

有機リン剤及び有機塩素剤の免疫系への影響については、反復経口投与による特異的抗体価の抑制作用、本研究で用いたパラチオン及びメトキシクロルの胸腺細胞アポトーシス誘発作用が報告されており、免疫抑制作用を主体とした免疫毒性が共通して考えられている。一方、2,4-D-butyl 及びオイゲノールは皮膚感作性が認められ、2,4-D-butyl については気道過敏症発現の可能性も報告されている。以上のように異なった免疫毒性作用を示す農薬を複合投与することにより、特定の免疫毒性作用のみを増強させる報告はあまりない。著者らは、パラチオン及びメトキシクロルの胸腺細胞アポトーシス誘発作用に着目し、幼若時の免疫攪乱作用がその後の発達段階における異常免疫担当細胞出現を誘起する可能性を仮説とした。本研究では、異常免疫担当細胞が引き起こす影響を検出する手法として、アレルギー反応増強作用誘発を指標とした検査を実施した。本研究では、胸腺細胞アポトーシス誘発作用を有するパラチオンを幼若期に投与し、その後2,4-D-butyl 及びオイゲノールの LLNA 法を実施した結果、リンパ球細胞増殖活性 (^3H -methyl thymidine 取り込み量) が投与群で顕著に増加し、パラチオン高用量投与群での EC3 濃度は 2,4-D-butyl で 8 倍、オイゲノールで 6 倍の低濃度となり、2,4-D-butyl 及びオイゲノールのアレルギー反応に対する増強効果が認められた。メトキシクロルについても同様の手法を用いて検査を実施した結果、2,4-D-butyl 及びオイゲノールのアレルギー反応に対する増強効果が認められた。上記結果より、アポトーシス誘発作用を有するパラチオン及びメトキシクロルの幼若期投与により免疫攪乱が起こり、その後の免疫系に何らかの影響を及ぼす異常免疫担当細胞が出現す

る可能性が示唆された。本研究におけるアレルギー性増強作用と同様の事例として、農薬を暴露することにより誘発される自己免疫疾患の発症が報告されている。Sobel 等は自己免疫疾患モデル動物の (NZB×NZW) F1 マウスを用いた実験で、メトキシクロル、*o,p'*-DDT 及びクロルデコンの慢性投与が膜性糸球体腎炎誘発及び自己 DNA に反応する抗体の産生を引き起こすことを報告しており、農薬投与による免疫攪乱が、自己免疫疾患を引き起こす異常免疫担当細胞を出現させる可能性を示唆している。

Sobel 等の報告は、本研究における仮説及び結果を裏付ける材料の一つであると考えられた。

平成 19 および 20 年度の結果を踏まえ、本研究では 4 種の食品添加物による CYP1 および CYP3A サブファミリー酵素誘導性を 2 種のレポーター細胞株を用いて詳細に検討した。まず、HepG2-A10 細胞を用いて、CYP1A 酵素誘導の指標となる AhR 活性化の経時変化を解析し、その AUC を算出することにより、その機構解析を目指した。MC の濃度依存的にピーク時間が後方へとシフトし、また AUC が増加することから、これら現象は細胞内の MC 濃度が増加することによる可能性が示唆された。TBZ 存在下では、0.1 μM MC による AhR 活性化が著しく増強されたが、この TBZ+MC 群でみられた AhR 活性化の経時変化は 1 μM MC 処理群のそれと酷似しており、TBZ の存在下では細胞内 MC 濃度が増加している可能性が示唆された。一方、CUR 存在下では、AUC の増加は観察されたにも関わらず AhR 活性化の最大値に変化は見られなかった。これまでの報告では、CUR は TCDD による AhR 活性化に対して抑制作用を示すことが報告されている。本研究でも、反応早期 (6 時

間以前)において、MCによるAhR活性化はCUR存在下で低値を示すことから、これまでの報告と同様、CURはAhR活性化に対して抑制的に働いていることが示唆された。一方、反応後期(12時間以降)においてCURは、AhR活性化のネガティブフィードバックに対して拮抗的に働き、結果的にAhR活性化を増強しているものと考えられた。PG存在下においても、AUCの増加が観察されるが、反応早期(6時間以前)には、AhR活性化パターンはMC単独処理群とMC+PG処理群間ではほとんど同一であることから、PGはAhR活性化の初期過程には影響しないことが示唆される。一方、反応後期(12時間以降)では、PGはAhR活性化を長時間維持させる。これらの結果より、PGはAhRの活性化を総合的に増強することが示唆された。次に

HepG2-PXRLucA3を用いて、CYP3A酵素誘導に対する食品添加物の影響について検討した。昨年度のPXR活性化の結果と同様に、CUR、PGおよびBHTはRIFによるCYP3A4遺伝子発現を抑制していることが示唆された。したがって、これら化合物はヒトPXRの活性化に対して拮抗的に働き、CYP3A酵素誘導を抑制していることが示唆された。一方、TBZはRIFによるPXR活性化を増強するにも関わらず、CYP3A4遺伝子の発現にはほとんど影響を与えなかった。昨年度の本細胞を用いた検討では、低レベルのPXR活性化を惹起する化合物では、CYP3A4遺伝子誘導がほとんど見られないケースも見られており、TBZもこれら化合物と同様、PXR活性化を優先的に引き起こしている可能性が考えられた。また、p450-Gloを用いたCYP3A酵素活性の測定

結果からは、PGは高濃度域において酵素活性を増加させるものと思われた。一方、他の化合物にはCYP3A酵素の活性に対する直接的な作用はないことが示された。

クロロゲン酸およびCFA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す結果が得られた。フェノール性化合物のニトロ化は構造によってベンゼン環が直接ニトロ化を受ける場合と、側鎖に受ける場合がある。ベンゼン環がニトロ化を受ける場合、電子密度が大きく変化すると考えられ、ヒドロキシラジカルに代表される反応性が高い分子種はベンゼン環に結合するものと考えられる。他方、CFAのニトロ化のように側鎖に起こった場合、不安定な構造になることが考えられ、活性酸素種生成には寄与しないが、活性窒素種の生成を引き起こす可能性がある。活性窒素種は活性酸素種と反応することでペルオキシナイトライドなど反応性の高い分子種に変化することが知られていることから、活性窒素種生成についても調査する必要があると考えられる。

