

Table 10 Final body and liver weight

Item	Control	Alz (ppm)			NFT (ppm)		
		20	100	500	100	500	2500
No. of animals	5	4	5	5	5	5	5
Body weight (g)	355.1 ± 23.7	349.8 ± 34.8	359.9 ± 34.1	347.8 ± 19.8	337.1 ± 19.8	353.8 ± 22.2	233.7 ± 29.3 ^{**}
Absolute (g)							
Liver	11.53 ± 0.89	10.85 ± 1.46	11.18 ± 1.28	10.49 ± 1.28	10.52 ± 0.47	10.85 ± 0.80	6.98 ± 1.16 ^{**}
Kidney	2.08 ± 0.12	2.00 ± 0.17	2.20 ± 0.24	2.48 ± 0.07 ^{**}	2.07 ± 0.09	2.14 ± 0.14	1.86 ± 0.28 [*]
Relative (g%)							
Liver	3.26 ± 0.10	3.10 ± 0.11	3.10 ± 0.14	3.01 ± 0.21	3.12 ± 0.12	3.07 ± 0.21	2.98 ± 0.12
Kidney	0.59 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.61 ± 0.05	0.71 ± 0.05 ^{**}	0.62 ± 0.04	0.60 ± 0.03	0.79 ± 0.02 ^{**}

Table 11 *gpt* MFs in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with NFT for 13 weeks.

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	1	10.3	7	0.68	1.04 ± 0.62
	2	4.8	10	2.08	
	3	4.0	4	1.01	
	4	8.3	4	0.48	
	5	6.2	6	0.97	
NFT 100 ppm	6	8.9	5	0.56	0.62 ± 0.31
	7	5.5	2	0.36	
	8	15.8	12	0.76	
	9	9.2	10	1.08	
	10	8.8	3	0.34	
NFT 500 ppm	11	5.0	7	1.39	0.80 ± 0.40
	12	6.6	5	0.76	
	13	6.6	2	0.30	
	14	7.6	7	0.92	
	15	9.3	6	0.64	
NFT 2500 ppm	16	4.4	7	1.60	2.13 ± 0.46 *
	17	4.8	12	2.49	
	18	3.9	7	1.79	
	19	3.5	5	1.44	
	20	4.2	14	3.35	

*: $p < 0.05$ vs. Control group

Table 12 *gpt* MFs in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with Alz for 13 weeks.

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	1	7.4	5	0.68	0.65 ± 0.15
	2	9.3	8	0.86	
	3	11.0	6	0.55	
	4	6.3	3	0.47	
	5	8.8	6	0.68	
Alz 20 ppm	6	9.6	5	0.75	0.69 ± 0.15
	8	7.6	6	0.79	
	9	6.6	4	0.60	
	10	7.1	6	0.85	
Alz 100 ppm	11	10.6	8	0.76	0.84 ± 0.11
	12	10.4	8	0.77	
	13	12.9	13	1.01	
	14	8.9	7	0.79	
	15	7.8	7	0.90	
Alz 500 ppm	16	8.2	6	0.73	0.66 ± 0.34
	17	12.3	5	0.41	
	18	11.8	3	0.25	
	19	7.9	9	1.14	
	20	11.9	9	0.75	

Table 13 Spi MFs in the renal cortex of F344 *gpt* delta rats treated with NFT for 13 weeks.

Treatment	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA ($\times 10^5$)	Plaques within WL95 (P2)	MF ($\times 10^{-5}$)	Mean \pm SD
Control	1	15.1	24	1.59	1.77 \pm 0.19
	2	11.0	19	1.73	
	3	11.6	19	1.64	
	4	12.7	26	2.05	
	5	11.3	21	1.87	
NFT 100 ppm	6	12.7	21	1.65	1.85 \pm 0.50
	7	8.6	22	2.57	
	8	16.1	25	1.55	
	9	13.9	71	1.93	
	10	15.1	23	1.52	
NFT 500 ppm	11	8.3	16	1.93	1.64 \pm 0.39
	12	9.5	15	1.57	
	13	5.1	11	2.14	
	14	11.6	14	1.21	
	15	12.5	17	1.36	
NFT 2500 ppm	16	3.6	8	2.22	1.55 \pm 0.50
	17	4.1	5	1.23	
	18	6.0	6	1.00	
	19	7.0	7	1.42	
	20	3.7	10	1.90	

Table 14 Spi MFs in the renal cortex of F344 *gpt* delta rats treated with Alz for 13 weeks.

