

II. 動物用医薬品ニトロフラゾン

我々は女性生殖器系癌の発症機構としてエストラジオール代謝物による DNA 損傷とエストラジオール自体の細胞増殖作用がそれぞれ発がんのイニシエーションとプロモーションに関与することを提唱した(Int. J. Cancer, 92,333-337,2001)。

ニトロフラゾンは畜産動物の抗菌剤として使用されてきたが、動物実験において乳腺や卵巣などの生殖器腫瘍の発生が報告されている。ニトロフラゾンによる雌性生殖器系発がん機構の解析を目的として、酸化的 DNA 損傷と細胞増殖活性について検討した。

その結果、ニトロフラゾンは cytochrome P450 reductase および Cu(II)の両者の存在下で、p53 がん抑制遺伝子の hotspot の 1 つであるコドン 273 の相補対である 5'-ACG-3'配列で強い損傷を起こした(図 3)。また、DNA 損傷はカタラーゼで抑制された。ニトロフラゾンは培養細胞の 8-oxodG 生成量を有意に増加させた。

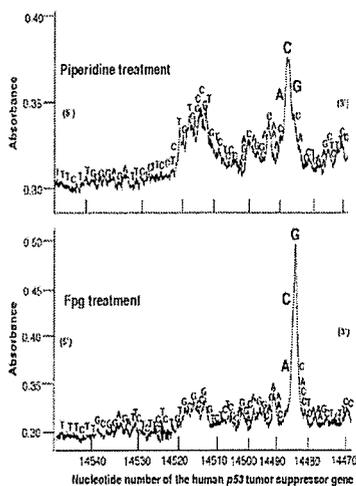


図3. ニトロフラゾンによるDNA損傷の塩基特異性

ESR 法ではニトロフラゾンを cytochrome P450 reductase および NADPH の両者の存在下で反応させた場合のみフ

リーラジカルのシグナルが観察された。このラジカルはシミュレーションの結果、hyperfine coupling constant は、 $a^N_{NO_2} = 1.109 \text{ mT}$, $a^{H_4} = 0.593 \text{ mT}$, $a^{H_3} = 0.151 \text{ mT}$, $a^N_{CH=N} = 0.244 \text{ mT}$, $a^{H_{CH=N}} = 0.117 \text{ mT}$ であり、ニトロフラゾンの一電子還元により生じるニトロアニオンラジカルであることが判明した(図 4)。

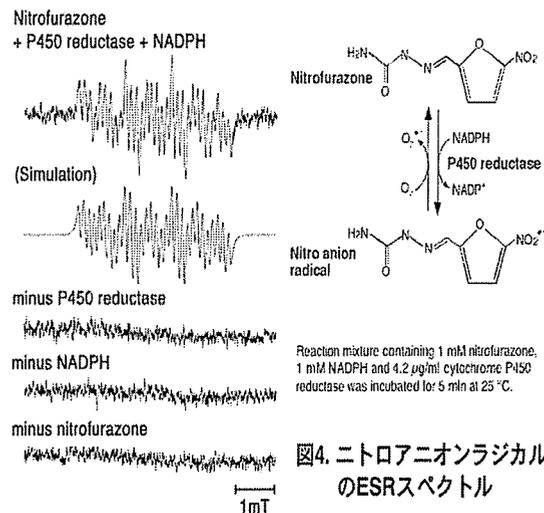


図4. ニトロアニオンラジカルのESRスペクトル

ニトロフラゾンの女性生殖器への細胞増殖活性を検討するために E-screen assay を応用してエストロゲン受容体をもつヒト乳癌由来 MCF-7 細胞に対する増殖活性を検討した(図 5)。ニトロフラゾン 100 nM 以上で有意な細胞増殖が認められ、10 μM ではエストロゲン活性の約 8 割の活性がみられた。一方、エストロゲン受容体のない MCF-10A 細胞においては細胞増殖活性は認められなかった。

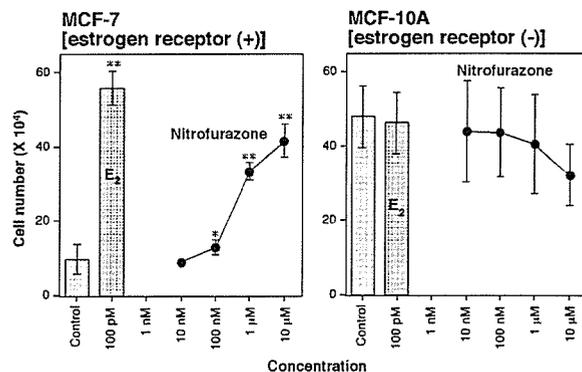


図5. ニトロフラゾンのエストロゲン活性

以上の結果から、ニトロフラゾンは酵素的に一電子還元を受け、ニトロアニオンラジカルとなり、再び自動酸化を受けて酸化還元サイクルを形成する。その過程で生成された H_2O_2 と $Cu(I)$ から成る活性種が DNA 損傷を起こすと考えられる。DNA 損傷をもたらす活性種は大部分がこの酸化還元サイクルに由来すると考えられる。さらに、ニトロフラゾンはエストロゲン依存性ヒト乳癌細胞 MCF-7 を有意に増殖させた。ニトロフラゾンは代謝物による酸化的 DNA 損傷を介したイニシエーションに関与し、また、ニトロフラゾン自体がエストロゲン活性を有することから細胞増殖を介したプロモーションにも関与し、両者が協奏的に作用して発がんをもたらすと推定される。

III. プロシアニジン B2

プロシアニジン B2 (procyanidin B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin]; PCN B2) は、ココア豆、ブドウの種子、リンゴの皮、松皮 (ピクノジノール) に含まれるエピカテキンの二量体である。その抗酸化作用から癌や循環器疾患の予防への期待が持たれている。我々の以前の研究により、カテキンは銅あるいは鉄の存在下で DNA 損傷することを見いだしている。一方、プロシアニジン B2 は過酸化水素と $Fe(II)$ の存在下ではプロシアニジン B2 は DNA 損傷に対し抑制効果があることを見いだしている。ここでは、プロシアニジン B2 と金属の複合による DNA 傷害を検討した。

培養細胞を用い、8-oxodG を定量した結果(図 6)、200 μM と高濃度の PCN B2 で 18 時間処理すると、8-oxodG の有意な上昇が認められた。

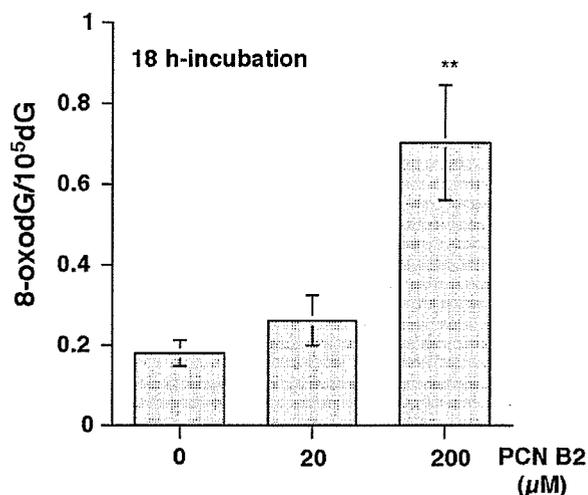


図 6. PCN B2 による細胞内 8-oxodG 生成

(** ; $P < 0.01$ compared with control)