E. 結論

gpt delta ラットを用いて、IQとCYP1A2誘導剤(β-NFとTBZ)を併用投与するとIQの変異原性は減弱した。この結果は、併用投与群でUGT酵素活性の有意な上昇が認められたことから、IQの抱合排泄が促進されたためと考えられた。ラットと同様に、マウスにおいてもCYP1A2誘導剤β-NFおよびTBZを、誘導が起こらない用量で併用投与すると*Cyp1A2* mRNA発現の相加的誘導が認められた。また、MeIQxと肝臓障害を起こすFLUの併用投与実験では、炎症性

反応に惹起されたと考えられる MeIQx の変異原性の増強が認められた。

二つの実験の複合投与による血液生化学的、病理学的変化は認められなかった。I3C と Hes の実験に関しては、I3C に比べ Hes 投与によるマウス肝ストレス・毒性、薬物代謝、アポトーシスに係る遺伝子発現の変動は顕著でなく、両物質の生理活性の相違によるものと推察された。しかし、複合投与することによってそれらの遺伝子変動が増加したことから、両物質の複合投与の発がん（抑制）を含む健康への影響が示唆された。Q と C mix の実験に関しては、マウス肝ストレス・毒性、薬物代謝、アポトーシスに係る遺伝子発現の変動は、単独投与群と複合投与群間に差はなく、単独で強い抗酸化作用や生理作用を有する両物質においては、複合投与における影響は乏しいと推察された。

3 週齢の雌性ラットに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組み合わせ、2 週間反復経口投与し、神経毒性関連項目を指標に複合暴露影響を調査した。その結果、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。若齢と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、神経症状の発現及び ChE 活性の阻害は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は若齢において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、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。さらに、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認められた落ち着き難さの原因を精査するために、成獣の高用量複合暴露群について追加検査を実施した。その結果、中枢における酸化ストレスが増加していたが、学習能力及び知覚神経機能に障害が無いことを確認した。

殺虫剤の有機塩素剤（メトキシクロル）及び有機リン剤（パラチオン）と、殺菌剤のオイゲノール及びフェノキシ酢酸系除草剤の 2,4-D-butyl の複合暴露影響を明らかにするため、メトキシクロルないし有機リン剤のパラチオンを 4 週齢時の雌性 CBA/JN マウスに 5 日間反復経口投与し、4 週間休薬した後、オイゲノール及び 2,4-D-butyl に対するアレルギー性反応の変化を LLNA 法を用いて評価した。その結果、メトキシクロル及びパラチオンの若週齢における反復投与は、オイゲノール及び 2,4-D-butyl のアレルギー性反応に対して増強効果を示すことが示唆された。

本研究ではヒト AhR あるいは PXR 活性化を測定可能なレポーター細胞株を用いて、食品中の化学物質（4 種の食品添加物）が CYP1A および CYP3A 酵素誘導に及ぼす影響を評価した。その結果、各食品添加物には CYP1A および 3A 酵素の発現誘導に影響を及ぼす性質があることが示唆された。また、その機構は一様でなく、化合物毎に異なる可能性が示唆され、化学物質の複合影響を考える場合には各化合物の特徴を踏まえた詳細な解析が必要と考えられた。

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および CFA 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。まず、ニトロ化合物が胃酸条件下で進行し、ニトロクロロゲン酸およびニトロカフェイン酸の生成を確認した。次に、フェノール性化合物と金属の反応を評価するために ESR を用いた新たな評価法の開発を行った。最後に ESR で得られた結果との相同性を確認するために DNA 酸化指標である 8-OHdG の測定を試みた。これらの結果から、フェノール性化合物と NaNO₂ を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化が引き起こされ、ニトロ化を受けた化合物は Antioxidant 作用が増強することが示唆された。また、Prooxidant 作用についてもニトロ化を受けることで減少した。これらの結果を踏まえ、DNA への酸化を評価したところ、ESR と同様の結果が得られた。本研究の結果から、生体内でニトロ化を受けた新たに生成される化合物について ROS 生成量は減少することが示唆されたが、生体への影響を考える上で、他の毒性評価も行うことが必要と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Int. J. Cancer*, 124, 264-271, 2009.
- 2) Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T. Allergic reaction induced by dermal and/or

respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. *Toxicology*, 261, 152-161, 2009.

- 3) Tasaki M, Umemura T, Kijima A, Inoue T, Okamura T, Kuroiwa Y, Ishii Y, Nishikawa A. Simultaneous induction of non-neoplastic and neoplastic lesions with highly proliferative hepatocytes following dietary exposure of rats to tocotrienol for 2 years. *Arch. Toxicol.*, 83, 1021-1030, 2009.

- 4) Ishii Y, Okamura T, Inoue T, Tasaki M, Umemura T, Nishikawa A. Dietary catechol causes increased oxidative DNA damage in the livers of mice treated with acetaminophen. *Toxicology*, 263, 93-99, 2009.

- 5) Takahashi M, Shibutani M, Nakahigashi J, Sakaguchi N, Inoue K, Morikawa T, Yoshida M, Nishikawa A. Limited lactational transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods. *Arch. Toxicol.*, 83, 785-793, 2009.

- 6) Imai T, Hasumura M, Cho Y-M, Ota Y, Takami S, Hirose M, Nishikawa A. Inhibitory effects of aminoguanidine on thyroid follicular carcinoma development in inflamed capsular regions of rats treated with sulfadimethoxine after *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiation. *Cancer Sci.*, 100, 1794-1800, 2009.

- 7) Tanaka, T., Yasui, Y., Tanaka, M., Tanaka, T., Oyama, T. and Rahman, K.M.W. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel

oncogenesis in rats. Chem.-Biol. Interact., 177, 128-136, 2009.

8) Shimizu, M., Shirakami, Y., Iwasa, J., Shiraki, M., Yasuda, Y., Hata, K., Hirose, Y., Tsurumi, H., Tanaka, T. and Moriwaki, H. Supplementation with branched-chain amino acids inhibits azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-*db/db* mice. Clin. Cancer Res., 15, 3068-3075, 2009.

9) Yasuda, M., Nishizawa, T., Ohigashi, H., Tanaka, T., Hou, D.-X., Colburn, N.H. and Murakami, A. Linoleic acid metabolite suppresses skin inflammation and tumor promotion in mice: Possible roles of programmed cell death 4 induction. Carcinogenesis, 30, 1209-1216, 2009.

