

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

分担研究者： 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

グルコン酸銅は保健機能食品の成分として使用の拡大が予想される。しかし、グルコン酸銅の過剰摂取はラット肝に銅の蓄積を惹起し、肝障害を誘発することが報告されている。また、遺伝的に肝臓に銅を蓄積する LEC ラットでは酸化ストレスを生じることが知られている。そこで今回、グルコン酸銅をラットに投与し、銅蓄積による酸化ストレス誘発の有無を検討した。更に、*in vitro* において銅イオンを触媒とした活性酸素生成系を有するフェノール系抗酸化物質を併用投与し、*in vivo* における複合影響を検討した。また、食品に含まれる金属キレーターであるフィチン酸とグルコン酸銅を併用投与し、食品からの銅の過剰摂取に対する効果を検討した。6 週齢の雄 F344 ラットにグルコン酸銅を 6000 ppm 混餌、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 飲水で 13 週間投与し、血清生化学的検査（AST、ALT、ALP）、血清及び肝組織中銅濃度、病理組織学的検査、肝臓の脂質過酸化（TBARS）および肝 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを測定した。グルコン酸銅投与により肝組織中の銅濃度、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、8-OHdG レベルの上昇も認められ、酸化ストレスが誘発されることが示された。しかし、抗酸化物質の複合効果は認められなかった。そこで、より高用量での抗酸化物質の複合影響を検索するために、グルコン酸銅をラットに 2 週間投与後、カテコールまたは没食子酸プロピルを 150 または 2000 mg/kg の用量で単回強制経口投与し、投与 0、2、6、12 及び 24 時間後に解剖し、TBARS および 8-OHdG レベルを測定した。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、酸化ストレスが誘発されることが明らかとなった。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ストレスへの複合影響は認められなかった。今回の実験結果より、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ストレスが誘発され、肝障害が生じることが示された。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あるいは金属キレート剤との併用投与による複合影響は明らかとはならなかった。

A. 研究目的

グルコン酸銅は人工栄養児の銅強化の目的で 1983 年に食品添加物として指定され、母乳代替食品への使用のみが認められていた。しかし近年、法改正により保健機能食品の成分としての使用が認可され、今後、使用用途が拡大することが見込まれている。グルコン酸銅は Ames 試験で陰性を示しており、各種の動物を用いた反復投与毒性試験にて高用量投与群で肝障害等が認められ

ている。発がん性については、ラットを用いた中期多臓器発がん性試験により、グルコン酸銅は肝と前胃の増殖性病変の発現を促進することが報告されている。また、遺伝的に肝臓に銅を蓄積する LEC ラットでは、肝臓において銅の蓄積に起因すると考えられる酸化ストレスが生じることが知られていることから、食品中の銅含有化合物の過剰摂取は肝臓への銅の蓄積を惹起し、酸化ストレスを誘発することが懸念される。

一方、食品中に含まれるカテコールや没食子酸プロピルなどの抗酸化物質は *in vitro* において遷移金属との共存下で DNA 損傷を引き起こすことが知られている。従って、グルコン酸銅摂取により肝臓中に蓄積した銅イオンを触媒として、抗酸化物質からの酸化ストレス発生の可能性も考えられ、何れも食品中に含まれる化学物質であることを考慮すると、その複合影響を検索することはヒトへの健康影響にとって緊急の課題である。そこで、本研究ではグルコン酸銅投与による銅の過剰な蓄積による酸化ストレスの有無を検討するとともに、*in vivo* における食品中に含まれる金属と種々の抗酸化物質の複合摂取による影響を検討した。また、食品中に含まれる金属キレーターであるフィチン酸とグルコン酸銅の複合影響を検索し、食品からの銅の過剰摂取に対する修飾効果を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質

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。

### 2. 動物及び飼育条件

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スシステムの動物室にて行い、室内の環境は温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、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。

### 3. 試験デザイン

<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。

#### 4. 血清生化学的検査、血清および肝組織中の銅濃度測定

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。

#### 5. 肝臓の脂質過酸化レベルの測定

脂質過酸化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。

#### 6. 肝DNA中の8-OHdGレベルの測定

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 phosphatase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<sup>5</sup>dGとして求めた。

#### 7. 病理組織学的検査

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。

#### 8. 統計処理

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。

#### （倫理面への配慮）

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所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。

#### C. 研究結果

<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 (Fig. 1)。摂餌量は群間で差はみられなかった (Fig. 2)。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 (Fig. 3)。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 (Table 1)。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 (Table 2)。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 (Fig. 4)。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 (Fig. 5)。

<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 (Fig. 6)。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 (Fig. 7)。

<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 (Fig. 8)。

#### 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ストレスへの複合影響は認められなかった。

#### 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た。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、酸化ストレス誘発への影響は明らかとはならなかった。

#### F. 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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

**Table 1. Final body weights and liver weights**

Group	Treatment	No. of rats	Final body weight (g)	Liver weight	
				Absolute (g)	Relative (g/100 g B.W.)
1	CuGL + DW	5	294 ± 9	7.95 ± 0.21	2.71 ± 0.11
2	CuGL + Catechol	5	268 ± 9**	7.58 ± 0.12	2.83 ± 0.07
3	CuGL + Tannic acid	5	282 ± 8	7.70 ± 0.34	2.73 ± 0.11
4	CuGL + E.M.I.	5	290 ± 14	7.64 ± 0.46	2.63 ± 0.11
5	CuGL + Phytic acid	5	266 ± 7**	7.23 ± 0.26**	2.71 ± 0.06

\*\* ;  $P < 0.01$  vs. Group 1.

