

200501031A

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中化学物質の複合毒性に関する実験的研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広瀬雅雄

平成 18 (2006) 年 4 月

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	----- 24
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	----- 48
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	----- 60
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	----- 73
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	----- 79
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	----- 86
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	----- 95
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	----- 100
原田孝則	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 118
IV. 研究成果の刊行物・別冊	----- 122

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

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

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。松元は、アミノ酸と糖の加熱生成物であるアクリルアミドと亜硝酸ナトリウム(NaNO_2)の複合による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(CHL)を用いてDNA損傷性(コメットアッセイ)および染色体異常誘発性を検討した。その結果、アクリルアミドと NaNO_2 の同時処理によってDNA損傷は誘発されなかった。一方、染色体異常誘発性に関しては弱い増強作用が認められた。次に、茶カテキンの主要成分である(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)と NaNO_2 の複合遺伝毒性を評価するため同様の実験を行った。EGCGと NaNO_2 を同時に処理した場合、EGCGおよび NaNO_2 の濃度に相関して、明確なDNA損傷誘発および染色体異常誘発が認められた。従って、EGCGと NaNO_2 の複合は、明らかな遺伝毒性を誘発することが明らかになった。*in vivo*では NaNO_2 とアスコルビン酸やカテコール、没食子酸などのフェノール性抗酸化物質をラットに複合投与すると、前胃に強い細胞傷害、細胞増殖あるいは発がん促進作用が認められる。平成16年度の研究結果から、これらの障害には酸性条件下における NaNO_2 と抗酸化物質の反応により生成する活性窒素種が関与することが示唆された。平成17年度中澤はこれらの事実を明らかにするため、生体内における活性窒素種による蛋白修飾物質として知られるニトロチロシンの高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による高感度分析法を構築した。さらに本分析法を*in vivo*へ適用するため、アセトアミノフェンを投与したマウス肝臓中のニトロチロシンを、本法および免疫化学的染色法により検出した結果、本法が*in vivo*におけるニトロチロシン測定に有用であることが明らかとなった。広瀬は、 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32週間併用投与した結果、食道粘膜に、強い過形成と乳頭腫が発生した。本モデルを用いた NaNO_2 とAsAの食道発がんプロモーション試験及び NaNO_2 とAsAの前胃発がんイニシエーション試験も行っている。また、食品添加物であり、抗酸化作用のある茶カテキンと NaNO_2 の複合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た結果、複合により前胃発がんが促進され、8-OHdGレベルも有意に増加した。*in vitro*ではカテキンとNOの共存下でOHラジカルが発生し、発がん促進にはNO由来の酸化ストレスの関与が示唆された。川西は、いわゆる健康食品の成分について、鉄や銅等の金属と複合曝露し、DNA傷害性を指標として複合毒性を検討した。老化防止・健康増進を期待されるピクノジノールの成分であるprocyanidin B2は高濃度で酸化を促進し、その際に銅が関与することを見出した。また、アガリクスの成分であ

る4-hydrazinobenzoic acidは銅存在下でラジカル形成によりDNA付加体を形成し、さらに酸化DNA損傷をもたらすことが明らかになった。茶カテキンは*in vitro*において銅イオンの存在下で酸化性DNA傷害を誘発することが知られている。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、Wistar系雄ラットをDEN, MNU, DMH, BBN, DHPNでイニシエーションを行った多臓器発がんモデルを用い、無処置またはカテキン(5000ppm, 飲水)とグルコン酸銅(10・300・3000・6000ppm, 混餌)を単独または複合で25週間投与して屠殺し、主要臓器の組織学的変化と胎盤型glutathione S-transferase (GST-P)陽性肝前がん病変の発生について検索した。その結果、肝前がん病変の発生個数は、300ppm以上のグルコン酸銅単独投与により有意に増加したが、カテキンを併用投与すると増加が抑制された。また、前胃過形成は6000ppmのグルコン酸銅単独投与により有意な頻度増加・程度増悪を認めたが、カテキンを併用投与すると群で頻度・程度とも減弱した。従って、本モデルにおいては予想に反しカテキンが抗酸化的に作用していることが示唆された。化学物質の酵素誘導能をスクリーニングすることは、代謝を介した化学物質同士の複合作用を予測する上で極めて重要である。大野は、*in vitro*でCYP3A4レポーター遺伝子安定発現株を用い、残留農薬として分析が行われている20種の農薬のCYP3A4誘導能評価を行った。その結果、今回用いた農薬の大多数がCYP3A4の誘導を示すことが判明した。これらの化合物はその程度から大きく4つのグループに分類された。最も誘導の強いグループは、Rifampicinの約半分程度の誘導能を示していた。やや強いグループでは、Clotrimazoleと同じか、むしろ強い誘導がclone 3-1-10細胞株において認められた。一方、Isoxathionでは、誘導率がclone 3-1-10細胞株よりclone 3-1-20細胞株で高いものであり、Methalaxyl, Isoprothiolan, Chlorpyrifos, Ethoxazole, EPNでは両細胞において同程度の誘導率を示した。本研究で用いた*in vitro* CYP3A4誘導評価系は、農薬のCYP3A4誘導能を良好に評価できることが確認された。なお、*in vivo*のヒト型酵素誘導試験系を開発するため、CYP3A4遺伝子レポーターベクターウイルスとヒトPXRウイルスを同時にマウスに投与するとPermethorinの投与によるヒトCYP3A4の約60倍もの誘導が肝臓で認められた。白井は、昨年度は、MeIQx肝発がんを修飾することが確認されている物質をラットに2週間混餌投与し、シトクロームp450分子種の誘導あるいは抑制の状態についてWestern Blotting法を用いてタンパク質レベルで追究したが、MeIQxの代謝活性化に必要なとされるCYP1A1/1A2の誘導と発がん修飾作用との間に明らかな相関は見出せなかった。今年度はラット中期肝発がん性試験法を用いて、CYP1A1/1A2の強い誘導が確認されている α -Naphthoflavoneまたは β -NaphthoflavoneをMeIQxと同時投与して、肝発がんへの影響を検討した。その結果、MeIQx単独、 α -Naphthoflavone単独、 β -Naphthoflavone単独投与により、GST-P陽性細胞巣が増加し、DENの肝発がんが促進されることが確認された。しかし、MeIQxと α -Naphthoflavoneあるいは β -Naphthoflavoneを同時に投与してもGST-P陽性細胞巣の有意な増加はなく、発がんへの影響はほとんど認められなかった。以上の結果より、CYP1A1/1A2の誘導能のみを指標にしてMeIQxの発がん修飾作用を予測することは困難であり、解毒酵素などを総合的に検討して評価する必要があると考えられた。原田は、農薬の相加・相乗毒性を検討するため、ラットを用い以下の2つの実験を実施した。実験1では、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、3週齢の幼若雌性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(ChE)活性(血漿、血球、脳)を指標に相加・相乗毒性を検索した。その結果、幼若ラットではMPPとDDTの複合投与により、成熟ラットでみられなかった自発運動量の増加(興奮作用の増強)とChE活性の回復遅延が認められた。また、MPMC単独投与では、成熟ラットで死亡がみられなかった用量で死亡例が生じ、MPMCとMPPの複合投与では全例が死亡した。このことから、MPMCは幼若ラットに対して強い毒性を示し、MPPとの複合毒

性の増強効果も成熟ラットに比べ顕著であることが判明した。実験2では、雄性ラットを用い若齢期（5週齢）にDDTを反復経口投与（前処理）した後に休薬し、成熟期（10週齢）にMPPを単回経口投与し、実験1と同様な諸検査を実施した。その結果、DDTの前処理群では、MPPの毒性が増強され、神経症状がより長期間にわたり残存した。これらの実験結果から、幼若動物は成獣に比べ殺虫剤の複合暴露の影響を受け易いこと、また、若齢期に塩素剤を暴露された動物が成熟後にリン剤に暴露された場合、その毒性効果が増強される可能性が示唆された。

分担研究者

松元綱六 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、松本は亜硝酸と天然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

o/in vivoの遺伝毒性試験で検討し、中澤は種々の抗酸化物質と亜硝酸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、健康食品中の成分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、特に発がん修飾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。例えば、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。白井は毒性の指標を発がん性に絞り、肝発がん物質であるMeIQx（ヘテロサイクリックアミンの1種）を代

謝活性化する酵素活性を有する食品中化学物質が、MeIQxの肝発がん性をどの様に修飾するかをラットを使って追究する。

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成熟および幼若ラット神経系への影響を明らかにする。

B. 研究方法

【松元】

in vitro コメットアッセイでは組織培養用60mmプレートにCHL細胞を播種し、48時間後、種々の濃度の亜硝酸ナトリウム、アクリルアミドを単独あるいは複合で最終培地濃度が1%または10%となるよう添加した。陽性対照物質として4-NQOを用いた。被験物質添加から1時間後、培養液を捨て、PBSで2回洗浄後、スライド標本作製した。

スライド作製は、プロナーゼにより細胞を回収した後、上清を棄て、適量のホモジナイズ液で細胞を再浮遊させた。細胞浮遊液とLow melting point agarを混和し、細胞を含んだ寒天をあらかじめNormal melting point agarをコーティングしておいたスライドグラス上に均等に広げた。寒天を固めた後、冷却した細胞溶解液に浸した。その後、電気泳動液にスライドグラスを20分間浸し、アンワインディングを行い、電気泳動を開始した。泳動条件は25V, 270~300mA, 4°C, 20分であった。電気泳動終了後、過剰なアルカリを中和し、脱水、エチジウムブロマイドで染色した。

観察はKomet 5.5を用いて各スライドグラスあたり50個、各濃度あたり200個の細胞を分析した。計測したパラメーターは% Migrated DNA, Tail Length, Olive tail Momentであった。

また、細胞毒性はATP測定用試薬キットのルシフェール250を用いて細胞内ATPレベルを発光量によって測定した。Controlに比べ、ATPの減少率を細胞毒性とし、百分率(%)で表した。

in vitro 染色体異常試験には組織培養用フアルコン60mmプレートにCHL細胞を播種した。対数増殖している細胞に種々の濃度のアクリルアミドまたはEGCGを単独で処理した場合と亜硝酸ナトリウムを同時に処理した場合とで実験を行った。薬物添加から3時間後、培養液を捨て、新鮮な培養液と交換し、さらに21時間培養した後、染色体標本作製した。

代謝活性化法では培地内にS9mixを加えた後、薬物を処理した。S9はフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与されたラットの肝臓ホモジネート9000×g上清画分を使用した。このS9にコファクターを加えてS9 mixとした。

標本作製の2時間前にコルセミドを培養液中に添加した。細胞は塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、カルノア液で固定し、空気乾燥標本作製した。標本は2%ギムザ液で染色した。

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) を調べた。1000個の細胞を観察し、分裂細胞の出現頻度を求めた。

【中澤】

[¹³C₉]-ニトロチロシンは[¹³C₉]-TYRから合成した。標準溶液は10mM 塩酸を用い1mM TYRおよびNTYRを調製した。検量線の作成には0.1から50μMのTYRおよび0.5から1000nMのNTYRを調製し、それぞれの安定同位体を最適濃度で添加して用いた。

LC-MS/MSはAliance HT model 2795 liquid chromatography system および Micromass Quattro Ultima mass spectrometry systemを用いた。カラムにはSHISEIDO製CAPCELL PAK C18 MG II (2.0 x 150 mm, 5 μm) を用いた。移動相は溶液 A : 0.01 %酢酸と溶液 B : アセトニトリルの混液を流速0.2 mL/minで送液した。カラムをA/B=97/3で安定させ、グラジエントでTYR、NTYRを溶出させ、MS/MSはエレクトロスプレーイオン化法を用い、ポジティブイオンモードによりTYRおよびNTYRを検出した。

動物実験では6週齢の雄B6C3F1マウス合計20匹を対照群、アセトアミノフェン投与後2時間群、4時間群、8時間群の計4群に配した。飼料にはCRF-1粉末を用い、アセトアミノフェン投与群には300mg/kgを腹腔内投与した。投与後各時間において屠殺し、肝臓の左葉はヘマトキシリン&エオジン染色およびNTYR免疫化学的染色法による病理組織学的検索に用いた。NTYR測定用の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。肝組織は、試料に50 mM酢酸緩衝液 (pH6.5) を加えホモジナイズした後、4°C、3000 x gで10分間遠心分離し、上清を取りタンパク質濃度を算出した。タンパク質濃度を10mg/mLに調整した後、0.5%トリクロロ酢酸0.5mLを加え、4°C、14000 x gで10分間遠心分離し、上清を

捨て、沈殿を採取し、2 mg/mLのプロテアーゼを含む50 mM酢酸緩衝液 (pH6.5) を加え、50°Cで20時間インキュベーションした。インキュベーション後、再度10%トリクロロ酢酸を加え、4°C、14000 x gで10分間遠心分離を行い、上清を採取して0.45μm PVDFフィルターを通し測定用試料とした。

(倫理面への配慮)

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。

【広瀬】

茶カテキン (茶抽出物 : 総カテキン83.1%、カフェイン0.27%) とNaNO₂複合投与の前胃発がんプロモーション検索では、6週齢のF344雄ラット80匹にイニシエーション処理として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。他の40匹は未処理群とした。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、以下の通り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%NaNO₂飲水投与、3群 : 1.0%カテキン、4群 : 0.2%NaNO₂)。実験期間終了後に解剖し、腺胃および前胃の病理組織学的検索を行った。

前胃粘膜8-OHdGレベル測定には6週令のF344ラット雄42匹を使用し、16時間絶食後、カテキンと亜硝酸をそれぞれ1.0%混餌および0.2%飲水で複合投与した。8, 12, 24時間および1週間後前胃粘膜を採取した。基礎飼料を与える対照群、また、投与24時間後の時点については、カテキンおよび亜硝酸の単独投与群も設けた。前胃粘膜からDNA Extraction WBキット (Wako) とGentle 共沈剤 (タカラバイオ) を用いてDNAを回収し、Nuclase P1とalkaline phosphataseにより消化した。得られた試料はHPLC/UV/ECDにより8-OHdGおよびdG量を測定した。8-OHdGレベルは8-

OHdG/10⁵dGとして求めた。

OHラジカルの検出には、スピントラッピング剤にDMP0を用い、ESRによりOHラジカルを検出した。カテキン類は、茶カテキンのうち含量の多い4種を用いた。0.1 mLのエピカテキン、ガロカテキン、エピカテキンガレートまたはエピガロカテキンガレートを1 mM DTPAC含有のリン酸緩衝液 (100 mM, pH 7.4) に添加した後、5 μ L DMP0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 μ L扁平石英セルに移し、ESR測定を行った。

逆流性食道炎モデルラットを用いたAsAとNaNO₂併用投与による食道発がん実験には、8週齢の雄のF344ラット45匹を24時間の絶食後、ネン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ネラトンカテーテル片で被覆し、固定した。さらに、前胃腺胃境界部を結紮した。2週間の回復期間後、4群に分け、1群：基礎飼料、2群：1.0%AsA混餌投与、3群：0.2%NaNO₂飲水投与、4群：1.0%AsA+0.2%NaNO₂を32週間投与後、食道を採取し病理組織学的検索を行った。

逆流性食道炎モデルラットを用いたAsAとNaNO₂併用投与による食道プロモーション検索のためには、5週令のF344ラットに0.1% *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を3週間飲水投与し、食道のイニシエーション処理を行った。1週間の回復後、逆流性食道炎手術を行った。2週間の回復期間後、ラット96匹を4群 (各群：24匹) に分け、1群：基礎飼料、2群：1.0%AsA混餌投与、3群：0.2%NaNO₂飲水投与、4群：1.0%AsA+0.2%NaNO₂を16週間投与後、食道の病理組織学的検索を行う予定である。

AsAとNaNO₂複合投与の前胃発がんイニシエーション検索では、6週齢のF344ラット雄125匹を各群25匹の5群に分け、1群：基礎飼料、2群：1.0%AsA混餌投与+0.2%NaNO₂飲水投与、3群：

1.0%AsA、4群：0.2%NaNO₂、5群：基礎飼料を13週間投与した。第5群には陽性対照として、100 mg/kg体重のMNNGを強制経口投与した。13週間のイニシエーション期間後、病理組織検索用に各群5匹を途中解剖して前胃を採取した。残りの動物には2週間基礎飼料を与えた後、ひき続き1% BHAを混餌投与している。52週間の実験期間終了後に解剖し、前胃の病理組織学的検索を行う予定である。

(倫理面への配慮)

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 100~400bp 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シ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-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、飛行時間型質量分析計 (TOF-MA) 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。

【中江】

動物は、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、0.05% BBN混水投与2週間、0.1% DHPN混水投与2週間よ

り成る計4週間の化学発がん物質によるイニシエーション処置 (DMBDD処置) を施した後、無処置 (第1群) またはカテキン (5000 ppm, 混水) とグルコン酸銅 (10・300・3000・6000 ppm, 混餌) の単独 (第6群; 第2~5群) または併用投与 (第6~10群) 下に25週間飼育した。さらにDMBDD処置を行わない群を設け、それらにおいては、4週間の無処置飼育の後に、無処置 (第11群) またはカテキンとグルコン酸銅 (3000・6000 ppm) の単独 (第14群; 第12, 13群) または併用投与 (第15, 16群) 下に25週間飼育した。動物は実験開始29週間後に屠殺した。全動物について、一般状態は毎日観察し、体重は週1回測定し、飲水量及び摂餌量は週1ないし2回測定した。血清 ($\mu\text{g/dL}$) 及び肝 ($\mu\text{g/wet.g}$) の銅濃度は、株式会社エスアールエルに依頼して測定した。測定は、第1・6・10・13・14・16群の各3-5例について実施した。全動物は、剖検後全身主要臓器及び肉眼的異常部位を摘出し、肝重量を測定した後、摘出臓器・組織を中性緩衝ホルマリン液にて固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色、GST-P免疫染色並びに8-OHdG免疫染色を施して鏡検した。肝におけるGST-P陽性病変の解析においては、病変の数・面積及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、病変の単位面積当たり個数・面積占有割合・平均面積を算出した。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いに関しては、佐々木研究所に定める規定に従い実施した。

【大野】

当研究室にて樹立したHepG2細胞由来のCYP3A4レポーター遺伝子安定発現株 (clone number 3-1-10, 3-1-20) を継代、維持して使用した。CYP3A4レポーター遺伝子安定発現株は0.3

Antibiotic-Antimycotic (100U/ml penicillin G sodium, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B, MEM Non-essential amino acids solution および 10% fetal calf serum) を添加したDMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 中で培養した。培養は5% CO₂-95% 空気を気相とし、37°CのCO₂インキュベーター内で行った。

農薬による培養細胞を用いたin vitroでの誘導評価実験では、細胞を12wellのディッシュに3 x 10⁵を撒き、2日後に各農薬を10microM培地に加え、さらに2日後に細胞をかき集め、可溶性画部を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

細胞をPBSで回収した後、Reporter Lysis Buffer (Promega) 100 μl で溶解し、細胞溶解液20 μl に35 μl のルシフェラーゼ基質 (Luciferase Assay System, Promega) を加え、ルミノメーター (TD-20/20, Promega) によりルシフェラーゼ活性を測定した。測定は室温で30秒間行った。得られた値はタンパク濃度により補正し、薬物無処置群の平均に対する百分率で表した。タンパク濃度はBradford法により測定した。

(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90匹に、イニシエーターとしてDEN (200mg/kg) を1回腹腔内投与し、その2週間後から0.03% MeIQx、0.02% α -Naphthoflavone、0.02% β -Naphthoflavoneをそれぞれ単独、あるいはMeIQxと α -Naphthoflavoneまたは β -Naphthoflavoneの複

合で6週間行った。実験開始3週目に肝部分切除を定法に従い行った。実験開始後8週目にラットを剖検屠殺し、肝臓の組織切片を作製、前がん病変マーカーであるGST-Pを免疫染色し、単位面積あたりの個数と大きさを計測した。

(倫理面への配慮)

実験は動物愛護の精神を十分に尊重して行った。

【原田】

実験1では、有機リン剤MPP (Fenthion, 50mg/kg)、有機塩素剤DDT (*p, p'*-DDT, 75mg/kg)、カーバメート剤MPMC (Xyllylcarb, 30mg/kg)をそれぞれ単独あるいは2種の組み合わせで、3週齢のWistar Hannover系雌幼若ラットに複合的に単回投与後1時間、1日および7日目に計画的に屠殺した。経過中、一般状態の観察、自発運動量の測定を行い、屠殺時に血漿、赤血球、脳のコリンエステラーゼ活性の測定を行った。実験2では、若齢時(5週齢)にDDTを60, 30, 15mg/kgの用量で14日間反復経口投与(前処置)したWistar Hannover系雄ラットに、4週間の休薬期間を置いた後の成熟時(10週齢)にMPP200mg/kgを単回投与し、3日後に屠殺した。それぞれの対照群も設けた。経過中、一般状態の観察、自発運動量の測定を行い、屠殺時に血漿および脳のコリンエステラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱い、残留農薬研究所の規程に基づいておこなった。

C. 研究結果

【松元】

亜硝酸ナトリウムおよびアクリルアミド単独でのコメットアッセイを実施したところ、亜硝酸ナトリウムではDNA損傷性は認められ

なかったが、アクリルアミドにおいては最高濃度2mg/mL群で、Tail lengthのみに有意な増加が認められた。しかし、その値は小さく、その他のパラメーターには有意な差が認められないことからDNA損傷性はないと判断した。一方、陽性対照群(4NQO)では、有意に高い値が得られた。したがって亜硝酸ナトリウムおよびアクリルアミドは単独でのDNA損傷性はないと考えられた。次に5mg/mL亜硝酸ナトリウムと種々の濃度のアクリルアミドを同時処理したが、DNA損傷はまったく観察されなかった。

代謝活性化系によらない染色体異常誘発性では、アクリルアミド単独3時間処理した場合、1mg/mL以上の濃度で構造的染色体異常が有意に増加した。最高濃度(4mg/mL)では強い細胞毒性が現われ、分裂像が観察できなかった。なお、1mg/mL以上では倍数体も有意に増加した。次に0.5mg/mL亜硝酸ナトリウムと種々の濃度のアクリルアミドを同時処理した結果、1mg/mL以上の濃度で構造的染色体異常および倍数体が有意に増加したが、アクリルアミド単独処理の結果とほぼ同じであった。よって、この濃度の亜硝酸ナトリウムとの複合効果は特になかったことを示している。さらに亜硝酸ナトリウム濃度を5mg/mLに上げて同じ実験を行った結果、0.5mg/mL以上で有意な増加が認められた。亜硝酸ナトリウムを共存させなかった場合と比べると、1mg/mL処理群で著しい増強効果が現われた。

代謝活性化系による染色体異常誘発性では、アクリルアミド単独3時間処理した場合、1mg/mL以下の濃度では溶媒対照群と比べて構造的染色体異常の有意な増加は認められなかった。しかし、2mg/mLで構造的染色体異常が有意に増加した。さらに、1mg/mL以上では倍数体が有意に増加した。これは代謝活性化系

によらない場合の結果とほとんど同じであった。0.5mg/mLまたは5mg/mL亜硝酸ナトリウムとアクリルアミドを同時処理した場合、やはり2mg/mLで構造的染色体異常が誘発されたが、その頻度はアクリルアミド単独処理に比べて2倍以上に増加した。

倍数体の誘発に関しては、亜硝酸ナトリウム共存により誘発頻度が増加する傾向は認められなかった。

亜硝酸ナトリウムとEGCGの複合によるDNA損傷性では、亜硝酸ナトリウム単独では陰性であるためEGCG単独でコメットアッセイを行った。その結果、細胞毒性が観察されるものの、DNA損傷はまったく観察されなかった。次に、5mg/mL亜硝酸ナトリウムと種々の濃度のEGCG (100, 200, 400 μ M)を同時処理した。その結果、100 μ MではTail Lengthに、200 μ MではTail lengthおよびOlive tail momentに、400 μ Mでは3つのパラメーター全てに有意差が認められ、亜硝酸ナトリウムとEGCGの複合によりDNA損傷性が誘発されたと考えられた。また、種々の濃度の亜硝酸ナトリウム(0.039~5mg/mL)とEGCG 400 μ Mを同時処理した結果、亜硝酸濃度0.039mg/mLでTail Lengthに有意差が認められた。0.313mg/mLでは全てのパラメーターに有意差が認められた。従って、亜硝酸ナトリウムの濃度を下げても、EGCGの複合作用によりDNA損傷が誘発されたと考えられた。

代謝活性化系によらない染色体異常誘発性では、EGCG単独で3時間処理した場合50~200 μ Mの濃度で有意な染色体異常の有意な増加は認められなかった。400 μ Mでは強い細胞毒性が現われ、分裂像の観察はできなかった。しかし、0.5mg/mLまたは5mg/mLの亜硝酸ナトリウムと50~400 μ MのEGCGを同時に処理したところ、すべての濃度で染色体異常が誘発され

た。誘発頻度は概ね亜硝酸ナトリウムの濃度とEGCGの濃度に比例して増加していることが示された。一方、倍数体の頻度に有意な増加は認められなかった。また、400 μ Mでは強い細胞毒性が現われ、分裂像の観察はできなかった。

代謝活性化系による染色体異常誘発性では、EGCG単独で3時間処理した場合、400 μ Mで明らかに染色体異常が誘発された。代謝活性化系非存在下の結果と比較して、細胞毒性が大きく低下した。0.5mg/mLの濃度の亜硝酸ナトリウムと50~400 μ MのEGCGを同時に処理したところ、EGCGが200 μ M以上の濃度で染色体異常が有意に誘発された。さらに、5mg/mLの亜硝酸ナトリウムと同時処理したところ、すべての濃度で染色体異常が高頻度に誘発された。したがって、代謝活性化系非存在の場合と同様、代謝活性化系存在の下においても亜硝酸ナトリウムと複合増強効果が明確に現われた。一方、倍数体の頻度に有意な増加は認められなかった。

【中譯】

移動相の酢酸濃度の影響を検討した結果、0.01%酢酸において最大のピーク強度が得られたため、本条件で測定を行った結果、TYRおよびNTYRはそれぞれ保持時間3.0分(RSD=0.4%, n=5)と5.7分(RSD=0.4%, n=5)に検出された。本分析条件におけるTYRおよびNTYRの定量限界(S/N=10)は100および0.5nMで、検出下限値(S/N=3)は30および0.1nMであった。また、サロゲート物質を用いた検量線範囲は、TYRは0.1から50 μ Mで、NTYRは0.5から1000nMの範囲で良好な直線性(相関係数0.999以上)が得られた。

実際にマウス肝臓からの抽出液にTYR標準溶液25, 50 μ M, NTYR標準溶液100または200nMを添加し、添加回試験を行った結果、すべてに

において92%以上の良好な回収率が得られた。次にiNOSを誘導する肝障害物質であるアセトアミノフェン300 mg/kgを投与したマウス肝組織中のTYRおよびNTYRの測定を行った結果、TYR、NTYRともにすべての試料から検出が可能であった。またその値はアセトアミノフェンの投与後4時間で最大値となった。免疫化学的染色法によるNTYRの検出では、対照群では小葉中心性にNTYR陽性細胞がわずかに観察されたのに対し、アセトアミノフェン投与群では投与後2時間で小葉中心性のNTYR陽性細胞が強く染色され、投与後4時間で最も強く、実測値と一致する結果が得られた。

【広瀬】

カテキンと亜硝酸の併用投与により、MNNGで誘発された前胃の乳頭腫および扁平上皮癌の発生頻度ならびに発生個数が有意に増加した。併用投与群に生じた扁平上皮癌のうち2例は漿膜への浸潤像が認められ、扁平上皮癌の深達度も上昇した。一方、腺胃腫瘍には併用投与の影響は認められなかった。

前胃粘膜上DNA中の8-OHdGレベルは、カテキンと亜硝酸の併用投与後24時間以降に有意な高値を示した。

NO発生剤のNOC7とエピガロカテキンガレートおよびエピカテキンガレートをインキュベーションした結果、DMPO-OHアダクトのスペクトルが観察された。

逆流性食道炎手術の影響により、投与期間中に各群の多数の動物が食道穿孔や食道貯留物の誤嚥などで死亡した。最終的な生存率は対照群、AsA単独、NaNO₂単独および併用投与群でそれぞれ22、67、67および53%であった。最初の死亡動物（NaNO₂単独投与群、投与5週死亡）から食道粘膜上皮の過形成が認められたため、標本作成が不可能な個体を除くすべての死亡動物について生存動物と同様に食道の増殖性病変を評価し

た。病理組織学的には、食道炎手術により食道下部に粘膜上皮過形成が認められたが、併用投与により病巣の範囲は食道の中および上部へと拡大し、過形成の重篤度も有意に増加した。また、併用投与群の1例には乳頭腫が認められた。

逆流性食道炎モデルラットを用いたAsAとNaNO₂併用投与の食道プロモーション試験は、現在、21週間の実験期間のうち、16週が順調に経過しており、AsAとNaNO₂併用投与の前胃ニシエーション試験は、現在、52週間の実験期間のうち、42週が順調に経過している。

【川西】

プロシアニジンB2と金属の複合によるDNA傷害を検討した。培養細胞を用い、8-oxodGを定量した結果、と高濃度（200μM）のPCN B2で18時間処理すると、8-oxodGの有意な上昇が認められた。牛胸腺DNAを用い、金属イオンおよび過酸化水素存在下での8-oxodG生成量を検討した結果、Cu(II)存在下で8-oxodG生成は有意に上昇し、過酸化水素の添加により著しく8-oxodG生成が増強した。電子スピン共鳴装置(ESR)を用いて3,3,5,5-tetramethyl-1-pyrroline-N-oxide (M4PO)により過酸化水素と金属イオンから生成する・OHをトラップし、PCN B2によるラジカル生成への影響を検討した。Cu(I)および過酸化水素存在下で生じる・OHのシグナル強度はPCN B2を加えることにより増強した。以上の結果から、PCN B2は銅イオンとの複合により酸化促進作用をもたらす可能性が示唆された。

4-hydrazinobenzoic acid (4-HBA) は栽培マッシュルームに含まれる成分の一つであり、アガリクスの成分でもある。4-HBAはマウスの大動脈平滑筋に肉腫を誘発することが報告されている。32Pで標識したDNAと4-HBAをCu(II)存在下で反応させたところ、濃度依存的にDNA傷害性が認められた。catalaseの添加によ

りDNA損傷は抑制され、過酸化水素を介した経路があることが明らかとなった。一方、Cu(I)およびcatalase存在下においても4-HBAの濃度依存的にDNA損傷が認められたことから、過酸化水素以外の活性種もDNA損傷に関わっていることが示唆された。Maxam-Gilbert法を応用しDNA損傷の塩基特異性を検討した。catalase非存在下ではチミン、シトシンの損傷が強かった。一方、catalase存在下ではグアニン、アデニンが強く損傷され、シトシンも損傷された。8-oxodGの生成はCu(II)存在下では濃度依存的に上昇したが、catalase存在下では認められなかった。Cu(II)およびcatalase存在下における4-HBAによるDNA損傷はバソキuproイン(Cuキレート剤)により抑制され、活性種の生成にCuの関与が示唆された。スピントラップ剤を用いたESRの測定結果からbenzoic acid ring Cラジカルが生成されていることが認められた。また、dGMP、dAMP、CMPの添加でラジカル生成は抑制されたが、TMP添加では抑制されなかった。benzoic acid ring CラジカルがDNA塩基と付加体を形成するという反応を検討するため、質量分析による解析を行った。その結果、アデニン、グアニンとbenzoic acid ring Cラジカルは付加体を形成していることが検出された。4-HBAによるDNA損傷は過酸化水素の生成による酸化的DNA損傷と、Cセンターラジカルであるbenzoic acid ring Cラジカルによるグアニン、アデニン、シトシンのDNA付加体形成の両者が存在すると考えられた。以上の結果から、4-HBAが生体内のCu(I)存在下で過酸化水素生成およびCセンターラジカル生成によりDNAを損傷し発がんに関与する可能性が示唆された。

【中江】

実験期間中の一般状態、体重、肝臓重量はDMB

DD処置を行った群あるいは行わなかった群内において群間の差を認めなかった。グルコン酸銅の摂取量はDMBDD処置の有無にかかわらず、グルコン酸銅単独投与とカテキン・グルコン酸銅併用投与群の間に大きな差はなかった。カテキン摂取量も同様に差はなかった。肝の銅濃度はDMBDD処置の有無にかかわらず、カテキンを複合投与することにより、グルコンサン銅単独よりも増加傾向を示した。

肝前がん病変であるGST-P陽性細胞巢の単位面積当たり個数は、DMBDD処置を行った群のグルコン酸銅300 ppm以上単独投与で有意に増加した。一方、カテキンとグルコン酸銅の併用投与では、6000 ppm投与の場合に増加傾向を示したものの、有意差を認めなかった。DMBDD処置を行わなかった群では、群間に差はなかった。病変の面積占有割合及び平均面積については、全群間に有意な差がなかった。

肝細胞における8-OHdG陽性率は、DMBDD処置を行った群のグルコン酸銅300ppm以上単独投与で増加傾向を認め、6000ppm投与で有意に増加した。カテキンとグルコン酸銅6000ppmの併用投与では、陽性率の増加傾向を認めるのみであった。DMBDD処置を行わなかった群では有意な増加を認めなかった。

その他、グルコンサン銅の高用量群で、前胃境界縁の過形成が増加したが、カテキンの併用投与によって、その発生頻度及び程度が有意に減弱した。

【大野】

ヒトCYP3A4の代表的誘導剤であるRifampicinに対して高い応答性を示す細胞株(3-1-10)とClotrimazoleに対してより高い応答性を示す細胞株(3-1-20)を樹立した。今回用いた20種の農薬(分析用評品)は、その大多数がCYP3A4の誘導を示すことが判明した。これらの化合物はその程度から大きく4つのグループに

分類された。もっとも誘導の強いグループ (Dymron, Pyributicarb, Flutolanil, Isofenfos, Dithiopyr) は、実際臨床において誘導により相互作用を引き起こすとして問題となっているRifampicinの約半分程度の誘導能を示していた。やや強いグループ (Etoxazole, Propyzamide, EPN, Isoxathion) では、Clotrimazoleと同じかむしろ強い誘導率が3-1-10細胞株において認められた。一方、Isoxathionでは、誘導率が3-1-10細胞株より3-1-20細胞株で高いものであり、Methalaxyl, Isoprothiolan, Chloropyrifos, Ethoxazole, EPNでは両細胞において同程度の誘導率を示した。市販品として入手した農薬について、分析用の評品とCYP3A4誘導能を比較した結果、誘導能に差はなかった。誘導は、clone 3-1-10細胞株において強く示した。一方、Kepone, o,p'-DDDおよびp,p'-DDEは、以前よりマウスやラットのCYP2B分子種を誘導することが報告されていたが、本結果よりヒトCYP3A4も誘導する可能性が示された。

次に、肝臓におけるヒト型誘導のシステムを構築し、この系を用いて2種の農薬のCYP3A4誘導能について検討した。その結果、Iprobenfosを投与した群は、毒性が強く半分以上のマウスが死んだために誘導の評価はできなかった。Permethorinの場合、CYP3A4遺伝子レポーターベクターウイルスのみの投与では、CYP3A4の誘導は全く認められなかった。一方、ヒトPXRウイルスを同時に投与し、マウスの肝臓にヒトPXRを発現させるとPermethorinの投与によるヒトCYP3A4の約60倍もの誘導が認められた。また、Permethorinは、体内動態を考慮しても誘導を示すことが確認された。

【白井】

GST-Pの単位面積あたりの個数と大きさを指標に肝発がん修飾作用を検討した結果、MeIQx

単独投与により、GST-P陽性細胞巢の単位面積当たりの個数および面積が、無処置対照群に比べ、有意に増加し、MeIQxの肝発がん性を裏付ける結果となった。しかし、MeIQxと α -Naphthoflavoneあるいは β -Naphthoflavoneを同時に投与してもGST-P陽性細胞巢の数あるいは面積は、MeIQx単独群や α -Naphthoflavone、 β -Naphthoflavone単独群に比べて増加せず、MeIQx肝発がんを増強させる結果は得られなかった。また、 α -Naphthoflavone単独、 β -Naphthoflavone単独投与により、GST-P陽性細胞巢の単位面積当たりの個数および面積が、無処置対照群に比べ、僅かであるが有意に増加し、これらの物質は肝発がんを促進する可能性が示唆された。

【原田】

実験1の有機リン剤であるMPPと、カーバメート剤であるMPMC複合投与群において、18例中3例が死亡した。しかし、各剤の単独投与およびその他の組み合わせ (MPP+MPPあるいはMP+DDT) による複合投与による死亡はみられなかった。

臨床症状では、各剤の単独投与群と比べて、MPP + MPP複合投与群およびMPP+DDT複合投与群ではほとんど差がなかった。MPP+MPMC複合投与群では、単独投与に比べて症状発現の質的差異はなかったが、投与後1時間における震顫および流涎の発現頻度が増加し、神経症状の程度もより重篤であった。しかし、生存動物における神経症状は投与後4時間では軽減し、MPPの単独投与群よりも速やかに回復した。

自発運動量投与後1日目の自発運動量は、MP+DDT複合投与群でのみ対照群に比べ有意に増加したが、投与後7日目の自発運動量は、全ての群で有意な変化は認められなかった。

投与後1時間のChE活性測定では、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、対照群の値と比べて血漿では32%~36%、赤血球では8%~12%、脳では29%~33%とほぼ同程度に低下した。一方、カーバメート剤であるMPMCの単独投与群では、血漿、赤血球および脳のChE活性は、それぞれ63%、42%、64%と軽度な低下であった。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1日目のChE活性測定では、有機リン剤MPPの単独およびMPP+MPP投与群において対照群の値と比べて血漿では29%、赤血球では45%~52%、脳では57%~67%のレベルに回復していた。しかしながら、MPP+DDT投与群では、血漿、赤血球および脳のChE活性は、それぞれ19%、39%および49%とやや回復が遅れ、MPP+MPMC投与群では、それぞれ43%、57%、91%と速やかに回復する傾向がみられた。MPMCの単独投与群では、全ての項目で対照群と同程度まで回復していた。

投与後7日目のChE活性測定では、MPPを投与した全ての群で赤血球のChE活性が対照群の72%~79%とやや低かった他は、全項目において対照群と同程度に回復した。

実験2では、有機塩素剤DDTを若齢期に60mg/kgの用量で反復投与（前処理）し、その後の成熟期に有機リン剤MPP 200mg/kgを複合投与した群において、6例中1例の死亡が認められた。DDTあるいはMPPの単独投与、DDT 15mg/kg+MPP 200mg/kg複合投与およびDDT 30mg/kg+MPP 200mg/kgの複合投与では、いずれも死亡例はみられなかった。

DDT14日間連続投与期間および休薬期間では、全ての動物で臨床症状の異常は認められなかった。

単独・複合を問わずMPP 200mg/kgを投与した各群の動物全例に鎮静、攣縮、振戦、縮腫

などの症状が認められたが、MPP単独投与群では投与後48時間までに症状の回復と軽減が認められた。一方、DDTで前処理した後にMPP 200 mg/kgを投与した群では、DDTの用量に依存して強い神経症状が投与後72時間まで継続して認められた。

MPP投与後72時間の自発運動量測定では、MPP単独およびDDT前処理後のMPPの複合投与群で、対照群と比較して有意な減少が認められたが、単独・複合投与群間で差はなく、DDT前処理の影響は特に認められなかった。

MPP投与後72時間のChE活性測定では、血漿および脳ともにMPP単独およびDDTとMPPの複合投与群で、対照群の値に比べて血漿では37%~45%、脳では61%~67%に低下した。しかし、単独・複合投与群間で差はなく、DDT前処理の影響は特に認められなかった。

D. 考察

【松元】

アクリルアミドが染色体異常を誘発することは既に知られており、本実験でも1mg/mL以上の濃度で3時間処理することにより染色体異常が誘発された。また、アクリルアミド1mg/mLの場合、染色体異常誘発性頻度は亜硝酸ナトリウム5mg/mLと共存することによって、4.0%から19.0%に増加した。代謝活性化系による場合では、共存した場合の方が、染色体異常誘発頻度が明らかに高くなった。アクリルアミドはDNAへの結合性は低いが、ヘモグロビンやプロタミンなどタンパク質と結合するため、染色体の構築等に関与するタンパク質や酵素類、例えばヒストンやトポイソメラーゼなどの働きを阻害し、染色体異常を誘発しているものと考えられる。今回の研究で観察された亜硝酸の弱い複合染色体異常増強作用は、アクリルアミドの染色体構築阻害効果

をやや増強することによって現れているかもしれない。

本実験では、アクリルアミド単独処理において、代謝活性化系による場合とよらない場合で染色体異常誘発のプロファイルはほとんど変わらなかった。その理由は次のように考えられる。アクリルアミドはCYP2E1によってグリシダミドに代謝されるが、使用したラットS9中には十分量のCYP2E1が含有していなかったものと推測される。

倍数体の誘発が認められたが、この原因はアクリルアミドがチューブリンへの結合能を有するためであると考えられる。本研究では2mg/mLよりも1mg/mLの方が高い出現頻度を示す場合が多かったが、これは、2mg/mL処理の細胞では細胞周期が伸びて、倍数体出現ピークが後ろにずれるため、見かけ上2mg/mL処理の倍数体頻度が低下したものと推測された。市販のポテトチップスには1袋(70g)あたり0.1~0.25mgのアクリルアミドを含有する。本実験で設定した0.25~2mg/mLという濃度は条件によっては胃内で起こりうる濃度である。

亜硝酸ナトリウムとEGCGは単独ではDNA損傷性がなかったものの、同時処理すると、DNA損傷の誘発が明らかに認められた。また、細胞毒性試験の結果より、細胞毒性も同時に現れていた。一般には30%以上の細胞毒性が観察される濃度ではコメットアッセイの結果は避けられてきたが、今回は60%程度の細胞毒性が見られ、一見すると細胞毒性によるDNA損傷と考えられた。しかし、EGCG 400 μ M単独でも細胞毒性がすでに46.6%あった。亜硝酸を加えると、EGCG単独処理では現れなかったDNA損傷が亜硝酸濃度に依存して有意に増加した。一方、細胞毒性は亜硝酸の濃度とは関係なく、やや増加した(59.7~70.2%)。これは細胞毒性由来のDNA損傷と考えるよりは、

EGCGによる元々の細胞毒性に加えて、亜硝酸との複合作用により新たなDNA損傷性がひきおこされた可能性が最も高いと結論した。今後、この点について細胞毒性と遺伝毒性の関係を考慮しながら、さらなる研究が必要とされる。

また、コメットアッセイの結果からEGCG単独のDNA損傷性は陰性であることが判明した。染色体異常誘発性に関しても、代謝活性化系によらない場合では陰性であることが示された。しかし、ヒトBリンパ球WIL2-NS細胞に対し、100 μ Mの濃度で染色体異常が誘発される報告がある。また、本実験では代謝活性化系存在下で明らかな染色体異常の誘発が観察された。よって、EGCGは弱い染色体異常誘発性を有するものと考えられる。

EGCGを亜硝酸ナトリウムと共存させることで、強いDNA損傷作用が発現し、また、高頻度で染色体異常の誘発が認められた。その原因およびメカニズムは今後の研究課題であるが、EGCGと同じフェノール系抗酸化剤であるカテコールは亜硝酸ナトリウムと複合させることにより、ヒドロキシラジカルが生成される。EGCGも同様にヒドロキシラジカルが生成される可能性があるが、この経路は酸性条件下で亜硝酸ナトリウムからNOが生成することを必須としている。本研究は中性域で行われていたので、この仮説が適用されるかどうかは不明である。

代謝活性化系存在下のEGCGによって誘発された染色体異常は、亜硝酸ナトリウムと複合してその頻度が増強された。したがって、EGCGの代謝物にも染色体異常誘発性があり、かつ、亜硝酸ナトリウムにより異常頻度が増大することも本実験から判明した。そのメカニズムは上述したものと同一であると推測する。市販緑茶飲料水中のカテキン濃度はおよそ

0.5~2.5 mg/mLである。その約50%がEGCGであるとすれば、それを飲用した場合、希釈されなければ胃内濃度は0.25~1.25mg/mLである。したがって、本実験で設定した50~400 μ M = 23~184 μ g/mLという濃度は、十分に胃内で起こりうる濃度と言えよう。

【中澤】

*in vivo*におけるニトロチロシン生成量は極めて微量であり、試料も微量であることから、高感度かつ高精度な分析法が必要である。構築した分析法はNTYRの検出限界0.1nM、定量限界は0.5nMと高感度な分析を達成し、マウス肝組織を用いた添加回収試験では94%以上と良好な結果が得られた。また、TYRの定量限界は30nM、検出限界は100nM、添加回収試験では92%以上と実試料の測定には十分な感度が得られ、NTYR、TYRともに高感度かつ高精度な測定が達成された。また、本分析法をアセトアミノフェン300mg/kgを腹腔内投与したマウス肝組織に適用した結果、アセトアミノフェン投与後4時間でNTYR/TYR (μ mol/mol) 値が最大となり、免疫化学的染色法によるNTYRの検出と同様の結果が得られた。従って、本分析法を用いることにより、生体内のNTYRを測定することが可能であると考えられた。

【広瀬】

食品中に多量に含まれるフェノール系抗酸化剤の茶カテキンは他の抗酸化剤と同様にNaNO₂との併用投与により前胃に対する発がんプロモーション作用を有することが明らかになった。NaNO₂は胃内の低pH条件下でNOを発生させることが知られている。カテキンとNaNO₂の複合投与でラット前胃粘膜上皮DNA中の8-OHdGレベルは投与24時間後から上昇し、ESRではOHラジカルが検出された。したがって、これらの複合による前胃発がん促進作用には、亜硝酸由来のNOとカテキンとの反応で生じるOHラ

ジカルが関与している可能性が示唆された。

抗酸化剤とNaNO₂の複合による標的臓器は前胃であり、実験結果をヒトに外挿することが困難であった。最近、ヒト逆流性食道炎の発生要因として、NOが注目されており、我々は既に*in vitro*ではAsAとNaNO₂の共存下で、多量のNOが産生されることを報告した。そこで、胃液逆流型食道炎モデルラットを作成して、AsAとNaNO₂の併用投与の食道への影響を検証した。その結果、複合投与した動物では、食道の上部から下部にかけて広範囲な粘膜上皮過形成が認められ、1例には乳頭腫が発生した。このように、ラット前胃で認められる複合投与による病変が食道粘膜においても観察されたことから、AsAとNaNO₂の複合投与は、逆流性食道炎下の食道に対しても発がん性を有する可能性が示唆された。現在、食道に対する発がん促進作用を短期間に、かつ詳細に検索するため、本食道炎モデルと発がんイニシエーターの投与を組み合わせた食道2段階発がん実験を実施中である。AsAとNaNO₂を長期間投与すると、ラット前胃粘膜に腫瘍が発生する。また、複合投与で前胃粘膜上皮に酸化DNA傷害が起こり、*in vitro*では強い染色体異常が誘発されることから、複合による発がんには、イニシエーション作用が関与している可能性がある。この可能性を証明するため、イニシエーション期にAsAとNaNO₂を投与し、その後のプロモーション期に前胃発がんプロモーターであるbutylated hydroxyanisole (BHA)を投与する実験を行っている。

【川西】

プロシアニジンB2 (procyanidin B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin]; PCN B2) は、ココア豆、ブドウの種子、リンゴの皮、松皮(ピクノジノール)に含まれるエピカテキンの二量体である。その抗酸化作用から癌や循

環器疾患の予防への期待が持たれているが、本研究の結果、銅イオンの存在下で牛胸腺DNAの8-oxodGが増加し、さらに過酸化水素水の添加により8-oxodGが著明に増加したことなどから、銅イオンの存在下では、OHラジカルによる酸化的ストレスが発生することが示唆された。4-hydrazinobenzoic acid (4-HBA) は栽培マッシュルームに含まれる成分の一つであり、健康食品アガリクスの成分でもある。4-HBAは、遺伝毒性が陽性であり、マウスの大動脈平滑筋に肉腫を誘発することが報告されている。本研究では4-HBAの安全性評価を目的にDNA傷害性を検討した。その結果、*in vitro*でDNAを銅イオンの存在下で反応させるとDNA損傷が発生し、過酸化水素の生成による酸化的DNA損傷が生じることが明らかになった。また、過酸化水素を介する経路以外に、benzoic acid ring Cラジカルによるグアニン、アデニン、シトシンとのDNA付加体形成もDNA損傷に関与していることも明らかになった。従って、これらの原因によるDNA損傷が発がんに関与している可能性が示唆された。

【中江】

グルコン酸銅10ppm投与群の銅摂取量は、基礎飼料中の銅濃度（約10ppm）と合わせると、約8mg/day/ヒト（60kg体重）に換算され、ヒトの銅摂取目安5mg/day及び許容上限摂取量(UL) 9mg/dayの範囲内に相当する。一方、カテキン 5000ppm群のカテキン摂取量は、約20g/day/ヒトに換算され、一般的なカテキン含有の健康食品に表示される摂取目安 500～1000mg/dayの約20-40倍に相当する。DMBDD処置を行った群のグルコン酸銅3000ppm以上投与で肝における銅の蓄積が認められたことから、DMBDD処置条件下で投与されるグルコン酸銅は、300ppmまでであれば腸管における非吸収と肝における処理による体外排出により恒常性を

保つことが可能であるが、3000ppmでそれらの処理能の限界を超え、6000ppmで急激に銅が蓄積するものと推察された。また、カテキンは、グルコン酸銅高用量曝露による肝における銅蓄積を促進するものと示唆された。DMBDD処置条件下で、グルコン酸銅300ppm以上の単独投与で肝前がん病変の発生個数を有意に増加させたが、カテキンの併用投与によりこの増加が認められなくなった。また、前胃でもグルコン酸銅6000ppm単独投与は、過形成を発生させたが、カテキンの併用投与によりこの変化が減弱した。以上の結果より、グルコン酸銅は、ヒトが摂取すると考えられる用量では特段の生体影響を示さないが、高用量の場合、肝及び前胃において発がん促進作用を有し、発がんリスクを増加させる可能性のあるものと判明した。一方、カテキンは、ヒトが摂取する量よりも明らかに高い用量を投与しても、何れの臓器に置いても発がん促進作用を示さず、グルコン酸銅と併用すると、肝、前胃に置いて発がんリスクを軽減させる可能性のあるものと示唆された。酸化性DNA傷害の指標である8-OHdGは、DMBDD処置下において、グルコン酸銅の300ppm以上単独投与で肝細胞に増加し、カテキンの併用により減少した。このことより、グルコン酸銅の高用量投与は生体内の利用可能銅量を増加させ、過剰に存在する銅は酸化性ストレスを誘導し、このストレスはDNA傷害等を介して肝・前胃発がんを促進すること、カテキンは抗酸化作用によりグルコン酸銅の肝・前胃発がん促進を抑制することが推察された。

【大野】

今回CYP3A4誘導評価に用いた培養細胞株は、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、CYP3A4遺伝子のプロモーターとエンハンサーを組み込んだプラスミドDNAを、ヒ

ト肝臓がん由来細胞であるHepG2細胞の染色体に組み込んで作成したものである。この細胞を用いることでCYP3A4誘導をルシフェラーゼ活性として安定的に評価することが可能である。今回用いた20種の農薬は、分析用の評品を用いたが、その大多数がCYP3A4の誘導を示すことが判明した。ただし、TPNとCaptanは、clone 3-1-10細胞株に対して毒性を示した。これらの化合物はその程度から大きく4つのグループに分類された。最も誘導の強いグループは、実際臨床において誘導により相互作用を引き起こすとして問題となっているRifampicinの約半分程度の誘導能を示していた。Isoxathionなど、誘導率がclone 3-1-10細胞株よりclone 3-1-20細胞株で高いものや、Methalaxylなど同程度のもがありclone 3-1-10細胞株とclone 3-1-20細胞株の誘導率が化学物質によって異なる明確な原因は現在のところ明らかではないが、誘導の強いものはclone 3-1-10細胞株において高い応答性を示すようである。

in vitroにて得られた結果は、in vivoの結果と必ずしも同じではない場合も考えられる。特に、生体内に取り込まれた化学物質の多くは、代謝を受け速やかに体外へと排泄される。本研究で用いた培養細胞系を用いた実験結果には、体内動態などの複雑な生体反応が考慮されていない。また、薬物代謝酵素誘導の種差の大きな原因に、誘導に関わる核内レセプターPXRの薬物に対する応答性がヒトと実験動物間で大きく異なることが知られている。そこで本研究では、アデノウイルスを用いてマウスにPXRを強制発現させると同時にCYP3A4遺伝子レポーターベクターをマウスに導入して、肝臓におけるヒト型誘導のシステムを構築した。この系を用い、Permethorinを投与した結果、Permethorinはマウス内在のPXR

を活性化しないが、ヒトのPXRを活性化することにより強くCYP3A4を誘導することが示され、PermethorinのヒトにおけるCYP3A4の誘導評価は、マウスを用いた実験結果から予測することは難しいことが示唆された。

今後は、強い誘導能を示した他の農薬についても本実験系を用いて、実際に生体内において誘導を引き起こすかについて検討する予定である。また、農薬による他の薬物代謝酵素の誘導についても検討を行う予定である。

【白井】

α -Naphthoflavoneや β -Naphthoflavoneは必ずしも食品中に多く含まれている化学物質ではないが、前年度、ウエスタンブロット法を用いた試験により、ラット肝において後者はCYP1A1/1A2を顕著に誘導し、前者は特にCYP1A2を強く誘導することを報告している。MeIQxを含めたヘテロサイクリックアミンは、CYP1A1/1A2で代謝活性化を受けた後、さらにアセチルトランスフェラーゼで活性化され、最終発がん物質になる。また、代謝過程で、第2相酵素でグルクロン酸抱合され解毒される。さらに、代謝活性化されたヒドロキシ体は自動酸化され活性酸素を産生し、酸化的DNA傷害を起こすとも言われている。今回、MeIQxの代謝活性化に関わるCYP1A1/1A2の誘導を促進させるべく α -Naphthoflavoneあるいは β -Naphthoflavoneを同時に投与したが、期待とは異なりMeIQxの肝発がん性を促進しない結果となった。 β -NaphthoflavoneはAhRのリガンドであり、抗酸化や解毒に関与する酵素であるNAD(P)H:quinone oxidoreductase、glutathione S-transferase A subunits、heme oxygenase-1やUDP-glucuronosyltransferaseを誘導することも知られており、これらの酵素が発がん修飾作用に影響している可能性も否定できない。実際、多くの抗酸化物質はMeIQx

との同時投与でMeIQxによる肝発がんを抑制する。従って、実際の生体内では、CYP1A1/2のみならず、解毒酵素などが複雑に関与していることが示唆され、第1相酵素の誘導能のみを指標としても、発がん修飾作用の予測は困難であることが示唆された。また α -Naphthoflavoneと β -Naphthoflavoneの両者にGST-P陽性細胞巢の発生促進作用があることが示され、これらに肝発がん促進作用あるいは肝発がん性を有することが示唆される結果が得られた。 β -Naphthoflavoneの肝発がん促進作用はすでに報告されており、その結果を支持するものとなったが、 α -Naphthoflavoneの肝発がん促進作用は今回の研究で初めて明らかとなった新知見であり、強力なCYP1A1/1A2の発現上昇作用を有する物質の肝発がん促進作用として、極めて興味深い。

【原田】

農薬の複合毒性（相加・相乗毒性）に関する情報は、従来から社会的にもその必要性が認識されているが、実際の報告は比較的少なく、依然として情報量に乏しい。そこで、被験物質として有機リン系、カーバメート系および有機塩素系の3種類の殺虫剤を組み合わせ、複合暴露影響について検討した。

実験1では、幼若動物を用い有機リン剤（MPP）、有機塩素剤（DDT）およびカーバメート剤（MPMC）の組み合わせによる単回経口複合投与毒性について検索し、成獣における実験結果と比較検討した。

まず、リン剤（MPP）、塩素剤（DDT）あるいはカーバメート剤（MPMC）の単回単独投与毒性では、幼若ラットが自ら飼料を経口摂取し始める離乳直後に死亡が発現しない程度の用量で強制経口投与し、神経症状およびChE活性抑制の程度を主要な指標として単剤による暴露影響を検索した。その結果、幼若ラット

における単剤投与では、同用量のMPPあるいはDDTの投与によって、成熟ラットでは見られなかった攣縮あるいは震顫や流涎が幼若ラットでは認められ、神経症状は幼若ラットの方が成熟動物よりやや強く発現し、解毒酵素が未熟である幼若ラットでは、一過性の急性症状がやや強く発現することが示唆された。さらに、幼若ラットにおけるMPMCの単独投与では、成熟ラットでは死亡がみられなかった用量で死亡が生じ、カーバメート剤に対する幼若動物の感受性の高さを裏付ける結果となった。

リン剤と有機塩素剤（MPP + DDT）の単回複合投与毒性については、成熟ラットにおいて、有機塩素剤であるDDTに予め暴露された場合、肝臓の薬物代謝酵素が活性化されて有機リン剤の毒性が弱まることが報告されている。今回の幼若ラットにおけるDDTとMPPの複合投与では、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、成熟ラットと同様に明確な複合影響は認められなかった。

MPPとMPMCの複合投与群では、死亡率の増加および神経症状の増強が認められ、成熟ラットと同様に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。投与後1時間のChE活性の低下は、MPPあるいはMPMCの単独投与と同程度であった。しかしながら、症状およびChE活性の回復がMPP単独投与群と比べて速やかだった点が、症状発現期間の延長および血漿ChE活性低下の回復遅延傾向が認められた成熟ラットの複合投与結果と異なっていた。

実験2では、成長期の子供が食物を介して定期的にDDTの暴露を受け、成人後に有機リン剤に単回大量暴露された場合を想定し、若齢期に有機塩素剤DDTを反復投与（前処理）したラットに対し、休薬期間を置いた後の成熟期に