

Table 2 Concentrations of Tyr and NO₂Tyr in mice liver samples

Group	Tyr ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$)	NO₂Tyr ($\text{pmol}/\text{mg protein}$)	NO₂Tyr/Tyr ($\mu\text{mol}/\text{mol}$)
Blank (Protease only)	2.53 \pm 0.14	ND	ND
Control	3.53 \pm 0.20	0.20 \pm 0.02	58.2 \pm 5.28
APAP 300 mg/kg (i.p.)			
2 hr	3.63 \pm 0.08	0.26 \pm 0.02*	71.7 \pm 4.28*
4 hr	3.43 \pm 0.17	0.28 \pm 0.02*	81.6 \pm 6.95*
8 hr	3.31 \pm 0.39	0.25 \pm 0.02*	75.5 \pm 10.9*

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

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

Table 3 Recoveries of Trp and NO₂Trp in digested mice liver samples (n=5)

	Added (nM)	Conc.	Recovery (%)	RSD (%)
Trp	250	333.6 ± 4.1	99.3	1.65
	500	603.9 ± 17.9	103.7	3.46
	0	85.4 ± 0.2	-	-
2-NO ₂ Trp	25	24.7 ± 0.5	98.8	2.05
	100	97.1 ± 4.6	97.1	4.76
	0	0	-	-
4-NO ₂ Trp	50	49.0 ± 4.7	97.9	9.57
	200	192.3 ± 7.0	96.1	3.63
	0	0	-	-
6-NO ₂ Trp	25	24.9 ± 1.9	99.5	7.44
	100	98.4 ± 1.8	98.4	1.81
	0	0	-	-

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

食品中に多量に含まれるフェノール系酸化防止剤の茶カテキンについて、ラット2段階発がんモデルを用いて NaNO_2 との複合投与による胃発がんの修飾作用を検証した。この結果、茶カテキンと亜硝酸の複合投与は、MNNG で誘発された前胃腫瘍の発生率及び発生頻度を有意に上昇させた。また、*in vitro* ESR によりカテキン類と一酸化窒素 (NO) の共存下で OH ラジカルの発生が確認され、実際に茶カテキンと NaNO_2 の複合投与により前胃粘膜の 8-OHdG レベルも有意に増加した。したがって、茶カテキンもまたアスコルビン酸や他のフェノール系抗酸化物質と同様に、亜硝酸との複合で前胃発がんを促進することが明らかとなり、その機構には亜硝酸由来の NO とカテキン類が反応して生じる OH ラジカルが関与する可能性が示唆された。

ヒトにおけるリスク評価の一環として、ヒトの逆流性食道炎に類似した病態を示す慢性酸型逆流性食道炎モデルラットを作成し、アスコルビン酸と NaNO_2 の複合投与による食道発がん性を検討した。複合投与により、食道の粘膜上皮過形成の重篤度が有意に増加し、複合投与群にのみ乳頭腫の発生がみられた。さらに、同モデルに発がんイニシエーターDHPN 投与を組み合わせさせた 2段階発がん試験では、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が増加し、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。

AsA と亜硝酸の複合はラット前胃粘膜 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。酸化的 DNA 損傷による遺伝毒性を検証するため、*mutM* (8-OH-G DNA glycosylase) 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 株に比べてその *mutM* 欠損株でより明確に複合遺伝毒性が認められた。しかし、ラットに AsA と 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。したがって、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生合成が減少し、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複合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の関与が示唆されている。

AsA と同様に、ヒドロキノン、カテコールなどのフェノール系抗酸化物質も亜硝酸との複合投与によりラット前胃発がんを増強する。そこで本研究では、ヒトが食事中から多量に摂取しているフェノール系抗酸化物質の茶カテキンについて、発がんイニシエーターとして *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitroso-guanidine (MNNG) を用いたラット 2 段階発がんモデルを用いて NaNO₂ との複合投与による胃発がんの修飾作用を病理組織学的に検索した。また、短期試験により酸化的 DNA 損傷を検索するとともに *in vitro*実験によりラジカルの発生を

検出し、これら 2 剤の複合による発がんへの酸化的ストレスの関与を検証した。

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限られており、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複合投与による発がん機構の解明は、ヒト食道がん一次予防の観点からも重要と考えられる。そこで本研究では、前胃と同様の組織構造を有する食道に対する影響を調べるために、ヒトの逆流性食道炎に類似した病態を示すラットの胃液逆流型慢性逆流性食道炎モデルを作成し、亜硝酸と AsA の複合投与の食道に対する影響及び食道発がん促進作用を検証した。

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 の長期複合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、亜硝酸と 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 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。そこで本研究では、2 剤複合の酸化 DNA 損傷による遺伝毒性を検証する目的で、酸化 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 *in vivo* 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. 茶カテキンと NaNO_2 複合投与の胃プロモーション検索試験 (Fig. 1)

