

19980594

畜水産食品中の化学物質残留防止対策に関する研究

平成 10 年度厚生科学研究費補助金
生活安全総合研究事業報告

主任研究者
国立医薬品食品衛生研究所 病理部
三 森 国 敏

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書（平成 10 年度）

畜水産食品中の化学物質残留防止対策に関する研究

主任研究者 三森国敏 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨

2,6-dimethylaniline (DMA) はラットに鼻腔腫瘍を誘発することが報告されている。一方、DMA は家畜の鎮静剤として用いられている α_2 アドレナリン受容体刺激剤 xylazine (XZ) の代謝物でもあることから、畜産食品中に残留することによるヒトへの影響が懸念されている。本年度は、この XZ ないし DMA に鼻腔腫瘍プロモーション作用が存在するか否かを検討するための実験を行った。N-bis (2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) 2400 mg/kg をイニシエーターとしてラットに単回投与後、1000ppm の XZ ないし 300 あるいは 3000ppm の DMA 混餌飼料を 52 週間にわたり投与した。DHPN+DMA 3000ppm 群では鼻腔に対して発癌プロモーション作用が認められたが、その他の群では認められなかった。一方、DHPN+XZ 群では甲状腺に対し発癌プロモーション作用を示す成績が得られた。その他、DMA の発癌性の有無を、短期発癌試験系の動物モデルとして遺伝毒性発癌物質の検出に非常に感受性が高いことが示されているヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (rash2 マウス) に DMA 3000ppm 混餌飼料を 26 週間自由に摂取させる実験を継続中である。動物用医薬品のうち、内寄生虫用剤のトリクラベンダゾール及びモキシデクチンについて、畜水産食品中の残留検査法を検討し、実用に適する検査法を確立した。

分担研究者 三森 国敏

国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長

分担研究者 豊田 正武

国立医薬品食品衛生研究所 食品部部長

A. 研究目的

国際食糧農業機関 (FAO) と世界保健機構 (WHO) 合同食品規格委員会では、畜産食品中に残留する動物用医薬品および抽出困難なそれらの結合型残留物や代謝物

の毒性学的な評価を含めた新しい評価法に基づく残留基準値 (MRL) の策定が進行中である。我国においてもこの FAO/WHO の勧告を考慮し、輸入食品に含まれるこれらの動物用医薬品についての残留基準値の設定作業が進められている。

動物用医薬品の食品内残留基準値の設定上、最も重要かつ問題となる点としては、畜産物中に残留する代謝物や結合型残留物の安全性が全て明確にされていないこ

とがあげられ、 α_2 アドレナリン受容体刺激剤である xylazine (XZ) は動物の輸送時における鎮静剤として国際的に汎用されているが、その代謝物の 2,6-dimethylaniline (DMA) はラットの鼻腔に対して発癌性を示し、畜産食品中への残留によるヒトへの影響が懸念されていることから、XZ の国際基準の策定は未だなされていない。この食品中の安全性確保のために、本年度は、XZ および DMA の鼻腔腫瘍プロモーション作用の有無を明確にすることを目的として以下の実験を行った。

また、ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (rash2 マウス) は短期間の被験物質投与により遺伝毒性発がん物質の検出に非常に感受性が高いことが示されていることから、DMA の発がん性の有無をこれらの動物を用いて検討した。

平成 7 年 12 月、平成 9 年 3 月に食品衛生法が改正され、計 11 品目の動物用医薬品の食品への残留基準が食品・添加物等の規格基準において新たに設定され、さらに 4 品目の動物用医薬品の食品への残留規格基準について諮問された。新たに諮問された 4 品目の動物用医薬品のうち、抗生物質のスピラマイシン及びベンジルペニシリンについては、平成 9 年度本研究事業において残留検査法を確立した。本年度は、残り 2 品目の動物用医薬品、内寄生虫用剤のトリクラベンダゾール及びモキシデクチンについて残留検査法を検討した。

