

201234013A

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

(H22-食品-一般-016)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅村 隆志

平成25(2013)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 梅村隆志	----- 1
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 梅村隆志	----- 15
2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 西川秋佳	----- 29
3. 食品中残留農薬の複合暴露影響に関する研究 原田孝則	----- 35
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 出川雅邦	----- 109
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 中澤裕之	----- 113
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 122
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 124

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 24 年度総括研究報告書

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 残留農薬研究所 理事
出川雅邦 静岡県立大学 教授
中澤裕之 星薬科大学 教授

研究要旨

食品添加物の臭素酸カリウム (KBrO_3) と水道水汚染物質のニトリロ三酢酸 (NTA) 併用投与の遺伝子突然変異誘発性に対する影響を検討した。6 週齢の雌性 B6C3F₁ *gpt delta* マウス 40 匹を各群 10 匹に配し、0.15% KBrO_3 と 1.5% NTA の併用投与群、それぞれの単独投与群ならびに対照群を設定した。 KBrO_3 は飲水に、NTA は粉末飼料に混じて 13 週間投与した。腎臓の病理組織学的検索、DNA 中の *gpt* 及び *Spi* 遺伝子変異体頻度 (MF) の検索ならびに酸化 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の測定を行った。8-OHdG レベルは KBrO_3 単独投与群及び KBrO_3 +NTA 併用投与群で有意に上昇したが、NTA 併用投与の影響は認められなかった。一方、*gpt* 及び *Spi* MF は KBrO_3 単独投与群及び KBrO_3 +NTA 併用投与群で対照群に比して有意に上昇し、*gpt* MF は NTA 併用投与により約 1.5 倍の上昇が認められ、酸化 DNA 損傷に特徴的な GC-TA transversion 及び 2 base 以上の deletion の頻度は約 3 倍増加した。また、*Spi* 変異体では NTA 併用投与により large deletion の頻度が約 1.5 倍上昇した。これらの結果から、細胞増殖亢進を引き起こす化学物質が KBrO_3 の遺伝子突然変異誘発性及び発がん性を増強する可能性が示唆された。

非遺伝毒性発がん物質フランにより誘発された GST-P 陽性巣内では、NRF2 経路が活性化しており、遺伝毒性発がん物質 DEN 誘発の GST-P 陽性巣内ではそのような変化は認められないことを報告してきた。そこで今回、外因性の NRF2 経路活性化が腫瘍性病変に及ぼす修飾作用を明らかにするために、食品中化学物質であり、NRF2 経路活性化作用を有するスルフォラファン (SFN) を用いて、フランおよび DEN 投与により誘発した GST-P 陽性細胞巣に対する NRF2 経路活性化の影響を検討した。結果、SFN はフラン誘発 GST-P 陽性細胞巣の進展に影響を与えなかったが、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巣に対してはその数および面積を有意に増加させた。以上の結果から、SFN 投与による NRF2 経路の活性化は遺伝毒性発がん物質により誘導された変異細胞巣の進展に対して促進的に作用する可能性が示唆された。また、外因性の NRF2 経路の活性化に対する GST-P 陽性細胞巣の反応は GST-P 陽性細胞巣内における元々の NRF2 経路の活性化状態により異なる可能性が示唆された。

神経系を標的とした有機リン剤 (メタミドホス、パラチオン) 及び類似化合物 (カーバメート剤のキシリルカルブ、ニコチン製剤の 50%硫酸ニコチン水溶液) を 8 週齢の雌性ラ

ット(BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)) に複合投与し、その直後に生理食塩水に懸濁した活性炭の経口投与、硫酸アトロピンの皮下注射、PAM の皮下注射及びバルピタールの経口投与を行い、類似の作用機序を持つ農薬群の複合暴露影響（急性毒性）に対する、代表的な解毒剤の効果を確認した。その結果、アトロピンはニコチン製剤と有機リン剤及びカーバメート剤との混合暴露時には有効であった。PAM は有機リンを含む混合剤の中毒に対しては一定の効果が期待できることが確認された。一方、バルピタールはメタミドホスには有効だが、他のほとんどの組合せで不適であった。メタミドホスとパラチオンの2種類の有機リン系農薬を混合して非妊娠成熟ラットと妊娠ラットにおける複合暴露による毒性発現の違いについて検討を加えた。その結果、妊娠期間中の PON1 活性の低下が、母動物に対するパラチオン及びメタミドホスの複合反復経口投与による毒性発現を増強し、また、有機リン系農薬の投与による母動物の生理学的あるいは行動学的変化が、児動物の発達に影響を及ぼす可能性が示唆された。免疫毒性を有する農薬の複合暴露による獲得免疫及び免疫攪乱（アレルギー喘息）に及ぼす影響を調査すべく、有機リン剤（パラチオン）、有機塩素剤（メトキシクロル）及び殺虫剤用共力剤（ピペロニルブトキシド）を用いて検討を行った。本試験条件下では、メトキシクロルとパラチオン及びメトキシクロルとピペロニルブトキシドの複合暴露により、獲得免疫能が相乗的に抑制され、アレルギー喘息作用が相乗的に増悪することが示唆された。

シトクロム P450 (CYP) 酵素誘導に対するクルクミン (CUR) と CYP3A 酵素誘導剤の複合影響機構を追究した。まず、処理時間で相反する作用が発揮される原因として、生成する CUR 代謝物の関与を推定し、主代謝物のテトラヒドロクルクミン (THC) の CYP3A 酵素誘導効果を検討した。しかし、THC と CYP3A 酵素誘導剤との間に複合影響は観察されなかった。そこで次に、CUR が VDR リガンドとなりうることに着目し、CYP3A 酵素誘導における VDR リガンドと CYP3A 酵素誘導剤との相互作用を解析した。その結果、VDR リガンドと CYP3A 酵素誘導剤との間に相加的な複合影響が見られた。以上の結果から、CUR と CYP3A 酵素誘導剤は、VDR を介した機構をはじめ、複数の機構によって複合影響を発揮している可能性が示された。

食品中に含まれるフェノール性化合物としてケイ皮酸類縁化合物に着目し、Antioxidant 作用および金属との反応による Prooxidant 作用について評価した。Antioxidant 作用の強さはフェノール性水酸基が多い化合物ほど増加していく傾向が認められた。一方、オルト位にフェノール性水酸基を持つ化合物は中性条件下で銅と反応することで活性酸素種 (ROS) の産生が認められた。更に、一部の化合物は金属と反応することにより、新たな化合物が生成された。

A. 研究目的

1. 食品中化学物質複合投与の *in vivo* 変異原性への影響 (梅村)

腎臓において酸化ストレスを引き起こす食品添加物の臭素酸カリウム (KBrO₃) と水道水汚染物質であり、細胞増殖活性能を有するニトリロ三酢酸 (NTA) を用いて、細胞増殖亢進が酸化的 DNA 損傷を介した

遺伝子突然変異誘発性に及ぼす影響を検討した。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 (西川)

フランおよび DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢内の NRF2 経路活性化状態の差異に着目し、外因性の NRF2 経路の活性化がそれぞ

れの化学物質の肝発がん過程後期に与える修飾作用を NRF2 経路活性化物質であるスルフォラファン (SFN) を用いて検討した。

3. 食品中の残留農薬の複合暴露影響に関する研究 (原田)

3-1. 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すると共に、代表的な解毒処置の有効性を確認した。

3-2. メタミドホスとパラチオンを組み合わせ、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を目的とした。

3-3. パラチオン、メトキシクロル及びピペロニルブトキシドを反復複合経口投与した後、獲得免疫能及びアレルギー性皮喘息反応に及ぼす影響について調査した。

4. CYP1A/3A 酵素誘導を指標とした食品中化学物質の複合影響とその機構解析 (出川)

我々はこれまで、ヒト CYP3A 酵素誘導を簡便に解析できるルシフェラーゼレポーター細胞株を樹立し、これを用いて、食品中化学物質の肝 CYP 酵素誘導における複合影響を解析してきた。本研究では、CYP3A 酵素の誘導に対する CUR と CYP3A 酵素誘導剤の複合影響の発現機構を追究した。

5. 金属とフェノール性化合物が反応することで生成する新たな化合物に関する研究 (中澤)

本研究では、食品中に含まれるフェノール性化合物としてケイ皮酸類縁化合物に着目し、Antioxidant 作用および Prooxidant 作

用について評価した。また、金属と反応して生成する新たな化合物についても検討した。

B. 研究方法

1. 食品中化学物質複合投与の *in vivo* 変異原性への影響 (梅村)

6 週齢の雌性 B6C3F₁ *gpt delta* マウス 40 匹を各群 10 匹に配し、KBrO₃ と NTA の併用投与群、それぞれの単独投与群ならびに対照群を設けた。KBrO₃ は 0.15% の濃度で飲水に、NTA は 1.5% の濃度で粉末飼料に混ぜて 13 週間投与した。対照群には被験物質の溶媒としてイオン交換水と基礎飼料を自由摂取させた。13 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、腎臓を採取し、重量を測定した。各群 5 例の腎臓は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、残り 5 例の腎臓は *gpt assay* 用および 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 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。酸化的 DNA 損傷の指標である 8-OHdG の測定では液体クロマトグラフィー/電気化学検出器 (HPLC/ECD) システム (ESA, Coulochem[®] II) を用いて定量的解析を実施した。*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) に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (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。Spi 欠失変異の検出では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2) 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活

化した真の Spi プラークを検出した。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 フェージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の Spi プラーク数を回収した総プラーク数で除して Spi MF を算出した。また、Spi フェージの DNA を、*red/gam* 遺伝子を含む 5k 及び 14k base に対応したそれぞれのプライマーを用いて PCR 法により増幅し、*red/gam* 遺伝子配列を決定して変異部位を同定した。

(統計学的処理方法)

体重、腎重量、8-OHdG レベル、遺伝子突然変異頻度及び変異スペクトラムは、Tukey の多重比較検定により行った。

(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。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 (西川)

実験 1:6 週齢の雄性 F344 ラット(日本 SLC) に SFN(Toronto Research Chemicals)を 300、600 および 1200 ppm の濃度で 2 週間混餌投

与した。対照群には基礎食を投与した。投与終了後に肝臓から蛋白を抽出し、抗 NQO1 ポリクローナル抗体 (abcam) および抗 HO1 ポリクローナル抗体 (abcam) を用いたウェスタンブロット法にて、NRF2 標的遺伝子の蛋白発現を解析した。

実験 2:6 週齢の雄性 F344 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 (東京化成工業) を 10 ppm の濃度で 13 週間飲水投与した。その後、1 週間の休薬期間を設けたのちに、SFN を 1200 ppm の濃度で 6 週間混餌投与した。対照群には基礎食を同様に投与した。SFN 投与終了後に肝臓を摘出し、抗 GST-P ポリクローナル抗体 (医学生物学研究所) を用いた免疫組織化学的染色を行い、GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

(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」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。

3. 食品中の残留農薬の複合暴露影響に関する研究 (原田)

3-1. 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を組合せた混合剤を半数致死が予想される用量で単回強制経口投与した後に代表的な解毒剤である活性炭、硫酸アトロピン、プラリドキシムヨウ化メチル及びバルピタールを投与し、複合暴露中毒時の応急処置

に役立てるための解毒方法の検討を行った。
3-2. パラチオン及びメタミドホスを組み合わせ、非妊娠成熟 (11 週齢) 雌性動物に対しては 14 日間、そして妊娠動物に対しては GD6 から PND3 まで複合的に反復経口投与し、暴露時の動物の状態 (妊娠、非妊娠) の違いが発現する毒性の程度に影響を及ぼすか否かを検討した。また、実験 2 で採取した児動物の脳を対象に病理組織学的検索を実施した。

3-3. 有機リン系 (パラチオン) ないしは有機塩素系 (メトキシクロル) 農薬を 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た。Local Lymph Node Assay (LLNA 法) を実施した。

4. CYP1A/3A 酵素誘導を指標とした食品中化学物質の複合影響とその機構解析 (出川)

ヒト PXR リガンド検索用細胞株 HPL-A3 を用いた。HPL-A3 細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように播種し、48 時間前培養後、被検化合物を処理した。処理後、Reporter Lysis Buffer (Promega) を用いて細胞溶解液を調製し、これをルシフェラーゼ基質液 (東洋インキ) と混和して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。HPL-A3 細胞に被験化合物を添加して一定時間培養後、Total RNA を単離した。この Total RNA より、cDNA を合成し、この cDNA

に各種遺伝子に特異的なプライマーと Power SYBR PCR Master Mix (Applied Biosystems) を添加し、7300/7500 RealTime PCR system (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行った。さらに、各遺伝子の発現量を GAPDH 遺伝子の発現量で除することにより標準化した。

(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いずれも、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

5. 金属とフェノール性化合物が反応することで生成する新たな化合物に関する研究 (中澤)

