

201131029A

別紙 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の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

(H 2 2 - 食品 - 一般 - 0 1 6)

平成 2 3 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅 村 隆 志

平成 2 4 (2 0 1 2) 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	12
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	27
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	33
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	164
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	172
中澤裕之	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	179
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	180
-----------------	-----

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
総括研究報告書

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

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。

ヒトが同時に摂取する可能性のある MeIQx および FL の複合影響を評価するため、*gpt* delta マウス肝臓における、MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性に対する FL の影響を検討した。また、肝組織傷害を引き起こさない肝発がんプロモーターであるフェノバルビタール (PB) の複合影響についても同様に検討した。その結果、MeIQx 投与により上昇した *gpt* および Spi MF は FL 併用投与によりさらに 2 倍以上増加し、MeIQx 単独投与群と比較して有意な高値となった。網羅的遺伝子発現解析の結果、FLU 投与により炎症性サイトカイン (*IL-1b*、*Tnf*)、細胞周期関連因子 (*Cyclin D1*、*Cyclin E1*) の mRNA レベルの増加が認められた。PB との併用投与では、小葉中心性の肝細胞肥大は認められたものの、MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性に変化は認められなかった。以上の結果、マウス肝臓における MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性は、動物薬 FL の併用投与により増強され、この作用には、FL による肝組織傷害に引き続いておこる細胞増殖活性の亢進が関与している可能性が考えられた。発がん過程において認められる遺伝子やタンパクの発現異常などの変化に着目した化学物質の複合影響を検討するために、フラン投与により発生した肝前がん病変における部位特異的な Nrf2 関連因子の遺伝子発現解析を行った。結果、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巣では、周囲の GST-P 陰性領域に比較して、Nrf2 の標的遺伝子である *Nqo1* の mRNA 発現の程度が高かった。さらに細胞周期調節に関与する *Cyclin E1* の発現も GST-P 陽性細胞巣で高値を示した。以上より、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巣では、Nrf2 経路が活性化している可能性が示唆され、フランと Nrf2 経路活性化物質の発がんに与える複合影響を検討する必要があると考えられた。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、8 週齢の雌性ラット (BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)) に有機リン剤 (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) のうち 3 剤あるいは 4 剤を複合投与した。Dubois らの方法を参考に投与用量を決定し複合投与試験を行い、先に実施した単剤投与試験で得られた各剤の LD₅₀ 値に基づく推定半数致死量 (LD₅₀ 期待値) と複合投与の半数致死量 (LD₅₀ 実測値) を比較することによって複合暴露による毒性効果(複合毒性強度; LD₅₀ 期待値/LD₅₀ 実測値)を確認した。その結果、有機リン剤 2 剤にカーバメート剤あるいはニコチン製剤を加えた 3 剤の複合暴露影響は拮抗的 (複合毒性強度 0.64-0.90)

であったが、有機リン剤、カーバメート剤およびニコチン製剤各 1 剤ずつの 3 剤組合せでは相加的（複合毒性強度 1.04-1.12）であった。4 剤すべての複合暴露による毒性強度値は 0.82 で、やや拮抗的結果であった。今回の 3 剤ないし 4 剤の複合暴露試験では、単剤毒性から予想される複合毒性強度の変化（拮抗あるいは増強作用）が 2 剤暴露に比べより軽度であった。さらに、先に実施した 2 剤の複合投与による毒性強度と今回の結果を比較したところ、3 ないし 4 剤の複合投与による毒性強度は、構成する 2 剤の複合毒性強度の中央値及び平均値とほぼ一致した。これらの結果から、多剤の複合暴露影響の予測には、2 剤の複合毒性情報が有用である可能性が示唆された。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の 2 種類の有機リン系農薬を混合して妊娠 6 日より哺育 21 日まで複合反復経口投与し、児動物の発達に及ぼす影響を検索した。その結果、高用量のパラチオン及びメタミドホスを複合暴露した母動物では、妊娠期間中あるいは哺育期間中に、死亡または重篤な神経症状が認められた。高用量群及び低用量群の血清 ChE 活性は有意に低下した。児動物では、高用量群における雌雄で観察期間に有意な体重増加抑制及び身体発達の遅延が認められた。さらに、雄動物では哺育 4 日の血清 ChE 活性が有意に低下した。また、被験物質投与群では、連続的な探索行動、自発運動の有意な増加、驚愕反応の軽度抑制が認められた。乳汁中のパラチオン、メタミドホス及びその代謝物の化学分析を行った結果、いずれも検出限界以下であった。パラチオン及びメタミドホスを複合反復投与すると単剤暴露に比べ相加的に毒性が強く発現し、さらに生理学的変化の著しい妊娠期では、その症状や毒性は増強される傾向にあった。児動物に対する影響に関しては、パラチオン及びメタミドホスの直接的な作用ではなく、母動物の投与に伴う生理学的及び行動学的変化が児動物の身体発達、衝動性や多動性などの行動に影響を及ぼしたものと推察された。有機リン剤（パラチオン）、有機塩素剤（メキシクロル）及び植物調整剤（ピペロニルブトキシド）のアレルギー反応に及ぼす影響を調査すべく、アトピー性皮膚炎に着目し検討を行った。実験では、アトピー性皮膚炎発症モデルとして使用される雌性 NC/Nga マウスに各被験物質を 5 日間反復経口投与し、4 週間後にアトピー性皮膚炎を惹起する Picryl chloride を反復経皮暴露して、アトピー性皮膚炎反応の増強影響を検索した。パラチオン、メキシクロルないしはピペロニルブトキシドを前投与したマウスにおいて、アトピー性皮膚炎で見られる皮膚所見や投与部位の皮膚厚（耳介部）が用量相関性に有意に増加した。また、アトピー性皮膚炎に特徴的に認められる、血清中 IgE 量、リンパ節中 IgE 陽性 B 細胞数、リンパ節中サイトカイン産生量および耳介中サイトカイン遺伝子発現量が対照群と比較して用量依存性に有意に増加し、パラチオン、メキシクロル及びピペロニルブトキシドの前投与によるアトピー性皮膚炎反応の増強効果が認められた。これらの結果から、本試験条件下ではパラチオン、メキシクロル及びピペロニルブトキシドの反復投与は、NC/Nga マウス及び Picryl chloride で惹起されるアトピー性皮膚炎反応を増強する可能性が示唆された。ヒト CYP3A4 酵素は、肝薬物代謝において中心的な役割を担う酵素であり、本酵素の発現量や活性の変動は、薬物や異物の代謝分解の変動、ひいてはその薬理作用発現や毒性発現の変動を引き起こす。従って、CYP3A4 酵素の発現に影響を及ぼす食品中化学物質の把握は、その安全性を考える上で重要である。そこで本研究では、ヒト肝 CYP3A4 酵素遺伝子の誘導をルシフェラーゼアッセイにより簡

