

Table 2. Validation of LC-MS/MS method

	LOD (nM)*	LOQ (nM)**	RSD _{PA} (%)	Correlation coefficient	RSD _{RT} (%)
Tyrosine	30	100	2.80	0.999 (0.1-50 μ M)	0.19
Nitrotyrosine	0.1	0.5	1.44	1.000 (0.5-1000 nM)	0.20

* LOD: Limit of detection (S/N=3)

**LOQ: Limit of quantitation (S/N=10)

Table 3. Recoveries of TYR and NTYR in digested mice mice liver sample (n=5)

	Added (μ M)	Concentration (μ M)	Recovery (%)	RSD (%)
TYR	25	28.1 \pm 0.7	95.6	4.97
	50	50.2 \pm 2.4	92.1	2.88
	0	4.2 \pm 0.2		
	Added (nM)	Concentration (nM)		
NTYR	100	109.0 \pm 0.7	94.4	0.70
	200	213.6 \pm 9.8	98.9	5.28
	0	14.6 \pm 0.7		

Table 4. Concentrations of TYR and NTYR in mice liver samples

Group	TYR (μ mol /mg protein)	NTYR ^a (pmol/mg protein)	NTYR/TYR (μ mol/mol)
Blank (Protease only)	2.53 \pm 0.14	ND	ND
Control	3.53 \pm 0.20	0.20 \pm 0.02	58.2 \pm 5.28
APAP 300 mg/kg (i.p.)			
2 hr	3.63 \pm 0.08	0.26 \pm 0.02*	71.7 \pm 4.28*
4 hr	3.43 \pm 0.17	0.28 \pm 0.02*	81.6 \pm 6.95*
8 hr	3.31 \pm 0.39	0.25 \pm 0.02*	75.5 \pm 10.9*

^a N.D. indicates NTYR concentrations lower than 0.5 nM

*: Significantly different (P<0.01) from the control group.

厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

亜硝酸と食品中の化学物質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

亜硝酸と酸化防止剤の併用はラット前胃に発がん性および発がん促進作用を有し、その機構には酸化的ストレスの関与が考えられている。本実験では、食品中に多量に含まれるフェノール系酸化防止剤の茶カテキンについて、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した。この結果、茶カテキンと亜硝酸の併用投与は、MNNG で誘発された前胃腫瘍の発生率および発生個数を有意に上昇させた。また、*in vitro* ESR によりカテキン類と一酸化窒素 (NO) の共存下で OH ラジカルの発生が確認され、実際に茶カテキンと NaNO_2 の併用投与により前胃粘膜の 8-OHdG レベルも有意に増加した。したがって、茶カテキンもまたアスコルビン酸や他のフェノール系抗酸化物質と同様に、亜硝酸との併用で前胃発がんを促進することが明らかとなり、その機構には亜硝酸由来の NO とカテキン類が反応して生じる OH ラジカルが関与する可能性が示唆された。

また、ヒトにおけるリスク評価の一環として、ヒトの逆流性食道炎に類似した病態を示す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 の併用投与による食道発がん性を検討した。その結果、食道の粘膜上皮過形成の重篤度が有意に増加し、併用投与群にのみ乳頭腫の発生がみられた。この結果から、アスコルビン酸と亜硝酸の併用投与は、逆流性食道炎の病態下で食道に対する発がん性を有する可能性が示唆された。現在、食道発がん促進修飾作用をさらに詳細に検討するため、発がんイニシエーター投与を組み合わせた 2 段階発がん試験を実施中である。

アスコルビン酸と亜硝酸の併用は *in vitro* で染色体異常性を示し、イニシエーション処理無しでラット前胃乳頭腫を発生させることから、酸化的 DNA 損傷を介した発がんイニシエーション作用が疑われる。本研究では、ラット前胃に対するイニシエーション作用を検索するためにラット前胃 2 段階発がんモデルを用いてアスコルビン酸と NaNO_2 の併用投与による発がんイニシエーション検索試験を実施中である。

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生成が減少し、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 酸化的損傷を示す 8-OHdG 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。

AsA と同様に、ヒドロキノン、カテコールなどのフェノール系抗酸化物質も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。そこで本研究では、ヒトが食事中から多量に摂取しているフェノール系抗酸化物質の茶カテキンについて、発がんイニシエーターとして *N*-methyl-*N'*-nitroso-*N*-nitrosoguanidine (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病理組織学的に検索した。また、短期試験により酸化的 DNA 損傷を検索するとともに *in vitro* 実験によりラジカルの発生を検出し、これら 2 剤の併用による発がんへの酸化的ストレスの関与を検証した。

亜硝酸と酸化防止剤の共存による有害作用はラット前胃に限定的であり、ヒトの胃に対応するラット腺胃には認められないことから、発がんリスクはヒトに外挿できないと考えられてきた。しかし、亜硝酸と AsA 複合による NO 発生には、胃酸による低 pH 環境が必要であると考えられており、胃液が逆流して管腔内が低 pH となる逆流性食道炎の病態下では、前胃と同様の組織構造を有する食道への発がん性が懸念される。ヒトでは食道下部腺がんの危険因子となっている逆流性食道炎の発生要因として NO が注目されている。したがって、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と考えられる。そこで本研究では、前胃と同様の組織構造を有する食道に対する影響を調べるために、ヒトの逆流性食道炎に類似した病態を示すラットの胃液逆流型慢性逆流性食道炎モデルを作成し、食道に対する影響を検証している。前年度の予備的検討の結果、併用投与により食道の粘膜上皮の過形成が認められ酸化 DNA 損傷もみられたことから、前胃と同様の発がん作用が懸念された。そこで本年度は逆流性食道炎モデルラットに、 NaNO_2 と AsA を 32 週間併用投与する発がん実験を行った。現在、食道発がん促進作用を詳細に検証するため、本食道炎モデルにイニシエーター投与を組み合わせたプロモーション検索実験を実施中である。

