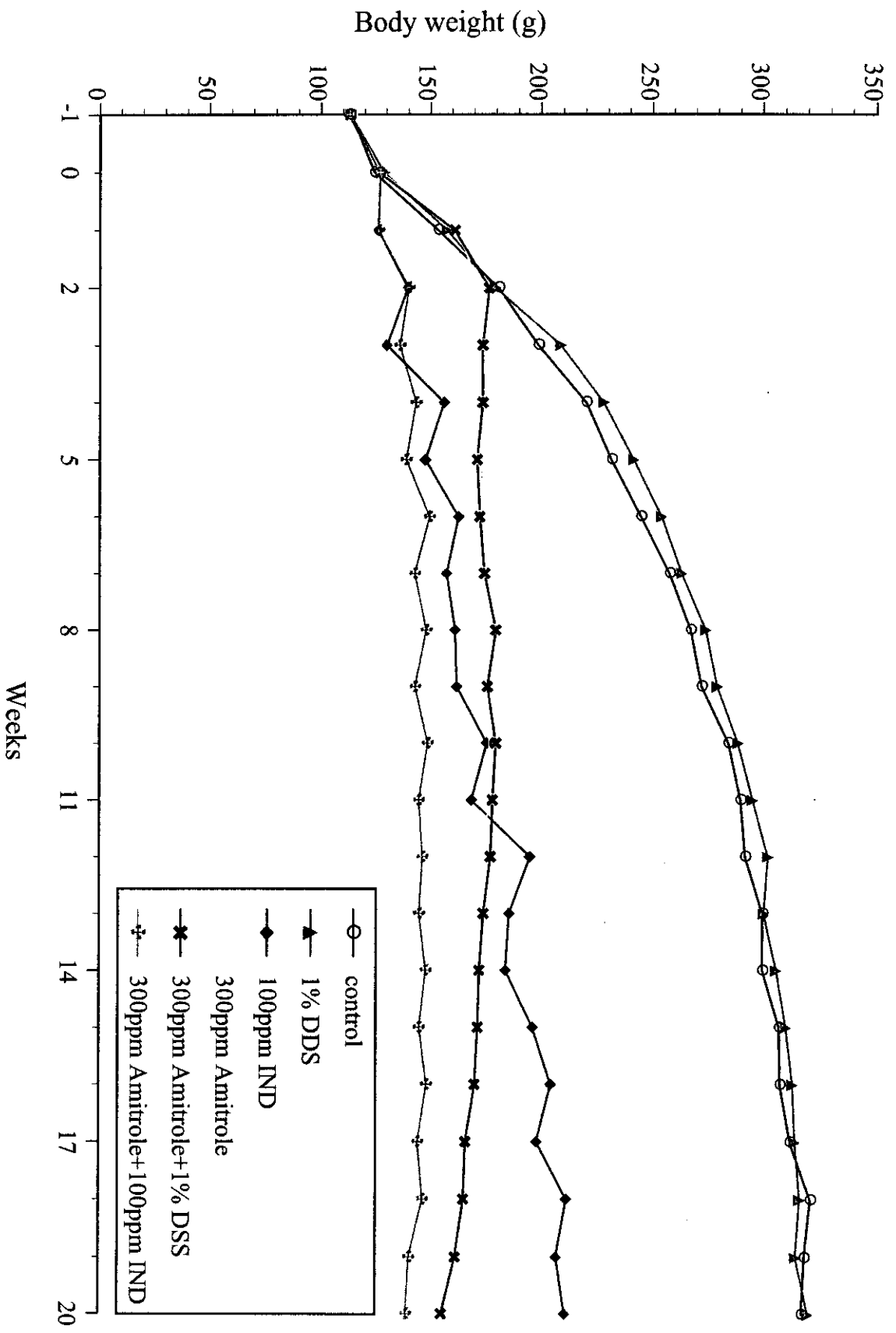


Fig. 7 Body weight curves