便に予測できる細胞株 (HPL-A3) を用いて、食品添加物が CYP3A4 酵素誘導に及ぼす影響を評価した。まず、食品添加物のクルクミン (CUR)、チアベンダゾール (TBZ)、没食子酸プロピル (PG) あるいはブチルヒドロキソトルエン (BHT) をそれぞれ最終濃度 10 μ M で HPL-A3 細胞に 24 時間あるいは 72 時間処理し、各化合物の CYP3A4 酵素誘導能をルシフェラーゼアッセイおよびリアルタイム RT-PCR 法により測定した。ルシフェラーゼアッセイの結果、CUR および TBZ は両時間でルシフェラーゼ誘導能が観察され、また、PG および BHT は 24 時間処理でわずかな誘導能を示した。また、CYP3A4 遺伝子発現については、化合物 72 時間処理後、CUR で誘導作用が、BHT で抑制作用が認められた。次いで、CYP3A4 mRNA を誘導した CUR と既知の CYP3A 酵素誘導剤 (リファンピシン (RIF: 1 μ M)、タモキシフェン (TAM: 10 μ M) あるいはニカルジピン (NIC: 10 μ M)) との複合影響について検討した。CUR は、用いた全ての誘導剤によるルシフェラーゼ活性および CYP3A4 遺伝子の誘導を、24 時間処理では抑制し、72 時間処理では増強した。なお、他の食品添加物と CYP3A 酵素誘導剤との複合曝露では、一部の化合物の組み合わせによっては CYP3A4 遺伝子発現誘導における相互作用が認められたが、その作用は化合物の組み合わせにより異なる場合がみられた。以上、試験したいずれの食品添加物 (特に CUR と TBZ) にも CYP3A4 遺伝子の発現を変動させる作用があることが示された。また、CUR による CYP3A4 遺伝子の活性化は VDR を介した機構で起こる可能性を示唆した。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。また、健康補助食品としてビタミンなどが含有されている食品が数多く流通している。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。本研究では、食品中に含まれる抗酸化物質 (フェノール性化合物、チオール化合物、ビタミン類) に着目し、金属との反応が ROS 生成に及ぼす影響について評価した。金属との複合反応がラジカル発生能 (Prooxidant) 及ぼす影響を検討したところ、オルト位にフェノール性水酸基を有する化合物とビタミンは二価の銅と反応し、ROS が生成されることが明らかとなった。

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。

遺伝毒性肝発がん物質である MeIQx は、食品の加熱処理によって生じるヘテロサイクリクアミンの一つである。一方、動物用医薬品として食品中への残留が懸念されているフルメキン (FL) は肝障害を誘発する発がんプロモーターである。ヒトは食品を介して MeIQx と FL を同時に長期間摂取する可能性があり、FL は MeIQx の発がん標的臓器である肝臓に対して組織傷害を引き起こす物質であることから、MeIQx の変異原性に対して何らかの影響を与える可能性も否定できない。そこで本研究では、*gpt delta* マウス肝臓における MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性に対する FL の複合影響を検討した。また、FL とは異なる経路での発がんプロモーター作用を有するフェノバルビタール (PB) の複合影響も検討した。

本年度は、食品中に含まれる可能性があるフランの発がん機序と、それを修飾するような化学物質との複合影響の可能性を検討する。Nrf2 は親電子性物質や活性酸素などにより活性化される転写因子であり、酸化ストレス防御遺伝子群などの遺伝子の発現を誘導し、細胞の種々のストレスに対する恒常性維持機構として働いている。しかし、一方ではヒトがん組織やがん細胞株において、Nrf2 活性化にいたるような遺伝子変異が認められることが報告されていることから、Nrf2 経路は正常な細胞の恒常性維持に関わるのみならず、病巣の生存に

も関与し、病巣形成にも重要である可能性が示唆されている。本年度は、フランを投与したラット肝臓を用いて、肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢における部位特異的な Nrf2 関連因子の遺伝子発現解析を行った。また、肝発がん過程における Nrf2 経路の活性化がフランと異なる機序を持つ発がん物質においても認められるか否かを検討するために、遺伝毒性発がん物質である diethylnitrosamine (DEN) 投与ラット肝臓の GST-P 陽性細胞巢においても同様の検討を行った。

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、発達期における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、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を用いて調査し、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事を目的とした。本年度は有機リン剤のメタミドホス及びパラチオン、カーバメート剤のキシリルカルブ、ニコチン製剤である 50%硫酸ニコチン水溶液から 3 ないしは 4 剤を組合せて単回強制経口投与し、Dubois らの方法を参考にして、単剤投与と複合投与の半数致死量 (LD₅₀ 値) を比較することによって複合暴露による毒性効果を確認した。さらに、先に実施した 2 剤の複合投与における複合毒性強度と今回の結果を比較し、多剤混合毒性影響の予測における 2 剤複合毒性情

報の有用性を検討した。また、2 種類の有機リン剤（パラチオン及びメタミドホス）を複合的に妊娠6日目より哺育21日まで反復経口投与し、母動物および児動物の発達に及ぼす影響を検索した。さらに、免疫系への影響が示唆されている有機リン剤（パラチオン）、有機塩素剤（メキシクロル）及び植物調整剤（ピペロニルブトキシド）を幼若期に反復経口投与した後、4週間後にアトピー性皮膚炎を惹起する Picryl chloride を反復経皮暴露し、アトピー性皮膚炎反応の増強影響を検索した。

我々はこれまでの本研究において、化学物質によるヒト CYP3A 酵素の誘導を簡便に解析することを目的として、ヒト肝 CYP3A4 酵素遺伝子プロモーターのレポータープラスミドと、CYP3A 酵素誘導に関わる受容体型転写因子であるヒトプレグナン X 受容体 (hPXR) を共発現させることにより、ヒト肝 CYP3A4 酵素遺伝子の誘導をレポーターアッセイにより簡便に予測できる細胞株 (HPL-A3) を樹立した (*Biol. Pharm. Bull.*, in press)。そこで本研究では、ヒト肝 CYP3A4 酵素の発現に及ぼす代表的な食品添加物の影響について、本細胞を用いて検討し、さらに、その機構について解析した。

ROS が過剰に生成されることでさまざまな疾患を惹起することから、これらを消去する抗酸化物質の摂取は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、赤ワインやコーヒーなどに多く含ま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。そのため、手軽に摂取できる健康食品が人気を博している。一方、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。ビタミン A を摂取することで、動脈硬化症をわずかに悪化させるといった報告もされている。これらのことから、食品に含まれる抗酸化物質の安全性を評価することは重要であると考えられる。本研究では、食品に含まれる抗酸化物質（フェノール性化合物、チオール化合物、ビタミン類）に着目し、金属との反応が ROS 生成に及ぼす影響について評価した。

