

細胞の分化、増殖、アポトーシス、DNA 損傷修復の制御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。さらに、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 (Cat mix) 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。この Cat mix および前述の Q の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。さらに Q に関しても同様の報告がされている。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 Q 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。

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。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性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性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。本研究では、雌性ラットあるいはマウスを用い有機リン剤パラチオンとメタミドホス、カーバメート剤 MPMC 及び有機塩素系農薬メトキシクロルを組み合わせ3つの実験を実施し、免疫系への複合暴露影響を検索した結果、パラチオンと MPMC を雌性ラットの成熟動物に複合投与したが免疫系への複合暴露影響は認められなかった。パラチオンとメタミドホスを雌性ラットの成熟動物に複合投与したが免疫系への複合暴露影響は認められなかった。パラチオン及びメトキシクロルを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 LLNA 法により用いて検索した。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性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性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。

2種のレポーター細胞株を用いて、食品添加物であり、かつ肝 CYP 分子種の発現変動を引き起こす事が知られている CUR、TBZ、BHT および PG の CYP1A および CYP3A 酵素誘導に及ぼす影響を評価した結果、用いた被検化合物いずれも、単独では強い作用を示さないものの、それぞれの誘導剤と組み合わせることで処理することにより、CYP1A および CYP3A 酵素誘導に対して増強あるいは阻害効果を示すことが明らかとなった。CYP1A 酵素誘導に及ぼす影響について、CUR は MC による AhR 活性化 (CYP1A 酵素誘導) に対して、早期 (6時間以前) では抑制作用を、また後期 (12時間以降) では増強作用を示した。CUR は AhR 依存的に CYP1A1 遺伝子の発現を増加させる一方で、TCDD による CYP1A 酵素誘導や AhR 活性化を阻害することが示されている。本研究の結果から、これらは CUR の持つ作用が早期と後期で異なっていることに起因するものと考えられた。TBZ は単独でも AhR 活性化能を有し、また MC による AhR 活性化を著しく増強した。さらに、AhR 活性化の経時変化から、TBZ は MC の細胞内濃度を増加させる可能性が考えられた。これまでの知見より TBZ は AhR に直接結合することなく間接的に AhR を活性化し、CYP1A 遺伝子の発現を誘導する事が知られている。しかし、AhR リガンドによる相乗的な

CYP1A 酵素誘導や、相乗的な AhR 活性化についての報告は見当たらないため、*in vivo*での相乗作用の有無、あるいは相乗作用に伴った毒性発現などについて更なる検討が必要である。BHT は単独、あるいは MC 存在下いずれの場合にも AhR 活性を変化させなかった。BHT にはマウス肝で CYP1A 酵素を誘導することが報告されているが、*in vitro*培養細胞における誘導性は報告されていない。比較的分子量の小さな CYP1A 酵素誘導剤は *in vivo*特異的な誘導作用を示すことが知られており、BHT も *in vivo*特異的な CYP1A 酵素誘導剤である可能性が考えられた。PG は MC 存在下、AhR 活性化を増強した。また、AhR 活性化の経時変化から、この増強作用は AhR 活性化の維持作用によるものと考えられた。活性化した AhR は通常、AhR タンパク分解 (ユビキチン化) や抑制因子 AhRR の発現促進により抑制を受け、その活性が低下することが知られている。このことから、PG はこれら機構に対して拮抗的に働いている可能性が考えられた。CYP3A 酵素誘導に及ぼす影響について、CUR、PG、BHT はいずれも、RIF による PXR 活性化に対して抑制効果を示した。これまでに CUR がヒト初代肝細胞において PXR 活性化を介して CYP3A4 遺伝子の誘導作用を示すことが報告されている他に、CYP3A 酵素誘導との関わりは明らかとされておらず、その機構に興味を持たれた。TBZ は単独で PXR 活性化能を示し、また RIF による PXR 活性化に対して増強作用を示した。これまでに、TBZ の単独処理によるヒト CYP3A 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一部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 の増強作用にも興味を持たれる。その一方で、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場合も確認されており、TBZ もこれら化合物と同様、PXR 活性化を引き起こすものの CYP3A 酵素誘導にはあまり影響しない化合物であ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、CYP3A 酵素活性に及ぼす他の化合物の影響はほとんど見られなかった。したがって、食品添加物は、PXR 活性化および CYP3A4 遺伝子発現レベルとは異なった、転写以外のレベル、すなわち翻訳過程や酵素反応の過程で CYP3A 酵素に何らかの影響を及ぼしているものと思われた。