牛胸腺 DNA を用い、金属イオンおよび過酸化水素存在下での 8-oxodG 生成量を検討した結果(図 7)、 $Cu(II)$ 存在下で 8-oxodG 生成は有意に上昇し、過酸化水素の添加により著しく 8-oxodG 生成が増強した。

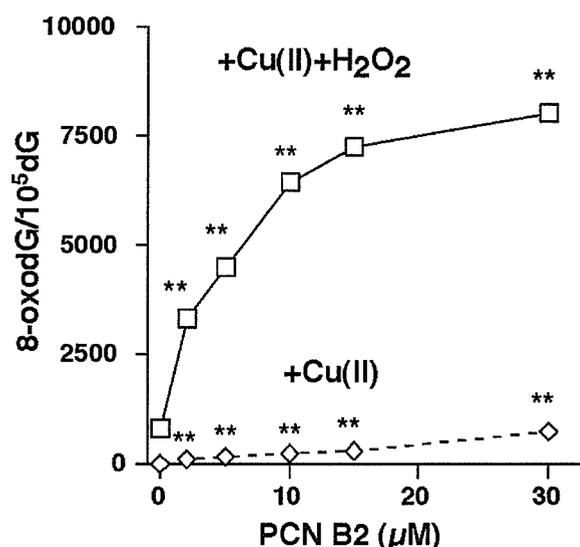


図 7. PCN B2 による 8-oxodG 生成と過酸化水素添加による増強効果 (** ; $P < 0.01$ 対照に対して)

電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いて 3,3,5,5-tetramethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (M4PO) により過酸化水素と金属イオンから生成する $\cdot OH$ をトラップし、PCN B2 によるラジカル生成への影響を検討した (図 8)。 $Cu(II)$ および過酸化水素存在下で生じる $\cdot OH$ のシグナル強度は PCN B2 を

加えることにより増強した。

Cu(II)+H₂O₂



Cu(II)+H₂O₂+PCN B2



1 mT

図 8. PCN B2 による・OH 生成増強効果

以上の結果から、PCN B2 は銅イオンとの複合により酸化促進作用をもたらす可能性が示唆された。

IV. アガリクス 4-hydrazinobenzoic acid

栽培マッシュルーム *Agaricus bisporus* は、日本名をツクリタケといい、広く食用されている。栽培マッシュルームを摂餌させたマウスに種々のがんが誘発されることから、発がん性が指摘されている。また、4-hydrazinobenzoic acid(4-HBA) は栽培マッシュルームに含まれる成分の一つであり、健康食品アガリクスの成分でもある。4-HBA はマウスの大動脈平滑筋に肉腫を誘発することが報告されている。4-HBA の DNA 傷害性を検討した。

4-HBA は Cu(II)存在下で濃度依存的に DNA 損傷性が認められた (図 9A)。catalase の添加により DNA 損傷は抑制され、過酸化水素を介した経路があることが明らかとなった (図 9B)。一方、Cu(II)および catalase 存在下においても 4-HBA の濃度依存的に DNA 損傷が認められた (図 9B) ことから、過酸化水素以外の DNA 損傷経路があることが示唆された。また、この DNA 損傷はバソキュプロイン (Cu キレート剤) により抑制され、活性種の生成に Cu の関与が示唆された。

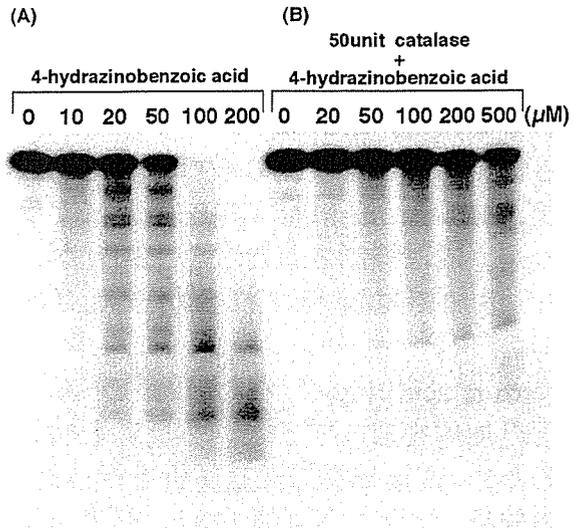


図 9. 4-HBA による DNA 損傷と catalase の効果

Maxam-Gilbert 法を応用し DNA 損傷の塩基特異性を検討した。catalase 非存在下ではチミン、シトシンの損傷が強かった (図 10A)。一方、catalase 存在下ではグアニン、アデニンが強く損傷され、シトシンも損傷された (図 10B)。

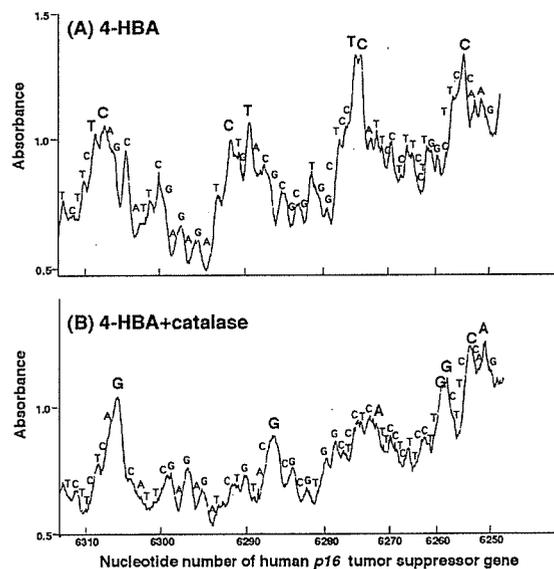


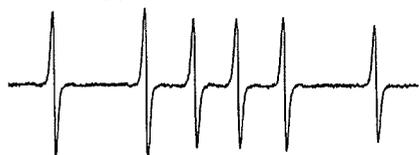
図 10. 4-HBA による DNA 損傷の塩基特異性

牛胸腺 DNA と 4-HBA を Cu(II)存在下で反応させたところ、8-oxodG の生成は濃度依存的に上昇した。一方、catalase 存在下では 8-oxodG の生成は認められなかった。

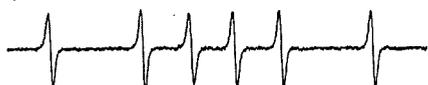
スピントラップ剤 DMPO を用いた ESR の測定結果から 炭素中心ラジカルである benzoic acid ring C ラジカルが生成されていることが認められた (図 11A)。また、dGMP、dAMP、CMP の添加でラジカル生成は抑制された (図 11B-D) が、TMP 添加では抑制されなかった (図 10E)。

benzoic acid ring C ラジカルが DNA 塩基と付加体を形成するという反応を検討するため、質量分析による解析を行った。その結果、アデニン (図 12A)、グアニン (図 12B) と benzoic acid ring C ラジカルは付加体を形成していることが検出された。

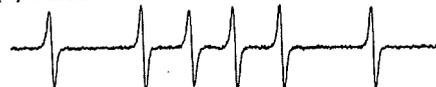
(A) 4-HBA + Cu(II) + catalase + DMPO



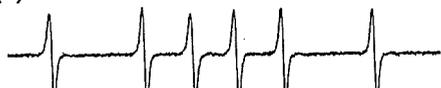
(B) (A) + dGMP



(C) (A) + dAMP



(D) (A) + CMP



(E) (A) + TMP



図 11. ESR による 4-HBA 由来ラジカルの検出とヌクレオシドによる抑制効果

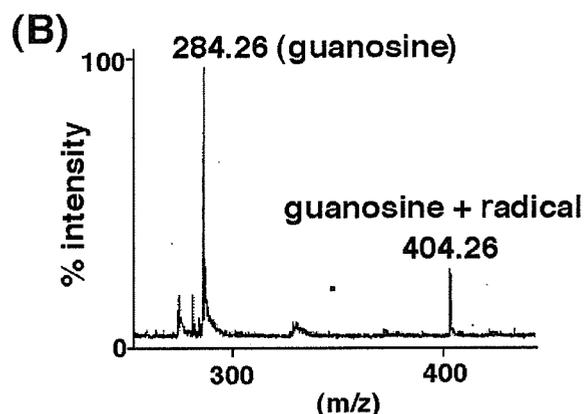
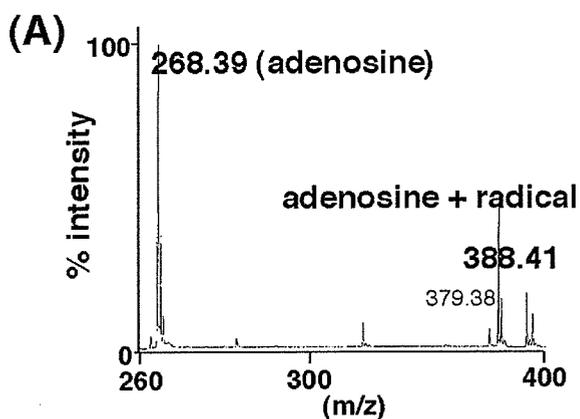


図 12. TOF-MS による付加体形成の検出

以上の結果から、4-HBA による DNA 損傷は過酸化水素の生成による酸化的 DNA 損傷と、benzoic acid ring C ラジカルによるグアニン、アデニン、シトシンとの DNA 付加体形成の両者が存在すると考えられた (図 13)。また、これらの DNA 傷害は 4-HBA の発がんに関与する可能性が示唆された。

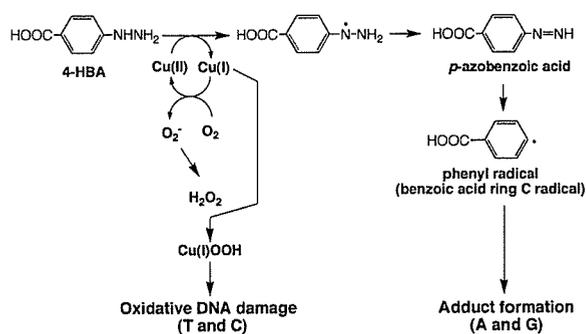


図 13. 4-HBA による DNA 損傷の分子機構

V. 唐辛子辛み成分カプサイシン

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。唐辛子に含まれる辛みの主成分である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。

CYP 前処理を行ったカプサイシンの DNA 傷害性について、各種 CYP で比較した結果 (図 14)、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 傷害が認められ、代謝活性化が必要であることが明らかになった。この傷害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。

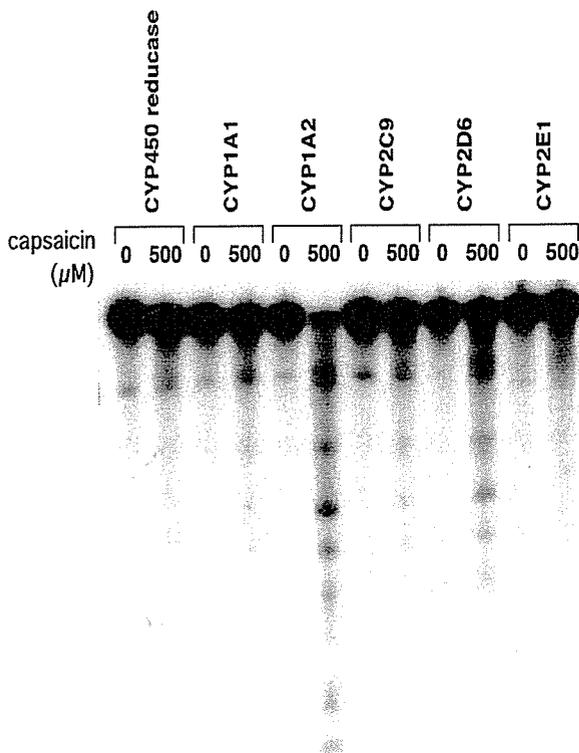


図 14. Capsaicin による Cu(II)および各種 CYP 存在下における DNA 傷害

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 傷害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 15)。DNA 傷害は、カプサイシン代謝物による Cu(II)存在下における DNA 傷害は、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により DNA 傷害は抑制されず、メチオナルで抑制されたため、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。

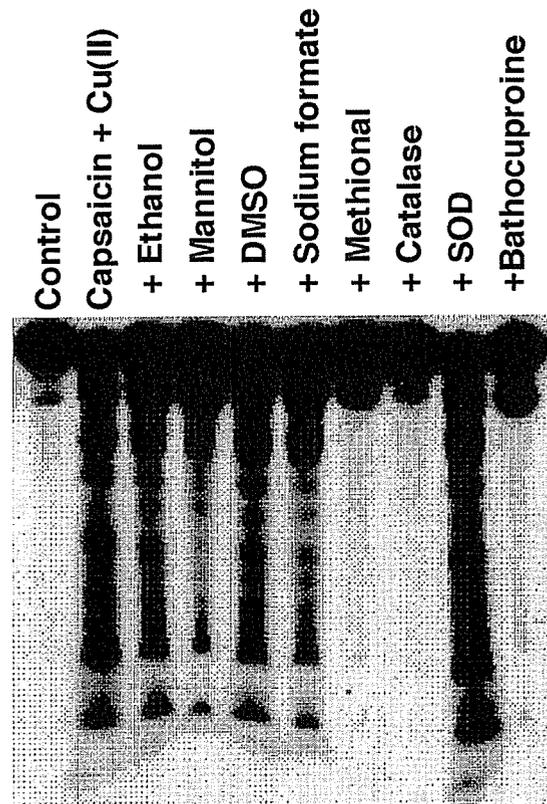


図 15. CYP1A2 で前処理した Capsaicin による Cu(II)存在下における DNA 傷害に対するラジカルスカベンジャーの効果

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。ヒトがん抑制遺伝子 *p16* の 5'-TG-3'および 5'-GC-3'配列において二塩基連続損傷がみられた (図 16)。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 17)。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、*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。

