

した。その後、上清を回収し、生じた蛍光代謝物による蛍光を測定した。

また、酵素阻害試験を行う場合には、MCを24時間前処理することでHepG2細胞中のCYP1A1酵素を十分に誘導したのち、これをERおよびHCA類を含んだ無血清培地にて30分間培養し、生じる蛍光を測定した。

いずれの場合にも、反応後の細胞を1N NaOHで溶解し、溶解液中のタンパク濃度を測定、タンパクあたりの酵素活性を算出した。

### C. 研究結果

#### 1) 癌原性 HCA 類による AhR 活性化と CYP1A1 酵素誘導

HepG2-A10細胞に、各々のHCA(10 μM)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。

次に、HepG2細胞またはHepG2-A10細胞

に種々濃度(0-100 μM)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CYP1A1酵素誘導能をそれぞれ測定した。

その結果、①Glu-P-1、Glu-P-2及びPhIPには、顕著なAhR活性化能やCYP1A1誘導能は観察されなかった。②Trp-P-1、Trp-P-2及びAαCには、AhR依存的なCYP1A1酵素誘導能が認められた。また、③MeAαC、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。これらの結果より、MeAαC、IQおよびMeIQxはAhR活性化およびCYP1A1酵素発現誘導能を持つが、これら化合物にはCYP1A1酵素活性阻害能も有することが示唆された。

そこで、EROD活性に対するHCA類の阻害効果を検討したところ、MeAαC、IQ及びMeIQxには強力なEROD阻害活性があることが明らかになった。(表1)

表1 HCA類によるAhR活性化能ならびにCYP1A1酵素誘導能

Type	Chemical	Toxicity IC <sub>50</sub> (μM)	AhR activation	CYP1A1 level	CYP1A2 level	Enzyme (EROD) activity	Enzyme Inhibition IC <sub>50</sub> (μM)
γ-carbolines	Trp-P-1	10-30	+++	+++	+++	+++	22.9
	Trp-P-2	10-30	++	+++	+++	+++	20.1
δ-carbolines	Glu-P-1	> 100	+	+	±	±	> 100
	Glu-P-2	> 100	+	±	+	±	> 100
δ-carbolines	AαC	> 100	+++	+++	+++	++	10.1
	MeAαC	> 100	+++	+++	+++	±	< 0.1
Aminoimidazo- -azaarenes	IQ	> 100	++	++	++	-	1.1
	MeIQx	> 100	++	++	±	-	0.31
	PhIP	> 100	+	+	+	±	26.0

+++ : more than 50% activation at max dose (vs 1 μM MC), ++ : 20-50% activation, + : less than 20% activation, ± : not significant, - : significantly suppressed

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  $\mu\text{M}$ ) を 24 時間処理し、各化合物の AhR 活性化能を比較した。その結果、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 >> LAN > CBD > TBZ、BML の順であった (表 2)。次に、ベンズイミダゾール類 (各 100  $\mu\text{M}$ ) と MC (0.1  $\mu\text{M}$ ) 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 (表 2)。ベンズイミダゾール類 (各 100  $\mu\text{M}$ ) と MC (0.1  $\mu\text{M}$ ) 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。

D. 考察

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、A $\alpha$ C、MeA $\alpha$ C、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。

表2 ベンズイミダゾール類によるヒトおよびマウスAhR活性化

Chemical	Human AhR activation (HepG2-XL24)			Mouse AhR activation (Hepa-XL11)		
	Basal effects (単独)	MC Combination (複合)	予測値 との比較	Basal effects (単独)	MC Combination (複合)	予測値 との比較
Benzimidazole (BEZ)	±	±	近似	±	±	近似
Thiabendazole (TBZ)	+	+++	大きい	+	++	大きい
Carbendazim (CBD)	+	+++	大きい	±	++	大きい
Benomyl (BML)	+	++	大きい	±	±	小さい
Omeprazole (OME)	++	++	小さい	+	++	大きい
Lansoprazole (LAN)	+	+	小さい	++	++	近似

## 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 (表 2)、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。

## E. 結論

以上、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。

これら結果は、食品中化学物質の複合曝露によるリスク評価を考える上で重要であり、その機構解明が重要と考える。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 村木俊文、関本征史、出川雅邦：芳香族炭化水素受容体 (AhR) 活性化におけるヒト-マウス間での種差. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜)、2013 年 10 月 5 日
- 2) 田崎愛佳、村木俊文、長澤聖子、根本清光、関本征史、出川雅邦：合成着色料による芳香族炭化水素受容体活性化とその種差. 第 134 回日本薬学会年会 (熊本)、2014 年 3 月 30 日

## 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

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： フェノール性化合物の複合影響

研究分担者： 福原 潔 昭和大学薬学部

研究要旨

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、キノン酸化体を経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

近年、多くの天然由来の成分が生活習慣病の発症や進行に対して予防効果を示すことが科学的に証明され、それに伴い健康維持や生活習慣病の予防目的として、これらの成分を高濃度に含む機能性食品や天然からの抽出物の積極的な摂取が話題となっている。代表的な機能性物質にはカテキンやケルセチン、レスベラトロール等のフェノール構造を有する抗酸化物質が多く、その多くが脂質や糖の吸収を阻害したり、生活習慣病の原因となる酸化ストレスに対して抑制作用を示す。フェノール性抗酸化物質は比較的安全性が高いと考えられ、例えば

カテキンは溶血性貧血による急性腎不全の症例が報告されたのみであった。しかしながら、最近、これらの抗酸化成分を含む緑茶抽出物の摂取と肝毒性との関連が至適されるようになった。

2007年1月、カナダ保健省は緑茶抽出物を含む成分を体重減少目的で6カプセル（カテキン600mg相当）/dayを半年間摂取した42歳の女性が劇症肝炎になり、肝移植を受けた事例を発表した。その後、文献上でもカテキンによる肝機能障害が13例報告されている。また、培養肝細胞を用いた実験では、エピガロカテキンガレート（EGCG）はミトコンドリア膜を直接破壊し、

酸化ストレスを誘導することが明らかとなった。これらの報告を受け、2007年6月に米国薬局方のDSI-EC (Dietary Supplements Information Expert Committee) は、緑茶成分を含むサプリメントには肝障害の危険性を示した警告文をつけるように指導している。日本では緑茶抽出物を利用した製品は多く販売されているが、現時点まで類似の報告はない。フェノール性抗酸化物質を高濃度に含む製品の消費量が年々増加していることから、今後、我が国でも同様の健康被害が発生する事が懸念される。

近年、健康食品に含まれている第I相酵素を誘導する成分が、医薬品の作用に影響を与えることが問題となっている。軽度の鬱状態の改善作用によって健康食品としての利用が高まっているセントジョーンズワートは第I相薬物代謝酵素を誘導することによって、インジナビル(抗HIV薬)、ジゴキシン(狭心症薬)、シクロスポリン(免疫抑制薬)の効果を減少させることから、平成12年5月、厚生労働省は医療関係社に注意喚起を行った。多くのフェノール性抗酸化物質は第II相薬物代謝酵素によって抱合体となって排泄される。しかし、健康食品等によって第I相薬物代謝酵素が誘導されると、フェノール性化合物はキノン酸化体へと代謝されることが予想される。キノン代謝物は化学的には不安定で核酸や蛋白質と結合したり、活性酸素を発生して遺伝毒性を示すことが懸念される。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. カテキンからの活性酸素生成機構の解析

