20073404 8A

別紙１

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

平成１９年度　総括・分担研究報告書

主任研究者　西川　秋佳

平成２０（２００８）年　４月

別紙２

目　　次

Ⅰ．総括研究報告

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究 ------------- 1

西川秋佳

Ⅱ．分担研究報告

１．食品中化学物質の複合影響による*in vivo* 変異原性に関する研究 ------------- 19

西川秋佳

２．食品中化学物質の複合影響による発がん性に関する研究 ------------- 35

田中卓二

３．残留農薬の複合影響による神経毒性に関する研究 ------------- 57

原田孝則

４．食品中化学物質の複合影響に及ぼす代謝活性化に関する研究 ------------- 81

出川雅邦

５．食品中化学物質の複合影響による反応生成物に関する研究 ------------- 89

中澤裕之

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表 -------------------------------- 95

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

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

主任研究者　西川　秋佳　国立医薬品食品衛生研究所　病理部長

研究要旨
食品中の複数の化学物質による健康影響に関する基礎的データを収集するため、以下の研究を実施した。（西川）食品添加物グルコン酸銅を短期間投与したラット肝で銅の蓄積に起因すると考えられる酸化的ストレスが誘発され、さらに13週間投与では肝障害が認められている。しかし、今回の実験条件下ではグルコン酸銅と抗酸化物質との併用投与による複合影響は認められず、*in vitro*で報告されている遷移金属を触媒としたフェノール系抗酸化物質による酸化的ストレスの誘発は*in vivo*では明らかとはならなかった。また、金属キレート剤とグルコン酸銅との複合影響により、銅の生物学的利用能の増加に伴う血清中の銅濃度の増加が認められたが、酸化的ストレス誘発への影響は明らかとならなかった。（田中）食品中に存在する様々な化合物のうち肝薬物代謝酵素P450 (CYP)活性を修飾（主として抑制）し、発がんに抑制的に作用するとされる化合物であるcurcuminとquercetinを選択し、その複合投与による諸臓器の変化を病理組織学的、血清生化学的に解析し、同時にmicroarray解析による遺伝子発現変異を検討した。その結果、投与4週時でのmicroarray解析では、複合投与と単独投与での比較で、いくつかのpathwayで遺伝子発現の変化がみられ、また雌雄差も観察され、雄でのprostate cancer pathway、biosynthesis of steroid pathway、雌でのC21-steroid hormone metabolism pathway、type II diabetes mellitus pathwayの変化が顕著であった。（原田）殺虫剤の有機リン剤（パラチオン）とカーバメート剤（MPMC）の複合暴露影響を明らかにするため、雌性ラットに両剤を2週間にわたり同時に反復経口投与し、一般毒性、神経毒性及び免疫毒性関連項目を指標にその複合暴露影響を調査した。その結果、パラチオンとMPMCの反復複合投与により血漿中のグロブリン及び総コレステロールが上昇することが示唆された。（出川）食品添加物のチアベンダゾールやクルクミンが、*in vitro*でAhR活性化やCYP1A酵素活性上昇（誘導）に影響を及ぼす可能性が示唆された。すなわち、これら化合物は3-メチルコラントレンと複合曝露されることでAhR活性化やCYP1A酵素活性誘導において相乗的な誘導作用を示した。これまで、AhR活性化やCYP1A酵素活性誘導にける複合影響についての報告例はほとんどなく、本研究結果はAhR活性化やCYP1A酵素誘導を介した毒性発現を考える上で重要であると思われた。（中澤）食品中フェノール性抗酸化物質と$NaNO_2$の併用投与によるニトロ化反応で発生する活性酸素種 (ROS)への影響を検討した。ニトロ化された物質においても同様の抗酸化作用が認められたが、ニトロ化を受けることにより、ラジカル発生作用はROSの発生量を大きく増強した。本研究で明らかとなったニトロ化反応によるラジカル発生作用の増強は極めて重要な知見であり、抗酸化物質の安全性についてさらに研究を進めていく必要がある。

分担研究者
田中卓二　金沢医科大学腫瘍病理　教授
原田孝則　残留農薬研究所　理事・毒性部長
出川雅邦　静岡県立大学分子毒性　教授
中澤裕之　星薬科大学薬品分析化学　教授

A. 研究目的

食品中には、食品添加物、残留農薬、加熱調理過程で生成される発がん物質、種々の汚染物質など多様な化学物質が含まれており、ヒトはそれらを長期間摂取する可能性が高い。したがって、それら化学物質の安全性を含む健康影響の評価は極めて重要である。これまでの食品中化学物質の安全性に関する評価は、主として物質毎に実施されているが、近年、物質単独での健康影響よりも相互作用による複合影響を検討することの必要性が指摘されている。しかし、複数の化学物質による健康影響を解析することには、多くの困難が伴い、国内外でいろいろな試みがなされているが、いずれも実際の安全性評価に応用されるまでに至っていない現状がある。その理由にはいくつかの要因が考えられるが、最も重要なのは化学物質の生物活性が多岐にわたり、影響の予測が難しいことである。即ち、影響が単なる足し算として現れる場合（相加作用）もあるし、それ以上の影響として発現する場合（相乗作用）もあり、逆に相殺しあう場合（拮抗作用）もあることが知られている。それらの発現の差異は、化学物質の化学構造の類似性と相関することもあるが、全く相関しないことも多い。本研究は、食品中化学物質の複合影響による*in vivo*変異原性、発がん性、神経毒性、代謝および反応生成物を多角的に解析し、実用的な安全性評価に資するデータの蓄積を目的とする。そのため、食品中の添加物、残留農薬、汚染物質などを組み合わせて、遺伝子改変動物、多段階発がんモデル動物、幼若動物などに適用し、各物質の相互作用を比較検討する。得られたデータを総合的に解析し、どの程度パターン化が可能かどうかを検証する。その成果は、食品中化学物質の複合影響に対するより的確な安全性評価に貢献し、ヒトの食生活の安心と安全に大きく寄与できるものと期待される。

B. 研究方法

I. 食品中化学物質の複合影響による*in vivo*変異原性に関する研究（西川）

グルコン酸銅、カテコール、タンニン酸、フィチン酸、没食子酸プロピルは和光純薬工業株式会社から購入した。酵素処理イソクエルシトリンは三栄源エフ・エフ・アイ株式会社より供与された。本試験は国立医薬品食品衛生研究所「動物実験に関する指針」に従って実施された。動物は5週齢の雄性F344ラットを日本チャールス・リバー株式会社（静岡）より購入し、CRF-1基礎飼料（粉末、オリエンタル酵母工業株式会社、東京）と水道水で1週間馴化飼育した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行い、室内の環境は温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数18回／時（オールフレッシュ）、12時間蛍光灯照明／12時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージ3または5匹ずつ収納し、床敷は三協ラボサ

