

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。1,000 個の細胞を観察し、分裂細胞の数をカウントした。

6. 染色体異常の統計解析

陰性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。

C. 研究結果

1. 亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸の染色体異常誘発性

亜硝酸ナトリウムを 0.625~5 mg/mL で 3 時間処理した。十分に高い濃度で処理したにもかかわらず細胞毒性は低く、最高濃度 5 mg/mL における分裂頻度は陰性対照より 18%低下しただけであった。陰性対照における染色体異常細胞の誘発頻度は 2.0% (ギャップのみを持つ細胞を除く) であったのに対し、亜硝酸ナトリウム処理群の異常細胞誘発頻度は 1.0~5.5% であり、有意な増加は認められなかった (Table 1)。

アスコルビン酸を 0.313~5 mg/mL で 3 時間処理した。処理濃度が上昇するに従い処理直後の培養液の pH が徐々に低下し、2.5 mg/mL では 6.4 になったが (処理 3 時間後は pH 7.3)、僅かな細胞毒性しか認められなかった。しかし、5 mg/mL 処理で pH は 4.9 になり (処理 3 時間後は pH 4.6)、ほとんどの細胞は死滅した。よって、染色体異常の解析は 2.5 mg/mL 以下の処理群で実施した。その結果、異常細胞誘発

頻度は 0~4.0% であり、陰性対照に比べて有意な増加は認められなかった (Table 1)。

2. 亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸の複合遺伝毒性

亜硝酸ナトリウム 0.5 mg/mL とアスコルビン酸 1~2.5 mg/mL を同時処理した。その結果、1.5 と 2.5 mg/mL で 7.5% の染色体異常が観察され、陰性対照に比べて有意な増加が認められた (Table 2)。処理直後の培養液の pH は 6.2~7.0 であった (処理 3 時間後は pH 6.7~7.5)。亜硝酸ナトリウム単独処理の分裂頻度を 100% とした場合、相対分裂頻度 (Relative mitotic index) は 65~89% であり、弱い細胞毒性が認められた。

亜硝酸ナトリウム濃度を 10 倍に上げて同じ実験を行った。すなわち、亜硝酸ナトリウム 5 mg/mL とアスコルビン酸 1~2.5 mg/mL を同時処理した。その結果、アスコルビン酸 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た (Table 2, Figs. 3, 4)。

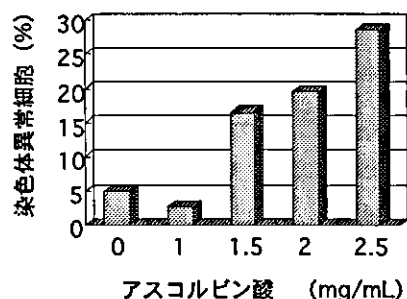


Fig. 3 亜硝酸ナトリウム 5 mg/mL とアスコルビン酸の同時処理による染色体異常の誘発

処理直後の培養液の pH は 6.1~7.0 であ

り (処理 3 時間後は pH 7.5~7.8)、亜硝酸ナトリウム 0.5 mg/mL + アスコルビン酸処理の場合とほぼ一致した。アスコルビン酸単独処理に比べ、同時処理の方がやや pH が低下する傾向が認められた。細胞が非生理的な pH 下で長時間保持されると、染色体異常を引き起こすことが知られている。しかし、通常は染色体異常を誘発しない pH 域でも染色体異常が誘発されていたことから (例えば、アスコルビン酸 1.5 mg/mL 群)、これらの異常は同時処理によって誘起されたものと言える。

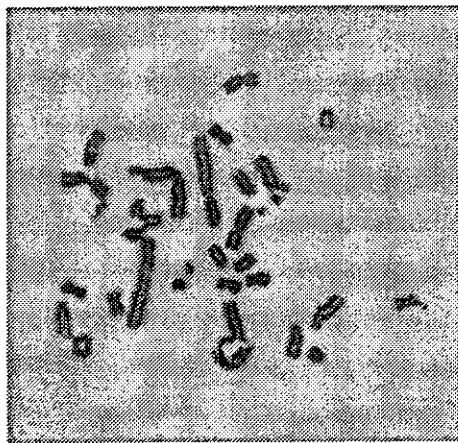


Fig. 4 亜硝酸ナトリウム 5 mg/mL とアスコルビン酸 1.5 mg/mL 同時処理によって誘発されたチャイニーズハムスター培養細胞の染色体異常

3. 亜硝酸ナトリウムとカテコールの複合遺伝毒性

カテコール自身の染色体異常誘発性を調べるために予備実験を行い、12.5~800 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で CHL 細胞に 3 時間処理した。その結果、400 $\mu\text{g/mL}$ 以上では極めて強い細胞毒性が現われた (データは示さない)。よって、200 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で染

色体異常の解析を行った。その結果、50 $\mu\text{g/mL}$ 以上で染色体異常が増加し、100 $\mu\text{g/mL}$ では 14.0% の中期細胞に染色体異常が観察された。また、200 $\mu\text{g/mL}$ では倍数体の出現頻度が有意に増加した (Table 3)。

次に、亜硝酸ナトリウムと共存した場合にカテコールの染色体異常誘発性がどのように変化するかを調べるため、亜硝酸ナトリウム 5 mg/mL とカテコール 12.5~200 $\mu\text{g/mL}$ を同時に 3 時間処理した。すると、25 $\mu\text{g/mL}$ 以上で染色体異常が明らかに増加し、50 および 100 $\mu\text{g/mL}$ では中期細胞の約 20% に染色体異常が観察された (Table 3, Fig. 5)。この結果は、亜硝酸ナトリウム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ことを明らかに示している。

カテコール 200 $\mu\text{g/mL}$ では亜硝酸ナトリウム共存の有無にかかわらず、100 $\mu\text{g/mL}$ に比べて染色体異常頻度が低下した。その理由として、強い細胞毒性により染色体異常を持つ細胞の細胞周期が伸び、染色体異常の出現ピークが後ろへシフトしているためであると推測される。