UV測定：嫌氣的条件下、カテキンのアセトニトリル溶液に0~3倍量のNaOCH<sub>3</sub>を添加してUVスペクトルを測定した。

ESR測定：ESRの測定セルに嫌氣的条件下、カテキンのアセトニトリル溶液に2倍量のNaOCH<sub>3</sub>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<sub>2</sub>O, DDQ, Pb(OAc)<sub>4</sub>, 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. 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  $\text{NaOCH}_3$  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  $\text{NaOCH}_3$  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 (図 1)。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  $\text{NaOCH}_3$  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 (図 2)。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 (図 3)。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。

ジアニオン体が酸素を還元すると、ジアニオン体はセミキノラジカルアニオンに、また、酸素はスーパーオキシドへと変化する。そこで、ESR を用いてそれぞれの生成を確認した。嫌氣的条件下、2 倍量の  $\text{NaOCH}_3$  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ュミ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 (図 4)。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 (図 5)。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。

## 2. カテキンの酸化反応の解析

フェノール性抗酸化剤は第 I 相薬物代謝酵素によってキノン体へと酸化されることが予測される。カテキンのキノン体へ酸化的代謝反応については既にいくつかの報告例はあるが、キノン体の構造は未だ同定されていない。そこで、本研究では様々な酸化剤を用いてカテキンの酸化代謝のモデル反応を行い、酸化生成物の構造について解析を行った。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  $\text{Ag}_2\text{O}$ , 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 (図 6)。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、 $\text{Ag}_2\text{O}$ , 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 $\text{Ag}_2\text{O}$ 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。

### 3. カテキン酸化体の反応性の解析

カテキンがキノン体へと酸化されると、DNA や蛋白質と付加体を形成して毒性を発現することが予測される。そこで、核酸塩基のモデル化合物である4-クロロベ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(図7)。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 $\text{Ag}_2\text{O}$ 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

フェノール性抗酸化物質は比較的安全性が高い化合物として知られているが、海外では緑茶抽出物を摂取することで肝炎を発症した事例が報告されている。そこで、本研究ではフェノール性抗酸化物質の毒性発現機構を明らかにし、毒性の発現に関わる因子を特定することでヒトへの影響を評価し、健康被害に関わる複合影響について情報提供を行うことを目的とする。フェノール性抗酸化剤の毒性発現機構としては、酸

素分子を直接還元活性化する機構と酸化代謝されて生成するキノンを経由する機構が考えられる。そこで、代表的なフェノール性抗酸化剤のカテキンについて、それぞれの反応機構による毒性発現の可能性を検討した。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。一般的に金属イオンが関与する毒性は細胞レベルと動物レベルでは大きく異なり、毒性動物レベルでは化学物質の毒性に金属イオンが影響しないことが多い。しかし今回、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、海外ではカテキンによる肝炎発症の事例が数件報告されていることから、カテキンの毒性は肝臓で代謝活性化を伴う機構で発現する可能性も考えられる。カテキンなどのフェノール性抗酸化物質はカテコール構造を有することから化学的には容易にキノンへと酸化され易い。実際、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。化学的な反応条件で行ったため、ベンジルアミンとともに溶媒のアセトンも付加したインドール構造が生成したが、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。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。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。

#### E. 結論

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から、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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Imai, K., Nakanishi, I., Ohno, A., Kurihara, M., Miyata, N., Matsumoto, K., Nakamura, A., Fukuhara, K., Synthesis and radical-scavenging activity of a dimethyl catechin analogue. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press



2. 学会発表

1) Fukuhara, K.: Antioxidative properties of substituted or analogues of natural molecules.  
Antioxidants: New Sources & Application in

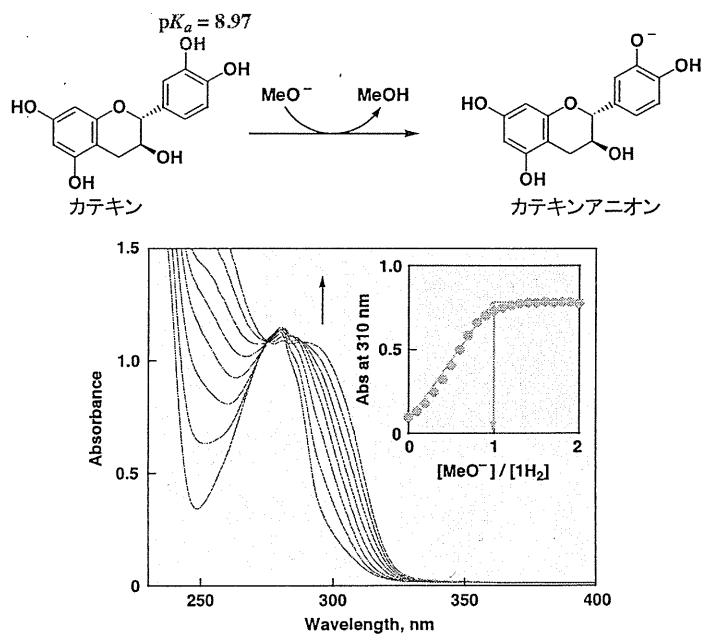


図1. 塩基 ( $\text{MeO}^-$ ) 添加におけるカテキンのUVスペクトルの変化：カテキンアニオンの生成

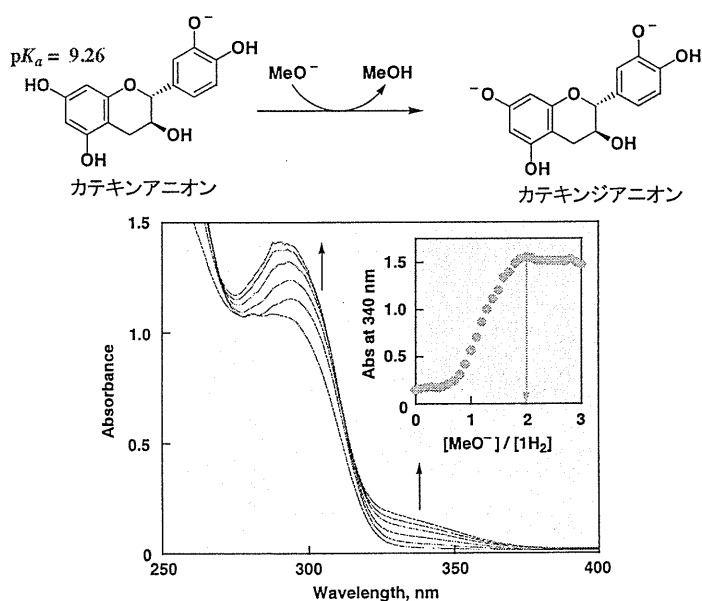


図2. 塩基 ( $\text{MeO}^-$ ) 添加におけるカテキンアニオンのUVスペクトルの変化：カテキンジアニオンの生成

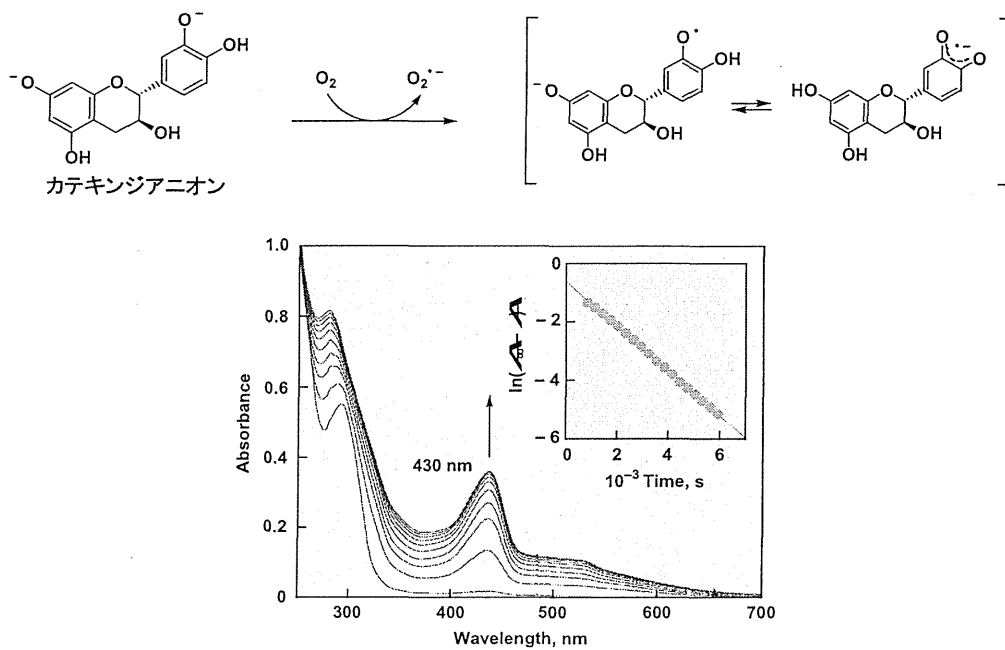


図3. 酸素添加におけるカテキンジアニオンのUVスペクトルの変化：スーパーオキシドアニオンの生成

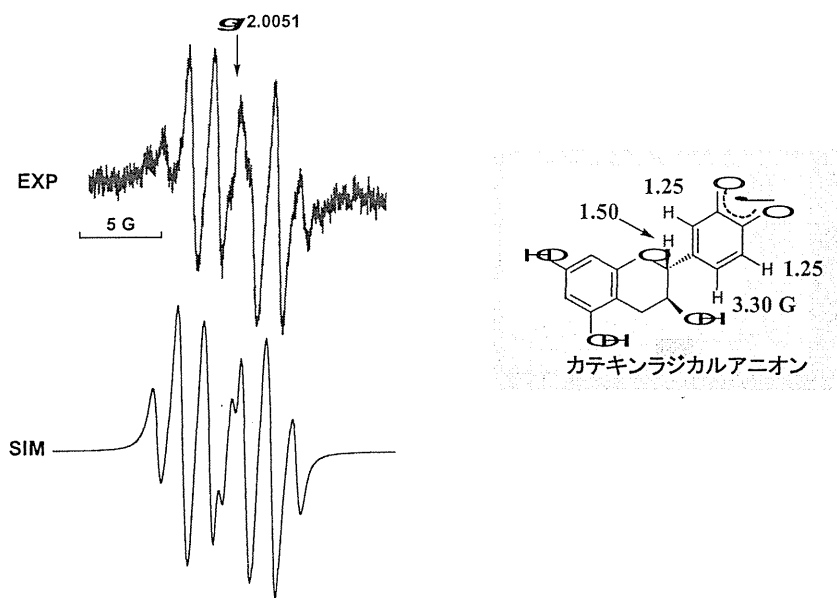


図4. カテキンジアニオンと酸素との反応：カテキンラジカルアニオンのESRスペクトル

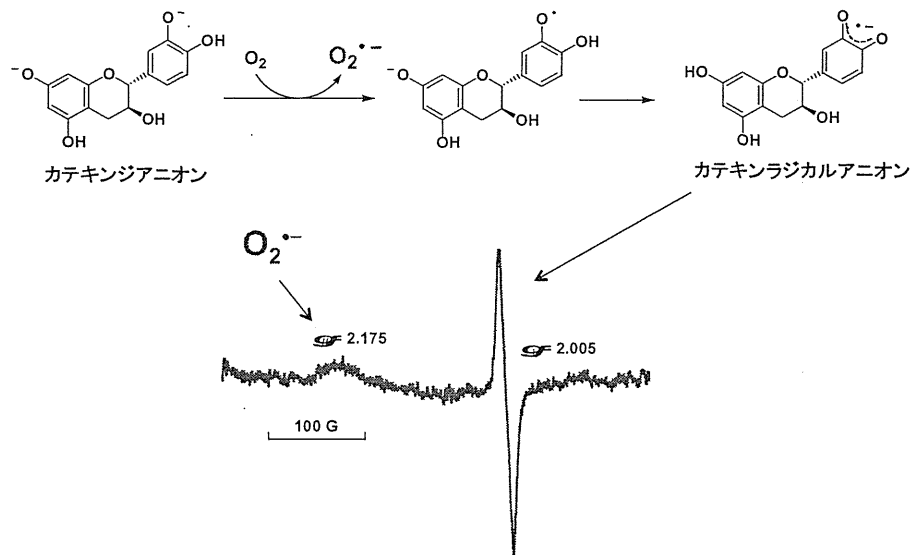


図5. カテキンジアニオンと酸素との反応：カテキンラジカルアニオンとスーパーオキシドアニオンのESRスペクトル

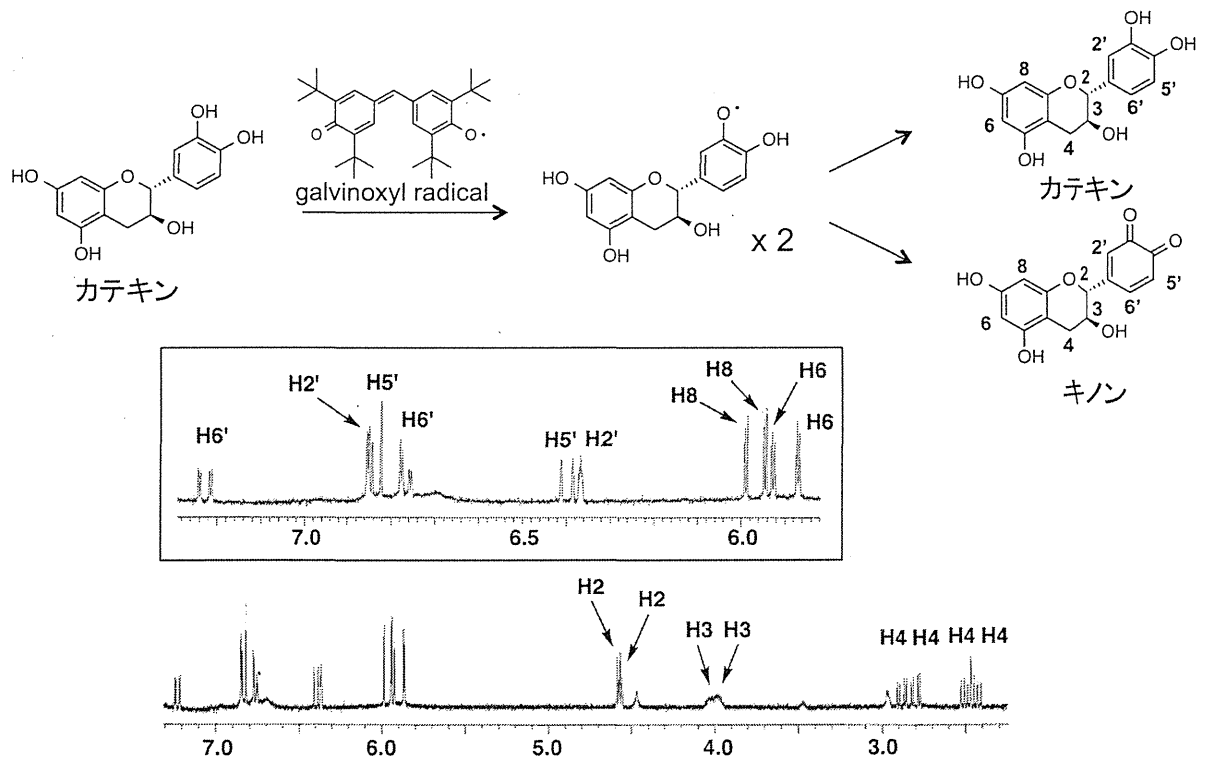


図6. NMRによるカテキンとガルビノキシルラジカルとの反応の解析：キノン体の生成

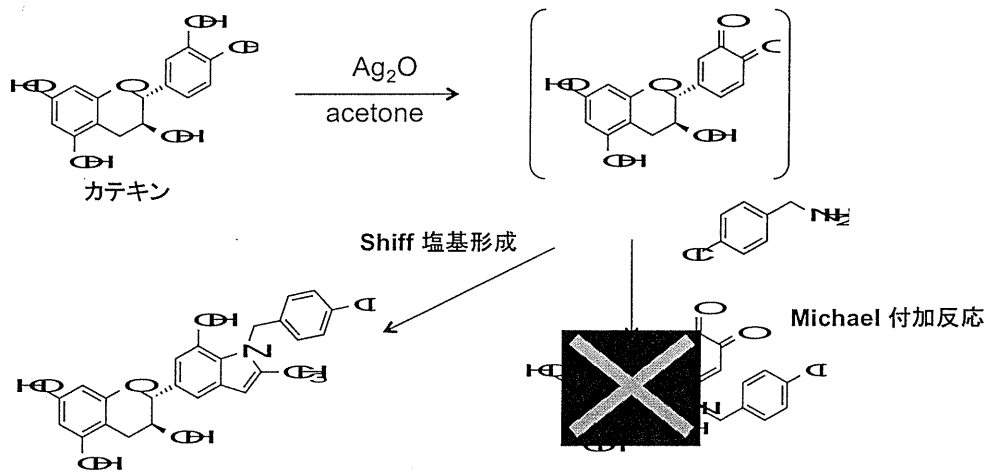


図7. カテキンの酸化と求核付加反応

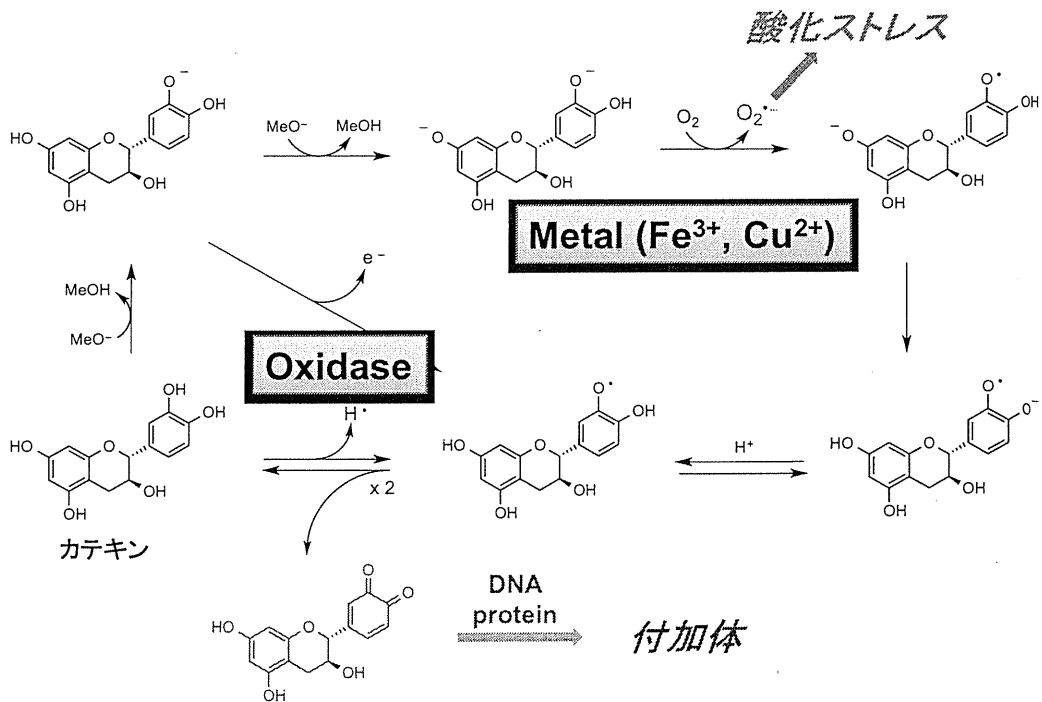


図8. カテキンの毒性発現機構：活性酸素の発生と生体高分子との付加反応

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	87	1609-1619	2013
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	10(2)	150-159	2013
Nishino, R., Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Watanabe, Y., Kurosawa, Y., Ueda, H., and Harada, T	Effects of short-term oral combined exposure to environmental immunotoxic chemicals in mice.	J Immunotoxicol			in press
Imai, K., Nakanishi, I., Ohno, A., Kurihara, M., Miyata, N., Matsumoto, K., Nakamura, A., Fukuhara, K.	Synthesis and radical-scavenging activity of a dimethyl catechin analogue.	Bioorg. Med. Chem. Lett.			in press