ービス社（東京）のソフトチップを用い、週2回交換を行った。

＜実験1.＞6週齢のF344ラット雄25匹を無作為に各群5匹の5群に分け、グルコン酸銅を6000 ppmの濃度で基礎飼料中に混じて13週間投与した。同時にカテコール、タンニン酸、酵素処理イソクエルシトリンまたはフィチン酸をそれぞれ1000、5000、5000、10000 ppmの濃度で蒸留水に溶解し、飲水投与した。対照群として、グルコン酸銅単独投与群を設けた。投与期間中は一般状態を毎日観察した。体重及び摂餌量は週1回、摂水量は週2回測定した。投与期間終了時にエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血後、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。採取した血清は血清生化学的検査（AST、ALT、ALP）、血清中の銅濃度測定に供し、肝臓は肝組織中の銅濃度測定、病理組織学的検査、脂質過酸化レベルおよびDNA中の8-OHdGレベルの測定に供した。

＜実験2.＞6週齢のF344ラット雄48匹を無作為に4群（各群12匹）に分け、試験に供した。グルコン酸銅を6000 ppmの濃度で2週間混餌投与し、投与期間終了時にカテコールを150 mg/kgの用量で単回強制経口投与した。同様に基礎飼料を与える対照群を設け、溶媒（蒸留水）を強制経口投与した。また、グルコン酸銅およびカテコールの単独投与群も設けた。強制経口投与0、2、6、12および24時間後にエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈切断により放血致死させ、解剖して肝臓を採取した。各時点での動物数はそれぞれ3匹とした。採取した肝臓の脂質過酸化レベルおよび肝DNA中の8-OHdGレベルを測定した。

＜実験3.＞6週齢のF344ラット雄48匹を無作為に4群（各群12匹）に分け、試験に供した。グルコン酸銅を6000 ppmの濃度で2週間混餌投与し、投与期間終了時にカテコールを2000 mg/kgの用量で単回強制経口投与した。同様に基礎飼料を与える対照群を設け、媒体（コーン油）を強制経口投与した。また、グルコン酸銅および没食子酸プロピルの単独投与群も設けた。強制経口投与0、2、6、12および24時間後にエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈切断により放血致死させ、解剖して肝臓を採取した。各時点での動物数はそれぞれ3匹とした。採取した肝臓の脂質過酸化レベルを測定した。今後、肝DNA中の8-OHdGレベルを測定する予定である。血清生化学的検査（ALT、AST、ALP）、血清および肝組織中の銅濃度の測定は、株式会社エスアールエルに依頼して測定した。肝臓の脂質過酸化レベルはチオバルビツール酸陽性物質（TBARS）として、フルオロスキャンアセント（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）により測定した。肝DNA中の8-OHdGレベルを測定するため、採取した肝臓からDNA Extraction WBキット（Wako）を用いてDNAを回収した。処理中の試料の酸化を防ぐために、Lysis Buffer にEDTAを添加してDNA抽出を行った。回収したDNAはNuclease P1とalkaline hosphataseにより消化した。得られた試料はHPLC/UV/ECD（Coulochem II、ESA）により8-OHdGおよびdG量を測定した。8-OHdGレベルは8-OHdG/10^5dGとして求めた。病理組織学的検査のため、肝臓を重量測定後に一部を10％中性緩衝ホルマリン液にて固定し、その他は液体窒素により凍結保存し

た。固定後の肝臓は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

統計処理は以下のように実施した。体重、肝重量、血清生化学的検査項目、血清および肝組織中の銅濃度については、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnettの方法で対照群と投与群との間の有意差検定を行った。肝臓中の脂質過酸化レベルおよび肝DNA中の8-OHdGレベルについては、各群の分散比をF検定で検定し、等分散の場合はStudentのt検定を行い、不等分散の場合はWelchのt検定により検定を行った。

II. 食品中化学物質の複合影響による発がん性に関する研究（田中）

5週齢のC57BL/6Jマウス120匹（雄60匹、雌60匹）をそれぞれ6群に分け、以下の処置を行った。第1群（雄10匹、雌10匹）：100 ppm quercetin+100 ppm curcumin、第2群（雄10匹、雌10匹）：250 ppm quercetin+250 ppm curcumin、第3群（雄10匹、雌10匹）：500 ppm quercetin+500 ppm curcumin、第4群（雄10匹、雌10匹）：500 ppm quercetin、第5群（雄10匹、雌10匹）：500 ppm curcumin、第6群（雄10匹、雌10匹）：無処置。Quuercetin、curcuminは混餌投与とし、実験期間は8週とした。実験開始後4週、8週でそれぞれ各群に雌雄各5匹を犠牲死させ、実験開始後4週、8週では血液生化学検査、主要臓器の病理組織検査を、実験開始後4週では肝（左葉）のmicroarray解析(Agilent社、Whole Mouse Genomeオリゴ DNAマイクロアレイキット、41534 probe sets使用)を実施した。

III. 残留農薬の複合影響による神経毒性に関する研究（原田）

本研究では、殺虫剤の有機リン剤（パラチオン）とカーバメート剤（MPMC）を組合せ、雌性ラットに複合的に2週間反復経口投与し、以下の実験条件下で一般毒性、神経毒性及び免疫毒性関連項目を指標にして複合暴露影響を検索した。

本試験の被験物質として、有機リン剤のパラチオン（Parathion、*O,O*-Dietyl *O*-4-Nitroohenyl Phosphorothiate、99.6％、和光純薬工業株式会社）及びカーバメート剤のMPMC（Xylylcarb、3-4-Xylyl Methylcarbamate、98.9％、和光純薬工業株式会社）を使用した。被験物質は受領後冷蔵庫（許容範囲1~10℃）で保管した。

日本クレア株式会社富士生育場（静岡県）で生産されたWistar Hannover系SPFラット（BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]）の雌を9週齢にて45匹購入し、10日間試験環境に馴化した後、10週齢で試験に用いた。馴化期間中毎日一般状態を観察した。動物は温度22 ± 2°C、湿度50 ± 20%、換気回数10回以上／時間（オールフレッシュエアー方式）、照明時間12時間／日（午前7時点灯、午後7時消灯）に設定された動物飼育室で飼育した。投与開始日の前日に全ての動物の体重を測定し、体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に10匹ずつ配分し、群分けを実施した。群分け後の個体識別は耳鑑札法で行なった。基礎飼料には保証飼料ＭＦ粉末 (オリエンタル酵母工業株式会社) を

用い、ステンレス鋼製粉末給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、市上水（常総市）をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所で定める倫理規定に従い実施した。

当該試験に先立ち、１群5匹ずつの雌性Wistar Hannover系SPFラットを用いて対照群、パラチオン0.25 mg/kg群、MPMC 30 mg/kg群及びパラチオン0.125 mg/kgとMPMC 15 mg/kgの複合投与群の4群で7日間の反復強制経口投与による予備試験を実施した。その結果、パラチオン0.25 mg/kg群において、血漿中コリンエステラーゼ活性の低下がみられたが，脳内コリンエステラーゼ活性に変化はみられなかった。臓器重量検査において、パラチオン0.25 mg/kg群及びMPMC 30 mg/kg群で胸腺重量の減少傾向が認められた。これらの予備試験結果に基づいて、明らかな毒性変化が予想される予備試験用量の２倍用量を選択した。投与用量は対照群 (0 mg/kg)、パラチオン0.5 mg/kg群、MPMC 60 mg/kg群及びパラチオン0.25 mg/kgとMPMC 30 mg/kgの複合投与群の４群を設定した。