B. 研究方法

6 週齢の雄 B6C3F₁ 系 *gpt delta* マウス(自家繁殖)30 匹を対照群、MeIQx 単独群、FL 単独群、PB 単独群、MeIQx+FL 併用群、MeIQx+PB 併用群の 6 群に分け、各被験物質を CRF-1 粉末基礎飼料(オリエンタル酵母株式会社)と混合し、13 週間混餌投与した。MeIQx の投与量は *gpt delta* マウス肝臓においてレポーター遺伝子変異頻度の上昇が報告されている 0.03% (Masumura et al., 2003)、FL の投与量は発がん用量相当量である 0.4% (Yoshida et al., 1999)、PB の投与量はプロモーション作用量である 0.05%とした。対照群には、基礎飼料のみを与えた。また、解剖 2 時間前にブロモデオキシウリジン(BrdU)投与した。剖検時に採材した肝臓は、重量測定後に一部をホルマリン固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色の後に病理組織学的検査に供し、未染色切片は BrdU 免疫組織化学的解析に供した。また、剖検時に採材した肝臓の一部は液体窒素により急速凍結して保存し、レポーター遺伝子の変異頻度(MF)解析(*gpt* 及び *Spi* assay)に供した。さらに、採材した肝臓の一部は RNA を抽出したのち Whole Mouse Genome (4×44K) / Oligo Microarray Kit および Gene Spring (Agilent technologies)を用いて

cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。なお、変動遺伝子については、抽出した RNA をリアルタイム PCR 法に供し、mRNA 定量解析を実施した。

6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット(日本 SLC)にコーンオイル(和光純薬)に懸濁させたフラン(和光純薬)を 8 mg/kg 体重の用量で、週 5 日、13 週間強制経口投与、または DEN を 10 ppm の濃度で 16 週間飲水投与した。肝臓の未固定新鮮凍結サンプルから作製した連続切片を用いて、抗 GST-P ポリクローナル抗体(医学生物学研究所)を用いた免疫組織学的染色および 0.05%トルイジンブルー染色を行った。GST-P 免疫組織学的染色標本を参照しながら、0.05%トルイジンブルー染色標本において GST-P 陽性細胞巢または GST-P 陰性領域に対応するそれぞれの部位をレーザーマイクロダイセクション法により切除し、切除切片より RNeasy Plus micro kit (QIAGEN)を用いて Total RNA を抽出した。cDNA 合成は High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いて行った。リアルタイム PCR は、Nrf2 関連因子として *glutathione S-transferase pi 1 (Gstp1)*、*Nrf2* および *Nqo1*、細胞周期関連遺伝子として、*Cyclin D1* および *Cyclin E1* について、TaqMan® Gene Expression Assays を用いて行った。内在性コントロールには、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*を用いた。

半数致死量(LD₅₀ 値)を比較する試験では、7 週齢の Wistar Hannover 系 SPF 雌性ラット(BrlHan:WIST@Jcl [GALAS])を試験環境に 7 日間馴化させた後に体重を測定し、5 匹/用量で被験物質混合液を投与した。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て記録した。観察は、投与日は投与 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、実施した。また、投与直前及び観察期間終了時あるいは死亡発見時に、体重を測定した。母動物および児動物の発達に及ぼす影響を検索した試験では OECD 発達神経毒性試験ガイドライン (TG 426)¹⁾ に準拠して実施した。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混合して、妊娠 6 日目の雌性ラットに対し、哺育 21 日まで反復経口投与した。免疫系への影響を検討する試験では、有機リン剤(パラチオン)、有機塩素剤(メキシクロル)ないしは植物調整剤(ピペロニルブトキシド)を雌性の NC/Nga 系マウスに 5 日間反復経口投与し、4 週間休薬後にアトピー性皮膚炎を惹起する Picryl chloride を反復経皮暴露し、皮膚所見や各種免疫学的因子測定など、アトピー性皮膚炎反応の増強影響を検索した。

HPL-A3 細胞を 24 ウェル培養プレートに 5 x 10⁴ cell/well の割合で播種し、48 時間前培養した後、被検化合物を添加し、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。また、HPL-A3 細胞を 60 mm 培養皿に 5 x 10⁵ cell/dish の割合で播種し播種し、48 時間前培養した後、被検化合物を一定時間処理した。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、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。

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 (POBN)を用いたスピントラッピング法によって評価した。

試料調製は PBS 180 μ L に 20 mM に調製した測定対象物質 30 μ L、DMSO に溶解した POBN (100 mM)を 30 μ L、金属 (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。

(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

BrdU 免疫組織化学的解析の結果、FL 投与群で対照群と比較して BrdU 標識細胞率の有意な増加が認められ、MeIQx+FL 併用群では MeIQx 単独群と比較しても有意な高値となった。*gpt* および *Spi*⁻ Mutant frequency (MF) は、MeIQx 単独群で基礎飼料群と比較して 10～50 倍程度の増加が認められた。MeIQx+FL 併用群では、*gpt* および *Spi*⁻ MF のいずれにおいても、MeIQx 単独群と比較してさらに 2 倍以上増加し、有意な変化となった。一方、MeIQx+PB 併用群では、MeIQx 単独群と比較して *gpt* および *Spi*⁻ MF のいずれにおいても変化は認められなかった。網羅的遺伝子発現解析の結果、MeIQx 単独群と比較して MeIQx+FL 併用群で炎症関連遺伝子、細胞増殖関連遺伝子、DNA 傷害・修復関連遺伝子等の遺伝子の発現上昇が認められた。上記遺伝子の一部についてリアルタイム PCR 法により mRNA レベルの定量解析を実施した結果、炎症性サイトカイン (IL-1 β 、Tnf)、細胞周期促進因子 (Cyclin D、Cyclin E) の mRNA レベルの増加が認められた。また、MeIQx の代謝活性化あるいは解毒・排泄に関与する遺伝子について mRNA レベルの定量解析を実施した結果、*Cyp1a2* はすべての MeIQx および PB 投与群で対照群と比較して発現増加が認められたものの、FL 投与群に共通して変動は認められなかった。一方、*UGT1b1* については、FL 投与群で対照群および MeIQx 単独群と比較して有意な mRNA 発現レベルの減少が認められた。

フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢内では、周囲の GST-P 陰性領域と比較して、*Gstpl*、*Nqo1*

の mRNA 発現の程度が有意に高かった。しかし、*Nrf2* の mRNA 発現は GST-P 陽性細胞巢と GST-P 陰性領域間において、顕著な差は認められなかった。一方、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢内では、*Gstp1*、*Nqo1* および *Nrf2* のいずれも mRNA 発現に顕著な差は認められなかった。細胞周期関連因子では、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢内では、*Cyclin E1* の mRNA 発現が周囲の GST-P 陰性領域に比較して有意に高かったものの、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢では mRNA 発現に差は認められなかった。

半数致死量 (LD₅₀ 値) を比較する試験では、3 ないし 4 剤の複合投与における各組合せにおいても、単剤あるいは 2 剤複合同様にコリンエステラーゼ活性阻害に起因する典型的な副交感神経系の興奮を示唆する症状が認められた。これらの症状は、投与直後から認められ、生存動物では投与後 7 日以内に回復し、投与 7 日後における全生存動物の体重も増加した。母動物および児動物の発達に及ぼす影響を検索した試験ではパラチオン 0.3 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 mg/kg/day、パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.8 mg/kg/day 用量で単剤あるいは複合させて反復経口投与しても、幼若期および成熟期ラットで死亡あるいは瀕死状態は認められず、パラチオン 0.3 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 mg/kg/day の組み合わせでは神経症状は認められず、また ChE 活性測定においても異常は認められなかった。一方、パラチオン 0.6+メタミドホス 0.8 mg/kg/day の組み合わせでは、幼若および成熟ラットとも振戦、縮瞳など典型的な症状に加え、ChE 活性値の有意な低下が認められた。免疫系への影響を検討する試験では、免疫抑制作用を有するパラチオン、メトキシクロルナ