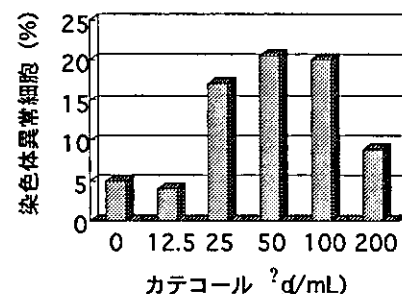


Fig. 5 亜硝酸ナトリウム 5 mg/mL とカテコールの同時処理による染色体異常の誘発

D. 考察

1. 亜硝酸ナトリウムの染色体異常誘発性

CHL 細胞に亜硝酸ナトリウムを 0.25 mg/mL 以上の濃度で連続24時間あるいは48時間処理を行った場合、染色体異常が誘発される⁴⁾。しかし、通常の食生活において体内の亜硝酸濃度がこのような高濃度で24時間以上も維持されることは考えにくい。ある食品を摂取し、その食品中に含まれる化学物質が体内で高濃度になる期間は、一般に数時間以内であると考えられる。そこで、本実験では被験物質の処理時間を3時間に設定した。その結果、亜硝酸ナトリウム 5 mg/mL の高濃度においても染色体異常の誘発は認められなかった。

亜硝酸ナトリウムを 0.3% (3 mg/mL) の濃度で含んだ飲水をラットに長期間飲ませると、前胃に過形成が発生することから、亜硝酸のプロモーター作用が示された¹⁾。亜硝酸ナトリウムは Ames 試験や in vivo 小核試験でも陽性を示すことから^{5,6)}、弱いイニシエーション作用も持ち合わせていると考えられる。

2. アスコルビン酸の染色体異常誘発性

アスコルビン酸も亜硝酸ナトリウムと同様、単品では染色体異常を誘発しないことが明らかとなった。アスコルビン酸は連続24または48時間処理でも染色体異常の誘発は認められず⁴⁾、Ames 試験でも陰性であることから⁷⁾、それ単独で変異原性を有する可能性はほとんどないものと考えられる。

3. 亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸の複合遺伝毒性

亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸を同時処理すると、染色体異常の誘発が明らかに認められた。それぞれ単独では染色体異常を誘発させないものが、組み合わせることによって誘発されたことから、両者で何らかの相互作用があった事は間違いない。酸性条件下で亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸を反応させると dehydroascorbic acid が生成される。しかし、ここで行った実験はいずれも処理中の培養液の pH は弱酸性であった。また、dehydroascorbic acid の変異原性についての報告はない。よって、dehydroascorbic acid が染色体異常の要因とは考えにくい。

それ以外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⁸⁾。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 (この点については、本事業の中澤裕之博士らの分担研究報告書を参照)。

亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸の同時投与によって誘発されたラットの胃における前がん病変と、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。なぜなら、同時投与によって胃内組織細胞に染色体異常が誘発されると、それにより細胞の遺伝的安定性が大きく崩れる。そうなれば、ある一定の時間を経て核の異型が誘発されたり、細胞増殖活性が亢進したりするからである。前がん病変は前胃にのみ観察され、腺胃に

はみられていないが^{1,2,8)}、これは、染色体異常誘発の要因物質が、腺胃を覆う粘液でブロックあるいは消去されるために、細胞が直接的にダメージを受けにくいためであると推測する。

本研究では亜硝酸ナトリウム処理濃度を 7.2 mM (0.5 mg/mL) または 72 mM (5 mg/mL) に設定した。しかし、人は平均して亜硝酸を唾液から 1 日約 10mg、食品から約 1.5mg 摂取しており、胃内の亜硝酸濃度は 50 μ M 以下と言われている⁹⁾。このような低濃度で長期間処理を行った場合も染色体異常が誘発するかどうかは確認されていない。今後の研究課題である。

一方、アスコルビン酸が胃内で高濃度になる確率は十分に高い。人は主に野菜や果実などからアスコルビン酸を摂取しているが、その他にサプリメントと称して健康ドリンク剤を飲用する人々も多い。それらにはアスコルビン酸を 2 mg/mL 前後含有する商品が多い。これらを飲用することにより、一時的に胃内のアスコルビン酸濃度が本実験で染色体異常を誘発した濃度 (1.5~2.5 mg/mL) に達することは容易に想像できる。

4. 亜硝酸ナトリウムとカテコールの複合遺伝毒性

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^{10, 11)}。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 (Table 3)。しかし、Ames 試験では陰性であることから¹²⁾、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。事実、*in vitro* 小核試験では染色体不分離の痕跡を示す動原体含有小核が観察されており¹⁰⁾、また、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示唆される。ラットに亜硝酸ナトリウムとカテコールを同時投与した場合も前胃に過形成や乳頭腫が誘発される¹⁾。その原因の一つには、このような染色体異常誘発が関与しているものと推測される。

フェノールと亜硝酸の化学反応については既に調べられている。フェノールは酸性下で亜硝酸と反応し、*in vitro* で変異原性を示す *p*-diazquinone が形成される¹³⁾。同様に、カテコールは亜硝酸と反応して変異原活性を持つ diazo 化合物が形成されることも知られている¹⁴⁾。また、ここでも亜硝酸との反応により NO が発生することが知られている。これらのいずれかが、あるいは複合的にカテコールの染色体異常誘発の増幅に関与していることも考えられる。しかし、本研究において実施したカテコール+亜硝酸ナトリウム同時処理は pH 中性域で実施されており、上述した diazo 化合物や NO が生成することは考えにくい。あるいは、中性条件下でもある程度生成されるかもしれない。この点も今後の検討項目である。

E. 結論

亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸はそれぞれ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・中期発がん性研究において前胃で認められた過形成等の発生の要因になっているものと考えられる。