我々は過去に亜硝酸と AsA の 52 週間併用投与によりイニシエーション処理無しでラット前胃に乳頭腫が発生することを報告しており、前年度の報告では分担研究者の松元らが *in vitro* の系で染色体異常性を明らかにしている。したがって、これら 2 剤併用投与は酸化 DNA 損傷を介して発がんイニシエーション作用を有する可能性が疑われる。そこで本研究では、イニシエーション検索法としてプロモーターに butylated hydroxyanisole (BHA) を用いたラット 2 段階前胃発がん試験を実施中である。

B. 研究方法

1. 茶カテキンと NaNO_2 併用投与の前胃プロモーション検索

茶カテキン（茶抽出物：総カテキン 83.1%、カフェイン 0.27%）は太陽化学株式会社から供与された。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 ）。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。

2. 前胃粘膜 8-OHdG レベル測定

6 週齢の F344 ラット雄 42 匹を使用した。16 時間の絶食後、カテキンと亜硝酸をそれぞれ 1.0%混餌および 0.2%飲水で投与し、8, 12, 24 時間後および 1 週間後に解剖して前胃粘膜を採取した。同様に、基礎飼料を与える対照群を設けた。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。8, 12, 24 時間後および 1 週間後の各時点の動物数はそれぞれ、5, 5, 5 および 3 匹とした。採取した前胃粘膜から 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 $8\text{-OHdG}/10^5\text{dG}$ として求めた。

3. OH ラジカルの検出

スピントラッピング剤に DMPO を使い、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 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、ESR 測定を行った。

4. 逆流性食道炎モデルラットを用いた AsA と NaNO_2 併用投与による食道発がん実験

8 週齢の雄の F344 ラットを 24 時間の絶食

後、ネンブ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 週間の回復期間後、ラット 45 匹を 4 群 (1 群: 9 匹、2 群: 9 匹、3 群: 9 匹、4 群: 15 匹) に分け、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%AsA 混餌投与、3 群: 0.2%NaNO₂ 飲水投与、4 群: 1.0%AsA+0.2%NaNO₂)。32 週間の投与後、解剖して食道を採取し、ホルマリン固定した。固定後の食道の全長を 4 等分してそれぞれ 3 片ずつ切り出し、病理組織学的検索を行った。

5. 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

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、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%AsA 混餌投与、3 群: 0.2%NaNO₂ 飲水投与、4 群: 1.0%AsA+0.2%NaNO₂)。16 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、食道の病理組織学的検索を行う予定である。

6. AsA と NaNO₂ 併用投与の前胃イニシエーション検索

6 週齢の F344 ラット雄 125 匹を各群 25 匹の 5 群に分け、次の被験物質を 13 週間投与した (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)。第 5 群には陽性対照として、投与開始日に前日から 16 時間絶食した後 100 mg/kg 体重の MNNG (媒体: 50%DMSO 水溶液) 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、引き続き 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。

研究結果

1. 茶カテキンと NaNO₂ 併用投与による前胃発がん促進作用

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多発性が有意に増加した。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 (Table. 1)。一方、腺胃腫瘍には併用投与の影響は認められなかった。

2. 茶カテキンと NaNO₂ 併用投与による前胃酸化 DNA 損傷

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 (Fig. 1, 2)。

3. カテキン類と NO の反応による OH ラジカルの発生

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、DMP0-OH アダクトのスペクトルが観察された (Fig. 3, 4)。

4. AsA と NaNO₂ 併用投与による逆流性食道炎の食道に対する発がん性

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 (Fig. 5)。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 (Table. 2, 3)。

5. 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検索

現在、21 週間の実験期間のうち、16 週が順調に経過している。

6. AsA と NaNO₂ 併用投与の前胃イニシエーション検索

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。

D. 考察

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は他の酸化防止剤と同様に 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。亜硝酸は胃内の低 pH 条件下で NO を発生させることが知られている。ESR では OH ラジカルの発生が検出され、実際に前胃粘膜上皮 DNA の 8-OHdG レベルも投与 24 時間後から上昇した。したがって、これら 2 剤の併用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。

また、NaNO₂ と AsA の併用投与の食道への影響を検証するため、慢性の胃液逆流型食道炎モデルラットを作成して併用投与実験を行った。その結果、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 2 剤併用等による病変が食道粘膜においても観察されたことから、NaNO₂ と AsA の併用投与は、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。これまで NaNO₂ と AsA の併用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できないと考えられてきたが、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があることを示唆するものである。現在、食道に対する発がん促進作用を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的 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。

E. 結論

茶カテキンと NaNO₂ 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 NaNO₂ 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 NaNO₂ in the rat. *J Toxicol Sci*, 30: 1-6, 2005.

Sugaira S, Asamoto M, Hokaiwado N, Hirose M, Shirai T. Harman and norharman suppressed but NaNO₂ 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.

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.

Kitamura Y, Umemura T, Kanki K, Ishii Y, Kuroiwa Y, Masegi T, Nishikawa A, Hirose M. Lung as a new target in rats of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline carcinogenesis: Results of a two-stage model initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer Sci*. 97: 368-373, 2006.

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.

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.

Ishii Y, Umemura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Nishikawa A, Ito R, Saito K, Nakazawa H, Hirose M. A 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.

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 in livers of mice administered acetaminophen. *J Pharm Biomed Anal.*, 2006, in press.

2. 学会発表

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

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)

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)

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし。

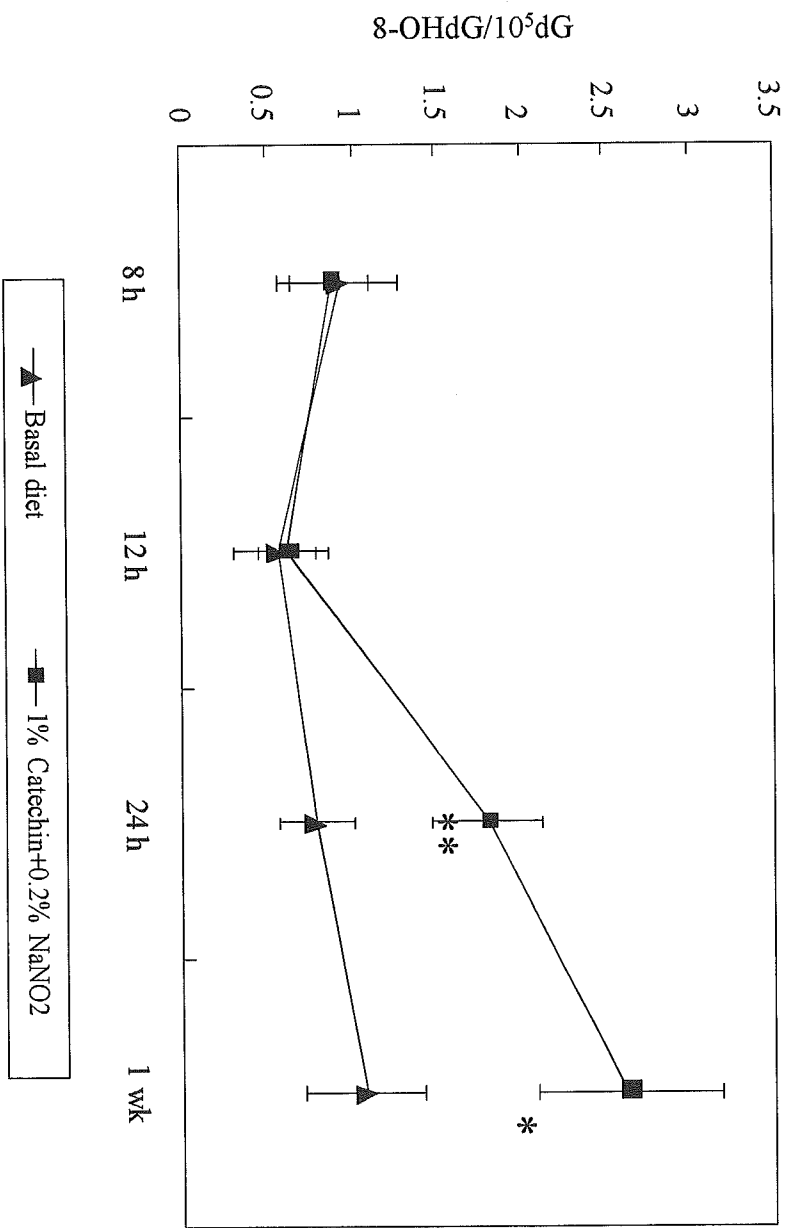


Fig. 1. Changes of 8-OHdG levels in forestomach epithelium of rats given 1% Green tea catechin and 0.2% NaNO₂ for 8, 12, 24 hour and 1 week. Values are means ± SD. */**. Significantly different (p<0.01/0.05) from the basal diet group.

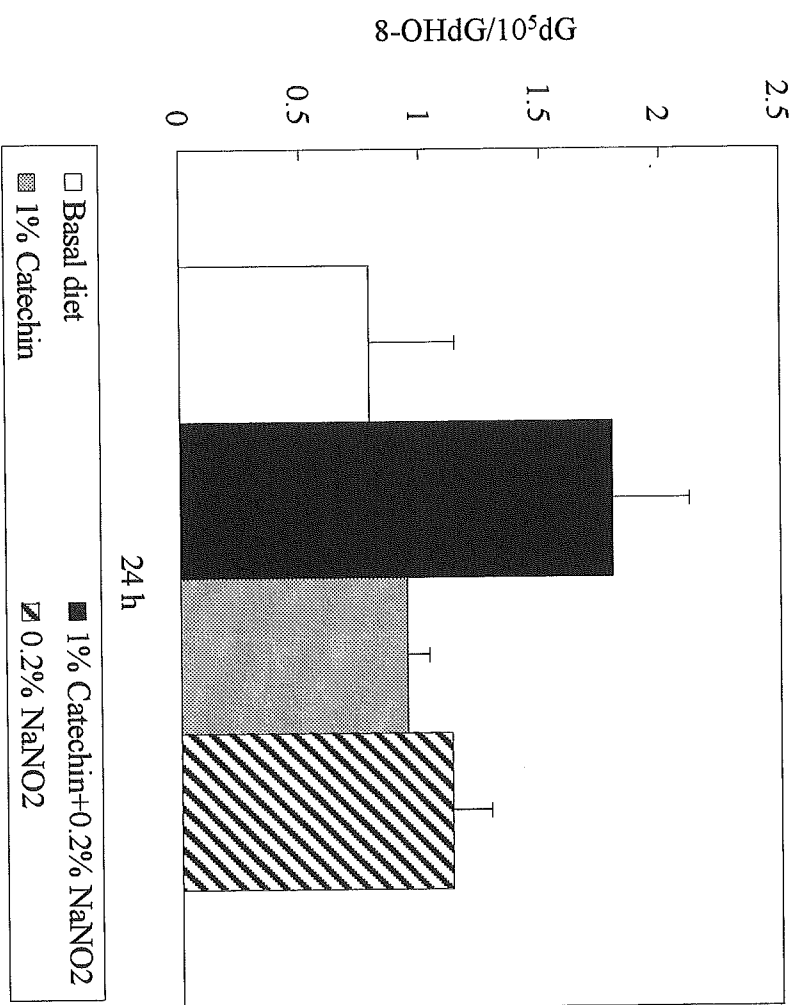


Fig. 2. Changes of 8-OHdG levels in forestomach epithelium of rats given 1% Green tea catechin and 0.2% NaNO₂ for 24 hour. Values are means ± SD. ******. Significantly different ($p < 0.05$) from the basal diet group.

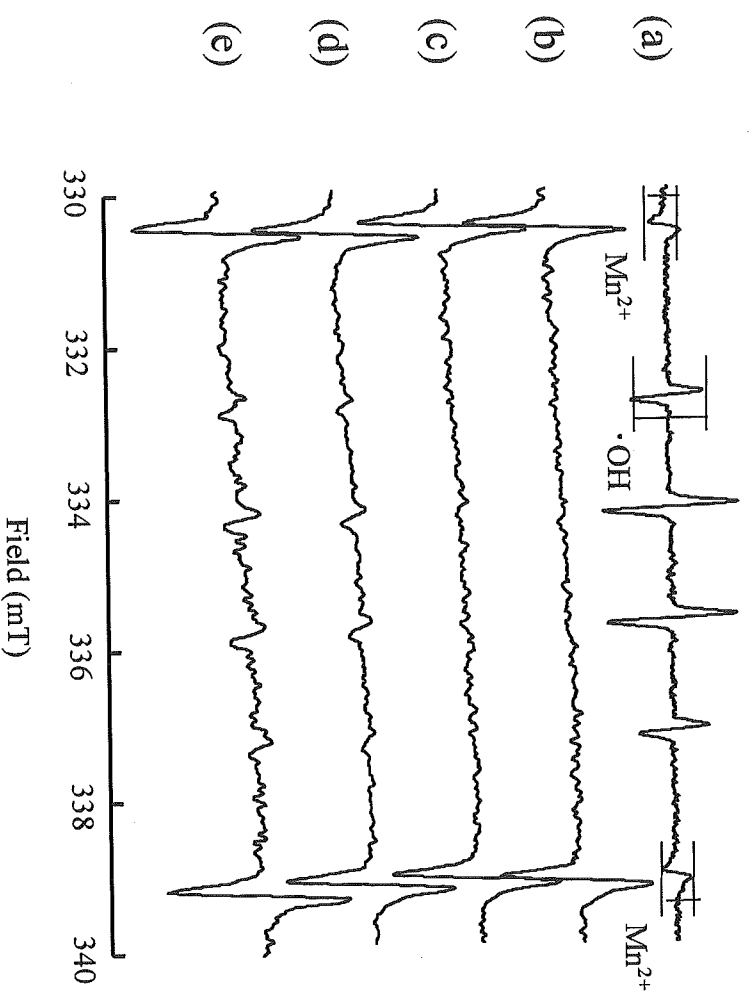


Fig. 3. (a) Typical ESR spectrum of DMPD with $\cdot\text{OH}$. (b) epicatechin, (c) epigallocatechin, (d) epicatechingallate and (e) epigallocatechingallate.

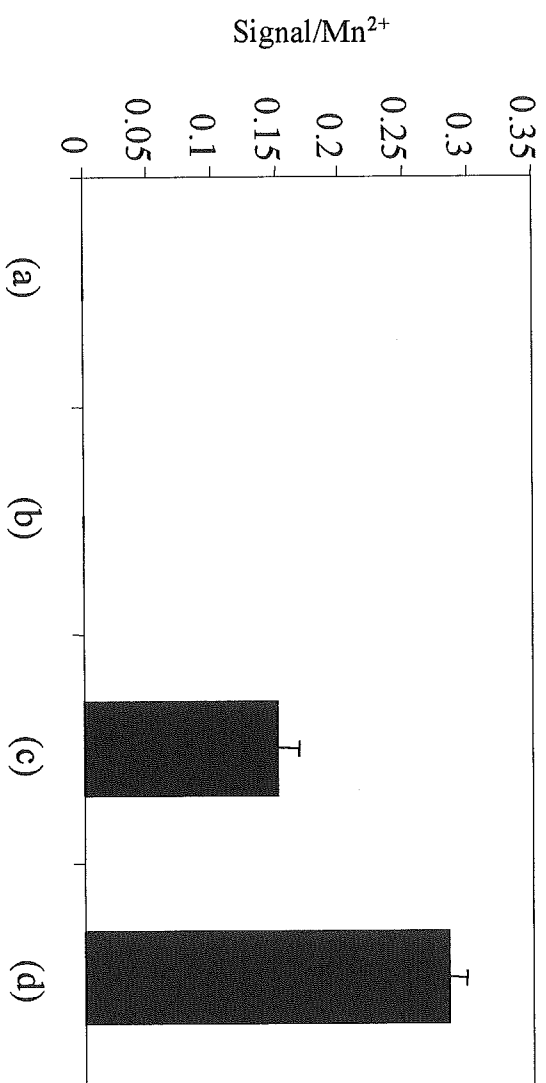


Fig. 4. Changes of DMPD signal intensity of catechins incubated with NOC 7. (a) epicatechin, (b) epigallocatechin, (c) epicatechingallate and (d) epigallocatechingallate.

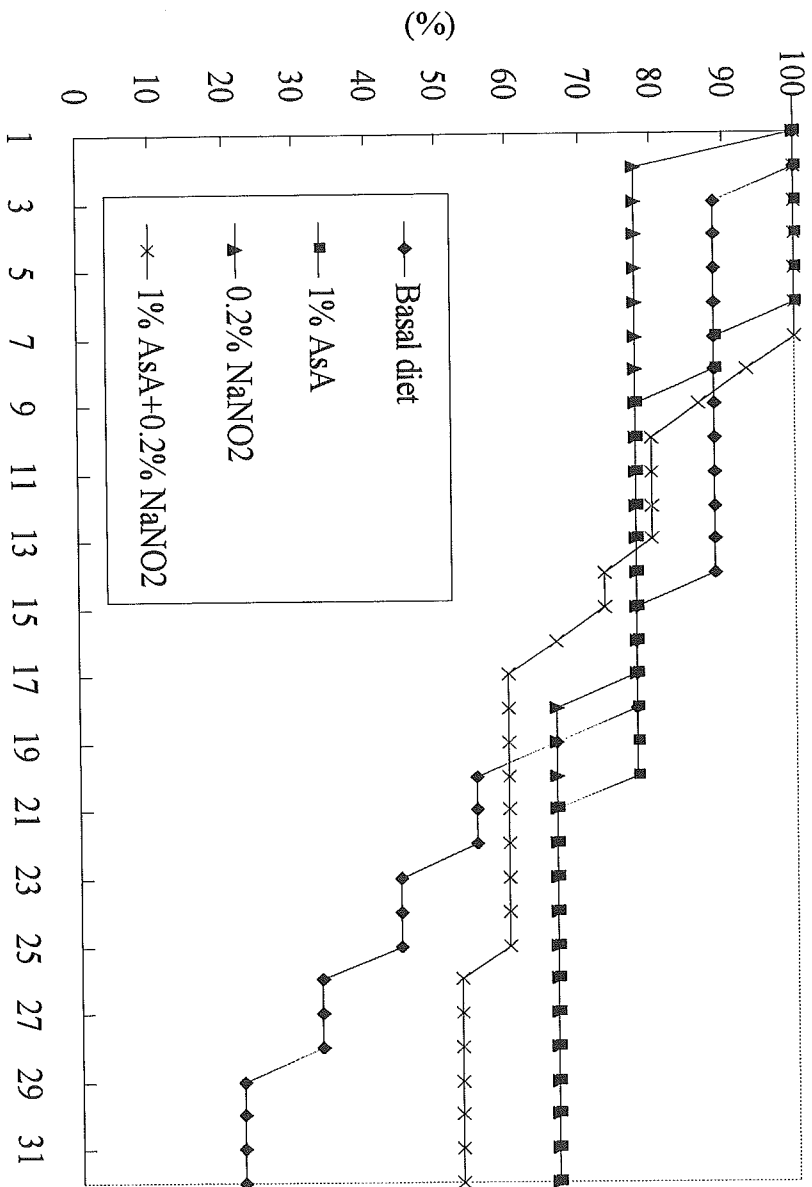


Fig. 5. Survival curves of esophagitis model rats treated with AsA and NaNO₂.

Table 1. Incidences of proliferative and neoplastic lesions in the forestomach

Treatment	Number of rats	Number of rats with (%)					
		Hyperplasia		Papilloma		SCC	
		Moderate	Severe	Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity
MNNG →							
Basal diet	16	8 (50)	1 (6)	7 (44)	0.44 ± 0.38	3 (19)	0.51 ± 0.50
Catechin + NaNO ₂	20	19 (95)**	5 (25)	17 (85)*	1.70 ± 1.00**	^{a)} 11 (55)*	1.42 ± 1.62*
1% Catechin	19	8 (42)	4 (21)	1 (5)*	0.05 ± 0.16	2 (16)	0.23 ± 0.50
0.2% NaNO ₂	19	7 (37)	2 (11)	4 (21)	0.32 ± 0.11	2 (5)	0.75 ± 0.32

Table 2. Incidences of proliferative and neoplastic lesions in the esophagus (including dead animal)

Part of esophagus	Basal diet	1% AsA	0.2% NaNO ₂	AsA + NaNO ₂
Lesion	n = 9	9	9	13
P1				
Hyperplasia	0	0	0	1 (8%)
±				
P2				
Hyperplasia	1 (11%)	1 (11%)	0	6 (46%)
±				
+	0	0	0	2 (15%)
P3				
Hyperplasia	1 (11%)	3 (33%)	4 (44%)	11 (85%)**
±				
+	0	0	0	4 (31%)
++	0	0	0	4 (31%)
Papilloma	0	0	0	1 (8%)
P4				
Hyperplasia	7 (77%)	6 (66%)	6 (66%)	10 (77%)
±				
+	5 (55%)	5 (55%)	6 (66%)	9 (69%)
++	1 (11%)	3 (33%)	3 (33%)	8 (62%)*

Table 3. Multiplicity of proliferative and neoplastic lesions in the esophagus (including dead animals)

Part of esophagus	Lesion	Basal diet		1% AsA		0.2% NaNO ₂		AsA + NaNO ₂	
		n =	9	9	9	9	13		
P1									
Hyperplasia									
±			0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.15 ± 0.55		
P2									
Hyperplasia									
±			0.11 ± 0.33	0.22 ± 0.67	0 ± 0	0 ± 0	1.23 ± 1.44**		
+			0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.23 ± 0.60		
P3									
Hyperplasia									
±			0.33 ± 1	0.89 ± 1.17	0.89 ± 1.17	3.00 ± 1.45**			
+			0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.92 ± 1.55			
++			0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.38 ± 0.65			
Papilloma									
			0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.08 ± 0.28			
P4									
Hyperplasia									
±			2.33 ± 1.73	1.89 ± 2.20	1.44 ± 1.42	2.31 ± 1.55			
+			1.00 ± 1.32	1.33 ± 1.87	1.67 ± 1.50	1.54 ± 1.66			
++			0.11 ± 0.33	0.44 ± 0.73	0.56 ± 1.01	1.62 ± 1.71*			

厚生労働科学補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

食品中化学物質と金属の複合による DNA 傷害に関する実験的研究
分担研究者 川西正祐 三重大学・医学部・衛生学講座 教授

研究要旨：サプリメントの化学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、健康食品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 付加体形成する一方、酸化 DNA 損傷をもたらすことが明らかになった。以上のように、健康食品の長期摂取において安全性評価が重要であり、食餌性因子による DNA 傷害の機構を解明する本研究事業は非常に有意義である。

A. 研究目的

高齢社会を迎えた我が国において、健康増進・疾病予防を目指して多くの健康食品が利用されている。健康効果を謳うサプリメントは一般の食品からの摂取に比べ、化学物質を大量に摂取することが起こりえる。これらの化学物質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。健康食品の安全性評価の観点から、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、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 と健康食品アガリクスの成分である 4-hydrazinobenzoic acid について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。

C. 研究結果と考察

I. プロシアニジン B2 と金属の複合による DNA 傷害¹

我々はプロシアニジン 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(図 1)、200 μM と高濃度の 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。

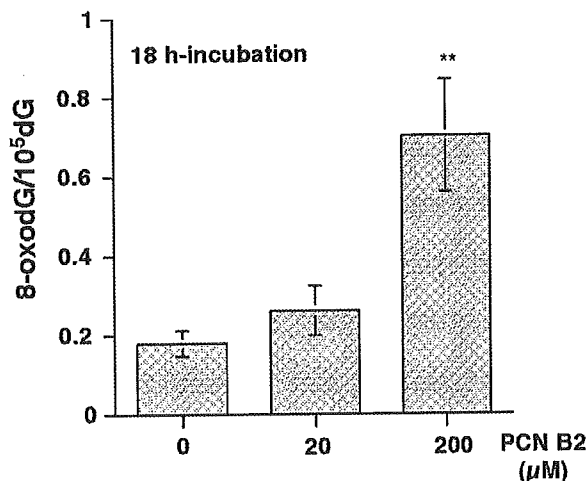


図 1. PCN B2 による細胞内 8-oxodG 生成 (** ; $P < 0.01$ compared with control)

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(図 2)、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。

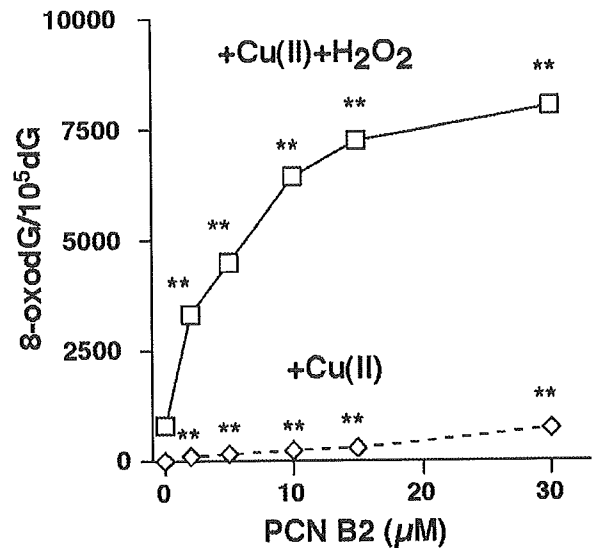
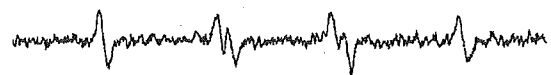


図 2. PCN B2 による 8-oxodG 生成と過酸化水素添加による増強効果

(** ; $P < 0.01$ compared with control)

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 $\cdot\text{OH}$ 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(図 3)。Cu(II) および過酸化水素存在下で生じる $\cdot\text{OH}$ のシグナル強度は PCN B2 を加えることにより増強した。

Cu(II)+H₂O₂



Cu(II)+H₂O₂+PCN B2

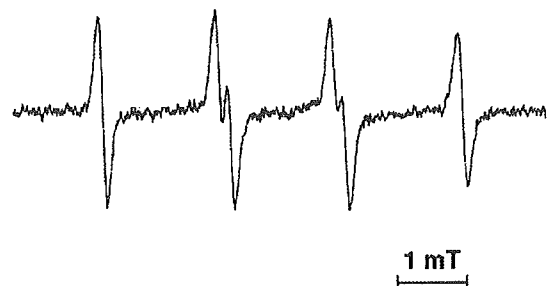


図 3. PCN B2 による $\cdot\text{OH}$ 生成増強効果

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。

II. 健康食品アガリクス成分 4-hydrazinobenzoic acid による DNA 傷害の分子機構²

栽培マッシュルーム *Agaricus bisporus* は、日本名をツクリタケといい、広く食用されている。栽培マッシュルームを摂餌させたマウスに種々のがんが誘発されることから、発がん性が指摘されている。また、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。

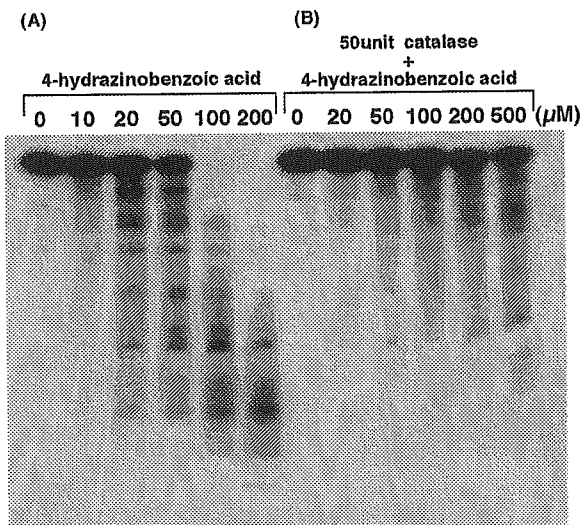


図 4.4-HBA による DNA 損傷と catalase による抑制効果

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 (図 4A)。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 (図 4B)。一方、Cu(II) 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 (図 4B) 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 (図 5A)。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 (図 5B)。

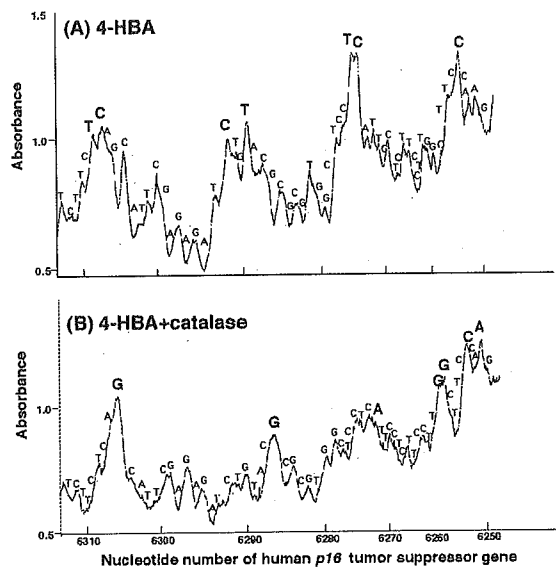


図 5.4-HBA による DNA 損傷の塩基特異性

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 (図 6)。

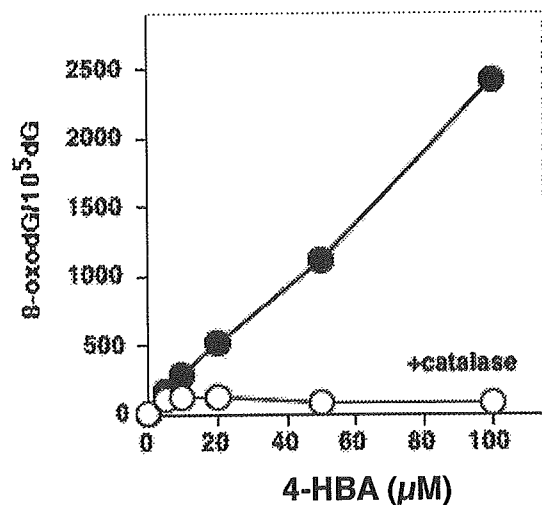


図 6.4-HBA による 8-oxodG の生成 Cu(II) および catalase 存在下における

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 (図 7)。

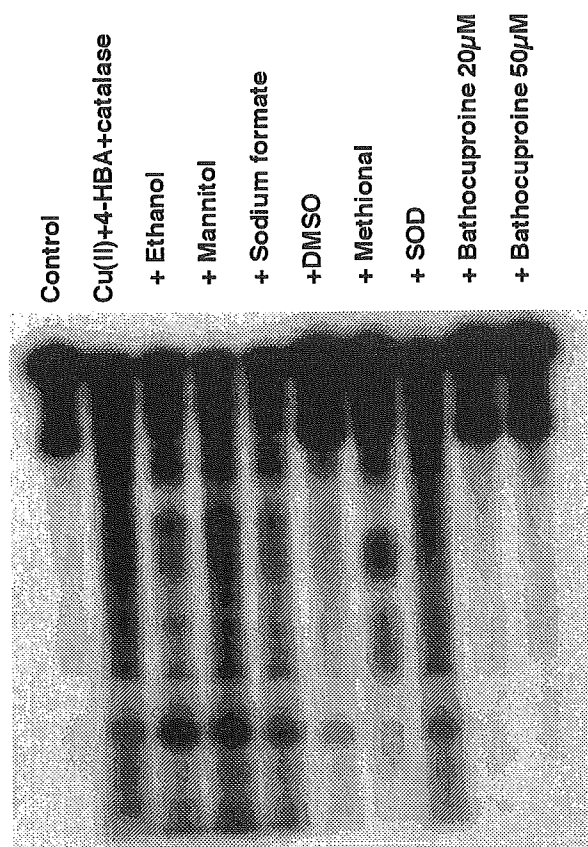


図 7. 4-HBA の DNA 損傷におけるスカベンジャー効果

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 (図 8A)。また、dGMP、dAMP、CMP の添加でラジカル生成は抑制された (図 8B-8D) が、TMP 添加では抑制されなかった (図 8E)。