フェノール性物質である CAT 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を検討した。ROS 生成は、種々の発がん機構に関与することが知られている。生体内で摂取されたフェノール性化合物と NaNO₂ の併用投与によって ROS 生成の増加が起こり、さまざまな疾患の発症につながる事が考えられる。DCFH-DA を用いた抗酸化作用の評価ではニトロ化された物質においても同様の抗酸化作用が認められた。しかし、ラジカル発生作用はニトロ化反応を受けたことにより、ROS の発生量に大きな変化が認められた。また、食品に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反応を引き起こす結果が得られた。ニトロ化反応はフェノール性化合物の化学構造によってベンゼン

環が直接ニトロ化反応を受ける場合と、側鎖がニトロ化される場合がある。ベンゼン環がニトロ化反応を受ける場合、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ような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のように側鎖にニトロ化が起こった場合、不安定な化学構造になることが考えられ、ROS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ROSと反応することでペルオキシナイトライト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。今後、活性窒素種生成についても解明する必要があると考えられる。

E. 結論

グルコン酸銅投与によりラット肝で銅の蓄積に起因すると考えられる酸化ストレスが誘発され、肝障害も認められた。しかし、今回の実験条件下ではグルコン酸銅と抗酸化物質との併用投与による複合影響は認められなかった。肝炎を誘発する動物用医薬品FLUとMeIQxの併用投与実験では、MeIQxの変異原性の増強が認められた。 β -NFとTBZを併用投与すると、ラットならびにマウス肝臓中のCyp1a2 mRNAレベルの相加的誘導が認められた。一方、gpt delta ラットを用いて、IQとCYP1A2誘導剤を併用投与すると、IQの変異原性はCYP1A2誘導剤の併用投与によって減弱した。

発がん抑制を含む種々の生理活性が報告されている2種の化合物を選択して複合投与による影響を知る目的でマウスを使用した実験を実施した結果、I3Cおよび

Hesperidinの複合投与による健康影響が示唆された。複合投与による影響は雄に比べ雌に大きかった実験結果から、その雌雄差の原因も追究する必要がある。

有機リン剤パラチオンとカーバメート剤MPMCを、雌ラットに2週間反復経口投与した結果、神経毒性は増強されなかった。同種の有機リン系農薬2剤パラチオンとメタミドホスを同様に反復経口投与し結果、神経毒性を増強する可能性が示唆された。若齢と成獣ラットの比較では、毒性の質的差はないと考えられたが、神経症状の発現及びChE活性の阻害は若齢動物の方が軽度であった。瞳孔径の推移から、成獣で認められた耐性は若齢動物において生じ難いと思われた。落ち着き難さの原因を精査する追加検査を実施した結果、学習能力及び知覚神経機能に影響がないことを確認した。

雌ラットにパラチオンとMPMCあるいはメタミドホスを反復投与した結果、免疫系に対する複合暴露影響は認められなかった。一方、パラチオンないしメトキシクロルを4週齢の雌CBA/JNマウスに5日間反復経口投与し、アレルギー性反応の変化をLLNA法を用いて評価した結果、オイゲノール及び2,4-D-butylのアレルギー性反応に対する増強効果が示唆された。

ヒトAhRあるいはPXR活性化能を評価できるレポーター細胞株(HepG2-A10及びHepG2-PXRLucA3)を樹立し、4種の食品添加物のCYP1AおよびCYP3A酵素誘導に及ぼす影響を評価した結果、それらの添加物には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。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。

フェノール性化合物と NaNO₂ の併用により酸性条件下でニトロ化反応が引き起こされ、ROS 生成に関与しているかを検証した結果、クロロゲン酸、CFA と NaNO₂ を人工胃液中で反応させることによってニトロ化反応が起こり、ROS 発生量が増大した。マウス肝において、フェノール性化合物がニトロ化反応を受けた物質を検出した。一方、フェノール性化合物と NaNO₂ の併用により胃酸酸性条件下でニトロ化反応を受けた化合物は antioxidant 作用を増強することが示唆され、prooxidant 作用についてもニトロ化反応を受けることで減少した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuroiwa Y, Ishii Y, Umemura T, Kanki K, Mitsumori K, Nishikawa A, Nakazawa H, Hirose M. Combined treatment with green tea catechins and sodium nitrite selectively promotes rat forestomach carcinogenesis after initiation with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Cancer Sci.*, 98: 949-957, 2007.
- 2) 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.*, 99: 7-13, 2008.
- 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.*, 36: 353-361, 2008.
- 4) 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.*, 104: 274-282, 2008.
- 5) Miyamoto S, Epifano F, Curini M, Genovese S, Kim M, Ishigamori-Suzuki R, Yasui Y, Sugie S, Tanaka T. A novel prodrug of 4'-geranyloxy-ferulic acid suppresses colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Nutr. Cancer*, 60: 675-684, 2008.
- 6) Kim M, Miyamoto S, Sugie S, Yasui Y, Ishigamori-Suzuki R, Murakami A, Nakagama, H, Tanaka T. A tobacco-specific carcinogen, NNK, enhances AOM/DSS-induced colon carcinogenesis in male A/J mice. *In Vivo*, 22: 557-563, 2008.
- 7) Miyamoto S, Yasui Y, Tanaka T, Ohigashi H, Murakami A. Suppressive effects of nobiletin on hyperleptinemia and colitis-related colon carcinogenesis in male ICR mice. *Carcinogenesis*, 29: 1057-1063, 2008.
- 8) Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Adachi S, Hata K, Hirose Y, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. (-)-Epigallocatechin gallate

- suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. *Cancer Prev. Res.*, 1: 298-304, 2008.
- 9) Fukuyama T, Ueda H, Hayashi K, Tajima Y, Shuto Y, Saito TR, Harada T, Kosaka T. Use of long term dermal sensitization followed by intratracheal challenge method to identify low-dose chemical-induced respiratory allergic responses in mice. *Toxicol. Lett.*, 181: 163-70, 2008.
- 10) 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*, 257: 46-52, 2009.
- 11) Kim M, Miyamoo S, Yasui Y, Oyama T, Murakami A, Tanaka T. Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. *Int. J. Cancer*, 124: 264-271, 2008.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Tanaka T, Yasui Y, Tanaka M, Tanaka T, Oyama T, Rahman K.M.W. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. *Chem.-Biol. Interact.*, 177: 128-136, 2009.
- 18) Shimizu M, Shirakami Y, Iwasa J, Shiraki M, Yasuda Y, Hata K, Hirose Y, Tsurumi H, Tanaka T, 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.

19) Yasuda M, Nishizawa T, Ohigashi H, Tanaka T, Hou D.-X., Colburn N.H., 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.

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

21) 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) 岡村俊也, 石井雄二, 井上知紀, 田崎雅子, 梅村隆志, 広瀬雅雄, 西川秋佳: グルコン酸銅摂取によるラット肝酸化ストレスの誘発とカテコール併用投与による修飾効果の検討. 第24回日本毒性病理学会 2008年2月7日.

2) 岡村俊也, 石井雄二, 井上知紀, 田崎雅子, 広瀬雅雄, 梅村隆志, 西川秋佳: グルコン酸銅摂取によるラット肝酸化ストレスの誘発と抗酸化物質併用投与による複合影響の検討. 第35回日本トキシコロジー学

会 2008年6月27日

3) 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 MelQx の *in vivo* 突然変異解析. 第67回日本癌学会 2008年10月28日

4) 岡村俊也, 石井雄二, 井上知紀, 田崎雅子, 鈴木裕太, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: MelQx のマウス肝 *in vivo* 変異原性に対する CCl₄ 誘発肝障害の増強効果. 第36回日本トキシコロジー学会 2009年7月7日

5) 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

6) 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

7) 岡村俊也, 石井雄二, 井上知紀, 田崎雅子, 鈴木裕太, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: *p53* ノックアウト *gpt delta* マウス肝における MelQx の変異原性に対する CCl₄ 誘発肝障害の修飾効果. 第26回日本毒性病理学会 2010年2月3日

8) 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)

9) 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)

10) 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)

11) 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

12) 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

13) 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-PXRLucA3の樹立. 日本薬学会129年会 (京都)、2009年3月28日

14) 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

15) 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

16) 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

17) 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 分析化学学会年会 (2009年9月・北海道)

18) 大柄敦資、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之. カテコールのニトロ化と活性酸素種生成. 第20回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2007) (2007年7月・東京)

19) Atsushi Ogara, Yusuke Iwasaki, Yuji Ishii, Rie Ito, Koichi Saito, Akiyoshi Nishikawa and Hiroyuki Nakazawa. Effect of the nitration on generation of the reactive oxygen species for caffeic acid. 59th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (2008年2月・アメリカ)

20) 大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中

澤裕之. フェノール性化合物の Prooxidant 作用に対するニトロ化反応の影響. フィジカル・ファーマフォーラム 2008 (2008 年 3 月・東京)

21) 大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之. カフェイン酸による活性酸素種生成に及ぼすニトロ化の影響. 日本薬学会第 128 年会 (2008 年 3 月・東京)

22) 大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、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)

23) 大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、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)

G. 知的所有権の取得状況

なし。

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

保健機能食品の成分として使用の拡大が予想されるグルコン酸銅は、過剰摂取によってラット肝に銅の蓄積を惹起し、肝障害を誘発する。また、遺伝的に肝臓に銅を蓄積する LEC ラットにおいて、酸化ストレスを生じることが知られている。そこで、ラットを用いて銅蓄積による酸化ストレス誘発の有無を検討するとともに、銅との複合影響が懸念される食品中の抗酸化物質との併用投与実験を行った。その結果、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 の高値が認められた。病理組織学的にも肝細胞の変性、壊死が散見され、銅蓄積に起因すると考えられる肝障害が認められた。また、肝臓の脂質過酸化 (TBARS) レベルおよび肝 DNA 中の 8-OHdG レベルの上昇が認められ、酸化ストレスが誘発されることが示された。しかし、これらのパラメーターに抗酸化物質 (カテコール、タンニン酸、酵素処理イソクエルシトリン、フィチン酸、没食子酸プロピル) の複合効果は認められなかった。

また、食品中への残留が懸念され、肝炎を誘発する動物用医薬品フルメキン (FLU) とヘテロサイクリックアミン 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) との併用投与実験を行った。その結果、FLU 併用投与により MeIQx の変異頻度の上昇が認められた。一方、非炎症性肝発がんプロモーター物質のフェノバルビタール (PB) の併用投与では増強効果は認められなかったことから、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。

さらに、薬物代謝酵素を誘導する食品中物質とヘテロサイクリックアミン 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) の複合摂取による複合影響について検索する実験を行った。IQ は食品中に含まれ、ヒトに対して発がん性が疑われる遺伝毒性物質で、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が知られている。CYP1A2 誘導剤として知られる食品中物質として β -ナフトフラボン (β -NF)、チアベンダゾール (TBZ) を様々な用量でラットに投与し、Cyp1a2 誘導の閾値用量を探索し、得られた用量で二剤の併用投与実験を行った。その結果、併用投与による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。さらに、この実験から得られた CYP1A2 誘導剤の用量を用いて、IQ との三剤併用投与実験を行った結果、IQ 投与群と比較して、

IQ+CYP1A2 誘導剤併用投与群において、変異頻度の有意な減少が認められた。二剤投与により、同時に第Ⅱ相酵素 UGT の活性の上昇も認められたことから、IQ の抱合排泄が促進されたことにより IQ の変異頻度が減少したと考えられた。また、マウス発がん剤への複合影響を念頭に、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結果、二剤の併用投与により *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。

A. 研究目的

本研究目的は、保健機能食品の成分として使用の拡大が予想されるグルコン酸銅と食品中に含まれる種々の抗酸化物質、肝炎誘発物質であり食品中に残留する可能性のある動物用医薬品フルメキン (FLU) とヘテロサクリックアミン 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MelQx)、食品に含まれる可能性がある CYP1A2 誘導剤 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) とヘテロサイクリックアミン 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) の組み合わせによる複合影響を取り上げ、食品中の様々な化学物質を複合摂取することによる酸化ストレスや *in vivo* 変異原性への複合影響を検討し、実用的な安全性評価に資するデータの蓄積を目指している。

B. 研究方法

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。

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。

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。

(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。

C. 研究結果

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 MeIQx 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 MeIQx 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。

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。

E. 結論

グルコン酸銅投与によりラット肝で銅の蓄積に起因すると考えられる酸化ストレスが誘発され、肝障害も認められた。しかし、今回の実験条件下ではグルコン酸銅と抗酸化物質との併用投与による複合影響は認められなかった。

肝炎を誘発する動物用医薬品 FLU と MeIQx の併用投与実験では、MeIQx の変異原性の増強が認められた。

β -NF と TBZ を併用投与すると、ラットならびにマウス肝臓中の *Cyp1a2* mRNA レベルの相加的誘導が認められた。一方、*gpt delta* ラットを用いて、IQ と CYP1A2 誘導剤を併用投与すると、IQ の変異原性は CYP1A2 誘導剤の併用投与によって減弱した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kuroiwa Y, Ishii Y, Umemura T, Kanki K,

- Mitsumori K, Nishikawa A, Nakazawa H, Hirose M. Combined treatment with green tea catechins and sodium nitrite selectively promotes rat forestomach carcinogenesis after initiation with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Cancer Sci.*, 98: 949-957, 2007.
- 2) 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.*, 99: 7-13, 2008.
- 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.*, 36: 353-361, 2008.
- 4) 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.*, 104: 274-282, 2008.
- 5) 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*, 257: 46-52, 2009.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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) 岡村俊也, 石井雄二, 井上知紀, 田崎雅子, 梅村隆志, 広瀬雅雄, 西川秋佳: グルコン酸銅摂取によるラット肝酸化的ストレスの誘発とカテコール併用投与による修飾効果の検討. 第24回日本毒性病理学会 2008年2月7日
- 2) 岡村俊也, 石井雄二, 井上知紀, 田崎雅子, 広瀬雅雄, 梅村隆志, 西川秋佳: グル

コン酸銅摂取によるラット肝酸化的ストレスの誘発と抗酸化物質併用投与による複合影響の検討. 第 35 回日本トキシコロジー学会 2008 年 6 月 27 日

3) 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 2008 年 10 月 28 日

4) 岡村俊也, 石井雄二, 井上知紀, 田崎雅子, 鈴木裕太, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: MeIQx のマウス肝 *in vivo* 変異原性に対する CCl₄ 誘発肝障害の増強効果. 第 36 回日本トキシコロジー学会 2009 年 7 月 7 日

5) 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

6) 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

7) 岡村俊也, 石井雄二, 井上知紀, 田崎雅子, 鈴木裕太, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: *p53* ノックアウト *gpt delta* マウス肝における MeIQx の変異原性に対する CCl₄ 誘発肝障害の修飾効果. 第 26 回日本毒性病理学会 2010 年 2 月 3 日

G. 知的所有権の取得状況

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）
分担総合研究報告書

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

Quercetin & curcumin（雌雄）、Indole-3-carbinol & hesperidin(雄)、および quercetin & catechin mixture（雄）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 により遺伝子発現変異を解析した。それぞれの複合投与において、諸臓器の病理学的変化は認められなかった。Quercetin と curcumin の実験において、単独投与と複合投与による変動遺伝子数は雌に顕著に差があり、複合投与におけるマウス肝薬物代謝、ストレス、毒性に係る遺伝子発現の影響は、Gad2, Cdkn1a, Pkm2, Fas1, Mt2, Igfbp6, Lta, Serpine1, Egr1, Nos2 などにみられ、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。Indole-3-carbinol と hesperidin の実験においては、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。マウス肝薬物代謝、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は認められなかった。

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 解析により遺伝子発現変異を明らかにする事で、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て、研究を実施した。

H19年度は、curcumin (C) と quercetin (Q) を雌雄のマウスに単独及び複合混餌投与して全臓器の病理組織学的変化、血液生化学的変化お

よび肝臓における遺伝子発現、主として薬物代謝酵素の変化を microarray にて解析して、雌雄の差および複合投与による健康影響についての基礎的資料を得ようとした。H20年度は indol-3-carbinol (I3C)と hesperidin (Hes)を雄性マウスに単独及び複合混餌投与して全臓器の病理組織学的変化、血液生化学的変化および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ようとした。本年度(21年度)は、20年度と同様に、quercetin(Q)と catechin

mixture(Cat mix)を雄性マウスに単独および複合混餌投与して、各解析を実施した。

B. 研究方法

H19年度：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。

H20年度：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。

H21年度：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。

(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) QとCの複合投与による影響

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、Mit2、Igfbp6、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。

(2) I3CとHesの複合投与による影響

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、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。

(3) Q と Cat mix の複合投与による影響

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。

D. 考察

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)。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ー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。

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。

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 (Cat mix) 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。この Cat mix および前述の Q の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 Q 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 Q 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。

E. 結論

発がん抑制を含む種々の生理活性が報告され

ている 2 種の化合物を選択して複合投与による影響を知る目的でマウスを使用した実験を実施した。選択した化合物の中では、複合投与において単独投与と比較して変動遺伝子数が顕著であった I3C および Hesperidin の組み合わせが、もっとも複合投与における健康影響が示唆された。この影響が、がんを含む疾病に対して抑制に働くか否かは、さらなる実験を要する。

さらに、複合投与による影響は雄に比べ雌に大きかった H19 年度の実験結果から、その雌雄差の原因も追究する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Narayan, B., Hosokawa, M., Yasui, Y., Suzuki, R., Kohno, H., Tanaka, T. and Kazuo Miyashita, K.: Chemopreventive effects of conjugated linolenic acid (CLN) occurring in plant seed oils. *Curr. Nutr. Food Sci.* 3: 309-318 (2007).
- 2) Tanaka, T. and Sugie, S.: Inhibition of colon carcinogenesis by dietary non-nutritive compounds. *J. Toxicol. Pathol.*, 20: 215-235 (2007).
- 3) Miyazawa, K., Miyamoto, S., Suzuki, R., Yasui, Y., Ikeda, R., Kohno, H., Yano, M., Tanaka, T., Hata K, and Suzuki, K.: Dietary beta-cryptoxanthin inhibits N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Oncol. Rep.*, 17: 297-304 (2007).
- 4) Makita, H., Mutoh, M., Maruyama, T., Yonemoto, K., Kobayashi, A., Fujitsuka, H., Toida, M., Shibata, T., Miyamoto, S., Yasui, Y., Suzuki, R., Wakabayashi, K. and Tanaka, T.: A prostaglandin E₂ receptor subtype EP₁-selective antagonist, ONO-8711, suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 28: