

遺伝子)の発現を誘導したことから、上記応答性の差は動物種に依存していることが確認された。

5. フェノール性化合物の複合影響 (福原)

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。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。複合影響の観点から健康食品による第 I 相薬物代謝酵素の誘導は、フェノール性抗酸化物質においてはキノン酸化体の生成を伴う毒性の発現が懸念される。そこで、フェノール性抗酸化物質の毒性を明らかにすることを目的として、化学的な反応モデルによるカテキンからのキノンへの酸化と活性酸素毒性の構築を試みた。第 I 相薬物代謝酵素によるキノンへの酸化は化学的にはガルビノキシルラジカルや DPPH などの一電子酸化剤を用いることによって再現することができた。生成するキノン酸化体は不安定で単離生成することが困難であるので、NMR のサンプルチューブの中で反応を行い、そのままスペクトルを測定することで、キノン酸化体の生成を確認した。その結果、カテキンに対して 4 倍量の DPPH を用いるとほぼ定量的にキノン酸化体が生成することがわかった。そこで、この反応系をエッペ

ンドルフチューブで行い、そこに pBR322DNA と NADH を添加してインキュベートし、アガロースゲル電気泳動によって解析したところ、pBR322DNA の切断反応が進行していることが確認できた。また、発生している活性酸素種を検討したところ、ヒドロキシルラジカルによる DNA 鎖の切断が進行していることがわかった。以上の結果より、フェノール性抗酸化物質がキノン体へと酸化されると、NADH による一電子還元反応によって生成するセミキノンラジカルアニオンが酸素を還元してスーパーオキシドアニオンラジカルが発生することがわかった。また、スーパーオキシドアニオンラジカルは過酸化水素を経由してヒドロキシルラジカルを生成することで DNA 鎖への切断反応が進行していることが明らかとなった。

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)

1-1. ES と FL の併用投与は、マウス肝臓における細胞増殖活性を加算的に上昇させることが明らかとなった。従って、FL 併用投与は ES が誘発する突然変異頻度を増加させることが予想された。

1-2. KBrO₃ に対する Alz の併用投与によりラット腎皮質において酸化的 DNA 損傷が加算的に蓄積し、その結果として欠失サイズの増加を伴う遺伝子突然変異が誘発される可能性が示唆された。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 (西川)

4 週間の高脂肪食摂取は IQ および MeIQx 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。

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. 有機リン系農薬パラチオンとメタミドホスの複合暴露では、妊娠期で最も毒性は強く、成熟期、若齢期の順に毒性は軽減した。偽妊娠動物にこれらの有機リン系農薬を複合投与すると妊娠期と同様の症状を示した。妊娠期で認められた強い毒性症状は、体重増加に伴う投与量の増加によるものではなく、ChE 及び PON-1 活性、血清 E2 あるいは CORT のレベルが変化する、生理学的変動に起因することが示唆された。有機リン系農薬による PON-1 活性の直接的な抑制作用に酸化ストレスが関与することが報告されており、また妊娠期では各種代謝酵素の分泌量及び活性量が増加することが知られているため、今後は、これらについての詳細な検討を行う。

3-2. 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) 及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。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を測定した結果、ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロル及びデキサメタゾンの妊娠期における反復投与は、呼吸器アレルギー反応に対して増強効果を示すことが示唆された。

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相乗的な AhR 活性化はリガンド同士の組合せでは起こらず、リガンド型化合物と非リガンド型 AhR 活性化物質の組合せで起こる場合があること、②合成着色料のなかには、AhR 活性化能を有する化合物が存在し、その活性化には動物種差を示すものがあることを明らかとした。

5. フェノール性化合物の複合影響 (福原)

フェノール性抗酸化物質は第 I 相薬物代謝酵素によってキノン体へと酸化されると、生体分子との付加や酸化ストレスを引き起こす可能性がある。しかしながら、非常に不安定なキノン酸化体について毒性を評価することは難しい。そこで、化学的な系でキノンへの酸化を伴う毒性の再現を試みた。一電子酸化剤によってキノン酸化体を生成させた後、この反応系に NADH と pBR322DNA を添加すると、活性酸素の生成による DNA 鎖の切断反応が進行することがわかった。この系を利用してカテキンとエピガロカテキンについて毒性を再現したところ、肝炎が報告されているエピガロカテキンはカテキンよりも非常に強力に DNA 切断反応が進行した。この結果より、フェノール性抗酸化物質はヒトではキノン酸化体を經由する発現機構で毒性を発現している可能性が示唆された。この反応系は健康食品やサプリメントなどに含まれる薬物代謝酵素を誘導する化合物と、フェノール性抗酸化物質と

の複合影響を評価する試験系としての活用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukuyama, T., Nishino, R., Kosaka, T., Watanabe, Y., Kurosawa, Y., Ueda, H., and Harada, T. Effects of prior oral exposure to combinations of environmental immunosuppressive agents on ovalbumin allergen-induced allergic airway inflammation in Balb/c mice. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 36(4):261-270, 2014.

2) 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*, 11(4): 359-366, 2014.

