

200837034A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成21（2009）年 4月

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 <i>in vivo</i> 変異原性に関する研究	----- 16
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	----- 31
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	----- 36
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	----- 53
出川雅邦	
5. 食品中化学物質の複合影響による反応性生物に関する研究	----- 59
中澤裕之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 64
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 66

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

研究代表者： 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究分担者： 田中卓二 金沢医科大学 腫瘍病理学講座
原田孝則 財団法人残留農薬研究所 毒性部
出川雅邦 静岡県立大学 分子毒性学分野
中澤裕之 星薬科大学 薬品分析化学教室

研究要旨

食品中化学物質による複合影響の安全性評価に資するデータを収集するため、それら物質を併用投与し、相互作用を検討した。1) 発がんへの影響について、 β -ナフトフラボンとチアベンダゾールをラットに併用投与した結果、肝 CYP1A2 mRNA 上昇には双方に閾値がある可能性が示された。一方、レポーター遺伝子導入マウスに四塩化炭素またはフルメキンを MeIQx と併用投与した結果、レポーター遺伝子 *gpt* ないし *red/gam* の変異頻度が MeIQx 単独投与に比べて著しく上昇することが明らかとなった。2) 発がん抑制への影響について、肝薬物代謝酵素活性を抑制し、発がん抑制作用を示すとされるクルクミンとケルセチンを選択し、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すると同時に microarray 解析による遺伝子発現変異を検討した結果、複合投与と単独投与での比較で、いくつもの pathway で特徴的な遺伝子発現の変化がみられ、また雌雄差も観察された。3) 神経毒性等への影響について、殺虫剤の有機リン剤) とカーバメート剤の複合暴露影響を明らかにするため、ラットに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結果、併用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された。また、ラットに 2 種類の有機リン系農薬 (パラチオンとメタミドホス) を反復経口投与した結果、複合投与した場合には単剤投与に比べ多動性などの神経行動毒性が増強される可能性が示された。4) 代謝活性化への影響について、チアベンダゾールやクルクミンは、3-メチルコラントレンとの複合曝露で 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発揮したことから、*in vitro* で AhR 活性化や CYP1A 酵素活性に影響を及ぼす可能性が示された。また、ヒト PXR リガンドに反応するレポーター細胞株の樹立に成功した。5) 酸化ストレスへの影響について、食品中フェノール性抗酸化物質と亜硝酸ナトリウムの複合曝露によるニトロ化反応で発生する活性酸素種への影響を *in vitro* で検討した結果、ニトロ化された物質においても同様の抗酸化作用を示したが、ニトロ化を受けることにより、ラジカル発生作用は活性酸素種の発生量を増強することが判明した。

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の確か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

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(西川)

β -ナフトフラボン、四塩化炭素、フェノバルビタールは和光純薬工業株式会社から、チアベンダゾール、フルメキンは Sigma-Aldrich 社から、メナジオンは Alexis Biochemicals 社から、MelQx は Toronto Research Center から購入した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラット(実験 1~3)または 6.5 週齢の雄性 *gpt delta* マウス(それぞれ実験 4、5)を日本エスエルシー株式会社(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。動物の飼育はバリエーション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。<実験 1.>6 週齢の F344 ラット雄 57 匹を無作為に各群 3 匹の 19 群に分け、 β -ナフトフラボンを 0.6、3.2、16、80、400、2000 ppm、チアベンダゾールを 1.6、8、40、200、1000、5000 ppm、メナジオンを 0.3、1.6、8、40、200、1000 ppm の濃度でそれぞれの基礎飼料中に混じて 2 週間投与した。投与期間中は一

般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は週 1 回測定した。投与期間終了時にエーテル麻酔下で開腹し、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。肝臓は mRNA レベルの測定に供した。

<実験 2.>6 週齢の F344 ラット雄 27 匹を無作為に各群 3 匹の 9 群に分け、 β -ナフトフラボンを 50、100、200、400 ppm、チアベンダゾールを 25、50、100、200 ppm の濃度でそれぞれの基礎飼料中に混じて 2 週間投与した。投与期間中は一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は週 1 回測定した。投与期間終了時にエーテル麻酔下で開腹し、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。肝臓は mRNA レベルの測定に供した。

<実験 3.>6 週齢の F344 ラット雄 18 匹を無作為に各群 3 匹の 6 群に分け、単独投与群として β -ナフトフラボンを 200、400 ppm、チアベンダゾールを 100、200 ppm の濃度でそれぞれの基礎飼料中に混じり、複合投与群として β -ナフトフラボン 200 ppm およびチアベンダゾール 100 ppm を基礎飼料中に混じて 2 週間投与した。投与期間中は一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は週 1 回測定した。投与期間終了時にエーテル麻酔下で開腹し、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。肝臓は mRNA レベルの測定に供した。

<実験 4.>7 週齢の *gpt delta* マウス雄 57 匹を無作為に各群 15-18 匹の 4 群に分け、基礎飼料または MelQx 300 ppm を基礎飼料に混じてそれぞれ 2 群に投与した。基礎飼料群と MelQx 投与群各 1 群には、週 1 回、四塩化炭素 0.2 mL/kg を計 12 回腹腔内投与した。投与期間中は一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は週 1 回測定した。投与 13 週後、各群 5 匹ずつエーテル麻酔下で開腹し、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。採取した肝臓は *in vivo* 変異原性アッセイに供した。

<実験 5.>6 週齢の *gpt delta* マウス雄 25 匹を無作為に各群 5 匹の 5 群に分け、MelQx 0.03%、フルメキン 0.4%、フェノバルビタール 0.05% の濃度で 13 週間投与した。MelQx は飲水に混じり、フルメキンおよびフェノバルビタールは基礎飼料に混じて投与した。複合投与群として、MelQx 0.03% とフルメキン 0.4% 投与群および MelQx 0.03% とフェノバルビタール 0.05% 投与群を設けた。投与期間中は一般状態を毎日観察した。体重および

摂餌量は週1回測定した。投与期間終了時にエーテル麻酔下で開腹し、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。肝臓は *in vivo* 変異原性アッセイに供した。

肝臓中の mRNA レベルの測定を以下のように実施した。ISOGEN (株式会社ニッポンジーン) を用いて抽出した全 RNA を High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写した。得られた cDNA から、Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システムを用いて目的 mRNA 発現量を測定した。

gpt 点突然変異の検出と解析のため、回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。またファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育するコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 変異頻度 (MF) を算出した。

SpI 欠失変異の検出と解析を以下のように行った。ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2) 株) に感染させ、*SpI* プラークの候補を検出した。*SpI* プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*redIgam* 遺伝子機能が不活化した真の *SpI* プラークを検出した。またパッケージング反応後の懸濁液を、適宜希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。

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 (田中)

まず、quercetin (Q) と curcumin (C) の複合投与による影響 (前年度実施) についてストレス、毒性に係る遺伝子発現について再度検討した。次いで、indol-3-carbinol (I3C) と hesperidin (Hes) の複合投与による影響を知るために、総計 50 匹の雄性 C57BL/6J マウス (5 週齢) を 5 群に分け、以下の処置を行った。500 ppm I3C + 500 ppm Hes 群、250 ppm I3C + 500 ppm Hes 群、500 ppm I3C 群、500

ppm Hes 群、無処置群。実験は 8 週で終了し、実験開始後 4 週時に肝臓における薬物代謝酵素の変化を microarray にて解析し、同時に血液生化学的解析や病理組織学的を行い、実験終了時には血液生化学的解析や病理組織学的を実施した。

