

200909018A

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

(H19-食品-一般-019)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成22(2010)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	-----	25
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	-----	38
田中卓二		
3. 残留農薬の複合影響による神経・免疫毒性に関する研究	-----	44
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	-----	84
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	-----	90
斉藤貢一		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	98
---------------------	-------	----

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

研究代表者： 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長
研究分担者： 田中卓二 金沢医科大学 腫瘍病理学教授
研究分担者： 原田孝則 (財) 残留農薬研究所 毒性部長
研究分担者： 出川雅邦 静岡県立大学 薬学部教授
研究分担者： 斉藤貢一 星薬科大学 薬品分析化学教室准教授

研究要旨

食品中化学物質の相互作用を検討するため、発がん、発がん抑制、神経毒性及び免疫毒性に関する *in vivo* 実験、代謝活性化及び酸化ストレスへの影響に関する *in vitro* 実験を実施した。①IQの複合影響を *gpt delta* ラットで検討した。*Cyp1a2* mRNA 発現量への複合影響をマウスで検討した。フルメキンと MelQx の併用投与による *gpt* 変異頻度への影響を検討した。②Indole-3-carbinol と hesperidin、或いは quercetin と catechin mixture をマウスに併用投与し、microarray 解析を行った。③2種類の有機リン系農薬をラットに反復経口投与した。有機リン剤と有機塩素剤をマウスに反復経口投与し、フェノキシ酢酸系除草剤・殺菌剤を経皮暴露して LLNA 法で検索した。④ヒト AhR リガンド検索用細胞株に食品添加物を処理し、AhR 活性化の経時変化を検討した。また、ヒト PXR リガンド検索用細胞株に処理し、CYP3A 酵素発現への影響を検討した。⑤クロロゲン酸およびカフェイン酸について、ニトロ化によるラジカル発生能を ESR で検討した。その結果、①IQ+CYP1A2 誘導剤併用投与で、*gpt* 変異頻度が減少し UGT 活性が上昇した。ラット同様、併用で *Cyp1a2* 発現量が相加的に上昇した。フルメキン併用により MelQx の *gpt* 変異頻度が上昇した。②変動遺伝子数は併用投与群で顕著に多く、単独群ではみられなかった遺伝子発現の変動が見られた。③パラチオンとメタミドホスは、相加的な ChE 活性阻害作用を示した。ChE 活性阻害等は若齢の方が軽度であった。パラチオン及びメトキシクロルは、リンパ球細胞増殖活性を増加し、EC3 濃度を低下させた。④チアベンダゾール共存下、低濃度の MC を処理したところ、MC 単独処理に比して AUC の増加が見られたが、CYP3A 酵素活性にはほとんど影響を及ぼさなかった。⑤フェノール性化合物はニトロ化によって prooxidant 作用が減弱し antioxidant 作用が上昇した。フェノール性化合物は DNA の酸化を示すが、ニトロ化によって作用が減弱した。得られたデータを総合的に解析することにより、複合影響に対するよりの確な安全性評価に寄与できるものと期待される。

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

＜実験 1-1＞ 6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット 25 匹を無作為に各群 5 匹の 5 群に分け、対照群、単独投与群として IQ 20 ppm および 200 ppm、併用投与群として IQ 20 ppm + β -ナフトフラボン (β -NF) 200 ppm + チアベンダゾール (TBZ) 100 ppm および IQ 200 ppm + β -NF 200 ppm + TBZ 100 ppm をそれぞれの基礎飼料中に混じて 4 週間投与した。併用投与群については、三剤併用投与開始 1 週間前から β -NF および TBZ を上記の用量で混餌投与した。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、mRNA レベルの測定、*in vivo* 変異原性アッセイおよび酵素活性測定を実施した。

＜実験 1-2＞ 6 週齢の雄性 B6C3F₁ マウス 36 匹を無作為に各群 3 匹の 12 群に分け、対照群の他に、 β -NF を 1.6、8、40、200、1000 ppm、TBZ を 1.6、8、40、200、1000、5000 ppm の用量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、mRNA レベルを測定した。

＜実験 1-3＞ 6 週齢の雄性 B6C3F₁ マウス 33 匹を無作為に各群 3 匹の 11 群に分け、対照群の他に、 β -NF を 37.5、75、150、300、600 ppm、TBZ を 37.5、75、150、300、600 ppm の用量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、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、mRNA レベルを測定した。

＜実験 1-4＞ 6 週齢の雄性 B6C3F₁ マウス

18匹を無作為に各群3匹の6群に分け、対照群の他に、単独投与群として β -NF 300、600 ppm、TBZ 75、150 ppm、併用投与群として β -NF 300 ppmおよびTBZ 75 ppmを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、mRNAレベルを測定した。

<実験 1-5> 6週齢の雄性 B6C3F₁ *gpt* delta マウス 25匹を無作為に各群5匹の5群に分け、対照群の他に、単独投与群として MeIQx 0.03%、フルメキン (FLU) 0.4%、フェノバルビタール (PB) 0.05%の濃度で、併用投与群として、MeIQx0.03%と FLU 0.4%投与群および MeIQx0.03%と PB 0.05%の濃度で13週間投与した。MeIQxは飲水に混じ、FLUおよびPBは基礎飼料に混じて投与した。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、*in vivo* 変異原性アッセイを実施した。

<実験 2-1> インドール-3-カルビノール (I3C) とヘスピリジン (Hes) の複合投与による影響 (前年度実施) について、薬物代謝、ストレス・毒性、アポトーシスに係わる遺伝子発現について検討した。

<実験 2-2> ケルセチン (Q) とカテキン mixture (C mix) 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) を以下の 5 群に分けた。500 ppm Q + 500 ppm C mix 群、250 ppm Q + 250 ppm C mix 群、500 ppm Q 群、500 ppm C mix 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等の変化を microarray にて解析し、さ

