

G. 研究発表

1. 論文発表

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(2): 283-287, 2002.

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.

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.

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.

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.

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.

2. 学会発表

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 MeIQx 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)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

表 1

Number and Area of GST-P positive foci

Treatment	Number (/ cm ²)	Area (mm ² / cm ²)
MeIQx	10.1 ± 3.4	0.64 ± 0.25
MeIQx+PB	13.6 ± 4.3	0.92 ± 0.32 *
MeIQx+DEN	70.5 ± 15.5 **	6.97 ± 2.36 **
MeIQx+Clofibrate	3.8 ± 1.6 **	0.35 ± 0.25 *
MeIQx+Caffeine	9.4 ± 2.8	0.61 ± 0.21
PB	12.5 ± 2.2 *	0.89 ± 0.15 *
DEN	37.8 ± 8.8 **	2.94 ± 0.86 **
Clofibrate	3.5 ± 1.4 **	0.27 ± 0.11 **
Caffeine	6.5 ± 1.2	0.41 ± 0.13

Data shows mean ± S.D.

* : P <0.05, ** : P <0.01 v.s. MeIQx ## : P <0.01 , Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction

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）
分担研究報告書

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

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

研究要旨

複数の毒物に同時に曝露（複合曝露）される事例は食品中残留農薬を対象とした場合、通常の食生活等に於いて十分にその様なことが起こりうると想定される。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。酸化ストレスの様に、その反応自体は新たな遺伝子発現を必要としない機構や、それらの複合曝露時の毒性機序の解析は従来手法では遂行し難く、高精度のデータ標準化を併用した網羅的遺伝子発現解析手法を以て初めて効率的に行うことが出来る。本研究では酸化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。

A. 研究目的

本研究は、毒性評価に於いて使用されている安全係数に含まれるところの毒性反応に於ける宿主要因（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ものである。

B. 研究方法

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の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。

(倫理面への配慮)

基本的に *in vitro* 実験を中心に行うが、やむを得ず使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、当研究施設はそのモデル施設となっている。

C. 研究結果

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ニ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。

D. 考察

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。その中に於いても特に Bcl-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。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

J. Kanno. Reverse toxicology and data normalization/standardization Toxicogenomics International Forum 2002, Okazaki, 2002

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

「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」
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

分担研究者 小野 宏 (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 所長
研究協力者 澤田 純一、手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所、
金澤 由基子、小島 幸一、新藤 智子、古谷 真美
(財) 食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

農薬の動物の免疫系に及ぼす複合作用を検討するために、現在使われており、また農作物への残留の知られている含窒素系農薬を取り上げ、それら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。また、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。今年度は、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脱顆粒およびサイトカイン産生の促進のみられた含窒素系農薬(クロロニトロフェン(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。

A. 研究目的

アレルギー疾患が近年増加する傾向が認められているが、環境汚染物質の存在がその原因の一つとして疑われている。これらの環境汚染物質暴露によるアレルギー疾患増悪の有無を明らかにすることが急務とされるものの、簡便かつ適切な評価系に乏しいのが現状である。我々の分担研究としては、農薬等食品中化学物質相互のアレルギー増悪作用の有無を検討するために、アレルギーモデル系を確立することを目的としている。今年度は、農薬として、昨年度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のみられた含窒素系農薬である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。遺伝子発現は、Affymetrix社のDNAチップを用いて解析した。DNAチップは、光化学反応を用いてガラス基盤上に直接オリゴDNAを固層合成することにより、高密度にプローブを配置したアレイを用いる方法である¹⁾。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、あらかじめ卵白アルブミン(OVA)投与による即時型アレルギー状態およびトリニトロクロルベンゼン(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。