茶カテキン(茶抽出物:総カテキン 83.1%、カフェイン 0.27%)は太陽化学株式会社から供与された。6 週齢の F344 ラット雄 120 匹を使用した。このうち 80 匹は腺胃のイニシエーション処置として 0.01% NMMG (飲水)及び 5% NaCl (混餌)を 10 週間複合投与した。加えて、9 週目に 16 時間の絶食後 100 mg/kg 体重の MNNG (媒体:50%DMSO 水溶液)を強制経口投与して前胃に対するイニシエーション処置を行った。残る 40 匹は未処理群として基礎飼料及び蒸留水を与え、9 週目には媒体のみを強制経口投与した。11 週目にイニシエーション処理群及び未処理群の動物をそれぞれ 4 群に分けた。イニシエーション処理群は各群 20 匹、未処理群は各群 10 匹とした。それぞれの群には次の被験物質を投与した(1 群:基礎飼料、

2 群:1.0%カテキン混餌投与+0.2% NaNO_2 飲水投与、3 群:1.0%カテキン、4 群:0.2% NaNO_2)。実験期間終了後に解剖し、腺胃及び前胃の病理組織学的検索を行った。

2. 前胃粘膜 8-OHdG レベル測定

6 週令の F344 ラット雄 42 匹を使用した。16 時間の絶食後、カテキンと亜硝酸をそれぞれ 1.0%混餌及び 0.2%飲水で投与し、8, 12, 24 時間後及び 1 週間後に解剖して前胃粘膜を採取した。同様に、基礎飼料を与える対照群を設けた。また、投与 24 時間後の時点については、カテキン及び亜硝酸の単独投与群も設けた。8, 12, 24 時間及び 1 週間後の各時点の動物数はそれぞれ、5, 5, 5 及び 3 匹とした。採取した前胃粘膜から DNA Extraction WB キット (Wako) と GenTLE 共沈剤 (タカラバイオ) を用いて DNA を回収し、Nuclase P1 と alkaline phosphatase により消化した。得られた試料は HPLC/UV/ECD により 8-OHdG 及び dG 量を測定した。8-OHdG レベルは 8-OHdG/10⁵dG として求めた。

3. OH ラジカルの検出

スピントラッピング剤に DMPO を使い、ESR により OH ラジカルを検出した。カテキン類は、茶カテキンのうち含量の多い 4 種を用いた。0.1 mL のエピカテキン、ガロカテキン、エピカテキンガレートまたはエピガロカテキンガレートを 1 mM DTPAC 含有のリン酸緩衝液 (100 mM, pH 7.4) に添加した後、5 μL DMPO と 0.1 mL の 1 mM NOC-7 を加えて混合した。この試料を ESR 測定用 200 μL 扁平石英セルに移し、ESR 測定を行った。

4. 逆流性食道炎ラットへの複合投与 (Fig. 4)

8 週齢の雄の F344 ラットを 24 時間の絶食後、ネンブタール麻酔下で開腹した。幽門輪直下の十二指腸を幅約 2 mm の 18Fr ネラトンカテーテル片 (直径 4 mm) で被覆し、脱落防止のため 5-0 ナイロン糸で胃の漿膜に固定した。さらに、2-0 絹糸で前胃腺胃境界部の結紮を行った。2 週間の回復期間後、ラット 45 匹を 4 群 (1 群: 9 匹、2 群: 9 匹、3 群: 9 匹、4 群: 15 匹) に分け、それぞれの群には次の被験物質を投与した (1 群: 基礎飼料、2 群: 1.0%AsA 混餌投与、3 群: 0.2%NaNO₂ 飲水投与、4 群: 1.0%AsA+0.2%NaNO₂)。32 週間の投与期間の後、解剖して食道を採取した。ホルマリン固定した食道を上、上中、中下及び下部 (それぞれ P1 から P4 とした) に 4 等分し、それぞれの場所から 3 片を切り出して病理組織学的検索を行った。死亡動物についても、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。

5. 食道プロモーション検索試験 (Fig. 5)

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 週齢で胃液逆流のための手術を行った (方法前述)。1 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 (方法前述)。死亡動物についても、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。

6. 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 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。

7. 前胃イニシエーション検索試験 (Fig. 7)

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%NaNO₂ 飲水投与、3 群: 1.0%AsA、4 群: 0.2%NaNO₂、5 群: 基礎飼料)。第 5 群には陽性対照として、投与開始日に前日から 16 時間絶食した後 100 mg/kg 体重の MNNG (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。

C. 研究結果

1. 亜硝酸と茶カテキンの複合投与による前胃発がん促進作用

亜硝酸と茶カテキンの複合投与により、MNNGで誘発された前胃の乳頭腫及び扁平上皮癌の発生頻度並びに多発性が有意に増加した ($P < 0.05$, 0.01)。複合投与群に生じた扁平上皮癌のうち2例は漿膜への浸潤像が認められ、扁平上皮癌の深達度も上昇した (Table 1)。一方、腺胃腫瘍には複合投与の影響は認められなかった。前胃粘膜DNA中の8-OHdGレベルは、複合投与後24時間以降に有意な高値を示した ($P < 0.05$, 0.01 , Fig. 2)。ESRによるラジカルの検出では、NO発生剤のNOC7とエピガロカテキンガレート及びエピカテキンガレートをインキュベーションした時に、OHラジカルの発生がみられた (Fig. 3)。