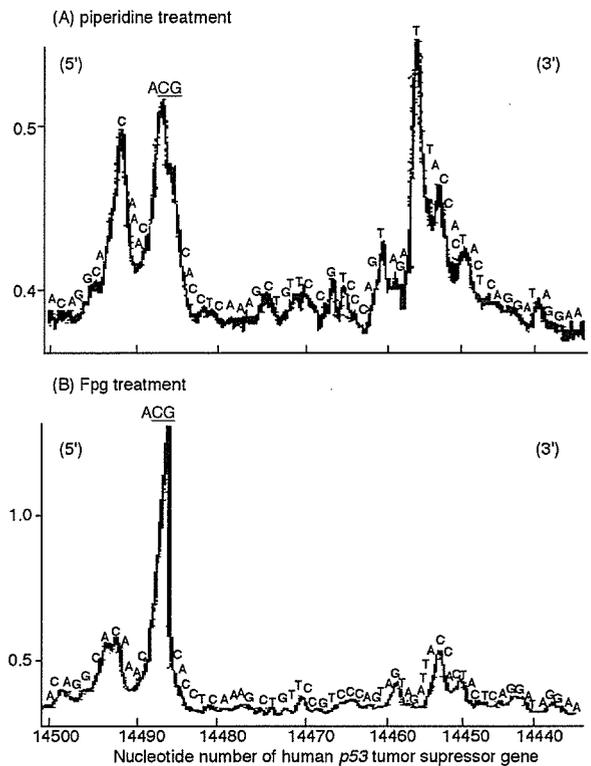


図 17.カプサイシンによるがん抑制遺伝子 *p53* における塩基配列特異的 DNA 損傷

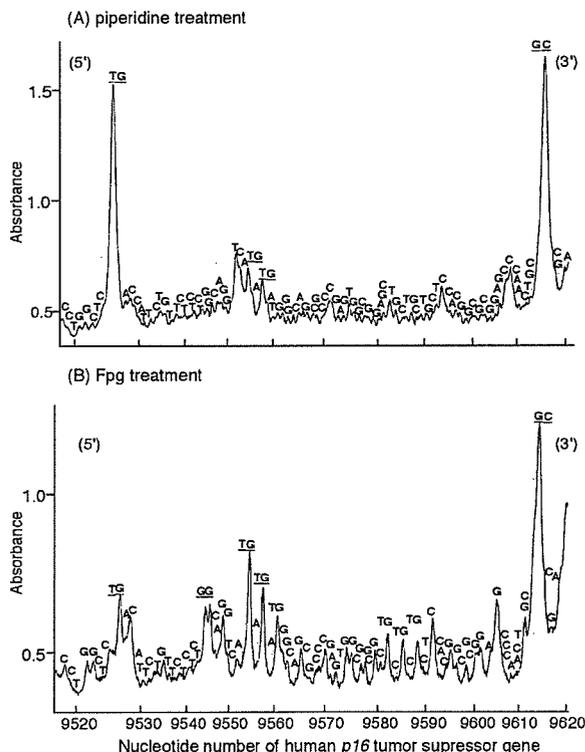


図 16.カプサイシンによるがん抑制遺伝子 *p16* における塩基配列特異的 DNA 損傷

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 18)。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。

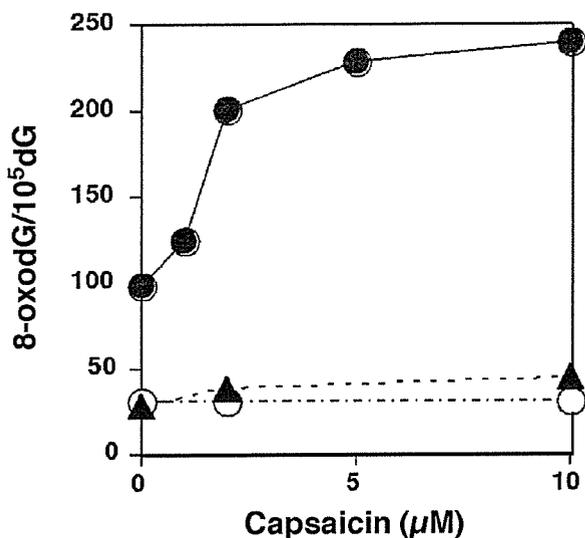


図 18. カプサイシンによる 8-oxodG 生成

以上の結果から、カプサイシンによる DNA 損傷の機構を図 19 に示す。カプサイシンは CYP、特に CYP1A2 による代謝で脱メチル化を受け、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。したがって、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ことが示された。

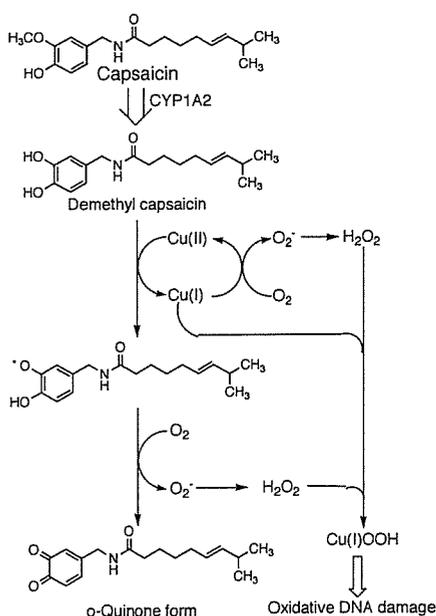


図 19. カプサイシンによる DNA 損傷機構

D. 考察

発がん過程は遺伝子損傷(イニシエーション)に始まり、突然変異を起こして悪性化した細胞の増殖促進過程(プロモーション)が重要な役割を果たすと考えられる。ホットスポットに特異的な DNA 損傷はがん原遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の機能喪失をもたらし、がんの発生および進展において鍵となる過程である。これまでの我々の研究において遺伝子損傷性と細胞増殖活性が発がんリスクに寄与することは明らかである。食品中化学物質は多岐にわたり、また、長期間摂取する。さらに、近年ではサプリメントとして多量摂取する可能性が生じてきており、安全性の評価は益々重要となっている。本報告書において示したように、食品中化学物質の多くは生体内で代謝活性化を受け、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。また、金属の存在下で DNA 付加体形成を促進する場面があることが見いだされた。さらに、エストロゲン受容体に作用して細胞増殖に働く食品中化学物質を明らかにした。ここには示していないが、本研究期間中に、その他の食品中化学物質として抗酸化性食品添加物プロピルガレートや大豆食品に含まれるイソフラボン、茶カテキン類、食品中に混入するベンズアントラセンやニトロピレン等の多環芳香族化合物の代謝物が金属イオン存在下で酸化 DNA 損傷性を示すことを明らかにした。

E. 結論

本研究結果から、種々の食品中化学物質が金属との複合作用により DNA 傷害をきたす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: M. Murata, S. Ohnishi, K. Seike, K. Fukuhara, N. Miyata, and S. Kawanishi. Oxidative DNA damage induced by carcinogenic dinitropyrenes in the presence of P450 reductase. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1750-1756 (2004).
- 2: K. Sakano, Y. Inagaki, S. Oikawa, Y. Hiraku, and S. Kawanishi. Copper-mediated oxidative DNA damage induced by eugenol: possible involvement of O-demethylation. *Mutat. Res.* 565, 35-44 (2004).
- 3: K. Seike, M. Murata, K. Hirakawa, Y. Deyashiki, and S. Kawanishi. Oxidative DNA damage induced by benz[a]anthracene dihydrodiols in the presence of dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1445-1451 (2004).
- 4: Y. Hiraku, A. Sekine, H. Nabeshi, K. Midorikawa, M. Murata, Y. Kumagai, and S. Kawanishi. Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA damage and cell proliferation. *Cancer Lett.* 215, 141-150 (2004).
- 5: H. Kobayashi, S. Oikawa, K. Hirakawa, and S. Kawanishi. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. *Mutat. Res.* 558, 111-120 (2004).
- 6: M. Murata, K. Midorikawa, M. Koh, K. Umezawa, and S. Kawanishi. Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs. *Biochemistry* 43, 2569-2577 (2004).
- 7: Sakano K, Mizutani M, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S. Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 1041-1049 (2005).
- 8: Piao F, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S, Cheng F, Zhong L, Yamauchi T, Kawanishi S, Yokoyama K. Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels. *J. Occup. Health.* 47, 445-449 (2005).
- 9: Kawanishi S, Oikawa S, Murata M. Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents. *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 1728-1739. Review (2005).
- 10: Oikawa S, Ito T, Iwayama M, Kawanishi S. Radical production and DNA damage induced by carcinogenic 4-hydrazinobenzoic acid, an ingredient of mushroom *Agaricus*

- bisporus. *Free Radic. Res.* 40, 31-39 (2006).
- 11: 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, 966-973 (2006).
- 12: Kawanishi S, Murata M.
Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress. *Toxicology.* 221, 172-178, (2006).
- 13: 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, 353-362 (2007).
2. 学会発表
- 1: 平工雄介, 関根亜樹, 鍋師裕美, 翠川薫, 村田真理子, 熊谷嘉人, 川西正祐,
発がん性合成抗菌剤ニトロフラゾンによるラジカル生成を介した酸化的 DNA 損傷.
第 26 回日本フリーラジカル学会学術集会, 2004 年 6 月 24-25 日 山形市
- 2: 及川伸二, 川西正祐,
特別講演: 天然抗酸化剤のヒト遺伝子損傷性に基づく安全性評価.
茶学術研究会, 2004 年 3 月 18 日 静岡市
- 3: 及川伸二, 古川絢子, 川西正祐,
カテキン類による発がん機構の解明.
第 11 回日本がん研究会, 2004 年 7 月 15-16 日 東京都
- 4: 及川伸二, 長尾恵美子, 坂野克久, 川西正祐,
唐辛子成分カプサイシンによる酸化的 DNA 損傷.
第 33 回日本環境変異原学会, 2004 年 11 月 30 日-12 月 2 日 長崎市
- 5: 村田真理子, 翠川薫, 川西正祐,
アルコール由来物質サルソリノールによる酸化的 DNA 損傷と乳腺細胞増殖活性.
第 75 回日本衛生学会, 2005 年 3 月 28-30 日 新潟市
- 6: Hatasu Kobayashi, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi,
Mechanism of oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate, ISCaP Symposium in Kyoto, 2005 年 5 月 20-21 日 京都市
- 7: 村田真理子, 翠川薫, 川西正祐,
アルコール関連物質サルソリノールによるラジカル生成を介した酸化的 DNA 損傷,
第 27 回日本フリーラジカル学会学術集会, 2005 年 6 月 4-5 日 岡山市
- 8: Ayako Furukawa, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi,
The distinct effect of iron and copper ion on catechin-dependent DNA damage.
第 15 回 金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2005 年 6 月 9-10 日、大阪市
- 9: 及川伸二、川西正祐、

マッシュルームに含まれる発がん性
4-hydrazinobenzoic acid によるラジカル
生成と DNA 損傷機構、

第 64 回日本癌学会総会, 2005 年 9 月
14-16 日 札幌市

10: 及川伸二、古川絢子、川西正祐、
Site-specific DNA damage induced by
purpurin, a natural pigment, with
reference to carcinogenesis、

日本環境変異原学会第 34 回大会, 2005
年 11 月 16-18 日 東京都

11: 川西正祐, 村田真理子,
抗酸化物質フラボノイド類の有効性と安
全性の評価、第 42 回植物化学シンポジウ
ム, 2005 年 12 月 2 日 名古屋市

12: 村田真理子、渡辺奈々、川西正祐、
がんの化学予防の安全性評価 (その 11)
フラボノイド類ケンフェロールによる酸
化的 DNA 損傷と AhR リガンド活性、第 76
回日本衛生学会総会, 2006 年 3 月 25-28
日 宇部市

13: 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

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: 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

16: 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

17: 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

18: 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

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
総合研究報告書

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* 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、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。その結果、ラット中期肝発がん性試験において、グルコン酸銅は、6000 ppm の投与により肝前がん病変発生と、肝細胞の酸化性 DNA 傷害生成、増殖活性亢進及びアポトーシス誘導を有意に増強した。この時の遺伝子発現変化としては、金属代謝、炎症、酸化性ストレス、アポトーシスに関連する遺伝子と癌遺伝子の発現が増強した。これらの遺伝子の一部については、2 週間反復投与試験でも発現増強が認められた。一方、カテキンは、単独で有意な変化を示さず、グルコン酸銅との併用投与によっても、グルコン酸銅による諸変化に対して有意な影響を及ぼさなかった。

研究全体の成果として、グルコン酸銅は、酸化性ストレスに基いて肝と前胃を標的とする増殖性病変誘発促進作用を発揮し、高用量で発がんリスクがあるが、ヒト暴露レベルにおいてそうしたリスクが顕現する可能性が低いものと判明した。一方、カテキンは、単独でそのようなリスクがなく、グルコン酸銅との複合曝露により、グルコン酸銅の発がんリスクを軽減する可能性があるものと示唆された。

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は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 9 mg/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、アカネ科ガンピ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・エピカテキンガラート・エピガロカテキンガラ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おいて、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。平成18年度は、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購入した。N-nitrosodiethylamine (DEN), N-methylnitrosourea (MNU), 1,2-dimethylhydrazine (DMH), N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)は東京化成工業から、2,2-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine(DHPN)はNacalai Tesqueから、それぞれ購入した。

2. 動物及び飼育条件

平成16及び17年度の予備試験及び中期多臓器発がん試験では、5週齢のBr/Han:WIST@Jcl (GALAS)系雄性ラット(日本クレア株式会社)を190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25±5℃、湿度50±10%、換気回数12回/時、12時間照明とした。動物は、最大3匹ずつ、ソフトチップを敷いたポリカーボネイト製のプラスチックケージに収容し、ケージ及びチップを週1回交換した。

平成18年度の中期肝発がん性試験及び2週間反復投与試験では、5週齢のFischer 344系雄性ラット(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

[予備試験]

動物は、試験開始時より、ラット中期多臓器発がん性試験法に準拠したDEN(100 mg/kg体重、腹腔内投与1回)・MNU(20 mg/kg体重、腹腔内投与4回)・DMH(40 mg/kg体重、皮下投与4回)・BBN(0.05%混水投与2週間)・DHPN(0.1%混水投与2週間)より成る計4週間のイニシエーション処置(DMBDD処置)を施行すると共に、グルコン酸銅を0・1000・3000・4800・6000(以上各群3匹)・12000 ppm(1匹)の用量にて粉末CE-2飼料(クレア)に混じて13週間自由摂取させた。全ての動物は、実験開始の13週間後に屠殺し、肝、血清及び尿の銅レベル、また肝において組織学的検索並びに胎盤型glutathione S-transferase (GST-P), 8-OHdG, proliferative cell nuclear antigen (PCNA), methalothionein (MT)の免疫組織化学的染色及び銅染色を施し検索した。

群	DMBDD 処置	銅(ppm)
1	有	0
2	有	1000
3	有	3000
4	有	4800
5	有	6000
6	有	12000

[中期多臓器発がん性試験]

動物は、4週間のDMBDD処置を施した後、グルコン酸銅(0, 10, 300, 3000, 6000ppm混餌)、カテキン(5000 ppm混水)またはグルコン酸銅とカテキンの併用投与下に25週間飼育した(各群9-12匹)。同時にDMBDD無処置群を設け、グルコン酸銅(0, 3000, 6000 ppm)、カテキン(5000 ppm)または併用投与を行った(各群9匹)。全ての動物は、実験開始の29週間後に屠殺し、主要臓器の組織学的変化と肝でのGST-P及び8-OHdGについて免疫組織化学的に検索した。

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

[中期肝発がん性試験]

試験開始時に、第 1～6 群 (各群 12 匹) の動物は DEN (200 mg/kg 体重, 腹腔内投与 1 回) を投与し, 第 7・8 群の動物 (各群 9 匹) は溶媒の生理食塩液を同様に投与した. その 2 週間後より, 第 1～6 群の動物にはグルコン酸銅 (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投与した. また同時に 7 及び 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には, 全生存動物を屠殺し, 肝において GST-P, 8-OHdG, PCNA, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL), MT の免疫組織化学的染色及び銅染色を施し検索した. またリアルタイム RT-PCR を用い肝臓の遺伝子発現解析を行った.

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

とカテキンを併用して投与 (各群 5 匹) を 2 週間行い, 投与終了後肝臓を摘出し, 遺伝子発現解析を行った.

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. 倫理面への配慮

本研究においては, 実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等ならびに試験実施施設の規定に準拠し, 適切な倫理面への配慮を行った.

C. 試験結果

[予備試験]

得られた所見は, グルコン酸銅 1000 ppm 以上群の肝細胞における銅染色陽性所見・MT 発現増強 (小葉中心性, 高用量でびまん性), 3000 ppm 以上群の便黒色化, 6000 ppm 以上群の肝銅レベル増加・肝細胞大小不同・肝肉芽腫・肝細胞核内 8-OHdG 誘発増強・肝細胞増殖活性亢進, 12000 ppm 群の肝重量増加・血清及び尿の銅レベル増加・肝細胞壊死・肝前がん病変の発生個数増加であった.

[中期多臓器発がん性試験]

肝臓の前がん病変である GST-P 陽性細胞巣について解析したところ, その発生個数は, DMBDD 処置後のグルコン酸銅単独投与 10 ppm 群あるいはカテキン単独投与群で変化しなかったが, グルコン酸銅単独投与 300 ppm 以上群で有意に増加した. 一方, グルコン酸銅・カテキン併用投与群では, グルコン酸銅 6000 ppm 群で増加傾向を示したものの, 有意な変化を認めなかった. DMBDD 無処置群の GST-P 陽性細胞巣は, 僅かに認められたのみであり, 群間に変化がなかった. GST-P 陽性細胞巣の総面積及び 1 つあたりの平均面積については, 全群間に差異を認めなかった (表 1). 肝臓における 8-OHdG 陽性率は, DMBDD 処置後のグルコン酸銅単独投与 10 ppm 群あるいはカテキン単独投与群で変化しなかったが, グルコン酸銅単独投与 300 ppm 以上群で増加傾向が認められ, 同 6000 ppm 群で有意に増加した. またグルコン酸銅 6000 ppm・カテキン併用投与群においても増加傾向が認められたが, 同濃度のグルコン酸銅単独投与群と比較し低値であった. DMBDD 無処置群では, グルコン酸銅単独投与 6000 ppm 群で僅かに増加したが, そ

の他の群で 8-OHdG の発生を認めなかった (表 1)。

検体投与群においては、前胃境界縁に過形成病変が認められた。その発生頻度及び程度は、グルコン酸銅単独投与 6000 ppm 群にて、明らかに増加した。一方、そのカテキン併用投与群では、発生頻度及び程度が、明らかに減弱した (表 2)。

グルコン酸銅単独投与 10 ppm 群及びカテキン単独投与群での全臓器、あるいは全群における肝臓及び前胃以外の他の臓器への影響は、明らかでなかった。

[中期肝発がん性試験及び 2 週間反復投与試験]

中期肝発がん性試験における肝臓の GST-P 陽性細胞巢の発生個数は、DEN 処置後のグルコン酸銅単独投与 6000 ppm 群及びそのカテキン併用投与群で有意に増加した。一方、グルコン酸銅単独投与 10・300 ppm 群及びカテキン単独投与群では、GST-P 陽性細胞巢発生個数に変化がなかった。DEN 無処置群では、GST-P 陽性細胞巢を認めなかった。GST-P 陽性細胞巢の総面積は全群間で差異がなかったが、1 つあたりの平均面積は、グルコン酸銅・カテキン併用投与群で有意に減少した (表 3)。

中期肝発がん性試験における肝臓の 8-OHdG・PCNA・TUNEL 陽性細胞は、DEN 処置及び無処置のグルコン酸銅単独投与 6000 ppm 群及びそのカテキン併用投与群で有意に増加した (表 4)。

中期肝発がん性試験における遺伝子発現解析では、金属代謝関連遺伝子 (Mt1a, Trfc)、アポトーシス関連遺伝子 (TNF α , p21, p53) 及び癌遺伝子 (c-fos) の発現が DEN 処置及び無処置のグルコン酸銅単独投与 6000ppm 群及びそのカテキン併用群で有意に増強した。Mt1a, Trfc 及び p21 の発現増強は、2 週間反復投与試験でも認められた。また、Mt1a の発現は、いずれの試験においても、グルコン酸銅・カテキン併用群においてそれぞれの単独群より増強していた (表 5, 6)。

D. 考察

[予備試験]

予備試験の結果より、グルコン酸銅は、複数の発がん物質を投与した条件下ながら、比較的低い用量より単独でも肝に影響を及ぼすことが判明した。また、グルコン酸銅の暴露が肝における排出機構の能力を超えることが明らかとなる用量は、6000 ppm であるものと判断され、以降の中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅の最高用量を 6000 ppm と決定した。

[中期多臓器発がん性試験]

グルコン酸銅 10 ppm 群の銅摂取量は、基礎飼

料中の銅濃度 (約 10 ppm) と合わせると、約 8 mg/day/ヒトであり、ヒトの銅摂取目安 5 mg/day 及び許容上限摂取量 (UL) 9 mg/day の範囲内に相当する。一方、カテキン 5000 ppm 群のカテキン摂取量は、約 20 g/day/ヒトであり、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 500~1000 mg/day の約 20-40 倍に相当する。中期多臓器発がん性試験の結果より、グルコン酸銅は、ヒトが摂取すると考えられる用量で影響を示さないが、それよりも明らかに高い用量を与えた場合、肝臓及び前胃において増殖性病変誘発促進作用を有し、発がんリスクを増加させる可能性が考えられた。一方、カテキンは、ヒトが摂取する量よりも明らかに高い用量を投与しても、単独で増殖性病変誘発促進作用を示さず、むしろグルコン酸銅と併用することでその発がんリスクを軽減する可能性が示唆された。酸化性 DNA 傷害の指標である 8-OHdG は、肝臓においてグルコン酸銅単独投与 300 ppm 以上群で増加し、カテキンの併用投与により減少した。したがって、グルコン酸銅の高用量投与は生体内の利用可能銅量を増加させ、過剰に存在する銅は酸化性ストレスを誘導して肝・前胃発がんを促進する一方、カテキンは抗酸化作用によりグルコン酸銅による肝・前胃発がん促進を抑制したものと推察された。