B. 研究方法

1. *in vitro*アレルギーモデル系での検討

(1)試薬の調製： CNP(和光純薬)は、100mg/mLの濃度でDMSOに溶解し、P

IPES緩衝液(10mM PIPES(pH7.4), 0.14M NaCl, 5mM KCl, 0.1%BSA, 5.5mM glucose, 1.0mM CaCl₂, 0.6mM MgCl₂)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)遺伝子発現の測定：T-75フラスコ中、10%FCSを含むDMEM培地に 1×10^6 cells/mLの濃度で培養されたRBL-2H3細胞10mLに、DNP特異的マウスモノクローナルIgE抗体溶液50 μ 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、CNP 30 μ g/mLを加え、37 $^{\circ}$ Cで10分培養し、次いで抗原(DNP₇-BSA, 10 μ g/mL)を加え、刺激を開始した。刺激開始後、1、3時間後に細胞を回収し、PBSで2回洗浄後、TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies)により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(T7-(dT)24プライマー)(GENSET Corp)を用いて、SuperScript Choice systemにより逆転写し、二本鎖cDNAを得た。PCI処理によりこれを精製し、12 μ LのDEPC処理水に溶解した。12 μ Lのうち3.3 μ Lを用いてBioArray HighYield (ENZO)により37 $^{\circ}$ C、7時間の*in vitro*転写反応を行い、ピオチン標識されたcRNAを増幅した。RNeasy Mini (QIAGEN)によりRNAを精製し、吸光度により濃度を測定し、この段階でのRNAの純度としては、A260/A280の比が1.9~2.1程度であることを確認した。20 μ gのRNA(1~32 μ L)に5倍濃縮のRNA Fragmentation Buffer (1M Tris acetate(氷酢酸でpH8.1に調整)4.0mL, 0.64g MgOAc, 0.98g KOAc /D EPC処理水20mL)を8 μ L加え、DEPC処理水により全量を40 μ Lにして94 $^{\circ}$ C、

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、15 μ gのピオチン標識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 (RG-U34A)で、これはラットの既知遺伝子と機能既知ESTのすべて(8799種)が載っており、コントロール遺伝子および断片化したcRNAを60rpm、45 $^{\circ}$ C、16時間ハイブリダイズした。Affymetrix Fluidics Stationにより、アレイの染色および洗浄を行い、ピオチン標識cRNAをstreptoavidin-PE (SAPE)で染色、ピオチン標識抗アビジンIgGの結合、SAPEによる再染色という増感手法で、蛍光を増幅し、アレイスキャナ Gene Arrayにより、Ar⁺レーザ488nm単色光励起の共焦点系で、染色したRG-U34Aの蛍光画像を取得した。4733 \times 4733 pixelの16bitデータで、2回のスキャン画像を平均してノイズを低減した。解析には、Microarray Suite (Affymetrix)、GeneSpring (Silicon Genetics) およびMicrosoft Excelを用いた。スキャンした画像はSuiteにより自動的にグリッドがかけられ、個々のプローブセルの蛍光強度が読みとられるもので、統計処理の後、発現量を示すパラメータ (Signal) や、シグナルの信頼度 (Detection)、比較解析した場合はコントロールに対する発現比 (Fold Change) などのパラメータが、GenBankのIdentifierなどとともにマトリクスシート形で表示される。このデータを元に、GeneSpringおよびExcelによりさらに統計処理を加えた。具体的には、Studentのt検定 (n=3) により、有意 (p<0.05) な発現変化を示し

た遺伝子 (ESTを除く) を抽出した。

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

動物は、6週齢の雄BALB/cマウスを使用した。群構成および実験スケジュールをFig. 1に示した。あらかじめ2mg/mL 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、最終感作投与1週間目に採血して得た血清中の抗OVA抗体価を測定して、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。最終投与の2日後に10mg/mL OVAを0.2mL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、採血および脾臓と胸腺の摘出を行い、脾臓および胸腺重量を測定した。また、得られた血漿を用いて、ELISAによる血漿中総IgG1、IgG2a濃度 (BETHYL LABORATORIES, INC.) および総IgE濃度 (株) 森永生化学研究所)、抗OVA IgGおよびIgE抗体価 (吸光度表示、自家開発) の測定を行った。さらに、血漿中ロイコトリエンC4濃度 (NEOGEN CORPORATION) をそれぞれELISAキットを用いて測定した。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。