らに 4 週、8 週時の血液生化学的解析や、病理組織学的解析を実施した。

<実験 3-1> 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、若齢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神経毒性関連項目を指標として複合暴露影響を検索した。成獣と幼若における用量群を対応させて毒性影響の差を検討するために、成獣に対する追加用量群の投与を併せて実施した。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°C) 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]) の雌を試験に用いた。3 週齢にて 60 匹購入し、試験環境に 3 日間馴化させた後、投与を開始した。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。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。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は、血漿中活性が20%を超えて低下し、そして脳内活性の低下が20%未満になる用量に相当すると考えられる。成獣（8週齢）雌性Wistar Hannover系SPFラットを用いた予備実験から、パラチオン0.6 mg/kg/day、メタミドホス0.8 mg/kg/dayがこれにあたりと判断した。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。これらの実験結果に基づいて、若齢（3週齢）ラットに対する複合暴露群として、パラチオン0.3 mg/kg/dayとメタミドホス0.4 mg/kg/day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2用量を設け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あるいは1.2 mg/kg/day単剤暴露群及びメタミドホス0.8 mg/kg/dayあるいは1.6 mg/kg/day単剤暴露群の5群を設け、合計7群で実験を行った。さらに、成獣と若齢の暴露影響を比較するために、媒体対照群（0 mg/kg/day）、パラチオン1.2 mg/kg/day単剤暴露群、メタミドホス1.6 mg/kg/day単剤暴露群及びパラチオン0.3 mg/kg/dayとメタミドホス0.4 mg/kg/dayを平成20年度に実施した成獣（8週齢）における暴露影響の追加実験として実施した（実験方法は平成20年度報告書参照）。各用量の被験物質投与液を週に

1回調製し、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、パラチオンはコーン油にて0、0.15、0.3、0.6 mg/mLの濃度に、メタミドホスは1%Tween80水溶液（Tween80、和光純薬工業株式会社）にて0、0.2、0.4、0.8 mg/mLの濃度に溶解あるいは懸濁させ、この2液を1:1にてスターラーで懸濁して、各実験群の投与液を調製した。各投与液は小分けし、冷蔵・遮光（5°C）条件下にて保存し、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、成獣にて変化が認められた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として、振戦、警戒性、筋緊張、取り扱いに対する反応に対する観察を実施した。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。明暗箱検査として、全動物について、投与2週時に、狭い暗箱と広い明箱で構成されている受動回避試験装置（SHUTAVOID, Panlab. s.l.）を利用して明暗箱検査を実施した。明暗箱検査では、暗箱及び明箱の滞在時間と移動回数を測定して抗不安や危険判断能力について評価した。

全動物について、投与開始時（0日）、投与4日、8日、12日及び殺処分前に、体重を測定した。2週間反復投与終了後の全動物について、血漿及び脳のコリンエステラーゼ(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、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（日本電子株式会社）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。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、肝臓）。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、肝臓）。各検査項目について、対照群と各被験物質暴露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、自発運動量、明暗箱検査項目、ChE活性、臓器重量のデータについて、Student-t検定を実施して対照群と各暴露群間における有意差の有無を判定した。詳細な症状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Mann・Whitney-U検定を用いて対照群と各暴露群間における平均順位の有意差の有無を判定した。

<実験 3-2>行動変化の原因を精査するために、成熟雌性ラットの高用量複合暴露群について追加検査を実施した。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°C）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]）の雌を試験に用いた。7週齢にて20匹購入し、試験環境に6日間馴化した後、8週齢で投与を開始した。馴化期間中毎日一般状態を観察した。動物は実験3-1と同様な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複合暴露群と溶媒対照群に8匹ずつ、学習検査陽性対照群に4匹配分し、群分けを実施した。群分け後の個体識別は被毛染色法で行なった。基礎飼料及び飲料水は実験3-1と同様とした。試験群として、パラチオン0.6 mg/kg/dayとメタミドホス0.8 mg/kg/dayの高用量複合暴露群と媒体対照群（0 mg/kg/day）を設けた。また、学習検査の陽性対照として、投与開始日にトリメチルスズ（TMT）10 mg/kgを単回投与したTMT群を設けた。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、パラチオンはコーン油にて0.03 mg/mLの濃度に、メタミドホスは1% Tween80水溶液 (Tween80、和光純薬工業株式会社) にて0.04 mg/mLの濃度に溶解あるいは懸濁させ、この2液を1:1にてスターラーで懸濁して、各実験群の投与液を調製した。各投与液は小分けし、冷蔵・遮光(5°C)条件下にて保存し、投与直前に室温に戻して使用した。TMT群の投与液は投与開始日にTMTを2 mg/mLの濃度となるように0.5%メチルセルロースナトリウム水溶液に溶解して調製し、5 mL/kgの容量で投与した。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、投与4日、8日及び12日に、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、投与13日に60°Cに設定した熱板式鎮痛効果測定装置 (HOT PLATE ANALGESIA METER MK-350、室町機械株式会社) を用いて知覚 (痛覚) 検査を行った。学習記憶検査として、投与2週にモーリス水迷路検査を実施した。投与8日から1日4回、4日間連続して学習試行を行い、プラットホームへの到達時間と60秒以内での到達率を測定した。さらに、5日目にはプラットホームを取り去って、プラットホームが存在した4分円区域 (標的領域) での滞在時間と侵入回数を測定して学習記憶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日及び殺処分前に、体重を測定した。

中枢神経の酸化ストレス検査として、中枢神経系における酸化ストレス検査として、2週間反復投与終了後の全動物の海馬について、グルタチオン濃度測定を実施した。エーテル麻酔下で開腹し、後大静脈より放血した各動物から脳を摘出し、左右に切り分けた後、右脳から海馬を摘出して重量を測定した。この海馬について HT Glutathione Assay Kit (TREVIGEN Inc.) を用いて総グルタチオン及び酸化型グルタチオン濃度を測定して、中枢神経における酸化ストレスを評価した。さらに病理組織学的検索の必要性を考慮して、左脳は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。有意差検定は、各検査項目について、対照群と各被験物質暴露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、自発運動量、明暗箱検査項目、学習記憶機能検査項目、中枢神経の酸化ストレス検査項目について、Student-t検定を実施して対照群と各暴露群間における有意差の有無を判定した。