いしピペロニルブトキシドを幼若期に投与し、その後 Picryl chloride を反復経皮投与することによってアトピー性皮膚炎を惹起した結果、アトピー性皮膚炎様皮膚所見や耳介の厚さ、各組織中の IgE 量、サイトカイン産生量がコントロール軍と比較して有意に増加し、アトピー性皮膚炎反応に対する増強効果が認められた。

最近樹立したヒト CYP3A 酵素誘導剤検索用細胞株である HPL-A3 を用いて、CYP3A 酵素誘導に対する食品添加物の影響を検討した結果、それぞれの化合物毎に異なった相互作用が起こることが示された。

食品中に含まれるフェノール性化合物と金属の反応が ROS の生成に与える影響について ESR を用いて評価した。得られた結果から、オルト位に水酸基を有する化合物と銅が反応することで最も ROS の生成が認められた。一方、フェルラ酸のようにオルト位の片方がメチル基で置換されている化合物は ROS の生成が認められなかった。

D. 考察

MeIQx は食品の加熱処理により生成するため、ヒトの 1 日摂取量は極微量であるものの、暴露を避けられない遺伝毒性発がん物質である。今回、MeIQx とその標的臓器に組織障害および細胞増殖活性の亢進を引き起こす FL との併用により、MeIQx の変異原性が増強した。本実験で使用した MeIQx および FL の投与量は高用量および発がん用量であり、食品中に含まれる用量とは乖離があるものの、標的臓器の慢性的な炎症あるいは細胞増殖活性の高い環境は、遺伝毒性発がん物質の発がんリスクが増加する一つの要因になりうる可能性が考えられた。

本研究では、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢

では、Nrf2 経路が活性化している可能性が示された。今後は、Nrf2 経路活性化物質のフラン肝発がんに与える影響を検討することにより、発がん過程における Nrf2 活性化の意義を明らかにするとともに、Nrf2 活性化物質の複合影響を予測する基礎的なデータを提供できるものとする。

今回用いた農薬の 3 剤ないし 4 剤の複合暴露試験では、2 剤暴露と比較して単剤毒性から予想される複合毒性強度の変化(拮抗あるいは増強作用)が軽度であった。さらに、先に実施した 2 剤の複合投与による毒性強度と今回の結果を比較したところ、3 ないしは 4 剤複合投与による毒性強度は、構成する 2 剤の複合毒性強度の中央値及び平均値とほぼ一致した。この結果から、多剤複合暴露影響の予測には、2 剤複合毒性情報が有用である可能性が示唆された。妊娠動物における高用量群(パラチオン 0.6+メタミドホス 0.8 mg/kg/day)で認められた死亡あるいは重篤な神経症状の発現は、妊娠期における様々な生理学的変化による作用と有機リン系農薬投与による作用とが相加的に作用することによって生じた生体内恒常性維持の失調が原因ではないかと考えた。児動物では、PND4 の高用量群における雄で ChE 活性の有意な低下が認められた。乳汁中のパラチオンおよびメタミドホス、パラチオン代謝物のパラオキソンが検出限界以下であったことから、パラチオンおよびメタミドホスの経乳汁移行は成立していないと判断した。また、有機リン系農薬を投与された母動物から生まれた児動物では、体重増加抑制や発育遅延、幼若期 (PND17, 25±2) における自発運動量の増加、プレパルス反応抑制の低下を示した。児動物に対する影響は、有機リン系農薬の直接的作用ではなく、母動物の妊娠期における

有機リン系農薬投与による著しい生理学的変化あるいは行動学的変化に起因すると判断した。メキシクロル、パラチオンないしピペロニルブトキシドを 4 週齢時の雌性 NC/Nga マウスに 5 日間反復経口投与し、4 週間休薬した後、Picryl chloride を経皮投与することでアトピー性皮膚炎を惹起し、アトピー性皮膚炎反応を皮膚所見、耳介厚、IgE 量および寒冷サイトカイン産生量を測定することにより被験物質の影響を調査した。その結果、メキシクロル、パラチオンおよびピペロニルブトキシドの若週齢における反復投与は、アトピー性皮膚炎反応に対して増強効果を示すことが示唆された。

本研究の結果から、試験した食品添加物は何れも単独では CYP3A 酵素誘導に対してわずかな作用しか示さなかったが、CYP3A 酵素誘導剤との複合処理時には、様々な機構によって CYP3A 酵素遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性が示された。特に CUR は、複合処理時間によって異なる影響を及ぼすため、それら標的分子の解明、あるいは *in vivo* での生体影響の把握が今後の課題となる。

フェノール性化合物は、オルト位に水酸基を有する化合物は銅と反応し、ROS を生成することが明らかとなった。更に、この反応によって過酸化水素が生成されていることを示した。チオール化合物とビタミン類については、一部の化合物と銅の反応で ROS が生成していることが明らかとなった。本研究の結果から、抗酸化物質と金属を同時に摂取した場合、ROS が生成される可能性を示唆し、今後、生体への影響を考える必要があると考えられる。

E. 結論

In vivo による食品中化学物質の複合影響を検討するグループでは、発がん過程早期に

における細胞増殖誘導や腫瘍内微小環境と言った新たな作用点での複合影響を明らかにした。また、同じ作用点を有する農薬では多剤の複合影響予測の可能性を示した。In vitro の系を用いたグループでは、食品中化学物質の新たな作用点の可能性あるいは新たな組み合わせの可能性を提示した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

M. Sekimoto, S. Sano, T. Hosaka, K. Nemoto and M. Degawa: Establishment of a stable human cell line, HPL-A3, for use in reporter gene assays of CYP3A inducers. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

Y. Iwasaki, T. Hirasawa, Y. Maruyama, Y. Ishii, R. Ito, K. Saito, T. Umemura, A. Nishikawa and H. Nakazawa, (2011) Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. *Toxicol. in Vitro*, 25(7), 1320-1327.

Y. Iwasaki, M. Nomoto, M. Oda, K. Mochizuki, Y. Nakano, Y. Ishii, R. Ito, K. Saito, T. Umemura, A. Nishikawa and H. Nakazawa, (2011) Characterization of nitrated phenolic compounds for their anti-oxidant, pro-oxidant, and nitration activities. *Arch. Biochem.*

Biophys., 513(1), 10-18.

Y. Iwasaki, K. Mochizuki, Y. Nakano, N. Maruya, M. Goto, Y. Maruyama, R. Ito, K. Saito and H. Nakazawa, (2012) Comparison of fluorescence reagents for simultaneous determination of hydroxylated phenylalanine and nitrated tyrosine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.*, 26(1), 41-50.

2. 学会発表

黒田 顕, 木島綾希, 松下幸平、金美蘭、高須伸二、石井雄二、児玉幸夫、小川久美子、梅村隆志:マウス肝臓における MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性に対するフルメキンの増強効果. 第 28 回日本毒性病理学会 (東京、2012)

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:首藤康文、齋島淳子、藤江秀彰、小松豊、青山博昭、原田孝則 第 151 回日本獣医学会学術集会(東京、2011)

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毒性-3 ないし 4 剤混合投与による影響:首藤康文、齋島淳子、藤江秀彰、小松豊、青山博昭、原田孝則 第 153 回日本獣医学会学術集会(大宮、2012)

パラチオンおよびメタミドホスの単剤投与による発達神経毒性:齋島 淳子、首藤康文、小松豊、藤江 秀彰、富田 真理子、小嶋 五百合、青山 博昭、原田 孝則 第 152 回 日本獣医学会学術集会 (大阪、2011)

田中裕有、関本征史、西川秋佳、梅村隆志、
出川雅邦:プレグナン X 受容体依存的な
CYP3A 酵素誘導に対する食品添加物の影響.
第 57 回日本薬学会東海支部大会(名古屋、
2011)

田中裕有、関本征史、西川秋佳、梅村隆志、
出川雅邦:ヒト肝癌細胞株 HepG2-PXRLucA3
での CYP3A 酵素発現へのクルクミンの影響.
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会
東海支部 合同学術大会 2011(名古屋、
2011)

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

所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究協力者： 黒田 顕

所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

食品の加熱処理によって生じるヘテロサイクリックアミンの一つである 2-amino-3,8-dimethyl-3H-imidazo [4,5-f]quinoxaline (MeIQx)は遺伝毒性肝発がん物質である。一方、動物用医薬品として食品中への残留が懸念されているフルメキン (FL) は肝臓に組織傷害を誘発する発がんプロモーター物質である。本研究では、ヒトが同時に摂取する可能性のある MeIQx および FL の複合影響を評価するため、*gpt delta* マウス肝臓における、MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性に対する FL の影響を検討した。また、肝組織傷害を引き起こさない肝発がんプロモーターであるフェノバルビタール (PB) の複合影響についても同様に検討した。6 週齢の雄 B6C3F₁ 系 *gpt delta* マウス各群 5 匹に基礎飼料、0.03%MeIQx、0.4%FL、0.05%PB、0.03%MeIQx+0.4%FL、0.03%MeIQx+0.05%PB を 13 週間混餌投与した。投与終了後、肝臓の病理組織学的解析、BrdU 免疫組織化学的解析、レポーター遺伝子の変異頻度 (MF) 解析 (*gpt* 及び *Spi* assay)、cDNA マイクロアレイおよびリアルタイム PCR 法による網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、MeIQx 投与により上昇した *gpt* および *Spi* MF は FL 併用投与によりさらに 2 倍以上増加し、MeIQx 単独投与群と比較して有意な高値となった。*gpt* 変異スペクトラム解析では、MeIQx 投与により高頻度で観察された GC:TA tranversion および一塩基欠失の変異頻度が、FL 併用投与により 2 倍以上増加した。また、FL 投与により、小葉中心性の空胞化を伴った肝細胞肥大ならびに炎症細胞浸潤が認められ、BrdU 標識率の有意な増加が確認された。網羅的遺伝子発現解析の結果、FLU 投与により炎症性サイトカイン (*IL-1b*、*Tnf*)、細胞周期関連因子 (*Cyclin D1*、*Cyclin E1*) の mRNA レベルの増加が認められた。PB との併用投与では、小葉中心性の肝細胞肥大は認められたものの、MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性に変化は認められなかった。以上の結果、マウス肝臓における MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性は、動物薬 FL の併用投与により増強され、この作用には、FL による肝組織傷害に引き続いておこる細胞増殖活性の亢進が関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

食品中には非意図的に種々の発がん物質が生成あるいは混入する可能性がある。様々な生物学的作用を有する複数の発がん物質が食品を介してヒトに摂取された場合、それらの複合影響が相加・相乗あるいは抑制作用として発現する可能性が考えられる。しかし、それぞれの発がん物質は単体での

毒性についてのみ評価されており、複合影響について検討した報告は極端に少ない。遺伝毒性肝発がん物質である MeIQx は、食品の加熱処理によって生じるヘテロサイクリックアミンの一つである。これまでに我々は、マウス肝臓における MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性に対して、肝障害誘発物質である四塩化炭素が増強作用を示すことを明

らかにした。この増強作用には、四塩化炭素による肝組織障害あるいは炎症が関与していると考えられた。一方、動物用医薬品として食品中への残留が懸念されているフルメキン (FL) は肝障害を誘発する発がんプロモーターである。ヒトは食品を介して MeIQx と FL を同時に長期間摂取する可能性があり、FL は MeIQx の発がん標的臓器である肝臓に対して組織傷害を引き起こす物質であることから、四塩化炭素と同様に MeIQx の変異原性に対して何らかの影響を与える可能性も否定できない。そこで本研究では、*gpt delta* マウス肝臓における MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性に対する FL の複合影響を検討した。また、FL とは異なる経路での発がんプロモーター作用を有するフェノバルビタール (PB) の複合影響も検討した。

B. 研究方法

6 週齢の雄 B6C3F₁ 系 *gpt delta* マウス (自家繁殖) 30 匹を対照群、MeIQx 単独群、FL 単独群、PB 単独群、MeIQx+FL 併用群、MeIQx+PB 併用群の 6 群に分け、各被験物質を CRF-1 粉末基礎飼料 (オリエンタル酵母株式会社) と混合し、13 週間混餌投与した。MeIQx の投与量は *gpt delta* マウス肝臓においてレポーター遺伝子変異頻度の上昇が報告されている 0.03% (Masumura et al., 2003)、FL の投与量は発がん用量相当量である 0.4% (Yoshida et al., 1999)、PB の投与量はプロモーション作用量である 0.05% とした。対照群には、基礎飼料のみを与えた。いずれの群も飼料は週 1 回調製、交換した。

投与期間中、体重及び摂餌量測定を週 1 回実施し、解剖 2 時間前にプロモデオキシウリジン (BrdU) 投与した。剖検時に採材した肝臓は、重量測定後に一部をホルマリン固定し、常法によりパラフィン切片を作製した。パラフィン切片はヘマトキシリン・エオジン染色の後に病理組織学的検査に供し、未染色切片は BrdU 免疫組織化学的解析に供した。また、剖検時に採材した肝臓の一部は液体窒素により急速凍結して保

存し、レポーター遺伝子の変異頻度 (MF) 解析 (*gpt* 及び *Spi* assay) に供した。さらに、採材した肝臓の一部は ISOGEN (ニッポンジーン) に浸漬して凍結保存し、組織破碎して RNA を抽出したのち Whole Mouse Genome (4×44K) / Oligo Microarray Kit および Gene Spring (Agilent technologies) を用いて cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。なお、変動遺伝子については、抽出した RNA をリアルタイム PCR 法に供し、mRNA 定量解析を実施した。

統計学的解析には、Turkey の多重比較検定を用い、対照群との比較および MeIQx 単独群との比較を実施した。

(倫理面への配慮)

本試験は「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」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。また、遺伝子組み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、遺伝子組換え実験計画書を作成し、承認を得た後に使用した。

