

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広瀬雅雄

平成19(2007)年3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	----- 26
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	----- 52
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	----- 80
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	----- 91
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	----- 96
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	----- 107
山添 康	
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	----- 112
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	----- 120
原田孝則	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 137
IV. 研究成果の刊行物・別冊	----- 140

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。

松元は亜硝酸ナトリウム(NaNO_2)と茶カテキンの主要成分である(-)-epigallocatechin-gallate (EGCG)の複合処理により、*in vitro*コメットアッセイでDNA損傷誘発性が誘発されることを見いだした。Amesテストでは種々のpH(5.0~7.4)で同時処理を行ったが、複合突然変異誘発性は認められなかった。 NaNO_2 と他の茶カテキン3種類の複合では、(-)-epigallocatechin(EGC)で強いDNA損傷が誘発されたが、(-)-epicatechin(EC)または(-)-epicatechin-gallate (ECG)では誘発されなかったが、以上より、EGCGとEGCは NaNO_2 との複合DNA損傷作用があるものと結論した。さらに、 NaNO_2 とアスコルビン酸の複合遺伝毒性をAmesテストで評価した。TA100とWP2uvrA/pKM101のどちらの株においても弱酸性条件下で著しい相乗効果が認められた。同様の方法で NaNO_2 とカテコールの複合遺伝毒性をAmesテストで評価したが、pHに関係なく複合効果は認められなかった。

中澤は平成16年度、亜硝酸ナトリウムとカテコールあるいはアスコルビン酸の併用投与によるラット前胃発がん促進機構には、活性酸素種だけでなく活性窒素種が関与することを明らかにした。平成18年度は活性窒素種の発がん促進機構への関与を明らかにするため、活性窒素種によるDNA損傷評価法を検討した。更に、活性窒素種によるタンパク質中ニトロ化合物としてニトロトリプトファンの高感度分析法を構築した。活性窒素種によるDNA損傷評価法として、液体クロマトグラフィー/質量分析法によるニトログアニンの分析法を構築し、液体クロマトグラフィー/電気化学検出器による8-ヒドロキシデオキシグアノシンの分析法と組み合わせることで、DNAのニトロ化および酸化の両方の評価法を確立した。本評価法を*in vitro*試料へ適用した結果、活性窒素種によってDNAの酸化およびニトロ化が生じることを明らかにした。一方、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によるニトロトリプトファンの分析法では、*in vitro*におけるタンパク質中ニトロトリプトファン生成を確認し、3種のニトロトリプロファン異性体の同時分析法を確立した。更に、活性窒素種生成の知られる毒性量のアセトアミノフェンを投与したマウス肝組織の分析に本法を応用した結果、アセトアミノフェン投与群においてニトロトリプトファンが生成することを明らかにした。

広瀬は、前年度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用い、アスコルビン酸(AsA)と亜硝酸ナトリウム(NaNO_2)の複合が逆流性食道炎の病態下で食道に対して発がん性を有する可能性を示した。本年度は、複合

投与の食道発がん促進修飾作用をさらに詳細に検討するため、同モデルに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した。この結果、AsAとNaNO₂の複合投与により食道の肉眼的結節の体積並びに腫瘍の発生頻度及び発生個数は増加し、軽度ながら食道発がん促進作用が認められた。従って、ヒトにおいても飲食物由来の亜硝酸と抗酸化物質の複合暴露が食道発がんのリスク要因となっている可能性が考えられた。さらに、AsAと亜硝酸の併用はラット前胃粘膜8-OHdGレベルを増加させ、*in vitro*では染色体異常を誘発し、イニシエーション処置無しでもラット前胃及び逆流性食道炎下の食道に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も疑われる。本年度は、酸化的DNA損傷修復遺伝子*mutM*欠損大腸菌株を用いた*in vitro*遺伝毒性検索を行った。この結果、大腸菌WP2 *uvrA*/pKM101株では明らかな復帰株数の増加は認められなかったが、*mutM*欠損株ではNaNO₂との複合によりAsA濃度依存的に復帰株数の増加がみられ、AsAを含まない対照値と比べて約3倍の高値を示した。しかし、ラットにAsAとNaNO₂を12週間複合投与したのち前胃発がんプロモーターとしてBHAを投与する2段階発がんモデルでは、前胃の腫瘍性病変の発生数増加はみられず、複合投与のイニシエーション活性は検出できなかった。従って、これら2剤の複合は酸化的DNA損傷を介した遺伝毒性を有するものの、*in vivo*での発がんイニシエーション作用は小さいと考えられた。

川西は、唐辛子に含まれ発がん性や変異原性を示すことも報告されている辛み主成分のカプサイシンと金属との複合によるDNA傷害について検討した。カプサイシンは代謝酵素Cytochrome P450 (CYP)、特にCYP1A2の前処理によりCu(II)存在下で酸化的にDNAを損傷した。すなわち、カプサイシン代謝物が活性酸素種を生成し、金属イオン存在下でDNA損傷することが示された。

中江はグルコン酸銅とカテキンの複合投与が肝発がん性に及ぼす影響の検証と機構を解明するため、ラット中期肝発がん性試験及び2週間反復投与試験を実施した。ラット中期肝発がん性試験は、被験物質としてグルコン酸銅またはカテキンをそれぞれ単独で、あるいは複合で6週間投与した。屠殺後、肝臓を採取して、各種免疫組織学的解析及びRT-PCRによる遺伝子発現解析を行った。2週間反復投与試験は、グルコン酸銅とカテキンを2週間単独あるいは複合投与し、上記と同様の遺伝子発現解析を行った。ラット中期肝発がん性試験において、GST-P陽性細胞巢の発生個数、8-OHdG陽性細胞数、PCNA標識率及びアポトーシス発生程度は、グルコン酸銅単独及びカテキンとの複合投与群にて有意に増加した。これらの群では、金属代謝関連遺伝子(methalothionein 1A, transferrin receptor)、アポトーシス関連遺伝子(tumor necrosis factor α , p21, p53)及び癌遺伝子(c-fos)の発現増強が認められた。Methalothionein 1A・transferrin receptor・p21の発現増強は、2週間反復投与試験でも認められた。以上の結果から、グルコン酸銅は、高用量で肝発がんリスクを有し、その機序に、酸化ストレス・細胞増殖・アポトーシスの誘導が関与するものと示唆された。一方、カテキンは、単独でなんらの影響も示さず、グルコン酸銅との複合投与でも発がん抑制作用を示さなかった。

ヒトの主要な異物代謝酵素であるCYP3A4は、医薬品や食品成分など様々な化学物質の暴露により酵素誘導を受ける。したがって、CYP3A4で代謝される化学物質を、CYP3A4誘導作用を示す化学物質と同時に摂取した場合、単独摂取の場合とは異なる薬理効果や毒性を示す可能性があり、ヒトに用いられる化学物質のCYP3A4誘導性を事前に把握しておくことは非常に重要である。山添は本研究において、前年度までに作成したCYP3A4レポーター遺伝子安定発現細胞とCYP3A4レポーター発現アデノウイルスを用いて、20種類の農薬のCYP3A4誘導性を評価し、pyributicarbが代表的なCYP3A4誘導剤であるrifampicinよりも強力なCYP3A4誘導性を示すことを明らかにした。

白井は、前年度食品中の発がん物質であるMeIQxとその代謝活性化酵素であるCYP1A1/1A2を誘導する作用のある α -および β -naphthoflavone (ANF, BNF)を複合投与し

