

リン剤MPPを単回投与し、その複合投与の影響について検索した。具体的には、単独投与では体重増加抑制および神経症状が認められない用量のDDTを成長期（若齢時）のラットに反復投与（前処理）し、その後休薬期間において、成熟後にMPPを単回投与した結果、顕著な体重増加抑制、神経症状の増強および回復遅延がみられ、DDT前処理の影響（MPPの毒性発現に対する増強効果）が確認された。なお、DDT 60mg/kg/day + MPP 200mg/kg群では6例中1例が死亡した。ただし、自発行動量およびChE活性には複合暴露の影響はみられなかった。

## E. 結論

①チャイニーズハムスター培養細胞において、アクリルアミドと亜硝酸ナトリウムの間には複合的なDNA損傷性作用は認められない。しかし、複合的な染色体異常誘発性は弱いながら認められた。それに対して、茶カテキンの主要成分であるEGCGと亜硝酸ナトリウムとの間には明らかな複合的なDNA損傷作用および染色体異常誘発・増強効果が認められた。

②一酸化窒素やペルオキシナイトライトは反応性が高く不安定なため、生体試料においてそれらを直接測定することは困難であるが、NTYRのような生体内修飾物質を測定することで、間接的ではあるが活性窒素種の生成量を評価することが可能である。本研究では生体内における活性窒素種の生成を明らかにすることを目的として、タンパク質の活性窒素種による修飾物質であるNTYRの分析法を構築し、実際に測定可能であることを明らかにした。今後、種々の臓器における応用が期待される。

③茶カテキンとNaNO<sub>2</sub>の併用投与は、MNNGラット胃発がんモデルにおいて、前胃発がんを促進することが明らかになった。また、その発がん機構にはNOを介した酸化的ストレスの

関与が示唆された。AsAとNaNO<sub>2</sub>の併用投与は、逆流性食道炎モデルラットの食道に対して粘膜上皮過形成の程度を増悪させ、低頻度ながら腫瘍も発生させた。したがって、これら2剤の併用は逆流性食道炎下の食道に対して発がん性を有する可能性が示唆された。

④健康食品中に含まれる化学物質が金属との複合作用で酸化的あるいは付加体形成により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、酸化性ストレスに基いて肝と前胃を標的とする発がん促進作用を有し、高用量で発がんリスクを増加させる恐れがあるが、使用基準範囲においてその可能性が低いものと判明した。またカテキンは、単独で増殖性病変誘発促進作用を発揮せず、むしろグルコン酸銅による発がんリスクを軽減する可能性があるものと示唆された。

⑥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。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と考えられる。

⑦in vivoにおける発がん物質と他の化学物質との酵素誘導を介した発がん修飾作用の予測には、CYPの誘導や阻害のみでなく、解毒酵素など他の要因を総合的に考慮する必要がある。

⑧MMPとカーバメート剤MPMCを複合投与した

場合、成獣と比べて幼若動物の方が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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. Ishii Y., Umemura T., Kanki K., Kuroiwa Y., Nishikawa A., Ito R., Saito K., Nakazawa H., Hirose M.: Possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite, *Arch. Biochem. Biophys.*, 447:127-135, 2006.
2. Ishii Y., Iijima M., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.: Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunohistochemical analysis in livers of mice administered acetaminophen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, in press.
3. Ichihara T, Miyashita K, Kawabe M, Imaida K, Asamoto M, Ogiso T, Tamano S, Hirose M, Shirai T. Lack of combination hepatocarcinogenicity of harman, norharman and amitrol when given with NaNO<sub>2</sub> in the rat. *J Toxicol Sci*, 30: 1-6, 2005.
4. Suguira S, Asamoto M, Hokaiwado N, Hirose M, Shirai T. Harman and norharman suppressed but NaNO<sub>2</sub> enhanced the development of preneoplastic liver cell foci in 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinixaline (MeIQx)-treated rats. *J Toxicol Pathol.* 18: 99-104, 2005.
5. Kitamura Y, Umemura T, Okazaki K, Kanki K, Imazawa T, Yanai T, Masegi T, Nishikawa A, Hirose M. Enhancing effects of combined treatment with IQ and sodium nitrite on rat liver, colon and Zymbal's gland carcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine (DEN) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH). *Int J Cancer*, 118:2399-2404, 2006.
6. Okazaki K, Ishii Y, Kitamura Y, Maruyama S, Umemura T, Miyauchi M, Yamagishi M, Imazawa T, Nishikawa A, Yoshimura Y, Nakazawa H, Hirose M. Dose dependent promotion of forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine - Possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage. *Cancer Sci.* 97: 175-182, 2006.
7. Kitamura Y, Yamagishi M, Umemura T, Nishikawa A, Hirose M. Lack of enhancing effects of sodium nitrite on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.*, 235: 69-74, 2006.
8. Sakano K, Mizutani M, Murata M, Oikawa S,

