

推察された。また一部の遺伝子の発現変動は、グルコン酸銅による毒性作用あるいは増殖性病変誘発促進作用の背景機構に関与するものと考えられた。

以上のことから、グルコン酸銅は、高用量で肝発がんリスクを有するが、低用量でそのリスクを有しないことが示された。グルコン酸銅の高用量での肝発がん機序には、酸化ストレスの増加に基く、細胞増殖活性亢進と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、単独でリスクを示さず、グルコン酸銅との併用投与で、銅代謝遺伝子の発現増強を亢進したが、中期肝発がん性試験の条件下で明瞭な発がん修飾作用を示さなかった。

#### 【山添】

本研究により、*CYP3A4*レポーター安定発現培養細胞を用いた*in vitro*レポーターアッセイとマウス個体を用いた*in vivo*レポーターアッセイを組み合わせることで、ヒト*CYP3A4*誘導性を示す化合物のスクリーニングシステムを確立することができた。また、このシステムにPXRの*siRNA*発現アデノウイルスを応用することで、これら化学物質による*CYP3A4*誘導におけるPXRの寄与の解析も可能であることが示唆された。近年、PXRは*CYP3A4*だけではなく、*CYP2A*や*CYP2B*、*CYP2C*サブファミリーの他の*CYP*分子種の発現調節にも関わっていることが示されており、本研究で同定されたPXR活性化作用を有する農薬はヒトにおいて複数の*CYP*分子種を誘導する可能性が考えられる。

*CYP3A4*誘導の評価に加えて、我々は既に、*CYP1A1*および*CYP1A2*遺伝子の転写活性化能を同時に評価可能なシステムを構築している。これまで、*CYP1A1/1A2*遺伝子の化学物質による発現亢進にはaryl hydrocarbon receptor (Ah

R) が中心的に働いていると考えられてきたが、我々は本評価システムを用いて、ある種の化学物質は核内受容体constitutive androstan e receptor (CAR) を介して*CYP1A2*遺伝子を転写活性化することを示唆する結果を得ている。したがって、今後は各種農薬による*CYP1A*分子種の誘導能についてスクリーニングを行い、その誘導におけるAhRやCARの寄与についても解析を進める必要がある。

#### 【白井】

代謝活性化酵素の誘導あるいは阻害を介してヘテロサイクリックアミンによる発がん性修飾作用を検討したが、発がん物質の第1相代謝酵素である*CYP1A1/2*の肝における変動と発がん修飾作用の結果は関連しなかった。化学物質の代謝には肝臓の領域特異性が存在し、発がん物質の代謝活性化も領域によって異なる可能性が示唆されるため、免疫染色による酵素発現の部位特異性と腫瘍発生との関連性を領域ごとに検索したところ、発がん物質により*CYP1A1/2*の発現部位および強度は異なることが示された。このように本研究の成果は、発がん性に関与する発がん物質の代謝活性化機構は単純なものではないことを示唆しており、今後、発がん物質の活性化機構の部位特異性とその発がん機構との関連について追究する必要がある。

#### 【原田】

有機リン系、カーバメート系および有機塩素系の3種類の殺虫剤を組み合わせ、平成16年度は成熟ラット、平成17年度は幼若ラットを用い複合的に単回経口投与し、さらに若齢期に塩素剤DDTを反復経口投与したラットに対し成熟期にリン剤MPPを単回経口投与し、時間差を置いた複合曝露影響について検討した。その結果、若齢期における臨床症状を発現しない用量のDDT曝露が、成熟後のMPP曝露によ

り毒性発現を変化させることが判明した。そこで、平成18年度は離乳直後（3週齢）の幼若動物に14日間DDTを反復投与した群と若齢時（5週齢）に14日DDTを反復投与した群を設け、DDT曝露開始時期による成熟後（10週齢）のMPP単回投与における毒性発現の違いを比較検討した。

その結果、MPP投与群全てに典型的な有機リン剤による神経症状が認められ、血漿および脳のChE活性低下が確認された。また、肝薬物代謝酵素に関してはMPP投与によりCYP2B1、CYP3A2がともに減少傾向を示した。一方、幼若期あるいは若齢期においてDDTを14日間反復投与のみを行ったDDT単独投与群では、臨床症状に異常は認められなかったが、肝薬物代謝酵素のCYP2B1およびCYP3A2の誘導が認められた。

DDTとMPPの複合曝露では、神経症状、自発運動量および体重増加抑制のいずれも若齢開始群より幼若開始群で、より顕著であったことから、生体機能への影響はDDTに曝露される時期が早くなるほど重篤になると推察された。

血中および脳のChE活性は、DDTの投与量に相関して低下する傾向にあった。特にMPPの神経系への影響を示す脳のChE活性は、若齢開始群より幼若開始群でやや低下したが、その差は僅かであり、生体機能への影響の違いがChE活性阻害の程度に起因する可能性は低いと考えられた。

血中のDDT濃度は、幼若開始群においてより高濃度で検出されたが、生体機能への影響が全く認められなかったDDT 60mg/kg単独投与群との比較ではより低値を示した。このことは、複合曝露による生体機能への影響は、DDTの毒性の再発現ではなく、幼若期のDDT曝露が、成熟後におけるMPPの毒性を修飾したことを示すものと考えられた。

