

[妊娠中期]

用量	GD0	GD6
0 mg/kg/day	185±12	212±16
P0.3+M0.4 mg/kg/day	185±8	207±13
P0.6+M0.8 mg/kg/day	188±13	215±14

用量	GD13
0 mg/kg/day	244±19
P0.3+M0.4 mg/kg/day	230±15
P0.6+M0.8 mg/kg/day	220±13*

(Mean±SD)

(Student's t-test; p ≤ 0.05)

[妊娠後期]

用量	GD0	GD6
0 mg/kg/day	183±13	206±11
P0.3+M0.4 mg/kg/day	181±8	204±8
P0.6+M0.8 mg/kg/day	192±11	217±13

用量	GD13	GD20
0 mg/kg/day	231±13	285±21
P0.3+M0.4 mg/kg/day	227±13	272±32
P0.6+M0.8 mg/kg/day	235±17	275±17

(Mean±SD)

[偽妊娠中期]

用量	PD0	PD6
P0.6+M0.8 mg/kg/day	201±15	229±16

用量	PD13
P0.6+M0.8 mg/kg/day	229±21

(Mean±SD)

[偽妊娠後期]

用量	PD0	PD6
P0.6+M0.8 mg/kg/day	196±17	221±16

用量	PD13	PD20
P0.6+M0.8 mg/kg/day	221±18	224±15

(Mean±SD)

4. ChE 活性

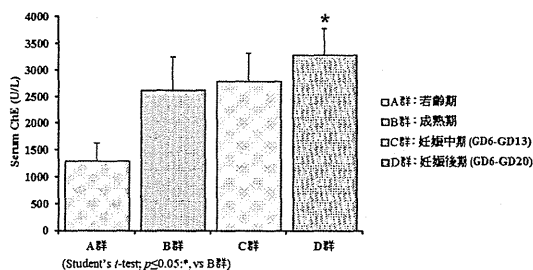
血清及び脳の ChE 活性を測定した。また各々の結果は成熟期の結果に対する Student-t 検定で評価した。尚、偽妊娠動物に対しては、妊娠動物と比較検討した。

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

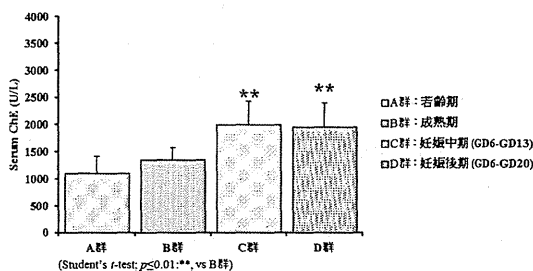
後期及び偽妊娠後期では血清 ChE 活性は有意な高値を示した。

[血清 ChE 活性]

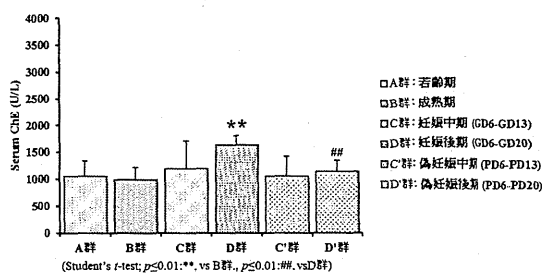
0 mg/kg/day



P0.3+M0.4 mg/kg/day

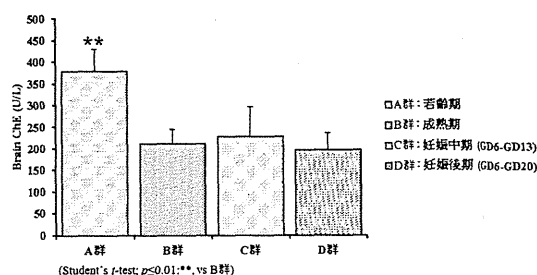


P0.6+M0.8 mg/kg/day

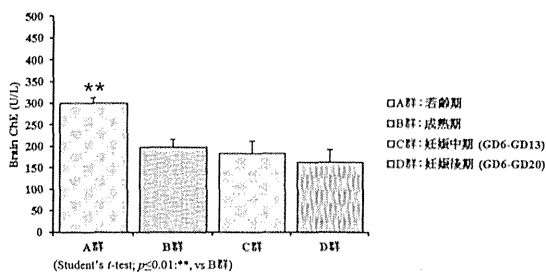


[脳 ChE 活性]