各用量の被験物質投与液を週に1回調製した。投与液調製時には純度換算を行なった。投与容量は5 mL/kgとした。所定量の被験物質を秤量した後、パラチオンではコーン油にて0.1 mg/mLの濃度に、MPMCでは1%Tween80水溶液（Tween80、和光純薬工業株式会社）にて12 mg/mLの濃度に溶解あるいは懸濁させた。パラチオンとMPMCの複合投与液は、上記2液を1：1にてスターラーで懸濁し、使用した。対照群では、コーン油及び1%Tween80水溶液の1：1混合液を媒体として用いた。各濃度の投与液は小分けし、冷蔵・遮光（5℃）条件下にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

全動物について、投与期間中1日2回瀕死状態ないし死亡の有無を、1日1回被験物質投与後に一般状態を観察した。また、全動物について、詳細な状態の観察を投与開始前、投与4日、8日、11日及び14日に実施した。観察は、ケージ内あるいは外 (オープンフィールド) で以下の項目を対象に実施し、それらの程度をスコアリングして記録した。［詳細な状態の観察項目：体位/姿勢、呼吸状態、攣縮、振戦、痙攣、警戒性、攻撃性、眼球突出、眼瞼閉鎖、流涙、流涎、粘膜、分泌物/付着物、筋緊張、取り扱いに対する反応、瞳孔径の変化、常同行動、異常行動、被毛の状態、皮膚色、探索行動、歩様異常、立ち上がり姿勢、糞の個数、糞の状態及び尿の状態］

全動物について、投与開始時（0日）、投与1日、3日、7日、10日および14日に体重を測定した。また、全動物について殺処分前に最終体重を測定した。2週間反復投与終了後の全生存動物について、血液学的検査を実施した。動物をエーテル麻酔下で開腹し、無処理の注射筒を用いて後大静脈より採血した。血液学的検査は、EDTA処理した血液試料を用いて、以下の項目について総合血液学検査装置アドヴィア120（Bayer Corporation）で測定した。［測定項目（略号）：ヘマトクリット値（Ht）、血色素量（Hb）、赤血球数（RBC）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）、血小板数（PLT）、網赤血球

数（Retics）、白血球数（WBC）及び白血球のディファレンシャルカウント；好中球（N）、リンパ球（L）、単球（M）、好酸球（E）、好塩基球（B）、大型非染色球（LUC）］

2週間反復投与終了後の全生存動物について、前項の血液学的検査で採取した血液試料をヘパリン処理した血漿を用い、以下の項目をJCA-BM1250 自動分析装置にて測定した。［測定項目（略号）：アルカリホスファターゼ（ALP）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ASAT）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALAT）、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGTP）、クレアチニン（Creat）、尿素窒素（BUN）、総蛋白（TP）、アルブミン（Alb）、グロブリン（Glob）、アルブミン／グロブリン比（A/G ratio）、血糖（Gluc）、総コレステロール（T.Chol）、トリグリセライド（TG）、総ビリルビン（T.Bil）、カルシウム（Ca）、無機リン（P）、無機リン（P）、カリウム（K）及び塩素（Cl）］

コリンエステラーゼ(ChE)活性の測定は以下のように実施した。2週間反復投与終了後の全生存動物について、血漿、赤血球及び脳のChE活性を測定した。動物をエーテル麻酔下で開腹し、後大静脈よりヘパリン処理を施した注射筒を用いて採血した。得られた血液試料から血漿と赤血球を分離した。また、各動物から脳を摘出し、左右に切り分けた後、全脳重量及び右脳重量を測定した。ChE活性の測定はヨウ化アセチルチオコリンを基質としたDTNB法により行なった。血漿については、JCA-BM1250 自動分析装置を用いてChE活性を測定した。赤血球については、20%(V/V)赤血球浮遊液を調製して、エゼリン（ChE阻害剤）添加及び非添加状況下でオートアナライザーII型(SEAL Analytical, West Sussex, U.K.)を用いてChE活性を測定し、その差（エゼリン非添加時の活性－エゼリン添加時の活性）を赤血球のChE活性とした。脳については、半脳（右）で20%(w/v)脳ホモジネートを調製し、JCA-BM1250自動分析装置を用いてChE活性を測定した。

免疫学的検査として、2週間反復投与終了後に、全生存動物の胸腺及び脾臓について、フローサイトメトリー解析（リンパ球サブセット解析）を実施した。胸腺及び脾臓の半量を５％FCS（牛胎児血清）添加のPBS（Phosphate Buffered Saline）に氷冷下で浸し、時計皿上でステンレス鋼製のメッシュを用いて細胞懸濁液を調製した。脾臓細胞については、0.85％塩化アンモニウム水溶液に懸濁し、室温で10分間静置し、赤血球を溶解させた。総合血液学検査装置アドヴィア 120（Bayer Corporation）を用いて胸腺および脾臓細胞数を計測した。次に、反応抗体との非特異的結合を防ぐため、約1×10^7の胸腺ないし脾臓細胞を20％山羊血清添加PBSにて４℃で10分間培養した。1×10^6の胸腺ないし脾臓細胞について以下の蛍光標識抗ラット細胞膜表面抗原の抗体（BD PharMingen）を用いて4℃で30分間培養・染色した。T細胞のリンパ球サブセットの解析では、 FITC標識抗ラットCD3抗体、PE標識抗ラットCD8抗体及びCy-Chrome標識抗ラットCD4抗体を使用した。B細胞の解析ではCy-Chrome標識抗ラットCD45RA抗体を、NK細胞の解析ではPE標識抗ラットNKR P1A抗体を使用した。染色

後、PBSで洗浄した後、FACS Calibur（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いてリンパ球サブセットを解析した。胸腺リンパ球サブセット解析においては、未成熟胸腺細胞のダブルネガティブ細胞（CD4-CD8-）及びダブルポジティブ細胞（CD4+CD8+）について、また成熟胸腺細胞のヘルパーT細胞（CD4+CD8-）及び細胞傷害性T細胞（CD4-CD8+）について解析した。脾臓リンパ球サブセット解析においては、汎T細胞（CD3+）、汎B細胞（CD45RA+）、ヘルパーT細胞（CD4+CD8-）、細胞傷害性T細胞（CD4-CD8+）及びNatural killer細胞（NK細胞；NKR P1A+）について解析した。各リンパ球サブセットの対象細胞集団は、フロサイトメーターの解析で得られた各細胞集団の統計値（%）に細胞数を乗じて、対象細胞集団の細胞数として表した。

2週間反復投与終了後の全生存動物について剖検し、以下の臓器の固定前の重量（絶対重量）を測定して最終体重から比体重値（相対重量）を算出した。［測定項目：脳、下垂体、胸腺、肝臓、腎臓（両側）、脾臓、副腎（両側）］

2週間反復投与終了後の全生存動物について、エーテルの深麻酔下で腹大動脈・後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。さらに病理学的精査が必要となる可能性を考慮して、剖検時に全動物から以下の臓器及び組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。［採取した臓器：脳、下垂体、胸腺、肝臓、腎臓（両側）、脾臓、副腎（両側）］

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率5及び1%レベルで解析した。体重、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、胸腺及び脾臓の細胞数、フローサイトメトリーによるリンパ球、臓器重量のデータについて、Studentのt検定を実施して対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。詳細な状態の観察所見のスコアについては、ノンパラメトリック手法を用いたDunnett型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有意差の有無を判定した。

IV. 食品中化学物質の複合影響に及ぼす代謝活性化に関する研究（出川）

ヒト肝がん細胞株HepG2およびラット肝由来細胞株Kan-R2に、ラットCYP1A1遺伝子のプロモーター領域にあるAhR結合配列（XRE）の3回繰り返し配列を組み込んだルシフェラーゼプラスミドを導入し、その後、導入遺伝子を安定発現するクローンHepG2-A10およびKanR2-XL8を選択、樹立し、試験細胞株として用いた。

クルクミン（CUR）は生薬試験用標準品（純度99%）を和光純薬より購入し使用した。チアベンダゾール（TBZ）は純度98%（Sigma）、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）は純度99%（Sigma）、没食子酸プロピル（PG）は純度98%（Fluka）のものをそれぞれ購入し、使用した。また、MCについては、98%純度品（Aldrich）を使用した。各化合物はいずれもジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して使用した。

HepG2-A10あるいはKanR2-XL8細胞を2 x 10^4cell/cm^2となるように96穴プレートに播種し、48 時間前培養した。前培養後、被検化合物を添加し、さらに48時間培養した。

培養後、細胞を洗浄し、Alamar Blue試薬（Biosource INTERNATIONAL）を含んだ無血清培地にて2時間培養した。その後、生細胞由来の蛍光代謝物による蛍光を測定し、生存細胞数を定量化した。さらに、溶媒対照群を100とした場合の相対値を算出し、プロビット法により細胞死に対するEC_{50}を算出した。

HepG2-A10あるいはKanR2-XL8細胞を2 x 10^4cell/cm^{2}となるように24穴プレートに播種し、48 時間前培養した。前培養後、被検物質を添加し、24時間培養した。その後、Reporter Lysis Buffer（Promega）を用いて細胞を溶解した。この細胞溶解液にルシフェラーゼ基質液（東洋インキ）を添加し、生じた発光をルミネッセンサーPSN（ATTO）により測定した。また、BCA-protein assay kit（PIERCE）を用いて細胞溶解液中のタンパク濃度を測定し、タンパクあたりの発光強度を算出した。

CYP1A酵素の代表的な基質として知られるエトキシレゾルフィン（ER）を用い、その脱エチル化活性（EROD活性）を指標として、CYP1A酵素活性を測定した。なお、KanR2-XL8細胞の恒常的CYP1A酵素活性は著しく弱いため、ここではHepG2-A10細胞のみを使用した。

前術の方法に準じてHepG2-A10細胞を前培養し、被検物質を処理した。培養後、細胞を洗浄し、さらにERを含んだ無血清培地にて30分間培養した。その後、上清を回収し、生じた蛍光代謝物による蛍光を測定した。また、1N NaOHを用いて細胞を溶解し、この細胞溶解液中のタンパク濃度をBCA-protein assay kit（PIERCE）を用いて測定して、タンパクあたりの酵素活性を算出した。

V. 食品中化学物質の複合影響による反応生成物に関する研究（中澤）

ニトロカテコール（NO_2-CAT）が活性酸素種発生に与える影響を検討した。ラジカル消去作用の評価のため、CATおよびNO_2-CATの抗酸化能を評価するために、塩基性条件下において過酸化水素を添加することで、発生するヒドロキシラジカルとCATおよびNO_2-CATを反応させた。ROS発生量の評価には、蛍光プローブである2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate（DCFH-DA）を用いて励起波長485 nm、蛍光波長523 nm で蛍光強度を測定した。一方、ラジカル発生作用の評価のため、CATおよびNO_2-CATのROS発生能の評価を行うために、フェノール性化合物と高い反応性を示す銅と反応させ、DCFH-DA を用いて蛍光強度を測定した。

ニトロカフェイン酸（NO_2-CFA）が活性酸素種発生に与える影響を検討した。NO_2-CFAの標準品を得るためにカフェイン酸（CFA）と硝酸を酢酸酸性条件化で反応を行った。得られた化合物は高速液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC/MS）および核磁気共鳴法（NMR）によって解析を行なった。

ラジカル消去作用の評価のため、CFAおよびNO_2-CFAの抗酸化能を評価するために、CATと同様の方法で測定した。ROS 発生量の評価には、蛍光プローブであるDCFH-DAを用い、励起波長485 nm、蛍光波長523 nm に設定し蛍光強度を測定した。ラジカル発生作用の評価のため、CFAおよびNO_2-CFAのROS発生能の評価を行うために、

CATと同様に銅と反応させ、DCFH-DAを用いてその蛍光強度を測定した。また、電子スピン共鳴法（ESR）により、発生するROSの定性を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は、各施設の動物実験ガイドラインに準拠し、実験動物委員会の承認に基づき実施した。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置には倫理基準に充分配慮し、実験終了時、安楽死においても深麻酔下、苦痛に配慮した。また、申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で被験物質として使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

C. 研究結果

I. 食品中化学物質の複合影響による*in vivo*変異原性に関する研究（西川）

<実験1.>投与期間中に一般状態の異常はみられなかった。体重推移では、カテコール併用投与群およびフィチン酸併用投与群で投与7週以降にグルコン酸銅単独投与群と比べて有意な低値で推移した。また、酵素処理イソクエルシトリン併用投与群とフィチン酸併用投与群で投与2週目に体重の有意な低値が認められた。摂餌量は群間で差はみられなかった。摂水量はカテコール併用投与群、タンニン酸併用投与群並びにフィチン酸併用投与群において、投与期間を通してグルコン酸銅単独投与群に比べて低値を示した。肝重量はフィチン酸併用投与群で絶対重量の高値が認められた。グルコン酸銅の13週間混餌投与により、肝組織中の銅濃度の高値がみられ、AST、ALT並びにALPの高値が認められたが、併用投与の影響は認められなかった。また、フィチン酸併用投与群で血清中の銅濃度の高値が認められた。病理組織学的検索ではいずれの投与群でも肝細胞の変性、壊死が散見されたが、併用投与による影響は認められなかった。TBARSレベルはカテコール併用群でグルコン酸銅単独投与群と比べて有意な高値を示した。肝DNA中の8-OHdGレベルはグルコン酸銅投与により高値を示したが、群間で差は認められなかった。

