

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：食品成分として繁用されるカテキンは、遺伝毒性と 90 日間反復投与毒性試験の高用量群における生体に対する悪影響が検出されていることより、現在、ラットを用いて長期安全性試験が行われているが、*in vitro*において銅イオンの存在下で酸化性 DNA 傷害を生成するとの報告がある。一方、グルコン酸銅は、機能食品の成分として使用の拡大が予想され、遺伝毒性がないものの、反復投与毒性試験の高用量群で生体に対する悪影響が検出されている。以上より、本研究は、カテキンと銅化合物の単独または複合投与の及ぼす生体影響について検索することを目的に、ラット中期多臓器発がん性試験法を用いて *in vivo* 動物実験を行っている。平成 16 年度は、グルコン酸銅単独の効果を予備的に判定し、後の実験に用いる至適用量を決定した。平成 17 年度は、Br/Han:WIST@Jcl (GALAS)系雄性ラット（6 週齢）を、*N*-nitrosodiethylamine (100 mg/kg 体重) 腹腔内投与 1 回、*N*-methylnitrosourea (20 mg/kg 体重) 腹腔内投与 4 回・1,2-dimethylhydrazine (40 mg/kg 体重) 皮下投与 4 回・0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine 混水投与 2 週間・0.1% 2,2-dihydroxy-di-*n*-propylnitrosamine 混水投与 2 週間より成る計 4 週間の発がん起始処置を施した後、無処置またはカテキン（5000 ppm, 混水）とグルコン酸銅（10・300・3000・6000 ppm, 混餌）の単独または併用投与下に 25 週間飼育して屠殺し、主要臓器の組織学的変化と胎盤型 glutathione *S*-transferase 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、300 ppm 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しなかった。一方、前胃過形成は、6000 ppm 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。グルコン酸銅単独またはカテキンとの併用投与による肝・前胃以外の臓器への影響や、カテキン単独による全臓器への影響は、明らかでなかった。以上の結果より、本実験条件下において、グルコン酸銅は肝と前胃に増殖性病変誘発リスクを有するのに対し、カテキンは単独でリスクを示さず、むしろグルコン酸銅のリスクを減弱するものと判明した。

A. 研究目的

カテキンは、ツバキ科チャの茎及び葉、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及び葉などに含まれている化合物の総称である。これには、カテキン（狭義）・ガロカテキン・エピカテキン・エピガロカテキン・エピカテキンガレート・エピガロカテキンガレートなどが含まれる。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作用を示すものと報告され、それらに基いて、水産加工品・食肉加工品・菓子類・油脂・清涼飲料水等の食品添加物（酸化防止剤）として使用されている。一方、グルコン酸銅は、銅塩類のひとつで、人工栄養児の銅強化の目的で 1983 年に食品添加物として指定された。グルコン酸銅は、日本における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。しかしながら、米国では栄養強化材としてサプリメント類・あめ類・飲料等に用いられており、EUにおいては単なる食品添加物でなく食品成分扱いで幅広く用いられている。ま

た、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使用が認可される方向にあり、今後の使用拡大が見込まれている。

カテキンに対する安全性評価としては、変異原性試験及び混餌投与によるラット 90 日間反復投与毒性試験が実施されている。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の結果が得られている。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ている。さらに、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ところである。一方、グルコン酸銅は、Ames 試験にて陰性で、各種の動物を用いた反復投与毒性試験にて高用量投与群に肝障害等が認められているが、発がんリスクについて明らかでない。さらに、カテキンは、*in vitro*において、銅イオンの存在下に酸化性 DNA 傷害である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)を生成すると報告されている。

本研究の目的は、以上の背景に鑑み、カテキ

ンと銅化合物の単独または複合投与による発がんリスクについて、ラット中期発がんモデルを用いて *in vivo* で検索することである。平成 16 年度は、グルコン酸銅単独の効果を予備的に判定し、後の実験に用いる至適用量を決定した。平成 17 年度は、ラット中期多臓器発がん性試験法を用い、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すると共に、血清・肝の銅濃度の測定と肝における免疫組織化学的検索を行った。

B. 研究方法

1. 被験物質

緑茶カテキン（サンフェノン 100S）は、太陽化学株式会社より供与された。グルコン酸銅は和光純薬工業株式会社から購入した。N-diethylnitrosamine (DEN), N-methylnitrosourea (MNU), 1,2-dimethylhydrazine (DMH), N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)は東京化成工業から、2,2-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine (DHPN)はNacalai Tesqueから、それぞれ購入した。なお、基礎飼料は、日本クレア株式会社製の CE-2 粉末飼料を用いた。

2. 動物及び飼育条件

動物は、5 週齢の Br/Han:WIST@Jcl(GALAS)雄性ラット（クレア）を 174 匹入手し、1 週間の検疫・馴化期間を経た 6 週齢にて、適切な無作為抽出法を用いて 1 群 9-12 匹に割り付けて実験に供した。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。室内の環境は、温度 25±5℃、湿度 50±10%、換気回数 12 回/時、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、ケージ及びチップを週 1 回交換した。

3. 実験プロトコール

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、無処置またはカテキン (5000 ppm, 混水) とグルコン酸銅 (10・300・3000・6000ppm, 混餌) の単独または併用投与下に 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、無処置またはカテキンとグルコン酸銅 (3000・6000

ppm) の単独または併用投与下に 25 週間飼育した。各群の概要は以下の通りで、すべての動物は実験開始の 29 週間後に屠殺した。

群	DMBDD 処置	銅(ppm)	カテキン(ppm)
1	有	0	0
2	有	10	0
3	有	300	0
4	有	3000	0
5	有	6000	0
6	有	0	5000
7	有	10	5000
8	有	300	5000
9	有	3000	5000
10	有	6000	5000
11	無	0	0
12	無	3000	0
13	無	6000	0
14	無	0	5000
15	無	3000	5000
16	無	6000	5000

4. 観察及び検査項目

観察及び検査は、以下の項目について実施した。

[一般状態、体重、摂餌量]

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。

[血清及び肝の銅濃度測定]

血清 (μ g/dL) 及び肝 (μ 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。

[病理組織学的検索]

