



厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広瀬雅雄

平成 16 (2004) 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 広瀬雅雄	1
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 広瀬雅雄	22
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 白井智之	28
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 菅野 純	34
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 小野 宏	39
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 大野泰雄	44
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 佐々木久美子	49
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 吉池信男	56
III 研究成果の刊行に関する一覧表	62
IV 研究成果の刊行物・別冊	63

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

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は、ヘテロサイクリンクアミンであるIQの発がん性に対する肝、腎障害の及ぼす影響を検討するため、DEN及びDMHで処置した後、肝障害物質であるCC14あるいは腎障害物質である葉酸を隔週で間歇投与し、それらの休薬期間中に隔週でIQを混餌投与した。現在本実験開始36週目で、イニシエーション後にIQ+CC14を投与した死亡例3例にはすべて肝腫瘍が発生しており、CC14による肝障害はIQ肝発がんを促進する可能性が高い。実験2では、抗酸化酵素及び第2相酵素群の誘導因子であるnrf2の、IQ誘発肝発がんへの関与を調べる目的で、Nrf2 KOを用いた検討を行った。また、その発がんメカニズムを検討する目的で、酸化的ストレスによるDNA傷害の指標である8-OHdGを測定した。その結果、Nrf2(-/-)ではNrf2(+ /+)より発がん感受性が高かったが、これには、酸化ストレスではなく、解毒酵素の低下が関与していると考えられた。【白井】MeIQxを代謝活性化するCYP1A2誘導物質であるcaffeineをMeIQxと同時投与し、化学物質の相互作用を検討したところ、caffeineはMeIQx活性化酵素CYP1A2およびNAT2を誘導したものの、MeIQx発癌に対する明らかな作用は見いだされなかった。そこでその原因を検討すべく、網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果周囲肝細胞に特異的なp21の発現亢進とMeIQx投与によるCDK4発現亢進をcaffeineが抑制するという結果が得られ、caffeineのSdc2発現抑制を介した細胞増殖抑制作用により発がん増強が減弱されたものと考えられた。【菅野】酸化的ストレス誘導剤に対して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15年度は酸化的ストレス障害物質が引き起こす毒性機序をAffymetrix社 GeneChipシステムを用いてin vitroおよびin vivoで解析すると共に、複合曝露下に於いて相殺・相殺効果を呈する遺伝子候補の絞り込み手法の検討を行った。【小野】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、in vitroの系ではフタル酸シブチル (DBP) をとりあげ、ラットの培養マスト細胞の脱顆粒並びに遺伝子発現変化を遊離β-hexosaminidase 活性並びにDNAチップ技術を用いて解析した。その結果、非常に多くの転写因子や転写調節因子、ストレス応答遺伝子Gadd 45a、サイトカインであるTNF-αやIL-3の発現等が顕著に増加し、各種ヒストンの発現も増加した。

多くの遺伝子発現は、DBPと抗原との共存刺激により、相加的あるいは相乗的に増加した。中でも、転写因子Egr-1やJun-Dの相乗的な発現増加は顕著であった。in vivoの系では、フェントエート(PAP)、クロルニトロフェン(CNP)あるいはチオファネートメチル(TM)の単独吸入曝露、PAPとCNPとの併用曝露による免疫機能への影響を、BALB/cマウスを用いて検討した。脾臓細胞を用いたリンパ球幼若化反応では、mitogen無刺激時に対する増加率で比較すると、CNP、PAPの単独および併用曝露群の多くでmitogenであるPHAおよびLPS刺激に有意に強く反応した。in vitroの実験結果を手がかりに、in vivoで確認を行い、生体に影響するかどうかを調べて行くことは環境化学物質の安全性評価に重要である。【大野】Prometrynのヒトでの代謝が低濃度では主にCYP1A2により、高濃度では主にCYP3A4で行われると考えられた。また、複数のP450分子種で代謝を受けることからin vivoで代謝阻害に起因する相互作用を起こす可能性は少ないと考えられた。今までに確立したヒトの主要な薬物代謝酵素CYP3A4の誘導を測定する培養細胞システムを用いて各種農薬の酵素誘導能を検討し、IBPが強い誘導能を有する事を示した。【佐々木】超臨界流体抽出(SFE)法と溶媒抽出法を用い、15年度は、14年度に市販食品の残留農薬調査を行った試験溶液をGC/MS(SCAN)で再測定し、調査対象外の農薬及びその他の化学物質の検索を行った。その結果、ヘンゾフェノン、パラシクロロヘンセン、クレゾール及びリン酸トリブチルが肉類及び魚介類から高頻度で検出された。溶媒抽出法では国産魚介類の汚染調査を実施するとともに、動物性食品群についてマーケットバスケット方式による摂取量調査を行った。その結果、魚介類から微量のDDT類及びクロルデン類が検出される場合もあるが、動物性食品中の農薬の残留は、農作物に比べて、検出農薬数、検出濃度ともに、きわめて低レベルであった。【吉他】「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」では、食品の摂取重量のみではなく、調理形態や摂取の仕方も考慮する必要がある。そこで、本研究では、2001年11月実施の国民栄養調査データ(4224世帯、12481名分)については、調理加工形態別の出現頻度及び摂取量の割合を算出し、また2001年以降の国民栄養調査では、学校給食等の取り扱い方が変更されたことから、そのことが調理加工形態別の農作物の摂取量に及ぼす影響について試算を行った。さらに残留農薬等の暴露評価の対象となる個々の農作物に関して、国民栄養調査の新しい食品番号体系に基づいて摂取量を推計するための基礎データとして、加工食品等の原材料構成・使用量、調理加工の状況及び重量変化率等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ンクアミンであるIQ発がんおよび肝及び腎障害の影響を検討した。

[実験2] 臓器障害の一端として、抗酸化酵素、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の発がん実験を行った。

【白井】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、コーヒー等様々な飲料に含まれ、MeIQxを代謝活性化するCYP1A1/1A2を誘導するcaffeineとを同時投与したが、caffeineはMeIQx活性化酵素CYP1A2およびNAT2を誘導したものの、MeIQx発癌に対する明らかな作用は見いだされなかった。そこでその理由を解明すべく、どのような遺伝子変化が生じているかを詳細に検討した。

【菅野】本研究は、毒性評価に於いて使用されている安全係数に包含される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。

【小野】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、*in vitro*の系として食品中に混在し得る化学物質として、農薬に加えて、ゴム製品、プラスチックなどの可塑剤として用いられているフタル酸エステル（フタル酸シブチル、DBP）をとりあげ、抗原特異的IgEで感作されたラットの培

養マスト細胞の抗原刺激による脱顆粒並びに遺伝子発現変化を遊離β-hexosaminidase活性並びにDNAチップ技術（Affymetrix GeneChip）を用いて解析し、農薬並びにフタル酸エステルのマスト細胞への影響を評価した。また、*in vivo*の系としては、フェントエート（PAP）、クロロニトロフェン（CNP）あるいはチオファネートメチル（TM）の単独吸入曝露、PAPとCNPとの併用曝露による免疫機能への影響を、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、農薬の代謝や動態に関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ている。今年度は1) Pmの代謝物をLC-MSで明らかにし、代謝に関与するP450分子種について3社のP450発現系を用いて比較検討するとともに、それらの分子種の関与の程度を明らかにするための酵素力学的な検討を行った。2)今までに確立したCYP3A4酵素誘導評価系を用いて残留農薬の作用を検討した。3) 肝臓 腎臓ならびに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、種差の検討を行い、ヒトと比較した。また、2,4-Dの近位尿細管の尿細管分泌の*in vitro*モデルとしてRSTとOat3との共遺伝子発現系を構築することを試みた。

【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

例を報告したが、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。

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、国立医薬品食品衛生研究所において超臨界流体抽出（SFE Supercritical fluid extraction）法を、兵庫県立健康環境科学研究所において溶媒抽出法をそれぞれ開発した。平成14年度は、分析法の適用食品の拡大について検討するとともに、確立した分析法を用いて市販食品の残留農薬調査を行った。15年度は、SFE法では、14年度に市販食品の残留農薬調査を行った試験溶液をGC/MS(SCAN)で再測定し、市販の保持時間データベース及びマススペクトルライブラリーによる検索を行い、調査対象外の農薬及びその他の化学物質の検索を行った。溶媒抽出法では国産魚介類の汚染調査を実施するとともに、動物性食品群についてマーケットハスケルト方式による摂取量調査を行った。

【吉他】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暴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] 予備実験としてF344系雄ラット36匹を6群に分け、(1群) CCl<sub>4</sub> 2ml/kg週2回、隔週で2×4回強制経口投与、(2群) CCl<sub>4</sub> 1ml/kg週2回、隔週で2×4回強制経口投与、(3群) CCl<sub>4</sub> 2ml/kg週2回2週連続で強制経口投与した後、2週間休薬することの2回繰返し、(4群) CCl<sub>4</sub>を1mL/kg体重の用量にて週2回2週連続で強制経口投与した後、2週間休薬することの2回繰返し、(5群) 葉酸 (FA) 200mg/kg週1回、隔週で4回皮下投与、(6群) FA 200mg/kg週1回2週連続で皮下投与した後、2週間休薬することの2回繰返しを行った。最終投与週及び最終休薬週にて各3匹の動物をエーテル麻酔下にて屠殺剖検し、肝あるいは腎を摘出して重量を測定するとともに、病理組織学的に検索した。本実験では、F344系雄ラット120匹にDEN(200mg/kg 体重)を単回腹腔内投与し、その3日後からDMH(40mg/kg 体重)を2週間に4回皮下投与した。その後、ラットを6群に分け、CCl<sub>4</sub>を1ml/kg週2回強制経口投与、あるいはFA200mg/kg週1回皮下投与する処置を隔週で行い、さらにCCl<sub>4</sub>あるいはFAの休薬期間中に

隔週でIQを300ppm濃度で混餌投与した。現在実験開始36週目で、40週まで投与を継続 (CCl<sub>4</sub>/FA及びIQの投与を19回繰返し) した後、全動物をエーテル麻酔下にて開腹、大動脈より採血して、肝、腎障害の状況を血清生化学検査(AIT, AsT, BUN)にて確認し、動物を剖検し、肝、腎、肺、小腸及び大腸を摘出して病理組織学的に検索する。【実験2】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】中期肝発がん性試験法に従いDEN投与後、1群にはMeIQx (0.01%、混餌)、2群にはMeIQxとcaffeine (0.1%、飲水)、3群にはcaffeineを6週間投与した。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。得られた肝臓を用い、肝の前癌病変であるGST-P陽性細胞巢の発生を免疫組織学的手法により解析した。GST-P陽性細胞巢の発生については画像解析装置を用いて定量的に計測した。また、GST-P陽性細胞巢あるいはその周囲肝細胞をレーザーマイクロダイゼクション法にて選択的に組織を採取し、RNAを抽出して遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析には肝発がんへの関与が示唆される126遺伝子についてオリンパスPAMマイクロアレイシステム (オリンパス) を用い、さらに詳細な検討には定量的PCRを行った。【菅野】平成14年度までの成果で、酸化ストレスによる毒性のような、新たな遺伝子発現を介さない毒物においても二次的な遺伝子発現誘導を観察す

ることで毒性評価可能であることが示唆され、また複合曝露時の毒性機序を遺伝子発現データで予測出来る可能性が示唆されていたため、本年度は主に *in silico*での解析と基本アルゴリズムの開発を進めた。

酸化ストレスに関しては、BALB/3T3細胞におけるパラコート曝露実験の遺伝子発現データのみならず、C57B1/6 12週齢・雄にパラコートを強制経口投与し用量 経時的にサンプリングした肝 肺での遺伝子発現データの分譲を得て、毒性機序の分子レベルでの比較解析を行った。

複合曝露時の毒性誘導現象である相乗 相殺効果については、遺伝子発現レベルにおける評価アルゴリズムで既知のものが存在しないため、平成14年度に得られたデータをモデルとし、評価アルゴリズム新規構築に向けた基礎的検討を行った。

遺伝子発現データは独自に開発した遺伝子発現量の絶対量化手法により標準化し、SiliconGenetics 社 GeneSpringおよび独自開発のソフトウェア (MFツール群) にて解析を行った。

【小野】1 *In vitro* アレルギーモデル系での検討

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の各ウェルに、DMEM 培地に RBL-2H3 細胞を加え、37°Cで 16 時間培養した。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。刺激開始後、35

分後に上清を分取し、上清中に放出された  $\beta$ -hexosaminidase 活性を、基質を用いて比色法にて測定し、脱顆粒の程度の指標とした。

(3) 遺伝子発現の測定 RBL-2H3 細胞に、ニトロフェノール (DNP) 特異的マウスモノクローナル IgE 抗体溶液を加え、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、DBP50 $\mu$ M を加え、37 °C で 10 分培養し、次いで抗原 (DNP7-BSA、10 $\mu$ g/mL) を加え、刺激を開始した。刺激開始後、1 時間および 3 時間後に細胞を回収し、PBS で洗浄後、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) を用いて、SuperScript Choice system により逆転写し、二本鎖 cDNA を得た。これを精製し、DEPC 処理水に溶解した。BioArray HighYield により *in vitro* 転写反応を行い、ヒオチン標識された cRNA を増幅した。RNeasy Mini により RNA を精製し、吸光度により濃度を測定した。20 $\mu$ g の RNA (1~32 $\mu$ L) に 5 倍濃縮 RNA Fragmentation Buffer を 8 $\mu$ L 加え、DEPC 処理水により全量を 40 $\mu$ L にして 94°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。15 $\mu$ g のヒオチン標識 cRNA を用いてハイブリダイゼーションを行った。アレイは Rat Genome U34A を用いて、コントロール遺伝子および断片化した cRNA を 60rpm、45°C、16 時間ハイブリダイズした。ヒオチン標識 cRNA を streptoavidin-PE (SAPE) で染色、ヒオチン標識抗アピシン 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 GeneArray により 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

動物は、6週齢の雄性BALB/cマウスを使用した。各種農薬を1回1時間、週3回、計10回吸入曝露した。最終曝露の2日後に採血および脾臓、胸腺および肺（高濃度曝露群のみ）の摘出を行い、脾臓、胸腺および肺重量を測定した。各群5~6匹について脾臓細胞を単離し、リンパ球の増殖活性をBrdU assayで測定した（実験1）。また、各農薬の高用量曝露群の各5~6匹について、あらかじめヒツシ赤血球浮遊液（SRBC）を静脈内投与した4日後に脾臓細胞を単離し、プラーク形成試験（PFC assay）を行った（実験2）。さらに、得られた血清を用いて、ELISAによる血清中総IgM濃度を測定した。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。本試験は、法令に基づいて定めた所内動物取り扱い規定に従い、動物愛護の精神を遵守して行った。

### 【大野】1) 農薬の代謝に関与する酵素に関する研究

各種濃度の基質PmをNADPH存在下のヒト肝ミクロソームおよびCYP発現系P450ミクロソーム等のリン酸緩衝液（pH 7.4）中37℃でインキュベートした。肝細胞は $3 \times 10^6$  cells/mLの濃度でHEPES緩衝Krebs液中37℃でインキュベートした。代謝物は逆相系カラムInertsil ODS-3（15cm x  $\phi$  4.6mm）を用いたHPLC（LC-10A）で分離し、UV検出器およびMassで代謝物を検出した。また、各種阻害剤を用いてPm代謝に関与するP450分子種を推定した。

## 2) ヒト型CYP3A4誘導検索系の開発

前年度までに構築したアデノウイルスCYP3A4レポーターヘクターを腸管の

誘導を予測する培養細胞として大腸ガン由来のLS147T細胞と肝臓におけるCYP3A4誘導が予測可能なHepG2細胞に導入し、CYP3A4誘導の評価を行った。さらにこのレポーター遺伝子ヘクターをヒト由来の肝細胞であるHepG2の染色体に組み込み、恒常的にCYP3A4誘導の評価が可能な培養細胞系を開発した。本年度はこの系を用いて5種の農薬（Pm、Alanycarb、Ethiofencarb、Ametryn、IBP）によるCYP3A4誘導評価を行った。方法の詳細は前年度までの報告に記載した。

## 3) 農薬の腎排泄に関する研究

サル腎臓から、RT-PCR法によりOAT1とOAT3cDNAのクローニングを行った。HEK293細胞を用いて、遺伝子発現系を構築した。ディノシュに撒種し、定法に従い輸送実験を行った。また、マウスRSTとラットOat3を発現させたLLC-PK1細胞に導入した。多孔性フィルター上にて、細胞を培養し、経細胞輸送実験をおこなった。

（倫理面への配慮）

動物実験及び市販のヒト組織を用いた研究に関しては国立衛研および協力機関の研究倫理委員会の承認をうけて、或いは承認を受ける必要の無い研究であるとの了解のもとで実施した。

【佐々木】SFE法では肉類（筋肉）22検体、肉類（内臓）18検体、魚介類（筋肉）28検体及び魚介類（内臓）10検体の合計78検体について実態調査を行った。試料は、いずれも東京都内の小売店で購入したものをを用いた。溶媒抽出法の試料は、魚介類中の残留実態調査では、淡路及び坊勢で採取されたも