<実験2.>グルコン酸銅投与によりTBARSレベルの有意な高値が認められたが、いずれの観察時点でも併用投与による影響は観察されなかった。肝DNA中の8-OHdGレベルはグルコン酸銅投与群で対照群と比べて高値傾向を示したが、いずれの観察時点でもカテコール併用投与による影響は観察されなかった。

<実験3.>グルコン酸銅投与によりTBARSレベルの有意な高値が認められたが、いずれの観察時点でも没食子酸プロピル併用投与による影響は観察されなかった。

II. 食品中化学物質の複合影響による発がん性に関する研究（田中）

実験期間中のマウス当たりの1日摂餌量（平均値±SD 、g）は、雄で第1群：5.6 ± 1.75、第2群：5.2 ± 1.65、第3群：5.8 ± 1.73、第4群：6.0 ± 1.60、第5群：5.4 ± 1.44、第6群：5.0 ± 1.12、雌で第1群：5.7 ± 1.54、第2群：5.5 ± 1.60、第3群：5.7 ± 1.74、第4群：5.7 ± 1.53、第5群：5.5 ± 1.33、第6群：4.9 ± 0.82であり、雌雄とも無処置群に比べ処置群でやや多い傾向にあったが、群間に有意の差はなかった。

実験期間中の体重増加に関しては雌雄とも、各群間に有意の差はみられなかったが、実験4週時の雌の平均体重は、第3群（18.98 ± 0.64 g）は第5群（20.25 ± 0.71 g）に比べ有意（P<0.05）に低値であった。実験8週時の雌雄の平均体重は群間に有意の差はなかった。主要臓器の平均重量では、実験4週時の雄腎重量（左右）で、第1群（0.36 ± 0.02 g）、第2群（0.36 ± 0.02 g）でG6（0.40 ± 0.02 g）群に比べ有意（P<0.05）に低かった。肝重量では、実験8週時の雌で、第2群（1.05 ± 0.05 g）がG6（0.92 ± 0.07 g）群に比べ有意（P<0.05）に高かった。実験終了時（8週）には結腸長を測定したが、G1（8.00 ± 0.14 cm、P<0.01）、G2（8.30 ± 0.47 cm、P<0.05）、G3（8.10 ± 0.74 cm、P<0.01）でG5（9.38 ± 0.45 cm）に比べ有意に短かった。

血液生化学的検査では、実験4週時の雄HDLコレステロール値（mg/dL）で、第1群（68.0 ± 2.92、P<0.05）、第3群（67.4 ± 3.05、P<0.05）、第5群（66.8 ± 2.59、P<0.01）は第6群（74.0 ± 2.35）に比べ有意に低値であり、第3、5群の値は第4群（73.2 ± 2.77）よりも有意（P<005）に低かった。実験4週時の雌では、第4群の中性脂肪値（65.8 ± 4.56 mg/dL）が、第5群（45.0 ± 6.28 mg/dL、P<0.01）、第6群（46.0 ± 7.54 mg/dL、P<0.05）に比べ有意に高かった。８週時の血液生化学検査は雌雄とも群間に有意な差をみなかった。

病理組織学的検査（肝、腎、脾）では、実験8週時の第2群雄の1匹の左腎臓に水腎症を認めた以外、特記すべき所見はみられなかった。

一方、実験開始後4週における肝（左葉）の遺伝子発現のmicroarray解析では、そのクラスタリング結果において無処置群に比べた複合投与の用量による変化の比較で、雄では、prostate cancer pathway、biosynthesis of steroid pathway、erbB signaling pathwayの遺伝子発現が濃度依存的にup-regulateし、type I disbetes mellitus pathway、arachidonic acid metabolism pathway、metabolosm of xenobiotics by cytochrome P450 pathwayがdown-regulateし、雌では、toll-like receptor signaling pathwayの遺伝子発現が濃度依存的にup-regulateし、C21-steroid hormone metabolism pathway、Parkinson’s disease pathway、neurodegenerative diseases pathway、androgen/estrogen metabolism pathway、metabolosm of xenobiotics by cytochrome P450 pathway、circadian rhythm pathwayがdown-regulateしていた。無処置群に対する最高用量（500 ppm）の複合投与と単独投与（500 ppm）での発現変化の比較では、雄でaxon guidance pathway、biosynthesis of steroids pathwayの遺伝子発現が複合投与群で単独投与群に比べてup-regulateし、雌では、type II disbetes mellitus pathway、type I disbetes mellitus pathway、insulin signaling pathway、cell adhesion molecules (CAMs) pathway、antigen processing and presentation pathwayが複合投与群で単独投与群に比べてup-regulateしていた。一方、Cyp遺伝子の発現に変化がみられたのは遺伝子変化のグルーピングのgroup 7（複合投与用量依存性に上昇、雄）、group 12（複合投与により上昇、雄）、group 15（複合投与により減少、雄）、group 26（複合投与により減少、雌）、group 31（複合投与により減少、

雌）にみられ、その変化は雄に顕著で、雌での変化は軽微であった。さらに、Cyp遺伝子の発現変化の程度を詳細に検討すると雄の複合投与の用量による変化の比較では、Cyp2b10、Cyp2b9、Cyp2b13の発現がdown-regulateし、雌ではCyp2b10、Cyp4b12の発現がup-regulateしており、また無処置群に対する最高用量（500 ppm）の複合投与と単独投与（500 ppm）での発現変化の比較では、雄でCyp2c70がup-regulateし、Cyp4a10、Cyp4a14、Cyp2c38、Acyp2がdown-regultaeしており、雌ではCyp7a1、Cyp51がdown-regulateしていた。

III. 残留農薬の複合影響による神経毒性に関する研究（原田）

MPMC単独投与群において、攣縮、振戦、縮瞳及び流涙が10例中全例に、被毛の汚れが7例に観察され、いずれも対照群と比べ統計学的有意差が認められた。また、パラチオンとMPMCの複合投与群では、縮瞳が10例中全例に、攣縮が4例に認められ、いずれも統計学的有意差を示した。パラチオン単独投与群では一般状態に異常は認められなかった。

詳細な状態の観察の結果、スコアの変動が認められた項目を表2に示す。表にない項目は全ての動物でスコア0あるいはN(観察不能)であった。MPMC単独投与群において、投与4日に筋緊張低下を示す動物の発生頻度が有意に増加した。その他の投与群では、観察項目に異常所見は認められなかった。

MPMC単独投与群において、統計学的に有意な体重減少が投与7日に認められた。その他の投与群では、有意な体重変化はみられなかった。

MPMC単独投与群において、血小板値の有意な増加が認められた。その他の投与群では、被験物質投与に関連付けられる有意な変化はみられなかった。

パラチオン単独投与群では、尿素窒素値の有意な減少と総ビリルビン値の有意な増加が観察された。MPMC単独投与群では、総蛋白、アルブミン、カルシウム値の有意な減少及び総ビリルビンとリン値の有意な増加が観察された。パラチオンとMPMCの複合投与群では、血漿グロブリンと総コレステロール値の有意な増加及びA/G比の有意な減少が観察された。

パラチオン単独投与群では、血漿のChE活性、赤血球中ChE活性及び脳のChE活性に統計学的に有意な低下がみられ、対照群の値と比べそれぞれ58%、26%及び86%の低下であった。MPMC単独投与群では、血漿のChE活性に有意な低下がみられ、対照群と比べ72%の低下であった。パラチオンとMPMCの複合投与群では、赤血球中ChE活性に有意な低下がみられ、対照群と比べ63%の低下であったが、血漿及び脳のChE活性については有意な低化は認められなかった。

パラチオン単独投与群では、脾臓細胞数に有意な増加及び胸腺細胞数に増加傾向が観察され、MPMC単独投与群では胸腺細胞数に減少傾向が観察された。胸腺のリンパ球サブセット解析において、MPMC単独投与群では成熟胸腺細胞のヘルパーT細胞の有意な減少及び未成熟胸腺細胞のダブルポジティブ細胞（CD4+CD8+）の減少傾向が観察された。脾臓のリンパ球サブセット解析において、パラチオン単独投与群では、汎B細胞の有意な増加が観察された。パラチオンとMPMCの複合投与群では、いずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった。

MPMC単独投与群では、脾臓の絶対重量及

び相対重量の有意な減少が、そして副腎の絶絶対重量及び相対重量の有意な増加が認められた。その他の投与群では、複合投与群を含め特に異常は認められなかった。

いずれの投与群にも被験物質投与に関連付けられる有意な肉眼的異常は観察されなかった。

IV. 食品中化学物質の複合影響に及ぼす代謝活性化に関する研究（出川）

KanR2-XL8およびHepG2-A10の細胞増殖に対する各被験化合物の影響を、Alamar Blue Assayにより検討した。CURには用いた両細胞に対し強い細胞増殖阻害性が見られた。また同様に、BHTにも弱いながら細胞増殖阻害活性が見られた。

各被験化合物を単独で処理した場合のAhR活性化およびCYP1A酵素活性に及ぼす影響について、HepG2-A10細胞およびKanR2-XL8細胞を用いて検討した。その結果、TBZ（10 μM、100 μM）処理群では、有意なAhRの活性化が認められたが、CUR、BHTあるいはPG処理群では、いずれの細胞株においてもAhRの活性化は認められなかった。また、いずれの被検化合物の処理によっても、CYP1A酵素活性の有意な増加は観察されなかった。

4種の被験化合物のうち2種を組み合わせた場合のAhR活性化に及ぼす影響についてHepG2-A10細胞を用いて検討した。その結果、TBZと他の被検化合物のそれぞれ複合曝露群において、TBZ単独処理群と同程度のAhR活性化が認められたに過ぎず、他の組み合わせ処理による有意なAhRの活性化は認められなかった。

環境中にはダイオキシン類や芳香族炭化水素類など、様々なAhRリガンドが存在しており、これらAhRリガンドと食品添加物の相互作用の有無についても興味が持たれる。そこで、AhRリガンドであるMCによって惹起されるAhR活性化やCYP1A酵素誘導に及ぼす被検化合物の影響について検討した。MCとCURあるいはTBZの複合処理により、MC単独処理時に比べて有意なAhR活性化増強が認められた。一方、BHTやPGの複合処理による影響は認められなかった。CYP1A酵素活性についても、弱いながらCURあるいはTBZとMCによる複合処理効果が認められた。

前項において、MCによるAhR活性化およびCYP1A酵素活性化（誘導）を増強したCURおよびTBZについて、その濃度依存性を検討した。AhR活性化およびCYP1A酵素誘導はCUR単独処理群では認められなかったが、0.1 μM MCの存在下では、最大濃度（10 μM）のCUR処理により有意なAhR活性化およびCYP1A酵素活性の上昇が観察された。TBZは単独高濃度（200 μM）において有意にAhR活性化を引き起こしたが、その程度は0.1 μM MC処理群と同程度であった。MC（0.1 μM）との複合処理では、TBZの濃度に依存的なAhR活性化増強が認められた。AhR活性化と同様、CYP1A酵素活性についてもTBZ単独処理群ではほとんど上昇が認められなかったのに対し、MCの存在下では、TBZの濃度に依存的した活性の上昇が観察された。また、MC共存下におけるAhR活性化およびCYP1A活性の増強はいずれも低濃度（6 μM）のTBZ処理により惹起されることも確認された。

V. 食品中化学物質の複合影響による反応

生成物に関する研究（中澤）

ニトロカテコール（NO_2-CAT）はCATと同様に抗酸化作用が見られた。しかし、ラジカル発生作用については、NO_2-CATの方がROSの発生量が有意に増大する結果が得られた。

ニトロカフェイン酸（NO_2-CFA）が活性酸素種発生に与える影響を検討するため、C-2-1. NO_2-CFAを合成した。酢酸酸性条件下で硝酸と反応させ、得られた化合物をLC/MSで測定を行ったところ、ネガティブイオンモードで分子量関連イオンのピークである*m/z* 224を確認することができた。また、NMRによる構造解析の結果、カフェイン酸の2位がニトロ化されたNO_2-CFAを確認した。CFAおよびNO_2-CFAの抗酸化能を評価するために、CATと同様にヒドロキシラジカルとCFAおよびNO_2-CFAをそれぞれ反応させた。その結果、それぞれの化合物についてDCFH-DAの蛍光強度が減少したことにより、ニトロ化によって抗酸化作用は変化しないことを確認した。

CFAおよびNO_2-CFAのROS 発生能の評価を行うために、フェノール性化合物と高い反応性を示す銅と反応させ、DCFH-DAを用いてその蛍光強度を測定した。銅と反応させることで、ROSの発生量がニトロ化によって有意に増大した。また、抗酸化物質であるアスコルビン酸、マンニトールを添加することで、ROSの発生量は減少した。さらに、ESRでもヒドロキシラジカルの増加が確認された。これらの結果より、ニトロ化によってROS発生量の増加が認められた。

D. 考察

グルコン酸銅と食品中の化学物質との13週間併用投与試験を実施し、酸化的ストレスに対する複合影響を検索した。体重では、カテコール併用投与群とフィチン酸併用投与群でグルコン酸銅単独投与群と比べて低値が認められた。同群では摂餌量には差異はなかったものの、投与期間を通して摂水量の低値が認められ、体重増加抑制の原因がカテコールあるいはフィチン酸自体の影響の可能性も考えられ、今回の実験条件からは併用投与の体重増加に及ぼす影響は明らかとはならなかった。肝重量ではフィチン酸併用投与群で絶対重量の高値が認められたが、相対重量に変化はなく、体重減少に伴う変化と考えられた。グルコン酸銅投与により肝組織中の銅濃度の高値、血清中のAST、ALT並びにALPの高値が認められた。病理組織学的にも肝細胞の変性、壊死が散見され、銅蓄積に起因すると考えられる肝障害が認められた。また、肝DNA中の8-OHdGレベルの上昇が認められ、酸化的ストレスが誘発されることが示された。しかし、これらのパラメーターに抗酸化物質の複合効果は認められなかった。TBARSレベルではカテコール併用投与群でグルコン酸銅単独投与群と比べて有意な高値が認められたが、変動の幅は僅かであり、生物学的意義は低いと考えられた。また、フィチン酸併用投与群で血清中の銅濃度がグルコン酸銅単独投与群と比べて有意な高値が認められた。雄性離乳ラットにフィチン酸を混餌投与すると銅の生物学的利用能を増加させ、結果として血中銅濃度が上昇することが報告されており、本試験において認められたフィチン酸併用投与による血清中の銅濃度の増加は本機序による可能性が考え

