

201327028A

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

(H25-食品-一般-004)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅村 隆志

平成26(2014)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	20
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	44
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	53
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	76
出川雅邦	
5. フェノール性化合物の複合影響	82
福原 潔	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	91
IV. 研究成果の刊行物・別刷	92

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）
平成 25 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
原田孝則 残留農薬研究所 理事
出川雅邦 静岡県立大学薬学部 教授
福原 潔 昭和大学薬学部 教授

研究要旨

薬物動態に係る酵素群や細胞内微小環境に影響を与える化学物質が低用量の食品中遺伝毒性発がん物質に及ぼす影響を明らかにするための予備的検討として、マウス肝発がん物質エストラゴール（ES）を雌性 6 週齢の *gpt delta* マウスに 1、10 又は 100 mg/kg/day の濃度で 4 週間強制経口投与し、ES 特異的 DNA 付加体量と突然変異誘発性との関連を検討した。その結果、ES には DNA 損傷を引き起こすものの、遺伝子突然変異を誘発しない濃度が存在することが明らかとなった。また、酸化的 DNA 損傷を引き起こす複数の化学物質の複合影響を検討するため、まずは単剤による酸化的 DNA 損傷の程度と突然変異誘発性の関連を検索する目的で、臭素酸カリウム（KBrO₃）を 9 週間、ニトロフラントイン（NFT）あるいはアリザリン（Alz）を 13 週間、雄性 6 週齢の *gpt delta* ラットにそれぞれ 3 用量で飲水又は混餌投与した。その結果、KBrO₃、NFT 及び Alz はいずれもラット腎皮質において顕著な酸化的 DNA 損傷を引き起こすものの、その投与量によって遺伝子突然変異の有無や生じる変異パターンが異なることが明らかとなった。

本研究では、高脂肪食摂取が食品中発がん物質の引き起こす遺伝子突然変異への影響を明らかにすることを目的として、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットに高脂肪食を与え、同時にヘテロサイクリックアミンである IQ あるいは MeIQx を併用投与して、食品中肝発がん物質が引き起こす *in vivo* 変異原性に与える高脂肪食摂取の影響を検討した。6 週齢の雄 F344 系 *gpt delta* ラットに基礎食（粗脂肪含量 5.4%）または高脂肪食（粗脂肪含量 32%）を自由摂取させ、オリーブ油に懸濁させた IQ を 1.0 mg/kg 体重、あるいは MeIQx を 5.0 mg/kg 体重の用量で 28 日間強制経口投与した。その結果、基礎食を与え、IQ あるいは MeIQx を投与した群の *gpt MF* は基礎食対照群に比較して統計学的に有意に上昇した。また、高脂肪食を与えた群においても同様の有意な上昇が認められた。しかし、これらの変化に高脂肪食摂取の影響は認められなかった。また、IQ あるいは MeIQx 投与により Spi MF は有意に上昇したが、高脂肪食摂取の影響は認められなかった。以上の結果から、高脂肪食の摂取はヘテロサイクリックアミンのラット肝臓における *in vivo* 変異原性に影響を与えない可能性が示された。

これまで 2 種類の有機リン系農薬（パラチオンとメタミドホス）を異なるライフステー

ジ（若齢期、成熟期、妊娠期）の雌性ラットにそれぞれ複合反復経口投与し、妊娠期において死亡を含む最も強い神経毒性症状が発現することを確認した。今年度は無処置の若齢期、成熟期、妊娠中期及び後期の雌性ラットの肝臓あるいは血清を用いて、有機リン剤標的酵素の Cholinesterase (ChE)、薬物代謝酵素の CYP1A、3A 及び 2C、有機リン酸塩を加水分解する Paraoxonase1 (PON1)、ストレス因子の Corticosterone (CORT)、抗酸化除去因子の Glutathione (GSH) を測定した。その結果、妊娠期のラットでは薬物代謝酵素の CYP1A、CYP3A 及び PON1 が低下し、ストレス関連因子の CORT が上昇することにより、この時期における薬物感受性が増強される可能性が示唆された。また、動物のライフステージにおける特に発達期の影響に着目し、農薬暴露が吸入アレルギーに及ぼす影響について、①免疫毒性評価候補農薬の選定、②マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立を目的に実験を行った。その結果、①免疫毒性評価候補農薬の選定実験では、全ての剤でアポトーシス誘発能が増大し、抗原特異的 IgM 抗体産生能が減少し、免疫毒性影響が強く示唆された。②マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立では、TMA を感作及び惹起した群で血中、肺胞洗浄液中、肺門リンパ節中に誘導される IgE、サイトカイン、ケモカイン及び免疫担当細胞数が、無処置群あるいは感作のみの実施群と比較して有意に増加し、吸入アレルギーが適切に誘導されていることが示唆された。

食品中成分の毒性発現における複合影響を調べるにあたり、加熱食品成分中から見出されている 9 種の癌原性ヘテロサイクリックアミン(HCAs: Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, MeAaC, AaC, IQ, MeIQ, PhIP) を選択し、これら化合物による AhR 活性化や自身の代謝活性化酵素 (CYP1As) 誘導能をヒト肝がん由来 HepG2 細胞、あるいは申請者らが樹立したヒト AhR-based reporter gene assay 用細胞株 (HepG2-A10) を用いて検討した。その結果、Glu-P-1、Glu-P-2、PhIP を除く 6 種の HCAs にはヒト AhR 活性化能および CYP1As 誘導能があることを明らかにした。これら結果は、これまでのマウスあるいはラット肝臓に対する酵素誘導試験結果とは一部異なるものであり、Glu-P-1、Glu-P-2、PhIP の 3 化合物についてはその応答性(CYP1As 誘導性)に種差がある可能性を示した。また、改良型 AhR-based reporter gene assay 用細胞株 (ヒト HepG2-XL24 およびマウス Hepa-XL11) を樹立した。これら細胞株を用いて、6 種のベンズイミダゾール化合物 (Benzimidazole、Thiabendazole、Carbendazim、Benomyl、Omeprazole、Lansoprazole) の AhR 活性化能を調べ、それら活性能が種差 (ヒトとマウス細胞株差) を示すことを明らかにした。さらに、ベンゾイミダゾール類と代表的な AhR リガンド (3-methylcholanthrene, MC) の複合曝露による AhR 活性化能への影響について種差 (ヒトとマウス細胞株差) を検討し、MC との複合曝露による AhR 活性化の増強や、その複合影響の種差を明らかにした。

フェノール性抗酸化物質の毒性発現における複合影響を明らかにすることを目的として薬物代謝酵素による酸化反応を経由するカテキンの毒性発現機構について化学的解析を行った。その結果、カテキンは塩基性条件下では酸化の過程で酸素をスーパーオキシドアニオンに還元することができた。金属イオンを伴うフェノール性抗酸化物質の毒性は in vitro