2. 胃酸逆流下での複合投与の影響

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により死亡した。最終的な生存率は対照群、AsA単独、 NaNO_2 単独及び複合投与群でそれぞれ22、67、67及び53%であった。最初の死亡動物 (NaNO_2 単独投与群、投与5週死亡) から食道粘膜上皮の過形成が認められたため、標本作成が不可能な個体を除くすべての死亡動物について生存動物と同様に食道の増殖性病変を評価した。病理組織学的には、食道炎手術により食道下部に粘膜上皮過形成が認められたが、複合投与により病巣の範囲は食道の中及び上部へと拡大し、過形成の重篤度も有意に増加した ($P < 0.05$, 0.01)。また、複合投与群の1例には乳頭腫が認められた

(Table 2)。

3. 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により死亡した。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_2 単独及び複合投与群でそれぞれ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_2 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 3)。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 4)。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 5, 6)。

4. 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_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た。S9mixを含まない条件では、2500及び5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で濃度依存的に復帰株数の増加がみられ、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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 μ g/plate では AsA を含まない対照値の約 3 倍になった (Fig. 6)。

5. 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 7)。

D. 考察

食品中に多量に含まれるフェノール系酸化防止剤のカテキンは他の酸化防止剤と同様に NaNO_2 との複合投与により前胃に対する発がんプロモーション作用を有することが明らかになった。亜硝酸は胃内の低 pH 条件下で NO を発生させることが知られている。ESR では OH ラジカルの発生が検出され、実際に前胃粘膜上皮 DNA の 8-OHdG レベルも投与 24 時間後から上昇した。したがって、これら 2 剤の複合による前胃発がん促進作用には、亜硝酸由来の NO とカテキンとの反応で生じる OH ラジカルが関与している可能性が示唆された。

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、本実験の結果から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_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。*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_2 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

亜硝酸と茶カテキンの複合投与は、ラット前胃発がんを促進することが明らかになった。また、その発がん機構にはNOを介した酸化ストレスの関与が示唆された。

亜硝酸とアスコルビン酸の複合投与は、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になった。したがって、特に逆流性食道炎の患者においては亜硝酸と酸化防止剤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。

亜硝酸とアスコルビン酸の複合は、酸化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. 研究発表

1. 投稿論文

- 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) Sugira 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]quinoline (MeIQx)-treated rats. *J Toxicol Pathol*. 18: 99-104, 2005.

- 3) 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.
- 4) Kitamura Y, Umemura T, Kanki K, Ishii Y, Kuroiwa Y, Masegi T, Nishikawa A, Hirose M. Lung as a new target in rats of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline carcinogenesis: Results of a two-stage model initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer Sci*. 97: 368-373, 2006.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Ishii Y, Iijima M, Umemura T, Nishikawa A, Iwasaki Y, Ito R, Saito K, Hirose M, Nakazawa H. Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry in livers of mice administered acetaminophen. *J Pharm Biomed Anal.*, 2006, in press.
- 9) 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.
2. 学会発表
- 1) 広瀬雅雄：食品中化学物質の複合摂取と発がん性. 平成 16 年度厚生労働科学研究シンポジウム 食と安全の化学 2004 年 11 月、2005 年 1 月
- 2) 黒岩有一, 石井雄二, 梅村隆志, 神吉けい太, 西川秋佳, 中澤裕之, 広瀬雅雄：茶抽出物（カテキン類）と亜硝酸ナトリウムの併用投与による前胃発がん促進作用. 第 22 回日本毒性病理学会 2006 年 1 月 26 日
- 3) Yuji Ishii, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, Keita Okano, Tomononari Yajima, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Masao Hirose Hiroyuki Nakazawa. Quantitation of protein-bound nitrotyrosine by liquid chromatography with mass spectrometry in liver of mice administered acetaminophen. *Separation in the BioSciences (SBS) 2005* (2005 年 9 月・Utrecht)
- 4) Yuji Ishii, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Masao Hirose, Hiroyuki Nakazawa. A possible involvement of nitric oxide-mediated oxidative stress in the induction of rat forestomach damage and cell proliferation by the combined treatment with catechol and sodium nitrite. *Pacificchem. 2005* (2005 年 12 月・Honolulu)
- 5) Yuji Ishii, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, Keita Okano, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Masao Hirose, Hiroyuki Nakazawa. Determination of peroxynitrite-derived nitrotyrosine in mice liver by Liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *PITCON 2006* (2006 年 3 月・Orlando)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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
- 9) 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)
- 10) 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
- 11) 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)
- 12) 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
- G. 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

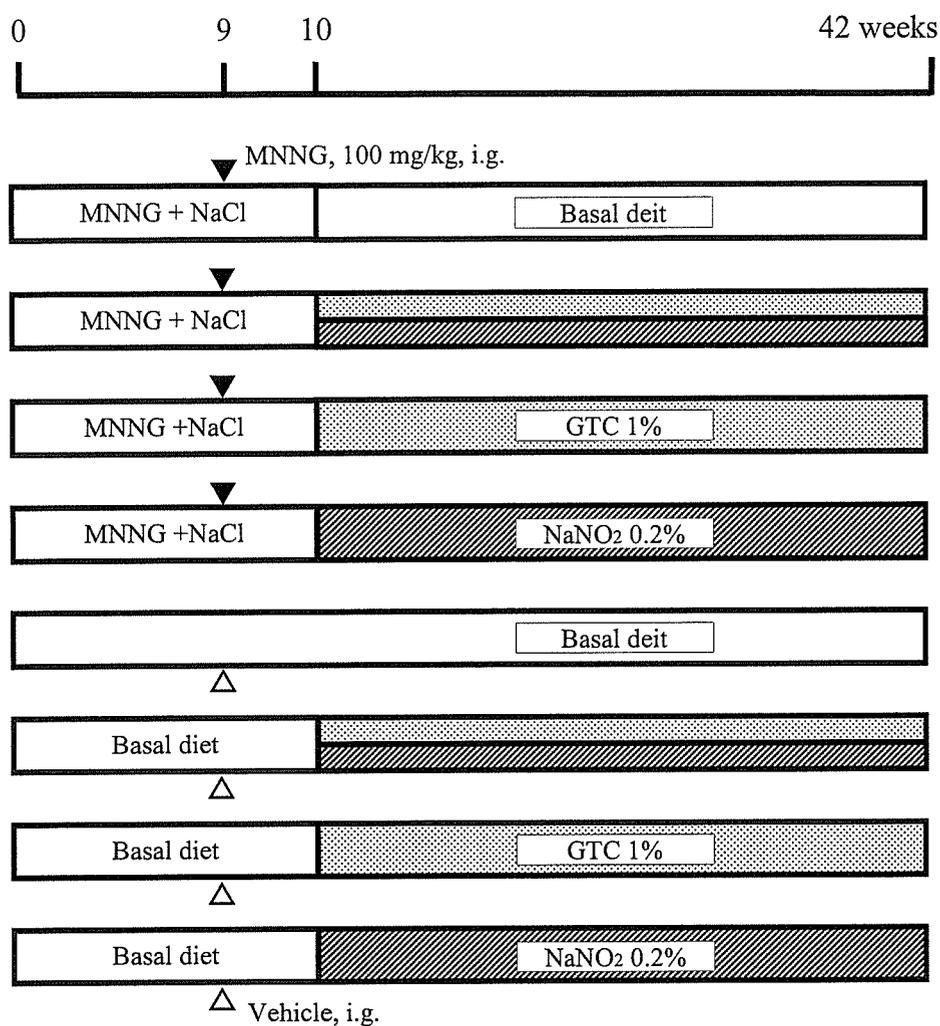


Fig. 1. Experimental design of the 2-stage carcinogenesis study in the stomach

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

Treatment	Number of rats	Papilloma		SCC		Invasion serosa
		Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)
MNNG →						
Basal diet	16	7 (44)	0.44 ± 0.51	3 (19)	0.19 ± 0.40	0
1% GTC + 0.2% NaNO ₂	20	16 (80)*	1.70 ± 1.59††	11 (50)*	1.05 ± 1.64†	2 (10)
1% GTC	19	1 (5)*	0.05 ± 0.23	2 (16)	0.16 ± 0.50	0
0.2% NaNO ₂	20 ^a	4 (20)	0.30 ± 0.73	2 (10)	0.10 ± 0.31	0
Vehicle →						
Basal diet	10	0	-	0	-	0
1% GTC + 0.2% NaNO ₂	10	0	-	0	-	0
1% GTC	10	0	-	0	-	0
0.2% NaNO ₂	10	0	-	0	-	0

SCC; Squamous Cell Carcinoma, GTC; Green tea catechin

a: including one dead animal

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

† P<0.05, †† P<0.01 (vs. the basal diet group, Tukey-Kramer's test)

