

mg/kg 前処置群で、TNF- α はパラチオン 0.4 及び 1.2 mg/kg 前処置群、メトキシクロル 300 mg/kg 前処置群で、IL-17 はパラチオン 0.4 及び 1.2 mg/kg 前処置群、メトキシクロル 100 及び 300 mg/kg 前処置群で対照群と比較して有意に増加した。

オイゲノールの感作では、パラチオン及びメトキシクロル前処置群のいずれも、サイトカイン産生量が用量相関性に増加した。IFN- γ はパラチオン 0.4 及び 1.2 mg/kg、メトキシクロル 300 mg/kg 前処置群で、TNF- α はパラチオン 0.4 及び 1.2 mg/kg、メトキシクロル 100 及び 300 mg/kg 前処置群で、IL-17 はパラチオン 1.2 mg/kg 及びメトキシクロル 300 mg/kg 前処置群で対照群と比較して有意に増加した。

D. 考察

本研究では、有機リン剤のパラチオン及び有機塩素剤のメトキシクロルをそれぞれ4週齢時の雌性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、フェノキシ酢酸系除草剤の 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸ブチル (2,4-D-butyl) ないし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)、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により評価した。

有機リン剤及び有機塩素剤の免疫系への影響に関しては、反復経口投与による特異的抗体価の抑制作用²⁴⁾、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⁵⁾、免疫抑制作用を主体とした免疫毒性が共通して示唆されている。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⁶⁾。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効果はほとんど報告されていない。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想定し、本研究を企画した。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。また、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 ないしオイゲノールの LLNA 法を実施した結果、リンパ球細胞増殖活性 (³H-methyl thymidine 取込量) 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。また、耳介リンパ節中の T 細胞数 (ヘルパー及び細胞傷害性)、Th1 型サイトカイン産生量 (IFN- γ 、TNF- α 、IL-17) について測定を実施した結果、いずれもパラチオン及びメトキシクロル投与群で用量相関性の増加が認められた。

上記の結果から、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

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⁷⁾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および結果を裏付ける証拠の一つであると考えられた。

E. 結論

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。

F. 引用文献

1) Dearman, R. J., Basketter, D. A., and Kimber, I. Local lymph node assay: use in hazard and risk assessment. *J Appl Toxicol* 19, 299-306, 1999.

- 2) Saha S and Banerjee BD. Effect of sub-chronic Lindane exposure on humoral and cell-mediated immune responses in albino rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 795-802, 1993.
- 3) Banerjee BD, Remachandran and Hussain QZ. Sub-chronic effect of DDT on humoral immune response in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 37, 433-440, 1986.
- 4) Crittenden PL, Carr R and Prurtt SB. Immunotoxicological assessment of Methyl parathion in female B6C3F1 mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 54, 1-20, 1998.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Sobel ES, Gianini J, Butfiloski EJ, Croker BP, Schiffenbauer J, Roberts SM. Acceleration of Autoimmunity by Organochlorine Pesticides in (NZB × NZW)F1 Mice *Environ. Health Persp.*, 113, 323-328, 2005.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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

- 1) 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：有機リンおよび有機塩素化合物の経口投与による化学物質アレルギー増強作用の検出 第17回日本免疫毒性学会学術大会、2010年

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1. LLNA assay data of 2,4-D-butyl pretreated with Parathion

Treatment at 4wk (Parathion)	Dose of LLNA (2,4-D-butyl)	Final BW (g; mean \pm SD)	Lymph node weight (mg; mean \pm SD)	^3H -TdR incorporation	
				dpm (mean \pm SD)	SI ^a
0 mg/kg	0 %	20.8 \pm 1.2	3.85 \pm 0.90	134 \pm 40	1.0
	2.5 %	21.1 \pm 3.2	4.48 \pm 1.27	222 \pm 52*	1.7
	5 %	21.7 \pm 2.6	4.70 \pm 0.70	322 \pm 49**	2.4
	10 %	21.4 \pm 1.6	6.26 \pm 1.02**	461 \pm 42**	3.5
0.4 mg/kg	0 %	21.0 \pm 1.1	3.20 \pm 0.80	130 \pm 38	1.0
	2.5 %	21.4 \pm 1.6	5.58 \pm 0.87*	601 \pm 252	4.6
	5 %	20.9 \pm 1.6	6.75 \pm 1.55**	1054 \pm 294	8.1
	10 %	21.8 \pm 1.1	9.66 \pm 0.81**	2107 \pm 832**	16.1
1.2 mg/kg	0 %	20.9 \pm 1.6	3.88 \pm 0.22	129 \pm 52	1.0
	2.5 %	21.2 \pm 1.1	8.45 \pm 1.19**	816 \pm 367	6.3
	5 %	21.0 \pm 1.1	11.56 \pm 1.86**	2106 \pm 683**	16.3
	10 %	21.5 \pm 1.6	12.52 \pm 2.22**	2957 \pm 243**	22.9

The SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. *p < 0.05; ** p < 0.01.

Table 2. LLNA assay data of Eugenol pretreated with Parathion

Treatment at 4wk (Parathion)	Dose of LLNA (Parathion)	Final BW (g; mean \pm SD)	Lymph node weight (mg; mean \pm SD)	^3H -TdR incorporation	
				dpm (mean \pm SD)	SI
0 mg/kg	0 %	20.3 \pm 2.5	3.85 \pm 1.14	304 \pm 208	1.0
	5 %	20.7 \pm 1.4	5.28 \pm 0.77	593 \pm 159	2.0
	10 %	20.8 \pm 1.2	6.15 \pm 0.62	2287 \pm 705	7.5
	25 %	20.5 \pm 1.6	10.54 \pm 1.93**	8964 \pm 2588**	29.5
0.4 mg/kg	0 %	20.6 \pm 1.3	3.70 \pm 0.48	205 \pm 133	1.0
	5 %	20.2 \pm 1.5	4.35 \pm 1.41	972 \pm 448	4.7
	10 %	20.7 \pm 1.9	8.03 \pm 0.99**	2931 \pm 1843	14.3
	25 %	20.5 \pm 1.5	12.44 \pm 1.80**	11492 \pm 2841**	56.1
1.2 mg/kg	0 %	20.8 \pm 1.8	4.50 \pm 1.14	302 \pm 170	1.0
	5 %	20.7 \pm 1.3	7.58 \pm 1.72	2648 \pm 1392	8.8
	10 %	21.2 \pm 1.1	11.46 \pm 3.20**	6947 \pm 3184**	23.0
	25 %	20.0 \pm 1.2	14.76 \pm 2.64**	13775 \pm 2869**	45.6

The SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. *p < 0.05; ** p < 0.01.

Table 3. LLNA assay data of 2,4-D-butyl pretreated with Methoxychlor

Treatment at 4wk (Methoxychlor)	Dose of LLNA (2,4-D-butyl)	Final BW (g; mean \pm SD)	Lymph node weight (mg; mean \pm SD)	³ H]-TdR incorporation	
				dpm (mean \pm SD)	SI ^a
0 mg/kg	0 %	21.4 \pm 1.5	4.63 \pm 0.47	134 \pm 76	1.0
	2.5 %	21.7 \pm 1.9	4.98 \pm 0.24	254 \pm 34	1.9
	5 %	21.3 \pm 1.8	4.55 \pm 0.70	334 \pm 26	2.5
	10 %	21.2 \pm 2.0	6.84 \pm 1.23**	592 \pm 249**	4.4
100 mg/kg	0 %	21.8 \pm 1.7	4.08 \pm 0.19	122 \pm 43	1.0
	2.5 %	21.5 \pm 2.1	5.80 \pm 1.02	230 \pm 58	1.9
	5 %	21.2 \pm 1.5	9.20 \pm 3.04**	721 \pm 248**	5.9
	10 %	21.6 \pm 1.4	9.60 \pm 1.34**	1705 \pm 208**	14.0
300 mg/kg	0 %	21.3 \pm 2.3	4.18 \pm 0.76	129 \pm 13	1.0
	2.5 %	21.7 \pm 2.6	7.80 \pm 2.52*	616 \pm 360	4.8
	5 %	21.3 \pm 2.2	9.00 \pm 1.41**	843 \pm 188*	6.5
	10 %	21.2 \pm 2.1	12.50 \pm 1.35**	1942 \pm 555**	15.1

The SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. *p < 0.05, ** p < 0.01.

Table 4. LLNA assay of Eugenol pretreated with Methoxychlor

Treatment at 4wk (Methoxychlor)	Dose of LLNA (Eugenol)	Final BW (g; mean \pm SD)	Lymph node weight (mg; mean \pm SD)	^3H -TdR incorporation	
				dpm (mean \pm SD)	SI ^a
0 mg/kg	0 %	20.9 \pm 1.7	3.65 \pm 0.32	392 \pm 113	1.0
	5 %	21.1 \pm 1.3	5.48 \pm 1.85	808 \pm 536	2.1
	10 %	21.0 \pm 1.1	7.60 \pm 0.53**	2029 \pm 1276	5.2
	25 %	21.2 \pm 1.9	11.42 \pm 1.76**	9476 \pm 1707**	24.2
100 mg/kg	0 %	21.9 \pm 2.3	3.38 \pm 1.13	289 \pm 128	1.0
	5 %	21.7 \pm 2.5	9.90 \pm 0.44**	1209 \pm 435	4.2
	10 %	21.5 \pm 1.2	12.75 \pm 3.71**	4087 \pm 2839*	14.1
	25 %	21.8 \pm 1.7	14.92 \pm 2.32**	12157 \pm 4083**	42.1
300 mg/kg	0 %	20.8 \pm 1.6	3.85 \pm 0.37	267 \pm 113	1.0
	5 %	21.0 \pm 1.8	8.63 \pm 1.85*	1411 \pm 596	5.3
	10 %	20.8 \pm 1.4	11.85 \pm 3.93**	5434 \pm 3324**	20.4
	25 %	21.2 \pm 1.8	15.56 \pm 1.95**	15085 \pm 2995**	56.5

The SI is the ratio of the mean of the measurements of the treatment group to that of the vehicle control group. The criterion for a positive response in the standard LLNA was an SI of 3 or greater.