CuGL; Copper gluconate., E.M.I.; Enzymatically modified isoquercitrin.

**Table 2. Serum biochemical data**

Group	Treatment	No. of		AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)
		rats				
1	CuGL + DW	5		347.4 ± 69.9	301.2 ± 57.9	781.0 ± 32.8
2	CuGL + Catechol	5		468.2 ± 144.9	395.6 ± 96.9	827.6 ± 38.1
3	CuGL + Tannic acid	5		480.8 ± 84.3	377.0 ± 87.4	799.4 ± 54.9
4	CuGL + E.M.I.	5		411.6 ± 150.6	313.6 ± 149.0	757.2 ± 26.9
5	CuGL + Phytic acid	5		507.6 ± 63.5	446.0 ± 28.8	842.2 ± 100.5

CuGL; Copper gluconate, E.M.I.; Enzymatically modified isoquercitrin.

Table 3. Copper concentration of serum and liver tissue

Group	Treatment	No. of rats	Copper concentration	
			Serum ( $\mu\text{g/dL}$ )	Liver ( $\mu\text{g/g}$ wet tissue)
1	CuGL + DW	5	162.2 $\pm$ 9.8	206.7 $\pm$ 139.4
2	CuGL + Catechol	5	179.8 $\pm$ 16.6	373.7 $\pm$ 177.0
3	CuGL + Tannic acid	5	177.8 $\pm$ 17.3	269.6 $\pm$ 128.6
4	CuGL + E.M.I.	5	163.4 $\pm$ 15.1	316.1 $\pm$ 57.9
5	CuGL + Phytic acid	5	191.2 $\pm$ 12*	274.8 $\pm$ 131.3

\* ;  $P < 0.05$  vs. Group 1.

CuGL; Copper gluconate., E.M.I.; Enzymatically modified isoquercitrin.



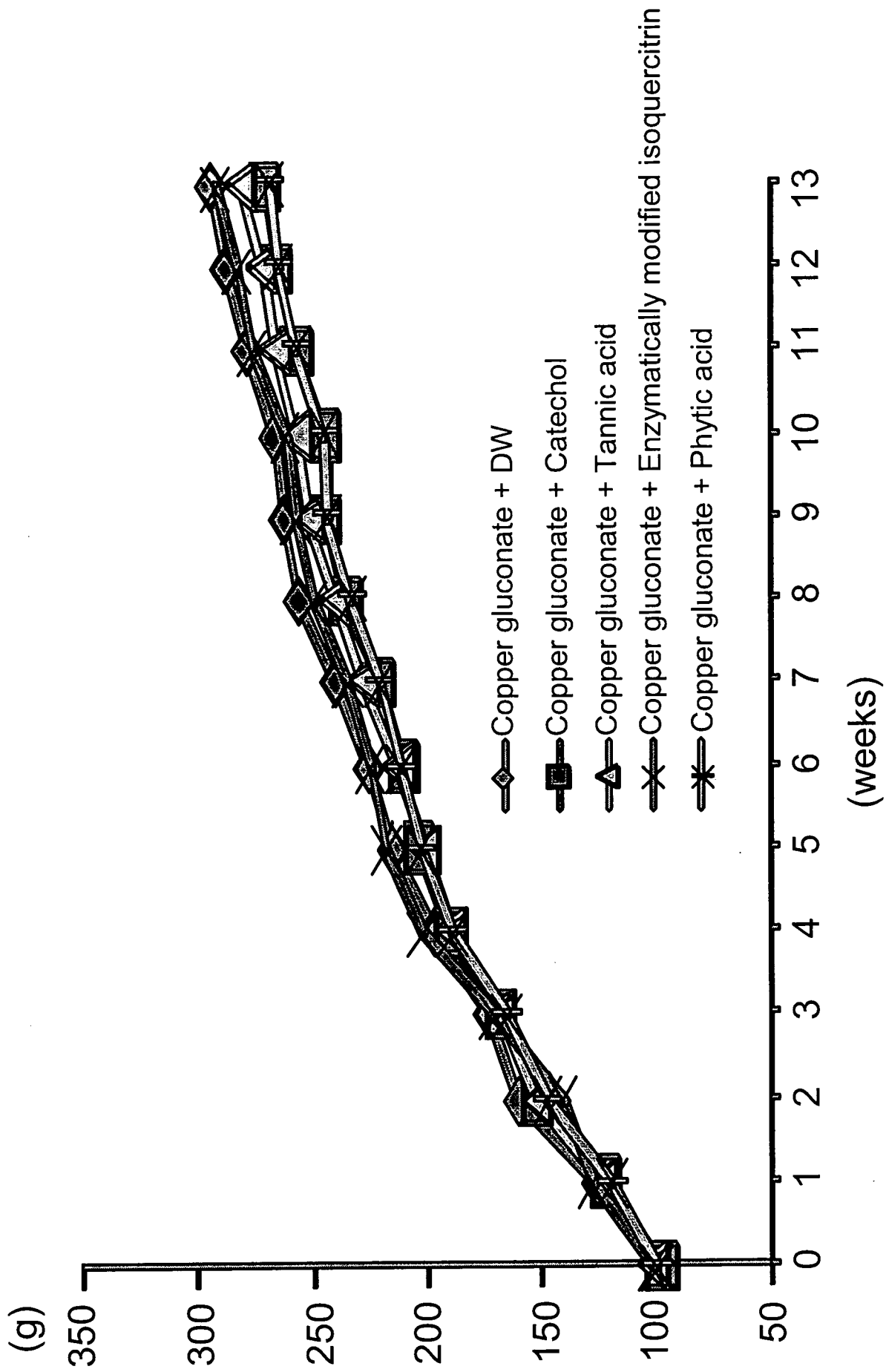


Fig. 1. Growth curves for F344 rats treated with copper gluconate and antioxidants for 13 weeks

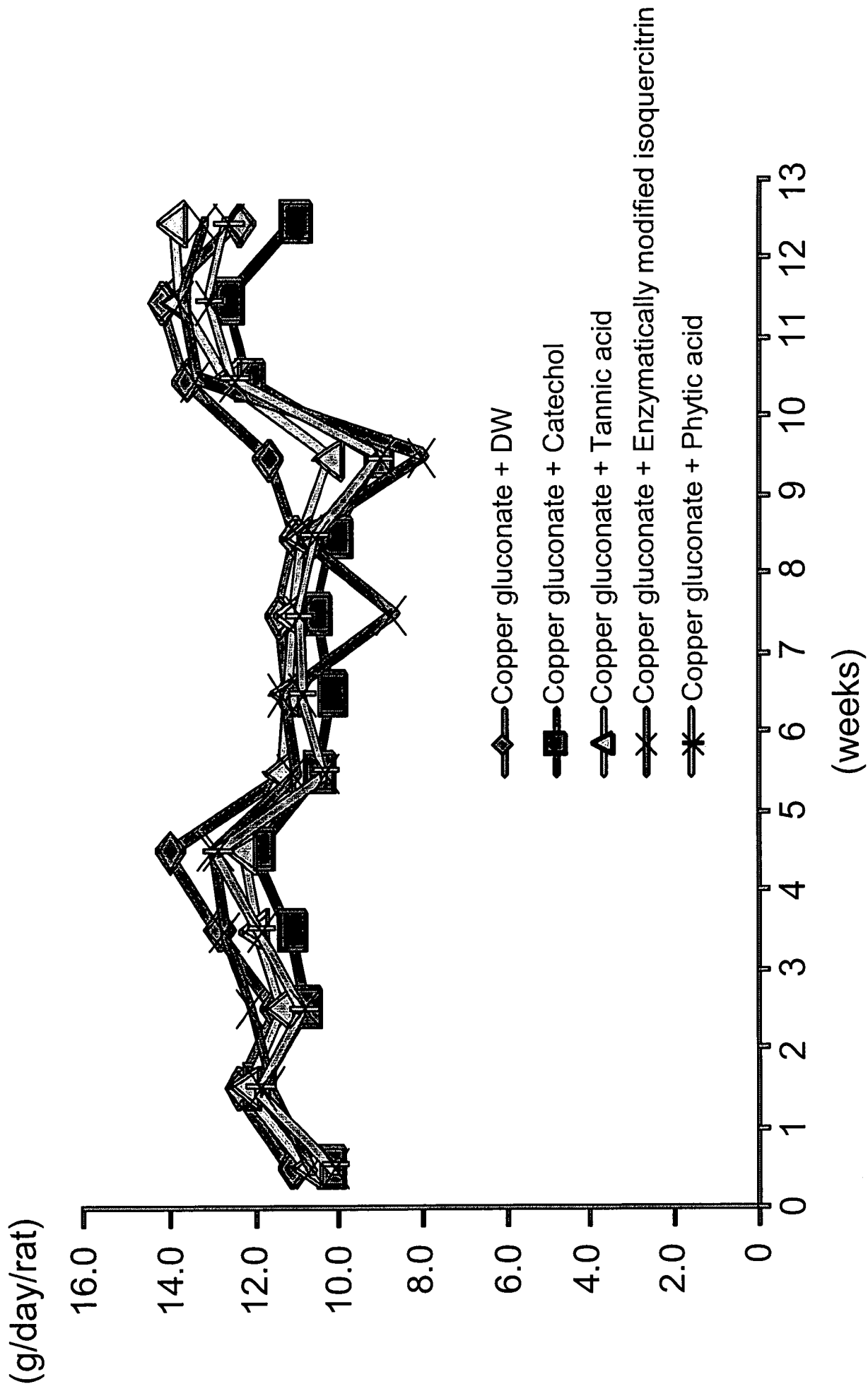


Fig. 2. Food consumptions for F344 rats treated with copper gluconate and antioxidants for 13 weeks