DDTとMPPの複合投与群における肝薬物代謝酵素誘導に関しては、DDT投与の若齢開始群ではCYP2B1はDDTの用量に依存して増加したが、CYP3A2はDDTの高用量群（60mg/kg/day）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。一方、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。これらの結果から、DDTに関連した肝薬物代謝酵素（CYP2B1/CYP3A2）の誘導は、MPP投与により抑制される可能性が示唆された。また、幼若開始群と若齢開始群では反応が明らかに異なることから、幼年期における代謝系の反応は曝露時期により大きく異なる可能性が推察された。

過酸化脂質濃度は、肝臓では幼若開始群で顕著に増加し、各用量群における過酸化脂質濃度と生体機能への影響は良く一致していた。

今回の実験において、若齢である5週齢でDDTの投与を開始した場合にも成熟後のMPP投与の毒性は強く現れたが、離乳直後の3週齢からDDTの投与を開始するとMPPの毒性はより増強された。このことから、幼年期におけるDDT曝露時期によって、成熟後のMPP投与の毒性影響が変化することが明らかとなり、その違いは代謝能力が未熟な時期の曝露によるDDT蓄積量の違い、あるいは幼若動物の肝臓機能が潜在的な障害を受けることによって、成熟後の酸化ストレス除去能力が減弱することによって起因する可能性が高いと考えられた。しかしながら、脳神経系に対する直接的な障害に起因する可能性も考えられるため、幼若期のDDT曝露が成熟後のMPP曝露による毒性増強メカニズムの解明にはさらなる検討を要する。

## E 結論

①チャイニーズハムスター培養細胞において、茶カテキンの主要成分であるEGCGとNaNO<sub>2</sub>の間には、明らかな複合的DNA損傷誘発性が認められた。また同じく茶カテキンの一種であるEGCもNaNO<sub>2</sub>との複合的なDNA損傷誘発性が認められた。しかしEGCGとNaNO<sub>2</sub>の間には複合的な突然変異誘発作用は認められなかった。NaNO<sub>2</sub>とアスコルビン酸は弱酸性条件下で相乗的な複合突然変異誘発性を示した。一方、NaNO<sub>2</sub>とカテコールは弱酸性条件下でも複合的な効果は認められなかった。

②生体内において生成したRNSによって引き起こされるDNAおよびタンパク質のニトロ化の評価法を確立した。近年、生体内におけるRNSによる酸化ストレスが注目されており、RNSの過剰な生成は結果としてDNAの酸化損傷や脂質の過酸化を引き起こすことが知られている。これらのことから、生体内におけるRNSの生成量を測定することは、RNSと疾患との関係を明らかにするのに極めて重要である。本年度において構築したニトログアニンおよびニトロトリプトファンの高精度な測定法は未だ報告されておらず、RNSによって引き起こされる新たな障害の機構解明に極めて有用な手段になると考えられる。今後、これらの測定法を用いて、RNSと種々の疾患の関係についてもさらに研究を進めていく必要がある。

③AsAとNaNO<sub>2</sub>の複合投与は、逆流性食道炎モデルラットの食道に対して発がんプロモーション作用を有することが明らかとなった。したがって、特に逆流性食道炎の患者においては抗酸化剤とNaNO<sub>2</sub>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示唆された。一方、AsAとNaNO<sub>2</sub>の複合は、酸化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。

④抗酸化作用や抗がん作用、抗炎症作用を持ち、健康増進作用が期待される唐辛子成分と金属との複合作用で酸化的に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づき肝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。一方、カテキンは、中期肝発がん性試験の条件下で、単独投与で増殖性病変誘発になんらの影響も与えず、併用投与によってグルコン酸銅の肝発がん性に明瞭な抑制効果を示さないことが、明らかとなった。

⑥CYP3A4レポーター安定発現培養細胞を用いたin vitroレポーターアッセイとマウス個体を用いたin vivoレポーターアッセイを使用する、ヒトCYP3A4誘導性を示す化合物のスクリーニングシステムを確立した。

⑦発がん物質の第1相代謝酵素であるCYP1A1/2は、発がん物質によってその発現部位および強度が異なることが示された。今後、発がん物質の活性化機構の部位特異性とその発癌機構との関連について追究する必要がある。

⑧今回の、幼若あるいは若齢期にDDTを反復経口投与したラットに対し成熟期にMPPを単回経口投与した実験では、幼年期において毒性症状が認められない程度のDDTに短期連続曝露されてから休薬し、ある程度の期間を経過した後でも、有機リン剤であるMPPに大量曝露された場合にはその毒性を増悪させ、その程度はDDTに曝露される時期によって異なる可能性が示唆された。結論として、幼年期に塩素剤を曝露された動物が成熟後にリン剤に曝露され

た場合、若齢期よりも離乳直後から塩素剤に曝露された方がリン剤の毒性効果がより増強された。よって、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複合曝露の影響を受け易いと考えられた。今回のDDTの曝露量は、ヒトにおける無毒性量 (0.06mg/kg) の250~1000倍、経口投与による推定最小中毒量 (2.5mg/kg) の6~24倍という高用量曝露での実験結果であり、実際の生活環境下での危険性を直接示すものではない。しかしながら、有機塩素剤の反復曝露経歴がある場合には、有機リン剤の曝露による症状が発現し易くなる可能性があり、時間差を置いた複合曝露についても留意する必要性が確認された。