金属として塩化銅 (I) および塩化鉄 (III) は和光純薬社製を用いた。硫酸銅 (II)、硫酸アンモニウム鉄 (II) は関東化学社製を用いた。DPPH 法による Antioxidant 作用の評価は、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。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。また、DNA に対する酸化ストレス評価は高速液体クロマトグラフ/紫外吸光度検出/電気化学検出器 (HPLC/UV/ECD) を使用し、8-OHdG を測定した。B-4. フェノール性化合物と金属の反応は、それぞれ PBS または人工胃液中で

反応を行った。得られた反応溶液は高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出/質量分析計 (LC/PDA/MS) で測定を行い、未知成分については核磁気共鳴装置 (NMR) で構造解析を行った。

C. 研究結果

1. 食品中化学物質複合投与の *in vivo* 変異原性への影響 (梅村)

最終体重では KBrO_3 及び NTA 単独投与群で対照群に比して低値が認められ、 KBrO_3 +NTA 併用投与群では有意な低値 ($p<0.05$) が認められた。また、腎相対重量では KBrO_3 単独投与群 ($p<0.05$)、NTA 単独投与群 ($p<0.01$) 及び KBrO_3 +NTA 併用投与群 ($p<0.01$) で対照群に比して有意な高値が認められた。腎 DNA 中 8-OHdG レベルは、対象群 ($0.37 \pm 0.06/10^5\text{dG}$) に比して KBrO_3 単独投与群 ($0.65 \pm 0.11/10^5\text{dG}$) 及び KBrO_3 +NTA 併用投与群 ($0.72 \pm 0.11/10^5\text{dG}$) において 8-OHdG レベルの有意な上昇 ($p<0.01$) が認められた。また、NTA 単独投与群 ($0.31 \pm 0.10/10^5\text{dG}$) では変化は認められなかった。点突然変異頻度を示す *gpt* MF は、対象群 (0.26 ± 0.09) に比して KBrO_3 単独投与群 (0.97 ± 0.42 , $p<0.05$) 及び KBrO_3 +NTA 併用投与群 (1.50 ± 0.57 , $p<0.01$) で有意な上昇が認められた。これら 2 群間に有意な差は認められなかったものの、 KBrO_3 単独投与群に比して、 KBrO_3 +NTA 併用投与群では約 1.5 倍の上昇が認められた。一方、NTA 単独投与群 (0.35 ± 0.19) では変化は認められなかった。*gpt* 変異体の変異スペクトラム解析の結果、対照群に比して、 KBrO_3 単独投与群では single base deletion の特異的頻度の有意な増加

($p<0.01$) が認められた。一方、 KBrO_3 +NTA 併用投与群では対照群に比して GC-TA transversion ($p<0.01$)、single base ($p<0.05$) 及び 2 base 以上の deletion ($p<0.05$) の有意な増加が認められ、GC-TA transversion 及び 2 base 以上の deletion の頻度は KBrO_3 単独投与群に比して約 3 倍の増加が認められた。主に *red/gam* 遺伝子の欠失変異頻度を示す *Spi* MF は、対象群 (0.28 ± 0.17) に比して KBrO_3 単独投与群 (0.88 ± 0.23) 及び KBrO_3 +NTA 併用投与群 (0.99 ± 0.46) で有意な上昇 ($p<0.01$) が認められたが、これら 2 群の間に有意な差は認められなかった。また、NTA 単独投与群 (0.21 ± 0.14) では変化は認められなかった。*Spi* 変異体の変異スペクトラム解析の結果、対照群に比して KBrO_3 単独投与群では guanine 及び adenine の single base deletion 及び large deletion (1k base 以上) の頻度の増加傾向が認められ、 KBrO_3 +NTA 併用投与群では large deletion の頻度の有意な上昇 ($p<0.05$) が認められ、 KBrO_3 単独群に比べ約 1.5 倍の上昇が認められた。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 (西川)

実験 1: SFN 投与ラット肝臓における NQO1 および HO1 蛋白発現の結果を Fig. 1 に示す。SFN 投与ラット肝臓における NRF2 標的遺伝子の蛋白発現を検討した結果、1200 ppm の濃度で SFN を投与したラット肝臓において NQO1 および HO1 の蛋白発現の程度が対照群に比較して上昇した。

実験 2: GST-P 定量的解析の結果を Fig. 2 に示す。DEN 投与後に SFN を投与した群では、GST-P 陽性細胞巢の数および面積ともに対

照群に比較して有意に増加した。一方、フラン投与後にSFNを投与した群のGST-P陽性細胞巢の数および面積は対照群と比較して、有意な変化は認められなかった。

3. 食品中の残留農薬の複合暴露影響に関する研究（原田）

3-1 メタミドホス、パラチオン、キシリルカルブ混合剤投与では、バルピタール投与は解毒剤として不適であると判断した。活性炭投与群は解毒剤として高い効果があると判断した。アトロピン投与及びPAM投与は解毒剤として有効であると判断した。メタミドホス、パラチオン、50%硫酸ニコチン水溶液混合剤投与では、バルピタール投与は解毒剤として不適であると判断した。活性炭投与群は解毒剤として高い効果があると判断した。アトロピン投与及びPAM投与は解毒剤として有効であると判断した。メタミドホス、キシリルカルブ、50%硫酸ニコチン水溶液混合剤投与では、PAM投与は解毒剤として不適であると判断した。活性炭投与、アトロピン投与及びバルピタール投与は解毒剤として有効であると判断した。パラチオン、キシリルカルブ、50%硫酸ニコチン水溶液混合剤投与では、活性炭投与及びアトロピン投与は解毒剤として高い効果があると判断した。PAM投与群でも解毒剤として有効であると判断した。バルピタール投与は解毒剤としての効果はないと判断した。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混合剤投与では、アトロピン投与及びPAM投与でも、解毒剤として有効であると判断した。バルピタール投与は解毒剤としての効果はないと判断した。

3-2. 母動物及び非妊娠成熟雌動物では、死亡動物数は、P0.6+M0.8 mg/kg 投与の母動物では4例、非妊娠成熟雌動物では1例の死亡が認められた。一般状態は、P0.6+M0.8 mg/kg 投与の母動物及び非妊娠成熟雌動物では攣縮、振戦及び流涎が認められた。体重は、P0.6+M0.8 mg/kg 投与群では体重増加抑制が認められた。剖検では、生存する無処置群では異常は認められなかったが、溶媒対照群の母動物では軽度の胸腺萎縮が2例認められた。一方、P0.6+M0.8 mg/kg 投与群の母動物では、胸腺の軽度から中程度の萎縮が6例、脾臓の軽度の小型化が2例、脳の軽度腫大3例、また肝臓の軽度小型化1例、副腎あるいは子宮膜の水腫が各1例、認められた。ChE活性は、各測定時点における母動物の血清及び脳のChE活性は、P0.6+M0.8 mg/kg 群において統計学的有意な低下が認められた（溶媒対照群の45-68%低下）。P0.6+M0.8 mg/kg 投与の母動物及び非妊娠成熟雌動物では、脳のChE活性が母動物で統計学的有意な低下を示した。Paraoxonase 1 (PON 1) 活性は、有機リン酸塩を加水分解する酵素であるPON1の活性は、P0.6+M0.8 mg/kg 投与群の母動物において、溶媒対照と比較してGD21及びPND4で統計学的有意な低下を認めた。児動物では、一般状態は、PND0（出生日）からPND4（哺育4日）までの間に、無処置群、溶媒対照群及びP0.6+M0.8 mg/kg 投与群の母動物から生まれた児動物に異常は認められなかった。病理組織学的検索では、平成23年度に採取したPND22および60-70の雌雄ラットの脳において定性的病理組織学的検査では変化は認められなかった。被験物質投与群におけるPND22の雄の児動物で認めら

れた小脳の高さの低値について、統計学的有意差は認められなかったが、P0.6+M0.8 mg/kg 投与群において分子層の菲薄化が顕著であった。

3-3. 獲得免疫抑制検出実験 (SRBC 特異的 IgM 抗体産生能) では、脾臓中 PFC 法については、単剤暴露と比較して、メトキシクロル+パラチオン、メトキシクロル+ピペロニルブトキシドの複合暴露についてはさらに有意な抑制反応が認められた。血清中抗体価測定については、PFC 法と同様に単剤暴露と比較してメトキシクロル+パラチオン、メトキシクロル+ピペロニルブトキシドの複合暴露については有意な抑制反応が認められた。獲得免疫抑制検出実験 (B 細胞数) では、総 B 細胞数については、単剤暴露と比較して、メトキシクロル+パラチオン、メトキシクロル+ピペロニルブトキシドの複合暴露では細胞数の減少が認められた。胚中心陽性 B 細胞数については、単剤暴露と比較してメトキシクロル+ピペロニルブトキシドの複合暴露ではさらに有意な抑制反応が認められた。獲得免疫抑制検出実験 (T 細胞数) では、単剤暴露と比較して、メトキシクロル+パラチオンの複合暴露では細胞数の有意な減少が認められた。アレルギー喘息検出実験 (BALF 中各種細胞数) では、メトキシクロル+パラチオン、及びメトキシクロル+ピペロニルブトキシドの複合暴露では、単剤暴露と比較して有意な増加が認められた。アレルギー喘息検出実験 (BALF 中ケモカイン量) では、メトキシクロル+パラチオン及びメトキシクロル+ピペロニルブトキシドの複合暴露では、単剤暴露とは比較して有意な反応の増加が認められた。アレルギー喘息検

出実験 (肺門リンパ節中 IgE 陽性 B 細胞数) では、メトキシクロル+パラチオン及びメトキシクロル+ピペロニルブトキシドの複合暴露では、単剤暴露とは比較して有意な反応の増加が認められた。

4. CYP1A/3A 酵素誘導を指標とした食品中化学物質の複合影響とその機構解析 (出川)

4-1. HPL-A3 細胞での CYP3A4 プロモーター活性化に及ぼす CUR 代謝物の影響では、ラット肝細胞懸濁液を用いた検討より、CUR は速やかに代謝を受け、テトラヒドロクルクミン (THC) などに代謝されることが示されている。さらに、THC をはじめとする CUR の代謝物は、CUR よりも強い生理活性を有する場合がある。そこで、PXR 活性化剤と CUR との複合影響の経時的な変化 (早期抑制/後期増強) と CUR の代謝との関連性を検討した。HPL-A3 細胞に CUR (10 μ M) あるいは THC (10 μ M) をそれぞれ単独、あるいは RIF (1 μ M) と複合処理し、24 時間および 72 時間後の CYP3A4 プロモーター活性化に及ぼす影響を検討した。CUR は 24 時間後に活性化抑制作用、72 時間後に活性化増強作用を示したが、これら作用は THC ではいずれも認められなかった。

4-2. PXR 活性化剤と VDR 活性化剤の複合影響では、HPL-A3 の性状を詳細に解析したところ、強制発現させた PXR だけでなく、ビタミン D 受容体 (VDR) の発現増加が観察された。この VDR は PXR と同様に CYP3A4 遺伝子を正に制御することが報告されている。また、大腸がん細胞において CUR は VDR の活性化を介して CYP3A4 酵素を誘導することが示されている。そこで、

HPL-A3 細胞に PXR 活性化剤と VDR 活性化剤を同時処理場合の複合影響を検討した。HPL-A3 細胞に PXR 活性化剤である RIF (1 μ M) を単独、あるいは VD₃ (0.1 μ M) と複合処理し、24 時間後および 72 時間後の CYP3A4 プロモーター活性化および CYP3A 遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。その結果、RIF と VD₃ を 24 時間複合処理することで、これら発現量の相加的な増加が観察された。

5. 金属とフェノール性化合物が反応することで生成する新たな化合物に関する研究 (中澤)

DPPH 法により、検討対象物質について Antioxidant 作用を評価した。その結果、フェノール性水酸基を多く持つ物質については、強い Antioxidant 作用を示す傾向があることが明らかとなった。Prooxidant 作用の評価のために ESR を用いて測定を行った。検討した化合物については、オルト位にフェノール性水酸基を持つ、カフェイン酸、クロロゲン酸、3,4,5-トリヒドロキシケイ皮酸は銅と反応することで ROS の産生が認められた。しかし、シナピン酸はオルト位にフェノール性水酸基を持たないにも関わらず ROS が産生された。生体成分の酸化指標である 8-OHdG を HPLC/UV/ECD によって評価したところ、ESR で得られた結果と同様にカフェイン酸、クロロゲン酸、シナピン酸および 3,4,5-トリヒドロキシケイ皮酸と銅の反応によって DNA の酸化が促進された。生体内における各々の化合物の安定性試験を行うために、人工胃液および PBS 中で反応を行い、経時的に測定を行った。人工胃液中では金属が共存しても、検討した