- Hiraku Y, Kawanishi S. Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 39:1041-9, 2005.
9. Oikawa S, Ito T, Iwayama M, Kawanishi S. Radical production and DNA damage induced by carcinogenic 4-hydrazinobenzoic acid, an ingredient of mushroom *Agaricus bisporus*. *Free Radic Res.* 40:31-9, 2006.
10. Piao F, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S, Cheng F, Zhong L, Yamauchi T, Kawanishi S, Yokoyama K. Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels. *J Occup Health.* 47:445-9, 2005.
11. Kawanishi S, Oikawa S, Murata M. Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents. *Antioxid Redox Signal.* 7:1728-39, 2005. Review
12. Hongo T, Kajikawa M, Ishida S, Ozawa S, Ohno Y, Sawada J, Umezawa A, Ishikawa S, Kobayashi T, and Honda H: Three-Dimensional High-Density Culture of Hep G2 Cells in a 5-ml Radial-flow Bioreactor for Construction of Artificial Liver. *J, Bioscience and Bioengineering*, 99, 237-244, 2005
13. Takashi Kubo, Su-Ryang Kim, Kimie Sai, Yoshiro Saito, Toshiharu Nakajima, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, Kuniaki Shirao, Noboru Yamamoto, Hironobu Minami, Atsushi Ohtsu, Teruhiko Yoshida, Nagahiro Saijo, Yasuo Ohno, Shogo Ozawa, and Jun-ichi Sawada, Functional Characterization of Three Naturally Occurring Single Nucleotide Polymorphisms in the CES2 gene encoding carboxylesterase 2 (hCE-2). *Drug Metab. Disp.* 33:1482-1487, 2005.
14. Yawata A, Kim SR, Miyajima A, Kubo T, Ishida S, Saito Y, Nakajima Y, Katori N, Matsumoto Y, Fukuoka M, Ohno Y, Ozawa S, Sawada J. Polymorphic tandem repeat sequences of the thymidylate synthase gene correlates with cellular-based sensitivity to fluoropyrimidine antitumor agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 56:465-472, 2005.
15. Kuribayashi, M., Asamoto, M., Suzuki, S., Hokaiwado, N., Ogawa, K. and 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 influences. *Cancer Lett.* 232: 289-299, 2006.
- (2) 学会発表
1. 松元郷六ら、チャイニーズハムスター培養細胞を用いた亜硝酸ナトリウムと抗酸化剤の複合処理による染色体異常誘発、日本環境変異原学会第34回大会（東京、2005年11月）
2. Yuji Ishii, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, Keita Okano, Tomononari Yajima, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Masao Hirose Hiroyuki Nakazawa. Quantitation of protein-bound nitrotyrosine by liquid chromatography with mass spectrometry in liver of mice administered acetaminophen. *Separation*