(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

動物は、6週齢の雄BALB/cマウスを使用した。群構成および実験スケジュールをFig. 1に示した。あらかじめ30mg/mL TNCB 100 μ Lを腹部に塗布し、その1週間後に左耳に10mg/mL TNCB、右耳に媒体であるアセトン：オリブ油 (4 : 1) 20 μ L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10mg/mL TNCB、右耳に媒体であるアセトン：オリブ油（4：1）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、採血および脾臓と胸腺の摘出を行い、脾臓および胸腺重量を測定した。また、得られた血漿を用いて、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。

C. 研究結果

1. *in vitro* アレルギーモデル系での検討

Fig.2に、RBL-2H3細胞を抗原刺激なしで、培養液(control)のみで1時間、3時間培養した時の8,799種のmRNAの発現プロフィールを示した。横軸には、1時間培養時のmRNA発現の蛍光強度をsignal値で、縦軸には、3時間培養時のmRNA発現量をsignal値で表した。対角線上に載っているプロットは、1時間および3時間の反応で、発現が同程度であることを意味し、対角線から左上にずれると、3時間での発現量が高く、対角線から、右下にずれると、発現量が1時間の方が高いことを意味する。GeneChipのアルゴリズムにより発現の信頼度をPresence, Marginal, Absenceの3段階で表しているが、発現量の多い遺伝子

(signal 1000以上を示し、Presenceの段階に属する遺伝子)のほとんどが、時間変化による発現量が安定しており、1、3時間でのmRNAの発現量の変動幅が、2~3倍以内に収まっていることが示された。Fig.3には、代表的な遺伝子の発現に及ぼすCNPの影響を示した。横軸は時間、縦軸は、signal値を表した。CNP単独の処理で、発現の上昇した遺伝子としては、ここに示した転写因子

の1つであるearly growth response gene (Egr-1, 別名krox24, NGF1-A)⁵⁾、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

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をTable 1に示した。ほとんどの測定項目において、control群の挙動が他の群と異なり、そのため、体重とIgG2a濃度、IgE濃度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、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

(1)と同様、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遅延型アレルギーマウスの免疫系への影響をTable 2に示した。(1)と同様に、ほとんどの測定項目において、control群の挙動が他の群と

異なり、そのため、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、体重は、MEP単独群に比べてCNP単独群で有意な高値を示した。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。

D. 考察

1. in vitroアレルギーモデル系での検討

平成13年度は、含窒素系農薬の中でジフェニル型農薬であるCNPが、RBL-2H3細胞から、後期炎症に関与すると考えられているサイトカインまたはケモカインであるTNF- α 、MCP-1^{2,3)}の産生を増加させることを報告した。CNPによるマスト細胞からの脱顆粒、並びにサイトカイン産生促進のメカニズムについては、不明であるが、ジフェニ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、これが膜構造の変化を起こし、脱顆粒を促進する可能性、また、サイトカイン産生を上昇させる転写因子の活性化を上昇させる可能性が考えられた⁴⁾。今年度は、TNF- α 、MCP-1の産生の顕著にみられた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⁵⁾、マスト細胞においても、刺激をうけて早い時間(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、平成13年度に示された蛋白質レベルでの発現量の増大は、転写レベルでの活性化を伴ったものであることが示唆された。平成15年度は、含窒素系農薬と有機リン系農薬の複合投与による影響を、脱顆粒、サイトカイン産生、遺伝子発現の3点から網羅的に解析を行いたいと考えている。

2. in vivoアレルギーモデル系での検討

平成13年度は、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、ヒツジ赤血球(SRBC)投与によるアレルギー状態および無投与の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/Nga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現れ、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⁶⁾。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、この変化は群間の動物のばらつきによるものと推測した。動物の例数が5匹であり、偶然偏りが生じたものと考えられる。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窒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と言った含窒素系農薬には、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。平成15年度には、*in vitro*の系での検討結果を踏まえて、感作動物の遺伝子発現の変化を合わせて検討し、*in vitro*と*in vivo*での反応性からより有効なアレルギーモデル系の構築を図りたい。

