

Table 1 Final body and liver weight

Item	Basal diet			0.4% FL		
	Vehicle	ES 10 mg/kg	ES 100/70 mg/kg	Vehicle	ES 10 mg/kg	ES 100/70 mg/kg
No. of animals	4	5	5	5	5	4
Body weight (g)	20.5 ± 0.3	20.6 ± 0.8	20.4 ± 0.8	18.8 ± 1.2	19.0 ± 0.8	18.4 ± 1.8
Absolute (g)						
Liver	0.89 ± 0.05	0.92 ± 0.05	0.95 ± 0.02	0.99 ± 0.11	0.93 ± 0.04	1.03 ± 0.06
Relative (g%)						
Liver	4.37 ± 0.22	4.45 ± 0.11	4.65 ± 0.17	5.26 ± 0.30 ^{**}	4.98 ± 0.09 ^{**,#}	5.60 ± 0.34 ^{**,\$\$}

^{**}: $p < 0.01$ vs. Basal diet + Vehicle group

[#]: $p < 0.05$ vs. Basal diet + ES 10 mg/kg group

^{\$\$}: $p < 0.01$ vs. Basal diet + ES 100 mg/kg group

Table 2 Final body weights and organ weights of *gpt* delta rats treated with KBrO₃ or/and Alz for 13 weeks.

	Control	Alz 500 ppm ♂	KBrO ₃ 250 ppm	KBrO ₃ 500 ppm	KBrO ₃ 250 ppm + Alz 500 ppm	KBrO ₃ 500 ppm + Alz 500 ppm	NFT 500 ppm	NFT 2500 ppm	NFT 500 ppm + Alz 500 ppm	NFT 2500 ppm + Alz 500 ppm
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Final B. W. (g)	354.8 ± 33.1	311.8 ± 25.6	321.8 ± 28.8	282.6 ± 21.7**	296.9 ± 11.2**	271.1 ± 10.7**	346.2 ± 17.8	215.6 ± 13.1**	320.9 ± 22.7	212.9 ± 16.6**
Absolute (g)										
Kidneys	2.01 ± 0.18	2.12 ± 0.22	2.05 ± 0.12	2.16 ± 0.21	2.15 ± 0.09	2.20 ± 0.16	2.16 ± 0.18	1.91 ± 0.09	2.24 ± 0.14	1.92 ± 0.17
Relative (%)										
Kidneys	0.57 ± 0.05	0.68 ± 0.04**	0.64 ± 0.04*	0.76 ± 0.04**	0.72 ± 0.02**, †	0.81 ± 0.03**	0.62 ± 0.02	0.89 ± 0.04**	0.70 ± 0.05**	0.90 ± 0.03**

** , *: $p < 0.01, 0.05$ vs Control. †: $p < 0.05$ vs corresponding group without combined administration of Alz 500 ppm.

Table 3 *gpt* MFs in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO₃ or/and Alz for 13 weeks.

Group	Animal No.	Cm ^R colonies (x10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	1	6.6	3	0.46	0.69 ± 0.31
	2	10.5	6	0.57	
	3	5.8	6	1.03	
Alz 500 ppm	6	5.4	4	0.74	0.52 ± 0.27
	7	5.1	3	0.58	
	8	4.5	1	0.22	
KBrO ₃ 250 ppm	11	4.5	8	1.76	1.20 ± 0.50
	12	5.0	4	0.80	
	13	3.8	4	1.05	
KBrO ₃ 500 ppm	16	3.0	6	1.99	1.53 ± 0.42
	17	3.5	5	1.44	
	18	2.6	3	1.17	
KBrO ₃ 250 ppm + Alz 500 ppm	21	6.3	1	0.16	0.66 ± 0.78
	22	7.6	2	0.26	
	23	5.1	8	1.56	
KBrO ₃ 500 ppm + Alz 500 ppm	26	6.4	8	1.25	1.27 ± 0.09
	27	5.9	7	1.20	
	28	4.4	6	1.37	

Table 4 Spi MFs in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO₃ or/and Alz for 13 weeks.

Group	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x10 ⁵)	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	1	7.9	2	0.25	0.26 ± 0.12
	2	13.0	5	0.39	
	3	6.9	1	0.14	
Alz 500 ppm	6	5.9	4	0.68	0.51 ± 0.23
	7	8.0	2	0.25	
	8	8.2	5	0.61	
KBrO ₃ 250 ppm	11	6.5	3	0.46	0.41 ± 0.07
	12	5.6	2	0.36	
KBrO ₃ 500 ppm	16	4.4	1	0.23	0.63 ± 0.43
	17	3.4	2	0.58	
	18	3.7	4	1.08	
KBrO ₃ 250 ppm + Alz 500 ppm	21	7.6	4	0.53	0.50 ± 0.16
	22	6.1	2	0.33	
	23	6.3	4	0.63	
KBrO ₃ 500 ppm + Alz 500 ppm	26	3.4	4	1.17	1.07 ± 0.19 **
	27	8.5	10	1.18	
	28	5.9	5	0.85	

** : $p < 0.01$ vs Control

Table 5 Deletion size analysis of Spi⁻ mutants in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO₃ or/and Alz for 13 weeks.

	Control		Alz 500 ppm		KBrO ₃ 250 ppm		KBrO ₃ 500 ppm		KBrO ₃ 250 ppm + Alz 500 ppm		KBrO ₃ 500 ppm + Alz 500 ppm	
	MF	No.	MF	No.	MF	No.	MF	No.	MF	No.	MF	No.
(No. of animals)	(3)		(3)		(2)		(3)		(3)		(3)	
Small deletion	0.21 ± 0.06	6	0.51 ± 0.23	11	0.41 ± 0.07	5	0.63 ± 0.43	7	0.50 ± 0.16	10	0.81 ± 0.09	14
Large deletion	0.05 ± 0.09	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.26 ± 0.24	5
Plaques within WL95 (P2)	0.26 ± 0.12	8	0.51 ± 0.23	11	0.41 ± 0.07	5	0.63 ± 0.43	7	0.50 ± 0.16	10	1.07 ± 0.19	19

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や大腸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。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、肝臓における Spi assay ならびに搔爬した大腸粘膜を用いた *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。肝臓における 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、高脂肪食を与えた群においても同様に溶媒対照群に比較して有意に上昇したが、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 変異体の変異スペクトラム解析を行ったところ、IQ または MeIQx を投与した群では、何れの食餌群においても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上昇したが、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でも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、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頻度が高い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。以上の結果から、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。

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。

ヘテロサイクリックアミンは、肉や魚などを高温調理することにより生成される物質であり、その一種である 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone (IQ) はラットの肝臓や大腸において、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) は、ラットの肝臓において変異原性や発がん性を示すことが報告されている遺伝毒性発がん物質である。

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るとともに、IQ あるいは 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。

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、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。

C. 研究結果

昨年度実施した肝臓における Spi assay の結果を Table 1 に示す。また、引き続き今年度に行った Spi 変異体スペクトラム解析の結果を Table 2 に示す。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。

次に、大腸粘膜における *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、Spi assay の結果を Table 5 に示す。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。

D. 考察

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、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、高脂肪食群において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ことから、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。

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発がん物質である。本研究における *gpt* assay や Spi assay の結果から、本実験条件下においても IQ や MeIQx の肝臓における *in vivo* 変異原性が再確認された。しかし、高脂肪食の摂取は IQ や MeIQx の *in vivo* 変異原性の程度や変異スペクトラムを変化させなかったことから、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ことが明らかとなった。

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。

また、MeIQx はラット大腸における発がん性は報告されていないものの、大腸前がん病変の一つである aberrant crypt foci の発生を増加させることが報告されている。また、Big blue マウスを用いた検討から MeIQx 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。これまでに、ラットにおける MeIQx の *in vivo* 変異原性は詳細に検討されていないが、今回、MeIQx 投与により大腸における *gpt* MF や Spi MF が上昇する傾向が認められたことから、MeIQx はラット大腸においてもマウス同様、変異原性を示すことが明らかとなった。

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。

E. 結論

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。

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

- 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

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

Table 1. 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	8.9	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	15	0.88	0.93 ± 0.39 *
	17	16.4	18	1.10	
	18	11.3	17	1.51	
	19	19.9	13	0.65	
	20	13.8	7	0.51	
Vehicle	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	
Vehicle + 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	

N.D., Not detected.

