

別添1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

食品中化学物質の複合毒性に関する実験的研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広瀬雅雄

平成17（2005）年4月

別添2

目 次

I. 総括研究報告書	
食品中化学物質の複合毒性に関する実験的研究	1
広瀬雅雄	
II. 分担研究報告	
1. 食品中化学物質の複合による遺伝毒性に関する実験的研究	17
松元郷六	
2. 食品中化学物質の複合反応と反応生成物に関する研究	25
中澤裕之	
3. 亜硝酸と食品中化学物質の複合による発がんリスクに関する実験的研究	43
広瀬雅雄	
4. 食品中の化学物質と金属の複合による DNA 傷害に関する実験的研究	47
川西正祐	
5. 食品中金属類と食品中化学物質の複合による発がんリスクに関する実験的研究	52
中江 大	
6. 発がん物質等の代謝活性化に影響を及ぼす食品中化学物質の検索	56
大野泰雄	
7. 食品中化学物質相互の酵素誘導を介した発がんリスクに関する実験的研究	61
白井智之	
8. 残留農薬等の相加・相乗毒性に関する実験的研究	64
原田孝則	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	75
IV. 研究成果の刊行物・別冊	77

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

総括研究報告書

食品中化学物質の複合による遺伝毒性に関する実験的研究

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

食品中化学物質の複合毒性の実態を、*in vitro*及び*in vivo*の実験により総合的に明らかにし、ヒト健康への影響を評価するための資料とすることを目的としている。松元らは、亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) とアスコルビン酸 (AsA) の複合的な遺伝毒性を評価するため、チャイニーズハムスター培養細胞を用いて染色体異常誘発性を検討した結果、 NaNO_2 とAsAを弱酸性～弱塩基性下で同時に処理した場合、 NaNO_2 の用量に相関して有意な染色体異常誘発が認められた。カテコールと NaNO_2 でも、同様に染色体異常が誘発され、これらの複合による前胃発がんには、遺伝毒性が関与している可能性が示唆された。中澤らは、AsAと NaNO_2 の併用によるラット前胃発がん機序を解明する目的で、*in vitro*の実験系において酸性条件下でAsAと NaNO_2 の反応により生成するnitric oxide (NO) の検出を行った。その結果、 NaNO_2 及びAsA濃度に依存的なNOの生成が観察され、AsAと NaNO_2 併用投与におけるラット前胃の細胞増殖活性にNOが関与していることが示唆された。次に、酸性条件下における NaNO_2 から生成するnitric oxide (NO) に着目し、*in vitro*の実験系においてカテコールとNOの反応により生成する活性酸素種の検出及びその反応機構の解明を行った結果、 ONOO^- に起因するOHラジカルの産生を認めた。*in vivo*実験系では、0.8% カテコールを混餌で、0.2% NaNO_2 を飲料水に混じてF344ラットに投与し、ラット前胃粘膜DNAの酸化的損傷および病理組織学的検索を行った。その結果、併用投与により細胞障害並びに8-oxodGの増加が観察され、これらの併用による前胃発がんには、NOによるDNAの酸化的損傷が関与していることが明らかになった。広瀬らは、 NaNO_2 とAsAによる発がんのヒトに対する意義を検討する目的で、ラット逆流性食道炎モデルを作成し、 NaNO_2 とAsAを2週間併用投与した結果、食道粘膜に、強い過形成が発生し、8-oxodGも増加した。他に、食品添加物であり、抗酸化作用のあるカテキンと NaNO_2 の併用による胃発がんへの影響を検討する実験を、ラットMNNG 2段階発がんモデルを用いて行っている。川西らは、*in vitro*の系で金属と食品中化学物質の相互反応による酸化的DNA傷害について検討した結果、プロピルガレート、イソフラボンやカテキンのみならず、食品添加物であるオイゲノールのカテコール代謝物が銅の存在下で酸化的DNA傷害を誘発し、動物用医薬品であるニトロフラゾン、アルコール由来サルソリノールでも銅や鉄の存在下で酸化的DNA傷害を誘発するため、これら物質による発がんの一因として、酸化的DNA傷害が重要であること

を明らかにした。中江らはカテキンとグルコンサン銅の複合による発がんを検討するための予備実験として、ラット中期多臓器発がん性試験に準拠した5種類の発がん物質による4週間のイニシエーション処置を行うと共に、グルコン酸銅(0, 1000, 3000, 4800, 6000, 12000ppm)を13週間混餌投与して動物を屠殺し、肝・血清・尿の銅レベルを検索し、肝の組織学的および免疫組織化学的検索を行った。その結果、6000ppm以上の投与群で、肝障害と8-oxodGの増加が観察され、長期試験の投与量をグルコンサン銅6000ppm、カテキン5000ppmとした。大野らは、*in vitro*でCYP3A4レポーター遺伝子安定発現株を用い、種々の農薬のCYP3A4誘導能評価を行った結果、誘導の程度には大きな差があるが、Alanycarb, ethiofencarb, ametryn, prometryn, CNP, IBP, MCC, permethrinすべての被験農薬によってCYP3A4が誘導され、代謝酵素の誘導を介した化学物質の相互作用を予測する有効な系であると考えられた。白井らは、ヘテロサイクリックアミン(HCA)による発がんを修飾する食品中化学物質を予測する*in vivo*の系を構築するため、既知の修飾物質をラットに2週間混餌投与し、如何にシトクロームP450分子種が誘導または抑制されるかをWestern Blotting法を用いてタンパク質レベルで追究した。その結果、HCAの代謝活性化に必要とされるCYP1A1/1A2の誘導と発がん修飾作用との明らかな相関は認められず、解毒酵素等を総合的に検討する必要性を明らかにした。一方、 β -naphthoflavoneがCYP1A1を顕著に誘導したことから、HCAの発がんを修飾する可能性が示唆された。原田らは、農薬の相加・相乗毒性を検討するため、有機リン系(MPP)、有機塩素系(DDT)およびカーバメート系(MPMC)の3種類の殺虫剤を組み合わせ、ラットに複合的に単回経口投与し、臨床症状、死亡率、自発運動量およびコリンエステラーゼ活性(血漿、血球、脳)について検索した。その結果、MPPとMPMCの複合投与群では、死亡率の増加、神経症状の発現期間の延長、自発運動量の減少等が認められ、ラットに有機リン剤とカーバメート剤を複合投与すると相加的毒性効果が発現することが示唆された。

分担研究者

松元郷六 残留農薬研究所
毒性部遺伝毒性研究室長
中澤裕之 星薬科大学
薬品分析化学教室教授
川西正祐 三重大学医学部
衛生学講座教授
中江 大 佐々木研究所
病理部 部長
大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所
副所長
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
原田孝則 残留農薬研究所
毒性部長

A. 研究目的

食品中には残留農薬、食品添加物、加熱調理過程で生成される発がん物質（ヘテロサイクリックアミン、アクリルアミドなど）など多様な化学物質が含まれている。これら化学物質の安全性を評価する場合、単独の化学物質での評価が原則であるが、本研究では、これら食品中化学物質の複合毒性を総合的に解析し、健康影響の有無を検証することにある。具体的には、広瀬、松本は亜硝酸と抗酸化物質や加熱調理過程で生成される遺伝毒性発がん物質であるヘテロサイクリックアミン、アクリルアミドとの複合作用をそれぞれin vivoの動物実験及びin vitro/in vivoの遺伝毒性試験で検討し、中澤はこれらによる複合反応機構を、ラジカル反応の面から解明し、かつ反応生成物を同定する。

銅や鉄などの金属類は、食品中に含まれ、近年健康食品としての利用も増加している。一方、これら金属類は活性酸素の発生を媒介

することも知られている。川西は銅、鉄、マンガン等の金属類と食品中の残留農薬、食品添加物等による活性酸素を介したDNA傷害について主にin vitroの系で検討し、中江はin vivoの動物実験により、金属類の存在下における食品中化合物の複合毒性、特に発がんの可能性について検討する。

毒性物質と、その代謝を修飾する物質との複合による毒性影響も極めて重要である。白井は毒性の指標として肝発がん性に絞り、代謝活性化あるいは解毒に係わる酵素の活性を左右する食品中化学物質が、ヘテロサイクリックアミン等の化学物質の肝発がん性をどの様に修飾するかを追究する。食品中成分が肝薬物代謝機能や胆汁排泄などを変動させることにより、解毒能に影響し、薬の副作用や毒性に影響する可能性がある。しかし、酵素誘導に関するPXRなどの核内受容体には顕著な動物間種差があり、実験動物で得られた成績を直ちにヒトに適用できなかった。そこで大野は、ヒト型核内受容体を導入した細胞や実験動物を用いて食品中に含有される可能性のある化学物質の酵素誘導作用を調べ、複合作用による健康影響評価への基礎データを供給する。

有機リン系農薬は、遅発性神経毒性を発生させ、子供の脳・神経の発達に影響を与える事が明らかになってきたが、乳幼児や子供の発育・成長に対する有機リン剤等の複合的暴露影響に関する研究は少なく、我が国での規制は遅れている。原田は、神経毒性が示唆されている有機リン系、カーバメート系、有機塩素系農薬に対し複合的に暴露された場合の神経系への影響を明らかにする。

B. 研究方法

【松元】

変異原性を検討するため、組織培養用のプレートにCHL細胞を播種し、約24~48時間後、種々の濃度の亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) 及びアスコルビン酸 (AsA) あるいはカテコールを単独あるいは同時に30~50 μL ずつ添加した。3時間後、PBSで洗浄し、通常の増殖培養液と交換した。さらに21時間培養した後、染色体標本を作製した。対照群には被験物質の溶媒である生理食塩水のみを添加した。同時処理する場合は各被験物質溶液を30~50 μL ずつ添加した。その後の操作は上記と同様であった。

AsAを添加した処理群では培養液が赤色から黄色へ変色し、培養液が酸性側へ変化したことが窺われた。よって、pHメーターを用いて培養液の正確なpHを測定した。

各スライドグラスあたり100個、各濃度あたり200個の中期分裂細胞を顕微鏡観察した。同時に倍数体 (染色体数37以上) の出現数を記録した。ギャップの判定基準は、「非染色性部分のうち、その長さが染色分体幅より短く、染色体中軸線がずれていないもの」とした。一つの核内に切断型や交換型の異常が多数観察された場合、その中期分裂細胞はその他 (Others) に分類した。細胞毒性の指標として分裂頻度 (Mitotic index) を計測した。

統計処理は、対照群と処理群の間でカイ二乗検定を行った。構造的染色体異常を持つ細胞の統計解析では、-g (ギャップのみの異常を持つ細胞を除く) の集計について検定した。

【中澤】

6週齢の雄F344ラット全168匹を対照群、 NaNO_2 飲水投与群、カテコール混餌投与群及び NaNO_2 、カテコール併用投与群の計4群に配した。0.8%カテコールおよび0.2% NaNO_2 をそれぞれ単独あるいは複合で投与した。投与後12、

24時間、1週及び2週間後に屠殺し、各群及び時間で3匹ずつを病理組織学的検索に用いた。投与後12時間及び2週間で、3匹分を1サンプルとして各群及び時間5サンプルずつ8-hydroxydeoxyguanosine (8-oxodG) 測定用のサンプルを採取した。

カテコールとNOの反応を確認するために、カテコールに1mM DTPACを含むリン酸塩緩衝液とNO発生剤であるNOC7を加え、カテコールの最終濃度を0.1とし、室温でインキュベーションした後、60分まで15分間隔でそのUVスペクトルを測定した。

ROSは、トラッピング剤としてDMPOを用い、ESRにより検出した。

ONOO⁻の生成はrhodamineの生成量で測定した。

前胃粘膜DNAはDNAエキストラクターWBキットを用いて抽出し、nuclease P1とalkaline phosphataseにより消化した。得られた試料はHPLC/ECDにより測定を行った。

【広瀬】

逆流性食道炎モデルラットの作成のため、8週齢の雄のF344ラットを24時間の絶食後、ネブタール麻酔下で開腹した。幽門輪直下の十二指腸を幅約2 mmの18Frネラトンカテテル片 (直径4 mm) で被覆し、脱落防止のため5-0ナイロン糸で胃のしょう膜に固定した。さらに、2-0絹糸で前胃腺胃境界部の結紮を行った。

逆流性食道炎手術1週間後のラット5匹に、1.0% AsA (混餌) および0.2% NaNO_2 (飲水) を2週間併用投与した。同様に、手術後に基礎飼料および蒸留水を与える対照動物を3匹設けた。2週間の投与後、エーテル麻酔下で腹部大動脈より放血致死させた。対照群の1匹および併用投与群の2匹は食道を摘出し、

定法に従い病理組織学的検索を行った。対照群の2匹および併用投与群の3匹については食道粘膜を採取し、8-oxodGを測定した。

ラット2段階胃発がんモデルにおいて、カテキンとNaNO₂の併用投与の影響を検討するために、6週齢のF344ラット雄80匹にはイニシエーション処理群として0.01% NMMG（飲水）および5% NaCl（混餌）を10週間併用投与し、9週目に100 mg/kg体重のMNNGを強制経口投与した。その後0.2%NaNO₂および1.0%カテキンを単独あるいは複合で投与した。残りの40匹はイニシエーション処理を行わないそれぞれの対照とした。現在、42週間の実験期間のうち、35週が経過している。実験期間終了後にエーテル麻酔下で放血致死させ、腺胃および前胃の病理組織学的検査を実施する予定である。

動物の取り扱いに関しては国立医薬品食品衛生研究所に定める倫理規定に従い実施した。

【川西】

ヒトがん原遺伝子 c-Ha-ras-1 及びがん抑制遺伝子 p53 やp16から変異のホットスポットを含む 100~400 bp の断片をサブクローニングした。これらのヒトがん関連遺伝子の DNA断片の5'末端を³²Pで標識し、食品中化学物質および各種生体内物質（金属、還元物質、代謝酵素等）と共にリン酸緩衝液（pH 7.8）中で反応し、ピペリジンあるいはFpg処理後に電気泳動を行い、DNA損傷性を検討した。DNA損傷の塩基配列特異性の解析にはMaxam-Gilbert 法を応用し、オートラジオグラムをレーザーデンストメーターで定量化し解析した。さらに、酸化的DNA損傷の指標の一つである8-oxodGをHPLC-ECDを用いて定量した。また、ESRを用いて活性種を検討し、DNA損傷機構を推定した。食品中化学物質による細胞増殖活性をE-screen assayで測定した。