られた。

13週間併用投与試験では、ラット肝への過剰な銅の蓄積を惹起するためにグルコン酸銅を混餌投与とし、抗酸化物質を飲水投与とした。この投与方法は抗酸化物質の水溶液中での安定性の点から、選択できる抗酸化物質が限られ、また、動物の忌避行動や毒性の点から高用量での投与が困難であった。そこで、より高用量の抗酸化物質を投与した時の影響を検討するため、ラットにグルコン酸銅を2週間投与し、カテコールを強制経口投与する試験を実施し、酸化的ストレスに対する複合影響を検索した。また、脂溶性の抗酸化物質として没食子酸プロピルを選択し、同様の方法で実施した。グルコン酸銅2週間混餌投与により、ラット肝のTBARSおよび8-OHdGレベルの上昇が認められ、酸化的ストレスが誘発されることが再確認された。しかし、高用量のカテコールまたは没食子酸プロピルの併用投与による酸化的ストレスへの複合影響は認められなかった。(西川)

食品中に存在する様々な化合物のうち、発がん抑制が知られるcurcuminとquercetinをマウスに単独及び複合混餌投与して全臓器の病理組織学的変化に解析し、血液生化学的変化および肝臓における主として薬物代謝酵素の変化をmicroarrayにて解析した。その結果、両化合物の複合投与や単独投与による病理組織学的変化は認められず、いずれのパラメータでも複合投与の群間で用量による有意の差はなかった。しかし、投与4週時でのmicroarray解析では、複合投与の用量や最高用量(500 ppm)の複合投与と単独投与での比較で、いくつかのpathwayで遺伝子発現の変化がみられ、また雌雄差も観察され、雄でのprostate cancer pathway、biosynthesis of steroid pathway、雌でのC21-steroid hormone metabolism pathway、type II disbetes mellitus pathwayの変化が顕著であった。現在、そのpathwayにおいてみられた具体的な遺伝子の同定を行っているところである。肝薬物代謝酵素P450 (Cyp)関連遺伝子の変化では、雌雄により発現遺伝子が異なり、その発現パターンも異なっていた。しかし、これらの遺伝子発現変化を除き、他のパラメータでの観察ではcurcuminとquercetin複合投与による変化は乏しいものと考えられた。今後、遺伝子発現パターンの解析を詳細に実施して行く予定である。(田中)

農薬の複合毒性については、社会的関心は高いものの、実験上及び評価上の困難性などにより未解決な問題点が多い。有機リン剤の複合投与影響について記載されている文献を挙げてみると、MPP (Fenthion) とDDVP (Dichlorvos) の混合投与により相加毒性作用が認められたとの報告[1]がある。パラチオン (Parathion) では、クロルピリフォス (Chlorpyrifos) の先行投与および同時投与により神経毒性作用が強まることが報告されている[2]。さらに、フェニトロチオン (Fenitrothion) とカーバメート剤のBPMCを混合投与すると予想致死量の2倍の毒性を示すことが報告されている[3]。このように、有機リン剤の複合毒性は、それらの暴露状況により相加的あるいは相乗的に多様に作用する可能性が示唆されている。また、近年食品中の残留農薬の成長期の子供への累積暴露影響が懸念され、農薬の反復複合暴露影響調査の重要性が注目されている。そこで本研究では、有機リン剤のパラチオン

及びカーバメート剤MPMCを対象にラットを用いて複合的に2週間反復経口投与し、一般毒性、神経毒性及び免疫毒性関連項目を指標に複合暴露影響を評価した。

一般毒性：血液学的検査では、MPMC単独投与群において血小板の増加がみられたものの、パラチオンとMPMCの複合投与群では有意な変化は認められなかった。血液生化学的検査では、パラチオンとMPMCの複合投与群において血漿グロブリンと総コレステロール値の有意な増加が観察された。これらの変化は、それぞれの単剤投与群ではみられない変化であったことから、複合投与により惹起された変化であると考えられた。臓器重量検査では、MPMC単独投与群に脾臓重量の減少と副腎重量の増加がみられたものの、パラチオンとMPMCの複合投与群では有意な変化はいずれの臓器重量においても認められなかった。

神経毒性：一般状態の観察およびスコアリングによる詳細な状態の観察の結果、パラチオンとMPMCの複合投与群では、縮瞳および攣縮が認められた。しかし、これらの変化は、MPMC単独投与群で高頻度に認められていることから、複合投与による相加・相乗的な神経毒性とは考えられなかった。コリンエステラーゼ（ChE）活性において、パラチオン投与群で血漿ChE、赤血球中ChE及び脳ChE活性に低下がみられ、パラチオンとMPMCの複合投与群では赤血球中ChE活性に低下がみられた。複合投与群の赤血球中ChE活性の低下は、パラチオン投与群の半分程度の低下であり、複合投与によるChE活性への影響（増強効果）は認められなかった。

免疫毒性：胸腺および脾臓のリンパ球サブセット解析において、MPMC 単独投与群ではヘルパーT 細胞の減少及び未成熟胸腺細胞のダブルポジティブ細胞（CD4+CD8+）の減少傾向が観察され、パラチオン単独投与群では汎 B 細胞の増加が観察された。一方、パラチオンと MPMC の複合投与群では、T 細胞や B 細胞集団に変化は認められず、むしろ単剤投与群に比べ免疫細胞の変化が軽減される傾向にあり、複合投与による免疫毒性の増強効果はみられなかった。（原田）

本研究では、食品添加物であり、かつ肝 CYP 分子種の発現変動を引き起こす事が知られている CUR、TBZ、BHT および PG を用いて、AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導に及ぼす影響を検討した。その結果、用いた被検化合物のうち、TBZ にのみ単独で AhR 活性化作用があることや、MC との複合処理により CUR や TBZ が MC の AhR 活性化ならびに CYP1A 酵素活性の誘導を増強することを明らかとした。以下に、化合物ごとに考察する。

ヒト肝癌細胞由来のHepG2-A10およびラット肝細胞由来のKanR2-XL8細用いた本研究結果より、CURがAhRリガンド様作用を示す可能性は低いものと考えられる。CURは雌マウス肝ではCYP1A誘導性を示さないことが報告されており、本研究結果はこれと一致した。一方、CURはヒト初代肝細胞やがん細胞株においてAhR依存的にCYP1A1遺伝子の発現を増加させることが報告されている。したがって、細胞の種類や動物種間、あるいは培養条件の違いなどによりCURのCYP1A酵素誘導性やAhR活性化能が異なる可能性がある。