10) Yoshimi, K., Tanaka, T., Atakizawa, A., Kato, M., Hirabayashi, M., Mashimo, T., Serikawa, T. and Kuramoto, K. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel *Apc*-mutant rat. Cancer Sci., 100, 2022-2027, 2009.

11) Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T. Apoptosis in immunocytes induced by several types of pesticides. J Immunotoxicol. 7, 39-56, 2010.

2. 学会発表

1) 梅村隆志, 石井雄二, 井上知紀, 金美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 児玉幸夫, 能美健彦, 西川秋佳: フルメキン同時投与による MelQx の *in vivo* 変異原性に及ぼす促進効果.

第 68 回日本癌学会 2009 年 10 月 1 日

2) 鈴木裕太, 岡村俊也, 日比大介, 石井雄二, 金美蘭, 梅村隆志, 能美健彦, 西川秋佳: 食品中 CYP1A2 誘導剤による IQ の *in vivo* 変異原性への複合影響. 第 68 回日本癌学会 2009 年 10 月 1 日

3) 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及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)

4) 首藤 康文、齋島 淳子、藤江 秀彰、小松 豊、小嶋 五百合、富田 真理子、小坂 忠司、青山 博昭、原田 孝則: 有機リン化合物の複合毒性: 若齢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 149 回日本獣医学会学術集会 (東京、2010)

5) 藤江 秀彰、小松 豊、齋島 淳子、富田 真理子、小嶋 五百合、首藤 康文、青山 博昭、原田 孝則: 有機リン剤の複合暴露におけるコリンエステラーゼ活性と瞳孔径の測定. 日本実験動物技術者協会関東支部総会第 35 回懇話会 (浦和、2010)

6) 福山朋季, 田島由香里, 林宏一, 上田英夫, 首藤康文, 原田孝則, 小坂忠司: 化学物質による気道過敏症検出法の検討 第 16 回日本免疫毒性学会学術大会, 2009 年

7) 福山朋季, 田島由香里, 上田英夫, 林宏一, 首藤康文, 小坂忠司, 原田孝則: 各首農薬の呼吸器アレルギー反応検出検討 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会,

2009年

8) 関本征史、佐野慎亮、根本清光、西川秋佳、出川雅邦：食品添加物のヒト PXR 活性化能：ヒト PXR 活性化物質検索用レポーター細胞株 HepG2-PXRLucA3 を用いた解析。
第 36 回日本トキシコロジー学会（盛岡）、
2009年7月6-7日

9) 岩崎 雄介、斉藤 勇介、石井 雄二、伊藤 里恵、斉藤 貢一、西川 秋佳、中澤 裕之。クロロゲン酸と亜硝酸ナトリウム併用投与による活性酸素種生成に関する研究。
第 58 回 分析化学会年会（2009年9月・北海道）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

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）
分担研究報告書

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

分担研究課題： 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 病理部長
研究協力者： 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長
研究協力者： 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部研究員

研究要旨

食品中に含まれ、ヒトに対して発がん性が疑われているヘテロサイクリックアミン 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) は、薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 1A2 によって代謝活性化し、DNA と付加体を形成することで遺伝毒性を示すことが知られている。前年度、CYP1A2 誘導剤として知られる食品中物質β-ナフトフラボン (β-NF) ならびにチアベンダゾール (TBZ) をラットに投与すると *Cyp1a2* mRNA 発現量に相加効果が認められることを報告している。そこで今回、同条件下で、*gpt delta* ラットを用いた IQ の併用投与実験を行った。その結果、IQ 投与群と比較して、IQ + CYP1A2 誘導剤併用投与群において *gpt* 変異頻度の有意な減少が認められた。第Ⅱ相酵素活性を測定した結果、併用投与群において UGT 活性の上昇が認められた。今回用いた CYP1A2 誘導剤は IQ の抱合排泄に関わる酵素活性も同時に誘導し、結果として併用投与群における IQ の *in vivo* 変異原性を減弱させたと考えられた。また、マウス発がん剤への複合影響を検討する実験条件を確立する目的で、二剤を用いたマウスにおける *Cyp1a2* mRNA 発現量の複合影響について同様の検討を実施した。その結果、β-NF 300 ppm、TBZ 75 ppm で *Cyp1a2* が誘導されなくなることで、二剤の併用投与によりラットと同様に、*Cyp1a2* 発現量の相加的な上昇が認められることが明らかとなった。食品中への残留が懸念される非遺伝毒性肝発がん物質の動物用医薬品フルメキン (FLU) と 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) との併用投与による *gpt* 変異頻度への影響を検討した。その結果、FLU 併用投与により MeIQx の *gpt* 変異頻度の上昇が認められた。また、*gpt* 変異コロニーを用いたスペクトラム解析により、FLU の併用投与は MeIQx の変異スペクトラムには影響せず、それぞれの変異頻度を増加させたことが明らかとなった。同時に実施した非炎症性肝発がんプロモーター物質フェノバルビタール (PB) と MeIQx 併用投与群では、*gpt* 変異頻度に変化が認められなかった。従って、FLU が肝炎誘発物質であることを考慮に入れると、FLU 併用投与による MeIQx の *in vivo* 変異原性増強効果には炎症性サイトカイン等の関与の可能性が示唆された。

A. 研究目的

焼いた肉や魚の焦げに含まれるヘテロサ

イクリックアミンの一つである 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) は、げっ歯類およびサルで発がん性が報告されており、ヒトに対する発がん性も疑われる変異原性発がん物質である。IQ は肝臓で薬物代謝酵素 CYP1A2 によって代謝活性化され、最終的に DNA と付加体を形成することにより遺伝毒性を示すと考えられている。一方、CYP1A2 は食品に含まれる様々な化学物質によって発現誘導されるため、それらの複合影響が懸念されている。前年度、食品に含まれる可能性のある CYP1A2 を誘導する化学物質β-ナフトフラボン