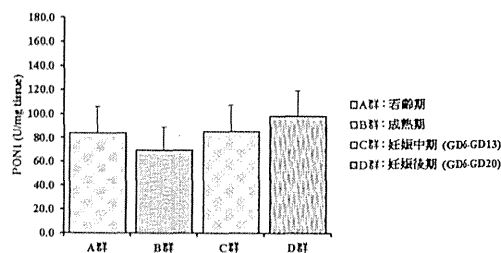
0 mg/kg/day



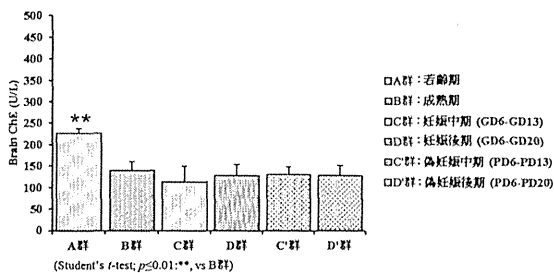
P0.3+M0.4 mg/kg/day



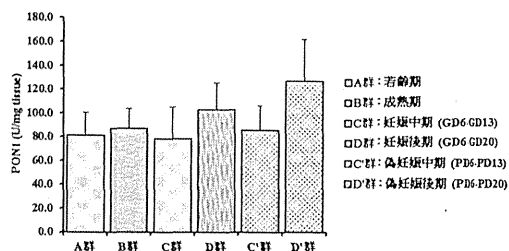
P0.3+M0.4 mg/kg/day



P0.6+M0.8 mg/kg/day



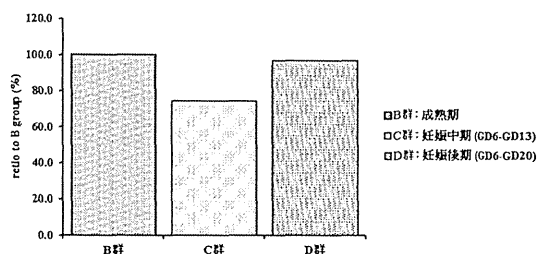
P0.6+M0.8 mg/kg/day



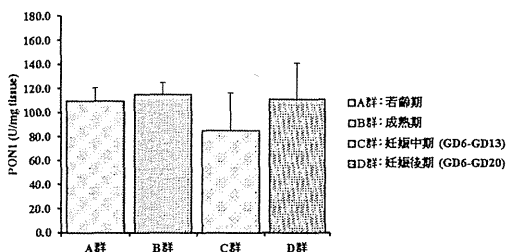
5. Paraoxonase-1 活性

有機リン酸塩を加水分解する酵素である Paraoxonase-1 (PON1)の活性について、肝臓を用いて測定した。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。

成熟期に対する PON-1 相対比 (0 mg/kg/day)



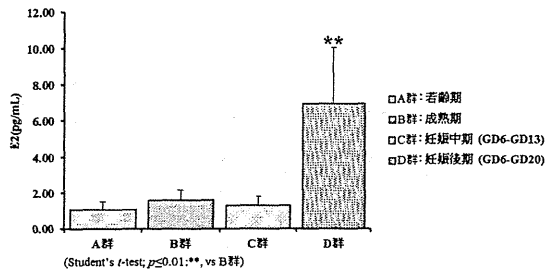
0 mg/kg/day



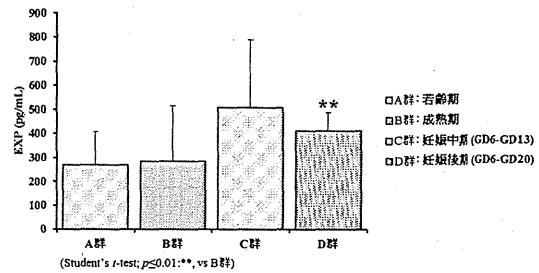
6. Estradiol 測定

各試験群における血清中の E2 を測定した。性周期に関わる E2 は、妊娠初期から増加し、後期では最も多く分泌される。近年、E2 分泌は PON-1 活性に関与することが報告されている。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。