F. 引用文献

- 1) Hirose, M., Tanaka, H., Takahashi, S., Futakuchi, M., Fukushima, S. and Ito, N. (1993) Effects of sodium nitrite and catechol, 3-methoxycatechol, or butylated hydroxyanisole in combination in a rat multiorgan carcinogenesis. *Cancer Res.*, 53: 32-37.
- 2) Hirose, M., Fukushima, S., Hasegawa, R., Kato, T., Tanaka, H. and Ito, N. (1990) Effects of sodium nitrite and catechol or 3-methoxycatechol in combination on rat stomach epithelium. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81: 857-861.
- 3) Koyama, H., Utakoji, T. and Ono, T. (1970) A new cell derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *Gann*, 61: 161-167.
- 4) 染色体異常試験データ集 改訂 1998 年版 (1999) 監修 祖父尼俊雄、株式会社 L.I.C.
- 5) National Toxicology Program (2001) Toxicology and carcinogenesis studies of sodium nitrite (CAS NO. 7632-00-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies) *Natl. Toxicol. Tech. Rep. Ser.*, 495: 7-273.
- 6) Luca, D., Luca, V., Cotor, F. and Raileanu, L. (1987) In vivo and in vitro cytogenetic damage induced by sodium nitrite. *Mutation Res.*, 189: 333-339.
- 7) 微生物を用いる変異原性試験データ集 (1991) 監修 石館基、株式会社 L.I.C.
- 8) Yoshida, Y., Hirose, M., Takabe, K., Kimura, J. and Ito, N. (1994) Induction and promotion of forestomach tumors by sodium nitrite in combination with ascorbic acid or sodium ascorbate in rats with or without N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine pre-treatment. *Int. J. Cancer*, 56: 124-128.
- 9) 津田充宥、倉島由紀子 (1991) 亜硝酸および窒素酸化物との相互作用による変異原の生成、修飾とその抑制、環境変異原研究、13: 31-52.
- 10) Robertson, M.L., Eastmond, D.A. and Smith, M.T. (1991) Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Res.*, 249: 201-209.
- 11) Ciranni, R., Barale, R., Ghelardine, G. and Loprieno, N. (1988) Benzene and the genotoxicity of its metabolites. II. The effect of the route of administration on the micronuclei and bone marrow depression in mouse bone marrow cells. *Mutation Res.*, 209: 23-28.
- 12) Yoshida, D. and Fukuhara, Y. (1983) Mutagenicity and co-mutagenicity of

catechol on Salmonella. Mutation Res.,
120: 7-11.

- 13) Kikugawa, K. and Kato, T. (1988)
Formation of a mutagenic diazoquinone
by interaction of phenol with nitrite.
Food Chem. Toxicol., 26: 209-214.
- 14) Oshima, H., Friesen, M., Malaveille, C.,
Brouet, I., Hautefeuille, A. and Bartsch,
H. (1989) Formation of direct-acting
genotoxic substances in nitrosated
smoked fish and meat products:
identification of simple phenolic
precursors and phenyldiazonium ions
as reactive products. Food Chem.
Toxicol., 27: 193-203.

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Table 1 No induction of chromosomal aberrations in Chinese hamster cells treated with sodium nitrite or ascorbic acid for 3 h

Treatment	Concentration (mg/mL)	No. of cells scored	Polyploid cells	No. of cells with structural chromosome aberrations										Mitotic index (%)	Relative mitotic index (%)	pH ^a
				Gap	Chromatid type			Chromosome type			Others	Total				
					ctb	cte	csb	cse	Fragmentation	+g		-g				
Physiological saline	1% (control)	200	0 (0)	3	1	0	0	0	0	0	0	7 (3.5)	4 (2.0)	6.8	100	8.1
	0.625	200	1 (0.5)	4	1	0	0	1	0	0	0	6 (3.0)	2 (1.0)	6.3	93	-
	1.25	200	2 (1.0)	2	0	2	2	0	0	0	0	7 (3.5)	5 (2.5)	5.6	82	-
	2.5	200	2 (1.0)	0	1	2	0	1	0	0	0	4 (2.0)	4 (2.0)	6.4	94	-
	5.0	200	2 (1.0)	0	0	8	3	0	0	0	0	11 (5.5)	11 (5.5)	5.6	82	-
Ascorbic acid	0.313	200	1 (0.5)	1	2	0	1	0	0	0	0	4 (2.0)	3 (1.5)	5.1	75	7.7
	0.625	200	0 (0)	4	0	2	0	1	0	0	0	7 (3.5)	3 (1.5)	5.5	81	7.5
	1.25	200	2 (1.0)	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0)	4.7	69	7.0
	2.5	200	3 (1.5)	0	3	4	1	0	0	0	0	8 (4.0)	8 (4.0)	4.8	71	6.4
	5.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ctb, chromatid break ; cte, chromatid exchange ; csb, chromosome break ; cse, chromosome exchange ; +g, including gaps ; -g, excluding gaps

The figures shown in parentheses are percentages.

^a : pH of the medium immediately after treatment

Table 2 Synergistic effects of sodium nitrite and ascorbic acid on cytogenetic toxicity in Chinese hamster cells

NaNO ₂ (mg/mL)	Treatment		No. of cells scored	Polyploid cells	No. of cells with structural chromosome aberrations							Mitotic index (%)	Relative mitotic index (%)	pH ^a
	Ascorbic acid (mg/mL)	Gap			Chromatid type	Chromosome type	Fragmentation	Others	Total					
		ctb	cte	csb	cse		+g	-g						
0.5	0 (control)	2	0	2	1	0	0	0	7 (3.5)	5 (2.5)	7.2	100	8.0	
	1.0	1	8	1	1	0	0	0	10 (5.0)	9 (4.5)	6.4	89	7.0	
	1.5	4	8	6	2	1	0	0	18 (9.0)	15 (7.5) *	4.7	65	6.7	
	2.0	2	7	2	1	0	1	1	14 (7.0)	11 (5.5)	4.8	67	6.3	
	2.5	1	10	1	2	0	0	0	16 (8.0)	15 (7.5) *	5.0	69	6.2	
5.0	0 (control)	3	5	2	1	0	0	0	11 (5.5)	10 (5.0)	6.7	100	8.3	
	1.0	5	3	0	0	0	0	0	10 (5.0)	5 (2.5)	5.4	81	7.0	
	1.5	8	21	6	1	0	3	3	39 (19.5)	33 (16.5) ***	5.1	76	6.8	
	2.0	19	28	2	0	1	2	2	46 (23.0)	39 (19.5) ***	5.2	78	6.1	
	2.5	25	38	6	2	1	1	1	66 (33.0)	57 (28.5) ***	2.3	34	6.1	

NaNO₂, sodium nitrite

ctb, chromatid break ; cte, chromatid exchange ; csb, chromosome break ; cse, chromosome exchange ; +g, including gaps ; -g, excluding gaps
The figures shown in parentheses are percentages.

^a : pH of the medium immediately after treatment

*, ** : Significantly different from the concurrent control at $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.001$, respectively.

Table 3 Synergistic effects of sodium nitrite and catechol on cytogenetic toxicity in Chinese hamster cells

Treatment		No. of cells scored	Polyploid cells	No. of cells with structural chromosome aberrations										Mitotic index (%)	Relative mitotic index (%)
NaNO ₂ (mg/mL)	Catechol (µg/mL)			Gap	Chromatid type		Chromosome type		Fragmentation	Others	Total				
				ctb	cte	csb	cse			+g	-g				
0	0 (control)	200	1 (0.5)	0	1	0	1	0	0	0	3 (1.5)	2 (1.0)	5.1	100	
	12.5	200	0 (0)	3	4	1	1	0	0	9 (4.5)	7 (3.5)	6.2	122		
	25	200	2 (1.0)	3	5	3	0	0	1	10 (5.0)	9 (4.5)	6.2	122		
	50	200	1 (0.5)	5	11	1	2	0	0	15 (7.5)	15 (7.5)	3.1	61		
	100	200	1 (0.5)	7	18	4	1	1	6	31 (15.5)	28 (14.0)	1.5	29		
	200	200	18 (9.0) ^{***}	3	4	1	2	0	3	21 (10.5)	12 (6.0) [*]	1.1	22		
5.0	0 (control)	200	1 (0.5)	3	5	2	1	0	0	11 (5.5)	10 (5.0)	6.7	100		
	12.5	200	3 (1.5)	1	6	2	1	0	0	11 (5.5)	8 (4.0)	5.9	88		
	25	200	3 (1.5)	10	25	6	1	2	0	35 (17.5)	34 (17.0) ^{***}	4.9	73		
	50	200	3 (1.5)	12	32	4	2	1	2	42 (21.0)	41 (20.5) ^{***}	2.5	37		
	100	200	7 (3.5)	8	26	2	0	3	8	42 (21.0)	40 (20.0) ^{***}	1.7	25		
	200	200	9 (4.5) [*]	7	12	2	2	0	0	24 (12.0)	18 (9.0) ^{***}	2.1	31		

NaNO₂, sodium nitrite

ctb, chromatid break ; cte, chromatid exchange ; csb, chromosome break ; cse, chromosome exchange ; +g, including gaps ; -g, excluding gaps

The figures shown in parentheses are percentages.

^{*}, ^{**}, ^{***} : Significantly different from the control at $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, and $p \leq 0.001$, respectively.

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金
(医薬品安全総合研究事業) 分担研究報告書

食品中化学物質の複合反応と反応生成物に関する研究

分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学	薬品分析化学教室
研究協力者	斉藤 貢一	星薬科大学	薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学	薬品分析化学教室
	岩崎 雄介	星薬科大学	薬品分析化学教室
	石井 雄二	星薬科大学	薬品分析化学教室

研究要旨

食肉等の発色剤として広く用いられている亜硝酸 (NaNO_2) と ascorbic acid (AsA) や catechol, gallic acid などのフェノール性抗酸化物質をラットに併用投与することで、前胃に強い細胞増殖活性がおきることが知られている。しかし、これらの機序は未だ明らかにされていない。

実験 1 では *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。

また、実験 2 では酸性条件下において NaNO_2 から生成する NO に着目し、*in vitro* の実験系において catechol 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。他方、*in vivo* 実験系では、飼料に 0.8% catechol を、飲水に 0.2% NaNO_2 を混ぜて、雄 6 週齢の 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、catechol と NaNO_2 の併用投与による発がん増強メカニズムには NO によって引き起こされる DNA の酸化的損傷が関与しているという新たな知見を得た。

A. 研究目的

近年、茶葉に含まれるカテキン類のように、植物等に含まれる抗酸化物質の作用が注目を集め、食品のみならず化粧品などにも添加されている。他方、活性酸素種

(reactive oxygen species : ROS) は、動脈硬化、心疾患、老化や発がんといった種々の疾病に関与していることが明らかとなっており、ROS を消去する抗酸化物質の摂取はこれら疾病の予防につながると考えられている。

このような理由から、従来抗酸化物質は安全であり、生物にとって有用なものであると信じられてきた。しかし、強力な抗酸化物質であり、酸化防止剤として使用されていた butylated hydroxyanisole (BHA) がラット前胃に扁平上皮癌を誘発する¹⁾ことが報告されている。さらに BHA 以外にも caffeic acid, sesamol 及び catechol などのフェノール性抗酸化物質も発がん性を示す²⁾ことが明らかとなっており、抗酸化剤の安全性についてはさらに詳細な研究が要求されている。

一方、NaNO₂ はハムやソーセージなど食肉の発色剤として用いられているが、NaNO₂ 自体には反復投与毒性試験、発がん性試験において毒性は認められていない³⁾。しかしながら、NaNO₂ は魚肉などに含まれる第二級アミンと酸性条件下つまり胃内で反応して、強い発がん物質であるニトロソアミンを生成することが知られている⁴⁾。このニトロソアミン生成は AsA, gallic acid, α -tocopherol といった種々の抗酸化物質により抑制される^{5, 6)}が、近年、NaNO₂ と ascorbic acid や hydroquinone, catechol, gallic acid などのフェノール性抗酸化物質をラットに併用投与することで、前胃に強い細胞増殖が発生することが明らかとなった⁷⁾。特に catechol と NaNO₂ の併用投与において、*N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

(MNNG) によるイニシエーション後では明らかに前胃発がんを増強させ、イニシエーションなしでも前胃乳頭腫を引き起こす^{8, 9)}ことが知られているが、その機序は未だ明らかとなっていない。

そこで実験 1 では AsA と NaNO₂ 併用投与によるラット前胃発がん機構の解明を目

的とし、*in vitro* 実験系で酸性条件下すなわち胃内において、NaNO₂ と AsA の反応により生成する NO の検出を電子スピン共鳴法 (electron spin resonance : ESR) で行った。実験 2 では、カテコールと NaNO₂ 併用投与によるラット前胃発がん機序の解明を目的とし、NaNO₂ が単独でも酸性条件下において nitric oxide (NO) を生成する¹⁰⁾ことに着目し、NO と catechol のラジカル反応について検討した。*in vitro* の実験系では、電子スピン共鳴法 (electron spin resonance : ESR) を用いたラジカル種の検出及びその生成機序の解明を行った。*in vivo* の実験系では、雄 6 週令の F344 ラットを用い DNA 酸化損傷及び病理組織学的検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

NaNO₂, ascorbic acid, catechol, ferrous sulfate 及び hydrochloric acid は和光純薬工業社製 (特級) を用いた。ESR による NO 及び ROS の検出にはスピントラッピング剤として *N*- (dithiocarboxy) sarcosine (DTCS) -Na, 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (Carboxy-PTIO) 及び 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) (同仁化学研究所社製) を使用した。ONOO[•] の測定に用いた dihydrorhodamine (DHR) 及び rhodamine 123 は Sigma chemical 社製を用いた。また *in vitro* の全ての実験において NO 発生剤には、1-hydroxy-2-oxo-3-(*N*-methyl-3-aminoethyl)-3-methyl-1-triazene (NOC 7) を使用し、キレート剤には Diethyltriaminepentaacetic acid (DTPAC) (Sigma chemical 社製) を用

いた。DNA の抽出に用いた nuclease P1 はヤマサ醤油株式会社製を、alkaline phosphatase は sigma chemical 社製を使用した。また、精製水は Millipore 社製の Milli-Q gradient-A10 EDS ポリッシャー付き精製水装置を用いて調製した。

B-2. 実験 1

B-2-1. ESR 測定条件

ESR 装置は日本電子社製 JES-FR30 を用いた。測定条件を以下に示す。

Magnetic field, 330.7 ± 5 mT

Power, 9.0 mW

Frequency, 16 GHz

Modulation width, 0.063 mT

Gain, 500

Sweep time, 0.5 min

Time constant, 0.03 sec.

B-2-2. NO の検出

NO のスピントラッピング剤には、DTCS-Na を用いた。Fe(DTCS)₂ 錯体はリン酸塩緩衝液 (100 mM, pH7.4) 中に ferros sulfate と DTCS-Na を 5:1 の割合で溶解、混合し用事調製した。0.1 mL の 1 mM Fe(DTCS)₂ を pH1.5 hydrochloric acid に添加した後、0.1 mL の 50, 100 及び 200 mM の Ascorbic acid と、0.1 mL の 0.5 及び 1.0 mM の NaNO₂ を 15 秒間隔でそれぞれ加えた。

この試料を ESR 測定用 200 μ L 扁平石英セルに移し、1 分後に ESR 測定を行った。

B-3. 実験 2

B-3-1. ESR 測定条件

Magnetic field, 335.0 ± 5 mT

Power, 9.0 mW

Frequency, 16 GHz

Modulation width, 0.063 mT

Gain, 500

Sweep time, 0.5 min

Time constant, 0.03 sec.

B-3-2. 動物試料及び飼育条件

5 週齢の F344 ラット雄各 168 匹を日本 SLC(株)より購入し、約 1 週間の馴化飼育の後、各群 42 匹ずつ 4 群に配した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時間、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。動物は、ポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹又は 3 匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス(株)のソフトチップを用い、週 2 回交換した。また、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

B-3-3. 動物実験操作

6 週齢の雄 F344 ラット全 168 匹を対照群、NaNO₂ 飲水投与群、catechol 混餌投与群及び NaNO₂、catechol 併用投与群の計 4 群に配した。飼料にはオリエンタル MF 粉末 (オリエンタル酵母社製) を用い、catechol 投与群には catechol を 0.8% 混じて投与した。NaNO₂ 投与群には NaNO₂ 0.2% を水道水に混じて投与した。投与は 24 時間の絶食後開始し、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。採取した前胃は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。8-hydroxydeoxyguanosine (8-oxodG) 測定用のサンプル採取は投与後 12

時間及び 2 週間で、サンプルは採取後ただちに液体窒素により凍結し、測定まで -80°C で保存した。前胃粘膜は非常に微量であることから、3 匹分を 1 サンプルとして各群及び時間で 5 サンプルずつ採取した。

B-3-4. Catechol と NO の反応確認

catechol に 1 mM DTPAC を含むリン酸塩緩衝液 (100 mM, pH7.4) と NO 発生剤である 0.1 mM NOC 7 を加え、catechol の最終濃度を 0.1 mM 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。紫外可視吸光光度計は島津製作所社製 UV-1600PC を用いた。

B-3-5. ROS の検出

スピントラッピング剤に DMPO を用い、ESR により ROS を検出した。0.1 mL catechol を 1 mM DTPAC 含有のリン酸塩緩衝液 (100 mM, pH 7.4) に添加した後、5 μL DMPO と 0.1 mL の 1 mM NOC 7 を加えて混合した。この試料を ESR 測定用 200 μL 扁平石英セルに移し、1 分後から 60 分まで 10 分間隔で ESR 測定を行った。

B-3-6. ONOO⁻ の測定

ONOO⁻ の測定は Neil¹¹⁾ 及び Benoit¹²⁾ らの方法を参考にし、ONOO⁻ の生成は rhodamine の生成量で測定した。dimethylformamide に溶解した DHR (28.9 mM) は使用するまで -20°C で保存した。1 mM DTPAC, 3 mM DHR, 10 μM catechol, 0.1 mM NOC 7 をリン酸緩衝液 (100 mM, pH7.4) に加え反応溶液とした。24 時間インキュベーションの後、マイクロプレートリーダー (Model 550, Bio

Rad 社製) を用い、490 nm の吸光度測定を行った。また、hydroxyl radical (-OH) の消去剤である mannitol (1 mM) を添加したものを対照群とし、NO 発生剤のみを添加したものをブランクとした。

B-3-7. 8-oxodG 測定

前胃粘膜 DNA 中の 8-oxodG の測定は Nakae¹³⁾ らの方法を参考にした。DNA は DNA エキストラクター WB キット (和光純薬社製) を用いて抽出し、nuclease P1 と alkaline phosphatase により消化した。得られた試料は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) / 紫外・可視吸光光度検出器 (UV) / 電気化学検出器 (ED) により測定を行った。HPLC ポンプは Gynkotek 480 (Gynkotek 社製) を、カラムは ULTRASPHERE ODS (4.6 x 240 mm, 5 μm , BECKMAN COULTER 社製) UV は GILSON 118 (GILSON 社製), ED は Coulochem II (ESA 社製) を使用した。移動相には 10 mM リン酸一ナトリウム塩 / methanol = 96 / 4 (v/v) (1.0 mL/min) を送液し、分析カラムで分離した後 deoxyguanosine (dG) を UV 290 nm で、8-oxodG を ED 300 mV で検出し、8-oxodG 値は 8-oxodG / 10^5 dG 量として算出した。

B-3-8. 統計学的処理法

8-oxodG 値については Student's *t* 検定及び Welch's *t* 検定を用い、対照群と被験物質投与群との間で有意差検定を行った。

B-4. 倫理面への配慮

動物実験については、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い指針に基づいて

実施された。

C. 研究結果

C-1. 実験 1

ESR による NO の検出には Fe(DTCS)₂ をスピントラップ剤として用いた。

Fe(DTCS)₂-NO の標準的なスペクトルを Fig. 1-a に示す。NaNO₂ 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、Fe(DTCS)₂-NO のスペクトルが観察された (Fig. 1-d)。また、そのスペクトル強度は AsA, NaNO₂ それぞれの濃度に依存して増加した (Fig. 2)。NaNO₂ 及び AsA のみでは Fe(DTCS)₂-NO のスペクトルはみられなかった (Fig. 1-b-c)。

C-2. 実験 2

C-2-1. *in vitro* 実験

NOC 7 を用い、NO と catechol の反応による UV スペクトルの変化を測定した結果、catechol の極大吸収である 250 nm 付近の吸収は経時的に減少し、同時に 370 nm 付近に新たな吸収が観察された (Fig. 3)。

ESR による ROS の検出では DMPO をスピントラップ剤として用いた。DMPO の標準スペクトルを Fig. 4-a に示す。catechol と NOC 7 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 (Fig. 4-b-e)。

ONOO[•] の生成は、catechol と NOC 7 をインキュベーションした際の rhodamine 生成量から、ブランクとして NOC 7 のみをインキュベーションした際の rhodamine 生成量を差し引くことによって算出した。その結

果、catechol 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 (Table. 1)。

C-2-2. *in vivo* 実験

0.2% NaNO₂ と 0.8% catechol 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 値を Fig. 5 に示す。8-oxodG 値はどちらの時間においても併用投与群において対照群に比べ有意な上昇がみられた (Fig. 5)。Table 2 には 0.2% NaNO₂ と 0.8% catechol を投与後 2 週間までのラット前胃の病理組織学的検索の結果を示す。併用投与群は、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た (Fig. 6-a)。24 時間では表皮の過形成が、1 週及び 2 週では潰瘍及びびらん性病変と炎症性細胞の浸潤が認められた (Fig. 6-b)。それに対して、他の群においては変化が認められなかった (Fig. 6-c, d)。

D. 考察

実験 1 では、AsA と NaNO₂ 併用投与によるラット前胃発がん機構の解明を目的として *in vitro* の実験を行った。その結果、酸性条件下において NaNO₂ と AsA が反応することで NO が生成することを確認した。またその生成量は NaNO₂ と AsA それぞれの濃度に依存して増加した。NaNO₂ は単独でも酸性条件下において NO を生成することが知られている¹⁴⁾が、本実験で使用した NaNO₂ 濃度では、Fe(DTCS)₂-NO スペクトルは見られなかった。つまり AsA との併用に

より、その還元力によって NaNO_2 からの NO 生成が増加するものと考えられる。これらの結果から、 NaNO_2 と AsA 併用投与によるラット前胃発がん機構には NO が関与していることが示唆された。

実験 2 では、Catechol と NaNO_2 併用投与によるラット前胃発がん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 が酸性条件下つまり胃内において NO を生成することに着目し、NO と catechol のラジカル反応のついて種々検討した結果、この反応により catechol 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。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 catechol 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 \cdot 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 \cdot の測定を行った。DHR は ONOO \cdot 、 $\cdot\text{OH}$ 、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。Catechol と NOC 7 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 10 mM 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 \cdot 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 \cdot に起因することが明らかとなった。ONOO \cdot は NO よりも反応性が高く、DNA の酸化¹⁵⁾や脂質の過酸化¹⁶⁻¹⁸⁾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構に ONOO \cdot による DNA の酸化的損傷が関与することが示唆された。

in vivo 実験系では NaNO_2 、catechol 単独投与群において、ラット前胃粘膜 DNA 中の 8-oxodG 値及び病理組織に変化は見られなかったのに対し、併用投与群では大きな変化が見られた。併用投与開始 2 週目における病理組織では潰瘍及びびらん性病変の周囲に炎症性細胞の浸潤が観察された。このことから 2 週目における 8-oxodG 値の異常な上昇はこれらの細胞によって誘導される ROS に起因する可能性も考えられた。しかし、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 catechol 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。これらの結果は我々の示した *in vitro* の結果を強く支持するものと考えられる。

本実験結果から catechol、 NaNO_2 併用投与によりラット前胃において Fig. 5 に示す反応が生じ、生成する ONOO \cdot によって DNA の酸化的損傷及び種々の病変が生じたと考えられる。

E. 結論

本研究では、抗酸化物質と NaNO_2 の反応によるラジカル反応及び酸化的ストレスについて検討を行った。近年 NO と $\cdot\text{O}_2^-$ の反応により生成する ONOO \cdot が引き起こす酸化的ストレスが注目を集めており、NO の過剰

な生成は結果として DNA の酸化的損傷や脂質の過酸化を引き起こすことが知られている。これらのことから、強力な抗酸化物質として知られている AsA と NaNO_2 の反応による NO の生成は極めて重要な結果であり、ラット前胃発がん機構に関与するものと考えられる。

また、フェノール性化合物の酸化によるセミキノンラジカル及び ROS の生成は、特に金属によって引き起こされることが知られている。本研究では NaNO_2 と catechol 併用投与によるラット前胃の発がん機構が、NO に起因することを明らかにした。また、これらの反応は種々のフェノール性化合物においても生じるものと考えられる。in vitro においては種々のフェノール性化合物の毒性が NO によって増強するという報告がある¹⁹⁾ことや、 NaNO_2 との併用投与によるラット前胃への障害は hydroquinone, gallic acid などでも報告されており⁷⁾、これらについても同様の機序に関与す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的ストレスを負荷することが危惧される。

本研究で明らかとなった AsA と NaNO_2 の反応による NO 生成、catechol と NO の反応による ONOO⁻ の生成及びそれによる in vivo における組織障害は極めて重要であり、抗酸化物質の安全性についてさらに研究を進めていく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

- 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. PITTCON 2005 (2005 年 3 月・Orland)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

【参考文献】

- 1) Ito N., Fukushima S., Hagiwara A., Shibata M., Ogiso T.: Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats, *J Natl Cancer Inst.*, 70(2), 343-352 (1983)
- 2) Hirose M., Fukushima S., Shirai T., Hasegawa R., Kato T., Tanaka H.,

- Asakawa E., Ito N.: Stomach carcinogenicity of caffeic acid, sesamol and catechol in rats and mice, *Jpn J Cancer Res.*, 81(3), 207-212 (1990)
- 3) Inai K.; Aoki Y.; Tokuoka S.: Chronic toxicity of sodium nitrite in mice, with reference to its tumorigenicity, *Gann.*, 70, 203-208 (1979)
 - 4) Mirvish S. S.: Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31, 325-351 (1975)
 - 5) Omori Y., Takahashi A., Ohno Y., Ishiwata H., Tanimura A.: Drug-nitrite interactions: species and sex differences in the formation of dimethylnitrosamine and its effects on the hepatic enzymes activities, *Arch Toxicol Suppl.*, (2), 349-354 (1979)
 - 6) Kalus W. H., Filby W, G.: Inhibition of nitroamine formation by ascorbic acid: participation of free radicals in its anaerobic reaction with nitrite, *Experientia.*, 36(2), 147-149 (1980)
 - 7) Kawabe M., Takaba K., Yoshida Y., Hirose M.: Effects of combined treatment with phenolic compounds and sodium nitrite on two-stage carcinogenesis and cell proliferation in the rat stomach, *Jpn. J. Cancer Res.*, 85, 17-25 (1994)
 - 8) Hirose M., Kurata Y., Tsuda H., Fukushima S., and Ito N.: Catechol strongly enhances rat stomach carcinogenesis: a possible new environmental stomach carcinogen, *Jpn. J. Cancer Res.*, 78, 1144-1149 (1987)
 - 9) Hirose M., Tanaka H., Takahashi S., Futakuchi M., Fukushima S., and Ito N.: Effects of sodium nitrite and catechol, 3-methoxycatechol, or butylated hydroxyanisole in combination in a rat multiorgan carcinogenesis model, *Cancer Res.*, 53, 32-37 (1993)
 - 10) Alexandre S., Peroammam K., Jay L. Z.: Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems, *Arch. Biochem. Biophys.*, 357, 1-7 (1998)
 - 11) Neil W. K., James A. R., Harry I., Joseph S. B.: Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, *Free radic. Biol. Med.*, 16, 149-156 (1994)
 - 12) Benoit P., Andre M. C., Suzanne K. B., Sophie B., Rosalie L., Jean-Paul J. G.: In vitro generation of peroxynitrite by 2- and 4-hydroxyestrogens in the presence of nitric oxide, *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 547-554 (2001)
 - 13) Nakae D., Mizumoto Y., Kobayashi E., Noguchi O., Konishi Y.: Improved genomic / nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amount of rat liver tissue, *Cancer Lett.*, 97, 233-239 (1995)
 - 14) Alexandre S., Periannan K., and Jay L. Z.: Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems, *Arch. Biochem. Biophys.*, 357, 1-7 (1998)
 - 15) Hattori Y., Nishigori C., Tanaka T., Uchida K., Nikaide O., Osawa T., Hiai H., Imamura S., Toyokuni S.: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic

- ultraviolet B exposure, *J Invest Dermatol.*, 107, 733-737 (1996)
- 16) Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman BA.: Peroxynitrite- induced membrane lipid peroxidation : the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *Arch Biochem Biophys.*, 288, 481-487 (1991)
 - 17) Darley-Usmer V. M., Hogg N., O'Leary V. J., Wilson M. T., Moncada S.: The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein, *Free Radic Res Commun.*, 17, 9-20 (1992)
 - 18) Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalanaraman B., Barnes S., Kirk M., Freeman BA.: Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite -dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives, *J Biol Chem.*, 269, 26066-26075 (1994)
 - 19) Amparo U. M., Pilar L-G. M., Carmen G., Jaime P., Alicia M., Guadalupe H., Juan C. E., Jose-Enrique O' . C., and Manuel B.: Nitric oxide promotes strong cytotoxicity of phenolic compounds against *Escherichia coli*: the influence of antioxidant defenses, *Free Radic. Biol Med.*, 35, 1373-1381 (2003)

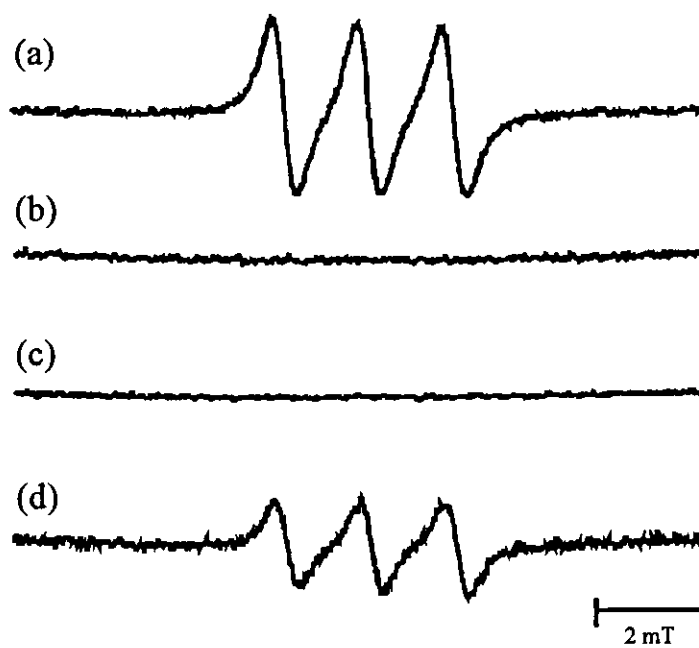


Fig. 1. (a) Typical ESR spectrum of $\text{Fe}(\text{DTCS})_2\text{-NO}$ with NO. (b) 20 mM AsA + pH1.5 HCl (c) 0.1 mM NaNO_2 + pH1.5 HCl (d) 0.1 mM NaNO_2 + 10 mM AsA + pH 1.5 HCl

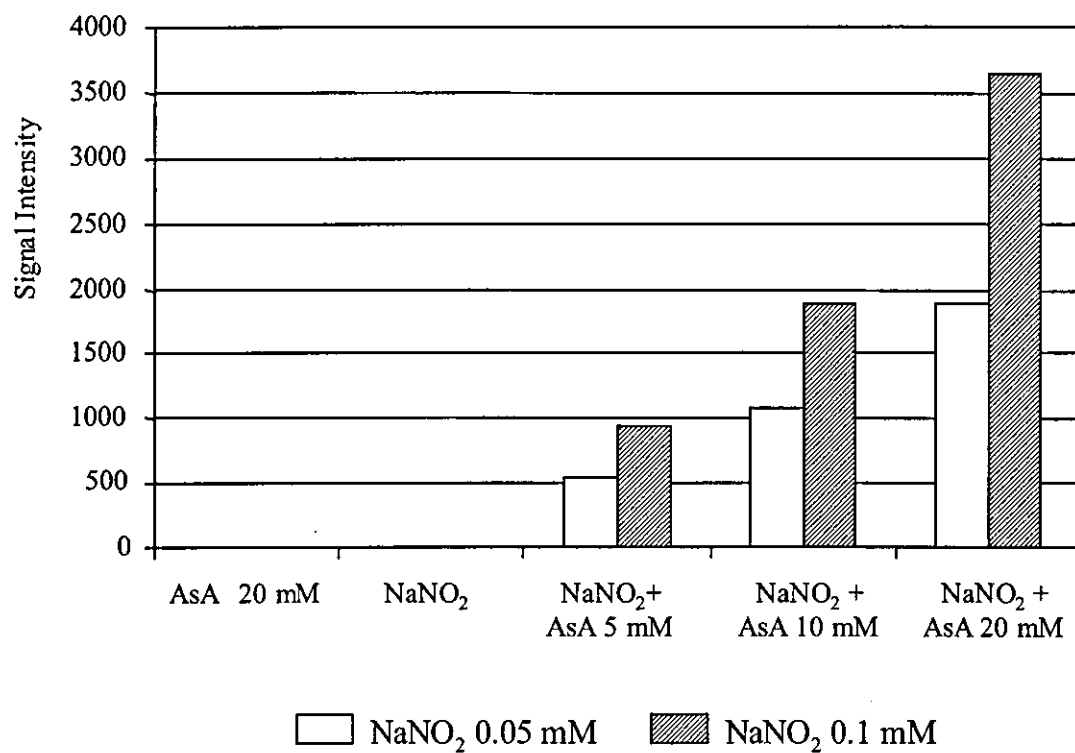


Fig.2. Changes of Fe(DTCS)₂-NO signal intensity by the reaction of NaNO₂ and AsA in the pH 1.5 hydrochloric acid.