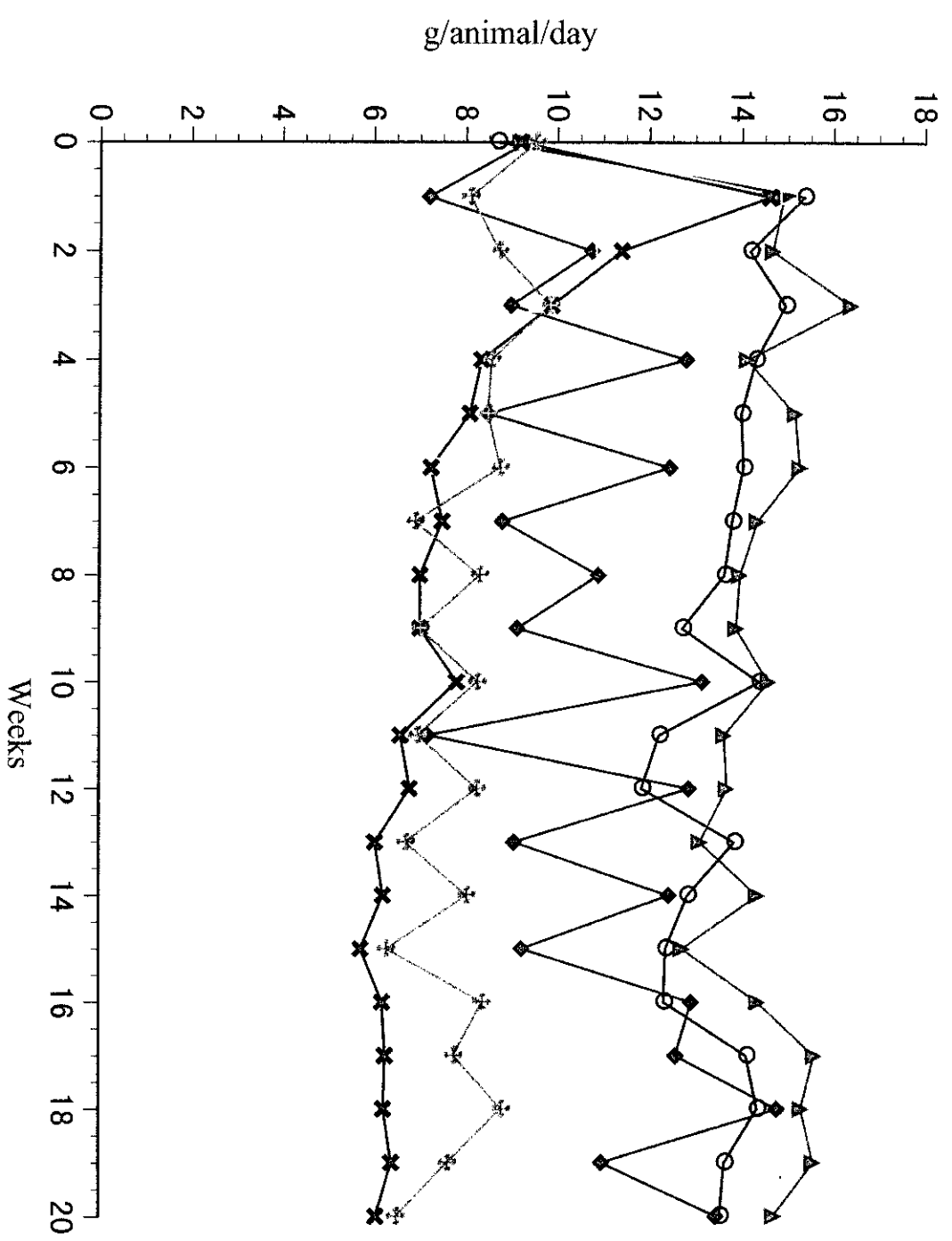


Fig. 8 Food intake changes

