

**Table 4 Concentrations of NO<sub>2</sub>Trp in mice liver samples**

		2-NO <sub>2</sub> Trp/Trp (nmol/mol)	4-NO <sub>2</sub> Trp/Trp (nmol/mol)	6-NO <sub>2</sub> Trp/Trp (nmol/mol)
Control	1	N.D.	N.D.	N.D.
	2	N.D.	N.D.	N.D.
	3	N.D.	N.D.	N.D.
	4	N.D.	N.D.	N.D.
	5	N.D.	N.D.	N.D.
APAP 2 hr	6	N.D.	2.99	29.58
	7	N.D.	N.D.	N.D.
	8	N.D.	N.D.	N.D.
	9	N.D.	N.D.	N.D.
	10	N.D.	N.D.	N.D.
APAP 4 hr	11	N.D.	N.D.	N.D.
	12	N.D.	3.92	26.96
	13	N.D.	2.78	24.54
	14	N.D.	N.D.	32.71
	15	N.D.	N.D.	N.D.
APAP 8 hr	16	N.D.	3.45	31.36
	17	N.D.	2.24	30.51
	18	N.D.	N.D.	30.17
	19	N.D.	N.D.	28.02
	20	N.D.	N.D.	29.32

N.D.:not detected

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

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

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）  
協力研究者：石井雄二（星薬科大学薬学部）  
協力研究者：能美健彦（国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部）  
協力研究者：増村健一（国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部）  
協力研究者：山田雅巳（国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部）  
協力研究者：松井恵子（国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部）

研究要旨

昨年度に引き続き、亜硝酸と酸化防止剤の複合による前胃・食道発がんリスクの解明を目的に研究を行った。前年度は、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 ( $\text{NaNO}_2$ ) 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  $\text{NaNO}_2$  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多発性は増加し、食道発がん促進作用が認められた。したがって、ヒトにおいても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* では染色体異常性を示し、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  $\text{NaNO}_2$  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  $\text{NaNO}_2$  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。

## 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合成が減少し、発がんが抑制されると考えられている。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を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を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 酸化的損傷の指標となる 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は NO に起因する酸化的ストレスが関与していることが示唆されている。昨年度までの研究で、フェノール系抗酸化物質の茶カテキンもまたラット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 とカテキン類の反応により生じる OH ラジカルが関与が示された。

これまで、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られており、ヒトの胃に相当するラット腺胃には認められないことから、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。しかし、亜硝酸と AsA 複合による NO 発生は胃酸による低 pH 環境で著しく促進されることから、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。前年度は、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、NaNO<sub>2</sub> と AsA の複合投与が胃液逆流状態の食道に対しても前胃と同様に過形成病変や乳頭腫を発生させることを明らかにした。そこで本年度は、食道発がん促進作用をさらに詳細に検証するため、この逆流性食道炎モデルラットにあらかじめ発がんイニシエーターとして DHPN を投与するプロモーション作用検索実験を実施した。

亜硝酸と AsA、亜硝酸とカテコールあるいは茶カテキン等のフェノール系抗酸化物質を複合投与すると、ラット前胃粘膜の 8-OHdG レベルが増加する。また、前年度までの研究で、分担研究者の松本らは *in vitro* の系で亜硝酸と AsA の複合による染色体異常性を明らかにしている。亜硝酸と AsA の長期併用投与はイニシエーション処置無しでラット前胃に乳頭腫を発生させ、逆流性食道炎下の食道においてもイニシエーション無しで乳頭腫が認められた。したがって、NaNO<sub>2</sub> と AsA の複合投与は、発がんプロモーション作用のみならず、酸化的 DNA 損傷を介した発がんイニシエーション作用を有する可能性も疑われる。そこで本年度は、アスコルビン酸と亜硝酸の複合が酸化的 DNA 損傷による遺伝毒性を有するかどうかを調べる目的で、酸化的 DNA 損傷修復遺伝子 *mutM* を欠損させた大腸菌株を用いた

*in vitro* 遺伝毒性検索試験を実施した。続いて、複合投与が実際に前胃発がんに対してイニシエーション作用を有するかどうかを明らかにする目的で、複合投与後に既知の前胃プロモーターである butylated hydroxyanisole (BHA) を投与するラット2段階前胃発がん試験を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 食道プロモーション検索試験 (Fig. 1)

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週間の回復期間の後、9週齢で次に示す胃液逆流のための手術を行った：ネブタール麻酔下で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)で被覆して脱落防止のため5-0ナイロン糸で胃の漿膜に固定し、2-0絹糸で前胃腺胃境界部を結紮した。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%NaNO<sub>2</sub>飲水投与、4群：1.0%AsA+0.2%NaNO<sub>2</sub>)。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。死亡動物についても、前年度実施したイニシエーション処置無しの実験と同様に、標本作成が不可能な個体を除いたすべての例を評価した。