<実験 3-3>殺虫剤の有機リン剤 (パラチオン) ないしは有機塩素剤 (メトキシクロル) を雌性のCBA/J系マウスに5日間反復経口投与し、4週間休薬後にフェノキシ酢酸系除草剤 (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸ブチル、2,4-D-butyl) ないし殺菌剤 (オイゲノール) を用いた Local Lymph Node Assay (LLNA法) を実施した。LLNA法は2002年4月24日付け経済協力開発機構の毒性試験指針「OECD Guideline for the testing of chemicals. Guideline 429: Skin sensitization- Local Lymph Node Assay)」に従い実施した。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 Phosphorothiate、99.6%、

和光純薬工業株式会社)、有機塩素剤のメトキシクロル (Methoxychlor、2,2-Bis (p-Methoxyphenyl)-1,1,1-Trichloroethane、97%>、和光純薬工業株式会社、大阪府)、フェノキシ酢酸系除草剤の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸ブチル (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-butyl、2,4-D-butyl、98%>) 及び殺菌剤のオイゲノール

(Eugenol、4-Allyl-2-Methoxyphenol、95%>、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°C) で保管した。日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター (神奈川県) で生産された近交系 SPF マウス (CBA/JnCrj) の雌動物を用いた。CBA/Jn マウスは接触性過敏症研究に良く用いられ、Guideline により使用が定められている動物種である。試験動物は 3 週齢にて購入し、6 日間試験環境に馴化した後、4 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。経口投与 (パラチオンないしメトキシクロル) 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により群分けを実施した。4 週間休薬後の経皮感作投与 (2,4-D-butyl ないしオイゲノール) 開始日にも同様の方法にて群分けを実施した。基礎飼料には保証飼料 MF 固型 (オリエンタル酵母工業株式会社) を用い、ステンレス鋼製バスケット型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業研究所で定める倫理規定に従い実施した。試験群として、パラチオン及びメトキシクロルは、経口経路にて毒性及び死亡の起こらない用量を最高用量として選択し、それぞれ公比 3 にて、パラチオンは 1.2、0.4、及び 0 mg/kg、メトキシクロルは 300、100 及び 0 mg/kg の各 3 用量を設定した。

4-D-butyl 及びオイゲノールは経皮経路にて毒性、皮膚刺激性および死亡の起こらない濃度を最高用量として選択し、2,4-D-butyl は 10、5、2.5 及び 0 %、オイゲノールは 25、10、5 及び 0 % の各 4 濃度を設定した。パラチオン及びメトキシクロルは各用量の被験物質調製時に純度換算を行い、投与容量は 10 mL/kg とした。所定量の被験物質を秤量した後、コーン油にて溶解あるいは懸濁させた。対照群の投与液はコーン油とした。各用量の投与液は小分けし、冷蔵・遮光 (5°C) 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。

2,4-D-butyl 及びオイゲノールは用時調製とした。各濃度の被験物質調製時に純度換算を行い、所定量の被験物質を秤量した後、アセトン/オリーブオイル (アセトン (和光純薬工業株式会社) : オリーブオイル (和光純薬工業株式会社) = 4 : 1) にて溶解させた。対照群の投与液はアセトン/オリーブオイルとした。パラチオン及びメトキシクロルは、各用量の被験物質投与液を 4 週齢時に 5 日間連続経口投与した。2,4-D-butyl 及びオイゲノールは各濃度の被験物質投与液を最終経口投与の 4 週間後に両耳後方に 3 日間経皮投与した。被験物質投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、経口経路はゾンデを用いて、経皮経路はピペッ

トを用いて左右の耳介後方に 25 μL ずつ投与実施した。全動物について、経口投与開始直前、投与後 1 週間毎及び最終解剖日に体重を測定した。最終解剖予定時刻の 5 時間前に 20 μCi の放射性 ^3H -Methyl Thymidine (20 μCi /250 μL リン酸緩衝液、株式会社パーキンエルマージャパン、東京) を動物の尾静脈内に投与した。 ^3H -Methyl Thymidine 投与の 5 時間後、全生存動物についてエーテルの麻酔下で放血屠殺し、各動物より両側の耳介リンパ節を採取した。両側の耳介リンパ節は重量測定後、リンパ球細胞の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液の調製は、リン酸緩衝液 (PBS) に浸水したリンパ節をナイロンメッシュ (75 μm メッシュ) 上で揺りつぶし、単細胞懸濁液を得た。次に細胞懸濁液を PBS にて 2 回洗浄し、洗浄後 5%トリクロロ酢酸溶液 (和光純薬工業株式会社) にて懸濁させた後、冷蔵庫 (5°C) にて約 18 時間静置した。翌日 (約 18 時間後)、遠心分離後に沈渣を 1 mL の 5%トリクロロ酢酸溶液にて懸濁した。リンパ球細胞増殖活性の測定は、5%トリクロロ酢酸溶液に懸濁した 1 mL のリンパ球細胞懸濁液に 9 mL の液体シンチレーター (AtomLight、株式会社パーキンエルマージャパン) を加えて混和した後、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100、株式会社アロカ、東京) にて ^3H -methyl thymidine の放射エネルギーを測定した。DPM (disintegrations per minute) で表された個体ごとの放射エネルギーをリンパ球細胞増殖活性とした。有意差検定は、各検査項目について、対照群と各被験物質 (2,4-D-butyl 及びオイゲノール) 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、臓器重量およびリンパ球細胞増殖活性のデータについては、まず Bartlett の等分散検定を行なった。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた時は、Dunnett の多重比較法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。Bartlett の等分散検定で各群の分散が等しくないという判定が出た場合は、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた時は、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。試験結果の評価としては、リンパ球細胞増殖活性について SI 値 (Stimulation Index) を被験物質投与群の用量群ごとに求め、SI 値を基に、2,4-D-butyl 及びオイゲノールの EC3 濃度 (SI=3 となる濃度) を求めた。