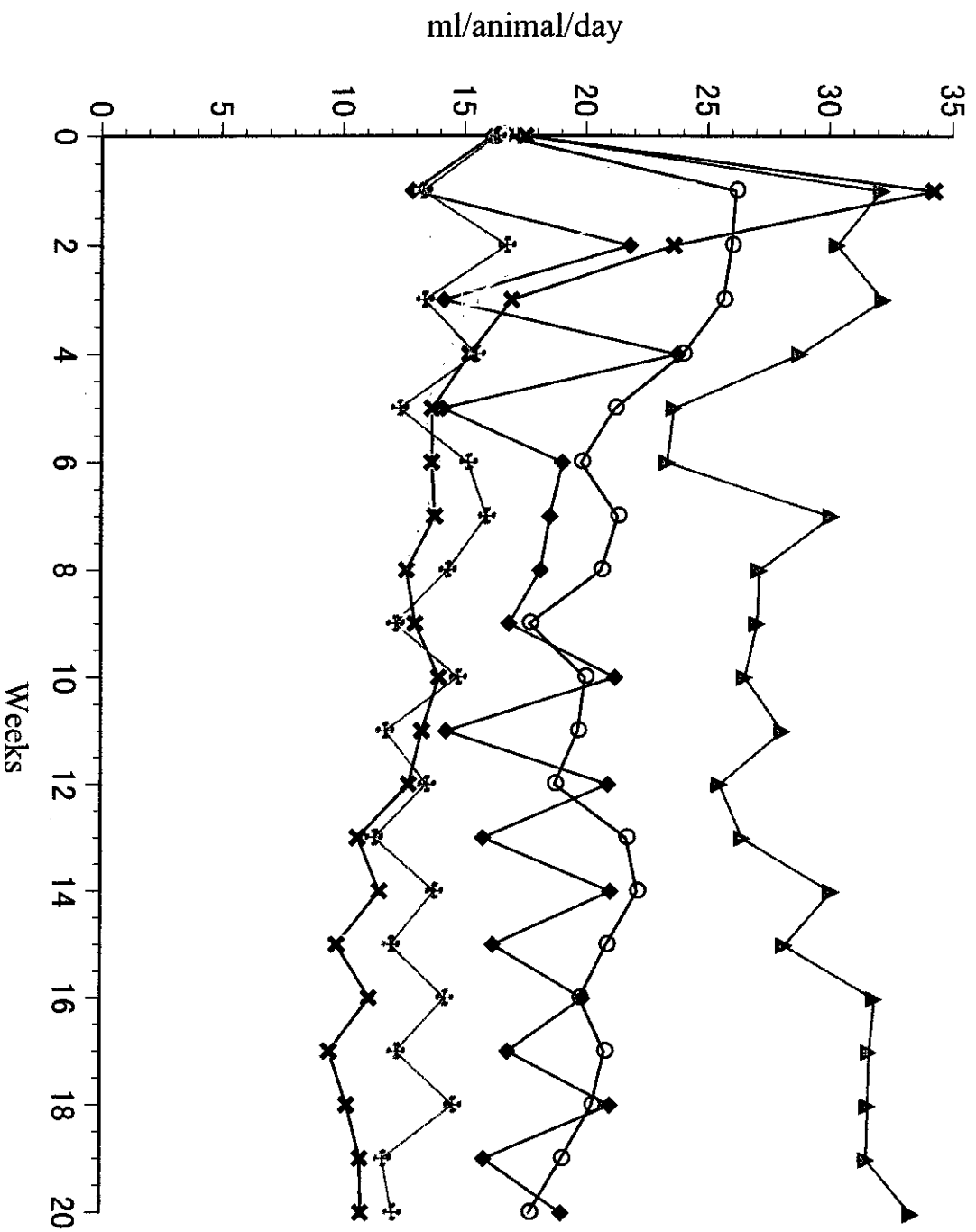
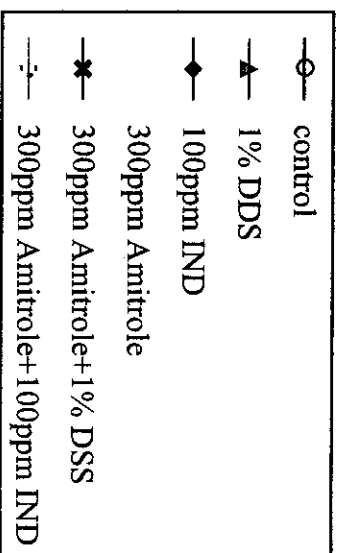