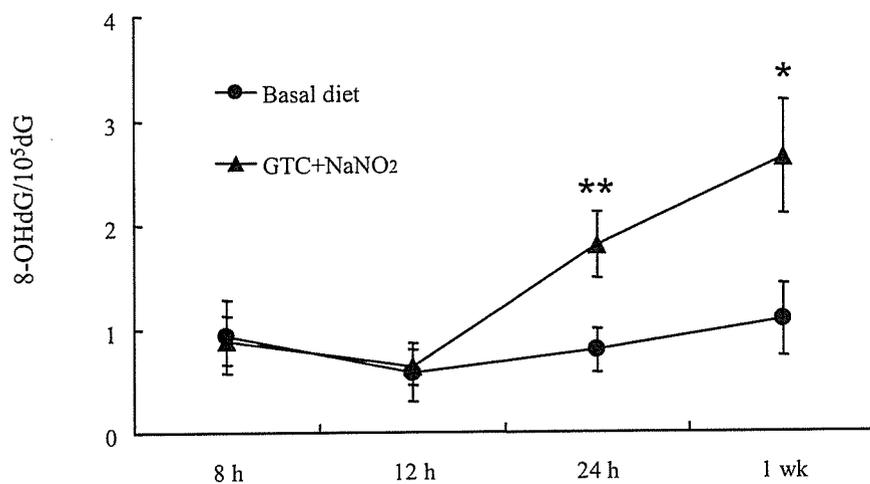


Fig. 2. Sequential changes in 8-OHdG levels in forestomach epithelium of rats given green tea catechin (GTC) and NaNO₂ for 8, 12 or 24 h or 1 week.

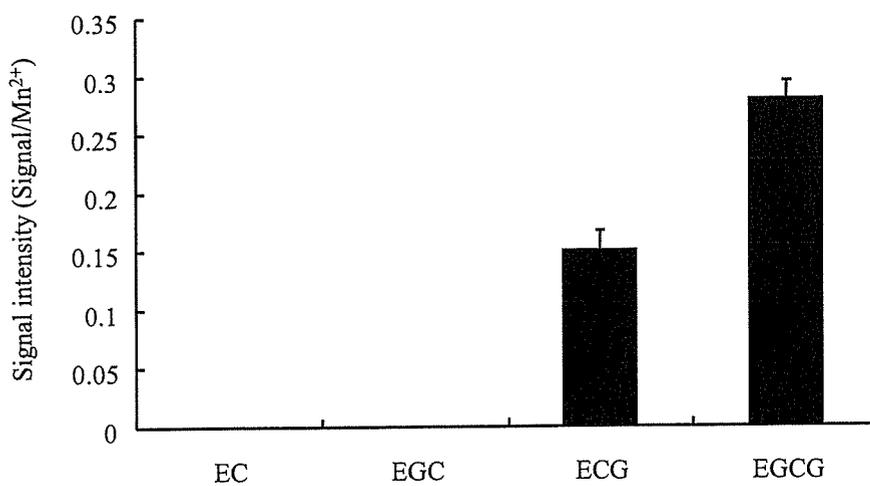


Fig. 3. ESR signal intensity in the reaction with NOC-7 and catechins. EC, (-)-epicatechin; ECG, (-)-epicatechin gallate; EGC, (-)-epigallocatechin; EGCG, (-)-epigallocatechin gallate.

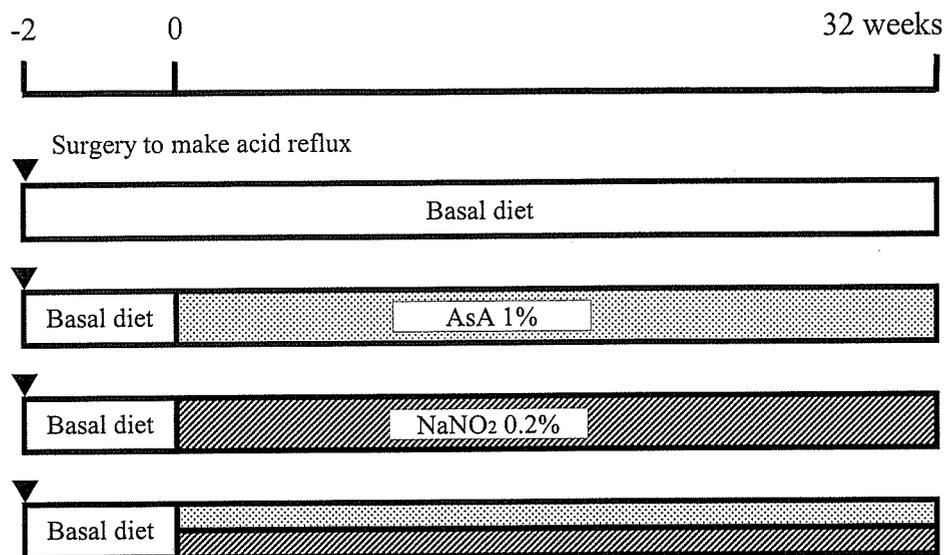


Fig. 4. Experimental design in the acid reflux model rats

Table 2. Incidence of proliferative lesions in the esophagus of reflux esophagitis rats

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

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

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

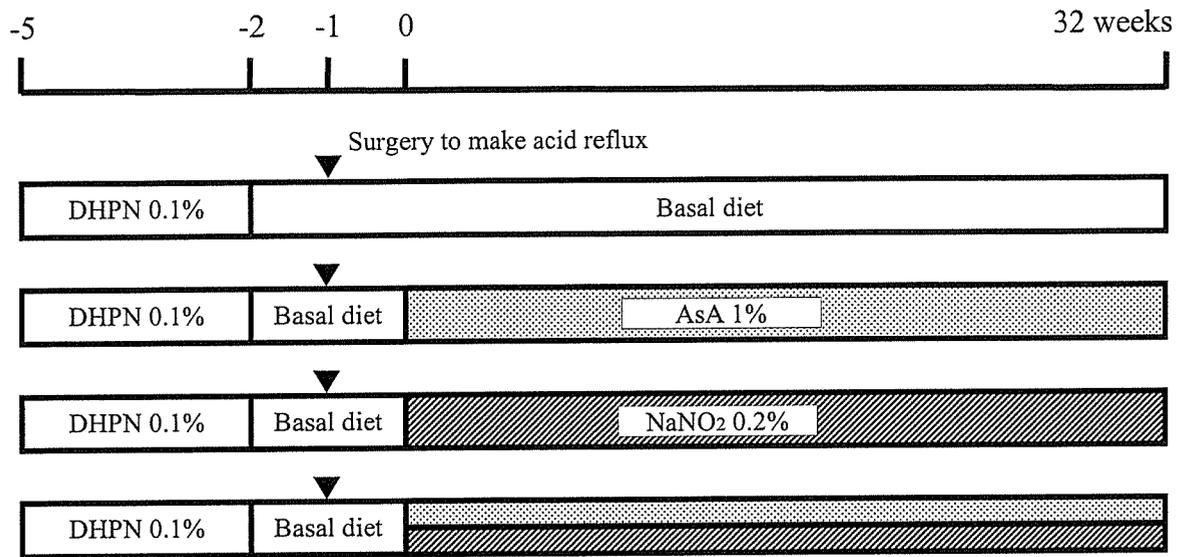


Fig. 5. Experimental design of the 2-stage carcinogenicity study in the acid reflux model rats

Table 3. Macroscopic nodule in the esophagus of DHPN treated reflux esophagitis rats

	Basal diet	1% AsA	0.2% NaNO ₂	AsA + NaNO ₂
n=	11	13	15	16
Number of nodule	5	3	2	5
Volume of nodule ^a (mm ³)	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 4. Incidence of epithelial hyperplasia in the esophagus of DHPN treated reflux esophagitis rats

Esophagus	Treatment	Basal diet	1% AsA	0.2% NaNO ₂	AsA + NaNO ₂
		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 5. Incidence of neoplastic lesions in the esophagus of DHPN treated reflux esophagitis rats

Esophagus	Treatment	Basal diet	1% AsA	0.2% NaNO ₂	AsA + NaNO ₂
		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 6. Number and multiplicity of neoplastic lesions in the esophagus of DHPN treated reflux esophagitis rats

Esophagus	Treatment	Basal diet n= 23	1% AsA 22	0.2% NaNO ₂ 21	AsA + NaNO ₂ 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

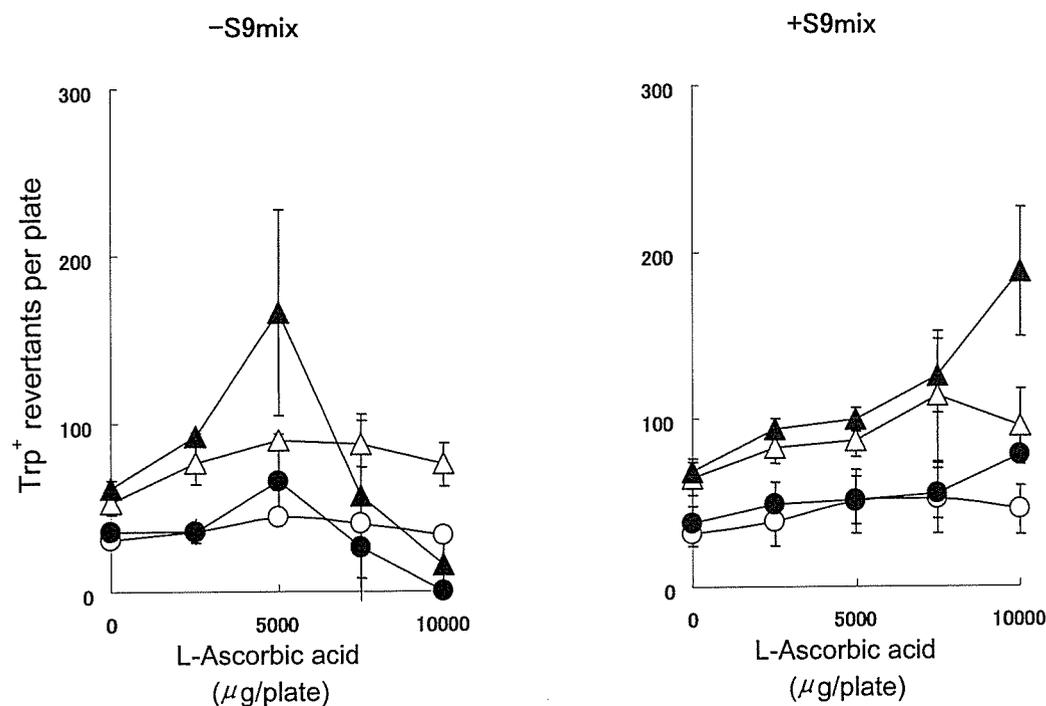


Fig. 6. Mutation rates of combination with AsA and NaNO₂ in the *E. coli* strain deficient in *mutM*.
 ○, WP2 *uvrA*/pKM101 (0 μg/plate NaNO₂); ●, WP2 *uvrA*/pKM101 (100 μg/plate NaNO₂); △, WP2 *mutM uvrA*/pKM101 (*mutM* deficient, 0 μg/plate NaNO₂); ▲, WP2 *mutM uvrA*/pKM101 (*mutM* deficient, 100 μg/plate NaNO₂).

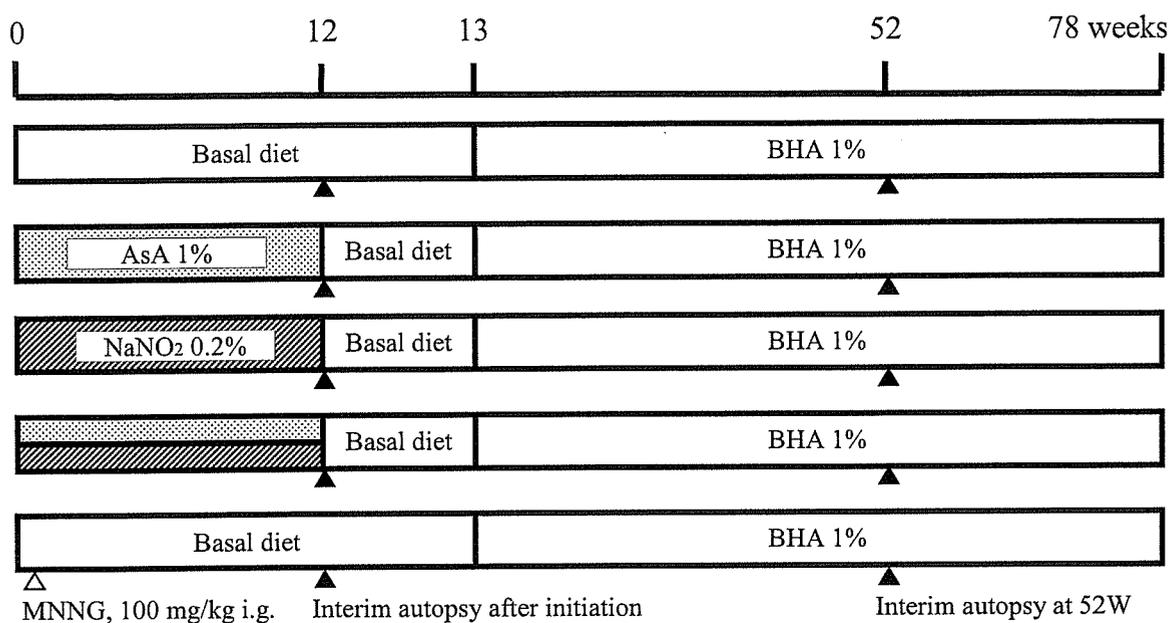


Fig. 7. Experimental design of the 2-stage carcinogenicity study in the forestomach

Table 7. Incidence of proliferative lesions in the forestomach of rats treated with BHA after treatment with AsA and NaNO₂

Stage	Treatment	Basal diet	1% AsA	0.2% NaNO ₂	AsA + NaNO ₂	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

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：がんの原因として、食餌性因子は約 35%を占めているといわれており、最も重要な因子である。食品は、残留農薬や食品添加物等の種々の化学物質を含み、それらと鉄や銅、マンガン等の金属とが相互作用し、活性酸素を介して DNA 傷害をきたす可能性がある。また、健康効果を謳うサプリメントは一般の食品からの摂取に比べ、化学物質を大量に摂取することが起こりえる。がん予防の観点から、これらの種々の食餌性因子による DNA 傷害の機構を解明することは重要である。本研究事業では、丁子から抽出される食品添加物オイゲノール、動物用医薬品ニトロフラゾン、唐辛子の辛み成分カプサイシン、サプリメントとして摂取されることの多い化学物質として、老化防止・健康増進を期待されるピクノジノールの成分である procyanidin B2、健康食品アガリクスの成分である 4-hydrazinobenzoic acid、その他の食品中化学物質について検討した。食餌性因子のヒト発がんへのリスクを科学的に評価し、がん予防を有効に進めるための基礎資料を得た。本研究事業は、安心・安全な食生活の推進に非常に有意義である。

A. 研究目的

がんの原因として、食餌性因子は約 35%を占めているといわれており、最も重要な因子である。食品は、残留農薬や食品添加物等の種々の化学物質を含み、それらと鉄や銅、マンガン等の金属とが相互作用し、活性酸素を介して DNA 傷害をきたす可能性がある。また、高齢社会を迎えた我が国において、健康増進・疾病予防を目指して多くの健康食品が利用されている。健康効果を謳うサプリメントは一般の食品からの摂取に比べ、化学物質を大量に摂取することが起こりえる。がん予防の観点から、食餌性因子に

よる DNA 傷害の機構を解明することは重要である。本研究事業では、分子遺伝学的手法、細胞工学的手法および物理化学的手法を駆使することによって、食餌性因子のヒト発がんへのリスクを科学的に評価し、がん予防を有効に進めるための基礎資料を得ることができた。平成 16 年度においては、丁子から抽出される食品添加物オイゲノールおよび動物用医薬品ニトロフラゾンと金属との複合による DNA 傷害について検討した。平成 17 年度においては、サプリメントとして摂取されることの多い化学物質として、老化防止・健康増進を期待されるピクノジノ

ールの成分である procyanidin B2 および健康食品アガリクスの成分である 4-hydrazinobenzoic acid について検討した。平成 18 年度においては、唐辛子の辛み成分カプサイシンについて検討した。

B. 研究方法

ヒトがん原遺伝子 *c-Ha-ras-1* 及びがん抑制遺伝子 *p53* や *p16* から変異のホットスポットを含む 100~400 bp の断片をサブクローニングした。これらのヒトがん関連遺伝子の DNA 断片の 5'末端を ^{32}P で標識し、食品中化学物質および各種生体内物質（金属、還元物質、代謝酵素等）と共にリン酸緩衝液（pH 7.8）中で反応し、ピペリジンあるいは Fpg 処理後に電気泳動を行い、DNA 損傷性を検討した。DNA 損傷の塩基配列特異性の解析には Maxam-Gilbert 法を応用し、オートラジオグラムをレーザーデンシトメーターで定量化し解析した。さらに、酸化的 DNA 損傷の指標の一つである 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) を電気化学検出器付 HPLC (HPLC-ECD) を用いて定量した。また、飛行時間型質量分析計、分光光度計および電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いて活性種および DNA 損傷機構を推定した。食品中化学物質による細胞増殖活性を E-screen assay で測定した。

C. 研究結果

I. 食品添加物オイゲノール

丁子から抽出されるオイゲノールは、食品添加物として使用されているが、マウスで肝腫瘍の報告がある。オイゲノールを種々薬物代謝酵素 CYP で処理したところ、CYP2D6 で前処理したオイゲノールは Cu(II) の存在下で最も強く DNA を損傷した (図 1)。

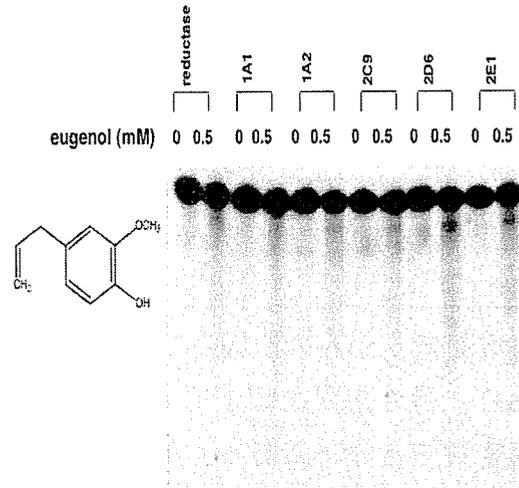


図1. 多種のCYP存在下におけるオイゲノールによるDNA損傷

この損傷はカタラーゼによって抑制され、過酸化水素の関与が示唆された。

飛行時間型質量分析計によりオイゲノールは CYP2D6 により O-脱メチル化体に代謝されたことが明らかになった (図 2)。

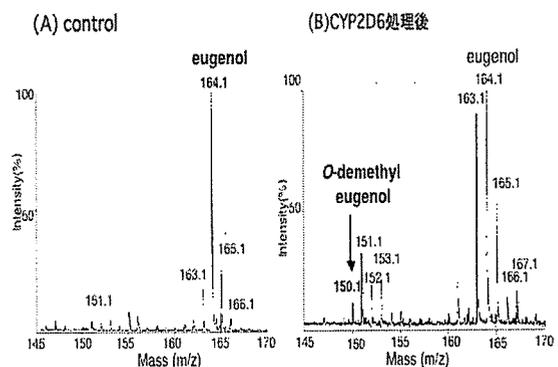


図2. 飛行時間型質量分析計によるオイゲノール代謝物の検出

以上の結果から、薬物代謝酵素でカテコール体代謝物ができ、Cu(II) の存在下で活性酸素を生成して酸化的に DNA を損傷することが示唆された。オイゲノールによる発がん機構には、これまで付加体が重要と考えられてきたが、代謝物による酸化的 DNA 損傷も重要な役割を果たしていると考えられた。