

201033044A

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

(H22-食品-一般-016)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅村 隆志

平成23(2011)年 5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
梅村隆志		

II. 分担研究報告

1. 食品中化学物質複合投与の <i>in vivo</i> 変異原性への影響	-----	11
梅村隆志		

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響	-----	24
西川秋佳		

3. 食品中残留農薬の複合暴露影響に関する研究	-----	36
原田孝則		

4. 異物代謝酵素誘導を指標とした食品中化学物質の複合影響	-----	189
出川雅邦		

5. 食品の複合反応が酸化および窒素化ストレスに与える影響	-----	197
中澤裕之		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	210
---------------------	-------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	211
-----------------	-------	-----

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：梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

食品中化学物質の複合影響による *in vivo* 変異原性、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して、以下の研究を行った。

食品中に含まれる代謝酵素誘導能を有する物質と発がん物質による複合影響を検索する目的で、第一相酵素 CYP1A2 を誘導するチアベンダゾール(TBZ)とβ-ナフトフラボン(β-NF)による相加作用が、CYP1A2 によって代謝活性化されるエストラゴール(ES)の *in vivo* 変異原性ならびに発がん性に及ぼす影響を検討した。*gpt delta* ラットにβ-NF 及び TBZ をそれぞれ 200 及び 100 ppm の濃度で飼料に混じ、ES を 200 mg/kg bw の濃度で 4 週間併用投与した。ES の投与により *gpt MF* の上昇傾向が認められ、肝前がん病変の指標である GST-P 陽性肝細胞巢の数及び面積ともに増加が認められた。CYP 誘導剤の併用投与は *gpt MF* に影響しなかったものの、GST-P 陽性肝細胞巢の数及び面積を増加させたことから、CYP 誘導剤の併用投与は ES の肝発がん性に促進効果を及ぼす可能性が示唆された。*In vivo* における CA と NaNO₂ の酸化ストレスを介した複合影響を検討した。6 週齢の雄性 F344 ラット 35 匹を、0.6%と 2.0% CA 及び 0.1%と 0.3% NaNO₂ をそれぞれ組みあわせた併用投与群の 4 群、2.0% CA 及び 0.3% NaNO₂ 単独群ならびに対照群を合わせた計 7 群に配し、CA は粉末飼料に、NaNO₂ は飲水に混じ、4 週間自由に摂取させた。病理組織学的検索の結果、肝臓において変化は認められなかったものの、前胃では過角化を伴う粘膜上皮の過形成が軽度認められた。肝臓では CA と NaNO₂ の複合反応で生成するベンゾキサジン誘導体が検出されたが、前胃粘膜及び肝臓 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)レベルならびに肝臓のチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)レベルに変化は認められなかった。これらの結果から、*in vivo* における CA と NaNO₂ の複合反応の進行が明らかになったが、ROS 生成を介した複合影響は認められなかった。類似の作用機序を持つ農薬群の単回複合経口投与による急性毒性影響を検索するため、有機リン剤(メタミドホス、パラチオン)、カーバメート剤(キシリルカルブ)、ニコチン製剤(50%硫酸ニコチン水溶液)を 8 週齢の雌性ラット(BrlHan:WIST@Jcl (GALAS)) に単剤あるいは複合投与した。その結果、同一の主作用(アセチルコリンエステラーゼ阻害)を有する有機リン剤とカーバメート剤の複合投与による影響は拮抗的であった(複合毒性強度 0.47~0.83)が、カーバメート剤とニコチン製剤との組合せでは相乗効果が認められた。一方、ニコチン製剤と有機リン剤の組合せでは、メタミドホスでは相乗的(複合毒性強度 1.13)、パラチオンでは拮抗的(複合毒性強度 0.59)と組合せによって逆の効果が認められた。次に、OECD 発達神経毒性試験ガイドライン(TG 426)に準拠して、パラチオン及びメタミドホスを各々単剤で、妊娠 6 日より哺育 21 日まで反復経口投与し、児動物の発達に及ぼす影響を検索するとともに、複合暴露

する際の用量設定を目的として実験を行った。その結果、パラチオンとメタミドホスの複合投与実験を行う際には、母動物に死亡や重篤な神経症状がみられず、児動物に何らかの影響を及ぼすと予測される用量(パラチオン 0.6 mg/kg/day、メタミドホス 0.8~1.0 mg/kg/day)を高用量に、また、低用量としてパラチオン 0.3 mg/kg/day、メタミドホス 0.4 mg/kg/day を設定するのが妥当であろうと考えられた。農薬を複合暴露した際のアレルギー性増強影響を検索する目的で、有機リン剤(パラチオン)及び有機塩素剤(メキシクロル)をそれぞれ雌性マウスに 5 日間反復経口投与(前処置)し、4 週間後にアレルギー反応が示唆される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)のアレルギー性反応の増強影響を Local Lymph Node Assay(LLNA 法)及び免疫担当細胞(T細胞)の解析により検索した。その結果、パラチオン及びメキシクロルの反復投与は 2,4-D-butyl ないしオイゲノール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。芳香族炭化水素受容体(AhR)レポーター細胞株である HepG2-A10 に対して、CYP1A 酵素誘導剤(3-メチルコランスレン(MC)、ベンゾ[a]ピレン(B[a]P)、β-ナフトフラボン(BNF)、あるいは7,12-ジメチルベンズアントラセン(DMBA))と食品添加物を複合処理し、AhR 活性化と CYP1A 酵素活性に及ぼす影響を解析した結果、CUR は種々 CYP1A 酵素誘導剤による AhR 活性化や CYP1A 酵素活性誘導に対して、6 時間処理では抑制作用を、24 時間処理では増強作用を示した。TBZ は MC や B[a]P による AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導を増強した。PG は、6 時間処理では CYP1A 酵素を阻害するが、24 時間処理では種々 CYP1A 酵素誘導剤による AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導を増強した。さらに、CUR には細胞内 MC 濃度を増加させる作用があることが明らかとなった。次に、プレグナン X 受容体(PXR)レポーター細胞株である HepG2-PXRLucA3 に対して、CYP3A 酵素誘導剤(リファンピシン(RIF)、ニカルジピン(NIC)、あるいはタモキシフェン(TAM))と食品添加物を複合処理し、PXR 活性化および CYP3A 遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。その結果、CUR は各 CYP3A 誘導剤による PXR 活性化や CYP3A 酵素遺伝子(CYP3A4 および CYP3A7)発現を抑制した。用いた他の食品添加物には PXR 活性化や CYP3A 酵素遺伝子をわずかに変動させるものもあったが、PXR 活性化と CYP3A 酵素遺伝子の変動パターンに相関性を示すものは見られなかった。コーヒー中に含まれるクロロゲン酸およびカフェイン酸について、ニトロ化反応によるラジカル発生能(Prooxidant)および抗酸化(Antioxidant)作用に及ぼす影響を検討した。その結果、ニトロ化によって Antioxidant 作用が上昇し、Prooxidant 作用が減弱する結果が得られた。しかし、一部の化合物においては、NO₂の産生が認められた。