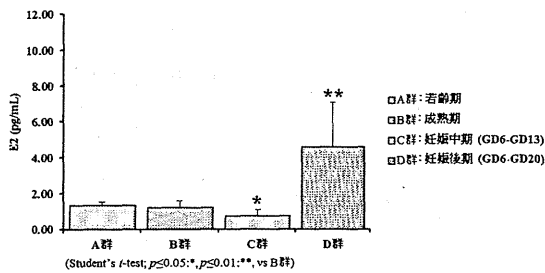
0 mg/kg/day



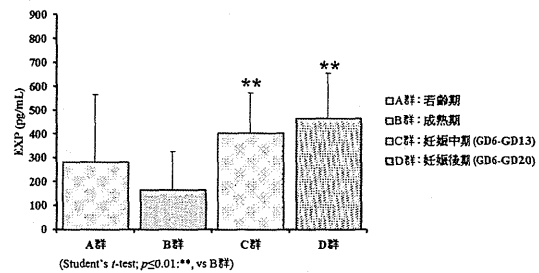
0 mg/kg/day



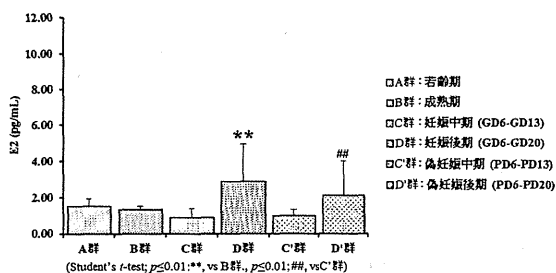
P0.3+M0.4 mg/kg/day



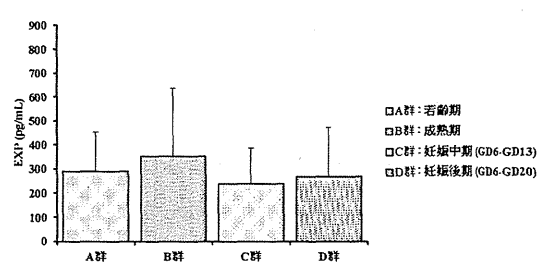
P0.3+M0.4 mg/kg/day



P0.6+M0.8 mg/kg/day



P0.6+M0.8 mg/kg/day



7. 血清 Corticosterone 測定

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

D. 考察

1. 一般状態の観察

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。妊娠期に次いで、成熟期で発現する毒性は強く、若齢期では弱かった。

観察期間中における体重の増加率は、妊娠期では 12-23% に対して、成熟期では

6-8%であった。妊娠期における毒性の増強は主に胎児の成長に伴う体重増加に基づく投与量の増加に起因する可能性が指摘されたが、妊娠による投与量の増分は多くても成熟期の10%程度であるため、毒性発現に大きな影響を及ぼすとは考え難い。そこで、偽妊娠動物を作製し、P0.6+M0.8 mg/kg/day を妊娠期と同様に偽妊娠確定(PD0)から6日目に投与を開始し、中期はPD6-PD13、後期はPD6-PD20まで反復投与した。その結果、偽妊娠動物でも強い神経毒性症状を示し、特に偽妊娠中期では瀕死状態の動物を1例観察し、安楽殺を実施した。妊娠期と同様の変化を示したことから、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。

2. ChE 及び PON-1 活性

Butyrylcholinesterase (BChE) と Paraoxonase-1 (PON-1) は有機リン系農薬に対する生物学的指標となる酵素である。PON-1は有機リン系農薬を解毒するのに重要な役割を果たす。近年、ChE 及び PON-1 活性の相関性が示唆されており、メタミドホスを投与したラットにおける、肝臓中の BChE 及び PON-1 活性は低下することが報告されている⁶⁾。しかし、ChE 及び PON-1 活性は週齢で異なり、妊娠期で低下することが報告されている⁷⁾。またヒトの妊娠期における血清 ChE レベルの低下は、パラチオンの中毒性コリン作動性の行動に対する感受性を増強するとの報告もある⁸⁾。尚、当該試験では、妊娠期における ChE 活性量の明らかな低下は認められなかった。

妊娠期間中、薬物代謝酵素や各代謝酵素の活性あるいは発現量が変化することが報告されており、PON-1 についても同様である⁹⁾。妊娠期間中における PON-1 活性の低下は、有機リン系農薬などに対する毒性を増強させる⁷⁾。そして、妊娠期間中に低下した PON-1 mRNA 発現量は妊娠後期から増加する⁹⁾。当該試験では、若齢期、成熟期、妊娠期における PON-1 活性の違いを各投与用量から明らかにすることは出来なかった。しかし、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。

また、有機リン系農薬による PON-1 活性の低下は、有機リン系農薬による直接的な作用によって活性が低下すると考えられている⁹⁾。当該試験においても多くの被験物質投与群で低下を示したが、D 群では 0 mg/kg/day と同様の活性を示した。

これらの結果から、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。

3. 血清中の Estradiol 及び Corticosterone

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。血清 PON-1、SOD、GPx、IL-6、脂肪酸は E2 の Peak level に相関して、値を示すと報告されている⁵⁾。当該試験においても、各投与用量の妊娠後

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) はストレスの指標となる。すなわち、個体が高いストレス状態である場合、CORT は高い値を示す。Hapon らは、血清中の CORT は virgin では妊娠初期から中期、哺育期よりも高い値を示し、妊娠初期から中期では経時的に値は高くなるが、妊娠 20 日に低下し、分娩直前に非常に高い値を示すことを報告している¹⁰⁾。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。

E. 結論

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。
2. 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。
3. 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に変化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。

F. 参考文献

- 1) 新版トキシコロジー、朝倉書店 (2009 年)
- 2) He XJ, Ejiri N, Nakayama H and Doi K. (2005) Effects of pregnancy on CYPs protein expression in rat liver. *Exp. Mol. Pathol.* 78: 64-70.
- 3) 一般財団法人残留農薬研究所 (2014):厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全性高度化推進研究事業) 食品中の複数の化学物質による神経・免疫毒性に関する研究 平成 25 年度分担研究報告書『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』
- 4) 改訂増補 家畜生理学、養賢堂発行 (1999 年)
- 5) Younis A, Clower C, Nelsen D, Butler W, Carvalho A, Hok E and Garelnabi M. (2012) The relationship between pregnancy and oxidative stress markers on patients undergoing ovarian stimulations. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29: 1083-1089.
- 6) Araoud M, Neffeti F, Douki W, Khaled

L, Najjar MF, Kenani A and Houas Z, (2014) Toxic effects of methamidophos on paraoxonase 1 activity and on rat kidney and liver and ameliorating effects of alpha-tocopherol. *Environ. Toxicol.* DOI 10.1002/tox. 22095.