3. 残留農薬の複合影響による神経毒性に関する研究 (原田)

2 種の有機リン系殺虫剤のパラチオンとメタミドホスを組合せ、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曝露影響を検索した。被験物質として、有機リン剤のパラチオン (Parathion, O,O-Diethyl O-4-Nitrophenyl Phosphorothioate, 99.6%、和光純薬工業株式会社) 及びメタミドホス (Methamidophos, O,S-dimethyl phosphoramidothioate, 99.7%、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育場 (静岡県) で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット (BriHan:WIST@Jcl[GALAS]) の雌を 7 週齢にて 45 匹購入し、13 日間試験環境に馴化した後、8 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℃、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 8 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。

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 0.2、0.6、2 mg/kg/day 群、メタミドホス 0.4、0.8、1.6 mg/kg/day 群及びパラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.8 mg/kg/day の複合投与群の 8 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、有機リン剤の主作用であるコリンエステラーゼ活性阻害に対する神経毒性学的最大耐量であると考えられる、血漿中活性が20%を超えて低下し、脳内活性低下が20%未満である用量は、パラチオン0.6 mg/kg/day、メタミドホス0.8 mg/kg/dayだった。また、この用量による複合投与によって脳内コリンエステラーゼ活性の低下が引き起こされることも確認した。これらの予備試験結果に基づいて、パラチオンは最大耐量である0.6 mg/kg/dayと一定にして、メタミドホスを0.8 mg/kg/dayから0.4及び0.2 mg/kg/dayと1/2及び1/4に減少させて複合毒性変化を確認した。対照群としては、媒体対照群(0 mg/kg/day)、パラチオン0.6 mg/kg/day単独投与群及びメタミドホス0.8 mg/kg/day単独投与群の3群を設け、合計6群で実験を行った。

各用量の被験物質投与液を週に1回調製した。投与容量は4 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0.3 mg/mLの濃度に、メタミドホスでは1% Tween80水溶液(Tween80、和光純薬工業株式会社)にて0.1、0.2、0.4 mg/mLの濃度に溶解あるいは懸濁させた。パラチオンとメタミドホスの複合投与液は、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。

一般状態の観察として、全動物について、投与期間中1日1回瀕死状態ないし死亡の有無を観察した。機能検査として、全動物について、投与4日、8日及び12日に詳細な症状の観察を実施した。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。[詳細な症状の観察項目: 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] また、観察終了後に、遠赤外線方式の検出器(SUPER MEX®)を装着した自発運動測定システム(室町機械株式会社)を使用して1時間、自発運動量を測定した。測定結果は前、中、後半の各20分間及び1時間合計値を集計した。さらに、自発運動量測定後に、目盛付き拡大鏡(Spiegel measure)を用いて左右の瞳孔径を測定した。全動物について、投与2週に、台車から約50 cm(床から約1m)の高さに組まれた十字に交差した開架と閉架で構成されている高架式十字迷路を用いて、抗不安や認知機能について評価した。

全動物について、投与開始時(0日)、投与4日、8日、12日および殺処分前に、全動物について体重を測定した。2週間反復投与終了後の全生存動物について、血液生化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。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(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、 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)]

2週間反復投与終了後の全生存動物について、血漿及び脳の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。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。総合血液学検査装置アドヴィア 120（Bayer Corporation）を用いて胸腺細胞数を計測した。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、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。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。サブセットは、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。各リンパ球サブセットの対象細胞集団は、フロー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、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、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、胸腺、肝臓、腎臓（両側）、脾臓、副腎（両側）]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、胸腺、肝臓、脾臓、副腎（両側）]

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（出川）

試験細胞株の樹立のため、ヒトCYP3A4遺伝子プロモーターに存在するPXR結合配列

を含んだ2か所の転写調節領域（-7836～-7208、-362～+53）を、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドを作成し、ヒトPXR強制発現プラスミドとともにヒト肝がん由来の培養細胞株HepG2に導入した。薬剤によるセレクションおよび細胞のクローニングを行って得られたクローンは、既知のヒトPXRリガンドであるリファンピシン（RIF）を処理し、PXRの活性化をルシフェラーゼアッセイにより測定した。その結果、最も高い反応性を示したクローンA3をヒトPXRレポーター細胞株HepG2-PXRLucA3として樹立した。

被検化合物として、ヒトPXRリガンドとしてリファンピシン（RIF）およびクロトリマゾール（CLO）を、齧歯類のPXRリガンドとしてデキサメタゾン（DEX）およびプレグネロン16 α -カルボニトリル（PCN）を用いた。また、HepG2-PXRLucA3の有用性の確認のため、CYP3A酵素を誘導することが知られる化合物として、フェノバルビタール（PB）、ニカルジピン（NIC）、ニフェジピン（NIF）、タモキシフェン（TAM）、トログリタゾン（TRO）、オメプラゾール（OME）、ヒドロコルチゾン（HC）を使用した。また、肝薬物代謝酵素を誘導することが知られている4種の食品添加物として、クルクミン（CUR）、チアベンダゾール（TBZ）、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）および没食子酸プロピル（PG）を被検体とし、PXR活性化能およびCYP3A酵素誘導能を測定した。なお、各化合物はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して使用した。

PXR活性化能の測定のため、HepG2-PXRLucA3細胞を 2×10^4 cell/cm²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、一定時間培養した。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スセンサー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。

CYP3A遺伝子発現量の測定のため、HepG2-PXRLucA3細胞を60mm dishで培養し、化合物を添加して一定時間培養後、Total RNAをISOGEN（ニッポンジーン）により単離した。このTotal RNAより、ランダムヘキ

サマーと MMLV-逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。この cDNA に、ヒト CYP3A4 またはヒト GAPDH プライマーセット、および SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を添加し、7300/7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) によりリアルタイム PCR を行った。さらに、CYP3A4 遺伝子の発現量を GAPDH 遺伝子の発現量で除することにより標準化した。

CYP3A 酵素アッセイとして、CYP3A 酵素活性を p450-Glo CYP3A4 assay kit (Promega 社) により測定した。本キットは、CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7 の基質となる Luciferin-6'-pentafluorobenzyl ether の脱アルキル化を酵素活性の指標とするものである。HepG2-PXRLucA3 細胞を 96well plate で培養し、化合物を添加して一定時間培養した。細胞を洗浄後、50 μ M の基質を含む無血清培地を 60 μ L/well の割合で加え、37°C で 4 時間培養した。その後、上清 50 μ L をとり、50 μ L の Luciferin Detection Reagent と混合し、代謝物に由来する発光を測定した。また、各 well に残存した細胞の細胞溶解液を調製し、蛋白質濃度を測定することにより、タンパク質 1mg 当たりの酵素活性を算出した。

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 (中澤)

ニトロ化を受けたフェノール性化合物が活性酸素種発生に与える影響を検討した。人工胃液中におけるフェノール性化合物と NaNO₂ の反応性を確認するためにクロロゲン酸およびカフェイン酸と NaNO₂ をそれぞれ人工胃液中で反応を行った。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) によって解析を行なった。ラジカル発生作用の評価として、ニトロ化前後における ROS 発生量の比較を行うために、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。

次に、*in vivo* におけるフェノール性化合物の検出を検討した。動物実験として、6 週齢の雄 ddy 系マウスに 0.5% のクロロゲン酸を混餌で、0.2% の NaNO₂ を飲水で投与後、経時的に屠殺し、得られた肝臓組織

中のニトロ化合物の検出を行った。ニトロ化合物の解析には液体クロマトグラフィー/フォトダイオードアレイ/質量分析法 (LC/PDA/MS) を用いた。

(統計処理)

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。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 検定または Mann・Whitney-U 検定を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は主に混餌による経口投与であり、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、各施設における動物実験の適正な実施に関する倫理規程に従い、実験動物委員会の承認に基づき実施した。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。また、使用した薬品のうち有害物質を含むものについては、環境への拡散がないように注意した。

C. 研究結果

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 (西川)

<実験 1.>CYP1A1、1A2 について肝臓での mRNA 発現量を測定した結果、 β -ナフトフラボンおよびチアベンダゾールは用量相関性の増加を示した。 β -ナフトフラボンでは、CYP1A1 は 3.2 ppm 以上、CYP1A2 は 400 ppm 以上の投与群で mRNA 発現量の有意な増加が認められた。チアベンダゾールでは、CYP1A1 は 40 ppm 以上、CYP1A2 は 200 ppm 以上の投与群で mRNA 発現量の有意な増加が認められた。メナジオン投与群における CYP1A 遺伝子の mRNA 発現量は、用量相関性が認められなかったため、後の実験では、 β -ナフトフラボンおよびチアベンダゾールを使用した。

<実験 2.>実験 1 より、 β -ナフトフラボンおよびチアベンダゾールの CYP1A2 を誘導する最低濃度が概算され、さらに詳細な測定を行った。その結果、 β -ナフトフラボン は 200 ppm

以下、チアベンダゾールは 100 ppm 以下で CYP1A2 を誘導しないことが示された。

＜実験 3＞実験 2 の結果から得られた濃度で β -ナフトフラボンおよびチアベンダゾールの複合投与を行った結果、 β -ナフトフラボン 200 ppm で CYP1A2 の誘導が認められ、チアベンダゾール 200 ppm で CYP1A2 誘導が認められなかったものの、 β -ナフトフラボン 200 ppm またはチアベンダゾール 100 ppm で誘導される mRNA 発現が複合投与により加算的に増加することが示された。

＜実験 4＞*gpt* アッセイの結果、MelQx 投与群は対照群と比較して変異頻度の有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。MelQx+四塩化炭素投与群でも四塩化炭素投与群と比較して変異頻度の有意な増加が認められ ($p < 0.01$)、MelQx 投与群と比較しても変異頻度の有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。Sp1 アッセイの結果も *gpt* アッセイと同様の傾向を示し、MelQx 投与群は対照群と比較して変異頻度の有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。MelQx+四塩化炭素投与群でも四塩化炭素投与群と比較して変異頻度の有意な増加が認められ ($p < 0.01$)、MelQx 投与群と比較しても変異頻度の有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。

＜実験 5＞*gpt* アッセイの結果、MelQx 投与群は対照群と比較して、変異頻度の上昇が認められ、フルメキン投与群、フェノバルビタール投与群では変異頻度の上昇は認められなかった。MelQx + フルメキン投与群は、対照群の約 250 倍、MelQx 投与群の約 15 倍の変異頻度の上昇が認められたが、MelQx + フェノバルビタール投与群では変化は示されなかった。

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 (田中)

＜実験 1＞Q と C の複合投与による影響

ストレス、毒性に係る遺伝子発現について再検討した結果は以下のように集約された。

1) 単独投与と複合投与による影響の比較では変動遺伝子数は雌に顕著であった。

2) その変動は雄では、Gad1 (第 II 相薬物代謝酵素関連)、Cdkn1a (増殖停止・老化関連) の発現上昇、雌では Pkm2 (第 II 相薬物代謝酵素関連)、Fasl (壊死・apoptosis 関連) の発現上昇、Mt2 (薬物輸送関連)、Igf1 (増殖停止・老化関連)、Lta (炎症関連)、Serpine1

(炎症関連) の発現低下が観察された。

3) 一方、複合投与における用量の比較では、雌雄とも変動遺伝子数はほぼ同じ数であった。

4) その変動は、用量の増加にしたがって Gad1 (第 II 相薬物代謝酵素関連) の発現上昇が雄にのみ観察された。また、Egr1 (細胞増殖・発がん関連)、Lta (炎症関連) の発現低下が雌雄に観察され、Nos2 (炎症関連) の発現上昇が雄に、Fasl (壊死・apoptosis 関連) の発現上昇が雌に観察された。

＜実験 2＞I3C と Hes の複合投与による影響

実験期間中の体重増加や摂餌量は群間に有意な差は認められなかった。また、4 週時、実験終了時 (8 週時) の体重、主要重量 (肝、腎、脾、腎) も群間に有意をみなかった。血液生化学的検査では、I3C、Hes の複合投与、単独投与による変化を認めなかった。肝、腎の病理組織学的検査でも、I3C、Hes の単独あるいは複合投与による影響は見られなかった。なお、肝の array 解析は、現在実施しているところである。

3. 残留農薬の複合影響による神経毒性に関する研究 (原田)

いずれの試験群においても死亡あるいは瀕死状態の動物は認められなかった。詳細な症状の観察の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単独投与群、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単独投与群及びパラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.2 mg/kg/day 複合曝露群におけるスコアは媒体対照群と同様であった。パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 あるいは 0.8 mg/kg/day の複合曝露では、曝露 4 日から 8 日にかけて筋緊張低下が、曝露 8 日から 12 日にかけて振戦が認められた。さらに、パラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合曝露群では、投与期間の経過に伴い警戒性の低下傾向が認められた。

自発運動量測定の結果、散発的に認められた有意差は偶発性であると思われた。測定の後半 (40-60 分) における運動量は、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単独投与群、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単独投与群及びパラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.2 mg/kg/day 複合曝露群では媒体対照群と同様に全運動量の 10 から数パーセントだったが、パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 あるいは 0.8 mg/kg/day の複

合曝露では20%前後の高い行動活性が残った。

瞳孔径測定の結果、パラチオン0.6 mg/kg/day 単独投与群では、投与期間を通して媒体対照群とほぼ同様であったが、メタミドホス0.8 mg/kg/day 単独投与群では有意に縮瞳した。全てのパラチオンとメタミドホスの複合曝露群でも有意な縮瞳が認められ、その程度はパラチオン0.6 mg/kg/day+メタミドホス0.2 mg/kg/day 複合曝露群においてメタミドホス0.8 mg/kg/day 単独曝露と同程度で、パラチオン0.6 mg/kg/dayとメタミドホス0.4あるいは0.8 mg/kg/dayの複合曝露では、パラチオン0.8 mg/kg/day 単独曝露よりも重篤になった。また、パラチオン0.8 mg/kg/day 単独曝露及びパラチオン0.6 mg/kg/day+メタミドホス0.2 mg/kg/day 複合曝露群では、曝露終盤の12日では縮瞳の回復が認められたのに対して、パラチオン0.6 mg/kg/dayとメタミドホス0.4あるいは0.8 mg/kg/dayの複合曝露では、回復傾向はみられなかった。

高架式十字迷路検査の開架滞在時間において、曝露に関連付けられる変化及び有意差は認められなかった。開架閉架間の移動回数では、パラチオン0.6 mg/kg/day 単独投与群、メタミドホス0.8 mg/kg/day 単独投与群及びパラチオン0.6 mg/kg/day+メタミドホス0.2 mg/kg/day 複合曝露群のスコアは媒体対照群と同様であった。パラチオン0.6 mg/kg/dayとメタミドホス0.4 mg/kg/day 複合曝露群では移動回数が減少し、パラチオン0.6 mg/kg/dayとメタミドホス0.8 mg/kg/day 複合曝露では有意差が認められた。

いずれの試験群においても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な体重変化はみられなかった。血液生化学的検査において、いずれの試験群においても、全ての測定項目で溶媒対照群と比較して統計学的に有意な変化はみられなかった。

コリンエステラーゼ(ChE)活性において、全ての有機リン曝露群で血漿のChE活性が対照群と比較して80%未満に減少し、有意差が認められた。脳のChE活性低下も、全ての有機リン曝露群で対照群と比較して有意差がみられたが、パラチオン0.6

mg/kg/day 単独投与群及びメタミドホス0.8 mg/kg/day 単独投与群における低下は90%と僅かであった。一方、パラチオン0.6 mg/kg/dayとメタミドホス0.2、0.4あるいは0.8 mg/kg/dayの複合曝露では、51~62%に低下した。

免疫学的検査の結果、散発的に認められた有意差は偶発性であると思われた。臓器重量測定の結果、パラチオン0.6 mg/kg/dayとメタミドホス0.8 mg/kg/day 複合曝露群の腎臓相対重量、パラチオン0.6 mg/kg/dayとメタミドホス0.4 mg/kg/day 複合曝露の副腎重量及び全複合曝露群の副腎相対重量が有意に増加した。剖検所見では、いずれの試験群でも肉眼的異常は観察されなかった。

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(出川)

<実験1.>ヒトPXRリガンド処理時の濃度依存的なPXR活性化およびCYP3A酵素誘導

HepG2PXR-LucA3に対し、リファンピシン(RIF)を処理し、PXR活性化の経時的变化を解析したところ、24時間後に最も強くPXR活性化が見られた。この有意なPXR活性化は0.3 µM以上のRIFを処理した場合に認められた。また、RIF処理24時間後のCYP3A4遺伝子発現、または72時間後のCYP3A酵素活性のRIF濃度依存性について検討したところ、CYP3A4遺伝子発現は1 µMより、CYP3A酵素活性は10 µMより、濃度依存的な増加が認められた。次に、RIF処理時のPXR活性化とCYP3A4遺伝子発現量およびCYP3A酵素活性との相関関係を解析したところ、それぞれ正の相関が見られた。このことから、RIF処理時には、ルシフェラーゼ活性の誘導を指標としてCYP3A酵素の誘導を簡便かつ迅速に予測可能であることが示された。

<実験2.>種々CYP3A酵素誘導剤処理時のPXR活性化およびCYP3A酵素誘導

HepG2-PXR/LucA3を用いて、ヒトまたはラットCYP3A酵素を誘導することが報告されている、11種の化合物について、PXR活性化能を評価した。その結果、ヒトPXR活性化剤(RIF、CLO)および用いた全てのCYP3A酵素誘導剤でヒトPXRの活性化が確認された。一方、ラットCYP3A酵素誘導剤(DEX、PCN)によるヒトPXR活性化は認められなかった。さらに、これら11化合物のCYP3A遺伝子発現量を測定したところ、PXR活性化誘導パタ

ーンと類似したCYP3A4遺伝子の発現誘導が観察された。次に、各化合物処理時のPXR活性化とCYP3A4遺伝子発現量との相関関係を解析したところ、両パラメータは正の相関を示した。このことから、RIFだけでなく、ルシフェラーゼ活性の誘導を指標として被検化合物のCYP3A酵素誘導能を簡便かつ迅速に予測可能であることが示された。

<実験3.>PXR活性化に及ぼす食品添加物の影響

HepG2-PXR/LucA3細胞株が化学物質のヒト肝におけるPXR活性化ならびにCYP3A酵素誘導能を予測する上で極めて有用であることが確認されたため、代表的な食品添加物として知られるCUR、TBZ、PG、BHTの4化合物のヒトPXR活性化に及ぼす影響について検討した。CUR単独処理では、用いたいずれの濃度でもPXRの活性化に影響を及ぼさなかった。一方、10 µM CURをRIFと同時に処理すると、RIFによるPXR活性化を有意に抑制した。なお、100 µMのCUR処理により顕著な細胞死が認められた。TBZは、10 µMあるいは100 µMの濃度で単独処理することで、わずかではあるが有意にPXR活性化を惹起した。RIFによるPXR活性化は、1 µM以上のTBZと同時に処理することで、添加したTBZの濃度に依存して増強された。PGやBHTは、いずれの濃度で単独処理してもPXRの活性化を引き起こさなかった。RIFによるPXR活性化は、10 µM以上のPGあるいはBHTと同時に処理することで、抑制された。

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 (中澤)

<実験1.>ニトロ化を受けたフェノール性化合物が活性酸素種発生に与える影響

フェノール性化合物とNaNO₂を人工胃液中で反応させ、得られた化合物をLC/MSで測定したところ、ニトロ化合物の生成が確認された。また、DCFH-DAによるROS発生量の評価を行ったところ、フェノール性化合物はニトロ化を受けることで活性酸素種の生成量を増大させる結果が得られた。また、この反応系は抗酸化物質であるアスコルビン酸を加えることでROSの発生量を減少させた。

<実験2.>*in vivo*におけるフェノール性化合物の検出および酸化ストレス評価

生体内でもフェノール性化合物と

NaNO₂を併用投与することにより胃酸条件下で上記C-1と同様の反応が起こる可能性があると考え、*in vivo*への適用を試みた。その結果、クロロゲン酸とNaNO₂を併用投与したマウス肝臓組織からフェノール性化合物がニトロ化を受けた1,2-(4*H*)-benzoxazin-4-oneが検出された。

D. 考察

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 (西川)

薬物代謝酵素であるCYP1A1、1A2を誘導する食品中の物質として、β-ナフトフラボン、チアベンダゾール、メナジオンを選択し、ラットに投与したところ、β-ナフトフラボンおよびチアベンダゾールで用量相関的なCYP1A誘導が認められた。さらにCYP1Aファミリーの内、MeIQxやエストラゴールのような食品に含まれる発がん性が疑われる物質の代謝活性化に関与するCYP1A2に着目し、それぞれCYP1A2を誘導しない最高濃度を求めた。続いて、その濃度を用いた複合投与を行った結果、CYP1A2レベルの有意な増加が認められ、相加的誘導が確認された。このことから、単体ではCYP1A2を誘導しない濃度であっても、複数の化学物質を摂取することにより、CYP1A2誘導が起こり得ることが示唆され、今後は本条件下における発がん物質との複合影響を*in vivo*変異原性ならびに前がん病変マーカーなどをエンドポイントに検討を進める予定である。

炎症と発がんとの関連性についてはこれまで、炎症反応によって生じるサイトカインや活性酸素種/窒素種、組織障害に対する細胞増殖活性の上昇など種々の炎症関連因子の発がん過程への関与が示唆されている。今回、レポーター遺伝子導入動物に対して炎症モデルを適用し、炎症による発がん促進効果を*in vivo*変異原性をエンドポイントとして検討した。四塩化炭素を0.2 mL/kg単回腹腔内投与すると急性肝炎が惹起され、回復に1週間を要することから、週1回の投与を12回実施し、持続的な肝炎状態を維持した。この条件下において、MeIQxを併用投与したところ、複合投与群ではMeIQx誘発の*gpt*ならびに*red/gam*遺伝子MFの上昇が顕著に増進し、四塩化炭素誘発肝炎による*in vivo*変異原性の促進効果が確認された。そこで、動物用医薬品として使用され、畜肉内への残留によりヒトばく露が懸念されるフルメキンについて同

様に検討した。フルメキンは *in vivo* 変異原性を含む種々の変異原性試験に陰性を示す、いわゆる非遺伝毒性発がん物質であり、その発がん機序には投与により生じる炎症、それに続く組織障害に起因した細胞増殖活性の上昇の関与が考えられている。そこで、フルメキンと MelQx を *gpt delta* マウスに複合投与したところ、四塩化炭素と同様、複合投与群では MelQx 単独群に比べて顕著な *gpt* 遺伝子 MF の増加が観察された。同様のプロトコールにて非炎症性肝プロモーター物質として知られるフェノバルビタールを複合投与したが変化は観察されなかったことから、MelQx 誘発 *gpt* 遺伝子 MF 上昇に対する促進効果には炎症関連因子の関与の可能性が示唆された。今後は、遺伝子の網羅的解析等により促進効果に関与する炎症系サイトカイン等の同定を目指す予定である。

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 (田中)

わが国では、近年極端な健康志向により、健康増強目的でフラボノイドを中心とする天然化合物を利用する傾向にある。そのような目的の場合、多量あるいは複合摂取が予想され、健康影響が懸念される (Free Radic Biol Med 29: 375-383, 2000; Free Radic Biol Med 37: 287-303, 2004)。このような天然化合物は、単独投与による毒性試験はなされているものの、ヒトでの摂取を模倣する複合投与での毒性を検討した報告は極めて少ない (Free Radic Biol Med 29: 375-383, 2000; Free Radic Biol Med 37: 287-303, 2004)。

本分担研究では、食品中に存在する様々な化合物のうち CYP 活性抑制を有する発がん抑制的に作用する天然化合物を選択した。前年度に実施した Q と C の複合投与による影響についてストレス、毒性に係る遺伝子発現について再度検討したが、肝における第 II 相薬物代謝酵素の活性化、増殖抑制、壊死・apoptosis 増強、炎症抑制などを惹起することが示唆された。さらに、単独投与に比べ、複合投与では変動遺伝子の数に雌雄差 (雌 > 雄) がみられた。複合投与群間でみると変動遺伝子数に雌雄差はみられず、用量に従いその数が増加した。これらの結果は、これまで報告されている両物質の細胞・組織保護、発がん予防などの作用と関連し、支持するものと考えられた。

今回の実験において、Q と C および I3C と

Hes の複合投与に起因する血液生化学的変化、病理学的変化は認められなかったが、肝における薬物代謝、ストレス、毒性関連遺伝子が変動していた。したがって、今後このようなヒトが複合あるいは多量に摂取する可能性がある食品中化合物の健康影響を知るために、今回のような肝遺伝子発現システムを利用した予測を可能として行きたい。

I3C および Hes の複合投与による影響に関しては、血液生化学的、病理学的変化を認めず、現在、詳細な肝の array 解析を行っている。

3. 残留農薬の複合影響による神経毒性に関する研究 (原田)

農薬の複合毒性 (相加・相乗毒性) に関する情報は、従来から社会的にもその必要性が認識されているが、実験上及び評価上の困難性などもあって未解決な問題点が多く、今後さらなる毒性情報の集積が求められている。2 種の有機リン剤の単回投与による複合曝露影響については、Dubois が複合曝露した 43 組のうち、相加作用が 21 組、拮抗作用が 18 組、相乗作用が 4 組という結果を報告している。さらに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には、MPP (Fenthion) と DDVP (Dichlorvos) の混合投与による相加毒性作用、クロルピリフォス (Chlorpyrifos) の先行投与および同時投与によるパラチオン (Parathion) の神経毒性作用増強、フェントロチオン

(Fenitrothion) とカーバメート剤の BPMC の混合投与による致死量の低下などが報告されている。このように、有機リン剤の複合毒性は、それらの曝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曝露影響が懸念され、農薬の反復複合曝露影響調査の重要性が高まっている。そこで本研究では、有機リン剤のパラチオンとメタミドホスの混合剤を調製してラットに 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して両在による複合曝露影響を評価した。

その結果、今回検査した一般毒性指標 (体重、摂餌量、血液生化学的検査、剖検結果) および免疫毒性指標 (胸腺の細胞数測定およびリンパ球サブセット) に著変は認めら

れなかった。

神経毒性学的検査では、パラチオンとメタミドホスの複合曝露によってChE活性阻害作用が増強され、有機リン曝露における鋭敏な臨床指標である縮瞳（ヒトの代表的自覚症状）の重篤化がみられた。この増強効果は、パラチオンとの複合曝露下においてはメタミドホスの用量が低下しても明確に認められた。また、筋緊張の低下のような末梢神経性の症状は、速やかに発現して反復投与による耐性が比較的早期に生じ、振戦のような中枢性の症状はやや遅れて発現する傾向が認められた。

自発運動量の測定において複合曝露により測定の後半（40-60分）でも高い行動活性が残存することが確認された。これはスコポラミンやトリメチル錫によって記憶が障害されたラットの運動パターンに類似するが、記憶障害に伴って通常認められる運動量の増加はみられなかった。よって、ChE活性阻害による副交感神経作用の発現に伴う運動量の低下と、認知機能低下による運動量の増加の相反する作用が混在している可能性が考えられた。症状観察において警戒性低下が認められたことから、さらに認知機能低下について検討するために高架式十字迷路検査を実施した。その結果、抗不安作用を示す薬剤によって増加するといわれる開架滞在時間への影響は認められなかったが、開架/閉架間の移動回数が減少した。このことから、注意力あるいは作業空間記憶に対する複合曝露の影響が疑われた。また、剖検時の臓器重量の測定において、急性ストレスに対する生体反応のひとつである副腎の重量増加が複合曝露によって認められた。急性ストレスがコルチコステロン増加を介して海馬におけるグルタミン酸放出を引き起こし、空間記憶検索に障害を与えるという指摘もあり、複合曝露によるストレスが副腎を活性化して認知行動に影響を与えた可能性も考えられた。

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（出川）

本研究にて樹立したレポーター細胞株HepG2-PXRLucA3は、ヒトCYP3A4遺伝子のPXR結合領域とルシフェラーゼ遺伝子を連結させたレポータープラスミドを、ヒト

PXRの発現プラスミドと共にHepG2細胞に導入することで得られたクローンである。

HepG2-PXRLucA3のレポーター応答性について、各種濃度のRIFを用いて検討したところ、PXR活性化では0.3 μMから、CYP3A4遺伝子発現では1 μMから、またCYP3A4酵素活性では10 μMから濃度依存的な誘導が確認でき、PXR活性化とCYP3A4酵素誘導の間には強い相関関係が認められた。種々CYP3A4酵素誘導剤を用いた検討からも、PXR活性化とCYP3A4酵素誘導の間には強い相関関係が見られたことから、本細胞株を用いたレポーター活性の変動を指標としてCYP3A4酵素誘導を予測できることが可能と考えられた。

これまでに、PXR活性化物質を検索できるレポーター細胞株として、DPX-2細胞（Yueh MF, 2005; Trubetskoy O, 2005）や3-1-10細胞（Norachartiyapot W 2006; Matsubara T, 2007）が樹立されている。これら細胞株と今回樹立したHepG2-PXRLucA3細胞株のPXRリガンドに対する応答性を、有意なルシフェラーゼ活性を示す最低濃度で比較したところ、DPX-2では0.1 μM、3-1-10では1 μMであるのに対して、HepG2-PXRLucA3では0.3 μMであり、本細胞株は既存の細胞株と比較しても遜色のない感度を有することが確認された。

また、DPX-2については、本細胞と同様に遺伝子発現、酵素活性の誘導が確認されているが、DPX-2におけるCYP3A4遺伝子の発現誘導は最大で5倍に過ぎず、他のCYP3Aサブファミリー酵素の発現も確認されていない。これらの点から、HepG2-PXRLucA3はPXR活性化、CYP3Aサブファミリー酵素遺伝子発現、あるいはCYP3A酵素活性を感度よく、かつ一斉に分析することができる優れた細胞株であると考えられる。

HepG2-PXRLucA3を用いて、CYP3A4酵素誘導に対する食品添加物（CUR、TBZ、PGおよびBHT）の影響について検討したところ、TBZは単独でPXR活性化能を示し、かつRIFによるPXR活性化を増強したのに対し、他の化合物はいずれも単独作用はなく、RIFによるPXR活性化を抑制するといった結果が得られた。

これまでに、TBZの単独処理によるヒトCYP3A4酵素誘導やPXR活性化については既に報告されており、本研究の結果はこれを支持するものであった。また、RIFによるPXR活性化に対するTBZの増強作用についてはこれまで全く報告されておらず、本研究で見ら

れた現象は非常に興味深い。

CURについては、最近ヒト初代肝細胞においてCYP3A4遺伝子の誘導作用を示すことや、PXR活性化を惹起することが報告されている一方で、誘導及び活性化は見られないとする報告もあり、統一した見解が得られていない。特にCURについては毒性が強いため、毒性との関わりを考えた検討が必要であると考えられた。

また、RIFによるPXR活性化に対して、CUR、PGおよびBHTはいずれも抑制作用を示した。RIFによるPXR活性化に対する食品添加物の複合影響について検討した例はなく、本研究結果は非常に興味深いものと思われた。

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 (中澤)

本研究において、コーヒーなどに多く含まれているクロロゲン酸とNaNO₂を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化を引き起こし、ROSの生成に関与しているかについて*in vitro*の系で検証した。フェノール性化合物は抗酸化作用があることで、近年、注目されているが、ベンゼン環のオルト位に水酸基がある化合物についてはROSを発生させることが知られている。本実験系においても銅を加えたことで、ROSの上昇が見られたが、ニトロ化を行うことで、ROSの発生量がさらに増大した。ニトロ基は強力な電子吸引力性基であることから、銅との反応性が上がり、ROSの上昇につながったものと考えられる。

他方、*in vivo*の結果より、フェノール性化合物がニトロ化を受けた化合物を検出できたことから、クロロゲン酸とNaNO₂を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化を引き起こし、ROSの生成に寄与していることが示唆された。

E. 結論

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 (西川)

CYP1A2を誘導する α -ナフトフラボンおよびチアベンダゾールを、誘導が起らない濃度で複合投与するとCYP誘導の加算的上昇が認められた。レポーター遺伝子導入動物に四塩化炭素肝炎モデルを適用し、MeIQx誘発*in vivo*変異原性への炎症による促進効果を確認した。食品中の炎症誘発物質フルメキン

との複合投与においても同様の結果が得られ、本モデルが食品中に含まれる発がん性物質と炎症誘発物質の複合影響評価に有用なモデルであることが示された。

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 (田中)

QuercetinとcurcuminおよびIndole-3-carbinolとhesperidinの複合投与による血液生化学的変化、病理学的変化は認められなかった。前者の複合投与によるマウス肝臓物代謝、ストレス、毒性に係る遺伝子発現への影響は、第II相薬物代謝酵素の活性化、増殖抑制、壊死・apoptosis増強、炎症抑制などを惹起することが示唆された。

3. 残留農薬の複合影響による神経毒性に関する研究 (原田)

パラチオンとメタミドホスの2種類の有機リン系農薬を2週間にわたり8週齢の雌性ラットに反復経口投与し、一般毒性、神経毒性及び免疫毒性関連項目を指標に複合曝露影響を調査した。その結果、パラチオンとメタミドホスは、それぞれの単独曝露では毒性を示さない用量でも、複合的に反復曝露された場合には神経毒性の発現が増強される可能性が示唆された。

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 (出川)

本研究ではヒトCYP3A酵素誘導を簡便に予測できるレポーター細胞株HepG2-PXRLucA3を樹立し、この細胞を用いて4種の食品添加物(CUR、TBZ、PGおよびBHT)のヒトCYP3A4酵素誘導への影響を検討した。その結果、各食品添加物にはCYP3A4酵素の発現誘導に影響及ぼす性質があることが示唆された。今後さらに、他の食品添加物についても、CYP3A4酵素の発現誘導に及ぼす影響を検討することが必要であり、複合影響を踏まえた安全性評価系の構築が重要と考える。

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 (中澤)

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クロロゲン酸およびカフェイン酸とNaNO₂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。生体内における過剰

の ROS 生成は、種々の疾患に関与することが知られている。このことから、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。本研究の結果より、フェノール性化合物と NaNO_2 を併用することで、人工胃液中でニトロ化反応が起こり、ROS 発生量の増大が認められた。また、*in vivo* において併用投与実験を行ったところ、マウス肝臓からフェノール性化合物がニトロ化を受けた物質を検出したことから、生体内でも ROS 生成量の増大と、それによって惹起される DNA や脂質への影響が危惧された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Umemura T, Tasaki M, Kijima A, Okamura T, Inoue T, Ishii Y, Suzuki Y, Masui N, Nohmi T, Nishikawa A. Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and *in vivo* mutagenicity in kidneys of gpt delta rats treated with potassium bromate. *Toxicology* (2009) 257: 46-52.
- 2) Kuroiwa, Y., Yamada, M., Matsui, K., Okamura, T., Ishii, Y., Masumura, K., Tasaki, M., Umemura, T., Mitsumori, K., Nohmi, T., Hirose, M., Nishikawa, A.: Combined ascorbic acid and sodium nitrite treatment induces oxidative DNA damage-associated mutagenicity *in vitro*, but lacks initiation activity in rat forestomach epithelium. *Toxicol. Sci.* (2008) 104: 274-282.
- 3) Kanki, K., Umemura, T., Kitamura, Y., Ishii, Y., Kuroiwa, Y., Kodama, Y., Itoh, K., Yamamoto, M., Nishikawa, A., Hirose, M.: A possible role of *nrf2* in prevention of renal oxidative damage by ferric nitrilotriacetate. *Toxicol. Pathol.* (2008) 36: 353-361.
- 4) Kuroiwa, Y., Okamura, T., Ishii, Y., Umemura, T., Tasaki, M., Kanki, K., Mitsumori, K., Hirose, M., Nishikawa, A.: Enhancement of esophageal carcinogenesis in acid reflux model rats treated with ascorbic acid and sodium

- nitrite in combination with or without initiation. *Cancer Sci.* (2008) 99: 7-13.
- 5) Miyamoto, S., Yasui, Y., Tanaka, T., Ohigashi, H., and Murakami, A. Suppressive effects of nobiletin on hyperleptinemia and colitis-related colon carcinogenesis in male ICR mice. *Carcinogenesis* 29: 1057-1063 (2008).
 - 6) Kim, M., Miyamoto, S., Sugie, S., Yasui, Y., Ishigamori-Suzuki, R., Murakami, A., Nakagama, H., and Tanaka, T. A tobacco-specific carcinogen, NNK, enhances AOM/DSS-induced colon carcinogenesis in male A/J mice. *In Vivo*, 22: 557-564 (2008).
 - 7) Shimizu, M., Shirakami, Y., Sakai, H., Adachi, S., Hata, K., Hirose, Y., Tsurumi, H., Tanaka, T., and Moriwaki, H. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. *Cancer Prev. Res.*, 1: 298-304 (2008).
 - 8) Miyamoto, S., Epifano, F., Curini, M., Genovese, S., Kim, M., Ishigamori-Suzuki, R., Yasui, Y., Sugie, S., and Tanaka, T. A novel prodrug of 4'-geranyloxy-ferulic acid suppresses colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Nutr. Cancer* 60: 675-684 (2008).
 - 9) Kim, M., Miyamoto, S., Yasui, Y., Oyama, T., Murakami, A., and Tanaka, T. Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. 2008, *Int. J. Cancer*, 124: 264-271 (2008).

2. 学会発表

- 1) 岡村俊也, 石井雄二, 井上知紀, 田崎雅子, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: *gpt delta* マウスを用いた四塩化炭素誘発肝障害モデルにおける MeIQx の *in vivo* 突然変異解析. 第 67 回日本癌学会 (名古屋) 2008 年 10 月 28 日
- 2) Mihe Kim, 安井由美子, 杉江茂幸, 田中卓二. A novel prodrug of ferulic acid suppresses AOM/DSS-induced mouse colon carcinogenesis. 第 97 回日本病理学会総会、金沢、(2008 年 5 月)
- 3) 安井由美子, 金 美慧, 杉江茂幸, 田中卓二. Pitavastatin inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. 第 97 回日本病理学会総会、金沢、(2008 年 5 月)

- 4) 金 美慧、安井由美子、杉江茂幸、田中卓二、甲野裕之、宮本真吾。Pitavastatin による 4-NQO 誘発 rasH2 マウス舌・食道発がん抑制。がん予防大会 2008 福岡 (第 15 回日本がん予防学会、第 9 回日本がん分子疫学研究会、第 31 回がん疫学研究会)、福岡、(2008 年 5 月)
- 5) 安井由美子、金 美慧、杉江茂幸、田中卓二、細川雅史、宮下和夫。炎症関連大腸発がんに対する 9c,11t,13c-CLN 含有ザクロ種子油の抑制効果。がん予防大会 2008 福岡 (第 15 回日本がん予防学会、第 9 回日本がん分子疫学研究会、第 31 回がん疫学研究会)、福岡(2008 年 5 月)
- 6) 杉江茂幸、金 美慧、安井由美子、尾山 武、田中卓二、嶋田昇二、増田佳史。パン酵母の AOM 誘発ラット大腸発がんにおける修飾効果。がん予防大会 2008 福岡 (第 15 回日本がん予防学会、第 9 回日本がん分子疫学研究会、第 31 回がん疫学研究会)、福岡、(2008 年 5 月)
- 7) 宮本真吾、村上 明、田中卓二。脂肪細胞のレプチン分泌に対するノビレチンの抑制メカニズム。がん予防大会 2008 福岡 (第 15 回日本がん予防学会、第 9 回日本がん分子疫学研究会、第 31 回がん疫学研究会)、福岡、(2008 年 5 月)
- 8) 安井由美子、尾山 武、杉江茂幸、田中卓二、細川雅史、宮下和夫。9c,11t,13c-CLN 含有ザクロ種子油による炎症関連マウス大腸発がんの化学予防。第 13 回日本フードファクター学会学術集会、東京、(2008 年 11 月)
- 9) Yasui, Y., Miyamoto, S., Kim, M., Oyama, T., Sugie, S., Murakami, A., and Tanaka, T. Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. 4th International Niigata Symposium on Diet and Health - "Integrative Functions of Diet in Anti-aging and Cancer Prevention", Niigata, (2008 年 11 月)
- 10) Kim, M., Yasui, Y., Ishigamori-Suzuki, R., Miyamoto, S., Sugie, S., and Tanaka, T. A novel prodrug of 4'-geranyloxy-ferulic acid suppresses colitis-related colon carcinogenesis in mice. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第 67 回日本癌学会学術総会), Nagoya, (2008 年 10 月)
- 11) Yamaguchi, K., Kohno, H., Wakabayashi, K., and Tanaka, T. Suppression of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by a cyclooxygenase-1 selective inhibitor. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第 67 回日本癌学会学術総会), Nagoya, (2008 年 10 月)
- 12) Yasui, Y., Hosokawa, M., Miyashita, K., Kim, M., Sugie, S., and Tanaka, T. Pomegranate seed oil containing 9c,11t,13c-CLN inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第 67 回日本癌学会学術総会), Nagoya, (2008 年 10 月)
- 13) Tanaka, T., Miyamoto, S., Yasui, Y., Oyama, T., Kim, M., Akira Murakami, and Sugie, S. Dietary zerumbone inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第 67 回日本癌学会学術総会), Nagoya, (2008 年 10 月)
- 14) Sugie, S., Yasui, Y., Kim, M., Oyama, T., Kohno, H., Masuda, Y., Shimada, S., and Tanaka, T. Chemopreventive effects of zinc on AOM-induced colon carcinogenesis in rats. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第 67 回日本癌学会学術総会), Nagoya, (2008 年 10 月)
- 15) Shirakami, Y., Shimizu, M., Adachi, S., Tanaka, T., and Moriwaki, H. EGCG suppresses tumor growth by inhibiting the VEGF/VEGFR axis in the xenograft model of human colon cancer and hepatoma. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第 67 回日本癌学会学術総会), (2008 年 10 月)
- 16) Shimasaki, T., Ishigaki, Y., Nakaya, N., Nakajima, H., Tomosugi, N., Tanaka, T., Mai, W., Kawakami, K., Minamoto, T., and Motoo, Y. Combined effect of gemcitabine and GSK3b inhibitor against pancreatic cancer: Basic analysis for future clinical trial. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第 67 回日本癌学会学術総会), Nagoya, (2008 年 10 月)
- 17) 首藤 康文、福山 朋季、藤江 秀彰、小嶋 五百合、富田 真理子、小坂 忠司、原田 孝則：有機リン化合物の複合毒性：ラットにおけるパラチオンおよびメタミドホス混合剤の反復経口投与毒性。第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会 (盛岡、2009 演題登録済)
- 18) 佐野慎亮、関本征史、矢部香織、根本清光、出川雅邦：ヒト PXR 活性化物質検索用レポーター細胞株 HepG2-PXR/LucA3 の樹立。日本薬学会 129 年会 (京都)、2009 年 3 月 28 日

19) 佐野慎亮、関本征史、矢部香織、根本清光、出川雅邦：ヒトプレグナンX受容体活性化物質検索用レポーター細胞株の樹立。平成20年度日本薬学会東海支部例会(静岡)、2008年12月5日

20) 関本征史、根本清光、西川秋佳、出川雅邦：3-メチルコラントレンによるHepG2細胞でのCYP1A酵素誘導に及ぼす食品添加物の影響。第35回日本トキシコロジー学会(東京)、2008年6月26日

21) 大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、齊藤貢一、西川秋佳、中澤裕之。カフェイン酸のProoxidant作用に

ニトロ化反応が及ぼす影響 第69回分析化学討論会(2008年5月・愛知県)

22) 大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、齊藤貢一、西川秋佳、中澤裕之。カフェイン酸のニトロ化反応による活性酸素種生成への影響。第96回日本食品衛生学会学術講演会(2008年9月・兵庫県)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし。

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

研究分担者： 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究協力者： 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

食品に含まれる 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)などのヘテロサイクリックアミンは、薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 1A によって代謝活性化し、DNA と結合することで遺伝毒性を示すことが知られている。CYP1A 誘導剤として知られる食品中化学物質としてβ-ナフトフラボン、チアベンダゾール、メナジオンを様々な濃度でラットに投与し、CYP1A mRNA 発現量を測定したところ、β-ナフトフラボンおよびチアベンダゾール投与群で用量相関性の CYP1A1, 1A2 mRNA の発現上昇が認められた。さらに CYP1A2 誘導の閾値濃度を探索した結果、β-ナフトフラボンは 200 ppm、チアベンダゾールは 100 ppm となり、さらにこれらの用量で 2 剤の複合投与を行ったところ、CYP1A2 の相加的な発現量の上昇が認められた。このことから、CYP1A2 誘導が起こらない無作用量でも、複合摂取による影響が表れる可能性が示唆された。

また、レポーター遺伝子導入動物に四塩化炭素誘発肝障害モデルを適用し、MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性への影響を検索したところ、複合投与により、レポーター遺伝子 *gpt* ならびに *redlgam* 遺伝子の変異頻度 (MF) が MeIQx 単独投与に比べて著しく上昇することが明らかとなった。そこで食品中の炎症誘発物質であるフルメキンについても同様に検索したところ、複合投与により *gpt* 遺伝子 MF の顕著な増加が認められた。以上より、レポーター遺伝子導入動物を用いて *in vivo* 変異原性をエンドポイントにすることで、食品中の発がん性物質と炎症誘発物質による複合影響を明らかにすることが可能となり、本モデルは食品中の複数の化学物質によるヒト健康影響評価に有用なモデルであることが示された。

A. 研究目的

食品に含まれる MeIQx などのヘテロサイクリックアミンはヒトに対する発がん性が疑われる物質で、肝臓の薬物代謝酵素 CYP1A に代謝活性化され、DNA と付加体を形成することにより遺伝毒性を示す。一方、CYP1A は食品に含まれる様々な物質によって発現誘導されるため、これらの物質を同時に体内に摂取する可能性があり、その複合影響はヒト健康影響評価にとって重要である。さらに、単体では薬物代謝酵素誘導を起こさない無作用量であっても複数摂取した時の複合影響に関して、詳細はわかっていない。そこで、食品に含まれる

可能性のある化学物質の中からβ-ナフトフラボン（食品中に存在）、チアベンダゾール（防かび剤）およびメナジオン（ビタミン K）を取り上げ、これらの投与による CYP1A 誘導を mRNA レベルで測定し、CYP1A、特に MeIQx の代謝に重要な CYP1A2 誘導に対する複合投与の影響を検索した。

また、食品中には炎症誘発作用を有する化学物質も存在することから、炎症が発がんリスクを高める要因の一つとして考えられていることに着目し、食品中の炎症誘発物質とヘテロサイクリックアミンとの複合影響についてレポーター遺伝子導入動物を用いて *in vivo* 変異原性をエンドポイントに

検索し、本モデルの有用性について検討した。

B. 研究方法

1. 被験物質

β -ナフトフラボン、四塩化炭素、フェノバルビタールは和光純薬工業株式会社から、チアベンダゾール、フルメキンはSigma-Aldrich社から、メナジオンはAlexis Biochemicals社から、MeIQxはToronto Research Centerから購入した。

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（実験1～3）または6、5週齢の雄性gpt deltaマウス（それぞれ実験4、5）を日本エスエルシー株式会社（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。動物の飼育はバリエーション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57匹を無作為に各群3匹の19群に分け、 β -ナフトフラボンを0.6、3.2、16、80、400、

2000 ppm、チアベンダゾールを1.6、8、40、200、1000、5000 ppm、メナジオンを0.3、1.6、8、40、200、1000 ppmの濃度でそれぞれの基礎飼料中に混じて2週間投与した。投与期間中は一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は週1回測定した。投与期間終了時にエーテル麻酔下で開腹し、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。肝臓はmRNAレベルの測定に供した。

<実験2.>6週齢のF344ラット雄27匹を無作為に各群3匹の9群に分け、 β -ナフトフラボンを50、100、200、400 ppm、チアベンダゾールを25、50、100、200 ppmの濃度でそれぞれの基礎飼料中に混じて2週間投与した。投与期間中は一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は週1回測定した。投与期間終了時にエーテル麻酔下で開腹し、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。肝臓はmRNAレベルの測定に供した。

<実験3.>6週齢のF344ラット雄18匹を無作為に各群3匹の6群に分け、単独投与群として β -ナフトフラボンを200、400 ppm、チアベンダゾールを100、200 ppmの濃度でそれぞれの基礎飼料中に混じ、複合投与群として β -ナフトフラボン200 ppm およびチアベンダゾール100 ppmを基礎飼料中に混じて2週間投与した。投与期間中は一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は週1回測定した。投与期間終了時にエーテル麻酔下で開腹し、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。肝臓はmRNAレベルの測定に供した。

<実験4.>7週齢のgpt deltaマウス雄

57匹を無作為に各群 15-18匹の4群に分け、基礎飼料または MelQx 300 ppm を基礎飼料に混じてそれぞれ2群に投与した。基礎飼料群と MelQx 投与群各1群には、週1回、四塩化炭素 0.2 mL/kg を計12回腹腔内投与した。投与期間中は一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は週1回測定した。投与13週後、各群5匹ずつエーテル麻酔下で開腹し、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。採取した肝臓は *in vivo* 変異原性アッセイに供した。

<実験5.>6週齢の *gpt delta* マウス雄25匹を無作為に各群5匹の5群に分け、MelQx0.03%、フルメキン0.4%、フェノバルビタール0.05%の濃度で13週間投与した。MelQxは飲水に混じり、フルメキンおよびフェノバルビタールは基礎飼料に混じて投与した。複合投与群として、MelQx0.03%とフルメキン0.4%投与群およびMelQx0.03%とフェノバルビタール0.05%投与群を設けた。投与期間中は一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は週1回測定した。投与期間終了時にエーテル麻酔下で開腹し、大動脈切断により放血致死させ、肝臓を摘出した。肝臓は *in vivo* 変異原性アッセイに供した。

4. 肝臓中の mRNA レベルの測定

ISOGEN (株式会社ニッポンジーン) を用いて抽出した全 RNA を High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写した。得られた cDNA から、Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システムを用いて目的 mRNA 発現量を測定した。

5. *gpt* 点突然変異の検出と解析

回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。またファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後 YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育するコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 変異頻度 (MF) を算出した。

6. *Spī* 欠失変異の検出と解析

ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2) 株) に感染させ、*Spī* プラークの候補を検出した。*Spī* プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の *Spī* プラークを検出した。またパッケージング反応後の懸濁液を、適宜希釈した後 P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。

7. 統計処理

肝臓中の mRNA レベルおよび *in vivo* 変異原性アッセイについて、各群の分散比を F 検定で検定し、等分散の場合は