

201234013B

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22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 梅村 隆志

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総合研究報告

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
----------------------------	-------	---

研究代表者：梅村隆志
研究分担者：西川秋佳
 ：原田孝則
 ：出川雅邦
 ：中澤裕之

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	19
--------------------	-------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	22
------------------	-------	----

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）
総合研究報告書（平成 22 年度～平成 24 年度）

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

研究要旨

本研究は、食品中化学物質の複合影響を多角的に解析し、実用的な安全性評価に資するデータの蓄積を目的とし、以下の研究を行った。

多段階に進む化学発がん過程の中で、代謝活性化及び細胞増殖という二つの修飾作用に着目し、これらに寄与する化学物質が遺伝毒性発がん物質の突然変異誘発性に及ぼす影響を検討した。【実験 1】ではエストラゴールと *Cyp1a2* 誘導剤であるチアベンダゾール及びβ-ナフトフラボンを、【実験 2】では 2-amino-3,8-dimethyl-3H-imidazo [4,5-f]quinoxaline (MeIQx) とフルメキン (FL) を、【実験 3】では臭素酸カリウム (KBrO₃) とニトリロ三酢酸 (NTA) を *gpt delta* マウス及びラットに併用投与し、発がん標的臓器における *in vivo* 変異原性を検索した。その結果、CYP 誘導剤では ES の突然変異誘発性への影響は認められなかったのに対し、細胞増殖を亢進させる FL 及び NTA は MeIQx 及び KBrO₃ の突然変異誘発性を増強することを見出した。本研究結果は、単剤では遺伝毒性を示さないが、細胞増殖亢進作用能を有する食品中化学物質は、他の遺伝毒性発がん物質との同時摂取により、遺伝毒性発がん物質の発がんリスクを増加させる可能性を示した。

化学発がん過程には遺伝子変異を含む様々なイベントが多段階に関与していると考えられている。本研究では、食品中発がん物質とその発がん過程の各ステージにおいて修飾作用を発揮する化学物質との複合影響を明らかにすることを目的とした。まず、発がん修飾作用としての酸化ストレスに注目し、その産生が予想される食品中化学物質の新たな組み合わせを探る目的で、ラット肝臓および前胃におけるカフェイン酸 (CA) と亜硝酸ナトリウム (NaNO₂) の複合影響を検討した。その結果、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レベルに変化は認められず、この組み合わせが生体内で酸化障害を引き起こす可能性は低いと考えられた。次に、発がん過程の中で異型形質獲得の初期段階と考えられる前がん病変内の遺伝子やタンパクの発現異常を把握し、それらに対する化学物質の複合的な影響を明らかにするために、非遺伝毒性発がん物質フランまたは遺伝毒性発がん物質 diethylnitrosamine (DEN) により誘導した肝臓の GST-P 陽性細胞巣における抗酸化酵素群の転写因子 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 陽性巣内では周囲の GST-P 陰性領域に比較して、NRF2 の標的遺伝子である *Nqo1* の mRNA 発現が高かった。一方、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かった。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た。この結果を踏まえ、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、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 陽性細胞巣の発生を促進した。以上の結果から、NRF2 経路活性化能を有する食品中化学物質は遺

伝毒性のある食品中発がん物質により誘導された前がん病変の進展に対して促進的に作用する可能性が示唆された。

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。【実験 1】類似の作用機序を持つ農薬群の急性複合暴露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。また、複合投与した混合剤に対する一般的な解毒処置の有効性を確認した。平成 22 年度では、先ず単剤投与による各剤の LD50 値を求めた後、Dubois らの方法を参考にして、2 剤を組合せて単回強制経口投与する複合投与試験を行い、単剤投与の結果から求めた推定半数致死量（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を確認した（複合毒性強度；LD50 期待値/LD50 実測値）。平成 23 年度では、さらに 3 剤あるいは 4 剤を組合せた複合投与実験を実施した。その結果、多剤混合毒性影響を予測する上で 2 剤複合投与の毒性情報が有用であることが示唆された。平成 24 年度では、3 ないし 4 剤の混合剤を投与した直後に代表的な解毒剤の効果を確認した。その結果、農薬の経口暴露後早期であれば、剤の種類及び単剤、混合剤に係わらず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。【実験 2】妊娠中に複数の農薬に暴露された場合の妊娠動物及び児動物の神経系に及ぼす影響を調査することを目的として、妊娠 6 日から哺育 21 日まで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妊娠ラットに単剤あるいは複合投与し、神経症状、学習及び記憶、コリンエステラーゼ (ChE) 活性、薬物代謝酵素活性を測定するとともに、病理組織学的検索を実施した。平成 22 年度では、複合暴露試験での用量設定を目的に、妊娠・非妊娠ラットを用いパラチオン及びメタミドホスの単剤反復経口投与試験を行った。平成 23 年度では、妊娠ラットにパラチオンとメタミドホスを複合反復経口投与し、母動物及び児動物に及ぼす影響を検索した。その結果、妊娠ラットに複合反復経口投与すると、相加的に毒性が発現し、生理学的変化が著しい妊娠期間では症状及び毒性はさらに増強することが示唆された。平成 24 年度では、妊娠あるいは非妊娠成熟雌ラットに対するパラチオン及びメタミドホスの複合暴露影響を比較検討した。その結果、妊娠期間中の複合暴露による毒性は、薬物代謝酵素を含む生理学的変化により、さらに増強されることが示唆された。【実験 3】免疫毒性を有する農薬の複合暴露による獲得免疫抑制及びアレルギーに及ぼす影響を調査すべく、平成 22 年度では、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、パラチオン及びメトキシクロルを雌性 CBA/J マウスに 5 日間反復経口投与し、4 週間後に 2, 4-D-butyl ないし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) により検索した。その結果、前処置したパラチオン及びメトキシクロルの用量相関性にリンパ球細胞増殖活性の増加が認められた。平成 23 年度では、パラチオン、メトキシクロル及びピペロニルブトキシドのアトピー性皮膚炎に及ぼす影響を調査する目的で雌性 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 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結果、パラチオン、メトキシクロルないし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症状が用量依存性に有意に増加した。平成 24 年度では、免疫毒性を有する農薬の複合暴露による獲得免疫及びアレルギー喘息に及ぼす影響を調査した。獲得免疫抑制検出実験では、雌性 Balb/c マウス

に各投与液を5日間反復経口投与し、IgM抗体産生能および免疫担当細胞数を検索した。アレルギー喘息検出実験では、雌性 Balb/c マウスに各投与液を5日間反復経口投与し、4週間後にアレルギー喘息を惹起するOVAを反復吸入暴露して、アレルギー喘息の増強影響を検索した。その結果、獲得免疫抑制検出実験及びアレルギー喘息検出実験ともに、メトキシシクロル+パラチオン及びメトキシシクロル+ピペロニルプトキシド複合投与群において、獲得免疫能の抑制、アレルギー喘息症状の増悪が相乗的に認められた。

本研究では、シトクロム P450 (CYP) 酵素の誘導に対する食品添加物(クルクミン(CUR)、チアベンダゾール(TBZ)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)および没食子酸プロピル(PG))と異物代謝酵素誘導剤の複合影響を、芳香族炭化水素受容体(AhR)リガンド検索用細胞株 HepG2-A10 およびプレグナン X 受容体(PXR)リガンド検索用細胞株 HPL-A3 を用いて解析した。用いた食品添加物4種(CUR、TBZ、BHT および PG)のうち、CURとTBZに顕著なCYP1A発現変動作用が認められたため、以下この2種の化合物について、その詳細を検討し、以下の結果を得た。①TBZは、HepG2-A10細胞において、CYP1A酵素誘導剤によるAhR活性化およびCYP1A酵素誘導(遺伝子および酵素活性)に対して増強作用を示した。また、HPL-A3細胞において、CYP3A酵素誘導剤によるCYP3A4プロモーター活性化およびCYP3A酵素遺伝子(CYP3A4、CYP3A5およびCYP3A7)発現誘導に対しても増強作用を示した。②CURは、HepG2-A10細胞において、CYP1A酵素誘導剤によるAhR活性化およびCYP1Aサブファミリー酵素誘導に対して、それぞれ処理後早期には抑制作用を、後期では増強作用を示した。さらに、処理後期に見られたCURのAhR活性化増強作用は、誘導剤の細胞内蓄積量の増加に起因することが示唆された。同様に、HPL-A3細胞におけるCYP3A酵素誘導剤でのCYP3A4プロモーター活性化およびCYP3A酵素遺伝子発現誘導に対して、処理後早期には抑制作用を、後期では増強作用を示した。なお、これらの処理時間で見られるCURの相反した作用は、生成するCUR代謝物に起因するものでないことが示唆された。③CURがVDRリガンドになることが報告されており、CYP3A酵素誘導におけるVDRリガンドとPXRリガンドのリファンピシン(CYP3A酵素誘導剤)との相互作用を追究した結果、VDRリガンドとPXRリガンドの活性化がCYP3A誘導に対して相加的誘導をもたらすことが示された。以上、本研究で用いた2種の食品添加物は、代表的なCYP1A/3A誘導剤による各CYP誘導に対して複合影響をもたらすことが明らかになった。

フェノール性化合物やビタミンなど抗酸化物質として謳われている化合物と金属の反応が活性酸素種(ROS)の生成に関与しているかを*in vitro*の系で検証した。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銅と反応し、ROSを生成することが明らかとなった。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。また、一部のフェノール性化合物は金属または亜硝酸ナトリウムと反応することで新たな化合物が生成された。

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
残留農薬研究所 理事
研究分担者 出川雅邦

静岡県立大学 教授
研究分担者 中澤裕之
星薬科大学 教授

A. 研究目的

食品中には、食品添加物、残留農薬、加熱調理過程で生成される発がん物質(ヘテロサイクリックアミンなど)、食品加工中に

生じる予期せぬ副産物（グリシドール酸エステルなど）、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いる。そこで本研究は、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。

1. 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・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ているが、発がん性の評価はこれまで化学物質単体で実施されており、このような複合影響を評価した報告は極めて少ない。本研究ではレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラット又はマウスを用いて、単剤では遺伝毒性を有しないが様々な化学発がん過程に作用する食品中化学物質が同時に摂取される可能性のある食品中遺伝毒性発がん物質の突然変異誘発性に及ぼす影響を検討した。

2. 化学発がん過程には遺伝子変異を含む様々なイベントが多段階に関与していると考えられている。そのため、それぞれの発がんステージにおいて、それらを修飾する食品中化学物質は食品中発がん物質との間で種々の複合影響を惹起する可能性が考えられる。本研究では、まず、発がん修飾作用としての酸化ストレスに着目し、その発生する食品中化学物質の新たな組み合わせを探る目的で、カフェイン酸 (CA) と亜硝酸ナトリウム (NaNO₂) を酸性条件下で反応させると活性酸素種 (ROS) が生成し、反応生成物の 1, 2-(4H)-benzoxazin-4-one (BZX 誘導体) 及び 2-oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2,5-oxadiazole (OXZ 誘導体) も ROS 生成能を有することから、CA と NaNO₂ の酸化ストレスを介した複合影響を検討した。続いて、前がん病変内の

遺伝子発現異常を把握することを目的に、香料として使用されているフラン誘導体の基本骨格である、非遺伝毒性発がん物質フランおよび遺伝毒性発がん物質 diethylnitrosamine (DEN) 誘発 GST-P 陽性細胞巢の遺伝子発現における特徴を検討した。抗酸化酵素群の転写因子である NRF2 に着目し、肝臓における GST-P 陽性細胞巢の部位特異的な NRF2 経路の活性化状態を精査した。さらに、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、食品に含まれる化学物質であり、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。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、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。次に、有機リン剤などの農薬に胎児、乳幼児が暴露されると、身体発育または行動学的変化に対し影響を及ぼすことが問題となっている。本研究では米国 EPA における累積リスク評価法の基盤農薬の一つである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。また、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、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。