#### 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.: 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.
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.*, 41: 1325-1331, 2006.
3. Ishii Y., Ogara A., Okamura T., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.: Development of quantitative analysis of 8-nitroguanine concomitant with 8-hydroxydeoxyguanosine formation by liquid chromatography with mass spectrometry and glyoxal derivatization, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43: 1737-1747, 2007.
4. Ishii Y., Ogara A., Katsumata T., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.: Quantification of nitrated tryptophan in proteins and tissues by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44: 150-159, 2007.
5. Kuroiwa Y., Ishii Y., Umemura T., Kanki K., Mitsumori, K., Nishikawa A., Nakazawa H., Hirose M. Combined treatment with green tea catechins and sodium nitrite selectively promotes rat forestomach carcinogenesis after initiation with *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*'-nitrosoguanidine. *Cancer Sci.*, 98:949-957; 2007.
6. 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.
7. 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.
  8. 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.
  9. Fujita N., Horiike S., Sugimoto R., Tanaka H., Iwasa M., Kobayashi Y., Hasegawa K., Ma N., Kawanishi S., Adachi Y., Kaito M. Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. *Free Radic. Biol. Med.*, 42 (3) :353-362, 2007.
  10. Oikawa S., Nagao E., Sakano K., Kawanishi S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by capsaicin, a principal ingredient of hot chili pepper. *Free Radic. Res.*, 40 (9) :966-973, 2006.
  11. Kawanishi S., Murata M. Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress. *Toxicology*, 221 (2-3) :172-178, 2006.
  12. 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.
  13. Matsubara T, Noracharttiyapot W, Toriyabe T, Yoshinari K, Nagata K, and Yamazoe Y. Assessment of human pregnane X receptor-involvement in pesticide-mediated activation of CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos.*, 35:728-733, 2007.
- (2) 学会発表
1. 和田邦生ら、NaNO<sub>2</sub>と主要な茶カテキン、エピガロカテキンガレートの *in vitro* 相乗遺伝毒性効果、日本環境変異原学会第35回大会 (大阪、2006年11月)
  2. 松元郷六ら、細菌におけるNaNO<sub>2</sub>と抗酸化剤の複合遺伝毒性、日本環境変異原学会第35回大会 (大阪、2006年11月)
  3. 石井雄二, 大柄敦資, 梅村隆志, 西川秋佳, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 広瀬雅雄, 中澤裕之, 活性窒素種によるDNA損傷評価法の構築. 第28回 日本フリーラジカル学会学集会 (2006年5月・三重)
  4. Yuji Ishii, Atsushi Ogara, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Akiyoshi Nishikawa, Masao Hirose, Hiroyuki

- Nakazawa, Estimation of oxidative DNA damage induced by reactive nitrogen species 20 th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2006年6月・Kyoto)
5. 石井雄二, 梅村隆志, 岡野圭太, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 西川秋佳, 斉藤貢一, 広瀬雅雄, 中澤裕之, カテコール亜硝酸ナトリウム併用投与によるラット前胃発がん機構の解明. 日本食品化学学会 第12回 総会・学術大会 (2006年6月・名古屋)
  6. 石井雄二, 大柄敦資, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 梅村隆志, 西川秋佳, 斉藤貢一, 広瀬雅雄, 中澤裕之, 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による生体中ニトロトリプトファンの高感度分析法. 第50回日本薬学会関東支部大会 (2006年10月・新潟)
  7. 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: 茶抽出物と亜硝酸ナトリウムの併用投与によるMNNG誘発ラット前胃発がん促進作用と酸化的ストレスの関与, 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 7月, 2006
  8. 黒岩有一, 石井雄二, 神吉けい太, 田崎雅子, 梅村隆志, 西川秋佳, 広瀬雅雄: ラット逆流性食道炎モデルにおけるアスコルビン酸と亜硝酸併用投与による食道粘膜増殖性病変の誘発, 第65回日本癌学会学術総会, 横浜, 9月, 2006
  9. 黒岩有一, 石井雄二, 神吉けい太, 岡村俊也, 田崎雅子, 梅村隆志, 西川秋佳, 広瀬雅雄: ラット逆流性食道炎モデルにおけるアスコルビン酸と亜硝酸複合投与の食道発がん促進作用, 第23回日本毒性病理学会学術集会, 東京, 1月, 2007.
  10. 村田真理子, 沼田遥, 川西正祐, 天然抗酸化物質クロロゲン酸によるDNA損傷機構, 第77回日本衛生学会総会, 2007年3月25-28日, 大阪市
  11. 及川(多田)佐枝子, 加藤琢磨, 栗林景容, 西野幸典, 川西正祐, トリブチルスズによる過酸化水素生成を介したアポトーシス - 免疫毒性との関連性-, 第77回日本衛生学会総会, 2007年3月25-28日, 大阪市
  12. 古川絢子, 原田夏菜子, 及川伸二, 川西正祐, 発がん物質アミトロールの代謝物によるDNA損傷機構, 第77回日本衛生学会総会, 2007年3月25-28日, 大阪市
  13. 及川(多田)佐枝子, 加藤琢磨, 栗林景容, 川西正祐, トリブチルスズによるアポトーシスを介した免疫毒性発現機構の解析, 日本分子生物学会2006フォーラム, 2006年12月6日, 名古屋市
  14. 沼田遥, 村田真理子, 川西正祐, 食品因子クロロゲン酸のDNA損傷性を指標とした安全性評価, 第65回日本癌学会総会, 2006年9月28-30日, 横浜市
  15. 沼田遥, 村田真理子, 川西正祐, 天然抗酸化物質クロロゲン酸による酸化的DNA損傷, 第28回日本フリーラジカル学会学術集会, 2006年5月13-14日, 津市
  16. T Matsubara, T Toriyabe, K Yoshinari, K Nagata, and Y Yamazoe: A herbicide pyributicarb is more potent inducer of CYP3A4 expression interacting with pregnane X receptor than rifampicin. 第21回日本薬物動態学会年会 2006年11月29日 (東京)
  17. 難波江恭子, 土井悠子, 中島弘尚, 市原敏夫, 竹下健太郎, 朝元誠人, 白井智之, MeIQxと $\alpha$ -および $\beta$ -naphthofalvone同時投与による肝発がん修飾作用の検討 第23回日本毒性病理学会, 東京, 2007年1月