^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 $p < 0.02$.

*, ** Significantly different from the relevant vehicle control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively. (t-test)

Table 2. Mutation spectra of Spi^r mutants in the liver of F344 *gpt* delta rats treated with IQ or MeIQx and STD or HFD.

	IQ		IQ + HFD		MeIQx		MeIQx + HFD		Vehicle		Vehicle + HFD	
	No. %	Specific mutation frequency (x10 ⁻⁵)	No. %	Specific mutation frequency (x10 ⁻⁵)	No. %	Specific mutation frequency (x10 ⁻⁵)	No. %	Specific mutation frequency (x10 ⁻⁶)	No. %	Specific mutation frequency (x10 ⁻⁶)	No. %	Specific mutation frequency (x10 ⁻⁶)
1 bp deletion												
Simple												
G/C	5 14	0.07 ± 0.08	0 0	0	1 2	0.02 ± 0.04	6 9	0.08 ± 0.07	1 10	0.01 ± 0.02	3 25	0.05 ± 0.07
A/T	0 0	0	0 0	0	0 0	0	0 0	0	0 0	0	0 0	0
In run												
G/C	21 57	0.31 ± 0.15 *	20 56	0.38 ± 0.08	35 73	0.72 ± 0.11**	50 71	0.67 ± 0.36**	4 40	0.07 ± 0.05	3 25	0.14 ± 0.19
A/T	5 14	0.08 ± 0.05	5 14	0.10 ± 0.07	3 6	0.07 ± 0.11	4 6	0.04 ± 0.06	1 10	0.02 ± 0.04	3 25	0.05 ± 0.07
2 bp - 1 kb deletion	0 0	0	0 0	0	0 0	0	3 4	0.04 ± 0.04	0 0	0	0 0	0
>1 kb deletion	1 3	0.01 ± 0.02	4 11	0.09 ± 0.10	6 13	0.17 ± 0.34	3 4	0.04 ± 0.03	1 10	0.02 ± 0.04	1 8	0.02 ± 0.03
Complex	3 8	0.05 ± 0.05	5 14	0.10 ± 0.08	1 2	0.03 ± 0.06	2 3	0.02 ± 0.03	1 10	0.02 ± 0.03	2 17	0.03 ± 0.04
Insertion	0 0	0	0 0	0	0 0	0	2 3	0.03 ± 0.04	0 0	0	0 0	0
Base substitution	2 5	0.03 ± 0.04	2 6	0.04 ± 0.05	2 4	0.04 ± 0.05	0 0	0	2 20	0.03 ± 0.03	0 0	0

*, ** Significantly different from the relevant vehicle control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively. (t-test)

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

Treatment	Animal No.	CmR clones (x 10 ⁵)	6-TGR and CmR colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
IQ	1	2.2	2	0.91	0.76 ± 0.30 *
	2	12.8	7	0.55	
	3	10.0	7	0.70	
	4	13.4	6	0.45	
	5	9.9	12	1.21	
IQ + HFD	6	3.1	5	1.61	0.89 ± 0.48
	7	N.D.	-	-	
	8	12.0	7	0.58	
	9	14.8	10	0.68	
	10	11.9	8	0.67	
MeIQx	11	4.9	2	0.41	0.69 ± 0.25
	12	9.4	7	0.74	
	13	10.9	11	1.01	
	14	N.D.	-	-	
	15	13.7	8	0.58	
MeIQx + HFD	16	4.6	7	1.53	1.03 ± 0.37 *
	17	13.2	7	0.53	
	18	9.6	9	0.94	
	19	11.6	14	1.21	
	20	16.4	16	0.97	
Vehicle	21	15.0	7	0.47	0.38 ± 0.13
	22	8.4	4	0.48	
	23	14.6	7	0.48	
	24	16.1	3	0.19	
	25	14.0	4	0.29	
Vehicle + HFD	26	15.0	5	0.33	0.39 ± 0.28
	27	1.8	3	1.63 ^a	
	28	9.4	7	0.75	
	29	12.8	1	0.08	
	30	15.0	6	0.40	

N.D., Not detected.

^a The data were excluded by Grubbs test at $p < 0.01$

*, ** Significantly different from the relevant vehicle control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively. (t-test)

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

	IQ		IQ + HFD		MeIQx		MeIQx + HFD		Vehicle		Vehicle + 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												
GC:TA	6 (17.6)	0.11 ± 0.08	6 (20.0)	0.18 ± 0.14	8 (28.6)	0.24 ± 0.12	12 (22.6)	0.24 ± 0.14	5 (20.0)	0.09 ± 0.09	5 (26.3)	0.10 ± 0.03
GC:CG	3 (8.8)	0.13 ± 0.19	2 (6.7)	0.04 ± 0.05	1 (3.6)	0.02 ± 0.04	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0
AT:TA	1 (2.9)	0.02 ± 0.04	1 (3.3)	0.08 ± 0.16	2 (7.1)	0.05 ± 0.06	1 (1.9)	0.01 ± 0.03	0 (0.0)	0	2 (10.5)	0.04 ± 0.05
AT:CG	1 (2.9)	0.02 ± 0.04	1 (3.3)	0.02 ± 0.04	2 (7.1)	0.05 ± 0.09	0 (0.0)	0	2 (8.0)	0.03 ± 0.04	0 (0.0)	0
Transitions												
GC:AT	9 (26.5)	0.23 ± 0.15	9 (30.0)	0.30 ± 0.23	4 (14.3)	0.09 ± 0.06	15 (28.3)	0.27 ± 0.18	8 (32.0)	0.11 ± 0.14	8 (42.1)	0.15 ± 0.12
AT:GC	0 (0.0)	0	1 (3.3)	0.02 ± 0.04	0 (0.0)	0	1 (1.9)	0.01 ± 0.03	2 (8.0)	0.03 ± 0.04	1 (5.3)	0.02 ± 0.03
Deletions												
Single bp	11 (32.4)	0.20 ± 0.24	8 (26.7)	0.21 ± 0.16	10 (35.7)	0.23 ± 0.20	23 (43.4)	0.46 ± 0.20	5 (20.0)	0.08 ± 0.05	1 (5.3)	0.03 ± 0.05
Over 2 bp	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	1 (4.0)	0.01 ± 0.03	1 (5.3)	0.03 ± 0.05
Insertions	2 (5.9)	0.04 ± 0.05	0 (0.0)	0	1 (3.6)	0.02 ± 0.04	0 (0.0)	0	1 (4.0)	0.02 ± 0.05	1 (5.3)	0.03 ± 0.05
Complexes	1 (2.9)	0.02 ± 0.04	2 (6.7)	0.04 ± 0.04	0 (0.0)	0	1 (1.9)	0.04 ± 0.10	1 (4.0)	0.01 ± 0.03	0 (0.0)	0
Total	34	0.76 ± 0.30	30	0.89 ± 0.48	28	0.69 ± 0.25	53	1.03 ± 0.37	25	0.38 ± 0.13	19	0.39 ± 0.28