4. 肝シトクロム P450 (CYP) 分子種のうち、CYP1、CYP2 および CYP3 ファミリー酵素

は、外来異物に対する解毒代謝反応の中心を担っている。また一方、CYP1A 酵素は発がん性芳香族炭化水素類や発がん性芳香族アミン類の、また CYP3A 酵素は発がん性多環式芳香族炭化水素類や発がん性カビ毒（アフラトキシン）の代謝活性化にも関わっている。したがって、食品中の化学物質によるこれら CYP 分子種の発現・活性への影響の評価は、これら化学物質の安全性を考える上で重要である。実際に、米国食品医薬品局（FDA）では、食品成分（サプリメント）の安全性評価の一環として、これら CYP 分子種の発現変動を含めた薬物動態試験を行うことを推奨している。我々は化学物質によるヒト CYP1A 酵素や CYP3A 酵素誘導が、それぞれ芳香族炭化水素受容体（AhR）やプレグナンX受容体（PXR）の活性化を介した経路で起こることに着目し、先行研究として両受容体の活性化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てきた。そこで本研究では、肝 CYP 酵素活性に影響を与えることが知られている代表的な食品添加物のうち、クルクミン（CUR）、チアベンダゾール（TBZ）、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）および没食子酸プロピル（PG）を試料として、それら化合物の CYP1A および CYP3A 酵素誘導能やそれら活性への影響を調べるとともに、それら化合物と代表的な CYP1A/3A 誘導剤との複合影響の有無を明らかにすることを目的とした。

5. 2008 年 4 月から特定健診・特定保健指導が始まり、国民の健康意識は増加傾向にある。特に、メタボリックシンドロームは高血圧や糖尿病と密接な関係があり、これらの疾患の発現には活性酸素種（ROS）や活性窒素種（RNS）が関与していると考えられている。ROS や RNS 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。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、食品中に含まれる抗酸化物質に着目し、金属または NaNO_2 を併用することで ROS または RNS の産生に与える影響について Antioxidant 作用および Prooxidant 作用の観点から評価した。

B. 研究方法

1. 【実験 1】6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラットを 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 群に配した。 β -NF 及び TBZ をそれぞれ 200 及び 100 ppm の濃度で粉餌に混じ、エストラゴールは予備試験において *gpt* 変異体頻度（MF）の有意な上昇が認められた最低濃度である 200 mg/kg/day の濃度で週 5 日間、4 週間強制経口投与した。投与後、肝臓における *in vivo* 変異原性の検索、肝前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による定量解析及びリアルタイム RT-PCR 法による *Cyp1a2* 遺伝子発現レベルを検索した。【実験 2】6 週齢の雄性 B6C3F₁ *gpt delta* マウスを MeIQx+FL、MeIQx+PB 併用投与群とそれぞれの単独群及び対照群の計 6 群に配し、MeIQx を 0.03%、FL を 0.4%、PB を 0.05% の濃度で 13 週間混餌投与した。投与終了後、肝臓における病理組織学的検索、BrdU 免疫組織化学的解析、*in vivo* 変異原性の検索、cDNA マイクロアレイ及びリアルタイム RT-PCR 法による網羅的遺伝子発現解析を実施した。【実験 3】6 週齢の雌性 B6C3F₁ *gpt delta* マウスを KBrO₃+NTA 併用投与群とそれぞれの単独投与群及び対照群の計 4 群に配し、

KBrO₃ を 0.15%の濃度で飲水に、NTA を 1.5%の濃度で粉餌に混じ、13週間投与した。投与終了後、腎臓における病理組織学的検索、*in vivo* 変異原性の検索、酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの測定を実施した。

(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. 【実験 1】6 週齢雄性 F344 ラットに 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、それぞれ高用量の単独群ならびに対照群を合わせた計 7 群に配し、4 週間自由に摂取させた。投与後、肝臓および胃を採取し、前胃粘膜および肝臓の DNA 中 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを HPLC/ECD 法にて測定した。さらにチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) レベルを測定した。また、肝臓における BZX 及び OXZ 誘導体の測定を HPLC 法にて行った。

【実験 2】6 週齢の雄性 F344 ラットにフランを 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に抗 GST-P 抗体を用いた免疫組織化学的染色および 0.05%トルイジンブルー染色を施し、GST-P 染色標本を参照しながら GST-P 陽性細胞巣または GST-P 陰性領域をレーザーマ

イクロダイセクション法により切除し、Total RNA を抽出した。その後、*glutathione S-transferase pi 1 (Gstp1)* および *Nqo1*、細胞周期関連遺伝子として、*Cyclin D1* および *Cyclin E1* についてリアルタイム PCR を行った。【実験 3-1】6 週齢の雄性 F344 ラットに SFN 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 抗体および抗 HO1 抗体を用いてウェスタンブロット法にて蛋白発現を解析した。【実験 3-2】6 週齢の雄性 F344 ラットにフランを 8 mg/kg 体重の用量で、週 5 日、13 週間強制経口投与、あるいは DEN 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、GST-P 陽性細胞巣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。

3-1. 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、ニコチン製剤を組合せて単回強制経口投与し、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。また、2 剤の複合投与における複合毒性強度と 3 及び 4 剤の強度を比較し、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。さらに、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ビタールを投与して、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各々妊娠 6 日 (GD6) から哺育 21 (PND21) 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を設定した。また、パラチオン及びメタミドホスを組み合わせ、GD6 から PND21 まで反復経口投与し、母動物に対する複合暴露が児動物の発達に及ぼす影響を検討した。さらに、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。Balb/c マウスを用いた詳細解析では、LLNA 法と同様のスケジュールにて投与を実施した後、耳介リンパ節について、T 細胞解析と T 細胞由来サイトカイン産生量測定を行った。また、有機リン剤 (パラチオン)、有機塩素剤 (メトキシクロル) ないしは殺虫剤用共力剤 (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。さらに、有機リン剤 (パラチオン)、有機塩素剤 (メトキシクロル) ないしは殺虫剤用共力剤 (ピペロニルブトキシド) を雌性の Balb/c マウスに 5 日間反復複合経口投与し、羊赤血球細胞に対する獲得免疫能への影響を IgM 抗体産生能および免疫担当細胞数を測定することで検索した。また、上記と同様に被験物

質を反復複合経口投与後、アレルギー喘息を惹起する卵白アルブミン (OVA) を反復吸入暴露し、肺胞洗浄液中や肺門リンパ節中の各種免疫学的因子測定など、アレルギー喘息反応への影響を検索した。

C. 研究結果

1. 【実験 1】肝臓における *Cyp1a2* mRNA 発現レベルは CYP 誘導剤を併用投与したすべての群で対照群及び ES 単独投与群に比して有意な上昇が認められた。肝臓の *gpt* 変異体頻度 (MF) は ES 単独投与群およびすべての CYP 誘導剤併用投与群において対照群に比して約 4 倍の上昇が認められたものの、ES 単独投与群と CYP 誘導剤併用投与群の間に差は認められなかった。一方、GST-P 陽性細胞単の数及び面積は、ES 単独投与群、ES+β-NF+TBZ 及び ES+β-NF 併用投与群において対照群に比べ増加が認められ、ES+β-NF+TBZ 群及び ES+β-NF 群は ES 単独投与群に比して数、面積ともに増加傾向が認められた。一方、ES+TBZ 併用投与群では数、面積ともに ES 単独群に比して有意な低下が認められた。【実験 2】病理組織学的検索の結果、FL 処置群において空胞化を伴った小葉中心性肝細胞肥大及び軽度の炎症細胞浸潤が認められ、PB 処置群では小葉中心性肝細胞肥大が認められた。BrdU 免疫組織化学的解析の結果、FL 処置群で対照群に比して有意な上昇が認められ、MeIQx+FL 併用投与群では MeIQx 単独投与群に比べ有意な高値が認められた。*gpt* 及び Spi MF は MeIQx 単独投与群において対照群に比して有意な上昇が認められ、FL の併用投与によりそれぞれ 2 倍以上増加した。*gpt* 変異体の変異スペクトラム解析の結果、MeIQx 単独投与群において GC-TA transversion 及び single base deletion が高頻度に認められ、FL 併用投与群においても同様の変化が認められた。網羅的遺伝子発現解析では、MeIQx 単独投与群に比べ、MeIQx+FL 併用投与群において炎症、細胞増殖及び DNA 傷害・修復関連遺伝子の発現

上昇が認められ)、リアルタイム RT-PCR 法により *IL-1β*, *Tnf*, *Cyclin D* 及び *Cyclin E* の上昇を確認した。また、MeIQx の代謝活性化及び排泄に寄与する *Cyp1a2*, *Nat2*, *Ugt1a1* 及び *Ugt2b1* の遺伝子発現を検索した結果、*Cyp1a2* は MeIQx 単独投与群に比して MeIQx+FL 併用投与群で有意に上昇し、*Ugt2b1* は FL 単独投与群及び MeIQx+FL 併用投与群で対照群及び MeIQx 単独投与群に比して有意な低値を示した。【実験 3】腎臓の病理組織学的検索の結果、投与に起因する変化は認められなかった。腎 DNA 中 8-OHdG レベルは KBrO₃ 単独投与及び KBrO₃+NTA 併用投与群において対照群に比して有意な上昇が認められたが、2 群間に有意な差は認められなかった。*gpt* 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た。変異スペクトラムでは、KBrO₃+NTA 併用投与群において single base deletion に加えて GC-TA transversion 及び 2 base 以上の deletion の有意な増加が認められ、これらの変異は KBrO₃ 単独投与群に比して約 3 倍増加した。*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、KBrO₃+ NTA 併用投与群では large deletion の頻度の有意な上昇が認められた。

2. 【実験 1】CA 及び NaNO₂ を併用投与した結果、前胃では角化を伴う粘膜上皮の過形成が軽度に認められた。一方、肝臓では病理組織学的に変化は認められなかった。肝臓における CA、BZX 及び OXZ 誘導体の分析の結果、CA は CA を投与したすべての群の動物で検出された。BZX 誘導体は CA と NaNO₂ の併用投与群のラット肝臓において検出されたが、群間での差は認められなかった。また、OXZ 誘導体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 レベルを検討した結果、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。【実験 2】フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢および DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢における NRF2 関連遺伝子および細胞周期関連遺伝子の発現解析の結果、フラン誘発 GST-P 陽性細胞巢内では、GST-P 陰性領域に比較して、*Gstp1*, *Nqo1* の mRNA 発現の程度が有意に高かった。一方、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢内では、*Nqo1* の 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。【実験 3-1】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 3-2】GST-P 定量的解析の結果、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に比して、有意な変化は認められなかった。

3. 【実験 1】有機リン剤であるメタミドホスは、同じ有機リン剤のパラチオン及びカーバメート剤のキシリルカルブとの組合せでは拮抗的に作用することが判明した。有機リン剤であるパラチオンは、有機リン剤及びカーバメート剤との組合せで拮抗的作用を示した。カーバメート剤であるキシリルカルブは、有機リン剤との組合せでは拮抗的に作用することが判明した。2 剤を組み合わせた際の複合毒性強度は、メタミドホス+パラチオンが 0.80、メタミドホス+キシリルカルブが 0.58、メタミドホス+50%硫酸ニコチン水溶液が 1.13、パラチオン+キシリルカルブが 0.47、パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液が 0.59、キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液が 1.21 で、平均値および中央値は 0.80 および 0.84 であり、4

剤を混合投与して得られた複合毒性強度 0.82 と良く一致した。3 剤を組み合わせた際の複合毒性強度は、メタミドホス+パラチオン+キシリルカルブが 0.64、メタミドホス+パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液が 0.90、メタミドホス+キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液が 1.04、パラチオン+キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液が 1.12 で、平均値および中央値は 0.93 および 0.88 であり、4 剤を混合投与して得られた複合毒性強度 0.82 とほぼ一致した。アトロピンは有機リン剤及びカーバメート剤との混合暴露時には、有効に作用した。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。

【実験 2】パラチオンとメタミドホスの複合投与実験において、パラチオン 0.6 mg/kg/day とメタミドホス 0.8 mg/kg/day の組み合わせを高用量とし、パラチオン 0.3 mg/kg/day とメタミドホス 0.4 mg/kg/day の組み合わせを低用量とした。高用量の母動物では、妊娠期間中及び哺育期間中に死亡または重篤な神経症状が認められた。高用量及び低用量の母動物の血清 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中に有意な体重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。高用量及び低用量の児動物では、連続的な探索行動、自発運動量の有意な増加、驚愕反応の軽度抑制などが認められた。妊娠あるいは非妊娠成熟雌ラットに対するパラチオン及びメタミドホス複合暴露影響の検索を行った。妊娠 (母)ラットでは非妊娠ラットよりも死亡または重篤な神経症状が観察され、また体重増加抑制が認められた。さらに血清及び脳の ChE 活性の有意な低下が認められた。【実験 3】LLNA 試験において、パラチオン前処置による低濃度での 2,4-D-butyl の感作性誘発が認められた。パラチオン前処置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。メトキシクロル前処置による低濃度での 2,4-D-butyl の感作性誘発が認められた。メトキシクロル前処置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。LLNA 法による 2,4-D-butyl の感作では、パラチオンおよびメトキシクロル前処置群のいずれも、ヘルパー T および細胞傷害性 T 細胞が用量相関性に増加した。オイゲノールの感作では、パラチオンおよびメトキシクロル前処置群のいずれも、ヘルパー T および細胞傷害性 T 細胞群が用量相関性に増加した。LLNA 法による 2,4-D-butyl の感作では、パラチオンおよ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。オイゲノールの感作では、パラチオンおよ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。いずれの投与群においても用量相関性の耳介厚の増加及び皮膚所見の亢進が 9~12 週齢時に認められた。血清中 IgE および IgG_{2a} 量のいずれも、各被験物質投与群で用量相関性の有意な増加が認められた。リンパ節中 IgE 陽性 B 細胞数は各被験物質投与群で用量相関性の有意な増加が認められた。リンパ節中サイトカイン産生量は各被験物質投与群で用量相関性の有意な増加が認められた。アトピー性皮膚炎が惹起されている耳介部の皮膚組織から mRNA を分離し、Th1 (IFN γ)、Th2 (IL-4, 5, 6, 13) および Th3 (IL-17) 型サイトカインの産生量を調査した結果、各被験物質投与群で用量相関性の有意な増加が認められた。脾臓中 SRBC 特異的 IgM 抗体産生能 (PFC 法) は、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、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。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。総 T 細胞数、ヘルパー T 細胞数、細胞障害性 T 細胞数のいずれも、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。BALF 中好酸球、リンパ球、好中球、マクロファージ数についても、メトキシクロル+パラチオン、およびメトキシクロル+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増加が認められた。BALF 中 RANTES、MIP-1 β 、KC、いずれのパラメーターについても、メトキシクロル+パラチオンおよびメトキシクロル+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。肺門リンパ節中 IgE 陽性 B 細胞数は、メトキシクロル+パラチオンおよびメトキシクロル+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. 【実験 1】 AhR 活性化剤である MC (0.1 μ M) の存在下、TBZ (10 μ M) あるいは CUR (10 μ M) を組み合わせて HepG2-A10 細胞に処理した。さらに、AhR 活性化の経時的変化をルシフェラーゼアッセイにより、また CYP1A 酵素誘導の経時的変化を EROD アッセイにより、それぞれ検討した。MC 単独では AhR 活性化、CYP1A 酵素誘導ともに 6 時間で最大となり、その活性化は徐々に減少した。TBZ 共存下では、AhR 活性化、CYP1A 酵素誘導ともに 6 時間で最大となり、その誘導量は MC 単独処理時よりもわずかに大きくなった。さらに、MC 単独処理時に比べて、TBZ との共処理では、処理 6 時間以降の AhR 活性化ならびに CYP1A 酵素誘導効果の減弱化が抑制され、それぞれの効果の持続性が高まった。一方、CUR 共処理 6 時間後では、AhR 活性化や

CYP1A 酵素誘導が MC 単独処理群に比べて著しく低下し、処理 24 時間後には逆に MC 単独処理群に比べて著しく増加した。さらに、TBZ、CUR と他の AhR 活性化剤である BaP (1 μ M) や DMBA (1 μ M) との複合影響を検討した結果、何れも MC との複合処理で見られた結果と同様の複合影響が出る事が明らかになった。【実験 2】 PXR 活性化剤である RIF (1 μ M) の存在下、TBZ (10 μ M) あるいは CUR (10 μ M) を組み合わせて HPL-A3 細胞に処理した。さらに、CYP3A4 プロモーターの活性化の経時的変化をルシフェラーゼアッセイにより、CYP3A 酵素発現誘導をリアルタイム RT-PCR 法により検討した。TBZ は、24 時間後および 72 時間後ともに、RIF による PXR 活性化を増強し、CYP3A 酵素遺伝子発現の誘導に対してもわずかに増強した。CUR は、RIF による PXR 活性化および CYP3A 酵素遺伝子の誘導を、複合処理 24 時間後では抑制し、72 時間後では逆に増強した。次に、他の PXR 活性化剤である TAM (10 μ M) および NIC (10 μ M) との複合影響を検討した。その結果、24 時間、72 時間いずれにおいても、TBZ は TAM や NIC による CYP3A4 プロモーター活性化や CYP3A 酵素遺伝子発現の誘導に対して増強作用を示した。また CUR は、TAM や NIC による CYP3A4 プロモーター活性化や CYP3A 酵素遺伝子発現の誘導に対し、24 時間では抑制作用を、逆に 72 時間では増強作用を示した。【実験 3】

HepG2-A10 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 MC (0.1 μ M) と複合処理し、6 時間および 24 時間後の AhR 活性化に及ぼす影響を検討した。CUR は 6 時間後に AhR 活性化抑制作用、24 時間後に AhR 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。また、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。【実験 4】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. DPPH 法は簡便な Antioxidant 作用の分析法であり、現在でも汎用性の高い方法として認知されている。そこで、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化合物については、強い Antioxidant 作用を示す傾向があることが明らかとなった。また、ニトロ化を受けたフェノール性化合物は Antioxidant 作用が増強する結果が得られた。Prooxidant 作用の評価のために ESR を用いて測定を行った。フェノール性化合物と各種金属を反応させたところ、フェノール性化合物と銅または鉄が反応することでヒドロキシラジカルが生成されることを確認した。特に生成量が多かった銅に着目し検討したところ、フェノール性化合物と銅濃度の比率が 2:1 のときに最も ROS が生成されることが分かった。この結果を踏まえ、食品中に含まれる各種フェノール性化合物と銅の反応を比較検討したところ、オルト位にフェノール性水酸基を有する化合物について、ROS の生成が認められた。同一の系を用い、チオール化合物およびビタミンと金属の反応を検証した。その結果、チオール化合物と銅の反応については、ROS の生成は認められなかった。しかし、抗酸化系ビタミンであるビタミン A 群、ビタミン C、ビタミン D 群、ビタミン E は銅と反応することでフリーラジカルの産生が認められた。生体内における抗酸化物質と金属の反応性を評価するために、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、CaA および Sin 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。CaA 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。また、CaA と NaNO₂ の反応については、CaA がニトロ化反応を受けた化合物

6,7-dihydroxy-1,2-(4H)-benzoxazin-4-one

(CaA-NO-1)、2-(3,4-dihydroxyphenyl)-

2-oxoethanaloxime (CaA-NO-2)、2-oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2,5-oxadiazole

(CaA-NO-3) の生成を確認した。ChA、CaA およびニトロ化されたフェノール性化合物について、RNS 発生能は Griess 法によって評価した。その結果、全ての化合物について、人工胃液中では NO₂ の産生が認められなかった。しかし、中性条件下では CaA-NO-3 について、NO₂ の産生が経時的に認められた。

D. 考察

1. 実験 1 では、ES と β -NF+TBZ を併用投与した群では、CYP1A2 の mRNA 発現レベルの相加的な増加が認められたが、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。これは β -NF 及び TBZ が CYP1A2 に加え、種々の第一相及び二相酵素を誘導し、代謝活性化の増加とともに ES の代謝排泄が進行したためと考えられた。実験 2 では、MeIQx+FL 併用投与群では、MeIQx 単独投与により生じる変異パターンを持って *gpt* MF が上昇したことから、これは FL が MeIQx 誘発 *in vivo* 変異原性を増強した結果と考えられた。また、FL 投与群では BrdU 標識細胞率が高値を示したことから、この増強作用には細胞増殖亢進が寄与するものと考えられた。病理組織学的検索では FL による肝組織傷害が確

認められ、網羅的遺伝子発現解析では細胞周期関連及び炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルが上昇したことから、FLの細胞増殖亢進作用は組織傷害後の代償性変化によるものと考えられた。一方、MeIQxを解毒・排泄する *Ugt2b1* の mRNA レベルはFL処置群で有意に減少したことから、MeIQxの代謝排泄抑制も変異原性増強作用の一部に寄与していると考えられた。一方、PB併用投与群ではMeIQxの突然変異誘発性に影響が認められなかったことから、PBのような一過性の細胞増殖亢進ではなく、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寄与すると考えられた。実験3では、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はマウス腎臓に酸化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が、*gpt* MF及びlarge deletionの頻度を増加させたことから、NTAはKBrO₃の遺伝子突然変異誘発性に対して増強作用を有していると考えられた。

2. 実験1では、*in vitro*試験系において報告されたCAとNaNO₂併用による酸化ストレスを介した複合影響について、F344ラットを用いた*in vivo*での評価をおこなった。*in vitro*では、酸性条件下CAとNaNO₂の反応によりROS生成が報告されること、さらにROS生成能を有する複合反応生成物BZX誘導体が併用投与したラット肝臓で検出されることが報告されている。本実験条件下においてもCAとNaNO₂の反応で生成するBZX誘導体は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。しかしながら、前胃と肝臓の酸化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ことから、CAとNaNO₂の併用投与によるROS生成を介した*in vivo*での複合影響は認

められなかった。また、CAとNaNO₂併用投与群において認められた前胃粘膜の過角化を伴う軽度の過形成については、前胃粘膜の酸化DNA損傷が認められていないことから、BZX誘導体等の複合反応生成物による刺激に起因する可能性が示唆された。実験2では肝前がん病変内の遺伝子発現異常を把握するために、フランおよびDEN誘発GST-P陽性細胞巢内の部位特異的なNRF2経路の活性化状態を精査した。その結果、フラン誘発GST-P陽性細胞巢内においてはNRF2経路が活性化されている可能性が示唆された。一方、DEN誘発GST-P陽性細胞巢ではNRF2経路は活性化されていないと考えられた。実験3では、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経路活性化がそれぞれの発がん物質により誘導された前がん病変の進展にどのような影響を与えるかを検討した。SFNは本条件下において、ラット肝臓のNRF2経路活性化作用を有していることを確認した。しかし、SFN投与はフラン誘発GST-P陽性細胞巢の進展に影響を与えなかった。一方、DEN誘発GST-P陽性細胞巢の形成に対しては促進的に作用した。このことから、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巢の進展に対して促進的に作用する可能性が示唆された。

3. 実験1では、2剤を組み合わせた際の複合毒性強度は、パラチオン+キシリルカルブが0.47、パラチオン+50%硫酸ニコチン水溶液が0.59、キシリルカルブ+50%硫酸ニコチン水溶液が1.21で、平均値および中央値は0.76および0.84であった。3剤を混合投与して得られた複合毒性強度は1.12で、多少の相違はあったがいずれもほぼ相加的影響を示した。4剤全てを混合した剤の複合投与では、軽度の拮抗作用を示した。この結果は各剤の相互作用を反映したもので、相乗的な毒性の増強は認められなかった。平成22-23年度の実験において混合剤の毒作用と

強度は混合する農薬の組合せによって変動することが示唆されたため、平成24年度では各種解毒剤が混合剤に対しても有効かどうかを確認した。このことは、食品の安心・安全確保において重要である。本研究では、神経系を標的とした類似の作用機序を持つ農薬群の混合剤による急性毒性に対する、代表的な解毒剤の効果を確認した。実験2では、パラチオン及びメタミドホスを複合反復経口投与すると相加的に毒性が発現し、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ことが示唆された。また、児動物に対する影響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すものと推察した。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変化あるいは行動学的変化が児動物の発達に影響を及ぼすことが示唆された。実験3では、有機リン剤および有機塩素剤の免疫系への影響については、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結果、パラチオン投与群ではリンパ球細胞増殖活性(3H-methyl thymidine 取り込み量)が投与群で顕著に増加し、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およ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、2,4-D-butylおよ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、免疫抑制作用およびアポトーシス誘発作用を有するパラチオン、メトキシクロルおよびピペロニルブトキシド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。有機塩素剤(メトキシクロル)、有機リン剤(パラチオン)および殺虫剤用共力

剤(ピペロニルブトキシド)の複合暴露による獲得免疫抑制能およびアレルギー性喘息に及ぼす影響を検索した結果、メトキシクロルとパラチオンおよ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。さらに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. 本研究ではヒト AhR あるいは PXR 活性化化合物検索用に樹立した2種のレポーター細胞株を用いて、4種の食品添加物(CUR、TBZ、BHT および PG)の CYP1A/3A 酵素誘導能を検索した。用いた化合物のうち特に CUR と TBZ には、代表的な CYP1A/3A 誘導剤(AhR あるいは PXR 活性化剤)との共処理で、顕著な複合作用を惹起することが明らかになった。TBZ による AhR の活性化は、類似化合物である Omeprazole によるそれと同様に cAMP responsive element modulator (CREM) の活性化を介して起こると推察される。また、TBZ による PXR の活性化についても、TBZ が PXR リガンドとして作用するのではなく、protein phosphatase の活性化を介した機序で PXR を活性化している可能性も考えられる。CUR は AhR リガンドによる AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導、また、PXR リガンドによる CYP3A4 プロモーターの活性化や CYP3A 酵素誘導に対して、共処理早期では抑制作用を、その後増強作用を示した。このような CUR の相反する作用機序を明らかにする一環として、CUR 代謝物の影響を調べたが、CUR の主代謝物である THC には、CUR がもつ上記 CYP 発現への影響は認められず、現在なお CUR の処理時間依存的な CYP 発現変動機序は明らかになっていない。CUR が VDR を介して CYP3A4 遺伝子発現を誘導することが報告されたこと、また、本研究で用いた HPL-A3 細胞は、VDR を高発現していることから、本研究で見られた CUR

によるCYP3A4遺伝子の発現誘導やPXRリガンドとの共処理によるその誘導増強効果は、VDRの活性化を介して惹起された可能性が考えられる。

5. 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ROSの生成が認められた。一方、FA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。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際に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、オルト位に水酸基を有する化合物は二価の銅と反応し、ROSを生成することが示唆された。フェノール性化合物と金属が反応することで別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、CaAおよびSin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。他方、チオール化合物やビタミン類については、抗酸化力が強いビタミンA群、ビタミンC、ビタミンD群、ビタミンEが金属と反応することでROSの生成が認められた。還元鉄や還元銅は溶存酸素と反応し、金属が酸化される際にROSが生成されることが知られている。抗酸化系ビタミンは酸化された金属を還元させる作用があると考えられ、金属のレドックスサイクルを促進することで、ROSが生成された可能性が考えられた。食品に含まれているChAおよびCaAとNaNO₂を併用することにより胃酸酸性条件下でニトロ化反応を引き起こす結果が得ら

れた。ニトロ化反応は反応pHとフェノール性化合物の化学構造によってベンゼン環が直接ニトロ化反応を受ける場合と、側鎖がニトロ化される場合がある。ベンゼン環がニトロ化反応を受ける場合、電子密度が大きく変化すると考えられ、ヒドロキシラジカルに代表されるような反応性が高い分子種はベンゼン環に結合するものと考えられる。CaAのように側鎖にニトロ化が起こった場合、不安定な化学構造になることが考えられ、ROS生成には寄与しないが、RNSの生成を引き起こす可能性がある。RNSはROSと反応することでペルオキシナイトライドなど反応性の高い分子種に変化することが知られている。今回、Griess法によって活性が認められたCaA-NO₃については、構造内にフロキサン骨格を有している。フロキサン骨格はNOのドナーとして使用される構造である。そのため、CaAとNaNO₂を併用して生成されたCaA-NO₃については、NO₂が産生したものと考えられた。

E. 結論

化学発がん過程における重要なイベントである代謝活性化及び細胞増殖に影響を与える遺伝毒性を示さない食品中化学物質と遺伝毒性を有する食品中発がん物質との複合影響を検討した。代謝酵素を誘導する薬物は同時に複数の第一相及び第二相酵素を誘導することから、発がん物質の代謝・排泄を促進し、結果として発がん物質の遺伝毒性を増強しなかった。一方、細胞増殖活性の亢進は発がん物質の突然変異誘発性を増強した。以上より、単独では遺伝毒性を示さないものの、細胞増殖亢進能を有する食品中化学物質は同時に摂取される可能性のある食品中遺伝毒性発がん物質の発がんリスクを上昇させる可能性が示された。

化学発がん過程の各ステージにおける病変部の特徴に基づいた食品中化学物質の発がん修飾作用を明らかにする目的で、発がん修飾作用を有する酸化ストレスの新たな発生系の組み合わせを*in vitro*の実験結果を

参考に検討した。CA と NaNO_2 の併用投与はラット胃内において複合反応を引き起こすことが明らかとなったが、反応過程および反応生成物による ROS 生成を介した酸化ストレスは生体内において酸化障害を引き起こさないことが明らかとなった。また、ラット肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の特異的な変化として、フランおよび DEN 誘発肝前がん病変内において NRF2 経路状態が異なることを見出した。さらに、フランおよび DEN 誘発肝前がん病変の進展に対する SFN の影響を検討したところ、SFN は DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢の形成を促進したことから、NRF2 活性化能を有する食品中化学物質は遺伝毒性発がん物質により誘導された変異細胞巢の進展に対して促進的に作用する可能性が示唆された。

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た。2 剤投与と 3-4 剤投与の複合毒性強度を比較した結果、3 ないしは 4 剤複合投与による複合毒性強度は、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、多剤混合毒性影響を予測する上で、2 剤複合投与の毒性情報が有用であることが示唆された。農薬の経口暴露後早期であれば、剤の種類及び単剤、混合剤に係わらず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。パラチオン及びメタミドホスの児動物に対する直接的な発達神経毒性は認められなかった。しかしながら、妊娠ラットに対する有機リン剤の複合暴露は相加的に毒性が強く発現し、妊娠期間中の生理的な薬物代謝酵素活性の変化が母動物において毒性を増強させると考えられた。メトキシクロルおよびパラチオンの若週齢における反復投与は、オイゲノールおよび 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。メトキシクロル、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。メトキシクロルとパラチオンおよ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。

本研究ではヒト AhR あるいは PXR 活性化化合物検索用レポーター細胞株を用いて、食品中の化学物質(主に TBZ と CUR)と代表的な AhR リガンドあるいは PXR リガンドとの複合影響について解析した。その結果、これら化合物はそれぞれ異なった機構で CYP1A および 3A 酵素の発現に対して複合影響を引き起こすことを明らかとした。今後さらに、より多くの化合物を評価することにより、複合影響を起こしうる化合物の化学構造上の特徴を明らかとすることができれば、食品添加物、サプリメントや医薬品の開発やそれらの安全かつ適切な使用に向けて多大な貢献をなすと考える。

フェノール性化合物やビタミンなど抗酸化物質として謳われている化合物と金属の反応が ROS の生成に関与しているかを *in vitro* の系で検証した。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。また、一部のフェノール性化合物は金属または NaNO_2 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、ROS が生成される可能性を示唆し、一部の化合物については生体内条件で新たな化合物が生成されることから今後、生体への影響などを考える必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okamura, T., Ishii, Y., Suzuki, Y., Inoue, T., Tasaki, M., Kodama, Y., Nohmi, T., Mitsumori, K., Umemura, T., Nishikawa, A. Effects of co-treatment of dextran sulfated sodium and MeIQx on genotoxicity and possible carcinogenicity in the colon of p53-deficient mice. *J. Toxicol. Sci.* 35, 731-741, 2010.
- 2) Okamura, T., Ishii, Y., Suzuki, Y., Inoue, T., Tasaki, M., Kodama, Y., Nohmi, T., Mitsumori, K., Umemura, T., Nishikawa, A. Enhancing effects of carbon tetrachloride on in vivo mutagenicity in the liver of mice fed 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). *J. Toxicol. Sci.* 35, 709-720, 2010.
- 3) Ishii, Y., Suzuki, Y., Hibi, D., Jin, M., Fukuhara, K., Umemura, T., Nishikawa, A. Detection and quantitation of specific DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the livers of rats given estragole at the carcinogenic dose. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 532-541, 2011.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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)
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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
- 11) Masashi Sekimoto, Shinsuke Sano, Takuomi Hosaka, Kiyomitsu Nemoto and Masakuni Degawa: Establishment of a stable humancell line, HPL-A3, for use in reporter gene assays of CYP3A inducers. *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 677, 2012
- 12) Y. Iwasaki, T. Hirasawa, Y. Maruyama, Y. Ishii, R. Ito, K. Saito, T. Umemura, A. Nishikawa, H. Nakazawa, Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. *Toxicol. in Vitro*, 25(7), 1320-1327, (2011).
- 13) Y. Iwasaki, M. Nomoto, M. Oda, K. Mochizuki, Y. Nakano, Y. Ishii, R. Ito, K. Saito, T. Umemura, A. Nishikawa, H. Nakazawa, Characterization of nitrated phenolic compounds for their anti-oxidant, pro-oxidant, and nitration activities. *Arch. Biochem. Biophys.*, 513(1), 10-18, (2011).
- 14) 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) 鈴木裕太、木島綾希、日比大介、金美蘭、石井雄二、児玉幸夫、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳：gpt deltaマウスを用いた食品添加物estragoleのin vivo変異原性の解析 第37回日本トキシコロジー学会学術年会 2010年6月

2) 北澤隆宏、鈴木裕太、木島綾希、日比大介、金美蘭、石井雄二、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳：食品中のCYP1A2誘導剤の複合投与によるestragoleのin vivo変異原性への影響 第28回日本毒性病理学会 2011年1月

3) 鈴木裕太、石井雄二、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：Estragoleマウス肝発がん機序への遺伝子障害性メカニズムの関与 第28回日本毒性病理学会 2011年1月

4) 鈴木裕太、木島綾希、日比大介、金美蘭、石井雄二、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳：Estragoleのラットにおける発がん性および遺伝毒性の検討 第38回日本トキシコロジー学会学術年会 2011年7月

5) 黒田 顕、木島綾希、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併用投与の増強効果 第28回日本毒性病理学会 2012年2月

6) Ishii, Y., Takasu, S., Jin, M., Matsushita, K., Fukuhara, K., Ogawa, K., Nishikawa, A., Umemura, T. Quantification of specific DNA adducts by LC-MS/MS in the livers of mice given estragole at carcinogenesis. *Society of Toxicology 2012*, March 2012

7) 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

8) 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)

9) 高須伸二、石井雄二、日々大介、松下幸平、黒田 顕、小川久美子、西川秋佳、梅村隆志：Increased expression of Nrf2-target gene in GST-P positive lesions in the liver of rats treated with furan. 第71回日本癌学会学術集会 (札幌、2012、9月)

10) 首藤康文、薮島淳子、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)

11) 首藤康文、薮島淳子、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毒性-3ないし4剤混合投与による影響第153回日本獣医学会学術集会 (大宮、2012)

12) 首藤康文、元村淳子、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毒性-混合投与における複合毒性の予測第154回日本獣医学会学術集会 (盛岡、2012)

13) 藤江 秀彰、小松 豊、薮島 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-溶媒による妊婦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)

14) 薮島 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：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 第152回 日本獣医学会学術集会 (大阪、2011)

15) 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：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 第39回 日本毒性学会学術年会 (仙台、2012)

16) 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

17) 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：短期間暴露による環境化学物質免疫毒性評価法の検討第39回日本毒性学会 (仙台、2012)

18) 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：N C/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 第19回日本免疫毒性学会 (東京、2012)

19) 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

20) 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

21) 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

22) 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）、要旨集、p.87、2011年7月9日

23) 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）、講演要旨集、p.75、2011年11月23日

24) 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

25) Masashi Sekimoto, Shinsuke Sano, Takumi 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

26) 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

27) 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

28) 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

29) 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

30) 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

31) 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

32) 織田ももこ、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、中澤裕之：ビタミンと金属の相互作用が活性酸素種生成に与える影響 第132回 日本薬学会 2012年3月28日-31日 北海道

33) 岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、梅村隆志、中澤裕之：食品中の化学物質の複合反応に関する研究-活性酸素種および活性窒素種の生成-第25回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (2012年8月8日 東京

34) 佃優里、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、中澤裕之：ケイ皮酸類縁化合物の抗酸化作用および活性酸素種産生に関する研究 第133回 日本薬学会 2013年3月27日-30日 神奈川

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし