

201522004B

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25年度～平成27年度 総合研究報告書

研究代表者 梅村 隆志

平成28(2016)年 5月

目 次

I. 総合研究報告

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
----------------------------	-------	---

研究代表者：梅村隆志
研究分担者：西川秋佳
 ：原田孝則
 ：出川雅邦・吉成浩一
 ：福原潔

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	31
--------------------	-------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	32
------------------	-------	----

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）
総合研究報告書（平成 25 年度～平成 27 年度）

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

研究要旨

本研究は、食品中化学物質の複合影響を多角的に解析し、実用的な安全性評価に資するデータの蓄積を目的とし、以下の研究を行った。

本研究では、遺伝毒性発がん物質の突然変異誘発過程における化学物質の複合影響を検討した【実験 1】ではエストラゴール (ES) とフルメキン (FL) を *gpt delta* マウスに併用投与し、FL による細胞増殖活性の亢進が ES の突然変異誘発性を増強させることを明らかにした。【実験 2】では臭素酸カリウム (KBrO₃) 又はニトロフラントイン (NFT) とアリザリン (Alz) の併用投与により酸化 DNA 損傷が加算的に蓄積すること、さらには Alz 併用投与による酸化 DNA 損傷の加算が KBrO₃ の欠変異誘発を増強させることを明らかにした。

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。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に与える影響を明らかにすることを目的に、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットまたはマウスに高脂肪食を与えると同時に、IQ あるいは MeIQx を併用投与し、肝臓や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。F344 系 *gpt delta* ラットに高脂肪食（粗脂肪含量 32%）を 4 週間与え、同時に IQ を 1.0 mg/kg 体重/日あるいは MeIQx を 5.0 mg/kg/日の用量で投与した結果、IQ または MeIQx 投与は肝臓あるいは大腸における *gpt* および Spi⁻ 変異体頻度 (MF) を上昇させ、それぞれに特徴的な遺伝子変異を引き起こしたが、高脂肪食摂取は *gpt* および Spi⁻ MF とその遺伝子変異パターンに影響を与えなかった。続いて、より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検討する目的で、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（粗脂肪量 32%）を与え、20 週目に実験を終了し、実験終了 4 週間より MeIQx を 0.9 mg/マウス/日の用量で投与した結果、MeIQx は肝臓における *gpt* MF を上昇させる傾向を示したが、高脂肪食摂取の影響は認められなかった。以上の結果から、高脂肪食の摂取は、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* 変異原性に影響を与えないことが明らかとなり、高脂肪食摂取が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唆された。

我々は、パラチオンとメタミドホスの異なる 2 つの有機リン系農薬を若齢期、成熟期、妊娠期の雌ラットに複合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。

各ライフステージにおける、有機リン系農薬標的酵素 [Cholinesterase (ChE)]、薬物代謝酵素 (CYP1A、2C、3A、PON1 / *cyp1a2*、*cyp3a23*、*pon1*)、Estradiol (E2)、ストレス因子 [Corticosterone (CORT)、過酸化脂質] および除去因子 [Glutathione (GSH)] の違いが発現する毒性の程度に影響を及ぼすものと考えた。

【実験 1: 農薬の複合影響を左右する主要因子を精査し、ライフステージに適合する評価モデルを検討】無処置のラットを用いて標的酵素のコリンエステラーゼ (ChE)、分解酵素のパラオクソナーゼ (PON1)、抗酸化物質の Glutathione、ストレスマーカーである Corticosterone (CORT) の活性変化を検討した。その結果、有機リン系農薬の標的酵素および分解酵素は発育に伴い活性化し、妊娠中期における分解酵素の活性は低下することが判明し、この時期に認められた強い毒性発現との関連性が示唆された。また CORT は若齢期で低く、妊娠中期で高いことから、若齢期はストレスに対する感受性が低いものと考えられた。

【実験 2: パラチオンとメタミドホスを複合反復投与した動物における毒性発現に影響を与える因子を確認】パラチオン (P) およびメタミドホス (M) を投与した動物における毒性発現に影響を与えると予想される要因の ChE、PON1、Estradiol (E2) を確認するとともに、偽妊娠動物を作成し、妊娠期の体重増加に伴う投与量の増加が発現する毒性を増強させるか否かを検討した。投与用量は P0.3+M0.4 mg/kg/day および P0.6+M0.8 mg/kg/day とした。症状は用量相関性に強く発現し、若齢期<成熟期<妊娠後期<妊娠中期の順に増強された。偽妊娠中期の動物において、死亡を含む重篤な神経症状が認められた。成熟期よりも強い毒性を示す偽妊娠動物から、妊娠期間中の生理学的変化が毒性を増強させると考え、体重増加に伴う投与量の増加は毒性を増強しないと考えた。妊娠中期は 0 mg/kg/day、P0.3+M0.4、P0.6+M0.8 mg/kg/day で、脳 ChE、E2 活性は低く、CORT は高い。PON1 活性は 0 mg/kg/day で低く、この活性は成熟期よりも 40%程度低い。妊娠中期における PON1 の低下が毒性を増強すると考えた。

【実験 3: パラチオンとメタミドホスを複合投与した動物における過酸化脂質、血清 PON1 活性および薬物代謝酵素の mRNA 発現量の測定】酸化ストレスのバイオマーカーである過酸化脂質は妊娠中期で P & M の複合反復投与に関係無く高く、血清 PON1 活性は投与に関係無く若齢期で高い値を示し、妊娠中期では低く、成熟期と同程度の発現量であった。*Cyp1a2* および *pon1* mRNA 発現量は 0 mg/kg/day の若齢期および妊娠中期で低く、*cyp3a23* mRNA 発現量は高い。CYP3A23 はパラチオンを活性代謝物のパラオクソンに代謝する。妊娠中期では *cyp3a23* mRNA 発現量が高いのに対し、*pon1* mRNA 発現量は低い。代謝活性物質であるパラオクソンの代謝が不十分である事、さらに有機リン系農薬の代謝に関する *cyp1a2* mRNA 発現量の低下によって、妊娠中期では死亡を含む重篤な神経症状を発現するものと考えられた。但し、P & M の複合反復投与による各薬物代謝酵素の発現量の違いや、血清 PON1 活性との相関性などを明らかにすることは出来なかった。これまで我々は、成獣に対する農薬複合暴露による免疫毒性影響（獲得免疫抑制およびアレルギーに及ぼす影響）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においてどのように影響を及ぼすか、特に免疫機能発達期に着目し実験を行った。

平成 25 年度では、マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立を目的に、被験物質暴露後の吸入アレルギー反応を検出するための実験スケジュールとアレルギー性物質（トリメリト酸無水物）の暴露濃度を検討した。その結果、免疫毒性影響の評価に最適な暴露濃度、3 週間の経皮感作と吸入暴露を組み合わせた試験系を確立した。

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、ベンゾ [a] ピレン、メトキシクロルおよびデキサメタゾンを経妊娠 13 日目の BALB/c マウスに 5 日間連続経口投与し、生まれてきた児動物の成熟後のアレルギー反応を平成 25 年度に確立した吸入アレルギー実験系を用いて調査した。その結果、メトキシクロルないしデキサメタゾンを母動物に投与した群では吸入アレルギーで

見られる症状が用量依存的に有意な増加を示した。またベンゾ[a]ピレンを投与した群では、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を認められた。

平成27年度では、免疫抑制作用を示すベンゾ[a]ピレン、メトキシクロル) およびパラチオンを選択し、各被験物質を平成26年度と同じ試験法を用いて妊娠後期のBALB/cマウスに複合的に暴露後、生まれてきた児動物の吸入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投与された群と比較して有意に増加した。

上記3年間の結果から、免疫毒性作用を有する農薬の妊娠後期の母動物への投与が児動物の成熟後のアレルギー反応の増強を引き起こすだけでなく、一部の複合暴露により、アレルギー作用が相乗的に増悪化することが示唆された。

本研究では、化学物質の毒性発現に重要とされる受容体型転写因子、芳香族炭化水素受容体(AhR)の活性化を指標として、食品中の複数の化学物質による健康影響について検討し、以下の結果を得た。

① 食品添加物に使用されているベンズイミダゾール化合物と食品中発がん物質である多環式芳香族炭化水素類でAhR活性化の複合影響が見られた。この相乗的複合効果は、AhR活性化様式の違う化合物(リガンド型活性化剤と非リガンド型活性化剤)の組合せで起こる可能性が示唆された。さらに、この相乗的複合効果は、動物種や臓器に関わらず、様々な細胞種において起こりうる現象であり、AhRリガンドの代謝阻害や、AhRタンパク質の安定化とは異なる機序により起こることが示された。

② ヒトAhRレポーター細胞を用いて、加熱食品成分由来の癌原性ヘテロサイクリックアミン類(9種)のヒトAhR活性化作用を検索したところ、これら化合物の多くに、ヒトAhR活性化能およびCYP1As誘導能があることを見出した。また、改良・樹立したヒト、マウスおよびラットAhRレポーター細胞を用いて、タール系合成着色料(18種)によるAhR活性化作用を解析した。その結果、単独でAhR活性化能を持つ7化合物を見いだした。また、これら化合物のうち3化合物はヒト、マウスおよびラットでのAhR活性化能に種差を示した。

以上、本研究より、食品中には様々なAhR活性化物質が含まれること、これらの複合曝露により単独曝露時よりも強いAhR活性化が起こりうること、が示された。

フェノール性抗酸化物質の毒性発現における複合影響を検討した結果、カテキンは塩基性条件下では酸素をスーパーオキシドアニオンに還元することから、金属イオンを伴う毒性発現機構が示唆された。一方、カテキンは酸化を受けてキノン体が生成すると、生体高分子との付加反応が進行した。また、キノン体はNADH存在下、プラスミドDNAの切断反応が進行した。これらの結果より、機能性食品等によって第1相代謝酵素が誘導されるとフェノール性抗酸化物質はキノン酸化体へと代謝されて毒性を発現する可能性が示唆された。キノンへの酸化を伴うDNA切断反応については、反応条件の検討を行い、フェノール性抗酸化物質の酸化代謝を伴う簡便な毒性試験法を開発した。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とそのキノン酸化体について分子軌道計算を行った結果、キノン酸化体のラジカルアニオンの生成熱は酸化代謝を伴う毒性の強さと相関することから、複合毒性の予測に利用可