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

Treatment	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x10 ⁵)	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
IQ	1	3.2	1	0.31	0.53 ± 0.31
	2	20.9	7	0.34	
	3	16.7	11	0.66	
	4	19.4	6	0.31	
	5	20.7	21	1.01	
IQ + HFD	6	16.5	4	0.24	0.29 ± 0.08
	7	N.D.	-	-	
	8	19.8	8	0.40	
	9	17.5	5	0.29	
	10	17.9	4	0.22	
MeIQx	11	5.5	6	1.09	1.19 ± 0.78
	12	8.1	18	2.22	
	13	15.3	17	1.11	
	14	N.D.	-	-	
	15	18.9	6	0.32	
MeIQx + HFD	16	10.1	14	1.39	0.79 ± 0.46
	17	16.1	8	0.50	
	18	14.9	10	0.67	
	19	15.0	4	0.27	
	20	21.3	24	1.13	
Vehicle	21	22.1	11	0.50	0.39 ± 0.10
	22	7.8	2	0.26	
	23	17.6	7	0.40	
	24	14.7	6	0.41	
	25	10.4	5	0.48	
Vehicle + HFD	26	11.6	11	0.95	0.42 ± 0.37
	27	1.5	0	0.00 ^a	
	28	9.7	3	0.31	
	29	20.7	2	0.10	
	30	12.1	4	0.33	

N.D., Not detected.

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

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：食品中残留農薬の複合暴露影響に関する研究

1. ラットにおける有機リン剤の複合投与神経毒性：ライフステージによる
有機リン剤の複合暴露に対する感受性

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
	田島 均	(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

平成25年度では、異なる2種類の有機リン系農薬のパラチオン(P)及びメタミドホス(M)を若齢期、成熟期、妊娠中期(投与期間:GD6-GD13)及び後期(投与期間:GD6-GD20)に反復経口投与すると、妊娠中期では死亡を含む重篤な神経症状を示し、その毒性は成熟期、若齢期の順に減弱することを確認した。このライフステージにより毒性発現の程度が異なる原因を探るため、平成26年度では有機リン系農薬標的酵素(Cholinesterase:ChE)、有機リン酸塩を加水分解する酵素(Paraoxogenase-1:PON1)、PON-1に相関するEstradiol(E2)及びストレス因子のCorticosterone(CORT)を測定した。加えて、偽妊娠動物を用いて同様な検索を実施し、比較検討した。その結果、妊娠動物及び偽妊娠動物における神経毒性発現は、成熟期の非妊娠動物に比べより重篤で強く、特に妊娠中期あるいは偽妊娠中期において顕著であり、それぞれ1例ずつが死亡あるいは瀕死状態で安楽殺された。脳のChE活性は各ステージで抑制が認められ、若齢期、成熟期、妊娠期・偽妊娠の順に強い抑制が認められた。PON-1活性は妊娠中期で低く、妊娠後期では高い値を示した。なお、妊娠中期におけるPON-1活性は溶媒対照群でも同様であった。血清E2は妊娠後期及び妊娠後期相当の偽妊娠動物で高い値を示した。被験物質投与後の血清CORTは各ライフステージでの変化は認められなかったが、溶媒対照群では妊娠期で高い値を示した。

以上のように異なる 2 つの有機リン系農薬を若齢期、成熟期及び妊娠中に複合反復経口投与をすると、妊娠期中最も強い神経症状を示したが、その理由を明確にすることは出来なかった。しかし、妊娠中期では PON-1 活性が低く、血清中の CORT レベルが高いことを確認した。この時期における妊娠動物及び偽妊娠動物では、被験物質投与後の PON-1 活性は低く、血清 E2 レベルも低値を示した。妊娠中期では、抗ストレス活性が高まっているものの、有機リン剤投与によって抵抗性が減弱し、さらに生理的及び有機リン剤投与の直接的影響によって分解酵素の活性が低下することにより、薬物に対する感受性が強くなり、重篤な神経症状が発現したものと推察した。また、偽妊娠動物でも同様な変化を示したことから、胎児の存在による影響ではなく、妊娠期中における母体の生理的变化が薬物に対する感受性に影響を及ぼすものと推察された。

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て母動物及び若齢期、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。成熟期及び妊娠期中における毒性は、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、妊娠中の暴露は死亡を含む重篤な神経毒性症状を示した。若齢期の雌ラットは、成熟期よりも発現する神経症状の程度は低かった。毒性発現に影響する因子として、種差、性

差あるいは年齢等がある。He XJ.らは妊娠期中あるいは哺乳期中では、薬物代謝酵素の発現レベルが異なることを報告している^{1),2)}。また、平成 25 年度の本事業³⁾において、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無処置の若齢期、成熟期及び妊娠中期・後期の雌ラットを用いて検討したところ、妊娠後期中有機リン酸塩を加水分解する酵素 Paraoxygenase-1 (PON-1)、薬物代謝酵素の CYP1A および 3A の有意な低下を認めた。またストレス因子の Corticosterone (CORT) は妊娠中期で高い値を示した。妊娠中の各種代謝酵素の変化やストレスが薬物に対する感受性に影響を及ぼしていることを報告した。

平成 26 年度はパラチオン及びメタミドホスを若齢期、成熟期及び妊娠期中(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、妊娠期中における重篤な神経症状の発現は、妊娠初期から後期中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。

B. 研究方法

1. 被験物質

本試験の被験物質として、有機リン剤のパラチオン (Parathion、O, O-DiethylO-4-Nitrophenyl Phosphorothioate、99.6%、和光純薬工業株式会社) 及びメタミドホス (Methamidophos、O, S-Dimethyl Phosphoramidothioate、99.7%、和光純薬株式会社) を使用した。パラチオンは冷蔵庫 (1-10°C) で、メタミドホスは冷凍庫 (-20°C) においてそれぞれ保管した。

2. 試験動物

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 [CrI:WI (Han)] 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。入荷後、3 週齢の動物は 4 日間、7 週齢の雌雄動物は 7 日間、それぞれ試験環境に馴化させた。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。

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 (GDO) 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た。その後、スメアを採取し、3 日間の休止期を確認した動物を偽妊娠成立 (PDO) とした。動物は温度 22±2°C、湿度 50±20%、換気回数

10 回以上/時間 (オールフレッシュ方式)、照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に設定された飼育室で飼育した。

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; AC14056)。

3. 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 (P) 0.6 mg/kg、メタミドホス (M) 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。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、ライフステージによる薬物の感受性の違いを検討するため、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。

4. 被験物質投与液の調製

各用量の被験物質投与液を週に 1 回調製し、投与容量は 4 mL/kg とした。所定量の被験物質を秤量した後、1%Tween80 水溶液 (Tween80、和光純薬工業株式会社) にてパラチオンを濃度 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、各投与液は小分けし、冷蔵・遮光 (5°C) 条件下にて保存し、投与前に室温に戻して使用した。

投与方法は胃ゾンデを用いた強制経口投与とした。経口投与は毒性試験で汎用されている方法であり、またヒトの暴露経路に一致することから、この方法を採用した。

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。

5. 検査項目

5.1. 若齢期、成熟期、妊娠期及び偽妊娠動物の観察

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。

5.2. 体重

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。尚、死亡あるいは瀕死状態の動物については、発見後、速やかに測定を実施した。

5.3. 剖検及び組織採取

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 にインフルラン [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剖検した。血液は分離剤入り試験管 (セパラビット S; 積水化工業) 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、臓器重量を測定した。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。

5.4. 測定項目

5.4.1. 薬物代謝酵素活性および関連因子

5.4.1.1. 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及び脳の 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。一方、脳については、半脳 (左脳) で 20% (w/v) 脳ホモジネートを調製し、JCA-BM1250 自動分析装置を用いて ChE 活性を測定した。

5.4.1.2. Paraoxonase 1 測定

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。

5.4.1.3. Estradiol 測定

主として卵胞から分泌される発情ホルモンの総称である Estrogen は、おもに Estradiol や Estrone がある⁴⁾。発情期や妊娠後期に多く分泌される Estradiol は、PON-1 活性に関連することが知られている。そこで、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。

5.4.1.4. 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。

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。

C. 研究結果

1. 死亡動物数

試験期間中、幼若期 (A 群) 及び成熟期 (B 群) の各投与用量で死亡は認められませんでした。妊娠中期 (C 群) の投与用量

P0.6+M0.8 mg/kg/day で1例の死亡が認められた。妊娠後期 (D 群) では各投与用量で死亡は認められなかった。偽妊娠中期において瀕死状態の動物が1例認められたため、安楽殺を実施した。偽妊娠後期では、死亡は認められなかった。

2. 一般状態

試験期間中、投与前後に攣縮、振戦、痙攣、流涎、縮瞳を観察した。

本文表 1 一般状態
[若齢期]

		(mg/kg/day)		
症状	程度	0	P0.3+M0.4	P0.6+M0.8
攣縮	局所性	0	0	0
	全身性	0	0	0
振戦	局所性	0	0	0
	全身性	0	0	0
痙攣	局所性	0	0	0
	全身性	0	0	0
流涎	軽度	0	0	0
	中程度	0	0	0
縮瞳	軽度	0	2	1
	重度	0	0	0

[成熟期]

		(mg/kg/day)		
症状	程度	0	P0.3+M0.4	P0.6+M0.8
攣縮	局所性	0	0	0
	全身性	0	0	0
振戦	局所性	0	0	0
	全身性	0	0	0
痙攣	局所性	0	0	0
	全身性	0	0	0
流涎	軽度	0	0	0
	中程度	0	0	0
縮瞳	軽度	0	3	3
	重度	0	0	0

[妊娠中期]

(mg/kg/day)

症状	程度	0	P0.3+M0.4	P0.6+M0.8
攣縮	局所性	0	0	3
	全身性	0	0	5
振戦	局所性	0	0	1
	全身性	0	0	0
痙攣	局所性	0	0	0
	全身性	0	0	1
流涎	軽度	0	0	0
	中程度	0	0	0
縮瞳	軽度	0	2	3
	重度	0	0	1

[偽妊娠後期]

(mg/kg/day)

症状	程度	P0.6+M0.8
攣縮	局所性	4
	全身性	1
振戦	局所性	0
	全身性	0
痙攣	局所性	0
	全身性	0
流涎	軽度	0
	中程度	0
縮瞳	軽度	2
	重度	0

[偽妊娠中期]

(mg/kg/day)

症状	程度	P0.6+M0.8
攣縮	局所性	1
	全身性	1
振戦	局所性	0
	全身性	1
痙攣	局所性	0
	全身性	0
流涎	軽度	0
	中程度	0
縮瞳	軽度	1
	重度	0

3. 体重

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。

本文表 2 平均体重

[若齢期]

用量	投与当日	投与後 7 日
0 mg/kg/day	78±6	113±6
P0.3+M0.4 mg/kg/day	67±9	99±12
P0.6+M0.8 mg/kg/day	73±10	109±14

[妊娠後期]

(mg/kg/day)

症状	程度	0	P0.3+M0.4	P0.6+M0.8
攣縮	局所性	0	0	2
	全身性	0	0	5
振戦	局所性	0	0	1
	全身性	0	0	0
痙攣	局所性	0	0	0
	全身性	0	0	0
流涎	軽度	0	0	0
	中程度	0	0	0
縮瞳	軽度	3	3	3
	重度	0	0	0

用量	投与後 14 日
0 mg/kg/day	136±6
P0.3+M0.4 mg/kg/day	117±15
P0.6+M0.8 mg/kg/day	129±14

(Mean±SD)

[成熟期]

用量	投与当日	投与後 7 日
0 mg/kg/day	162±12	173±14
P0.3+M0.4 mg/kg/day	160±6	176±7
P0.6+M0.8 mg/kg/day	163±10	176±8

用量	投与後 14 日
0 mg/kg/day	187±11
P0.3+M0.4 mg/kg/day	189±8
P0.6+M0.8 mg/kg/day	186±8

(Mean±SD)