C. 研究結果

試験期間中の動物の一般状態に変化は認められず、死亡例も認められなかった。FL 投与群で摂餌量の低値に起因したと考えられる体重増加抑制が認められた (Fig. 1)。最終体重は MeIQx+FL 併用群で対照群と比較して有意な減少が認められ、肝相対重量はすべての FL 投与群および PB 投与群で有意な増加が認められた (Table 1)。病理組織学的検査では、FL 投与群で空胞化を伴った小葉中心性肝細胞肥大および軽度の炎症細胞浸潤が認められ、PB 投与群で小葉中心性肝細胞肥大が認められた (Fig. 3)。BrdU 免疫組織化学的解析の結果、FL 投与群で対照群と比較して BrdU 標識細胞率の有意な増加が認められ、MeIQx+FL 併用群では

MeIQx 単独群と比較しても有意な高値となった (Fig. 2)。 *gpt* および *Spi* Mutant frequency (MF) は、MeIQx 単独群で基礎飼料群と比較して 10~50 倍程度の増加が認められた。MeIQx+FL 併用群では、*gpt* および *Spi* MF のいずれにおいても、MeIQx 単独群と比較してさらに 2 倍以上増加し、有意な変化となった (Table 2 および 4)。 *gpt* 変異コロニーを用いた変異スペクトラム解析の結果、MeIQx 単独群で増加した GC:TA transversion および一塩基欠失変異の変異頻度が、FL 併用投与によりいずれも 2 倍以上増加した (Table 3)。一方、MeIQx+PB 併用群では、MeIQx 単独群と比較して *gpt* および *Spi* MF のいずれにおいても変化は認められなかった。網羅的遺伝子発現解析の結果、MeIQx 単独群と比較して MeIQx+FL 併用群で炎症関連遺伝子 (*Nfkb2*、各種ケモカイン、*IL-1β*、*Tnf*)、細胞増殖関連遺伝子 (*Cyclin*、*Cdk*、*Jun*、*Fos*)、DNA 傷害・修復関連遺伝子 (*Rad51*、*Rad18*、*Neil3*、*Brca1*) 等の遺伝子の発現上昇が認められた (Table 5)。上記遺伝子の一部についてリアルタイム PCR 法により mRNA レベルの定量解析を実施した結果、炎症性サイトカイン (*IL-1β*、*Tnf*)、細胞周期促進因子 (*Cyclin D*、*Cyclin E*) の mRNA レベルの増加が認められた (Fig. 4-1 および 4-2)。また、MeIQx の代謝活性化 (*Cyp1a2*、*Nat2*) あるいは解毒・排泄 (*UGT1a1*、*UGT2b1*) に関与する遺伝子について mRNA レベルの定量解析を実施した結果、*Cyp1a2* はすべての MeIQx および PB 投与群で対照群と比較して発現増加が認められたものの、FL 投与群に共通して変動は認められなかった。一方、*UGT1b1* については、FL 投与群で対照群および MeIQx 単独群と比較して有意な mRNA 発現レベルの減少が認められた。

D. 考察

MeIQx は *gpt* 変異スペクトラム解析において GC:TA transversion や一塩基欠失といった特徴的な変異パターンを示し、MeIQx+FL

併用群では、その変異パターンを保ったまま変異頻度が上昇したことから、FL の併用投与は MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性を増強したと考えられた。遺伝毒性物質による DNA 傷害が変異として固定されるためには DNA の複製が必要であることから、一般的に増殖期にある細胞は遺伝毒性物質に対して感受性が高いと考えられている。今回、FL 投与群では BrdU 標識細胞率が高値を示していたことから、細胞増殖亢進が FL による MeIQx 誘発変異原性の増強作用と関連していると考えられた。病理組織学的検査の結果、FL 投与により空胞化を伴った小葉中心性の肝細胞肥大および軽度な炎症細胞浸潤が認められ、FL による肝組織傷害が確認された。網羅的遺伝子発現解析の結果、*Cyclin D1* および *Cyclin E1* といった細胞周期に係る遺伝子群の変化と共に、肝組織傷害により惹起される炎症性サイトカイン *IL-1β* と *Tnf* の mRNA レベルが上昇していた。これらのサイトカインは組織傷害後に引き続いて起こる細胞増殖を誘発することが知られており、FL 投与による組織傷害が細胞増殖活性の亢進に深く関与している可能性が考えられた。一方、PB 併用投与により MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性は変化しなかった。PB は投与開始後早期に一過性の細胞増殖活性の亢進が報告されているが、本試験では 13 週間投与後における BrdU 標識細胞率の変化は認められなかった。本試験においても投与初期に PB 投与による細胞増殖活性の亢進が起きていたかは明らかでないが、PB は MeIQx 誘発変異原性には影響を与えなかったことから、FL で認められたような持続的な組織傷害および細胞増殖活性の増加が、変異原性の増強には重要である可能性が考えられた。

MeIQx は CYP1A2 による N-ヒドロキシ化の後、NAT2 による o-アセチル化を経て活性代謝物となり、DNA 付加体を形成することで遺伝毒性を発揮し、一方で UGT や GST により解毒・排泄される。そこで、本試験で認められた FL による MeIQx 誘発 *in*

vivo 変異原性の増強に、これらの酵素の発現変動が関与しているかについて、リアルタイム PCR により確認した。*Cyp1a2* の mRNA レベルは、MeIQx 群と比較して MeIQx+FL 併用群で有意に増加したものの、FL 群では対照群と比較して増加しておらず、*Cyp1a2* の発現増加と FL による変異原性の増強作用との関連は明らかでなかった。一方、MeIQx を解毒・排泄する *Ugt2b1* の mRNA レベルは対照群および MeIQx 群と比較して FL 群および MeIQx+FL 群で有意に減少しており、MeIQx の解毒・排泄の低下が FL による変異原性の増強と関与している可能性も考えられた。

MeIQx は食品の加熱処理により生成するため、ヒトの 1 日摂取量は極微量であるものの、暴露を避けられない遺伝毒性発がん物質である。今回、MeIQx とその標的臓器に組織障害および細胞増殖活性の亢進を引き起こす FL との併用により、MeIQx の変異原性が増強した。本実験で使用した MeIQx および FL の投与量は高用量および発がん用量であり、食品中に含まれる用量とは乖離があるものの、標的臓器の慢性的な炎症あるいは細胞増殖活性の高い環境は、遺伝毒性発がん物質の発がんリスクが増加する一つの要因になりうる可能性が考えられた。

E. 結論

マウス肝臓における MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性は、動物薬 FL の併用投与により増強された。この増強作用には、FL による肝組織傷害に引き続いておこる細胞増殖活性の亢進が関与している可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