Values for treatment and control groups were compared by Dunnett's multiple comparison test. *p < 0.05; ** p < 0.01.

Table 5. Influence of Parathion or Methoxychlor pretreatment on the EC3 values of 2,4-D-butyl and Eugenol

	Parathion pretreatment at 4wk			Methoxychlor pretreatment at 4wk		
	0 mg/kg	0.4 mg/kg	1.2 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
EC3 values of 2,4-D-butyl	7.73	1.39	0.94	6.32	3.19	1.32
EC3 values of Eugenol	5.28	2.66	0.83	6.45	3.13	2.33

EC3 value was an estimation of the amount of the test solution required in LLNA to induce a SI of 3.

Fig 1 Influence of Parathion or Methoxychlor pretreatment on the T-cell populations in the LLNA assays

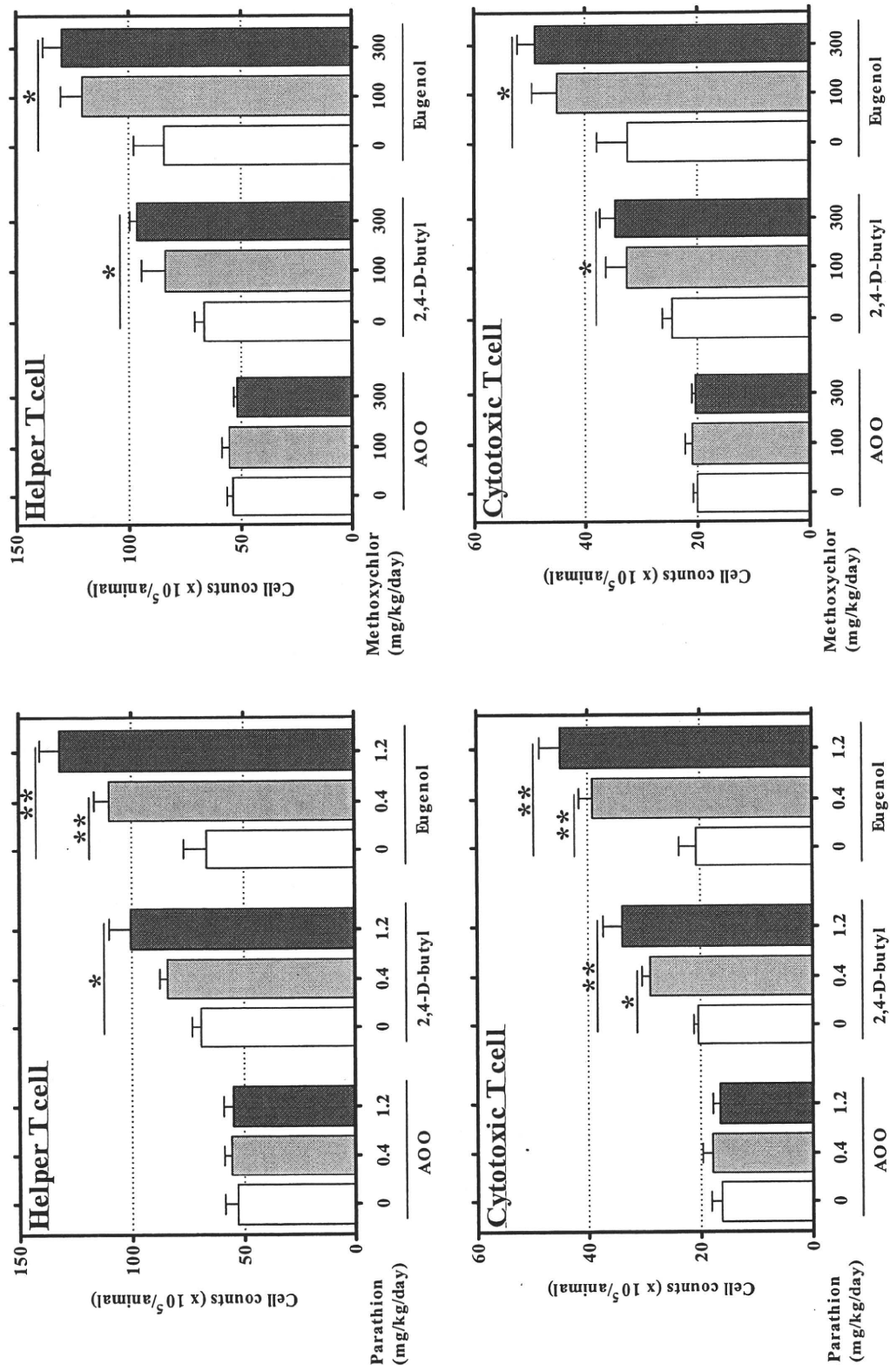
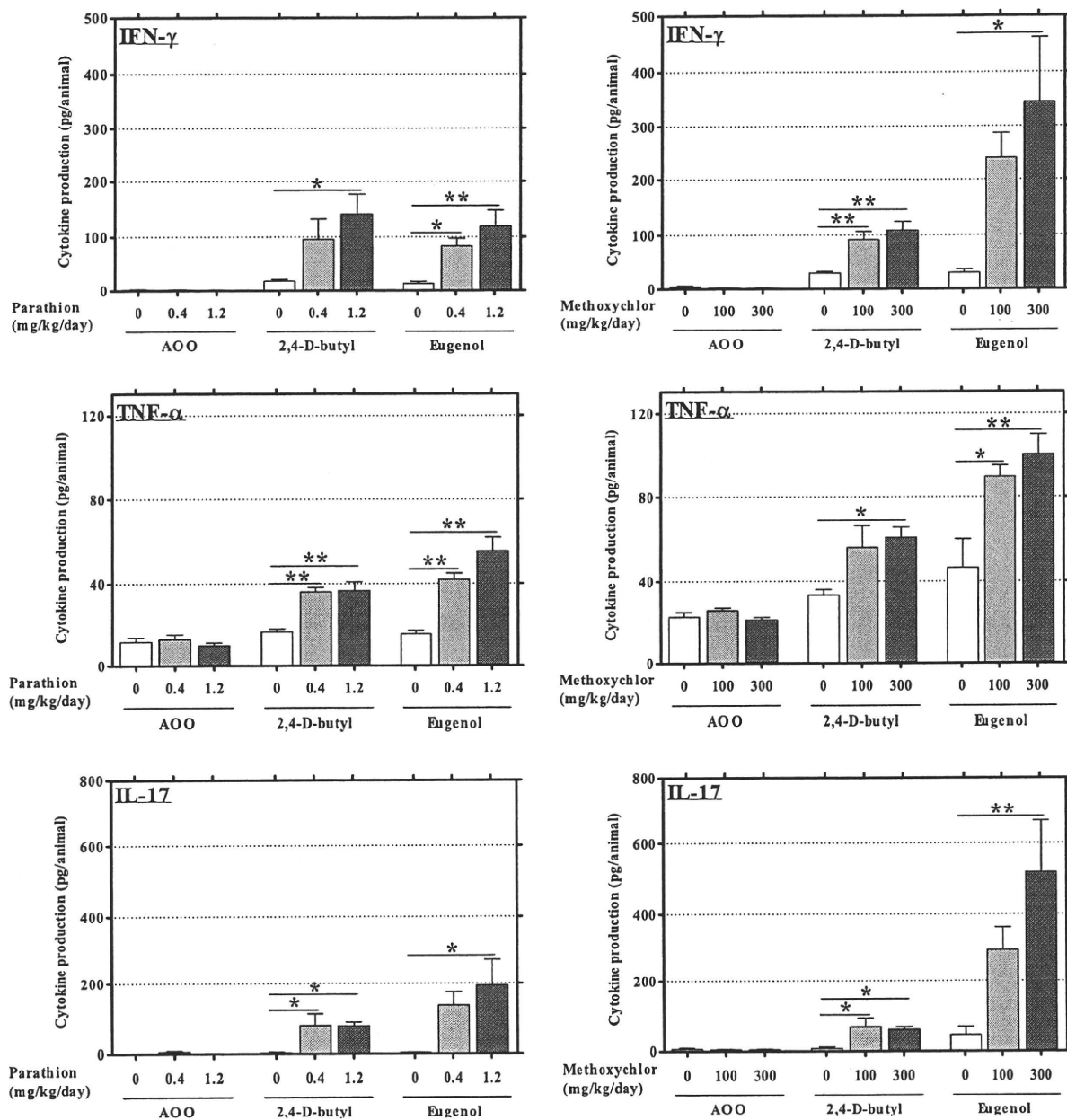


Fig 2 Influence of Parathion or Methoxychlor pretreatment on the Cytokine productions in the LLNA assays



分担研究課題: 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

研究分担者 出川 雅邦 静岡県立大学 薬学部教授

研究協力者 関本 征史 静岡県立大学 薬学部講師

研究要旨

本年度は、主に CYP1A 酵素誘導剤および CYP3A 酵素誘導剤による各酵素の誘導に対するクルクミン(CUR)、チアベンダゾール(TBZ)、没食子酸プロピル(PG)およびブチルヒドロキシトルエン(BHT)の影響を検討した。

まず、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-メチルコランズレン(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。その結果、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。

以上、用いた食品添加物中、BHT を除く 3 種の化合物には 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。

A. 研究目的

肝シクロム 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、我々は、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。

B. 研究方法

1) 試験細胞株

① ヒト AhR リガンド検索用細胞株: ラット CYP1A1 遺伝子のプロモーター領域にある AhR 結合配列 (XRE) の 3 回繰り返し配列と Simian virus 40 遺伝子プロモーターをルシフ

ェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミド (XRE-Luc) をヒト肝がん培養細胞株 HepG2 に導入した。その後、AhR リガンドに対し高い反応性を有する細胞をクローニングし、HepG2-A10 細胞株を樹立した。

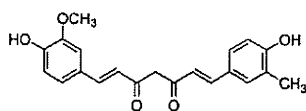
② ヒト PXR リガンド検索用細胞株: ヒト CYP3A4 遺伝子プロモーターに存在する PXR 結合配列を含んだ 2 か所の転写調節領域 (-7836~-7208 および -362~+53) を、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミド (phCYP3A4Luc) を作成し、ヒト PXR 強制発現プラスミドとともに HepG2 に導入した。その後、PXR リガンドに対し高い反応性を有する細胞をクローニングし、HepG2-PXRLucA3 細胞株を樹立した。

2) 被検化合物

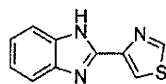
食品添加物として、クルクミン (CUR、Wako)、チアベンダゾール (TBZ、Sigma)、ブチルヒドロキシトルエン (BHT、Sigma)、および没食子酸プロピル (PG、Fluka) を用いた (図 1A)。CYP1A 酵素誘導剤としては、3-メチルコランスレン (MC、Wako)、ベンゾ [a] ピレン (B[a]P、Sigma)、 α -ナフトフラボン (BNF、Wako) および 7,12-ジメチルベンズアントラセン (DMBA、Nakarai) を用いた (図 1B)。CYP3A 酵素誘導剤としては、リファンピシン (RIF、Sigma)、ニカルジピン塩酸塩 (NIC、Wako) およびタモキシフェン (TAM、Sigma) を用いた (図 1C)。

また、一部実験には、 $[^3\text{H}]$ で標識した MC (10.7 Ci/mmol、Moravek Biochemicals) を使用した。

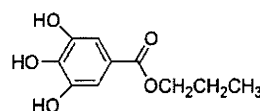
(A) Food additives



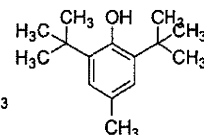
Curcumin
(CUR)



Thiabendazole
(TBZ)

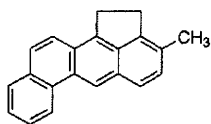


Propyl gallate
(PG)

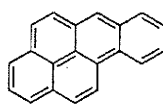


Butylated
hydroxytoluene
(BHT)

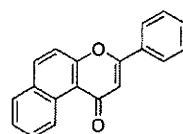
(B) CYP1A inducers



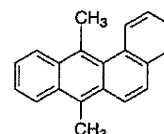
3-Methylcholanthrene
(MC)



Benzo [a] pyrene
(B[a]P)

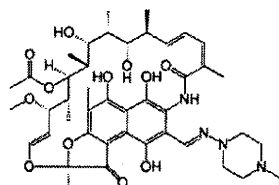


β-naphthoflavone
(BNF)

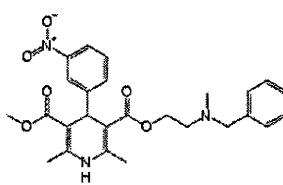


7,12-dimethylbenz[a]
anthracene
(DMBA)

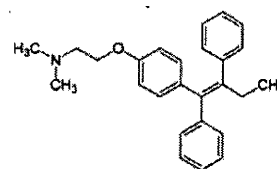
(C) CYP3A inducers



Rifampicin (RIF)



Nifedipine (NIC)



Tamoxifen (TAM)

図. 本研究で用いた化合物

3) AhRあるいはPXR活性化能の測定

前項 1) で作成した AhR あるいは PXR レポーター細胞株を 48 時間前培養した後、被検化合物および CYP 誘導剤を添加し、一定時間処理した。処理後、細胞を 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 (Toyo Ink) を添加し、生じた発光をルミネッセンスセンサー PSN (ATTO) により測定した。さらに、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。

3) CYP1A 酵素活性の測定

前項 1) で作成した HepG2-A10 細胞を 48 時間前培養した後、被検化合物および誘

導剤を添加して、一定時間処理した。その後、培地を CYP1A 酵素の代表的な基質であるエトキシレゾルフィン (Sigma) を含んだ無血清培地に換えて 30 分間培養し、上清中に生成した代謝物の蛍光を測定した。また、反応後の細胞を 1N NaOH を用いて溶解し、細胞溶解液中の蛋白質濃度を測定し、蛋白質あたりのエトキシレゾルフィン脱エチル化 (EROD) 活性を算出した。

4) 細胞内 [³H]-MC 量の測定

HepG2-A10 細胞を 48 時間前培養し、被検化合物および 30 nM の [³H]-MC を添加した。6 時間培養後、1N NaOH を用いて細胞を溶解した。1N HCl を用いて中和した後、シンチレーション用カクテル (Ecoscint H、

National Diagnostics) を加え、細胞内 $[^3\text{H}]$ -MC に由来する放射活性を液体シンチレーションカウンター (LSC5100、Aloka) を用いて測定した。さらに、細胞溶解液の蛋白質濃度を測定し、蛋白質あたりの $[^3\text{H}]$ -MC 量を算出した。

5) CYP3A 遺伝子発現量の測定

HepG2-PXRLucA3 細胞を播種し、48 時間前培養した後、被検化合物および誘導剤を添加して、一定時間処理した。全 RNA を ISOGEN (NipponGene) により単離し、pd(N)₆ プライマー (GE Healthcare) と MMLV-逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。この cDNA に、ヒト *CYP3A4*、*CYP3A5*、*CYP3A7* あるいは *GAPDH* 遺伝子に特異的なプライマーセット、および SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を添加し、7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行い、各遺伝子の発現量を測定した。なお、各遺伝子の発現量は、それぞれ *GAPDH* 遺伝子の発現量で補正し、算出した。

6) 倫理面への配慮

申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で注意して取り扱った。また、使用した薬品のうち有害物質を含むものについては、環境への拡散がないように注意した。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

1) AhR 活性化

本実験に先立ち、HepG2-A10 細胞に対して種々 CYP1A 酵素誘導剤を 24 時間処理し、AhR 活性化能を比較した。その結果、MC では 0.1 μM 、B[a]P、BNF および DMBA では 1 μM において、有意な AhR の活性化 (ルシフェラーゼ活性の増加) が観察され、上記濃度を含む範囲で濃度依存的な活性化が見られた。そこで、相互作用の解析に適した CYP1A 酵素誘導剤の処理濃度として上記濃度を、また、食品添加物の濃度は細胞毒性がみられない 10 μM にそれぞれ設定し、食品添加物単独および CYP1A 酵素誘導剤との複合曝露による AhR 活性化への影響を検討した。

MC、B[a]P、BNF および DMBA を 6 時間単独処理したところ、それぞれ対照群の 4.5 倍、3.6 倍、2.4 倍および 2.3 倍と有意な AhR 活性化の増強が認められた。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抑制した。TBZ および PG は、MC による AhR 活性化を増加させたが、B[a]P、BNF および DMBA による AhR 活性化には影響を与えなかった。なお、BHT は各 CYP1A 酵素誘導剤による AhR 活性化に影響を与えなかった。

MC、B[a]P、BNF および DMBA を 24 時間単独処理したところ、それぞれ対照群の 3.9 倍、4.4 倍、4.4 倍および 3.1 倍と有意な AhR 活性化の増強が認められた。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

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。

2) CYP1A 酵素活性誘導

食品添加物と CYP1A 酵素誘導剤の複合曝露が、EROD 活性に及ぼす影響を検討した。なお、各試薬の濃度は前項 1) に準じた。

MC、B[a]P、BNF および DMBA を 6 時間単独処理したところ、EROD 活性はそれぞれ 55.2、49.7、58.9 および 32.8 pmol/mg/min となり、有意な誘導が観察された。CUR は、全ての CYP1A 酵素誘導剤による EROD 活性の誘導を 1/10 程度に抑制した。PG は、全ての CYP1A 酵素誘導剤による EROD 活性の誘導を 1/2 程度に抑制した。なお、TBZ と 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。

MC、B[a]P、BNF および DMBA を 24 時間単独処理したところ、EROD 活性はそれぞれ 23.5、10.6、2.4 および 5.3 pmol/mg/min となった。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。

3) 細胞内 MC 蓄積に及ぼす食品添加物の影響

食品添加物と種々 CYP1A 酵素誘導剤との相互作用が生じる機構を解析する一環として、 ^3H -MC の細胞内蓄積に及ぼす CUR および TBZ の影響を検討した。その結果 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。

4) PXR 活性化

本実験に先立ち、HepG2-PXRLucA3 細胞に対して種々 CYP3A 酵素誘導剤を 24 時間処理し、PXR 活性化能を比較した。その結果、RIF では 1 μM 、NIC および TAM では 10 μM において、有意な PXR の活性化が観察された。そこで、CYP3A 酵素誘導剤の処理濃度として上記濃度を、また、食品添加物の濃度を 10 μM にそれぞれ設定し、食品添加物単独および CYP3A 酵素誘導剤との複合曝露による PXR 活性化への影響を検討した。

RIF、NIC および TAM を 24 時間単独処理したところ、それぞれ対照群の 4.0 倍、5.0 倍および 3.1 倍と有意な PXR 活性化が認められた。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。なお、BHT は各 CYP3A 酵素誘導剤による PXR 活性化に影響を与えなかった。

5) CYP3A 酵素遺伝子の発現誘導

HepG2-PXRLucA3 細胞に対して種々 CYP3A 酵素誘導剤を 24 時間処理し、CYP3A 酵素遺伝子 (CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7) 発現に及ぼす影響を検討した。

CYP3A4 発現は RIF、NIC および TAM の単独処理により、それぞれ対照群の 4.0 倍、5.2 倍および 6.0 倍と有意に増加した。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。

CYP3A5 発現は RIF、NIC および TAM の単独処理により、それぞれ対照群の 2.9 倍、3.0 倍および 3.1 倍に増加した。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。なお、TBZ および BHT は、各 CYP3A 酵素誘導剤による CYP3A5 発現誘導に影響を与えなかった。

CYP3A7 発現は RIF、NIC および TAM の単独処理により、それぞれ対照群の 2.0 倍、2.1 倍および 4.0 倍に増加した。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。なお、TBZ および BHT は、各 CYP3A 酵素誘導剤による CYP3A7 誘導に影響を与えなかった。

D. 考察

本研究では種々 CYP1 および CYP3A サブファミリー酵素誘導剤による受容体型転写因子 (AhR および PXR) の活性化や酵素誘導に対する食品添加物の影響を検討した。

まず、CYP1A 酵素誘導剤として MC、B[a]P、BNF および DMBA を用い、AhR 活性化への食品添加物の影響を検討した。

CUR は各 CYP1A 誘導剤による AhR 活性化と CYP1A 酵素活性のいずれに対しても 6 時間では抑制作用を、24 時間では増強作

用を示した。近年、CUR はダイオキシン類 (AhR リガンド) による AhR のリン酸化の阻害、あるいは AhR の分解を促すことで AhR 活性化に対して抑制的に働くことが報告されている。このことは、CUR が AhR そのものを標的としていることを示唆している。また、本研究の結果から、ダイオキシン類だけでなく、多環式芳香族炭化水素類をはじめとした種々 CYP1A 誘導剤に対しても CUR が短時間処理 (6 時間) では抑制効果を示しており、これまでの報告を支持するものと考えられる。

しかし、CUR はより長時間の処理 (24 時間) では AhR 活性化や酵素活性を増強し、処理時間により相反する作用を持つことが明らかになった。また、長時間処理で見られた AhR 活性化や酵素活性誘導の増強作用は少なくとも一部、CUR の細胞内 MC 濃度増加作用を介して起こる事が示された。今回使用した他の CYP1A 酵素誘導剤に対しても同様の機構により増強作用を示すと考えられる。

TBZ も MC および B[a]P による AhR 活性化や CYP1A 酵素活性誘導に対して増強作用を示したが、CUR とは異なり、TBZ は細胞内 MC 濃度増加作用を有しておらず、CUR とは異なった機序で作用を発現することが示された。

最近、オメプラゾール (OME) などの非 AhR リガンド型ベンズイミダゾール化合物による AhR 活性化には CREM (cAMP responsive element modulator) を介したシグナル伝達が重要である可能性が指摘されている。したがって、OME に類似した構造を持つ TBZ でも細胞内シグナル伝達系の活性化を起こし、さらに、AhR リガンド型の MC や

B[a]P との複合暴露により相乗的な AhR の活性化を惹起する可能性が考えられる。しかし、AhR リガンド型の BNF や DMBA との複合暴露では相乗効果はほとんど認められず、同じ AhR リガンド型の CYP1A 酵素誘導剤でも標的となる細胞内分子が単に AhR だけではなく、その他の異なった分子 (要因) が関わっていると考えられる。

PG は、DMBA 以外の CYP1A 誘導剤による AhR 活性化を増強した。しかし、CYP1A 酵素活性に対しては、24 時間では増強作用を、一方、6 時間では阻害作用を示した。また、この阻害作用は PG の競合的 CYP1A 酵素活性阻害によることを明らかにした。なお、24 時間処理時の活性増加は、誘導された酵素量 (活性) が、阻害活性を上回った結果と考えられる。

次に HepG2-PXRLucA3 を用いて、PXR 活性化および 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。本研究で CYP3A 酵素誘導剤として用いた RIF、NIC および TAM はいずれも PXR を活性化することで CYP3A 酵素を誘導することが示されている。

CUR は、使用した各 CYP3A 酵素誘導剤による PXR 活性化や CYP3A4、CYP3A7 誘導に対してそれぞれ抑制作用を示した。このことから、CUR は PXR の活性化を阻害することで、標的遺伝子である CYP3A4 および CYP3A7 誘導を抑制することが示された。一方、CYP3A5 誘導に対してはほとんど影響を与えなかった。CYP3A4 と CYP3A7 遺伝子の転写調節領域には PXR 結合配列が同定されているのに対し、CYP3A5 遺伝子では未

だ同定に至っていない。また、種々薬剤を処理した HepG2-PXRLucA3 を用いて PXR 活性化と遺伝子発現誘導の相関性を解析した結果から、CYP3A4 あるいは CYP3A7 遺伝子は PXR 活性化と関連性が比較的高い ($R^2 = 0.87$, $R^2 = 0.89$) のに対し、CYP3A5 遺伝子については関連性が低い ($R^2 = 0.52$) ことを確認している。これらのことから、CYP3A5 発現誘導には PXR 非依存的な機構も存在していることが考えられる。なお、CUR による PXR 活性化抑制機構は不明であり、今後の検討が必要である。

TBZ は PXR 活性化をわずかに増強するものの、遺伝子発現には影響を及ぼさなかった。また、PG は PXR 活性化をわずかに減弱させ、CYP3A 酵素遺伝子の発現も低下させた。一方、BHT は、PXR 活性化に影響を与えることなく CYP3A 酵素遺伝子の発現をわずかに抑制した。これら食品添加物の処理時における PXR 活性化と CYP3A 酵素遺伝子の変動はいずれも軽微なものであり、また、そのパターンに共通性は認められなかった。

E. 結論

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。

131 年会、要旨集 3、237、2011 年 3 月 30 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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

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：食品の複合反応が酸化および窒素化ストレスに与える影響

ニトロ化を受けたクロロゲン酸およびカフェイン酸が活性窒素種産生に与える影響

研究分担者	：	中澤 裕之	所属	星薬科大学	薬品分析化学教室
研究協力者	：	斉藤 貢一	所属	星薬科大学	薬品分析化学教室
	：	伊藤 里恵	所属	星薬科大学	薬品分析化学教室
	：	岩崎 雄介	所属	星薬科大学	薬品分析化学教室

研究要旨

近年、食品中に含有されるフェノール性化合物の抗酸化能が注目されており、健康食品などにフェノール性化合物が幅広く使用されている。しかし、種々のフェノール性化合物は、金属との反応によって活性酸素種（ROS）を生成し、DNA の損傷や脂質の過酸化を引き起こすことが報告されている。他方、亜硝酸ナトリウム（ NaNO_2 ）は食品添加物として使用されていることから、それぞれの化合物を併用することで、生体内でニトロ化反応を引き起こすことが考えられる。

本研究では、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、 NO_2 の産生が認められた。

A. 研究目的

活性酸素種（ROS）は動脈硬化、心疾患や発がんといった種々の疾病に関与していることが明らかとなっている。ROS を消去する抗酸化物質の摂取はこれら疾病の予防につながると考えられている。そのため、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、近年、注目されている。

しかし、フェノール性化合物と金属が反応することでROSが発生することが報告さ

れており、抗酸化物質の安全性について更なる詳細な研究が要求されている。

他方、亜硝酸ナトリウム（ NaNO_2 ）は発色剤として食品添加物で使用されているが、胃酸酸性条件下でフェノール性化合物と反応してニトロ化反応を引き起こすことが考えられる。

本研究では、クロロゲン酸およびCFAと NaNO_2 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

B-1. 材料及び試薬

3,4-ジヒドロキシけい皮酸 (カフェイン酸: CaA)、亜硝酸ナトリウム (NaNO_2)、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 (ChA) 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。

B-2. 人工胃液中におけるフェノール性化合物と NaNO_2 の反応

フェノール性化合物と NaNO_2 の反応生成物の標準品を得るために ChA および CaA と NaNO_2 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、 NaNO_2 を 2 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、反応生成物を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。

B-3. 生体内 pH におけるニトロ化合物の安定性

各種フェノール性化合物を PBS (pH 7.4)、

人工胃液 (0.1 M 塩酸) 条件下において、その分解挙動を経時的に LC/UV を用いて測定した。UV 検出器の測定波長は 300 nm に設定した。分離カラムには XBridge C18 (150 × 2.0 mm) を使用し、移動相には水:アセトニトリル:ギ酸=90:10:0.1 を用いた。

B-4. DPPH 法による Antioxidant 作用の評価

Antioxidant 作用の評価には、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を用い、DPPH ラジカルの消去率を吸光度によって測定することで評価した。各種フェノール性化合物に DPPH 溶液を加え、プレートリーダーを用いて波長 540 nm で測定した。

B-5. 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

電子スピン共鳴装置は JEOL 製 JES-RE1X ESR spectrometer を使用した。ESR による Prooxidant 作用の評価には、 α -(4-Pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitron (4-POBN) を用いた。

試料調製は PBS 180 μL に 20 mM に調製したフェノール性化合物 30 μL 、DMSO に溶解した 4-POBN (100 mM) を 30 μL 、硫酸銅 (10 mM) を 30 μL 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。

また、DNA における酸化ストレス評価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、8-OHdG を測定した。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