

200939018B

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19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成22(2010)年 4月

目 次

I. 総合研究報告

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	-----	30
西川秋佳		

2. 食品中化学物質の複合影響による発がん性に関する研究	-----	35
田中卓二		

3. 残留農薬の複合影響による神経・免疫毒性に関する研究	-----	50
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	-----	78
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	-----	85
中澤裕之		
斉藤貢一		

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

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： 中澤裕之 星薬科大学 薬品分析化学教室教授
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。①グルコン酸銅と抗酸化物質或いは金属キレート剤、 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。また、MeIQx と四塩化炭素またはフルメキンを *gpt delta* マウスに併用投与した。②クルクミンとケルセチン、或いはヘスペリジンとインドール-3-カルビノールをマウスに併用投与し、microarray により遺伝子発現変異を解析した。③有機リン剤とカーバメート剤、或いは2種類の有機リン系農薬（パラチオンとメタミドホス）をラットに併用投与し、神経毒性及び免疫毒性への影響を検討した。④AhR または PXR 活性化を高感度に検出するヒト肝がん細胞株を用いて、各種食品添加物の複合影響を検討した。⑤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暴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。主な結果は以下のとおりである。①グルコン酸銅投与により酸化的ストレスが誘発されたが、併用投与による複合影響は顕著でなかった。 β -ナフトフラボン及びチアベンダゾールは、肝 CYP1A2 mRNA 上昇に閾値を有する可能性が示された。四塩化炭素またはフルメキンの併用は、レポーター遺伝子の発現頻度を MeIQx 単独投与群に比べて著しく上昇させた。②クルクミンとケルセチンの複合投与は、いくつかの特徴的な遺伝子発現の変化を誘導した。ヘスペリジンとインドール-3-カルビノールの複合影響は解析中である。③有機リン剤とカーバメート剤の併用により血漿総コレステロールが上昇した。有機リン系農薬の複合投与では、多動性などの神経行動毒性が増強される傾向がみられた。免疫毒性については検証中である。④チアベンダゾールやクルクミンは、AhR 活性化や CYP1A 酵素活性誘導において、3-メチルコラントレンとの相乗作用を示した。樹立したレポーター細胞株は、ヒト PXR リガンドに対して高い反応性を示した。⑤ニトロ化により活性酸素種の発生量が増強した。クロロゲン酸と亜硝酸ナトリウムを人工胃液中で反応させたところ、新たな化合物の生成が示唆された。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＞ 雄性 F344 ラットにグルコン酸銅とカテコール、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併用投与し、血清生化学的検査（AST、ALT および ALP）、血清中および肝臓中の銅濃度測定、病理組織学的検査、肝臓中の脂質過酸化（TBARS）レベルおよび肝 DNA 中の 8-OHdG レベルの測定を行った。また、雄性 F344 ラットにグルコン酸銅と高用量のカテコールまたは没食子酸プロピルを投与し、肝臓中の TBARS および肝 DNA 中の 8-OHdG レベルの測定を行った。また、雌性 B6C3F1 *gpt delta* マウスに四塩化炭素と MelQx を併用投与し、*in vivo* 変異原性試験を行った。また、同様に FLU あるいは PB と MelQx を併用投与し、*in vivo* 変異原性試験を行った。さらに、雄性 F344 ラットを用いて、 β -NF または TBZ の肝臓中の *Cyp1a2* mRNA 発現量における無作用量を検索した。続いて、その用量を用いて併用投与を行い、同様に測定した。さらに、雄性 F344 *gpt delta* ラットに CYP1A2 誘導剤と IQ を三剤併用投与し、*in vivo* 変異原性試験および第Ⅱ相酵素活性測定を行った。また、雄性 B6C3F1 マウスを用いて、 β -NF または TBZ の肝臓中 *Cyp1a2* mRNA 発現量における無作用量の検索ならびに併用投与の影響を同様に検討した。（西川）

＜実験 2＞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。100 ppm Q+100 ppm C 群、250 ppm Q+250 ppm C 群、500 ppm Q+500 ppm C 群、500 ppm Q 群、500 ppm C 群、無処置群。Q、C 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。また、I3C と 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。