18. 有機塩素系および有機リン系農薬の複合曝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）
19. 有機塩素系および有機リン系農薬の複合曝露がラットの中枢神経系におよぼす影響：配島淳子、首藤康文、大塚亮一、山口悟、藤江秀彰、松本力、林豊、武田真記夫、原田孝則、第33回日本トキシコロジー学会学術年会（名古屋国際会議場、2006）

#### 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）  
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
	竹澤 祐造	(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、*in vitro* コメットアッセイにより DNA 損傷誘発性を、また、Ames テストにより突然変異誘発性を検討した。その結果、 $\text{NaNO}_2$  と EGCG を交互に処理しても DNA 損傷は誘発されず、同時処理によってのみ誘発された。Ames テストにおいては種々の 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。次に、 $\text{NaNO}_2$  とその他の茶カテキン 3 種類について複合 DNA 損傷の有無を検討した。その結果、 $\text{NaNO}_2$  と (-)-epicatechin (EC) または (-)-epicatechin-gallate (ECG) を同時処理した場合、DNA 損傷は誘発されなかったが、 $\text{NaNO}_2$  と (-)-epigallocatechin (EGC) を同時処理した場合、強い DNA 損傷が誘発された。以上より、EGCG と EGC は  $\text{NaNO}_2$  との複合 DNA 損傷作用があるものと結論した。さらに、 $\text{NaNO}_2$  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  $\text{NaNO}_2$  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。

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。亜硝酸ナトリウム ( $\text{NaNO}_2$ ) 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>。一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を  $\text{NaNO}_2$  と同時に哺乳類培養細胞に処理させると、染色体異常が増強あるいは誘発されることを示した<sup>3)</sup>。昨年度は抗酸化剤の一種である茶カテキンについて  $\text{NaNO}_2$  との複合遺伝毒性を調査したところ、 $\text{NaNO}_2$  と EGCG の複合処理によって染色体異常や DNA 損傷が誘発された<sup>4)</sup>。

今年度は、① $\text{NaNO}_2$  と EGCG の複合遺伝毒性、② $\text{NaNO}_2$  に対するアスコルビン酸またはカテコールとの複合遺伝毒性について検討を行った。

$\text{NaNO}_2$  と EGCG の複合遺伝毒性では、昨年度の検討事項であった細胞毒性と DNA 損傷の関係を検索した。さらに、 $\text{NaNO}_2$  と EGCG の処理時間をずらした場合について検討した。加えて、異なるエンドポイントを持つ Ames テストを用いて中性～弱酸性条件下における突然変異誘発作用を検討した。また、緑茶には複数のカテキン類が含まれるため、その他のカテキン類3種類 (-)-epicatechin (EC)、(-)-epicatechin-gallate (ECG)、(-)-epigallocatechin (EGC) について、 $\text{NaNO}_2$  との複合による DNA 損傷誘発性を検討した。

$\text{NaNO}_2$  とアスコルビン酸またはカテコールの複合遺伝子突然変異誘発性については、中性～弱酸性条件下で Ames テストを実施した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

$\text{NaNO}_2$  (CAS No. 7632-00-0、純度 98.5%)、アスコルビン酸 (CAS No. 50-81-7、純度 99.5%)、カテコール (CAS No. 120-80-9、

純度 99.0%)、(-)-epigallocatechin-gallate (EGCG、CAS No: 989-51-5、純度>90%)、(-)-epicatechin (EC、CAS No: 490-46-0、純度 98%)、(-)-epigallocatechin (EGC、CAS No: 970-74-1、純度 98%)、(-)-epicatechin-gallate (ECG、CAS No: 1257-08-5、純度 98%) はすべて和光純薬工業株式会社製造のものを使用した。これらは滅菌水または生理食塩液(大塚製薬株式会社)に溶解または懸濁して用いた。

Ames テストでは 100 mM ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH 7.4) と 100 mM ナトリウムー酢酸緩衝液 (pH 5.0、6.0) を用いた。緩衝液に含まれる酸とナトリウム塩の比率を変えることにより目的の pH に調製した。

### 2. コメットアッセイ使用細胞

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℃、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. Ames テスト使用菌株

試験菌株はネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA/pKM101 の 2 菌株を用いた。テスト菌株は以下の遺伝的特性およびその他の諸性質について検査を行い、これらの特性を有することを確認した。

- ① ヒスチジン要求性(ネズミチフス菌)  
トリプトファン要求性(大腸菌)
- ② 紫外線感受性
- ③ ネズミチフス菌におけるクリスタル

バイオレット感受性

- ④ アンピシリン耐性
- ⑤ 自然突然変異体数
- ⑥ 既知変異原物質に対する反応性

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℃で8時間振盪培養した。分光光度計で吸光度 (OD<sub>660</sub>) を測定し、 $1 \times 10^9$  生菌数/mL 以上の菌懸濁液であることを確認した。

#### 4. *In vitro* コメットアッセイ

試験はHartmannらのガイドライン<sup>5)</sup>およびSasakiらの方法<sup>6)</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 50  $\mu$ 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  $\mu$ g/mL であった。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、スライド標本を作製するためトリプシンにより細胞を回収した。

細胞回収後、遠心し、上清を棄てた後、適量のホモジナイズ液 (75 mM NaCl, 30 mM EDTA2Na) で細胞を再浮遊させた。細胞浮遊液と低融点寒天 (PBS に Low melting point agar (ナカライテスク株式会社) を 0.75% で融解したものを) を 10:75 で混和し、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。スライドガラスに暗号化したコード番号を付与し、冷却により寒天を固めた後、冷却した細胞溶解液 (2.5M NaCl, 100 mM EDTA2Na, 10 mM Tris base, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH10) に浸した。1 プレートあたり 2 枚のスライド標本を作製した。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℃ に冷却した電気泳動液 (300 mM NaOH, 1 mM 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、270~300 mA、4℃、20 分、暗所であった。電気泳動終了後、中和液 (400mM Tris base pH7.5) に 5 分浸し、過剰なアルカリを中和した。中和は 2 回行った。中和終了後、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 (20  $\mu$ g/mL) で染色し観察した。

各スライドガラスあたり 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(キッコーマン株式会社)を用いて発光量を測定し、陰性対照群と比較した。

## 5. Ames テスト

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たがって実施した<sup>7)</sup>。滅菌小試験管に緩衝液0.5 mL、前培養した菌懸濁液0.1 mLおよび被験物質溶液0.1 mLを分注し、37°Cで20分間振盪処理した。処理後、45°Cで保温したアミノ酸添加軟寒天液2 mLを加え、良く混合した後、最少グルコース寒天平板培地(クリメディア AM-N 培地、オリエンタル酵母工業株式会社)に広げた。37°Cで48時間培養後、コロニーアナライザー(システムサイエンス株式会社)を用いて復帰変異コロニー数を計測した。同時に、菌の生育阻害を実体顕微鏡下で観察した。

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。

## C. 研究結果

### 1. NaNO<sub>2</sub> と EGCG の複合遺伝毒性

#### 1.1. 同時処理による DNA 損傷誘発性

NaNO<sub>2</sub> と EGCG の複合的な効果を調べるため、NaNO<sub>2</sub> (1.25、2.5、5 mg/mL) と EGCG (100 μM) を1時間同時処理した。その結果を Table 1 に示す。溶媒対照群での% Tail DNA は4.32、Tail length は10.39、Olive tail moment は0.44であった。同時処理した群では% Tail DNA は6.10~9.45、Tail length は16.61~23.01、Olive tail moment は0.75~1.60に増加し、すべての用量で3つのパラメーターに有意差が認められた。また、細胞生存率はNaNO<sub>2</sub>濃度が1.25、2.5、5 mg/mLの場合、溶媒対照群に比べそれぞれ90、74、57%であった。細胞生存率が高くかつDNA損傷がみられていることからNaNO<sub>2</sub>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。

#### 1.2. 時間差処理による DNA 損傷誘発性

EGCG (100 μM) を1時間処理し、取り除いた後にNaNO<sub>2</sub> (1.25、2.5、5 mg/mL) を1時間処理した。その結果を Table 2 に示す。溶媒対照群での% Tail DNA は4.53、Tail length は8.17、Olive tail moment は0.46であった。時間差処理した群では% Tail DNA は4.75~5.05、Tail length は7.01~9.68、Olive tail moment は0.46~0.50であり、すべての用量でDNA損傷は認められなかった。

次に被験物質処理の順番を逆に行った。NaNO<sub>2</sub> (1.25、2.5、5 mg/mL) を1時間処理し、取り除いた後にEGCG (100 μM) を1時間処理した。その結果を Table 3 に示す。溶媒対照群での% Tail DNA は4.19、Tail length は8.00、Olive tail moment は0.53であった。NaNO<sub>2</sub> 5 mg/mL の用量で Tail

length が 12.00 とわずかに増加し有意な差が認められた。また EGCG 単独処理で Tail length が 11.47 とわずかに増加し、有意な差が認められた。しかしその値は小さく、% Tail DNA と Olive tail moment では有意な差が認められなかったことから、両処理群とも陰性と判断した。また、その他の用量では有意な差は認められなかった。

### 1.3. 突然変異誘発性

通常の条件下(pH7.4)で行った試験の結果を Table 4 に示す。TA100、大腸菌とも EGCG のみでは 39.1~2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (公比 2, 7 用量) で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で生育阻害が認められた。陽性対照を除く全ての用量に  $\text{NaNO}_2$  を 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  加えたところ、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。なお、1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で生育阻害が認められた。 $\text{NaNO}_2$  を加えると、加えない場合に比べコロニー数が最大 3.8 倍 (118→451:TA100)、または 2.3 倍 (98→225:大腸菌) に増加したが、EGCG を加えていない対照群でも 4.3 倍 (109→466:TA100)、または 2.4 倍 (90→219:大腸菌) に増加しているため、 $\text{NaNO}_2$  自身の突然変異誘発性と考えられた。よって、 $\text{NaNO}_2$  と EGCG に複合突然変異誘発性はないと判断した。

次に pH6.0 で行った試験の結果を Table 5 に示す。緩衝液には酢酸バッファーを使用した。TA100、大腸菌とも EGCG のみでは 39.1~2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (公比 2, 7 用量) で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で生育阻害が認められた。陽性対照を除く全ての

用量に  $\text{NaNO}_2$  を 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  加えたところ、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。なお、1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で生育阻害が認められた。 $\text{NaNO}_2$  を加えない場合に比べ、コロニー数が最大 3.9 倍 (111→435:TA100)、または 4.2 倍 (72→303:大腸菌) に増加したが、EGCG を加えていない対照群でも 3.5 倍 (133→467:TA100)、または 4.9 倍 (78→380:大腸菌) に増加しているため、 $\text{NaNO}_2$  自身の突然変異誘発性と考えられた。よって、 $\text{NaNO}_2$  と EGCG に複合突然変異誘発性はないと判断した。

さらに pH5.0 で行った試験の結果を Table 6 に示す。緩衝液には酢酸バッファーを使用した。試験は大腸菌のみで行った。加える  $\text{NaNO}_2$  はこの pH で適度な復帰突然変異コロニー数が得られる 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とした。大腸菌は EGCG のみでは 39.1~2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (公比 2, 7 用量) で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で生育阻害が認められた。陽性対照を除く全ての用量に  $\text{NaNO}_2$  を 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  加えたところ、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。なお、1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で生育阻害が認められた。 $\text{NaNO}_2$  を加えない場合に比べ、コロニー数が最大 16.2 倍 (67→1084) に増加したが、EGCG を加えていない対照群でも 11.8 倍 (76→900) に増加しているため、 $\text{NaNO}_2$  自身の突然変異誘発性と考えられた。よって、 $\text{NaNO}_2$  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。

## 2. NaNO<sub>2</sub> とその他カテキンの複合 DNA 損傷誘発性

### 2.1. EC

溶媒対照群での% Tail DNA は 5.18、Tail length は 15.94、Olive tail moment は 0.61 であった (Table 7)。一方、同時処理した群での% Tail DNA は 5.20~7.12、Tail length は 15.52~18.07、Olive tail moment は 0.56~0.78 であり、全ての用量で DNA 損傷は認められなかった。細胞生存率は 1.25、2.5、5 mg/mL でそれぞれ 75、67、71% であった。また、EC 単独での DNA 損傷性は 100 μM において% Tail DNA は 7.08、Tail length は 16.81、Olive tail moment は 0.71 であり陰性であった。よって NaNO<sub>2</sub> と EC の複合 DNA 損傷誘発性はないと判断した。

### 2.2. ECG

溶媒対照群での% Tail DNA は 6.61、Tail length は 17.64、Olive tail moment は 0.72 であった (Table 8)。一方、同時処理した群での% Tail DNA は 5.08~6.54、Tail length は 16.24~17.99、Olive tail moment は 0.58~0.79 であり、全ての用量で DNA 損傷が認められなかった。細胞生存率は 1.25、2.5、5 mg/mL でそれぞれ 76、73、60% であった。ECG 単独での DNA 損傷性は 100 μM において% Tail DNA は 6.07、Tail length は 16.68、Olive tail moment は 0.70 であり陰性であった。よって NaNO<sub>2</sub> と ECG の複合 DNA 損傷誘発性はないと判断した。

### 2.3. EGC

溶媒対照群での% Tail DNA は 4.75、Tail

length は 11.61、Olive tail moment は 0.54 であったが、EGC 単独 100 μM での DNA 損傷性は% Tail DNA は 8.65、Tail length は 23.76、Olive tail moment は 1.19 に上昇し、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 (Table 9)。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。

NaNO<sub>2</sub> (1.25、2.5、5 mg/mL) と EGC(100 μM) の同時処理では% Tail DNA は 24.48~31.01、Tail length は 41.76~48.18、Olive tail moment は 6.02~8.30 に大きく上昇し全ての用量で有意差が認められた。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。NaNO<sub>2</sub> との複合処理によって EGC 単独の DNA 損傷よりも大きく値が上昇していることから複合 DNA 損傷誘発性があると判断した。

なお、一連の実験における陽性対照群の値 (平均 ± 標準偏差) は以下の通りであった : % Tail DNA = 12.79 ± 1.84、Tail length = 33.41 ± 7.35、Olive tail moment = 2.40 ± 0.59。

## 3. NaNO<sub>2</sub> とアスコルビン酸の複合突然変異誘発性

### 3.1. NaNO<sub>2</sub> 単独の突然変異誘発性

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た (Table 10)。よって、NaNO<sub>2</sub> は明らかな突然変異誘発性を示した。