全動物は、屠殺時に詳細な剖検を行ない、肝・腎・脾・副腎・肺・気管・甲状腺・舌・心・胸腺・食道・胃・小腸・大腸・盲腸・膵・唾液腺・リンパ節（頸部・腸管膜）・膀胱・精巣・精巣上体・精嚢・凝固腺・前立腺・脳・下垂体及び肉眼的異常部位を摘出し、肝の重量を測定した後に、摘出臓器・組織を中性緩衝ホルマリン液にて固定した。各臓器・組織は、固定後に適宜切り出しを行ない、通常の方法でパラフィン包埋・薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。また、免疫組織化学的染色は、ホルマリン固定パラフィン包埋した肝切片を脱パラフィン後、精製水で洗浄し、3%過酸化水素を加えたエタノール内・室温条件下で内因性ペルオキシダーゼを失活させた。8-OHdG 染色においては、これに加えて、10%硫酸亜鉛水溶液内・

95°C・30 分間の抗原賦活化を施行した後、2 M 塩酸内で核の変性処理を行った。以上の処置を行った肝切片は、精製水ですすいだ後、50 mM トリス緩衝生理食塩水(TBS)で洗浄し、内因性の蛋白質により非特異結合が起こるのを防ぐため、Blocking 試薬 (Protein Block Serum-Free, ダコ・ジャパン株式会社) で処理した。GST-P 染色の一次抗体反応は、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)を0.1% ウシ血清アルブミン含有 TBS で希釈して用い、湿潤箱中 1 時間・室温の条件で行った。8-OHdG 染色の一次抗体反応は、抗 8-OHdG モノクローナル抗体 (日本老化制御研究所) を用いて、一晚・4°Cの条件で行った。一次抗体反応の後、切片を 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 Histfain (株式会社ニチレイ) を用いて、湿潤箱中・室温で反応させ、TBS で 2 回洗浄した後、3,3-ジアミノベンジジン四塩酸塩 (和光純薬) 水溶液中で、抗体結合部位を茶褐色に可視化した。染色標本は、ヘマトキシリン(ダコ)により核染色し、色出しとして 10 分程度流水にさらし、エタノール・キシレンで脱水を行なった後、通常の方法で封入を行なった。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。

5. 統計学的解析

体重、摂餌量、肝臓重量、銅濃度及び免疫組織化学的検索結果については、ANOVA による解析を行い、群間に有意差が認められた場合に、Dunnnett の方法で対照群と各検体投与群の間で検定を行った。病理組織学的検索結果については、Fischer の直接確率検定法を用いて統計学的解析を実施した。検定は DMBDD 処置を行った群と行わなかった群それぞれの中で行い、必要に応じて別途検定方法を選択して行った。

6. 倫理面への配慮

本研究においては、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等に準拠し、動物実験を実施した分担研究者の前任地である財団法人 佐々木研究所 動物実験委員会による事前審査とモニタリングを受けることにより、適切な倫理面への配慮を行った。

C. 試験結果

1. 一般状態、体重、臓器重量、摂餌量、飲水量、

グルコン酸銅及びカテキン摂取量

実験期間中の一般状態、体重 (図 1)、最終平均体重、肝臓重量 (表 1) は DMBDD 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。一方、摂餌量には群間の差がなかったが、飲水量は DMBDD 処置の有無にかかわらず、全てのカテキン投与群において有意に低下した。

DMBDD 処置群のグルコン酸銅摂取量は、グルコン酸銅の 10・300・3000・6000 ppm 単独投与でそれぞれ 0.5・14.6・152.6・314.8 mg/kg 体重/day (銅換算 0.07・2.05・21.37・44.08 mg/kg 体重/day)、カテキン・グルコン酸銅併用投与でそれぞれ 0.5・15.4・155.3・321.9 mg/kg 体重/day (銅換算 0.07・2.16・21.74・45.07 mg/kg 体重/day) であった。一方、DMBDD 処置を行わなかった群のグルコン酸銅摂取量は、グルコン酸銅の 3000・6000 ppm 単独投与でそれぞれ 140.4・285.3 mg/kg 体重/day (銅換算 19.66・39.95 mg/kg 体重/day)、カテキン・グルコン酸銅併用投与でそれぞれ 146.6・285.8 mg/kg 体重/day (銅換算 20.53, 40.02 mg/kg 体重/day) であった。カテキン摂取量は、DMBDD 処置を行った群で 335.3-355.7 mg/kg 体重/day、DMBDD 処置を行わなかった群で 325.5-333.2 mg/kg 体重/day であった (表 2)。

2. 血清及び肝の銅濃度

血清の銅濃度は、DMBDD 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 (表 2)。DMBDD 処置を行った群における肝の銅濃度は、グルコン酸銅の 3000 ppm 単独投与でやや増加し、6000 ppm 単独投与で有意に増加した。また、カテキンとグルコン酸銅 6000 ppm の併用投与では、肝の銅濃度が有意に増加し、グルコン酸銅単独投与の場合より高値の傾向を示した。DMBDD 処置を行わなかった群では、グルコン酸銅 6000 ppm の単独投与で増加傾向を示したが、DMBDD 処置を行った場合より低値であった。また、この群の肝銅濃度は、カテキンとグルコン酸銅 6000 ppm の併用投与でも増加傾向を示し、グルコン酸銅単独投与の場合より高値の傾向を示した (表 2)。

3. 病理学的検索

GST-P 陽性肝前がん病変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、後者の 6000 ppm 投与の場合に増加傾向を示したものの、有意な変化を認めなかった。DMBDD 処置を行わなかった群では、病変が僅かに認められ

たのみで、群間の差もなかった。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(表3)。

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 300 ppm 以上単独投与で増加傾向を認め、同 6000 ppm 単独投与で有意に増加した。また、カテキンとグルコン酸銅 6000 ppm の併用投与では、肝細胞 8-OHdG 陽性率の増加傾向を認めたが、グルコン酸銅単独投与の場合より低値であった。DMBDD 処置を行わなかった群では、8-OHdG 陽性肝細胞の有意な増加を認めなかった(表3)。

第 4・6・10・13・16 群においては、前胃境界縁に過形成の発生を観察した。その発生頻度及び程度は、DMBDD 処置を行った群のグルコン酸銅 6000 ppm 単独投与にて有意に増加した。一方、カテキンの併用投与によっては、その発生頻度及び程度が有意に減弱した(表4)。

グルコン酸銅 10 ppm 単独またはカテキンとの併用投与及びカテキン単独投与では DMBDD 処置の有無にかかわらず全臓器に影響なく、肝・前胃以外の臓器への影響は全群でみられなかった。

D. 考察

銅あるいはカテキンは、DMBDD 処置の有無にかかわらず実験期間中の体重・最終平均体重に群間の差がなかったことより、本実験の条件下において明らか全身影響を示さないものと考えられた。一方、飲水量がカテキン投与により有意に低下したが、これは、悪味による飲用忌避の影響によるものと推察され、生体影響でないものと判断した。

グルコン酸銅 10 ppm 投与群の銅摂取量は、基礎飼料中の銅濃度(約 10 ppm)と合わせると、約 8 mg/day/ヒト(60 kg 体重)に換算され、ヒトの銅摂取目安 5 mg/day 及び許容上限摂取量(UL) 9 mg/day の範囲内に相当する。一方、カテキン 5000 ppm 群のカテキン摂取量は、約 20 g/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 500~1000 mg/day の約 20-40 倍に相当する。

肝の銅濃度は、DMBDD 処置を行った群と行わなかった群のグルコン酸銅 6000 ppm 投与の場合で比較すると、DMBDD 処置を行った群で明らかに高値を示した。このことから、DMBDD 処置は、生体の銅処理能を低下させるものと考えられた。さらに、DMBDD 処置を行った群のグルコン酸銅 3000 ppm 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、300 ppm 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、3000 ppm でそれらの処理能の限界を超え、6000 ppm で急激に銅が蓄積するものと推察された。また、グルコン酸銅単独投与の場合よりカテキンとグルコン酸銅の併用投与の場合の方が高い肝銅濃度を示したことから、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。一方、血清銅濃度は全群間で変化が認められなかったことから、DMBDD 処置の有無にかかわらず、グルコン酸銅は、6000 ppm までの用量であれば、血中への銅オーバーフローに至ることのないものと考えられた。

グルコン酸銅 10 ppm 単独またはカテキンとの併用投与及びカテキン単独投与は、DMBDD 処置の有無にかかわらず、全臓器に影響を与えなかった。一方、グルコン酸銅は、300 ppm 以上の単独投与により、DMBDD 処置条件下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かった。また、前胃においても、グルコン酸銅 6000 ppm 単独投与は、DMBDD 処置条件下で過形成病変を発生させたが、カテキンの併用投与によりこの変化の頻度と程度が共に減弱した。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特段の生体影響を示さないが、高用量投与の場合、肝及び前胃において増殖性病変誘発促進作用を有し、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、単独で増殖性病変誘発促進作用を示さず、グルコン酸銅と併用すると、むしろその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 300 ppm 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こうした機構によるグルコン酸銅の肝・前胃発がん促進を抑制することが推察された。

E. 結論

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増殖性病変誘発促進作用を有し、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、むしろ他の化学物質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。平成 18 年度の研究は、カテキンとグルコン酸銅の単独または複合投与による生体影響の背景分子機構をさらに詳細に検索するため、短期投与実験及びラット中期肝発がん性試験（伊東法）を実施し、酸化性ストレス関連遺伝子、炎症関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子等を指標とし、それらの産物の発現を検索する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- (1) 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).
- (2) 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).

- (3) 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).

G. 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

図1. 体重の推移

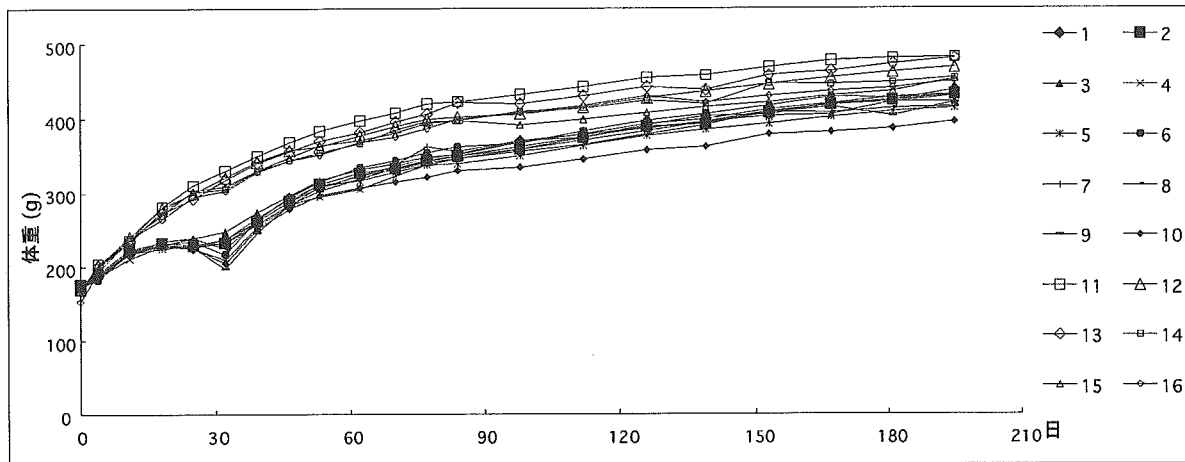


表1. 最終体重及び肝重量

群	DMBDD 処置	グルコン酸銅 (ppm)	カテキ (ppm)	有効 動物数	最終体重 (g)	肝重量	
						絶対 (g)	相対 (g/100g体重)
1	+	0	0	11	409 ± 43	9.5 ± 1.2	2.3 ± 0.1
2	+	10	0	11	406 ± 61	9.3 ± 1.1	2.3 ± 0.3
3	+	300	0	11	392 ± 38	9.5 ± 1.2	2.4 ± 0.3
4	+	3000	0	10	416 ± 36	10.1 ± 0.6	2.4 ± 0.2
5	+	6000	0	12	399 ± 36	9.6 ± 0.9	2.4 ± 0.1
6	+	0	5000	11	412 ± 50	10.2 ± 2.1	2.5 ± 0.4
7	+	10	5000	9	415 ± 38	9.3 ± 0.7	2.3 ± 0.2
8	+	300	5000	7	396 ± 30	10.3 ± 1.3	2.6 ± 0.3
9	+	3000	5000	10	404 ± 34	9.4 ± 1.0	2.3 ± 0.2
10	+	6000	5000	11	380 ± 43	9.0 ± 1.4	2.4 ± 0.2
11	-	0	0	9	470 ± 25	11.2 ± 1.3	2.4 ± 0.2
12	-	3000	0	9	452 ± 28	10.2 ± 0.8	2.3 ± 0.1
13	-	6000	0	9	463 ± 50	10.8 ± 1.6	2.3 ± 0.3
14	-	0	5000	9	442 ± 43	10.9 ± 1.2	2.5 ± 0.3
15	-	3000	5000	9	439 ± 41	10.4 ± 0.8	2.4 ± 0.1
16	-	6000	5000	9	441 ± 43	11.6 ± 2.5	2.6 ± 0.5

平均値±SD

表2. 被験物質摂取量及び銅濃度

群	グルコン酸銅 摂取量 (mg/kg体重/day)	銅 摂取量 (mg/kg体重/day)	カテキ 摂取量 (mg/kg体重/day)	銅 血清濃度 (μg/dL)	銅 肝濃度 (μg/wet.g)
1				157.7 ± 35.1 (3)	5.5 ± 0.6 (3)
2	0.5 ± 0.0	0.07 ± 0.00		140.3 ± 21.4 (3)	5.4 ± 0.7 (3)
3	14.6 ± 1.4	2.05 ± 0.20		124.4 ± 10.0 (5)	6.7 ± 2.6 (5)
4	152.6 ± 14.9	21.37 ± 2.08		153.2 ± 53.9 (5)	23.8 ± 22.5 (5)
5	314.8 ± 27.4	44.08 ± 3.83		134.2 ± 6.6 (5)	117.1 ± 71.8 (5)**
6			355.7 ± 15.9	180.7 ± 70.9 (3)	4.5 ± 1.0 (3)
7	0.5 ± 0.0	0.07 ± 0.00	353.4 ± 14.9	NE	NE
8	15.4 ± 0.8	2.16 ± 0.12	335.3 ± 8.6	NE	NE
9	155.3 ± 5.6	21.74 ± 0.78	343.2 ± 22.0	NE	NE
10	321.9 ± 25.4	45.07 ± 3.55	355.3 ± 24.2	154.0 ± 10.4 (4)	170.3 ± 83 (4)**
11				117.3 ± 21.7 (3)	4.2 ± 0.3 (3)
12	140.4 ± 2.9	19.66 ± 0.40		106.8 ± 22.4 (5)	5.4 ± 1.5 (5)
13	285.3 ± 9.2	39.95 ± 1.29		116.8 ± 9.9 (5)	19.0 ± 19.3 (5)
14			333.2 ± 34.3	116.3 ± 9.1 (3)	4.0 ± 0.6 (3)
15	146.6 ± 1.4	20.53 ± 0.19	330.8 ± 8.8	NE	NE
16	285.8 ± 19.2	40.02 ± 2.69	325.5 ± 20.4	133.2 ± 23.5 (5)	39.2 ± 26.3 (5)

平均値±SD, (N):測定数, NE:実施せず, **:1群に対し有意差あり (P<0.01).

表 3. GST-P 陽性肝前がん病変発生状況及び肝細胞 8-OHdG 陽性率

群	GST-P 陽性病変			8-OHdG 陽性率	
	個数 (No. /cm ²)	面積占有割合 (mm ² /cm ²)	平均面積 (mm ²)	(%)	
1	2.1 ± 1.2	0.12 ± 0.09	0.057 ± 0.037	0.3 ± 0.5	(5)
2	3.3 ± 1.1	0.33 ± 0.40	0.129 ± 0.215	0.1 ± 0.1	(5)
3	7.2 ± 4.7 *	0.39 ± 0.39	0.089 ± 0.149	4.3 ± 9.6	(5)
4	5.7 ± 3.0 *	0.19 ± 0.11	0.033 ± 0.009	11.5 ± 15.7	(5)
5	6.9 ± 5.0 **	0.32 ± 0.33	0.049 ± 0.024	72.0 ± 36.8	(5) *
6	3.6 ± 2.0	0.18 ± 0.11	0.052 ± 0.019	0.6 ± 0.5	(5)
7	2.5 ± 1.5	0.29 ± 0.50	0.077 ± 0.088	NE	
8	3.3 ± 2.0	0.13 ± 0.07	0.042 ± 0.022	NE	
9	3.1 ± 0.8	0.14 ± 0.07	0.047 ± 0.021	NE	
10	5.3 ± 5.0	0.30 ± 0.21	0.073 ± 0.037	46.8 ± 19.7	(5) *
11	0.09 ± 0.13	0.0006 ± 0.0008	0.004 ± 0.0045	0.0 ± 0.0	(3)
12	0.08 ± 0.09	0.0009 ± 0.0009	0.007 ± 0.0071	0.0 ± 0.0	(4)
13	0.15 ± 0.09	0.0020 ± 0.0011	0.014 ± 0.0050	2.5 ± 5.0	(4)
14	0.08 ± 0.13	0.0016 ± 0.0027	0.010 ± 0.0152	0.0 ± 0.0	(4)
15	0.06 ± 0.07	0.0009 ± 0.0011	0.007 ± 0.0073	NE	
16	0.24 ± 0.36	0.0028 ± 0.0040	0.006 ± 0.0064	0.0 ± 0.0	(4)

平均値±SD, (N):測定数, NE:実施せず, *,** : 1 群に対し有意差あり (P<0.05,0.01).

表 4. 前胃過形成発生状況

群	前胃境界線過形成			
	-	+	++	++
1	11	0	0	0
2	11	0	0	0
3	11	0	0	0
4	9	0	1	0
5	3	3	4	2 **
6	10	1	0	0
7	9	0	0	0
8	8	0	0	0
9	10	0	0	0
10	8	3	0	0 #
11	9	0	0	0
12	9	0	0	0
13	7	2	0	0
14	9	0	0	0
15	9	0	0	0
16	7	2	0	0

平均値±SD, * : 1 群に対し有意差あり (P<0.05), # : 5 群に対し有意差あり (P<0.05).

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

食品中化学物質の毒性発現に及ぼす諸要因に関する調査研究

分担研究者： 大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）
協力研究者： 山添 康（東北大学薬学部）

研究要旨

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。もっと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率が 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, Chloropyrifos, Ethoxazole, EPN では両細胞において同程度の誘導能を示した。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。

A. 研究目的

農薬は、農作物等を害する生物の防除に用いられる殺菌剤、殺虫剤、除草剤その他の化学物質、および農作物等の生理機能の調節に用いられる化学物質をいう。農薬の使用により、ヒトにおける偶発的曝露が起こることが予想される。すなわち、農業従事者等は農薬に接する機会が多いため職業的に農薬に曝露されやすく、また、一般大衆においても野菜等の農作物に残留する農薬を摂取する可能性がある。このような農薬の曝露により強力に CYP3A4 が誘導された場合、これにより代謝される薬物が多くあることから、薬物療法上の問題が生じうる。そのため、農薬の CYP3A4 誘導能評価を行うことは重要な課題である。

一方、ヒトへの投与を意図して開発される医薬品と異なり、このような低濃度かつ非意図的な農薬の曝露によるヒトへの生物学的影響はほとんど分かっていない。ヒトを対象とした長期的な農薬の集団曝露実験を行うのは困難であるため、実験動物を用いてヒトへの影響の予測が行われている。ところが、ヒトと実験動物間では薬物代謝活性に大きな種差が知られており、殊に、ヒトと実験動物間で薬物代謝酵素誘導を引き起こす化学物質は必ずしも同じでないことがわかってきた。そのため、実験動物を用いた予測からヒトで起こりうる誘導を予測することは難しい。したが

って、ヒトでの CYP3A4 誘導を簡便に予測できる系を用いて、農薬の CYP3A4 誘導能を評価することが求められる。

したがって、ヒトでの CYP3A4 誘導を簡便に予測できる系を用いて、農薬の CYP3A4 誘導能を評価することが求められる。そこで、本研究では、ヒトにおける誘導を簡便に評価できるレポーターアッセイ法を用い、*in vitro* および *in vivo* での農薬の CYP3A4 誘導能評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 細胞

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

CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現株は 0.35% glucose, 0.4% NaHCO₃, 2 mM L-glutamine (和光純薬), Antibiotic-Antimycotic (100 U/ml penicillin G sodium, 100 µg/ml streptomycin sulfate, 0.25 µg/ml amphotericin B (GIBCO BRL), MEM Non-essential amino acids solution (GIBCO BRL) および 10% fetal calf serum (Boehringer) を添加した DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 日水製薬) 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。

2. 被験薬物

図 1 は、当研究室にて樹立した CYP3A4 誘導評価を簡便で迅速に、さらに再現が高く好感度に行うことが可能な培養細胞株を示している。この細胞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、ヒト肝臓ガン由来細胞である 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。

農薬による培養細胞を用いた *in vitro* での誘導評価実験の実験プロトコールは以下のように行った。

細胞を 12well のディッシュに 3×10^5 を撒き、2 日後に各農薬を 10 μM 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。

3. ルシフェラーゼ活性の測定

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。

C. 研究結果及び考察

図 1 は、協力研究者の研究室にて樹立した CYP3A4 誘導評価を簡便で迅速に、さらに再現が高く好感度に行うことが可能な培養細胞株を示している。この細胞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、ヒト肝臓ガン由来細胞である 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。その下には、農薬による培養細胞を用いた *in vitro* での誘導評価実験の実験プロトコールを示している。細胞を 12well のディッシュに 3×10^5 を撒き、2 日後に各農薬を 10 μM 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。

ヒト CYP3A4 の代表的誘導剤であるリファンピシンに対して高い応答性を示す細胞株とクロトリマゾールに対してより高い応答性を示す細胞株を樹立した。表 1 に示したものは、この 2 種の細胞株を用いて、現在土壌の残留農薬として分析が行われている代表的農薬の CYP3A4 誘導評価の結果を示した。

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。もっと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。またやや強いグループでは、Clotrimazole と同じかむしろ強い誘導率が 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能を示した。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。

一方、実際に使用されている農薬の純度は製品間で異なり、約 90%前後のものが多い。そこで、昨年度の研究では、これらの農薬に含まれる不純物あるいは、そのまま培養細胞に添加しても本実験に使用可能であるかを確かめるために、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。その結果、表 2 に示したように、市販され使用されている農薬と高純度の評品の間の誘導能は、変わらなかった。また、今回用いた市販の農薬には、先に示した TPN と Captan などの強い細胞毒性を示すものはなかった。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。

ところで、*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。

図2は、その作成の概略とマウスを用いた実験プロトコルを示したものである。マウスにヒトPXR発現ウイルスとCYP3A4遺伝子レポーターベクターを組み込んだウイルスを同時に腹腔内投与し、7日後から3日間連続して強い誘導が認められた*iprobefos*および*permethorin*をそれぞれ100 mg/kgを腹腔内投与した。ウイルス投与10日後に肝臓を摘出して、ルシフェラーゼ活性を測定した。

*iprobefos*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。この図は、*Permethorin*投与による結果を示したものである。まず、赤のカラムにて示したものは、CYP3A4遺伝子レポーターベクターウイルスのみを投与した結果である。*Permethorin*の投与により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。この結果は、*Permethorin*が、マウス内在のPXRを活性化しないがヒトのPXRは、活性化することを示している。即ち、*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を示唆している。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。

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。

D. 結論

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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) 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 HepG2 Cells in a 5-ml Radial-flow Bioreactor for Construction of Artificial Liver. *J. Bioscience and Bioengineering*, 99, No 3, 237-244, 2005
- 2) Takashi Kubo, Su-Ryang Kim, Kimie Sai, Yoshiro Saito, Toshiharu Nakajima, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, Kuniaki Shira, 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.
- 3) 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 (2005) Polymorphic tandem repeat sequences of the thymidylate synthase gene correlates with cellular-based sensitivity to fluoropyrimidine antitumor agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 56:465-472.

F-2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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
 - 3) 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体差. 日本薬学会第125年会(2005.3.29-31) 東京
 - 4) 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)
 - 5) Kenya Nakai, Shogo Ozawa, Fumitaka Suzuki, Hiromitu 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)
 - 6) 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)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
なし。

図1：農薬によるCYP3A4誘導評価に用いたレポーター安定発現培養細胞と実験プロトコール

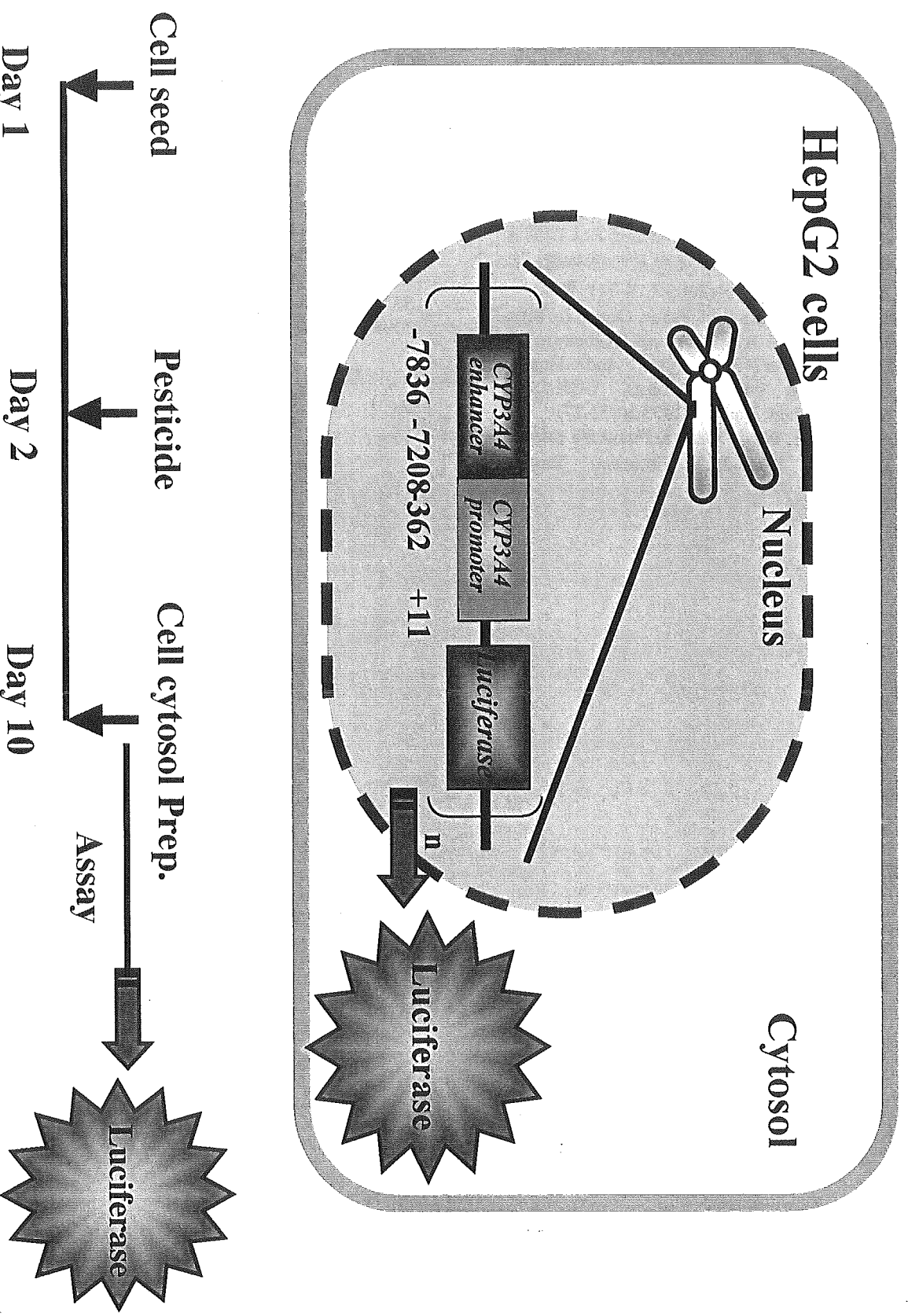


表 1 : 残留農薬として分析が行われている農薬のCYP3A4誘導評価

Chemicals	Classification	Relative level (fold increases) (mean \pm SD)		Ratio of relative level
		Clone 3-1-10	Clone 3-1-20 (3-1-10/3-1-20)	
DMSO		1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.0
Clotrimazole		5.0 \pm 1.0	13.0 \pm 1.0	0.4
Rifampicin		45.0 \pm 1.0	5.0 \pm 1.0	9.0
<hr/>				
TPN	Fungicide	0.1 \pm 0.1 ^a	1.9 \pm 0.3	ND
Captan	Fungicide	0.6 \pm 0.1 ^a	1.5 \pm 0.1	ND
Chloroneb	Herbicide	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.0
Bentazone	Herbicide	1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.1
Echloomezol	Fungicide	1.6 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.5
<hr/>				
CAT	Herbicide	2.4 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	1.7
Metaxyl	Fungicide	2.6 \pm 0.1	2.8 \pm 0.2	0.9
Isoprothiolane	Fungicide	3.4 \pm 0.6	3.0 \pm 0.2	1.1
Chloropyrifos	Insecticide	4.0 \pm 0.9	4.3 \pm 0.3	0.9
MEP	Insecticide	4.3 \pm 0.7	2.1 \pm 0.1	2.0
Mepronil	Fungicide	4.9 \pm 1.3	2.1 \pm 0.1	2.3
<hr/>				
Etoxazole	Insecticide	6.5 \pm 0.6	5.0 \pm 0.3	1.3
Propyzamide	Herbicide	7.5 \pm 0.6	2.8 \pm 0.1	2.7
EPN	Insecticide	7.8 \pm 4.4	7.6 \pm 0.5	1.0
Isoxathion	Insecticide	8.9 \pm 1.2	11.9 \pm 1.0	0.7
<hr/>				
Dymron	Herbicide	16.8 \pm 3.6	3.9 \pm 0.5	4.3
Pyributicarb	Herbicide	17.0 \pm 1.0	5.7 \pm 0.8	3.0
Flutolanil	Fungicide	18.4 \pm 1.0	2.7 \pm 0.5	6.8
Isofenfos	Herbicide	21.8 \pm 4.6	6.2 \pm 0.2	3.5
Dithiopyr	Herbicide	24.5 \pm 3.2	4.7 \pm 0.3	5.2

a; cell death

ND; not determined

表2：市販農薬と分析用評品のCYP3A4誘導評価

Pesticides	Classification	Luciferase activity (% of control)		Luciferase activity (% of control)	
		Clone 3-1-10	Clone 3-1-20	Product	Standard
Alanylcarb	Insecticide	1.27 ± 0.08	1.49 ± 8.3	1.22 ± 0.08	1.19 ± 0.07
Ametryn	Herbicide	1.23 ± 0.18	1.50 ± 0.11	1.56 ± 0.14	1.50 ± 0.18
Chloronitrofen	Herbicide	3.69 ± 0.37	3.96 ± 0.24	2.47 ± 0.18	2.70 ± 0.25
Ethiofencarb	Insecticide	1.93 ± 0.12	1.96 ± 0.52	1.20 ± 0.13	1.44 ± 0.07
Iprobenfos	Fungicide	7.62 ± 1.04	8.44 ± 0.52	2.72 ± 0.10	2.85 ± 0.07
Kepone	Insecticide	ND	4.62 ± 0.26	ND	3.50 ± 0.23
MCC	Herbicide	1.34 ± 0.10	1.21 ± 0.09	1.34 ± 0.12	1.36 ± 0.11
o, p'-DDD	Insecticide	ND	5.92 ± 0.56	ND	3.17 ± 0.28
p, p'-DDE	Insecticide	ND	3.21 ± 0.19	ND	2.64 ± 0.15
Permethrin	Insecticide	5.86 ± 0.53	5.62 ± 0.68	3.49 ± 0.14	3.42 ± 0.08
Prometryn	Herbicide	4.52 ± 0.34	4.70 ± 0.06	1.34 ± 0.14	1.58 ± 0.10

ND; not determined 註：本表は平成16年度報告のデータをまとめたもの。

図2：ヒトPXRおよびCYP3A4遺伝子レポーター発現ウイルスの作成と農薬によるCYP3A4誘導実験プロトコール

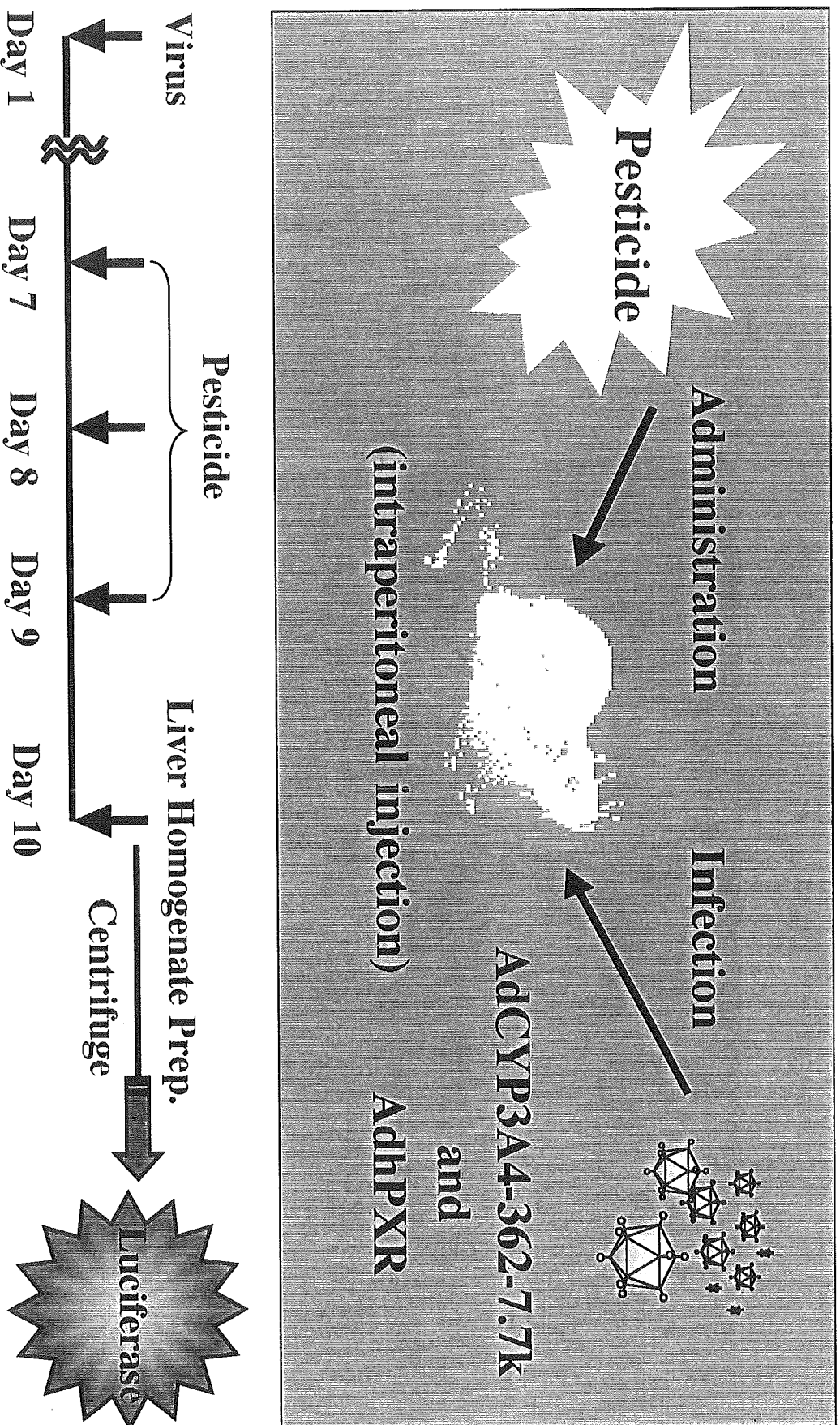
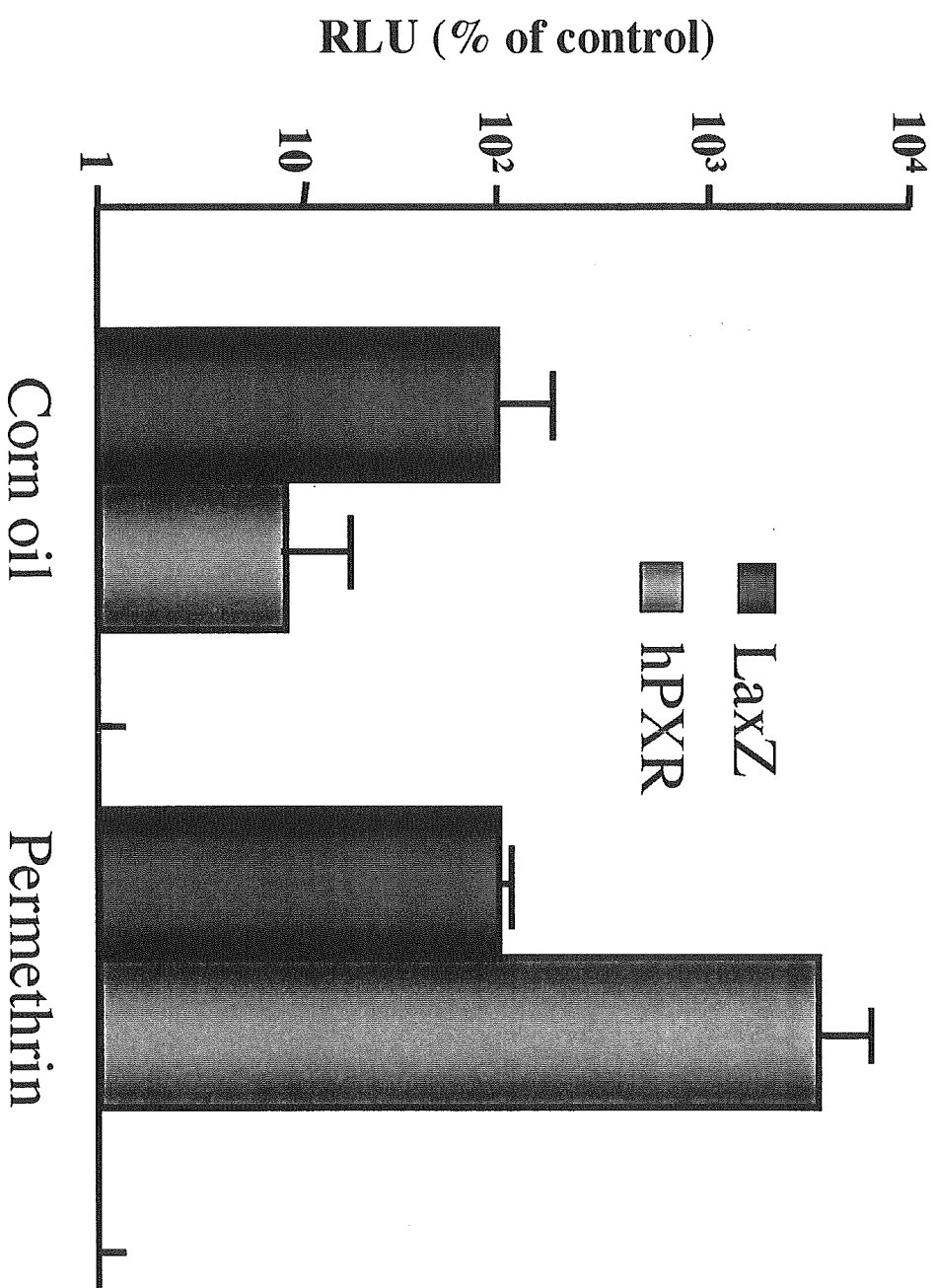


図3 : ヒトPXRを強制発現させたマウス肝臓におけるCYP3A4誘導



The S9 fraction from mouse liver was measured for the luciferase activity and protein concentration. The column represents the means of 5 experiments and the error bar is a standard deviation.

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
分担研究者 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

研究要旨

化学物質の肝における CYP1A1/1A2 誘導能と、CYP1A1/1A2 で代謝活性化されるヘテロサイクリックアミンによる肝発がん修飾作用との相関を検討するため、ラット中期肝発がん性試験法を用いて、CYP1A1/1A2 の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、肝発がんへの影響を検討した。その結果、MeIQx 単独、 α -Naphthoflavone 単独あるいは β -Naphthoflavone の単独投与により、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。

A. 研究目的

発がん物質の発がん性修飾作用は生体内での代謝活性化に大きく左右されるため、発がん物質と同時に代謝活性化を誘導あるいは阻害する化学物質を同時に投与すると、発がんが修飾されると考えられる。医薬品においては、CYP3A4 を阻害するグレープフルーツジュースと、CYP3A4 で代謝活性化される抗癌剤を投与すると、抗癌剤の効果が減弱するなどの実例が報告されている。昨年度は、加熱食品中に含まれるヘテロサイクリックア

ミンの1種である MeIQx によるラット肝発がんを、促進あるいは抑制することが既に報告されている化学物質を、ラットに2週間混餌投与し、如何にシトクローム P450 分子種が誘導または阻害されるかを Western Blotting 法を用いてタンパク質レベルで追究した。その結果、MeIQx の代謝活性化に必要とされる CYP1A1/1A2 の誘導能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、CYP1A1/2 の強い誘導が確認され

ている α -Naphthoflavone または β -Naphthoflavone を MeIQx と同時に混餌投与して、MeIQx のラット肝発がんへの影響を検討した。

B. 研究方法

6 週令雄 F344 ラット 90 匹を 6 群 (各 15 匹) に分け、すべての群に diethylnitrosamin (DEN) を 200mg/kg の用量で 1 回腹腔内投与した。その後 2 週間後から 1 群には基礎食のみ、2 群には 0.01%MeIQx のみ、3 と 4 群にはそれぞれ 0.01% MeIQx と 0.02% α -Naphthoflavone あるいは 0.01%MeIQx と 0.02% β -Naphthoflavone の混合飼料を、5 群と 6 群にはそれぞれ α -Naphthoflavone、 β -Naphthoflavone のみをそれぞれ 6 週間投与した。全動物に対して実験開始 3 週目に 2/3 肝部分切除を定法に従って行った。実験開始後 8 週目にすべてのラットを剖検屠殺し、肝臓の組織切片を作製、肝前がん病変マーカーである胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) の免疫染色を施行し、GST-P 陽性細胞巢の個数と大きさを病理標本画像解析装置 (IPAP-WIN、住友テクノサービス (株)) を用いて計測し、それぞれを単位面積あたりの数値として表現した。

(倫理面への配慮)

実験は、名古屋市立大学の規程に基づき動物愛護の精神を十分に尊重して行った。

C. 研究結果

実験 3 日目に 3 群の 1 匹が死亡した。死因は腹腔内の癒着があり、腹膜炎に起因するものと解釈された。さらに 3 群の 1 匹が肝部分切除術施行翌日に死亡した。また 1 群の 1 匹の全身状態の悪化を認めため、これらのラットを解析有効動物から除外した。摂餌量には各群間に差は無かったことから各化合物の摂取量には設定通りであることが示された。各群間における体重には有意差は認められなかった。しかし、2、5 および 6 群のラット肝重量は 1 群のそれに比して有意に上昇していた (表 1)。また 3 群と 4 群の肝重量は 2 群のそれに比して有意に上昇していた。

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 (表 2)、MeIQx 単独投与により、GST-P 陽性細胞巢の単位面積あ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になった。なお、MeIQx 単独群における GST-P 陽性細胞巢の発生個数及び面積は、従来の結果より少ないが、この原因は MeIQx の投与量を 0.03% から 0.01% に減少させたためである。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。

D. 考察

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

に關与する酵素である 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關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 2000 年の Toxicologic Pathology に論文として報告されており (Shoda et al., Toxicol. Pathol., 28:540-547, 2000)、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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. 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.
2. 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*]quinoxaline (MeIQx)-treated rats. *J Toxicol Pathol*. 18: 99-104, 2005.
3. 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

該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。