対象物質は安定に存在していた。しかし、カフェイン酸およびシナピン酸については、PBS 中で銅と反応することで新たなピークを確認することができた (Fig. 4)。カフェイン酸と銅が反応してできた新たな化合物を MS および NMR で解析したところ、3-Carboxy-6,7-dihydroxy-1-(3',4'-dihydroxyphenyl)-naphthalene が生成されていることが明らかとなった (Fig. 5)。

D. 考察

1. 食品中化学物質複合投与の *in vivo* 変異原性への影響 (梅村)

本研究結果において、KBrO₃ はマウス腎臓において 8-OHdG レベルの上昇と欠失変異を特徴とした遺伝子突然変異を誘発した。8-OHdG はその修復過程において欠失変異を引き起こす可能性が考えられており、KBrO₃ は非発がん標的臓器のマウス腎臓においても酸化的ストレスを介した変異原性を有することが示された。一方、NTA の併用投与は 8-OHdG レベルに影響しなかったものの、*gpt* 遺伝子突然変異頻度及び *red/gam* 遺伝子の large deletion の頻度を増加させた。それら変異体のスペクトラム解析の結果、KBrO₃+NTA 併用投与群において酸化的 DNA 損傷に特徴的な GC-TA transversion 及び large deletion の頻度が増加していた。従って、NTA は KBrO₃ による酸化的 DNA 損傷を介した遺伝子突然変異誘発を増強する作用を有していると考えられた。遺伝毒性物質による DNA 傷害が変異として固定されるには DNA の複製が必要であることから、一般に分裂期にある細胞は遺伝毒性物質に対する感受性が高いと考えられている。このことから、本実験で認め

られた複合影響はNTAによる細胞増殖亢進により、KBrO₃投与で生成した8-OHdGが変異として固定される頻度が増加した結果と考えられた。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響（西川）

今回、SFNは1200 ppmの濃度でラットに混餌投与すると、肝臓においてNQO1やHO1の蛋白発現を誘導したことから、本条件下において、SFNはラット肝臓においてもNRF2経路活性化作用を有することが明らかとなった。DEN投与後にSFNを投与した結果、GST-P陽性細胞巢の数および面積は有意に上昇したことから、外因性のNRF2経路活性化はDEN誘発GST-P陽性細胞巢の形成を促進することが明らかとなった。本実験結果は、ラット肝臓におけるNRF2経路の活性化が発がん物質により既に形成されたGST-P陽性細胞巢の進展に促進的に作用していることを示唆している。

一方、フラン投与後にSFNを投与したラット肝臓におけるGST-P陽性細胞巢の数および面積は対照群と比較して有意な変化は認められなかったことから、NRF2経路の活性化はフラン誘発GST-P陽性細胞巢の形成には影響を与えないと考えられた。NRF2経路の活性化は遺伝毒性発がん物質により誘導されたGST-P陽性細胞巢の形成には促進的に作用するが、非遺伝毒性肝発がん物質により誘導されたGST-P陽性細胞巢には影響を与えない可能性が示唆された。今後、SFNのNRF2経路活性化を介した発がん促進機序の精査が必要であると考えられるが、本研究は食品中発がん物質とNRF2活性化物質との複合影響に関して基礎的なデータを

供与できるものとする。

3. 食品中の残留農薬の複合暴露影響に関する研究（原田）

3-1. バルビタールはメタミドホスには有効だが、他のほとんどの組合せで不適であった。複合暴露による急性症状が発現している際に中枢を抑制することは危険性が高く、痙攣あるいは振戦に対して使用する場合は、慎重を期す必要がある。

3-2. 母動物で認められた死亡を含む重篤な神経症状や血清及び脳ChE活性の有意な低下は、妊娠期間中のPON1活性の低下に伴った有機リン剤の代謝活性の低下に起因する可能性が示唆された。また、パラチオン0.6 mg/kg及びメタミドホス0.8 mg/kg複合投与の母動物より出生した児動物の統計学的有意な身体発育の遅延、小脳虫部長軸長及び面積で認められた有意な変化は、妊娠期の薬物代謝酵素活性の低下を含む母動物の生理学的変化あるいは投与に起因した行動学的変化による児動物の発達遅延に起因すると判断した。

3-3. 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。さらに本年度の結果から、免疫抑制作用をもつ農薬の複合暴露によってその影響が増強された場合、その後の免疫攪乱に及ぼす影響も強まることが示唆された。

4. CYP1A/3A 酵素誘導を指標とした食品中化学物質の複合影響とその機構解析 (出川)

CUR 作用の時間による相違が CUR 代謝物の生成に起因する可能性を考え、CUR 代謝物である THC を用いた検討を行った。しかし、THC には活性化の抑制・増強作用はいずれも見られなかった。したがって、CUR そのものの作用が時間により変化していることが示唆される。これまでに、CUR は Jun N-terminal Kinase (JNK) の活性化抑制を介して VDR 活性化に伴う CYP3A4 遺伝子発現を抑制することが示されている。従って、CUR 処理早期で見られた CYP3A4 プロモーター活性の抑制は、JNK の抑制に起因する可能性が考えられる。後期に見られた CUR による CYP3A4 遺伝子プロモーター活性化の増強機構の 1 つとして、細胞内リガンド量の増加の可能性が考えられる。PXR リガンドである RIF や NIC、および TAM はいずれも異物排泄トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp/MDR1) の基質となることが知られている。一方、CUR は P-gp の発現あるいは機能を阻害することが知られることから、CUR 処理後期でみられる CYP3A4 遺伝子プロモーター活性化の増強作用は、異物トランスポーターの阻害に伴う細胞内リガンド量の増加による可能性が示唆された。CUR とヒト PXR 活性化剤の複合影響発現における VDR の役割にも興味を持たれる。そこでまず、PXR 活性化剤と VDR 活性化剤の複合処理が CYP3A4 遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、相加的な誘導増強作用が観察された。HPL-A3 細胞には CYP3A4 遺伝子プロモーター中の PXR が結合すると報告されている XREM 領域 (-7839/-7208) 及び PXRE 領域

(-362/+53) を含むレポータープラスミドを導入している。VDR は、ヒト CYP3A4 遺伝子プロモーターの PXR 結合配列だけでなく、VDR 特異的な配列に結合することも示されている。これらのことから、本細胞では少なくとも VDR リガンドと PXR リガンドとの間に複合影響が見られることから、CUR による PXR 活性化作用増強にも関わる可能性が考えられた。

5. 金属とフェノール性化合物が反応することで生成する新たな化合物に関する研究 (中澤)

食品中に含まれるフェノール性化合物の Antioxidant 作用の強さについて、DPPH 法によって評価した。Antioxidant 作用の強さはフェノール性水酸基が多い化合物ほど増加していく傾向が認められた。フェノール性化合物と金属の反応による Prooxidant 作用の強さについて ESR を用い評価した。得られた結果から、酸性条件下では ROS の生成は認められなかった。しかし、オルト位に水酸基を有する化合物と銅が中性条件下で反応することで ROS の生成が認められた。オルト位に水酸基を有するフェノール性化合物と銅はキレート錯体を形成し、銅が一電子還元を受けるときに ROS が生成されることが報告されている。このことから、食品中に含有されているフェノール性化合物についても同様に、二価の銅と反応し、ROS を生成することが示唆された。しかし、シナピン酸はオルト位にフェノール性水酸基を持たないにも関わらず ROS の生成が認められた。フェノール性化合物と金属が反応することで新たな化合物が生成される可能性が考えられたため、LC/PDA/MS を用い反

応溶液の測定を試みた。その結果、カフェイン酸およびシナピン酸は中性条件下で銅と反応することにより、新たな化合物が生成されることが明らかとなった。新たに生成された化合物は金属と反応することで ROS が生成される可能性があることから、今後、構造解析を含め、Antioxidant 作用および Prooxidant 作用の評価が必要であると考えられる。

E. 結論

1. 食品中化学物質複合投与の *in vivo* 変異原性への影響 (梅村)

遺伝毒性を示さないが細胞増殖能を有する食品中の化学物質は、食品中遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性を増強する可能性が明らかとなり、この種の組み合わせによる食品中化学物質の複合影響検索の必要性が示された。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 (西川)

SFN は遺伝毒性発がん物質により誘導された変異細胞株の進展に対して促進的に作用する可能性が示唆された。また、外因性の NRF2 経路の活性化に対する GST-P 陽性細胞株の反応は、GST-P 陽性細胞内の NRF2 経路の活性化状態により異なる可能性が示された。

3. 食品中の残留農薬の複合暴露影響に関する研究 (原田)

農薬の経口暴露後早期であれば、活性炭による吸着除去の解毒効果が高いことが確認された。アトロピンはニコチン製剤と有機リン剤及びカーバメート剤との混合暴露

時には有効であった。PAM は有機リンを含む混合剤の中毒に対しては一定の効果が期待できることが確認された。バルピタールはメタミドホスには有効だが、他のほとんどの組合せで不適であった。

母動物及び非妊娠成熟雌ラットにパラチオン 0.6 mg/kg、メタミドホス 0.8 mg/kg の混合投与液を反復経口投与して、妊娠・非妊娠状況下での暴露影響の差異について比較検討した結果、妊娠期間中の PON1 活性低下がパラチオン及びメタミドホスの代謝低下に繋がり、毒性を増強させた可能性が示唆された。

有機塩素剤 (メトキシクロル)、有機リン剤 (パラチオン) 及び殺虫剤用共力剤 (ピペロニルブトキシド) の複合暴露による免疫抑制能及びアレルギー性喘息及びぼす影響を検索した結果、メトキシクロルとパラチオン及びメトキシクロルとピペロニルブトキシドの複合暴露により、獲得免疫能が相乗的に抑制され、アレルギー喘息作用が相乗的に増悪することが示唆された。また、その組合せにより作用点に違いがある事も明らかとなった。

4. CYP1A/3A 酵素誘導を指標とした食品中化学物質の複合影響とその機構解析 (出川)

ヒト PXR 活性化を測定出来るレポーター細胞株を用いて、CUR と PXR リガンドとの複合影響について解析した。その結果、これら化合物は複数の機構により CYP3A 酵素の発現に対して複合影響を引き起こす可能性を明らかとした。今後、より詳細な機構を明らかとすることができれば、食品中化学物質の安全な使用に大きく貢献する

ことが期待される。

5. 金属とフェノール性化合物が反応することで生成する新たな化合物に関する研究 (中澤)

フェノール性化合物については、オルト位に水酸基を有する化合物は中性条件下で銅と反応し、ROSを生成することが明らかとなった。更に、一部の化合物は金属と反応することで新たな化合物が生成された。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、一部の化合物については生体内で新たな化合物を生成し、ROSが産生される可能性を示唆した。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki, Y., Umemura, T., Hibi, D., Inoue, T., Jin, M., Ishii, Y., Sakai, H., Nohmi, T., Yanai, T., Nishikawa, A., Ogawa, K. Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Arch. Toxicol.* 86, 1593-1601, 2012.

2) Suzuki, Y., Umemura, T., Ishii, Y., Hibi, D., Inoue, T., Jin, M., Ssakai, H., Kodama, Y., Nohmi, T., Yanai, T., Nishikawa, A., Ogawa, K. Possible involvement of sulfotransferase 1A1 in estragole-induced DNA modification and carcinogenesis in the livers of female mice. *Mutat. Res.* 749, 23-28, 2012.

3) Kuroda, K., Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Jin, M., Matsushita, K., Kodama, Y., Umemura, T. Flumequine enhances the *in vivo* mutagenicity of MeIQx in the mouse liver.

Arch. Toxicol. (in press)

4) Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Miyashita, L., Tajima, Y., Wada, K., Nishino, R., Ueda, H., and Harada, T. Role of regulatory T cells in the induction of atopic dermatitis by immunosuppressive chemicals. *Toxicol Lett.* 213, 392-401, 2012.

5) Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Miyashita, L., Tajima, Y., Wada, K., Nishino, R., Ueda, H., and Harada, T. Immunotoxicity in mice induced by short-term exposure to methoxychlor, parathion, or piperonyl butoxide. *J Immunotoxicol.* 2012, in press

6) Masashi Sekimoto, Shinsuke Sano, Takuomi Hosaka, Kiyomitsu Nemoto and Masakuni Degawa: Establishment of a stable human cell line, HPL-A3, for use in reporter gene assays of CYP3A inducers. *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 677-685, 2012

7) Y. Iwasaki, K. Mochizuki, Y. Nakano, N. Maruya, M. Goto, Y. Maruyama, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, 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, 2012.

2. 学会発表

1) 石井雄二、木島綾希、高須伸二、松下幸平、黒田 顕、児玉幸夫、小川久美子、梅村隆志: gpt delta マウスを用いた臭素酸カリウムの *in vivo* 変異原性の検索とニトリロ三酢酸併用投与の影響 第29回日本毒性病理学会 2013年1月

2) 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-混合投与における複合毒性の予測: 首藤康文、元村淳子、藤江秀彰、小松豊、青山博昭、原田孝則 第154回日本獣医学会学術

集会 (盛岡、2012)

なし

3) パラチオンおよびメタミドホスの複合反復経口投与による発達神経毒性: 元村 淳子、首藤 康文、藤江 秀彰、小松 豊、富田 真理子、小嶋 五百合、坂 真智子、青山 博昭、原田 孝則 第 39 回 日本毒性学会学術年会 (仙台、2012)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

4) 短期間暴露による環境化学物質免疫評価法の検討: 福山朋季、小坂忠司、林宏一、宮下理沙、田島由香里、上田英夫、原田孝則第 39 回日本毒性学会 (仙台、2012)

5) NC/Nga マウスアトピー性皮膚炎モデルを用いた環境中免疫抑制化学物質によるアトピー性皮膚炎増悪機序の解明: 福山朋季、小坂忠司、宮下理沙、西野里沙子、林宏一、上田英夫、原田 孝則、第 19 回日本免疫毒性学会 (東京、2012)

6) 長澤孝真、田中裕有、関本征史、根本清光、出川雅邦: プレグナン X 受容体およびビタミン D 受容体の活性化を介した CYP3A4 遺伝子の発現. 第 39 回日本毒性学会学術年会 (仙台)、プログラム・要旨集、p.S237、2012 年 7 月 17 日

7) Masashi Sekimoto, Shinsuke Sano, Takuomi Hosaka, Kiyomitsu Nemoto, Masakuni Degawa: Establishment of a stable human cell line, HPL-A3, adaptable for the PXR/VDR-based reporter gene assays for screening of human CYP3A inducers. 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX- VI) (Sendai, Japan), Proceedings, July 17-20, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 24 年度分担研究報告書

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
研究協力者： 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

本研究では、食品添加物の臭素酸カリウム (KBrO₃) と水道水汚染物質のニトリロ三酢酸 (NTA) 併用投与の影響を遺伝子突然変異誘発性をエンドポイントに検討した。6 週齢の雌性 B6C3F₁ *gpt delta* マウス 40 匹を各群 10 匹に配し、0.15% KBrO₃ と 1.5% NTA の併用投与群、それぞれの単独投与群ならびに対照群を設定した。KBrO₃ は飲水に、NTA は粉末飼料に混じて 13 週間投与した。腎臓の病理組織学的検索、DNA 中の *gpt* 及び Spi 遺伝子変異体頻度 (MF) の検索ならびに酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の測定を行った。8-OHdG レベルは KBrO₃ 単独投与群及び KBrO₃+NTA 併用投与群で有意に上昇したが、NTA 併用投与の影響は認められなかった。一方、*gpt* 及び Spi MF は KBrO₃ 単独投与群及び KBrO₃+NTA 併用投与群で対照群に比して有意に上昇し、*gpt* MF は NTA 併用投与により約 1.5 倍の上昇が認められ、酸化的 DNA 損傷に特徴的な GC-TA transversion 及び 2 base 以上の deletion の頻度は約 3 倍増加した。また、Spi 変異体では NTA 併用投与により large deletion の頻度が約 1.5 倍上昇した。これらの結果から、細胞増殖亢進を引き起こす化学物質が KBrO₃ の遺伝子突然変異誘発性及び発がん性を増強する可能性が示唆された。

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又は混入する。これら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あるいは相乗作用として発現する可能性が考えられているが、発がん性の評価はこれまで化合物単体でのみ実施されており、このような複合影響を評価した報告は極めて少ない。平成 23 年度は食品の加熱調理によって生じる遺伝毒性発がん物質 2-amino-3,8-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) と遺伝毒性は示さないものの食肉中への残留が懸念されている動物用医薬品フルメキン (FL) の二剤について、レ

ポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* マウスを用いて、MeIQx の *in vivo* 変異原性における FL の複合影響を検討した。その結果、肝臓における MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性は FL 併用投与により 2 倍以上に増強され、この作用には FL による肝組織傷害に引き続き生じる細胞増殖活性の亢進が寄与することを明らかにした。これらの結果は、単剤では遺伝毒性を示さない食品中化学物質においても、細胞増殖誘導能を有する場合、他の遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性を増強する可能性を示すものであり、この種の食品中化学物質の複合影響の検索は食の安心・安全確保の点からも重要である。平成 24 年度は腎臓において酸化的

ストレスを引き起こす食品添加物の臭素酸カリウム (KBrO₃) と水道水汚染物質であり、細胞増殖活性を有するニトリロ三酢酸 (NTA) を用いて、細胞増殖亢進が酸化 DNA 損傷を介した遺伝子突然変異誘発性に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

動物は当研究所で系統維持している C57BL/6J *gpt delta* マウスと野生型 C3H マウス (日本チャールズ・リバー株式会社) の交配によって作出した 6 週齢の雌性 B6C3F₁ *gpt delta* マウスを実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±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。実験プロトコルを図 1 に示す。*gpt delta* マウス 40 匹を各群 10 匹に配し、KBrO₃ と NTA の併用投与群、それぞれの単独投与群ならびに対照群を設けた。KBrO₃ はこれまでに行われたマウス発がん性試験の濃度の 2 倍にあたる 0.15% の濃度で飲水に、NTA はマウス腎発がん用量にあたる 1.5% の濃度で粉末飼料に混じて 13 週間投与した。対照群には被験物質の溶媒としてイオン交換水と基礎飼料を自由摂取させた。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 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。13 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、腎臓を採取し、重量を測定した。各群 5 例の腎臓は 10% 中性緩衝ホルマリン液に

て固定し、残り 5 例の腎臓は *gpt assay* 用および 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 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。酸化 DNA 損傷の指標である 8-OHdG の測定では、約 80 mg の腎臓から和光純薬社製 DNA Extractor[®] WB Kit を用いてヨウ化ナトリウム法により DNA を抽出した。得られた DNA は和光純薬社製 8-OHdG Assay Preparation Reagent Set を使用し、nuclease P1 及び alkaline phosphatase による酵素処理によってデオキシヌクレオシドまで分解した。8-OHdG 量は液体クロマトグラフィー/電気化学検出器 (HPLC/ECD) システム (ESA, Coulochem[®] II) を用いて定量的解析を実施した。*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* 遺伝子変異体頻度 (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。Spi 欠失変異の検出では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株) に感染させ、Spi プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の Spi プラ

ークを検出した。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 フェージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の Spi⁺ プラーク数を回収した総プラーク数で除して Spi⁺ MF を算出した。また、Spi⁺ フェージの DNA を、*red/gam* 遺伝子を含む 5k 及び 14k base に対応したそれぞれのプライマーを用いて PCR 法により増幅し、アガロース電気泳動法により single base deletion と large deletion (>1k base) を同定した。また、5k base のバンドが検出された PCR 産物について *red/gam* 遺伝子配列を決定して変異部位を同定した。

(統計学的処理方法)

体重、腎重量、8-OHdG レベル、遺伝子突然変異頻度及び変異スペクトラムは、Tukey の多重比較検定により行った。

(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

試験期間中の一般状態観察では、各群にお

いて投与に起因する変化は認められなかった。試験期間中の体重の推移を図 1 に示す。KBrO₃ 及び NTA 単独投与群では変化は認められなかったのに対し、KBrO₃+NTA 併用投与群では試験開始 4 及び 6 週目と 10 週目以降に対照群に比して有意な低値が認められた。試験期間中の摂餌量を図 2 に示す。いずれの群においても試験期間を通じて 4~10 g の間で同様の推移を示した。1 日当りの平均摂餌量は、対照群、KBrO₃、NTA 単独投与群及び KBrO₃+NTA 併用投与群で、それぞれ 5.1、5.1、5.1 及び 5.7 g であった。試験期間中の飲水量を図 3 に示す。対照群及び NTA 単独投与群では試験期間を通じて 4~5 g の間で推移したのに対し、KBrO₃ 単独投与群及び KBrO₃+NTA 併用投与群では試験開始から飲水量の減少が認められ、3~4 g の間で推移し、KBrO₃ 投与に起因すると考えられる飲水量の低値が認められた。最終体重及び腎重量を表 1 に示す。最終体重では KBrO₃ 及び NTA 単独投与群で対照群に比して低値が認められ、KBrO₃+NTA 併用投与群では有意な低値 (p<0.05) が認められた。また、腎実重量では変化は認められなかったのに対し、腎相対重量では KBrO₃ 単独投与群 (p<0.05)、NTA 単独投与群 (p<0.01) 及び KBrO₃+NTA 併用投与群 (p<0.01) で対照群に比して有意な高値が認められた。一方、いずれの投与群でも腎臓において病理組織学的変化は認められなかったことから、腎重量の変化は体重の低値に起因する変化と考えられた。腎 DNA 中 8-OHdG レベルを図 4 に示す。対象群 (0.37 ± 0.06/10⁵dG) に比して KBrO₃ 単独投与群 (0.65 ± 0.11/10⁵dG) 及び KBrO₃+NTA 併用投与群 (0.72 ± 0.11/10⁵dG) において 8-OHdG レベルの有意な上昇 (p<0.01) が認められた。これら 2 群間に有意な差は認められず、酸化

的 DNA 損傷のレベルは同程度であった。また、NTA 単独投与群 ($0.31 \pm 0.10/10^5\text{dG}$) では変化は認められなかった。腎臓の *gpt* assay の結果を表 2 に示す。点突然変異頻度を示す *gpt* MF は、対象群 (0.26 ± 0.09) に比して KBrO_3 単独投与群 ($0.97 \pm 0.42, p<0.05$) 及び KBrO_3 +NTA 併用投与群 ($1.50 \pm 0.57, p<0.01$) で有意な上昇が認められた。これら 2 群間に有意な差は認められなかったものの、 KBrO_3 単独投与群に比して、 KBrO_3 +NTA 併用投与群では約 1.5 倍の上昇が認められた。一方、NTA 単独投与群 (0.35 ± 0.19) では変化は認められなかった。*gpt* 変異体の変異スペクトラム解析の結果を表 3 に示す。対照群に比して、 KBrO_3 単独投与群では single base deletion の特異的頻度の有意な増加 ($p<0.01$) が認められた。一方、 KBrO_3 +NTA 併用投与群では対照群に比して GC-TA transversion ($p<0.01$)、single base ($p<0.05$) 及び 2 base 以上の deletion ($p<0.05$) の有意な増加が認められ、GC-TA transversion 及び 2 base 以上の deletion の頻度は KBrO_3 単独投与群に比して約 3 倍の増加が認められた。*Spi* assay の結果を表 4 に示す。主に *red/gam* 遺伝子の欠失変異頻度を示す *Spi* MF は、対象群 (0.28 ± 0.17) に比して KBrO_3 単独投与群 (0.88 ± 0.23) 及び KBrO_3 +NTA 併用投与群 (0.99 ± 0.46) で有意な上昇 ($p<0.01$) が認められたが、これら 2 群の間に有意な差は認められなかった。また、NTA 単独投与群 (0.21 ± 0.14) では変化は認められなかった。*Spi* 変異体の変異スペクトラム解析の結果を表 5 に示す。対照群に比して KBrO_3 単独投与群では guanine 及び adenine の single base deletion 及び large deletion (1k base 以上) の頻度の増加傾向が認められ、 KBrO_3 +NTA 併用投与群では large deletion の頻度の有意な上昇 ($p<0.05$) が

認められ、 KBrO_3 単独群に比べ約 1.5 倍の上昇が認められた。

D. 考察

本研究結果において、 KBrO_3 はマウス腎臓において 8-OHdG レベルの上昇と欠失変異を特徴とした遺伝子突然変異を誘発した。8-OHdG はその修復過程において欠失変異を引き起こす可能性が考えられており、 KBrO_3 は非発がん標的臓器のマウス腎臓においても酸化的ストレスを介した変異原性を有することが示された。一方、NTA の併用投与は 8-OHdG レベルに影響しなかったものの、*gpt* 遺伝子突然変異頻度及び *red/gam* 遺伝子の large deletion の頻度を増加させた。それら変異体のスペクトラム解析の結果、 KBrO_3 +NTA 併用投与群において酸化的 DNA 損傷に特徴的な GC-TA transversion 及び large deletion の頻度が増加していた。従って、NTA は KBrO_3 による酸化的 DNA 損傷を介した遺伝子突然変異誘発を増強する作用を有していると考えられた。遺伝毒性物質による DNA 傷害が変異として固定されるには DNA の複製が必要であることから、一般に分裂期にある細胞は遺伝毒性物質に対する感受性が高いと考えられている。このことから、本実験で認められた複合影響は NTA による細胞増殖亢進により、 KBrO_3 投与で生成した 8-OHdG が変異として固定される頻度が増加した結果と考えられた。本研究結果は、単剤では遺伝毒性を有しないが細胞増殖誘導能を有する食品中化学物質は、他の遺伝毒性物質の遺伝毒性を増強する可能性を示したもので、この種の組み合わせによる食品中化学物質の複合影響検索の必要性を示すものとする。