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 (図 9A)、グアニン (図 9B) 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。

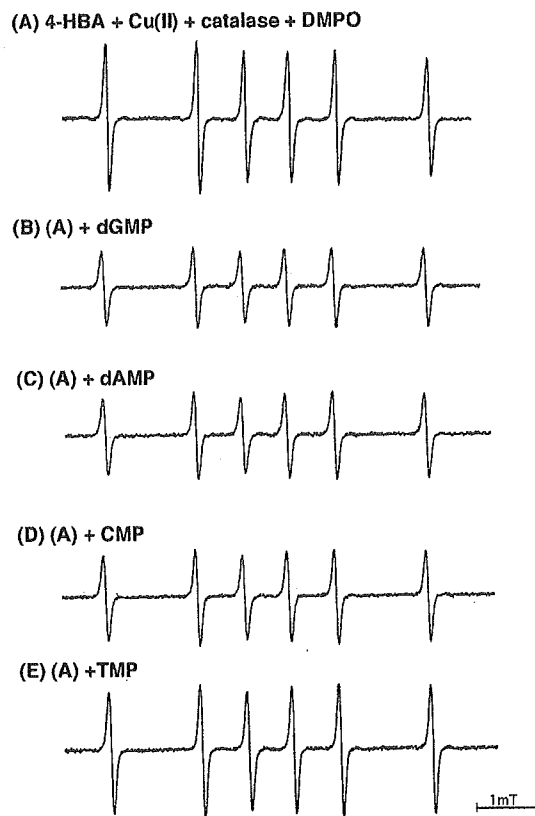


図 8. ESR による 4-HBA 由来ラジカルの検出とヌクレオチドによる抑制効果

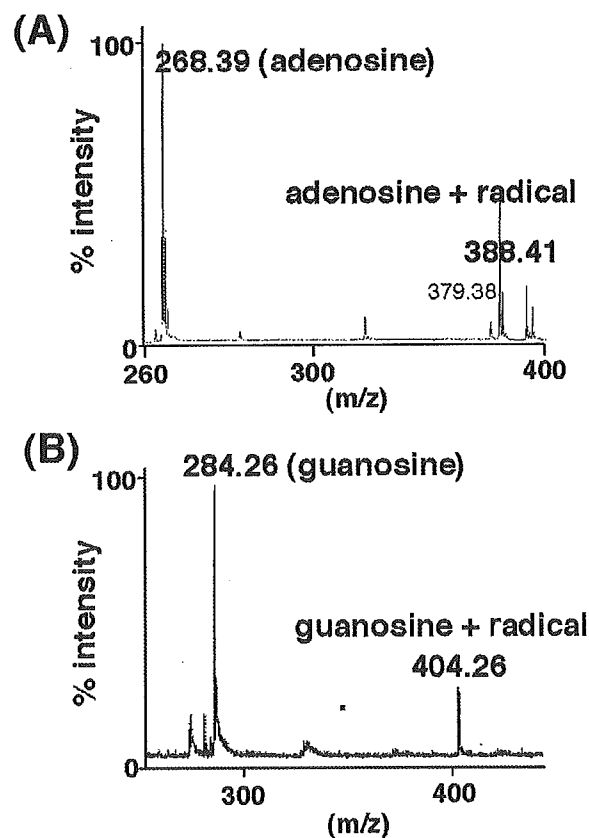


図 9. TOF-MS による付加体形成の検出

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、シトシンとの DNA 付加体形成の両者が存在すると考えられた (図 10)。

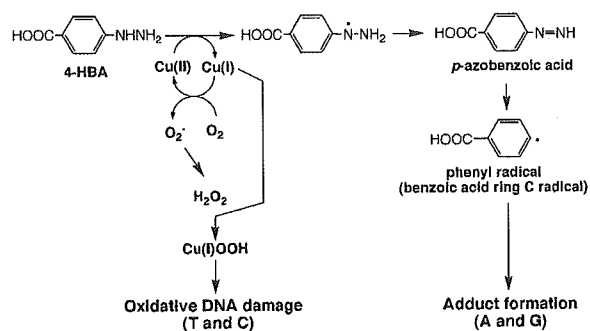


図 10.4-HBA による DNA 損傷の分子機構

以上の結果から、4-HBA が生体内の Cu(II)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。

III. 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

飲料水汚染によるヒ素の生体影響³を検討した。また、がんの化学予防に期待されている種々の抗酸化物質について安全性⁴の検討結果をまとめた。

D. 結論

本研究結果から、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。

E. 研究発表

1. 論文発表

1: 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.* 2005;39(8):1041-9.

2: 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.* 2006;40(1):31-9.

3: 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.* 2005;47(5):445-9.

4: Kawanishi S, Oikawa S, Murata M. Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(11-12):1728-39. Review.

2. 学会発表

1: 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

2: 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

3: 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

4: 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

5: 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

6: 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 名古屋市

7: 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 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

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし