

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に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。

(実験 2)高脂肪食を投与した群の体重は、高脂肪食の投与開始直後から増加し、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* assay の結果、MeIQx を投与した群における *gpt* 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、何れの高脂肪食投与期間においても、基礎食と MeIQx を投与した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 *Spi* 変異体頻度への影響は認められなかった。

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

異なる 2 種類の有機リン系農薬のパラチオンおよびメタミドホスを若齢期、成熟期、妊娠期の雌ラットに複合反復経口投与すると妊娠期中で死亡を含む強い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、薬物代謝酵素、ストレス因子および除去因子の違いが発現する毒性の程度に影響を及ぼすのではないかと考えた。そこで、無処置の若齢期、成熟期、妊娠中期および後期の雌ラットの肝臓および血清を用いて、有機リン系農薬標的酵素 (Cholinesterase: ChE)、薬物

代謝酵素活性については CYP1A、CYP3A および CYP2C、有機リン酸塩を加水分解する Paraoxonase 1 (PON1)、ストレス因子の Corticosterone (CORT)、抗酸化物質の Glutathione (GSH) を測定した。ChE は若齢期で低く、成熟期および妊娠期中で高い値を示した。CYP1A および 3A は妊娠後期中で有意な低下を示し、CYP2C は若齢期で低く、成熟期、妊娠中期および後期中で高い値を示した。PON1 は妊娠後期中で有意な低下を示した。CORT は妊娠中期で最も高い値を示し、若齢期では低い値を示した。GSH は若齢期で僅かに低い値を示した。薬物代謝酵素は動物種、性別あるいは年齢で変化することが知られている。また CORT および GSH は発達に伴い上昇するが、加齢に伴い低下する。特に生理学的変化の著しい妊娠期中では、薬物代謝酵素やストレス因子の活性化あるいは分泌量が変化することも報告されている。本試験で認められた妊娠期中における薬物代謝酵素の CYP1A、CYP3A および PON1 活性の有意な低下、CORT の高い値がこの時期における薬物感受性に影響を及ぼし、発現する毒性の増強に関連する可能性を示唆した。

実験 2: パラチオンおよびメタミドホスを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

これまでに、パラチオン (P) およびメタミドホス (M) を若齢期、成熟期、妊娠期中の雌動物に複合反復経口投与をすると妊娠期中で、死亡を含む重篤な神経症状が発現することを確認した。実験 1 の結果から、無処置の妊娠期中の雌動物で PON1 活性の有意な低下、CYP1A および 3A 活性の低下を確認し、さらにストレス因子である CORT の増加を確認した。これらの変化が発現する毒性を増強すると考え、P および M を複合反復投与した若齢期、成熟期、妊娠中期および後期中の雌動物を用いて、毒性発現に影響を与える因子を確認した。投与用量は P0.3+M0.4 mg/kg/day の組み合わせを低用量とし、P0.6+M0.8 mg/kg/day の組み合わせを

高用量とした。また媒体である 1%Tween80 水溶液を投与する 0 mg/kg/day を対照群とした。また、妊娠期中で認められた重篤な神経症状は、妊娠動物の胎児の発育に伴う体重増加による投与量の増加が原因か否かを確認するため、偽妊娠動物を作製し、偽妊娠中期及び後期として高用量のみを反復経口投与した。妊娠中期および後期では用量相関性に毒性は強く、また妊娠中期の高用量では死亡を含む重篤な神経症状が認められた。偽妊娠動物では、中期に瀕死状態の動物を認め、人道的配慮から速やかに安楽殺した。中期および後期ともに攣縮あるいは振戦など、成熟期には認められない神経症状を認めた。各ライフステージで発現する毒性の程度が異なる原因を検討するため、ChE、PON1、PON1 に相関すると考えられている Estradiol (E2)、CORT を測定した。脳 ChE 活性は被験物質投与に関係なく若齢期では高く、成熟期、妊娠中期および偽妊娠動物で低い。PON1 活性は 0 mg/kg/day における妊娠中期で低く、成熟期よりもおよそ 40%低下した。血清 E2 は妊娠後期および偽妊娠動物で高く、妊娠中期では低い。CORT は 0 mg/kg/day の妊娠中期で最も高い値を示した。異なる 2 種類の有機リン系農薬を若齢期、成熟期、妊娠中期および後期に複合反復経口投与すると、妊娠中期で最も強い神経症状を示す。この時期では、PON1 活性が低く CORT の高い値を示す。また、PON1 と相関すると考えられている E2 の値は低い。こうした変化が毒性を増強させると考えた。また、偽妊娠動物では成熟期よりも毒性が強く発現することから、体重増加に伴う投与量の増加が妊娠期の毒性を強くしているのではなく、妊娠による生理学的変化が毒性を増強させると判断した。但し、当該試験では、0 mg/kg/day と P0.3+0.4 および P0.6+M0.8 mg/kg/day における各測定項目の関連性については明らかにすることが出来なかった。

実験 3: パラチオンおよびメタミドホスを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

実験 2 で妊娠中期の PON1 活性の低下とストレス因子の増加を確認した。当該試験では、各ライフステージにおける毒性発現に影響を与える因子を詳細に確認することを目的とした。実験 2 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、PON1、有機リン系農薬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。実験 2 における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、各測定結果からは差違を明らかにすることが出来なかった。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を示唆した。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。パラチオンを活性代謝物のパラオクソンに代謝する *cyp3a23* は妊娠中期で高い事を確認した。*cyp3a23* で代謝されたパラオクソンは *pon1* 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・分解できないため、妊娠中期に重篤な神経症状が認められたと考えた。尚、*pon1* 遺伝子発現量と、血清 PON1 活性との相関性を明らかにすることは出来なかった。

3.2

25 年度

1. 試験スケジュールの検討

血清中 IgE 産生量および肺門リンパ節中 IgE 陽性細胞数血清中 IgE 産生量測定および肺門リンパ節中 IgE 陽性細胞数結果を図 4 に示す。血清中 IgE 産生量は投与群で媒体対照群と比較して有意に増加した。肺門リンパ節中では、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。

1. 肺胞洗浄液の解析

肺胞洗浄液中の好酸球数、好中球数、各ケ

モカイン産生量 (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, KC) の測定結果を図 4 に示す。好酸球数および好中球数は、感作・惹起群では媒体対照群および感作のみの群と比べて有意な増加が認められた。また、好酸球や好中球から産生されるケモカイン量も媒体対照群・感作のみの群と比べて投与群で有意な増加が認められた。

2. 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, 9, 13, 17A) 測定結果を図 5 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、感作・惹起群で媒体対照群と比較して有意な増加が認められた。

2. 暴露濃度の検討

1. 肺門リンパ節の解析

肺門リンパ節中の IgE 陽性 B 細胞数および各サイトカイン産生量 (IL-4, 5, 17A) 測定結果を図 6 に示す。IgE 陽性 B 細胞数および各サイトカイン産生量は感作濃度および惹起濃度が高いほど増加し高濃度群では有意な差が認められた。

26 年度

1. 肺の組織学的解析

図 7 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。

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 8 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 9 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。

4. 肺胞リンパ節の解析

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 10 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。

27 年度

1. 血清中 IgE 産生量

血清中 IgE 産生量測定結果を図 10 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 産生量の増加が認められた。特にパラチオンとベンゾ[a]ピレンを複合投与した群でその増加が顕著であった。

2. 肺胞洗浄液の解析

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を図 11 に示す。好酸球数および好塩基球は、ベンゾ[a]ピレン単剤を除く投与群で媒体対照群と比べて増加が認められ、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。

3. 肺胞リンパ節の解析

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, -17A) 測定結果を図 12 に示す。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.