### 2. 大腸菌を用いた遺伝毒性試験

大腸菌 WP2 *uvrA*/pKM101 株及びその *mutM* (8-OH-G or Fapy DNA glycosylase) 欠損

株 (WP2 *mutMuvrA*/pKM101) を 0 又は 100  $\mu$ g の NaNO<sub>2</sub> に対して 0、2500、7500 及び 1000  $\mu$ g 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。

### 3. 前胃イニシエーション検索試験 (Fig. 2)

6週齢のF344ラット雄125匹を各25匹の5群に分け、次の被験物質を12週間投与した(1群：基礎飼料、2群：1.0%AsA混餌投与+0.2%NaNO<sub>2</sub>飲水投与、3群：1.0%AsA、4群：0.2%NaNO<sub>2</sub>、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(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匹を途中解剖し、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。手術操作はネブタール麻酔下で実施し、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。

## G. 研究結果

### 1. 食道プロモーション検索試験

逆流性食道炎手術の影響により、投与期間中に各群で複数の動物が食道穿孔や食道貯留物の誤嚥で死亡した。また、実験後期には DHPN 誘発性の腎腫瘍による死亡も認められた。最終的な生存率は対照群、AsA 単独、NaNO<sub>2</sub> 単独及び併用投与群でそれぞれ 46、54、63 及び 67%であった。食道の肉眼的観察では、主に食道下部に胃酸逆流の影響と考えられる潰瘍や粘膜肥厚がみられたが、AsA と NaNO<sub>2</sub> の複合投与群では、粘膜肥厚の範囲が食道の中及び上部へと拡大する傾向がみられた。さらに、複合投与群では DHPN 投与で誘発された肉眼的結節の体積が有意に増加した (P<0.05, Table 1)。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 (Table 2)。さらに、複合投与は DHPN 誘発性の腫瘍の発生率や多発性を増加させ、食道下部の乳頭腫の発生率や多発性に統計学的有意差がみられた (P<0.05, Table 3, 4)。

### 2. 大腸菌を用いた遺伝毒性試験

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、その *mutM* 欠損株では NaNO<sub>2</sub> 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 (Fig. 2)。

### 3. 前胃イニシエーション検索試験

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。他の群では変化はみられなかった。プロモーション処置後、全群の前胃に BHA 投与による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、イニシエーション作用は検出できなかった (Table 5)。

### D. 考察

亜硝酸と 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 で誘発された食道の肉眼的結節の体積を有意に増加させ、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。また、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。したがって、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考えられる。

*In vitro* 遺伝毒性試験では、*mutM* 欠損株において NaNO<sub>2</sub> 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* 遺伝子は大腸菌における哺乳類 *Ogg1* 遺伝子の counterpart であり、酸化塩基 8-OHdG の除去修復に関わっている。*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 NaNO<sub>2</sub> を 12 週間複合投与したのち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。したがって、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。

#### E. 結論

AsA 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酸化防止剤と亜硝酸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疑われた。一方、AsA と NaNO<sub>2</sub> 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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### 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 (2): 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 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 (2007) 949-957.
  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.
- (2) 学会発表
1. 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
  2. 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
  3. 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

4. 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術集会 (2006 年 5 月・三重)
5. 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)
6. 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)

7. 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)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

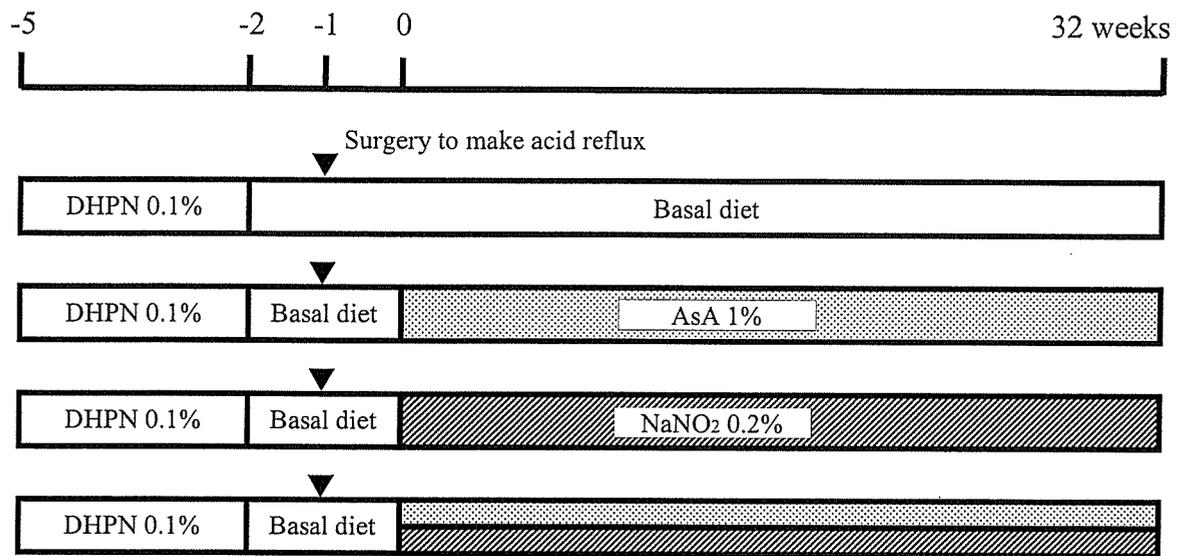


Fig. 1. Experimental design (esophagus)

**Table 1.** Macroscopic nodule in the esophagus of DHPN treated reflux esophagitis rats

	Basal diet	1% AsA	0.2% NaNO <sub>2</sub>	AsA + NaNO <sub>2</sub>
n=	11	13	15	16
Number of nodule	5	3	2	5
Volume of nodule <sup>a</sup> (mm <sup>3</sup> )	27 ± 17	43 ± 49	20 ± 15	149 ± 116 *

a: Data are mean ± SD value.

\* P<0.05 (vs. the basal diet group, Mann-Whitney's U-test)

**Table 2.** Incidence of epithelial hyperplasia in the esophagus of DHPN treated reflux esophagitis rats

Esophagus	Treatment	Basal diet	1% AsA	0.2% NaNO <sub>2</sub>	AsA + NaNO <sub>2</sub>
		n= 23	22	21	21
P1					
	Hyperplasia				
	+	1	4	1	7*
P2					
	Hyperplasia				
	+	8	13	10	16**
	++	3	6	1	12**
	+++	1	3	1	6*
P3					
	Hyperplasia				
	+	13	15	17	19**
	++	8	6	4	17**
	+++	6	4	1	10
P4					
	Hyperplasia				
	+	19	20	19	10
	++	15	16	17	20**
	+++	6	9	12	14**

\* P<0.05, \*\* P<0.01 (vs. the basal diet group, Fisher's exact probability test)

+, mild, ++, moderate, +++; severe

**Table 3.** Incidence of neoplastic lesions in the esophagus of DHPN treated reflux esophagitis rats

Esophagus	Treatment	Basal diet	1% AsA	0.2% NaNO <sub>2</sub>	AsA + NaNO <sub>2</sub>
		n= 23	22	21	21
P1					
	SCC	1	0	0	0
P2					
	Papilloma	1	0	0	0
	SCC	1	0	0	2
	Tumors	2	0	0	2
P3					
	Papilloma	1	3	1	3
	SCC	3	2	0	6
	Adenocarcinoma	1	0	0	0
	Tumors	5	4	1	7
P4					
	Papilloma	0	0	1	4*
	SCC	4	1	2	6
	Tumors	4	1	3	7
P1 - P4					
	Papilloma	2	3	2	6
	SCC	5	3	2	9
	Adenocarcinoma	1	0	0	0
	Tumors	7	5	4	11

\* P<0.05 (vs. the basal diet group, Fisher's exact probability test)

SCC; Squamous cell carcinoma

**Table 4.** Number and multiplicity of neoplastic lesions in the esophagus of DHPN treated reflux esophagitis rats

Esophagus	Treatment	Treatment			
		Basal diet n= 23	1% AsA 22	0.2% NaNO <sub>2</sub> 21	AsA + NaNO <sub>2</sub> 21
P1	SCC	1 (0.04 ± 0.21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
P2	Papilloma	1 (0.04 ± 0.21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	SCC	1 (0.04 ± 0.21)	0 (0)	0 (0)	2 (0.10 ± 0.30)
	Tumors	2 (0.09 ± 0.29)	0 (0)	0 (0)	2 (0.10 ± 0.30)
P3	Papilloma	1 (0.04 ± 0.21)	4 (0.18 ± 0.50)	1 (0.05 ± 0.22)	4 (0.19 ± 0.51)
	SCC	3 (0.13 ± 0.34)	2 (0.09 ± 0.29)	0 (0)	8 (0.38 ± 0.67)
	Adenocarcinoma	1 (0.04 ± 0.21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Tumors	4 (0.22 ± 0.42)	6 (0.27 ± 0.63)	1 (0.05 ± 0.22)	12 (0.57 ± 1.08)
P4	Papilloma	0 (0)	0 (0)	1 (0.05 ± 0.22)	8 (0.38 ± 0.92)*
	SCC	5 (0.22 ± 0.52)	1 (0.05 ± 0.21)	2 (0.10 ± 0.30)	9 (0.43 ± 0.75)
	Tumors	5 (0.22 ± 0.52)	1 (0.05 ± 0.21)	0 (0.14 ± 0.36)	17 (0.81 ± 1.40)
P1 - P4	Papilloma	2 (0.09 ± 0.29)	4 (0.18 ± 0.50)	2 (0.10 ± 0.30)	12 (0.57 ± 1.12)
	SCC	10 (0.43 ± 1.04)	3 (0.14 ± 0.35)	2 (0.10 ± 0.30)	19 (0.90 ± 1.34)
	Adenocarcinoma	1 (0.04 ± 0.21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Tumors	13 (0.57 ± 1.08)	7 (0.32 ± 0.65)	4 (0.19 ± 0.40)	31 (1.48 ± 2.18)

Data are number of tumor and parenthetic data are mean ± SD value of tumor multiplicity.

\* P<0.05 (vs. the basal diet group, Tukey-Kramer's test)

SCC; Squamous cell carcinoma

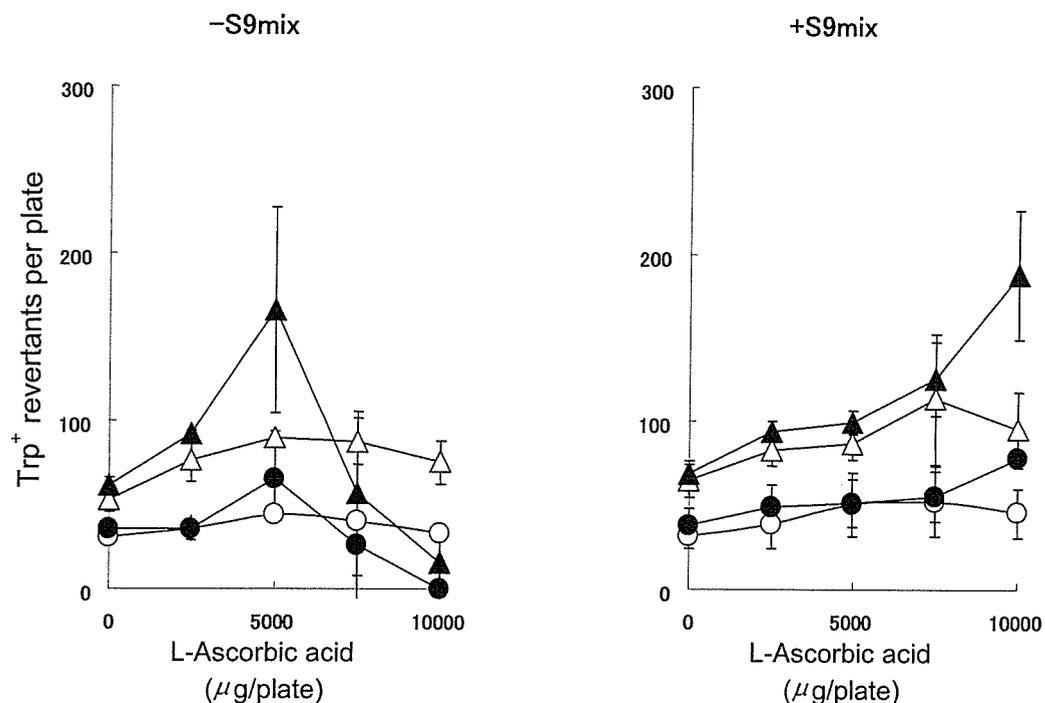


Fig. 2. Mutation rates of combination with AsA and NaNO<sub>2</sub> in the *E. coli* strain deficient in *mutM*. ○; WP2 *uvrA*/pKM101 (0 μg/plate NaNO<sub>2</sub>), ●; WP2 *uvrA*/pKM101 (100 μg/plate NaNO<sub>2</sub>), △; WP2 *mutM uvrA*/pKM101 (*mutM* deficient, 0 μg/plate NaNO<sub>2</sub>), ▲; WP2 *mutM uvrA*/pKM101 (*mutM* deficient, 100 μg/plate NaNO<sub>2</sub>).

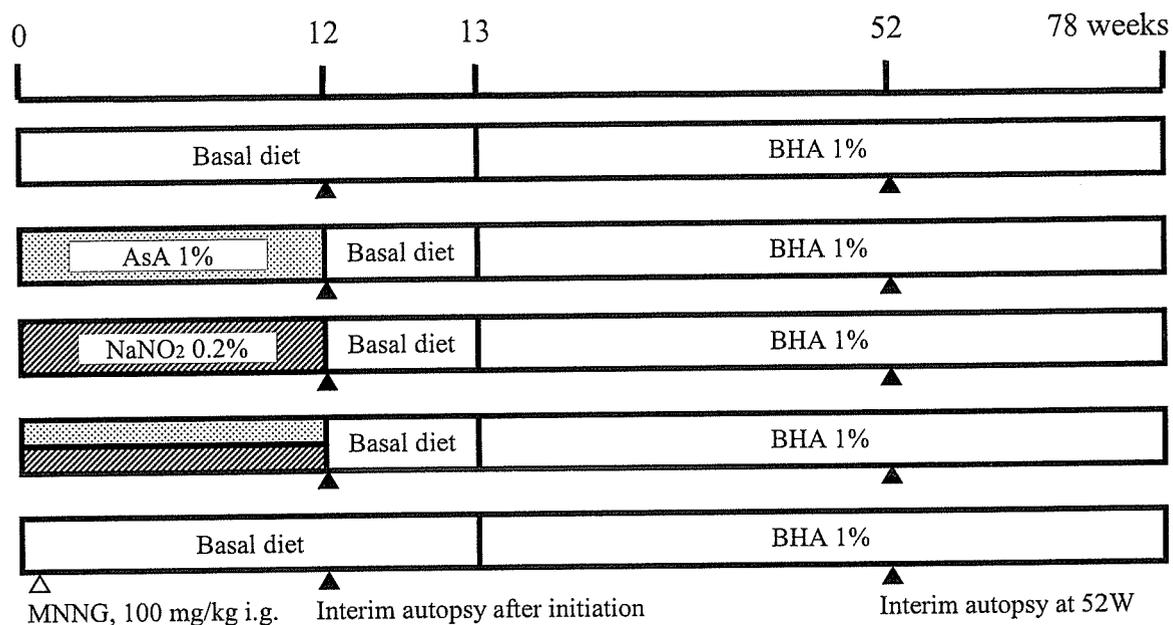


Fig. 3. Experimental design (forestomach)

**Table 5.** Incidence of proliferative lesions in the forestomach of rats treated with BHA after treatment with AsA and NaNO<sub>2</sub>

Stage	Treatment	Basal diet	1% AsA	0.2% NaNO <sub>2</sub>	AsA + NaNO <sub>2</sub>	MNNG
After initiation	n=	5	5	5	5	5
Hyperplasia						
+		0	0	0	5**	0
++		0	0	0	4*	0
52 week	n=	4	5	5	5	5
Hyperplasia						
+		4	4	4	5	5
++		3	4	4	5	5
+++		2	1	4	3	5
Papilloma		0	0	0	0	0
SCC		0	0	0	0	5**
78 week	n=	15	15	15	15	15
Hyperplasia						
+		15	15	13	15	15
++		15	13	13	13	15
+++		13	9	11	11	15
Papilloma		0	0	1	0	9**
SCC		0	0	0	1	14**

\* P<0.05, \*\* P<0.01 (vs. the basal diet group, Fisher's exact probability test)

+, mild, ++, moderate, +++; severe

SCC; Squamous cell carcinoma

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  
分担研究者 川西正祐 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部 教授

研究要旨：がん化学予防物質として注目されている唐辛子に含まれる辛み主成分のカプサイシンは発がん性や変異原性を示すことも報告されている。本研究においては、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。食品は長期にわたる摂取により重要な健康影響を及ぼす。したがって、食餌性因子による DNA 傷害の機構を解明し、安全性を評価する本研究事業は非常に有意義である。

A. 研究目的

本研究は、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により、複合毒性のリスクを科学的に評価することを目的とする。特に活性酸素に注目し、発がんのイニシエーションに関わる DNA 傷害性について検討し、その機構を解明することにより、がん予防対策を有効に進めることを目指す。唐辛子に含まれる辛みの主成分であるカプサイシンは抗酸化、抗炎症作用を有することから、がん化学予防物質として注目されている。その一方で、カプサイシンが発がん性や変異原性を示すことも報告されている。本年度においては、唐辛子に含まれる辛み主成分のカプサイシン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

5' 末端を  $^{32}\text{P}$  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°C 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 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。

C. 研究結果と考察

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 (図 1)、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。

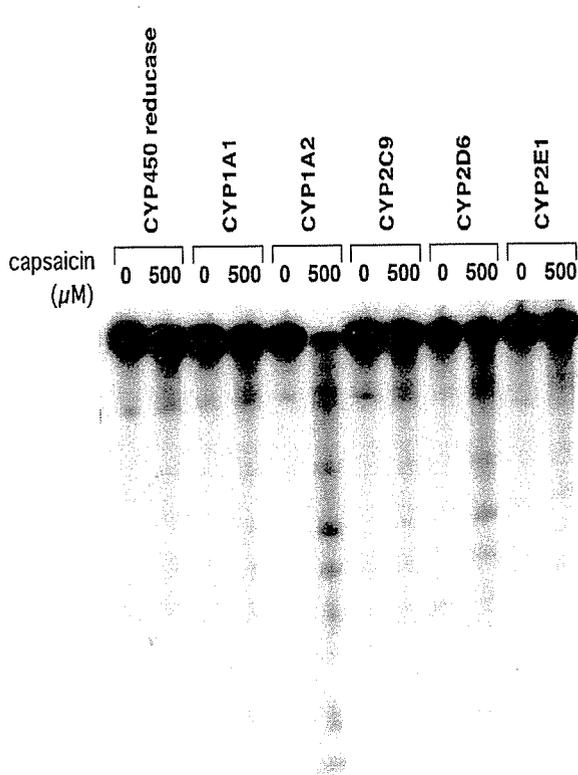


図 1. Capsaicin による Cu (II) および各種 CYP 存在下における DNA 損傷

CYP1A2 で前処理を行ったカプサイシンによる Cu (II) 存在下における 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 (図 2)。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イ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あるエタノール、マンニトール、ジメチルスルホキシド (DMSO) および蟻酸ナトリウムでは DNA 損傷の抑制は認められなかった。一方、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。

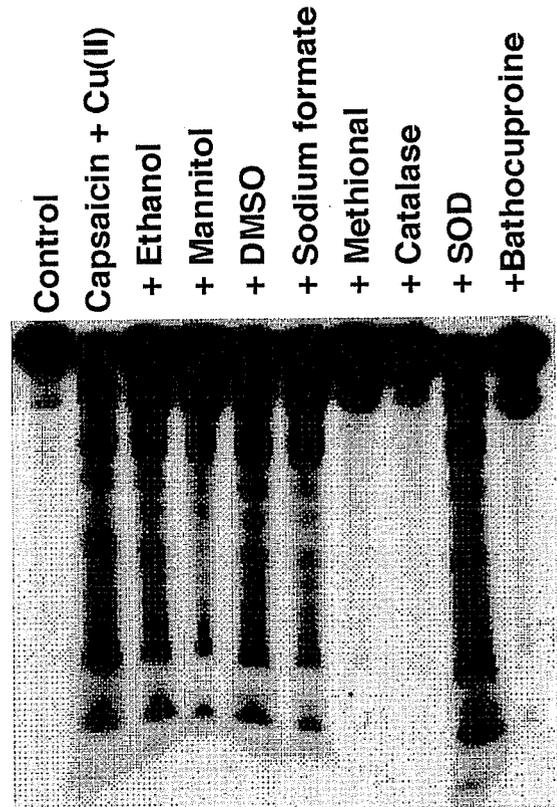


図 2. CYP1A2 で前処理した Capsaicin による Cu (II) 存在下における DNA 損傷に対するラジカルスカベンジャーの効果

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 (図 3 および図 4)。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 (図 3)。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 (図 4)。

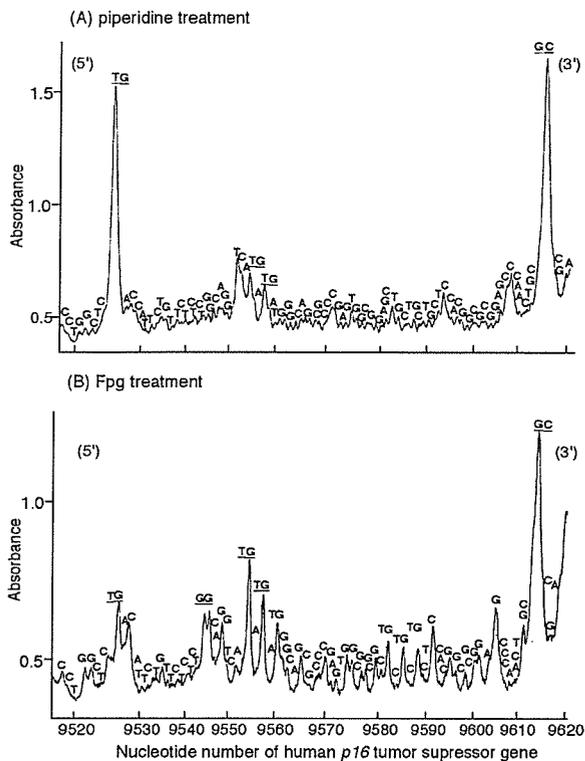


図 3. カプサイシンによるがん抑制遺伝子 *p16* における塩基配列特異的 DNA 損傷

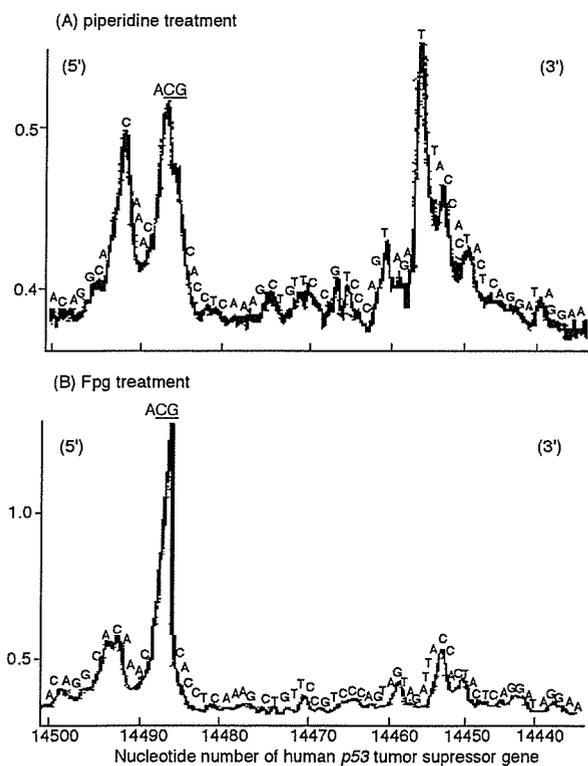


図 4. カプサイシンによるがん抑制遺伝子 *p53* における塩基配列特異的 DNA 損傷

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 (図 5)。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。

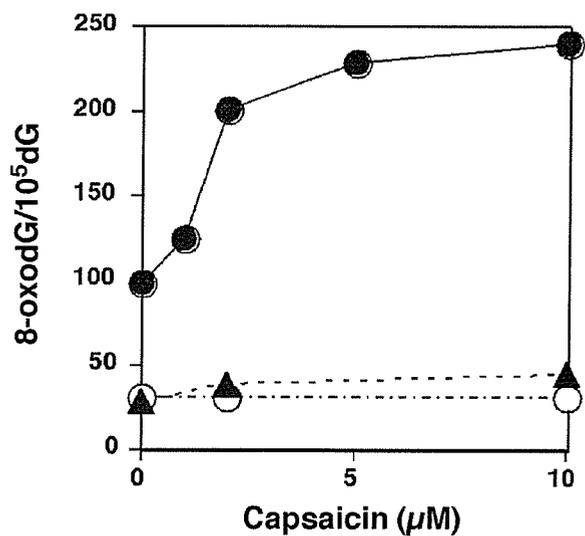


図 5. カプサイシンによる 8-oxodG 生成

#### D. 考察

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。この損傷はピ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、カタラーゼ及び Cu (I) キレート剤であるバソキュプロ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  $\cdot\text{OH}$  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。

## E. 結論

本研究結果から、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。

## G. 研究発表

### 1. 発表論文

1: 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.

2: 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.

3: 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.

### 2. 学会発表

1: 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

2: 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

3: 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

4: 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

5: 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

6: 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

厚生労働科学研究費補助金  
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（東京都健康安全研究センター参事研究員）

研究要旨：本研究は、銅イオンの存在下でカテキンが酸化性 DNA 傷害を誘発するという *in vitro* での報告を受け、共に食品添加物として用いられている銅化合物（グルコン酸銅を選択）とカテキン（緑茶カテキンを選択）の単独または複合投与の毒性（発がん性）について検索した。平成 16 年度は、グルコン酸銅単独の影響を複数の発がん物質投与下で予備的に検討した。平成 17 年度は、その成果を基に、グルコン酸銅とカテキンの単独または複合影響について、ラット中期多臓器発がん性試験法を用いて検索した。その結果、肝前がん病変の発生個数は、300ppm 以上のグルコン酸銅単独投与にて有意に増加したが、グルコン酸銅・カテキン併用群で増加しなかった。一方、前胃過形成の発生頻度は 6000ppm のグルコン酸銅単独投与にて有意に増加したが、カテキンの併用投与はグルコン酸銅によるこの現象を有意に抑制した。グルコン酸銅の単独またはカテキンとの併用投与下での他臓器への影響や、カテキン単独による被検臓器への影響は認められなかった。平成 18 年度は、以上の成果を基に、グルコン酸銅とカテキンの及ぼす生体影響の背景機構を詳細に検索するため、肝にターゲットを絞り、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、Fischer 344 系雄ラットに N-nitrosodiethylamine によるイニシエーション処置を施した 2 週間後からグルコン酸銅(0, 10, 300, 6000ppm 混餌)またはカテキン(5000ppm 混水)をそれぞれ単独で、あるいはグルコン酸銅 6000ppm とカテキンを併用して 6 週間投与した。全動物には、実験開始の 3 週間後に 2/3 部分肝切除を施行した。8 週間試験期間満了後、肝臓を採取して、免疫組織学的解析及び real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction による遺伝子発現解析を行った。一方、2 週間反復投与試験は、上記と同様の無処置ラットに、グルコン酸銅とカテキンを、上記と同様に 2 週間単独あるいは併用投与し、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、肝前がん病変である胎盤型 glutathione S-transferase 陽性細胞巢の発生個数、8-hydroxydeoxyguanosine 要請細胞数を指標とした酸化性 DNA 傷害発生程度、proliferative cell nuclear antigen 標識率を指標とした肝細胞増殖活性及び terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling 陽性細胞数を指標とした肝細胞アポトーシス発生程度は、グルコン酸銅 6000ppm 単独及びそのカテキン併用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  $\alpha$ , 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、グルコン酸銅との併用投与で、銅代謝能の亢進作用が推察されたが、発がん抑制作用が明らかでなかった。

## A. 研究目的

グルコン酸銅は、我が国において、銅塩類の一つとして、人工栄養児の銅強化の目的で 1983 年に食品添加物に指定された。グルコン酸銅は、これまで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かった。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においては食品添加物でなく食品成分扱いとされて幅広く用いられている。グルコン酸銅は、日本においても、2004年に、通常の食品の形態をしていない液剤・カプセル・顆粒・錠剤・粉末のであれば、栄養機能食品として使用できるよう使用基準を改正が行われ、許容上限摂取量（UL）が銅として 9mg/ヒト/日と設定された。

一方、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。これに含まれるいわゆるカテキン類としては、カテキン・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挙げられる。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、それらに基づいて、水産加工品・食肉加工品・菓子類・油脂・清涼飲料水等に食品添加物（酸化防止剤）として使用されている。

グルコン酸銅は、Ames 試験にて陰性で、反復投与毒性試験において、各種動物の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にされていない。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。しかしながら最近の報告では、変

異原性が無いか弱い、あるいは抗変異原性を示すとも言われている。90 日間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、現在、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。一方、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) を生成することが報告されている。そこで我々は、銅化合物とカテキン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 2 段階中期発がんモデルを用いて *in vivo* で検索を行うことにした。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、グルコン酸銅とカテキンの単独または複合影響について、ラット中期多臓器発がん性試験法を用いて検索した。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て有意に増加したが、グルコン酸銅・カテキン併用投与群で増加しなかった。一方、前胃過形成の発生頻度は 6000 ppm のグルコン酸銅単独投与にて有意に増加したが、カテキンの併用投与はグルコン酸銅によるこの現象を有意に抑制した。グルコン酸銅の単独またはカテキンとの併用投与下での他臓器への影響や、カテキン単独による被検索臓器への影響は認められなかった。平成 18 年度は、以上の成果を基に、グルコン酸銅とカテキンの及ぼす生体影響の背景機構を詳細に検索するため、肝にターゲットを絞り、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。

## B. 試験方法

### 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、

N-nitrosodiethylamine (DEN) は東京化成工業から購入した。

## 2. 動物及び飼育条件

動物は、5週齢の Fischer 344 雄性ラット（日本チャールス・リバー株式会社）を98匹入手し、1週間の検疫・馴化期間後、6週齢にて試験に供し、適切な無作為抽出法を用いて割り付けた。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22℃（下限19℃，上限25℃），55%（下限45%，上限70%），換気回数18回/時，12時間照明とした。動物は、各1匹ずつ，ステンレス網底側板アルミ打抜きブラケットケージ内に収容した。

## 3. 試験設計

### [中期肝発がん性試験]

本試験開始時には、第1～6群（各群12匹）の動物に対し 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）に対しては DEN の溶媒である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, 6000ppm 混餌) またはカテキン (5000ppm 混水) を単独で、あるいはグルコン酸銅 6000ppm 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, 6000ppm) を投与した。全ての動物には、実験開始の3週間後に、エーテル麻酔下で肝臓の左外側葉及び中間葉を切除する2/3部分肝切除術を実施した。8週間の試験期間終了後、全生存動物については、エーテル麻酔下で放血屠殺し、肉眼的病理学検査の後、肝臓を摘出して重量測定を行った。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、残余を凍結保存した。

群	DEN 処置	銅 (ppm)	カテキン (ppm)
1	有	0	0
2	有	10	0
3	有	300	0

4	有	6000	0
5	有	0	5000
6	有	6000	5000
7	無	0	0
8	無	6000	0

### [2週間反復投与試験]

本試験では、無処置の動物（各群5匹）にグルコン酸銅 (0, 10, 300, 6000ppm 混餌) またはカテキン (5000ppm 混水) を単独で、あるいはグルコン酸銅 6000ppm とカテキンを併用して、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。

群	銅 (ppm)	カテキン (ppm)
1	0	0
2	10	0
3	300	0
4	6000	0
5	0	5000
6	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回測定士、飲水量及び摂餌量は週1ないし2回測定した。

### [病理組織学的・免疫組織化学的検査]

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。具体的には、ホルマリン固定パラフィン包埋肝切片から薄切によって標本作製し、標本を脱パラフィン後に精製水にて湿潤して、過酸化水素を3%の濃度で加えたエタノールによる処理（室温）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、さらに、95℃の10%硫酸亜鉛水溶液中で30分間抗原賦活化処理を施行した後、2N塩酸中で核を変性させた。