<実験 4>試験には、二種の細胞株を用いた。① ヒト AhR リガンド検索用細胞株：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導入し、ヒト肝がん培養細胞株 HepG2 に導入した。その後、セレクションおよびスクリーニングを行い、AhR リガンドに対し高い反応性を有する細胞株として株化した HepG2-A10 を使用した。② ヒト PXR リガンド検索用細胞株：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 および -362 ~ +53) を、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだレポータープラスミド (phCYP3A4Luc) を作成し、ヒト PXR 強制発現プラスミドとともに HepG2 に導入した。その後、セレクションおよびスクリーニングを行い、PXR リガンドに対し高い反応性を有する細胞株として株化した HepG2-PXRLucA3 を使用した。被検化合物として、クルクミン (CUR) (生薬試験用標準品、純度 99%、和光純薬)、チアベンダゾール (TBZ) (純度 98%、Sigma)、ブチルヒドロキシトルエン (BHT) (純度 99%、Sigma)、およびプロピルガレート (PG) (純度 98%、Fluka) 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。AhR 活性化能は、以下のように測定した。HepG2-A10 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、被検化合物を添加し、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蛋白質濃度を測定し、蛋白質あたりの発光強度を算出した。CYP3A 遺伝子発現量は、以下のように測定した。HepG2-PXRLucA3 細胞を 60mm dish で培養し、被験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、遺伝子特異的なプライマーセット (ヒト CYP3A4 または GAPDH) 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 酵素アッセイは、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、各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 に残存した細胞の溶解液を調製し、蛋白質濃度を測定することにより、蛋白質あたりの酵素活性を算出した。

<実験 5> フェノール性化合物と NaNO₂ の反応生成物の標準品を得るためにクロロゲン酸および CFA と NaNO₂ をそれぞれ人工胃液中で反応を行った。フェノール性化合物 1 mmol に対し、亜硝酸ナトリウムを 5 mmol 加え、0.1 M 塩酸条件下で反応を行い、その後、酢酸エチルを用いて液液分配抽出を行った。エバポレーターで酢酸エチル相を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラ

フィーによって精製を行い、高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) および核磁気共鳴装置 (NMR) によって構造解析を行なった。また、電子スピン共鳴装置 (ESR) による Antioxidant 作用および prooxidant 作用の評価を実施した。電子スピン共鳴装置は JEOL 製 JES-RE1X ESR spectrometer を使用した。antioxidant 作用を評価するためのスピントラッピング剤には 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) を使用し、Prooxidant 作用では、 α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron (4-POBN) を用いた。さらに、酸化ストレス評価のための 8-OHdG を測定した。高速液体クロマトグラフ-紫外吸光度検出-電気化学検出器 (HPLC-UV-ECD) を使用した。UV 検出器は島津製作所社製 SPD-10AV_{VP} を用い、電気化学検出器は ESA 社製 Coulochem III を使用した。UV 検出器の測定波長は 290 nm、ECD の印加電圧は 300 mV に設定した。分離カラムは Inertsil ODS3 (150 × 4.6 mm) を使用し、移動相は 20 mM リン酸 2 水素 1 ナトリウム : メタノール = 97 : 3 を用いた。

(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

<実験 1-1> *Cyp1a2* mRNA の発現量を測定した結果、CYP1A2 誘導剤併用投与群で有意な発現の増加が認められた。*gpt* アッセイの結果、IQ 200 ppm 単独投与群および IQ + CYP1A2 誘導剤併用投与群で変異頻度の有意な上昇が認められ、併用投与群は単独投与群と比較して有意な減少が認められた。第 II 相酵素 UGT および GST 酵素活性を測定した結果、IQ 200 ppm + CYP1A2 誘導剤併用投与群で UGT 酵素活性の有意な上昇が認められた。

<実験 1-2> 肝臓での *Cyp1a2* mRNA 発現量を測定した結果、 β -NF および TBZ は用量相関性の増加を示した。 β -NF では、1000 ppm 投与群で *Cyp1a2* 発現量の有意な増加が認められた。TBZ も 1000 ppm 投与群で *Cyp1a2* 発現量の有意な増加が認められた。

<実験 1-3> 実験 2 の結果を参考に、 β -NF および TBZ の *Cyp1a2* を誘導する最低用量検討した結果、 β -NF は 300 ppm 以下、TBZ は 75 ppm 以下で *Cyp1a2* を誘導しないことが示された。

<実験 1-4> 実験 3 の結果に基づいて β -NF および TBZ の併用投与を行った結果、 β -NF 600 ppm で *Cyp1a2* の誘導が認められ、TBZ 150 ppm で *Cyp1a2* 誘導が認められなかったものの、 β -NF 300 ppm または TBZ 75 ppm で誘導される mRNA 発現が併用投与により加算的に増加することが示された。

<実験 1-5> *gpt* アッセイの結果、FLU、PB 単独投与群では変異頻度の上昇は認められなかったが 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、MelQx + PB 投与群の変異頻度は変化しなかった

が、MelQx + FLU 投与群では、対照群および FLU 投与群と比較して有意に上昇し、MelQx 投与群と比較しても上昇傾向を示した。変異スペクトラム解析の結果、MelQx 投与群および MelQx+FLU 投与群において類似した変異スペクトラムが認められ、併用投与群ではそれぞれの変異頻度が上昇していた。

<実験 2-1>I3C と Hes の単独投与群と複合投与群により、血清の GOT、GPT 値の減少がみられたが、体重、肝重量変化、および肝・腎の病理組織学的異常所見は観察されなかった。Microarray 解析により変動した遺伝子数は単独投与群に比較して、複合投与群に多かった（高濃度複合投与群 408 個、低濃度複合投与群 259 個、I3C 単独投与群 87 個、Hes 単独投与群 109 個）。複合投与において変動の大きかったアポトーシス関連遺伝子は、Ghrl、Cish、Shh、Hhip、Fgf8、Mapk8 の発現上昇、Bcl6、Cyp26b1、Trib3、Bach2、Snai2、Igfbp1 の発現低下であった。また、薬物代謝関連遺伝子は Lpo、Mt3 の発現上昇が観察された。

<実験 2-2>Q と C mix の低濃度複合投与により、コレステロール値上昇をみたが、体重、肝重量変化、および肝・腎の病理組織学的異常所見は観察されなかった。変動遺伝子数の変化は単独投与群と複合投与群間で大きな差はなかった。複合投与において変動の大きかったストレス・毒性関連遺伝子は、Mt1、Mt2 の発現上昇、Hspa1b の発現低下であった。CYP 関連遺伝子では CYP26b1 の発現低下を認めた。アポトーシス関連遺伝子は、Fos、Cidea、Nr4a1 の発現上昇、Hspa1a の発現低下を認めた。

<実験 3-1>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。機能検査では、詳細な症状の観察の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単剤暴露群、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単剤暴露群及びパラチオン 0.3 mg/kg/day+メタミドホス 0.4 mg/kg/day 複合暴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 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群では投与 4 日から 12 日、メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群では投与 4 日から 8 日、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群では投与 4 日に振戦が認められた。自発運動量測定の結果、メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群では投与 4 日の測定において前半（測定開始-20 分）の運動量が有意に減少した。また、測定の後半（40-60 分）における運動量は、投与 4 日から 12 日におけるメタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群及び投与 4 日におけるパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群で有意に増加した。さらに有意差は認められなかったものの、投与 12 日におけるパラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群でも 23%と高い行動活性が認められた。瞳孔径測定の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単剤暴露群では、投与期間を通して媒体対照群とほぼ同様であった。その他の全暴露群では有意な縮瞳が認められ、メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群及びパラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群で重篤だった。各実験群における縮瞳の程度は投与期間を通して変化しなかった。明暗箱検査では、明箱滞在時間において、投与に関連すると思われる

る変化及び有意差は認められなかった。明暗箱間の移動回数では、パラチオン 0.3 mg/kg/day+メタミドホス 0.4 mg/kg/day 複合暴露群で移動回数が有意に増加したが、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露では対照群と同程度であったため、偶発的な変動であると考えられた。体重測定の結果、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群は軽度な増加抑制を示し、投与 14 日では溶媒対照群と比較して有意差が認められた。その他の試験群では、有意な体重変化はみられなかった。血漿の ChE 活性は、パラチオン 1.2 mg/kg/day 及びメタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群において有意差が認められ、溶媒対照群の 80%未満に低下した。パラチオン 0.3 mg/kg/day+メタミドホス 0.4 mg/kg/day 複合暴露群では有意差は認められなかったが、対照群の 79%に低下した。脳の ChE 活性は、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群において溶媒対照群の 80%未満に低下し、有意差も認められた。メタミドホス 0.8 mg/kg/day 及び 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群では有意差は認められたが、その値は対照群の 80%以上だった。脳重量測定の結果、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群とパラチオン 0.3 mg/kg/day+メタミドホス 0.4 mg/kg/day 及びパラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群の相対重量が有意に増加した。肝臓重量は、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群で絶対及び相対値とも有意に増加した。剖検の結果、いずれの試験群でも肉眼的

異常は観察されなかった。

〈実験 3-2〉一般状態の観察の結果、溶媒対照群及びパラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群ともに、死亡あるいは瀕死状態の動物は認められなかった。機能検査として、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群の自発運動量測定の結果、投与 4 日から 12 日にかけて測定後半 (40-60 分) における運動量が有意に増加した。陽性対照群として設定した TMT10 mg/kg 単回暴露群では、投与後 8 日及び 12 日とも 60 分間の測定期間を通して高度な運動量増加が認められた。知覚機能への影響を調べるために熱板式鎮痛効果測定装置を用いて実施したホットプレート検査の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群及び TMT10 mg/kg 単回暴露群ともに溶媒対照群と比較して有意な影響は認められなかった。学習記憶能力への影響を調べるために実施したモーリス水迷路検査の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群では、記憶の獲得能力を測定する Training trial、記憶の保持能力を測定する Probe trial、遊泳能力による検査結果への影響を確認する Cue test のいずれにおいても溶媒対照群と比較して有意な影響は認められなかった。中枢神経系における酸化ストレスへの影響を調べるために実施した海馬のグルタチオン濃度測定の結果、パラチオン 0.6 mg/kg/day+メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群では、溶媒対照群と比較して総グルタチオン濃度が有意に増加していた。酸化グルタチオン濃度は有意差は認められなかったが、陽性対照である TMT 10 mg/kg

単回暴露群と同程度まで増加していた。体重測定の結果、投与期間を通して、パラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群と溶媒対照群の体重に有意な変化は認められなかった。TMT 10 mg/kg 単回暴露群では投与 4 日に有意な減少が、投与 8 日及び 14 日には有意な増加が認められた。

<実験 3-3>いずれの投与群においても被験物質投与の影響と考えられるような体重減少は認められなかった。パラチオン投与群では、2,4-D-butyl の LLNA 試験において、0 mg/kg 投与群では高濃度の 10%濃度にリンパ節重量の有意な増加がみられた。パラチオン 0.4 mg/kg 及び 1.2 mg/kg 投与群ではいずれも 2.5%濃度より用量相関的で顕著なリンパ節重量の増加が認められた。オイゲノールの LLNA 試験において、0 mg/kg 投与群では高濃度の 25%濃度にリンパ節重量の有意な増加がみられた。パラチオン 0.4 mg/kg 及び 1.2 mg/kg 投与群ではいずれも 10%濃度より用量相関的で顕著なリンパ節重量の増加が認められた。メトキシクロル投与群では、2,4-D-butyl の LLNA 試験において、0 mg/kg 投与群では高濃度の 10%濃度にリンパ節重量の有意な増加がみられた。メトキシクロル 100 mg/kg 投与群では 5%濃度より、300 mg/kg 投与群では 2.5%濃度よりいずれも用量相関的で顕著なリンパ節重量の増加が認められた。オイゲノールの LLNA 試験において、0 mg/kg 投与群では 10%濃度よりリンパ節重量の有意な増加がみられた。メトキシクロル 100 mg/kg 及び 300 mg/kg 投与群ではいずれも 5%濃度より用量相関的で顕著なリンパ節重量の増加が認められた。リンパ球細胞増殖活性測定の結果、パラチオン投与のいずれの投与群の LLNA 試験においても、

2,4-D-butyl 及びオイゲノールの経皮暴露に対する近傍リンパの ³H-methyl thymidine 取り込み量には用量相関的な増加が認められた。2,4-D-butyl の LLNA 試験において、SI 値は 0 mg/kg 投与群で 2.5、5 及び 10%濃度の順にそれぞれ 1.7、2.4 及び 3.5、0.4 mg/kg 投与群で 4.6、8.1 及び 16.1、そして 1.2 mg/kg 投与群で 6.3、16.3 及び 22.9 であった。オイゲノールの LLNA 試験において、SI 値は 0 mg/kg 投与群で 5、10 及び 25%濃度の順にそれぞれ 2.0、7.5 及び 29.5、0.4 mg/kg 投与群で 4.7、14.3 及び 56.1、そして 1.2 mg/kg 投与群で 8.8、23.0 及び 45.6 であった。メトキシクロル投与のいずれの投与群の LLNA 試験においても、2,4-D-butyl 及びオイゲノールの経皮暴露に対する近傍リンパの ³H-methyl thymidine 取り込み量には用量相関的な増加が認められた。2,4-D-butyl の LLNA 試験において、SI 値は 0 mg/kg 投与群で 2.5、5 及び 10%濃度の順にそれぞれ 1.9、2.5 及び 4.4、100 mg/kg 投与群で 1.9、5.9 及び 14.0、そして 300 mg/kg 投与群で 4.8、6.5 及び 15.1 であった。オイゲノールの LLNA 試験において、SI 値は 0 mg/kg 投与群で 5、10 及び 25%濃度の順にそれぞれ 6.3、15.8 及び 49.4、100 mg/kg 投与群で 10.8、20.8 及び 41.5、そして 300 mg/kg 投与群で 17.4、50.5 及び 102.3 であった。EC3 濃度測定の結果、パラチオン投与群において、2,4-D-butyl に対する EC3 濃度は対照群と比較して 0.4 及び 1.2 mg/kg 投与群でそれぞれ 18 及び 12%の顕著な低下が観察され、オイゲノールに対する EC3 濃度は対照群と比較して 0.4 及び 1.2 mg/kg 投与群でそれぞれ 50 及び 16%の用量相関性の低下がみられ、いずれの感作物質に対しても感作能の増強が認められた。高濃度の 1.2 mg/kg 投与群の EC3 濃度は

2,4-D-butyl で 0.94、オイゲノールで 0.83 であった。メトキシクロル投与群において、2,4-D-butyl に対する EC3 濃度は対照群と比較して 100 及び 300 mg/kg 投与群でそれぞれ 50 および 21% の用量相関性の低下が観察され、オイゲノールに対する EC3 濃度は対照群と比較して 100 及び 300 mg/kg 投与群でそれぞれ 28 及び 32% の低下がみられ、いずれの感作物質に対しても感作能の増強が認められた。高濃度の 300 mg/kg 投与群の EC3 濃度は 2,4-D-butyl で 1.32、オイゲノールで 0.61 であった。

<実験 4>平成 19 年度の同研究の結果より、本研究で使用する 4 種の食品添加物 (CUR、TBZ、BHT、PG) はいずれも単独では AhR を活性化しないこと、また、AhR リガンドである 3-メチルコランズレン (MC) の共存下、CUR、TBZ、BHT は MC による AhR 活性化を増強することが明らかとなっている。そこで、被験化合物処理時の AhR 活性化の経時変化を測定し、その時間—曲線下面積 (AUC) を算出し、活性化の度合いを評価した。まず、各種濃度の MC を処理したところ、0.01 μM および 0.1 μM では 6 時間、1 μM では 12 時間で AhR 活性化がピークとなり、その後減少に転じた。処理後 48 時間までの AhR 活性化における AUC 値 (RLU \cdot h) は、0.01 μM 、0.1 μM 、1 μM 処理群でそれぞれ対照群の 2.14 倍、5.04 倍、11.20 倍となった。一方、被験化合物の単独処理時の AUC は、対照群と比較して CUR で 1.62 倍、TBZ で 2.55 倍、BHT で 0.88 倍、PG で 1.43 倍となった。次に、MC (0.1 μM) と被験化合物 (10 μM) を組み合わせて処理し、AhR 活性化の経時変化を測定し

た。CUR + MC 処理群では、MC 単独処理群と比較して AhR 活性化のピークに遅延が見られ (6 時間 \rightarrow 24 時間)、AUC 値は 1.62 倍 (対照群の 8.19 倍) となったが、最大値に変化は見られなかった。TBZ + MC 処理群では、MC 単独処理群と比較してピークの遅延 (6 時間 \rightarrow 12 時間)、および最大値の増加が認められた。また、12 時間以降の全ての時間において AhR 活性化の増強が見られ、AUC 値は 2.41 倍 (対照群の 12.16 倍) に増大した。PG + MC 処理群では、6 時間までは MC 単独処理群と同程度の活性化を示した。単独処理群では 12 時間以降で AhR 活性化が経時的に減少したが、PG+MC 処理群ではその減少が軽微であり、AUC 値は MC 単独処理群の 1.57 倍 (対照群の 7.89 倍) となった。BHT + MC 処理群では、AhR 活性化の経時変化パターンは MC 単独処理群とほぼ同一であり、AUC 値は MC 単独処理群の 0.91 倍 (対照群の 4.59 倍) となった。一方、平成 20 年度の同研究において、我々は 4 種の食品添加物 (CUR、TBZ、BHT、PG) はいずれも単独ではヒト PXR を活性化しないこと、また、10 μM のリファンピシン (RIF) 処理時に見られるヒト PXR 活性化に対して CUR、BHT、PG は抑制作用を、また TBZ は増強作用を持つ可能性を明らかとしている。そこで、HepG2-PXR LucA3 に対して、RIF (10 μM) と被験化合物 (10 μM) を組み合わせて処理し、CYP3A4 遺伝子発現量を RT-PCR 法により測定した結果、食品添加物の単独処理では、いずれの被験化合物を処理した場合にも CYP3A4 遺伝子の発現誘導は見られなかった。また、RIF との複合暴露により、CUR + RIF 処理群で 0.82 倍 (対照群の 3.1

倍)、TBZ + RIF 処理群で 1.00 倍 (対照群の 3.7 倍)、PG + RIF 処理群で 0.82 倍 (対照群の 3.1 倍)、BHT + RIF 処理群で 0.73 倍 (対照群の 2.8 倍) となり、TBZ 以外では CYP3A4 発現の減少傾向が認められた。ここまでの検討より、RIF 処理による PXR 活性化および CYP3A4 遺伝子発現誘導に食品添加物が影響を与えることが確認されたことから、HepG2-PXRLucA3 に対して、RIF (10 μ M) と被験化合物 (1-100 μ M) を組み合わせて処理し、CYP3A 酵素活性を p450-Glo assay により測定した結果、各化合物の単独処理群の中では唯一、100 μ M PG 処理群において対照群の 1.67 倍と活性増加が見られた。一方、10 μ M RIF との複合暴露では、PG (100 μ M) + RIF 処理群において 1.67 倍 (対照群の 2.90 倍) と活性増加が見られた。他の化合物については、活性はわずかながら増加させる傾向にあったものの、単独処理、あるいは RIF との複合処理いずれの場合でも、CYP3A 酵素活性に影響を与えなかった。

<実験 5> フェノール性化合物のニトロ化体の標準品が市販されていないことから合成を試みた。得られた化合物を LC/MS および NMR で確認したところ、CFA がニトロ化を受けた化合物

1,2-(4H)-benzoxazin-4-one、2-oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2,5-oxadiazole の生成を確認した。活性酸素種生成を評価する方法として、現在までにさまざまな方法がある。その中でも ESR を用いた方法はラジカルを直接測定できることから、信頼性の高い方法と考えられる。ニトロ化を受けたフェノール性化合物が活性酸素種生成に及ぼ

す影響を調べるために、汎用性の高いスピントラッピング剤である

5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-

oxide (DMPO) を用い、prooxidant 作用を評価した。しかし、DMPO は銅を添加することで、ヒドロキシラジカルの生成が認められたが、DMSO を併用することで、メチルラジカルの生成を確認することができなかった。このことから、DMPO は銅と反応することで、ヒドロキシラジカルに類似したスペクトルを描写するため、活性酸素種生成の評価が困難であることが分かった。そこで、新たな活性酸素種測定方法としてスピントラッピング剤に

α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron を用いた方法を検討した。既存の方法である DMPO と POBN を比較したところ、ヒドロキシラジカル発生量に相関性が認められたことから、DMPO に代わるヒドロキシラジカルの測定法の構築ができた。構築した方法を用い、フェノール性化合物 (CFA、ニトロカフェイン酸、クロロゲン酸およびニトロクロロゲン酸) と金属 (鉄および銅) と反応させたところ、フェノール性化合物と銅との反応において、ヒドロキシラジカルの生成を確認した。また、ニトロ化を受けることでヒドロキシラジカルの生成量が減少する結果が得られた。他方、antioxidant 作用については、全てのフェノール性化合物について、スーパーオキシドラジカルの消去を確認し、特にニトロ化を受けた化合物においては、ヒドロキシラジカルの消去も確認された。これらの結果より、フェノール性化合物はニトロ化を受けることで antioxidant 作用が増強し、活性酸素種生成量を減少させることが示唆された。前項で

示唆された活性酸素種生成について生体内でも同様の結果が得られるか評価するために、DNA酸化の指標である8-OHdGの測定を試みた。その結果、ESRで得られた結果と同様に、フェノール性化合物と銅を併用することで、8-OHdG量の増加が認められ、ニトロ化を受けることで減少することが分かった。

D. 考察

gpt delta ラットを用いてIQとCYP1A2誘導剤の併用投与による変異原性への複合影響を検索した結果、併用投与により、IQの変異原性の減弱が認められた。*Cyp1a2*の発現量を測定した結果、併用投与群において*Cyp1a2*の発現誘導が認められたため、IQが代謝活性化される経路の他に、併用投与によって影響を受けている経路があると考えられ、IQの排泄に関与する酵素の影響が疑われた。そこで、 β -NFおよびTBZにより誘導されると報告のある第II相酵素UGTおよびGSTの酵素活性を測定した結果、併用投与群においてUGT酵素活性の有意な上昇が認められた。このことから、CYP1A2誘導剤の併用投与により、*Cyp1a2*だけでなく第II相酵素の誘導も同時に引き起こされ、IQの抱合排泄が促進されたと考えられた。CYP1A2誘導剤 β -NFおよびTBZをマウスに投与したところ、 β -NFおよびTBZで用量相関的な*Cyp1a2* mRNA誘導が認められた。さらに、それぞれ*Cyp1a2*を誘導しない用量での併用投与を行った結果、相加的誘導が認められた。このことから、単体では*Cyp1a2*を誘導しない用量であっても、複数の化学物質を摂取することにより、*Cyp1a2*誘導が起り得ることが示唆さ

れ、既報のラットを用いた実験と同様の結果が得られた。また、食品中への残留が懸念される非遺伝毒性肝発がん物質FLUとMelQxの併用投与実験より、四塩化炭素とMelQxの併用投与実験の結果と同様に、肝障害がMelQxの遺伝毒性を増強することが示唆された。スペクトラム解析の結果からも、併用投与群はMelQx単独投与群の変異とほぼ同じスペクトラムを示し、それぞれの変異頻度が増強された値を示した。非炎症性肝発がんプロモーター物質PBとの併用投与群では変異頻度の上昇が認められなかった。FLU併用投与によるMelQxの*in vivo*変異原性増強効果には、FLUが肝炎誘発物質であることを考慮に入れると、炎症性サイトカイン等の関与の可能性が示唆された。

前年度に引き続き、2種類の化学物質を複合投与した際のマウス肝臓におけるストレス・毒性、薬物代謝酵素の発現についてマイクロアレイを用いて解析した。I3Cはアブラナ科の植物に含有しており、アポトーシス誘導作用や、抗腫瘍活性(乳がん、前立腺がん、肝がん、膵臓がん)、免疫賦活活性などが報告されている。一方、Hesはポリフェノールの一種で柑橘類の皮などに含有しており、主に血管系に関する生理作用が報告されている。この両者の複合投与により、単独投与時に比べて変動遺伝子数は著しく、変動した遺伝子に関しては、細胞の増殖、分化、アポトーシス、ストレス応答に係わるMapk8、成長ホルモンの分泌や摂食に係わるGhrlの発現上昇や、細胞の分化、増殖、アポトーシス、DNA損傷修復の制御に係わる癌原遺伝子Bcl6や、Akt(インスリン作用)活性阻害因子であるTrib3、

レチノイン酸分解酵素である Cyp26b1、骨成長の促進、細胞増殖・分化促進、タンパク質同化に係わる Igfbp1 などの発現低下が観察された。複合投与によるこれらの遺伝子変動が、生体にどのような効果を及ぼすかさらなる検討が必要であるが、単独投与と比較して異なる効果が得られることが考えられた。Q はケッパー(1,800 mg/kg)、タマネギ(350 mg/kg)、ブロッコリー、ブドウなど野菜や果物に多く含有しており、抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用などが報告されている。一方、catechin は緑茶の渋み成分として含有量は EGCg>EGC>ECg>EC の順で、実験においてはこれら 4 種の混合物を用いた。

Catechin においては抗酸化作用、抗癌作用、血中コレステロール低下作用、抗菌作用、抗アレルギー作用が報告されている。これら両者の複合および単独投与による変動遺伝子数には変化が見られなかった。抗酸化活性の強い catechin (EGCG) は、ある種の抗がん剤と複合投与するとその効力を阻害する可能性があるとの報告がある (Blood. 113:5927-5937, 2009)。さらに quercetin に関しても同様の報告がされている (Blood 112: 3835-3846, 2008)。本実験においては、両者の複合投与による変動遺伝子数に及ぼす影響は見られなかったが、単独で強い生理活性を示す catechin や quercetin などのフラボノイドにおける複合での使用は様々な面を考慮しなければならないことが示唆された。

農薬の複合毒性 (相加・相乗毒性) に関する情報の必要性について、従来から社会的に認識されている。そして近年、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。特に、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ことが知られている。農薬の複合毒性に関する情報のさらなる蓄積が求められているものの、その実験及び評価が困難であること、また未解決な問題点が多いことなどの理由から、情報の収集・蓄積が不足している。そこで昨年度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 8 週齢の成熟ラットに 2 週間反復経口投与し、複合暴露影響を評価した。本研究では、昨年度と同一条件で 3 週齢のラットに 2 週間反復経口投与し、成獣で影響が強く認められた神経毒性関連項目を主な指標として、ヒトの成長期にあたる若齢ラットに対する複合暴露影響を評価した。その結果、パラチオン高用量群で体重抑制及び肝臓重量減少といった全身状態の低下が示唆された。パラチオン、メタミドホス、複合暴露とも高用量で中枢 ChE 活性阻害作用が認められたが、複合暴露による増強はなく、毒性は相加的であると判断された。脳重量測定における相対重量の有意な増加は、体重の変動によるものであり、神経系への作用とは無関係であると考えられた。今回の若齢ラットにおける成績と平成 20 年度及び本年度に実施した成獣ラットにおける成績を比較すると、単剤、複合暴露ともに発現する症状は若齢と成獣でほぼ同一であり毒性の質的差はないと考えられた。しかしながら、神経症状の発現は若齢の方が軽度であり、パラチオンの 1.2 mg/kg/day 単剤暴露では成獣において 8 例中 3 例の死亡が生じたが若齢の死亡は認められなかった。血漿

及び脳におけるChE活性の阻害も若齢の方が軽度であった。投与期間を通じた瞳孔径の推移から、成獣の単剤及び低用量の複合暴露群で認められた耐性が若齢においては生じ難いと思われた。60分間の自発運動量減少の割合からは、成獣と同様に若齢でも単剤の高用量暴露群及び複合暴露群における落ち着き難さが認められた。

成獣及び若齢動物における単剤の高用量暴露群及び複合暴露群で、自発運動量の測定後半になっても高い行動活性が残存していた。この落ち着き難さの原因として、有機リン剤の各種エステラーゼ抑制作用あるいは急性ストレスによる注意力あるいは作業空間記憶に対する影響が考えられた。よって、これらの影響を精査するために、成獣の高用量複合暴露群についてモーリス水迷路を用いて空間認知と学習記憶機能を検査すると共に、海馬の組織を採取してグルタチオン濃度測定を実施し中枢の酸化ストレス活性を調べた。また、知覚神経機能に対する影響を確認するために温熱板検査を実施した。モーリス水迷路検査による学習記憶検査では、陽性対照として設けたTMT10 mg/kg単回暴露群では、Training testの初期における記憶獲得の遅れ、Probe trialにおける標的領域滞在時間の有意な低下が認められ、学習記憶能力への影響が検出された。さらにCue testの逃避潜時も延長していたことから、学習記憶能力及び運動能力双方への障害の検出が可能であることが確認された。一方、複合暴露群ではTraining trial、Probe trial、Cue testのいずれにおいても溶媒対照群と比較して有意な差は認められず、記憶獲得、記憶保持、遊泳の各能力への影響はないと判定された。海馬のグルタチオ

ン濃度測定による中枢神経の酸化ストレス検査では、複合暴露群の総グルタチオン濃度及び酸化グルタチオン濃度が増加していた。総グルタチオン濃度に占める酸化型の割合は対照群と同程度であったことから、酸化ストレスに対する生体防御反応としてグルタチオンの生成が亢進したと考えられた。有機リン剤は、エステラーゼの一種である脂肪酸アミノ脱水素酵素 (FAAH) の活性阻害作用を示すことが知られている。FAAHは脳内マリファナ類似物質である内在性カンナビノイドの制御に係る。カンナビノイド系の失調は、認知機能障害を引き起こすことが知られており、また、FAAH欠損マウスにおける内在性カンナビノイドは15倍高く、痛覚閾値も高いことが報告されている。今回の熱板式鎮痛効果測定装置を用いて実施したホットプレート検査では、知覚機能への影響は認められなかったことから、複合暴露群がFAAHの阻害を介したカンナビノイド系の失調を引き起こした可能性は低いと考えられた。以上の追加検査の成績から、中枢神経における酸化ストレスは明らかに増加していたが、学習能力及び知覚神経機能の障害が成獣及び若齢動物における単剤の高用量暴露群及び複合暴露群の落ち着き難さの原因である可能性は低いことが示唆された。

本研究では、有機リン剤のパラチオン及び有機塩素剤のメトキシクロルを4週齢時の雌性マウスに5日間反復経口投与し、4週間休薬した後、フェノキシ酢酸系除草剤の2,4-ジクロロフェノキシ酢酸ブチル (2,4-D-butyl) 及び殺菌剤のオイゲノールに対するアレルギー性反応の変化をLocal Lymph Node Assay (LLNA法) を用いて評価した。