研究分担者 梅村隆志

国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長

研究分担者 西川秋佳

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長

研究分担者 原田孝則

財団法人残留農薬研究所 理事

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 薬学部 教授

A. 研究目的

食品中には、食品添加物、残留農薬、種々

の汚染物質など多様な化学物質が含まれており、ヒトはそれを長期間摂取する可能性が高い。従って、複数の化学物質による健康影響を解析することの必要性が指摘されており、米国環境保護庁や欧州食品安全機関においても食品経由で暴露されるある特定の農薬群の累積影響評価法導入の検討が進められている。しかし、複数の化学物質による影響は、化学物質間の相互作用が相加、相乗あるいは拮抗作用として発現する場合があります。また、これらの発現パターンを単純に化学構造の類似性から予測することが出来ないことから、その解析は困難であるとされてきた。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、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。

エストラゴール (ES) はバジルやファンネルなどのハーブに含まれる天然の有機化合物で、香料として食品中に添加されている。ES は薬物代謝酵素 CYP1A2 により 1-hydroxyestragole に代謝された後、スルフォトランスフェラーゼ (SULT) の抱合を受け、1-sulfooxyestragole となり、DNA に共有結合することから、代謝活性化の第一段階である CYP1A2 は ES のマウス肝発がん過程において重要な代謝酵素である。そこで今回、TBZ と β -NF による相加作用が、CYP1A2 によって代謝活性化される ES の *in vivo* 変異原性ならびに発がん性に及ぼす影響を検討した。複合影響検索のための ES の投与量設定のための実験に続き、*gpt delta* ラットに β -NF と TBZ の 2 剤を ES と併用投与し、*in vivo* 変異原性及び発がん性への複合影響について検討した。

これまで「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」において報告さ

れた *in vitro* 試験系における複合影響について、*in vivo* 試験系で評価することを目的とし、平成 21 年度に中澤らが報告したカフェイン酸 (CA) と亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) の複合影響に注目した。CA と NaNO_2 の併用は *in vitro* において弱いながらも変異原性を示し、酸性条件下において二剤の反応で生成する 1, 2-(4H)-benzoxazin-4-one (以下 BZX 誘導体) 及び 2-oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2,5-oxadiazole (以下 OXZ 誘導体) の関与が疑われている。さらに中澤らは、CA と NaNO_2 を酸性条件下で反応させると活性酸素種 (ROS) が生成し、さらに反応生成物である BZX 及び OXZ 誘導体もそれぞれ ROS 生成能を有することを報告している。また、二剤を併用投与したラット肝臓で BZX 誘導体が検出されていることから、*in vivo* でも 2 剤の複合反応が進行すると考えられることから、F344 ラットに種々の濃度の CA 及び NaNO_2 を併用投与し、前胃と、肝臓において、酸化ストレスを介した複合影響の有無を検討した。

食品中に残留する農薬は個々のレベルでは微量で安全性に問題はないが、類似の作用機序を有する複数の農薬に複合的に暴露された場合での影響が懸念されている。この問題を解決するため、米国 EPA や欧州食品安全機関では、ある特定の農薬群を対象に累積リスク評価法を導入し、検討が進められている。この点を考慮し、本研究ではヒト健康影響へのリスク評価に必要な基礎的毒性情報を収集することを目的として、米国 EPA における累積リスク評価法の基盤農薬のひとつであるメタミドホスと同一あるいは類似の作用機序を有する農薬を組合せて雌性ラットの成獣に複合投与し、その毒性効果を検索した。また、メタミドホスと他の有機リン剤を組合せてラットの母動物

に複合投与し、経胎盤・経乳汁暴露を受けた児動物の発達神経系への影響を、機能学的及び形態学的手法を用いて検索した。さらに、有機リン剤などの殺虫剤を対象に、食品中の残留農薬が複合的に反復暴露された場合の免疫系への影響を実験動物で調査した。

肝シトクロム P450 (CYP) 分子種のうち、CYP1 および CYP3 ファミリー酵素は、多くの外来異物の代謝に関わっている。特に、CYP1A 酵素は発がん性多環式芳香族炭化水素類や芳香族アミン類の、CYP3A 酵素はアフラトキシンの代謝活性化に関わっており、これら CYP 分子種の発現変動は各動物・臓器の発がん感受性を理解する上で重要なものとなっている。したがって、食品中の化学物質による CYP1A および CYP3A 酵素の発現誘導への影響を把握することは、健康影響や安全性を考える上で重要である。CYP1A 酵素や CYP3A 酵素の誘導には、それぞれ化学物質に応答する受容体型転写因子である芳香族炭化水素受容体 (AhR) とプレグナン X 受容体 (PXR) が重要な役割を果たしている。そこで、化学物質による CYP1A あるいは CYP3A 酵素の誘導を簡便に解析することを目的として、ヒト AhR レポーター細胞株である HepG2-A10、およびヒト PXR レポーター細胞株である HepG2-PXRLucA3 をそれぞれ樹立し、種々食品添加物単独および種々の CYP1 や CYP3 ファミリー酵素誘導剤との複合暴露による CYP1 や CYP3A ファミリー酵素の発現誘導への影響について検討した。

