

Fig. 3. Changes of absorption spectra of catechol (0.1 mM) incubated with NOC 7 (0.1 mM) for 1 hr at room temperature in 100 mM sodium phosphate buffer at pH7.4.

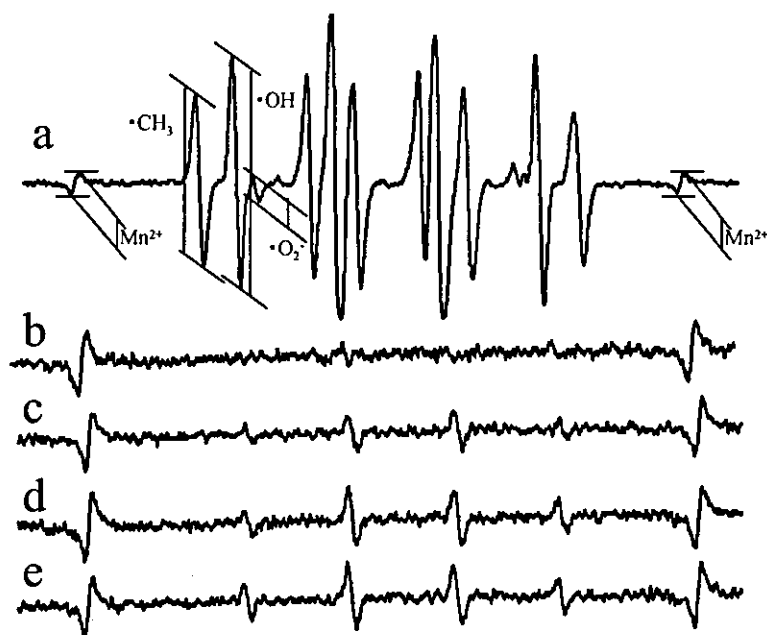


Fig. 4. Typical ESR spectra of DMPO with $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ and $\cdot\text{CH}_3$ using by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}/\text{DMSO}$ system (a). Time dependent changes of spectra in the reaction of catechol (0.1 mM) incubated with NOC 7 (0.1 mM) at 1 min (b), 10 min (c), 20 min (d) and 30 min (e). The ordinate indicates the signal height of carboxy-PTI relative to the MnO_2 internal marker signal.

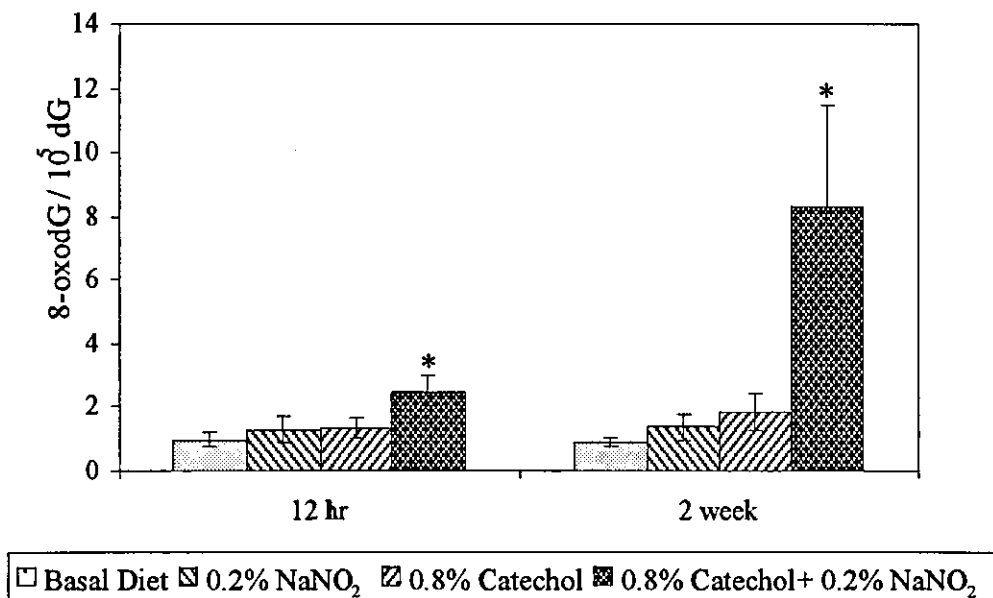


Fig. 5. Changes of 8-oxodG levels in forestomach epithelium of rats given 0.2% NaNO₂ in the drinking water, 0.8% catechol in the diet, or 0.2% NaNO₂ in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12 hr and 2 weeks. Values are means \pm SD of data for 5 samples collected from a total of 15 rats. *: Significantly different ($P < 0.01$) from the control group.

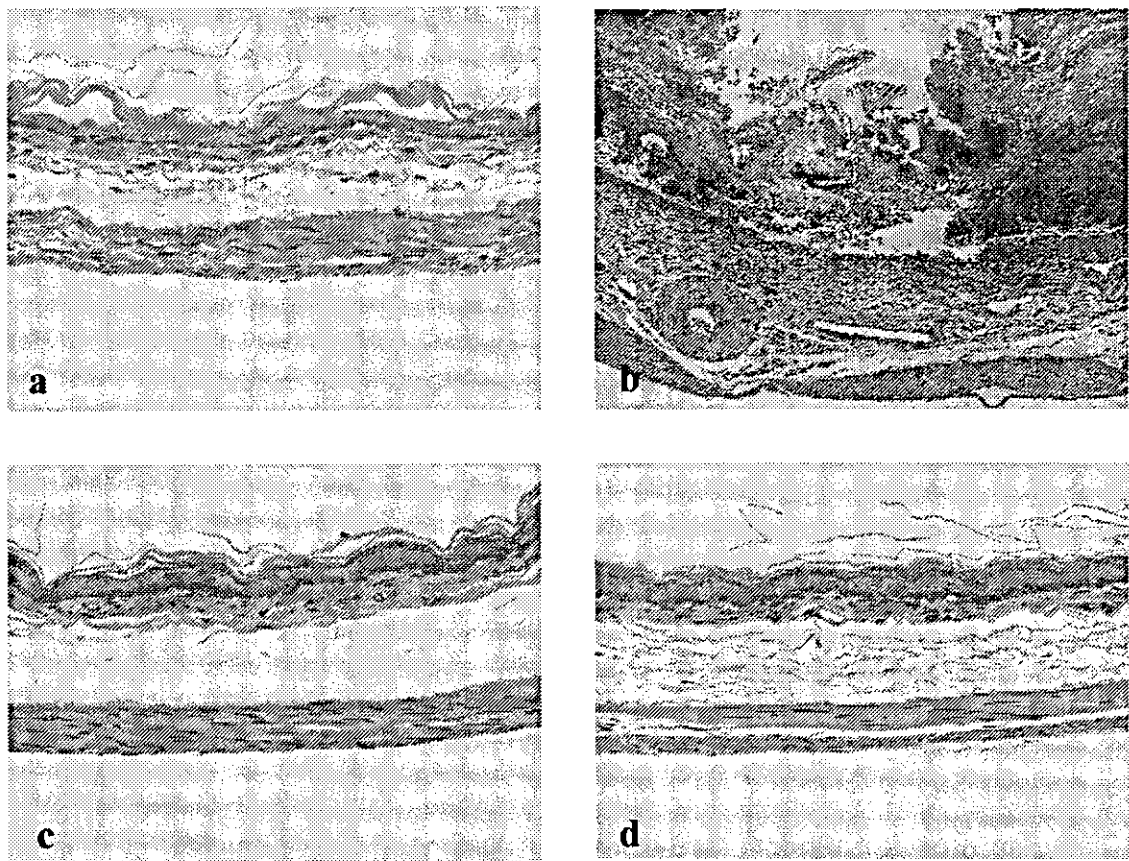


Fig. 6. Forestomach of a male rat co-treated with 0.2% NaNO_2 in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12 hr (a) or 2 weeks (b). (c) Forestomach of a male rat treated with 0.2% NaNO_2 in the drinking water for 2 weeks. (d) Forestomach of a male rat treated with 0.8% catechol in the diet for 2 weeks. H&E staining at x180 original magnification.

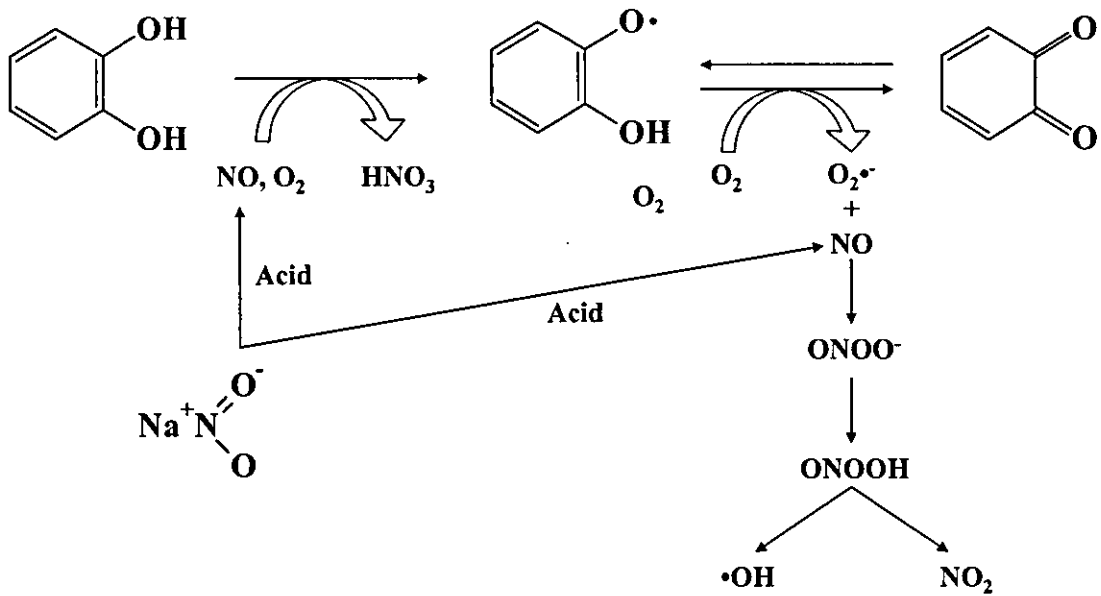


Fig. 7. Proposed pathways from the reaction of catechol with NaNO_2 to generating $\cdot\text{OH}$

Table 1. Efficiency of catechol in producing ONOO⁻ in the presence of NO-donor.

		ONOO ⁻ production	
NO donor	t _{1/2}	Catechol ^{a, b}	Catechol+Mannitol ^c
NOC 7	5 min	7.2 ± 0.8	6.1 ± 0.8

^a Concentration : 10 μM catechol, 100 μM NO donor.

^b Values presented are means ± SD of five separate experiments.

^c Concentrations : 10 μM catechol, 100 μM NO donor, 1 mM mannitol.

Table 2. Effect of NaNO₂ and catechol on histopathological findings of the rat forstomach after the treatment.

Group time	Cont. ^a	0.2% NaNO ₂ ^b				0.8% Catechol ^c				0.8% Catechol + 0.2% NaNO ₂ ^d			
		12hr	24hr	1w	2w	12hr	24hr	1w	2w	12hr	24hr	1w	2w
site/lesion													
Epithelium													
hyperplasia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	++	++
erosion/ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
with inflammatory cell infiltration													
Submucosa													
edema	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	++	±
cell infiltration	-	-	±	-	-	-	±	±	-	±	+	++	±
fibrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++

^aBasal diet

^b0.2% NaNO₂ in drinking water

^c0.8% Catechol in diet

^d0.8% Catechol in diet and 0.2 % NaNO₂ in drinking water

—: no observed, ±: mild, +: moderate, ++: severe

厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者： 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
協力研究者： 黒岩有一（国立医薬品食品衛生研究所病理部）

研究要旨

慢性酸型逆流性食道炎モデルラットを作成し、アスコルビン酸と NaNO_2 の 2 週間の併用投与による食道への影響を検討した。その結果、2 週間の併用投与により食道粘膜の扁平上皮過形成および角化亢進が認められるとともに、食道粘膜 DNA 中の 8-oxodG レベルの上昇がみられ、長期投与での食道発がんの可能性が示された。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、ラット 2 段階発がんモデルを用いて NaNO_2 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。

A. 研究目的

二級アミンと亜硝酸を同時に摂取すると胃内で発がん性物質のニトロソアミンが生成されるが、アスコルビン酸 (AsA) などの酸化防止剤を同時に加えるとニトロソアミン合成が減少し、発がんが抑制されることが知られている。しかし、一方で AsA やフェノール系の酸化防止剤と亜硝酸を同時に与えるとラット前胃発がんに促進的に作用することが報告されている。亜硝酸はそれ自体でもラット前胃発がんに促進的に作用するが、AsA などの酸化防止剤と併用投与することでその発がん促進作用は著しく増強される。亜硝酸と AsA は酸性条件下で反応して一酸化窒素 (NO) を発生することが *in vitro* の実験系で確認されており、実際にラット前胃の DNA 酸化損傷を示す 8-oxodG レベルの増加も明らかになっていることから、亜硝酸と AsA の発がん促進作用に NO に起因する酸化的ス

トレスが関与していることが予想されている。

ヒトの逆流性食道炎患者における食道腺癌の多発に、胃酸が食道に逆流して酸性となるために生じる NO が関与している可能性が考えられていることから、ヒトが常時摂取する亜硝酸と酸化防止剤の併用投与による発がん機構の解明は、ヒト食道がん一次予防の観点からも重要である。そこで本研究ではラットの慢性酸型逆流性食道炎モデルを作成し、AsA と NaNO_2 を併用投与した場合の食道への発がん作用について検証することを目的として 2 週間の予備実験を行った。

また、ヒドロキノン、カテコール、没食子酸などのフェノール系抗酸化物質も AsA と同様に亜硝酸との併用投与によりラット前胃発がんを増強する。そこで本研究において、食物中に多量に含まれているフェノール系抗酸化物質のカテキンについて、発がんイニシエーターとして *N*-methyl-*N'*-nitroso-*N*-nitroso-

guanidine (MNNG) を用いたラット 2 段階発がんモデルを用いて NaNO_2 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。

B. 研究方法

1. 逆流性食道炎モデルラットに対する AsA および NaNO_2 併用投与の影響

1) 逆流性食道炎モデルラットの作成

8 週齢の雄の F344 ラットを 24 時間の絶食後、ネンプター麻酔下で開腹した。幽門輪直下の十二指腸を幅約 2 mm の 18Fr ネラトンカテーテル片 (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。

2) AsA および NaNO_2 の併用投与

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、液体窒素で凍結後 8-oxodG 測定に使用するまで -80°C で保存した。

3) 食道粘膜 DNA の 8-oxodG 測定

1 個体の食道粘膜から回収可能な DNA 量は少量のため、対照群 2 匹分または併用投与群 3 匹分の食道粘膜をそれぞれ 1 つずつにまとめ、DNA Extractor WB キット

(Wako) を用いて DNA を回収した。Nuclase P1 (Yamasa) で DNA を消化した後、Phosphatase Alkaline solution (Sigma) で処理した。これを Ultra Free-MC 100,000NMWL Filter Unit (Millipore) で限外ろ過し、HPLC-ECD 装置で 8-oxodG および dG 量を測定した。8-oxodG レベルは 8-oxodG/ 10^5dG として求めた。

2. ラット 2 段階胃発がんモデルにおけるカテキンおよび NaNO_2 併用投与の影響

6 週齢の F344 ラット雄 120 匹を使用した。このうち 80 匹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 週間併用投与した。加えて、9 週目に 16 時間の絶食後 100 mg/kg 体重の MNNG (媒体: 50%DMSO 水溶液) を強制経口投与した。残る 40 匹は未処理群として基礎飼料および蒸留水を与え、9 週目には媒体のみを強制経口投与した。11 週目にイニシエーション処理群および未処理群の動物をそれぞれ 4 群に分けた。イニシエーション処理群は各群 20 匹、未処理群は各群 10 匹とした。それぞれの群には次の被験物質を投与した (1 群: 基礎飼料、2 群: 1.0% カテキン混餌投与 + 0.2% NaNO_2 飲水投与、3 群: 1.0% カテキン、4 群: 0.2% NaNO_2)。現在、42 週間の実験期間のうち、35 週が経過している。体重および摂餌量の測定は 15 週までは週 1 回、それ以降は 5 週間に 1 回の頻度で実施している。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。

C. 実験結果

1. 逆流性食道炎モデルラットに対する AsA および NaNO₂ 併用投与の影響

食道炎手術により、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た。病理組織学的には、肉眼的に認められた隆起層の中心部に細胞浸潤を伴った潰瘍がみられ、潰瘍周辺の隆起部にのみ扁平上皮の過形成および角化亢進が認められた。

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広範囲に粘膜の肥厚がみられた。病理組織学的には、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/10⁵dG) に対し、併用投与群で 0.95 (8-oxodG/10⁵dG) と 2 倍以上の高値を示した。

2. ラット 2 段階胃発がんモデルにおけるカテキンおよび NaNO₂ 併用投与の影響

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、NaNO₂ を投与した群で体重増加の抑制が認められている (Fig.1)。

D. 考察

抗酸化物質と NaNO₂ 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生要因として、NO が注目されており、

in vitro では AsA と NaNO₂ の併用により、多量の NO が産生される。そこで本研究では、慢性酸型逆流性食道炎モデルラットを作成し、AsA と NaNO₂ の併用投与を行った。その結果、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扁平上皮の過形成および角化亢進が認められた。一方、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。このように、ラット前胃での報告と同様に、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、AsA と NaNO₂ の併用投与により本モデルの食道粘膜においても DNA の酸化的損傷が生じていることが分かった。

以上の結果から、本モデルにおいて長期間の併用投与を行うことで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。

E. 結論

AsA と NaNO₂ 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

広瀬雅雄：食品中化学物質の複合摂取と発がん性。平成 16 年度厚生労働科学研究シンポジウム 食と安全の化学 2004 年 11 月、2005 年 1 月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

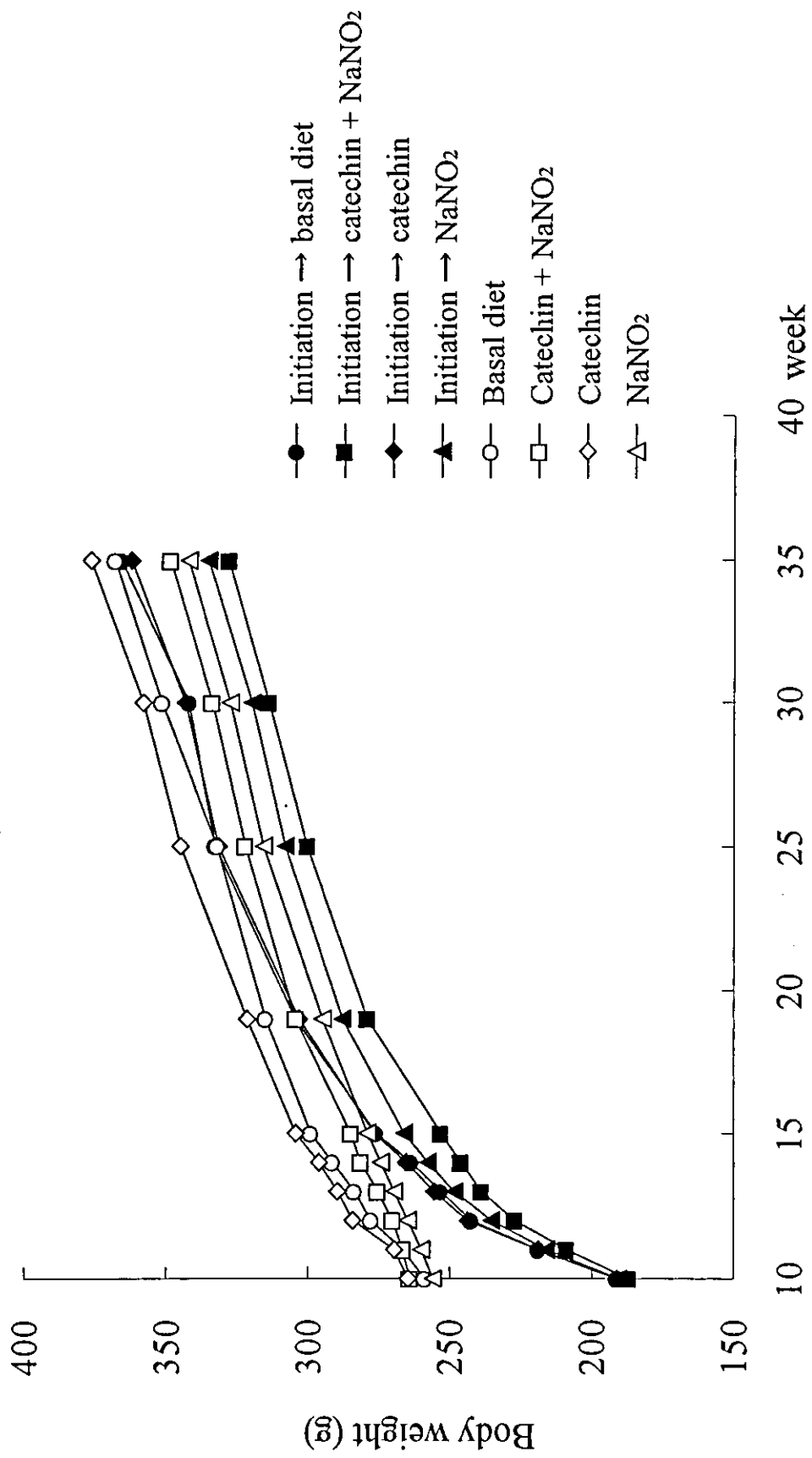


Fig. 1 Growth curves for male F344 rats treated with catechin and NaNO₂ (post-initiation phase)

厚生労働科学補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

（総合）研究報告書

食品中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

研究分担者 川西正祐 三重大学・医学部・衛生学講座 教授

研究要旨：がんの原因として、食餌性因子は約 35%を占めているといわれており、最も重要な因子である。食品は、残留農薬や食品添加物等の種々の化学物質を含み、それらと鉄や銅、マンガン等の金属とが相互作用し、活性酸素を介して DNA 傷害をきたす可能性がある。がん予防の観点から、食餌性因子による DNA 傷害の機構を解明することは重要である。本研究事業では、食餌性因子のヒト発がんへのリスクを科学的に評価し、がん予防を有効に進めるための基礎資料を得ることができる。

A. 研究目的

がんの原因として、食餌性因子は約 35%を占めているといわれており、最も重要な因子である。食品は、残留農薬や食品添加物等の種々の化学物質を含み、それらと鉄や銅、マンガン等の金属とが相互作用し、活性酸素を介して DNA 傷害をきたす可能性がある。がん予防の観点から、食餌性因子による DNA 傷害の機構を解明することは重要である。本研究事業では、分子遺伝学的手法、細胞工学的的手法および物理化学的手法を駆使することによって、食餌性因子のヒト発がんへのリスクを科学的に評価し、がん予防を有効に進めるための基礎資料を得ることができる。本年度においては、丁子から抽出される食品添加物オイゲノール、動物用医薬品ニトロフラゾン、アルコール由来物質サルソリノール、その他の食品中化学物質と金属との複合による DNA 傷害について検討した。

B. 研究方法

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 ^{32}P 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、ペペリジンあるいは 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シトメーターで定量化し解析した。さらに、酸化 DNA 損傷の指標の一つである 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) を電気化学検出器付 HPLC (HPLC-ECD) を用いて定量した。また、分光光度計および電子スピン共鳴装置(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。

C. 研究結果と考察

I. 食品添加物オイゲノールによる酸化的 DNA 損傷

丁子から抽出されるオイゲノールは、食品添加物として使用されているが、マウスで肝腫瘍の報告がある。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 を損傷した (図 1)。

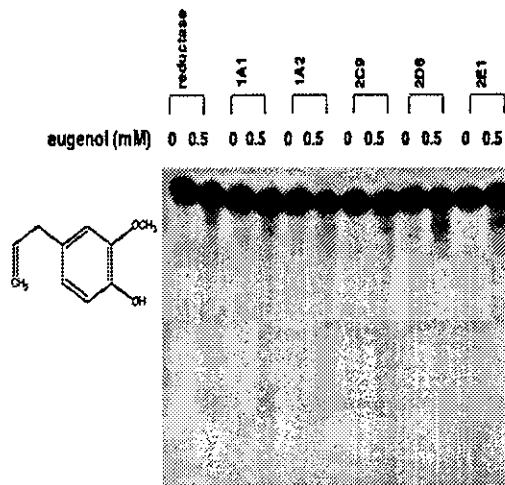


図1. 多種のCYP存在下におけるオイゲノールによるDNA損傷

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ことが明らかになった (図 2)。以上の結果から、薬物代謝酵素でカテコール体代謝物ができ、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。オイゲノールによる発がん機構には、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。

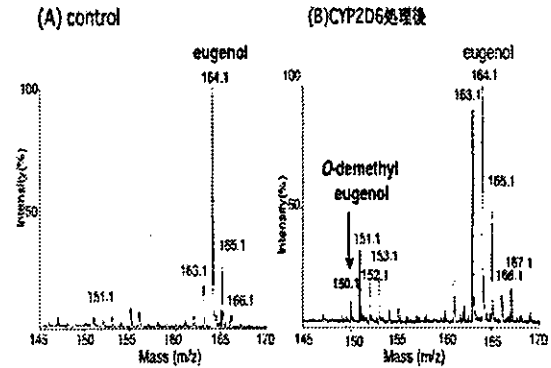


図2. 飛行時間型質量分析計によるオイゲノール代謝物の検出

II. 動物用医薬品ニトロフラゾンによる DNA 損傷性と細胞増殖活性

ニトロフラゾンは畜産動物の抗菌剤として使用されてきたが、動物実験において乳腺や卵巣などの生殖器腫瘍の発生が報告されている。我々は、女性生殖器系癌の発症機構としてエストラジオール代謝物による DNA 損傷とエストラジオール自体の細胞増殖作用がそれぞれ発がんのイニシエーションとプロモーションに関与することを提唱した(Int. J. Cancer, 92,333-337,2001)。

本研究ではニトロフラゾンによる発がん機構の解析を目的として、酸化的 DNA 損傷と細胞増殖活性について検討した。その結果、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 (図 3)。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。

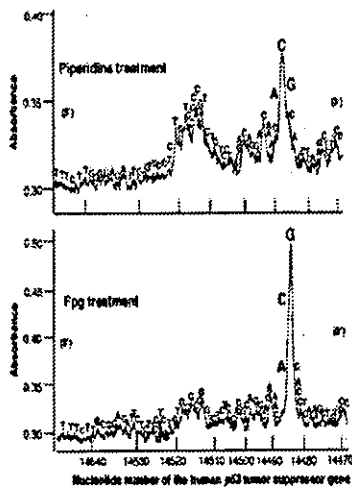


図3. ニトロフラゾンによるDNA損傷の塩基特異性

ESR 法ではニトロフラゾンを cytochrome P450 reductase および NADPH の両者の存在下で反応させた場合のみシグナルが観察された。シミュレーションの結果、hyperfine coupling constant は、 $a^N_{NO_2} = 1.109$ mT, $a^H_4 = 0.593$ mT, $a^H_3 = 0.151$ mT, $a^N_{CH=N} = 0.244$ mT, $a^H_{CH=N} = 0.117$ mT であり、ニトロフラゾンの一電子還元によりニトロアニオンラジカルが生成されることが判明した (図 4)。

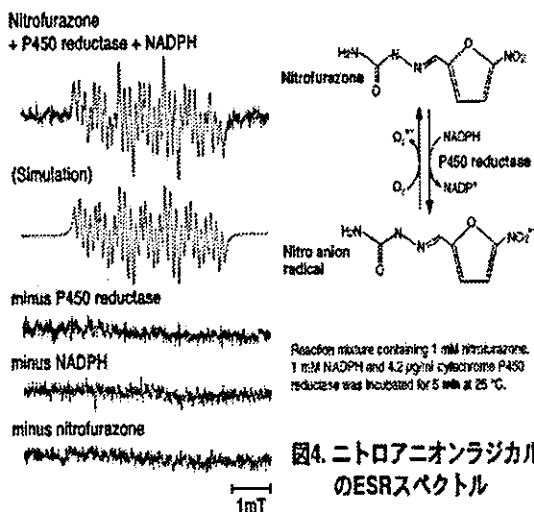


図4. ニトロアニオンラジカルのESRスペクトル

以上の結果から、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。その過

程で生成された H_2O_2 と $Cu(I)$ から成る活性種が DNA 損傷を起こすと考えられる。DNA 損傷をもたらす活性種は大部分がこの酸化還元サイクルに由来すると考えられる。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。ニトロフラゾンは代謝物による酸化的 DNA 損傷を介したイニシエーションに関与し、またエストロゲン活性を有することから細胞増殖を介したプロモーションにも関与し、両者が協奏的に作用して発がんをもたらすと推定される。

III. アルコール由来物質サルソリノールによる銅および鉄存在下における DNA 損傷とマンガンによるその増強

近年、アルコール摂取が食道癌、肝癌のみならず、乳癌のリスクを増大させることが明らかになってきた。本研究では、アルコールの摂取により生体内に生成することが知られているサルソリノール (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 (図 5)。

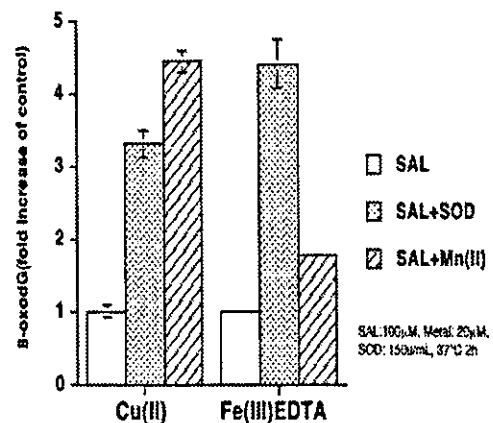


図5. MnおよびSODによる8-oxodG生成への増強効果

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。すなわち、エストロゲン受容体を介する経路と介さない経路による細胞増殖活性に SAL が関与すると考えられた。アルコール関連物質である SAL は、酸化 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する可能性が示唆された。

IV. その他の食品中化学物質による金属との複合による DNA 傷害に関する実験的研究

我々は、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 DNA を損傷することを報告した。また、食品中に混入するベンズアントラセンやニトロピレン等の多環芳香族化合物の代謝物が銅イオン存在下で酸化 DNA 損傷性を示すことを明らかにした。

D. 結論

本研究結果から、食品中に含まれる化学物質の多くは生体内で代謝活性化を受け、金属との複合作用で酸化 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。

E. 研究発表

発表論文

- 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).

学会発表

1: 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

2: 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

3: 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

4: 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

5: 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

G. 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
分担研究報告書

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
分担研究者 中江 大 佐々木研究所 病理部 部長

研究要旨：本研究は、食品添加物として広く使用されているカテキンと、そうした使用の拡大が予想されるグルコン酸銅に着目し、カテキンが *in vitro* で銅イオンの存在下に酸化性 DNA 傷害を誘発するという報告に立脚して、これらの単独または複合投与による毒性（発がん性）について、ラットを用いた *in vivo* での検索を行うものである。本年度は、グルコン酸銅単独の毒性（発がん性）を予備的に検索する実験を行った。実験は、BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)系雄性ラット（6週齢）に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・12000 ppm）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、肝の組織学および免疫組織化学的検索を行った。得られた所見は、1000 ppm 以上群の肝細胞における銅染色陽性所見・methalothionein 蛋白発現増強（小葉中心性、高用量でびまん性）、3000 ppm 以上群の便黒色化、6000 ppm 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-oxoguanine 誘発増強・肝細胞増殖活性増強、12000 ppm 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・肝がん病変数増加であった。したがって、グルコン酸銅は、複数の発がん物質を投与した条件下ながら、比較的低い用量より単独でも肝に影響を及ぼすことが判明した。この成果を基に、本年度は、さらに、ラット中期多臓器発がん性試験のプロトコールに基き、6000 ppm を最高用量とする種々の用量のグルコン酸銅と 5000 ppm のカテキンを単独または複合投与する実験を行った。本実験は動物実験が終了した段階であり、全身臓器を対象とした検索は来年度に実施する予定である。

A. 研究目的

カテキンは、ツバキ科チャの茎および葉、マメ科ペグアセンヤクの幹枝、アカネ科ガンビールの幹枝および葉などに含まれている化学物質の総称である。いわゆるカテキン類に含まれる化学物質としては、カテキン・ガロカテキン・エピカテキン・エピガロカテキン・エピカテキンガラート・エピガロカテキンガラートなどが挙げられる。カテキンは、これまでに抗酸化作用・発がん抑制作用をはじめとする種々の効果をもたらすものと報告され、それらの知見に基づいて、水産加工品・食肉加工品・菓子類・油脂・清涼飲料水等における食品添加物（酸化防止剤）として使用されている。またグルコン酸銅は、銅塩類の一つとして、人工栄養児の銅摂取強化の目的で 1983 年に食品添加物として指定された。グルコン酸銅は、現在の使用基準において母乳代替食品以外の食品への使用が認められていないが、米国で栄養強化材としてサプリメント類・あめ類・飲料等に用いられ、EU で食品成分として幅広く利用されているのが現状である。さらに、グルコン酸銅は、日本においても、栄養機能食品の成分としての使用が認可される方向にあり、食品添加物としての使用の拡大することが見込まれている。

カテキンに対する安全性評価としては、これまでに、変異原性試験および混餌投与によるラット 90 日間反復（混餌）投与毒性試験が実施された。変異原性試験においては、Ames 試験にて陽性、ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験にて弱陽性、マウス小核試験にて陰性であった。反復投与毒性試験においては、1.25% 以上の用量群の雌雄で、投与による影響が認められた。これらの結果を基に、現在は、ラットを用いた 1 年間慢性毒性試験と 2 年間発がん性試験が行われている。一方、グルコン酸銅は、Ames 試験にて陰性を示し、各種動物を用いた反復投与毒性試験の高用量投与群において肝障害等が認められているが、発がん性に関する明らかな情報がない。カテキンと銅化合物の複合影響については、明確な情報がないが、近年、カテキンが *in vitro* で銅イオンの存在下に酸化性 DNA 傷害である 8-oxoguanine (8-oxoG) を生成することが報告された。

以上の背景より、本研究は、カテキンと銅化合物の単独または複合投与による毒性（発がん性）について、ラット中期発がんモデルを用いて *in vivo* で検索することを目的とし、本年度に、グルコン酸銅単独の毒性（発がん性）を予備的に検索する実験を行った。

B. 研究方法

1. 被験物質

グルコン酸銅は、和光純薬工業株式会社から購入した。発がん物質としては、*N*-diethylnitrosamine (DEN)・*N*-methylnitrosourea (MNU)・1,2-dimethylhydrazine (DMH)・*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)を東京化成工業株式会社から、2,2-dihydroxy-di-*n*-propylnitrosamine (DHPN)をナカライテスク株式会社から、それぞれ購入した。

2. 動物および飼育条件

動物は、5週齢の BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)系雄性ラット(日本クレア株式会社)を5週齢にて16匹入手し、1週間の検疫・馴化の後、6週齢にて試験に供し、適切な無作為抽出法を用いて割り付けた。動物は、バリアーシステム内の温度・湿度を制御した動物室内で飼育した。室内の環境条件は、温度 25 ± 5°C・湿度 50 ± 10%・換気回数毎時 12 回・1日 12 時間照明とした。動物は、最大 3 匹ずつを、ソフトチップを敷いたポリカーボネイト製のプラスチックケージに収容し、ケージおよびチップを週 1 回交換した。飲料水としては、水道水を自由摂取させた。

3. 動物実験

動物実験は、その開始時より、ラット中期多臓器発がん性試験法に準拠した 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) より成る計 4 週間のイニシエーション処置を施行すると共に、グルコン酸銅を 0・1000・3000・4800・6000 (以上各群 3 匹)・12000 ppm (1 匹) の用量にて粉末 CE-2 飼料(クレア)に混じて 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。屠殺時には、詳細な肉眼的観察を行ない、肝を摘出した。肝は、重量を測定した後に、各薬より切り出した切片を中性緩衝ホルマリンにて固定して通常の方法でパラフィン包埋し、残部を凍結保存した。

4. 検索項目

[一般状態, 体重, 摂水量, 摂餌量]

本検索は、全動物を対象として行った。なお、一般状態は毎日観察し、体重・摂水量・摂餌量は週 1 回測定した。

[血清・尿・肝銅レベル]

血清(μ g/dL)・尿(μ g/dL)・肝(μ g/wet.g)における銅レベルは、血清・尿に関して全動物、肝に関して 0・3000・6000・12000 ppm 群の各 1 例について測定した。

[病理組織学的検索]

肝における銅の局在は、銅染色(ロダニン法)にて検索した。具体的には、ホルマリン固定パラフィン包埋肝切片から薄切によって標本作製し、標本を脱パラフィン後に精製水にて湿潤して、5%酢酸ナトリウム水溶液 100ml に *p*-dimethylaminobenzylidenerhodanine (和光純薬)の飽和アルコール溶液 3ml を加えたものを混じた染色液中で室温にて 12-24 時間反応させ、ヘマトキシリンより核染色し、鏡検した。

肝の組織学的検索は、ホルマリン固定パラフィン包埋肝切片から薄切によって標本作製し、標本を脱パラフィン後に精製水にて湿潤して、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、鏡検した。

[免疫組織化学的検索]

肝における methalothionein (MT) 蛋白発現・胎盤型 glutathione *S*-transferase (GST-P) 陽性前がん病変発生・8-oxoG 誘発・proliferative cell nuclear antigen (PCNA) 標識を指標とした肝細胞増殖活性変化は、免疫組織化学的に検索した。

免疫組織化学的染色は、ホルマリン固定パラフィン包埋肝切片から薄切によって標本作製し、標本を脱パラフィン後に精製水にて湿潤して、過酸化水素を 3% の濃度で加えたエタノールによる処理(室温)で内因性ペルオキシダーゼを失活させた。8-oxoG 染色においては、さらに、95°C の 10% 硫酸亜鉛水溶液中で 30 分間抗原賦活化処理を施行した後、2 N 塩酸中で核を変性させた。以上の処理を施した試料は、精製水で洗浄した後、50 mM トリス緩衝生理食塩水(TBS)で洗浄し、内因性の蛋白による非特異結合を防ぐため、Protein Block Serum-Free 試薬(ダコ・サイトメーション株式会社)によるブロッキング処理を行なった。一次抗体は、マウス抗 MT モノクローナル抗体(ダコ)・ウサギ抗ラット GST-P ポリクローナル抗体(株式会社 医学生物学研究所)・抗 8-oxoG モノクローナル抗体(日本老化制御研究所)・マウス抗 PCNA モノクローナル抗体(ダコ)をウシ血清アルブミンを 0.1% の濃度で加えた TBS で希釈したものを用い、湿潤箱中(室温)で 1 時間反応させた。ただし、8-oxoG 染色の場合のみは、4°C で 18 時間反応させた。一次抗体との反応の後には、試料を TBS で 5 分間 2 回洗浄し、二次抗体と発色基質が結合している Histofain (株式会社ニチレイ)と湿潤箱中(室温)で反応させた後、再び TBS で 2 回洗浄し、3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩(DAB, 和光)により抗体結合部位を茶褐色に可視化させ、ヘマトキシリンによる核染色を行った。なお、GST-P 陽性肝前がん病変の発生は、病変の数と面積および

肝組織切片の総面積を IPAP 画像解析装置（住化テクノス株式会社）により測定し、病変の単位面積あたりの個数・大きさ（面積）・標本中の面積占有率を算出して評価した。

5. 統計学的解析

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。

6. 倫理面への配慮

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。

C. 研究結果

1. 一般状態・体重・摂水量・摂餌量・臓器重量

動物の一般状態は、実験期間を通じて特記すべき変化を観察しなかったが、3000 ppm 以上群で用量依存性に増悪する糞の黒色化を認めた。実験期間中および屠殺時の体重は、群間に明らかな差を認めなかった。摂水量および摂餌量は、0-6000 ppm 群で同程度であったが、12000 ppm 群で動物が 1 匹のみであったために計測値にばらつきが生じた。絶対および体重に対する相対臓器重量は、12000 ppm 群の肝において高値を示したが、動物が 1 匹のみであったため、その有意性が不明であった。

2. 銅・MT 動態

血清および尿の銅レベルは、0-6000 ppm 群においてばらつきながらも群間に明確な差がなく（血清 92-153 $\mu\text{g/dL}$ 、尿 19-99 $\mu\text{g/dL}$ ）、12000 ppm 群で増加した（血清 287 $\mu\text{g/dL}$ 、尿 199 $\mu\text{g/dL}$ ）。

肝の銅レベルは、0 ppm 群の 4.3 $\mu\text{g/wet.g}$ に対して、3000 ppm 群で 5.4 $\mu\text{g/wet.g}$ と明確な差がなかったが、6000 ppm 群で 252.4 $\mu\text{g/wet.g}$ に増加し、12000 ppm 群で 453.2 $\mu\text{g/wet.g}$ とさらに増加した。

肝切片をロダニン法にて銅染色すると、0 ppm 群では陰性であったが、1000・3000 ppm 群では陽性染色所見を散在性に観察し、4800 ppm 以上群では明確な陽性染色所見が用量に依存して増強した。なお、本法の陽性染色所見は、肝細胞の

細胞質に赤く顆粒状に観察され、肝組織内にびまん性に分布していた。

MT 蛋白は、0 ppm 群においても、1-2 個の肝細胞の細胞質に発現している所見をわずかながら散見した。1000 ppm 群では小葉中心性に軽度の発現がみられ、3000 ppm 群では小葉中心性の発現が増強し、4800・6000 ppm 群では小葉中心性に分布する傾向を残しつつもびまん性に強度に発現し、12000 ppm 群では発現強度がさらに増強した。

3. 肝における病理学的変化

肝に対する肉眼的検索においては、いずれの群にも明らかな変化を観察しなかった。肝に対する組織学的検索において、0-4800 ppm 群では、肝細胞の核に軽度の大小不同を認めたが、その他に明らかな変化がなかった。6000 ppm 群では、肝細胞の核の大小不同が明確となったほか、肉芽腫を散見した。12000 ppm 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。

4. 肝前がん病変

GST-P 陽性を示す肝前がん病変の 1 cm^2 あたりの個数は、12000 ppm 群で増加した。一方、前がん病変の大きさは、群間に明らかな差がなかった。

5. 肝における 8-oxoG 誘発

8-oxoG は、いずれの群においても、肝細胞の核に検出された。その個数は、6000・12000 ppm 群で増加した。

6. 肝細胞増殖活性

核が 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、6000 ppm 群で増強し、12000 ppm 群でさらに顕著に増強した。

D. 考察

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、体重、最終平均体重について群間に明らかな差がなかったことから、今回の実験条件において全身的に顕著な銅の毒性が顕れなかったものと判断できる。しかし、肝においては、1000 ppm 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（小葉中心性、高用量でびまん性）、3000 ppm 以上群の便黒色化、6000 ppm 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、12000 ppm 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。

経口的に過剰摂取された銅は、腸管で吸収されずにそのまま排泄されるか、肝における代謝