て検討したところ、CYPは明らかに誘導されたが、MeIQx肝発がん促進作用は見られなかった。そこで今年度は、酵素誘導と前がん病変の発生の肝小葉を単位とする領域特異性に着目し、CYP1A1/2の免疫染色を行い、MeIQx, ANF, BNFの単独およびそれぞれを複合投与した際のCYP1A1/2の発現強度の領域特異性を検索した。その結果、MeIQx, ANF, BNF投与により誘導されたCYP1A1/2の発現強度は小葉の領域により異なり、MeIQx単独投与ではZone 3で上昇し、ANFとBNFではZone 1が上昇した。複合投与ではその発現強度の部位特異性に変化はみられず、前がん病変の発生はZone 2に多く見られたが、Zone 3での前がん病変の発生と酵素誘導には一定の相関が見られた。前がん病変ではCYP1A1/2の発現は高度に減少しており、いったん発生した前癌病変に対しては酵素誘導による発がん物質の活性化は、病変内できわめて起きにくいことが明らかとなった。

原田は、農薬の複合毒性を検索するため、雄ラットの幼若期（3週齢）あるいは若齢期（5週齢）に有機塩素系農薬DDTを14日間反復経口投与した後に休薬し、成熟期（10週齢）で有機リン剤MPPを単回経口投与し、臨床症状、死亡率、自発運動量、コリンエステラーゼ活性（血漿、脳）、血漿中DDT濃度（代謝物DDEを含む）、薬物代謝酵素活性（肝臓）および酸化ストレス（肝臓、脳）を指標に毒性効果を比較検討した。その結果、幼年期において毒性症状が認められない程度のDDTに短期間連続曝露した後に休薬期間を置き、動物が成熟期を迎えた時点で有機リン剤MPPに曝露された際の毒性はDDTに曝露されていない場合と比較して重篤になり、その程度は若齢期よりも離乳直後の幼若期からDDTに曝露された方がMPPの毒性効果がより顕著であった。この結果から、塩素剤とリン剤の時間差を置いた複合曝露においても、若齢動物と比べて幼若動物の方が曝露影響を受け易いと考えられ、時間差を置いた複合曝露についても留意する必要性が示唆された。

分担研究者

松元郷六 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 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部
教授
中江 大 東京都健康安全研究センター
参事研究員
山添 康 東北大学大学院薬学研究科教授
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

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、松本、広瀬は亜硝酸と天然抗酸化物質との複合による遺伝毒性あるいは発がん作用を、それぞれin vivoの遺伝毒性試験あるいはin vivoの動物実験で検証し、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、ラジカル反応の証拠を得るために組織中の反応生成物を同定する。

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

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おり、ヒトでは肝障害を増悪させる要因としても考えられている。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、酵素誘導に関係する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。そこで山添は、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のうち、特にヒトの主要な薬物代謝酵素であるCYP3A4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。

農薬の複合毒性については、評価上の困難性もあり、未解決な点が多く、これを解明することは食の安全を担保する上にも極めて重要である。特に現在世界的に懸念されている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曝露影響を明らかにすることは、社会的にも意義は大きい。従って、原田は本研究において有機リン剤を中心として、リン剤と同様に神経毒性が示唆されている有機塩素系あるいはカーバメート系農薬に対し複合的に曝露された場合の神経系への影響を明らかにし、リスク評価に必要な基礎的毒性

情報を得ることを目的として研究する。

B. 研究方法

【松元】

In vitro コメットアッセイ：

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℃、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。

試験はHartmannらのガイドラインおよびSasakiらの方法を参考に実施した。

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50 μ L添加した（最終培地濃度は被験物質溶液濃度の1/100）。陽性対照物質として4-ニトロキノリン-1オキシド（4-NQO、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。4-NQOの最終培地濃度は0.25 μ g/mLであった。

各スライドグラスあたり50個、各濃度あたり200個のコメット像（陽性対照群は500個のコメット像）をCCDカメラでPCに画像を取り込み、Komet5.5 (Kinetic Imaging Limited)により画像解析を行った。計測したパラメーターは% Tail 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。陰性対照群とカテキン単独処理群は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。

細胞毒性（細胞生存率）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レベルを検出することによって求めた。回収した細胞を冷メタノールに15分処理しATPを抽出した。抽出したATPは純水で希釈し、ルミテスター(キッコマン株式会社)を用いて発光量を測定し、陰性対照群と比較した。

Amesテスト:

試験菌株はネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2*uvrA*/pKM101の2菌株を用いた。

試験開始時に保存菌液を解凍し、ニュートリエントブロス液体培地 (Oxoid nutrient broth No. 2, Oxoid Ltd., Lot No. 349916) に接種し、37°Cで8時間振盪培養した。分光光度計で吸光度 (OD₆₆₀) を測定し、 1×10^9 生菌数/mL以上の菌懸濁液であることを確認した

試験は非代謝活性化系で実施した。被験物質処理群、溶媒対照群および陽性対照群のすべての用量について3枚のプレートを用いた。陽性対照物質にはAF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業株式会社) を用いた。

処理はプレインキュベーション法にして行って実施した。

次の2つの条件が満たされた場合、最終的に「陽性」と判定した: ①復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍以上に増加する。②その増加に用量相関性が見られる。一方、上記の条件が満たされない場合は「陰性」と判定した。

【中澤】

実験1:

仔牛胸腺は、消化過程における酸化を防ぐために、Nakaeら⁹⁾の方法を参考にDNA消化を行った。反応後の0.5 mLのDNA溶液に1.0 mLの2-プロパノールを加え、4°C, 15,000 x gで10分間遠心分離を行い、上清を捨てペレット

状のDNAを1.0 mLのエタノールで洗浄した後、再度4°C, 15,000 x gで10分間遠心分離を行った。得られたペレット状のDNAを0.2 mLの20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.8) に溶解し、2,000 units/mLのヌクレアーゼP1を4.0 μL添加し70°Cで15分間インキュベーションした。さらに、1.0 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を20 μL加えた後、1,000 units/mLのアルカリホスファターゼを4.0 μL添加し、37°Cで1.0時間インキュベーションした後、3.0 M 酢酸緩衝液 (pH 5.1) を20 μL加え、10,000 NMWLフィルターを通し試料とした。得られた試料のうち50 μLはLC-UV-ECDによる8-OHdG及びdGの測定に、100 μLには10 μLの2.5 M塩酸及び40 μLのMTNG溶液を加え1.5時間反応させた後、LC-MSによるNO₂Guaの測定に供した。

ONOO⁻により引き起こされるDNA損傷の評価には、1.0 mMのDTPAを含む100 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて調製した250 μg/mLの仔牛胸腺 DNA溶液に、0から100 μMのONOO⁻を添加し、37°Cで1.0時間インキュベーションした。DNAの抽出及び消化後、得られた約200 μLの試料のうち50 μLはLC-UV-ECDによるdG及び8-OHdGの測定に、100 μLはMTNG誘導体化後、CS-LC-ESI-MSによるNO₂Guaの測定に供した。

実験2:

組織タンパク質中NO₂Trp異性体及びTrpの検出を目的としていることから、酵素処理によるタンパク質の抽出および消化方法^{9,10)}を採用した。すなわち、肝組織に50 mM酢酸緩衝液 (pH 6.5) を加えて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10 mg/mLに調整した後、0.5 mLの0.5% TCA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、2.0 mg/

mLのプロテアーゼを含む50 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.5) 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% TCA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0.45 µm PVD Fフィルターを通し、測定用試料とした。

*in vitro*におけるNO₂Trp生成の確認には、BSAを1.0 mM DTPA含有100 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) に溶解して、最終濃度が10 mg/mLとなるように調整し、0 - 1000 µMの範囲のONOO⁻を添加した後、37°C、1時間インキュベーションした。反応後、0.5 mLの10% TCAを加え、4°C、14000 x gで10分間遠心分離し、沈殿に2.0 mg/mLのプロテアーゼを含む50 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.5) 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% TCA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0.45 µm PVDFフィルターを通し、測定用試料とした。

動物実験では、6週齢の雄B6C3F1マウス20匹を対照群、APAP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 (オリエンタル酵母社製) を用い、APAP投与群には300 mg/kgを腹腔内投与した。投与後各時間において屠殺し、試料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。

倫理面への配慮：

動物実験については、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い指針に基づいて実施された。

【広瀬】

食道発がんプロモーション試験では、5週齢のF344ラットに0.1% N-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) を3週間飲水投与し、

食道に対するイニシエーション処置を行った。1週間後、胃液逆流のための手術を行ない、2週間の回復期間の後、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16週間投与した (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)。投与期間終了後に全例を解剖し、食道に発生した結節の数と体積 (縦×横×高さ×0.52) を計測した後、病理組織学的検索を行った。

遺伝毒性試験では、大腸菌WP2 uvrA/pKM101株及びそのmutM (8-OH-G or Fapy DNA glycosylase) 欠損株 (WP2 mutM uvrA/pKM101) を0又は100 µgのNaNO₂に対して0、2500、7500及び1000 µgのAsA共存下で20分間処理した後プレートにまき、48時間後の復帰コロニー数を計測した。実験はS9mixを含む条件と含まない条件でそれぞれ2回ずつ行い、その合計で評価した。

前胃発がんイニシエーション試験では、6週齢の雄F344ラット125匹を各25匹の5群に分け、以下の被験物質を12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、100mg/kg体重のMNNG (溶媒：50% DMSO水溶液) を強制経口投与した。12週間のイニシエーション期間後、前胃の変化を確認するために各群5匹を途中解剖した。残りの動物には2週間基礎飼料を与えた後、1% BHAを混餌投与した。試験開始から52週間後に各群5匹を途中解剖、78週間後に残る全例 (各群15匹) を解剖し、前胃の病理組織学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は飲水ないし混餌による経口投与が主であり、動物の苦痛を最小限に留めた。手術操作はネンプター麻酔下で実施し、術後

の処置も適切に行った。解剖時には、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの放血により安楽死させ、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあたっては、研究所の利用規定に従った。

【川西】

5'末端を³²Pで標識したヒトがん原遺伝子 (*c-Ha-ras-1*) およびがん抑制遺伝子 (*p53*, *p16*) 断片と種々の代謝酵素Cytochrome P450 (CYP) で前処理したカプサイシンを、リン酸緩衝溶液中で金属イオン存在下、37℃で1時間反応させ、ピペリジン処理後ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、DNA損傷性について検討した。また、Maxam-Gilbert法を併用しその塩基配列特異性について解析を行った。酸化了的DNA損傷の指標である8-oxodGは電気化学検出器付HPLCで定量した。

【中江】

中期肝発がん性試験は、第1~6群 (各群12匹) の動物にDEN (200 mg/kg体重、腹腔内投与1回) を投与した。第7・8群の動物 (各群9匹) には生理食塩液を同様に投与した。第1~6群の動物には、その2週間後よりグルコン酸銅 (0, 10, 300, 6000 ppm混餌) またはカテキン (5000 ppm混水) を単独で、あるいはグルコン酸銅6000 ppmとカテキンを併用して、6週間投与した。第7・8群には、グルコン酸銅 (0, 6000 ppm) を投与した。全ての動物には、実験開始の3週間後に、エーテル麻酔下で2/3部分肝切除術を実施した。8週間の試験期間終了後、エーテル麻酔下で放血屠殺し、肝臓は、各葉より切り出した切片を10%緩衝ホルマリン液にて固定して通常の方法でパラフィン包埋し、残りを凍結保存した。2週間反復投与試験では、無処置の動物 (各群5匹) にグルコン酸銅 (0,

10, 300, 6000 ppm混餌) またはカテキン (5000 ppm混水) を単独で、あるいはグルコン酸銅6000 ppmとカテキンを複合で2週間投与し、投与終了後に上記と同様に肝臓を摘出し凍結保存した。肝に対しては、胎盤型glutathione S-transferase (GST-P)・8-OHdG・proliferative cell nuclear antigen (PCNA)・terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL)・methalothionein (MT) の免疫組織化学的染色並びに銅染色を実施した。肝凍結保存標本は、RNAを抽出し、cDNAを作製した。得られたcDNAは、7200リアルタイムPCRシステム (アプライドバイシステムズ) により増幅し、mRNA発現を解析した。mRNA発現解析は、methalothionein 1A (Mtl1a)・transferrin receptor (Trfc)・tumor necrosis factor α (TNF α)・p21・p53・interleukin 1 α (IL1 α)・nitric oxide synthase 2 (NOS2)・c-fos・ceruloplasmin (Cp)・superoxide dismutase 1 (SOD1)・oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1)・cyclin D1 (CD1) 及び18S rRNA (ハウスキーピング遺伝子) について実施した。

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、Dunnettの方法で対照群と各検体投与群の間で検定を行った。検定は、DEN処置群内あるいは無処置群内それぞれで行い、必要に応じて別途検定方法を選択して行った。

【山添】

農薬のCYP3A4誘導能の評価には、CYP3A4レポーターを安定的に発現するヒト肝癌細胞Hep G2由来細胞株 (クローン3-1-10) を24穴プレートに播種し、農薬あるいはrifampicinを0.3-30 μ Mの濃度で培地に添加して48時間培養し

た。細胞を回収後、可溶性画分を調製してそのレポーター（ルシフェラーゼ）活性を測定した。また、一部の農薬については、HepG2細胞にレポータープラスミドを一過性に導入した後、上記と同様の実験を行なった。

CYP3A4誘導におけるPXRの寄与を検討するためには、3-1-10細胞にヒトPXRのsiRNA発現アデノウイルスを感染させ、その3日後に薬物を培地中に添加して上記と同様にレポーター活性を測定した。また、HepG2細胞にヒトPXRのsiRNA発現アデノウイルスおよびCYP3A4レポーター発現アデノウイルスを感染させた後、3日後に薬物を培地中に添加し、さらに2日後に総RNAを調製してCYP3A4 mRNAレベルを定量的逆転写PCR法により測定した。

マウス個体におけるCYP3A4誘導能の評価には、マウスにヒトPXR発現アデノウイルスおよびCYP3A4レポーター発現アデノウイルスを投与し、2日後から薬物を2日間連続経口投与した。最終投与1日後にマウスを屠殺し、肝臓の可溶性画分を調製してレポーター活性を測定した。

【白井】

DENと肝部分切除を応用したラット中期肝発がん試験法を用い、MeIQx (300ppm)と α -naphthoflavone (0.02%)あるいは β -naphthoflavone (0.02%)を単独あるいは複合で6週間投与し、前癌病変の指標であるGST-P陽性細胞巢の単位面積当たりの個数と面積を測定した。さらにCYP1A1/2抗体を用いて免疫染色を行い、画像解析装置を用いてグリソン鞘周囲 (Zone 1)、中心静脈周辺 (Zone 3) および両者の中間であるZone 2におけるCYP1A1/2の陽性領域および染色強度と吸光度で測定し、MeIQx, ANF,

BNFの単独およびそれぞれの複合とした際のZoneごとのCYP1A1/2の発現量の変化を検討し

た。さらにGST-PおよびCYP1A1/2染色の連続切片を作成し、前がん病変であるGST-P陽性細胞巢とGST-P陰性である正常肝組織におけるCYP1A1/2の発現強度の差異も検索した。

(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】

平成18年度は有機リン系および有機塩素系の殺虫剤を組み合わせ、3週齢あるいは5週齢の雄性Wistar Hannover系SPFラットに、時間差を置いて複合的に経口投与し、種々の毒性指標を評価基準にして毒性影響の差異を検索した。

有機塩素剤DDT (*p, p'*-DDT) については連続投与しても臨床症状が生じないと予想される60 mg/kg/dayと、その1/2である30 mg/kg/dayおよび1/4である15 mg/kg/dayの3用量を設定した。各用量のDDTを幼若開始群では3週齢、若齢開始群では5週齢時から14日間連続強制経口投与した後、それぞれ6週間あるいは4週間休業し、10週齢時に最大耐量である200mg/kgのMPPを単回経口投与した。さらに対照として、DDTの溶媒であるコーンオイルと、MPPの乳化基剤である蒸留水を投与する対照群 (Control群)、コーンオイルとMPPを投与するMPP単独投与群 (MPP群)、DDTと蒸留水を投与するDDT単独投与群 (DDT群) の6群を設定した。供試動物数は、各群10匹を使用し、MPP投与後3日目に計画的に屠殺した。

全動物について、少なくとも1日1回、死亡の有無および一般状態について詳細に観察し、試験期間中毎週1回と投与前および計画屠殺前あるいは死亡発見時に体重を測定した。

各実験の計画殺直前に全生存動物を対象に、自発運動量の測定を行い、計画殺動物全例を

対象に、血漿および脳のChE活性を測定した。

生化学あるいは分子生物学的解析を実施するために、サンプルとして血漿、大脳および肝臓の一部を採材し、凍結保存した。

血漿についてはELISA法によりDDT濃度(代謝物DDEを含む)を測定した。肝臓についてはウエスタンブロット法による薬物代謝酵素活性(CYP2B1およびCYP3A2濃度)ならびにTAB法による酸化ストレスマーカー過酸化脂質濃度を測定した。脳については酸化ストレスマーカー過酸化脂質濃度を測定した。

各検査項目について、幼若開始群と若齢開始群間の統計学的有意差の有無を危険率5%および1%レベルで解析した。

自発運動量、体重、コリンエステラーゼ活性、薬物代謝酵素活性および過酸化脂質濃度については、Studentの*t*-検定を用いて平均値の有意差の有無を判定した。

死亡率ならびに一般状態の観察所見の発生頻度については、Fisherの直接確率計算法を用いて解析した。

(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】

NaNO₂とEGCGの複合遺伝毒性：

NaNO₂とEGCGの複合的な効果を検討するため、NaNO₂ (1.25、2.5、5 mg/mL)とEGCG (100 μM)を1時間同時処理した。その結果、% Tail DNA、Tail length、Olive tail momentは同時処理した群で、すべての用量で有意に増加した。また、細胞生存率が高くかつDNA損傷がみられていることからNaNO₂とEGCGの複合処理によりDNA損傷性が誘発されたと考えられた。

突然変異誘発性：

通常の条件下(pH7.4)で行った試験の結果、TA100、大腸菌ともEGCGのみでは復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。陽性対照を除く全ての用量にNaNO₂を5000 μg/プレート加えたが、EGCGの濃度に依存した復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。よって、NaNO₂とEGCGに複合突然変異誘発性はないと判断した。なお、NaNO₂自身には突然変異誘発性が認められた。

pH6.0、pH5.0で行った試験においても同様な結果が得られ、NaNO₂とEGCGに複合突然変異誘発性はないと判断した。なお、これ以上pHを下げると菌に生育阻害がみられるため、実験は不可能であった。

NaNO₂とその他カテキンの複合DNA損傷誘発性：

NaNO₂とECあるいはECGの複合DNA損傷誘発性は認められなかった。

EGC単独100 μMではDNA損傷性は% Tail DNA、Tail length、Olive tail moment全てのパラメーターに溶媒対照群に比べ有意差が認められた。細胞生存率は104%であり、細胞毒性は認められなかった。細胞生存率が高くかつDNA損傷がみられていることからEGC単独にDNA損傷性があると判断した。

NaNO₂ (1.25、2.5、5 mg/mL)とEGC (100 μM)の同時処理では% Tail DNA、Tail length、Olive tail momentともEGC単独に比較して大きく上昇し全ての用量で有意差が認められ、複合DNA損傷誘発性があると判断した。細胞生存率は1.25、2.5、5 mg/mLでそれぞれ73、66、57%であった。

NaNO₂とアスコルビン酸の複合突然変異誘発性：

NaNO₂は、単独でTA100およびWP2uvrA/pKM101の両菌株において、復帰変異コロニー数が用量相関性を持って増加し、明

らかな突然変異誘発性を示した。

アスコルビン酸単独では、TA100の最高用量では溶媒対照値に対して1.5倍の変異コロニー数を示し、WP2uvrA/pKM101でも最高用量では溶媒対照値に対して約1.4倍の変異コロニー数を示した。よって、アスコルビン酸は高濃度で僅かに突然変異を誘発した。

次にNaNO₂ (0~5000 µg/plate) とアスコルビン酸 (5000 µg/plate) を同時処理した。その結果、NaNO₂単独処理に比べて僅かに変異コロニー数が増加した。これら増加量はアスコルビン酸単独処理で誘発される正味変異コロニー数 (溶媒対照群の値を差し引いた数) とほぼ一致した。

NaNO₂とカテコールの複合突然変異誘発性：

カテコール単独では、TA100の250または500 µg/plateで溶媒対照値に対して約1.4または1.3倍の変異コロニー数の増加が認められた。一方、WP2uvrA/pKM101では有意な増加は認められなかった。

NaNO₂ (0~5000 µg/plate) とカテコール (500 µg/plate) を同時処理した。その結果、TA100ではNaNO₂の用量が0~313 µg/plateの場合、NaNO₂単独処理に比べて僅かに変異コロニー数が増加した。一方、WP2uvrA/pKM101ではカテコールと複合させても変異コロニー数の増加は認められなかった。これら増加量はカテコール単独処理で誘発される正味変異コロニー数とほぼ一致した。

pH6.0における複合突然変異誘発性：

NaNO₂単独処理により、pH7.4の場合と比べてTA100では変異コロニーの誘発頻度がやや減少したが、WP2uvrA/pKM101株では明らかに増加した。一方、アスコルビン酸単独処理の結果はpH7.4とpH6.0でほとんど差はなかった。NaNO₂とアスコルビン酸を同時に処理し

た場合、pH7.4の場合と大きく異なり、TA100およびWP2uvrA/pKM101株ともに復帰変異コロニー数が著しく増加した。いずれもNaNO₂が625 µg/plate以上の用量では強い細胞毒性が現れ、コロニー数は減少した。

カテコール単独処理では、pH7.4の場合と同様、TA100では極わずかに変異コロニー数が増加していたが、WP2uvrA/pKM101株ではコロニー数の有意な増加は認められなかった。

NaNO₂と同時に処理した場合、TA100ではNaNO₂単独処理に対してわずかに変異コロニー数が増加したが、WP2uvrA/pKM101株では全く増加は認められなかった。なお、両菌株もNaNO₂の高用量域では細胞毒性が認められた。