(β-NF ; 合成フラボノイド) およびチアベンダゾール (TBZ ; 防かび剤) の単独投与では CYP1A2 を誘導しない用量の同時投与が相加効果により、CYP1A2 の誘導を惹起することを報告した。今回、同様の実験条件下での IQ の *in vivo* 変異原性への影響を *gpt delta* ラットを用いて検討した。さらに、マウスでの発がん性が報告されている食品中発がん物質の複合影響を検討する実験条件を確立する目的で、マウスにおける二剤の併用投与実験を同様に行い、*Cyp1a2* の発現量の変化を検証した。

また、四塩化炭素誘発肝障害モデルにヘテロサイクリックアミンの一つである 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) を併用投与すると、*in vivo* 変異原性が増強することを前年度に報告した。そこで今回、食品中への残留が懸念される動物用医薬品のフルメキン (FLU) が肝障害を誘発することに着目し、MeIQx と FLU の併用投与による *gpt* 変異頻度解析ならびに変異スペクトラム解析を実施した。また、対照物質として非炎症性肝発がんブ

ロモーター物質のフェノバルビタール (PB) を選択し、同様の検討を行った。

B. 研究方法

<実験 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-NF 200 ppm + 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 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 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MelQx 0.03%、FLU 0.4%、PB 0.05%の濃度で、併用投与群として、MelQx0.03%とFLU 0.4%投与群およびMelQx0.03%とPB 0.05%の濃度で13週間投与した。MelQx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。

(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。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〉 *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 (Fig. 1)。*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 (Table 1)。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 (Fig. 2)。

〈実験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 (Fig. 3)。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 (Fig. 4)。

〈実験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 (Fig. 5)。

〈実験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、

(Table 2)。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 (Table 3)。

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* 誘導が起こ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。

E. 結論

gpt delta ラットを用いて、IQ と CYP1A2 誘導剤 (β -NF と TBZ) を併用投与すると IQ の変異原性は減弱した。この結果は、併用投与群で UGT 酵素活性の有意な上昇が認められたことから、IQ の抱合排泄が促進されたためと考えられた。

ラットと同様に、マウスにおいても CYP1A2 誘導剤 β -NF および TBZ を、誘導が起こらない用量で併用投与すると *Cyp1A2* mRNA 発現の相加的誘導が認められた。

また、MelQx と肝臓障害を起こす FLU の併用投与実験では、炎症性反応に惹起されたと考えられる MelQx の変異原性の増強が

認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tasaki M, Umemura T, Kijima A, Inoue T, Okamura T, Kuroiwa Y, Ishii Y, Nishikawa A. Simultaneous induction of non-neoplastic and neoplastic lesions with highly proliferative hepatocytes following dietary exposure of rats to tocotrienol for 2 years. Arch. Toxicol., 83, 1021-1030, 2009.

2) Ishii Y, Okamura T, Inoue T, Tasaki M, Umemura T, Nishikawa A. Dietary catechol causes increased oxidative DNA damage in the livers of mice treated with acetaminophen. Toxicology, 263, 93-99, 2009.

3) Takahashi M, Shibutani M, Nakahigashi J, Sakaguchi N, Inoue K, Morikawa T, Yoshida M, Nishikawa A. Limited lactational transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods. Arch. Toxicol., 83, 785-793, 2009.

4) Imai T, Hasumura M, Cho Y-M, Ota Y, Takami S, Hirose M, Nishikawa A. Inhibitory effects of aminoguanidine on thyroid follicular carcinoma development in inflamed capsular regions of rats treated with sulfadimethoxine after *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiation. Cancer Sci., 100, 1794-1800, 2009.

2. 学会発表

1) 梅村隆志, 石井雄二, 井上知紀, 金美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 児玉幸夫, 能美健彦,

西川秋佳:フルメキン同時投与による MeIQx の *in vivo* 変異原性に及ぼす促進効果. 第 68 回日本癌学会 2009 年 10 月 1 日

2) 鈴木裕太, 岡村俊也, 日比大介, 石井雄二, 金美蘭, 梅村隆志, 能美健彦, 西川秋佳: 食品中 CYP1A2 誘導剤による IQ の *in vivo* 変異原性への複合影響. 第 68 回日本癌学会 2009 年 10 月 1 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし。

Table 1 *gpt* mutant frequencies (MFs) in the livers of rats treated with IQ and CYP1A2 inducers

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Basal diet (0 ppm)	1011	4.10	7	1.71	1.66 ± 1.20
	1012	3.42	1	0.29	
	1013	1.31	1	0.77	
	1014	0.90	3	3.33	
	1015	2.30	5	2.18	
IQ 20 ppm	2011	1.67	7	4.20	2.60 ± 1.58
	2012	1.31	2	1.53	
	2013	1.85	3	1.63	
	2014	1.13	5	4.44	
	2015	3.29	4	1.22	
IQ 200 ppm	3011	1.49	16	10.77	15.8 ± 3.66*
	3012	1.08	16	14.81	
	3013	1.85	38	20.60	
	3014	1.13	20	17.78	
	3015	1.40	21	15.05	
IQ 20 ppm +TBZ 100 ppm +β-NF 200 ppm	4011	2.39	2	0.84	1.19 ± 0.65
	4012	1.26	2	1.59	
	4013	3.11	3	0.97	
	4014	2.16	1	0.46	
	4015	2.39	5	2.10	
IQ 200 ppm +TBZ 100 ppm +β-NF 200 ppm	5011	1.62	5	3.09	5.39 ± 3.99^s
	5012	2.07	4	1.93	
	5013	2.66	13	4.90	
	5014	1.89	23	12.17	
	5015	2.48	12	4.85	

*; ^s; p < 0.01 vs. Basal diet (0 ppm), IQ 200 ppm

Table 2 *gpt* mutant frequencies (MFs) in the livers of mice treated with MeIQx, Flumequine (FLU) or Phenobarbital (PB)