Treatment	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA ($\times 10^5$)	Plaques within WL95 (P2)	Mutant frequency ($\times 10^{-5}$)	Mean \pm SD
Control	1	11.8	6	0.51	0.55 ± 0.18
	2	13.4	10	0.75	
	3	14.5	4	0.28	
	4	9.5	5	0.52	
	5	8.9	6	0.67	
Alz 20 ppm	6	10.6	11	1.04	0.77 ± 0.29
	8	9.1	9	0.99	
	9	11.7	5	0.43	
	10	11.3	7	0.62	
Alz 100 ppm	11	13.3	5	0.38	0.49 ± 0.21
	12	10.7	3	0.28	
	13	16.8	7	0.42	
	14	9.6	8	0.83	
	15	9.0	5	0.56	
Alz 500 ppm	16	13.2	7	0.53	0.48 ± 0.14
	17	15.5	4	0.26	
	18	9.5	6	0.63	
	19	9.8	5	0.51	
	20	19.0	9	0.47	

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題： 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響

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
研究協力者： 高須 伸二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

疫学的研究から、高脂肪摂取は発がんのリスクファクターであることが示唆されている。また、実験動物を用いた研究においても、高脂肪摂取は齧歯類の肝臓に発がんプロモーション作用を有することが報告されている。しかし、そのメカニズムの詳細は未だ不明な点が多く、さらに発がんイニシエーション期における役割は明らかになっていない。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 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。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。投与終了後、肝臓の *gpt* および *Sp1* 遺伝子変異体頻度 (MF) 解析を行った。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。さらに、*gpt* 変異体のスペクトラム解析を行ったところ、IQ 投与により生じた G:C-T:A transversion 変異および一塩基欠失変異、MeIQx 投与により生じた G:C-T:A ならびに A:T-T:A transversion 変異および一塩基欠失変異の発現頻度の有意な上昇に対して、高脂肪食摂取による影響は認められなかった。また、IQ あるいは MeIQx 投与により *Sp1* 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。

A. 研究目的

疫学的研究から、がんは食生活と深く関連することが示唆されている。なかでも脂肪の過剰摂取は発がんのリスクファクターであることが示唆されており、動物モデルを用いた研究からも高脂肪摂取は齧歯類の発がんを促進させることが報告されている。本研究では、このような疫学的研究や動物

実験の知見に着目し、実際の日常生活の中で起こりうる一部栄養素の過剰摂取状態を想定した食品中発がん物質の生体影響を評価することを目的としている。

高脂肪摂取は動物モデルを用いた検討から、肝臓や大腸において発がんプロモーション作用を有することが報告されているが、その発がん促進メカニズムの詳細は未だ不明な点が多く、特に発がんイニシエーション

期における役割は明らかになっていない。また、高脂肪食摂取に続発する肥満状態は、げっ歯類の肝臓においてシトクロム P450 などの薬物代謝酵素に影響を与え、また、薬物代謝第二相酵素ならびに抗酸化酵素の発現調節に重要な転写因子である NRF2 の発現を変動させることが報告されている。しかし、実際に高脂肪食の摂取が遺伝毒性発がん物質の *in vivo* 変異原性にどのような影響を与えるかは検討されていない。

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。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

ラットの最終体重および肝重量の結果を Table 1 に示す。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を Table 2 に示す。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。

gpt assay の結果を Table 3 に、*gpt* 変異体スペクトラム解析の結果を Table 4 に示す。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

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。

今回認められた *gpt* 変異体のスペクトラム解析を行ったところ、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。

Spi⁻ assay の結果を Table 5 に示す。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。