7) Weitman SD., Vodcnik MJ. and Lech JJ. (1983) Influence of pregnancy on parathion toxicity and disposition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 71: 215-224.

8) Shnider SM. (1965) Serum cholinesterase activity during pregnancy, labor and the puerperium. *Anesthesiology.* 26: 335-339.

9) Fortin MC, Aleksunes LM and Richardson JR. (2013) Alteration of expression of pesticide-metabolizing enzymes in pregnant mice: potential role in the increased vulnerability of the developing brain. *Drug Metab. Dispos.* 41: 326-331.

10) Hapon MB, Simoncini M, Via G and Jahn A. (2003), Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reproduction.* 126: 371-382.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 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

H. 知的財産権の出願・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）
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

2. 農薬の複合経口暴露が免疫系（獲得免疫およびアレルギー発症）に及ぼす影響

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： 西野里沙子 （一財）残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
福山朋季 （一財）残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
渡部優子 （一財）残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
黒澤好 （一財）残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
小坂忠司 （一財）残留農薬研究所 試験事業部

研究要旨

我々は、これまで異なる 2 種類の農薬の成獣に対する複合暴露による免疫毒性影響を調査し、有用な結果を得てきた。当該研究においては、各ライフステージ、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調査することを目的とした。平成 25 年度では、免疫毒性評価候補農薬の選定及びマウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立を目指し種々の実験を行い、有効な実験モデルを確立した。

平成 26 年度では、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。その結果、メトキシクロルないしはデキサメタゾンを母動物に投与した児動物において、呼吸器アレルギーに特徴的な肺組織内における細胞浸潤が認められ、肺門リンパ節中の IgE 陽性 B 細胞数、炎症性細胞数及びケモカイン産生量、リンパ節中サイトカイン産生量が、それぞれ対照群と比較して用量相関性に有意に増加した。ベンゾ[a]ピレン投与群では、反応が有意でなかったものの、他 2 剤と同様に呼吸器アレルギー反応の増強傾向が認められた。

A. 研究目的

食品中に残存する農薬の安全性について、単剤における評価は、登録時に純分になされており、問題とはならない。しかし、農薬の複合毒性については、社会的関心は高いものの、実験上および評価上の困難性などの理由から毒性情報の蓄積が不足しており、特に近年懸念されている食品中残留農

薬の乳幼児・子供への累積暴露影響に関しては不明な点が多く、今後の研究課題である。従って、これらの課題を解明することは社会的かつ医学的にも有意義なことと考えられる。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¹⁾。

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。

B. 研究方法

本研究では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）を妊娠 13 日目の雌性 BALB/c マウスに 5 日間反復経口投与し、生まれてきた児動物の 8 週齢時に呼吸器アレルギーを発症する TMA を用いて呼吸器アレルギーを惹起し、肺組織所見や各種免疫学的因子測定など、呼吸器アレルギー反応の増強影響を検索した。

1. 被験物質

使用した被験物質情報を下記に示す。供給元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）であった。

名称： メトキシクロル標準品
純度： 97.0%以上
分子量： 345.65
外観： 白色結晶性粉末
保管条件： 冷蔵暗所

名称： デキサメタゾン
純度： 98.0%以上
分子量： 392.46
外観： 白色結晶性粉末
保管条件： 冷蔵暗所

名称： ベンゾ[a]ピレン
純度： 96.0%以上
分子量： 252.31
外観： 白色結晶性粉末
保管条件： 冷蔵暗所

名称： トリメリト酸無水物
 (Trimellitic anhydride)
純度： 97.0%以上
分子量： 192.13
CAS 番号： 552-30-7
外観： 白色~わずかにうすい黄色
供給元： 和光純薬工業株式会社
保管条件： 室温暗所

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場（静岡県）で生産された近交系 SPF マウス (BALB/cAJcl) の雌動物を用いた。Balb/c マウスは免疫・アレルギー研究での使用に適している系統動物である。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。馴化期間中毎日一般状態を観察した。動物は温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間（オールフレッシュエア方式）、照明時間 12 時間/日（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）に設定された動物飼育室で飼育した。経口投与開始日に全ての動物の体重を測定し、体重値に基づいた層別無作為抽出法により群分けを実施した。基礎飼料には保証飼料 MF 固型（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製バスケット型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倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

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、経口経路にて毒性及び死亡の起こらない用量を最高用量として選択し、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 は経皮経路にて毒性、皮膚刺激性および死亡の起こらない濃