食品中化学物質として、丁子から抽出され、マウス肝に発がん性のあるオイゲノール、動物用医薬品であり、動物の乳腺や卵巣に発がん性を示すニトロフラゾン及びアルコール由来物質サルソリノールを用いた。

【中江】

ラット中期多臓器発がん性試験法に準じ、イニシエーション処置としてDEN（100 mg/kg体重、腹腔内投与1回）、MNU（20 mg/kg体重、腹腔内投与4回）、DMH（40 mg/kg体重、皮下投与4回）、BBN（0.05%混水投与2週間）、DHPN（0.1%混水投与2週間）を4週間に投与し、グルコン酸銅を0・1000・3000・4800・6000（以上各群3匹）・12000 ppm（1匹）の用量で13週間自由摂取させた。全ての動物は、実験開始の13週間後に屠殺した。肝を摘出した後、重量を測定し、通常の方法でパラフィン包埋し、methalothionein (MT) 蛋白発現、GST-P陽性細胞巢、8-oxodG、PCNA標識を指標とした肝細胞増殖活性について免疫組織化学的に検索した。

体重・摂水量・摂餌量・臓器重量は、one-way analysis of variance (ANOVA) による解析を行い、群間に有意差が観察された場合にDunnettの多群間比較法を用いて検定した。

本研究は、倫理面への配慮として、「動物の保護及び管理に関する法律（昭和48年10月1日、法律第105）」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準（昭和53年3月27日、総理府告示第6号）」、また、World Health Organization (WHO) 医学研究顧問委員会 (CIOMS) の勧告である「International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals」に準拠して行った。なお、この配慮は、財団法人 佐々木研究所 動物実験委員会による事前審査と実験中のモニ

タリングにより担保された。

【大野】

CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現株 (clone number 3-1-10, 3-1-20) は当研究室にて樹立した細胞株を使用した。誘導実験は各薬物 alanycarb, ethiofencarb, ametryn, prometryn, CNP (chlornitrofen), IBP (iprobenfos), MCC, permethrin, kepone, p, p'-DDE, o, p'-DDD を DMSO に溶解し、DMSO の最終濃度が 0.1% となるよう培地に添加した。ルシフェラーゼ活性の測定は、細胞を PBS で回収した後、Reporter Lysis Buffer 100 μ l で溶解し、細胞溶解液 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測定した。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。

(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。

【白井】

6週令雄F344ラットにBHA 1%, ferulic acid 1%, curcumine 1%, caffeine 0.1%, α -naphthoflavone 0.02%, β -naphthoflavone 0.02%を混餌投与し、2週間後に剖検屠殺を行った。無処置の対照群も設けた。肝組織を採取し、タンパク質を抽出、Western blotting 法により、CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C11, CYP2C13, CYP2E1, CYP3A2, CYP4A1 のタンパク発現変動を β -actin を対照として検討した。

【原田】

有機塩素系およびカーバメート系の3種類の殺虫剤を組み合わせ、8週齢のWistar Hannover系雌性ラットに複合的に単回経口投与し、相加・相乗毒性を検索した。被験物質として、有機リン剤はMPP (Fenthion)、有機塩素剤はDDT (p, p'-DDT)、カーバメート剤はMPMC (Xylylcarb) をそれぞれ選択し使用した。投与量は、2剤複合投与しても死亡が認められないと予想され、且つ何らかの神経症状発現が期待される量として、MPP 200 mg/kg、DDT 60 mg/kg、MPMC 75 mg/kg の投与用量を設定した。毒性の指標として、臨床症状、死亡率、自発運動量およびコリンエステラーゼ活性 (血漿、血球、脳) を検索した。なお、動物の取り扱いに関しては試験研究実施機関である財団法人残留農薬研究所に定める倫理規定に従い実施した。

C. 研究結果

【松元】

NaNO₂ を 0.625~5mg/mL、AsA を 0.313~5mg/mL で3時間処理したのみでは異常細胞誘発頻度の有意な増加は認められなかった。NaNO₂ 0.5mg/mL と AsA 1~2.5mg/mL を同時処理した結果、1.5と2.5 mg/mL で7.5%の染色体異常が観察され、処理直後の培養液のpHは6.2~7.0であった。次に、NaNO₂濃度を10倍に上げて同じ実験を行った結果、AsA 1.5 mg/mL以上で明らかに染色体異常細胞の増加が確認され、処理直後の培養液のpHは6.1~7.0であった。

カテコール単独では、50 μ g/mL以上で染色体異常が増加し、100 μ g/mLでは14.0%の中期細胞に染色体異常が観察された。また、200 μ g/mLでは倍数体の出現頻度が有意に増加した。次に亜硝酸ナトリウム5mg/mLとカテコ

ール12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を同時に3時間処理した。すると、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で染色体異常が明らかに増加し、50および100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では中期細胞の約20%に染色体異常が観察された。従って、 NaNO_2 と共存することによって、カテコールの染色体異常誘発性が増幅された

【中澤】

0.2% NaNO_2 と0.8%カテコールを併用投与した群における病理組織学的所見は、投与開始12時間後で中程度の粘膜下織への細胞浸潤及び浮腫が観察され、24時間では表皮の過形成、1週及び2週では潰瘍・びらん性病変と炎症性細胞の浸潤が認められた。他の群においては変化が認められなかった。

0.2% NaNO_2 と0.8%カテコールを併用投与後12時間と2週間のラット前胃粘膜DNAの8-oxodG値はどちらの時間においても対照群に比べ有意な上昇がみられた。

NOC7を用い、NOとカテコールの反応によるUVスペクトルの変化を測定した結果、カテコールの極大吸収である250nm付近の吸収は経時的に減少し、同時に370nm付近に新たな吸収が観察された。

カテコールとNOC7を室温でインキュベーションしESR測定を行った結果、開始10分後からDMPO-OHアダクトのスペクトルが観察され、そのスペクトル強度は経時的に増加した。

カテコールとNOC 7によるONOO $^-$ の生成量は $7.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$ であった。また、対照群としてmannitolを添加した場合の生成量は $6.1 \pm 0.8 \mu\text{M}$ であり、mannitolによるONOO $^-$ の生成量への影響は見られなかった。

NaNO_2 とAsAを酸性条件下で1分間インキュベーションしESR測定を行った結果、 $\text{Fe}(\text{DTCS})_2\text{-NO}$ のスペクトルが観察された。また、そのスペクトル強度は

AsA、 NaNO_2 それぞれの濃度に依存して増加した。 NaNO_2 及びAsAのみでは $\text{Fe}(\text{DTCS})_2\text{-NO}$ のスペクトルはみられなかった。

【広瀬】

手術により、対照群のすべての動物の食道下部に肉眼的な隆起層が認められ、病理組織学的には、細胞浸潤を伴った潰瘍と、潰瘍周辺扁平上皮の過形成および角化亢進であった。一方、2週間の併用投与群では、対照群で認められた食道下部の隆起層はみられず、食道の上部から下部にかけて慢性に扁平上皮の単純性並びに乳頭状過形成が認められた。

食道粘膜DNA中の8-oxodGレベルは、対照群の0.47 (8-oxodG/ 10^5dG) に対し、併用投与群で0.95 (8-oxodG/ 10^5dG) と2倍以上の高値を示した。

ラット2段階胃発がんモデルにおいて、カテキンおよび NaNO_2 併用投与の影響を検討する実験は、現在42週間の実験期間のうち、35週が順調に経過しているが、イニシエーションの有無にかかわらず、 NaNO_2 を投与した群で体重増加の抑制が認められている。

【川西】

抗酸化物質として食品に添加されるプロピルガレートや大豆食品に含まれるイソフラボン、唐辛子成分カプサイシンや茶カテキン類が金属存在下で酸化的にDNAを損傷することを既に報告した。

今回、オイゲノールを種々薬物代謝酵素CYPで処理したところ、CYP2D6で前処理したオイゲノールは銅の存在下で最も強くDNAを損傷し、この損傷はカタラーゼによって抑制され、過酸化水素の関与が示唆された。飛行時間型質量分析計によりオイゲノールはCYP2D6によりO-脱メチル化体に代謝された。

ニトロフラゾンは cytochrome P450 reductase および Cu(II) の両者の存在下で、p53 遺伝子の hotspot の 5'-ACG-3' 配列で強い損傷を起こした。また、DNA 損傷はカタラーゼで抑制された。ニトロフラゾンは培養細胞の 8-oxodG 生成量を有意に増加させた。

アルコールの摂取により生体内に生成するサルソリノール(SAL)に注目し、そのDNA 損傷性と乳腺細胞増殖活性について検討した。SALはCu(II)あるいはFe(III)EDTA 存在下でDNAを損傷し、また、8-oxodGを生成した。このDNA損傷はMn(II)あるいはSOD存在下で著しく増強された。SALはヒト乳癌細胞MCF-7でも、ヒト正常乳腺上皮細胞MCF-10Aでも細胞増殖作用を示した。

【中江】

実験期間を通じて動物の一般状態、体重に特記すべき変化を観察しなかった。肝重量は12000ppm群で増加した。血清および尿の銅レベルは、12000ppm群でのみ増加した。肝の銅レベルは、6000ppm以上群で増加したが、肝切片のロダニン染色では、1000ppm以上群で陽性染色所見が用量に依存して増強した。MT 蛋白も、1000ppm以上群で、用量相関性の発現強度の増加が認められた。

病理組織学的検索では、4800ppm群では、肝細胞の核に軽度の大小不同、6000ppm群では、肝細胞の核の大小不同に加え、肉芽腫が散見された。12000ppm群では、肝細胞の細胞質がやや好酸性を増し、肝細胞の壊死が発生したほか、肉芽腫をびまん性に認めた。

肝前がん病変であるGST-P陽性細胞巢の1cm²あたりの個数は、12000ppm群で増加した。

8-oxodG陽性細胞核の単位面積あたりの個数は、6000、12000ppm群で増加した。

PCNA標識された肝細胞の出現率で評価した

肝細胞増殖活性は、6000ppm群で増強し、12000ppm群でさらに顕著に増強した。

【大野】

rifampicin および clotrimazole は、3-1-10 の細胞では薬物濃度10μMにおいて、それぞれ約32倍、約4倍の誘導率を示し、3-1-20の細胞ではそれぞれ10倍、約23倍の誘導率を示した。この結果より、各クローンは薬物により応答性が異なり、3-1-10の細胞ではrifampicinでより強い誘導を示し、3-1-20の細胞ではclotrimazoleでより強い誘導を示すことが確認できた。

種々の農薬については、3-1-10の細胞ではIBPで最も強い誘導応答を示し、薬物濃度10μMでは約8倍の誘導率が示された。次いで強い誘導応答を示したのはo,p'-DDDであり約6倍の誘導率が示された。以下 permethrin (約5.9倍)、kepone (約4.6倍)、prometryn (約4.5倍)、CNP (約3.7倍)、p,p'-DDE (約3.2倍)の順であった。Ethiofencarb (約1.9倍)、alanycarb (約1.3倍)、ametryn (約1.2倍)、MCC (約1.3倍)は他の被験農薬と比較すると低い誘導率を示した。

3-1-20の細胞ではpermethrin, keponeで最も強い誘導応答を示し、薬物濃度10μMでは約3.5倍の誘導率が示された。以下o,p'-DDD (約3.2倍)、IBP (約2.7倍)、p,p'-DDE (約2.6倍)、CNP (約2.5倍)の順であった。Ametryn (約1.6倍)、prometryn (約1.3倍)、MCC (約1.3倍)、alanycarb (約1.2倍)、ethiofencarb (約1.2倍)は他の被験農薬と比較すると弱い誘導率を示した。

【白井】

MeIQx肝発がんを抑制するBHAと促進するferulic acidではCYP1A2の増加、CYP2B1と3A2

の低下が共通して認められた。またferulic acidと同様にMeIQx肝発がんを促進するcurcuminでは各種CYPの大きな変動は見いだされなかった。肝発がんを修飾しないcaffeineではCYP1A2と2C11の発現上昇が認められた。また、 β -naphthoflavoneはCYP1A1/1A2を顕著に誘導し、 α -naphthoflavoneはCYP1A2を誘導した。

【原田】

MPPとMPMCを複合投与した場合において12例中4例が死亡した。

臨床症状では、MPP + MPP複合投与群では単独投与でみられた縮瞳に加え攣縮も観察された。また、MPP+MPMC複合投与群では単独投与に比べ症状発現の質的差異はなかったが、神経症状（攣縮、震顫、縮瞳、流涎、流涙）の発現期間の延長がみられた。しかし、投与後2日経過した時点では全ての症状が回復し、長期間残存することはなかった。

投与後1日の自発運動量は、MPPおよびDDTの単独投与では対照群に比べ有意に増加したが、MPP + MPMC複合投与群では逆に大幅に減少した。投与後7日の自発運動量は、MPMC単独投与群、MPP + DDTおよびMPP + MPMC複合投与群において有意に増加し、特にMPP + MPMC複合投与群での増加が顕著であった。

投与後1日のChE活性の測定では、有機リン剤MPPの単独およびMPPとその他の剤との複合（MPP + MPP、MPP + DDT、MPP + MPMC）投与群においてChE活性の有意な低下がみられ、対照群の値に比べ血漿では9%~13%、赤血球で27%~52%、脳では49%~60%低下した。これらのChE活性低下について、上記の投与群間で比較した場合、リン剤同士の（MPP + MPP）複合投与群においてより低値を示す傾向にあった。その他の投与群では、カーバメート剤

のMPMC単独投与群において軽度ながら（対照群に比べ12%）赤血球のChE活性の有意な低下がみられたが、DDT単独投与群ではいずれの項目においても有意な変化は認められなかった。投与後7日のChE活性測定では、投与後1日目に低下した投与群はいずれも回復傾向を示した。

D. 考察

【松元】

CHL細胞にNaNO₂とAsAを同時処理すると、染色体異常の誘発が明らかに認められた。その要因として亜硝酸から生成される一酸化窒素（NO）が疑われる（中澤らの分担研究報告参照）。NOは不対電子を一つ持つフリーラジカルで、半減期は3~6秒程度と考えられている。このNOが染色体DNAに直接あるいは間接的に作用している可能性が考えられる。ただし、pHが6~7の条件下でNOが生成されるかどうか、また、生成される場合はどの程度かを慎重に調査する必要がある。NaNO₂とAsAの同時投与によって誘発されるラット前胃発がんには、本実験で明らかになった染色体異常誘発の間には大きな関連性があるものと考えられる。

カテコールはフェノール系抗酸化剤として用いられるが、in vitroおよびin vivoで小核を誘発し、染色体異常誘発性のあることが知られている。本実験でもカテコールは弱い染色体異常誘発性を持つことが示されたが、Ames試験では陰性であることから、DNA遺伝子に直接作用して染色体異常を引き起すのではなく、真核細胞特有の染色体構築に関する機能に障害を及ぼすものと考えられる。本研究でも200 μ g/mLで倍数体が有意に増加していた。よって、カテコールは細胞分裂の紡錘体に作用し、染色体分離に障害を与えているものと思われる。カテコールは単独で前胃発

がんを促進し、腺胃に発がん性を示すが、これらの要因の一つとして、染色体異常誘発が関与しているものと推測される。

カテコールは亜硝酸と反応して変異原活性を持つdiazo化合物が形成され、ラットに複合投与すると前胃粘膜のDNAに付加体を形成する。また、中澤らにより、カテコールと NaNO_2 の反応により、 ONOO^- によるDNAの酸化的損傷が起こることも確認されている。(中澤の分担研究報告書参照)。従って、これらのいずれかが、あるいは複合的にカテコールと NaNO_2 の複合による前胃発がんに関与していることも考えられる。

【中澤】

カテコールと NaNO_2 併用投与によるラット前胃発癌機構の解明を目的として*in vitro*及び*in vivo*の実験を行った。*in vitro*の実験系では、 NaNO_2 が胃内と同様な酸性条件下でNOを生成することに着目し、NOとカテコールのラジカル反応について種々検討した結果、カテコールは370 nm付近に吸収を持つキノン体へと酸化されることが明らかとなった。このキノン体が付加体形成に関与している可能性がある。また、この反応過程におけるROSの検出をESRにより行った結果、 $\cdot\text{OH}$ の生成が確認された。これはカテコールの酸化の過程において生成するセミキノンラジカルにより、酸素からsuperoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) が生成することにより起因していると考えられる。通常 $\cdot\text{O}_2^-$ は反応性が高いことから、 H_2O_2 へと代謝され $\cdot\text{OH}$ を生成するが、本実験系では過剰のNOが共存していることから、生成した $\cdot\text{O}_2^-$ は速やかに過剰のNOと反応し ONOO^- を生成することが疑われた。 $\cdot\text{OH}$ の生成機序を明らかにするため、DHRを用いた ONOO^- の測定を行った。DHRは ONOO^- 、 $\cdot\text{OH}$ 、NO、 NO_2 と反応し490 nmに吸収を持つrhodamine

生成することが知られている。カテコールとNOをインキュベーションした際のrhodamine生成量と、対照として用いた強力な $\cdot\text{OH}$ 消去能を有する10mM mannitolを添加した際のrhodamine生成量との間に差が見られなかったことは、rhodamineの生成が ONOO^- によることを示している。このことから、 $\cdot\text{OH}$ の生成は H_2O_2 ではなく、 ONOO^- に起因することが明らかとなった。 ONOO^- はNOよりも反応性が高く、DNAの酸化や脂質の過酸化を引き起こすことが知られていることから、ラット前胃発がん機序に ONOO^- によるDNAの酸化的損傷が関与することが示唆された。

投与開始12時間において、組織障害に先立って8-oxodG値の上昇が見られたことは、併用群における組織障害はカテコールと NaNO_2 の反応により生じる酸化的ストレスが関与しているものと考えられる。

NaNO_2 とAsAを酸性条件下で1分間インキュベーションしESR測定を行った結果、 $\text{Fe}(\text{DTCS})_2\text{-NO}$ のスペクトルが観察された。従って、 NaNO_2 とAsAの併用投与によるラット前胃発がんにも、酸化的ストレスの関与していることが示唆された。

【広瀬】

抗酸化物質と NaNO_2 の併用投与による発がん標的は前胃に限られており、ヒトに外挿するには限界があった。最近、ラット逆流性食道炎の発癌要因として、NOが注目されおり、*in vitro*ではAsAと NaNO_2 の併用により、多量のNOが産生される(中澤の分担研究報告書参照)。そこで本研究では、ヒトに類似した逆流性食道炎モデルラットを作成し、AsAとの併用投与を行った。その結果、対照群では胃酸逆流によると思われる食道下部の潰瘍がみられたのみであったが、

すべての併用投与動物において、食道の上部から下部にかけて広範囲な強い過形成が認められた。このように、予備実験の段階ではあるが、逆流性食道炎手術後の食道においてもAsAとNaNO₂の併用投与による細胞増殖作用が認められた。

また、食道粘膜DNA中の8-oxodGレベルも併用投与により2倍以上上昇したことから、本モデルにおいて長期間の併用投与を行うことで酸化ストレスに起因する食道発がんが起きる可能性が示唆された。現在、これらの知見に基づき本食道炎モデルにおける32週間併用投与の発がん実験を実施中である。

また、食品中に多量に含まれるフェノール系酸化防止剤のカテキンについては、NaNO₂との短期併用試験によりラット前胃に過形成、またin vitroにおいてはNOの発生することを既に明らかにしている。このような背景から、現在ラット2段階発がんモデルを用いてNaNO₂との併用投与による胃発がんの修飾作用を検証中である。

【川西】

マウス肝に発がん性のあるオイゲノールはCYP2D6によりO-脱メチル化体に代謝された。ことから、カテコール体代謝物が、銅の存在下で活性酸素を生成して酸化的にDNAを損傷することが示唆された。オイゲノールは付加体を形成することも明らかにされており、その発がん機構には、付加体形成に加え、代謝物による酸化的DNA損傷が重要な役割を果たしていると考えられた。

動物用抗菌剤であるニトロフラゾン[®]は酵素的に一電子還元を受け、ニトロアニオンラジカルとなり、再び自動酸化を受けて酸化還元サイクルを形成することが明らかになった。その過程で生成されたH₂O₂とCu(I)から成る活

性種がDNA損傷を起こすと考えられる。さらに、ニトロフラゾンはエストロゲン依存性ヒト乳癌細胞MCF-7を有意に増殖させた。従って、ニトロフラゾンによる雌性生殖器の発がんには、代謝物による酸化的DNA損傷と、エストロゲン活性に関連する細胞増殖作用の両者が協奏的関与していると推定される。

アルコール関連物質であるSALは、酸化的DNA損傷性と乳腺細胞増殖活性を併せ持つことが明らかになった。したがって、SALが発がんのイニシエーションとプロモーションに関与し、発がん性を示す可能性が示唆された。

【中江】

本実験においては、複数の発がん物質が投与された条件下であるが、肝においては、1000ppm以上群の肝細胞における銅染色陽性所見・MT蛋白発現増強、6000ppm以上群の肝銅レベル増加・肝細胞大小不同・肝肉芽腫・肝細胞核内8-oxoG誘発増強・肝細胞増殖活性増強、12000ppm群の肝重量増加・血清および尿の銅レベル増加・肝細胞壊死・肝前がん病変数増加などの変化が検出できた。6000ppmでの暴露は肝における排出機構の能力を超える銅過負荷を、12000 ppmの暴露では肝の収容能力をも超える重篤な銅過負荷状態を来たし、その結果、肝細胞傷害が発生したと考えられる。先天的な銅代謝異常を有するLECラットでは、肝や腎において銅が蓄積し、8-oxodg産生を含む酸化的ストレスによる重篤な肝炎、肝細胞がんや腎細胞腫瘍を自然発症することが知られている。今回の結果は、通常のラットにおいても肝の処理能力を超えるグルコン酸銅の暴露により、肝毒性が誘発されることを示唆するものである。さらに、12000ppm群におけるGST-P陽性前がん病変の個数の増加は、グルコン酸銅が、少なくとも

高用量暴露の場合に、肝発がん性を発揮する可能性を示した。カテキンはCu(II)の存在下でDNA損傷を誘発するため、本研究においては、今回の成果を基に、同系雄性ラット（6週齢）を用い、ラット中期多臓器発がん性試験のプロトコルに基いたカテキンとグルコンサン銅の実験を行っている。被験物質の投与量はグルコン酸銅（10・300・3000・6000ppm混餌投与）とカテキン（5000ppm混水投与）で、それらを単独または併用投与した。併用試験の結果は、次年度に報告する。

【大野】

CYP3A4レポーター遺伝子安定発現株を用い、種々の農薬のCYP3A4誘導能評価を行った。その結果、誘導の程度には大きな差があるが、すべての被験農薬によってCYP3A4が誘導された。3-1-10の細胞ではIBP、o,p'-DDD、permethrinで特に強い誘導がみられ、3-1-20の細胞ではpermethrin、kepone、o,p'-DDDで特に強い誘導がみられた。

今回用いたCYP3A4レポーター遺伝子安定発現株は、薬物の種類によりクローン間で誘導応答性が異なることが確認されている。つまり、rifampicinとclotrimazoleによる誘導応答を比較した場合、3-1-10の細胞ではclotrimazoleに比べrifampicinでより強力に誘導され、3-1-20の細胞ではclotrimazoleでより強力に誘導されるという特性を持つ。被験農薬のうちprometryn、CNP、IBP、permethrin、kepone、p,p'-DDE、o,p'-DDDでは3-1-20の細胞に比べ、3-1-10の細胞で高い誘導率が示され、特にIBPおよびprometrynではその傾向が顕著であった。これらの農薬では、このようにクローンの違いによる誘導応答の違いがrifampicinと類似していたため、これらの農薬がrifampicinと同様の、あるいは類似した分子機構でCYP3A4を誘導してい

る可能性が考えられる。

有機塩素系農薬であるDDTやその類似体はラット肝の薬物代謝酵素(CYP2B, CYP3A)を誘導することが報告されており、chlordane, dieldrin, endosulfanはヒト肝細胞でhPXRを活性化しCYP3A4を誘導することが報告されている。本研究では有機塩素系農薬としてkepone, p,p'-DDE, o,p'-DDDを評価したが、これらいずれも比較的強くCYP3A4を誘導することが示された。また、本研究では有機リン系農薬のIBP、およびピレスロイド系農薬のpermethrinで、有機塩素系農薬と同等、あるいはそれ以上の誘導率を示す結果となった。

【白井】

HCAを代謝活性化するCYP1A1/1A2の誘導あるいは阻害を指標として、HCA発がんを修飾する食品中化学物質を評価する系を確立することを目的として研究を行った。MeIQx肝発がんを抑制することが既に知られているBHAではCYP1A1/1A2の阻害は認められず、促進するferulic acidではCYP1A2の増加が見られたものの、同じく促進するcurcuminではCYP1A1/1A2の変動は認められなかった。MeIQx肝発がんに対しては影響しないcaffeineはCYP1A2を誘導した。他のCYPに関しても、発がんの抑制や促進と関連するものはなかった。これらの結果は、食品中化学物質によるCYP1A1/1A2の変動は、必ずしもHCA発がん修飾の指標にはならないことを示唆している。今後、CYP1A1/1A2などのphase I酵素のみでなく、解毒系のphase II酵素の変動などを総合的に検討する必要があると考えられる。今回、 β -naphthoflavoneや α -naphthoflavoneがCYP1A1を顕著に誘導したことから、HCAの発がんを修飾する可能性が示唆された。

【原田】

有機リン剤であるMPPに有機塩素剤であるDDTあるいはカーバメート剤のMPMCを組み合わせ、ラットに複合的に単回投与し、臨床症状、死亡率、自発運動量、コリンエステラーゼ活性（血漿、赤血球、脳）を指標にして相加・相乗毒性の有無を検索した。

有機塩素系の農薬であるDDTは、有機リン剤であるMPPと同じく神経毒性を発現するが、その作用点は異なり、主に神経細胞膜のイオン透過性に変化を及ぼすことによって神経毒性を引き起こすことが知られている。また、致死量未満ではChE活性の低下を生じないことが報告されている。今回のDDTとMPPの複合投与群では、それぞれの単独投与群に比べ臨床症状およびChE活性において特に差はなく、明確な複合影響は認められなかった。

カーバメート系の農薬であるMPMCは、有機リン剤のMPPと同様にChE活性を阻害することによって神経毒性を引き起こすことが知られている。今回のMPPとMPMCの複合投与群では、死亡率の増加、種々の神経症状（攣縮、震顫、縮瞳、流涎、流涙）の発現期間の延長、投与後1日目における自発運動量の大幅な減少がみられ、各剤の単独投与群に比べ明らかに毒性発現の増強効果（相加作用）が認められた。ChE活性の測定では、単独投与群に比べMPP + MPMC複合投与群において血漿ChE活性低下の回復が遅い傾向にあったが、このことを除き複合投与の影響はほとんど認められなかった。しかし、中毒症状（神経症状）の発現時間と死亡動物の発生時間から、投与後数時間以内に両剤の相加作用によって顕著なChE活性低下が惹起された可能性も考えられ、

今後投与直後から数時間以内のChE活性動態を確認する必要がある

E. 結論

① NaNO_2 とAsAはそれぞれ単独ではチャイニーズハムスター培養細胞に染色体異常を誘発しなかった。しかし、両者を同時処理した場合、染色体異常を誘発させた。また、カテコールは単品でも弱い染色体異常誘発性を示したが、亜硝酸ナトリウムと同時処理することにより、その染色体異常誘発性は増強された。これら染色体異常の誘発は、ラットを用いた長・中期発がん性試験において前胃発がんの要因になっているものと考えられる。

② NaNO_2 とカテコール併用投与によるラット前胃の発がん機構には、NOの反応によるONOO⁻の生成及びそれによる*in vivo*における細胞障害は極めて重要であることを明らかにした。カテコールのみならず、ヒドロキノンや没食子酸など種々のフェノール性化合物においても NaNO_2 との併用投与により、前胃に同様な病変が生じるため、これらとの併用でもカテコールの場合と同様な変化が発生しているものと考えられる。さらに、NOの生成は NaNO_2 の摂取に限らず、炎症性疾患などでも引き起こされることが知られており、そのような条件下でのフェノール性化合物の摂取は生体に酸化ストレスを負荷することが危惧される。

③ AsAと NaNO_2 の複合による発がんは、ヒトに存在しない前胃に限られ、発がんリスクはヒトに外挿出来ないと考えられてきたが、予備実験ではあるが、本実験の結果は、逆流性食道炎のような病的状態では、食道発がんのリスク要因になる可能性のあることを示唆するものである。

また、カテキンと NaNO_2 を併用投与し、胃発がんの対する影響を、ラット二段階発がんモデルを用いて、検討している。

④ 本研究結果から、食品中に含まれるフェノール系抗酸化物質、ニトロフラゾン、サルソリノールなど多くの化学物質は、生体内で代謝活性化を受け、金属との複合作用で酸化的にDNAを損傷することが明らかとなった。このようなDNA傷害が食餌性因子による発がんに寄与する可能性が示唆された。

⑤ グルコン酸銅は、複数の発がん物質を投与した条件下、比較的低い用量から単独でも酸化的ストレスに起因する肝細胞傷害を誘発することが判明した。カテキンは、Cu(II)の存在下でDNA損傷を誘発するため、今回の成果を基にWistar系雄性ラットを用い、ラット中期多臓器発がん性試験のプロトコルに基いたカテキンとグルコンサン銅併用による29週間の実験を行っている。

⑥ 本研究では、レポーターアッセイ法を用い、*in vitro*での農薬のCYP3A4誘導能を評価した。その結果、すべての被験農薬でCYP3A4誘導がみられた。そのうちIBP, permethrin, kepone, p,p'-DDE, o,p'-DDDで比較的高い誘導率が示された。

本研究で用いた*in vitro*CYP3A4誘導評価系は、ヒトでのCYP3A4誘導を予測でき、多種多様な化学物質を対象にできるCYP3A4誘導初期スクリーニング方法として有効であると考えられている。この評価系を用い、本研究では良好に農薬のCYP3A4誘導能を評価できたと考えられる。農薬などの生体異物による生体への影響を正確に知るためには、吸収、分布、代謝、排泄といった体内動態による影響を考慮することが必要である。したがって、今後は、薬物の体内動態を考慮した動物個体中でのCYP3A4誘導能評価が必要である。

⑦ HCAの代謝活性化酵素であるCYP1A1/1A2の、食品中化学物質による誘導や阻害は必ずしも

HCA発がんを修飾する指標とはならなかった。今後PhaseII酵素等の遺伝子発現解析を含め総合的に検討する必要があると考えられる。

⑧ 今回の実験条件下では、有機リン剤のMPPとカーバメート剤のMPMCをラットに複合投与すると相加的毒性効果が発現することが示唆された。一方、その他の複合投与群(MPPとMPPあるいはMPPと有機塩素剤のDDT)では、明確な毒性作用の増強は認められなかった。従って、今回用いた実験手法は、農薬特に有機リン剤を中心とした複合毒性を検出するためのひとつの手段として有効であることが判明した。今後、本手法を用いて同様に幼弱動物での毒性発現を検索することにより成獣と幼若動物のリン剤等の複合投与に対する感受性の差異を明らかにすることができる。また、本手法をその他の農薬の複合単回投与試験にも適用し、反復投与試験も併用して実施すれば、農薬の相加・相乗毒性に関するリスク評価に有益な毒性情報が得られるものと考えられる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
(1) 論文発表

1. M. Murata, S. Ohnishi, K. Seike, K. Fukuhara, N. Miyata, and S. Kawanishi. Oxidative DNA damage induced by carcinogenic dinitropyrenes in the presence of P450 reductase. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1750-1756 (2004).
2. K. Sakano, Y. Inagaki, S. Oikawa, Y. Hiraku, and S. Kawanishi. Copper-mediated oxidative DNA damage induced by eugenol:

- possible involvement of *O*-demethylation. *Mutat. Res.* 565, 35-44 (2004).
3. K. Seike, M. Murata, K. Hirakawa, Y. Deyashiki, and S. Kawanishi. Oxidative DNA damage induced by benz[*a*]anthracene dihydrodiols in the presence of dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1445-1451 (2004).
 4. Y. Hiraku, A. Sekine, H. Nabeshi, K. Midorikawa, M. Murata, Y. Kumagai, and S. Kawanishi. Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA damage and cell proliferation. *Cancer Lett.* 215, 141-150 (2004).
 5. H. Kobayashi, S. Oikawa, K. Hirakawa, and S. Kawanishi. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. *Mutat. Res.* 558, 111-120 (2004).
 6. M. Murata, K. Midorikawa, M. Koh, K. Umezawa, and S. Kawanishi. Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs. *Biochemistry* 43, 2569-2577 (2004).
 7. T. Takada, K. Nagata and Y. Yamazoe. Protective role of hydroxysteroid sulfotransferase in lithocholic acid-induced liver I. Differences in transactivation between rat CYP3A1 and human CYP3A4 genes by human pregnane X receptor. *Drug Metab. Pharmacokin.* 19: 103-113, 2004.
 8. M. Miyata, H. Takano, L.Q. Guo, K. Nagata and Y. Yamazoe. Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against aflatoxin B1-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. *Carcinogenesis* 25: 203-220, 2004.
 9. T. Matsubara, H.J. Kim, M. Miyata, M. Shimada, K. Nagata and Y. Yamazoe. Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309: 1282-1290, 2004.
 10. M. Shimada, R. Terazawa, Y. Kamiyama, W. Honma, K. Nagata and Y. Yamazoe. Unique properties of a renal sulfotransferase, St1d1 in dopamine metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310: 808-814, 2004.
 11. T. Shiraga, T. Niwa, Y. Ohno, A. Kagayama. Interindividual variability in 2-hydroxylation, 3-sulfation, and 3-glucuronidation of ethynylestradiol in human liver. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1900-1906, 2004.
 12. Kuribayashi, M., Asamoto, M., Suzuki, S., Hokaiwado, N., Ogawa,

K., Shirai, T. Lack of modification of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) rat hepatocarcinogenesis by caffeine, a CYP1A2 inducer, points to complex counteracting influence. *Cancer Lett.*, 2005, in press.

(2) 学会発表

1. 石井雄二, 梅村隆志, 西川秋佳, 神吉けい太, 黒岩有一, 中澤裕之, 広瀬雅雄. カテコール, 亜硝酸ナトリウム併用投与によるラット前胃発癌機構の解明. 第21回 日本毒性病理学会 (2004年1月・静岡)
2. 石井雄二, 岡野圭太, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之. フェノール性化合物とNOの反応による酸化的DNA損傷機構. フィジカルファーマフォーラム 2005 (2005年3月・静岡)
3. 石井雄二, 梅村隆志, 西川秋佳, 神吉けい太, 黒岩有一, 中澤裕之, 広瀬雅雄. アセトアミノフェン誘発マウス肝障害におけるカテコールの増強効果. 第125年会 日本薬学会 (2005年3月・東京)
4. Yuji Ishii, Rie Ito, Koichi Inoue, Koichi Saito and Hiroyuki Nakazawa. The novel free radical trapping reagent for determination of specific nitric oxide by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. PITCON 2005 (2) 05年 3月・Orland)
5. 広瀬雅雄: 食品中化学物質の複合摂取と発がん性. 平成16年度厚生労働科学 学術シンポジウム 食と安全の化学 2004年11月、2005年1月
6. 平工雄介, 関根亜樹, 鍋師裕美, 翠川薫, 村田真理子, 熊谷嘉人, 川西正祐, 発がん性合成抗菌剤ニトロフラゾンによるラジカル生成を介した酸化的DNA損傷. 第26回日本フリーラジカル学会学術集会2004年6月24-25日 山形
7. 及川伸二, 川西正祐, 特別講演: 天然抗酸化剤のヒト遺伝子損傷性に基づく安全性評価. 茶学術研究会、2004年, 静岡
8. 及川伸二, 古川絢子, 川西正祐, カテキン類による発がん機構の解明. 第11回日本がん研究会, 2004年7月15-16日, 東京
9. 及川伸二, 長尾恵美子, 坂野克久, 川西正祐, 唐辛子成分カプサイシンによる酸化的DNA損傷. 第33回日本環境変異原学会2004年11月30日~12月2日 長崎市
10. 村田真理子, 翠川薫, 川西正祐, アルコール由来物質サルソリノールによる酸化的DNA損傷と乳腺細胞増殖活性. 第75回日本衛生学会2005年3月28-30日, 新潟市
11. 栗林正伯, 朝元誠人, 鈴木周五, 外岩戸尚美, 白井智之, 薬物代謝酵素CYP1A2誘導物質であるcaffeineによるMeIQx肝発がんの修飾作用、第63回日本癌学会学術総会、福岡、2004年9月。
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

食品中化学物質の複合毒性に関する実験的研究

平成 16 年度分担研究報告書

食品中化学物質の複合による遺伝毒性に関する実験的研究

分担研究者 松元 郷六 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室長

研究協力者 阿部 美咲樹 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室

研究要旨

亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸の複合的な遺伝毒性を評価するため、チャイニーズハムスター培養細胞を用いて染色体異常誘発性を調べた。両化学物質は単独では染色体異常を誘発しなかったが、亜硝酸ナトリウム (0.5 mg/mL) とアスコルビン酸 (1.5~2.5 mg/mL) で同時に 3 時間処理した場合、有意な染色体異常誘発が認められた。さらに 10 倍濃度の亜硝酸ナトリウム (5 mg/mL) と同時処理した場合、分裂中期細胞の約 17~29% に染色体異常が認められた。同様な実験を亜硝酸ナトリウムとカテコールで行った。カテコール単独でも 50 µg/mL 以上で弱い染色体異常誘発性を示したが、亜硝酸ナトリウム (5 mg/mL) と同時に処理した場合、25 µg/mL 以上で最大約 20% の染色体異常が誘発された。一般に亜硝酸は強酸性条件下で反応性を示すと考えられているが、ここで行った実験はいずれも弱酸性~弱塩基性下であった。亜硝酸と抗酸化剤の複合による毒性発現にとって、強酸性条件は必須な環境要因ではないかもしれない。

A. 研究目的

野菜などに含まれる硝酸塩は口腔細菌によって亜硝酸となり、食品中に含まれるさまざまな物質の変異原性を増強させる事例が知られている。例えば亜硝酸と二級アミンが胃内で反応し、発がん物質であるニトロソアミンが生成されることは有名である。それに対し、抗酸化剤を加えることで、これらニトロソアミンの生成を抑制することも知られている。しかし、広瀬らは、亜硝酸とアスコルビン酸またはカテコールをラットに同時投与させたところ、前胃に強い過形成や乳頭腫が発生することを見出した^{1,2)}。アスコル

ビン酸やカテコールが発がん性に対し抑制する方向に作用せず、逆に増強する方向に働いたことは注目される現象である。本研究は、その作用メカニズムを探るため、*in vitro* 実験系を用いて検証することを目的とした。

B. 研究方法

1. 試薬

亜硝酸ナトリウム (Sodium nitrite, CAS No: 7632-00-0, MW=69, 純度 98.5%、和光純薬工業)、アスコルビン酸 (L-Ascorbic acid, CAS No: 50-81-7, MW=176, 純度 99.5%、和光純薬工業、Fig. 1)、カテコー

ル (Catechol = Pyrocatechol、CAS No: 120-80-9、MW=110、純度 99.0%、和光純薬工業、Fig. 2) はいずれも水に易溶であるため、生理食塩水 (大塚製薬) を溶媒として用いた。

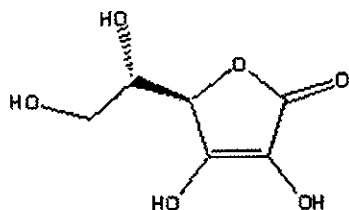


Fig. 1 アスコルビン酸の構造式

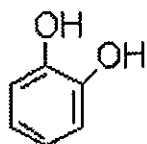


Fig. 2 カテコールの構造式

2. 細胞

チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL³⁾ を用いた。供試細胞は、37℃、5% 二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガスインキュベーターで組織培養用ファルコン 10 cm プレートを用いて培養した。培養液は、新生仔牛血清 (Gibco BRL) 10% を含むイーグル MEM 培地 (Gibco BRL、pH 指示薬フェノールレッド含有) を用いた。

3. 処理方法

組織培養用 6 cm プレートに細胞を播種した。培養液量は 3~5 mL とした。約 24~48 時間後、種々の濃度の被験物質溶液を 30~50 μ L ずつ添加した。したがって

最終培地濃度は被験物質溶液濃度の 100 分の 1 であった。被験物質添加から 3 時間後、培養液を捨て、PBS で 2 回洗浄後、通常の増殖培養液と交換した。さらに 21 時間培養した後、染色体標本を作製した。陰性対照群には被験物質の溶媒である生理食塩水のみを添加した。同時処理する場合は各被験物質溶液を 30~50 μ L ずつ添加した。その後の操作は上記と同様であった。

アスコルビン酸を添加した処理群では培養液が赤色から黄色へ変色し、培養液が酸性側へ変化したことが窺われた。よって、pH メーターを用いて培養液の正確な pH を測定した。

4. 染色体標本の作製

標本作製の 2 時間前にコルセミド (和光純薬工業) を最終濃度 0.2 μ g/mL で培養液中に添加した。細胞は 0.075M 塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、カルノア液 (メタノール: 酢酸=3:1) で固定した。各濃度あたり 2 枚のスライドグラスに滴下し、空気乾燥させた。作製した染色体標本には暗号化したコード番号を付し、2% ギムザ液 (メルク、pH 6.8 リン酸緩衝液で希釈) で約 15 分間 (室温) 染色した。

5. 染色体異常の分析

各スライドグラスあたり 100 個、各濃度あたり 200 個の中期分裂細胞を顕微鏡観察した。同時に倍数体 (染色体数 37 以上) の出現数を記録した。ギャップの判定基準は、「非染色性部分のうち、その長さが染色分体幅より短く、染色体中軸線がずれていないもの」とした。一つの核内に切断型や交換型の異常が多数観察された場合、そ