試験で既に報告されているが、今回、塩基性条件下で活性酸素の発生を直接証明できたことで、複合影響として金属イオンを伴う毒性がヒトでも発症する可能性が強く支持された。一方、カテキンは抱合反応を受けて排泄されるが、代謝酵素による酸化反応が亢進するとキノン体を生成することが考えられる。キノン構造は非常に不安定であるが、今回、カテキンは酸化剤の存在下ではキノン体に酸化されて生体高分子のモデル化合物と付加体を形成することを化学的な手法によって確認することができた。この結果より、酸化代謝を亢進する因子による複合影響として、キノン酸化体を經由する毒性を発症する可能性が考えられた。海外では緑茶抽出物による肝炎が報告されていることから、酸化代謝を亢進する可能性のある健康食品やサプリメントによる複合影響は早急に評価する必要がある。

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）

薬物動態に係る酵素群や細胞内微小環境に影響を与える化学物質が低用量の遺伝毒性発がん物質に及ぼす複合影響を明らかにすることを目的として研究を進める。本年度はその予備的検討として、遺伝毒性発がん物質であるエストラゴール（ES）を種々の濃度で *gpt delta* マウスに投与し、肝臓における ES 特異的 DNA 付加体量とレポーター遺伝子における突然変異頻度との関連を検討した。

一方、酸化ストレスを引き起こす化学物質の同時暴露による複合影響を評価した報告はない。本研究では臭素酸カリウム

（ KBrO_3 ）、ニトロフアントイン（NFT）及びアリザリン（Alz）を用いて、これらの併用投与による酸化的 DNA 損傷レベルや突然変異誘発性への複合影響を検討し、酸化ストレスを生じる食品中化学物質の複合影響について評価する。本年度は予備的検討として、それぞれ単剤を *gpt delta* ラットに投与し、投与量と腎臓における酸化的 DNA 損傷レベル及びレポーター遺伝子における突然変異頻度との関連を検討した。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響（西川）

本研究では、高脂肪食摂取が食品中発がん物質の引き起こす遺伝子突然変異への影響を明らかにすることを目的とし、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットに高脂肪食を与え、食品の加熱等により生成されるヘテロサイクリックアミンの一種で、ラット肝臓に変異原性や発がん性を示す 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone (IQ) あるいは 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) を併用投与して、食品中肝発がん物質が引き起こす *in vivo* 変異原性に与える高脂肪食摂取の影響を検討した。

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. 本年度は複合暴露に対するライフステージによる感受性変化に影響を与えている要因について情報を得ることを目的として、無処置の若齢期、成熟期および妊娠期（中期および後期）の雌ラットを用いて検討した。

3-2. 本年度の研究では、免疫系への影響

が示唆されている有機塩素系、有機リン系およびピレスロイド系農薬を対象に、様々なライフステージに反復経口投与し、その際の吸入アレルギー疾患に及ぼす影響を調査した。

4. ヘテロサイクリックアミン類およびベンズイミダゾール類によるヒト AhR の活性化 (出川)

4-1. 癌原性 HCA 類による AhR 活性化と CYP1A 酵素誘導

食品成分中の HCA 類に着目し、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞およびヒト AhR-based reporter gene assay 用細胞株 (HepG2-A10) を用いて、それらの AhR 活性化能と CYP1A 酵素誘導能との関連性を検討した。

4-2. ベンズイミダゾール類の AhR 活性化能とその動物種差

ベンズイミダゾール類による AhR 活性化作用や、PAH 類との複合効果について検討した。なお、AhR 活性化能の測定には、改良型ヒト AhR-based reporter gene assay 用細胞株の HepG2-XL24 を用いた。また、マウス AhR-based reporter gene assay 用細胞株 Hepa-XL11 を用いて比較検討した。

5. フェノール性化合物の複合影響 (福原)

本研究では、フェノール性抗酸化物質の毒性発現機構について化学的な解析を行う。毒性発現に関わる生物的、化学的因子を明らかにすることで、フェノール性抗酸化物質の薬物代謝酵素、生体環境、化学物質等との複合影響を予測し、毒性発現を事前に予測・予防するための情報提供を行う。

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)

<実験 1>6 週齢の雌性 B6C3F₁ *gpt delta* マウス 20 匹を各群 5 匹に配し、ES を 1、10 及び 100 mg/kg/day の用量で 4 週間強制経口投与した。対照群には被験物質の溶媒としてコーンオイルを強制経口投与した。4 週間の投与後、動物はイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓外側左葉を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリンエオジン染色を施した。残りは ES 特異的 DNA 付加体の測定並びに *gpt* 及び *Spi* assay 用のサンプルとして液体窒素により凍結後、-80°C で保存した。ES 特異的 DNA 付加体の測定は、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) にて測定した。*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。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はタカラバイオ株式会社にて *gpt* 遺伝子の塩基配列解析を実施し、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。P2 ファ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。

(統計学的処理方法)

体重、腎重量、遺伝子突然変異頻度及び変異スペクトラムの統計学的処理は、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合は Dunnet の多重比較検定により行った。〈実験 2〉 6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット 20 匹を各群 5 匹に配し、KBrO₃ を 0、125、250 及び 500 ppm の濃度で 9 週間飲水投与した(実験 2-1)。また、6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット 35 匹を各群 5 匹に配し、NFT を 100、500 及び 2500 ppm の濃度で、Alz を 20、100 及び 500 ppm の濃度で 13 週間混餌投与した(実験 2-2)。右腎を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリンエオジン染色を施した。左腎は皮質と髄質を分けて採取し、8-OHdG の測定並びに *gpt* 及び Spi assay用のサンプルとして液体窒素により凍結後、-80°C で保存した。8-OHdG レベルの測定は、腎皮質と髄質でそれぞれ実施した。8-OHdG 量は液体クロマトグラフィ/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* 及び Spi assay では、腎皮質のゲノム DNA を抽出し、実験に供した。各 assay は実験 1 と同様に実施した。

(統計学的処理方法)

腎皮質と髄質における 8-OHdG レベルの統計学的処理は Student t 検定により、その他のデータは実験 1 と同様な統計処理を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌投与、飲水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)

6 週齢の雄 F344 系 *gpt delta* ラットに基礎食(粗脂肪含量 5.4%) (オリエンタル酵母) または高脂肪食(粗脂肪含量 32%) (日本クレア) を自由摂取させ、さらにオリーブ油(和光純薬) に懸濁させた IQ (Toronto Research Chemicals) を 1.0 mg/kg 体重、あるいは MeIQx (和光純薬) を 5.0 mg/kg 体重の用量で 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。投与終了後に麻酔下にて採血し、血清生化学的検査を行った。さらに、肝臓を摘出後、病理組織学的検査ならびに *gpt* および Spi 遺伝子変異体頻度(MF) 解析を行った。得られた *gpt* 変異体についてはダイレクトシーケンシング法(タカラバイオ)により、変異スペクトラム解析を実施した。

(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」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、審査を受けた。

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. Wistar Hannover 系 SPF ラットの 4 および 8 週齢の雌動物を各々 10 匹購入した。さらに、妊娠 10 日目(GD10)の雌動物を 20 匹購入した。なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所で定める動物実験規程に従い実施した(動物実験委員会承認番号; AC13198)。パラチオン 0.6 mg/kg、メタミドホス 0.8 mg/kg を混合し、胃ゾンデを用いて反復経口投与をすると、毒性は妊娠期で最も強く発現し、次いで成熟期、若齢期であることが分かった。そこで、ライフステージによる薬物の感受性の変化が発現する毒性の程度に影響を及ぼすと考え、無処置の若齢期、成熟期、妊娠中期 (GD14)、妊娠後期 (GD20) の 4 群を設置した。GD10 の雌動物は入荷時及び剖検時 (GD14)、10 日間馴致の GD10 の雌動物は GD17 及び剖検日 (GD20) に体重を測定した。剖検は、若齢期は 4 週齢、成熟期は 10 週齢で実施し、妊娠中期は GD14、妊娠後期は GD20 に実施した。全生存動物について、イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、後大静脈より血液を採血した後に剖検した。血液は遠心分離し (2000g×4°C×10 分間)、その上清を血清サン

プルとした。また、各動物から肝臓及び脳を摘出した。肝臓は 1×PBS (GIBCO, Life technologies, USA) で灌流後、一部を-80°C で保存した。一方、脳については全脳重量を測定した。コリンエステラーゼ(ChE)活性の測定はヨウ化アセチルチオコリンを基質とした DTNB 法により行なった。血清については、JCA-BM1250 自動分析装置 (日本電子株式会社) を用いて ChE 活性を測定した。Paraoxonase 1 測定にはパラオキシナーゼ (PON-1:Arylesterase 活性) 測定キット (日研ザイル株式会社) を用いた。Cytochrome P450 測定には P450 Glo assay kit (Promega Corporation, USA) を用いた。血清 Corticosterone (CORT) の測定は DetectX Corticosterone Enzyme immunoassay kit (Arbor Assays, USA) を、Glutathione 測定には HT Glutathione Assay Kit (TREVIGEN®, Trevigen, Inc., USA) を用いた。

(有意差検定)

各データは、Student's *t*-test を実施して有意差の有無を判定した。

3-2.

3-2-1 ①免疫毒性評価候補農薬の選定

有機塩素系 (メトキシクロル、 γ -BHC)、有機リン系 (パラチオン、DDVP) ないしはピレスロイド系 (レスメトリン、テトラメトリン) 農薬を、ヒト T 細胞性急性白血病由来細胞 (Jurkat T 細胞) ないしは 7 週齢の雌性 Balb/c マウスに 7 日間反復経口投与し、アポトーシス誘発能ないしは羊赤血球抗原特異的 IgM 抗体産生能を調査した。Jurkat T 細胞を用いたアポトーシス誘発能測定試験では、全ての被験物質で 0、10、100 および 1000 nmol の 4 濃度を実験に用いた。添加後 6 時間のカスパーゼ 3/7 活性

を Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega KK, 東京都) および Annexin V 陽性細胞数を Annexin V : FITC Apoptosis Detection Kit I (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、東京都) を用いて測定した。近交系 SPF マウス (Balb/cAnNCrIj) の雌動物を 7 週齢で試験に用いた。メトキシクロル、レスメトリンおよびテトラメトリンは 30、100、300 mg/kg、 γ -BHC は 1.5、5、15 mg/kg、パラチオンは 0.15、0.5、1.5 mg/kg、DDVP は 2、6、20 mg/kg の各 3 用量を設定した。被験物質を 7 日間にわたって強制経口投与した。全例をイソフルラン吸入麻酔下で後大静脈および腹大動脈を切断し放血により安楽死させ、胸腺および脾臓を採取した。胸腺は重量を測定した。脾臓は測定時まで冷蔵 PBS 中で保存した。免疫グロブリン抗体価の測定は、酵素免疫測定法 (ELISA) で測定した。測定には BD OptELATM Reagent Set B (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を使用した。免疫グロブリン抗体反応の測定として、脾臓中のヒツジ赤血球特異的免疫グロブリン M クラス抗体 (抗ヒツジ赤血球免疫グロブリン M 抗体) の抗体反応は、Plaque forming cell (PFC) 法により測定した。胚中心陽性 B 細胞数測定は単離した脾臓細胞における Germinal center 陽性 B 細胞数測定をフローサイトメトリー法により行った。サイトカイン産生量測定は無菌化で調製した脾臓細胞 5×10^5 個について、細胞上清中のサイトカイン産生量 (インターロイキン 6、IL6) を測定した。

(有意差検定)

Bartlett の等分散検定により分散が均一である場合には、一元配置分散分析法を用い

て群間の有意差の有無を調べた。群間に有意差が認められた時は、Dunnett の多重比較法により有意差の有無を判定した。分散が等しくない場合は、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べ、有意差が認められた時は、Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有意差の有無を判定した。

3-2-2 ②吸入アレルギー実験系の確立

Balb/c マウス雌および吸入アレルギー性を持つ $2.5 \mu\text{m}$ 以下の微小粒子状物質 (トリメリト酸無水物、TMA) を用いて、吸入アレルギー検出モデルを作成した。近交系 SPF マウス (Balb/cAnNCrIj) の雌動物を 8 週齢で試験に用いた。TMA は経皮感作濃度として 1%、吸入惹起濃度として 0.5 mg/L を選択し、投与を行った。経皮感作は被験物質投与液をピペットを用いて左右の耳介後方に $25 \mu\text{L}$ ずつ解放経皮投与した。吸入暴露は、投与毎に同一チャンバー内で 30 分の連続暴露を行った。最終吸入惹起翌日に全例をペントバルビタール注射麻酔下で後大静脈および腹大動脈を切断し放血により安楽死させ、胸腺および脾臓を採取した。胸腺は重量を測定した。脾臓は測定時まで冷蔵 PBS 中で保存した。最終吸入惹起の翌日、全動物についてペントバルビタール注射麻酔下で後大静脈より採血し、肺胞洗浄液 (BALF) および肺門リンパ節を採材した。血液からは血清を分離し、ELISA 法により総 IgE 量を定量した。肺門リンパ節の細胞懸濁液の一部はフローサイトメーターを用いて IgE 陽性 B 細胞数、記憶ヘルパー T 細胞数および記憶傷害性 T 細胞数を測定した。また、CD3 および CD28 抗体と

24時間共培養することでT細胞から放出されるサイトカイン量 (IL-4、 5、 9、 13、 17A) を定量した。BALF 中細胞分画測定はフローサイトメーターを用いて実施した。BALF 上清中の各ケモカイン (RANTES、 MIP-1 α 、 MIP-1 β 、 KC、 MCP-1) 量測定は BD Cytometric Bead Array (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いて実施し、肺門リンパ節中細胞分画測定は、フローサイトメーターを用いて実施した。無菌化で調製した肺門リンパ節細胞 5×10^5 個について、細胞上清中のサイトカイン産生量 (IL-4、 5、 9、 13、 17A) を測定した。

(有意差検定)

Bartlett の等分散検定により、分散が均一である場合は、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べ、有意差が認められた時は、Tukey の多重比較法を実施した。

(倫理面への配慮)

なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所で定める動物実験規程に従い実施した (動物実験委員会承認番号 ; AC13103)。

4. ヘテロサイクリックアミン類およびベンズイミダゾール類によるヒト AhR の活性化 (出川)

HCA 類による AhR 活性化および CYP1A 酵素誘導は、ヒト肝がん HepG2 細胞、あるいは AhR 結合配列 (XRE) を組み込んだルシフェラーゼプラスミド (XRE-Luc) を安定に発現させたヒト HepG2-A10 細胞を用いてそれぞれ解析した。また、ベンズイミダゾール類による AhR 活性化の解析には、改良型 XRE-ルシフェラーゼプラスミド (XRE-pGL4.15) を安定に発現させたヒト

HepG2-XL24 およびマウス Hepa-XL11 細胞株を使用した。本研究で使用した化合物は、HCA 類として、Trp-P-1、Trp-P-2、Glu-P-1、Glu-P-2、A α C、MeA α C、IQ、MeIQx および PhIP を使用した。これら化合物は国立がんセンター研究所生化学部より供与頂いた。また、MC、 α -naphthoflavone (ANF) およびベンズイミダゾール化合物 (Benzimidazole (BEZ)、Thiabendazole (TBZ)、Carbendazim (CBD)、Benomyl (BML)、Omeprazole (OME)、および Lansoprazole (LAN)) はいずれも Sigma 社より購入して使用した。AhR 活性化の測定では、各 AhR-based reporter gene assay 用細胞株 (HepG2-A10、HepG2-XL24、Hepa-XL11) 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 Wallac1420 ARVO-SX (Perkin Elmer) 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。遺伝子発現量の測定では HepG2 細胞に被験化合物 (HCA 類) を添加して一定時間培養後、Total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン) により単離した。この Total RNA より、ランダムヘキサマーと MMLV-逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。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 Real Time 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。CYP1A 酵素活性の測定では、基質としてエトキシレゾルフィン (ER) を用い、その脱エ

チル化活性 (EROD 活性) を指標として、CYP1A 酵素活性を測定した。

5. フェノール性化合物の複合影響 (福原)

1. カテキンからの活性酸素生成機構の解析

UV 測定: 嫌気的条件下、カテキンのアセトニトリル溶液に 0~3 倍量の NaOCH_3 を添加して UV スペクトルを測定した。

ESR 測定: ESR の測定セルに嫌気的条件下、カテキンのアセトニトリル溶液に 2 倍量の NaOCH_3 を添加した後、酸素を導入しながら ESR を測定した。測定は室温 (298K) および低温 (113K) 条件下で行った。

2. カテキンの酸化反応の解析

カテキンをアセトニトリル、アセトンまたはテトラヒドロフランに溶解した溶液に、酸化剤 (Ag_2O , DDQ, $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, ガルビノキシルフリーラジカル) を添加して反応を行った。反応の進行は TLC で確認した。反応が進行した溶液は適切な条件で後処理した後、生成物の構造を NMR で解析した。ガルビノキシルフリーラジカルを酸化剤として利用した反応は NMR チューブ中でも行い、NMR スペクトルを測定して反応の進行を確認した。

3. カテキン酸化体の反応性の解析

実験 2 で検討した酸化条件を用いてキノン酸化体を合成した後、核酸塩基のモデル化合物として 4-クロロベンジルアミンとの反応を行った。反応生成物の構造は NMR で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は全て化学系の実験であり、倫理面への問題はない。

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)

<実験 1> 肝臓の実重量及び相対重量においても投与に起因する変化は何れの群においても認められなかった。ES 特異的 DNA 付加体量、ES-3'-8-dG、ES-3'- N^2 -dG 及び ES-3'- N^6 -dA は肝臓において低用量群から検出され、投与量依存的に増加した。*gpt* MF は、対照群 (0.61 ± 0.39) に比して高用量群 (1.27 ± 0.15 , $p < 0.01$) で有意な上昇が認められた。*gpt* 変異体のスペクトラム解析の結果、高用量群で A:T-G:C transition ($p < 0.01$) と G:C-T:A transversion ($p < 0.05$) の頻度の有意な増加が認められた。*Sp1* MF は、対照群 (0.69 ± 0.20) に比していずれの投与群においても有意な増加は認められなかった。

<実験 2-1> 高用量群において投与開始4週目から体重増加抑制が認められ、有意な低値 ($p < 0.05$) となった。高用量群では腎臓の相対重量の有意な高値 ($p < 0.01$) が認められ、実重量も高値を示したことから、腎重量の増加は KBrO_3 の投与に起因した変化であると考えられた。腎皮質及び髄質の DNA 中 8-OHdG レベルは、皮質では対照群 ($0.46 \pm 0.07/10^5 \text{dG}$) に比して中間用量群 ($0.94 \pm 0.08/10^5 \text{dG}$, $p < 0.01$) 及び高用量群 ($1.16 \pm 0.12/10^5 \text{dG}$, $p < 0.01$) で有意な高値が認められた。一方、髄質では対照群 ($0.33 \pm 0.16/10^5 \text{dG}$) に比して高用量群でのみ有意な高値 ($0.58 \pm 0.05/10^5 \text{dG}$, $p < 0.05$) が認められたが、そのレベルは皮質に比して有意に低かった ($p < 0.01$)。*gpt* MF は、対照群 (0.17 ± 0.09) に比して高用量群 (0.45 ± 0.21 , $p < 0.05$) で有意な高値を示した。*gpt* 変異体のスペクトラム解析の結果、高用量群では、single base deletion ($p < 0.01$) と A:T-T:A

transversion ($p < 0.01$) 頻度の有意な増加が認められた。Spi MF は、対照群 (0.15 ± 0.12) に比して高用量群で有意な高値を示した (0.34 ± 0.07 , $p < 0.05$)。Spi 変異体のスペクトラム解析の結果、高用量群では、G/C 及び A/T の繰り返し配列部位における single base deletion 頻度の増加傾向と insertion ($p < 0.05$) 頻度の有意な増加が認められた。

<実験 2-2> NFT 投与群では高用量群において投与開始 1 週目から体重増加抑制が認められた。この体重増加抑制は摂餌忌避に起因するものと考えられた。NFT 投与群では、肝臓 ($p < 0.01$) 及び腎臓 ($p < 0.05$) の実重量の有意な低値と、腎臓相対重量の有意な高値 ($p < 0.01$) が認められた。Alz 高用量群では肝臓の相対重量の有意な高値 ($p < 0.01$) が認められ、同群では腎臓の相対重量も有意な高値 ($p < 0.01$) を示した。腎皮質及び髄質の DNA 中 8-OHdG レベルは、NFT 投与群の皮質では、対照群 ($0.32 \pm 0.09/10^5 \text{dG}$) に比して中間用量群 ($1.07 \pm 0.30/10^5 \text{dG}$, $p < 0.01$) 及び高用量群 ($1.90 \pm 0.30/10^5 \text{dG}$, $p < 0.01$) において有意な高値を示した。一方、髄質では、高用量群においてのみ有意な上昇 ($1.09 \pm 0.30/10^5 \text{dG}$, $p < 0.01$) が認められたが、髄質の 8-OHdG レベルは皮質に比して有意に低かった ($p < 0.01$)。Alz 投与群では、皮質、髄質ともに高用量でのみ有意な高値 (皮質: $0.95 \pm 0.26/10^5 \text{dG}$, $p < 0.01$, 髄質: $0.75 \pm 0.19/10^5 \text{dG}$, $p < 0.01$) が認められ、髄質に比して皮質の 8-OHdG レベルは高値を示す傾向が認められた。NFT 投与群では、gpt MF は対照群 (1.04 ± 0.62) に比して高用量群において有意な高値を示した (2.13 ± 0.46 , $p < 0.05$)。Alz 投与群では、gpt MF は対照群 (0.65 ± 0.15) に比して有意な変化は認めら