MCとの複合曝露の結果からは、CURはAhRリガンドによるAhR活性化を間接的に増強している可能性が示唆された。これまでに、CURはTCDDによるCYP1A酵素誘導

を阻害することや、AhR活性化を阻害することが示されており、本研究の結果とは一致しない。これらの相違は用いた細胞の種類や培養条件の違いによって生じたものと考えられる。

TBZの単独処理によりAhRは活性化されたものの、CYP1A酵素活性の上昇は見られなかった。TBZはオメプラゾール（OME）に類似した構造を持つベンズイミダゾール誘導体であり、AhRには直接結合することなく間接的にAhRを活性化し、CYP1A遺伝子の発現を誘導する事が知られている。また、HepG2細胞においては、TBZ処理によるCYP1A酵素誘導はmRNAレベル、蛋白レベルでのみ認められるという報告があり、本実験結果はこれらと一致した。

一方、MCとの複合曝露の結果から、TBZはAhRリガンドによるAhR活性化およびCYP1A酵素活性化を増強することを見出した。したがって、TBZあるいはOMEなどのベンズイミダゾール誘導体には、環境中に含まれるAhRリガンドによるAhR活性化やCYP1A酵素誘導を促進する可能性が考えられる。TBZやOMEとAhRリガンドによる相乗的なCYP1A酵素誘導や、相乗的なAhR活性化についての報告は見当たらず、*in vivo*レベルでの相乗作用の有無、あるいは相乗作用に伴った毒性発現などについても更なる検討が必要である。

BHTやPGはHepG2-A10およびKanR2-XL8に対して、AhR活性化能やCYP1A酵素誘導能がないことが明らかになった。BHTにはマウス肝において弱いCYP1A酵素誘導作用があるとの報告があるが、*in vitro*培養細胞における誘導性については報告されていない。また、ニトロアニソール類やイソサフロールなど、比較的分子量の小さなCYP1A酵素誘導剤は*in vivo*特異的な誘導作用を示すことが明らかとなっており、BHTも*in vivo*特異的なCYP1A酵素誘導剤である可能性が考えられた。PGについては、CYP1A酵素に対する阻害作用がこれまでに報告されている。本研究の予備試験においても、PGがエトキシレゾルフィンの脱*O*-アルキル化反応を阻害することを見いだしており、これまでの報告を支持するものと思われた。（出川）

本研究では、食品中に含まれるフェノール性抗酸化物質であるCATおよびCFAと$NaNO_2$の併用投与によるニトロ化反応によるROS発生量に及ぼす影響の解明を行った。ROS生成は、種々の発がん機構に関与することが知られていることから、生体内で摂取されたフェノール性化合物と$NaNO_2$の併用投与によってROS生成の増加が起こり、さまざまな疾患へとつながることが考えられる。抗酸化作用の評価ではニトロ化された物質においても同様の抗酸化作用が認められた。しかし、ラジカル発生作用はニトロ化を受けたことにより、ROSの発生量に大きな変化が認められた。本研究で明らかとなったニトロ化反応によるラジカル発生作用の増強は極めて重要な知見であり、抗酸化物質の安全性についてさらに研究を進めていく必要がある。（中澤）

E. 結論

グルコン酸銅投与によりラット肝で銅の蓄積に起因すると考えられる酸化的ストレスが誘発され、13週間投与では肝障害が認められているが、今回の実験条件下ではグルコン酸銅と抗酸化物質との併用投与によ

る複合影響は認められず、*in vitro*で報告されている遷移金属を触媒としたフェノール系抗酸化物質による酸化的ストレスの誘発は*in vivo*で明らかとはならなかった。また、金属キレート剤とグルコン酸銅との複合影響により、銅の生物学的利用能の増加に伴う血清中の銅濃度の増加が認められたが、酸化的ストレス誘発への影響は明らかとならなかった。

肝薬物代謝酵素P450 (CYP)活性を修飾し、発がんに抑制的に作用するとされる化合物であるcurcuminとquercetinを選択し、その複合投与による諸臓器の遺伝子発現変異をmicroarray解析により検討した。その結果、投与4週時でのmicroarray解析では、複合投与と単独投与での比較で、いくつかのpathwayで遺伝子発現の変化がみられ、また雌雄差も観察され、雄でのprostate cancer pathway、biosynthesis of steroid pathway、雌でのC21-steroid hormone metabolism pathway、type II diabetes mellitus pathwayの変化が顕著であった。

殺虫剤の有機リン剤（パラチオン）とカーバメート剤（MPMC）の複合暴露影響を明らかにするため、雌性ラットに両剤を2週間にわたり同時に反復経口投与し、一般毒性、神経毒性及び免疫毒性関連項目を指標にその複合暴露影響を調査した。その結果、パラチオンとMPMCの反復複合投与により血漿中のグロブリン及び総コレステロールが上昇することが示唆された。

食品添加物として繁用されているチアベンダゾールやcurcuminがAhR活性化やCYP1A酵素活性上昇（誘導）に影響を及ぼす可能性が示唆された。特筆すべきは、これら化合物は3-メチルコラントレンと複合曝露されることでAhR活性化やCYP1A酵素活性誘導において相乗的な誘導作用を示すことを見いだしたことである。これまで、AhR活性化やCYP1A酵素活性誘導にける複合影響についての報告例はほとんどなく、本研究結果はAhR活性化やCYP1A酵素誘導を介した毒性発現を考える上で重要であると思われた。

食品中フェノール性抗酸化物質と$NaNO_2$の併用投与によるニトロ化反応で発生する活性酸素種 (ROS)への影響を検討した結果、ニトロ化された物質においても同様の抗酸化作用が認められたが、ニトロ化を受けることにより、ラジカル発生作用はROSの発生量を大きく増強した。本研究で明らかとなったニトロ化反応によるラジカル発生作用の増強は極めて重要な知見であり、抗酸化物質の安全性についてさらに研究を進めていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

岡村俊也，石井雄二，井上知紀，田崎雅子，梅村隆志，広瀬雅雄，西川秋佳：グルコン酸銅摂取によるラット肝酸化的ストレスの誘発とカテコール併用投与による修飾効果の検討. 第24回日本毒性病理学会 2008年2月7日

大柄敦資、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、

斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之. カテコールのニトロ化と活性酸素種生成. 第20回バイオメディカル分析科学シンポジウム（BMAS 2007）（2007年7月・東京）

Atsushi Ogara, Yusuke Iwasaki, Yuji Ishii, Rie Ito, Koichi Saito, Akiyoshi Nishikawa and Hiroyuki Nakazawa. Effect of the nitration on generation of the reactive oxygen species for caffeic acid. 59th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy（2008年2月・アメリカ）

大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之. フェノール性化合物のProoxidant 作用に対するニトロ化反応の影響. フィジカル・ファーマフォーラム2008（2008年3月・東京）

大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之. カフェイン酸による活性酸素種生成に及ぼすニトロ化の影響. 日本薬学会　第128年会（2008年 3月・東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし