

201426017A

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅村 隆志

平成27(2015)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	22
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	73
出川雅邦	
5. フェノール性化合物の複合影響	78
福原 潔	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	88
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	89
-----------------	----

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 26 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 理事長（代表理事）
出川雅邦 静岡県立大学薬学部 名誉教授
福原 潔 昭和大学薬学部 教授

研究要旨

炎症性サイトカインなどの細胞内微小環境の変化を引き起こす化学物質が低用量の遺伝毒性物質に及ぼす影響を明らかにするため、雌性 6 週齢の *gpt delta* マウスに代償性肝細胞増殖を誘導するフルメキン（FL）を 0.4% の濃度で粉末飼料に混じ、4 週間自由に摂取させ、また同時に肝発がん物質エストラゴール（ES）を 10 又は 100 mg/kg の濃度で 1 回/日、強制経口投与した。その結果、ES の遺伝毒性に FL の併用投与は細胞増殖活性を介した複合影響を引き起こす可能性が示唆された。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、雄性 6 週齢の *gpt delta* ラットに、250 あるいは 500 ppm の濃度の臭素酸カリウム（KBrO₃）を飲水あるいは 500 あるいは 2500 ppm の濃度のニトロフランチン（NFT）を粉末飼料に混じて 13 週間、自由に摂取させた。また併用投与群には、それぞれに対してアリザリン（Alz）を 500 ppm の濃度で粉末飼料に混じて投与した。その結果、KBrO₃ に対して Alz の併用投与は酸化的 DNA 損傷並びに欠失サイズの増加を伴う遺伝子突然変異頻度を加算的に増加させることが明らかとなった。

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。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与える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、ヘテロサイクリックアミンの *in vivo* 変異原性に対する高脂肪食摂取の影響を検討した。その結果、4 週間の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および大腸における *in vivo* 変異原性に明らかな影響を与えなかった。

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、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。また、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、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、6 種のベンゾ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 3-methylcholanthrene, MC 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。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。

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)

食品中には非意図的に発がん物質が生成又は混入する。これら発がん物質と様々な化学物質が食品を介してヒトに摂取された場合、それらの複合影響が相加あるいは相乗作用として発現する可能性があるが、発

がん性の評価はこれまで化合物単体でのみ実施されており、このような複合影響を評価した報告は極めて少ない。そこで、細胞内微小環境の変化を引き起こす化学物質が低用量の遺伝毒性物質に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、ハーブやスパイス等に含まれる香料成分であり、遺伝毒性物質のエストラゴール (ES) に着目し、

本年度は DNA 付加体の形成と変異頻度の有意な上昇が認められた用量（高用量）と DNA 付加体は生成するものの変異頻度の上昇が認められなかった用量（低用量）の ES と食品中への残留が危惧される動物用医薬品で肝臓に代償性細胞増殖を誘導することが知られているフルメキン（FL）の併用投与試験を実施した。肝臓におけるレポーター遺伝子変異原性解析、病理組織学的検索、ES 特異的 DNA 付加体の測定、PCNA 陽性細胞及び細胞増殖関連因子の遺伝発現解析、ES の活性化又は排泄に寄与する代謝酵素及び FL の肝組織傷害に起因するサイトカイン類の遺伝子発現解析を実施し、ES に対する FL の複合影響を検索した。一方、食品中に含まれる化学物質の中には、酸化ストレスを引き起こす化学物質が多数存在することが知られている。酸化ストレスは 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) に代表される酸化的 DNA 損傷を引き起こす可能性があるが、これらの化学物質を同時に摂取した場合、酸化的 DNA 損傷が蓄積するかどうかも含めて、酸化ストレス産生物質の同時曝露による複合影響を評価した報告はこれまでにない。そこで、複数の酸化的 DNA 損傷誘発物質による複合影響を検討する目的で、酸化ストレス産生物質として臭素酸カリウム (KBrO₃)、ニトロフランチン (NFT) 及びアリザリン (Alz) に着目し、KBrO₃ と NFT による酸化的 DNA 損傷並びにレポーター遺伝子突然変異に対する Alz の併用投与の影響を検討した。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響（西川）

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、実際の日常生活のなかで起こり得る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。本研究では、高脂肪食摂取が食品中遺伝毒性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るとともに、肉や魚などを高温調理すること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、肝臓および大腸におけるヘテロサイクリックアミンの *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. 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、メタミドホスと他の有機リン剤を組み合わせ、母動物及び若齢期、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を調査した。平成 26 年度はパラチオン及びメタミドホスを若齢期、成熟期及び妊娠期（妊娠中期/後期）の雌ラットに複合反復経口投与をし、神経症状の発現とそれに関連する因子を測定した。また、妊娠期における重篤な神経症状の発現は、妊娠初期から後期に掛けた体重増加に伴い投与量が多くなることに起因するという可能性を検討した。

3-2.我々の実験班ではこれまでに、有機塩素剤や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してきた。

本研究では、免疫系への影響が示唆されている有機塩素系農薬を対象に、様々なライフステージに反復経口投与した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ゾイミダゾール類によるヒト AhR の活性化 (出川)

4-1. ベンゾイミダゾール類による AhR 活性化増強機構の解析

AhR の活性化物質は、AhR と直接結合するリガンド型活性化物質と、AhR と直接結合しない非リガンド型活性化物質に大別される。これら AhR 活性化物質は、焦げや煙草の煙等々生活環境中に広く存在し、私たちは複合的に曝露されており、AhR 活性化物質間の複合曝露影響が懸念される。そこで本研究では、複数のリガンド型および非リガ

ド型 AhR 活性化物質を用いて、それら組合せと相乗的 AhR 活性化との関連性を追究し、その特徴と効果発現機序を明らかにすることを目的とした。

4-2. 合成着色料による AhR 活性化とその種差の解析

食品添加物に使用されているあるいは使用されてきた 18 種のタール系合成着色料を選択し、ヒト AhR に対する活性化能を検討した。また同時に、これまでに樹立したラットおよびマウスの AhR レポーター細胞株を用いて、ラットおよびマウスの AhR に対する活性化能を調べ、各化合物の AhR 活性化におけるヒトを含めた動物種差を検討した。

5. フェノール性化合物の複合影響 (福原)

近年、カテキンやケルセチン、レスベラトロールなどの天然のフェノール性抗酸化物質の生活習慣病に対する予防効果が明らかとなり、それに伴って健康維持や生活習慣病の予防目的として、これらの成分の積極的な摂取が注目されている。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。そして、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。平成 26 年度は、フェノール性抗酸化物質の複合影響に資する、キノンへの酸化代謝と活性酸素の生成を伴う毒性の評価系を確立とカテキン等の代謝活性化を伴う活性酸素毒性について評価を行う。

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)

1-1. 動物は当研究所で系統維持している C57BL/6J *gpt delta* マウスと野生型 C3H マウス (日本チャールズ・リバー株式会社) の交配によって作出した 6 週齢の雌性 B6C3F₁ *gpt delta* マウスを実験に供した。。*gpt delta* マウス 30 匹は各群 5 匹で 6 群に配した。ES 単独投与群には基礎飼料により飼育し、ES を 10 又は 100 mg/kg/day の用量で強制経口投与 (1 回/日、7 回/週) した。FL 単独投与群では、ES の溶媒であるコーンオイルを強制経口投与し、FL を 0.4% の濃度で基礎飼料に混じり自由摂取させた。併用投与群では ES を 10 又は 100 mg/kg/day の用量で強制経口投与し、FL を混じった粉末飼料を自由摂取させた。対照群ではコーンオイルを強制経口投与し、基礎飼料を自由摂取させた。なお、ES 100 mg/kg と FL の併用投与群では投与開始 2 週目において明らかな体重の低下と 1 例の死亡が確認されたことから、投与開始 3 週目から ES の用量を 100 mg/kg から 70 mg/kg に変更し試験を継続した。それに伴い、ES 100 mg/kg の単独投与群も 70 mg/kg に変更した。投与期間は 4 週間とし、試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。また、体重および摂餌量の測定は週 1 回行った。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、肝臓について肉眼的に観察後摘出し、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 付加体の測定及び *gpt* 及び *Sp1* 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 付加体として、ES-3'-N²-dG、ES-3'-8-dG 及び ES-3'-N⁶-dA 付加体を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。サンプルには ¹⁵N でラベル化した各付加体の安定同位体を内標準物質として一定量添加した。遺伝子発現解析では、Isogen[®] (ニッポンジーン社製) を用いて RNA の単離を行い、Applied Biosystems (ABI) 社製 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®] を用いた逆転写反応により cDNA 合成を行った。リアルタイム RT-PCR は TaqMan[®] Gene Expression Assay (ABI 社製) を用いて、ABI 社製 7900HT Fast Real-Time PCR System により解析を行った。遺伝子発現は、細胞周期調節因子である *Ccnb1*、*Ccnd1* 及び *Cnel1*、炎症性サイトカインである *Il1b* 及び *TNF*、ES の代謝に寄与する *Cyp1a2*、*Sult1a1* 及び *Ugt1a1* について検索した。PCNA の免疫組織化学染色は DAKO 社製抗 PCNA マウスモノクローナル抗体を用いた。

1-2. 動物は 6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットを日本エスエルシー(株)から購入し、実験に供した。実験プロトコルを Fig. 6 に示す。*gpt delta* ラット 50 匹を各群 5 匹に配し、対照群と Alz 単独投与群に加え、KBrO₃ 及び NFT 単独群とそれらに Alz を加えた併用投与群を含めた計 10 群を設けた。KBrO₃ は 250 又は 500 ppm の濃度で飲水投与した。NFT は 500 又は 2500 ppm の濃度で、Alz は 500 ppm の濃度で混餌投与した。対照群には基礎飼料及び水道水を自由摂取させた。被験物質の濃度は平成 26 年度の研究結果に基づき、いずれも酸化的 DNA 損傷を引き起こすものの、KBrO₃ と NFT は変異を誘発しない低用量 (KBrO₃ 250 ppm 及び

NFT 500 ppm) と、変異を誘発する高用量 (KBrO₃ 500 ppm 及び NFT 2500 ppm)、Alz は突然変異を誘発しない 500 ppm に設定した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。また、体重および飲水量の測定は週 1 回行った。13 週間の投与後、動物はイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、腎臓について肉眼的に観察後摘出し、右腎の下極側半分を 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。KBrO₃ 及び NFT の発がん標的部位ならびに Alz の毒性発現部位が腎皮質であることから、右腎の残り及び左腎を長軸にカットした後、眼科用反剪ばさみを用いて弓状動脈に沿ってハサミを入れて皮質と髄質を分けて採取し、8-OHdG の測定及び *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。腎皮質について 8-OHdG レベルの測定を実施した。8-OHdG 量は液体クロマトグラフィー/電気化学検出器 (HPLC/ECD) システム (ESA, Coulochem® II) を用いて定量的解析を実施した。腎皮質のゲノム DNA を抽出し、*gpt* 及び *Spi* assay に供した。*gpt* assay では回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MF) を算出した。*Spi* 欠失変異の検出では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株) に感染させ、*Spi* プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の *Spi* プラークを検出し

た。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 フ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。また、真の *Spi* プラーク内のファージを採取し、再度、大腸菌 LE392 株に感染させ、その上清を *Spi* lysate として保存した。*Spi* lysate から QIAGEN 社製の Gentra Puregene Kit を用いて DNA を抽出し、*red/gam* 遺伝子を含む約 5 kb の領域に対する PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により、5 kb の位置にバンドが見られたものを小さいサイズの deletion 又は塩基対置換と判定し、5 kb よりも小さいバンドが見られたものを大きいサイズの deletion と判定した。

(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、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、麻酔下にて採血し、血清生化学的検査を行った。また、肝臓を摘出し病理組織学的検査を行った。さらに、摘出した肝臓を用いて、Spi assay ならびに搔爬した大腸粘膜を用いて *gpt* assay および Spi assay を行い、得られた肝臓における Spi 変異体ならびに大腸粘膜における *gpt* 変異体については、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. 本試験の被験物質として、有機リン剤のパラチオン (和光純薬工業株式会社) 及びメタミドホス (和光純薬株式会社) を使用した。試験動物は日本チャールス・リバー株式会社日野生産所 (滋賀県) で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラットの 3 週齢の雌動物及び 7 週齢の雌雄動物を購入した。雄動物は交配用として購入した。

7 週齢の雌動物の一部は妊娠動物及び偽妊娠動物を得るため、馴化後、スメアを採取した。交配適期と確認された雌動物を雄と 1:1 で一晩同居させた。翌朝、膣栓あるいはスメア内に精子が認められた動物を交配成立とし、妊娠 0 日 (GD0) とした。一方、偽妊娠動物を得るため、スメアを採取後、交配適期が確認された雌動物に対し、夕方 (18:00) にガラス棒及び綿棒を用いて子宮膣部をタッピングで刺激を与え、3 日間の休止期を確認した動物を偽妊娠成立 (PD0) とした。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; AC14056)。当該試験では、妊娠期で死亡を含む最も強い神経症状を示す P 0.6+M 0.8 mg/kg/day を高用量とし、死亡は無いが何らかの神経症状を発現すると予想される P 0.3+M 0.4 mg/kg/day を低用量とした。また、溶媒を投与する 0 mg/kg/day を設けた。動物は、若齢期 (A 群)、成熟期 (B 群)、妊娠期 [中期 (C 群) / 後期 (D 群)] を設置した。さらに、偽妊娠動物 [中期 (C' 群) / 後期 (D' 群)] を設けた。但し、偽妊娠動物では投与用量を高用量のみとした。パラチオンを濃度 0.15 mg/mL (用量 0.3 mg/kg) 及び 0.30 mg/mL (用量 0.6 mg/kg) に調製し、メタミドホスは 0.20 mg/mL (用量 0.4 mg/kg) 及び 0.40 mg/mL (用量 0.8 mg/kg) に調製した。調製後、各調製液を 1:1 で混合して使用した。投与方法は胃ゾンデを用いた強制経口投与とした。投与期間は若齢期及び成熟期は 14 日間、妊娠及び偽妊娠動物については、GD6/PD6 から GD13/PD13 (妊娠あるいは偽妊娠中期) と GD6/PD6 から GD20/PD20 (妊

娠あるいは偽妊娠後期) までとした。全動物について観察期間中、一般状態を含む瀕死状態及び死亡を1日1回観察した。また、投与期間中は少なくとも2回(投与前後)に攣縮、振戦、痙攣、流涎及び縮瞳を観察した。若齢期及び成熟期の雌ラットでは、投与開始日(投与0日)、投与7及び14日、観察終了日に体重を測定した。妊娠及び偽妊娠動物はGD0/PD0、GD6/PD6、GD13/PD13、GD20/PD20に体重を測定した。若齢期及び成熟期は、投与14日に、妊娠・偽妊娠中期はGD13/PD13、妊娠・偽妊娠後期はGD20/PD20にイソフルラン[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取した後に剖検した。肝臓は1×PBS(Phosphate Buffered Salts, TaKaRa Bio Inc., Japan)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。脳の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。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。測定にはパラオキソナーゼ(PON-1: Arylesterase 活性)測定キット(日研ザイル株式会社)を用いた。血清を用いてEstradiol(E2)を測定した。測定にはRodent Estradiol ELISA test kit(Endocrine Technologies, Inc. USA)を用いた。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。各検査項目について、若齢期と成

熟期、妊娠中期または妊娠後期を成熟期、妊娠中期と偽妊娠中期、妊娠後期と偽妊娠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。

3-2. 使用した被験物質は和光純薬工業株式会社(大阪府)ないしシグマアルドリッチジャパン合同会社(東京都)から購入した。日本クレア株式会社の近交系SPFマウス(BALB/cAJcl)の雌動物を用いた。供試動物は、妊娠8日目(10週齢)にて購入し、5日間試験環境に馴化した後、7週齢で試験に用いた。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倫理規定に従い実施した。ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびデキサメタゾン(経口経路にて)、デキサメタゾンは公比10とし、0.6、0.06、及び0 mg/kg、メトキシクロルとベンゾ[a]ピレンは30、10及び0 mg/kgの各2用量を設定した。TMAは経皮経路にて、感作には0.3%濃度で動物に投与を、惹起(吸入暴露)には0.5mg/L濃度を設定した。目標濃度となるよう、コーンオイルを用いて調製した。吸入惹起用のTMAは暴露前に平均粒子径が2 µm以下となるように粉碎処理を行い、吸入ダストとして暴露を行った。ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびデキサメタゾンは、各用量の被験物質投与液を妊娠13日目から5日間にわたって強制経口投与した。TMAによる経皮感作は、産まれて来た仔動物の8週齢時より開始し、ピペットを用いて左右の耳介後方に25 µL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。動物の鼻部のみが暴露チャンバー

内に露出されるようにマウスを個別にアニマルホルダー（トキワ科学器械株式会社、東京都）に収容し、空気流動型鼻部暴露チャンバー（気積 31.2 L、トキワ科学器械株式会社）に装着した。被験物質等の発生は、空気流動型鼻部暴露チャンバーおよびターンテーブル型ダストフィーダー（DF-3、ターンテーブル TA32、柴田科学株式会社、東京都）を用いて行った。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安楽殺し、肺胞洗浄液（BALF）および肺門リンパ節を採材した。BALF はフローサイトメトリー法による各種細胞数解析（好中球、好酸球、肥満細胞、抗塩基球）に供した。肺門リンパ節は、10%牛胎児血清含有 RPMI1640 メディウムを用いて、ナイロンメッシュ（75 μm メッシュ）上で揺りつぶし、単細胞懸濁液を得た。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、6、9、17A）を定量した。肺はホルマリン固定の後に切片を作成し、ヘマトキシレン・エオジン染色による組織学的解析を行った。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。解析には、APC 標識抗マウス CD49b 抗体、PE 標識抗マウス CD49d 抗体、PerCp-Cy5.5 標識抗マウス Gr-1 抗体、APC-Cy7 標識抗マウス CD11c 抗体、PE-Cy7 標識抗マウス CD117 抗体および FITC 標識抗マウス FCRI 抗体（全て日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用い、好中球および好酸球を染色した。染色後、

フローサイトメーターを用いて解析を実施した。肺門リンパ節の細胞懸濁液中のリンパ球数は、コールターカウンター Z2 を用いて測定した。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。解析には FITC 標識抗マウス IgE 抗体、PerCP-Cy5.5 標識抗マウス CD45R/B220 抗体、APC 標識抗マウス CD3 抗体、PE-Cy7 標識抗マウス CD4 抗体、APC-Cy7 標識抗マウス CD8 抗体および PE 標識抗マウス CD62L 抗体（全て日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用い、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 細胞数をフローサイトメーターにより測定した。また、無菌化で調製した肺門リンパ節細胞 5×10^5 個について、48 穴培養プレート上で CD3 および CD28 抗体（Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28）と共に CO₂ インキュベーター（37°C、5%CO₂）で 24 時間共培養し、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。

（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；AC14007）。

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）

ベンズイミダゾール類による AhR 活性化増強機構の解析には、ヒト肝がん HepG2 細胞に AhR 結合配列（XRE）のルシフェラーゼレポータープラスミド（XRE-pGL4.27）を安定に発現させたヒト AhR レポーター細胞株（HepG2-XL24）を用いた。合成着色料の AhR

活性化能の解析には、上記 HepG2-XL24 のほか、既に樹立しているラット AhR レポーター細胞株 (H4IIE-XL9) およびマウス AhR レポーター細胞株 (Hepa-XL11) を使用した。さらに、AhR 標的遺伝子誘導を確認するため、ヒト肝由来細胞株 (HepG2、Hep3B および Huh7)、ラット肝由来細胞株 (H4IIE、KanR2 および RL34)、マウス肝由来細胞株 (Hepalcl7 および Hepa1-6) を使用した。リガンド型 AhR 活性化剤として 3-methylcholanthrene (MC)、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)、benzo[a]pyrene (BaP)、 β -naphthoflavone (BNF) Indigo (Ind)、3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) 及び 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeA \cdot C) を使用した。また、非リガンド型 AhR 活性化剤として Thiabendazole (TBZ) および Omeprazole (OME) を用いた。また、その他のベンズイミダゾール化合物として、Benzimidazole (BNZ)、Carbendazim (CBD)、Benomyl (BML)、および Lansoprazole (LAN) を使用した。合成着色料の AhR 活性化能の解析には、タール系合成着色料として、食用赤色 2 号 (Acid Red 27、Amaranth)、赤色 3 号 (Erythrosine B)、赤色 101 号 (Acid Red 26、Ponceau R)、赤色 102 号 (Acid Red 18、New Coccine)、赤色 103 号 (Acid Red 87、Eosine yellowish)、赤色 104 号 (Acid Red 92、Phloxine)、赤色 105 号 (Acid Red 94、Rose bengal)、赤色 106 号 (Acid red 52)、黄色 1 号 (Naphthol yellow S)、黄色 4 号 (Acid Yellow 23、Tartrazine)、黄色 5 号 (Acid Yellow 11、Sunset Yellow FCF)、青色 1 号 (Brilliant Blue FCF)、青色 2 号 (Acid Blue

74、Indigo carmine)、緑色 2 号 (Light green SF yellowish)、緑色 3 号 (Fast Green FCF)、紫色 1 号 (Acid Violet 49)、赤色 213 号 (Rhodamine B) および バターイエロー (Dimethyl yellow、DMY) を用いた。各 AhR レポーター細胞株 (HepG2-A10、HepG2-XL24、Hepa-XL11) をそれぞれ 2×10^4 cell/cm² となるように播種し、48 時間前培養し、その後被検化合物で処理した。一定時間各化合物を処理した後、Reporter Lysis Buffer (Promega) を用いて細胞溶解液を調製し、これをルシフェラーゼ基質液 (東洋インキ) と混和して生じた発光を 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。各細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように播種し、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。

5. フェノール性化合物の複合影響 (福原)
5-1. pBR322 を用いた DNA 切断反応では、エッペンドルフチューブにフェノール性抗酸化物質のアセトン溶液と 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) の溶液

それぞれ 2.5 μ l を混合後、3 時間 37°C でインキュベートした。その後、氷浴上で 50 μ M bp pBR322 の 50mM pH7.2 カコジル酸溶液を 40 μ l を添加、さらに 10mM NADH の 50mM pH7.2 のカコジル酸溶液を 40 μ l 添加した、37°C で 2 時間インキュベートした後、0.1% bromophenol blue in 30% glycerol を 5 μ l 添加し、泳動用サンプルとした。Ethydium bromide を添加した 1% アガロースゲルを作成し、各サンプル 10 μ l について電気泳動を行った (100V、5 時間) 後、ゲルを洗浄、UV トランスイルミネーター上で撮影した。

5-2. フェノール性抗酸化物質に対する DPPH の量は、異なる比率のカテキンと DPPH (2, 4, 8, 16 倍量) の d6-アセトン溶液について NMR を測定し、スペクトルにカテキンのピークが消失し、キノン酸化体のみが生成する条件を検討して決定した。

(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)

1-1. ES 100 mg/kg と FL の併用投与群では投与開始 1 週目から有意な低値を示し、投与開始 2 週目において一般状態の悪化と 1 例の死亡例が確認されたことから、3 週目以降、ES の用量を 70 mg/kg に変更した。ES 単独投与群では肝臓の実重量及び相対重量は用量依存的に増加した。一方、FL を投与した群では、すべての群において体重の低値と、肝相対重量の有意な上昇が認められ、併用投与群ではそれぞれの ES 単独投与群に比しても有意な高値を示した。肝臓の病理組織学的検索の結果、FL を投与した群で

はいずれも空胞化を伴った小葉中心性の肝細胞肥大及び軽度の炎症細胞浸潤と単細胞壊死が認められた。さらに、ES 100/70 mg/kg との併用投与群ではそれらの変化に加え、辺縁部における軽度の oval cell の過形成と肝細胞の有糸分裂像が散見された。いずれの投与群においても *Ili1b* の発現量に変化は認められなかったものの、*Tnf* は ES 100/70 mg/kg と FL の併用投与群において対象群及び単独投与群に比して有意な高値 (いずれも $p < 0.05$) を示した。肝臓の PCNA 陽性細胞率は、ES 100/70 mg/kg 及び FL 単独投与群において対照群に比して上昇傾向が認められ、ES 10 又は 100/70 mg/kg と FL の併用投与群において有意な上昇が認められた (いずれも $p < 0.01$)。また、それぞれの ES 単独投与群と比しても有意な高値を示した (いずれも $p < 0.01$)。細胞周期関連因子の遺伝子発現解析の結果、*Ccnb1*、*Ccne1* 及び *Ccnd1* の発現レベルはその程度に違いはあるものの、いずれも PCNA 陽性細胞率と同様の傾向を示し、ES 1 と FL の併用投与群ではいずれの用量においても対照群に比して有意な上昇が認められた。ES の排泄に寄与する *Ugt1a1* は FL を投与した群ではいずれも対照群に比して有意な低値を示し (いずれも $p < 0.01$)、FL と ES 100/70 mg/kg の併用投与群では、単独投与群に比しても有意な低値を示した ($p < 0.01$)。また、代謝活性化に寄与する *Cyp1a2* の発現レベルは軽度ではあるものの FL 単独投与群及び FL と ES 10 mg/kg の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 (いずれも $p < 0.01$)、FL と ES 10 mg/kg の併用投与群では、単独投与群に比しても有意な高値を示した ($p < 0.01$)。一方、*Sult1a1* はいずれの投

与群においても有意な変化は認められなかった。肝臓における ES 特異的 DNA 付加体 ES-3'-8-dG、ES-3'-N²-dG 及び ES-3'-N⁶-dA は ES を投与したすべての群において検出され、いずれの付加体も ES の投与量依存的に増加した。一方、FL の併用投与によるこれら付加体量の変化は認められなかった。

1-2. 試験期間中の一般状態及び体重の推移では、KBrO₃ 500 ppm 群及び KBrO₃ 500 ppm と Alz の併用投与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、それぞれ対照群及び Alz 単独投与群に比して有意な低値 ($p < 0.05$) となった。また、NFT 2500 ppm 群及び NFT 2500 ppm と Alz の併用投与群では投与開始 1 週目から体重増加抑制が認められ、それぞれ対照群及び Alz 単独投与群に比して有意な低値 ($p < 0.01$) となった。Alz 単独投与群では対照群に比して相対腎重量の有意な上昇 ($p < 0.01$) が認められた。KBrO₃ 単独投与群では対照群に比して相対腎重量の用量依存的な高値 ($p < 0.05$ 及び 0.01) が認められた。さらに、KBrO₃ と Alz の併用投与群では、いずれの用量においても KBrO₃ 単独投与群よりも顕著な体重の低値と腎実重量及び相対重量の高値が認められた。NFT 単独投与では、相対腎重量の用量依存的な増加が認められ、500 ppm 群では増加傾向が、2500 ppm 群では対照群に比して有意な高値 ($p < 0.01$) を示した。さらに、NFT と Alz の併用投与群では、NFT 単独投与群と同様の傾向が認められ、いずれの用量においても単独投与群に比してより顕著な体重の低値と腎実重量及び相対重量の高値が認められた。KBrO₃ 又は Alz 単独投与群及び KBrO₃ と Alz の併用投与群の各群 3 例の解析結果を示す。腎皮質の DNA 中

8-OHdG レベルは、対照群に比して、Alz 単独投与群、KBrO₃ 250 ppm 群及び 500 ppm 群において上昇傾向が認められた。一方、Alz と KBrO₃ 250 ppm 又は 500 ppm の併用投与群ではいずれも対照群に比して有意な上昇が認められ ($p < 0.01$)、それぞれの用量の KBrO₃ 単独投与群に比しても有意な高値 (いずれも $p < 0.01$) を示した。gpt 変異体頻度 (MFs) は、対照群に比して KBrO₃ 250 ppm 群及び 500 ppm 群で用量依存的な上昇傾向が認められた。一方、Alz と KBrO₃ 250 ppm 又は 500 ppm の併用投与群においても用量依存的な増加傾向は認められたものの、それぞれの用量の KBrO₃ 単独投与群に比して変化は認められなかった。Spi MF は、対照群に比して KBrO₃ 250 ppm 群及び 500 ppm 群で用量依存的な上昇傾向が認められた。一方、KBrO₃ 500 ppm と Alz の併用投与群では対照群に比して有意な高値を示し、KBrO₃ 単独投与群と比較しても顕著な増加が認められた。Spi assay で得られた変異体について生じた欠失の大きさを確認した結果、Alz、KBrO₃ の単独投与群及び KBrO₃ 250 ppm と Alz の併用投与群では、主に小さいサイズの deletion 又は塩基置換が認められたのに対し、KBrO₃ 500 ppm と Alz の併用投与群ではこれらの変異に加え大きいサイズの deletion の増加が認められた。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 (西川)

Spi assay の結果、基礎食を与え、IQ または MeIQx を投与した群の Spi 変異体頻度 (MF) は、溶媒対照群に比較して有意に上昇した。また、高脂肪食を併用投与した群においても同様に、溶媒対照群に比較して

統計学的に有意に上昇した。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。今回認められた Spi 変異体の変異スペクトラム解析を行ったところ、基礎食を与え、IQ または MeIQx を投与した群では、溶媒対照群に比較して G および C の繰り返し配列における一塩基欠失の変異頻度が有意に上昇した。また、高脂肪食併用投与群においても同様の傾向が認められた。しかし、それぞれの変異頻度に高脂肪食摂取の影響は認められなかった。大腸粘膜を用いた *gpt* assay の結果、IQ または MeIQx の投与は何れの食餌群においても、それぞれの溶媒対照群に比較して *gpt* MF を有意に上昇または上昇させる傾向が認められた。変異スペクトラム解析の結果、G:C-A:T transition および一塩基欠失変異の発現が比較的高頻度に認められたが、溶媒対照群に比較して統計学的に有意な変化は認められなかった。また、MeIQx 投与群において、高脂肪食を与えた群では基礎食を与えた群に比較して G:C-A:T transition および一塩基欠失の変異頻度が上昇する傾向が認められたが、*gpt* MF および各種変異頻度ともに、何れのヘテロサイクリックアミン投与群においても食餌群間に統計学的有意な変化は認められなかった。Spi assay の結果、MeIQx 投与群における Spi MF は何れの食餌群においても高値傾向が認められたが、食餌群間における有意な変化は認められなかった。

3. 食品中の残留農薬の複合暴露影響に関する研究 (原田)

3-1. 試験期間中、全生存動物における体重は概ね順調に増加した。但し、投与用量 P0.6+M0.8 mg/kg/day における妊娠中期で

は、GD13 の体重が 0 mg/kg/day と比較して有意な低下を示した。各投与用量の若齢期では血清 ChE 活性は低く、脳 ChE 活性が高かった。一方、妊娠後期及び偽妊娠後期では血清 ChE 活性は有意な高値を示した。投与用量 0 mg/kg/day では、妊娠中期である C 群における PON-1 活性は低かった。妊娠期間中の PON-1 活性について B 群に対する相対比を算出したところ、C 群では 26% 低下、D 群では 4% 低下している事が分かった。血清中の E2 レベルは各投与用量で妊娠後期に有意な高値を示した。また、偽妊娠後期でも偽妊娠中期に比べ、有意な高値を示した。0 mg/kg/day、P0.3+M0.4 mg/kg/day では妊娠中期及び後期に CORT の有意な高値を示した。P0.6+M0.8 mg/kg/day では僅かに低値を示した。

3-2. ベンゾ[a]ピレン投与群では、無処置群と比較して変化は認められなかったが、メトキシクロルおよびデキサメタゾンの高用量群では、間質への細胞浸潤が見られ、媒体対照群と比較して炎症反応が亢進している可能性が示唆された。全ての被験物質投与群で媒体対照群と比較して、TMA 感作・惹起による IgE 陽性細胞数の有意な増加が認められた。特にデキサメタゾンの高用量でその増加が顕著であった。肺胞洗浄液中の好酸球数、好中球数、肥満細胞数および好塩基球数は各被験物質投与群で媒体対照群と比べて用量相関性の増加が認められた。特に好塩基球数はすべての剤の投与群で対照群と比較して有意な増加が認められた。肥満細胞数は、メトキシクロル投与群で媒体対照群に比べて有意な増加が認められた。肺門リンパ節中の記憶ヘルパー T 細胞数および各サイトカイン量 (IL-4、5、6、9、13、

17A)は記憶ヘルパーT細胞数やBALF中の炎症性細胞数と同様に、各被験物質投与群で媒体対照群と比較して用量相関性の増加が認められた。特にメトキシクロルとデキサメタゾンでその増加が顕著であった。

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. HepG2-XL24細胞を、6種のリガンド型AhR活性化物質(BaP、A α C、BNF、DMBA、Trp-P-1およびIND(各最大AhR活性化値の30~50%を示す濃度)とMC(0.1 μ M)、あるいは2種の非リガンド型AhR活性化物質(TBZとOMEは、それぞれ100 μ M)とMC(0.1 μ M)でそれぞれ24時間複合処理し、AhR依存的転写活性をluciferase assayにより解析した。その結果、リガンド型AhR活性化物質とMCによるAhR活性化は相加的にみられる一方、TBZおよびOMEはMCによるAhR活性化を相乗的に増強した。このことから、相乗的なAhR活性化はリガンド型AhR活性化物質同士の組み合わせでは起こらず、リガンド型と非リガンド型という異なるタイプのAhR活性化物質の組み合わせによって起こることが示唆された。次に、OMEやTBZと共通骨格を持つ計6種のベンズイミダゾール化合物(TBZ、OME、BNZ、CBD、BMLおよびLAN、1-100 μ M)とMC(0.1 μ M)を複合処理し、複合影響が構造的特徴に起因する可能性を追求した。その結果、BNZを除く単独でAhR活性化能を持つ5種のベンズイミダゾール化合物に、MCによるAhR活性化を濃度依存的に増強する作用があることが示された。また、AhRリガンドに対するTBZの作用を解析したところ、TBZは

INDによるAhR活性化を相乗的に増強したが、他のAhRリガンド(BNF、BaP、DMBA、A α CおよびTrp-P-1)との組合せでは明確な増強作用を示さなかった。

4-2. タール系合成着色料18種(いずれも10 μ M)をHepG2-XL24、H4IIE-XL9およびHepa-XL11細胞に処理し、6時間後におけるAhR活性化の有無を検索した。その結果、赤色101号、赤色104号、赤色105号、赤色106号、赤色213号、DMYおよび緑色3号の7化合物にAhR活性化能が認められた。なお、赤色色素の多くでAhR活性化能に種差があることが示唆された。そこで、赤色色素およびその類縁化合物計5種類について、ヒト、ラットおよびマウスから樹立したレポーター細胞株を用い、各動物のAhRに対する活性化能を比較検討した。その結果、ヒト細胞株では赤色104および赤色105号に、また、ラットおよびマウス細胞株では赤色101号に顕著なAhR活性化能がそれぞれ認められた。さらに、レポーター細胞で見られたAhR活性化が、各動物の細胞種に依存しているか否かを明らかにするため、各動物由来の数種の細胞株を用いて、AhR標的分子の誘導(CYP1A1遺伝子の誘導)を指標として各動物細胞種間での相違を検討した。その結果、ヒト、ラットおよびマウスの複数の細胞株において、AhR活性化測定結果と同様のCYP1A1遺伝子の発現誘導が示された。

5. フェノール性化合物の複合影響(福原)

5-1. 酸化酵素によるカテキンからキノンへの酸化反応を一電子酸化剤のDPPHによって再現できるかNMRで確認した。その結果、カテキンに対して4倍量のDPPHを用い

ることで、ほぼ全てのカテキンがキノン体へ酸化されることがわかった。そこで、エッペンドルフチューブ中、この条件でキノンへの酸化を行い、さらにこの溶液に pBR322DNA と NADH を添加してキノン酸化体による DNA 切断反応を行った。その結果、カテキンは DPPH による酸化の後、NADH を添加することで DNA の切断反応が進行することが確認された。この切断反応はカテキンの濃度に依存して増強した。また、この切断反応は DPPH と NADH の両方を添加することで進行することがわかった。この結果より、カテキンは DPPH による酸化によって生成したキノン体が NADH 存在下、酸素を還元活性化して活性酸素を発生し、DNA を切断することがわかった。そこで次に緑茶抽出物の主なポリフェノールで健康被害が最も多いエピガロカテキンについて、同様の条件で DNA 切断実験を行った。その結果、エピガロカテキンも DPPH と NADH 存在下で DNA 切断反応が進行した。反応はエピガロカテキンの濃度に依存して増強すること、また、DPPH によってキノンへ酸化させても NADH が存在しないと反応が進行しないことがわかった。次に、エピガロカテキンの切断活性の強さをカテキンと比べてみた。pBR322DNA はスーパーコイルの Form I が切断が入るとオープンサーキュラーの Form II になり、さらに切断されるとリニアの Form III に転換される。カテキンは濃度依存的に Form II の生成量が増えてくるが、2mM でも Form I が残っている。一方、エピガロカテキンは高濃度では Form II への転換とともに Form III の生成が確認され、Form I は完全に消失した。この結果より、エピガロカテキンのキノン体への酸化を伴

う DNA 切断反応はカテキンと比べて非常に強力であることが明らかとなった。

5-2. キノン酸化体の生成と NADH が関与する DNA 切断反応がどのような活性酸素種によって進行しているか明らかにするため、カテキンおよびエピガロカテキンによる DNA 切断反応に対する活性酸素消去剤の影響を検討した。活性酸素の消去剤としてスーパーオキシドを過酸化水素に還元する SOD、過酸化水素を水に還元するカタラーゼ、ヒドロキシルラジカルを水に還元する DMSO を DNA 切断反応の系に添加したところ、全ての消去剤は DNA 切断を完全に抑制した。この結果は、これらの活性酸素の中で最も酸化力の強いヒドロキシルラジカルがスーパーオキシドと過酸化水素を経由して生成し、それが DNA に対し強力な切断活性を示していることを示している。

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)

1-1. これまでに我々は、高用量の ES が細胞増活性作用を有することを明らかにしている。その機序については不明な点も多いが、直接的な細胞増殖作用が示唆されている。一方、FL は肝組織傷害に引き続き生じる代償性の細胞増殖活性作用を有することが知られており、本研究においても空胞化を伴った小葉中心性の肝細胞肥大及び軽度の炎症細胞浸潤は FL を投与したすべての群で認められた。このことから、低用量の ES と FL の併用投与群で認められた細胞増殖は、主に FL 投与による代償性の増殖によるものと考えられた。一方、高用量の ES と FL の併用投与群では、TNF の遺伝子発現レ

ベルの有意な上昇も認められ、TNF が組織傷害後に生じる細胞増殖の誘発に寄与することを考慮すると、同群で認められた PCNA 陽性細胞率の顕著な上昇には、高用量の ES による直接的な細胞増殖活性作用に加えて、肝組織傷害の悪化に伴うより強い代償性の細胞増殖が寄与したことが示唆された。さらに、FL 併用投与が ES の代謝に及ぼす影響を明らかにするため、ES の代謝酵素の遺伝子発現レベルを解析した。その結果、FL の投与により *Sult1a1* の発現に変化はなかったものの、*Cyp1a2* の発現上昇と *Ugt1a1* の発現低下が認められたことから、FL の併用投与は ES の解毒・排泄を阻害し、代謝活性化を促進する可能性が示唆された。しかしながら、ES 特異的 DNA 付加体の形成量において FL 併用投与の影響は認められず、いずれの投与量においても ES の単独投与群と同程度の形成量であった。このことから、FL 投与で生じた種々の代謝酵素の遺伝子発現変動は ES 特異的 DNA 付加体の形成に影響しなかったと考えられた。

我々はこれまでに、ES の突然変異誘発性に、特異的 DNA 付加体の形成に加えて、細胞増殖活性の亢進が寄与することを明らかにしている。従って、本研究で認められた FL 併用投与による細胞増殖活性における複合影響は ES の突然変異誘発に大きく影響することが予想される。

1-2. 食品中化学物質の中には酸化ストレスを誘発する物質が多数あり、それらの複合影響が懸念されている。酸化ストレスは時に酸化的 DNA 損傷を引き起こし、それを引き金に遺伝子突然変異を誘発すると考えられている。しかし、酸化的 DNA 損傷と遺伝子突然変異との詳細な関連性は未だ不明で

あり、それらの複合影響についてもほとんど報告がない。本研究では、酸化的 DNA 損傷は何れも引き起こすものの、異なる変異スペクトラムによる遺伝子突然変異を誘発する KBrO_3 及び NFT、また変異を誘発しない Alz を用いて、酸化的 DNA 損傷による遺伝子突然変異誘発機序の解明並びにそれらの複合影響の詳細な検討を目的としている。 KBrO_3 及び Alz の併用投与は 8-OHdG レベルの顕著な上昇を引き起こし、 KBrO_3 単独投与群に比しても有意な高値を示したことから、 KBrO_3 と Alz の併用投与により酸化的 DNA 損傷が加算的に蓄積することが明らかになった。*in vivo* 変異原性の検索では、2 剤の併用投与により、*gpt* MFs に変化はなかったものの、高用量の KBrO_3 500 ppm と Alz の併用投与群において Spi^- MFs の顕著な上昇が認められた。さらに、同群では小さいサイズの deletion 又は塩基置換発現頻度の増加に加えて、 KBrO_3 単独投与群では認められなかった大きいサイズの deletion の頻度が顕著に増加したことから、 KBrO_3 と Alz の併用投与による酸化的 DNA 損傷の蓄積が、欠失サイズの増加を伴った遺伝子突然変異頻度の加算的な増加を引き起こしたと考えられた。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 (西川)

本研究では、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いて高脂肪食摂取がヘテロサイクリックアミンの *in vivo* 変異原性に与える影響を検討してきた。F344 系 *gpt delta* ラットに粗脂肪含量 32% の高脂肪食を 4 週間自由摂取させたところ、本実験条件下でラット生体に高脂肪食摂取の影響

が生じていることを昨年度に報告した。本年度は、昨年度実施した肝臓における *gpt* assay およびその変異体スペクトラム解析に引き続き、*Spi* assay および *Spi* 変異体スペクトラム解析を実施したところ、IQ や MeIQx 投与は何れの食餌群においても *Spi* MF を上昇させたが、その程度に高脂肪食摂取の影響は認められず、さらに、*Spi* 変異体の変異スペクトラム解析による各種変異頻度に対しても高脂肪食摂取の影響は認められなかった。大腸粘膜を用いた *gpt* assay の結果、IQ や MeIQx の投与は *gpt* MF を有意に上昇または上昇させる傾向を示し、変異スペクトラム解析の結果、G:C-A:T transition 変異および一塩基欠失変異の発現が比較的高頻度に認められた。IQ はラット大腸において発がん性を示すことが知られている。さらに、Big blue ラットを用いた検討から、IQ は大腸粘膜において変異原性を示すことが報告されている。本研究結果はこれらを支持するものとなった。一方、高脂肪食の摂取は IQ による *in vivo* 変異原性の程度に対して顕著な影響は与えなかった。さらにその変異パターンに関しても、有意な変化は認められなかったことから、本実験条件下における高脂肪食の摂取は IQ のラット大腸における *in vivo* 変異原性に影響を与えないものと考えられた。また、MeIQx 投与群においては、高脂肪食摂取により G:C-A:T transition および一塩基欠失の変異頻度を上昇させる傾向が認められたが、これら変化は何れも統計学的に有意ではなかったことから、その意義に関しては明らかとはならなかった。今回実施した 4 週間の高脂肪食摂取により、肝細胞の軽度な脂肪変性が認められ、ラット生体に一定の影響が生じてい

たと考えられたものの、顕著な体重増加や肝細胞への高度な脂肪滴の蓄積が認められなかったことから、今後はより長期間にわたり高脂肪食を摂取させ、生体に対してより顕著な高脂肪食摂取の影響が生じる条件下での検討が必要であると考えられた。

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. 若齢期、成熟期、妊娠中期及び妊娠後期の雌ラットに対し、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、妊娠期中で死亡を含む重篤な神経症状が発現することを確認した。妊娠期間中でも中期では後期と比較して、強い毒性を発現することを認めた。妊娠後に次いで、成熟期で発現する毒性は強く、若齢期では弱かった。妊娠期の体重増加による投与量の増加が毒性を強く発現させるのではなく、妊娠期の生理学的変化が薬物に対する感受性を変化させることが示唆された。投与用量 0 mg/kg/day における妊娠期の PON-1 活性を、成熟期に対する相対比で算出したところ、妊娠中期では 26%低下、後期では 4%低下している事が分かった。投与用量 P0.6+M0.8 mg/kg/day における偽妊娠動物でも、後期に比べて中期で活性が低下していた。妊娠期、特に妊娠中期における生理的な PON-1 活性の低下に加え、有機リン系農薬の暴露による直接的な低下が毒性を増強させているのではないかと考えた。妊娠期間中の Estradiol (E2) レベルは分娩直前まで増大するが、妊娠後期では E2 は最も高い値を示す。当該試験においても、各投与量の妊娠後期及び偽妊娠後期で高い値を示した。また、投与用量 0 mg/kg/day と P0.6+M0.8

mg/kg/day の PON-1 及び E2 レベルを比較すると、何らかの相関性が疑われるものの、その関係を明らかにすることは出来なかった。血清中の Corticosterone (CORT) は当該試験における投与用量 0 mg/kg/day でも妊娠期で高い値を示すことを確認した。この時期のストレスに対する抵抗性は高いと考えた。一方、P0.6+M0.8 mg/kg/day では妊娠期で血清 CORT の値が低下した。この変化は被験物質投与による一般状態の悪化によるストレス抵抗性の低下、あるいは生理学的変化によるものと考えた。

3-2. 免疫毒性評価候補農薬の選定

平成 26 年度の本研究では、今後の当該研究に遂行に向け、平成 25 年度に選定した候補農薬の中から多環芳香族炭化水素化合物 (ベンゾ[a]ピレン)、有機塩素系化合物 (メトキシクロル) およびステロイド系抗炎症薬 (デキサメタゾン) を選択し、各被験物質を妊娠後期の母動物に単剤暴露後、生まれてきた児動物の呼吸器アレルギーに及ぼす影響を初年度に確立した吸入アレルギー実験モデルを用いて調査した。本研究では、免疫抑制作用を有するベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルないしデキサメタゾンを妊娠動物に投与し、生まれてきた児動物の免疫機能を調査した。具体的には、成熟後の児動物にトリメリト酸無水物を経皮感作投与および吸入惹起暴露することによって呼吸器アレルギーを惹起させた。その結果、肺組織への炎症細胞の浸潤や肺門リンパ節や肺胞洗浄液中のリンパ球数、炎症採細胞数、サイトカイン産生量がコントロール群と比較して有意に増加し、呼吸器アレルギー反応に対する増強効果が認められた。上記結果より、ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロル

およびデキサメタゾンの妊娠動物への投与により免疫攪乱が起こり、児動物の免疫系に免疫亢進作用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。

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. 本研究から、TBZ に認められた AhR 活性化増強作用は、弱いながらも単独で非リガンド型 AhR 活性化能を持つベンズイミダゾール化合物に共通な作用であること、また、特定の AhR リガンドとの組み合わせ時に起こることが示された。このことから、ベンズイミダゾール化合物は、AhR 活性化に関するシグナル伝達系の活性化、AhR 活性化に関わる転写共役因子のリクルート、活性化 AhR の安定化、あるいはエピジェネティックな変化などを起こすことで、リガンド型 AhR 活性化物質による活性化を増強させたと考えられる。しかし、この増強作用はある種のリガンド型 AhR 活性化物質に対して特に強く見られたことから、その機構や毒性学的意義付けについてはさらなる検討が必要である。

4-2. 合成着色料 18 種より、AhR 活性化能を有する化合物を 7 種、そのうち、動物種差がみられる化合物 3 種を同定した。赤色 105 号は、マウス AhR およびラット AhR に比べてヒト AhR を、逆に赤色 101 号はマウス・ラット AhR を、それぞれ効率的に活性化することが明らかになった。これら化合物は、当該レポーター細胞株の親株 (ヒト HepG2、ラット H4IIE およびマウス Hepa1c1c7) のみならず、対応する同種の他細胞株においても AhR 標的遺伝子 (CYP1A1