度を最高用量として選択し、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。

4. 被験物質投与液の調製

初回投与直前に調製した。被験物質調製時に純度換算を行い、投与容量は10 mL/kgとした。目標濃度となるよう、コーンオイルを用いて調製し、必要に応じて超音波処理やマグネチックスターラー等での混合を実施した。投与液の調製時に均一性を目視により確認した。また、投与終了時の残余液について、調製直後と比べて変化していないことを目視にて確認してから廃棄した。各用量の投与液は小分けし、冷蔵・遮光(5°C)条件下にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

経皮感作用のTMA溶液は用時調製とした。純度換算は行わず、所定量の被験物質を秤量した後、アセトン/オリーブオイル（アセトン（和光純薬工業株式会社）：オリーブオイル（和光純薬工業株式会社）=4:1）にて溶解させた。対照群の投与液はアセトン/オリーブオイルとした。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。

5. 被験物質の投与

ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびデキサメタゾン、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。経口による暴露はヒトで予想される本被験物質の主たる暴露経路に一致する。強制経口投与方法は反復経口投与毒性試験で通常用いられている方法である。被験物質の投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、注射筒内に吸い上げ、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

6. 被験物質投与方法およびスケジュール

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、被験物質投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、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。暴露システムの概要および動物の装着部位を図1に示した。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。発生用空気は、コンプレッサー（ES4AD-5、KOBELCO、東京都）で発生させ、その後超高性能フィルター（F3000-10-Y、CKD株式会社、愛知県）で清浄化した圧搾空気をダストフィーダーに供給した。暴露チャンバーへの空気供給は、ダストフィーダーのエジェクター流量が20 L/minになるように調整することで行った。排気はブロアー（TFO-K4P、株式会社日立製作所、東京都）で行い、バグフィルター、ヘパフィルターおよび活性炭フィルターからなる排気処理装置（トキワ科学器械株式会社）で浄化した後大気中に放出した。ダストフィーダーのエジェクター流量が20 L/minに保たれていることを暴露中確認した。上記条件下では、暴露チャンバー内に被験物質等ダストが安定的に充填するまでの時間（ t_{95} ）は5分以内と算出されるため暴露の起点は暴露開始時とした。投与スケジュールは図2に示した。

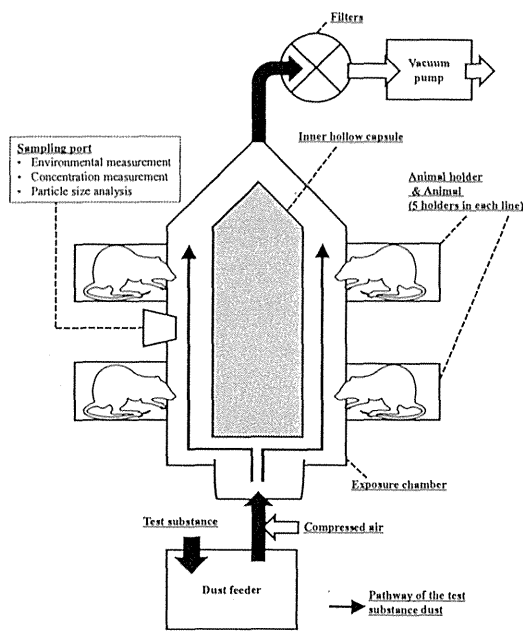


図1 吸入暴露システム

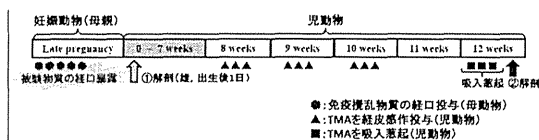


図2 被験物質投与スケジュール

7. 観察および検査項目

7.1. 死亡および臨床症状の観察

全動物について、投与期間中少なくとも1日1回、臨床症状、瀕死状態ないし死亡の有無をケージサイドから観察した。

7.2. 組織採取

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) 上で播りつぶし、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。

7.3. BALF の解析

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。反応抗体との非特異的結合を防ぐため、1 μg Mouse BD Fc Block™ にて 4°C で 10 分間培養後、上記の蛍光標識抗マウス細胞膜表面抗原の抗体を用いて 4°C 遮光下で 30 分間培養して染色した。染色後、PBS で洗浄した後、フローサイトメーターを用いて解析を実施した。

7.4. 肺門リンパ節細胞の調製

肺門リンパ節を 5%FCS 添加 RPMI1640 培地にて氷冷下で浸した後、ペトリ皿上にてナイロンメッシュ (75 μm メッシュ) 上で播りつぶし、単細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を遠心した後、5%FCS 添加 RPMI1640 培地で洗浄し、細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液中のリンパ球数は、コーンターカウンター Z2 を用いて測定した。

7.5. 肺門リンパ節細胞の解析

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 細胞数を測定した。反応抗体との非特異的結合を防ぐため、1 μ g Mouse BD Fc Block™にて 4°C で 10 分間培養後、上記の蛍光標識抗マウス細胞膜表面抗原の抗体を用いて 4°C 遮光下で 30 分間培養して染色した。染色後、PBS で洗浄した後、フローサイトメーターを用いて解析を実施した。

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。

8. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5 および 1% レベルで解析した。

最初に各データについて Bartlett の等分散検定を行なった。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた時は、Dunnett の多重比較法を実施して対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。Bartlett の等分散検定で各群の分散が等しくないという判定が出た場合は、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた時は、Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有義差の有無を判定した。

(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)。

C. 研究結果

1. 肺の組織学的解析

図 3 に肺の病理組織学的検査結果を示す。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。

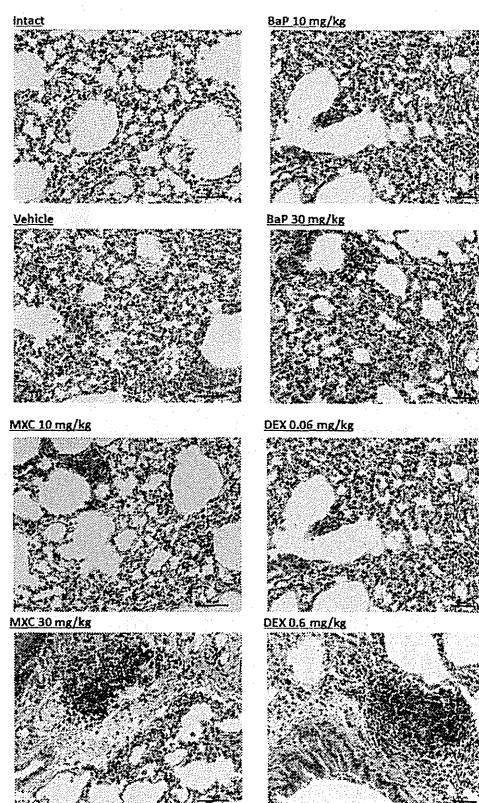


図 3 肺の病理組織写真

2. 肺門リンパ節中 IgE 陽性細胞数

肺門リンパ節中 IgE 陽性 B 細胞測定結果を図 4 に示す。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。

3. 肺胞洗浄液の解析

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測定結果を図 5 に示す。好酸球数、好中球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。

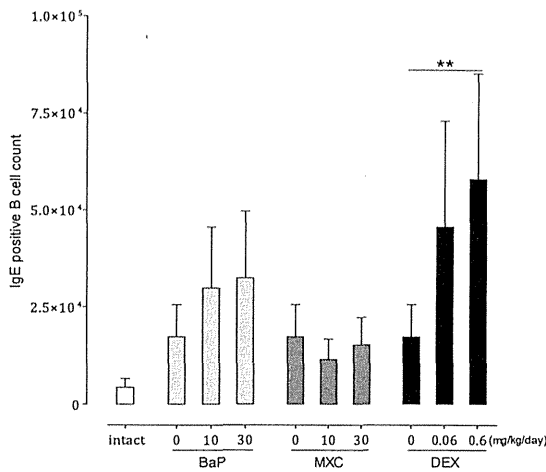


図 4 肺門リンパ節中 IgE 陽性細胞数

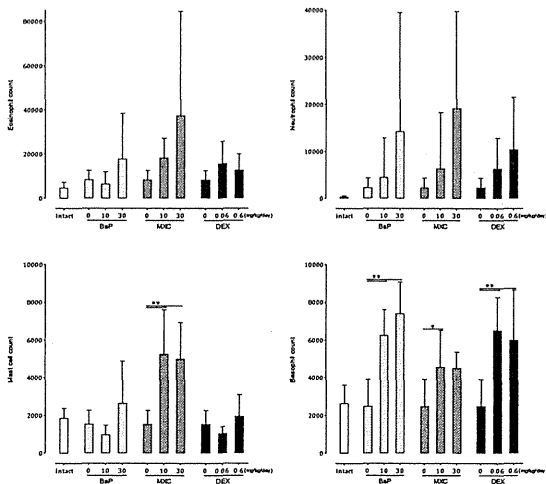


図 5 肺胞洗浄液の解析

4. 肺門リンパ節の解析

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) 測定結果を図 6 に示す。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。