3) Takizawa, Y., Nakata, R., Fukuhara, K., Yamashita, H., Kubodera, H., Inoue, H., The 4'-hydroxyl group of resveratrol is functionally important for direct activation of PPAR α , *PLoS One*, 10, e0120865 (2015)

2. 学会発表

1) 高須伸二, 石井雄二, 木島綾希, 横尾諭, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子, 梅村隆志: ヘテロサイクリックアミンが誘発する *gpt delta* ラット肝臓の *in vivo* 変異原性に対する高脂肪食摂取の影響 第 41 回日本毒性学会学術年会 2014 年 7 月

2) 高須伸二, 石井雄二, 木島綾希, 横尾諭, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子, 梅村隆

志: *gpt delta* ラット大腸におけるヘテロサイクリックアミン誘発 *in vivo* 変異原性に対する高脂肪食の影響 日本環境変異原学会第 43 回大会 2014 年 12 月

3) 元村 淳子、首藤 康文、藤江 秀彰、小松 豊、林 宏一、大塚 亮一、山口 悟、小嶋 五百合、青山 博昭、原田 孝則: 有機リン剤の複合暴露影響の Life stage による変化-無処置雌ラットを用いた感受性変化に影響を及ぼす要因についての検討 第 41 回日本毒性学会 2014 年 7 月

4) 長澤聖子、関本征史、田崎愛佳、西川秋佳、梅村隆志、根本清光、吉成浩一、出川雅邦: リガンドを介した AhR 活性化に及ぼすベンズイミダゾール類の複合影響 フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー 2014 年 9 月

5) 関本征史、村木俊文、吉成浩一、根本清光、出川雅邦: 食品添加物によるヒト、ラットおよびマウスの芳香族炭化水素受容体の活性化 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月

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

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：食品中化学物質複合投与の *in vivo* 変異原性への影響

研究分担者： 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究協力者： 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

実験 1 では、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、FL を投与したすべてのマウス肝臓では、空胞化を伴った小葉中心性の肝細胞肥大と軽度の炎症細胞浸潤が認められ、併用投与群では ES 単独群に比して、PCNA 陽性細胞率及び細胞周期関連因子の遺伝子発現レベルが付加的に上昇することを明らかにした。また、FL の投与はマウス肝臓において ES に寄与する代謝酵素の遺伝子発現変動を引き起こしたものの、ES 特異的 DNA 付加体量に FL 併用投与の影響は認められなかった。以上より、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。実験 2 では、酸化 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トイン (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。KBrO₃ と Alz 併用投与では、KBrO₃ 単独投与群において上昇傾向であった腎皮質における 8-OHdG レベルが Alz の併用投与により対照群及びそれぞれの用量の KBrO₃ 単独投与群に比して有意に上昇した。また、KBrO₃ の投与で *gpt* 及び Spi 変異体頻度 (MFs) の用量依存的な上昇傾向が認められたが、Alz を併用投与すると *gpt* MFs には影響しなかったものの、Spi MFs は対照群に比して有意な上昇を引き起こし、KBrO₃ 単独投与群では認められなかった大型の欠失変異頻度の増加が認められた。以上より、KBrO₃ に対して Alz の併用投与は酸化 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。

A. 研究目的

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。

実験 1 では、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いる。本研究では、遺伝毒性物質として、ハーブやスパイス等に含まれる香料成分であるエストラゴール (ES) に着目し、前年度、併用投与のための至適用量を探るため、種々の濃度の ES を *gpt delta* マウスに投与し、投与量と肝臓における ES 特異的 DNA 付加体量ならびに突然変異頻度の関係を明らかにした。これらの結果をもとに、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。そこで実験 2 では、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)、ニトロフラントイン (NFT) 及びアリザリン (Alz) に着目した。これらの物質は何れも腎 DNA 中の 8-OHdG レベルを上昇させることが知られているが、*in vivo* 変異原性試験の結果、KBrO₃ は single base deletion、NFT は GC-TA 及び GC-CG transition 変異頻度の増加を引き起こすのに対し、Alz では変異頻度の増加は認められない。前年度は、これらの単剤を *gpt delta* ラットに投与し、毒性発現部位である腎皮質における 8-OHdG レベルの用量依存的な増加とその結果生じる遺伝子突然変異の有無や変異スペクトラムが異なることを確認した。本年度は 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。

B. 研究方法

<実験 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。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 又は 3 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサー

ビス社（東京）のソフトチップを用い、週2回交換を行った。*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 *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、各臓器から抽出した DNA をヌクレアーゼ P1 及びアルカリフォスファターゼ処理によりデオキシヌクレオシドまで分解し、ES-3'- N^2 -dG、

ES-3'-8-dG 及び ES-3'- N^6 -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 ^{15}N 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。LC では 0.001% ギ酸/アセトニトリルを移動相とし、C18 カラム（Wakosil C18）を用いて分離した。MS/MS（Waters-Micromass 社製、Quattro Pt）はエレクトロスプレーイオン化法を用い、ポジティブイオンモードで測定を行った。各付加体の検出に用いたブリーカーサイオン及びフラグメントイオンは、ES-3'- N^2 -dG 及び ES-3'-8-dG では 414>298、ES-3'- N^6 -dA では 398>282 とした。MRM クロマトグラムより得られたピーク面積から内標準法によって各付加体の定量値を算出した。

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、アガロースゲル電気泳動による確認と、吸光度測定による濃度の算出を行った。得られた RNA は 0.02 ng/ μL に調整した後、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* (Mm03053893_gH)、*Ccnd1* (Mm00432359_ml) 及び *Ccne1* (Mm00432367_ml)、炎症性サイトカインである *Il1b* (Mm01336189_ml) 及び *Tnf* (Mm00443258_ml)、ES の代謝に寄与する *Cyp1a2* (Mm00487224_ml)、*Sult1a1* (Mm01132072_ml) 及び

Ugt1a1(Mm02603337_ml)について検索した。

PCNA の免疫組織化学染色は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋された肝組織標本を用いて切片を作成した。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンの後、3% H₂O₂ にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、1 次抗体として DAKO 社製抗 PCNA マウスモノクローナル抗体をそれぞれ用い、4°C で終夜インキュベートした。Phosphate-buffered saline にて洗浄の後、2 次抗体としてニチレイバイオサイエン社製ヒストファイン シンプルステイン (マウス第一抗体用) にて 30 分間インキュベートした。発色には diaminobenzidine を用いた。

(統計学的処理方法)

体重、肝重量、PCNA 陽性細胞率及び各遺伝子の発現レベルの統計学的処理は、Tukey の多重比較を用い、有意水準は 5%未満とした。

<実験 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㈱から購入し、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 又は 3 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。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静脈に沿ってハサミを入れて皮質と髓質を分けて採取し、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。約 80 mg の組織から和光純薬社製 DNA Extractor[®] WB Kit を用いてヨウ化ナトリウム法により DNA を抽出した。得られた DNA は和光純薬社製 8-OHdG Assay Preparation Reagent Set を使用し、nuclease P1 及び alkaline phosphatase による酵素処理に

よってデオキシヌクレオシドまで分解した。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) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。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。

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 Genra 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。

(統計学的処理方法)

体重、臓器重量、8-OHdG レベル及び遺伝子突然変異頻度の統計学的処理は、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 Tukey の多重範囲検定により行った。

(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。

C. 研究結果

<実験 1> 投与開始 1 週目において、対照群のマウス一例で誤投与に起因すると考

えられる死亡例が認められた。試験期間中、FLを投与した群ではいずれも投与開始1週目から体重増加抑制が認められた。さらに、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に変更した結果、一般状態及び体重の回復が認められた。最終体重及び肝重量をTable 1に示す。ES単独投与群では最終体重に変化は認められなかったものの、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 (Fig. 1-D-F)。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 (Fig. 1-F)。一方、ESの単独投与群ではいずれも顕著な変化は認められなかった (Fig. 1-B-C)。炎症性サイトカインの遺伝子発現解析の結果をFig. 2に示す。いずれの投与群においても *Il1b* 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陽性細胞率及び細胞周期関連因子の遺伝子発現解析の結果をFig. 3に示す。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の代謝に寄与する酵素の遺伝子発現解析の結果をFig. 4に示す。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 ($p < 0.01$) (Fig. 4-A)。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 ($p < 0.01$) (Fig. 4-B)。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 (Fig. 4-C)。

肝臓におけるES特異的DNA付加体量をFig. 5に示す。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。

<実験 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。これらの群の摂餌量及び摂水量は投与期間を通じて対照群とほぼ同等の値を示したことから、同群で認められた体重増加抑制は KBrO₃ の投与に起因するものと考えられた。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。これらの群では投与期間を通じて摂餌量及び摂水量の低値が認められたことから、同群で認められた体重増加抑制は高用量の NFT に対する忌避によるものと考えられた。

最終体重及び腎重量を Table 2 に示す。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。同群では最終体重の低値が認められたのに対し、腎実重量の上昇が認められたことから、腎重量の増加は Alz 投与に起因する変化と考えられた。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、200 ppm 群では体重の低値が、500 ppm 群では有意な低値 ($p<0.01$) を示したのに対し、腎実重量は用量依存的に増加したことから、腎重量の増加は KBrO₃ 投与に起因する変化と考えられた。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

たことから、KBrO₃ 及び Alz の投与による腎重量への影響が加算的に生じたものと考えられた。

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。2500 ppm 群では忌避に伴う最終体重の顕著な低値が認められたのに対し、500 ppm 群では最終体重に変化はないものの腎実重量の増加が認められたことから、これらの群で認められた腎重量の増加は NFT 投与に起因する変化と考えられた。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ことから、NFT 及び Alz の投与による腎重量への影響が加算的に生じたものと考えられた。

以下は、平成 26 年度に実施した 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 レベルを Fig. 7 に示す。対照群 ($0.46 \pm 0.20/10^5 \text{dG}$) に比して、Alz 単独投与群 ($0.55 \pm 0.10/10^5 \text{dG}$)、KBrO₃ 250 ppm 群 ($0.79 \pm 0.29/10^5 \text{dG}$) 及び KBrO₃ 500 ppm 群 ($0.82 \pm 0.11/10^5 \text{dG}$) において上昇傾向が認められた。一方、Alz と KBrO₃ 250 ppm ($1.57 \pm 0.06/10^5 \text{dG}$) 又は KBrO₃ 500 ppm ($1.72 \pm 0.38/10^5 \text{dG}$) 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 assay の結果を Table 3 に示す。*gpt* 変

異体頻度 (MFs) は、対照群 ($0.69 \pm 0.31 \times 10^{-5}$) に比して KBrO₃ 250 ppm 群 ($1.20 \pm 0.50 \times 10^{-5}$) 及び KBrO₃ 500 ppm 群 ($1.53 \pm 0.42 \times 10^{-5}$) で用量依存的な上昇傾向が認められた。一方、Alz と KBrO₃ 250 ppm ($0.66 \pm 0.78 \times 10^{-5}$) 又は 500 ppm ($1.27 \pm 0.09 \times 10^{-5}$) 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 assay の結果を Table 4 に示す。Spi MF は、対照群 ($0.26 \pm 0.12 \times 10^{-5}$) に比して KBrO₃ 250 ppm 群 ($0.41 \pm 0.07 \times 10^{-5}$) 及び 500 ppm 群 ($0.63 \pm 0.43 \times 10^{-5}$) 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 ($1.07 \pm 0.19 \times 10^{-5}$, $p < 0.01$) 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、PCR 増幅により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 (Table 5)。

D. 考察

<実験 1> *gpt delta* マウスを用いて ES に対する FL 併用投与の影響を検討した結果、肝臓の細胞増殖活性が加算的に上昇することが明らかとなった。これまでに我々は、高用量の ES が細胞増殖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。本研究においても高用量の ES 投与群において PCNA 陽性細胞率ならびに細胞周期関連因子の遺伝子発現レベルの上昇が認められたが、何れの用量においても組織障害は認められていない。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、FL の肝傷害に加えて軽度の oval cell の過形成が認められた。また、同群では投与期間中、一般状態の悪化及び体重の低下が認められており、肝傷害の悪化を示唆するものと考えられた。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。

ES は CYP1A2 による水酸化、Sult1a1 による硫酸抱合の後、脱硫酸によりカルボカチオンとなり DNA 付加体を形成し、遺伝毒性を発揮する。また、その排泄には UGT や GST といった第二相酵素が寄与する。そこで、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、これら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。今後、マウス肝臓における *in vivo* 変異原性試験を実施し、FL の併用投与による細胞増殖活性の上昇が、低用量及び高用量の ES の突然変異誘発性に及ぼす影響を明らかにする予定である。

<実験 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。本年度は、昨年度に検討した各用量を用いて、F344 系 *gpt delta* ラットに KBrO_3 あるいは NFT を投与、さらに Alz をそれぞれ併用投与する実験を終了した。本年度は KBrO_3 と Alz の併用投与について、酸化的 DNA 損傷レベル及びレポーター遺伝子の突然変異頻度における複合影響を解析した。

酸化的 DNA 損傷の指標である 8-OHdG レベルは、 KBrO_3 及び Alz 単独投与によりそれぞれの発がん標的部位或いは毒性発現部位である腎皮質において上昇傾向が認められ、平成 26 年度の研究結果と一致した。一方、これら 2 剤の併用投与は 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、平成 26 年度の結果と同様に、 KBrO_3 単独投与群で *gpt* 及び Spi MFs の用量依存的な増加が認められたのに対し、Alz 単独投与群でこれらの変化は認められなかった。一方、2 剤の併用投与群では、*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。今後、各群残り2例についての解析、さらに *gpt* 変異体についてもスペクトラム解析を実施し、2剤の併用投与が変異スペクトラムに与える影響を明らかにする。また、NFT と Alz の併用投与に関しても同様の検索を行い、異なる変異スペクトラムを示す KBrO_3 と NFT に対する Alz 併用投与の複合影響の差異を比較検討する。

E. 結論

<実験1> ES と FL の併用投与は、マウス肝臓における細胞増殖活性を加算的に上昇させることが明らかとなった。従って、FL 併用投与は ES が誘発する突然変異頻度を増加させることが予想された。

<実験2> KBrO_3 に対する Alz の併用投与によりラット腎皮質において酸化的 DNA 損傷が加算的に蓄積し、その結果として欠失サイズの増加を伴う遺伝子突然変異が誘発される可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

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。）

該当なし。

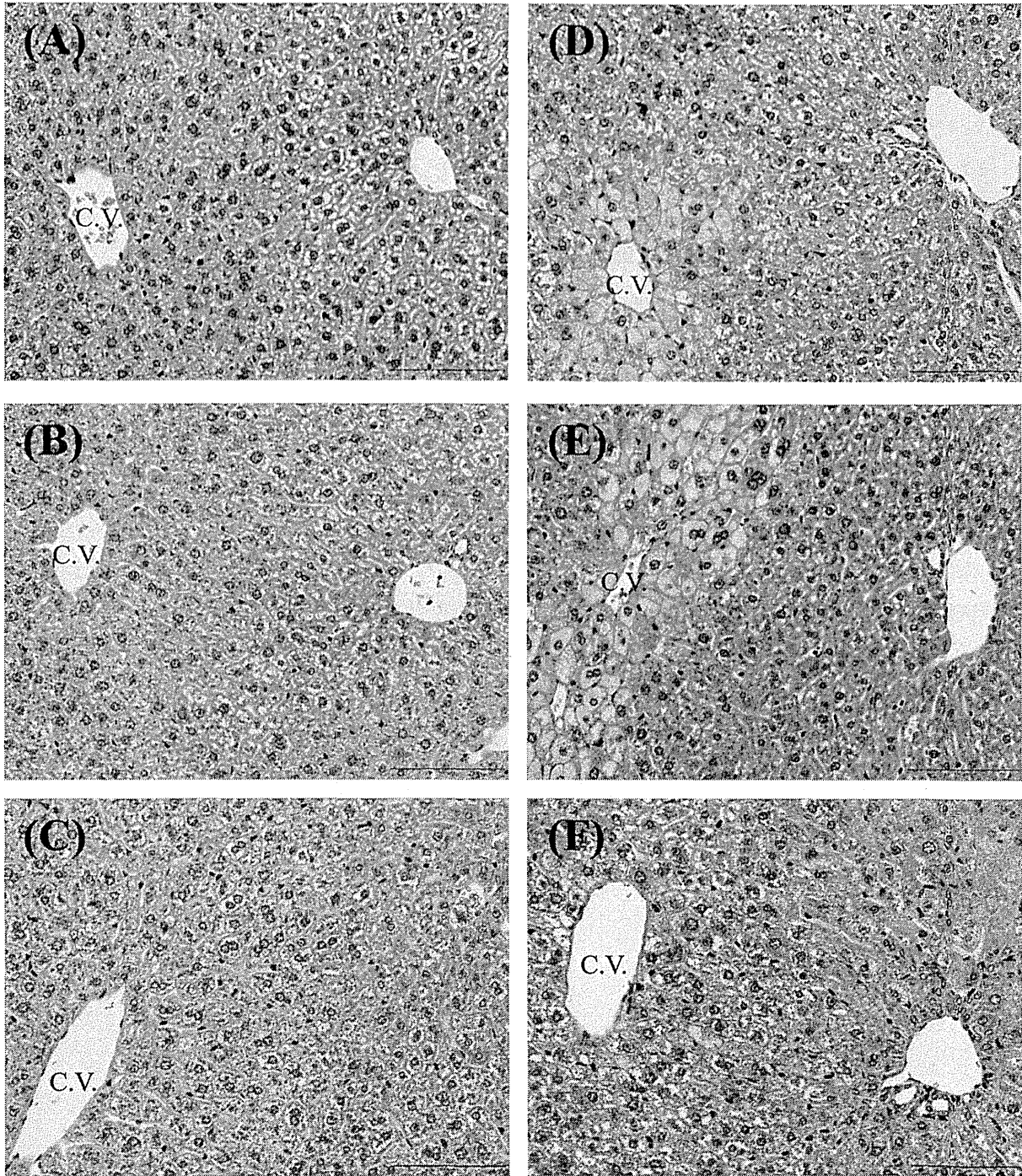


Fig. 1. Histopathological changes in the livers of gpt delta mice in the control (A), ES 10 mg/kg (B), ES 100 mg/kg (C), FL (D), ES 10 mg/kg + FL (E) and ES 100/70 mg/kg + FL (F) groups

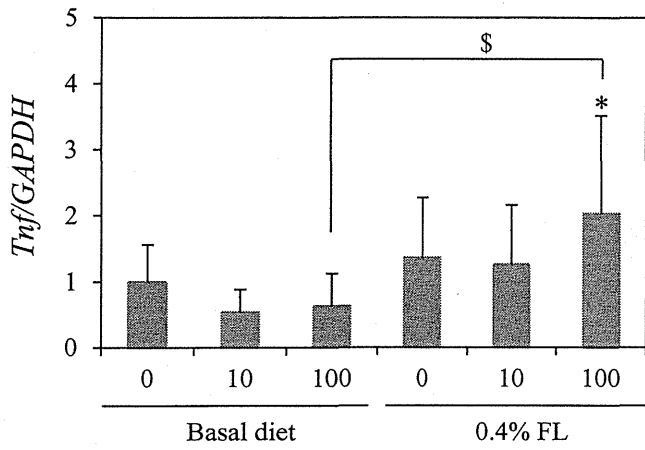
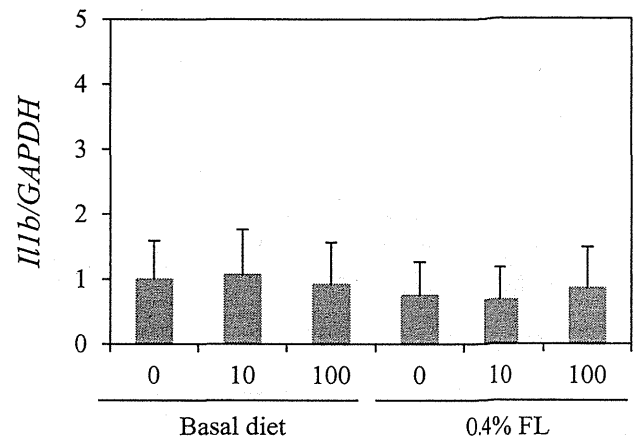
(A)**(B)**

Fig. 2. Changes in mRNA levels of cytokines, *Tnf* (A) and *Il1b* (B), in the livers of *gpt* delta mice treated with ES and/or FL for 4 weeks. Data represent means \pm S.D. (n = 4 or 5). *: $p < 0.05$ vs. Basal diet + Vehicle group. \$: $p < 0.05$ vs. Basal diet + ES 100 mg/kg group

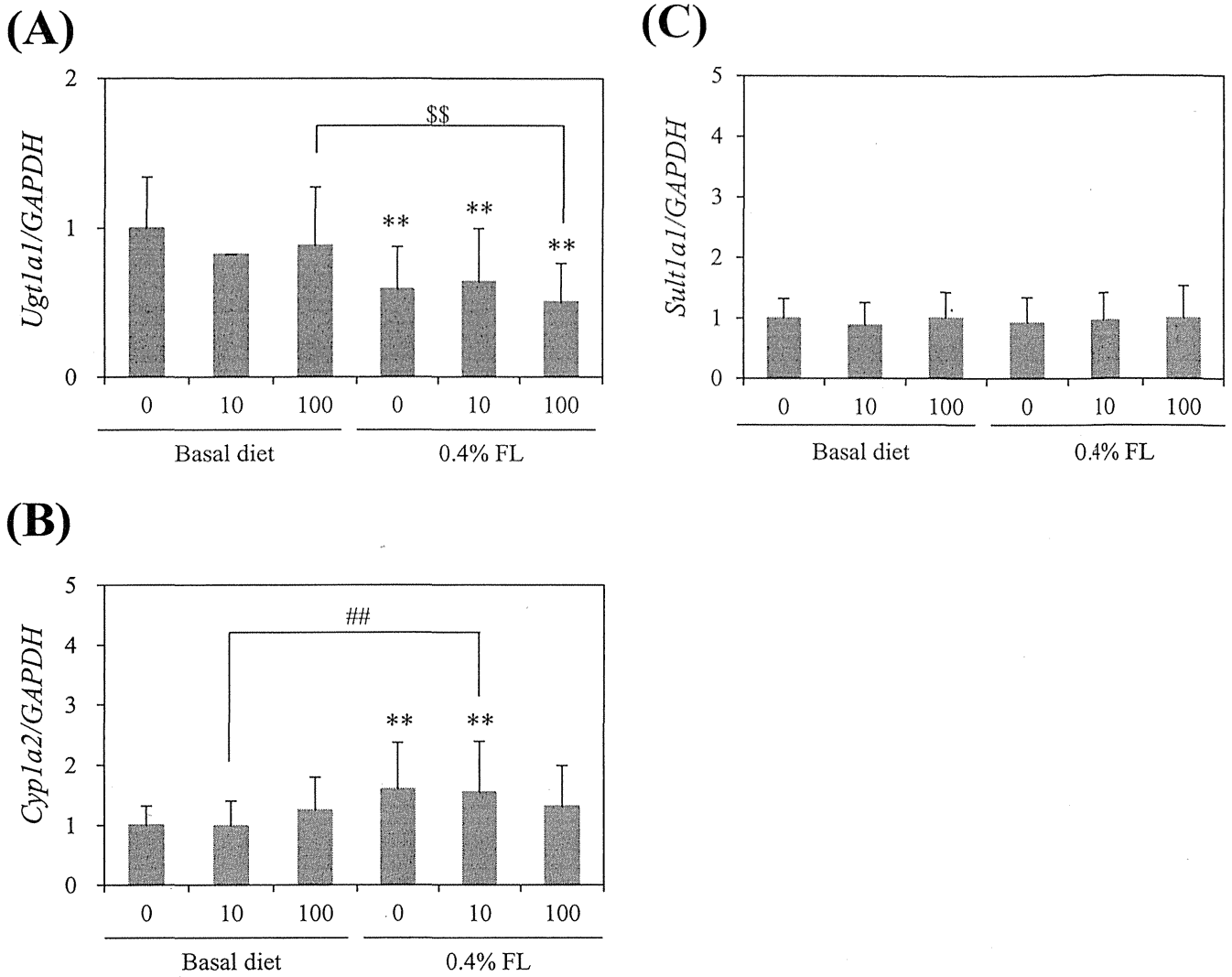


Fig. 4. Changes in mRNA levels of metabolic enzymes, *Cyp1a2* (A), *Sult1a1* (B) and *Ugt1a1* (C), in the livers of *gpt* delta mice treated with ES and/or FL for 4 weeks. Data represent means \pm S.D. (n = 4 or 5). **: $p < 0.01$ vs. Basal diet + Vehicle group. ##: $p < 0.01$ vs. Basal diet + ES 10 mg/kg group. \$\$: $p < 0.01$ vs. Basal diet + ES 100 mg/kg group

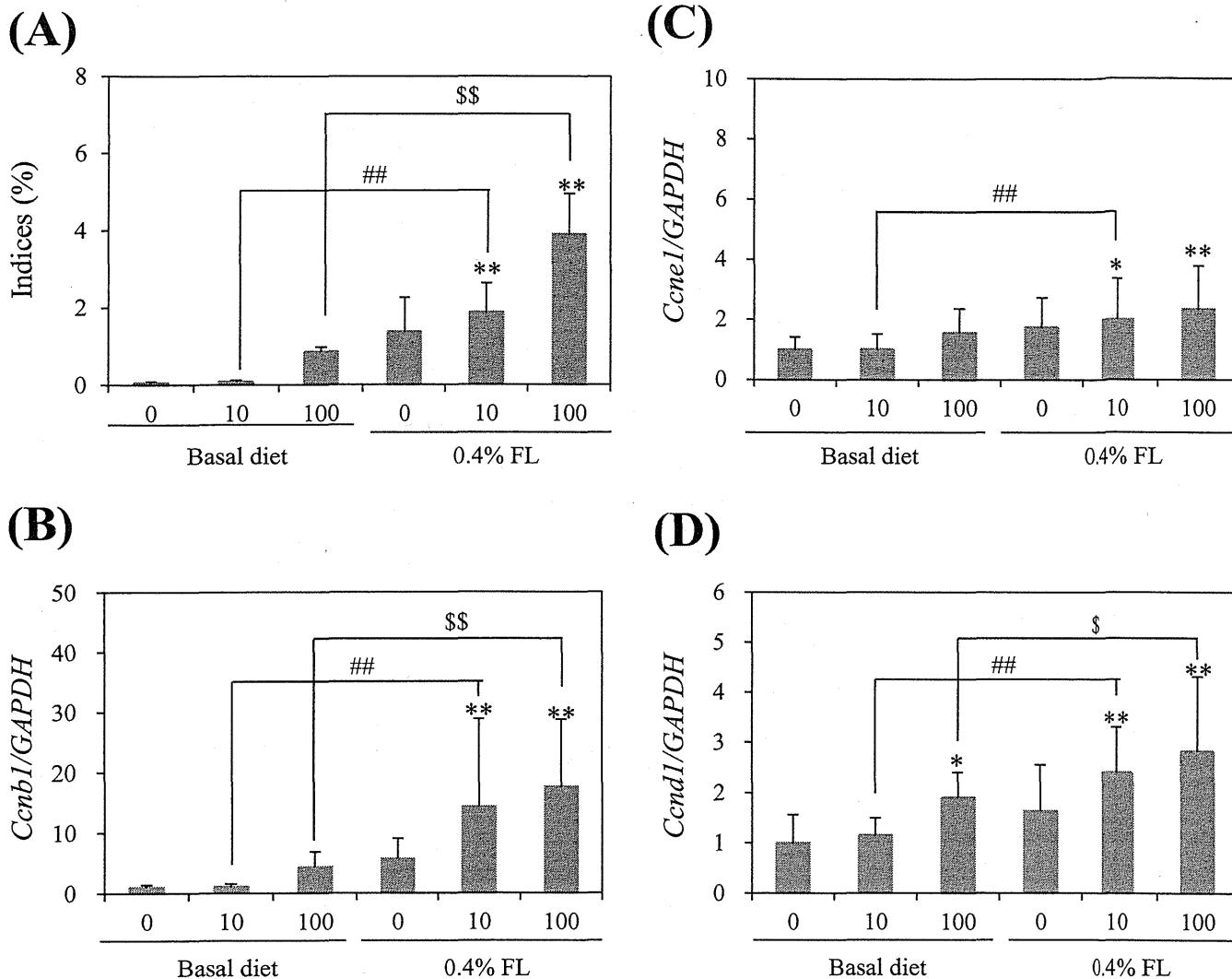


Fig. 3. Changes in cell cycle-related parameters in the livers of *gpt* delta mice treated with ES and/or FL for 4 weeks. (A) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive indices (%) of normal hepatocytes and mRNA levels of *Ccnb1* (B), *Ccne1* (C) and *Ccnd1* (D). Data represent means \pm S.D. (n= 4 or 5). *, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. Basal diet + Vehicle group. #: $p < 0.01$ vs. Basal diet + ES 10 mg/kg group. \$, \$\$: $p < 0.05, 0.01$ vs. Basal diet + ES 100 mg/kg group

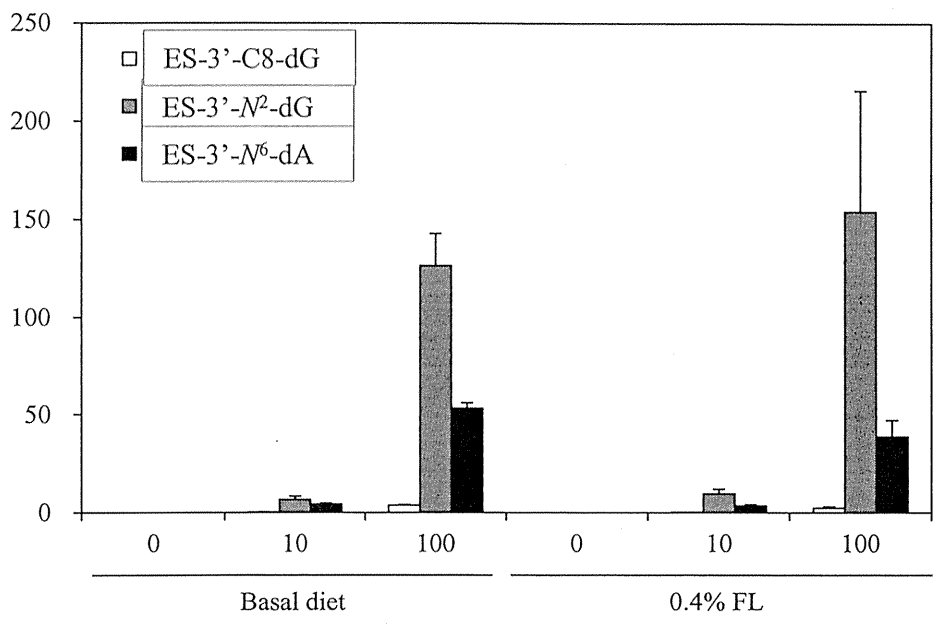
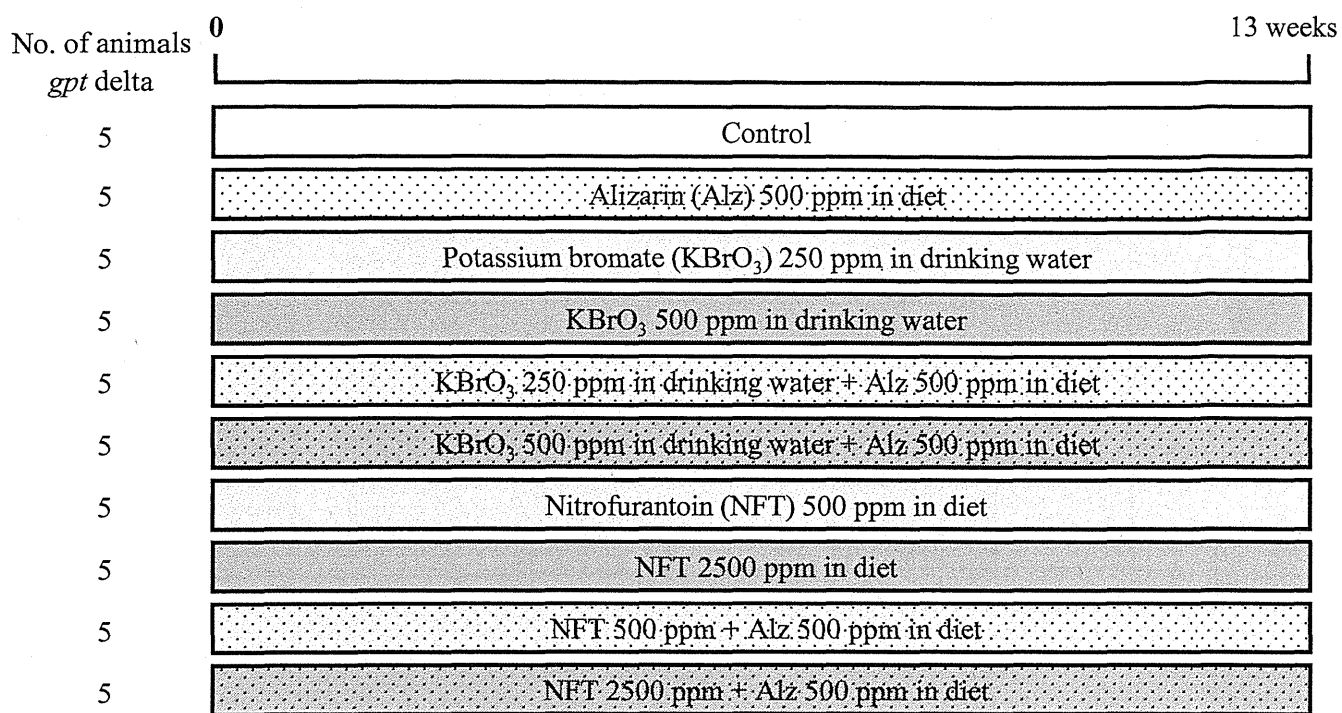


Fig. 5. ES-specific DNA adduct levels in the liver of *gpt* delta mice treated with ES and/or FL for 4 weeks. Data represent means \pm S.D. (n = 5 or 4)

Animals: Male *gpt* F344/N Slc Rats (6-weeks-old)



S

S: Sacrifice

Fig. 6 Experimental protocol.

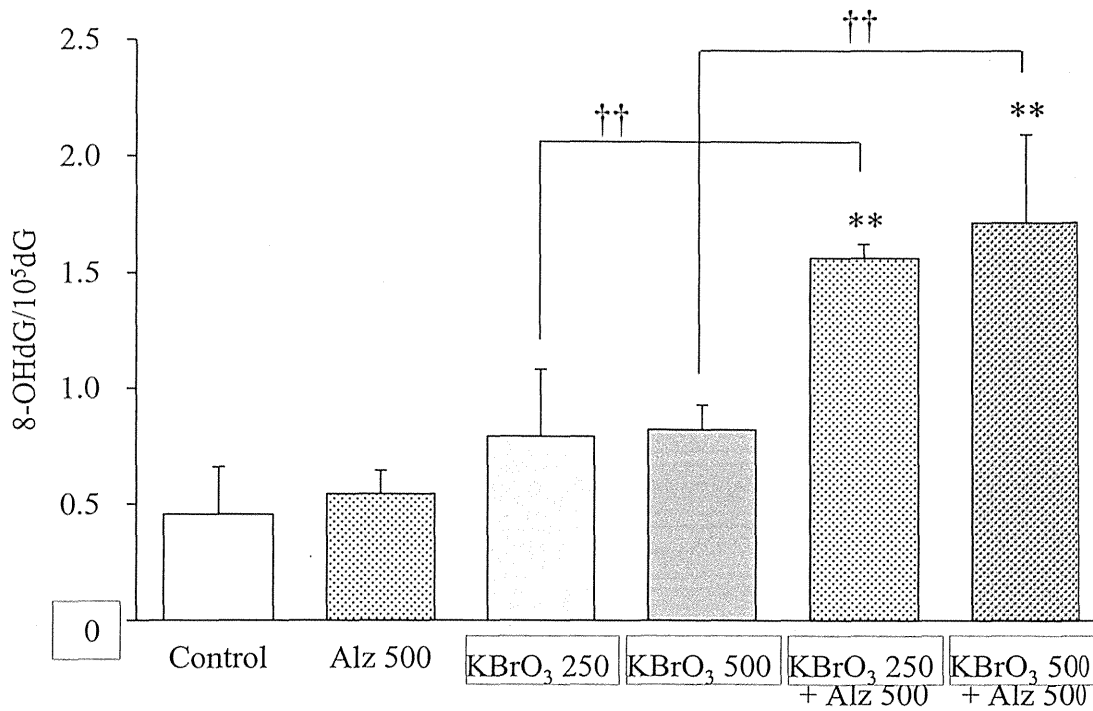


Fig. 7 8-OHdG levels in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO₃ or/and Alz for 13 weeks. Data represent means \pm S.D. (n = 3). **: $p < 0.01$ vs Control. ††: $p < 0.01$ vs corresponding group without combined administration of Alz 500 ppm.