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁵)	Mean ± SD
Basal diet	1	6.12	2	0.32	1.02 ± 0.68
	2	2.84	2	0.71	
	3	2.57	3	1.17	
	4	0.32	0	— ^a	
	5	1.58	3	1.90	
MeIQx	6	0.27	1	3.70	5.16 ± 1.46
	7	2.34	10	4.27	
	8	3.47	16	4.61	
	9	1.71	10	5.85	
	10	0.95	7	7.37	
FLU	11	1.35	2	1.48	1.29 ± 0.35
	12	2.93	3	1.03	
	13	2.07	2	0.97	
	14	0.59	1	1.69	
	15	N.D.	N.D.	N.D.	
PB	16	0.41	2	4.88	2.35 ± 1.76
	17	0.99	2	2.02	
	18	1.17	1	0.85	
	19	1.22	2	1.65	
	20	N.D.	N.D.	N.D.	
MeIQx + FLU	21	0.14	16	114.29	50.41 ± 43.31^{*, §}
	22	0.14	3	21.43	
	23	0.05	2	37.73	
	24	0.27	7	25.93	
	25	N.D.	N.D.	N.D.	
MeIQx + PB	26	3.33	5	1.50	2.48 ± 1.73
	27	1.44	7	4.86	
	28	1.98	1	0.51	
	29	2.03	4	1.97	
	30	1.40	5	3.57	

^a: The data was excluded for the calculation of the MF because of no detection of *gpt* mutant colony on the plate.
^{*, §}: p<0.05 vs. Basal diet, FLU.
N.D.: no detectable because of accidental error.

Table 3 Mutation spectra of *gpt* mutant colonies

	Basal diet	MeIQx	FLU	PB	MeIQx+FLU	MeIQx+PB
Base substitution						
Transversions						
GC-TA	4 (0.44)	29 (3.71)	2 (0.24)	0	21 (37.96 *)	11 (1.23)
GC-CG	0	2 (0.20)	1 (0.19)	1 (0.21)	0	0
AT-TA	1 (0.09)	1 (0.06)	1 (0.09)	0	0	0
AT-CG	0	0	0	0	0	0
Transitions						
GC-AT	2 (0.20)	4 (0.38)	2 (0.61)	3 (1.49)	1 (1.85)	6 (0.56)
AT-GC	1 (0.04)	0	0	0	0	0
Deletion						
Single bp	1 (0.16)	4 (0.26)	0	2 (0.42)	6 (13.89)	4 (0.56)
over 2bp	0	0	0	0	0	0
Insertion	1 (0.10)	1 (0.12)	0	1 (0.25)	0	0
Complex	0	0	0	0	0	0
Total	10	41	6	7	28	21

The number of colonies with independent mutations is shown. *: $p < 0.01$ vs. Basal diet.
 () : specific mutant frequency ($\times 10^{-5}$).

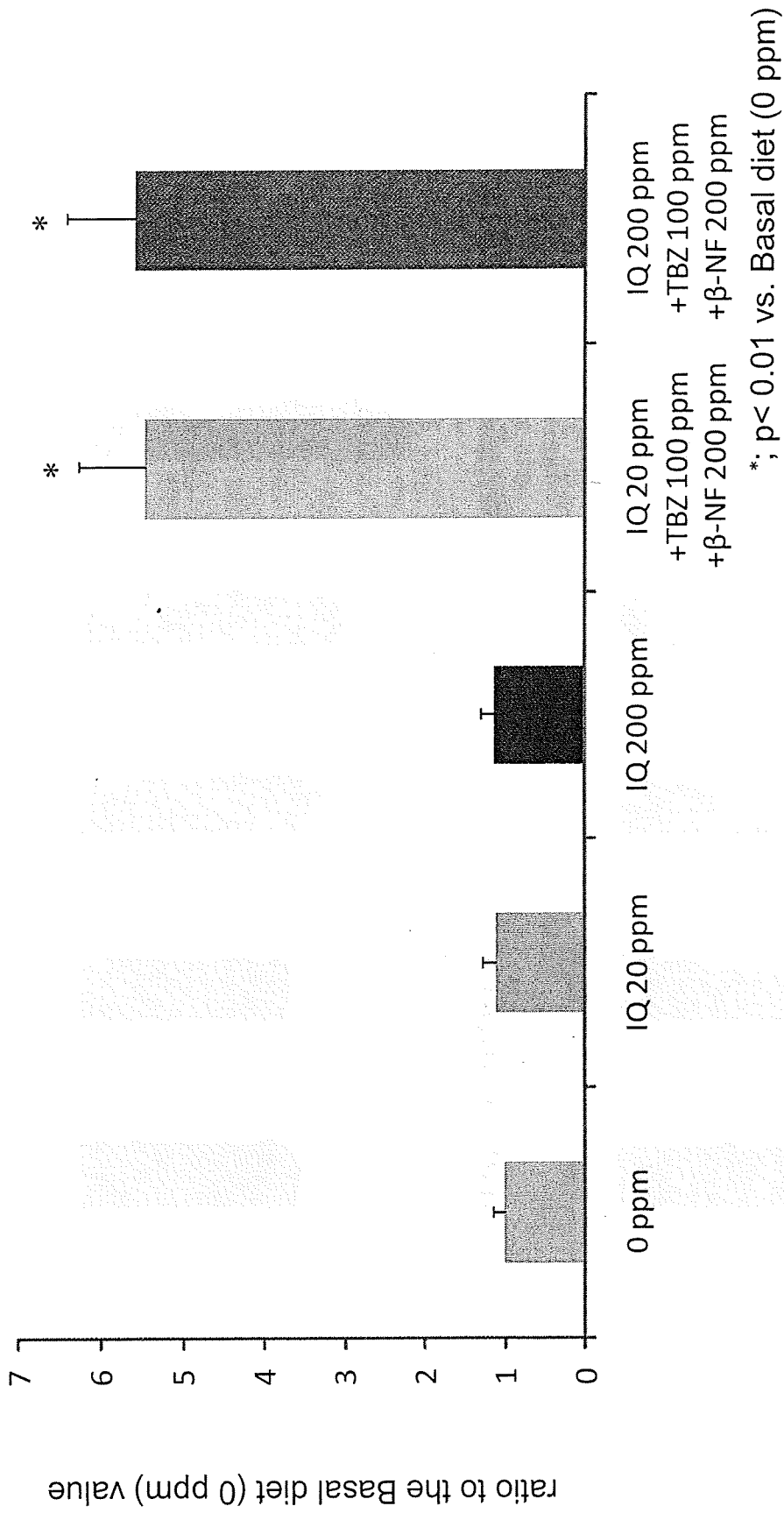


Fig.1 Changes of Cyp1a2 mRNA levels in livers of rats treated with IQ and CYP1A2 inducers

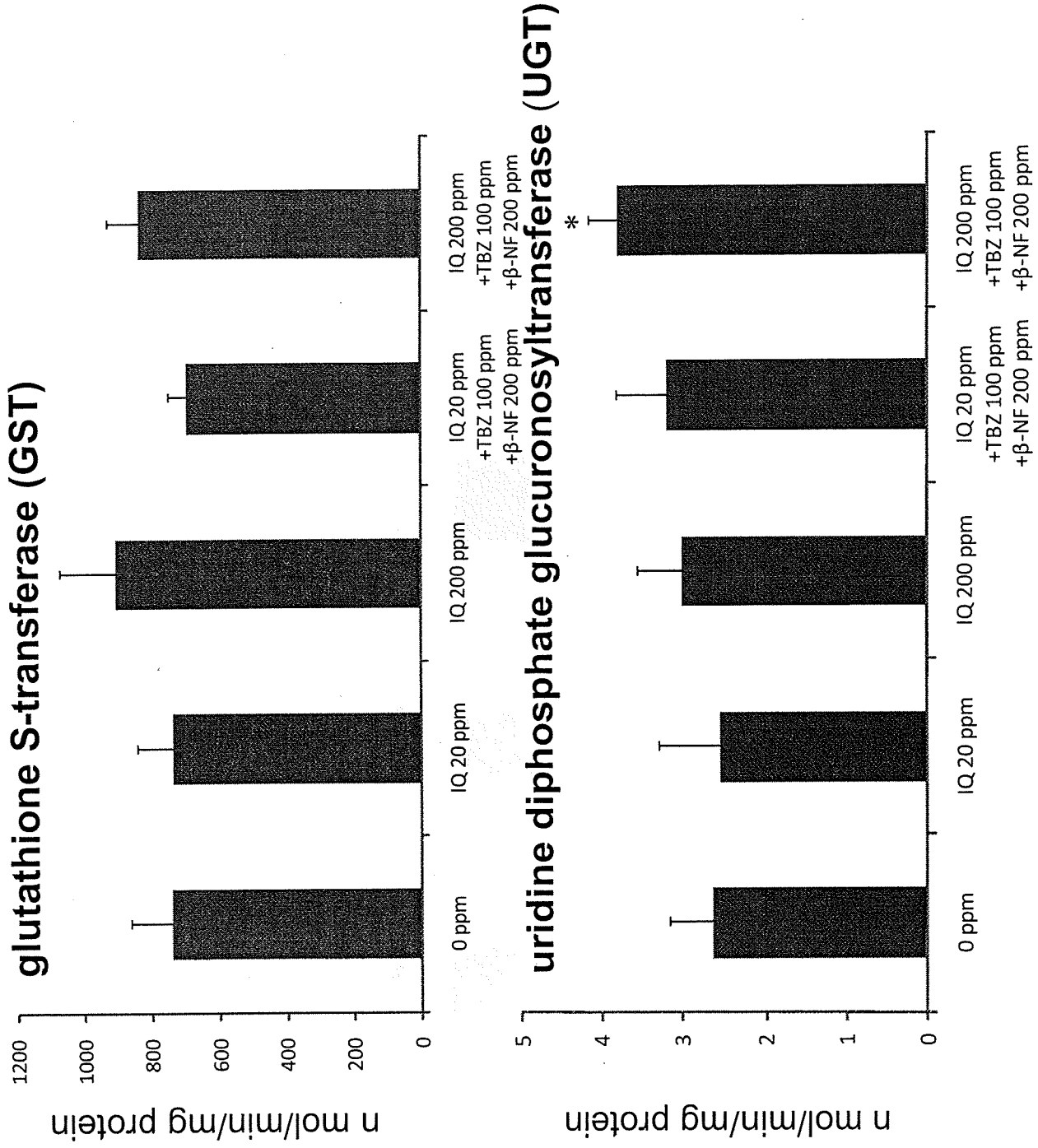
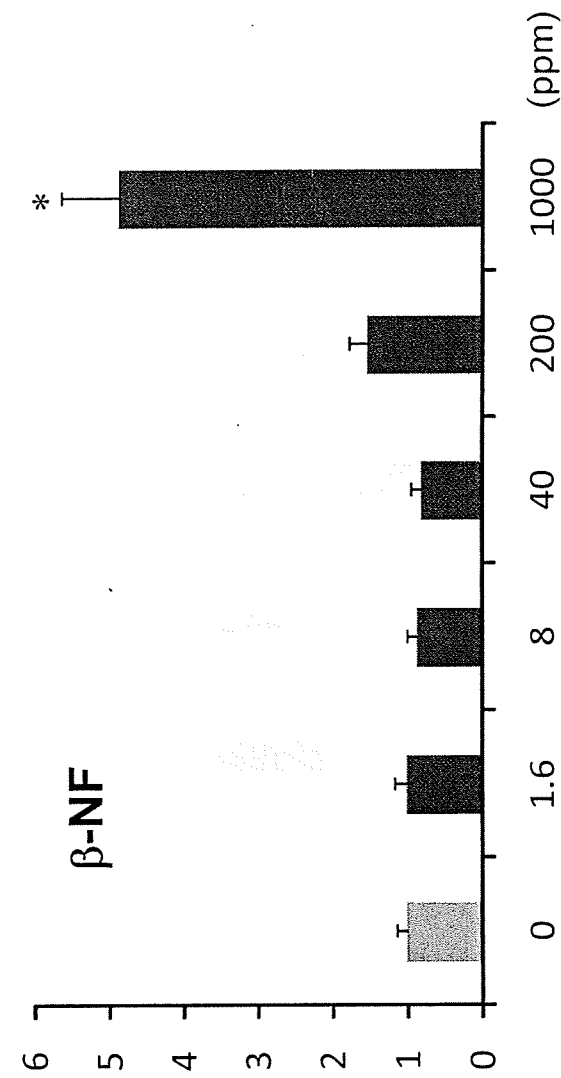
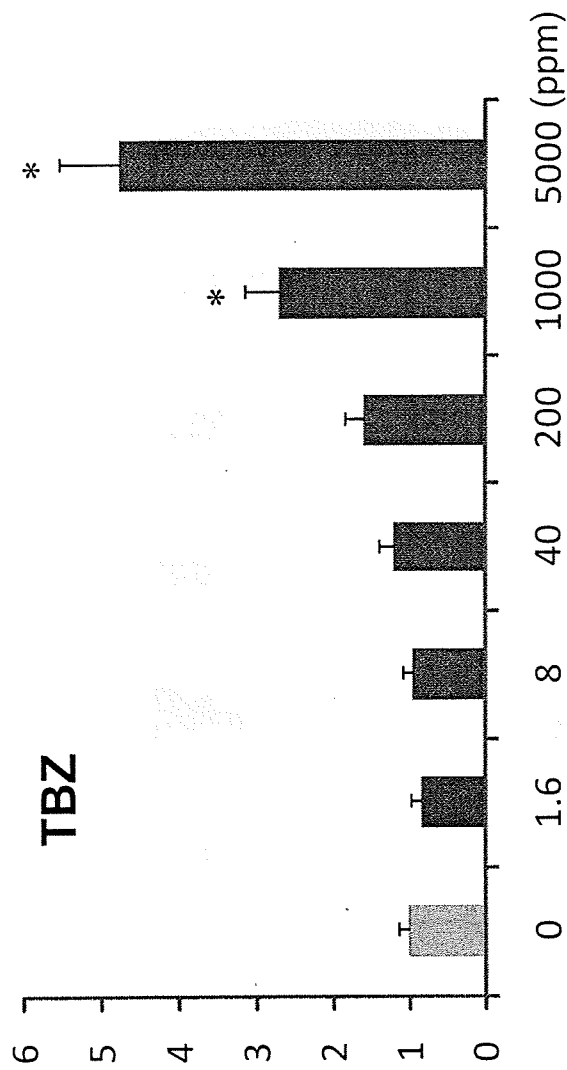