D. 考察

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。

このような実験条件下において、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

投与群に比較して *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。

IQ や MeIQx はタンパク質やアミノ酸を多く含む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 1 種であり、ラット肝臓において変異原性や発がん性を示すことが知られている遺伝毒性肝発がん物質である。今回、IQ や MeIQx の投与によりラット肝臓において *gpt* MF や *Spi*⁻ MF が上昇し、本実験条件下において IQ や MeIQx の *in vivo* 変異原性が再確認されたが、高脂肪食の摂取は IQ や MeIQx 投与による *in vivo* 変異原性の程度に影響を与えず、さらに遺伝子変異スペクトラムも変化させなかった。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。

一方、高脂肪食の摂取や肥満などの病態が肝臓における代謝酵素の発現に与える影響は、動物種や肥満モデル動物間において差異があることが報告されている。本実験条件下における高脂肪食摂取は、一定の肥満状態を誘発していたと考えられるものの、今回の高脂肪食摂取が代謝酵素発現に与える影響を精査する必要があると考えられた。また、マウスにおいて高脂肪食の摂取は肝臓における NRF2 発現を変動させることが報告されているが、その作用は高脂肪食の摂取期間により異なること報告されている。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。

E. 結論

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ている。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

		Treatment					
		IQ	IQ + HFD	MeIQx	MeIQx + HFD	STD	HFD
No. of animals		5	5	5	5	5	5
Final body weight (g)		218.9 ± 16.2	239.6 ± 14.8	219.0 ± 15.3	228.0 ± 5.3	218.6 ± 15.8	232.1 ± 7.8
Liver weight							
Absolute (g)		8.08 ± 0.67	9.09 ± 0.72	7.74 ± 0.71	8.60 ± 0.40 *	7.41 ± 0.72	8.54 ± 0.34 *
Relative (g/100g BW)		3.69 ± 0.04	3.79 ± 0.11	3.53 ± 0.08	3.77 ± 0.16 *	3.39 ± 0.15	3.68 ± 0.21 *

STD: Standard diet, HFD: High fat diet.

* $p < 0.05$ vs. relevant groups of rats fed STD

Table 2. Serum biochemistry for F344 *gpt* delta rats treated with IQ or MeIQx and STD or HFD

		Treatment																	
		IQ			IQ + HFD			MeIQx			MeIQx + HFD			STD			HFD		
T-Chol	(mg/dL)	58	±	3	61	±	4	57	±	3	58	±	11	56	±	1	61	±	3 *
Glu	(mg/dL)	196	±	20	232	±	25 *	190	±	12	205	±	5 *	211	±	35	216	±	16
TG	(mg/dL)	136	±	18	273	±	158	78	±	20	212	±	112 *	96	±	42	162	±	3
AST	(IU/L)	72	±	4 ###	66	±	7	68	±	3 #	64	±	6	62	±	6	56	±	3
ALT	(IU/L)	38	±	4 #	42	±	7	36	±	3	38	±	8	31	±	4	38	±	5 *
ALP	(IU/L)	1414	±	50	1501	±	141	1146	±	84	1439	±	140 **	1186	±	69	1526	±	351
γ-GTP	(IU/L)	ND			ND			ND			ND			ND			ND		

ND, Not detected.

#, ##, $p < 0.05, 0.01$ vs. STD group; *, **, $p < 0.05, 0.01$ vs. relevant groups of rats fed STD

Table 3. *gpt* MFs in the liver of F344 *gpt* delta rats treated with IQ or MeIQx and STD or HFD

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.		
IQ	1	6.2	9	1.46	1.81	±	0.60 **
	2	6.7	13	1.94			
	3	6.5	7	1.08			
	4	8.4	16	1.90			
	5	9.7	26	2.69			
IQ + HFD	6	9.2	13	1.41	1.59	±	0.41 ##
	7	ND	-	-			
	8	10.8	13	1.21			
	9	8.4	18	2.15			
	10	9.3	15	1.61			
MeIQx	11	7.7	19	2.45	2.84	±	0.35 **
	12	8.3	22	2.66			
	13	6.6	20	3.04			
	14	ND	-	-			
	15	9.6	31	3.22			
MeIQx + HFD	16	10.3	26	2.53	3.02	±	0.99 ##
	17	7.0	31	4.42			
	18	9.1	20	2.19			
	19	8.9	20	2.26			
	20	8.1	30	3.72			
STD	21	10.8	1	0.09	0.34	±	0.19
	22	9.0	2	0.22			
	23	8.2	3	0.36			
	24	10.3	6	0.58			
	25	6.7	3	0.45			
HFD	26	9.3	6	0.65	0.44	±	0.14
	27	3.5	1	0.29			
	28	8.1	4	0.50			
	29	7.6	3	0.39			
	30	8.4	3	0.36			

** $p < 0.01$ vs. STD group; ## $p < 0.01$ vs. HFD group

Table 4. Mutation spectra of *gpt* mutant colonies in the liver of F344 *gpt* delta rats treated with IQ or MeIQx and STD or HFD

	IQ		IQ + HFD		MeIQx		MeIQx + HFD		STD		HFD	
	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)
Base substitution												
Transversions												
G:C-T:A	32 (45.1)	0.84 ± 0.21 **	26 (44.1)	0.71 ± 0.36 #	31 (33.7)	0.95 ± 0.13 **	44 (34.6)	1.05 ± 0.42 ##	5 (33.3)	0.12 ± 0.13	6 (35.3)	0.17 ± 0.16
G:C-C:G	3 (4.2)	0.08 ± 0.08	2 (3.4)	0.06 ± 0.07	1 (1.1)	0.03 ± 0.05	5 (3.9)	0.13 ± 0.13	2 (13.3)	0.04 ± 0.06	0	0
A:T-T:A	4 (5.6)	0.10 ± 0.10	0	0	3 (3.3)	0.10 ± 0.07 *	6 (4.7)	0.14 ± 0.05 ##	0	0	0	0
A:T-C:G	0	0	2 (3.4)	0.05 ± 0.11	3 (3.3)	0.09 ± 0.11	2 (1.6)	0.05 ± 0.07	0	0	0	0
Transitions												
G:C-A:T	5 (7.0)	0.12 ± 0.13	3 (5.1)	0.08 ± 0.09	6 (6.5)	0.18 ± 0.06 †	7 (5.5)	0.17 ± 0.12	3 (20.0)	0.07 ± 0.06	8 (47.1)	0.20 ± 0.14
A:T-G:C	0	0	2 (3.4)	0.05 ± 0.06	1 (1.1)	0.03 ± 0.05	4 (3.1)	0.10 ± 0.12	1 (6.7)	0.03 ± 0.07	1 (5.9)	0.02 ± 0.05
Deletions												
Single bp	21 (29.6)	0.53 ± 0.22 **	20 (33.9)	0.54 ± 0.17 ##	39 (42.4)	1.22 ± 0.22 **	52 (40.9)	1.22 ± 0.26 ##	1 (6.7)	0.02 ± 0.04	1 (5.9)	0.03 ± 0.06
Over 2 bp	4 (5.6)	0.09 ± 0.14	2 (3.4)	0.05 ± 0.09	5 (5.4)	0.16 ± 0.06 **	3 (2.4)	0.06 ± 0.09	0	0	0	0
Insertions	1 (1.4)	0.02 ± 0.05	1 (1.7)	0.03 ± 0.05	0	0	0	0	1 (6.7)	0.02 ± 0.04	0	0
Complexes	1 (1.4)	0.02 ± 0.05	1 (1.7)	0.03 ± 0.05	3 (3.3)	0.09 ± 0.11	4 (3.1)	0.10 ± 0.14	2 (13.3)	0.05 ± 0.06	1 (5.9)	0.02 ± 0.05
Total	71	1.81 ± 0.60	59	1.59 ± 0.41	92	2.84 ± 0.35	127	3.02 ± 0.99	15	0.34 ± 0.19	17	0.44 ± 0.14

*, ** *p*<0.05, 0.01 vs STD group; #, ## *p*<0.05, 0.01 vs HFD group

Table 5. Spi^r MFs in the liver of F344 gpt delta rats treated with IQ or MeIQx and STD or HFD