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

芳香族炭化水素である MC はリガンド型の、食品添加物である TBZ は非リガンド型の AhR 活性化剤であることが示されている。そこで、MC の存在下リガンド型 AhR 活性化物質 (BaP, AαC, BNF, DMBA, Trp-P-1 および IND) あるいは非リガンド型 AhR 活性化物質 (TBZ と OME) を HepG2-XL24 細胞に複合処理し、その活性化における影響を解析した。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 を含んだ計 6 種のベンズイミダゾール化合物 (TBZ, OME, BNZ, CBD, BML および LAN) と MC を複合処理した結果、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 活性化を増強する作用があることが示された。OME や TBZ は、マウス AhR よりもヒト AhR を優先的に活性化する。そこで、ヒト HepG2-XL24 細胞 および マウス Hepa-XL11 細胞にベンズイミダゾール類と MC を 24 時間複合処理し、その AhR 活性化能を比較した。その結果、ヒト細胞では TBZ, CBZ > BML, OME > LAN の順に、マウス細胞では TBZ, LAN > OME, CBD の順に AhR 活性化の増強作用が認められた。また、両細胞株でみられたベンズイミダゾール類の AhR 活性化増強作用は、単独処理時の活性化パターンとは異なることも示された。

さらに、HepG2 細胞とは AhR や CYP1A1 酵素発現量が異なるヒト細胞株 (A549, Caco-2, MCF7, Hela および Ishikawa) を用

いて、AhR 活性標的遺伝子 (CYP1A1, CYP1B1) の誘導に対する MC と TBZ の複合影響を比較した。その結果、CYP1A1 遺伝子は Ishikawa 細胞を除く 5 細胞で、また、CYP1B1 遺伝子は A549 細胞および Hela 細胞を除く 4 細胞で、それぞれ複合処理群で相乗的な誘導が認められた。これまでに、CYP1A1 酵素阻害剤は AhR リガンドの代謝 (不活性化) を遅延させることで、AhR 活性化増強作用を示すことが知られている。そこで、CYP1A1 酵素を誘導した HepG2 細胞を用い、ベンズイミダゾール類の CYP1A1 酵素活性への影響と AhR 活性化増強との関連性を解析した。その結果、TBZ や OME は高濃度で CYP1A1 酵素活性を阻害するが、AhR 活性化増強作用を示した 10 μM では、CYP1A1 酵素活性の阻害は見られなかった。弱いながら TBZ に CYP1A1 酵素の活性阻害作用が観察されたため、CYP1A1 酵素発現が比較的高い HepG2 由来 HepG2-XL24 細胞と、ほとんど発現が見られない A549 由来の A549-XL 細胞を用いて、AhR 活性化における複合影響を細胞間で比較した。その結果、いずれの細胞株においても TBZ は MC による AhR 活性化を増強した。リガンドとの結合により活性化した AhR タンパク質は、ユビキチン化されプロテオソームにより分解される。このプロテオソームを阻害すると、AhR 活性化の持続的な増強が惹起されることが示されている。そこで、細胞内 AhR タンパク質発現に及ぼす TBZ 影響を Western blot 法により解析した。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 の処理による AhR 分解抑制作用は確認できなかった。

2) 食品中の AhR 活性化物質の検索

ヘテロサイクリックアミン類 (9 種) をヒト HepG2-A10 細胞に処理し、AhR 活性化能および CYP1A1 酵素誘導能をそれぞれ測定した。その結果、①Glu-P-1, Glu-P-2 及び PhIP には、有意な AhR 活性化能や CYP1A1

誘導能は観察されないこと、②Trp-P-1、Trp-P-2 及び AαC には、AhR 依存的な CYP1A1 酵素誘導能があること、また、③ MeAαC、IQ 及び MeIQx では、CYP1A1 酵素誘導能が見られるにも関わらず、EROD 活性の増強は起こらないことなどが明らかになった。これらの結果より、MeA□C、IQ および MeIQx は、AhR 活性化能および CYP1A 酵素誘導能を持つが、これら化合物には CYP1A 酵素活性阻害活性を合わせ持つことが示唆された。さらに、EROD 活性に対する HCA 類の阻害効果を検討したところ、MeA□C、IQ 及び MeIQx には極めて強い ERDO 阻害活性があることが示された。タール系合成着色料 18 種については、ヒト HepG2-XL24 だけでなく、ラット H4IIE-XL9 およびマウス Hepa-XL11 細胞を用いて、その AhR 活性化能を検索した。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、いずれかの細胞において AhR 活性化能が認められた。特に赤色色素の多くで AhR 活性化能に種差があることが示されたため、赤色色素およびその類縁化合物計 5 種類について、各動物の AhR に対する活性化能をさらに比較検討した。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。そこでさらに、各動物由来の数種の細胞株を用いて、AhR 標的遺伝子 (CYP1A1) の発現を指標として、AhR 活性化における種差を調べた。その結果、用いたいずれのヒト、ラットおよびマウスの細胞株においても、AhR 活性化に相応した CYP1A1 遺伝子の発現が示された。

5.

1. カテキンからの活性酸素生成機構の解析

カテキンが塩基性条件下、酸素を還元して活性酸素を生成する可能性について検討を行った。嫌氣的条件下、カテキンに 2 等量の NaOCH₃ を添加してジアニオン体を生

成させた後、酸素を添加すると 430nm の吸収の増大がみられた。この変化よりカテキンのジアニオン体は酸素を還元することが予測された。ジアニオン体が酸素を還元すると、ジアニオン体はセミキノラジカルアニオンに、また、酸素はスーパーオキシドへと変化する。そこで、反応溶液について ESR を用いてそれぞれの生成を解析したところ、2.0051 に g 値をもつシグナルが観測され、セミキノラジカルアニオンが生成していることが確認された。また、この反応溶液の凍結 ESR スペクトル (113K) を測定したところ、スーパーオキシドラジカルアニオンに特徴的な 2.175 に g 値をもつブロードなシグナルを直接観測することができた。以上の結果より、カテキンのジアニオン体は酸素を一電子還元してスーパーオキシドアニオンを発生し、自らはセミキノラジカルアニオンになることがわかった。