[中期肝発がん性試験及び 2 週間反復投与試験]

中期肝発がん性試験により、グルコン酸銅は、ヒトが摂取すると考えられる用量で影響を示さないが、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考えられた。また中期多臓器発がん試験では、グルコン酸銅 300 ppm 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と推察された。一方、カテキンは、本実験条件下において、単独投与でリスクを示さず、中期多臓器発がん試験でみられたグルコン酸銅との併用投与によるその肝発がん性に対する抑制作用も明瞭に示さなかった。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に基く細胞増殖活性亢進及びアポトーシス誘発が関与するものと考えられた。

遺伝子発現解析の結果、中期肝発がん性試験及び 2 週間反復投与試験の肝臓においては、各

種遺伝子の発現変動が認められた。変動したほとんどの遺伝子は、グルコン酸銅単独投与 6000 ppm 群及びそのカテキン併用投与群で発現が増強したことから、グルコン酸銅による増殖性病変誘発促進作用にこれらの遺伝子が関与するものと示唆された。

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。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抑制作用を示さなかった。さらに、グルコン酸銅の高用量での発がん機序には、酸化ストレスの誘導に基く細胞増殖活性亢進及びアポトーシス誘発が関与するものと考えられた。

E. 総合結論

グルコン酸銅は、酸化性ストレスに基いて肝と前胃を標的とする増殖性病変誘発促進作用を有し、高用量で発がんリスクを増加させる恐れがあるが、ヒト暴露レベルにおいてその可能性が低いものと判明した。

カテキンは、単独で増殖性病変誘発促進作用を発揮せず、複合投与でグルコン酸銅による発がんリスクを軽減する可能性が推察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Abe M, Suzuki N, Yoshida M, Igarashi M, Usuda K, Furukawa S, Maekawa A, Juneja LR, Okubo T and Nakae D, Preliminary evaluation of toxicologic and carcinogenic risks of copper gluconate in rats given multiple carcinogens. J Toxicol Pathol, 2006, 19: 129-135.

2. 学会発表

- (1) 中江 大, 阿部正義, 鈴木紀子, 吉田 緑, 五十嵐麻希, 植松史行, 高橋正一, 前川昭彦. 食品中金属類と食品中化学物質の複合による発がんリスクに関する実験的研究. カテキン及びグルコン酸銅を用いたラット中期多臓器発がん性試験法による検討1. 第10回日本フードファクター学会 (2005年11月, 岡山県岡山市).
- (2) 阿部正義, 鈴木紀子, 吉田 緑, 五十嵐麻希, 植松史行, 高橋正一, 前川昭彦, 中江 大. 食品中金属類と食品中化学物質の複合による発がんリスクに関する実験的研究. カテ

キン及びグルコン酸銅を用いたラット中期多臓器発がん性試験法による検討2. 第10回日本フードファクター学会 (2005年11月, 岡山県岡山市).

- (3) 阿部 正義, 鈴木 紀子, 吉田 緑, 五十嵐 麻希, 臼田 浩二, 古川 賢, 植松 史行, 高橋 正一, 前川 昭彦, 中江 大. 食品中金属類と食品中化学物質の複合による発がんリスクに関する実験的研究. カテキン及びグルコン酸銅を用いたラット中期多臓器発がん性試験法による検討1. 第22回日本毒理性病理学会学術集会 (2006年1月, 鹿児島県鹿児島市).
- (4) 中江 大, 吉田 緑, 前川 昭彦. カテキンとグルコン酸銅の単独および複合安全性に関するラット中期多臓器発がん性試験法を用いた検索. 第95回日本病理学会総会 (東京, 2006).
- (5) 阿部 正義, 鈴木 紀子, 吉田 緑, 五十嵐 麻希, 臼田 浩二, 古川 賢, 植松 史行, 高橋 正一, 前川 昭彦, 中江 大. カテキン及びグルコン酸銅を用いたラット中期多臓器発がん性試験法による検討. 第33回日本トキシコロジー学会学術集会 (名古屋, 2006).
- (6) 阿部 正義, 吉田 緑, 五十嵐 麻希, Juneja L, 中江 大. ラット中期多臓器発がん性試験法を用いたカテキン及びグルコン酸銅の発がんリスクの評価. 第65回日本癌学会学術総会 (横浜, 2006).
- (7) 阿部 正義, 臼田 浩二, 古川 賢, Raj JL, 大久保 勉, 中江 大. ラット中期肝発がん性試験法を用いたカテキン及びグルコン酸銅の発がんリスクの評価. 第23回日本毒理性病理学会年次学術集会 (東京, 2007).

G 知的所有権の出願・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

表 1. 肝臓における GST-P 陽性巣及び 8-OHdG 陽性率

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

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

表 2. 前胃過形成病変発生頻度及び程度

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

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

表 3. 肝臓における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析

群	DEN	グルコン酸銅 (ppm)	カテキン (ppm)	有効 動物数	GST-P陽性細胞巢 ^b		
					数 (No./cm ²)	総面積 (mm ² /cm ²)	面積/巢 (mm ²)
1	+	0	0	8	15.3 ± 3.8 ^a	0.879 ± 0.406	0.058 ± 0.020
2	+	10	0	11	15.9 ± 6.3	1.081 ± 0.917	0.059 ± 0.027
3	+	300	0	10	14.1 ± 5.1	0.918 ± 0.547	0.064 ± 0.017
4	+	6000	0	10	19.9 ± 4.8**	0.993 ± 0.310	0.050 ± 0.008
5	+	0	5000	10	13.9 ± 2.1	0.889 ± 0.116	0.065 ± 0.011
6	+	6000	5000	9	20.6 ± 3.7**	0.876 ± 0.107	0.043 ± 0.006*
7	-	0	0	8	0.0 ± 0.0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
8	-	6000	0	7	0.0 ± 0.0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000

^a: 平均値 ± SD.

^b: GST-P陽性細胞巢は面積が0.01mm²以上を計測した.

*, **: 1群に対し有意差あり (p<0.05, 0.01).

表 4. 8-OHdG, PCNA 及び TUNEL の定量的解析

群	DEN	グルコン酸銅 (ppm)	カテキン (ppm)	有効 動物数	8-OHdG	PCNA	TUNEL
					(%)	(%)	(%)
1	+	0	0	5	0.0 ± 0.0 ^a	2.2 ± 1.0	0.13 ± 0.08
2	+	10	0	5	0.0 ± 0.0	2.6 ± 1.1	0.11 ± 0.08
3	+	300	0	5	0.0 ± 0.0	2.5 ± 0.5	0.14 ± 0.04
4	+	6000	0	5	55.0 ± 9.9**	10.8 ± 4.2**	1.31 ± 0.52**
5	+	0	5000	5	0.0 ± 0.0	2.1 ± 0.3	0.12 ± 0.09
6	+	6000	5000	5	60.5 ± 17.1**	9.4 ± 4.5**	0.94 ± 0.59**
7	-	0	0	5	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.2	0.12 ± 0.10
8	-	6000	0	5	63.9 ± 12.5 [#]	22.2 ± 11.3 [#]	0.89 ± 0.43 [#]

^a: 平均値 ± SD.

** : 1群に対し有意差あり (p<0.01).

[#]: 7群に対し有意差あり (p<0.01).

表 5. 遺伝子発現解析 (中期肝発がん性試験)

群	DEN	グルコン酸銅 (ppm)	カテキン (ppm)	有効 動物数	8-OHdG	PCNA	TUNEL
					(%)	(%)	(%)
1	+	0	0	5	0.0 ± 0.0 ^a	2.2 ± 1.0	0.13 ± 0.08
2	+	10	0	5	0.0 ± 0.0	2.6 ± 1.1	0.11 ± 0.08
3	+	300	0	5	0.0 ± 0.0	2.5 ± 0.5	0.14 ± 0.04
4	+	6000	0	5	55.0 ± 9.9**	10.8 ± 4.2**	1.31 ± 0.52**
5	+	0	5000	5	0.0 ± 0.0	2.1 ± 0.3	0.12 ± 0.09
6	+	6000	5000	5	60.5 ± 17.1**	9.4 ± 4.5**	0.94 ± 0.59**
7	-	0	0	5	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.2	0.12 ± 0.10
8	-	6000	0	5	63.9 ± 12.5 [#]	22.2 ± 11.3 [#]	0.89 ± 0.43 [#]

^a: 平均値 ± SD.

** : 1群に対し有意差あり (p<0.01).

[#]: 7群に対し有意差あり (p<0.01).

表 6. 遺伝子発現解析 (2 週間反復投与試験)

群	グルコン酸銅 (ppm)	カテキン (ppm)	有効 動物数	Mt1a (g)	Tfro (g)	TNF α (g)	p21 (g)	p53 (g)	IL1 α (g)	NOS2 ^b (g)	c-fos (g)
1	0	0	5	1.0 \pm 0.5 ^a	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.6	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.6
2	10	0	5	2.5 \pm 1.2	1.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.4	1.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.5 \pm 0.3
3	300	0	5	1.4 \pm 0.7	1.1 \pm 0.3	1.9 \pm 1.2	1.5 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.3
4	6000	0	5	8.6 \pm 3.8 ^{**}	2.7 \pm 1.6 ^{**}	2.6 \pm 1.6	2.0 \pm 0.6 ^{**}	0.9 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.8 \pm 0.3
5	0	5000	5	4.3 \pm 2.0 [*]	1.2 \pm 0.2	1.5 \pm 0.7	2.0 \pm 0.4 ^{**}	1.2 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1
6	6000	5000	5	16.2 \pm 4.0 ^{**}	2.4 \pm 0.6 ^{**}	2.2 \pm 1.3	3.5 \pm 1.2 ^{**}	1.0 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3	0.6 \pm 0.6	0.8 \pm 0.4

^a: 値は1群に対する発現比を示す, 平均値 \pm SD.

^b: 値は発現量を示す.

^{*}, ^{**}: 1群に対し有意差あり ($p < 0.05$, 0.01).

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保研究推進研究事業）
総合研究報告書

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

分担研究者 山添 康 東北大学大学院薬学研究科

研究要旨 ヒトの主要な薬物代謝酵素である 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、化学物質の CYP3A4 誘導性を評価することは非常に重要である。本研究では、*CYP3A4* レポーター遺伝子安定発現細胞と *CYP3A4* レポーター遺伝子発現アデノウイルスを利用した *in vitro* ならびに *in vivo* レポーターアッセイシステムを用いて、ヒト CYP3A4 誘導能を簡便に評価可能なスクリーニングシステムを構築した。さらに、本システムを用いて、農薬である pyributicarb が強力な CYP3A4 誘導性を示すことを明らかにした。したがって、本スクリーニングシステムを用いることにより、食品成分や食品添加物などのヒトが摂取する可能性のある化学物質の CYP3A4 誘導能を簡便に測定することが可能になると考えられる。

A. 研究目的

チトクローム P450 (CYP) などの薬物代謝酵素は、臨床で用いられる医薬品に加えて、食品添加物や農薬などの環境由来の化学物質の代謝にも関与している。これらの薬物代謝酵素は、解毒だけではなく代謝的活性化も触媒することが知られており、薬物代謝酵素活性は化学物質の体内濃度を決定し、薬理作用や毒性発現レベルを決定する主要な因子である。

CYP3A4 などのいくつかの薬物代謝酵素はある種の化学物質によりその酵素活性が阻害されること、また酵素含量の増加

が起こる（酵素誘導）ことが知られている。したがって、例えば CYP3A4 で代謝される化学物質を、CYP3A4 酵素阻害作用あるいは誘導作用を示す化学物質と同時に摂取した場合には、単独で摂取した場合は体内動態が異なると考えられ、そのため予期せぬ薬理効果や毒性を示す可能性がある。

農薬をはじめとする化学物質のヒトに対する影響は、実験動物を用いた試験結果から予測されることが多いが、実際には、ヒトと実験動物の間には薬物代謝酵素やその発現調節に関わる因子に種差が

存在するため、実験動物で得られたデータをヒトへ外挿することは困難である。そこで本研究課題では、この問題を克服する手段の1つとして、in vitro および in vivo において化学物質のヒト CYP3A4 誘導能を予測可能な実験系の構築を試みた。

B. 研究方法

CYP3A4 レポーター安定発現細胞株の単離：CYP3A4 遺伝子プロモーター領域の -362 から +11 までの配列ならびに -7826 から -7208 までの配列をルシフェラーゼレポーター遺伝子の upstream に結合し、これとネオマイシン耐性遺伝子を含む pQBI ベクターを直線化した DNA を結合させた。これを HepG2 細胞に導入し、ジェネティシンにより上記遺伝子を安定的に発現する細胞株をスクリーニングした（図 1 に概略を示した）。得られた細胞株を 24 穴プレートに播種し、rifampicin (30 μM) あるいは clotrimazole (10 μM) を添加後 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。

農薬の CYP3A4 誘導能の評価：CYP3A4 レポーターを安定的に発現する細胞株（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 μM の濃度で培地に添加して 48 時間培養した。その後上記と同様にレポーター活性を測定した。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。

ヒト PXR の siRNA を発現するアデノウイルスの構築：ヒト PXR の siRNA 配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチドを、ヒト snRNA の U6 プロモーターと共に pShuttle プラスミドベクターに挿入した。これをアデノウイルス骨格を有するプラスミド pAdEasy-1 と同時に大腸菌に導入し、相同組換えにより得られたアデノウイルスベクターを単離精製した。このウイルスを HEK293 細胞中で増幅し、力価測定後に実験に使用した。

CYP3A4 誘導における PXR の寄与：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前述の通り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：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。