Treatment	Animal No.	Plaues within XL-1 Blue MRA (x10 ⁵)	Paque within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.		
IQ	1	9.1	6	0.66	0.56	±	0.20 **
	2	18.3	11	0.60			
	3	10.5	8	0.76			
	4	13.5	3	0.22			
	5	16.1	9	0.56			
IQ + HFD	6	13.3	8	0.60	0.69	±	0.10 ##
	7	ND	-	-			
	8	12.0	9	0.75			
	9	16.2	10	0.62			
	10	11.2	9	0.81			
MeIQx	11	8.91	17	1.91	1.06	±	0.58 **
	12	13.8	12	0.87			
	13	18.3	12	0.66			
	14	ND	-	-			
	15	8.9	7	0.79			
MeIQx + HFD	16	17.1	14	0.82	0.92	±	0.40 #
	17	16.4	18	1.10			
	18	11.3	17	1.51			
	19	19.9	13	0.65			
	20	13.8	7	0.51			
STD	21	21.3	4	0.19	0.17	±	0.07
	22	11.3	3	0.26			
	23	9.0	1	0.11			
	24	14.8	2	0.14			
	25	11.6	0	0.00 ^a			
HFD	26	11.3	14	1.24 ^b	0.30	±	0.11
	27	2.3	1	0.43			
	28	14.0	3	0.21			
	29	14.6	3	0.21			
	30	14.7	5	0.34			

^a No mutant colonies were detected on the plate and these data were excluded from the calculation of MF.

^b The data were excluded by Grubbs test at $p < 0.02$.

** $p < 0.01$ vs. STD group; #, ## $p < 0.05$, 0.01 vs. HFD group

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 年度分担研究報告書

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題：食品中残留農薬の複合暴露影響に関する研究

1. 動物のライフステージによる神経毒性の感受性の差異

研究分担者	原田孝則	(一財) 残留農薬研究所	毒性部
研究協力者	元村淳子	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	首藤康文	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	藤江秀彰	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	林 宏一	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	小松 豊	(一財) 残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	大塚亮一	(一財) 残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室
	小嶋五百合	(一財) 残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	牧野絵美	(一財) 残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	山口 悟	(一財) 残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室

研究要旨

我々は、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。その原因として、有機リン剤の標的酵素、薬物代謝酵素、ストレス因子及び除去因子のライフステージによる変動が挙げられ、その変動により毒性発現に差が生じるものと推察した。そこで、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、ChE は若齢期で低く、成熟期及び妊娠期で高値を示した。CYP1A 及び 3A は妊娠後期で有意に低下し、CYP2C は若齢期で低く、成熟期及び妊娠中期及び後期で有意に高い値を示した。PON1 は妊娠後期で有意に低下した。CORT は妊娠中期で最も高い値を示し、若齢期では低い値を示した。GSH は若齢期で僅かに低い値を示した。

以上の結果から、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。

A. 研究目的

食品中に残留する農薬は個々のレベルでは微量で安全性に問題はないが、類似の作用機序を有する複数の農薬に複合的に暴露された場合での影響が懸念されている。この問題を解決するため、米国 EPA や欧州食品安全機関では、ある特定の農薬群を対象に累積リスク評価法を導入し検討が進められている。この点を考慮し、これまでに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て、米国 EPA における累積リスク評価法の基盤農薬のひとつであるメタミドホスと他の有機リン剤を組み合わせ母動物及び成熟期の雌ラットに対し複合投与し、異なる時期の暴露が毒性発現に影響を及ぼすか否かを調査した。成熟期及び妊娠期における毒性は、単剤よりも複合投与された成熟期の雌ラットでは死亡を含む重篤な神経毒性症状を示さないのに対し、妊娠期の暴露は死亡を含む重篤な神経毒性症状を示した。毒性発現に影響する因子として種差、人種差(種差/系統差)、性差、年齢、遺伝的要因等がある。例えば、2-アセチルアミノフルオレンは多くの動物種で肝がんを誘発するが、発がんにつながる代謝系を欠損しているモルモットでは、発現を示さない¹⁾、また新生児や乳幼児では代謝能が未発達であるのに対し、高齢者では代謝能が減衰することにより影響は著しい²⁾ など、様々な要因によって毒性学的影響は異なる。また妊娠期あるいは哺育期などで、薬物代謝酵素の発現レベルが異なることも知られている^{2), 3)}。

平成 25 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。

B. 研究方法

1. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場(静岡県)で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット [BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)] 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。入荷後、4 週齢の動物を 3 日間、8 週齢の動物は 8 日間、それぞれ試験環境に馴化させた。尚、GD10 の雌動物は半数を 10 日間、残りの半数を 4 日間、それぞれ試験期間に馴化させた。馴化期間中、生死の確認を含む一般状態の観察を毎日実施した。動物は温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間(オールフレッシュエアー方式)、照明時間 12 時間/日(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)に設定された動物飼育室で飼育した。

基礎飼料には保証飼料 MF 粉末(オリエンタル酵母工業株式会社)を用い、ステンレス鋼製粉末給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、市上水(常総市)をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。

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)。

2. 試験群

これまでに我々は若齢期、成熟期および妊娠期における雌動物のパラチオンおよび

メタミドホスの複合毒性影響について検討した。その結果、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。

3. 検査項目

3.1. 若齢期、成熟期、妊娠期の雌動物の観察

全動物について馴化期間中、一般状態を含む瀕死状態及び死亡を 1 日 1 回観察した。

3.2. 体重

若齢期及び成熟期の雌ラットでは、入荷時及び剖検時に測定を実施した。4 日間馴致の 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。

3.3. 剖検及び組織採取

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 [エスカイン、マイラン製薬 (株)] 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。血液は分離剤入り試験管 (セパラビット S; 積水工業) に移し、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。

3.4. 測定項目

3.4.1. 薬物代謝酵素活性および関連因子

3.4.1.1. コリンエステラーゼ (ChE) 活性の測定

剖検時に採取した血清を用いて ChE 活性を測定した。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。

3.4.1.2. Paraoxonase 1 測定

各剖検日に採取した肝臓を用いて、有機リン酸塩を加水分解する酵素として知られる Paraoxonase 1 (PON1) を測定した。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。

3.4.1.3. Cytochrome P450

PON1 及び Carboxylesterases (CESs) と同様、農薬の代謝に関連する Cytochrome P450 について測定した。測定には P450 Glo assay kit [luciferin type; CEE, BE, H (Promega Corporation, USA)] を用いた。

3.4.2. 酸化ストレス及び除去因子

3.4.2.1. Corticosterone 測定

ストレス負荷時に分泌量が増加する糖質コルチコイドの一種である Corticosterone (CORT) について血清を用いて測定した。測定は DetectX Corticosterone Enzyme

immunoassay kit (Arbor Assays, USA) を用いた。

3.4.2.2. Glutathione 測定

剖検時に採取した肝臓を用いて、抗酸化物質のグルタチオンを測定した。測定には、HT Glutathione Assay Kit (TREVIGEN®, Trevigen, Inc., USA) を用いた。

4. 有意差検定

各検査項目について、若齢期と成熟期、妊娠中期及び後期、成熟期と妊娠中期及び後期、妊娠中期と後期で統計学的有意差を危険率 5 及び 1% レベルで解析した。

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。

C. 研究結果

1. 死亡動物数

試験期間中、死亡は認められなかった。

2. 一般状態

試験期間中、全生存動物に異常は認められなかった。

3. 体重

試験期間中、全生存動物における体重は順調に増加した。

本文表 1

[若齢期]

入荷時	剖検時
66±2	81±3

(mean±SD)

[成熟期]

入荷時	剖検時
175±6	198±11

(mean±SD)

[妊娠中期]

入荷時	剖検時
230±16	255±15

(mean±SD)

[妊娠後期]

GD17	剖検時
259±23	295±26

(mean±SD)

4. 剖検

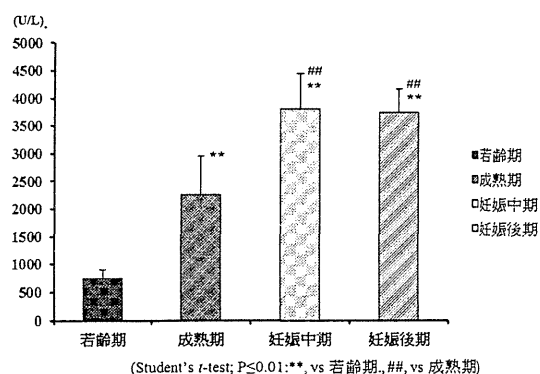
剖検時、全生存動物における肉眼的異常は認められなかった。

5. 薬物代謝酵素活性及び関連因子

5.1. 血清 ChE 活性

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 (本文図 1)。

本文図 1 血清 ChE 活性

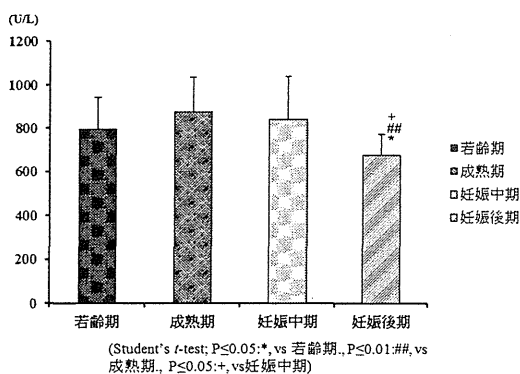


5.2. Paraoxonase 1 (PON1) 活性

有機リン酸塩を加水分解する酵素である PON1 の活性について、肝臓を用いて測定した。

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 (本文図 2)。

本文図 2 肝 PON1 活性

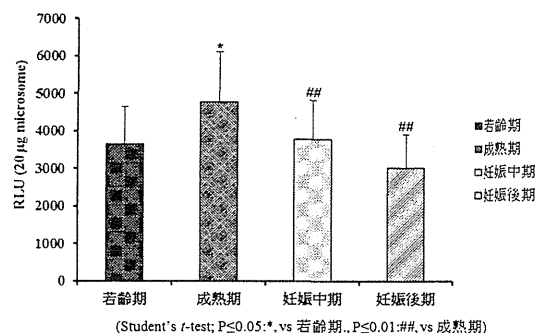


5.3. Cytochrome P450

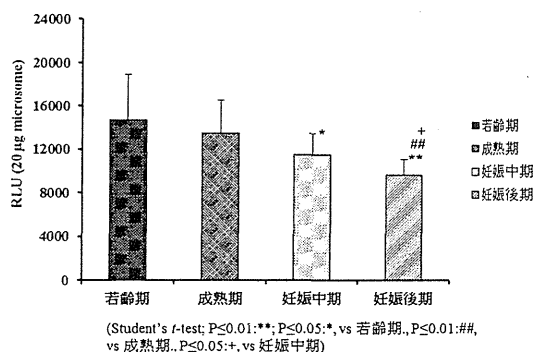
一般的に、有機リン系殺虫剤は CYP1A2、2B6、2C19 及び 3A4 によって活性化され、パラチオンは CYP1A2、2B6、2C9、3A4、3A5 及び 3A7 で活性化されることがヒトの肝臓を用いた実験で報告⁴⁾されている。そこで、本実験ではラットの肝ミクロソームより、CYP1A、2C 及び 3A 活性を測定した。

CYP1A は成熟期で高く、妊娠後期では最も低い値を示した (本文図 3-1)。CYP3A は妊娠中期及び後期で低い活性値を示した (本文図 3-2)。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 (本文図 3-3)。

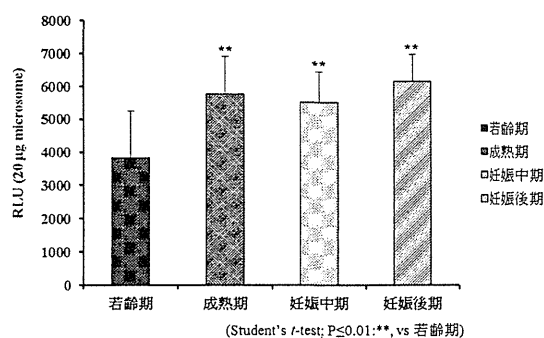
本文図 3-1 肝 CYP1A



本文図 3-2 肝 CYP3A



本文図 3-3 肝 CYP2C

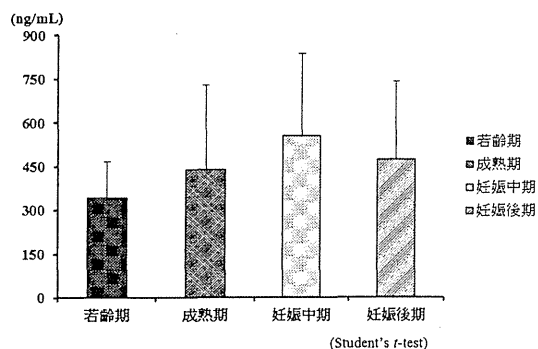


6. 酸化ストレス及び除去因子

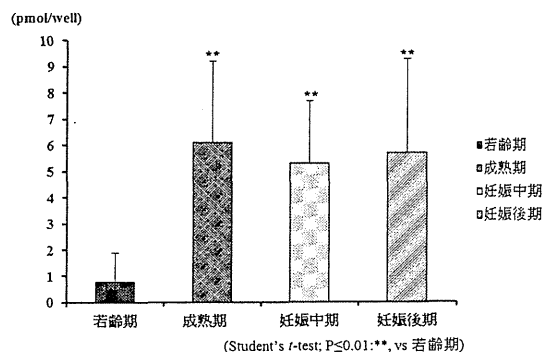
6.1. 血清 Corticosterone 測定

ストレス負荷時に分泌される Corticosterone (CORT) を測定した。本試験では、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。

本文図 4 血中 CORT



本文図 5-1 肝酸化型グルタチオン

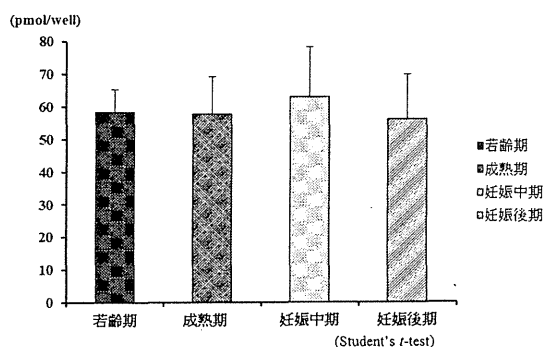


6.2. Glutathione 測定

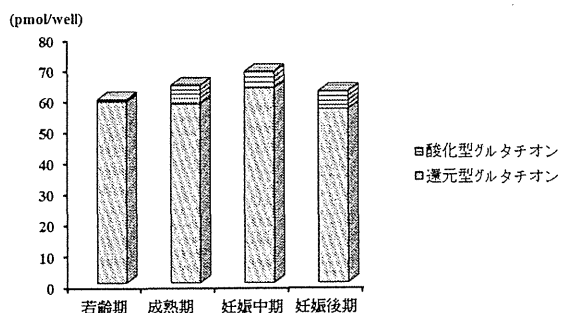
抗酸化作用あるいは薬物代謝に関与するトリペプチドであるグルタチオンは、還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンに分類される。一般的にグルタチオンとは総グルタチオンの 98%を占める還元型を指し、酸化型を還元型に変換する酵素である。酸化型は二分子の還元型グルタチオンがジスルフィド結合で結合して存在する。本試験では、総グルタチオン及び酸化型グルタチオンを測定し、この 2 つの差から還元型グルタチオンを算出した。

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 (本文図 5-1)。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。(本文図 5-2、3)。

本文図 5-2 肝還元型グルタチオン



本文図 5-3 肝総グルタチオン



D. 考察

1. 薬物代謝酵素

農薬など化学物質は、生体内に取り込まれると、主に肝臓で代謝された後、排泄される。代謝反応は第 I 相反応の後 (加水分解、酸化及び還元)、第 II 相 (抱合) 反応が起こる。多くの化学物質の代謝には様々な酵素が関与