Fig.2 Changes of GST and UGT activity in livers of rats treated with IQ and CYP1A2 inducers

ratio to the Basal diet (0 ppm) value



*; p < 0.01 vs. Basal diet (0 ppm)

Fig.3 Changes of *Cyp1a2* mRNA levels in livers of mice treated with Thiabendazole (TBZ) or β -Naphthoflavone (β -NF)

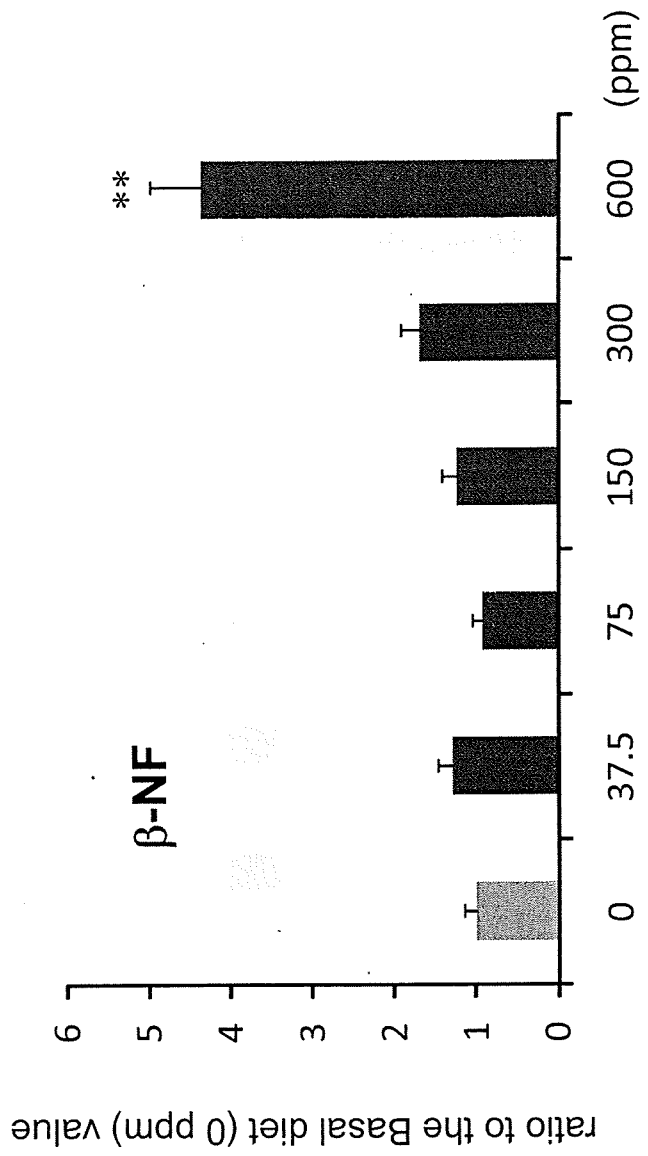
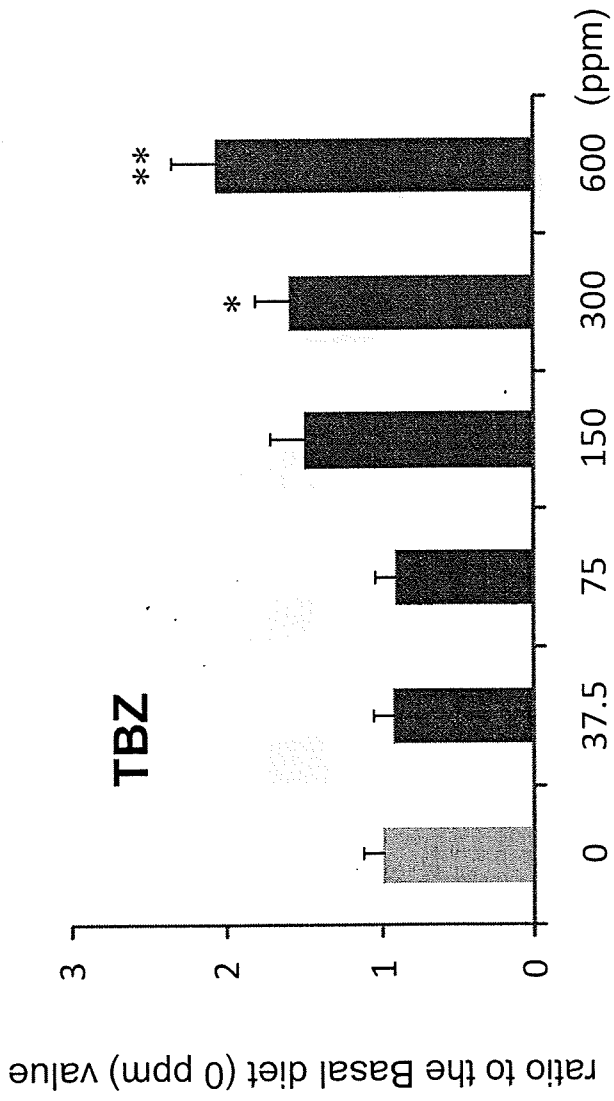
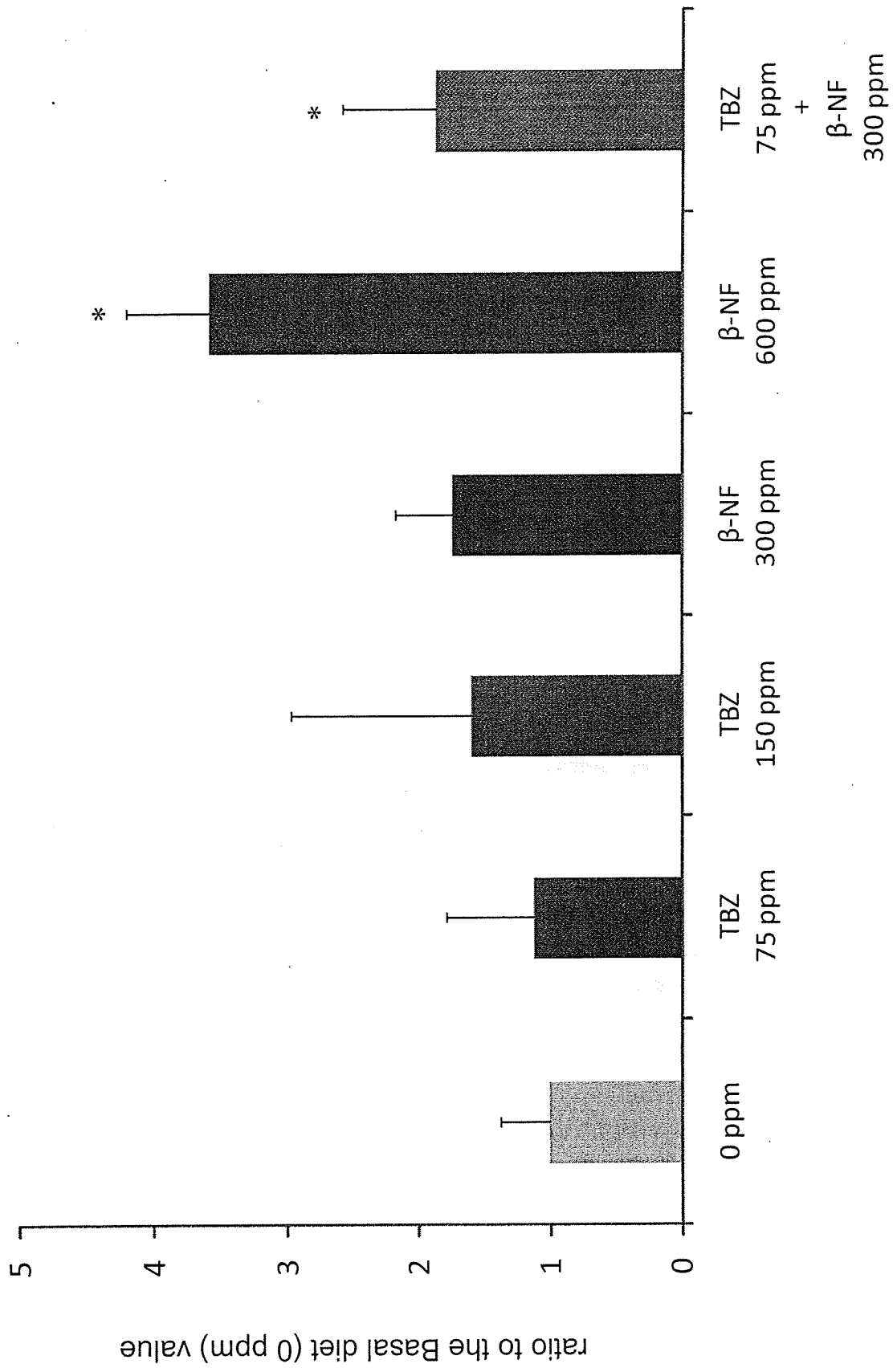


Fig.4 Changes of Cyp1a2 mRNA levels in livers of mice treated with TBZ or β -NF



*; p < 0.01 vs. Basal diet (0 ppm)

Fig.5 Changes of Cyp1a2 mRNA levels in livers of mice treated with beta-NF and/or TBZ

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）
分担研究報告書

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

分担研究課題： 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

研究分担者： 田中卓二 金沢医科大学

研究要旨

Indole-3-carbinol と hesperidin のマウスへの複合投与による健康影響を知る目的で肝臓での microarray 解析を行った結果、変動遺伝子数は単独投与と比べて複合投与群に顕著に多かった。マウス肝臓代謝、ストレス・毒性に関わる遺伝子発現に関しても、複合投与する事により単独では観察されなかった変動が見られ、両物質の複合投与による健康への影響が示唆された。次いで、quercetin と catechin mixture のマウスへの複合投与を行った結果、単独群と複合投与群間に血液生化学的変化、病理学的変化や毒性に関与する肝の遺伝子の変動数に差を認めなかった。

A. 研究目的

食品中に存在する様々な化合物のうち発がん抑制作用が報告されている化合物を選択し、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事を目的とする。

本年度は、前年度に実施した indole-3-carbinol (I3C) と hesperidin (Hes) の複合投与による影響について薬物代謝、ストレス・毒性、アポトーシスに係わる肝臓の遺伝子発現について検討した。次いで、quercetin (Q) と catechin mixture (C mix) をマウスに単独および複合混餌投与して全臓器の病理組織学的、血清生化学的変化を解析し、肝臓における遺伝子発現の変化を 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ることを目的とした。

B. 研究方法

まず、I3C と 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。

次いで、Q と 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。

（倫理面への配慮）動物実験は、金沢医科大学動物実施指針に従い、実験動物委員会の承認に基づき実施し、動物愛護を十分考慮した。

C. 研究結果

(1) I3C と Hes の複合投与による肝臓遺伝子