【中澤】

実験 1：

本分析条件におけるNO₂Guaの定量限界 (S/N = 10) はそれぞれ3.0 nMで、検出下限値 (S/N = 3) は1.0 nMであった。サロゲート物質を用いた検量線範囲は、3.0 nMから500 nMの範囲で良好な直線性 (相関係数0.999以上) が得られた。また、NO₂Guaの平均保持時間は20.18 (R.S.D. = 1.19, n = 5), ピーク面積のR.S.D. はそれぞれ0.68%であり、良好な感度及び再現性が得られた。DNA試料に25および50 nMのNO₂Gua標準品を添加した際の回収率 (value ± R.S.D.%, n = 5) は99.4 ± 0.53%及び99.8 ± 0.94%であった。これらの結果から、本法は、高感度かつ高精度なNO₂Guaの測定が可能であることを確認した。

*in vitro*実験系においてDNAとONOO⁻を反応させ、DNA中に生成するNO₂Gua及び8-OHdGを本評価法により測定した結果、対照群において、NO₂Guaは検出されなかったが、8-OHdGは10.1 ± 2.15 mol/10⁵ mol dGで検出された。しか

しながら、ONOO⁻の濃度依存的にNO₂Gua及び8-OHdGの生成量は増加し、50及び100 μMのONOO⁻を添加した際にはNO₂Guaは22.9 ± 8.74

及び30.1 ± 5.00 mol/10⁵ mol dG, 8-OHdGは23.7 ± 2.45及び31.5 ± 0.44 mol/10⁵ mol dGとほぼ同程度の生成が認められた。これらの結果から、ONOO⁻によって引き起こされるDNAの損傷を評価するためにはdGのニトロ化物であるNO₂Guaと酸化化物である8-OHdGの2つの修飾塩基を評価する必要があることを確認した。さらに、これら二つの修飾塩基を一つのDNA試料から測定可能な評価法の構築を達成した。

実験 2 :

本分析条件におけるTrp, 2-, 4-及び6-NO₂Trpの定量限界(S/N = 10)はそれぞれ4.0, 3.0, 10及び4.0 nMで、検出下限値(S/N = 3)は1.2, 1.0, 3.5及び1.2 nMであった。また、サロゲート物質を用いた検量線範囲は、全ての物質において定量限界値から1000 nMの範囲で良好な直線性(相関係数0.999以上)が得られた。また、Trp, 2-, 4-及び6-NO₂Trpそれぞれの平均保持時間は7.27 (R.S.D. = 0.49%, n = 5), 9.15 (R.S.D. = 0.39%, n = 5), 14.97分 (R.S.D. = 0.59%, n = 5) 及び12.94 (R.S.D. = 0.34%, n = 5) であった。さらに、ピーク面積のR.S.D.はそれぞれ2.4, 2.0, 1.4及び1.7%であり、良好な感度及び再現性が得られた。マウス肝組織におけるタンパク質の消化液中のブランク値はTrpが85.4 ± 0.2 nMでNO₂Trpは全ての異性体において検出限界以下であった。Trp, 2-, 4-及び6-NO₂Trpそれぞれの標準溶液の添加濃度を低濃度は250, 25, 50及び25 nMとし、高濃度は500, 100, 200及び100 nMとし回収率を算出した結果、すべてにおいて96から103%の範囲であり、良好な回収率が得られた。これらの結果から、Trp, 2-, 4-及び6-NO₂Trpのサロゲート物質を用いた高感度、高精度か

タンパクとONOO⁻の反応によるNO₂Trp異性体生成を確認するため、*in vitro*実験系においてBSAとONOO⁻を反応させ、本法を用いてBSA中に生成するNO₂Trp異性体の測定を行った。NO₂Trp異性体はそれぞれ、BSAのみでは検出されなかったが、ONOO⁻の濃度依存的に生成することを確認した。また、異性体の生成量は6-NO₂Trp, 4-NO₂Trp及び2-NO₂Trpの順であった。NO₂Trpについての報告では、その多くが6-NO₂Trpであり、他の異性体についての報告は少ない。しかしながら、本研究におけるこれらの結果から、RNSによるTrpの修飾を評価するには6-NO₂Trp以外の異性体についても評価する必要があることを明らかにした。

APAPによる肝障害にはROSやRNSが関与していることが知られている。NO₂Trpの*in vivo*試料中での検出例は未だにないが、*in vitro*での実験結果から*in vivo*でも炎症性疾患においてNO₂Tyr同様、NO₂Trp異性体が生成していると考えられる。そこで、*in vivo*におけるNO₂Trp生成と、本法の*in vivo*試料測定への適用性を確認するため、APAPを投与したマウス肝組織におけるタンパク質中NO₂Trpの測定を行った。対照群においては、NO₂Trp異性体は全て検出限界以下であったが、APAP投与後8時間では4-及び6-NO₂Trpを検出した。2-NO₂Trpは全ての試料において検出限界以下であったが、4-及び6-NO₂TrpはAPAP投与群においてそれぞれ9.03-12.60及び26.9-32.7 μmol/mol of Trpの範囲で検出された。さらに、6-NO₂TrpはAPAP投与後8時間群において全ての試料から検出された。このことから、本法は*in vivo*試料中のNO₂Trpの測定に適用可能で

あることを確認した。

【広瀬】

食道発がんプロモーション試験の最終的な生存率は対照群、AsA単独、NaNO₂単独及び併用投与群でそれぞれ46、54、63及び67%であった。食道の病理組織学検索では、主に食道下部にびらん/潰瘍、扁平上皮過形成、角化亢進、粘膜下織への細胞浸潤等の変化がみられたが、複合投与により扁平上皮過形成の範囲が食道の上及び中部へと拡大し、過形成の重篤度も有意に増加した。さらに、複合投与群では、食道下部の乳頭腫の発生率や発生個数が有意に増加した。

遺伝毒性試験において、大腸菌WP2 uvrA/pKM101株ではAsAとNaNO₂の複合による明らかな復帰株数の増加は認められなかったが、そのmutM欠損株では複合によりAsA濃度依存的に復帰株数の増加がみられた。S9mixを含まない条件では、2500及び5000 µg/plateで濃度依存的に復帰株数の増加がみられ、5000 µg/plateではAsAを含まない対照値の約3倍となった。AsA濃度をさらに上げると、致死作用が強くなりむしろ復帰株数は減少した。S9mixを含む条件では、より高濃度のAsAを加えた場合に復帰株数の増加がみられ、10000 µg/plateではAsAを含まない対照値の約3倍になった。

前胃発がんイニシエーション試験において、イニシエーション期間終了後の途中解剖では、複合投与群の全例に前胃の扁平上皮過形成がみられ、複合投与による影響が確認された。BHAによるプロモーション処置後、全群の前胃に扁平上皮過形成が認められ、MNNGを投与した陽性対照群ではほぼすべての動物に乳頭腫及び扁平上皮癌の発生が認められた。一方、複合投与群では1例に扁平上皮癌がみられるの

みであり、複合投与のイニシエーション作用は認められなかった。

【川西】

CYP前処理を行ったカプサイシンのDNA損傷性について、各種CYPで比較した結果、Cu(II)存在下において、CYP1A2で処理したカプサイシンが最も強くDNAを損傷し、次いでCYP2D6、CYP2C9においてもDNA損傷が認められた。この損傷はピペリジン処理により増強された。DNA損傷の活性種を推定するために各種ラジカルスカベンジャーを用いて実験を行った結果、DNA損傷は、カタラーゼ及びCu(I)キレート剤であるバソキュプロリンによって抑制された。また、フリーOHラジカルスカベンジャーではDNA損傷の抑制は認められなかったが、フリーOHラジカルに加え、金属酸素錯体も消去可能なメチオナルでは抑制された。SODではDNA損傷への抑制効果は認められなかった。DNA損傷の塩基配列特異性についてはピペリジン処理ではチミンおよびシトシン、8-oxodG除去修復酵素であるFpg処理ではグアニンが強く損傷された。ヒトがん抑制遺伝子*p16*の5'-TG-3'および5'-GC-3'配列において連続二塩基損傷がみられた。また、ヒトがん抑制遺伝子*p53*のhotspotのひとつであるコドン273の相補対である5'-ACG-3'配列において、シトシンおよびグアニンの連続した二塩基が強く損傷された。牛胸腺DNAを用いて酸化的DNA損傷の指標である8-oxodGの生成量を測定した。Cu(II)存在下において、CYP1A2の前処置により、カプサイシンは濃度依存的に8-oxodGの生成量を増加させた。一方、熱処理により不活化したCYP1A2の前処置では8-oxodGの有意な生成は認められなかった。また、NADPH-cytochrome P450 reductaseによる前処理においてもカプサイシンによる8-oxodGの生成はみられなかった。

【中江】

中期肝発がん試験では、肝前がん病変であるGST-P陽性細胞巢の発生個数は、DEN処置のグルコン酸銅6000 ppm群及び併用群で有意に増加した。また、GST-P陽性単細胞数は、DEN処置及び無処置のグルコン酸銅6000ppm群及びそのカテキン併用群で有意に増加した。

肝臓の8-OHdG・PCNA・TUNEL陽性細胞数は、DEN処置及び無処置のグルコン酸銅6000ppm群及びそのカテキン併用群で有意に増加した。

中期肝発がん性試験及び2週間反復投与試験の肝臓を用いて RT-PCRによる遺伝子発現解析を行った結果、アポトーシス関連遺伝子であるTNF α ・p21・p53の発現は、それぞれ変動が認められた。TNF α 発現は、中期肝発がん性試験のグルコン酸銅・カテキン併用群及びDEN無処置群のグルコン酸銅6000 ppmで増強した。p21発現は、中期肝発がん性試験のグルコン酸銅・カテキン併用群及びDEN無処置群のグルコン酸銅6000 ppmで増強し、2週間反復投与試験でもグルコン酸銅6000 ppm群・カテキン群・グルコン酸銅・カテキン併用群において増強した。

【山添】

農薬のCYP3A4誘導能の評価：3-1-10細胞株を用いて、20種の農薬のCYP3A4レポーター遺伝子の転写活性化能を測定したところ、特にpyributicarbは1 μ M以下の濃度で、強力なCYP3A4誘導物質であるrifampicinよりも強い誘導能を示した。この誘導能はHepG2細胞を用いた一過性発現系のレポーターアッセイによっても確認された。また、HepG2細胞におけるCYP3A4 mRNAレベルは、3 μ M pyributicarb、10 μ M isoxathion および 10 μ M *o*-ethyl *o*-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate

(EPN) 処理により、10 μ M rifampicin処理と同程度まで増加した。

CYP3A4誘導におけるPXRの寄与：CYP3A分子種の誘導にはPXRをはじめとする核内受容体が中心的な役割を果たしている。そこで、ヒトPXRのsiRNAを発現するアデノウイルスを用いて、pyributicarb、isoxathionおよびEPNによるCYP3A4誘導におけるPXRの関与を解析した結果、いずれの農薬においてもPXR発現量の抑制の程度に応じてCYP3A4レポーター活性が低下した。さらに、HepG2細胞における農薬添加に伴うCYP3A4 mRNAレベルの増加は、ヒトPXRのsiRNA発現アデノウイルスの感染によりほぼ消失した。以上の結果より、これら農薬によるCYP3A4の誘導はPXRを介していることが示唆された。

マウス個体におけるCYP3A4誘導能の評価：培養細胞ではCYPなどの薬物代謝酵素の発現レベルが著しく低いいため、培養細胞において誘導能を示した化合物でもin vivoにおいては代謝を受けて不活性化され誘導能を示さない可能性がある。そこで、マウスにCYP3A4レポーターを発現するアデノウイルスをマウスに接種し、in vivoレポーターアッセイを行なった。なお、CYPと同様にPXRのリガンド選択性には著しい種差が認められるため、本実験ではヒトPXR発現アデノウイルスを同時に接種した。その結果、ヒトPXR非発現時には、pyributicarb投与によるCYP3A4レポーター活性の上昇は認められなかったが、ヒトPXRを発現させた場合には約4倍のレポーター活性の上昇が認められた。この結果は、pyributicarbはマウスPXRをほとんど活性化せずヒトPXRを選択的に活性化することを示唆している。また、本in vivoレポーターアッセイを用いることで、そのようなヒトPXR選択的なCYP3A4誘導物質の検出も可能となることを示してい

る。

【白井】

肝全体のCYP1A1/2の発現強度は、MeIQx単独投与群に比較して、ANFおよびBNFの単独投与群およびMeIQxとの複合投与群のいずれにも発現強度が上昇しており、western blottingの結果と相関していた。CYPの発現強度は、MeIQx単独投与群では、Zone3優位、ANF、BNF単独投与群では、Zone1優位であった。Zone1におけるCYPの発現強度は、MeIQxとANFおよびBNFとの複合投与群で、MeIQx単独投与と比較して発現強度は有意に上昇した。またZone3におけるCYPの発現強度は、MeIQx単独投与群と比較して、ANF、BNFとの複合投与によっても発現強度の上昇はみられなかったが、CYP1A1/2のZone 3における発現強度と前癌病変の発生は、良い相関が見られた。いずれの群でもGST-P陽性細胞巢におけるCYP1A1/2の発現強度は陰性部位に比べて低下していた。

【原田】

若齢開始群のDDT 60mg/kg群で、10例中1例に死亡が認められたが、幼若開始群のDDT 60 mg/kg群では死亡率が50%に増加した。その他、若齢開始群のDDT30mg/kg群および幼若開始群のMPP単独投与群で、それぞれ10例中1例の死亡が認められた。幼若期および若齢期のDDT14日間連続投与期間およびそれに続く休薬期間では、臨床症状に異常は認められなかった。

単独、複合を問わずMPP 200mg/kg投与群全例に鎮静、攣縮、振戦、縮瞳などの症状が認められたが、これらの症状は若齢開始群よりも幼若開始群で発現が速やかで、発現頻度も高かった。

MPP投与後72時間の自発運動量は、幼若開始群、若齢開始群ともDDTとMPPを複合投与群し

た全ての群で自発運動量の減少が認められたが、特にDDT 15mg/kg投与群において幼若開始群と若齢開始群の間に有意な差が認められ、幼若開始群の行動抑制がより顕著であった。

MPP投与後72時間のChE活性は、幼若開始群、若齢開始群ともに、血漿、脳とも全例で低下した。また、抑制の割合は、血漿、脳ともDDTの用量に相関して低下する傾向にあった。血漿ChE活性は、DDT 15 および 30mg/kg投与群で、幼若開始群でやや強めに抑制が生じた。MPPの神経系への影響を示す脳のChE活性は、若齢開始群よりも幼若開始群で抑制率がやや高かったが、その差は僅かだった。

血漿中のDDT (代謝物DDEを含む) は、幼若開始群ではDDT投与全群の血漿中に検出されたのに対して、若齢開始群の15mg/kg群では検出限界以下であった。半数が死亡した幼若開始群のDDT 60 mg/kg群では、DDTが高いレベルで検出されたが、生体機能への影響が全く認められなかったDDT単独投与群よりもDDT濃度は低値を示した。

肝薬物代謝酵素は、DDT単独投与群 (60mg/kg) では、CYP2B1およびCYP3A2の誘導がみられ、幼若よりも若齢開始群においてより顕著であった。これに対しMPP単独投与群ではCYP2B1およびCYP3A2ともに無処置対照群に比べ低値を示した。一方、DDTとMPPの複合投与群では、若齢開始群においてCYP2B1はDDTの用量に応じて増加したが、CYP3A2はDDTの高用量群 (60 mg/kg) においてのみ増加がみられ、その他の用量群ではむしろ減少傾向を示した。幼若開始複合投与群では、CYP2B1およびCYP3A2ともに増加はみられず、無処置対照群に比べ同じか、むしろ低値を示す傾向にあった。

酸化ストレスマーカーである過酸化脂質濃度は、肝臓では複合曝露によってのみ増加した。その増加量は、若例開始群より幼若開始

群で高く、幼若開始群ではDDT 15mg/kg以上の用量で、若齢開始群では30 mg/kg以上の用量からそれぞれ変化が認められた。一方、脳において酸化ストレス反応は認められなかった。

D. 考察

【松元】

昨年度の結果、NaNO₂とEGCGは単独ではDNA損傷性がなかったが、複合処理するとDNA損傷の誘発が示唆されていた。今年度は高濃度EGCGが原因と考えられる細胞毒性由来のDNA損傷の影響を回避するため、EGCGの濃度を100 μMに下げ、NaNO₂と同時処理を行ったところ、細胞生存率が高い用量（70%以上）においてもDNA損傷が認められたことから、NaNO₂との複合作用により新たなDNA損傷が引き起こされた。NaNO₂とEGCGの複合処理によりDNA損傷性が認められたため、Amesテストを用いて突然変異誘発性について検索した。その結果、通常pH7.4条件下ではNaNO₂とEGCGの複合突然変異誘発性は認められなかった。ラットにおけるNaNO₂と抗酸化剤の反応は前胃で起こっているため、低いpHが反応に影響している可能性がある。そこで緩衝液のpHを6.0および5.0に下げて実験を行ってみたが、複合突然変異誘発性は認められなかった。一方、NaNO₂は酸性条件下になると、単独で急激に突然変異誘発性が強まることが確認された。本研究で使用した大腸菌WP2uvrA/pKM101は過酸化水素などによる酸化的損傷も検出できる試験菌株である。しかし、活性酸素を著しく生成することが知られているパラコートは突然変異誘発性は検出できない。NaNO₂とEGCGの複合によって生じる酸化的損傷がパラコートと同タイプであるためにWP2uvrA/pKM101で検出

できない可能性も否定できない。

NaNO₂とその他カテキンの複合DNA損傷誘発性では、EGCに強い複合DNA損傷誘発性が認められたが、ECとECGには複合DNA損傷誘発性は認められなかった。EGCに複合DNA損傷誘発性が認められた原因は二つ考えられる。一つはNaNO₂の突然変異誘発性とEGCのDNA損傷誘発性の複合作用によるものである。昨年度の研究により、中性領域でのNaNO₂のDNA損傷は検出されていない。また3時間処理を行った染色体異常試験においても染色体異常誘発性は認められていない。しかし、24時間もしくは48時間処理を行うと染色体異常が誘発している。また、*in vivo*小核試験でも陽性を示す。さらに、NaNO₂はAmesテストで陽性であった。したがって、NaNO₂は弱いイニシエーション作用を持ち合わせていると考えられる。一方、コメットアッセイの結果からEGCはDNA損傷誘発性が認められた。したがって、遺伝毒性作用の違う二つの被験物質の複合処理によりDNA損傷が増強したと考えられる。他の原因として、ヒドロキシラジカルの関与が考えられる。フェノール系抗酸化剤であるカテコールは酸性条件下でNaNO₂と共存した場合、NaNO₂から生じる一酸化窒素(NO)によってヒドロキシラジカルが発生する。NaNO₂と抗酸化剤EGCの同時処理の場合もこれと同様に、中性条件下ではあるが、NaNO₂とEGCから産生されたNOがEGCとさらに反応し、ヒドロキシラジカルが産生されDNA損傷を強く誘発したと考えられる。また、EGCは他の3種のカテキン類に比べ、ヒドロキシラジカル除去能が格段に低い。よって、生成したヒドロキシラジカルをEGCは十分に消去できないためDNA損傷を引き起こしたと説明できる。一方、ECやECGはヒドロキシラジカル除去能が高いため、DNA損

傷を引き起こさなかったと考えられる。

本研究では NaNO_2 処理濃度を72 mM (5 mg/mL) から18 mM (1.25 mg/mL) に設定した。しかし、人は平均して亜硝酸を唾液から1日約10 mg、食品から約1.5 mg摂取しており、胃内の亜硝酸濃度は50 μM 以下と言われている。このような低濃度で長期間処理を行った場合についての研究は確認されていない。今後の研究課題である。

一方、市販緑茶飲料水中のカテキン濃度は緑茶の種類や、抽出条件、製造過程で異なるが、例えば梅垣らのデータを参考にすると4種類の市販緑茶の平均でEGCGは87 $\mu\text{g/mL}$ 程度含まれており、EGCは63 $\mu\text{g/mL}$ 程度含まれている計算になる。したがって、本実験で設定したEGCG 100 μM = 45.8 $\mu\text{g/mL}$ 、EGC 100 μM = 36.3 $\mu\text{g/mL}$ という条件は充分におこりうる。

NaNO_2 の突然変異誘発性は中性条件下ではアスコルビン酸と共存することによってわずかに増加した。この複合突然変異誘発性は相加的であると考えられる。それに対して、緩衝液のpHをやや酸性にすると、複合突然変異誘発のレベルが飛躍的に増大した。亜硝酸は酸性条件下でNOを生成することから、このNOが引き金となって細胞DNAに酸化損傷を引き起こしている可能性が高い。

アスコルビン酸の場合と異なり、 NaNO_2 とカテコールでは弱酸性条件下でも複合突然変異は誘発されなかった。本研究班によって NaNO_2 とカテコールの複合により、酸化損傷の誘引を示すデータが示されているが、それを支持する結果にはならなかった。ただ、今回用いた菌株では検出できない酸化損傷である可能性も残っているため、異なる菌株を用いて検証を実施する必要がある。

【中澤】

実験 1

CS-LC-ESI-MSによる NO_2Gua の測定では、グリオキサル誘導体化により NO_2Gua 極性を低下させ、CSシステムを採用することで、オンラインでの試料の精製および濃縮を可能にした。さらに、安定同位体をサロゲート物質として用いることで、高精度な測定法の構築を達成した。その測定感度は検出限界が1.0 nM、定量限界が3.0 nMと良好な結果が得られた。また、すでにDNA中8-OHdGの測定で広く用いられているDNA消化法を採用し、LC-UV-ECDによるdGおよび8-OHdGの測定法を併用することで、一つのDNA試料から、酸化およびニトロ化の二つの修飾塩基の評価を可能にした。

本法をONOO \cdot を反応させた仔牛胸腺DNAの分析へ適用した結果、ONOO \cdot を添加していない対照群では8-OHdGのみが検出され、 NO_2Gua は検出されなかったが、高濃度のONOO \cdot では、8-OHdGと NO_2Gua がほぼ同程度で生成することを明らかにした。これらのことから、ONOO \cdot を始めとするRNSによるDNAの損傷を評価するには NO_2Gua だけでなく8-OHdGも評価する必要がある、これらの修飾塩基の評価はRNSが関連する傷害や発がん機構の解明に極めて有用である。

実験 2

生体内におけるRNSによって引き起こされるTrpのニトロ化を明らかにすることを目的として、タンパク質中に生成する NO_2Trp 異性体の高感度分析法を構築した。Trpのニトロ化は種々の異性体を生成することから、2-, 4-及び6- NO_2Trp を測定対象物質とし、 NO_2Trp の分析用標準品及びサロゲート物質として用いる ^{15}N でラベル化された安定同位体の合成を行った。LC-ESI-MS/MSによる測定法は高感度か

つ高精度であり、*in vivo*試料へも十分に適用可能な測定法を構築した。本法をAPAP投与後のマウス肝組織におけるタンパク質中のNO₂Trp測定に適用した結果、4-及び6-NO₂Trpの検出に成功した。このことはRNSによるTrpの修飾を評価するには、6-NO₂Trpだけでなく他の異性体についても測定する必要性を示している。さらに、APAPの投与によってNO₂Tyrだけでなく、NO₂Trp異性体も生成することを初めて明らかにしたことから、すでにNO₂Tyrの生成が知られている他の疾病においてもNO₂Trpが生成し、RNSによって引き起こされる様々な障害に関与している可能性が考えられた。また、前処理方法を含め、本法は高感度かつ高精度な測定が可能であることから、他の組織や酵素中の測定にも十分に適用可能であり、RNSに関連した傷害や発がん等の機構解明に極めて有用である。

【広瀬】

NaNO₂とAsAの複合投与は、慢性の胃液逆流型食道炎モデルラットの食道に広範囲な扁平上皮過形成を引き起こした。さらに、DHPNのイニシエーション後に投与することにより、腫瘍の発生も増加させた。これらの結果から、これら2剤の複合投与は前胃だけでなく、逆流性食道炎下の食道に対しても発がん促進作用を有することが明らかとなった。これまで亜硝酸と酸化防止剤の複合による発がんはヒトに存在しない前胃に限られ、その発がんリスクはヒトに外挿しにく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態下では複合暴露が食道発がんのリスク要因となる可能性が示唆された。既に、ヒトの逆流性食道炎における腺癌の発生に、炎症細胞由来のNOの関与を示唆する報告がある。従って、これらの内因性のNOと同様に、複合暴露によ

り発生したNOが食道発がんに関与している可能性も否定できない。

*in vitro*遺伝毒性試験では、mutM欠損株においてNaNO₂との複合によりAsA濃度依存的に復帰株数の増加がみられ、AsAを含まない対照値と比べて約3倍の高値を示した。mutM遺伝子は*E. coli*における哺乳類Ogg1遺伝子のcounterpartであり、酸化塩基8-OHdGの除去修復に関与している。mutM欠損株でより明確に複合遺伝毒性効果が現れたことから、亜硝酸とAsAの複合により大腸菌DNA中に8-OHdGが形成され、突然変異が誘発されたと考えられた。この結果は、これまでに明らかにされている2剤複合投与されたラット前胃粘膜における8-OHdG増加と一致する。しかし、ラットにAsAとNaNO₂を12週間複合投与したのち既知のプロモーターを投与する2段階発がんモデルでは、前胃の腫瘍性病変の発生数増加はみられず、複合投与のイニシエーション活性は検出できなかった。従って、2剤の複合は酸化的DNA損傷を介した遺伝毒性を有するものの、*in vivo*の発がんイニシエーション作用は小さいと考えられた。これまでに得られた結果から、AsAと亜硝酸の複合の発がん機構は、亜硝酸由来のNO及び酸化的ストレスによる細胞傷害と引き続いて起こる増殖亢進によるプロモーション作用が主であると考えられた。

【川西】

カプサイシンによる酸化的DNA損傷には、代謝活性化が必要であることが明らかになった。各種CYP中では、CYP1A2による代謝活性化が最も有効であった。次いでCYP2D6、CYP2C9であった。この損傷はペペリジン処理により増強されたことから、DNA鎖の切断とともに塩基の損傷が示唆された。カプサイシン代謝物によるCu(II)存在下におけるDNA損傷は、カタラー

ぜ及びCu (I) キレート剤であるバソキuproインによって抑制されたことから、過酸化水素とCu (I) の関与が示された。一方、フリーOHラジカールスカベンジャーではDNA損傷は抑制されず、メチオナルにより抑制されたため、活性種は過酸化水素とCu (I) から生成される金属-酸素錯体 (Cu (I) OOH) が関与していることが示唆された。がん抑制遺伝子*p16*および*p53*において連続二塩基損傷が検出された。連続二塩基損傷は修復されづらいことが報告されていることから、カプサイシン代謝物による連続二塩基損傷は変異を起こしやすいと考えられる。またの*p53*のhotspotコドン273の相補対での連続二塩基損傷はhotspot形成の機構を考察する上でも興味深い。

以上の結果から、カプサイシンはCYPにより脱メチル化代謝を受け、その代謝物 (demethyl capsaicin) が自動酸化する過程で・OHに類似した活性酸素種 (Cu (I) OOH) を生成し、酸化的にDNAを損傷することが示唆された。従って、カプサイシンの発がん性の可能性が示されていることやカプサイシン代謝物が酸化的DNA損傷を起こすことから、カプサイシンの発がん性についてさらなる研究が必要である。

【中江】

中期肝発がん性試験においては、グルコン酸銅 10ppm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14mg/day/ヒトであり、許容上限摂取量 (UL) 9mg/dayより若干多い程度に相当する。一方、カテキン 5000ppm群のカテキン摂取量は、約20g/day/ヒトであり、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 (濃度0.1~0.2%) の約20-40倍、濃度換算では2.5~5倍に相当する。

中期肝発がん性試験で、肝前がん病変であるGST-P陽性細胞巢の発生個数は、DEN処置のグルコン酸銅6000ppm群及びそのカテキン併用群で有意に増加した。一方、グルコン酸銅10, 300ppm群及びカテキン単独群では、GST-P陽性細胞巢の発生個数に変化がなかった。これらのことから、グルコン酸銅は、ヒトが摂取すること考えられる用量では影響を示さないが、それよりも明らかに高い用量を与えた場合、肝臓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が示唆された。また昨年度実施の中期多臓器発がん試験では、グルコン酸銅300ppmでもGST-P陽性細胞巢の発生個数を有意に増加させたが、この用量での発がん促進作用が弱いため、比較的長期間の投与によってはじめて検出できるものと推察された。一方、カテキンは、昨年度実施の中期多臓器発がん試験と同様に単独でリスクを示さなかったが、同試験でみられたグルコン酸銅の肝発がん性に対する抑制作用は、中期肝発がん性試験では明らかでなかった。この差は、同様に、実験期間の差に基くものである可能性が高いものと推察された。

中期肝発がん性試験における肝臓の8-OHdG・PCNA・TUNEL染色の結果から、グルコン酸銅の高用量での発がん機序には、生体内に過剰に存在する銅による酸化ストレスの誘導と、それに基く細胞増殖活性亢進・アポトーシス誘発が関与するものと示唆された。

遺伝子発現解析の結果では、中期肝発がん性試験及び2週間反復投与試験双方の肝臓において、酸化的ストレス、細胞増殖活性、アポトーシス関連遺伝子等の発現が変動した。変動したほとんどの遺伝子は、グルコン酸銅6000ppm及びグルコン酸銅・カテキン併用群で発現が増強したことから、グルコン酸銅による作用が概ね6000ppmの用量で発現することが