500ppm I3C+500ppm Hes 群、250ppm I3C+250ppm Hes 群、500ppm I3C 群、500ppm 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、ストレス・毒性、アポトーシスに係わる遺伝子の発現変化を microarray にて解析した。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。さらに、Q と Cat mix の複合投与による影響を知るために、H20 年度同様、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 Q+500 ppm Cat mix 群、250 ppm Q+250 ppm Cat mix 群、500 ppm Q 群、500 ppm Cat 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。(田中)

<実験 3-1>成獣 (8 週齢) の雌性ラットに

標的作用部位が同一である 2 種の農薬 (有機リン系農薬パラチオン及びカーバメート系農薬 MPMC) を 2 週間反復経口投与し、一般毒性及び神経毒性を指標に複合暴露による毒性影響を検索した。また、8 週齢及び若齢動物 (3 週齢) の雌性ラットに同種の農薬 2 剤 (有機リン系農薬パラチオン及びメタミドホス) を 2 週間にわたり反復経口投与し、主として神経毒性を指標にして複合暴露による毒性影響を検索した。被験物質として、有機リン系農薬 パラチオン (99.6%) 及びメタミドホス (99.7%)、カーバメート系農薬 MPMC (98.9%) を用いた。パラチオンはコーンオイルに溶解して、メタミドホス及び MPMC は 1% Tween80 水溶液に懸濁して、調製した。投与用量は 5 mL/kg または 4 mL/kg とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。供試動物として、Wistar Hannover 系 SPF ラットを日本クレア株式会社 富士生育場 (静岡県) から入手した。各被験物質の文献調査による成獣の半数致死量 (LD₅₀ 値) 及び当該研究実施機関である財団法人残留農薬研究所における成熟ラットの単回投与予備実験による最大耐量 (LD₀ 値及び ChE 活性阻害データ) に基づいて投与用量を決定した。実験 3-1 では、標的作用部位が同一である 2 種の農薬の反復経口投与による複合暴露毒性影響の検討には、以下の 4 群を設定した (対照群 (コーンオイル + 1% Tween80 水溶液)、パラチオン 0.5 mg/kg/day 単剤暴露群、MPMC 60 mg/kg/day 単剤暴露群及びパラチオン 0.25 mg/kg/day + MPMC 30 mg/kg/day 複合暴露群)。同種の農薬 2 剤の反復経口投与による複合暴露毒性影響検討では、成獣に対する影響の検討、若齢動物に対する影響の検討及び成

獣の高用量複合暴露群についての追加検査の3つの実験を行った。成獣に対する影響の検討には、以下の9群を設定した(対照群(コーンオイル + 1%Tween80 水溶液)、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単剤暴露群、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単剤暴露群、メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群、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、パラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.2 mg/kg/day 複合暴露群、パラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.4 mg/kg/day 複合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)。若齢動物に対する影響の検討には、以下の7群を設定した(対照群(コーンオイル + 1%Tween80 水溶液)、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単剤暴露群、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単剤暴露群、メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群、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)。成獣の高用量複合暴露群についての追加検査には、以下の3群を設定した(対照群(コーンオイル + 1%Tween80 水溶液)、パラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.8 mg/kg/day 複合暴露群及び陽性対照群(トリメチルスズ 10 mg/kg 単回投与))。検査項目として、体重測定、一般状態の観察に加え、詳細な状態の観察(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)を適宜実施した。機能検査として、詳細な症状の観察、自発運動量、瞳孔径、ホットプレート検査、高架式十字迷路検査、明暗箱検査、モーリス水迷路検査及び海馬のグルタチオン濃度測定を実施した。血液学的検査として、ヘマトクリット値、血色素量、赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、網赤血球数、白血球数及び白血球のディファレンシャルカウントを測定した。血液生化学的検査として、アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、クレアチニン、尿素窒素、総蛋白、アルブミン、グロブリン、アルブミン/グロブリン比、血糖、総コレステロール、トリグリセライド、総ビリルビン、カルシウム、無機リン、無機リン、カリウム及び塩素を測定した。コリンエステラーゼ(ChE)活性は、血漿、赤血球及び脳について測定した。臓器重量は以下の臓器の全てあるいは一部について測定した(脳、下垂体、胸腺、肝臓、腎臓(両側)、脾臓、副腎(両側))。一部実験について剖検を実施した。(原田<実験 3-2>8週齢の雌性ラットに同種の農薬2剤(有機リン系農薬パラチオン及びメタミドホス)を2週間にわたり反復経口投与し、免疫毒性を指標にして複合暴露による毒性影響を検索した。また、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)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。実験 3-1 で用いた被験物質の他に、有機塩素剤のメトキシクロル(97%>)、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(98%>)及び殺菌剤オイゲノール(95%>)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。試験動物として、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 系雌性ラット、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雌性マウス(CBA/JnCrj)を用いた。CBA/Jn マウスは接触性過敏症研究によく用いられ、Guideline により使用が定められている動物種である。標的作用部位が同一である 2 種の農薬の反復経口投与による複合暴露毒性影響の検討には、以下の 4 群(対照群、パラチオン 0.5 mg/kg/day 単剤暴露群、MPMC 60 mg/kg/day 単剤暴露群、パラチオン 0.25 mg/kg/day + MPMC 30 mg/kg/day 複合暴露群)並びに 9 群(対照群、パラチオン 0.6 mg/kg/day 単剤暴露群、パラチオン 1.2 mg/kg/day 単剤暴露群、メタミドホス 0.8 mg/kg/day 単剤暴露群、メタミドホス 1.6 mg/kg/day 単剤暴露群、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、パラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.2 mg/kg/day 複合暴露群、パ

ラチオン 0.6 mg/kg/day + メタミドホス 0.4 mg/kg/day 複合暴露群、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)を設定した。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。2,4-D-butyl 及びオイゲノールは経皮経路にて毒性、皮膚刺激性及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。パラチオンはコーンオイルに溶解して、メタミドホス及び MPMC は 1%Tween80 水溶液に懸濁して、調製した。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。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。パラチオンはコーンオイルに溶解して、MPMC 及びパラチオンは 1%Tween80 水溶液に懸濁して、雌性ラットに強制経口投与した。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週間毎および最終解剖日に体重を測定した。各群の動物について2週間反復投与終了後に、全生存動物の胸腺及び脾臓を採取し、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。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)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。胸腺及び脾臓の半量を5%FCS(牛胎児血清)添加のリン酸緩衝液(PBS)に氷冷下で浸し、時計皿上でステンレス鋼製のメッシュを用いて細胞懸濁液を調製した。脾臓細胞については、0.85%塩化アンモニウム水溶液に懸濁し、室温で10分間静置し、赤血球を溶解させた。総合血液学検査装置アドヴィア120(Bayer Corporation)を用いて胸腺および脾臓細胞数を計測した。

次に、反応抗体との非特異的結合を防ぐため、約 1×10^7 の胸腺ないし脾臓細胞を20%山羊血清添加PBSにて4°Cで10分間培養した。 1×10^6 の胸腺ないし脾臓細胞について以下の蛍光標識抗ラット細胞膜表面抗原の抗体(BD PharMingen)を用いて4°Cで30分間培養・染色した。T細胞のリンパ球

サブセットの解析では、FITC標識抗ラットCD3抗体、PE標識抗ラットCD8抗体及びCy-Chrome標識抗ラットCD4抗体を使用した。B細胞の解析ではCy-Chrome標識抗ラットCD45RA抗体を、NK細胞の解析ではPE標識抗ラットNKR P1A抗体を使用した。染色後、PBSで洗浄した後、FACS Calibur(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を用いてリンパ球サブセットを解析した。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)上で搗りつぶし、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1mLの5%トリクロロ酢酸溶液にて懸濁した。胸腺リンパ球サブセット解析においては、未成熟胸腺細胞のダブルネガティブ細胞(CD4-CD8-)及びダブルポジティブ細胞(CD4+CD8+)について、また成熟胸腺細胞のヘルパーT細胞(CD4+CD8-)及び細胞傷害性T細胞(CD4-CD8+)について解析した。脾臓リンパ球サブセット解析においては、汎T細胞(CD3+)、汎B細胞(CD45RA+)、ヘルパーT細胞(CD4+CD8-)、細胞傷害性T細胞(CD4-CD8+)及びNatural killer細胞(NK細胞; NKR P1A+)について解析した。各リンパ球サブセットの対象細胞集団は、フロ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。リンパ球細胞増殖活性測定のため、5%トリクロロ酢酸溶液に懸濁した1mLのリンパ球細胞懸濁液に9mLの液体シンチ

レーター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) 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。また、リンパ球細胞増殖活性について SI 値 (Stimulation Index) を次式にて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。
(原田)

<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 回繰り返す配列をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 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、セレクトオ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 5' 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、セレクトオ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。被験化合物として、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、被験化合物を添加し、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 $^{\circ}$ 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。(出川)

<実験 5>ピロカテコール (CAT)、1,2-ジヒドロキシ-4-ニトロベンゼン (4-ニトロカテコール: NO₂-CAT)、3,4-ジヒドロキシけい皮酸 (カフェイン酸: CFA)、亜硝酸ナトリウム (NaNO₂)、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG)、プロテアーゼ K、ヌクレアーゼ P1、ワコーシル[®]C-200 および HPLC 用アセトニトリルは和光純薬工業社製を用いた。クロロゲン酸水和物は東京化成工業社製を使用した。硫酸銅 (II) 五水和物、酢酸エチルおよびトルエンは関東化学社製を用いた。2'-デオキシグアノシン (dG)、牛胸腺 DNA およびアルカリホスファターゼは Sigma-Aldrich 社製を使用した。精製水は Millipore 社製の Milli-Q gradient-A10 EDS ポリッシャー付き精製水装置を用いて調製した。フェノール性化合物の Antioxidant 作用を評価するために、過酸化水素を添加し、塩基性条件下において発生するヒドロキシラジカルとフェノール

性化合物を反応させた。他方、フェノール性化合物の ROS 発生能の評価を行うために、高い反応性を示す銅を添加してその反応を検討した。ROS 発生量の評価には、蛍光プローブである 2,7-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFH-DA) を用い、ROS を蛍光物質に変換して蛍光測定した。蛍光検出器には島津製作所社製 RF-5300 PC を使用した。試料調製方法は PBS 1110 μ L に 10 mM に調製したフェノール性化合物 30 μ L、DMF に溶解した DCFH-DA (0.1 mM) を 30 μ L、硫酸銅溶液 (2.5 mM) を 30 μ L 加えて、攪拌した。37 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベート操作を行い、氷冷後、励起波長 485 nm、蛍光波長 523 nm で蛍光強度を測定した。In vivo におけるフェノール性化合物の検出のため、マウスの飼育はバリエーションシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 55 \pm 5%、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。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を測定した。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。人工胃液中における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 塩酸酸性条件下で反応させ、酢酸エチルを用いて液液分配抽出した。酢酸エチル相を減圧濃縮後、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) による構造解析に供した。電子スピン共鳴装置 (ESR) による Antioxidant 作用および Prooxidant 作用の評価のため、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 作用の評価には、 α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-tert-butyl nitron (4-POBN) を用いた。試料調製は PBS 180 μ L に 20 mM に調製したフェノール性化合物 30 μ L、DMSO に溶解した 4-POBN (100 mM) を 30 μ L、硫酸銅 (10 mM) を 30 μ L 加えて、攪拌した。37°C で 1 時間インキュベート操作を行い、氷冷後、ESR で測定した。酸化ストレスの評価には 8-OHdG を用い、その測定には、高速液体クロマトグラフ-紫外吸光光度検出-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 \times 4.6 mm) を使用し、移動相は 20 mM リン酸二水素一ナトリウム:メタノール=97:3 を用いた。(中澤・斉藤)

(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>平成 19 年度にグルコン酸銅と抗酸化剤の併用投与実験を行った結果、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 および ALP の高値、肝細胞の変性、壊死が散見された。また、肝臓中の TBARS レベルおよび肝 DNA 中の 8-OHdG レベルの高値が認められたが抗酸化剤併用投与による影響は観察されなかった。平成 20~21 年度に行った炎症誘発物質と MelQx の併用投与実験の結果、四塩化炭素との併用投与によって MelQx の変異頻度が増加することが認められたことから、食品中への残留が懸念される動物用医薬品 FLU との併用投与を行った結果、*gpt* 変異頻度の増加が認められた。平成 20~21 年度に行った CYP1A2 誘導剤の併用投与実験では、ラットにおいて、 β -NF および TBZ の投与により用量相関的な *Cyp1a2* mRNA の誘導が認められ、無作用量で併用投与を行うと、相加的誘導が認められた。さらに、この用量の CYP1A2 誘導剤と IQ の三剤併用投与実験の結果、IQ 単独投与と比較して併用投与によって変異頻度が有意に減少した。第 II 相酵素活性を測定した結果、UGT 活性の有意な増加が認められた。また、マウスにおいて同様の CYP1A2 誘導剤併用投与実験を行った結果、マウスにおいても *Cyp1a2* の相加的誘導が認められた。(西川)

＜実験 2＞Q と C の複合投与による影響を検討した結果、実験開始後 4 週における肝（左葉）の遺伝子発現の microarray 解析では、そのクラスタリング結果において無処置群に比した複合投与の用量による変化の比較で、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 の発現が低下し、雌では Cyp2b10、Cyp4b12 の発現が上昇しており、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 が上昇し、Cyp4a10、Cyp4a14、Cyp2c38、Acyp2 が低下しており、雌では Cyp7a1、Cyp51 が低下していた。ストレス、毒性に係る遺伝子発現について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、Cdkn1a の発現上昇、雌では Pkm2、Fasl の発現上昇、Mt2、Igf1bp6、Lta、serpine1 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 の発現上昇が雄にのみ観察された。また、Egr1、Lta 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 の発現上昇が雌に観察された。一方、I3C と Hes の複合投与による影響を検討した結果、単独投与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。マイクロアレイ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、Igf1bp1 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。さらに、Q と Cat mix の複合投与による影響を検討した結果、Q と Cat 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。（田中）

＜実験 3-1＞標的作用部位が同一である 2 種の農薬の反復経口投与による複合暴露毒性影響を検討した結果、成獣雌性ラットにおけるパラチオンと MPMC の複合暴露影響では、フェントロチオン（Fenitrothion）とカーバメート剤の BPMC を混合して単回投与すると予想致死量の 2 倍の毒性を示すことが報告されている。この例のように、標的作用部位が同一である有機リン剤とカーバメート剤の複合毒性は、それらの暴露状況により相加的あるいは相乗的に多様に作用する可能性が示唆されている。本研究では、致

死量に至らない用量の有機リン剤のパラチオン及びカーバメート剤 MPMC を、成獣ラットに対して複合的に反復経口投与し、一般毒性及び神経毒性関連項目を指標に複合暴露影響を評価した。一般毒性評価の結果、血液学的検査では MPMC 単剤暴露群において血小板の増加がみられたものの、パラチオンと MPMC の複合暴露群では有意な変化は認められなかった。血液生化学的検査では、パラチオンと MPMC の複合暴露群において生体のストレス反応であると考えられる、血漿グロブリンと総コレステロール値の有意な増加が観察された。これらの変化は、それぞれの単剤暴露群ではみられない変化であったことから、複合投与により惹起された変化であると考えられた。臓器重量検査では、MPMC 単剤暴露群に脾臓重量の減少と副腎重量の増加がみられたものの、パラチオンと MPMC の複合暴露群では有意な変化はいずれの臓器重量においても認められなかった。神経毒性評価の結果、一般状態の観察及びスコアリングによる詳細な状態の観察において、パラチオンと MPMC の複合暴露群では、縮腫及び攣縮が認められた。しかし、これらの変化は、MPMC 単剤暴露群で高頻度に認められていることから、複合投与による相加・相乗的な神経毒性とは考えられなかった。コリンエステラーゼ (ChE) 活性において、パラチオン暴露群で血漿 ChE、赤血球中 ChE 及び脳 ChE 活性に低下がみられ、パラチオンと MPMC の複合暴露群では赤血球中 ChE 活性に低下がみられた。複合暴露群の赤血球中 ChE 活性の低下は、パラチオン暴露群の半分程度の低下であり、複合投与による ChE 活性への影響 (増強効果) は認められなかった。

一方、同種の農薬 2 剤の反復経口投与に

よる複合暴露毒性影響を検討した結果、一雌性ラットにおけるパラチオンとメタミドホスの複合暴露影響では、2 種の有機リン剤の単回投与による複合暴露影響については、Dubois が複合暴露した 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) の先行投与及び同時投与によるパラチオン (Parathion) の神経毒性作用増強などが報告されている。このように、有機リン剤の複合暴露は、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。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、8 週齢の成獣ラットに 2 週間反復経口投与し、一般毒性、及び神経毒性関連項目を指標に複合暴露影響を評価した。一般毒性評価の結果、体重、摂餌量、血液生化学的検査及び剖検の成績に著変は認められなかった。神経毒性評価の結果、複合暴露によって ChE 活性阻害作用の増強及び重篤な縮腫が認められた。縮腫は有機リン暴露における鋭敏な臨床指標であり、ヒトにおける代表的な自覚症状である。また、筋緊張の低下等の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たが、振戦等の中枢性の症状はやや遅れて発現する傾向が認められた。自発運動量の測定では、複合暴露において測定の後半 (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認められなかった。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の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ていた。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暴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であると考えられる副腎の重量の増加が複合暴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誘導し、空間記憶検索に障害を与えると示唆されていることから、複合暴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。

また、若齢動物に対する影響の検討の結果、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、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有機リン剤の複合毒性に関しては、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、3週齢の若齢ラットに2週間反復経口投与し、成獣ラット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認められた。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考えられた。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判断した。

さらに、成獣及び若齢動物に対する影響の比較では、上述した成獣ラットに対する神経毒性作用と成績と若齢ラットにおける神経毒性作用を比較した結果、単剤、複合暴露ともに発現する症状は若齢動物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、神経症状の発現が若齢動物では軽度であり、成獣において8例中3例の死亡が生じたパラチオンの1.2 mg/kg/day 単剤暴露でも若齢動物は死亡しなかった。さらに若齢動物では、血漿及び脳におけるChE活性の阻害も軽度であった。一方、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動物においては生じ難いと思われた。また、60分間の自発運動量減少の割合では、成獣と同様に若齢動物でも単剤の高用量暴露群及び複合暴露群における落着き難さが認められた。

また、成獣の高用量複合暴露群について

の追加検査の結果、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。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。モーリス水迷路検査による学習記憶検査では、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。

さらに有機リン剤は、脂肪酸アミノ脱水素酵素 (FAAH) の活性を阻害することによって内在性カンナビノイド系を失調させ、認知機能及び知覚神経機能に影響を及ぼすことが知られているため、ホットプレート検査を実施した。ホットプレート検査では、内在のカンナビノイド系の失調を疑わせる知覚機能の異常は認められなかった。以上の追加検査の成績から、高用量複合暴露群で認められた落ち着き難さと認知障害の関連性は低いと考えられた。(原田)

<実験 3-2>パラチオン単剤投与群では、脾臓細胞数に有意な増加及び胸腺細胞数に増加傾向が観察され、MPMC 単剤投与群では胸腺細胞数に減少傾向が観察された。胸腺のリンパ球サブセット解析において、MPMC 単剤投与群では成熟胸腺細胞のヘルパーT 細胞の有意な減少及び未成熟胸腺細胞のダブルポジティブ細胞 (CD4+CD8+) の減少傾向が観察された。脾臓のリンパ球サブセット解析において、パラチオン単剤投与群では、汎B 細胞の有意な増加が観察された。パラチオンとMPMC の複合投与群では、いずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった。フローサイトメトリーを用いた測定の結果、いずれの投与群においても胸腺の細胞数測定及びリンパ球サブセット解析に著変は認められなかった。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。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。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を測定した結果、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。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。(原田)

<実験 4>HepG2-A10 細胞株を用いた研究では、AhR 活性化に及ぼす食品添加物の影響を検討した。まず、HepG2-A10 細胞に対して被験化合物 (1-100 µM) を単独で 24 時間処理し、AhR 活性化に及ぼす影響を検討した結果、TBZ (10 µM、100 µM) 処理群では、有意な AhR の活性化が認められたが、CUR、BHT あるいは PG 処理群では、いずれの濃度においても AhR の活性化は認められなかった。食品添加物の複合暴露が AhR 活性化に及ぼす影響について、4 種の食品添加物のうち 2 種 (各 10 µM) を組み合わせて 24 時間処理した場合の AhR 活性化に及ぼす影響について検討した結果、TBZ と他の被験化合物のそれぞれ複合暴露群において、TBZ 単独処理群と同程度の AhR 活性化が認められたが、他の組み合わせ

せ処理による有意な AhR の活性化は認められなかった。AhR リガンド (MC) と食品添加物との複合暴露が AhR 活性化に及ぼす影響について、環境中には様々な AhR リガンドが存在しており、食品添加物との相互作用の有無に興味を持たれる。そこで、AhR リガンドである MC (0.01-1 μM) と食品添加物 (10 μM) を組み合わせて 24 時間処理し、AhR 活性化に及ぼす影響を検討した結果、0.01 μM MC 存在下では TBZ と PG が、0.1 μM MC 存在下では CUR と TBZ が、また 1 μM MC 存在下では CUR と TBZ が、それぞれ MC による AhR 活性化を有意に増強した。一方、BHT はいずれの濃度の MC に対しても増強効果を示さなかった。MC と食品添加物との複合暴露が CYP1A 酵素遺伝子発現に及ぼす影響について、MC (0.1 μM) と食品添加物 (10 μM) を組み合わせて 24 時間処理し、CYP1A 酵素遺伝子 (CYP1A1 および CYP1A2) の発現に及ぼす影響について検討した結果、食品添加物はいずれも単独では CYP1A 酵素遺伝子の発現を誘導しなかったが、MC 存在下では TBZ 処理 (すなわち MC+TBZ 処理) において、MC 単独処理群と比べて有意な誘導が観察された。AhR 活性化および CYP1A 酵素誘導における TBZ の濃度依存性について、MC (0.1 μM) と TBZ (1-100 μM) を組み合わせて 24 時間処理し、AhR 活性化ならびに CYP1A 酵素活性誘導に及ぼす濃度依存性について検討した結果、AhR 活性化、CYP1A 酵素活性いずれにおいても TBZ 単独による誘導作用は見られなかったが、0.1 μM MC 存在下では 3 μM TBZ より濃度依存的な AhR 活性化ならびに CYP1A 酵素活性の上昇が観察された。食品添加物処理時に

おける AhR 活性化の経時的変化について、各食品添加物処理時の AhR 活性化の経時的変化を測定し、その時間—曲線下面積 (AUC) を算出することで、活性化の度合いを評価し、機構解析の一助とした結果、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、その後減少した。処理後 48 時間までの AhR 活性化における AUC 値 (RLU \cdot h) は、濃度依存的に増加した。一方、被験化合物の単独処理群では、CUR、TBZ および PG で AUC 値のわずかな増加が見られた。次に、MC (0.1 μM) と食品添加物 (10 μM) を組み合わせて処理し、AhR 活性化の経時変化を比較した。CUR+MC、TBZ+MC および PG+MC 処理群において、MC 単独処理群と比べて AUC 値の増加が見られ、その中でも TBZ+MC 処理群が最も高値を示した。CUR+MC 処理群では、AhR 活性化のピークに遅延が見られた。TBZ+MC 処理群では、MC 単独処理群と比較してピークの遅延、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た。また、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、また 12 時間以降で起こる AhR 活性化の減少が緩やかであった。

HepG2-PXRLucA3 を用いた研究では、PXR 活性化に及ぼす食品添加物の影響について、HepG2-PXRLucA3 細胞に対して各被験化合物 (1-100 μM) を単独で 24 時間処理し、PXR 活性化に及ぼす影響を検討した結果、TBZ は僅かではあるが有意な PXR の活性化を惹起した。また、4 種の食品添加物のうち 2 種 (各 10 μM) を組み合わせて

24 時間処理した場合には、いずれの組み合わせの場合にも、単独処理の場合同程度の PXR 活性化しか認められなかった。PXR リガンド (RIF) と食品添加物との複合暴露が PXR 活性化に及ぼす影響について、医薬品の多くは PXR リガンドになりうるものと考えられていることから、食品添加物との相互作用の有無に興味を持たれる。そこで、PXR リガンドである RIF (10 μ M) と食品添加物 (1-100 μ M) を組み合わせて 24 時間処理し、PXR 活性化に及ぼす影響を検討した結果、RIF による PXR 活性化は高濃度 (10 μ M 以上) の CUR、BHT および PG の存在下有意に抑制された。その一方、TBZ は、RIF による PXR 活性化をいずれの濃度においても増強した。RIF と食品添加物との複合暴露が CYP3A 酵素遺伝子発現に及ぼす影響について、RIF (10 μ M) と各被験化合物 (10 μ M) を組み合わせて 24 時間処理し、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、いずれの被験物質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 による PXR 活性化は CUR、BHT および PG の存在下、その発現が抑制される傾向が見られた。RIF と食品添加物との複合暴露が CYP3A 酵素活性に及ぼす影響について、HepG2-PXR_{LucA3} に対して、RIF (10 μ M) と各被験化合物 (1-100 μ M) を組み合わせて処理し、24 時間後の CYP3A 酵素を p450-Glo assay により測定した結果、各化合物の単独処理時には、100 μ M PG 処理群においてのみ活性増加が見られた。また、10 μ M RIF との複合暴露では、PG (100 μ M) +RIF 処理群において有意な活性増加が見られた。一方、他の

化合物については、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。(出川)

<実験 5>標準品が市販されている

NO₂-CAT および CAT を使用し、ROS 生成に与える影響について DCFH-DA を用いて評価した結果、NO₂-CAT には CAT と同様に抗酸化作用が見られた。しかし、ラジカル発生作用については、NO₂-CAT の方が ROS の発生量が有意に増大する結果が得られた。ニトロ化を受けたフェノール性化合物が ROS 発生に与える影響を検討した結果、クロロゲン酸、CFA と NaNO₂ をそれぞれ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ることが確認された。*In vivo* におけるフェノール性化合物の検出および酸化的ストレス評価では、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-2 と同様の反応が起こる可能性があるため、*in vivo* への適用を試みた結果、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反応を受けた 1,2-(4*H*)-benzoxazin-4-one が検出された。人工胃液中におけるフェノール性化合物と NaNO₂ の反応では、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標準品を確保するため

に合成を試みた。得られた化合物を LC/MS および NMR で確認したところ、CFA がニトロ化反応を受けた化合物

1,2-(4*H*)-benzoxazin-4-one、

2-oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2,5-

oxadiazole の生成を確認した。ROS 生成を評価する方法としては、現在までにさまざまな方法があり、その中でも ESR を用いた方法はラジカルを直接測定でき、信頼性の高い方法であることから、ニトロ化反応を受けたフェノール性化合物が ROS 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、ROS 生成の評価が困難であることが分かった。そこで、新たな ROS 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*-

butylnitron 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、

ニトロ化反応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、スーパーオキサイドラジカルの消去を確認し、特にニトロ化反応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。これらの結果から、フェノール性化合物はニトロ化反応を受けることで Antioxidant 作用が増強し、ROS 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 ROS 生成について生体内でも同様の結果が得られるかを評価するために、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、ニトロ化反応を受けることで 8-OHdG 量が減少した。(中澤・斉藤)

D. 考察

グルコン酸銅と抗酸化物質の併用投与実験において、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 および ALP の高値が認められ、病理組織学的にも肝細胞の変性、壊死が散見され、銅蓄積に起因すると考えられる肝障害が認められた。また、肝 DNA 中の 8-OHdG レベルの上昇が認められ、酸化的ストレスが誘発されることが示された。しかし、これらのパラメーターに抗酸化物質の複合効果は認められなかった。食品中への残留が懸念される肝炎誘発物質 FLU と MeIQx の併用投与実験において、MeIQx の変異原性が増強されることが示された。同時に実施した非炎症性肝発がんプロモーター物質 PB との併用投与では影響は認められなかったこ

とから、この増強作用に炎症性サイトカイン等の関与の可能性が示唆された。食品中のCYP1A2誘導剤β-NFとTBZの併用投与により、ラット肝におけるCyp1a2 mRNAの相加的誘導が認められた。一方、さらにIQを併用投与するとIQの変異原性が減弱することが示された。これは、IQの抱合排泄に関与する第Ⅱ相酵素活性であるUGT活性が同時に上昇していたことから、解毒経路の促進によってIQの変異原性が減弱したと考えられた。また、マウスを用いてCYP1A2誘導剤の併用投与実験を行った結果、ラットと同様にCyp1a2の相加的誘導を起こすことが示された。

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。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。そこで、本分担研究では、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Q&C、I3C&HesおよびQ&Cat mixのマウスへ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動を観察した。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、Cはウコンの黄色色素で、どちらも抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用などが報告されている。この両化合物の複合および単独投与の結果、病理組織学的変化は認められず、いずれのパラメータ

一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。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。さらに、ストレス・毒性に係る遺伝子発現について検討したが、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。また、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・組織保辞、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。また、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、