能なことが明らかとなった。本研究で開発した簡便な酸化代謝を伴う毒性試験法と分子軌道計算による毒性予測は、第1相薬物代謝酵素を誘導する機能性食品とフェノール性抗酸化物との複合影響を評価する試験法としての活用が期待される。

研究分担者 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 出川雅邦・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

A. 研究目的

ヒトは食品中の多様な化学物質を長期間摂取する可能性が高い。しかし、複数の化学物質による影響は、化学物質間の相互作用が相加、相乗あるいは拮抗作用として発現する場合があります。これらの発現パターンを化学構造の類似性から予測することが出来ないことから、継続的な複合影響に関するデータの蓄積が重要である。そこで本研究は、食品中化学物質の複合影響による *in vivo* 変異原性、神経毒性、代謝および反応生成物を多角的に解析し、実用的な安全性評価に資するデータの蓄積を目的とする。

1. 食品中には非意図的に種々の発がん物質が生成又は混入する。これら複数の発がん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・相乗あるいは抑制作用として発現する可能性が考えられているが、発がん性の評価はこれまで化学物質単体で実施されており、このような複合影響を評価した報告は極めて少ない。本研究ではレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラット又はマウスを用いて、遺伝毒性発がん物質の突然変異誘発性における複合影響を検討した。【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、バジルやファンネルなどのハーブに含まれるラット肝発がん物質エストラゴール (ES) と、肝臓において代償性の細胞増殖を引き起こす動物用医薬品フルメキン (FL) の複合影響を検討した。【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明らかにするため、小麦粉処理剤として使用される食品中化学物質である臭素酸カリウム (KBrO₃)、動物用医薬品として使用され食肉中への残留が懸念されるニトロフランチン (NFT) 及びアカネ色素の構成成分であるアリザリン (Alz) を用いて酸化的DNA損傷とそれに続く遺伝子突然変異における複合影響を検討した。

2. 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、実際の日常生活の中で起こりう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。

高脂肪食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、ラットやマウスの肝臓におい

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、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットまたは *gpt delta* マウスに高脂肪食を与えるとともに、IQ あるいは MeIQx を併用投与して、肝臓や大腸におけるヘテロサイクリックアミンの *in vivo* 変異原性に与える高脂肪食摂取の影響を検討した。

3. 食品中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。特に有機リン剤などの農薬に胎児、乳幼児が暴露されると、身体発育または行動学的変化に対し影響を及ぼすことが問題となっている。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、本研究では米国 EPA における累積リスク評価法の基盤農薬の一つであるメタミドホスとパラチオンを組み合わせ、母動物および若齢期、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およぼすかを調査した。また、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⁹⁾。本研究においては、有機リン剤などの農薬を含む各種化学物質を対象に、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、特に発達期の影響に着目して必要な基礎的毒性情報を収集する事を目的とした。

平成 25 年度の研究では、マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立を行い、被験物質暴露後の吸入アレルギー反応を検出するための実験スケジュールとアレルギー性物質（トリメリト酸無水物）の暴露濃度を検討した。平成 26 年度の研究では、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った。

平成 27 年度は、複合暴露による次世代への免疫かく乱影響を調査するために、免疫系への影響が示唆されている多環芳香族炭化水素化合物、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. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) は、癌原性多環式芳香族炭化水素 (PAH) 類や癌原性ヘテロサイクリックアミン類の代謝活性化に関わる CYP1A 酵素遺伝子の活性化を担う転写因子として知られる。この AhR の活性化は、ダイオキシン類による催奇形性、PAH 類やヘテロサイクリックアミン類による発がんなどの毒性発現に関わることが知られているが、さらに最近では脂質代謝や免疫機能の調節にも重要な役割を果たすことが示されている。一方、我々は、食品中の化学物質による複合影響を解析する一環として、それらの AhR 活性化能や CYP1A 酵素誘導能を調べるとともに、代表的な AhR リガンドの PAH 類との複合影響を検討してきた。その結果、防かび剤である Thiabendazole (TBZ) が PAH 類との複合曝露で、AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導を相加・相乗的に増強することを明らかとしている。本研究では、これまでの知見をもとに、食品中の化学物質による複合影響について、以下の 2 項目を検討した。

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

我々は既に、ベンズイミダゾール構造を持つ防かび剤の TBZ が、AhR リガンドの PAH 類による AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導を増強することを明らかとしている。そこで本研究では、ベンズイミダゾール類による AhR 活性化作用や、PAH 類との複合効果とその機構を、以下の観点から検討した。

- ① どのような AhR 活性化物質の組み合わせで複合影響が起こるのか？
 - ② AhR 活性化の複合影響には、動物種差ならびに臓器差があるか？
 - ③ AhR 活性化の複合影響の機構は？
- ## 2) 食品中の AhR 活性化物質の検索

化学物質の安全性は、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、ヒトへの影響については明らかとなっていないことも多い。本研究では、食品に含まれる化学物質として癌原性ヘテロサイクリックアミン類 (9 種) およびタール系合成着色料 (18 種) に着目し、これら化合物のヒト AhR 活性化能および CYP1A 酵素誘導能を検討した。

5. 近年、多くの天然由来の成分が生活習慣病の発症や進行に対して予防効果を示すことが科学的に証明され、それに伴い健康維持や生活習慣病の予防目的として、これらの成分を高濃度を含む機能性食品や天然からの抽出物の積極的な摂取が話題となっている。しかしながら、最近、これらの抗酸化成分を含む機能性食品の摂取と肝毒性との関連が至適されるようになった。

2007 年 1 月、カナダ保健省は緑茶抽出物を含む成分を体重減少目的で 6 カプセル

(カテキン 600mg 相当) /day を半年間摂取した 42 歳の女性が劇症肝炎になり、肝移植を受けた事例を発表した。その後、文献上でもカテキンによる肝機能障害が 13 例報告された。これらの報告を受け、2007 年 6 月に米国薬局方の DSI-EC (Dietary Supplements Information Expert Committee) は、緑茶成分を含むサプリメントには肝障

害の危険性を示した警告文をつけるように指導している。日本では緑茶抽出物を利用した製品は多く販売されているが、現時点まで類似の報告はない。フェノール性抗酸化物質を高濃度を含む製品の消費量が年々増加していることから、今後、我が国でも同様の健康被害が発生する事が懸念される。近年、健康食品に含まれている第 I 相酵素を誘導する成分が、医薬品の作用に影響を与えることが問題となっている。軽度の鬱状態の改善作用によって健康食品としての利用が高まっているセントジョーンズワートは第 I 相薬物代謝酵素を誘導することによって、インジナビル (抗 HIV 薬)、ジゴキシシン (狭心症薬)、シクロスポリン (免疫抑制薬) の効果を減少させることから、平成 12 年 5 月、厚生労働省は医療関係社に注意喚起を行った。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。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。毒性発現に関わる生物的、化学的因子を明らかにすることで、フェノール性抗酸化物質の薬物代謝酵素、生体環境、化学物質等との複合影響を予測し、健康被害を事前に予測・予防するための情報提供を行う。

B. 研究方法

1. 【実験 1】予備試験では 6 週齢の雌性 B6C3F₁ 系 *gpt delta* マウスを 4 群に配し、ES を 1、10 又は 100 mg/kg/day の濃度で 4 週間強制経口投与した。投与後、肝臓における *in vivo* 変異原性の検索と LC-MS/MS を用いた ES 特異的 DNA 付加体の測定を実施した。本試験では 6 週齢の雌性 B6C3F₁ *gpt delta* マウスを 6 群に配し、ES は予備試験におい

て *gpt* 変異体頻度 (MF) の上昇が認められた 100 mg/kg/day と、上昇が認められなかった 10 mg/kg/day の濃度を強制経口投与し、それぞれに対して FL を 0.4% の濃度で粉末基礎飼料に混じて 4 週間併用投与した。投与後、肝臓における病理組織学的検索、*in vivo* 変異原性の検索、LC-MS/MS による ES 特異的 DNA 付加体の測定、免疫組織化学染色法による PCNA 陽性細胞の検出及び、リアルタイム RT-PCR 法による ES の代謝に寄与する代謝酵素の遺伝子発現レベルを検索した。【実験 2】予備試験として 6 週齢の F344 系 *gpt delta* ラットに対して KBrO₃、NFT、Alz を 3 用量で飲水又は混餌投与し、それぞれ単剤投与による酸化 DNA 損傷の程度と突然変異誘発性の関連を検索した。本試験では 6 週齢の F344 系 *gpt delta* ラットに対して KBrO₃ 及び NFT の酸化 DNA 損傷は増加させるものの遺伝子突然変異は誘発しない用量 (KBrO₃ 250 ppm、NFT 500 ppm) 又は酸化 DNA 損傷と遺伝子突然変異の両方を増加させる用量 (KBrO₃ 500 ppm、NFT 2500 ppm) に対して、酸化 DNA 損傷を増加させる 500 ppm の Alz を併用投与した。投与後、標的部位である腎臓皮質について 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの測定及び *gpt* assay 及び Spi assay による *in vivo* 変異原性の検索を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌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. (実験 1) 6 週齢の雄 F344 系 *gpt delta* ラット (各群 5 匹) に高脂肪食 (粗脂肪含量 32%) または基礎食 (粗脂肪含量 5.4%) を自由摂取させ、さらにオリーブ油に懸濁させた IQ を 1.0 mg/kg 体重/日あるいは MeIQx を 5.0 mg/kg/日の用量で 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、摘出した肝臓および搔爬した大腸粘膜を用いてレポーター遺伝子突然変異頻度を検討した。得られた *gpt* 変異体および肝臓における Spi 変異体については変異スペクトラム解析を実施した。(実験 2) 6 週齢の雄 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。

3-1. 実験 1: 農薬の複合影響を左右する主要因子を精査し、ライフステージに適合する評価モデルを検討することを目的とし、無処置の若齢期、成熟期、妊娠中期および後期の雌動物を用いて標的酵素の Cholinesterase (ChE)、分解酵素のパラオクソナーゼ (PON1)、抗酸化物質の Glutathione (GSH)、ストレスマーカーである

Corticosterone (CORT) の活性変化を検討。

実験 2: パラチオンおよびメタミドホスを複合反復投与した若齢期、成熟期、妊娠中期および後期の雌ラットを用いて、毒性発現に影響を与える因子として、ChE、PON1、Estradiol (E2)を確認した。さらに妊娠期における重篤な神経症状の発現は、妊娠期の体重増加に伴う投与量の増加によるものか否かを、偽妊娠動物を作製し検討した。

実験 3: 複合反復投与による毒性発現に影響を与える因子を詳細に検討することを目的とし、酸化ストレスのバイオマーカーである過酸化脂質、有機リン系農薬の代謝に関与する *cyp1a2*、パラチオンを代謝活性物質であるパラオクソンに代謝すると考えられている *cyp3a23*、さらに *pon1* mRNA 発現量、血清 PON1 活性を実験 2 で得られたサンプルを用いて検討した。

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*-Diethyl *O*-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%、和光純薬工業株式会社) 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。

パラチオン及びメタミドホスは 1%Tween80 水溶液 (Tween80、和光純薬工業株式会社) 懸濁して調製した。投与容量は 4 mL/kg とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

2. 試験動物

動物の取扱いについては一般財団法人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: AC13198、14056)。

実験 1 では日本クレア株式会社富士生育場 (静岡県) で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) を用いた。実験 2 では日本チャールス・リバー株式会社日野生産所 (滋賀県) で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット [CrI:WI

(Han)] を用いた。動物はそれぞれ 3 週齢、7 週齢の雌を購入し、さらに同系統の雄を交配用として購入した。馴化期間は 3 週齢では 4 日間、7 週齢では 7 日間とした。馴化期間を終えた一部の雌動物のスミアを採取し、交配適期を確認後、雄と 1:1 で終夜同居させた。翌朝、膣栓あるいはスミア内に精子が確認された動物を交配成立とし、この日を妊娠 0 日 (GD0) とした。偽妊娠動物は、交配適期が確認された夕方 (pm. 18:00) にガラス棒および綿棒で子宮膣部をタッピングして刺激を与え、スミアを 3 日間採取し、休止期間であることを確認し、偽妊娠動物とした。

3. 投与用量及び試験群

実験 1: 投与は実施しなかった。試験群は以下の 4 群を設定した。若齢期、成熟期、妊娠中期、妊娠後期

実験 2: パラチオン (P)およびメタミドホス (M) の複合反復投与用量は P0.3+M0.4 mg/kg/day、P0.6+M0.8 mg/kg/day とし、媒体である 1%Tween80 水溶液を投与する 0 mg/kg/day 用量を設定した。各投与量に若齢期、成熟期、妊娠中期および後期の 4 群を設けた。さらに P0.6+M0.8 mg/kg/day には偽妊娠中期および後期の 2 群を設けた。

実験 3: 実験 2 の動物から採取した肝臓および血清を試料として用いた。

4. 検査項目

一般状態の観察 [生死の確認を含む] (実験 1、2)詳細な症状観察 (実験 2)体重測定 (実験 1、2、3)コリンエステラーゼ (ChE) 活性測定: 血清及び脳 (実験 1、2)剖検 (実験 1、2)脳重量 (実験 1、2)Paraoxogenase1 (PON1) (実験 1、2、3)Corticosterone (CORT) (実験 1、2)尚、これらの検査項目に加えて実験 1 では、薬物代謝酵素 CYP1A、3A および 2C 活性、ストレス因子の Corticosterone (CORT)、抗酸化物質の Glutathione (GSH)、実験 2 では PON1 に相関すると考えられている Estradiol (E2) を測定した。実験 3 では、酸化ストレスのバイオマーカーである過酸化脂質、*pon1*、*cyp1a2*、*cyp3a23* mRNA 発現量

について測定した。

3-2. 25年度

BALB/c 雌マウスおよび吸入アレルギー性を持つ 2.5 μm 以下の微小粒子状物質（トリメリト酸無水物，TMA）を用いて，吸入アレルギー検出モデルを作成した。

1.被験物質

吸入アレルギー性物質としてトリメリト酸無水物（TMA，純度 97.0%以上）を和光純薬工業株式会社から購入して使用した。

2.試験動物

日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター（神奈川県）で生産された近交系 SPF マウス（BALB/cAnNCrIcrIj）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である。試験動物は 7 週齢にて購入し，6 日間試験環境に馴化した後，8 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ー方式）、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。経皮感作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。

3.試験群

1.試験スケジュールの検討では，TMA は経皮感作濃度として 1%，吸入惹起濃度として 0.5 mg/L を選択し，投与を行った。上記濃度は，経皮および吸入経路にて毒性，皮膚刺激性および死亡の起こらない濃度である。試験群として，無処置群，感作のみ TMA 投与群，感作および惹起ともに被験物質を投与する群の 3 群を設定した。

2.暴露濃度の検討には，無処置群，低濃度群，中濃度群，高濃度群の 4 群を設定した。

4.被験物質投与液の調製

TMA は用時調製とした。各濃度の被験物質調製時に純度換算を行い，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。

5.被験物質の投与

8 週齢時から 3 週間，両耳後方に週 3 日間経皮投与した。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 ずつ投与実施した。1 週間の休薬の後，3 日間連続で投与群ごとに 30 分間各濃度で連続吸入暴露を行った。動物の鼻部のみが暴露チャンパ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パー（気積 31.2 L，トキワ科学器械株式会社）に装着した。被験物質等ダストの発生は，空気流動型鼻部暴露チャンパ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。暴露チャンパーへの空気供給は，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。排気はブローアー（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，暴露チャンパ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。

6. 観察および検査項目

6.1. 死亡および臨床症状の観察

全動物について、投与期間中 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。

6.2. 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採血後に安楽殺し、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 μ m メッシュ) 上で撈りつぶし、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 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。

6.3. 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 μ g Mouse BD Fc BlockTM 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。

6.4. 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 BlockTM 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。

26 年度

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

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

吸入アレルギー性物質として平成 25 年度
に使用したものと同様のトリメリト酸無水
物(TMA, 純度 97.0%以上) を和光純薬工業
株式会社から購入して使用した。

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。試験動物
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。動物は平成 25 年度と同じ環境下で飼育
し、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。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。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。

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) 上で揺りつぶし、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 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、13、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 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。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。

27 年度

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) を妊娠 13 日目の雌性 BALB/c マウスに単剤もしくは複合的に 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た後に各種免疫学的因子測定を行い、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： パラチオン

純度： 97.0%以上

分子量： 291.26

外観： 無色透明

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

吸入アレルギー性物質として平成 25 年度に使用したものと同様のトリメリト酸無水物(TMA, 純度 97.0%以上)を和光純薬工業株式会社から購入して使用した。

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。試験動物は妊娠 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。動物は平成 25 年度と同じ環境下で飼育し、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。なお、動物の取り扱いに関しては残留農業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パラチオンは、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、パラチオンは、0.15、及び 0 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。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

経口投与の調製液は、初回投与直前に平成 26 年度と同様の方法で調製・保存した。複合投与液については、単剤投与液を等量ずつ混合してマグネチックスターラーで攪拌した。

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。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. 試験スケジュール

平成 26 年度と同様の試験スケジュールを用いた。

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 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 (好中球、好酸球、肥満細胞、抗塩基球) に供した。肺門リンパ節は、10%牛胎児血清含有 RPMI1640 メディウムを用いて、ナイロンメッシュ (75 μm メッシュ) 上で揺りつぶし、単細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を遠心した後、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 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。

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 BlockTM 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 μg Mouse BD Fc BlockTM 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

平成 25~27 年度の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意差の有無を判定した。

(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。

4.

1) 試験細胞株

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を安定に発現させたヒト AhR レポーター細胞株 (HepG2-A10 または HepG2-XL24) を用いた。また、AhR 活性化における種差の解析には、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。また、AhR 活性化増強機構の解析に、ヒト肺がん A549 細胞由来の AhR レポーター細胞株 A549-Luc も使用した。さらに、AhR 標的遺伝子誘導における種差の確認には、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。また、誘導におけるヒト細胞間差の解析には、A549 (肺がん)、MCF-7 (乳がん)、Caco-2 (大腸がん)、Hela および Ishikawa 細胞 (いずれも子宮がん) を使用した。細胞はいずれも、細胞の生育に適した濃度の胎児ウシ血清を含んだ 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-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) および 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeA α 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。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。また、

CYP1A 酵素阻害剤として α -naphthoflavone (ANF) を用いた。加熱食品中から見出された発癌性ヘテロサイクリックアミン類として、上記 Trp-P-1、MeA α C の他、Trp-P-2、Glu-P-1、Glu-P-2、A α C、MeA α C、IQ、MeIQx および PhIP を使用した。タール系合成着色料としては、食用赤色 2 号、赤色 3 号、赤色 101 号、赤色 102 号、赤色 103 号、赤色 104 号、赤色 105 号、赤色 106 号、黄色 1 号、黄色 4 号、黄色 5 号、青色 1 号、青色 2 号、緑色 2 号、緑色 3 号、紫色 1 号、赤色 213 号およびバターイエロー (DMY) を用いた。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。なお、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

AhR レポーター細胞株をそれぞれ 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 (Promega) と混和して生じた発光を測定した。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、被検化合物を添加して一定時間培養後、Total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン) または Sepazol (ナカライテスク) を用いて単離した。この Total RNA を鋳型として、逆転写反応により 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 Green PCR Master Mix あるいは Fast SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を添加し、7300/7500 Real Time PCR system または StepOne Real Time PCR system (いずれも Applied Biosystems) を用いて定量的 PCR を行った。

遺伝子発現量は ^{dd}Ct 法により算出した。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。

4) CYP1A 酵素活性の測定

CYP1A 酵素の代表的な基質として知られる Ethoxyresorufin (ER) を用い、その脱エチル化活性 (EROD 活性) を指標として、CYP1A 酵素活性を測定した。前項に準じて HepG2 細胞を 48 時間前培養し、被検物質を処理した。培養後、細胞を洗浄し、さらに ER を含んだ無血清培地にて 30 分間培養した。その後、上清を回収し、生じた蛍光代謝物 (ER の脱エチル体) による蛍光 (励起波長 535 nm、蛍光波長 595 nm) を測定した。また、酵素阻害試験を行う場合には、前培養後に 1 μ M の MC を 24 時間前処理することで CYP1A 酵素を十分に誘導させた HepG2 細胞を用いた。この CYP1A 高発現 HepG2 細胞を、被検物質と ER を含んだ無血清培地にて 30 分間培養し、生じる ER 脱エチル代謝物を測定した。いずれの場合にも、反応後の細胞を 1N NaOH で溶解し、溶解液中のタンパク濃度を BCA-protein assay kit を用いて測定し、タンパクあたりの EROD 活性を算出した。

6) AhR タンパク質発現量の測定

HepG2 細胞を 6 well plate で培養し、化合物を添加して一定時間培養した。200 μ L の 1x sample buffer で細胞を溶解し、遠心 (4°C、12,000 g、10 min) 後の上清をタンパク溶解液とした。全タンパク質を 7.5 % SDS-PAGE により分離し、ニトロセルロース膜に転写した。5 % スキムミルク/TBST により室温で 1 hr ブロッキングした後、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、4 °C で一晚反応させた。二次抗体としてウサギ IgG ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗体を反応させた後、ECL-plus 試薬 (PIERCE) により検出した。生じた化学発光を High performance chemiluminescence film に現像した。

5.

1. カテキンからの活性酸素生成機構の解析

嫌氣的条件下、カテキンのアセトニトリル溶液に 0~3 倍量の NaOCH₃ を添加した後、UV と ESR を測定して活性酸素の生成反応を解析した。

2. カテキンの酸化反応の解析

カテキンをアセトニトリル、アセトンまたはテトラヒドロフランに溶解した溶液に、酸化剤 (Ag₂O, DDQ, DPPH, ガルビノキシルフリーラジカル) を添加して反応を行った。反応生成物の構造は NMR で解析した。ガルビノキシルフリーラジカルを酸化剤として利用した反応は NMR チューブ中でも行い、NMR スペクトルを測定して反応の進行を確認した。酸化生成物と生体高分子との反応は、核酸塩基のモデル化合物として 4-クロロベンジルアミンを用いて行い、反応生成物の構造は NMR で解析した。

3. pBR322 を用いた DNA 切断反応

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 10mM MNADH 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、アガロースゲル電気泳動を行って、DNA の切断状況を解析した。

4. 分子軌道計算

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. 【実験 1】予備試験において、肝臓の ES 特異的 DNA 付加体、ES-3'-8-dG、ES-3'-N²-dG 及び ES-3'-N⁶-dA は低用量群から検出され、投与量依存的に増加した (Fig. 1) のに対し、*gpt* MFs は高用量群でのみ対照群に比して有意に上昇した。また、ES 投与群において Spiⁱ MF の変化は認められなかった。以上より、本試験の ES の投与量を変異頻度の上昇が認められた 100 mg/kg/day と、認められなかった 10 mg/kg/day に設定した。本試験では、FL を投与した群で投与開始 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。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性細胞浸潤と単細胞壊死が認められた。さらに、ES 100/70 mg/kg との併用投与群では、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。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。遺伝子発現解析の結果、*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上昇を示したが、*Iilb* の発現に変化は認められなかった。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、FL の併用投与により ES 10 又は 100/70 mg/kg とともに加算的な上昇が認められた。細胞周期関連因子 (*Ccnb1*、*Ccn1* 及び *Cnd1*) の遺伝子発現レベルは、いずれも PCNA 陽性細胞率と同様の傾向を示した。また、ES の代謝活性化及び排泄に寄与する *Cyp1a2* と *Ugt1a1* の発現レベルは、FL の併用投与により軽度の変化が認められたが、*Sult1A* の発現に変化は認められなかった。さらに、肝臓における ES 特異的 DNA 付加体は 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が、FL

の併用投与による変化は認められなかった。*gpt* assay の結果、*gpt* MF は、対照群に比して ES 100/70 mg/kg で有意な上昇を示した。FL 投与群では、FL 単独投与群に比して ES 100/70 mg/kg の併用投与群で有意な上昇を示し、ES 単独投与群に比しても有意な高値を示した。*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 の頻度に変化が認められ、単独投与群では、ES 100/70 mg/kg で対照群に比して有意に上昇した。FL 投与群では、FL 単独投与群に比して ES 100/70 mg/kg の併用投与群で有意な上昇を示した。また、ES 10 mg/kg と FL 併用投与群では、単独投与群に比して有意な高値を示した。Spiⁱ assay の結果を Table 3 に示す。欠失変異頻度を示す Spiⁱ MF は、対照群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】予備試験において、KBrO₃ 投与群では腎皮質の 8-OHdG レベルが 250 ppm から有意に増加するのに対し、*gpt* 及び Spiⁱ MFs はいずれも高用量でのみ有意に増加した。NFT 投与群では腎皮質の 8-OHdG レベルが 500 ppm から有意に増加し、*gpt* MFs は高用量でのみ有意に増加したのに対し、Spiⁱ MFs には変化は認められなかった。Alz 投与群では腎皮質の 8-OHdG レベルは 500 ppm でのみ有意に上昇し、*gpt* 及び Spiⁱ MFs に何れも変化は認められなかった。本試験では、予備試験において 8-OHdG レベルの有意な増加が認められるものの遺伝子変異頻度は増加しなかった中間用量 (KBrO₃ 250 ppm、NFT 500 ppm) 又は 8-OHdG レベルと遺伝子変異頻度の両方が有意に増加した高用量 (KBrO₃ 500 ppm、NFT 2500 ppm) の KBrO₃ 又は NFT に対し、8-OHdG レベルのみを有意に増加させた高用量 (500 ppm) の Alz を併用投与した。KBrO₃ と Alz 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 8-OHdG レベルの有意な上昇が認められ、各用量の KBrO₃ 単独投与群に比しても有意な高値を示した。また、NFT と Alz の併用投与群においても 8-OHdG レベルの

有意な上昇が認められ、各用量の NFT 単独投与群に比しても有意な高値を示した。gpt MF は KBrO₃ と Alz 併用投与群において用量依存的な上昇傾向が認められたものの、各用量の KBrO₃ 単独投与群に比して変化は認められなかった。一方、Spi⁻ MFs は KBrO₃ 500 ppm と Alz 併用投与群において対照群に比して有意に上昇し、KBrO₃ 単独投与群と比較しても顕著な増加が認められた。変異スペクトラム解析の結果、gpt 変異体からは KBrO₃ 500 ppm と Alz 併用投与群で 1 塩基欠失変異頻度の有意な高値及び 2 塩基以上の欠失変異頻度の上昇傾向が、Spi⁻変異体からは G/C 又は A/T の繰り返し配列部位における 1 塩基欠失並びに大きなサイズの欠失変異頻度の上昇傾向が認められた。

2. (実験 1) ラットの最終体重および肝重量の結果を Table 1 に示す。高脂肪食を与え、IQ または MeIQx を投与した群ならびに溶媒対照群の最終体重は、基礎食を与えたそれぞれの群に比較して、統計学的に有意ではなかったものの高値を示した。高脂肪食を与え、MeIQx を投与した群ならびに溶媒対照群の肝臓の絶対重量ならびに相対重量は、基礎食を与えたそれぞれの群に比較して統計学的に有意に上昇した。また、IQ 投与群における肝臓の絶対重量ならびに相対重量は、高脂肪食を与えた群で基礎食を与えた群に比較して統計学的に有意ではなかったものの高値を示した。高脂肪食を与え、IQ または MeIQx を投与した群の血清中グルコース濃度は基礎食を与えたそれぞれの群に比較して統計学的に有意な高値を示した。また、高脂肪食を与え、MeIQx を投与した群の血清中トリグリセリド濃度は基礎食を与えた群に比較して統計学的に有意な高値を示した。肝臓の病理組織学的検索の結果、高脂肪食を与えた何れの群においても、小葉中心性の肝細胞の空胞化が認められた。肝臓における gpt assay の結果、gpt 変異体スペクトラム解析の結果、基礎食を与え、IQ または MeIQx を投与した群の gpt MF は、溶媒対照群に比較して統計学的に有

意に上昇した。また、高脂肪食を与え、IQ または MeIQx を投与した群においても、gpt MF は溶媒対照群に比して有意の高値を示した。しかし、基礎食を与えた群と高脂肪食を与えた群間では有意な差異は認められなかった。また、gpt 変異体のスペクトラム解析を行ったところ、IQ 投与群では、基礎食群ならびに高脂肪食群の何れにおいても、それぞれの溶媒対照群に比較して G:C-T:A transversion 変異および一塩基欠失変異の MF が有意に上昇していた。MeIQx 投与群でも同様に、何れの食餌群においても G:C-T:A および A:T-T:A transversion 変異ならびに一塩基欠失変異の MF が有意に上昇した。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。肝臓における Spi⁻ assay の結果、Spi⁻変異体スペクトラム解析の結果、基礎食を与え、IQ または MeIQx を投与した群の Spi⁻ MF は、溶媒対照群に比較して統計学的に有意に上昇した。また、高脂肪食を与えた群でも同様の結果であった。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。Spi⁻変異体の変異スペクトラム解析を行った結果、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の発現頻度が有意に上昇した。また、高脂肪食群においても同様の傾向が認められた。しかし、それぞれの変異スペクトラムの発現頻度に高脂肪食摂取の影響は認められなかった。大腸粘膜における gpt assay、gpt 変異体スペクトラム解析、Spi⁻ assay の結果、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