【参考文献】

- 1) Lockhart, D.J. et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 14, 1675-1680 (2000)
- 2) Teshima R., Onose J., Ikebuchi H. and Sawada J.: Ca^{2+} -ATPase inhibitors and PKC activation synergistically stimulate TNF- α production in RBL-2H3 cells. *Inflamm. Res.* 47, 328-333 (1998)
- 3) Teshima R., Onose J., Okunuki H. and Sawada J.: Effect of Ca^{2+} -ATPase inhibitors on MCP-1 release from bone marrow-derived mast cells and the involvement of p38 MAP kinase activation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121, 34-43 (2000)
- 4) Sato T., Taguchi M., Nagase H., Kito H. and Niikawa M.: Augmentation of allergic reaction by several pesticides. *Toxicol.* 126, 41-53 (1998)
- 5) McMahan S.B. and Monroe J.G.: The role of early growth response gene 1 (Egr-1) in regulation of the immune response. *J. Leukoc. Biol.* 60, 159-166

(1996)

6)小野宏他. 平成13年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)分担報告書「食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究」アレルギーモデル系を用いた化学物質の複合投与に関する研究(2002)

E. 結論

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。これらの結果を踏まえ、平成15年度には、*in vitro*の系での検討結果と、感作動物の遺伝子発現の変化を合わせて検討し、*in vitro*と*in vivo*での反応性からより有効なアレルギーモデル系の構築を図りたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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)

1) 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況
該当せず

Fig. 1 実験概要

<アレルギー状態>

即時型: OVAによる1型アレルギー
 遅延型: TNGBによる接触性皮膚炎

<農薬>

フェニトロチオン(MEP)
 クロロニトロフェン(CNP)
 ニトロフェン(NIP)

媒体: コーン油
 濃度: 10mg/mL

動物: BALB/c フラウス 6W、雄

群構成	アレルギー状態	投与物質(SC)	n
1群	即時型	コーン油	5
2群	即時型	MEP	5
3群	即時型	CNP	5
4群	即時型	NIP	5
5群	即時型	MEP-CNP	5
6群	即時型	MEP-NIP	5
7群	即時型	CNP-NIP	5
8群	遅延型	コーン油	5
9群	遅延型	MEP	5
10群	遅延型	CNP	5
11群	遅延型	NIP	5
12群	遅延型	MEP-CNP	5
13群	遅延型	MEP-NIP	5
14群	遅延型	CNP-NIP	5

解剖時測定項目

即時型アレルギー	遅延型アレルギー
脾臓 & 胸腺重量	脾臓 & 胸腺重量
血漿中抗OVA抗体価	MEST (耳の厚さ)
血漿中IgG1, IgG2a	血漿中IgG1, IgG2a, IgE
血漿中IgE	
血漿中LTc4	

実験日	w	アレルギー		TNGB	
		即時型	遅延型	即時型	遅延型
1	6	①		毛刈	
2				①	
3					
4					
5		②			
6					
7	7				
8				葦刈判定	
9		③			
10					①
11					
12					②
13					
14	8				③
15					
16		採血、抗体価測定			④
17					
18					
19					⑤
20					
21	9			葦刈	⑤
22				BW判定、解剖	
23					
24					④
25					
26					
27					⑤
28	10				
29		BW 葦刈、解剖 (葦刈後20分)			
30					
31					
32					
33					
34					
35					

Table 1 有機リン系農薬および含窒素系農薬の複合投与による免疫系に対する影響
(OVA感作によるI型アレルギーにおよぼす影響)

	BW (g)	脾臓 (g)	胸腺 (g)	IgG1 (μ g/mL)	IgG2a (μ g/mL)	Ratio (IgG1/IgG2a)	IgE (ng/mL)	抗OVA IgG1 (titer)	LTG4 (ng/mL)
1 コーン油 (Control)	mean 28.76 S.D. 0.32	0.099 0.003	0.031 0.007	1140.94 414.31	56.59 33.45	25.50 13.00	91.93 33.09	20667 11431	8.22 0.47
2 1.0% MEP	mean 28.65 S.D. 0.94	0.120 * 0.013	0.045 * 0.007	2406.00 ** 696.32	40.37 14.85	63.07 ** 19.74	37.28 * 4.55	56000 ** 21909	13.05 ** 3.28
3 1.0% NIP	mean 28.65 S.D. 0.90	0.112 * 0.009	0.043 * 0.005	3257.21 ** 704.38	42.39 31.43	103.35 ** 48.25	54.39 35.77	48000 * 17889	10.84 ** 1.14
4 1.0% GNP	mean 29.02 S.D. 0.51	0.114 * 0.009	0.044 * 0.003	2425.11 ** 371.38 #	39.45 47.09	132.10 * 99.53	60.56 ** 11.83 ##	56000 ** 21909	12.74 ** 1.90
5 1.0% MEP-NIP	mean 28.65 S.D. 1.09	0.117 ** 0.008	0.044 * 0.007	2057.48 * 519.57 #	38.22 16.20	66.18 42.43	77.80 31.56 #	64000 ** 21909	10.25 ** 0.87
6 1.0% MEP-GNP	mean 29.79 S.D. 1.16	0.123 ** 0.004	0.042 * 0.004	2509.49 ** 750.15	57.02 58.25	71.34 * 41.43	87.37 26.65 ##	72000 ** 17889	11.90 ** 1.39
7 1.0% NIP-GNP	mean 28.65 S.D. 1.59	0.122 * 0.012	0.041 0.015	2379.74 ** 411.56 #	22.67 8.78	120.74 ** 52.69	59.30 22.76	64000 ** 21909	12.15 ** 1.23

* P<0.05, ** P<0.01: significant from control
P<0.05, ## P<0.01: significant from MEP

Table 2 有機リン系農薬および含窒素系農薬の複合投与による免疫系に対する影響
(TNGB感作によるIV型アレルギーにおよぼす影響)

	BW (g)	脾臓 (g)	胸腺 (g)	IgG1 (μ g/ml)	IgG2a (μ g/ml)	Ratio (IgG1/IgG2a)	IgE (ng/ml)	MEST (pret.) (mm)	MEST (after t.) (mm)
1 コーソ油 (Control)	mean 25.25 S.D. 0.68	0.069 0.011	0.022 0.005	81.43 28.48	21.57 8.68	3.85 0.39	20.77 3.94	0.31 0.07	0.30 0.04
2 1.0% MEP	mean 27.12** S.D. 0.43	0.086* 0.010	0.039** 0.004	167.57* 32.94	59.74** 6.00	2.83* 0.63	24.53 10.41	0.28 0.04	0.28 0.05
3 1.0% NIP	mean 28.12** S.D. 1.12	0.098** 0.010	0.043** 0.004	382.08** 118.14##	84.66* 33.40	4.86# 1.68	21.82 6.89	0.27 0.03	0.29 0.08
4 1.0% GNP	mean 28.48** S.D. 0.65	0.097** 0.011	0.050** 0.006#	217.76 122.64	54.57* 16.33	3.88 1.20	23.55 6.77	0.27 0.05	0.22 0.07
5 1.0% MEP-NIP	mean 28.97** S.D. 1.84	0.107** 0.016#	0.051** 0.006\$	381.64* 157.15#	66.94 45.27	7.84 5.62	20.36 6.64	0.29 0.06	0.24 0.05
6 1.0% MEP-GNP	mean 27.67** S.D. 1.03	0.101** 0.008#	0.051** 0.005##	252.27* 108.87	127.16 167.50	3.67 1.93	18.95 5.04	0.29 0.04	0.25 0.03
7 1.0% NIP-GNP	mean 28.64** S.D. 0.70	0.103** 0.008	0.049** 0.005	413.11* 187.95	53.56* 15.44	8.25 5.10	22.53 4.65	0.31 0.03	0.24 0.05

* P<0.05, ** P<0.01: significant from control
P<0.05, ## P<0.01: significant from MEP
\$ P<0.05, \$\$ P<0.01: significant from NIP