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。

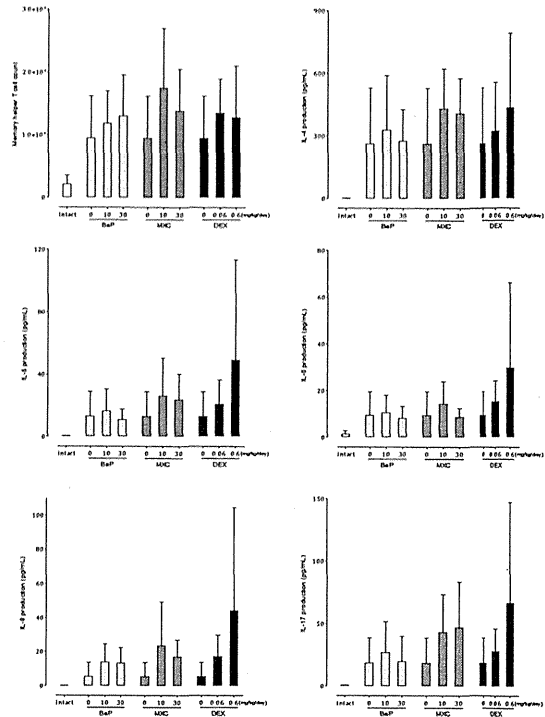


図 6 肺門リンパ節の解析

D. 考察

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。

多環芳香族炭化水素化合物、有機塩素系化合物およびステロイド系抗炎症薬の免疫系への影響については、反復経口投与による特異的抗体価の抑制作用 (1-4)、本研究で用いたメトキシクロルおよびデキサメタゾンの胸腺細胞アポトーシス誘発作用が報告

されており 5)、免疫抑制作用を主体とした免疫毒性が共通して考えられている。著者らは、上記化学物質の免疫抑制作用に着目し、妊娠期の免疫攪乱作用が児動物のその後の発達段階における異常免疫担当細胞出現を誘起する可能性を仮説とした。そこで異常免疫担当細胞が引き起こす影響を検出する手法として、呼吸器アレルギー増強作用を指標とした検査を実施した。

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経皮投与し、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。本研究におけるアレルギー性増強作用と同様の事例として、農薬を暴露することにより誘発される自己免疫疾患の発症が報告されている。Sobel 等 6)は自己免疫疾患モデル動物の(NZB×NZW) F1 マウスを用いた実験で、メトキシクロル、o,p'-DDT 及びクロルデコンの慢性投与が膜性糸球体腎炎誘発及び自己 DNA に反応する抗体の産生を引き起こすことを報告しており、農薬投与による免疫攪乱が、自己免疫疾患を引き起こす異常免疫担当細胞を出現させる可能性を示唆している。また、著者らの以前の研究 7)では、幼若期の免疫攪乱作用が成熟後の Picryl chloride 誘発アトピー性皮膚炎の増悪に繋がることを示している。

これらの報告は、本研究における仮説及

び結果を裏付ける材料の一つであると考えられた。

E. 結論

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。

F. 参考文献

- 1) Dean JH, Luster MI, Boorman GA, Lauer LD, Leubke RW, L Lawson, Selective immunosuppression resulting from exposure to the carcinogenic congener of benzopyrene in B6C3F1 mice. *Clin Exp Immunol.* 52(1): 199-206, 1983.
- 2) Takeuchi Y, Kosaka T, Hayashi K, Takeda M, Yoshida T, Fujisawa H, Teramoto S, Maita K, Harada T, Thymic atrophy induced by methoxychlor in rat pups. *Toxicol. Lett.* 135, 199-207, 2002.
- 3) Takeuchi Y, Kosaka T, Hayashi K, Ishimine S, Ohtsuka R, Kuwahara M, Yoshida T, Takeda M, Maita K, Alterations in the developing immune system of the rat after perinatal exposure to methoxychlor. *J. Toxicol. Pathol.* 17, 165-170, 2002.
- 4) Dietert RR, Lee JE, Olsen J, Fitch

K, Marsh JA, Developmental immunotoxicity of dexamethasone: comparison of fetal versus adult exposures. *Toxicol.* 194, 163-176, 2003.

5) Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T. Apoptosis in immunocytes induced by several types of pesticides. *J Immunotoxicol.* 7, 39-56, 2010.

6) Sobel ES, Gianini J, Butfiloski EJ, Croker BP, Schiffenbauer J, Roberts S M. Acceleration of Autoimmunity by Organochlorine Pesticides in (NZB × NZW)F1 Mice *Environ. Health Persp.*, 113, 323-328, 2005.

7) Fukuyama T, Tajima Y, Hayashi K, Ueda H, Kosaka T. Prior or coincident oral exposure to environmental immunosuppressive agents aggravates mite allergen-induced atopic dermatitis-like immunoreaction in NC/Nga mice. *Toxicol.* 289, 132-140, 2011.

G. 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.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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：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

ベンズイミダゾール類および合成着色料による芳香族炭化水素受容体（AhR）の活性化

研究分担者： 氏名 出川 雅邦 所属 静岡県立大学客員教授・薬学部名誉教授

研究協力者： 氏名 関本 征史 所属 麻布大学生命環境科学部・准教授

（前静岡県立大学薬学部・講師）

研究要旨

食品中成分の毒性発現における複合影響の可能性について、ダイオキシン類や芳香族炭化水素類による毒性発現に重要とされる芳香族炭化水素受容体（AhR）の活性化を指標として解析した。

食品添加物である Thiabendazole (TBZ) と芳香族炭化水素 (3-methylcholanthrene, MC) の複合曝露によるヒト AhR の相乗的活性化機構を明らかにする一環として、複数のリガンド型および非リガンド型 AhR 活性化物質を用いて解析した。その結果、相乗的な AhR 活性化は AhR リガンド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の AhR 活性化物質を組み合わせることで起こることが示唆された。TBZ と共通骨格を持つ他のベンズイミダゾール化合物と MC の複合影響を解析したところ、AhR 活性化能を有するベンズイミダゾール化合物に増強効果が認められた。さらに、AhR リガンドに対する TBZ の作用を解析したところ、TBZ は MC や Indirubin による AhR 活性化を相乗的に増強したが、他の AhR リガンドに対しては明確な増強作用を示さなかった。これらの結果から、TBZ に認められた AhR 活性化増強作用は、単独で 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。

また、AhR を介した複合毒性発現を考える上で、その動物種差を検索することも重要であり、本邦で食品添加物などに使用されているタール系合成着色料 18 種を被検化合物として、AhR 活性化における動物種差を検索した。昨年度までの研究で樹立したヒト、ラットおよびマウスの AhR レポーター細胞株を用いて検討した結果、18 化合物のうち 7 化合物はいずれかの動物種細胞株の AhR を活性化すること、さらに、赤色 105 号 (Acid Red 94) 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 (Acid Red 26) はマウス・ラット AhR を、それぞれ効率的かつ種差をもって活性化することが示された。これら化合物については、今後、ヒト細胞株を中心に複合影響を検討する必要がある。

A. 研究目的

受容体型転写因子である芳香族炭化水素受容体 (AhR) は、多環式芳香族炭化水素類による発がんや、ダイオキシン様化合物による催奇形性などの毒性発現に重要な役割を果たすことや、脂質代謝や免疫機能の調節にも関わっていることが明らかとなっている。そこで、AhR 活性化を指標として食品中化学物質の複合影響を検討した。

1) ベンズ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。

我々はこれまでに、食品添加物であり非リガンド型 AhR 活性化物質と推測される thiabendazole (TBZ) と、発がん性物質であり代表的なリガンド型 AhR 活性化物質である 3-methylchoranthrene (MC) の複合処理により、相乗的な AhR 活性化が起こることを見出している。しかし、その相乗作用発現機序については明確にされていない。

そこで本研究では、複数のリガンド型および非リガンド型 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。

2) 合成着色料による AhR 活性化とその種差の解析

食品添加物の安全性は、動物実験をはじ

めとする安全性試験で担保されているが、ヒトへの影響を真に捉えたものではない。

そこでまず、本邦で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。

B. 研究方法

1) 試験細胞株

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 (Hepa1c1c7 および Hepa1-6) を使用した。

使用したいずれの細胞も、5%胎児ウシ血清と硫酸カナマイシンを含んだ DMEM 培地を用い、5%炭酸ガス下、37°C で培養した。

2) 被検化合物

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、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-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1) および 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (MeA·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。

なお、各化合物はいずれもジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、使用した。また、実験者の健康保持のため、本研究で使

用する化合物、各実験で使用する薬品はいずれも、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

3) AhR 活性化の測定

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。

4) 遺伝子発現量の測定

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。

C. 研究結果

1) ベンズイミダゾール類による AhR 活性化増強機構の解析

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。

2) 合成着色料による AhR 活性化とその種差の解析

ターナル系合成着色料 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。

D. 考察

1) ベンズイミダゾール類による AhR 活性化増強機構の解析

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。

2) 合成着色類による AhR 活性化とその種差の解析

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 Hepalclc7)のみならず、対応する同種他細胞株においても AhR 標的遺伝子 (CYP1A1 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。

これら化合物はいずれもキサントン骨格を有しているが、その応答性に種差が見られたことから、その AhR 結合能の相違などの解析が望まれる。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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. 知的所有権の出願・登録状況

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

複合影響の観点からフェノール性抗酸化物質のヒトへの影響を評価するためには、機能性食品等によって誘導された第Ⅰ相薬物代謝酵素の影響を検討する必要がある。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、フェノール性抗酸化物質の酸化反応と、生成するキノンによる酸化ストレス反応の化学的なモデル系の構築を試みた。その結果、酸化代謝酵素と同様の一電子酸化反応を引き起こすDPPH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を添加することで、活性酸素の生成によるDNA鎖の切断反応を引き起こすことができた。また、キノン酸化体によるDNA鎖切断は、NADHによる一電子還元によって生成したセミキノンラジカルアニオンが酸素を還元活性化して発生した活性酸素によることがわかった。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酸化代謝を伴う毒性を検討したところ、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切断反応が進行することがわかった。以上の結果より、ヒトではフェノール性抗酸化物質はキノンへの酸化代謝を経由する酸化ストレスによって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。

A. 研究目的

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。天然のフェノール性抗酸化物質は多様な生物活性を有することが多い。例えば、カテキンやケルセチンなどは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。また、レスベラトロールはシクロオキシゲナーゼ阻害活性やサーチュインの活性化によって寿命延伸作用や化学発がん予防作用を示す。フェノール性抗酸化物質は比較的安全性が高く、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指摘されている。

2007年1月、カナダ保健省は緑茶抽出物