Fig. 9 Water intake changes



肝中期発がん試験法を用いた食品中化学物質の相互作用の影響

分担研究者 白井智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 教授

研究要旨 加熱した肉類魚類に含まれる発がん性ヘテロサイクリックアミンの1つである MeIQx は活性化酵素の代表であるチトクローム P450 (CYP450) によって代謝活性化される。本研究では異なった P450 誘導作用をもつ Phenobarbital (PB), Clofibrate, Diethylnitrosamine (DEN)あるいは Caffeine と MeIQx を同時投与し、MeIQx の発がん性がいかに変化するかを検討し、化学物質の相互作用について追究した。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。

A. 研究目的

食品中には無数の化学物質が含まれており、ヒトは多数の化学物質に暴露されているが、それらの物質による複合作用が体内でどのように起こっているかは不明である。これらの複合作用は発がん性を論じる場合の重要な課題であるにも係わらず、殆ど研究されていない。本研究は、食品中の化学物質の発がん作用に対する複合作用を検索する一つのモデルとして、加熱調理した肉類などに含まれる MeIQx と他の化学物質との複合作用を代謝活性化の面から追究した。MeIQx は活性化酵素の代表であるチトクローム P450 (CYP450) によって代謝活性化され、その代謝物が DNA と結合し、結果的に遺伝子に傷をつけ、変異を誘発すると考えられる。CYP450 には基質特異性をことにする多くのアイソザイムが存在し、

P450 誘導作用において CYP2A/2B/2C/3A を誘導する Phenobarbital (PB), CYP4A1/4A3 を誘導する Clofibrate, CYP1A2/2E1 を誘導する Diethylnitrosamine (DEN)あるいは CYP1A2 を誘導する Caffeine を用いた。また Phenobarbital, Clofibrate それに DEN はそれ自体肝に発がん性をもっており、これらを MeIQx と同時投与することによって、発がん物質の相互作用と同時に P450 の誘導作用によって MeIQx の発がん性がいかに変化するかを検討した。

B. 研究方法

動物は F344 雄ラット 6 週令を用い、DEN200mg/kg を腹腔内投与し、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 は飲飲料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。肝の前癌病変巣マーカーである GST-P の単位面積あたりの数と面積を計測した。

(倫理面への配慮)

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いれ行われたものである。

### C. 研究結果

MeIQx 単独投与群では、GST-P の単位面積あたりの数と面積は  $10.1 \pm 3.4$  個/cm<sup>2</sup> と  $0.6 \pm 0.3$ mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>であり、MeIQx と DEN の同時投与群では  $70.5 \pm 15.5$  個/cm<sup>2</sup>、 $7.0 \pm 2.4$  mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>と相乗的に GST-P 陽性前癌病変巣を増加させた。しかし、Phenobarbital では  $13.6 \pm 4.3$  個/cm<sup>2</sup>、 $0.9 \pm 0.3$ mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>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  $9.4 \pm 2.8$  個/cm<sup>2</sup>、 $0.6 \pm 0.2$ mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>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  $3.8 \pm 1.6$  個/cm<sup>2</sup>、 $0.4 \pm 0.3$ mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>と MeIQx の肝発がんに対する有意な抑制効果がみられた (表 1)。

### D. 考察

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巣を誘導した。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、MeIQx と Phenobarbital 投与による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。そのため、GST-P を指標とした肝発がん物質検索法では抑制物質として同定される。本実験でも MeIQx との同時投与により GST-P の数・面積とも減少したが、存在する GST-P 陽性細胞巣ははっきりと染色され、Clofibrate の作用を GST-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 CYP1A2 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。

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。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。

### E. 結論

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。

### F. 健康危惧情報

特になし