れなかった。Alz 又は NFT 投与群の皮質において、Spi MF は、対照群 (Alz: 0.55 ± 0.18 , NFT: 1.77 ± 0.19) に比していずれの投与群においても有意な変化は認められなかった。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 (西川)

高脂肪食を与え、IQ または MeIQx を投与した群ならびに溶媒対照群の最終体重は、基礎食を与えたそれぞれの群に比較して、統計学的に有意ではなかったものの高値を示した。高脂肪食を与え、MeIQx を投与した群ならびに溶媒対照群の肝臓の絶対重量ならびに相対重量は、基礎食を与えたそれぞれの群に比較して統計学的に有意に上昇した。また、IQ を投与した群における肝臓の絶対重量ならびに相対重量は、高脂肪食を与えた群で基礎食を与えた群に比較して統計学的に有意ではなかったものの高値を示した。血清生化学的検査の結果では、高脂肪食を与え、IQ または MeIQx を投与した群の血清中グルコース濃度は基礎食を与えたそれぞれの群に比較して統計学的に有意な高値を示した。また、高脂肪食を与え、MeIQx を投与した群の血清中トリグリセリド濃度は基礎食を与えた群に比較して統計学的に有意な高値を示した。肝臓の病理組織学的検索の結果、高脂肪食を与えた何れの群においても、小葉中心性の肝細胞の空胞化が認められた。基礎食を与え、IQ または MeIQx を投与した群の gpt MF は、溶媒対照群に比較して統計学的に有意に上昇した。また、高脂肪食を与え、IQ または MeIQx を投与した群においても、gpt MF は溶媒対照群に比して有意の高値を示した。しかし、基礎食を与えた群と高脂肪食を与

えた群間では有意な差異は認められなかった。*gpt* 変異体のスペクトラム解析の結果、IQ 投与群では、基礎食群ならびに高脂肪食群の何れにおいても、それぞれの溶媒対照群に比較して G:C-T:A transversion 変異および一塩基欠失変異の頻度が有意に上昇していた。MeIQx 投与群でも同様に、何れの食餌群においても G:C-T:A および A:T-T:A transversion 変異ならびに一塩基欠失変異の頻度が有意に上昇した。しかし、これらの変化に高脂肪食摂取の影響は認められなかった。基礎食を与え、IQ または MeIQx を投与した群の Spi MF は、溶媒対照群に比較して統計学的に有意に上昇した。また、高脂肪食を与えた群でも同様の結果であった。しかし、これらの変化に高脂肪食摂取の影響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. 試験期間中、死亡は認められなかった。試験期間中、全生存動物に異常は認められなかった。試験期間中、全生存動物における体重は順調に増加した。剖検時、全生存動物における肉眼的異常は認められなかった。血清 ChE 活性は、成熟期、妊娠中期及び後期で統計学的有意差を認めた。若齢期における血清 ChE 活性は非常に低い値を示した。

PON1 活性は、妊娠後期で最も低い値を示し、若齢期、妊娠中期、成熟期の順に高い値を示した。CYP1A は成熟期で高く、妊娠後期では最も低い値を示した。CYP3A は妊娠中期及び後期で低い活性値を示した。また、CYP2C は若齢期で低く、成熟期、妊娠中期及び後期で高い値を示した。血清

Corticosterone 量は各測定時点で統計学的有意差は認めなかったが、妊娠中期で高い値を示し、若齢期では低い値を示した。酸化型グルタチオンは成熟期、妊娠中期、妊娠後期で有意な高い値を示したが、若齢期では著しく低い値を示した。還元型グルタチオン及び総グルタチオン量は、全ての測定時点で高い値を示し、統計学的有意差は認められなかった。

3-2.

3-2-1. ①免疫毒性評価候補農薬の選定

Jurkat T 細胞のアポトーシス誘発能では、全ての剤について、Annexin V 陽性細胞数の濃度依存性の増加が認められ、Caspase 3/7 活性についてもほぼ同様の傾向が認められた。DDVP については Caspase 3/7 活性の増加が Annexin V 陽性細胞数の増加と比較して、低値であった。マウス獲得免疫能の解析では、胸腺重量は全ての被験物質で用量依存性の有意な減少が認められた。

羊赤血球特異的 IgM 抗体産生能では、有機塩素剤および有機リン剤については用量依存性の有意な減少が認められたが、ピレスロイド剤のテトラメトリンは変化が認められなかった。レスメトリンには有意な減少が認められたものの、用量依存性の変化ではなかった。胚中心陽性 B 細胞数では、有機塩素剤および有機リン剤については用量依存性の有意な減少が認められた。しかし、ピレスロイド剤については変化が認められなかった。脾臓中 IL-6 産生能では、有機塩素剤および有機リン剤については用量依存性の有意な減少が認められたが、ピレスロイド剤については変化が弱く、レスメトリンには有意な減少は認められなかった。

3-2-2 ②吸入アレルギー実験系の確立

血清中 IgE 量は、TMA 感作のみ群と TMA 感作・惹起群のいずれも無処置群と比較して有意な増加が認められた。TMA 感作のみ群と TMA 感作・惹起群の間には差は認められなかった。肺門リンパ節中 IgE 陽性細胞数は、TMA 感作・惹起群で TMA 感作のみ群と無処置群と比較して有意な増加が認められた。TMA 感作のみ群と無処置群の間には差は認められなかった。肺胞洗浄液の解析では、いずれのパラメーターについても、TMA 感作・惹起群で TMA 感作のみ群と無処置群と比較して有意な増加が認められた。TMA 感作のみ群と無処置群の間には差は認められなかった。肺胞リンパ節の解析では、いずれのパラメーターについても、TMA 感作・惹起群で TMA 感作のみ群と無処置群と比較して有意な増加が認められた。TMA 感作のみ群と無処置群の間には差は認められなかった。

4. ヘテロサイクリックアミン類およびベンズイミダゾール類によるヒト AhR の活性化 (出川)

4-1. 癌原性 HCA 類による AhR 活性化と CYP1A 酵素誘導

HepG2-A10 細胞に、各々の HCA (10 μ M) を処理し、AhR 活性化の経時的な変化を検討した。Glu-P-1、Glu-P-2 および PhIP を除いた 6 化合物には、処理後 6 あるいは 12 時間に有意な AhR 活性化能が示された。HepG2 細胞または HepG2-A10 細胞に種々濃度 (0-100 μ M) の HCA 化合物を 6 時間または 12 時間処理し、各 HCA の AhR 活性化能および CYP1A 酵素誘導能をそれぞれ測定した結果、①Glu-P-1、Glu-P-2 及び PhIP に

は、顕著な AhR 活性化能や CYP1A 誘導能は観察されなかった。②Trp-P-1、Trp-P-2 及び A α C には、AhR 依存的な CYP1A1 酵素誘導能が認められた。また、③MeA α C、IQ 及び MeIQx では、CYP1A1 酵素誘導能が見られるにも関わらず、EROD 活性の上昇は見られなかった。EROD 活性に対する HCA 類の阻害効果を検討したところ、MeA α C、IQ 及び MeIQx には強力な ERDO 阻害活性があることが明らかになった。

4-2. ベンズイミダゾール類による AhR 活性化とその動物種差

HepG2-XL24 細胞にベンズイミダゾール類 (各 1-100 μ M) を 24 時間処理し、各化合物の AhR 活性化能を比較した結果、BEZ を除く 5 化合物にヒト AhR 活性化能が認められた。また、その活性化能は OME \gg LAN $>$ CBD $>$ TBZ、BML の順であった。ベンズイミダゾール類 (各 100 μ M) と MC (0.1 μ M) を HepG2-XL24 細胞に 24 時間複合処理したところ、単独の誘導とは異なり、その AhR 活性化増強効果は TBZ、CBZ $>$ BML、OME $>$ LAN となった。なお、BEZ にはこのような複合効果は見られなかった。さらに、マウス Hepa-XL11 細胞を用いて同様の処理を行い、各化合物の AhR 活性化能を比較した。マウス AhR に対しては、BEZ、CBD、BML はいずれも活性化作用を示さず、また、残りの 3 化合物による活性化能は LAN $>$ OME、TBZ であった。ベンズイミダゾール類 (各 100 μ M) と MC (0.1 μ M) を Hepa-XL11 細胞に 24 時間複合処理したところ、単独の誘導とは異なり、そのマウス AhR 活性化能は TBZ、LAN $>$ OME、CBD となった。なお、BEZ および BML にはこのような修飾作用は認められなかった。

5. フェノール性化合物の複合影響 (福原)

5-1. カテキンからの活性酸素生成機構の解析

カテキンが塩基性条件下、酸素を還元して活性酸素を生成する可能性について検討を行った。嫌氣的条件下、カテキンに塩基として NaOCH_3 を添加して UV スペクトルを測定したところ、スペクトルは 0~1 等量の NaOCH_3 の添加とともに 310nm を肩とする UV 吸収の増加がみられ、カテキンのモノアニオン体の生成が確認できた。さらに、この溶液に酸素を添加したところ、UV スペクトルに変化はみられないことから、モノアニオン体から酸素への電子移動反応は進行しないことがわかった。一方、1~2 等量の NaOCH_3 の添加すると 295nm と 340nm の UV 吸収が増加したことから、ジアニオン体が生成することが確認できた。この溶液に酸素を添加したところ 430nm の吸収の増大がみられた。この変化よりジアニオン体は酸素を還元することが予測された。そこで、嫌氣的条件下、2 倍量の NaOCH_3 を用いてカテキンのジアニオンを生成させた溶液に酸素を添加して ESR を室温条件下、測定したところ、2.0051 に g 値をもつシグナルが観測された。このスペクトルは 3 つの超微細結合定数 ($hfc = 1.25, 1.50, 3.30$) でコンピューターシミュレーションすることができ、また分子軌道計算により解析した結果、セミキノラジカルアニオンが生成していることが確認できた。一方、この反応溶液の凍結 ESR スペクトル (113K) を測定したところ、スーパーオキシドラジカルアニオンに特徴的な 2.175 に g 値をもつブロードなシグナルを直接観測することができた。以上の結

果より、カテキンのジアニオン体は酸素を一電子還元してスーパーオキシドアニオンを発生し、自らはセミキノラジカルアニオンになることがわかった。

5-2. カテキンの酸化反応の解析

カテキンをアセトニトリル、アセトンまたはテトラヒドロフランに溶解した溶液に、一電子酸化剤として Ag_2O , DDQ, ガルビノキシルフリーラジカル、二電子酸化剤として $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ を添加して反応を行った。その結果、 $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ では反応は全く進行せず、原料が回収されたが、一電子酸化剤を添加するとカテキンは速やかに酸化を受けることがわかった。しかしながら、酸化生成物は非常に不安定で単離精製が難しいことから、NMR のサンプルチューブでカテキンとガルビノキシルフリーラジカルを 1:1 で反応させた溶液を作成し、NMR スペクトルを測定して反応生成物の構造解析を行った。その結果、NMR スペクトルからは、カテキン由来のピークとキノン体由来のピークが 1:1 で含まれていることが確認された。同様の方法で、 Ag_2O , DDQ を用いた反応についても NMR で確認し、反応条件について検討を行った結果、アセトン溶液中、6 当量の Ag_2O を用いてカテキンを酸化させると高収率でキノン体を合成できることが明らかとなった。

5-3. カテキン酸化体の反応性の解析

核酸塩基のモデル化合物である 4-クロロペンジルアミンを用いて合成したキノンに対する付加反応を行った。カテキンからキノンの合成反応は酸化剤として 6 当量の Ag_2O を用いて行った。生成したキノンは非常に不安定であることから、反応溶液の NMR を測定してキノンの生成を確認した後、3 当

量の4-クロロベンジルアミンを添加して引き続き反応を行った。TLC 上に新しい生成物が確認できたので、後処理後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって反応生成物を単離精製し、構造をNMR及びMSで解析した。その結果、4-クロロベンジルアミンと反応溶媒のアセトンがキノンと反応してインドール構造を有するカテキン誘導体が生成していることがわかった。

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）

〈実験1〉B6C3F₁ *gpt delta* マウスを用いてES特異的付加体形成量とレポーター遺伝子の突然変異頻度との関連を検討した結果、3種のES特異的DNA付加体はいずれも低用量群から検出され用量依存的に増加したのに対し、*gpt* MFsの有意な上昇は高用量群でのみ認められたことから、ESには直接的なDNA損傷を引き起こすものの突然変異を誘発しない用量が存在することが示唆された。今後、特異的付加体の形成は認められるものの、突然変異を誘発しない低用量のESと動物用医薬品のフルメキンの併用投与を実施して、突然変異を誘発しない低用量の食品中遺伝毒性発がん物質と、その代謝過程や細胞内微小環境に影響与える食品中化学物質との複合影響を明らかにする予定である。

〈実験2〉食品中の化学物質の中には酸化ストレスを発生し、結果として酸化的DNA損傷を引き起こすものがあるが、酸化ストレスに対する複合影響の詳細はいまだ不明な点が多い。そこで本年度は、予備的検討として、F344系 *gpt delta* ラットに酸化的

DNA損傷を引き起こすことが知られているKBrO₃、NFT及びAlzを投与して、酸化的DNA損傷レベルと突然変異誘発性の関連を検討した。腎皮質を標的とするKBrO₃及びNFTの発がん性に酸化的DNA損傷を介した遺伝子突然変異が寄与することが示唆された。一方、中間用量群では *gpt* MFの変化が認められなかったことから、KBrO₃及びNFTには酸化的DNA損傷を引き起こすものの、突然変異を誘発しない用量が存在することが示された。また、これら二剤によって生じる変異スペクトラムは異なる可能性が考えられた。一方、Alzの高用量群では、皮質及び髄質の8-OHdGレベルの有意な高値が認められたが、皮質の *gpt* 及びSpi MFsに有意な変化は認められなかったことから、Alzは酸化的DNA損傷を引き起こすものの、その損傷は突然変異の誘発に至らない可能性が考えられた。今後、KBrO₃とNFTにそれぞれAlzを併用投与し、酸化的DNA損傷の蓄積と、それによる突然変異誘発性への影響を検討する予定である。

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、高脂肪食摂取がヘテロサイクリックアミンの *in vivo* 変異原性にどのような影響を与えるかを検討するために、F344系 *gpt delta* ラットに粗脂肪含量32%の高脂肪食を4週間自由に摂取させたところ、投与終了後の最終体重や肝重量は基礎食群に比較して高値を示し、血清中グルコースやトリグリセリド濃度も高値を示す傾向が認められた。さらに、肝臓の病理組織学的な解析の結果、高脂肪食群はIQやMeIQxの投与に関わらず小葉中心性の空胞化が認められ、

グリコーゲンや脂質の蓄積の可能性が考えられた。以上の結果から、本実験条件下で、ラット生体に高脂肪食摂取の影響が生じることが明らかとなった。肝臓におけるレポーター遺伝子突然変異頻度解析を行ったところ、IQ や MeIQx の投与は溶媒投与群と比較して *gpt* MF や *Spi* MF を上昇させた。しかし、それらの変化に高脂肪食摂取の影響は認められなかった。さらに、*gpt* 変異体のスペクトラム解析の結果、IQ あるいは MeIQx 投与により、それぞれに特徴的な遺伝子変異パターンが観察されたが、高脂肪食摂取はその遺伝子パターンを変化させることはなかった。以上の結果より、高脂肪食の摂取はヘテロサイクリックアミンのラット肝臓における *in vivo* 変異原性に影響を与えない可能性が考えられた。本研究の実験期間は 28 日間と比較的短期間の実験であったため、より長期間高脂肪食を摂取させた際の *in vivo* 変異原性に与える影響も検討する必要があると考えられた。

3. 食品中の残留農薬の複合暴露影響に関する研究 (原田)

3-1-1. 薬物代謝酵素

パラチオンやクロルピリホスなどの有機リン系殺虫剤の暴露によって活性化される薬物代謝酵素のうち、CYP1A、CYP3A、CYP2C 活性について肝ミクロソームを用いて検討した。有機リン系農薬は P450 でオクソン体に分解された後、有機リン酸塩を加水分解する Paraoxonase 1 (PON1) で代謝される。PON1 活性と有機リン剤やカーバメート剤の暴露によって活性が抑制されるコリンエステラーゼ (ChE) は、発育に伴い発現量が変化することが知られている。本試験では、血清

ChE 活性は若齢期で最も低く、成熟期、妊娠後期、妊娠中期の順に高かった。若齢期における ChE 活性の低い値は、この時期では代謝酵素合成率が低いためと推察する。一方、妊娠期においても高い ChE 活性を示し、成熟期との間に統計学的有意差は認められなかった。さらに、肝臓における PON1 活性については、妊娠後期で最も低く、成熟期で最も高かった。また成熟期と妊娠中期では統計学的有意差は認められなかった。本試験では CYP1A 及び 3A 活性の妊娠中期と後期の有意な低下と、PON1 活性の妊娠後期における有意な低下を認める一方、CYP2C 及び ChE 活性は妊娠中期及び後期では明らかな低下は認められなかった。しかし、これらの結果は、薬物代謝酵素活性が加齢や妊娠によって変化することを示唆している。

3-1-2. 酸化ストレス及び除去因子

身体的・精神的ストレスによって分泌される Corticosterone (CORT) 及び抗酸化因子であるグルタチオン量を血清または肝臓を用いて測定した。いずれも加齢や発現する組織によって変化する。本試験における血清 CORT は妊娠中期で最も高い値を示し、妊娠後期、成熟期、若齢期の順に低い値を示した。肝臓の GSH は各測定時点で高い値を示すが、酸化 GSH は若齢期で最も低い値を示した。これは血清 CORT と同様にストレスに対する感受性が低いためと考えられた。

3-2-1 免疫毒性評価候補農薬の選定

有機塩素剤 (メトキシクロル、 γ -BHC)、有機リン剤 (パラチオン、DDVP) およびピレスロイド剤 (レスメトリン、テトラメトリン) を用い、Jurkat T 細胞に対するアポトーシス誘発能およびマウスの羊赤血球抗原特異的 IgM 抗体産生能を調査した。結果、

各被験物質を暴露した Jurkat T 細胞で Annexin V 陽性細胞数および Caspase 3/7 活性の有意な増加が認められ、リンパ球細胞に各薬剤がリンパ球細胞にアポトーシスを誘発することが示唆された。In vitro 実験で免疫細胞に対するアポトーシス誘発能が示された上記被験物質について、マウスに 7 日間経口経路で暴露し、胸腺重量、羊赤血球抗原に対する IgM 抗体産生能、脾臓中の胚中心陽性 B 細胞数および IL-6 産生量を測定した。結果、全てのパラメーターについて、有機塩素剤および有機リン剤を投与した群では用量依存性の有意な減少が認められた。一方で、ピレスロイド剤投与群では、コントロール群と比較して変化が認められず、in vivo での免疫毒性作用は示唆されなかった。次年度以降の本研究では有機塩素剤および有機リン剤を用いて実験を行うこととする。

3-2-2 マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立

マウスに吸入アレルギー性を持つ TMA を 3 週間経皮感作後に 3 日間吸入惹起するスケジュールを用い、血中、肺胞洗浄液中、肺門リンパ節中に誘導される IgE、サイトカイン、ケモカインおよび免疫担当細胞数を測定する事で、その有用性を確認した。結果、TMA を感作および惹起した群で血中、肺胞洗浄液中、肺門リンパ節中に誘導される IgE、サイトカイン、ケモカイン及び免疫担当細胞数が無処置群あるいは感作のみの実験群と比較して有意に増加し、吸入アレルギーが適切に誘導されていることが示唆された。

4. ヘテロサイクリックアミン類およびベ

ンズイミダゾール類によるヒト AhR の活性化 (出川)

4-1. 癌原性 HCA 類による AhR 活性化と CYP1A 酵素誘導

用いた 9 種の HCA 類はいずれも、ラットの in vivo 肝で CYP1A 酵素誘導能を示すことが報告されている。しかし、ヒト HepG2 細胞を用いた本研究では、Trp-P-1、Trp-P-2、AαC、MeAαC、IQ 及び MeIQx の 6 種の HCA に AhR 活性化能や CYP1A 誘導能が確認されたものの、Glu-P-1、Glu-P-2 及び PhIP には明らかなそれら活性は認められなかった。したがって、これら化合物は、少なくとも HepG2 細胞には存在しない経路で CYP1A 酵素を誘導している可能性が示唆された。ヒト AhR 活性化におけるこれら HCA 類と他の化学物質との複合作用機序の解明なども重要な研究課題になると考える。

4-2. ベンズイミダゾール類による AhR 活性化とその動物種差

用いた 6 種のベンズイミダゾール誘導体のヒト AhR 活性化に対する影響を検討した結果、単独処理時には OME が強い活性を示した。しかし、MC との複合処理時の増強作用は TBZ や CBD で大きく、この作用は単独でのヒト AhR 活性化とは異なる機構で起こることが示唆された。マウス AhR 活性化との比較では、単独処理時には LAN が比較的強い活性を示す一方、他の化合物の作用はヒト AhR に対する作用よりも弱く、応答性に動物種差 (ヒト-マウス細胞株間差) があることが示された。ベンズイミダゾール類による AhR 活性化はヒト細胞に比べてマウス細胞で弱いことが報告されており、本結果もこれを支持するものであった。なお、MC と TBZ、MC と CBD の複合処理時には、

ヒト、マウス両細胞において予測値（複合曝露させた化合物それぞれが持つ AhR 活性化能の積）よりも大きい誘導が観察されたことから、これら化合物による AhR 活性化の増強作用に興味を持たれ、分子レベルでの解析を進めていく必要がある。

5. フェノール性化合物の複合影響（福原）

カテキンは鉄イオンや銅イオン存在下で活性酸素を発生して毒性を発現する機構が報告されている。この場合、カテキンは金属イオンが存在すると一電子移動反応の活性化エネルギーを低下させて容易に酸素を還元し、スーパーオキシドイオンを発生することが考えられる。しかしながら、生体において金属イオン関与の毒性を明らかにする為には、カテキンが直接酸素を還元して活性酸素を発生することの証明が必要である。そこで、カテキンから酸素への電子移動反応について検討したところ、カテキンのジアニオン体は容易に酸素を還元活性化してスーパーオキシドアニオンを発生することが明らかとなった。ジアニオンからの酸素への電子移動反応を経由するスーパーオキシドイオンの発生が確認できたことから、金属イオンを伴う毒性が細胞レベルとともにヒトでも容易に進行する可能性が高いことが予測された。一方、本研究でカテキンによる化学的な酸化反応を検討したところ、一電子酸化剤によってカテキンは容易にキノンへと酸化されることが明らかとなった。この結果は、カテキンは生体内では薬物代謝酵素で容易にキノンに酸化されることを指示するものである。カテキンがキノンへと酸化されると DNA や蛋白質による求核付加を受けることで毒性を発現する

可能性が考えられる。今回、核酸塩基のモデル化合物としてベンジルアミンを反応させたところ、キノン酸化体と容易に付加体を生成した。この結果より、カテキンはキノンへの酸化を経由して生体高分子と付加体を形成して毒性を発現する機構を化学的に明らかにすることができた。以上、カテキンを用いて、比較的安全性が高いフェノール性抗酸化物質のヒトへの影響を化学的な手法で解析した結果、塩基性条件下では直接活性酸素を発生すること、また酸化剤の存在下ではキノン酸化体を形成し、それが生体高分子と付加する可能性が高いことを明らかにできた。今回、塩基性条件下で活性酸素の発生を直接証明できたことは、複合影響として金属イオンを伴う毒性が動物やヒトでも発症する可能性を強く支持するものである。一方、カテキンは抱合反応を受けて排泄されるが、生体の酸化代謝が亢進するとキノン体を生成することが考えられる。キノン構造は非常に不安定であるが、今回、化学的な手法によってカテキンからのキノンの生成と、生体高分子のモデル化合物との付加を確認できたことは、酸化代謝を亢進する因子による複合影響としてキノン酸化体を経由する毒性が発症する可能性が考えられた。

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）

低用量の ES は特異的 DNA 付加体を形成するものの、遺伝子突然変異を誘発しないことが示された。KBrO₃、NFT 及び Alz はいずれもラット腎皮質において重度な酸化的 DNA 損傷を引き起こすものの、遺伝子突然

変異の有無や生じる変異スペクトラムは異なることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、遺伝子突然変異を誘発しない低用量の食品中遺伝毒性発がん物質とその薬物動態に係る酵素群や細胞内微小環境に影響与える食品中化学物質の複合影響を明らかにするとともに、酸化ストレスを生じる食品中化学物質の複合影響の詳細について検討する。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響（西川）

高脂肪食摂取は IQ および MeIQx のラット肝臓における *in vivo* 変異原性に影響を与えない可能性が示された。本研究は食品中発がん物質と高脂肪食摂取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考ええる。

3. 食品中の残留農薬の複合暴露影響に関する研究（原田）

妊娠ラットでは、有機リン系農薬の代謝に関与する PON1、薬物代謝酵素の CYP1A 及び 3A は低下し、ストレス関連因子の CORT は逆に高値を示した。このことから、妊娠期における著しい生理学的変化は薬物代謝酵素やストレス因子の活性あるいは分泌量に影響を及ぼすものと考えられた。さらに、こうした変化は、生体の薬物感受性を高め、毒性発現の増強に繋がるものと推察した。今後の当該研究遂行に向け、①免疫毒性評価候補農薬の選定、②マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立を目的に実験を行った。その結果、①免疫毒性評価候補農薬の選定実験では、全ての剤でアポトーシス誘発能が増大し、抗原特異的 IgM 抗体産生能が減少し、免疫毒性影響が強く示唆され

た。②マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立では、TMA を感作および惹起した群で血中、肺胞洗浄液中、肺門リンパ節中に誘導される IgE、サイトカイン、ケモカイン及び免疫担当細胞数が無処置群あるいは感作のみの実施群と比較して有意に増加し、吸入アレルギーが適切に誘導されていることが示唆された。

4. ヘテロサイクリックアミン類およびベンズイミダゾール類によるヒト AhR の活性化（出川）

本研究では食品中化学物質の AhR 活性化における複合影響の可能性について検討し、①多くの HCA 類はヒト AhR を活性化能を有すること、②BEZ を除くベンズイミダゾール誘導体は単独でヒトおよびマウスのいずれの AhR に対しても活性化能を有すること、③BEZ を除くベンズイミダゾール誘導体には MC との複合曝露で増強効果を示すことなどを明らかとした。

5. フェノール性化合物の複合影響（福原）

カテキンを用いて、比較的安全性が高いフェノール性抗酸化物質のヒトへの影響を化学的な手法で解析した。その結果、カテキンは塩基性条件下では酸素をスーパーオキシドアニオンに還元した。また、酸化剤の存在下ではキノン体へと酸化されて生体高分子のモデル化合物と付加体を形成した。今回、塩基性条件下で活性酸素の発生を直接証明できたことは、複合影響として金属イオンを伴う毒性が動物やヒトでも発症する可能性を強く支持する。一方、キノン構造は非常に不安定であるが、今回、化学的な手法によってカテキンからのキノンの生