

201522004A

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27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅村 隆志

平成28(2016)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	-----	20
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	-----	35
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	-----	42
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	-----	60
吉成浩一		

5. フェノール性化合物の複合影響	-----	65
福原 潔		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	73
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	74
-----------------	-------	----

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 27 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
研究分担者： 原田孝則 残留農薬研究所 理事
研究分担者： 吉成浩一 静岡県立大学 教授
研究分担者： 福原 潔 昭和大学 教授

研究要旨

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ため、雌性 6 週齢の *gpt delta* マウスにフルメキン (FL) を 0.4% の濃度で粉末基礎飼料に混じ、肝発がん物質エストラゴール (ES) を 10 又は 100 mg/kg/day の濃度で強制経口により 4 週間併用投与した。その結果、高用量の ES 投与群における *gpt* 変異体頻度 (MF) の上昇が FL 併用投与により増強され、単独投与では変異を誘発しない低用量の ES 投与群においても FL 併用投与により G:C-T:A transversion 変異の増加を伴う MF の上昇が認められた。以上より、FL によって引き起こされた細胞増殖活性の加算的な増加により ES の突然変異誘発が増強されることが明らかになった。実験 2 では、昨年度までに動物実験を終了した臭素酸カリウム (KBrO₃) 250 又は 500 ppm 投与群、ニトロフアントイン (NFT) 500 又は 2500 ppm 投与群及びそれぞれに対するアリザリン (Alz) 500 ppm の 13 週間併用投与群について腎皮質における酸化的 DNA 損傷と突然変異誘発性における複合影響を検討した。8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルは KBrO₃ 又は NFT 単独投与群で用量依存的に上昇し、Alz の併用投与により対照群及び各用量の単独投与群に比して有意に上昇した。*gpt* 及び Spi MFs は KBrO₃ 単独投与群において用量依存的に上昇した。一方、Alz の併用投与は *gpt* MFs に影響を与えなかったものの、Spi MFs の有意な上昇を引き起こした。さらに、KBrO₃ 投与により生じた *gpt* 及び Spi 変異体のスペクトラム解析の結果、同群では欠失サイズの増加を伴った欠失変異頻度の増加が確認された。以上より、KBrO₃ 又は NFT と Alz の併用投与は酸化的 DNA 損傷を加算的に増加させ、KBrO₃ と Alz の併用投与では欠失サイズの増加を伴う遺伝子突然変異を誘発することが明らかになった。

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。これまでに、動物モデルを用いた検討から、高脂肪食摂取は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。我々は、昨年度までにレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いてヘテロサイクリックアミンの一つである 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone (IQ) または 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) と高脂肪食の併用投与を行い、4 週間

の高脂肪食摂取はこれらヘテロサイクリックアミンの *in vivo* 変異原性に影響を与えないことを明らかにした。しかしながら、より長期間に亘る高脂肪食摂取の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は不明のままである。そこで、本研究ではより長期間の高脂肪食摂取の影響を探る目的で6週齢の雄 C57BL 系 *gpt delta* マウスにそれぞれ実験開始後0、8、12または16週目から高脂肪食を給餌し、20週目に実験を終了した。また、実験終了4週間より MeIQx を 0.9 mg/マウス/日の用量で一日一回強制経口投与した。投与終了後、肝臓のレポーター遺伝子突然変異頻度を検索した。高脂肪食を与えた群の体重はどれも高脂肪食投与開始直後から増加し、投与期間に関わらず高脂肪食を与えた群の最終体重は基礎食群に比して有意な高値を示した。高脂肪食を与えた群における絶対および相対肝重量は、高脂肪食投与期間依存的に増加する傾向が認められ、絶対肝重量は高脂肪食を12週間以上与えた群において、相対肝重量は高脂肪食を20週間与えた群において、対照群に比して有意な高値を示した。*gpt assay* の結果、MeIQx を投与した群の *gpt* 変異体頻度は、高脂肪食を与えた何れの群においても対照群に比して高値を示す傾向が認められたが、高脂肪食摂取の影響は認められなかった。また、Spi変異体頻度に MeIQx 投与および高脂肪食の影響は認められなかった。以上の結果から、長期間の高脂肪食摂取はマウス肝臓における食品中発がん物質の遺伝毒性作用に影響を与えない可能性が示された。

異なる2種類の有機リン系農薬のパラチオン (P) とメタミドホス (M) を P0.3+M0.4 mg/kg/day、P0.6+M0.8 mg/kg/day の用量で若齢期、成熟期及び妊娠中期 (投与期間: GD6-GD13)、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平成26年度の調査研究で明らかにした。当該試験では、平成26年度の試験で得られた肝臓および血清を用いて、酸化ストレスのバイオマーカーである過酸化脂質、有機リン酸塩を加水分解する酵素 (Paraoxonase-1: PON1)、有機リン剤の代謝に関与する薬物代謝酵素として *cyp1a2* および *cyp3a23*、さらに *pon1* の mRNA 発現量を RT-PCR 法により検討した。一般状態の観察では用量相関性、暴露時期による症状の発現に違いがあることを確認したが、当該試験の測定結果からは、暴露時期による薬物代謝酵素発現の明確な差を確認することは出来なかった。しかし、妊娠中期の過酸化脂質の増加と *pon1* mRNA 発現量の低下に相関性を認め、酸化ストレスが *pon1* 発現量の低下に影響を及ぼすことが示唆された。また、妊娠中に低下する *cyp1a2* の遺伝子発現量は、妊娠中期に低下した。一方、パラチオンを活性代謝物のパラオクソンに代謝する *cyp3a23* は妊娠中期に高いことを確認した。*cyp3a23* によって代謝されたパラオクソンは *pon1* の低下によって無毒化できず、また *cyp1a2* の発現量の低下によって、2種類の有機リン剤を代謝・分解出来ないため妊娠中期に重篤な神経症状が認められたものと推察した。尚、*pon1* 遺伝子発現量と、血清 PON1 活性との明らかな相関性は認められなかった。これまで我々は、成獣に対する複合農薬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。当該研究では、農薬複合暴露が各ライフステージ、特に免疫機能発達期にどのように影響を及ぼすかに着目し実験を行った。初年度の平成25年度では候補農薬の選定とマウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立を、平成26年度では候補農薬を含む各種化学物質の母動物への単剤暴露による次世代の吸入アレルギー影響の確認を目的に実験を行い、それぞれ有用な結果を得た。平成

27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）および有機リン系化合物（パラチオン）を選択し、各被験物質を妊娠後期の母動物に単剤、もしくは複合暴露後、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調査した。その結果、メトキシクロルないしパラチオンを母動物に単剤投与した児動物において、リンパ節中サイトカイン産生量が対照群と比較し有意に増加した。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が認められた。また、メトキシクロルとパラチオンを母動物に複合投与した児動物において、炎症性細胞数およびケモカイン産生量、リンパ節中サイトカイン産生量が各単剤を母動物に投与された群と比較して有意に増加した。従って、ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびパラチオンの妊娠期における投与は、呼吸器アレルギー反応に対して増強効果を示し、さらにメトキシクロルとパラチオンを複合投与することにより、その作用が相乗的に増加することが示唆された。

我々は、多環式芳香族炭化水素類（Polycyclic aromatic hydrocarbon : PAH）類の一種であり、AhR リガンドである 3-methylchoranthrene (MC) と、食品添加物である thiabendazole (TBZ) を複合曝露することで、芳香族炭化水素受容体 (AhR) が相乗的に活性化されることを見出してきた。本年度の研究では、この相乗的な AhR 活性化機構の機序解明を目指した。TBZ と同じベンゾイミダゾール骨格を有する omeprazole は、CYP1A 酵素阻害作用により AhR リガンドの代謝（不活性化）を遅延させること、AhR 活性化増強作用を示すことが報告されている。そこで、HepG2 細胞を用い、TBZ の CYP1A1 酵素活性（ethoxyresorufin 脱エチル化）への影響を測定した。その結果、AhR 活性化増強作用が見られる濃度域では、TBZ による CYP1A1 酵素活性の有意な阻害は見られなかった。

次に、CYP1A 酵素発現レベルが高い HepG2 細胞と、低いヒト肺がん A549 細胞を用いて、MC による AhR 活性化（標的遺伝子 (CYP1A1) 発現および AhR 依存的レポーター活性の誘導）に対する TBZ 影響を比較解析した。その結果、いずれの細胞株でも TBZ は MC による AhR 活性化を増強した。また、AhR や CYP1 酵素の発現レベルが異なる他のヒト細胞株においても、TBZ と MC の複合処理による相乗的な CYP1A1 発現誘導が観察された。リガンドと結合して活性化された AhR はユビキチン-プロテアソーム系で分解されることから、TBZ が AhR タンパク質の分解を阻害し、AhR の転写活性を増強する可能性がある。そこで HepG2 細胞に MC と TBZ を複合または単独処理し、Western blot 法にて細胞内 AhR タンパク量を測定した。その結果、TBZ 処置は、MC 処理による AhR の分解を抑制しなかった。以上、本研究より、TBZ の AhR 活性化増強作用は、種々細胞株に共通した現象であること、また、その作用は、CYP1A 酵素活性の阻害や AhR タンパク質の分解阻害とは異なる未知の機構を介して起こることが推察された。

生活習慣病の予防効果が注目されてい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の毒性を評価することは難しい。そこで、複合影響の観点からフェノール性抗酸化物質の酸化反応と、生成するキノン体由来する酸化ストレス反応をプラスミド DNA 存在下で行うことで複合影響を評価できる簡便な試験法を開発した。この試験法を利用して、代表的なフラボノイドの毒性を検討した結果、劇症肝炎が報告された緑茶抽出物の主な成分であるエピガロカテキンガレートは、エピガロカテキンへと加水分解された後、酸化ストレスによる毒性を発現することが明らかとなった。また、フェノール

性抗酸化物質およびそのキノン代謝物について分子軌道計算を行い、得られた物理化学的パラメータ（HOMO、LUMO、生成熱）について毒性との相関を検討した。その結果、キノン代謝体からラジカルアニオンへの還元され易さの指標となる生成熱は強力な酸化ストレスを誘発するエピガロカテキンが最も小さいことから、分子軌道計算からの毒性予測が可能ながわかった。以上の結果より、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ことで酸化ストレスによる毒性を発現する可能性が示唆された。本研究で検討した試験法は第1相薬物代謝酵素を誘導する健康食品やサプリメントとフェノール性抗酸化物質との複合影響の評価として期待される。

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）

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、平成25及び26年度におい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）と動物用医薬品のフルメキン（FL）を *gpt delta* マウスに併用投与し、*gpt* assay 及び *Spi* assay による突然変異誘発性の検索を実施し、FL投与によって加算された細胞増殖活性がESの突然変異誘発性に及ぼす影響を検討した。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した。また、臭素酸カリウム（ KBrO_3 ）、ニトロフラントイン（NFT）及びアリザリン（Alz）の併用投与についてさらに変異スペクトラム解析を行い、遺伝子突然変異における詳細な解析を行うとともに、NFTとAlzの併用投与群についても酸化的DNA損傷と遺伝子突然変異における複合影響を検討した。

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食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。これまでの研究で、4週間の高脂肪食摂取は2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone (IQ) または2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)の*in vivo*変異原性に影響を与えないことが明らかとなった。しかしながら、より長期間にわたり高脂肪食を摂取させ、生体に対して顕著な高脂肪食摂取の影響が生じる条件下で検討する必要があると考えられた。そこで本研究では、C57BL系 *gpt delta* マウスに高脂肪食を長期間与えるとともに、MeIQxを併用投与して、MeIQxの肝臓における*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. 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。平成27年度は平成26年度の試験で得られたサンプルを用いて、酸化ストレスのバイオマーカーである過酸化脂質、有機リン酸塩を加水分解する酵素 Paraoxygenase-1 (PON1) 代謝活性、*pon1*、有機リン系農薬の代謝に関わるとされる *cyp1a2* および *cyp3a23* の遺伝子発現量を測定した。

3-2.本研究では、初年度(平成25年度)に候補農薬の選定およびマウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立をおこなった。2年目(平成26年度)には候補農薬の母動物への単剤暴露による次世代の吸入アレルギー影響の確認を行い、被験物質の母動物への投与が児動物の呼吸器アレルギー反応を悪化させることが判明した。本年度は、複合暴露による影響を調査するため、免疫系への影響が示唆される有機塩素系農薬および有機リン系農薬を対象に、妊娠期に複合的に反復経口投与した際の児動物への吸入アレルギー疾患に及ぼす影響を調査した。

4. ベンズイミダゾール類による芳香族炭化水素受容体(AhR)の活性化(吉成)

BNZ類によるCYP1酵素の阻害とAhR活性化増強との関連性の解析として、HepG2細胞を用い、BNZ類によるCYP1A1酵素活性(ethoxyresorufin O-脱エチル化)への影響とAhR活性化増強との関連性について解析した。さらに、HepG2細胞とはAhRやCYP1A1酵素発現レベルが異なるとされる

ヒト細胞株を用いて、AhR活性化(標的遺伝子CYP1A1の転写およびAhR依存的なレポーター活性)に対するMCとTBZの複合影響を比較した。BNZ類によるAhRタンパク質安定化の可能性として、AhRの活性化は複数のフィードバック制御を受けるが、その一つとして、ユビキチン-プロテアソーム系による分解が知られている。リガンドにより活性化されたAhRタンパク質は、ユビキチン化されてプロテアソームにより分解されるが、プロテアソームの阻害がAhR活性化の持続的増強を引き起こすことが示されている。そこで、BNZ類にも同様の作用があるか否かを、細胞内AhRタンパク質レベルを指標として解析した。

5. フェノール性化合物の複合影響(福原)
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。H27年度は我々が確立した酸化代謝を伴う毒性の簡便な試験法を用いて、劇症肝炎の報告例があった緑茶抽出物の成分の解析を行い、毒性発現機構について検討を行った。また、酸化代謝を伴って毒性を発現するフェノール性抗酸化物質について分子軌道計算を行い、毒性の強さの指標となる物理化学的パラメータの解析を行った。

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)

【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。*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、ES を 10 又は 100 mg/kg/day の用量で強制経口投与（7 回/週）し、基礎飼料を摂取させた。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 に変更して試験を継続した。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。

【実験 2】腎皮質について酸化 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (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。

(統計学的処理方法)

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。

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 週齢雄 C57BL 系 *gpt delta* マウス (各群 5 匹) にそれぞれ実験開始後 0、8、12 または 16 週目から高脂肪食 (粗脂肪量 32%) を給餌し、20 週目に実験を終了した。また、実験終了 4 週前よりコーン油に懸濁した MeIQx を 0.9 mg/マウス/日の用量で一日一回強制経口投与した。MeIQx 非投与群には

基礎食（粗脂肪量 5.4%）または高脂肪食を給餌した。投与終了後、肝臓を摘出し、肝臓のレポーター遺伝子突然変異頻度（各群 3 匹）を検討した。

（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. 試験試料は、平成 26 年度に実施した「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」¹⁾（動物実験委員会承認番号：AC14056）で得られた、若齢、成熟期、妊娠中期および後期の Wistar Hannover 系 SPF ラット [Cri:WI (Han)]（日本チャールス・リバー株式会社日野生産所（滋賀県）の肝臓および血清を用いた。若齢期は 3 週齢、成熟期は 7 週齢で購入し、投与用量はパラチオン (P) 0.6 mg/kg、メタミドホス (M) 0.8 mg/kg を混合したものを高用量 (P 0.6+M 0.8 mg/kg/day) とした。また、P 0.3 mg/kg および M 0.4 mg/kg を混合したものを低用量 (P 0.3+M 0.4 mg/kg/day) とし、溶媒を投与する対照群 (0 mg/kg/day) を設置した。投与経路は反復強制経口投与とした。投与期間は、若齢期および成熟期は 14 日間、妊娠中期および偽妊娠中期は

GD6-GD13/PD6-PD13、妊娠後期および偽妊娠後期は GD6-GD20/PD6-PD20 とした。酸化ストレス指標の過酸化脂質を、肝臓を用いた TBA 法 (2-thiobarbituric acid 法) で測定した。血清を用いて、有機リン酸塩を加水分解する酵素として知られる Paraoxonase1 (PON1) を測定した。測定にはパラオキシナーゼ (PON-1: Paraoxonase 活性) 測定キット (日研ザイル株式会社) を用いた。肝臓を用いて *pon1*、*cyp1a2*、*cyp3a23* の mRNA 発現量を real-time PCR 法で発現量を GAPDH との相対的定量法で算出した。

有意差検定

各測定項目の結果は、成熟期との統計学的有意差を危険率 5 および 1% レベルで解析し、Student's *t*-test を実施して有意差の有無を判定した。

3.2 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。試験動物は妊娠 8 日目 (10-13 週齢) にて購入し、7 週齢で試験に用いた。パラチオンは、0.15 mg/kg、メトキシクロルとベンゾ[a]ピレンは 10 mg/kg を設定した。また媒体のみを投与する媒体対照群を設定した。複合投与においては、上記濃度に調製した投与液を等量ずつ混合して作成した。TMA は感作には 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。媒体対照群 TMA 溶液は用時調製とした。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。ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびパラチオンは、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 μ L 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。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後大静脈から採血の後に安楽殺し、肺胞洗浄液 (BALF) および肺門リンパ節を採材した。血液は遠心して血清を分離し、一部を ELISA 法 (BD OptEIA mouse IgE Set) による血清中の IgE 産生量測定に用いた。BALF はフローサイトメトリー法による各種細胞数解析 (好酸球、肥満細胞、抗塩基球) に供した。肺門リンパ節から細胞懸濁液を調製し、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。細胞懸濁液の一部はフローサイトメーターを用いて記憶ヘルパー 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。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。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。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、肺門リンパ節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。

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無を判定した。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いに関しては、一般財団法人残留農薬研究所動物実験規程に基づき、国際実験動物ケア評価認証協会 (AAALAC International) 認証の試験施設において実施した (動物実験委員会承認番号; AC15006)。

4. ベンズイミダゾール類による芳香族炭化水素受容体 (AhR) の活性化 (吉成)
BNZ 類による CYP1 酵素の阻害作用の解析には、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いた。遺伝子発現解析には、HepG2 細胞のほか、ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞、ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞、ヒト子宮がん由来 Hela 細胞、Ishikawa 細胞を使用した。また、AhR 活性化能の測定には、AhR レポータープラスミド (XRE-Luc) を HepG2 細胞および A549 細胞に安定導入することで作成した HepG2-XL24 および A549-XL 細胞を使用した。AhR リガンドとして MC を、BEZ 化合物として TBZ および OME を用いた。CYP1A 酵素阻害剤としては α -naphthoflavone (ANF) を使用した。HepG2 細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように

播種し、48時間培養した。さらに、MC (1 μ M) を24時間前処理することでCYP1A1酵素発現を誘導した。培地を無血清培地に置換し、被検物質の存在下、CYP1A1酵素の基質 (5 μ M ethoxyresorufin) を作用させた。30分後、培養上清中に遊離されたCYP1A1酵素依存的代謝物 (resorufin) に由来する蛍光 (励起波長 535 nm、蛍光波長 595 nm) を測定した。また、細胞を溶解後、BCA-protein assay kit (PIERCE) を用いて蛋白質濃度を測定し、蛋白質あたりの酵素活性を算出した。さらに、CYP1A1酵素活性に対する阻害効果を算出した。各細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように播種し、被験化合物を添加して一定時間培養後、総RNAをSepasol(ナカライテスク)により単離した。この総RNAより、cDNAを合成した。このcDNAにAhR標的遺伝子 (CYP1A1 および CYP1B1) に特異的なプライマーとFast SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を添加し、StepOneリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) を用いて定量的PCRを行った。HepG2-XL24細胞およびA549-XL細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように96穴プレートに播種し、48時間前培養した。前培養後、被検化合物を添加し、一定時間培養した。その後、Reporter Lysis Buffer (Promega) を用いて細胞を溶解した。この細胞溶解液にルシフェラーゼ基質液 (東洋インキ) を添加し、生じた発光をルミネッセンサーPSN (ATTO) により測定した。また、BCA-protein assay kitを用いて細胞溶解液中のタンパク質濃度を測定し、タンパク質あたりの発光強度を算出した。HepG2細胞を6穴プレートで培養し、化合物を添加して一定時間培養後、総タンパク

質を7.5%SDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ウサギ抗ヒトAhR抗体 (Santa Cruz, sc-5579) あるいはウサギ抗ヒト β -actin抗体 (Cell Signaling Technology, #4967) を用いて、ECL-plus試薬 (PIERCE) により検出した。

統計解析

データ解析は、GraphPad Prism5を使用して行った。多重比較にはANOVA検定を、事後比較にはDunnett's検定またはNewman-Keuls多重比較検定を用いた。

5. フェノール性化合物の複合影響 (福原)
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分間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10mMNADH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、ゲルを洗浄後、UVトランスイルミネーター上で撮影した。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。Spartan'10 (Wavefunction, Inc.) を用いて分子軌道計算を行った。計算理論は密度汎関

数法 (DFT: B3LYP, 6-31G*) を用いて行い、抗酸化物質およびそのラジカルカチオンの生成熱、HOMO と、抗酸化物質のキノン酸化体およびそのラジカルアニオンの生成熱、LUMO を求めた。

(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)

【実験 1】単独投与群において、主に点突然変異頻度を示す *gpt* MF は、対照群 (0.49 ± 0.25) に比して ES 100/70 mg/kg (1.11 ± 0.55 , $p < 0.05$) で有意な上昇を示した。FL 投与群では、FL 単独投与群 (0.55 ± 0.26) に比して ES 100/70 mg/kg (1.11 ± 0.55 , $p < 0.05$) の併用投与群 (1.88 ± 0.73 , $p < 0.01$) で有意な上昇を示し、ES 100/70 mg/kg 単独投与群に比しても有意な高値を示した ($p < 0.05$)。 *gpt* 変異体のスペクトラム解析の結果、ES 投与群では G:C-T:A transversion 変異頻度に変化が認められ、単独投与群では、ES 100/70 mg/kg (0.18 ± 0.10 , $p < 0.05$) で対照群 (0.04 ± 0.07) に比して有意な高値を示した。FL 投与群では、FL 単独投与群 (0.06 ± 0.09) に比して ES 100/70 mg/kg の併用投与群 (0.54 ± 0.26 , $p < 0.01$) で有意に上昇した。また、ES 10 mg/kg 併用投与群においても、ES 10 mg/kg 単独投与群に比して有意な高値を示した (ES 10 mg/kg; $p < 0.05$, ES 100/70 mg/kg; $p < 0.01$)。主に欠失変異頻度を示す *Sp1* MF は、対照群 (0.26 ± 0.13) に比していずれの投与群においても有意な増加は認められなかった。

【実験 2】KBrO₃ 又は Alz 単独投与群及び KBrO₃ と Alz の併用投与群については、平成 26 年度に報告済みの各群 3 例を含めた各群 5 例の解析結果を示す。腎皮質の DNA 中 8-OHdG レベルは、対照群 ($0.37 \pm 0.03/10^5$ dG) に比して、Alz 単独投与群 ($0.69 \pm 0.18/10^5$ dG) では上昇傾向が認められ、KBrO₃ 250 ppm 群 ($0.86 \pm 0.15/10^5$ dG) 及び KBrO₃ 500 ppm 群 ($1.00 \pm 0.22/10^5$ dG) において有意な上昇が認められた。一方、Alz と KBrO₃ 250 ppm ($1.40 \pm 0.29/10^5$ dG) 又は KBrO₃ 500 ppm ($1.95 \pm 0.39/10^5$ 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 ($p < 0.01$)、各用量の 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。また、NFT 投与群については、対照群に比して、NFT 500 ppm 群 ($0.61 \pm 0.32/10^5$ dG) で上昇傾向が、NFT 2500 ppm 群 ($1.08 \pm 0.32/10^5$ dG) では有意な上昇が認められた。一方、Alz と NFT 500 ppm ($1.30 \pm 0.44/10^5$ dG) 又は NFT 2500 ppm ($2.04 \pm 0.49/10^5$ 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 ($p < 0.01$)、各用量の NFT 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* MF は、KBrO₃ 投与群において用量依存的な上昇 (250 ppm 群: 1.03 ± 0.29 、500 ppm 群: 1.22 ± 0.19) を認め、KBrO₃ 500 ppm 群では対照群 (0.49 ± 0.19) に比して有意な高値 ($p < 0.05$) を示した。一方、Alz 併用投与群においても KBrO₃ の用量依存的な *gpt* MF の上昇 (250 ppm 群: 0.69 ± 0.56 、500 ppm 群: 1.15 ± 0.25) が認められたものの、各用量の KBrO₃ 単独投与群と比して変化は認められなかった。 *gpt* 変異体のスペクトラム解析では、KBrO₃ 500 ppm と Alz の併用投与

群では、1 塩基欠失変異の頻度が対照群 (0.06 ± 0.09) に比して有意な高値 (0.42 ± 0.11 , $p < 0.05$) を示した。また、2 塩基以上の欠失変異の頻度も対照群 (0.03 ± 0.07) に比べ、上昇傾向 (0.15 ± 0.19) を示した。対照群の Spi MF が 0.20 ± 0.12 だったのに対し、KBrO₃ 投与群では用量依存的な増加 (250 ppm 群: 0.30 ± 0.16 , 500 ppm 群: 0.62 ± 0.31) が認められた。一方、Alz 併用投与群では、KBrO₃ 500 ppm と Alz の併用投与群において対照群に比して有意な高値 (1.02 ± 0.40 , $p < 0.01$) を示し、KBrO₃ 単独投与群と比しても顕著な増加が認められた。KBrO₃ 250 ppm と Alz の併用投与群 (0.40 ± 0.18) では KBrO₃ 単独投与群に比して明らかな差は認められなかったものの、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 (1.02 ± 0.40 , $p < 0.01$) 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 変異体のスペクトラム解析の結果、対照群では G/C の繰り返し配列部位及び A/T の繰り返し配列部位における欠失変異頻度がそれぞれ 0.07 ± 0.07 , 0.05 ± 0.07 だったのに対し、KBrO₃ 500 ppm と Alz の併用投与群では 0.22 ± 0.14 , 0.34 ± 0.29 と上昇傾向が認められた。また、2 塩基から 1000 塩基までの欠失変異及び 1000 塩基上の欠失変異もそれぞれ対照群 (0 , 0.03 ± 0.07) に比して上昇傾向 (0.05 ± 0.11 , 0.18 ± 0.20) を示した。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 (西川)

高脂肪食を投与した群の体重は、高脂肪食の投与開始時期に関わらず高脂肪食の投与開始時から増加し、高脂肪食を 8 週以上投

与した群における最終体重は基礎食群に比して有意に上昇した。高脂肪食を投与した群の絶対および相対肝重量は、基礎食群に比して高脂肪食投与期間依存的に増加する傾向が認められ、高脂肪食を 20 週間与えた群における絶対肝重量は基礎食群に比して有意な高値を示した。gpt アッセイの結果、MeIQx を投与した群における gpt 変異体頻度 (MF) は、高脂肪食投与期間に関わらず対照群に比して高値を示す傾向が認められた。しかしながら、高脂肪食と MeIQx を投与した群の gpt MF は、何れの高脂肪食投与期間においても、MeIQx 単独群に対し顕著な変化は認められなかった。また、Spi アッセイの結果、MeIQx 投与および高脂肪食の影響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 酸化ストレス指標の過酸化脂質は、0 mg/kg/day では各試験群間における統計学的有意差は認められなかった。P0.3+M0.4 mg/kg/day では若齢期および妊娠後期で成熟期と比較して有意な低値を示した。P0.6+M0.8 mg/kg/day においても若齢期および妊娠後期で低い値を示した。一方、妊娠中期は、0 mg/kg/day で僅かに高い値を示し、さらに P0.3+M0.4 mg/kg/day および P0.6+M0.8 mg/kg/day では、用量相関性に高い値を示した。偽妊娠動物では、成熟期と妊娠中期と同程度であった。死亡を含む重篤な神経症状が認められた妊娠中期における PON1 活性について血清を用いて測定した。また、ライフステージによる違いを検討するため、若齢期および成熟期についても検討した。若齢期では活性は有意に高く、

用量相関性に高い値を示した。成熟期では投与に起因する変化は認められなかったが、妊娠中期では、用量相関性に PON1 が活性することを確認した。pon1、cyp1a2 および cyp3a23 mRNA の発現量を定量解析した。pon1 の発現量は、0 mg/kg/day では若齢期および妊娠中期で低く、P0.3+M0.4 mg/kg/day では、妊娠中期および妊娠後期で有意な低値を示した。P0.6+M0.8 mg/kg/day では妊娠および偽妊娠動物で有意に高かった。cyp1a2 の発現量は、0 mg/kg/day では若齢期および妊娠中期で低く、P0.3+M0.4 mg/kg/day では妊娠後期で有意に高い。P0.6+M0.8 mg/kg/day では若齢期および妊娠中期で成熟期よりも有意な低値を示すが、P0.3+M0.4 mg/kg/day よりも高い値を示すことから、用量相関性に発現量が多かった。cyp3a23 の発現量は、0 mg/kg/day および P0.3+M0.4 mg/kg/day で若齢期および妊娠中期で有意に高い値を示したが、ほぼ同程度の発現量であった。P0.6+M0.8 mg/kg/day では各試験群で有意差を認めないが、各試験群で P0.3+M0.4 mg/kg/day と同程度あるいは僅かな増減を示した。

3-2. パラチオンとベンゾ[a]ピレンを複合投与した群にのみ対照群に比べて血清中 IgE 量の有意な増加が認められた。肺胞洗浄液中の好酸球数、肥満細胞数および好塩基球数測定結果では、好酸球数および好塩基球は、パラチオンを単剤投与した群で媒体対照群と比べて増加が認められた。またメトキシクロルとパラチオンを複合投与した群において、各単剤投与に比べて有意な増加が認められた。肥満細胞数は、メトキシクロルとパラチオンの複合投与群、およびパラチオンとベンゾ[a]ピレンの複合投与群

において、各単剤投与群と比較し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、-17A) 測定結果では、記憶ヘルパーT 細胞数は、血清中の IgE 産生量と同様に、各投与群で媒体対照群と比較して増加が認められた。各サイトカイン産生量は、メトキシクロルとベンゾ[a]ピレン、ないしはメトキシクロルとパラチオンを複合投与した群において、各単剤の投与群に比べて増加が認められた。

4. ベンズイミダゾール類による芳香族炭化水素受容体 (AhR) の活性化 (吉成)

CYP1A1 酵素活性 (ethoxyresorufin O-脱エチル化 (EROD) 活性) に対する TBZ および OME の阻害作用を解析した。ここでは、酵素阻害の陽性対照として ANF を使用した。ANF は 1 μ M から CYP1A1 酵素活性を 80%近く阻害した。一方、TBZ および OME は 30 μ M 以上の高濃度で CYP1A1 酵素活性を阻害したが、その阻害は最高濃度 (100 μ M) で 50%程度に過ぎなかった。さらに、TBZ および OME が AhR 活性化増強作用を示した 10 μ M では、有意な CYP1A1 酵素活性阻害は認められなかった。TBZ に弱いながら CYP1A1 活性阻害作用が観察されたため、CYP1A1 発現が高い HepG2 細胞由来 HepG2-XL24 細胞と、発現が低いヒト肺がん A549 細胞由来の A549-XL 細胞を用い、各細胞に MC (0.1 μ M) と TBZ (10 μ M) を複合処理し、AhR 活性化における複合影響を比較検討した。その結果、HepG2-XL24 細胞では、TBZ と MC の複合処理により AhR 活性化能が大幅に増強した。また、A549-XL 細胞株においても、HepG2-XL24

細胞株に比べて増強作用は弱いものの、同様の相乗的な AhR 活性化が認められた。さらに、HepG2 細胞や A549 細胞とは AhR や CYP1A 酵素の発現レベルが異なる複数のヒト細胞株を用いて、MC と TBZ をそれぞれ単独あるいは複合処理した場合の効果を検討した。24 時間後の AhR 標的遺伝子 (*CYP1A1* および *CYP1B1*) の mRNA レベルを測定したところ、*CYP1A1* 遺伝子は Ishikawa 細胞を除いた 5 細胞において、また、*CYP1B1* 遺伝子は A549 細胞および Hela 細胞を除いた 4 細胞において、複合処理群でそれぞれの単独処理に比べて強い誘導が認められた。HepG2 細胞に MC (0.1 または 1 μM) と TBZ (10 μM) を複合または単独処理し、3 および 6 時間後における細胞内 AhR タンパク質レベルを、Western blot 法により測定した。その結果、MC による AhR 分解作用は確認できたが、その分解作用は濃度依存的とはならなかった。また、TBZ 処理による AhR 分解抑制作用は確認できなかった。

5. フェノール性化合物の複合影響 (福原)
一電子酸化剤 DPPH を用いてキノンへの酸化を行い、引き続きプラスミド DNA 共存下、還元剤 NADH によるキノンラジカルアニオンへの還元を行う、酸化代謝を伴う複合毒性の試験系を用いて、緑茶に含まれている代表的なフェノール性抗酸化物質の毒性評価を行った。反応系に添加した DPPH の濃度は抗酸化物質の 4 倍量をそれぞれ用い、NADH は全て 1mM で測定を行った(図 1)。その結果、カテキンの光学異性体であるエピカテキンはカテキンと比べて強力に DNA を切断し、エピガロカテキンはさらに

強い切断活性を示した。一方、緑茶に最も多く含有されているエピガロカテキンガレートはエピカテキンとほぼ同程度の切断活性を示したが、エピガロカテキンと比べて活性が大きく低下した。フェノール性抗酸化物質とそのキノン酸化体について分子軌道計算を行い、毒性評価に有効な物理化学的パラメータの検討を行った。フェノール性抗酸化物質は酸化酵素によってキノンへと酸化された後、NADH 等の還元物質によって生成するキノンラジカルアニオンが酸素分子を還元して活性酸素を発生することが考えられる。そこで、密度汎関数法による分子軌道計算を行い、代表的なフェノール性抗酸化物質について、キノンへの酸化され易さの指標に関わる最高被占軌道(HOMO)、および一電子酸化体(ラジカルカチオン)の生成熱($\Delta E1$)を求めた。なお、 $\Delta E1$ はフェノール性抗酸化物質と一電子酸化体の生成熱(E)から求めた。また、キノン酸化体から活性酸素発生能に関わる、キノンの最低空軌道(LUMO)、および一電子還元体(ラジカルアニオン)の生成熱($\Delta E2$)を求めた。なお、 $\Delta E2$ はキノンと一電子還元体の生成熱(E)から求めた(表 1)。キノンへの酸化され易さの指標となる、HOMO はエピカテキン > エピガロカテキン > エピガロカテキンガレート > カテキンの順で小さくなることから、エピカテキンが最も酸化され易いことがわかった。また、ラジカルカチオンの生成熱($\Delta E1$)からは、エピガロカテキン > エピカテキン > エピガロカテキンガレート > カテキンの順で小さくなることから、カテキンが最も酸化され易いことが示された。一方、キノンの還元され易さの指標となる LUMO はエピカテ

キン > カテキン > エピガロカテキン > エピガロカテキンガラートの順で小さくなり、エピカテキンのキノン酸化体が最も還元され易いことがわかった。また、キノンラジカルアニオンの生成熱 (ΔE_2) からはカテキン > エピカテキン > エピガロカテキンガラート > エピガロカテキンの順で小さくなり、エピガロカテキンのキノンが最も酸化され易いことが示された。以上の結果より、フェノール性抗酸化物質のキノンラジカルアニオンの生成熱 (ΔE_2) が、プラスミド DNA を用いた酸化を伴う毒性評価試験の結果と最もよく相関することがわかった。

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)

【実験 1】 *gpt delta* マウスを用いて ES の突然変異誘発性に対する FL 併用投与の影響を検討した結果、FL の併用投与により高用量の ES 投与による *gpt MF* が増強されることが明らかになった。さらに、FL の併用投与は単独では変異を誘発しない低用量の ES でも突然変異を引き起こすことを明らかにした。平成 26 年度までの結果から、FL の併用投与により ES の代謝活性化及び排泄に寄与する *Cyp1A2* 及び *Ugt1a1* の遺伝子発現に変化が認められたものの、突然変異の原因となる ES 特異的 DNA 付加体量への影響は認められなかった。一方、FL は肝組織傷害に伴う代償性の細胞増殖を引き起こすことから、FL の併用投与は ES の細胞増殖活性に加算的に作用することを明らかにした。本研究で認められた FL による突然変異誘発性の増強作用は、細胞増殖による DNA 複

製頻度の増加により、ES 特異的 DNA 付加体に対する塩基の誤挿入が増加したこと起因するものと考えられた。【実験 2】 酸化的 DNA 損傷の指標である 8-OHdG レベルは、 $KBrO_3$ 、NFT 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有意な上昇あるいは上昇傾向が認められ、平成 26 年度の研究成果と一致した。一方、 $KBrO_3$ 又は NFT に対する Alz の併用投与は 8-OHdG レベルの顕著な上昇を引き起こし、 $KBrO_3$ 又は NFT 単独投与群に比しても有意な高値を示したことから、 $KBrO_3$ 又は NFT に対する 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、 $KBrO_3$ と Alz 2 剤の併用投与群では、*gpt MF* 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 MF* の有意な上昇が認められた。さらに、 $KBrO_3$ 500 ppm と Alz の併用投与群では 1 塩基欠失変異頻度の増加に加えて 2 塩基以上の大型の欠失変異の頻度が明らかに増加した。このことから、近接する領域に生じる多数の 1 塩基欠失変異により大型の欠失変異が誘発される可能性が考えられた。以上より、 $KBrO_3$ 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増加を引き起こすことが示された。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響 (西川)

今回、長期間にわたる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明らかにする目的で、C57BL

系 *gpt delta* マウスに粗脂肪含量 32%の高脂肪食を最長 20 週間与えた結果、体重は高脂肪食の投与開始時から増加し、高脂肪食を 8 週以上投与した群における最終体重は基礎食群に比して有意に上昇した。さらに、肝重量も高脂肪食投与期間依存的に増加する傾向が認められ、高脂肪食を 20 週間与えた群における絶対肝重量は基礎食群に比して有意な高値を示した。昨年度までの研究で、F344 系 *gpt delta* ラットに高脂肪食を 4 週間自由摂取させたところ、最終体重は基礎食群に対して約 6%、絶対および相対肝重量はそれぞれ約 15%および 9%の増加であったのに対し、今回 C57BL 系 *gpt delta* マウスに同一の高脂肪食を 20 週間与えた結果、最終体重は約 32%増加し、絶対および相対肝重量はそれぞれ約 113%および 60%増加したことから、今回の実験条件下では、長期間の高脂肪食によって、生体に対しより顕著な影響が認められたものと考えられた。このような実験条件下において、肝臓を用いた *gpt assay* を行った結果、MeIQx 投与群における *gpt MF* は、高脂肪食摂取の有無ならびに高脂肪食摂取期間に関わらず基礎食群に比して高値を示す傾向が認められた。しかし、高脂肪食と MeIQx を投与した群の *gpt MF* は、何れの高脂肪食投与期間においても MeIQx 単独群に対して顕著な変化は認められなかった。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、ラットやマウス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肝発がん物質である。本実験条件下においても、MeIQx 投与群における *gpt MF* は基礎食群に比して高値を示す傾向が認め

られたことから、MeIQx のマウス肝臓における *in vivo* 変異原性が再確認されたものと考えた。しかしながら、高脂肪食摂取は MeIQx の *gpt MF* に明らかな影響を与えなかったことから、長期間の高脂肪食の摂取は肝臓における食品中発がん物質の遺伝毒性作用に影響を与えない可能性が示された。

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. 当該試験では 0 mg/kg/day の妊娠中期で僅かに過酸化脂質の上昇が認められ、用量相関性に高い値を示すことから、妊娠による胎児の発育に伴う生理活性学的変化に伴うストレスに加え、被験物質投与に起因する生体への影響により、過酸化脂質が上昇したと考える。一方、若齢期では 0 mg/kg/day、P0.3+M0.4 mg/kg/day および P0.6+M0.8 mg/kg/day でいずれも他の試験群よりも低く、さらに同程度であった。これは、若齢期のストレスに対する感受性が低いこと、また被験物質投与による一般状態が他の試験群よりも極軽微であったためと考える。血清を用いた Paraoxonase (PON1) 活性から、血清における PON1 を測定した。当該試験では、PON1 活性の妊娠期における低下が認められず、さらに若齢期における活性が成熟期よりも高く、週齢に相関した PON1 活性の変化は認められなかった。有機リン剤の代謝に関わるとされている各種薬物代謝酵素の mRNA 発現について検討をした。*pon1* の 0 mg/kg/day で認められた妊娠中期における低い発現量は、妊娠期に PON1 活性が低下するという報告と一致する。さらに、妊娠期の PON1 活性の低下は、酸化ストレスによる生体内の酸化還元のパ

ランスが崩れることによると報告されている。一方、エストロゲンによってPON1活性が増加するという報告がある。偽妊娠動物は、交尾後の妊娠動物と同様に完全生殖周期と考えられ、非妊娠動物よりも多くエストロゲンが分泌されたことによって、偽妊娠動物における *pon1* の高い発現量が示されたと考えた。一方、*pon1* 発現量が妊娠期で低下するということについては明らかにできなかったが、妊娠中期の過酸化脂質が高い事を確認し、妊娠に伴う酸化ストレスが *pon1* の発現量に僅かに影響すると考えた。当該試験では妊娠中期に *cyp1a2* の発現量が僅かに低下することを確認した。妊娠期における薬物代謝酵素活性の変化が胎児や母体に対する影響が示唆されているが、今回の実験では確認出来なかった。

3-2. 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パラチオンを妊娠動物に複合的に投与し、生まれてきた児動物の免疫機能を調査することで、各被験物質の免疫攪乱作用が複合暴露によりどのように作用するかを調査した。その結果、単剤投与群および複合投与群において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するだけでなく、メトキシクロルとパラチオンの複合投与群では、呼吸器アレルギー反応に対する増強効果が各単剤投与群に比べて有意に認められた。上記結果より、ベンゾ[a]ピレン、メトキシクロルおよびパラチオンの妊娠動物への投与により免疫攪乱が起り、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し、さらにその増強作用は、メトキシクロルとパラ

チオンを複合的に投与されることで相乗的に増加する可能性が示唆された。

4. ベンズイミダゾール類による芳香族炭化水素受容体 (AhR) の活性化 (吉成)
はじめにTBZなどのBNZ類によるAhR活性化の増強効果がCYP1A1酵素によるAhRリガンドの代謝 (不活性化) 阻害に起因するか否かを検討した。しかし、TBZおよびOMEは有意なCYP1A酵素阻害作用を有するものの、複合影響が見られた10 μ Mでは阻害作用を示さなかった。さらに、CYP1A1遺伝子およびその酵素発現が低いとされるA549細胞を用いて、TBZによる複合影響の有無を解析したところ、HepG2細胞と同様、A549細胞でもMCとTBZのAhR活性化における複合影響 (相乗効果) が確認された。また、AhRやCYP1A1酵素の発現レベルが異なる細胞でも同様の傾向が見られた。これらの結果から、AhR活性化におけるTBZとMCとの複合影響は、TBZのCYP1A阻害作用によるものではないことが示唆された。リガンドにより活性化されたAhRタンパク質は、ユビキチン化を受けプロテアソームにより分解されるため、このプロテアソームの阻害は、AhR活性化の増強に繋がることが考えられる。実際に、プロテアソーム阻害剤であるMG132の処理により、AhRの活性化が増強する例も示されている。そこで、細胞内AhRタンパク質レベルに及ぼすTBZの影響についてWestern blot法を用いて解析したが、TBZによる顕著なAhR分解抑制作用は確認できなかった。このことから、TBZによるAhR活性化増強作用はAhRタンパク質の分解抑制に起因するものではないことが示唆された。

5. フェノール性化合物の複合影響（福原）

本研究で開発した簡便な毒性試験法は酸化代謝物であるキノンをプラスミド DNA を用いた切断反応の試験系で同時に生成させることで、不安定なキノンの活性酸素毒性を評価することが可能となった。しかしながら、入手困難な化合物については毒性を評価することが難しい。そこで次に、分子軌道計算を利用した化学構造による毒性予測法の開発を行った。キノンへの酸化反応とキノンのラジカルアニオンへの還元反応について物理化学的パラメータを求め、どちらが毒性発現の律速になるかを検討した結果、代表的なカテキン類の毒性はキノンのラジカルアニオンへの生成熱と相関することが明らかとなった。以上、本研究で開発した試験法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の評価系として活用が期待される。今後は、フェノール性抗酸化物質以外の化合物についても複合影響を評価できるように本試験法の改良を行う予定である。

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）

細胞内微小環境を変化させる食品中化学物質は食品中の遺伝毒性発がん物質の発がんリスクを増加させる一つの要因になることが明らかになった。酸化的 DNA 損傷を引き起こす食品中化学物質の同時ばく露は 8-OHdG の加算的蓄積を引き起こし、8-OHdG による欠失変異の発生に対して、欠失サイズの増加を伴う変異頻度の増加を

引き起こすことが明らかになった。

2. 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響（西川）

長期間の高脂肪食の摂取は肝臓における食品中発がん物質の遺伝毒性作用に影響を与えない可能性が示された。

3. 食品中の残留農薬の複合暴露影響に関する研究（原田）

対照群（投与用量 0 mg/kg/day）では、妊娠中期に *pon1* および *cyp1a2* mRNA 発現量が低下することを確認した。一方、複合投与群では *cyp3a23* は高い値を示したことから、*cyp3a23* によってパラチオンの活性代謝物であるパラオクソンを *pon1* の低下によって、無毒化できず、さらに、有機リン剤の代謝に関与する *cyp1a2* の低下がメタミドホスの代謝に影響を与えた結果、妊娠中期に死亡を含む重篤な神経症状が認められたと考えた。そして、妊娠中期には過酸化脂質が僅かに増加していたことから、胎児の発育に伴う母体の生理学的変化は生体に対するストレスとなり、抗酸化物質でもある *pon1* の低下に影響しているものと推察した。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、メトキシクロルおよびパラチオンの妊娠期における反復単剤投与は、呼吸器アレルギー反応に対して増強効果を示し、さらにメトキシクロルとパラチオンを複合的に反復投与すると、その増強作用が相乗的に増加することが示唆された。

4. ベンズイミダゾール類による芳香族炭化水素受容体 (AhR) の活性化（吉成）

本実験の結果から、TBZによるAhR活性化増強は①CYP1A 酵素の阻害によるものではないこと、②細胞や核内のAhRの分解抑制によるものではないことが示された。今後はAhR核内移行やクロマチン構造に及ぼす影響などについて、転写共役因子に着目し解析を行う必要があると考える。

5. フェノール性化合物の複合影響 (福原)

複合影響の観点からフェノール性抗酸化物質の酸化反応と、生成するキノン体に由来する酸化ストレス反応をプラスミド DNA 存在下で行うことで複合影響を評価できる簡便な試験法を開発した。この試験法を利用して、代表的なフラボノイドの毒性を検討した結果、劇症肝炎が報告された緑茶抽出物の主な成分であるエピガロカテキンガレートは、エピガロカテキンへと加水分解された後、強力な酸化ストレスによる毒性を発現することが明らかとなった。また、フェノール性抗酸化物質およびそのキノン代謝物について分子軌道計算を行い、得られた物理化学的パラメータ (HOMO、LUMO、生成熱) について毒性との相関を検討した。その結果、キノン代謝体からラジカルアニオンへの還元され易さの指標となる生成熱は強力な酸化ストレスを誘発するエピガロカテキンが最も小さいことが明らかとなり、分子軌道計算からの毒性予測が可能であることがわかった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakanishi, I., Ohkubo, K., Imai, K., Kamibayashi, M., Yoshihashi, Y., Matsumoto, K., Fukuhara, K., Terada, K., Itoh, S., Ozawa, T., Fukuzumi, S. Solubilisation of a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in water by β -cyclodextrin to evaluate the radical-scavenging activity of antioxidants in aqueous media, Chem. Comm., 51, 8311-8314, 2015.

1593-1601, 2012.

2. 学会発表

1) 土屋卓磨、石井雄二、高須伸二、木島綾希、横尾 諭、小川久美子、梅村隆志：酸化ストレス産生物質の複合投与による酸化的 DNA 損傷並びに遺伝子突然変異への加算効果 第 42 回日本毒性学会学術年会 2015 年 6 月

2) 石井雄二、高須伸二、木島綾希、横尾 諭、土屋卓磨、小川久美子、梅村隆志：遺伝毒性肝発がん物質エストラゴールの突然変異誘発性におけるフルメキン併用投与の影響 第 44 回日本環境変異原学会 2015 年 11 月

3) Shinji Takasu, Yuji Ishii, Aki Kijima, Yuh Yokoo, Takuma Tsuchiya, Takehiko Nohmi, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura : The effects of a high-fat diet on *in vivo* mutagenicity induced by heterocyclic amines in the colon of *gpt* delta rats. 51st Congress of the European

societies of toxicology, 2015 年 9 月

4) 元村 淳子、首藤 康文、林 宏一、藤江 秀彰、小松 豊、田島 均、大塚 亮一、山口 悟、牧野 絵美、小嶋 五百合、青山 博昭、原田 孝則：有機リン剤の複合暴露の Life stage による変化-ChE と PON1 活性の影響評価-