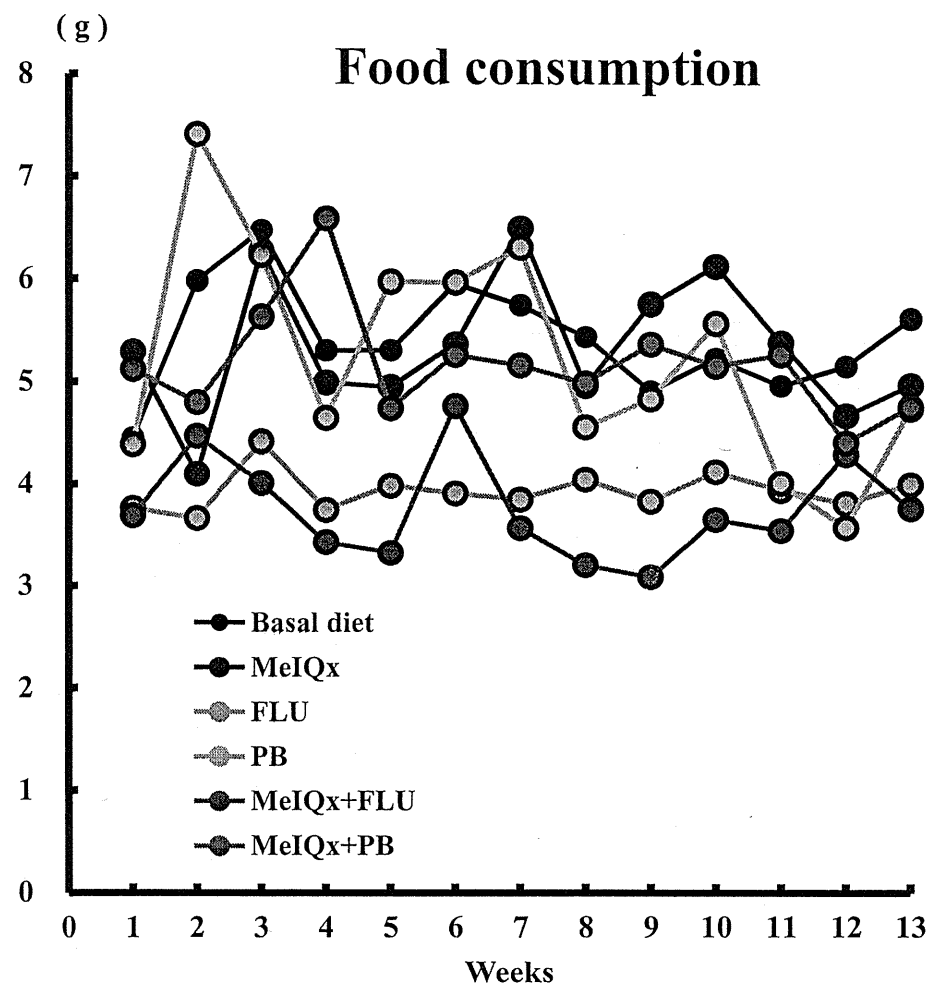
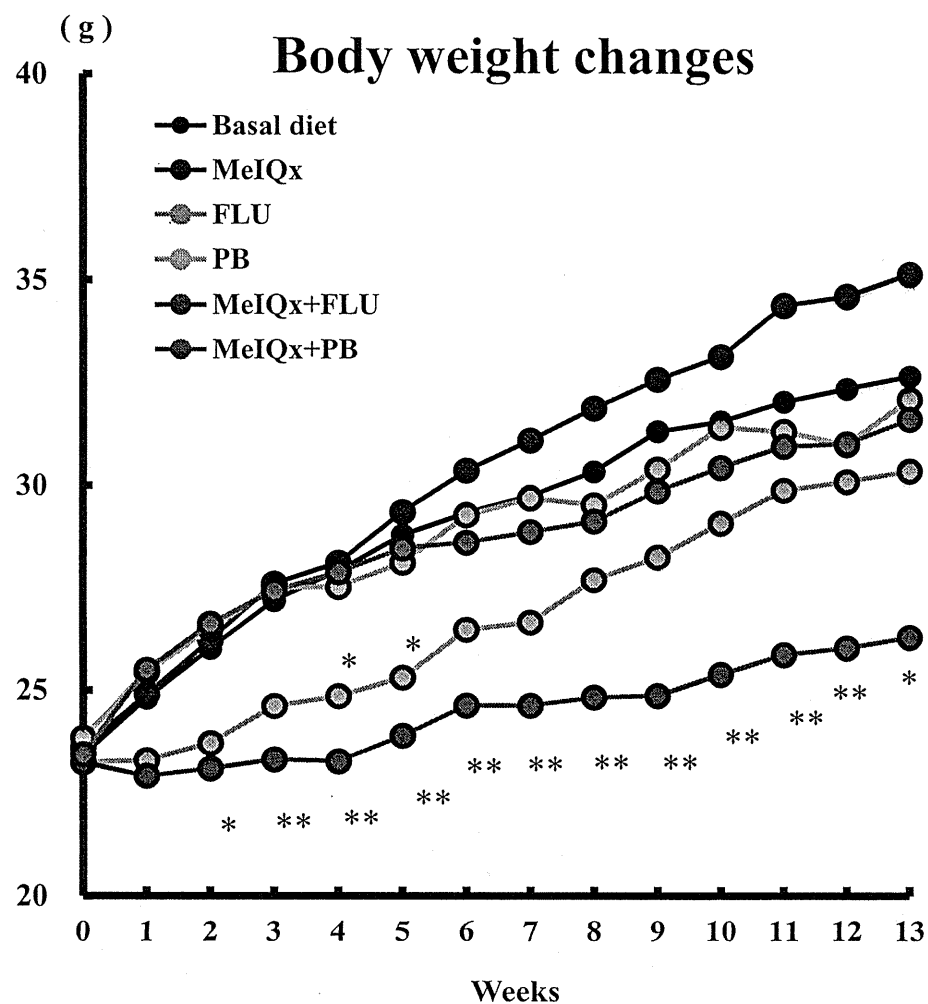
黒田 顕, 木島綾希, 松下幸平, 金美蘭, 高須伸二, 石井雄二, 児玉幸夫, 小川久美

子, 梅村隆志: マウス肝臓における MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性に対するフルメキンの増強効果. 第 28 回日本毒性病理学会, 東京, 第 28 回日本毒性病理学会講演要旨集: p75 (P-015), 2 月, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況

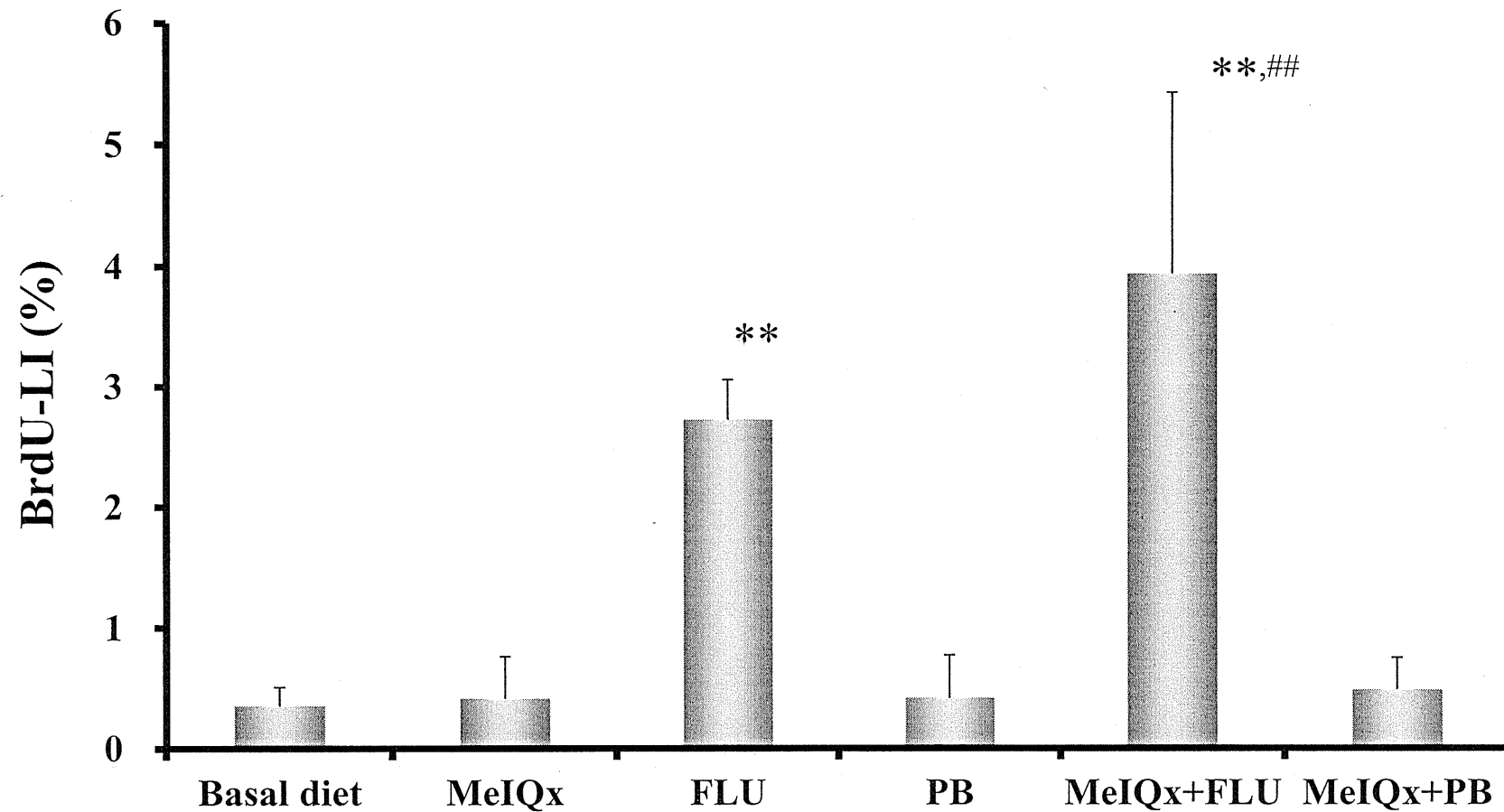
なし

Fig.1 Body weight changes and food consumption of *gpt* delta mice treated with MeIQx, FLU and PB



*, ** : $p < 0.05, 0.01$ vs Basal diet

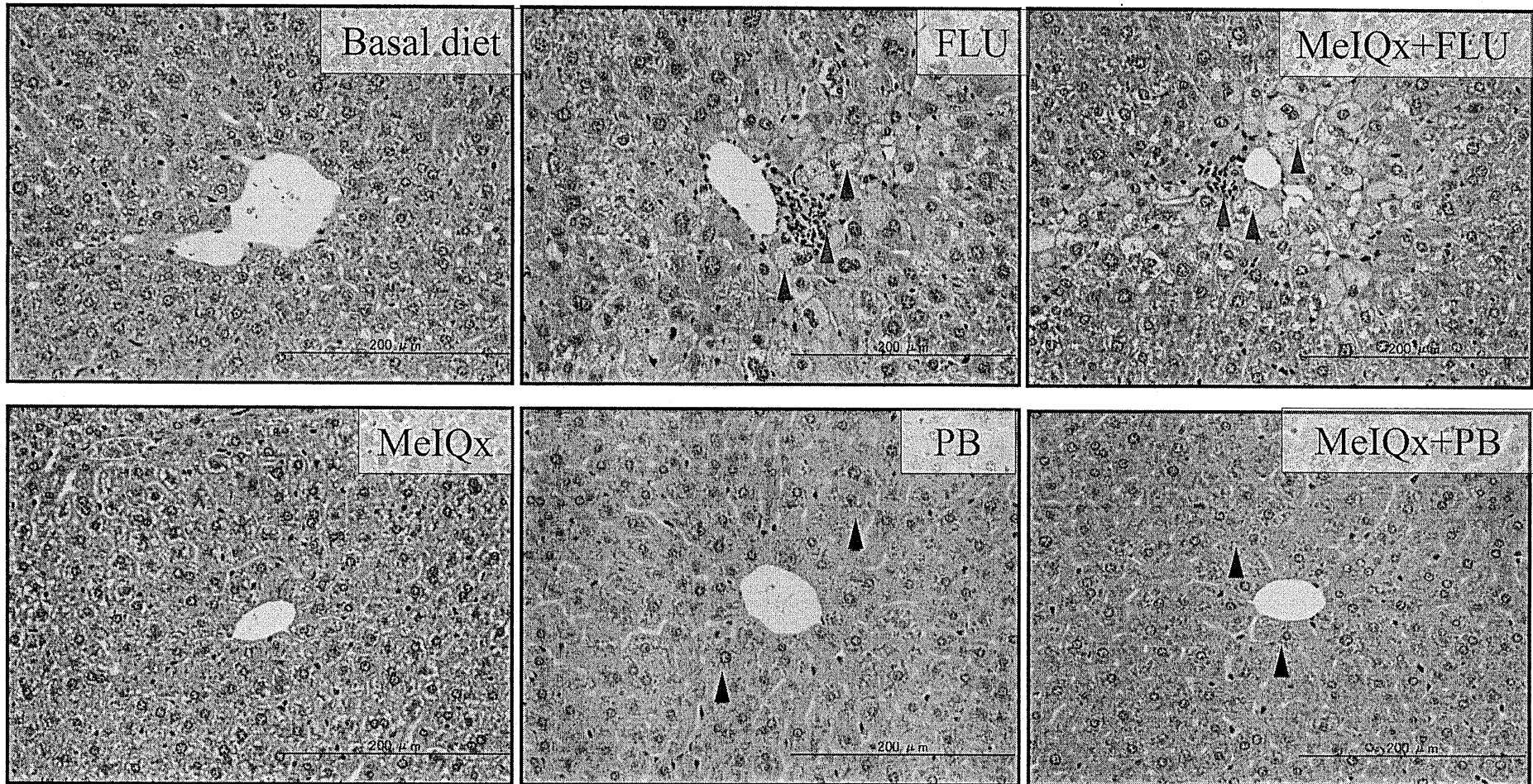
Fig.2 BrdU-labeling Index (LI) in the liver
of *gpt* delta mice treated with MeIQx, FLU and PB



** : $p < 0.01$ vs Basal diet

##: $p < 0.01$ vs MeIQx

Fig.3 Histopathology in the liver
of *gpt* delta mice treated with MeIQx, FLU and PB



▲ Hypertrophy

▲ Inflammatory cell infiltration

▲ Hypertrophy with vacuolation