Fig. 2. RBL-2H3細胞のmRNA発現プロファイル

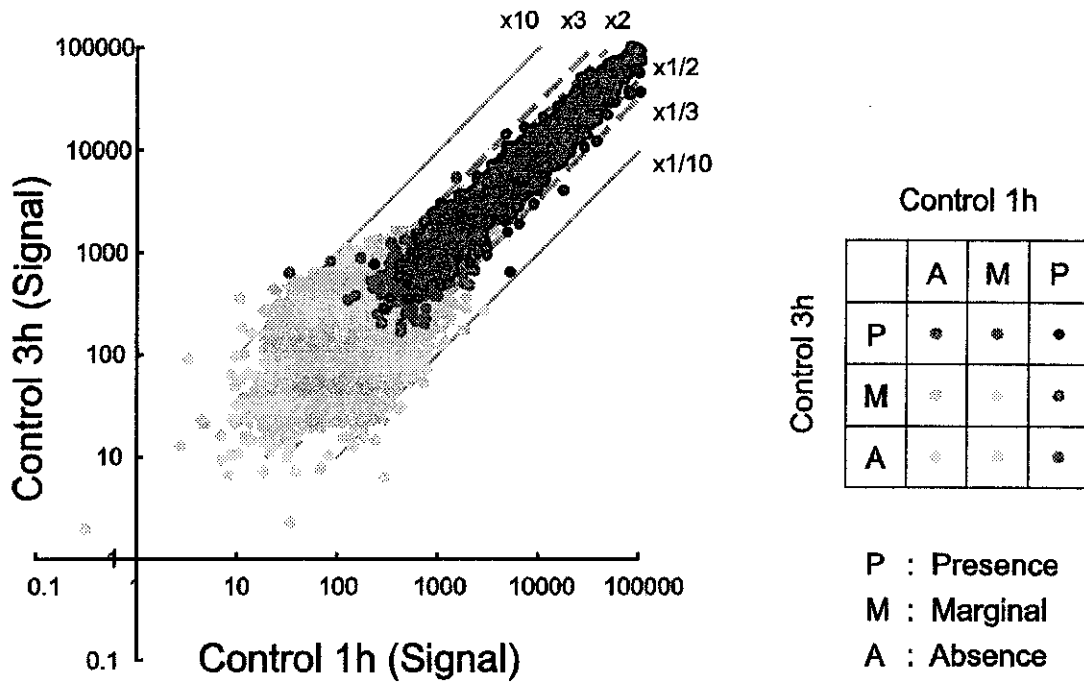
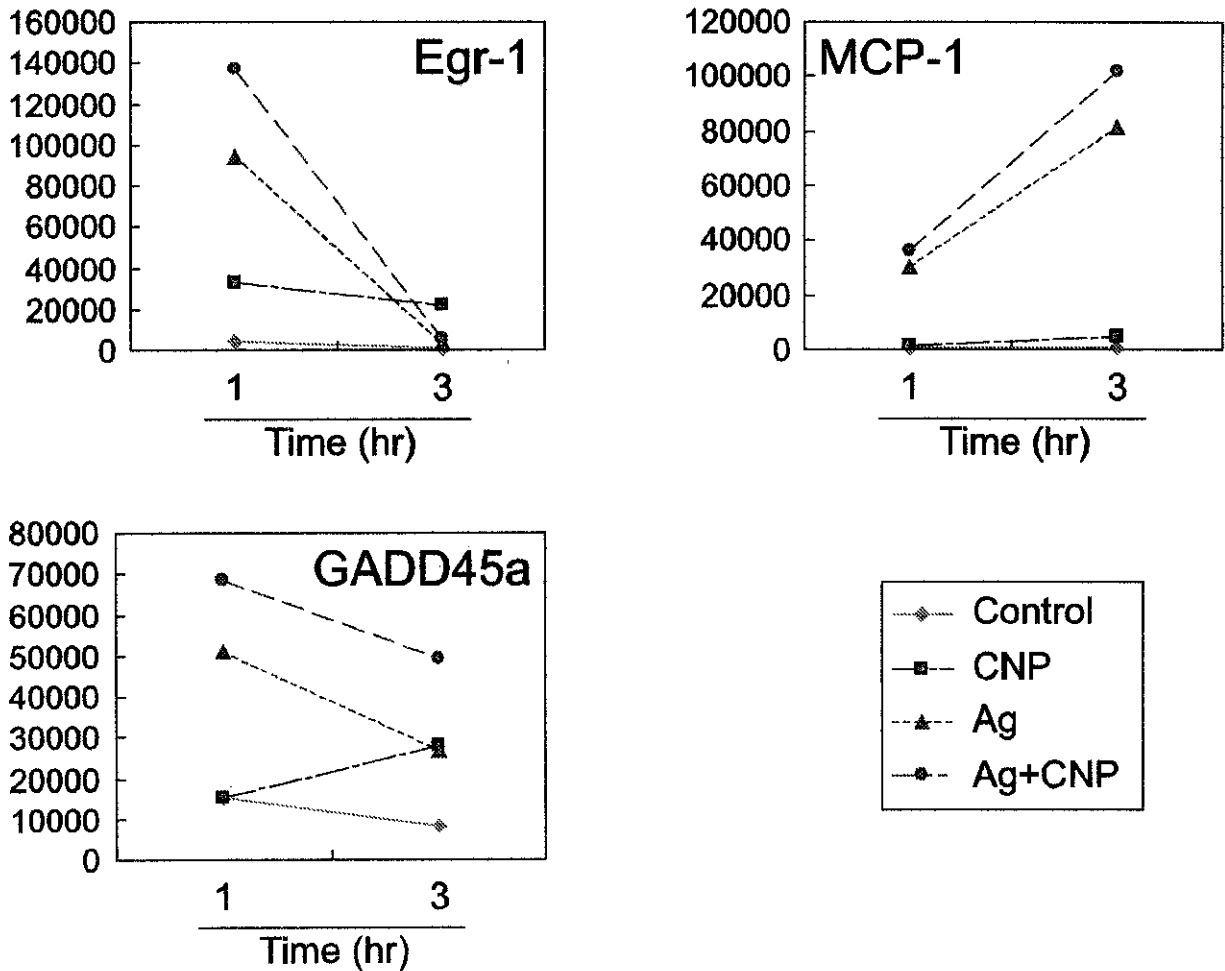


Fig. 3. 代表的な遺伝子の発現に及ぼすCNPの影響



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)
分担研究報告書

食品中化学物質の毒性発現に及ぼす諸要因に関する調査研究

分担研究者： 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部

協力研究者 山添 康 (東北大学薬学部) 杉山雄一 (東京大学薬学部)

紅林秀雄 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

研究要旨

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) の腎近位尿細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。

A. 研究目的

農薬等の相乗毒性については以前より懸念されてきたが、それらの間の組み合わせは膨大であり、一つ一つ検討することは不可能である。しかし、今までの経験から相互作用の多くが代謝酵素の誘導や阻害などによる薬物動態学的な相互作用に起因することが明らかになってきた。また、生活関連物質のなかにもグレープフルーツジュース成分のように医薬品の代謝を強く阻害する物があることが示されてきた。しかし、農薬や生活関連物質の相互作用予測に必要な薬物動態関連酵素の分子種レベルでの検討やヒト肝組織を用いた検討はほとんど行われておらず、この面からの相乗毒性の予測に関する研究も見当たらない。そこで本研究では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た。なお、昨年度までは酵素阻害について検討してきた。そこで、今年度からは引き続き農薬等生活関

連物質の代謝に関与する酵素分子種を明らかにしていくとともに、酵素誘導に関する検討を主に行う。

平成14年度においては 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すると共に、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の樹立する、および 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、ことを目的とする。

B. 研究方法

B-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、雄性 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、日本農産社を通じて XenoTech(米国) およびケーエーシー社を通じて 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°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。

B-2) ヒト型 CYP3A4 誘導検索系の開発

B-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 (pGLCYP3A4-362-7.7k) は CYP3A4 プロモーター領域(-362 から+11bp)をプライマー 5'-GCAAG CTTGC ACAGC AGTGA TTCAG TGAGG C-3' および 5'-GCCTC GAGGC GTGGA AACAC AATGG TGG-3' 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 pGL3-basic (Promega)の *Bgl* II、*Hind* III 切断部位に挿入後(pGLCYP3A4-362)、更に CYP3A4 エンハンサー領域(-7836 から-7208bp)をプライマー 5'-CGACG CGTCT AGAGA GATGG TTCAT TCC-3' および 5'-GCAGA TCTA ATGAT CTCGT CAACA GG-3' を用いて PCR により単離し、pGLCYP3A4-362 の *Bgl* II および *Mlu* I サイトに挿入し作成した。

B-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-fc 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。リン酸カルシウム法は、HepG2 を 6-well plate に 3.0×10^5 /well でまき、翌日 DNA 30 $\mu\text{g}/60\mu\text{l}/\text{well}$ に Buffer A $60\mu\text{l}/\text{well}$ を加え 10 分室温でインキュベート後、Buffer B を $120\mu\text{l}/\text{well}$ で混合し室温で 15 分インキュベートした溶液をプレートに加え、 37°C 、6 時間培養した。その後培地を除去し、15% Glycerol-HEPES 溶液を 3 ml/well 加え 3 分室温でインキュベート後、PBS で洗浄し、geneticin を $900\mu\text{g}/\text{ml}$

含む培地で培養した。その後形成されたコロニーを拾い、24-well plate にて個別に培養後、それぞれの活性を測定することによって CYP3A4-362-7.7k コンストラクトのレポーター活性を安定に発現するクローンを得た。

B-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。

B-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 $100\mu\text{l}$ で溶解し、サンプル $20\mu\text{l}$ に $35\mu\text{l}$ 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。

B-3) 農薬の腎排泄に関する研究

ラット腎臓から、厚さ 300 μm 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。

C. 研究結果

C-1) 農薬の代謝に関与する酵素に関する研究 (Fig. 1)

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 prometrynsulfoxide (PmSO)、および N-脱アルキル化された代謝物 deisopropylprometryn (De-Pm)、またグルタチオンが結合したと考えられる代謝物 (Pm-GS) 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、Pm 濃度 120-210 μ M で約 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、トランシプロミンやケトコナゾールで阻害された。

一方、凍結保存したヒト肝細胞を解凍して Pm と培養した場合、代謝物の生成速度は上記ラットの場合と比べて 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とが示唆された。Pm の脱アルキル化反応は CYP 1A の特異的阻害剤の α ナフトフラボンで阻害され、他の CYP で代謝されてできる PmSO が増加するメタボリックスイッチングが見られた。

C-2) ヒト型 CYP3A4 誘導検索系の開発 (Fig. 2, Table 1)

まず、レポーターコンストラクト：ネオマイシン耐性遺伝子の比率を 1 : 1 に混ぜた DNA サンプルを HepG2 細胞にリン酸カルシウム法によってトランスフェクトし、ゲネチシンをマーカーとした耐性コロニーのセレクションを行った。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。また、ゲネチシン耐性コロニーは多く得ることができたが、誘導剤を処置しない条件下ではルシフェラーゼ活性を示さないコロニーが大半であった。

次に、外来的発現プロモーターを用いない方法でルシフェラーゼ活性の強化を行うことを考え、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。すなわち、ゲネチシン耐性細胞あたりのレポーターコンストラクト数を増加させるために、コンストラクト：ネオマイシン耐性遺伝子の比率を 5 : 1 の割合でライゲーションを行った。この DNA サンプルを同様にして耐性コロニーのセレクションを行った。その結果、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。その結果やはり大半のコロニーは活性を示さなかったが、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。活性を示したこれらの細胞について更に培養を続け、前節と同様誘導剤 (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、表に示した 2-2-13 や 3-1-19 のクローンのようにリファンピシンに対してより強い応答を示したものの、3-1-20 など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 4-1-19 など二つの薬物に対して同程度の応答性を示したものの、更に両薬物ともに応答性を示さなかったものが見られた。また、薬物無処置の条件において高いルシフェラーゼ活性を示したコロニーが必ずしも薬物に対して高い誘導率を示すというわけではなく、薬物無処置でのルシフェラーゼ活性の値と薬物に対して示す誘導応答には相関関係が見られなかった。

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が 3-1-20 の細胞で、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 3-1-10 が最も強い誘導応答を示し、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。

C-3) 農薬の腎排泄に関する研究