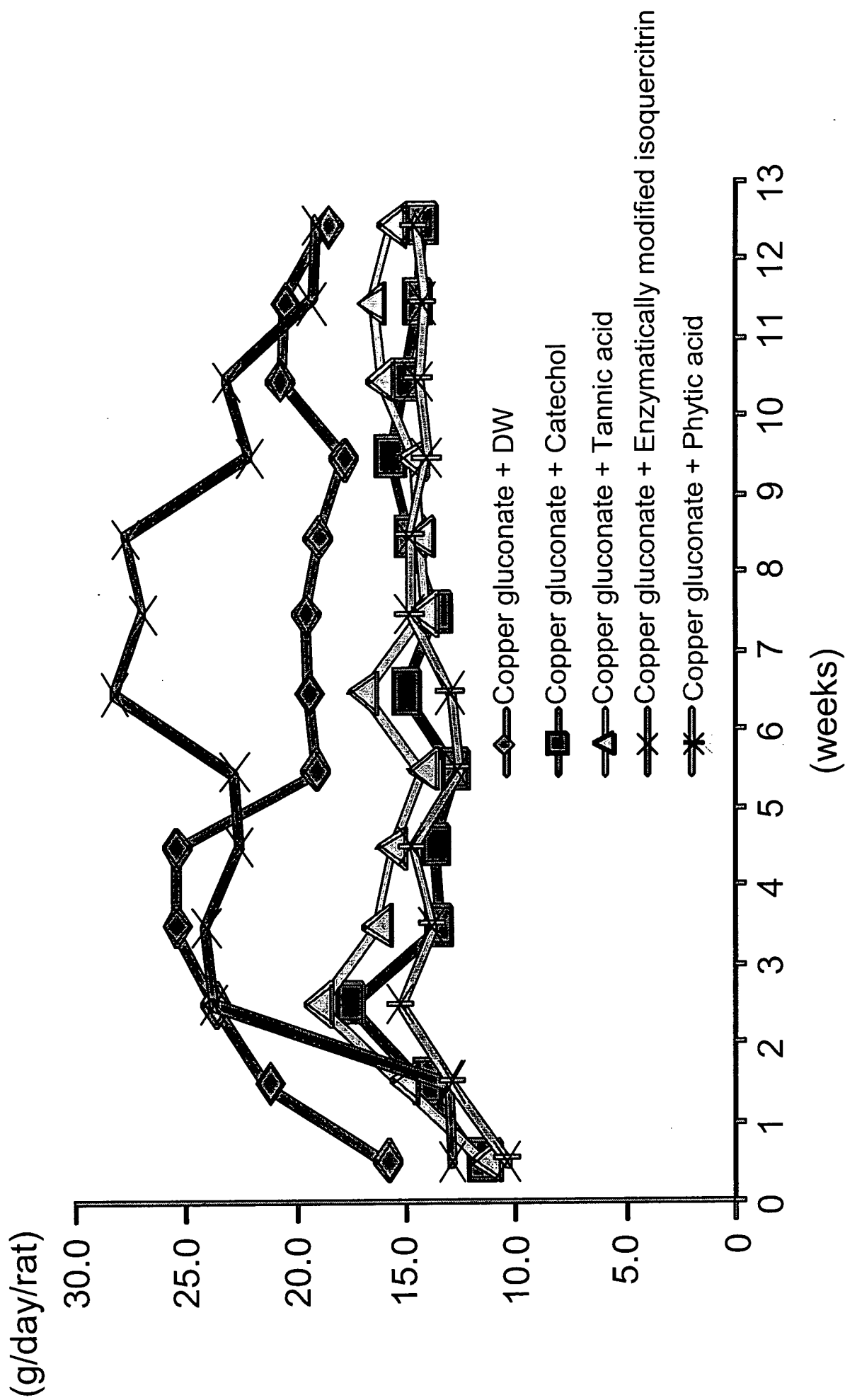


Fig. 3. Water intakes for F344 rats treated with copper gluconate and antioxidants for 13 weeks

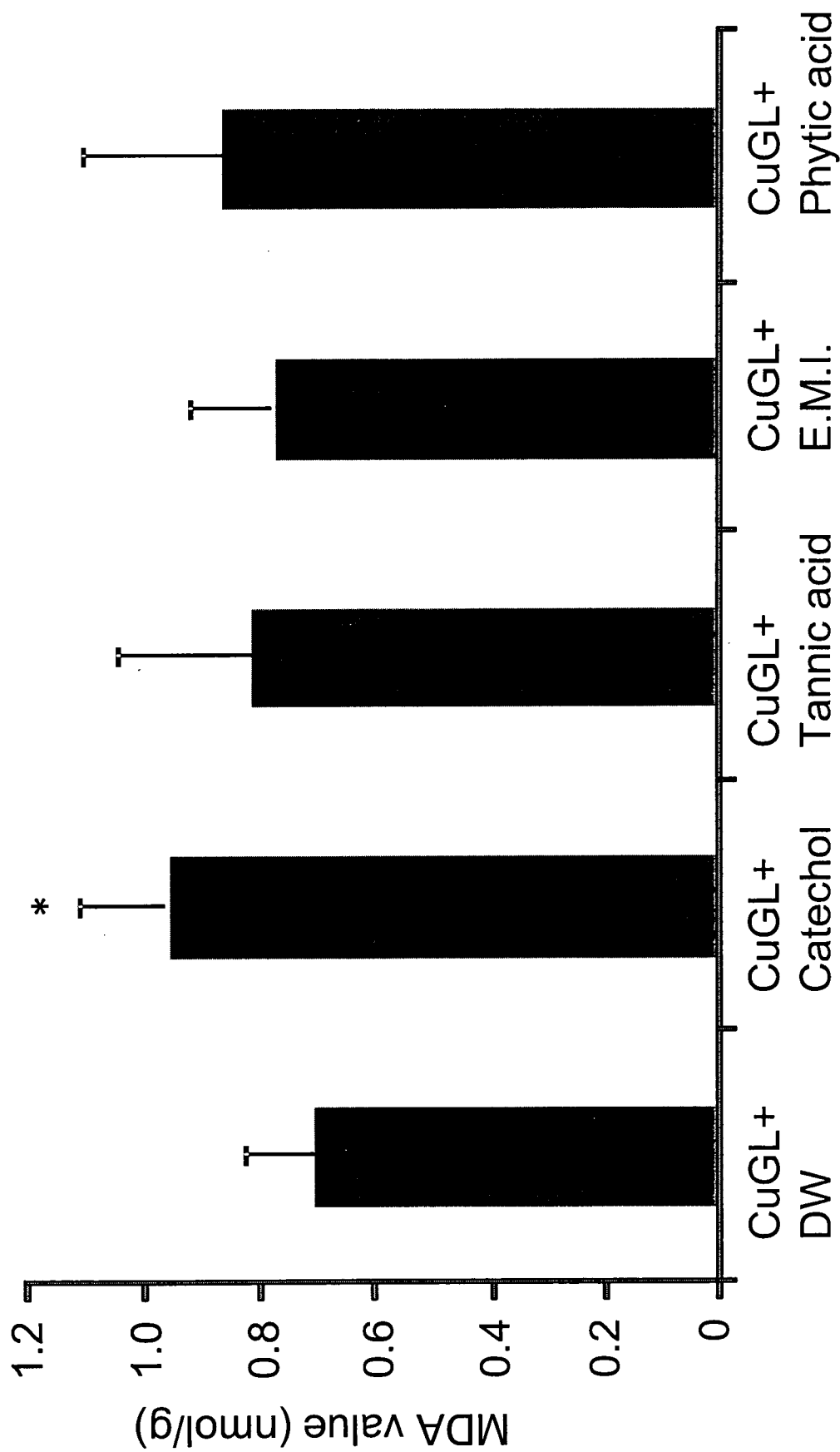


Fig. 4. Changes of TBARS levels in livers of rats for 13-weeks.

CuGL; Copper gluconate., E.M.I.; Enzymatically modified isoquercitrin.

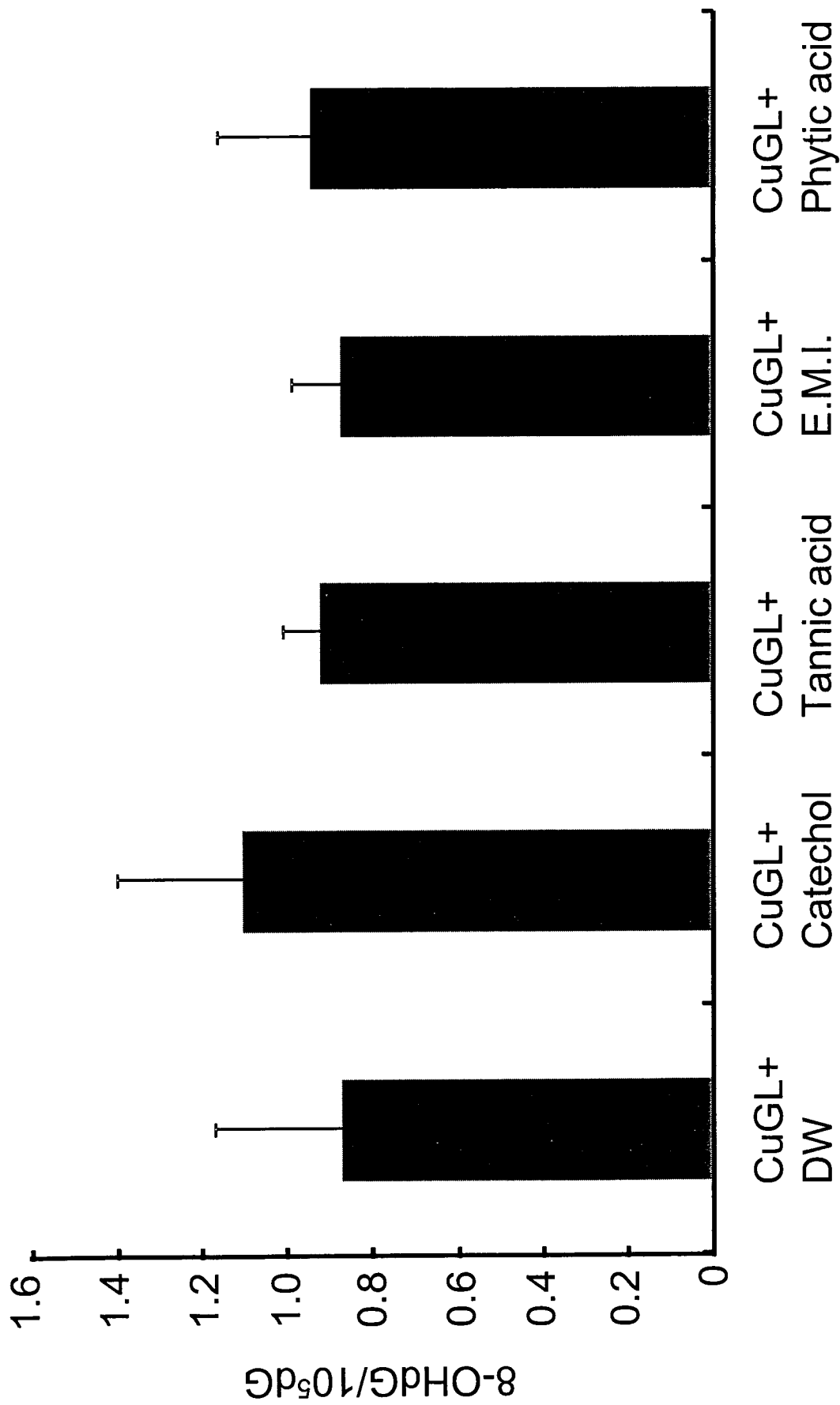


Fig. 5. Changes of 8-OHdG levels in liver nuclear DNA of rats for 13-weeks.

CuGL; Copper gluconate., E.M.I.; Enzymatically modified isoquercitrin.

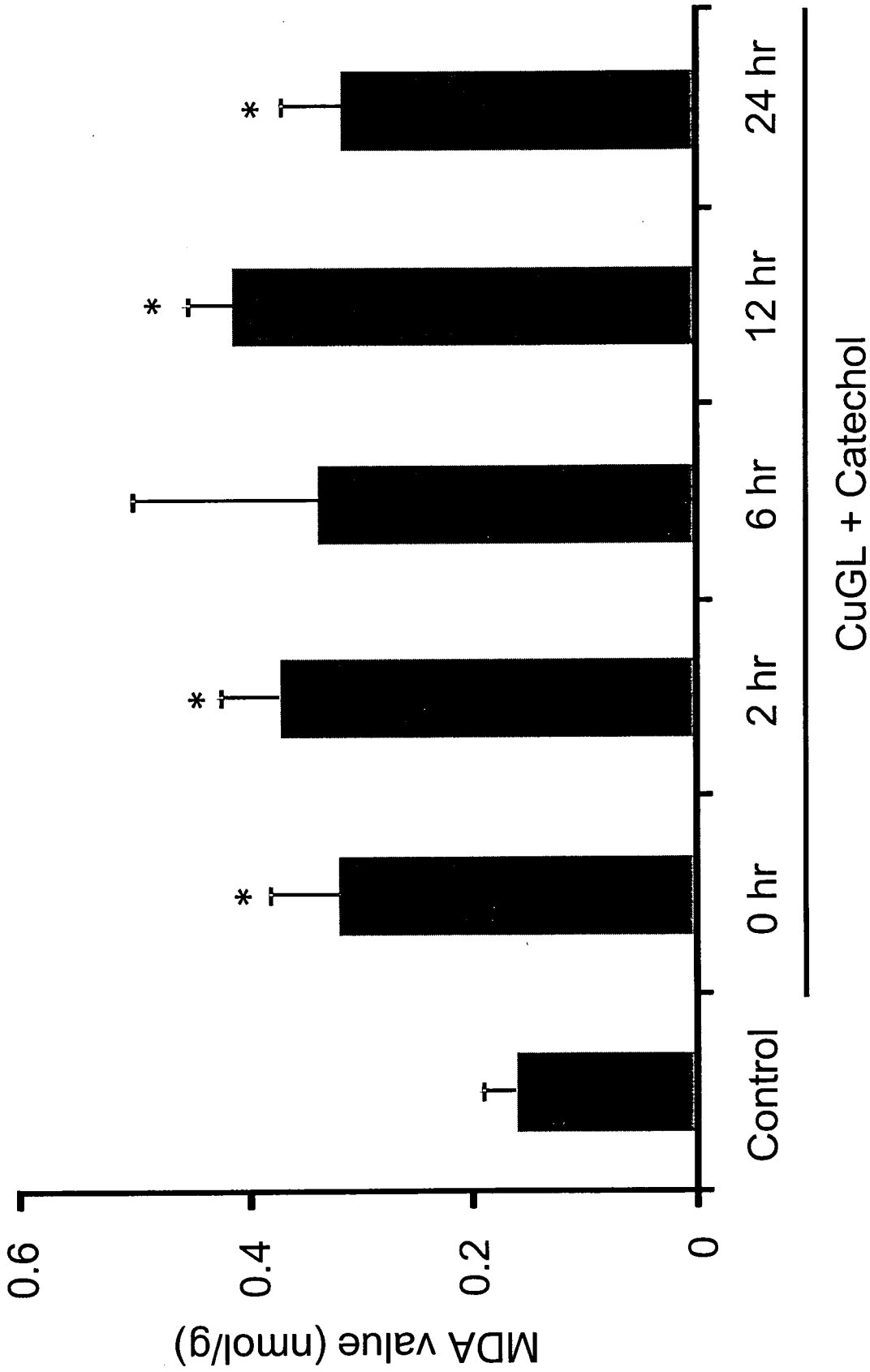


Fig. 6. Changes of TBARS levels in livers of rats treated with copper gluconate and catechol.

CuGL; Copper gluconate.

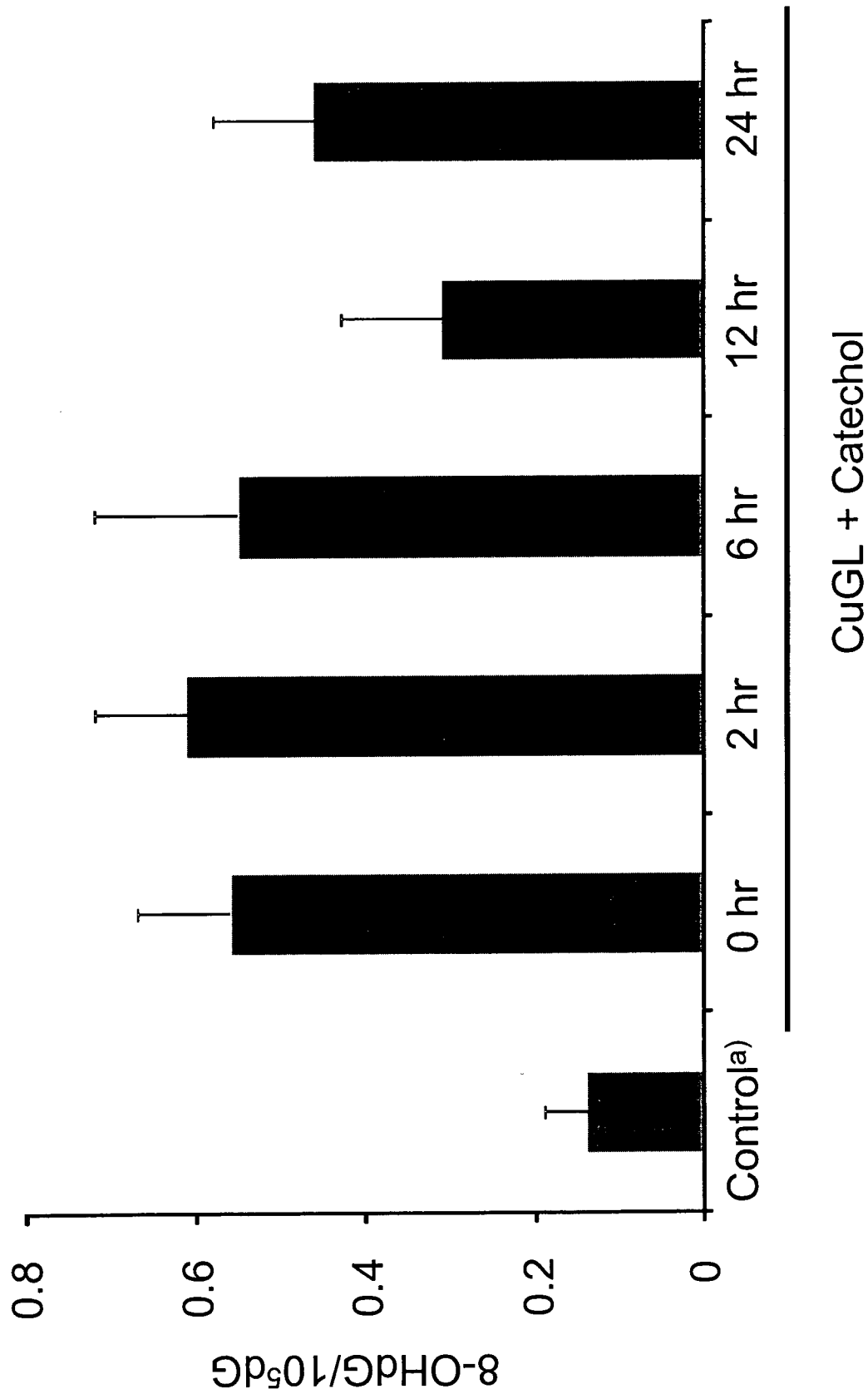


Fig. 7. Changes of 8-OHdG levels in liver nuclear DNA of rats treated with copper gluconate and catechol.

a): n=2

CuGL; Copper gluconate.

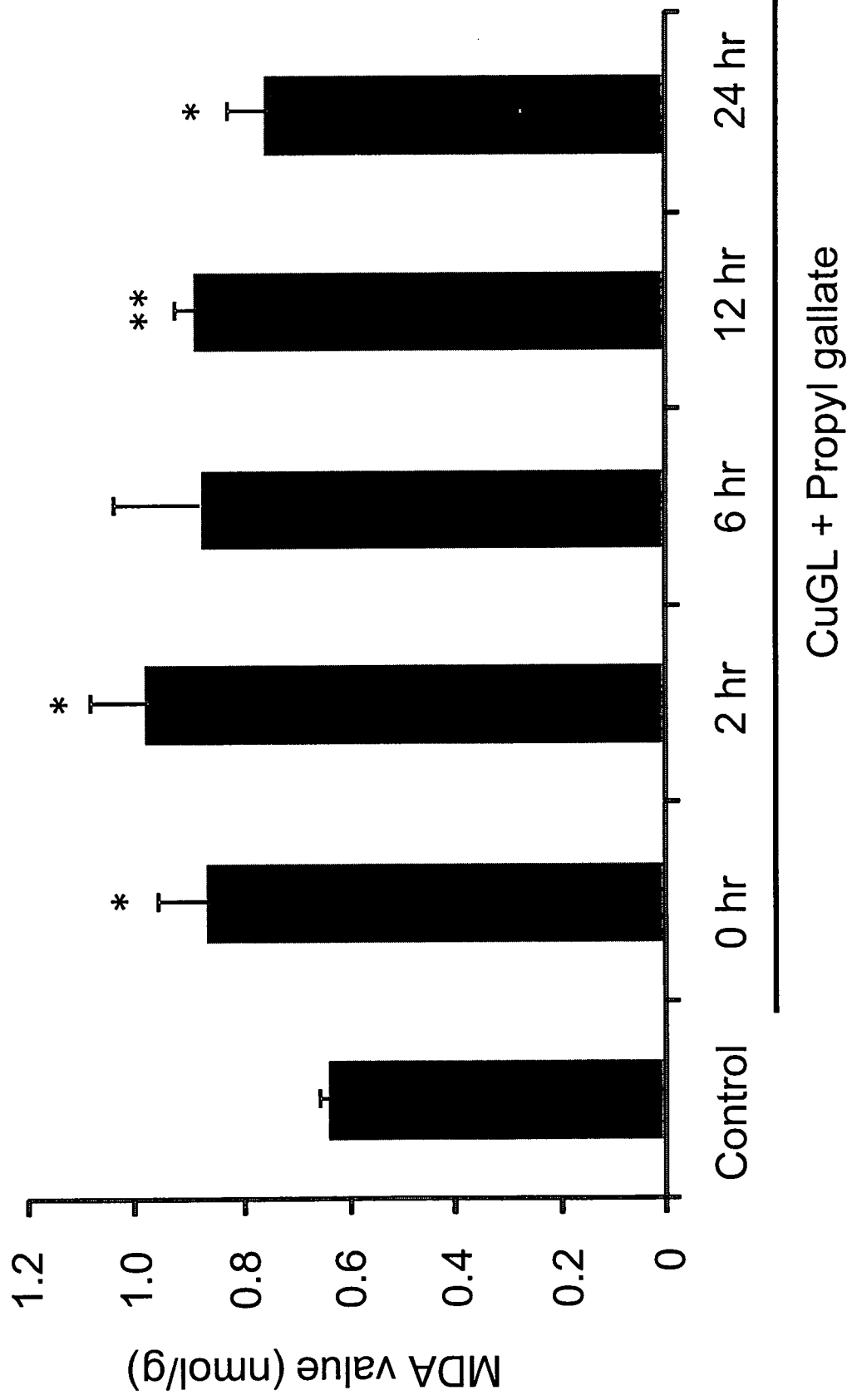


Fig. 8. Changes of TBARS levels in livers of rats treated with copper gluconate and Propyl gallate

CuGL; Copper gluconate.



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

分担研究者 田中卓二 金沢医科大学腫瘍病理 教授

研究要旨

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。

A. 研究目的

本分担研究では、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明らかにすることを目的とした実験を実施した。具体的には、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、血液生化学的变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 にて解析して、複合投与による健康影響についての基礎的資料を得ようとした。

B. 研究方法

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。Quercetin、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。

（倫理面への配慮）

動物実験は、金沢医科大学動物実験指針の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。

### C. 研究結果

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(図1)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(表2)。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(表3、表4)。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(表1)。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(表4)。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(表4)。

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( $P<0.05$ )に低かった(表5)。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(表6)。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(表7、表8)。

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(図2、3および表9-12)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 diabetes mellitus pathway、arachidonic acid metabolism pathway、metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 pathwayがdown-regulateし(図1A、表9)、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、metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 pathway、circadian rhythm pathwayがdown-regulateしていた(図2A、表11)。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(図1B、表10)、雌では、type II diabetes mellitus pathway、type I diabetes 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(図2B、表12)。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 (表 9、複合投与用量依存性に上昇、雄)、group 12 (表 10、複合投与により上昇、雄)、group 15 (表 10、複合投与により減少、雄)、group 26 (表 11、複合投与により減少、雌)、group 31 (表 12、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-regulate しており、雌では Cyp7a1、Cyp51 が down-regulate していた。

#### D. 考察

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 diabetes mellitus pathway の変化が顕著であった。

II diabetes 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。

#### E. 結論

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。

#### F. 研究発表

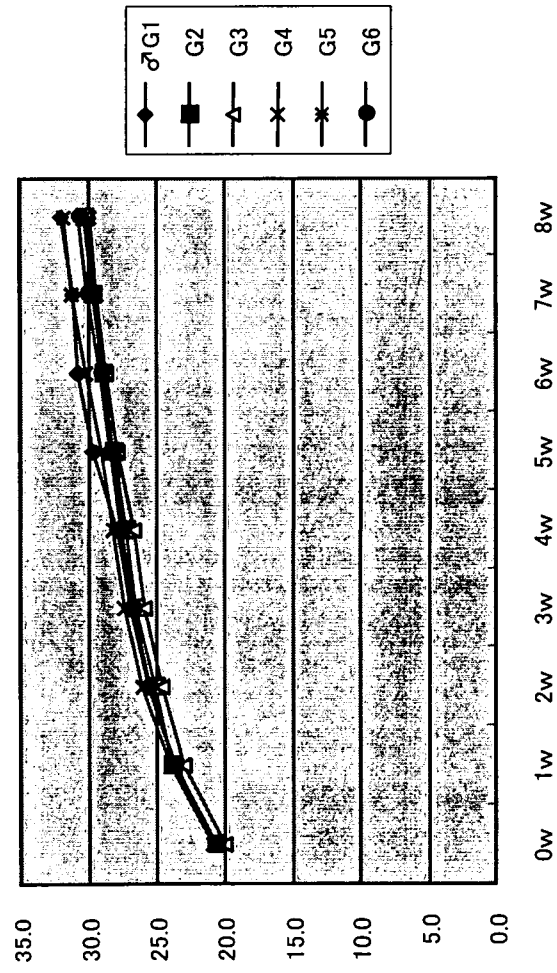
1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 图1. 体重变化

## ♂ 体重变化



## ♀ 体重变化