- in the BioSciences (SBS) 2005 (2005年9月・Utrecht)
3. Yuji Ishii, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Masao Hirose, Hiroyuki Nakazawa. A possible involvement of nitric oxide-mediated oxidative stress in the induction of rat forestomach damage and cell proliferation by the combined treatment with catechol and sodium nitrite. *Pacificchem. 2005* (2005年12月・Honolulu)
  4. Yuji Ishii, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, Keita Okano, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Masao Hirose, Hiroyuki Nakazawa. Determination of peroxynitrite-derived nitrotyrosine in mice liver by Liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *PITTCON 2006* (2006年3月・Orlando)
  5. 黒岩有一, 石井雄二, 梅村隆志, 神吉けい太, 西川秋佳, 中澤裕之, 広瀬雅雄: 茶抽出物(カテキン類)と亜硝酸ナトリウムの併用投与による前胃発がん促進作用. 第22回日本毒性病理学会 2006年1月26日
  6. Hatasu Kobayashi, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi, Mechanism of oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate, *ISCaP Symposium in Kyoto*, 2005年5月20~21日、京都市
  7. 村田真理子, 翠川薫, 川西正祐, アルコール関連物質サルソリノールによるラジカル生成を介した酸化的DNA損傷, 第27回日本フリーラジカル学会学術集会、2005年6月4~5日、岡山市
  8. Ayako Furukawa, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi, The distinct effect of iron and copper ion on catechin-dependent DNA damage. 第15回 金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2005年6月9~10日、大阪
  9. 及川伸二、川西正祐、マッシュルームに含まれる発がん性 4-hydrazinobenzoic acid によるラジカル生成とDNA 損傷機構、第64回日本癌学会総会、2005年9月14~16日、札幌市
  10. 及川伸二、古川絢子、川西正祐、Site-specific DNA damage induced by purpurin, a natural pigment, with reference to carcinogenesis、日本環境変異原学会第34回大会、2005年11月16~18日、東京都
  11. 川西正祐, 村田真理子, 抗酸化物質フラボノイド類の有効性と安全性の評価、第42回植物化学シンポジウム、2005年12月2日 名古屋
  12. 村田真理子、渡辺奈々、川西正祐、がんの化学予防の安全性評価 (その11) フラボノイド類ケンフェロールによる酸化的DNA損傷とAhRリガンド活性、第76回日本衛生学会総会、2006年3月25~28日、宇部市
  13. 中江 大, 阿部正義, 鈴木紀子, 吉田 緑, 五十嵐麻希, 植松史行, 高橋正一, 前川昭彦. 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. カテキン及びグルコン酸銅を用いたラット中期多臓器発がん性試験法による検討1. 第10回日本フードファクター学会 (2005年11月, 岡山県岡山市).
  14. 阿部正義, 鈴木紀子, 吉田 緑, 五十嵐麻希, 植松史行, 高橋正一, 前川昭彦, 中江 大. 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. カテキン及びグルコン酸銅を用いたラット中期多臓器発がん性試験法による検討 2. 第10回日本フードファクター学会(2005年11月, 岡山県岡山市) .
15. 阿部 正義, 鈴木 紀子, 吉田 緑, 五十嵐 麻希, 臼田 浩二, 古川 賢, 植松 史行, 高橋 正一, 前川 昭彦, 中江 大. 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. カテキン及びグルコン酸銅を用いたラット中期多臓器発がん性試験法による検討 1. 第22回日本毒性病理学会学術集会(2006年1月, 鹿児島県鹿児島市) .
16. A Miyajima-Tabata, S Ozawa, J He, H Tanaka, K Nakai, M Sunouchi, Y Kamikawa, K Kubota, H Ogata and Y Ohno. Interindividual variation of expression level of CYP3A4 and its related pharmacogenetic genes in Japanese liver tissue. 第44回 アメリカ トキシコロジー学会 (The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology) 2005. 3. 6-10, New Orleans LA.
17. 宮島敦子、小澤正吾、何晋徳、田中宏昌、仲井健也、簾内桃子、上川雄一郎、窪田敬一、緒方宏泰、大野泰雄: ヒト肝におけるCYP1A, 2B, 2C, 3A遺伝子および関連核内受容体遺伝子の発現量の個人差 日本薬学会第125年会(2005. 3. 29-31) 東京
18. Hideo Kurebayashi and Yasuo Ohno, In Vitro Metabolism of Ametryne and Prometryne by Human Liver Microsomes and Human Cytochrome P450 Isoforms. ISSX/JSSX meeting (Maui, Hawaii) (2005. 10. 22-27)
19. Kenya Nakai, Shogo Ozawa, Fumitaka Suzuki, Hiromitsu Kumada, Hiromasa Tanaka, Kazuhiko Hanada, Momoko Sunouchi, Keiichi Kubota, Yuichiro Kamikawa, Hiroyasu Ogata and Yasuo Ohno, Levels of Messenger RNA Encoding Drug Metabolism Enzymes and Drug Transporters in the Liver of Chronic Hepatitis C Patients. ISSX/JSSX meeting (Maui, Hawaii) (2005. 10. 22-27)
20. Atsuko Miyajima-Tabata, Shogo Ozawa, Hiromasa Tanaka, Kenya Nakai, Momoko Sunouchi, Jun-ichi Sawada, Yuichiro Kamikawa, Keiichi Kubota, Hiroyasu Ogata, Yasuo Ohno, The Crosstalk of Nuclear Receptors on the Expression of CYP Isoforms in Japanese Liver Tissue. ISSX/JSSX meeting (Maui, Hawaii) (2005. 10. 22-27)
21. 有機リン剤と有機塩素剤あるいはカーバメート剤のラットにおける単回投与複合: 首藤康文、配島淳子、小嶋五百合、佐々木淳矢、藤江秀彰、松本力、林豊、上田英夫、小坂忠司、原田孝則、第141回日本獣医学会学術集会(つくば国際会議場、2006年)
22. 有機塩素系および有機リン系農薬の複合暴露を受けたラット脳における網羅的遺伝子解析: 配島淳子、首藤康文、武田真記夫、大塚亮一、藤江秀彰、松本力、林豊、原田孝則第141回日本獣医学会学術集会(つくば国際会議場、2006年)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得  
なし。
  2. 実用新案登録  
なし。
  3. その他  
なし。

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）  
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 和田 邦生 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室  
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( $\text{NaNO}_2$ )とアクリルアミド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、 $\text{NaNO}_2$ とアクリルアミド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、 $\text{NaNO}_2$ と茶カテキンの主要成分である(-)-epigallocatechin-gallate (EGCG)の複合遺伝毒性を評価するため同様の実験を行った。 $\text{NaNO}_2$ とEGCGを同時に処理した場合、 $\text{NaNO}_2$ およびEGCG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。よって、 $\text{NaNO}_2$ とEGCGには複合遺伝毒性があるものと結論した。

A. 研究目的

野菜などに多く含まれる硝酸塩は口腔細菌によって亜硝酸となる。亜硝酸と抗酸化剤である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ると、前胃に強い過形成や乳頭腫が発生することが報告されている<sup>1,2)</sup>。昨年度の本事業において我々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したところ、アスコルビン酸やカテコールは亜硝酸と同時に哺乳類培養細胞に処理させることにより、染色体異常が増強あるいは誘発されることを示した。

本年度はアクリルアミドと茶カテキンに

ついて亜硝酸との複合遺伝毒性について調査することにした。アクリルアミドはげっ歯類に対し発ガン性のある化学物質で国際がん研究機関(IARC)では2A(ヒトに対して恐らく発ガン性がある)に分類されている。近年、炭水化物を多く含むイモ類を高温で調理する(焼くまたは揚げる)ことにより、アクリルアミドが自然に生成されていることが分かり、食の安全性に関して問題となっている。一方、お茶、特に緑茶は日本人が日常的に飲用するもので、その中に含まれるカテキン類は抗菌性、抗酸化作用、抗腫瘍効果があると信じられ、カテキン摂取がブ

ームのようになっている。アクリルアミドも茶カテキンも亜硝酸と組み合わせた場合、遺伝毒性の観点からどのような複合効果が見られるのかは知られていない。そこで、哺乳類培養細胞を用いて DNA 損傷性や染色体異常誘発性をエンドポイントとして評価した。なお、緑茶には複数のカテキン類が含まれるが、その内の 50% 以上を (-)-epigallocatechin-gallate が占めることから、本研究では茶カテキンとして (-)-epigallocatechin-gallate を用いた。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

亜硝酸ナトリウム (CAS No: 7632-00-0、純度 98.5%、和光純薬工業株式会社)、アクリルアミド (CAS No: 79-06-1、純度 95%、和光純薬工業株式会社)、(-)-epigallocatechin-gallate (EGCG、CAS No: 989-51-5、純度 >90%、和光純薬工業株式会社) はいずれも水に易溶であるため、生理食塩水 (大塚製薬株式会社) を溶媒として用いた。

### 2. 細胞

チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL を用いた。細胞は新生仔牛血清 (Gibco BRL) 10% を含むイーグル MEM 培地 (Gibco BRL) を用いて 37°C、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内で培養した。

### 3. in vitro コメットアッセイ

試験は Hartmann らのガイドライン<sup>3)</sup>および Sasaki らの方法<sup>4)</sup>を参考に、以下の

条件で実施した。

組織培養用 60 mm プレートに細胞を播種した。培養液量は 5 mL とした。48 時間後、種々の濃度の被験物質溶液を最終培地濃度が 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 (4-ニトロキノリン-1 オキシド、和光純薬工業株式会社) をジメチルスルホキシドに溶解させて用いた。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 (科研製薬株式会社) 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 (75mM NaCl, 30mM EDTA2Na) で細胞を再浮遊させた。細胞浮遊液と Low melting point agar (ナカライテスク株式会社) を混和し、細胞を含んだ寒天を、あらかじめ Normal melting point agar (ナカライテスク株式会社) をコーティングしておいたスライドガラス上に均等に広げた。冷却により寒天を固めた後、冷却した細胞溶解液 (2.5M NaCl, 100mM EDTA2Na, 10mM Tris base, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH10) に浸した。1 プレートあたり 2 枚のスライド標本作製した。細胞溶解液に 1 時間以上浸した後、電気泳動槽 (株式会社マリソル) 上で、4°C に冷却した電気泳動液 (300mM NaOH, 1mM EDTA2Na, pH >13) により、スライドガラスを 20 分間浸し、冷蔵暗所でアンワインディングを行った。その後直ちに電気泳動を開始した。泳動条件は 25V, 270~300mA, 4°C, 20 分、暗所であった。電気泳動が終了したら、冷却した中和液 (Tris base pH7.5) に 5 分浸し、過剰なアルカリを中和した。処理が終了したら

スライドガラスをエタノールに浸し、脱水し、エチジウムブロマイドで染色した。

観察は Komet 5.5(Kinetic Imaging Ltd.) を用いて各スライドガラスあたり 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。

統計解析は陰性対照群と処理群の間で One-way Anova を用いた。被験物質処理群に有意な差が認められた場合は Dunnett の多重検定を行った。陰性対照群と陽性対照群は Aspin-Welch の t 検定を行った。なお、いずれの検定法も有意水準を 5%以下に設定した。

また、細胞毒性は ATP 測定用試薬キットのルシフェール 250 (キッコーマン株式会社) 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。また、細胞毒性の陽性対照物質は SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、和光純薬工業株式会社) を用いた。

#### 4. in vitro 染色体異常試験

組織培養用ファルコン 60 mm プレートに細胞を播種した。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、PBS で 2 回洗浄後、新鮮な培養液と交換した。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。

代謝活性化法では培地内に S9 mix 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 (キッコーマン株式会社) を使用した。この S9 にコファクター (オリエンタル酵母工業株式会社) を加えて S9 mix とした。培地中での S9 濃度は 5%とした。

標本作製の 2 時間前にコルセミド (和光純薬工業株式会社) を最終濃度 0.2 µg/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、空気乾燥標本を作製した。標本は 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。

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。

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クリルアミドの



## 複合遺伝毒性

### 1.1. DNA 損傷性

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、亜硝酸ナトリウムにおいて、DNA 損傷性は認められなかった(Table 1)。アクリルアミドにおいては最高濃度 2 mg/mL 群で、溶媒対照群に比べて Tail length のみに有意な増加が認められた(Table 2)。しかし最高濃度のみで有意な差であり、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。

次に亜硝酸ナトリウムとアクリルアミドの複合的な効果を調べるため、5 mg/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。その結果、DNA 損傷はまったく観察されなかった(Table 3)。以上、亜硝酸ナトリウムとアクリルアミドの複合遺伝毒性試験の結果を Olive tail moment を使って Figure 1 に示す。

## 1.2. 染色体異常誘発性

### 1.2.1. 代謝活性化系によらない場合

結果を Table 4 に示す。アクリルアミド単独 3 時間処理した場合、0.5 mg/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、1 mg/mL 以上の濃度では構造的染色体異常が有意に増加した。最高濃度 (4 mg/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、

1 mg/mL 以上では倍数体も有意に増加した。

亜硝酸ナトリウムとの複合的な効果を調べるため、0.5 mg/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。その結果、1 mg/mL 以上の濃度で構造的染色体異常が有意に増加した。また、1 mg/mL 以上では倍数体が有意に増加した。この結果は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。

次に、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、5 mg/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。その結果、0.5 mg/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、1 mg/mL 処理群で著しい増強効果が現われた。

### 1.2.2. 代謝活性化系による場合

結果を Table 5 に示す。アクリルアミド単独 3 時間処理した場合、1 mg/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、2 mg/mL で構造的染色体異常が有意に増加した。さらに、1 mg/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。

0.5 mg/mL または 5 mg/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 2 mg/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。

## 2. 亜硝酸ナトリウムと EGCG の複合遺伝毒性

### 2.1. DNA 損傷性

亜硝酸ナトリウムの DNA 損傷性は陰性であるため(前述、Table 1)、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(Table 6)。

次に亜硝酸ナトリウムと EGCG の複合的な効果を調べるため、5 mg/mL 亜硝酸ナトリウムと種々の濃度の EGCG (100, 200, 400  $\mu$ M)を同時処理した。その結果、100  $\mu$ M では Tail Length に、200  $\mu$ M では Tail length および Olive tail moment に、400  $\mu$ M では 3 つのパラメーター全てに有意差があらわれた (Table 7)。よって、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 (0.039~5 mg/mL)と EGCG 400  $\mu$ M を同時処理した。その結果、亜硝酸濃度 0.039 mg/mL で Tail Length に有意差が認められた。0.313 mg/mL では全てのパラメーターに有意差が認められた (Table 8)。よって、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。

コメット(DNA 損傷)は強い細胞毒性によって誘発される場合がある。亜硝酸ナトリウムと EGCG を同時処理 1h 後に、顕微鏡下で細胞毒性が観察されたため、

細胞毒性試験を行った。その結果、亜硝酸ナトリウムと EGCG の同時処理によって 63.5%の細胞毒性が見られた(Table 8)。以上の結果を、Olive tail moment を使ってまとめ、Figure 2-1, 2-2 に示す。

また、対照物質として遺伝毒性物質である 4NQO は、DNA 損傷性が全ての濃度で観察されたにもかかわらず、全く細胞毒性がみられなかった(Table 9)。逆に、細胞毒性のみをもつ SDS は最高濃度で細胞毒性がみられたが、最高濃度を含む全ての濃度でコメット像は全く見られなかった (Table 10)。以上の結果を Olive tail moment を使ってまとめ、Figure 3-1,3-2 に示す。

### 2.2. 染色体異常誘発性

#### 2.2.1. 代謝活性化系によらない場合

結果を Table 11 に示す。EGCG 単独で 3 時間処理した場合 50~200  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

0.5 mg/mL または 5 mg/mL の亜硝酸ナトリウムと 50~400  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

#### 2.2.2. 代謝活性化系による場合

結果を Table 12 に示す。EGCG 単独で

3 時間処理した場合、400  $\mu\text{M}$  で明らかに染色体異常が誘発された (50 および 100  $\mu\text{M}$  で統計学的に有意であったが、用量相関性が認められなかったことから偶発的なものと考えられる)。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。

0.5 mg/mL の濃度の亜硝酸ナトリウムと 50~400  $\mu\text{M}$  の EGCG を同時に処理したところ、EGCG が 200  $\mu\text{M}$  以上の濃度で染色体異常が有意に誘発された。さらに、5 mg/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。

#### D. 考察

##### 1. 亜硝酸ナトリウムとアクリルアミドの複合遺伝毒性

コメントアッセイの結果より、アクリルアミドに DNA 損傷性の無いことが明らかとなった。また、細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験) でも陰性であることが知られていることから<sup>5)</sup>、アクリルアミドが DNA へ直接的にダメージを与えることは無いものと考えられる。しかし、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<sup>5)</sup>、本実験でも 1 mg/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。このようなアクリルアミドの染色体異常誘発性が亜硝酸ナトリウムと共存することによ

って、どのように変化するかが興味のある点であったが、本実験結果より、わずかな増強作用のあることが示唆された。例えば、アクリルアミド単独処理の場合、1 mg/mL での染色体異常誘発頻度は 4.0% であるが、5 mg/mL 亜硝酸ナトリウムと共存した場合、その頻度は 19.0% に増加した (Table 4)。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。

アクリルアミドがどのようなメカニズムで染色体異常を誘発するのかは明らかになっていない。アクリルアミドは DNA への結合性は低いようであるが<sup>6)</sup>、ヘモグロビンやプロタミンなどタンパク質と結合することが知られている<sup>7)</sup>。このことから、恐らく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。

アクリルアミドは生体内で代謝を受けた後、より反応性の高いグリシダミドに変換されることが知られている。したがって、代謝活性化系存在下では染色体異常の誘発レベルが増大することが予想された。しかし本実験の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。その理由とし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<sup>8)</sup>、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。したがって、アクリルアミドからグリシダミドへ充分に変換されなかったため、S9 の有無で染色体異常頻度に差がなかったものと考えられる。

倍数体の誘発が認められたが、アクリルアミドが培養細胞に倍数体を誘発することは既に知られている<sup>9)</sup>。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 2 mg/mL よりも 1 mg/mL の方が高い出現頻度を示す場合が多かったが、これは、2 mg/mL 処理の細胞では細胞周期が延びて、倍数体出現ピークが後ろにずれるため、見かけ上、2 mg/mL 処理の倍数体頻度が低下したものと推測される。

ところで、市販されているポテトチップスは 1 袋 (70 g) あたり 0.1~0.25 mg のアクリルアミドを含有する。本実験で設定した 0.25~2 mg/mL という濃度は条件によっては胃内で起こりうる濃度と言えよう。

## 2. 亜硝酸ナトリウムと EGCG の複合遺伝毒性

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。

今回とは使用細胞、実験方法が異なるが、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との報告がある<sup>10)</sup>。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  $\mu$ 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 の DNA 損傷性は全く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に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  $\mu$ M の濃度で染色体異常が誘発される報告がある<sup>11)</sup>。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キオ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<sup>12)</sup>。

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じであると推測する。

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 であるとするれば、それを飲用した場合、希釈されなければ胃内濃度は 0.25~1.25 mg/mL である。したがって、本実験で設定した 50~400  $\mu$ M = 23~184  $\mu$ 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。

## E. 結論

チャイニーズハムスター培養細胞において、アクリルアミドと亜硝酸ナトリウムの間には複合的な DNA 損傷性作用は認められない。しかし、複合的な染色体異常誘発性は弱いながら認められた。それに対して、茶カテキンの主要成分である EGCG と亜硝酸ナトリウムとの間には明らかな複合的な DNA 損傷作用および染色体異常誘発・増強効果が認められた。

## 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-methoxy- catechol, 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-methoxy- catechol in combination on rat stomach epithelium. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81: 857-861.
- 3) Hartmann, A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud and R.R. Tice (2003) 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*. 18(1);45~51.
- 4) Sasaki, YF., S. Tsuda, F. Izumiyama and E. Nishidate (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutation Res.* 388(1);33~44.
- 5) Dearfield, K.L., G.R. Douglas, U.H. Ehling, M.M. Moore, G.A. Sega and D.J. Brusick (1995) Acrylamide: A review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk,

- Mutat. Res., 330: 71-99.
- 6) Segal, G., R.P. Valdivia Alcota, C.P. Tancongco and P.A. Brimer (1989) Acrylamide binding to the DNA and protamine of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage, Mutat. Res., 216: 221-230.
  - 7) Hashimoto, K. and W.N. Aldridge (1970) Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent, Biochem. Pharmacol., 19: 2591-2604.
  - 8) Sumner, S.C.J., T.R. Fennell, T.A. Moore, B. Chanas, F. Gonzalez, and B.I. Ghanayem (1999) Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice, Chem. Res. Toxicol., 12: 1110-1116.
  - 9) Tsuda, H., C.S. Shimizu, M.K. Taketomi, M.M. Hasegawa, A. Hamada, K.M. Kawata and N. Inui (1993) Acrylamide; induction of DNA damage, chromosomal aberrations and cell transformation without gene mutations, Mutagenesis, 8: 23-29.
  - 10) Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu JC. and Sasaki YF. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen., 35(3): 206-21.
  - 11) Sugisawa A and Umegaki K. (2002)

Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-o-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. J. Nutr., 132: 1836-1839.

- 12) 中澤裕之ら (2005)、食品中化学物質の複合反応と反応生成物に関する研究、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、平成 16 年度分担研究報告書

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表  
松元郷六ら、チャイニーズハムスター培養細胞を用いた亜硝酸ナトリウムと抗酸化剤の複合処理による染色体異常誘発、日本環境変異原学会第 34 回大会 (東京、2005 年 11 月)

#### 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 DNA damage in CHL cells after 1h treatment with sodium nitrite

Sampling time (h)	Substance	Dose (mg/mL)	No. of slides	% Migrated DNA		Tail Length		Olive Tail Moment	
				Mean	± S.D.	Mean	± S.D.	Mean	± S.D.
1	Control (1%saline)	0	4	4.69	± 1.15	5.88	± 0.78	0.37	± 0.08
		1.25	4	4.81	± 0.80	4.50	± 1.08	0.40	± 0.08
		2.5	4	4.87	± 0.44	5.27	± 1.11	0.40	± 0.07
		5	4	4.93	± 0.31	6.59	± 1.33	0.39	± 0.02
	Sodium nitrite	2.5	4	4.87	± 0.44	5.27	± 1.11	0.40	± 0.07
		5	4	4.93	± 0.31	6.59	± 1.33	0.39	± 0.02
	4NQO	2 μM	4	47.75	° ± 1.86	45.92	° ± 1.95	13.31	° ± 1.44

4NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide

°:  $p \leq 0.001$ , Aspin-Welch t-test

Table 2 DNA damage in CHL cells after 1h treatment with acrylamide

Sampling time (h)	Substance	Dose (mg/mL)	No. of slides	% Migrated DNA		Tail Length		Olive Tail Moment	
				Mean	± S.D.	Mean	± S.D.	Mean	± S.D.
1	Control (10%saline)	0	4	3.40	± 0.92	5.08	± 1.01	0.39	± 0.17
		0.5	4	4.82	± 0.90	7.64	± 1.59	0.56	± 0.05
		1.0	4	5.93	± 1.79	9.03	± 2.48	0.67	± 0.20
	Acrylamide	2.0	4	6.62	± 2.60	14.34 <sup>b</sup>	± 4.74	0.94	± 0.51
		4NQO	2 μM	4	30.50 <sup>e</sup>	± 3.30	36.98 <sup>e</sup>	± 2.65	8.12 <sup>d</sup>

4NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide

b:  $p \leq 0.01$ , Dunnett test

d:  $p \leq 0.01$ , Aspin-Welch t-test

e:  $p \leq 0.001$ , Aspin-Welch t-test



Table 3 DNA damage in CHL cells treated with a combination of sodium nitrite and acrylamide

Sampling time (h)	Substance	Acrylamide (mg/mL)	No. of slides	% Migrated DNA		Tail Length		Olive Tail Moment	
				Mean	± S.D.	Mean	± S.D.	Mean	± S.D.
1	Control (10% saline)	0	4	3.74	± 1.00	7.37	± 3.22	0.47	± 0.18
		0.5	4	4.28	± 0.78	5.54	± 0.35	0.46	± 0.08
		1.0	4	3.06	± 1.18	5.63	± 2.38	0.36	± 0.14
	Sodium nitrite 5 (mg/mL)	2.0	4	4.63	± 1.56	8.44	± 2.87	0.55	± 0.20
		0	4	34.50 <sup>e</sup>	± 4.23	35.53 <sup>e</sup>	± 5.76	8.73 <sup>d</sup>	± 1.73
		Positive control 4NQO 2 $\mu$ M	4	34.50 <sup>e</sup>	± 4.23	35.53 <sup>e</sup>	± 5.76	8.73 <sup>d</sup>	± 1.73

4NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide

d:  $p \leq 0.01$ , Aspin-Welch t-test

e:  $p \leq 0.001$ , Aspin-Welch t-test

Table 4 Chromosome aberrations in CHL cells treated with a combination of sodium nitrite and acrylamide for 3 h (-S9 mix)

S9 mix	Treatment		No. of cells scored	Polyploid cells	Gap	No. of cells with structural chromosome aberrations										Mitotic index (%)	Relative mitotic index (%)	
	Sodium nitrite (mg/mL)	Acrylamide (mg/mL)				Chromatid type		Chromosome type		Fragmentation	Others	Total						
						ctb	cte	csb	cse			+g	-g					
0	0 (control)	0	200	2 (1.0)	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3 (1.5)	1 (0.5)	5.6	100
		0.25	200	4 (2.0)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	4.5	80
		0.5	200	7 (3.5)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	4.4	79
		1	200	21 (10.5) ***	0	5	3	1	0	0	0	0	0	0	8 (4.0)	8 (4.0) *	3.6	64
	0.5	2	200	11 (5.5) *	5	19	20	0	0	0	0	1	38 (19.0)	34 (17.0) ***	3.1	55		
		4	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		0.25	200	1 (0.5)	0	1	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	5.8	104		
		0.5	200	6 (3.0)	3	0	0	0	0	0	0	0	3 (1.5)	0 (0.0)	5.4	96		
	5	1	200	12 (6.0) *	1	6	5	0	0	0	0	0	10 (5.0)	9 (4.5) *	3.6	64		
		2	200	12 (6.0) *	2	10	11	0	0	1	1	23 (11.5)	22 (11.0) ***	3.1	55			
		0.25	200	2 (1.0)	0	0	4	0	0	0	0	4 (2.0)	4 (2.0)	4.2	75			
		0.5	200	4 (2.0)	1	6	8	0	0	0	0	10 (5.0)	9 (4.5) *	3.3	59			
5	1	200	7 (3.5)	1	16	33	0	0	0	0	0	39 (19.5)	38 (19.0) ***	2.8	50			
	2	200	5 (2.5)	4	21	17	0	0	0	0	2	39 (19.5)	35 (17.5) ***	2.7	48			

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 concurrent control at  $p \leq 0.05$  and  $p \leq 0.001$ , respectively.

Table 5 Chromosome aberrations in CHL cells treated with a combination of sodium nitrite and acrylamide for 3 h (+S9 mix)

S9 mix	Treatment		No. of cells scored	Polyploid cells	Gap	No. of cells with structural chromosome aberrations										Mitotic index (%)	Relative mitotic index (%)	
	Sodium nitrite (mg/mL)	Acrylamide (mg/mL)				Chromatid type		Chromosome type		Fragmen-tation	Others	Total						
						ctb	cte	csb	cse			+g	-g					
+	0	0 (control)	200	1 (0.5)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	7.0	100
		0.25	200	4 (2.0)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	6.9	99
		0.5	200	4 (2.0)	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3 (1.5)	3 (1.5)	5.5	79
		1	200	26 (13.0) ***	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (1.5)	2 (1.0)	6.8	97
		2	200	14 (7.0) **	2	13	23	0	0	0	0	0	0	0	34 (17.0)	32 (16.0) ***	6.7	96
		0.25	200	0 (0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	6.2	89
	0.5	0.5	200	2 (1.0)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	5.7	81
		1	200	22 (11.0) ***	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	5.8	83
		2	200	6 (3.0)	2	24	66	0	0	0	0	0	0	6	82 (41.0)	81 (40.5) ***	5.0	71
		0.25	200	2 (1.0)	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	3 (1.5)	3 (1.5)	5.6	80
		0.5	200	4 (2.0)	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	6.1	87
		1	200	8 (4.0) *	1	3	10	0	0	0	0	0	0	0	12 (6.0)	11 (5.5) **	4.8	69
5	2	2	200	5 (2.5)	2	22	64	0	0	0	0	0	8	84 (42.0)	82 (41.0) ***	5.2	74	

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 concurrent control at p ≤ 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

Table 6 DNA damage in CHL cells after 1h treatment with (-)-epigallocatechin-gallate

Sampling time (h)	Substance	Dose ( $\mu$ M)	No. of slides	% Migrated DNA		Tail Length		Olive Tail Moment		Cytotoxicity %
				Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	
1	Control (1%saline)	0	4	6.32	$\pm$ 1.74	5.91	$\pm$ 3.72	0.55	$\pm$ 0.24	0.00
		100	4	4.66	$\pm$ 0.58	4.72	$\pm$ 0.31	0.38	$\pm$ 0.05	-5.62
		200	4	5.03	$\pm$ 1.01	5.43	$\pm$ 2.18	0.44	$\pm$ 0.11	12.03
	EGCG	400	4	5.66	$\pm$ 1.19	8.79	$\pm$ 1.26	0.53	$\pm$ 0.11	46.55
		4NQO	2	4	54.67	$\pm$ 5.46	50.55	$\pm$ 5.20	17.77	$\pm$ 2.97

EGCG: (-)-epigallocatechin-gallate  
 4NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide

d:  $p \leq 0.01$ , Aspin-Welch t-test  
 e:  $p \leq 0.001$ , Aspin-Welch t-test