2. カテキンの酸化反応の解析

フェノール性抗酸化剤は第 I 相薬物代謝酵素によってキノン体へと酸化されることが予測されるがキノン体の構造は未だ同定されていない。そこで、本研究では様々な酸化剤を用いてカテキンの酸化代謝のモデル反応を行い、酸化生成物の構造について解析を行った。その結果、カテキンは一電子酸化剤 (Ag₂O, DDQ, DPPH, ガルビノキシルフリーラジカル) によって速やかに酸化を受けることがわかった。しかしながら、酸化生成物は非常に不安定で単離精製が難しいことから、カテキンとガルビノキシルフリーラジカルを 1:1 で反応させた溶液を直接 NMR スペクトルを測定した。その結果、NMR スペクトルから、カテキン由来のピークとキノン体由来のピークが 1:1 で含まれていることが確認された。同様の方法で、Ag₂O, DDQ を用いた反応についてもカテキンはキノン体へと酸化されることが確認できた。カテキンがキノン体へと酸化されると、DNA や蛋白質と付加体を形成して毒性を発現することが予測される。そこで、

核酸塩基のモデル化合物である 4-クロロベンジルアミンを用いて、合成したキノン酸化体に対する付加反応を行ったところ、4-クロロベンジルアミンがキノンに付加した、インドール構造を有するカテキン誘導体が生成することがわかった。

3. カテキンの酸化を伴う DNA 切断反応

カテキンのキノンへの酸化を伴う毒性を簡便に評価できる試験系の検討を行った。カテキンに 4 倍量を DPPH を反応させるとほぼ全てのカテキンがキノンに酸化される。この反応系に pBR322DNA と NADH を添加してインキュベーションした後、アガロース電気泳動で解析すると、DNA の切断を観測することができた。この切断反応はカテキンの濃度に依存して増強した。また、活性酸素の消去剤として SOD、カタラーゼ、DMSO を DNA 切断反応の系に添加したところ、全ての消去剤は DNA 切断を完全に抑制した。以上の結果より、カテキンは DPPH による酸化によって生成したキノン体が NADH 存在下、酸素を還元活性化して活性酸素を発生し、DNA を切断することがわかった。この反応系は、フェノール性化合物の酸化代謝を伴う、複合毒性の簡便な評価系として利用可能である。

4. 酸化代謝を伴う毒性試験

一電子酸化剤 DPPH を用いてキノンへの酸化を行った後、プラスミド共存下で 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 倍量をそれぞれ使い、NADH は全て 1mM で測定を行った。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強力な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。

5. 分子軌道計算による毒性予測

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が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一電子還元を受けた後、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)と一電子酸化体(ラジカルカチオン)の生成熱($\Delta E1$)を求めた。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)と一電子還元体(ラジカルアニオン)の生成熱($\Delta E2$)を求めた。その結果、 $\Delta E2$ の大きさ(カテキン > エピカテキン > エピガロカテキンガレート > エピガロカテキン)が酸化代謝を伴う毒性評価の結果と最も良く相関し、 $\Delta E2$ が低くキノンアニオンラジカルが生成し易いフェノール性抗酸化物質ほど毒性が強いことが明らかとなった。

D. 考察

1.

【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 による突然変異誘発性が増強された。さらに、FL の併用投与は単独投与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。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こし、併用投与群では細胞増殖活性の加算的な増

強が認められた。遺伝子突然変異は主に DNA 複製の際に生じた DNA 損傷に対して塩基が誤挿入されることで生じることから、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に起因するものと考えられた。さらに、高用量の ES 単独投与で特徴的に増加した G:C:T:A transversion 変異が、FL 併用投与により低用量から増加した事実は、併用投与群で生じた突然変異が ES 特異的 DNA 付加体に起因することを示唆するものと考えられた。

【実験 2】これまでの我々の研究結果から KBrO₃ は 1 塩基欠失変異を、NFT は G:C:T:A transversion 変異を誘発するのに対し、Alz は突然変異誘発性を示さないことが確認されている。このように異なるパターンの変異を誘発すると考えられる KBrO₃ 又は NFT と酸化的 DNA 損傷のみを誘発する Alz の併用投与により、酸化的 DNA 損傷及び突然変異誘発性における複合影響を検討した。その結果、KBrO₃ 又は NFT に対して Alz を併用投与することによって 8-OHdG レベルが加算的に増加することが確認された。また、KBrO₃ と Alz の併用投与により欠失サイズの増加を伴う欠失変異頻度の増加が認められ、近接する領域に 1 塩基欠失変異が多数生じることにより大きなサイズの欠失が誘発される可能性が考えられた。

2.

本研究では、高脂肪食摂取が食品中の発がん物質の遺伝毒性作用に与える影響を明らかにすることを目的とし、高脂肪食を摂取させた *gpt delta* ラットまたはマウスにおけるヘテロサイクリックアミンの *in vivo* 変異原性を検討した。実験 1 では、*gpt delta* ラットに高脂肪食を与え、同時に IQ あるいは MeIQx を投与した結果、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 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ことから、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が明らかとなった。

4 週間の高脂肪食摂取は体重や肝重量、血清中グルコース、トリグリセリド濃度の上昇や肝細胞の脂肪変性を引き起こしたものの、その程度は軽度であり、顕著な体重増加や肝重量の増加、肝細胞の高度な脂肪滴の蓄積等が認められなかったことから、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さらに検討する必要があると考えられた。そこで、実験 2 では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した。*gpt delta* マウスに高脂肪食を 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。実験 1 においては、最終体重は約 6%、絶対および相対肝重量はそれぞれ約 15%および 9%の増加であったことから、実験 2 の条件下では、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。しかしながら、このような実験条件下においても、MeIQx 投与群における *gpt* MF の上昇傾向に対して、高脂肪食摂取の影響は認められなかったことから、長期間の高脂肪食の摂取はマウス肝臓における MeIQx の *in vivo* 変異原性に影響を与えなかった。

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。

4. 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。さらに、この増強作

用は、ベンズイミダゾール化合物単独での AhR 活性化能とは関係なく起こることや、細胞種特異的な反応でないことが示された。これらのことから、ベンズイミダゾール化合物は、種々細胞株に共通した機構で AhR 活性化を増強することが示唆される。そこで、ベンズイミダゾール化合物による AhR 活性化増強機構について、CYP1A 酵素阻害に伴った AhR リガンドの分解阻害（遅延）の可能性を考え、CYP1A 酵素阻害能について検討した。その結果、TBZ や OME は、複合影響を示す濃度では CYP1A1 酵素を阻害しないこと、また、CYP1A1 酵素の発現が低い細胞でも AhR 活性化増強作用が見られることから、ベンズイミダゾール化合物は CYP1A1 酵素の阻害とは異なる機構で AhR 活性化を増強することが示された。HepG2 細胞での細胞内 MC 量は TBZ 共存下でも増加しないことを確認しており、本研究の結果を裏付けるものと思われる。さらに、TBZ などのベンズイミダゾール化合物が細胞内 AhR を安定化させ、結果として AhR 活性化を増強している可能性を考え、検討を行った。しかし、TBZ 処理による AhR タンパク質の安定化（分解阻害）は認められず、TBZ による AhR 活性化増強効果は、細胞内 AhR タンパク質量の変動を介したものであることが示唆される。これらの結果から、TBZ などのベンズイミダゾール化合物は AhR リガンド（MC）の分解、あるいは細胞内 AhR の安定化とは異なった機構、例えば、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、あるいはエピジェネティックな変化などによって、リガンド型 AhR 活性化物質による活性化を増強させていることが考えられた。

2) 食品中の AhR 活性化物質の検索

本研究で用いたヘテロサイクリックアミン類（9 種）はいずれも、ラットの *in vivo* 肝で CYP1A 酵素誘導能を示す。しかし、ヒト HepG2 細胞を用いた本研究では、6 化合物に AhR 活性化能や CYP1A 誘導能が確認

されたものの、Glu-P-1、Glu-P-2 及び PhIP には明らかな活性は認められなかった。したがって、これら化合物は HepG2 細胞には存在しない経路で CYP1A 酵素を誘導している可能性が示唆された。さらに、タール系合成着色料（18 種）より、いずれかの動物種の AhR を活性化する化合物を 7 種、また、赤色色素から AhR 活性化に動物種差がみられる化合物 3 種を同定した。これら化合物はいずれもキサンチン骨格を有しているにも関わらず、その応答性に種差が見られたことから、側鎖が持つ官能基の違いと AhR 結合能の関連性などの解析が必要であると考える。また、ヘテロサイクリックアミン類やタール系合成着色料の AhR を介した毒性発現や、他の化学物質との複合影響などが今後の研究課題である。

5. フェノール性抗酸化物質は比較的安全性が高い化合物として知られているが、海外では緑茶抽出物を摂取することで肝炎を発症した事例が報告されている。そこで、本研究ではフェノール性抗酸化物質の毒性発現機構を明らかにし、毒性の発現に関わる因子を特定することでヒトへの影響を評価し、健康被害に関わる複合影響について情報提供を行うことを目的とした。フェノール性抗酸化剤の毒性発現機構としては、酸素分子を直接還元活性化する機構と酸化代謝されて生成するキノンを經由する機構が考えられる。そこで、代表的なフェノール性抗酸化剤のカテキンについて、それぞれの反応機構による毒性発現の可能性を検討した。カテキンから酸素への電子移動反応について検討したところ、カテキンのジアニオン体は容易に酸素を還元活性化してスーパーオキシドアニオンを発生することが明らかとなった。この結果は、生体内で金属イオンが存在するとカテキンは酸素を還元活性化することを示すものであり、複合影響として金属イオンを伴う毒性が動物やヒトでも発症する可能性が示唆された。

一方、海外ではカテキンによる肝炎発症の事例が数件報告されていることから、カ

テキンの毒性は肝臓で代謝活性化を伴う機構で発現する可能性も考えられる。そこで、一電子酸化剤による酸化代謝のモデル反応を行ったところ、カテキンは容易にキノンへと酸化されることが明らかとなった。この結果は、カテキンは生体内では薬物代謝酵素が誘導されると容易にキノンに酸化代謝されることを示唆するものである。カテキンがキノンへと酸化されると DNA や蛋白質による求核付加を受けて毒性を発現する可能性、および還元物質とレドックスサイクルを形成して活性酸素を発生する可能性が考えられる。今回、核酸塩基のモデル化合物としてベンジルアミンを反応させたところ、キノン酸化体と容易に付加体を生成した。また、キノンへの酸化を行ったのち、同一反応系にプラスミド DNA と NADH を添加すると、活性酸素を発生して DNA の切断反応が進行することが明らかとなった。DNA の切断反応については条件検討を行い、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として構築することができた。この試験法で、緑茶に含まれるフェノール性抗酸化物質の毒性を検討したところ、エピガロカテキンがもっとも毒性が強く、エピガロカテキンガレート、エピカテキン、カテキンの順で毒性が弱くなることが明らかとなった。緑茶の主成分であるエピガロカテキンガレートは生体内では容易にエステラーゼによってエピガロカテキンに加水分解される。また、エピガロカテキンガレートは水溶性が高く吸収され難いが、エピガロカテキンは脂溶性が高く吸収され易い。従って、緑茶抽出物を大量摂取すると、エピガロカテキンガレートはエピガロカテキンへ加水分解されて細胞に蓄積され、第 I 相薬物代謝酵素が誘導されると、キノンへの酸化が進行して毒性を発現することが予測された。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毒性評価の反応系で生成させることで、不安定なキノンの活性酸素毒性を評価することができる。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、本研究で開発した評価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を評価する試験系としての活用が期待される。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.

【実験1】細胞内微小環境を変化させる食品中の化学物質が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。【実験2】複数の酸化的DNA損傷誘発物質のばく露により酸化的DNA損傷は加算的に増加し、遺伝子突然変異の増強につながる可能性が示された。

2.

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結果、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った。従って、高脂肪食摂取が食品中遺伝毒性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。

3.1

妊娠中はホルモン、薬物代謝酵素の活性あ

るいは発現量の変化、さらに胎児の発育に伴う母体への負担などによるストレスが生理学的変化を誘発し、毒性を増強させるものと推察した。ストレス因子や除去因子、あるいは各種薬物代謝酵素は成長に伴い分泌量が増加し、活性化されるため、若齢期では毒性が弱いと考えられた。

3.2

当該研究は農薬複合暴露による免疫毒性影響の調査を目的として、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農薬および各種化学物質を用いて検討を行った。平成25年度では、免疫攪乱影響を評価するための吸入アレルギーモデルの確立と、暴露濃度の検討を行い、評価に最適な試験系と暴露濃度を決定した。平成26年度の研究では、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系を用いて調査した。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、メトキシクロルおよ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。平成27年度の研究では、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ないしは複合暴露後、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初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。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、吸入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された。

以上の結果から、妊娠動物への免疫攪乱物質の複合投与が、次世代（児動物）の吸入アレルギー反応の増悪を引き起こす可能性が示唆された。

4.

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、以下の事を明らかとした。

- ・ベンズイミダゾール化合物は種々細胞株において多環式芳香族炭化水素類によるAhR活性化を増強する。

- ・ベンズイミダゾール化合物のAhR活性化増強作用は、AhR活性化様式の違う化合物（AhRリガンド）に対して発揮される。

- ・ベンズイミダゾール化合物は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でAhR活性化を増強する。

- ・癌原性ヘテロサイクリックアミン類やタール系合成着色料には、AhR活性化作用を持つ化合物が存在する。

5.

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化学的な手法で検討した。その結果、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、複合影響として金属イオンを伴う毒性が発症する可能性が示された。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することが明らかとなった。また、キノン体が生成すると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ことが示唆された。

また、キノンへの酸化を伴うDNA切断反応について条件検討を行い、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として構築することができた。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。さらに、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が酸化代謝を伴う毒性の強さと相関する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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuroda, K., Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Jin, M., Matsushita, K., Kodama, Y., Umemura, T. Flumequine enhances the in vivo mutagenicity of MeIQx in the mouse liver. *Arch. Toxicol.*, 87, 1609-1619, 2013.
- 2) 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. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 36(4):261-270, 2014.
- 3) 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.

- 4) Imai, K., Nakanishi, I., Ohno, A., Kurihara, M., Miyata, N., Matsumoto, K., Nakamura, A., Fukuhara, K., Synthesis and radical-scavenging activity of a dimethyl catechin analogue. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, 2582-2584, 2014
 - 5) Takizawa, Y., Nakata, R., Fukuhara, K., Yamashita, H., Kubodera, H., Inoue, H., The 4'-hydroxyl group of resveratrol is functionally important for direct activation of PPAR α . *PLoS One*, 10, e0120865 (2015)
 - 6) 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.
- ### 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) 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
 - 4) 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
 - 5) Shinji Takasu, Yuji Ishii, Aki Kijima, Yu

h 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

6) 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、相馬 克美、高橋 尚史、吉田 敏則、坂 真智子、青山 博昭、原田 孝則: 妊娠ラットに対するパラチオン及びメタミドホス複合暴露影響 第156回日本獣医学会学術集会 2013年9月

7) 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回日本毒性学会学術集会 2014年7月

8) 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- 第42回日本毒性学会 2015年7月

9) 西野里沙子、福山朋季、渡部優子、黒澤好、上田英夫、小坂忠司、原田孝則: 免疫攪乱化学物質暴露が次世代の呼吸器アレルギーに及ぼす影響調査 第42回日本毒性学会学術年会 2015年6月

10) 西野里沙子、福山朋季、渡部優子、黒澤好、上田英夫、小坂忠司、原田孝則: 免疫攪乱化学物質暴露が次世代の呼吸器アレルギーに及ぼす影響 第22回日本免疫毒性学会学術年会 2015年9月

11) 村木俊文、関本征史、出川雅邦: 芳香族炭化水素受容体 (AhR) 活性化におけるヒト-マウス間での種差. 第72回日本癌学会学術総会 (横浜)、2013年10月

12) 田崎愛佳、村木俊文、長澤聖子、根本清光、関本征史、出川雅邦: 合成着色料による芳香族炭化水素受容体活性化とその種差. 第134回日本薬学会年会 (熊本)、2014年3

月

13) 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

14) 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

15) 関本征史、吉成浩一、出川雅邦: 化学物質の複合影響による細胞毒性発現: AhR活性化を指標として (シンポジウム: 次世代研究者セミナー: 薬物の安全性評価における新たな挑戦). 第42回日本毒性学会学術年会 (金沢)、2015年7月

16) 田野辺潤、成瀬理紗、田崎愛佳、梅村隆志、遠藤治、出川雅邦、吉成浩一、関本征史: ベンズイミダゾール系化合物のAhR活性化増強機構: CYP1A1酵素阻害に着目した解析. 日本薬学会第136年会 (横浜)、2016年3月

17) Fukuhara, K.: Antioxidative properties of substituted or analogues of natural molecules. Antioxidants: New Sources & Application in Life Sciences, Japan-France Seminar at the Embassy of France in Japan (2013.7) Tokyo

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuroda, K., Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Jin, M., Matsushita, K., Kodama, Y., Umemura, T.	Flumequine enhances the in vivo mutagenicity of MeIQx in the mouse liver.	Arch. Toxicol.	87	1609-1619	2013
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.	Immunopharmacol Immunotoxicol	36	261-270	2014
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	359-366	2014
Imai, K., Nakanishi, I., Ohno, A., Kurihara, M., Miyata, N., Matsumoto, K., Nakamura, A., Fukuhara, K.	Synthesis and radical-scavenging activity of a dimethyl catechin analogue.	Bioorg. Med. Chem.	24	2582-2584	2014
Takizawa, Y., Nakata, R., Fukuhara, K., Yamashita, H., Kubodera, H., Inoue, H.	The 4'-hydroxyl group of resveratrol is functionally important for direct activation of PPAR α	PLoS One	10	e0120865	2015
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

研究成果の刊行物・別刷

Flumequine enhances the *in vivo* mutagenicity of MeIQx in the mouse liver

K. Kuroda · A. Kijima · Y. Ishii · S. Takasu · M. Jin ·
K. Matsushita · Y. Kodama · T. Umemura

Received: 17 January 2013 / Accepted: 23 April 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The combined effects of various carcinogens found in food products are a concern for human health. In the present study, the effects of flumequine (FL) on the *in vivo* mutagenicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in the liver were investigated. Additionally, we attempted to clarify the underlying mechanisms through comprehensive gene analysis using a cDNA microarray. Male *gpt* delta mice were fed a diet of 0.03 % MeIQx, 0.4 % FL, or 0.03 % MeIQx + 0.4 % FL for 13 weeks. The effects of cotreatment with phenobarbital (PB) were also examined. Treatment with MeIQx alone increased *gpt* and Spi⁻ mutant frequencies, and cotreatment with FL, but not with PB, further exacerbated these effects, despite the lack of *in vivo* genotoxicity in mice treated with FL alone. FL caused an increase in *Cyp1a2* mRNA levels and a decrease in *Ugt1b1* mRNA levels, suggesting that the enhancing effects of FL may be due in part to modification of MeIQx metabolism by FL. Moreover, FL induced an increase in hepatocyte proliferation accompanied by hepatocellular injury. Increases in the mRNA levels of genes encoding cytokines derived from Kupffer cells, such as *Il1b* and *Tnf*, and cell cycle-related genes, such as *Ccnd1* and *Ccne1*, suggested that FL treatment increases compensatory cell proliferation. Thus, the present study clearly

demonstrated the combined effects of 2 different types of carcinogens known as contaminants in foods.

Keywords MeIQx · Flumequine · *In vivo* mutagenicity · *gpt* delta mouse · Combined effects

Introduction

A variety of carcinogens are produced in foods or have been found to accidentally contaminate foods. Many studies have reported the toxicities of individual carcinogens. Although some carcinogens are known to cause either synergistic or antagonistic effects (Takayama et al. 1989; Hasegawa et al. 1991), the effects of many combinations of carcinogens have not yet been determined. 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) is a heterocyclic amine produced in cooked meat and has been shown to induce tumors in the liver, Zymbal glands, clitoral glands, and skin in rats and in the liver, lungs, hematopoietic system, and colon in mice (Ohgaki et al. 1987; Sugimura et al. 2004; Nishikawa et al. 2005). The *in vitro* genotoxicity of MeIQx has been demonstrated, and MeIQx has also been shown to exhibit *in vivo* mutagenicity in the livers of transgenic mice (Itoh et al. 2000; Masumura et al. 2003). Recently, we reported that the *in vivo* mutagenicity of MeIQx in the liver was enhanced by cotreatment with carbon tetrachloride (CCl₄) in *gpt* delta mice (Okamura et al. 2010). These data suggested that the genotoxicity of carcinogens could be enhanced by injury or inflammation in the target organs.

Flumequine (FL) is a fluoroquinolone compound with antimicrobial activity against gram-negative organisms and has been used in the treatment of enteric infections in domestic animals and livestock (Greenwood 1998); FL is

K. Kuroda and A. Kijima contributed equally to this work.

K. Kuroda · A. Kijima · Y. Ishii · S. Takasu · M. Jin ·
K. Matsushita · T. Umemura (✉)
Division of Pathology, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
e-mail: umemura@nihs.go.jp

Y. Kodama
Division of Toxicology, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

thought to persist in food products made from such livestock (Choma et al. 1999). FL induces hepatotoxicity, characterized by hepatocyte vacuolation and inflammatory cell infiltration, in both rats and mice and induces liver tumors in mice (JECFA 1998; Pronk 2004). Based on the negative results of genotoxicity tests, JECFA concluded that FL is a nongenotoxic hepatocarcinogen and that hepatocellular necrosis-regeneration cycles caused by hepatotoxicity are mechanistically relevant to its induction of liver tumors in mice (JECFA 2004). FL and MeIQx, both of which possibly exist in foods, could be ingested by humans on a long-term basis. Moreover, given that FL exhibits hepatotoxicity similar to CCl₄, FL indeed may exert additional effects on the genotoxicity of MeIQx.

Therefore, in the present study, we investigated the effects of FL on the *in vivo* mutagenicity of MeIQx in the mouse liver. *gpt* delta mice were given MeIQx and FL for 13 weeks. To clarify the relationship between changes in reporter gene mutations and molecular mechanisms, mouse livers were used for histopathological examination, bromodeoxyuridine (BrdU) immunostaining, and analysis of reporter gene mutations (*gpt* and Spi⁻ assays) as well as comprehensive gene expression analysis by cDNA microarray. In addition, cotreatment with phenobarbital (PB), a nonhepatotoxic tumor promoter for hepatocarcinogenesis, was examined as a comparative control.

Materials and methods

Chemicals

FL, a white crystallized powder (purity: 99.3 %), was kindly provided by Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. (Tokyo,

Japan). MeIQx and PB were purchased from Toronto Research Chemicals (North York, Canada) and Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), respectively. BrdU was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Animals and treatments

The protocol for this study was approved by the Animal Care and Utilization Committee of the National Institute of Health Sciences. Male B6C3F₁ *gpt* delta mice carrying 80 tandem copies of the transgene lambda EG10 in a haploid genome were raised by mating C57BL/6 *gpt* delta and nontransgenic C3H/He mice (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan). Thirty male B6C3F₁ *gpt* delta mice were randomized by weight into 6 groups. Animals were housed in a room with a barrier system and maintained under the following constant conditions: temperature of 24 ± 1 °C, relative humidity of 55 ± 5 %, ventilation frequency of 18 times/h, and a 12-h light/dark cycle. The animals were housed in plastic cages (5 mice/cage) on soft chips (Sankyo Labo-Service, Tokyo, Japan). Throughout the experimental period, chips were renewed every 3 or 4 days, and mice were provided tap water *ad libitum*.

Starting at 6 weeks of age, *gpt* delta transgenic mice were fed a diet containing 0.03 % MeIQx, 0.4 % FL, 0.05 % PB, 0.03 % MeIQx and 0.4 % FL, or 0.03 % MeIQx and 0.05 % PB for 13 weeks. Animals in the control group received the basal diet only. General signs were observed daily, and body weight and food consumption per cage were measured once a week. After 13 weeks, all mice were killed, and a part of the left lateral lobe of the liver was stored at -80 °C for *in vivo* mutation assays and cDNA microarray analysis. At autopsy, the body and liver weights were measured.

Fig. 1 Body weight and food consumption for B6C3F₁ *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks. * **Significantly different from control group at *p* < 0.05 and 0.01, respectively

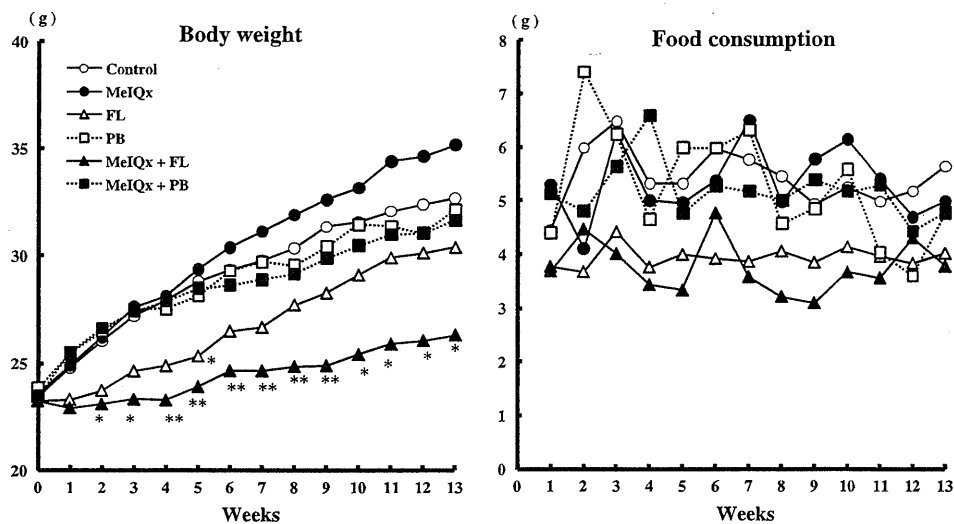


Table 1 Final body and liver weights in B6C3F₁ *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks

Group	Final body weight (g)	Liver weight	
		Absolute (g)	Relative (g/100 g BW)
Control	32.7 ± 3.9 ^a	1.40 ± 0.15	4.29 ± 0.23
MeIQx	35.4 ± 4.4	1.63 ± 0.21	4.63 ± 0.40
FL	31.1 ± 1.7	1.60 ± 0.15	5.13 ± 0.23**
PB	32.4 ± 2.9	1.57 ± 0.07	4.88 ± 0.30
MeIQx + FL	26.4 ± 2.1*	1.33 ± 0.10	5.02 ± 0.15*
MeIQx + PB	31.7 ± 2.2	1.64 ± 0.16	5.20 ± 0.47**

*, ** Significantly different from control group at $p < 0.05$, 0.01 , respectively

^a Mean ± SD

Quantification of hepatocyte proliferation

In order to examine the proliferative activity of hepatocytes, all animals were given BrdU (100 mg/kg) by intraperitoneal (i.p.) injection once a day for the final 2 days before killing and once on the day of killing at 2 h before being euthanatized at autopsy. For immunohistochemical staining of BrdU, after activation of the antigen by autoclaving, tissue sections were treated with rat anti-BrdU (AbD Serotec Inc., NC, USA) diluted by Dako Antibody Diluent (Dako, Glostrup, Denmark), followed by incubation with a high polymer stain (HISTOFINE Simple Stain, NICHIREI, Japan). At least 2,000 hepatocytes in each liver

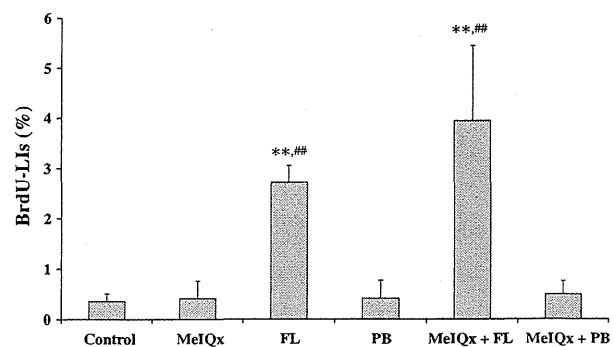


Fig. 3 BrdU-LIs for hepatocytes from B6C3F₁ *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks. Values are the mean ± SD of data for 5 mice. **, ## Significantly different from control and MeIQx groups, respectively, at $p < 0.01$

were counted, and labeling indices (LIs) were calculated as the percentage of cells positive for BrdU incorporation.

In vivo mutation assays

The 6-TG and Spi⁻ (insensitive P2 interference) selections were carried out as previously described (Nohmi et al. 1996, 2000). Briefly, genomic DNA was extracted from the liver tissue, and lambda EG10 DNA (48 kb) was rescued as the lambda phage through in vitro packaging. For 6-TG selection, the packaged phage was incubated with *Escheichia coli* YG6020, expressing Cre recombinase, and converted to a plasmid carrying *gpt* and chloramphenicol

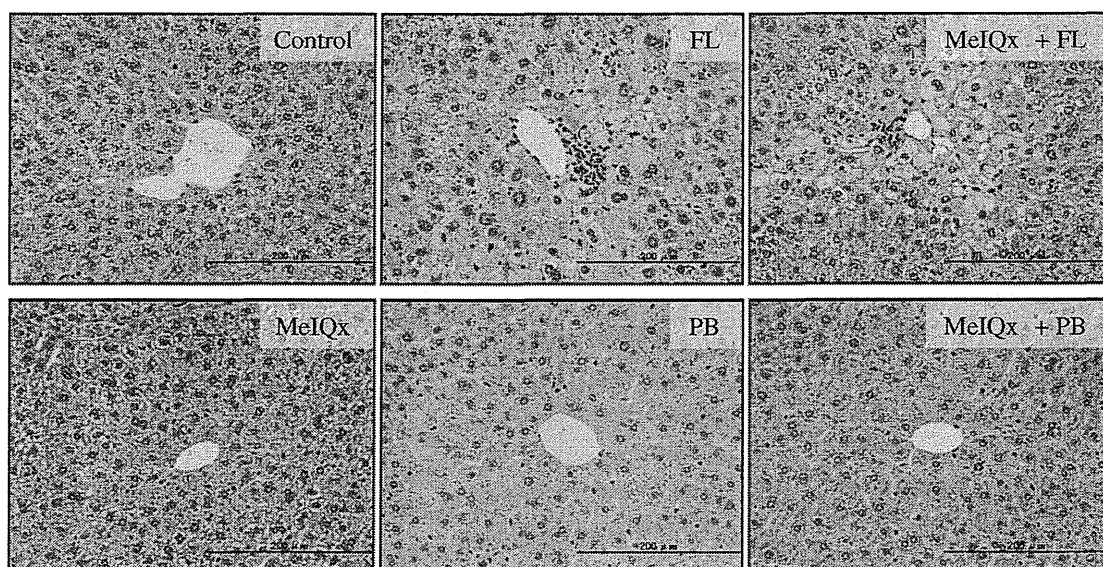


Fig. 2 Histopathological features in the livers of B6C3F₁ *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks. Note that no obvious alterations (MeIQx group),

centrilobular hypertrophy of hepatocytes with vacuolation (FL and MeIQx + FL groups), or centrilobular hypertrophy of hepatocytes (PB and MeIQx + PB groups) are evident. Bar represents 200 μm

Table 2 *gpt* mutant frequencies (MFs) in the livers of B6C3F₁ *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks

Group	Animal no.	Cm ^R colonies (×10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (×10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	1	26.7	4	0.15	0.20 ± 0.12
	2	12.5	3	0.24	
	3	26.7	2	0.07	
	4	1.7	0	0.00 ^b	
	5	26.2	9	0.34	
MeIQx ^a	6	0.7	3	4.33	5.47 ± 2.03
	7	3.2	18	5.56	
	8	3.5	10	2.85	
	9	2.3	19	8.18	
	10	3.1	20	6.44	
FL	11	25.6	7	0.27	0.29 ± 0.15
	12	20.2	8	0.40	
	13	20.4	10	0.49	
	14	22.4	4	0.18	
	15	7.9	1	0.13	
PB	16	26.6	4	0.15	0.24 ± 0.12
	17	17.2	7	0.41	
	18	23.9	7	0.29	
	19	18.5	2	0.11	
	20	22.4	5	0.22	
MeIQx + FL ^a	21	3.0	21	7.11	11.92 ± 6.26 ^{**#}
	22	3.4	37	10.93	
	23	5.1	28	5.51	
	24	1.9	29	15.06	
	25	1.0	20	20.96	
MeIQx + PB ^a	26	5.7	5	0.88	2.57 ± 2.60
	27	3.2	7	2.17	
	28	5.3	7	1.32	
	29	2.3	3	1.33	
	30	1.3	9	7.14	

** Significantly different from control group at $p < 0.01$

Significantly different from the MeIQx group at $p < 0.05$

^a For mice treated with MeIQx alone and for cotreatment groups, *gpt* mutants were analyzed only on one selected plate whose colony numbers were closest to the average number of 5 plates, and MFs were calculated using the packaging efficiency values (Cm^R colonies) divided by 5

^b Data of animal No. 4 were excluded for the calculation of the MF because of the poor packaging efficiency of the transgene

acetyltransferase. Infected cells were mixed with molten soft agar and poured onto agar plates containing chloramphenicol and 6-TG. In order to determine the total number of rescued plasmids, infected cells were also poured on plates containing chloramphenicol without 6-TG. The plates were incubated at 37 °C for the selection of 6-TG-resistant colonies, and the *gpt* mutant frequency (MF) was calculated by dividing the number of *gpt* mutants after clonal correction by the number of rescued phages. To characterize *gpt* mutations, a 739-bp DNA fragment containing the 456-bp coding region of the *gpt* gene was amplified by PCR as previously described, and the PCR products were analyzed with an Applied Biosystems 3,730 × 1 DNA Analyzer (Applied Biosystems Japan Ltd.). For the group of mice treated with MeIQx alone and for cotreatment groups, *gpt* mutants were analyzed only on one selected plate based on the assumption that the colony number on the selected plate was closest to the average number of 5 plates, and

MFs were calculated by the packaging efficiency value (Cm^R colonies) divided by 5.

For Spi⁻ selection, the packaged phage was incubated with *E. coli* XL-1 Blue MRA for survival titration and *E. coli* XL-1 Blue MRA P2 for mutant selection. Infected cells were mixed with molten lambda-trypticase agar plates. The next day, plaques (Spi⁻ candidates) were punched out with sterilized glass pipettes, and the resulting agar plugs were suspended in SM buffer. In order to confirm the Spi⁻ phenotype of candidates, the suspensions were spotted on 3 types of plates containing XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA P2, or WL95 P2 strains and were spread with soft agar. The numbers of mutants that made clear plaques on each plate were counted as confirmed Spi⁻ mutants. The Spi⁻ MF was calculated by dividing the number of Spi⁻ mutants by the number of rescued phages. For the group of mice treated with MeIQx alone and for the cotreatment groups, confirmation of Spi⁻ phenotype candidates

Table 3 Mutation spectra of *gpt* mutant colonies in the livers of B6C3F₁ *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks

Mutation	Control		MeIQx		FL		PB		MeIQx + FL		MeIQx + PB	
	Number (%)	Specific mutation frequency ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Specific mutation frequency ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Specific mutation frequency ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Specific mutation frequency ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Specific mutation frequency ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Specific mutation frequency ($\times 10^{-5}$)
<i>Transversions</i>												
GC-TA	4 ^a (22.2)	0.03 \pm 0.05 ^b	36 (51.4)	2.85 \pm 0.77	6 (20.0)	0.05 \pm 0.05	6 (24.0)	0.05 \pm 0.06	74 (54.8)	6.90 \pm 4.36 ^{**#}	16 (51.6)	1.21 \pm 1.15
GC-CG	0	0	2 (2.9)	0.15 \pm 0.21	1 (3.3)	0.01 \pm 0.02	1 (4.0)	0.01 \pm 0.02	2 (1.5)	0.14 \pm 0.23	1 (3.2)	0.04 \pm 0.08
AT-TA	1 (5.6)	0.01 \pm 0.02	3 (4.3)	0.19 \pm 0.28	0	0	0	0	5 (3.7)	0.48 \pm 0.34 [*]	0	0
AT-CG	0	0	1 (1.4)	0.06 \pm 0.14	2 (6.7)	0.02 \pm 0.03	0	0	0	0	0	0
<i>Transitions</i>												
GC-AT	9 (50.0)	0.08 \pm 0.05	2 (2.9)	0.35 \pm 0.63	9 (30.0)	0.10 \pm 0.06	13 (52.0)	0.13 \pm 0.11	11 (8.1)	0.77 \pm 0.83	7 (22.6)	0.67 \pm 0.98
AT-GC	0	0	0	0	3 (10.0)	0.03 \pm 0.03	3 (12.0)	0.03 \pm 0.03	0	0	0	0
<i>Deletion</i>												
Single bp	3 (16.7)	0.04 \pm 0.07	22 (31.4)	1.55 \pm 1.24	6 (20.0)	0.06 \pm 0.06	2 (8.0)	0.02 \pm 0.03	37 (27.4)	3.14 \pm 1.36 ^{**#}	5 (16.1)	0.50 \pm 0.63
Over 2 bp	0	0	1 (1.4)	0.09 \pm 0.19	2 (6.7)	0.02 \pm 0.03	0	0	1 (0.7)	0.21 \pm 0.47	0	0
Insertion	0	0	2 (2.9)	0.15 \pm 0.21	1 (3.3)	0.01 \pm 0.02	0	0	2 (1.5)	0.12 \pm 0.26	1 (3.2)	0.06 \pm 0.14
Complex	1 (5.6)	0.01 \pm 0.02	1 (1.4)	0.09 \pm 0.19	0	0	0	0	3 (2.2)	0.16 \pm 0.26	1 (3.2)	0.09 \pm 0.20

*^a ** Significantly different from control group at $p < 0.05$ and 0.01, respectively

Significantly different from the MeIQx group at $p < 0.05$

^a Number of colonies with independent mutations

^b Mean \pm SD

Table 4 Spi⁻ mutant frequencies (MFs) in the livers of B6C3F₁ *gpt* delta mice treated with MeIQx, FL, PB, MeIQx + FL, or MeIQx + PB for 13 weeks

Group	Animal no.	Plaques within XL-1 Blue MRA ($\times 10^5$)	Plaques within WL95 (P2)	Mutant frequency ($\times 10^{-5}$)	Mean \pm SD
Control	1	34.6	8	0.23	0.15 \pm 0.07
	2	14.9	1	0.07	
	3	49.4	8	0.16	
	4	6.0	2	0.33	
	5	21.1	3	0.14	
MeIQx ^a	6	3.2	4	1.27	3.53 \pm 1.97*
	7	5.7	12	2.12	
	8	7.3	24	3.28	
	9	9.6	58	6.07	
	10	12.0	59	4.91	
FL	11	39.8	6	0.15	0.17 \pm 0.03
	12	25.6	5	0.20	
	13	31.3	5	0.16	
	14	41.4	6	0.14	
	15	20.2	4	0.20	
PB	16	46.6	7	0.15	0.20 \pm 0.09
	17	45.7	8	0.17	
	18	30.4	4	0.13	
	19	17.3	6	0.35	
	20	32.9	7	0.21	
MeIQx + FL ^a	21	4.9	27	5.48	7.66 \pm 3.02** [#]
	22	5.5	30	5.49	
	23	8.0	43	5.40	
	24	6.5	70	10.80	
MeIQx + PB ^a	25	4.0	44	11.11	1.72 \pm 1.74
	26	7.2	3	0.42	
	27	5.7	4	0.71	
	28	8.3	7	0.84	
	29	6.0	12	1.99	
	30	3.0	14	4.64	

*. ** Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively

[#] Significantly different from the MeIQx group at $p < 0.05$

^a For mice treated with MeIQx alone and for cotreatment groups, confirmation of Spi⁻ phenotype candidates was performed only on the first of 2 plates, and MFs were calculated using the packaging efficiency values (plaques within XL-1 Blue MRA) divided by 2

was performed only on the first of 2 plates, and MFs were calculated using the packaging efficiency value (plaques within XL-1 Blue MRA) divided by 2.

RNA isolation

The livers from all animals were soaked overnight in RNeasy lysis buffer (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) at -20°C , and total RNA was then isolated using RNeasy Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The concentration and quality of total RNA were analyzed using a UV-VIS spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

cDNA microarray

In 3 mice from the control, MeIQx, and MeIQx + FL groups, purified total RNA was labeled with cyanine-3 dye using a Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies). RNA concentration, dye incorporation, and quality were analyzed using a UV-VIS spectrophotometer and an Agilent 2100 Bioanalyzer. Fluorescently labeled cRNA was hybridized to Agilent 4×44 K whole mouse genome microarray gene expression chips following the manufacturer's protocol (Agilent Technologies). Hybridized microarray chips were then scanned using an Agilent Microarray Scanner (Model G2565BA, Agilent Technologies). Feature Extraction software (Agilent Technologies) was employed for imaging analysis and data extraction processes. Using