## Flumequine enhances the *in vivo* mutagenicity of MeIQx in the mouse liver

K. Kuroda · A. Kijima · Y. Ishii · S. Takasu · M. Jin ·  
K. Matsushita · Y. Kodama · T. Umemura

Received: 17 January 2013 / Accepted: 23 April 2013 / Published online: 17 May 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** The combined effects of various carcinogens found in food products are a concern for human health. In the present study, the effects of flumequine (FL) on the *in vivo* mutagenicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in the liver were investigated. Additionally, we attempted to clarify the underlying mechanisms through comprehensive gene analysis using a cDNA microarray. Male *gpt* delta mice were fed a diet of 0.03 % MeIQx, 0.4 % FL, or 0.03 % MeIQx + 0.4 % FL for 13 weeks. The effects of cotreatment with phenobarbital (PB) were also examined. Treatment with MeIQx alone increased *gpt* and Spi<sup>-</sup> mutant frequencies, and cotreatment with FL, but not with PB, further exacerbated these effects, despite the lack of *in vivo* genotoxicity in mice treated with FL alone. FL caused an increase in *Cyp1a2* mRNA levels and a decrease in *Ugt1b1* mRNA levels, suggesting that the enhancing effects of FL may be due in part to modification of MeIQx metabolism by FL. Moreover, FL induced an increase in hepatocyte proliferation accompanied by hepatocellular injury. Increases in the mRNA levels of genes encoding cytokines derived from Kupffer cells, such as *Il1b* and *Tnf*, and cell cycle-related genes, such as *Ccnd1* and *Ccne1*, suggested that FL treatment increases compensatory cell proliferation. Thus, the present study clearly

demonstrated the combined effects of 2 different types of carcinogens known as contaminants in foods.

**Keywords** MeIQx · Flumequine · *In vivo* mutagenicity · *gpt* delta mouse · Combined effects

### Introduction

A variety of carcinogens are produced in foods or have been found to accidentally contaminate foods. Many studies have reported the toxicities of individual carcinogens. Although some carcinogens are known to cause either synergistic or antagonistic effects (Takayama et al. 1989; Hasegawa et al. 1991), the effects of many combinations of carcinogens have not yet been determined. 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) is a heterocyclic amine produced in cooked meat and has been shown to induce tumors in the liver, Zymbal glands, clitoral glands, and skin in rats and in the liver, lungs, hematopoietic system, and colon in mice (Ohgaki et al. 1987; Sugimura et al. 2004; Nishikawa et al. 2005). The *in vitro* genotoxicity of MeIQx has been demonstrated, and MeIQx has also been shown to exhibit *in vivo* mutagenicity in the livers of transgenic mice (Itoh et al. 2000; Masumura et al. 2003). Recently, we reported that the *in vivo* mutagenicity of MeIQx in the liver was enhanced by cotreatment with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in *gpt* delta mice (Okamura et al. 2010). These data suggested that the genotoxicity of carcinogens could be enhanced by injury or inflammation in the target organs.

Flumequine (FL) is a fluoroquinolone compound with antimicrobial activity against gram-negative organisms and has been used in the treatment of enteric infections in domestic animals and livestock (Greenwood 1998); FL is

K. Kuroda and A. Kijima contributed equally to this work.

K. Kuroda · A. Kijima · Y. Ishii · S. Takasu · M. Jin ·  
K. Matsushita · T. Umemura (✉)  
Division of Pathology, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan  
e-mail: umemura@nihs.go.jp

Y. Kodama  
Division of Toxicology, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

thought to persist in food products made from such livestock (Choma et al. 1999). FL induces hepatotoxicity, characterized by hepatocyte vacuolation and inflammatory cell infiltration, in both rats and mice and induces liver tumors in mice (JECFA 1998; Pronk 2004). Based on the negative results of genotoxicity tests, JECFA concluded that FL is a nongenotoxic hepatocarcinogen and that hepatocellular necrosis-regeneration cycles caused by hepatotoxicity are mechanistically relevant to its induction of liver tumors in mice (JECFA 2004). FL and MeIQx, both of which possibly exist in foods, could be ingested by humans on a long-term basis. Moreover, given that FL exhibits hepatotoxicity similar to  $\text{CCl}_4$ , FL indeed may exert additional effects on the genotoxicity of MeIQx.

Therefore, in the present study, we investigated the effects of FL on the *in vivo* mutagenicity of MeIQx in the mouse liver. *gpt* delta mice were given MeIQx and FL for 13 weeks. To clarify the relationship between changes in reporter gene mutations and molecular mechanisms, mouse livers were used for histopathological examination, bromodeoxyuridine (BrdU) immunostaining, and analysis of reporter gene mutations (*gpt* and  $\text{Spi}^-$  assays) as well as comprehensive gene expression analysis by cDNA microarray. In addition, cotreatment with phenobarbital (PB), a nonhepatotoxic tumor promoter for hepatocarcinogenesis, was examined as a comparative control.

## Materials and methods

### Chemicals

FL, a white crystallized powder (purity: 99.3 %), was kindly provided by Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. (Tokyo,

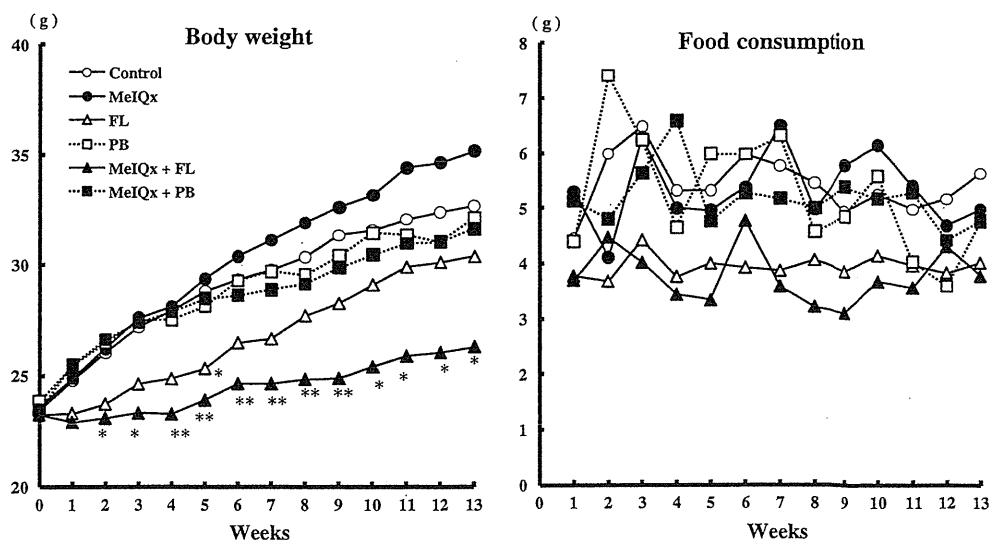
Japan). MeIQx and PB were purchased from Toronto Research Chemicals (North York, Canada) and Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), respectively. BrdU was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### Animals and treatments

The protocol for this study was approved by the Animal Care and Utilization Committee of the National Institute of Health Sciences. Male B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta mice carrying 80 tandem copies of the transgene lambda EG10 in a haploid genome were raised by mating C57BL/6 *gpt* delta and nontransgenic C3H/He mice (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan). Thirty male B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta mice were randomized by weight into 6 groups. Animals were housed in a room with a barrier system and maintained under the following constant conditions: temperature of  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative humidity of  $55 \pm 5\%$ , ventilation frequency of 18 times/h, and a 12-h light/dark cycle. The animals were housed in plastic cages (5 mice/cage) on soft chips (Sankyo Labo-Service, Tokyo, Japan). Throughout the experimental period, chips were renewed every 3 or 4 days, and mice were provided tap water *ad libitum*.

Starting at 6 weeks of age, *gpt* delta transgenic mice were fed a diet containing 0.03 % MeIQx, 0.4 % FL, 0.05 % PB, 0.03 % MeIQx and 0.4 % FL, or 0.03 % MeIQx and 0.05 % PB for 13 weeks. Animals in the control group received the basal diet only. General signs were observed daily, and body weight and food consumption per cage were measured once a week. After 13 weeks, all mice were killed, and a part of the left lateral lobe of the liver was stored at  $-80^\circ\text{C}$  for *in vivo* mutation assays and cDNA microarray analysis. At autopsy, the body and liver weights were measured.

**Fig. 1** Body weight and food consumption for B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks. \* \*\*Significantly different from control group at  $p < 0.05$  and 0.01, respectively



**Table 1** Final body and liver weights in B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks

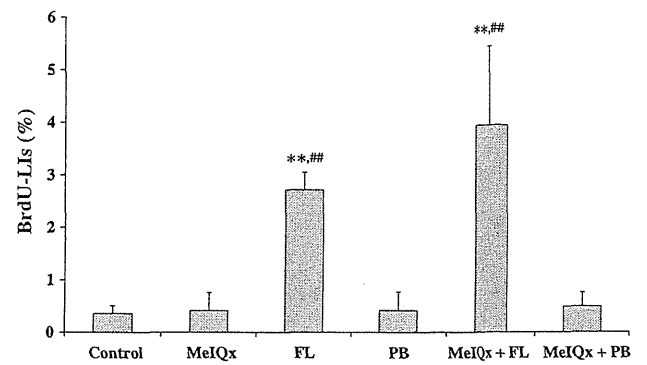
Group	Final body weight (g)	Liver weight	
		Absolute (g)	Relative (g/100 g BW)
Control	32.7 ± 3.9 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.15	4.29 ± 0.23
MeIQx	35.4 ± 4.4	1.63 ± 0.21	4.63 ± 0.40
FL	31.1 ± 1.7	1.60 ± 0.15	5.13 ± 0.23**
PB	32.4 ± 2.9	1.57 ± 0.07	4.88 ± 0.30
MeIQx + FL	26.4 ± 2.1*	1.33 ± 0.10	5.02 ± 0.15*
MeIQx + PB	31.7 ± 2.2	1.64 ± 0.16	5.20 ± 0.47**

\*, \*\* Significantly different from control group at  $p < 0.05$ ,  $0.01$ , respectively

<sup>a</sup> Mean ± SD

### Quantification of hepatocyte proliferation

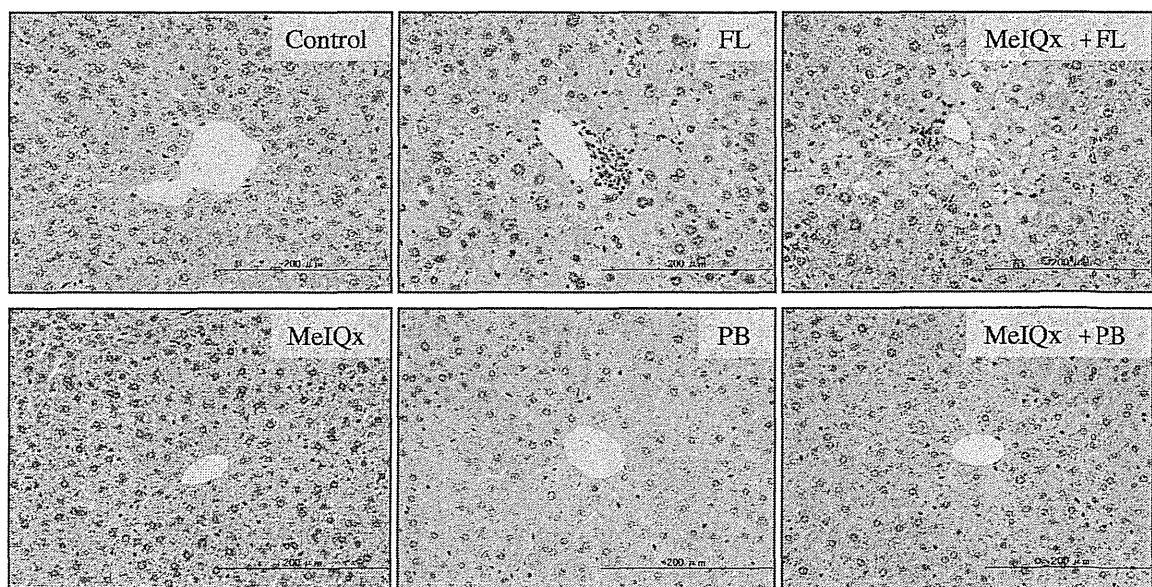
In order to examine the proliferative activity of hepatocytes, all animals were given BrdU (100 mg/kg) by intraperitoneal (i.p.) injection once a day for the final 2 days before killing and once on the day of killing at 2 h before being euthanatized at autopsy. For immunohistochemical staining of BrdU, after activation of the antigen by autoclaving, tissue sections were treated with rat anti-BrdU (AbD Serotec Inc., NC, USA) diluted by Dako Antibody Diluent (Dako, Glostrup, Denmark), followed by incubation with a high polymer stain (HISTOFINE Simple Stain, NICHIREI, Japan). At least 2,000 hepatocytes in each liver

**Fig. 3** BrdU-LIs for hepatocytes from B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks. Values are the mean ± SD of data for 5 mice. \*\*, ## Significantly different from control and MeIQx groups, respectively, at  $p < 0.01$ 

were counted, and labeling indices (LIs) were calculated as the percentage of cells positive for BrdU incorporation.

### In vivo mutation assays

The 6-TG and Spi<sup>-</sup> (insensitive P2 interference) selections were carried out as previously described (Nohmi et al. 1996, 2000). Briefly, genomic DNA was extracted from the liver tissue, and lambda EG10 DNA (48 kb) was rescued as the lambda phage through in vitro packaging. For 6-TG selection, the packaged phage was incubated with *Escheichia coli* YG6020, expressing Cre recombinase, and converted to a plasmid carrying *gpt* and chloramphenicol

**Fig. 2** Histopathological features in the livers of B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks. Note that no obvious alterations (MeIQx group),

centrilobular hypertrophy of hepatocytes with vacuolation (FL and MeIQx + FL groups), or centrilobular hypertrophy of hepatocytes (PB and MeIQx + PB groups) are evident. Bar represents 200 μm



**Table 2** *gpt* mutant frequencies (MFs) in the livers of B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks

Group	Animal no.	Cm <sup>R</sup> colonies (×10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant frequency (×10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	1	26.7	4	0.15	0.20 ± 0.12
	2	12.5	3	0.24	
	3	26.7	2	0.07	
	4	1.7	0	0.00 <sup>b</sup>	
	5	26.2	9	0.34	
MeIQx <sup>a</sup>	6	0.7	3	4.33	5.47 ± 2.03
	7	3.2	18	5.56	
	8	3.5	10	2.85	
	9	2.3	19	8.18	
	10	3.1	20	6.44	
FL	11	25.6	7	0.27	0.29 ± 0.15
	12	20.2	8	0.40	
	13	20.4	10	0.49	
	14	22.4	4	0.18	
	15	7.9	1	0.13	
PB	16	26.6	4	0.15	0.24 ± 0.12
	17	17.2	7	0.41	
	18	23.9	7	0.29	
	19	18.5	2	0.11	
	20	22.4	5	0.22	
MeIQx + FL <sup>a</sup>	21	3.0	21	7.11	11.92 ± 6.26 <sup>**#</sup>
	22	3.4	37	10.93	
	23	5.1	28	5.51	
	24	1.9	29	15.06	
	25	1.0	20	20.96	
MeIQx + PB <sup>a</sup>	26	5.7	5	0.88	2.57 ± 2.60
	27	3.2	7	2.17	
	28	5.3	7	1.32	
	29	2.3	3	1.33	
	30	1.3	9	7.14	

\*\* Significantly different from control group at  $p < 0.01$

# Significantly different from the MeIQx group at  $p < 0.05$

<sup>a</sup> For mice treated with MeIQx alone and for cotreatment groups, *gpt* mutants were analyzed only on one selected plate whose colony numbers were closest to the average number of 5 plates, and MFs were calculated using the packaging efficiency values (Cm<sup>R</sup> colonies) divided by 5

<sup>b</sup> Data of animal No. 4 were excluded for the calculation of the MF because of the poor packaging efficiency of the transgene

acetyltransferase. Infected cells were mixed with molten soft agar and poured onto agar plates containing chloramphenicol and 6-TG. In order to determine the total number of rescued plasmids, infected cells were also poured on plates containing chloramphenicol without 6-TG. The plates were incubated at 37 °C for the selection of 6-TG-resistant colonies, and the *gpt* mutant frequency (MF) was calculated by dividing the number of *gpt* mutants after clonal correction by the number of rescued phages. To characterize *gpt* mutations, a 739-bp DNA fragment containing the 456-bp coding region of the *gpt* gene was amplified by PCR as previously described, and the PCR products were analyzed with an Applied Biosystems 3,730 × 1 DNA Analyzer (Applied Biosystems Japan Ltd.). For the group of mice treated with MeIQx alone and for cotreatment groups, *gpt* mutants were analyzed only on one selected plate based on the assumption that the colony number on the selected plate was closest to the average number of 5 plates, and

MFs were calculated by the packaging efficiency value (Cm<sup>R</sup> colonies) divided by 5.

For Spi<sup>-</sup> selection, the packaged phage was incubated with *E. coli* XL-1 Blue MRA for survival titration and *E. coli* XL-1 Blue MRA P2 for mutant selection. Infected cells were mixed with molten lambda-trypticase agar plates. The next day, plaques (Spi<sup>-</sup> candidates) were punched out with sterilized glass pipettes, and the resulting agar plugs were suspended in SM buffer. In order to confirm the Spi<sup>-</sup> phenotype of candidates, the suspensions were spotted on 3 types of plates containing XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA P2, or WL95 P2 strains and were spread with soft agar. The numbers of mutants that made clear plaques on each plate were counted as confirmed Spi<sup>-</sup> mutants. The Spi<sup>-</sup> MF was calculated by dividing the number of Spi<sup>-</sup> mutants by the number of rescued phages. For the group of mice treated with MeIQx alone and for the cotreatment groups, confirmation of Spi<sup>-</sup> phenotype candidates

**Table 3** Mutation spectra of *gpt* mutant colonies in the livers of B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks

Mutation	Control		MeIQx		FL		PB		MeIQx + FL		MeIQx + PB	
	Number (%)	Specific mutation frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Number (%)	Specific mutation frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Number (%)	Specific mutation frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Number (%)	Specific mutation frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Number (%)	Specific mutation frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Number (%)	Specific mutation frequency ( $\times 10^{-5}$ )
<i>Transversions</i>												
GC-TA	4 <sup>a</sup> (22.2)	0.03 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	36 (51.4)	2.85 $\pm$ 0.77	6 (20.0)	0.05 $\pm$ 0.05	6 (24.0)	0.05 $\pm$ 0.06	74 (54.8)	6.90 $\pm$ 4.36 <sup>**#</sup>	16 (51.6)	1.21 $\pm$ 1.15
GC-CG	0	0	2 (2.9)	0.15 $\pm$ 0.21	1 (3.3)	0.01 $\pm$ 0.02	1 (4.0)	0.01 $\pm$ 0.02	2 (1.5)	0.14 $\pm$ 0.23	1 (3.2)	0.04 $\pm$ 0.08
AT-TA	1 (5.6)	0.01 $\pm$ 0.02	3 (4.3)	0.19 $\pm$ 0.28	0	0	0	0	5 (3.7)	0.48 $\pm$ 0.34 <sup>*</sup>	0	0
AT-CG	0	0	1 (1.4)	0.06 $\pm$ 0.14	2 (6.7)	0.02 $\pm$ 0.03	0	0	0	0	0	0
<i>Transitions</i>												
GC-AT	9 (50.0)	0.08 $\pm$ 0.05	2 (2.9)	0.35 $\pm$ 0.63	9 (30.0)	0.10 $\pm$ 0.06	13 (52.0)	0.13 $\pm$ 0.11	11 (8.1)	0.77 $\pm$ 0.83	7 (22.6)	0.67 $\pm$ 0.98
AT-GC	0	0	0	0	3 (10.0)	0.03 $\pm$ 0.03	3 (12.0)	0.03 $\pm$ 0.03	0	0	0	0
<i>Deletion</i>												
Single bp	3 (16.7)	0.04 $\pm$ 0.07	22 (31.4)	1.55 $\pm$ 1.24	6 (20.0)	0.06 $\pm$ 0.06	2 (8.0)	0.02 $\pm$ 0.03	37 (27.4)	3.14 $\pm$ 1.36 <sup>**#</sup>	5 (16.1)	0.50 $\pm$ 0.63
Over 2 bp	0	0	1 (1.4)	0.09 $\pm$ 0.19	2 (6.7)	0.02 $\pm$ 0.03	0	0	1 (0.7)	0.21 $\pm$ 0.47	0	0
Insertion	0	0	2 (2.9)	0.15 $\pm$ 0.21	1 (3.3)	0.01 $\pm$ 0.02	0	0	2 (1.5)	0.12 $\pm$ 0.26	1 (3.2)	0.06 $\pm$ 0.14
Complex	1 (5.6)	0.01 $\pm$ 0.02	1 (1.4)	0.09 $\pm$ 0.19	0	0	0	0	3 (2.2)	0.16 $\pm$ 0.26	1 (3.2)	0.09 $\pm$ 0.20

\* \*\* Significantly different from control group at  $p < 0.05$  and 0.01, respectively# Significantly different from the MeIQx group at  $p < 0.05$ <sup>a</sup> Number of colonies with independent mutations<sup>b</sup> Mean  $\pm$  SD

**Table 4** Spi<sup>-</sup> mutant frequencies (MFs) in the livers of B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks

Group	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	34.6	8	0.23	0.15 $\pm$ 0.07
	2	14.9	1	0.07	
	3	49.4	8	0.16	
	4	6.0	2	0.33	
	5	21.1	3	0.14	
MeIQx <sup>a</sup>	6	3.2	4	1.27	3.53 $\pm$ 1.97*
	7	5.7	12	2.12	
	8	7.3	24	3.28	
	9	9.6	58	6.07	
	10	12.0	59	4.91	
FL	11	39.8	6	0.15	0.17 $\pm$ 0.03
	12	25.6	5	0.20	
	13	31.3	5	0.16	
	14	41.4	6	0.14	
	15	20.2	4	0.20	
PB	16	46.6	7	0.15	0.20 $\pm$ 0.09
	17	45.7	8	0.17	
	18	30.4	4	0.13	
	19	17.3	6	0.35	
	20	32.9	7	0.21	
MeIQx + FL <sup>a</sup>	21	4.9	27	5.48	7.66 $\pm$ 3.02**.#
	22	5.5	30	5.49	
	23	8.0	43	5.40	
MeIQx + PB <sup>a</sup>	24	6.5	70	10.80	1.72 $\pm$ 1.74
	25	4.0	44	11.11	
	26	7.2	3	0.42	
	27	5.7	4	0.71	
	28	8.3	7	0.84	
	29	6.0	12	1.99	
	30	3.0	14	4.64	

\* \*\* Significantly different from the control group at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively

# Significantly different from the MeIQx group at  $p < 0.05$

<sup>a</sup> For mice treated with MeIQx alone and for cotreatment groups, confirmation of Spi<sup>-</sup> phenotype candidates was performed only on the first of 2 plates, and MFs were calculated using the packaging efficiency values (plaques within XL-1 Blue MRA) divided by 2

was performed only on the first of 2 plates, and MFs were calculated using the packaging efficiency value (plaques within XL-1 Blue MRA) divided by 2.

#### RNA isolation

The livers from all animals were soaked overnight in RNAlater-ICE (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) at  $-20$  °C, and total RNA was then isolated using RNeasy Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The concentration and quality of total RNA were analyzed using a UV–VIS spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

#### cDNA microarray

In 3 mice from the control, MeIQx, and MeIQx + FL groups, purified total RNA was labeled with cyanine-3 dye using a Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies). RNA concentration, dye incorporation, and quality were analyzed using a UV–VIS spectrophotometer and an Agilent 2100 Bioanalyzer. Fluorescently labeled cRNA was hybridized to Agilent  $4 \times 44$  K whole mouse genome microarray gene expression chips following the manufacturer's protocol (Agilent Technologies). Hybridized microarray chips were then scanned using an Agilent Microarray Scanner (Model G2565BA, Agilent Technologies). Feature Extraction software (Agilent Technologies) was employed for imaging analysis and data extraction processes. Using

**Table 5** Genes extracted from cDNA microarray analysis that were up- or downregulated by FL treatment in the livers of B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta mice

Gene symbol	Gene name	Fold change	GO categorize
Ccna2	Cyclin A2	3.7	Cell cycle
Ccnb1	Cyclin B1	12.7	Cell cycle
Ccnb2	Cyclin B2	4.0	Cell cycle
Ccnd1	Cyclin D1	3.1	Cell cycle
Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1	8.6	Cell cycle
Chek1	Checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)	3.2	Cell cycle, DNA damage
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	8.0	Cell proliferation
Jun	Jun oncogene	4.1	Cell proliferation, Apoptosis
Tnf	Tumor necrosis factor	4.4	Cell proliferation, Apoptosis, Immune system
Exo1	Exonuclease 1	6.7	DNA repair
Rad18	RAD18 homolog (S. cerevisiae)	2.4	DNA repair
Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	5.4	DNA repair
Cyp1a1	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	23.5	Drug metabolism
Cyp2b10	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10	6.2	Drug metabolism
Ccl2	Chemokine (C–C motif) ligand 2	19.6	Immune system
Ccl3	Chemokine (C–C motif) ligand 3	9.3	Immune system
Ccl4	Chemokine (C–C motif) ligand 4	7.6	Immune system
Ccl7	Chemokine (C–C motif) ligand 7	10.2	Immune system
Ccr2	Chemokine (C–C motif) receptor 2	3.7	Immune system
Ccr7	Chemokine (C–C motif) receptor 7	3.7	Immune system
Il1b	Interleukin 1 beta	2.8	Immune system
Il1f8	Interleukin 1 family, member 8	–3.7	Immune system
Nfkb2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100	1.8	Immune system
Ugt2b1	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B1	–2.5	Drug metabolism
Cyp7b1	Cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	–3.1	Drug metabolism

Listed genes were extracted under the cutoff condition of  $p < 0.05$  and exhibiting at least 1.5-fold change in expression when comparing the MeIQx group with the MeIQx + FL group

the analysis software GeneSpring (Agilent Technologies), normalization of gene expression data and filtering probe sets by expression levels, flags, and errors were performed. Differences in gene expression between the MeIQx group and the MeIQx + FL group were analyzed by analysis of variance ( $t$  test; cutoff value:  $p < 0.05$ ; multiple testing corrections: Benjamini-Hochburg false discovery rate [FDR]). Extracted genes were analyzed by a gene ontology approach using GeneSpring software.

#### Quantitative real-time PCR for mRNA expression

In all animals, cDNA copies of total RNA were obtained using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems Japan Ltd.). PCR was performed on an Applied Biosystems 7900HT FAST Real-Time PCR

System (Applied Biosystems) with TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) and TaqMan Rodent GAPDH control reagents (Applied Biosystems). The primers for assayed genes in TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) were used. Expression levels of target genes were calculated by the relative standard curve method. GAPDH levels were used as an endogenous control, and data were presented as fold-change values of treated samples relative to controls.

#### Statistical analysis

The significance of differences for body and liver weights, in vivo mutation assays, and real-time PCR analyses were evaluated using Turkey's multicomparison test. A  $p$  value of less than 0.05 was considered significant.