茶葉に含まれるカテキン類やコーヒーなどに多く含まれるクロロゲン酸およびカフェイン酸 (CaA) に代表されるフェノール性化合物は抗酸化作用を有することから、本研究では、クロロゲン酸および CFA と NaNO₂ を併用することにより生成されるニトロ化合物について、ROS

および RNS の生成に関与しているかについて *in vitro* の系で検証した。

B. 研究方法

6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットに ES 600、200、66 及び 22 mg/kg bw を週 5 日、4 週間強制経口投与した。4 週間の投与後、肝臓を採取し、*gpt assay* では、肝から採取したゲノム DNA を用いて *gpt* 遺伝子変異頻度 (MF) を算出した。*gpt* 遺伝子配列をダイレクトシーケンスにより決定して変異スペクトラム解析を実施した。肝 DNA 中の ES 特異的 DNA 付加体の測定では、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を用いた。細胞増殖活性は抗 proliferative cell nuclear antigen (PCNA) 抗体を用いた免疫組織化学染色法により染色し、PCNA 陽性細胞数をカウントし、PCNA 陽性率を算出した。続いて、4 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラット 75 匹に CYP 誘導剤である β -NF 及び TBZ、それぞれ 200 及び 100 ppm の濃度で粉末飼料に混じた飼料を与え、ES 200 mg/kg bw を週 5 日、4 週間強制経口投与した。*CYP1A2* mRNA レベルは real time RT-PCR を用いて解析した。肝前がん病変の指標である GST-P 陽性肝細胞巢は抗 GST-P 抗体を用いた免疫組織化学染色法により染色し、その数及び面積は IPAP 画像解析装置を用いて解析した。

6 週齢の雄性 F344 ラット、各群 5 匹に、CA は 0.6 及び 2.0% の濃度で粉末飼料に、NaNO₂ は 0.1 及び 0.3% の濃度で飲水に混じ、それぞれを組み合わせた併用投与群の計 4 群と、2.0% CA 及び 0.3% NaNO₂ 単独群ならびに対照群を合わせた計 7 群に 4 週間自由に摂取させた。前胃粘膜および肝臓の DNA 中 8-OHdG レベルを HPLC/ECD 法を用いて測定

し、8-OHdG 値は 8-OHdG/10⁵dG 量として算出した。脂質過酸化はマロンジアルデヒド-チオバルビツール酸付加物を UV プレートリーダーによる 530 nm の吸光度測定により検出した。CA と NaNO₂ の反応で生成する BZX 及び OXZ 誘導体の分析は逆相系 ODS カラムを用いて HPLC により測定した。

メタミドホス、パラチオン、キシリルカルブ、50%硫酸ニコチン水溶液のそれぞれ単体あるいは 2 剤の混合液を 1%Tween80 水溶液に溶解後、8 週齢の Wistar Hannover 系 SPF 雌性ラットに強制経口投与した。全生存動物について、瀕死状態及び死亡の確認に加え、神経毒性症状を観察しスコア化し、投与 1、3、6 時間後に、翌日から投与 7 日後までは少なくとも 1 日 1 回、観察した。半数致死量は、Moving Average 法を用いて算出した。また、2 種類の有機リン系殺虫剤のパラチオン及びメタミドホスを各々、妊娠 6 日目の Wistar Hannover 系雌性ラットに対し、哺育 21 日まで反復経口投与した。実験はパラチオン投与群(用量:当初 1.0 mg/kg/day を設定、後に 0.8、0.6、0.3 mg/kg/day に順次変更)、メタミドホス投与群(1.0 mg/kg/day)及び対照群として媒体対照群(0 mg/kg/day)を設け、合計 3 群で行った。母動物の観察、母動物の体重、児動物の観察、児動物の体重、剖検及び組織採取、コリンエステラーゼ(ChE)活性の測定を検索した。さらに、殺虫剤の有機リン剤(パラチオン)ないし有機塩素剤(メトキシクロル)を 4 週齢の雌性 CBA/J マウス及び Balb/c 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 3 日間耳介後方の皮膚に経皮投与し、Local Lymph Node Assay(LLNA 法)を実施した。

AhR あるいは PXR レポーター細胞株を 48 時間前培養した後、被検化合物(クルクミン(CUR)、チアベンダゾール(TBZ)、ブチルヒドロキソトルエン(BHT)、および没食子酸プロピル(PG)および CYP 誘導剤(リファンピシン(RIF)、ニカルジピン塩酸塩(NIC)およびタモキシフェン(TAM)を添加し、一定時間処理した。処理後、AhR あるいは PXR 活性化能をルシフェラーゼアッセイにより測定し、また、CYP1A 酵素活性の測定、細胞内[³H]-MC 量の測定ならびに CYP3A 遺伝子発現量の測定を実施した。

人工胃液中におけるフェノール性化合物と NaNO₂ の反応を LC/MS および核磁気共鳴装置(NMR)により、生体内 pH におけるニトロ化合物の安定性を LC/UV により検討し、また、DPPH 法による Antioxidant 作用の評価、電子スピン共鳴装置(ESR)および HPLC/UV/ECD による Prooxidant 作用の評価ならびに Griess 法によるフェノール性化合物の RNS 発生の評価を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌投与ならびに熟練者による強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテルあるいはイソフルラン麻酔下で大動静脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」、「残留農薬研究所倫理規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、各機関の実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え

実験計画書を作成し、審査を受けた。また、放射性物質は、静岡県立大学ラジオアイソトープセンターにて、法令を遵守して厳重に取り扱った。

C. 研究結果

gpt MF は ES 200 mg/kg bw 投与群で対象群に比して約 2 倍の有意な上昇が認められた。また、例数の減少により有意な差は認められなかったが、600 mg/kg bw 投与群では 2 例とも対照群に比して約 6 倍の上昇が認められた。ES 特異的 DNA 付加体の定量結果から、ES-3'-N²-dG、ES-3'-C⁸-dG 及び ES-3'-N⁶-dA は、ES を投与したすべてのラット肝臓から検出され、200 mg/kg bw 投与群まで投与量依存的に増加した。PCNA 陽性肝細胞率は 200 mg/kg bw 投与群においてのみ対照群に比べ有意に上昇した。複合影響では、肝臓の *gpt* MF はいずれの ES 投与群においても対照群に比べ 4 倍程度の上昇傾向が認められたが、CYP 誘導剤の併用投与群において ES 単独群との差は認められなかった。一方、ES 群、ES+β-NF+TBZ 群及び ES+β-NF 群において、対照群に比して GST-P 陽性肝細胞巢の数及び面積の有意な増加が認められた。また、ES+β-NF+TBZ 群及び ES+β-NF 群では ES 群と比して数及び面積の増加傾向が認められた。

CA は CA を投与したすべての群の動物の肝臓で検出された。BZX 誘導剤は CA と NaNO₂ の併用投与群のラット肝臓において 9.4 から 12.9 nmol/mg protein の濃度で検出されたが、群間での差は認められなかった。また、OXZ 誘導剤はいずれの群のラットでも検出されなかった。ラット前胃粘膜 DNA 中の 8-OHdG レベルはいずれの併用投与群におい

ても対照群に比べ変化は認められなかった。また、肝臓における TBARS 及び 8-OHdG レベルも対照群に比べ変化は認められなかった。

下記農薬の単剤での LD₅₀ 値は、それぞれメタミドホス 10 mg/kg、パラチオン 1.1 mg/kg、キシリルカルブ 101 mg/kg、50%硫酸ニコチン水溶液 107 mg/kg であった。複合投与による LD₅₀ 値は、メタミドホス+パラチオン 6.9 mg/kg、メタミドホス+キシリルカルブ 95 mg/kg、メタミドホス+50%硫酸ニコチン水溶液 52 mg/kg、パラチオン+キシリルカルブ 108 mg/kg、パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液 91 mg/kg、キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液 86 mg/kg であった。また、単剤、複合投与の何れにおいても、それぞれ投与 1 時間後から種々の神経症状が認められた。発達神経毒性では、母動物のパラチオン投与群では妊娠期間中に攣縮(8 例)、振戦(5 例)など、哺育期間中は筋緊張低下(1 例)および皮膚色蒼白化(1 例)が認められた。メタミドホス投与群では、妊娠期間中に攣縮(5 例)が認められ、哺育期間中では筋緊張低下(3 例)、眼周囲部赤色物付着(1 例)、鼻周囲部被毛の汚れ(1 例)が認められた。血清の ChE 活性はメタミドホス投与群において有意差が認められ、脳 ChE 活性は各投与群で統計学的に有意な変化は認められなかったが、メタミドホス投与群では対照群の 21%に低下した。児動物では、哺育 4 日齢 (PND4) までにメタミドホス投与群において 1 例に体温低下が認められた。また、身体発育、性成熟、初期行動発達、学習と記憶、感覚機能、自発運動量の種々の指標ならびに脳重量に両投与群で変化が認められた。免疫毒性では、パラチオンならびにメキシクロル前処置群による低濃度でのオイゲノールの感作性誘発が認められた。

CUR は使用した全ての CYP1A 酵素誘導剤

による AhR 活性化をいずれも有意に増強した。TBZ は、MC と B[a]P の、PG は DMBA を除く全ての CYP1A 酵素誘導剤による AhR 活性化をいずれも増強した。一方、BHT は全ての CYP1A 酵素誘導剤による AhR 活性化をわずかに抑制した。CUR、TBZ および PG は、全ての CYP1A 酵素誘導剤による EROD 活性の誘導を有意に増強した。また、BHT は各 CYP1A 酵素誘導剤による EROD 活性の誘導に対して影響を与えなかった。CUR は 6 時間後の細胞内 [³H]-MC 蓄積量を有意に増加させたが、TBZ による蓄積量の増加は見られなかった。CUR は、使用した各 CYP3A 酵素誘導剤による PXR 活性化に対して強い抑制作用を示した。TBZ は CYP3A 酵素誘導剤による PXR 活性化をわずかに増強し、また PG はわずかに抑制した。CUR あるいは BHT は、TAM および NIC による CYP3A4 発現誘導を有意に抑制し、また、RIF による同遺伝子発現誘導に対しても抑制傾向を示した。一方、TBZ および PG は、各 CYP3A 酵素誘導剤による CYP3A4 発現誘導に影響を与えなかった。CUR は NIC による、また PG は TAM による CYP3A5 発現誘導を抑制したが、他の誘導剤による CYP3A5 発現誘導には影響を与えなかった。CUR は用いた CYP3A 酵素誘導剤に対して抑制作用を示した。また、PG は NIC および TAM による誘導を抑制した。

コーヒーに含まれているクロロゲン酸、CaA 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。また、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反応が引き起こされ、ニトロ化反応を受けた化合物は Antioxidant 作用が増強す

ることが示唆された。さらに、Prooxidant 作用はニトロ化反応を受けることで減少した。しかし、一部のニトロ化合物は NO₂ を産生することが明らかとなった。

D. 考察

ES はラット肝臓において *gpt* MF の上昇を引き起こすことが明らかにされた。また、ES 特異的 DNA 付加体はすべての ES 投与群で検出され、PCNA 陽性肝細胞率の上昇も認められ、ES のラット肝臓がん性には遺伝毒性メカニズムに加え、細胞増殖活性の亢進が関与する可能性が示唆された。ES 200 mg/kg bw を投与したラット肝臓では、*gpt* MF の有意な上昇が認められた。CYP 誘導剤を併用投与した群では β-NF 及び TBZ それぞれ単独を ES と併用した群に比べ、相加的な CYP1A2 の mRNA 発現レベルの増加が認められたが、各群 3 例の *gpt* assay の解析結果においては、ES の *in vivo* 変異原性に対する CYP 誘導剤の併用投与の影響は認められなかった。一方、β-NF+TBZ の併用投与群で ES 投与による GST-P 陽性肝細胞巢の面積が有意に増加したことから、β-NF+TBZ の併用投与によりプロモーション活性が上昇している可能性が考えられた。

in vitro では、酸性条件下 CA と NaNO₂ の反応により ROS 生成が報告されている。また、ROS 生成能を有する複合反応生成物 BZX 誘導剤が、CA と NaNO₂ を併用投与したラット肝臓で検出されることが明らかにされている。しかしながら、本研究結果において前胃と肝臓の酸化的 DNA 損傷レベル及び肝臓の脂質過酸化レベルの変化は認められなかった。一方、酸性条件下 CA と NaNO₂ の反応で生成する BZX 誘導剤は、本実験条件下においてもラット肝臓から検出されており、*in vivo* における 2

剤の複合反応の進行が確認されたことから、反応過程で生成したと考えられる ROS 量は生体内の抗酸化システムにより抑制可能なレベルであったと考えられた。

今回用いた農薬の単回投与による複合暴露実験では、有機リン剤とカーバメート剤の組合せでは拮抗的に作用し、ニコチン製剤とカーバメート剤の組合せでは軽度ながら相乗効果がみられた(複合毒性強度 1.21)。一方、ニコチン製剤と有機リン剤との組合せでは、メタミドホスとでは相乗的に、パラチオンとでは拮抗的に作用し、剤の組合せによって逆の結果が得られた。このことは、複合毒性の予測の困難さを示すものであり、複数の農薬の複合暴露影響あるいは累積毒性の評価は、農薬群ごとに幾多の実験的検証を重ねた上で慎重に行う必要があることが示唆された。パラチオンとメタミドホスの複合投与実験を実施する際には、母動物の死亡や哺育に支障をきたすような重篤な神経症状を発現せず、かつ、児動物に何らかの影響を及ぼす可能性のある用量(パラチオン 0.6 mg/kg/day、メタミドホス 0.8 mg/kg/day)を高用量に、また、無毒性量として予測される用量(パラチオン 0.3 mg/kg/day、メタミドホス 0.4mg/kg/day)を低用量に設定することが妥当であろうと考えられた。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 及び Balb/c マウスに前処置として 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、近傍リンパ節中の T 細胞分類及びサイトカイン産生量、を測定することで評価した。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。

4 種の食品添加物(CUR, TBZ, PG および BHT)のそれぞれ単独および、それらをそれぞれ CYP1A 誘導剤や CYP3A 酵素誘導剤と複合暴露した場合の CYP1A および CYP3A 酵素発現誘導について、ヒト肝癌由来細胞を用いて検討した。その結果、BHTを除く3種の食品添加物には CYP1A や CYP3A 酵素の発現誘導を変動させる作用があることが明らかになった。なかでも CUR は、CYP1A 酵素誘導剤や CYP3A 酵素誘導剤の作用をそれぞれ増強および減弱させる効果を有しており、生活環境中に存在する様々な CYP1A 誘導剤および CYP3A 酵素誘導剤(医薬品を含む)との相互(併用)作用が危惧される。今後、各化合物の特徴を踏まえた、化学物質の複合影響についての更なる解析が必要である。

生体内でニトロ化反応を受け、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、RNS の増加が認められたことから、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。

E. 結論

食品中化学物質の複合影響は物質の組み合わせにより、相加、相乗、拮抗作用を示す場合があった。体系的評価法確立のためには、今後もデータの蓄積を要することが明らかとなった。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukuyama, T., Kosaka, T., Tajima, Y., Ueda, H., Hayashi, K., Shutoh, Y., and Harada, T. Prior exposure to organophosphorus and organochlorine pesticides increases the allergic potential of environmental chemical allergens in a local lymph node assay. *Toxicol Lett.*, 199, 347-56, 2010.

Fukuyama, T., Kosaka, T., Tajima, Y., Hayashi, K., Shutoh, Y., and Harada, T. Detection of thymocytes apoptosis in mice induced by organochlorine pesticides methoxychlor. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 33, 193-200, 2011.

2. 学会発表

北澤隆宏、鈴木裕太、木島綾希、日比大介、金美蘭、児玉幸夫、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳:食品中 CYP1A2 誘導剤の複合投与による estragole の *in vivo* 変異原性 第27回日本毒性病理学会 (大阪、2010年1月)

石井雄二、岩崎雄介、鈴木裕太、日比大介、金美蘭、北澤隆宏、梅村隆志、中澤裕之、西川秋佳:カフェイン酸と亜硝酸ナトリウムの *in vitro* 及び *in vivo* における複合影響 第27回日本毒性病理学会及び学術集会 (大阪、2010、1月)

首藤康文、齋島淳子、藤江秀彰、小松豊、青山博昭、原田孝則:有機リン剤とカーバメート剤及びニコチン製剤のラットにおける急性経口複合投与影響、第151回日本獣医学会学術集会(東京、2011)

藤江秀彰、小松豊、齋島淳子、首藤康文、青山博昭、原田孝則:化学物質の発達神経

毒性評価手法について-溶媒による妊娠および児動物への影響-、第44回日本実験動物技術者協会総会(旭川、2010)

小松豊、齋島淳子、首藤康文、青山博昭、原田孝則:化学物質の発達神経毒性評価手法について-溶媒による妊娠および児動物への影響-、藤江秀彰、第44回日本実験動物技術者協会総会(旭川、2010)

関本征史、保坂卓臣、根本清光、梅村隆志、西川秋佳、出川雅邦:ベンズイミダゾール系防カビ剤 Thiabendazole が芳香族炭化水素受容体の活性化に及ぼす影響、フォーラム2010衛生薬学・環境トキシコロジー、要旨集、p.169、2010年9月9日

Masakuni Degawa, Masahi Sekimoto and Kiyomitsu Nemoto: Effects of food additives on 3-methylcholanthrene-mediated activation of aryl hydrocarbon receptor in human hepatoma HepG2- A10 cells. *The 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences*, Oct. 16, 2010

田中裕有、関本征史、西川秋佳、梅村隆志、根本清光、出川雅邦:種々医薬品の PXR 活性化に及ぼす食品中化学物質の影響、日本薬学会第131年会、要旨集3、237、2011年3月30日

平澤貴之、丸山陽介、岩崎雄介、石井雄二、梅村隆志、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之:食品関連フェノール性化合物と金属の相互作用によるヒドロキシルラジカルの生成、第71回分析化学討論会 2010年5

月15日-16日 島根

岩崎 雄介、平澤 貴之、中野 有紀、石井 雄二、伊藤 里恵、梅村 隆志、斉藤 貢一、西川 秋佳、中澤 裕之:クロロゲン酸およびカフェイン酸と亜硝酸ナトリウム併用投与による活性酸素種産生、第23回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2010年7月21日-23日 宮城

平澤 貴之、大八木 章仁、岩崎 雄介、石井 雄二、梅村 隆志、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とグルコン酸銅の併用によるDNA の酸化的損傷、第23回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2010年7月21日-23日 宮城

平澤 貴之、大八木 章仁、岩崎 雄介、石井 雄二、梅村 隆志、伊藤 里恵、斉藤 貢一、西川 秋佳、中澤 裕之:食品中のフェノール性化合物の複合反応が酸化ストレスに与える影響、環境・衛生部会 フォーラム2010環境衛生トキシコロジー 2010年9月9日-10日 東京

平澤 貴之、大八木 章仁、岩崎 雄介、石井 雄二、梅村 隆志、伊藤 里恵、斉藤 貢一、西川 秋佳、中澤 裕之:カテキン類とグルコン酸銅の併用による活性酸素種生成、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 2010年9月16日-17日 熊本

平澤 貴之、大八木 章仁、丸山 陽介、岩崎 雄介、石井 雄二、梅村 隆志、伊藤 里恵、斉藤 貢一、西川 秋佳、中澤 裕之:食品関連フェノール性化合物の複合反応によるDNAの酸化的損傷、第131回 日本薬学会 2011年3月28日-31日 静岡

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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：食品中化学物質複合投与の *in vivo* 変異原性への影響

研究分担者： 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

食品中に含まれる代謝酵素誘導能を有する物質と発がん物質による複合影響の解明を目的とし、第一相酵素 CYP1A2 を誘導するチアベンダゾール (TBZ) とβ-ナフトフラボン (β-NF) による相加作用が、CYP1A2 によって代謝活性化されるエストラゴール (ES) の変異原性ならびに発がん性に及ぼす影響を検討した。【実験 1】では *gpt* 遺伝子変異頻度 (MF) の上昇が認められる ES の最低投与量を明らかにするため、雄性 *gpt delta* ラットに 4 週間、種々の用量の ES を強制経口投与した。*gpt* assay の結果、ラット肝臓では 200 mg/kg bw 以上の投与群で *gpt* MF の上昇が認められた。また、肝 DNA 中の ES 特異的 DNA 付加体は 200 mg/kg bw 投与群まで投与量依存的に増加し、PCNA 陽性細胞率は 200 mg/kg bw 投与群で有意に上昇したことから、【実験 2】で用いる ES の濃度を 200 mg/kg bw とした。【実験 2】では CYP1A2 の相加的誘導と ES による複合影響を検討するため、*gpt delta* ラットにβ-NF 及び TBZ をそれぞれ 200 及び 100 ppm の濃度で飼料に混じ、ES を 200 mg/kg bw の濃度で 4 週間併用投与した。ES の投与により *gpt* MF の上昇傾向が認められ、肝前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢の数及び面積ともに増加が認められた。さらに、CYP 誘導剤の併用投与は ES の *gpt* MF に影響しなかったものの、ES による GST-P 陽性細胞巢の数及び面積を増加させたことから、CYP 誘導剤の併用投与は ES の肝発がん性に影響を及ぼす可能性が示唆された。

A. 研究目的

エストラゴール (ES) はバジルやファンネルなどのハーブに含まれる天然の有機化合物で、香料として食品中に添加されている。しかしながら、マウスにおいて肝発がん性が報告されており、ラットでは 600 mg/kg bw の用量で 16 週間投与することで肝前がん病変の指標である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢の数及び面積の上昇を明らかにしている。また、種々の変異原性試験では陰

性を示すものの、ポストラベル法により DNA 付加体の形成も明らかになっていることから ES の発がん性には遺伝毒性メカニズムの関与が示唆されている。ES は薬物代謝酵素 CYP1A2 により 1-hydroxyestragole に代謝された後、スルフトランスフェラーゼ (SULT) の抱合を受け、1-sulfooxyestragole となり、DNA に共有結合することから、代謝活性化の第一段階である CYP1A2 は ES のマウス肝発がん過程において重要な代謝酵素である。昨年度の本

研究班において、我々は食品中に含まれる CYP1A2 誘導剤であるβ-ナフトフラボン (β-NF) 及びチアベンダゾール (TBZ) を用いて、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) の *in vivo* 変異原性に及ぼす CYP1A2 誘導剤の影響について報告している。本年度は被験物質を ES とし、TBZ と β-NF による相加作用が、CYP1A2 によって代謝活性化されるエストラゴール (ES) の変異原性ならびに発がん性に及ぼす影響を検討した。【実験 1】ラット肝臓における ES の *in vivo* 変異原性の検索と、【実験 2】で用いる ES の投与量設定を目的とし、*gpt delta* ラットに種々の濃度の ES を処置し、肝臓における *gpt* 遺伝子突然変異頻度 (MF) の検索と、*gpt* MF の上昇が認められる最低濃度について検討した。【実験 2】では *gpt delta* ラットにβ-NF と TBZ の 2 剤を ES と併用投与し、ES の肝臓における *in vivo* 変異原性及び発がん性への複合影響について検討した。

B. 研究方法

【実験 1】動物は 6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラットを日本 SLC 社から購入し、実験に供した。

動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 又は 3 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。エストラゴールの濃

度は 16 週間の投与で GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な上昇が認められた 600 mg/kg bw を最高用量とし、公比 3 で除した 200、66 及び 22 mg/kg bw とし、週 5 日間で 4 週間強制経口投与した。対照群には被験物質の溶媒として用いたコーンオイルを投与した。試験期間中、DW 水の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。また、体重および飲水量の測定は週 1 回行った。

4 週間の投与後、動物はイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓を採取し、重量を測定した。肝臓の一部を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、その他を *gpt* assay 用および ES 特異的 DNA 付加体の測定用サンプルとして液体窒素により凍結し、測定まで -80°C で保存した。

gpt assay では、肝から採取したゲノム DNA と Transpack (Stratagene) を用いて、 λ ファージの *in vitro* パッケージング反応を行い、ゲノム DNA から λ EG10DNA をファージ粒子として回収した。

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

Cm に耐性となったコロニーの *gpt* 遺伝子配列を決定して変異部位を同定した。

肝 DNA 中の ES 特異的 DNA 付加体の測定では、DNA を DNA エキストラクター WB キット (和光純薬社製) で抽出し、nuclease P1 と alkaline phosphatase により消化した。得られた試料は液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて測定した。LC はアジレントテクノロジー社製 HP1100 シリーズを使用し、MS/MS はマイクロマス社製 Quattro Ultima を用いた。測定はエレクトロスプレーイオン化法のポジティブイオンモードを用い、MRM モニタリングで測定した。各付加体の検出イオンは ES-3' -N2-dG 及び ES-3' -C8-dG 付加体を m/z 414>298、ES-3' -N6-dA を m/z 398>282 に設定した。カラムは関東化学社製の ODS カラム (Mightysil C18-GP、2.0 x 150 mm、5 μ m) を用い、0.001%ギ酸/アセトニトリル=75/25 の移動相で安定化させた後、サンプルを 20 μ L 注入し、グラジエントシステムを用いて 30 分間で 0.001%ギ酸/アセトニトリル=30/70 にすることで各付加体を溶出させた。各付加体の定量にはそれぞれの安定同位体を用いた内標準法を採用し、標準品を用いて作成した検量線から濃度を算出した。

細胞増殖活性は proliferation cell nuclear antigen (PCNA) の免疫組織化学染色法により染色し、約 1000 個の核をカウントし、PCNA 陽性率を算出した。

【実験 2】動物は 4 週齢の雄性 F344 *gpt* delta ラット 75 匹を日本 SLC 社から購入し、実験に供した。動物の飼育は【実験 1】と同様の方法で行った。CYP 誘導剤である β -NF 及び TBZ は昨年度の検討結果から、それぞ

れ 200 及び 100 ppm の濃度で粉餌に混じた。ES の濃度は【実験 1】で *gpt* MF の有意な上昇が認められた最低濃度である 200 mg/kg bw とし、週 5 日間で 4 週間強制経口投与した。ES+ β -NF+TBZ、ES+ β -NF 群、ES+TBZ 群と ES 単独投与群および対照群の計 5 群を設けた。対照群には被験物質の溶媒として用いたコーン油を投与した。一般状態観察、解剖時の処置ならびにサンプル採取、保存等は実験 1 と同様の方法で行った。また、サンプルの一部は mRNA 解析用サンプルとするため ISOGEN (ニッポン・ジーン社製) に加え、ホモジナイズの後凍結した。

CYP1A2 mRNA レベルは real time RT-PCR を用いて解析した。肝前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢は免疫組織化学染色法により染色し、その数及び面積を解析した。*gpt* assay は【実験 1】と同様の方法で行った。

(統計学的処理方法)

実験 1 の結果については、Two-way ANOVA を行った後、Dunnett の多重比較あるいは Student-Welch 検定を行った。実験 2 の結果については、対照群と各投与群について F 検定を行った後、t 検定を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌投与ならびに熟練者による強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、

DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

C. 研究結果

【実験 1】試験期間中の一般状態観察結果から、ES 600 mg/kg bw を投与したラットでは試験開始 1 週目より 1 例、2 週目に 2 例の途中死亡が認められた。また試験期間中の体重の推移は、ES 600 mg/kg bw を投与した群で試験開始 1 週目に ($p < 0.01\%$)、200 mg/kg bw を投与した群で試験開始 3 週目 ($p < 0.05\%$) と 4 週目 ($p < 0.01\%$) に対照群と比べ有意な低値を示した。摂餌量は対照群、ES 22、66 及び 200 mg/kg bw 投与群では 11.1 から 14.1 g/rat/day の範囲で推移したのに対し、600 mg/kg bw 投与群では 4.3 から 11.7 g/rat/day の範囲で推移し、定値を示した。最終体重と肝絶対及び相対重量を Table 1 に示す。肝相対重量において ES 200 mg/kg bw 投与群で対照群に比して有意な増加が認められた。また、600 mg/kg bw 投与群においても増加傾向が認められたが、途中死亡による例数の減少により有意差は認められなかった。肝臓における *gpt* MF を Table 2 に示す。*gpt* MF は 200 mg/kg bw 投与群で対象群に比して約 2 倍の有意な上昇が認められた。また、例数の減少により有意な差は認められなかったが、600 mg/kg bw 投与群では 2 例とも対照群に比して約 6 倍の上昇が認められた。ES 特異的 DNA 付加体の定量結果を Fig. 1 に示す。ES-3' -N2-dG、ES-3' -C8-dG 及び ES-3' -N6-dA は、ES を投与したすべてのラット肝臓から検出され、200 mg/kg bw 投与

群まで投与量依存的に増加した。

免疫組織化学染色法により検出した PCNA 陽性細胞率を Fig. 2 に示す。PCNA 陽性細胞率は 200 mg/kg bw 投与群においてのみ対照群に比べ有意に上昇した。

【実験 2】試験期間中の一般状態観察結果において変化は認められなかった。また、試験期間中の体重の推移は、ES+ β -NF 群及び ES+ β -NF+TBZ 群で試験開始 2 週目以降に対照群に比べ有意な低値を (2 週目 $p < 0.05\%$ 、3 及び 4 週目 $p < 0.01\%$)、ES+TBZ 群では 4 週目に有意な低値 ($p < 0.05\%$) を示した。摂餌量はいずれの群においても差は認められず、14.0 から 18.1 g/rat/day の範囲で推移した。最終体重、肝絶対及び相対重量を Table 3 に示す。肝相対重量は ES 群、ES+ β -NF+TBZ 群及び ES+ β -NF 群の動物において対照群に比して有意に上昇した。ラット肝臓における *Cyp1A2* mRNA 発現レベルを Fig. 3 に示す。CYP 誘導剤を併用投与したすべての群で ES 単独群に比べ有意な上昇が認められた。肝臓の *gpt* MF を Table 4 に示す。各群 3 例の解析結果では、いずれの ES 投与群においても対照群に比べ 4 倍程度の上昇傾向が認められたが、CYP 誘導剤の併用投与群において ES 単独群との差は認められなかった。Fig. 6 に免疫組織化学染色法による GST-P 陽性細胞巢の検出結果を示す。ES 群、ES+ β -NF+TBZ 群及び ES+ β -NF 群において、対照群に比して GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の増加が認められた。また、ES+ β -NF+TBZ 群及び ES+ β -NF 群では ES 群と比して数及び面積の増加傾向が認められた。

D. 考察

【実験 1】本研究結果において、ES はラッ

ト肝臓において *gpt* MF の上昇を引き起こすことが明らかにされた。また、ES 特異的 DNA 付加体はすべての ES 投与群で検出され、PCNA 陽性細胞率の上昇も認められ、ES のラット肝発がん性には遺伝毒性メカニズムと細胞増殖活性の亢進が寄与する可能性が示唆された。一方、本実験では 600 mg/kg bw を投与した動物において 3 例の途中死亡が認められた。また、ES 特異的付加体量ならびに PCNA 陽性率は 200 mg/kg bw 投与群まで上昇し、600 mg/kg bw 投与群では 200 mg/kg bw よりも低下したことから、本実験条件下において ES 600 mg/kg bw は毒性用量であると判断し、*gpt* MF の上昇が認められる ES の最低投与量を 200 mg/kg bw に設定した。

【実験 2】ES 200 mg/kg bw を投与したラット肝臓では【実験 1】の結果と同様に、*gpt* MF の有意な上昇が認められた。さらに肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の増加は、我々の過去の研究と一致しており、ES のラット肝発がん性を有する可能性を支持する結果であった。CYP 誘導剤を併用投与した群では β -NF 及び TBZ それぞれ単独を ES と併用した群に比べ、2 剤を ES と併用投与した群では相加的な *CYP1A2* の mRNA 発現レベルの増加が認められたが、各群 3 例の *gpt* assay の解析結果においては、ES の *in vivo* 変異原性に対する CYP 誘導剤の併用投与の影響は認められなかった。今後、さらなる解析を行い、統計学的処理を加えて最終的な考察をする予定である。一方、 β -NF+TBZ の併用投与群で ES 投与による GST-P 陽性細胞巢の面積が数に比べて顕著に増加したことから、 β -NF+TBZ の併用投与によりプロモーション活性が上昇してい

る可能性が考えられた。また、TBZ 群では GST-P 陽性細胞巢の有意な抑制が認められたが、その理由についてはさらなる解析を実施し、その結果を持って考察する。

E. 結論

gpt delta ラットを用いた【実験 1】及び【実験 2】の結果から、ES が直接的 DNA 損傷を介した遺伝毒性メカニズムによるラット肝発がん性を有する可能性が示唆された。一方、ES の代謝活性化に寄与する *CYP1A2* 誘導剤の併用投与は ES の *in vivo* 変異原性には影響しないと考えられたものの、ES による肝前がん病変への影響が示唆された。今後、【実験 2】における特異的 DNA 付加体量ならびに細胞増殖関連遺伝子の解析等を実施し、CYP 誘導剤の併用投与による ES への複合影響について検討する。

F. 研究発表

北澤隆宏、鈴木裕太、木島綾希、日比大介、金美蘭、児玉幸夫、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳：食品中 *CYP1A2* 誘導剤の複合投与による estragole の *in vivo* 変異原性 第 27 回日本毒性病理学会 2010 年 1 月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

Table 1 最終体重と絶対及び相対肝重量【実験1】

Dose (mg/kg bw)	No. of animals	Body weight (g)	Liver	
			Absolute (g)	Relative (g%)
0	5	236.9 ± 10.6	9.67 ± 0.53	4.09 ± 0.19
22	5	243.8 ± 12.1	10.43 ± 1.04	4.27 ± 0.24
66	5	237.0 ± 6.4	10.20 ± 0.30	4.30 ± 0.16
200	5	212.1 ± 5.0	9.60 ± 0.35	4.53 ± 0.13 *
600	2	179.6	9.86	5.49

*: p<0.01 vs. ES 0 mg/kg bw treated group.

Table 2 *gpt*遺伝子突然変異頻度【実験1】

Dose (mg/kg bw)	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
0	101	2.66	1	0.38	0.41 ± 0.20
	102	3.20	2	0.63	
	103	4.46	1	0.22	
22	201	2.21	2	0.91	0.45 ± 0.45
	202	4.50	2	0.44	
	203	2.21	2	0.91	
	204	2.25	0	0.00	
	205	3.92	0	0.00	
66	301	2.70	4	1.48	0.48 ± 0.70
	302	4.05	0	0.00	
	303	2.21	1	0.45	
	304	2.43	0	0.00	
200	401	2.48	3	1.21	0.98 ± 0.41*
	402	3.47	5	1.44	
	403	2.93	3	1.03	
	404	2.79	1	0.36	
	405	2.34	2	0.85	
600	504	2.70	8	2.96	2.92
	505	3.47	10	2.89	

*: p<0.01 vs. ES 0 mg/kg bw treated group.

Table 3 最終体重と絶対及び相対肝重量【実験2】

Group	No. of animals	Body weight (g)	Liver	
			Absolute (g)	Relative (g%)
Control	15	271.9 ± 19.3	10.53 ± 0.84	3.89 ± 0.16
ES	15	252.9 ± 15.3	10.24 ± 0.89	4.07 ± 0.32
ES+β-NF+TBZ	15	238.3 ± 12.5**	10.01 ± 0.78	4.20 ± 0.14**
ES+β-NF	15	234.7 ± 14.4**	9.60 ± 0.76	4.09 ± 0.11*
ES+TBZ	15	247.9 ± 21.1*	9.93 ± 0.97	4.00 ± 0.15

*, **, p<0.05, 0.01 vs. Control group.