### 3.2. アスコルビン酸単独の突然変異誘発

性

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た (Table 10)。同様に、WP2uvrA/pKM101 の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。

### 3.3. NaNO<sub>2</sub> とアスコルビン酸の複合処理

NaNO<sub>2</sub> (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、NaNO<sub>2</sub> 単独処理に比べて僅かに変異コロニー数が増加した (Fig. 1)。その増加量は平均して 48 個 (TA100) および 53 個 (WP2uvrA/pKM101) であった。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。

## 4. NaNO<sub>2</sub> とカテコールの複合突然変異誘発性

### 4.1. カテコール単独の突然変異誘発性

TA100 における 250 または 500 µg/plate の用量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 (Table 10)。一方、WP2uvrA/pKM101 では有意な増加は認められなかった。

### 4.2. NaNO<sub>2</sub> とカテコールの複合処理

NaNO<sub>2</sub> (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 NaNO<sub>2</sub> の用量が 0~313 µg/plate の場合、NaNO<sub>2</sub> 単独処理に比べて僅かに変異コロニー数が増加した (Fig. 2)。その増加量は平均して 42 個であった。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。

高用量 (2500 または 5000 µg/plate) の NaNO<sub>2</sub> では生育阻害が認められた。それが原因で、同用量群では変異コロニー数の低下が起こった。

## 5. pH6.0 における複合突然変異誘発性

### 5.1. NaNO<sub>2</sub> とアスコルビン酸の複合処理

NaNO<sub>2</sub> 単独処理の結果を Table 11 に示す。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 (Table 11)。NaNO<sub>2</sub> 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 (Fig. 3)。いずれも NaNO<sub>2</sub> 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。

### 5.2. NaNO<sub>2</sub> とカテコールの複合処理

カテコール単独処理の結果を Table 11 に示す。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。

NaNO<sub>2</sub> と同時に処理した場合、TA100 では NaNO<sub>2</sub> 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 (Fig. 4)。なお、両菌株も  $\text{NaNO}_2$  の高用量域では細胞毒性が認められた。

#### D. 考察

##### 1. $\text{NaNO}_2$ と EGCG の複合 DNA 損傷誘発性

昨年度の結果、 $\text{NaNO}_2$  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<sup>4)</sup>。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  $100 \mu\text{M}$  に下げ、 $\text{NaNO}_2$  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、 $\text{NaNO}_2$  との複合作用により新たな DNA 損傷が引き起こされたと結論した。

この複合作用は交互に処理を行った場合でも引き起こされるかを調べるため、EGCG を処理後、 $\text{NaNO}_2$  処理を行った。その結果、DNA 損傷は全く認められなかった。また逆に  $\text{NaNO}_2$  を処理後、EGCG を処理しても結果は同様であった。したがって、EGCG が  $\text{NaNO}_2$  と共存した場合にのみ、強い DNA 損傷作用が発現すると考えられた。

##### 2. $\text{NaNO}_2$ と EGCG の複合突然変異誘発性

複合処理による 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、通常の pH7.4 条件下では  $\text{NaNO}_2$  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  $\text{NaNO}_2$  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。しかし、ここで興味ある事実が明らかになった。 $\text{NaNO}_2$  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 (Table 4, 5, 6 における大腸菌)。しかし、いずれにせよ EGCG との複合によってその突然変異誘発性が増強されることはなかった。

本研究で使用した大腸菌 WP2*uvrA*/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の突然変異誘発性は検出できない<sup>8)</sup>。 $\text{NaNO}_2$  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 WP2*uvrA*/pKM101 で検出できない可能性も否定できない。

##### 3. $\text{NaNO}_2$ とその他カテキンの複合 DNA 損傷誘発性

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  $\text{NaNO}_2$  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  $\text{NaNO}_2$  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<sup>4)</sup>。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<sup>9)</sup>。また、*in vivo* 小核試験でも陽性を示す<sup>10)</sup>。さらに、 $\text{NaNO}_2$  は Ames テストで陽性であった。したがって、 $\text{NaNO}_2$  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。

もう一つの原因として、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  $\text{NaNO}_2$  と共存した場合、 $\text{NaNO}_2$  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<sup>11)</sup>。 $\text{NaNO}_2$  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、 $\text{NaNO}_2$  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<sup>12)</sup>。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。

したがって今後は、①抗酸化剤と  $\text{NaNO}_2$  を複合処理した場合には中性条件下でも NO が産生される、②抗酸化剤と NO は中性条件下においてヒドロキシラジカルを産生する、という二つの仮定について検証を進める必要がある。

本研究では  $\text{NaNO}_2$  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  $\mu\text{M}$  以下と言われている<sup>13)</sup>。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<sup>14)</sup>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  $\mu\text{M}$  = 45.8  $\mu\text{g/mL}$ 、EGC 100  $\mu\text{M}$  = 36.3  $\mu\text{g/mL}$  という条件は充分におこりうる。

#### 4. $\text{NaNO}_2$ とアスコルビン酸の複合突然変異

中性条件下では  $\text{NaNO}_2$  の突然変異誘発性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。増加量はアスコルビン酸単独処理で誘発される変異コロニー数 (正味誘発数) とほぼ一致したことから、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<sup>15)</sup>、この NO が引き金となって細胞 DNA に酸化的損傷を引き起こしている可能性が高い。

#### 5. $\text{NaNO}_2$ とカテコールの複合突然変異

アスコルビン酸の場合と異なり、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  $\text{NaNO}_2$  とカテコールの複合により、酸化的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的損傷である

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。

#### E. 結論

チャイニーズハムスター培養細胞において、茶カテキンの主要成分である EGCG と NaNO<sub>2</sub> との間には、明らかな複合的 DNA 損傷誘発性が認められた。また同じく茶カテキンの一種である EGC も NaNO<sub>2</sub> との複合的な DNA 損傷誘発性が認められた。しかし EGCG と NaNO<sub>2</sub> との間には複合的な突然変異誘発作用は認められなかった。

NaNO<sub>2</sub> とアスコルビン酸は弱酸性条件下で相乗的な複合突然変異誘発性を示した。一方、NaNO<sub>2</sub> とカテコールは弱酸性条件下でも複合的な効果は認められなかった。

#### 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) 松元郷六ら (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 17 年度分担研究報告書
- 4) 松元郷六ら (2006), 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
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura, (1980) Factors Modulating Mutagenicity in Microbial Tests, in: K.H. Norpoth and R.C. Garner (Eds.), *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. Springer-Verlag, pp. 273-285.
- 8) Watanabe, K., Sakamoto, K. and Sasaki, T. (1998) Comparisons on chemically-induced mutation among four bacterial strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli*

- WP2/pKM101 and WP2uvrA/pKM101: collaborative study II. *Mutat Res.*, 412:17-31.
- 9) 染色体異常試験データ集 改訂 1998 年版 (1999) 監修 祖父尼俊雄、株式会社 L.I.C.
- 10) Luca, D., Luca, V., Cotor, F. and Raileanu, L. (1987) *In vivo* and *in vitro* cytogenetic damage induced by sodium nitrite. *Mutation Res.*, 189: 333-339.
- 11) 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
- 12) Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S. and Xin, W. (1996) Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta.*, 1304: 210-22.
- 13) 津田充宥, 倉島由紀子 (1991) 亜硝酸および窒素酸化物との相互作用による変異原の生成, 修飾とその抑制, 環境変異原研究, 13: 31-52.
- 14) 梅垣敬三, 江指隆年, 手塚雅勝, 小野明子, 佐野満昭, 富田 勲 (1996) 電気化学検出 HPLC による食品中の茶カテキン類の分析法, 食品衛生学雑誌 37-2: 77-82.
- 15) Okazaki, K., Ishii, Y., Kitamura, Y., Maruyama, S., Umemura, T., Miyauchi, M., Yamagishi, M., Imazawa, T., Nishikawa, A., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. and Hirose, M. (2006) Dose-dependent promotion of rat 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.*, 97:175-82.
- G. 研究発表
1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
和田邦生ら、NaNO<sub>2</sub> と主要な茶カテキン、エピガロカテキンガレート *in vitro* 相乗遺伝毒性効果、日本環境変異原学会第 35 回大会 (大阪、2006 年 11 月)
- 松元郷六ら、細菌における NaNO<sub>2</sub> と抗酸化剤の複合遺伝毒性、日本環境変異原学会第 35 回大会 (大阪、2006 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 *In vitro* comet assay - Sodium nitrite + EGCC

Sodium nitrite (mg/ml)	EGCC ( $\mu$ M)	% Tail DNA		Tail length		Olive tail moment		Cell viability %
		Mean $\pm$ S.D.	S.D.	Mean $\pm$ S.D.	S.D.	Mean $\pm$ S.D.	S.D.	
0	0	4.32 $\pm$ 0.97		10.39 $\pm$ 1.88		0.44 $\pm$ 0.11		100
1.25	100	6.10 * $\pm$ 0.49		16.82 ** $\pm$ 2.58		0.75 ** $\pm$ 0.03		90
2.5	100	6.16 * $\pm$ 1.11		16.61 ** $\pm$ 0.72		0.77 ** $\pm$ 0.11		74
5	100	9.45 ** $\pm$ 0.50		23.01 ** $\pm$ 0.78		1.60 ** $\pm$ 0.16		57

200 cells were scored from each dose.

\*: P<0.05 Dunnett      \*\*: P<0.01 Dunnett

Table 2 *In vitro* comet assay – Effect of post-treatment with sodium nitrite on EGCG

1st treatment EGCG ( $\mu$ M)	2nd treatment Sodium nitrite (mg/ml)	% Tail DNA		Tail length		Olive tail moment	
		Mean $\pm$	S.D.	Mean $\pm$	S.D.	Mean $\pm$	S.D.
0	0	4.53 $\pm$	0.66	8.17 $\pm$	2.37	0.46 $\pm$	0.07
100	1.25	4.75 $\pm$	1.17	9.11 $\pm$	4.28	0.47 $\pm$	0.13
100	2.5	4.83 $\pm$	0.95	7.01 $\pm$	0.70	0.46 $\pm$	0.09
100	5	5.05 $\pm$	1.72	9.68 $\pm$	2.23	0.50 $\pm$	0.16
100	0	4.31 $\pm$	0.99	9.32 $\pm$	1.89	0.42 $\pm$	0.10

One hour later EGCG treatment, CHL cells were rinsed twice with PBS and treated with Sodium nitrite for one hour. 200 cells were scored from each dose.