のを使用した。また、動物性食品群における摂取量調査では、平成12年国民栄養調査結果の地域ブロック別食品群別摂取量に基づき、マーケットバスケット方式により兵庫県で購入調理して作製した試料〔魚介類(X群)、肉卵類(XⅠ群)、乳類(XⅡ群)、各4検体〕について分析した。各群3検体は平成14年度に、1検体は平成15年度に作製したものである。

【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ヘースの構築 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ヘース化 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ヘース化を継続実施した。

## C 研究結果

【広瀬】〔実験1〕予備実験の病理組織学的検索において、CC14投与後休薬期間なしで剖検した群では、肝臓において、小葉中心性肝細胞肥大及び空胞化が観察されたが、投与間隔あるいは投与用量による明らかな違いは認められなかった。休薬期間後に剖検した群では、CC14投与による肝臓の変化は明らかな回復傾向を示した。FA投与後休薬期間なしで剖検した群では、腎臓の皮質から髓質にかけて慢性に尿細管及び集合管の拡張がみられ、さらに軽度ながら尿細管上皮壊死、再生尿細管

及び巣状細胞浸潤が認められた。投与間隔あるいは投与用量による明らかな違いは認められなかった。休薬期間後に剖検した群では、FA投与による腎臓の変化は明らかな回復傾向を示した。本実験ではDEN+DMH処置後、IQ及びCCI4を投与した2群において、実験開始13週目以降に20例中3例が途中死亡し、IQのみを投与した1群において、13週目以降に20例中3例が途中死亡した。13週目以降における2群の死亡動物の肝臓及び腎臓の病理組織学的検索を実施した結果、肝臓においては肝細胞腺腫、肝細胞がん、肝細胞空胞化及び軽度の線維化が観察され、腎臓では軽度の巣状尿管上皮空胞化が認められた。

【実験2】病理組織学的検索結果、肝細胞腺腫及び肝細胞癌の合計で評価すると、腫瘍発生率及び1個体当たりの腫瘍発生数は、Nrf(+/-)及びNrf(-/-)ではIQ投与群はIQ非投与群に比べて有意な高値を示した。IQ投与群間で比較すると、雄Nrf(-/-)の1個体当たりの腫瘍発生数及び雌Nrf(-/-)の腫瘍発生率はNrf(+/-)のそれぞれの値に比べていずれも有意に高い値を示した( $p < 0.05$ )。他臓器では、雌雄とも前胃で、扁平上皮細胞過形成の発生率が雄Nrf2(+/-)を除いた各遺伝子型においてIQ投与群ではIQ非投与群に比べて有意に高かった。特に、雄ではIQ投与群間においてNrf2(+/-)及びNrf2(-/-)の発生率はNrf2(+/-)の発生率に比べて有意な高値を示した。他に、肺、肝臓、脾臓、造血系組織(白血病/悪性リンパ腫)、腎臓、包皮腺及び皮下組織において種々の所見がみられたが、その

発生率に群間での差はなかった。

肝臓における8-OHdG形成量は、雌雄とも、1週及び4週いずれのサンプルにおいてもほぼ同様な値を示し、群間での有意差は認められなかった。

【白井】GST-P陽性細胞巣あるいはその周囲肝細胞における遺伝子発現解析においてCYP1A2およびNAT2の発現亢進がcaffeine投与の周囲肝細胞に認められた。そこで、周囲肝組織での変化をマイクロアレイを用いて検索したところ27の遺伝子で変化が認められた。これらの遺伝子のうちSyndecan2 (Sdc2)はcell cycleを介した増殖に関与することが報告されており、さらにcell cycleに関与する遺伝子発現を検討したところ、MeIQxとcaffeineを同時投与したときの周囲肝細胞特異的なp21の発現亢進とMeIQx投与によるCDK4発現亢進をcaffeineが抑制するという結果が得られた。

【菅野】酸化ストレス毒性物質であるパラコートは、エネルギー代謝回路毒である2-デオキシグルコース(2-DG)やシアン化ナトリウム(NaCN)と比へ激烈な毒性反応を呈するが、*in vitro*において、曝露後3, 6, 12hrでの遺伝子発現誘導ではDNA修復や細胞周期、および細胞死関連分子など酸化ストレスに特徴的とされる主要分子で有意な変化を示したのはAtmのみで他はほとんどなかった。*in vivo*においては、パラコートの主要標的とされる肺臓と、一般的な体内酸素分圧環境にある肝臓とでは、遺伝子発現誘導までの経過時間に差異が観察された。すなわち、いずれの臓器でもGst関連分

子やTxn関連分子、Hsp等のストレス応答分子が発現していたが、それらの誘導は肺臓では曝露後2hr、肝臓では8hrを中心にしていた。また特に抗酸化ストレス分子の補充的二次誘導は一般的に複数回の観測時点で捉えられることがなく、急峻な一峰性の誘導反応であるが示唆された。次に、平成14年度までに細胞死の相殺効果が確認されている2-DGおよびNaCNの複合曝露モデルにおいて詳細な解析を進めたところ、本モデル系では単剤曝露効果の単純加算では説明の出来ない相乗相殺効果の要因が、最終的な細胞死誘導段階にあることが示唆された。すなわち解糖毒の2-DGおよびミトコントリア毒のNaCNそれぞれの単剤曝露において、それぞれの作用標的とその関連分子への影響パターンが全く異なり、複合曝露時の該当分子の遺伝子発現パターンは単剤曝露の相加で説明の付くものが多かった。一方、2-DGおよびNaCNの最終毒性作用である細胞死、特にアポトーシスにおいては、共通の誘導抑制分子を利用していることが多く、複合曝露時の遺伝子発現パターンには単剤曝露の加算では説明の付かないものが複数見いだされた。

#### 【小野】1 In vitroアレルギーモデル系での検討

(1) DBPによるRBL-2H3細胞の遺伝子発現への影響 1時間後の時点では発現変化した遺伝子の総数は346種、3時間後では501種であった。転写因子であるEgr-1やGadd153、ケモカインの一種MCP-1等の発現増加が顕著であった。発現変化が3倍以上でかつ発現シグナルが少なくとも1回は1000以上で、ESTで

ないものについては非常に多くの転写因子や転写調節因子の発現が増加していることが分かった。また、ストレス応答遺伝子Gadd45aの発現も顕著に増加した。他に、サイトカインであるTNF- $\alpha$ やIL-3の発現も顕著に増加した。また、各種ヒストンの発現も増加した。多くの遺伝子発現は、DBPと抗原とによる共存刺激により、相加的あるいは相乗的に発現が増加した。中でも、転写因子Egr-1やJun-Dの相乗的な発現増加は顕著であった。

(2) 農薬類によるRBL-2H3細胞からの脱顆粒への影響 各種濃度(0.01~100 $\mu$ g/mL)のTMによるRBL-2H3細胞からの脱顆粒( $\beta$ -hexosaminidaseの遊離)については、抗原刺激(Ag<sup>+</sup>)による脱顆粒反応への有意な影響は観察されなかった。含窒素系農薬CNP(10~30 $\mu$ g/mL)、有機リン系農薬PAP(100 $\mu$ g/ml)のそれぞれ単独での抗原刺激による脱顆粒反応は、単独効果では、CNPによる増強効果が観察されたが、PAPによる増強効果はみられなかった。CNPとPAPの併用では、CNP単独による増強効果が相殺される結果が得られた。

#### 2 In vivo アレルギーモデル系での検討

PAPとCNPの単独および併用曝露による影響および含硫系農薬TMの免疫系に対する影響では脾臓重量、胸腺重量に吸入曝露の影響は認められなかった。血清中総IgM濃度にも変化は認められなかった。脾臓細胞を用いたリンパ球幼若化反応(BrdU assay)では、細胞のみの培養により、CNP-PAP併用曝露群で有意に低値を示した。Tリンパ球特異的mitogenであるPHA刺激により、CNP、PAPの単独および併用曝露群の多くで、有意な高値を示した。Bリンパ球特異的mitogenであるLPS刺激によりCNP-PAP併用曝露群の低濃

度群が、有意な高値を示した。Mitogen無刺激時に対する増加率で比較すると、CNP、PAPの単独および併用曝露群の多くでPHAおよびLPS刺激に有意に強く反応していることが示された。一方、TM曝露群では、いずれの刺激に対しても有意な変化は認められなかった。SRBCを前投与した動物を用いた実験2では、解剖時体重、脾臓重量および血清中総IgM濃度に変化は認められなかった。PFC assayでは、TM曝露群が有意な低値を示した。

【大野】1) 農薬の代謝に関与する酵素に関する研究 ヒト肝ミクロソームは、NADPH存在下において Pmを代謝し、代謝物をLC-MSで分析したところ、S原子が酸化された主代謝物 prometryn-sulfoxide (PmSO)、次にN-脱アルキル化された代謝物 deisopropylprometryn (D-Pm)、アルキル基が水酸化された代謝物 1-hydroxyisopropylprometryn (M1-Pm) は昨年度同様に majorな代謝物として検出された。一方、P450分子種の発現系での代謝は cytochrome b5の存在や脂質環境等によって変わることから、確認のため、今年度は yeast、Baculovirusおよび E coliで発現させた各種P450分子種で代謝の検討を行った。その結果、CYP2C19による代謝が yeastおよび E coliの両発現系において著明に認められた。なお、Baculovirusの系では上記CYPの他3A4でも高い代謝活性が得られた。そこで、ヒトミクロソームを用いた阻害実験を行い、2C19阻害剤 tranilcypromine(10、60 $\mu$ M)及び ticlopidine (20、60 $\mu$ M)の影響を検討したところ、前者では10 $\mu$ Mで約20%、60 $\mu$ Mで約40%の代謝阻害が認

められた。後者では60 $\mu$ Mで約20%の阻害が認められた。

2) ヒト型CYP3A4誘導検索系の開発 LS174TおよびHepG2細胞における典型的なシコホールのCYP3A4誘導について、アデノウイルスCYP3A4レポーターヘクターを用い検討した。その結果、肝臓型の誘導を示すHepG2においてシコホールでは10 $\mu$ Mの処置濃度で約4倍のCYP3A4誘導が認められた。しかしながら腸管型の誘導を示すLS174T細胞においては同用量でCYP3A4誘導は認められなかったが、100 $\mu$ Mでは6倍もの誘導が認められた。次ぎに恒常的にCYP3A4誘導の評価が可能な培養細胞系を用いて、5種の農薬のCYP3A4誘導について検討した。また当研究室ではリファンピシンとクロトリマゾールを添加した時の誘導応答の程度と応答が異なる2種の細胞株(3-1-10および3-1-20)を樹立している。本実験ではこの2種の樹立株の間で誘導が異なるかも合わせて検討した。各農薬をこれらの細胞株に10 $\mu$ M処置したところ、いずれの農薬においても誘導が認められた。特にIBPが3-1-20において約7倍もの誘導を示した。また、Pmが約3倍の誘導を示したが、残りのものについては、1.2から2倍程度の弱い誘導が認められた。一方、3-1-10においてもIBPが強い誘導を示し、また他の農薬についても誘導の傾向は、3-1-20と同様であった。

3) 農薬の腎排泄に関する研究 単離したサルOAT1とヒト、ラットOAT1との相同性はアミノ酸レヘルでそれぞれ97、88%であった。サルOAT3とヒト、ラットOAT3との相同性はアミノ酸レヘルで

それぞれ96、79%であった。サルOAT1の機能解析を行ったところ、2,4-Dの輸送活性がもっとも高く、ついで*p*-aminohippurate, hippurateといった有機アニオンが続く。一方、サルOAT3では、estrone sulfateの輸送活性がもっとも高く、他の有機アニオンについてはindolacetateを除いて、押しなべて同程度の輸送活性が検出された。

【佐々木】SFE法では定量分析の結果、肉類及び魚介類のほとんどすべての試料からbenzophenone, tributyl phosphate, *p*-dichlorobenzene及びcresol類が検出された。また、ethoxyquinが肉類の筋肉及び内臓からそれぞれ1検体、魚介類の筋肉4検体から検出された。そのほか、chlormefosが肉類及び魚介類の筋肉からそれぞれ1検体、furathiocarb及びcycloateが肉類及び魚介類の内臓からそれぞれ1検体、9,10-anthraquinone, methyldymron及びthionazinが魚介類の筋肉からそれぞれ1検体検出された。筋肉ではbenzophenoneの濃度が最も高く中央値が197 ppbであり、次に濃度が高かったcresol類と比較して中央値で5倍以上濃度が高かった。内臓でもbenzophenoneとcresol類の濃度が高かった。また、全般的に筋肉よりも内臓の方が濃度が高かった。魚介類でも。肉類の場合と同様にbenzophenoneの濃度が最も高く中央値が176 ppbであり、cresol類と比較して中央値で約10倍濃度が高かった。このほかには、ethoxyquinが魚介類の筋肉4検体から検出されたが、その内訳はキングサーモン、アトランティックサーモン、ギンザケ及びブリであり、

サケ類からの検出頻度が高かった。溶媒抽出法ではスズキ1検体から、低濃度のDDT類及びクロルデン類を検出した。そのほかの4検体に*p, p'*-DDEの痕跡が認められた。マススペクトルライブラリーによる検索では国内規制のあるものとして85化合物、国内規制はないが有害性物質と思われるものとして170化合物が検索された。高頻度に検出された化学物質としてはフタル酸エステル類があるが、これらは食品の汚染以外に分析操作での混入も考えられる。

平成12年国民栄養調査結果の地域プロダクト別食品群別摂取量に基づき、マーケットバスケット方式により兵庫県で購入調理して作製した試料〔魚介類(X群)、肉卵類(XI群)、乳類(XII群)、各4検体〕について分析した。試料の詳細を表2に示したが、各群3検体は平成14年度に、1検体は平成15年度に作製したものである。X群4検体、XI群1検体に*p, p'*-DDEをはじめとするDDT類の痕跡を認めたのみで、一日摂取量に換算しても、total DDTとして0.5 µg未満、その他の農薬については0.1 µg未満と推定された。【吉他】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ト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へス化 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、データへス化した

#### D 考察

【広瀬】〔実験1〕予備実験により、肝腎障害を発生させるCC14とFAの投与条件を設定した。本実験において、DEN+DMH処置後、IQとCC14を投与した群において、実験開始13週以降20例中3例が途中死亡し、肝臓及び腎臓の病理組織学的検索を実施した結果、肝臓においては既に肝細胞腺腫、肝細胞がんの他、肝細胞空胞化及び軽度の線維化が観察され、腎臓では巣状の尿細管上皮空胞化が認められた。従って、1群20例中3例の死亡例の結果をみる限りにおいては、CC14を1ml/kg体重にて1週間間隔で投与することにより、所期の慢性肝障害が誘発され、肝発がんが促進されている可能性が示唆された。現在本実験開始36週目で、40週まで継続した後剖検し、各臓器における腫瘍性病変発生頻度及び発生数を比較検討する。〔実験2〕IQ肝発がん作用に抗酸化酵素及び第2相酵素群の誘導因子であるnrf2が関与しているかを調べる目的でNrf2ノックアウトマウスを用

いて検討を行った。また、その発がんメカニズムを検討する目的で、酸化ストレスマーカーである8-OHdG形成量を測定した。その結果、雌雄ともIQ投与によりNrf(-/-)ではNrf(+/-)に比べて肝発がんの著明な増加が認められた。ただ、その肝発がん増強作用は8-OHdG形成量とは関連性の無いものであった。Nrf2ノックアウトマウスは酸化ストレスに対して非常に高感受性のマウスと考えられているが、今回の実験結果からはIQ投与によるNrf(-/-)群における8-OHdG形成量の著明な上昇は認められなかった。今回の結果と同様に、IQ投与後のBig Blueラットの肝臓では、濃度依存的DNAアダクト形成及びDNA鎖切断は見られたが、酸化ストレスのマーカー類の値には変化がなかったことが報告されている。従って、IQ肝発がん性に酸化ストレスの関与は低く、第2相酵素の低下が関与している可能性が示唆された。また、第2相酵素が低下する様な病的状態では、IQによる肝発がんに対する感受性が高くなることも示唆された。

【白井】MeIQxの発がんへの同時投与物質による修飾作用は、単に代謝活性化酵素の誘導のみでは説明できない。そこでそのメカニズムの解明を3D-マイクロアレイを用い、レーザーマイクロダイゼクション法による選択的組織採材によって詳細な検討を行ったところ、Sdc2という遺伝子が得られた。Sdc2は大腸癌でがん細胞の接着およびcell cycleを介した増殖に関与することが報告されており、本実験においてはMeIQxによるSdc2発現上昇をcaffeine

が抑制するという結果であった。そこで cell cycle に関与する遺伝子発現を検討したところ、MeIQx と caffeine を同時投与したときの周囲肝細胞特異的な p21 の発現亢進と MeIQx 投与による CDK4 発現亢進を caffeine が抑制するという結果が得られた。これらの結果により、CYP1A2 により代謝活性化された MeIQx による発がん性亢進が caffeine の Sdc2 発現抑制を介した細胞増殖抑制作用により減弱されたものと考えられ、CYP1A2 誘導物質である caffeine が MeIQx 発がんに対する明らかな作用を示さなかった一序であると考えた。さらに、肝発がんには前がん病変部位のみでなくその周囲肝細胞の遺伝子発現変化も重要であることが示唆された。

【菅野】パラコートによる毒性分子機序の *in vitro*, *in vivo* 比較では、両者の差異を改めて認識するに至り、将来、生体における毒性評価を *in vitro* データから予測するためには、かなりの規模の比較データヘースを構築する必要があるだろう。

さらに肺臓と肝臓では、特に抗酸化ストレス分子の遺伝子発現パターンにおいて、それらの細胞系譜差以上の差異があることは、細胞臓器がおかれている酸化還元状態等の環境因子を加味する必要を示唆している。すなわち、今回観察された肺臓と肝臓では、抗酸化ストレス分子の分子シグナルカスケードには根本的な差異は無いと考えられた。そのため、抗酸化ストレス分子の発現時点のズレは各臓器での酸化還元状態を反映したものであると考察され、このことから、諸臓器の反応の

総体として把握し得ると想定される個体レベルでの最終的な毒性予測自体は少数の代表臓器での測定評価で賄える可能性が高い。また複合曝露モデルの解析により、単独曝露時の遺伝子発現パターンデータヘースによって複合毒性予測の実現可能性が高まった。すなわち、同じ分子シグナルカスケードを介する複数の毒性物質が複合的に作用する場合、程度の差こそあれ、毒性の相乗・相殺効果が生じ得ること、逆に分子シグナルカスケードレベルで全く重複のない毒性物質同士が複合的に作用しても、相乗・相殺効果を呈する可能性は低いこと、が示唆され、単独曝露時の情報だけでも高度な予測が可能であり、個々の複合曝露の組み合わせを評価してゆくよりも効率が良く現実的と考えられる。

【小野】1 *In vitro* アレルギーモデル系での検討 我々は以前に、環境汚染物質である DBP がマスト細胞に作用して細胞内カルシウム応答を惹起し、脱顆粒を誘導することを報告した。このことは DBP が遺伝子発現を介さずに直接的にマスト細胞の活性化を促す可能性があることを示している。今回の結果は、DBP が遺伝子発現レベルにも作用し、様々な転写因子の発現を介してマスト細胞の活性化に影響を及ぼしている可能性を示唆した。DBP は少なくとも 7 種の転写因子・転写調節因子の遺伝子発現を増加させたが、特に転写因子 Egr-1 は他の細胞系において TNF- $\alpha$  の転写調節に関与しているという報告があり、本実験においても TNF- $\alpha$  は有意な発現増加を示したことから非常に興味深い応答遺伝子であると思われた。また、農薬類による影響では、含窒素系農薬 CNP が



10-30  $\mu\text{M}$ の比較的高濃度で、脱顆粒反応の亢進が見られたが、有機リン系農薬との併用によるさらなる上昇がみられるという結果は得られなかった。

2 In vivoアレルギーモデル系での検討  
これまでに我々は、種々の環境化学物質、特に農薬について、免疫機能に対する影響を調べたが、今までの曝露条件は、経口投与、皮下投与が中心であった。環境化学物質の曝露経路として吸入曝露が臨床的にも重要な経路であることは知られおり、多くの毒性作用が吸入により認められている。今年度は、本研究の最終年度でもあり、今までの実験結果をより臨床に近づけることを目的に、吸入曝露による免疫系への影響を調べた。各農薬の高用量群の曝露量は、最大残留基準（MRL）あるいは水質基準を基に設定した。すなわちTM 20ppm、CNP 0.005ppm、PAP 1ppm、CNP-PAP 100ppm-PAP 1ppmとした。それぞれの低用量群は、高用量群の1/100とした。これらの農薬を吸入曝露した結果、体重推移、一般状態、解剖時の脾臓、胸腺、肺重量に変化は認められず、基準値内の曝露であれば、重篤な毒性は認められないことが確認された。免疫機能に対する実験のうち、リンパ球幼若化反応試験では、CNPおよびPAPの吸入曝露により、mitogenに対する反応性が増強する傾向が認められた。また、CNP-PAPの併用曝露により、その反応がさらに増強される傾向が認められた。一方、TM曝露においては反応が抑制される傾向が認められた。SRBC投与によるアレルギー状態においても、体重推移や各臓器重量に曝露の影響は認められなかったが、PFC assayにおいてTM曝露群が抗体産生能の低下を示した。この結果は、先に示したBrdU assayでの細胞増殖活性の

抑制傾向と共通した作用と考えられ、TMはリンパ球などの免疫細胞の増殖抑制作用を有する可能性が示唆された。in vitroの実験結果を手がかりに、in vivoで確認を行い、生体に影響するかどうかを調べていくことは環境化学物質の安全性評価に重要であり、本研究で実施してきたin vitroおよびin vivoの実験はその手段として有用である。

【大野】1) 農薬の代謝に関与する酵素に関する研究 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結果、Pm濃度が比較的高濃度時の代謝に於いては主にCYP3A4により、低濃度時に於いてはN-脱アルキル化代謝の特異性が高い1A2により主に代謝されると推定された。また、Pm代謝において、生成する代謝物によってTiclopidine、Omeprazole、TranlycypromineやKetoconazole等の阻害剤の感受性がヒトおよびラットの動物種差により微妙に異なっていた。これらはP450分子種の違いに基因すると考えられた。なお、CYP1A1でも代謝されたことから、農薬の接触部位でもある皮膚や肺でも効率的に代謝される可能性がある。Pmの代謝が複数種のP450でなされることは、例えば一種のCYP3A4で代謝される医薬品を投薬中の人間が、万一この農薬に暴露された場合、一種の代謝酵素3A4が拮抗阻害を受けても他のP450分子種が働いて代謝することで、血中薬物濃度が上昇するような副作用は起こり難いと考えられた。

2) ヒト型CYP3A4誘導検索系の開発  
酵素誘導能をヒト薬物代謝酵素について明らかにすることは農薬や薬物の安

全性評価に重要である。これまで実験動物試験の結果から外挿されて来たが、ヒトと実験動物のあいだに顕著な種差が存在するため予測は困難とされていた。近年、我々は誘導評価系はヒトの誘導を予測することが可能な系を構築し、本評価系を用いることで薬物によるヒトの誘導を予測することを可能とした。本評価系を用いた今回の研究より、使用したすべての農薬において程度は異なるもののCYP3A4誘導を引き起こす可能性が示めされた。またジコホールについては、誘導の分子機構が肝臓と腸管では異なる可能性も示唆された。本研究結果より、多くの農薬が実際にCYP3A4誘導を引き起こす可能性が予測され、またその誘導が臓器間で異なることも予測された。従って、農薬の詳細な毒性評価を行うためには、本系を用いたさらなるCYP3A4誘導の検討が必要と考えられる。

3) 農薬の腎排泄に関する研究 少なくとも、有機アニオン化合物の側底膜側の輸送については種差が小さいことが明らかとなり、動物実験からヒトへ外挿が可能であることが示唆された。サルを用いた動物実験も有効である。

酵素誘導能をヒト薬物代謝酵素について明らかにすることは農薬や薬物の安全性評価に重要である。これまで実験動物試験の結果から外挿されて来たが、ヒトと実験動物のあいだに顕著な種差が存在するため予測は困難とされていた。今回ヒト酵素遺伝子の転写活性化能をヒト由来の肝細胞株に発現させることが、農薬類を評価することが

可能となった。今後、定量性について検討して行く予定である。

【佐々木】今回の検討から250以上の化合物が検索されたが、その存在を確認するためには標準品を用いた検討が必要である。しかしこれらすべての化合物について標準品との比較を行うことは非常に困難であり、事前に更に絞り込んでおく必要がある。異なる化合物でも類似したマススペクトルを与える場合もあるため、今回の検討のように予め有害性物質を特定しないで検索する場合には、マススペクトル情報のみでの検索は現実的ではない。より効率的な検索を行うためには保持時間情報などマススペクトル以外の付加的な情報が必要である。

【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小児についても、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次的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

①HCAの発がん性に対して、化学物質による肝あるいは腎障害が及ぼす影響を検討する目的で実験を行った。本実験に先立ち予備実験を行い、肝及び腎に対する障害物質であるCCl<sub>4</sub>及びFAのラットにおける投与条件を明らかにした。現在HCAであるIQのラットにおける主に肝及び大腸における発がん性に対する肝、腎障害の修飾作用を検討する本実験を開始して36週目であり、途中死亡例からの判断では、IQによる肝発がんが肝障害により促進されていることを示唆する結果が得られている。40週まで継続した後剖検する。また、

抗酸化酵素や第2相酵素が低下する様な病的状態では、IQによる肝発がんに対する感受性が高くなることも示唆された。

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新たな遺伝子発現を必要としない酸化的ストレス障害のような毒性についてもゲノミクス手法で捕捉 評価できることを明らかにし、この際、測定時点設定の重要性や実験サンプルの酸化還元状態などの留意点を含めた測定手法を確立した。これにより遺伝子発現情報データベースによる総合的な毒性評価 予測システム構築の可能性が一層高まった。

また複合曝露のような通常手法では評価難しい毒性についても、実際に相殺効果の確認されている複合毒性モデルから分子レベルの知見が得られたことから、網羅的な遺伝子発現の観察により根本的な評価が可能であることが示唆された。これらにより、将来の総合的な毒性評価 予測システムの実現のために必要な、高度な遺伝子発現情報データベースが有するべき基本性能が明らかとなった。

④DBP、CNP、PAPについてラットの培養マスト細胞の脱顆粒並びに遺伝子発現変化を $\beta$ -hexosaminidase release 並びにDNAチップ技術 (Affymetrix GeneChip) を用いて解析した。その結果、ストレス応答遺伝子Gadd 45a、サイトカインであるTNF- $\alpha$ やIL-3の発現が顕

著に増加した。DBPと抗原との共存刺激により、転写因子Egr-1やJun-Dが相乗的な発現増加を示した。in vivoの系では、PAP、CNPあるいはTMの単独吸入曝露、PAPとCNPとの併用曝露による免疫機能への影響を、BALB/cマウスを用いて検討した。リンパ球幼若化反応では、CNP、PAPの単独および併用曝露群の多くでmitogen刺激に有意に強く反応した。SRBCを用いたPFC assayでは、TM曝露群が有意な低値を示した。In vitroの実験結果を手がかりに、in vivoで確認を行い、生体に影響を与えるかどうかを調べていくことは環境化学物質の安全性評価に重要であり、本研究で実施してきたin vitroおよびin vivoの実験系はその手段として有用である。

⑤ヒト肝ミクロソームでの薬物相互作用を考慮した場合、P<sub>m</sub>が低濃度時に於いてはCYP1A2で代謝される薬物と、また基質が比較的高濃度時に於いてはCYP3A4等により代謝される薬物との相互作用の可能性が推定される。しかし、P<sub>m</sub>の代謝は複数種のP450でなされることから、例え一種のP450での代謝を強く抑制する医薬品を投薬中の人間がP<sub>m</sub>に暴露された場合でも、他のP450分子種が働いて代謝され血中濃度が上昇するような毒性作用は起こり難いと考えられる。典型的なCYP3A4誘導剤であるリファンピシンとクロトリマソールを添加した時の誘導応答の程度と応答比の違いからNo 10およびNo 20の株を用いて、ヒトCYP3A4遺伝子の活性化能を農薬について検討した。DDTに構造が類似したシコホールは、約10 $\mu$ Mの添加で約4倍の誘導が認められた。さらに調べた5種の農薬のうちIBPは約7倍と、シコホールよりも強い誘導能が検出された。RSTとOat3の共遺伝子発