B. 研究方法

実験 I : XZ および DMA に鼻腔腫瘍プロモーション作用が存在するか否かを明らかにするため、5 週齢の雄 F344 ラット 120 匹を 2 群に分け 85 匹に遺伝毒性発癌物質の N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) 2400 mg/kg をイニシエーターとして背部皮下に単回投与した。35 匹には溶媒の生理食塩水を同様に投与した。DHPN あるいは溶媒投与後 1 週に、DHPN を投与した動物をさらに 4 群に分け、XZ 1000ppm (20 匹)、DMA 300 (15 匹) あるいは 3000ppm (30 匹) 混餌飼料を、また、一群 (20 匹) には基礎飼料のみを 52 週間にわたり自由に摂取させた。溶媒を投与した動物もさらに 3 群に分け XZ 1000ppm (10 匹) あるいは DMA 3000ppm (15 匹) 混餌飼料を、また、一群 (10 匹) には基礎飼料のみを同様に自由に摂取させた。実験開始 53 週時に各群 10 匹からエーテル麻酔下に血液を採取した後、EDTA-2K (和光純薬) 処置により血漿を分離し、XZ および DMA 濃度を HPLC (LC-6A、島津製作所) により測定した。さらに、53 週時には放血屠殺後、種々の組織を採取し、病理組織学的に観察を行った。

実験 II : DMA の発癌性の有無を解明するために、9 週齢の雌雄のヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したトランスジェニック CB6F1 マウス (rash2 マウス) あるいは同腹仔の非導入野生型 CB6F1 マウス (Non-Tg マウス) をそれぞれ 2 群に分け、一方には DMA 3000 ppm 混餌飼料 (rash2 および Non-Tg : 雄各 16 匹、雌各 18 匹) あるいは基礎飼料 (rash2 および Non-Tg : 雄雌各 10 匹)

を 26 週間自由に摂取させた。実験開始 26 週に生存動物をエーテル麻酔下に放血屠殺し、種々の臓器・組織をホルマリン液に浸漬固定した。現在、組織標本を作製中である。

残留検査法：トリクラベンダゾールは、生体内で代謝されて 5 種類の代謝物を生じるため、本体及び代謝物合わせて 6 種類の化合物が残留物として知られている。コーデックス委員会の規格では、本体及び 2 種類の代謝物を酸化処理して生じる 5-クロロ-6-(2,3-ジクロロフェノキシ)-ベンズイミダゾール-2-オンを標的化合物として基準が定められている。本研究においては、コーデックス委員会の推奨する検査法に従い、トリクラベンダゾール本体及び 2 種類の代謝物を酸化処理して生じた、5-クロロ-6-(2,3-ジクロロフェノキシ)-ベンズイミダゾール-2-オンを HPLC により測定する方法を検討した。また、コーデックス委員会の推奨する検査法は、抽出及び精製操作が煩雑で時間を要するため、抽出及び精製操作については、日本においてすでに告示されている、フルベンダゾール（平成 7 年 12 月厚生省告示 218 号）、チアベンダゾール（平成 9 年 3 月厚生省告示 72 号）等の試験法を基にして検討をおこなった。モキシデクチンはイベルメクチンと構造及び作用が類似する内寄生虫用剤で、イベルメクチン試験法は、すでに告示されている（平成 7 年 12 月厚生省告示第 218 号）。そこでイベルメクチン試験法のモキシデクチンへの適用を検討した。

C. 研究結果

実験 I：病理組織学的観察では、嗅腺の萎縮および背鼻道部への好中球浸潤が DMA を投与した DHPN+DMA および DMA 群でほとんどの動物に認められた。また、鼻腔においては鼻腔上皮細胞の過形成、嗅上皮粘膜下に好塩基細胞の集簇よりなる異形成巣、腺腫、腺癌および扁平上皮癌などがイニシエーション処置をした群で多数認められた。異形成巣および腺癌の発生頻度は DHPN 群に比し DHPN+DMA 3000ppm 群で有意に増加した。しかし、DHPN+DMA 300ppm 群および DHPN+XZ 群においては、DHPN 群との間に明らかな差を認めなかった。一方、甲状腺濾胞上皮の過形成が DHPN 群および DHPN+DMA 群に、さらに、甲状腺濾胞上皮の過形成および腺腫あるいは腺癌が XZ 群および DHPN+XZ 群で認められ、DHPN+XZ 群で誘発された甲状腺濾胞上皮の増殖性病変は DHPN 群に比し有意に増加した。

血漿中 XZ および DMA の濃度測定では、XZ 群における親化合物 XZ および代謝物 DMA 濃度は検出限界値 ($0.02\mu\text{g/ml}$) あるいは検出限界値以下であった。DHPN+XZ 群では XZ 濃度は検出限界値 ($0.02\mu\text{g/ml}$) あるいは検出限界値以下であったが、DMA 濃度は 10 例中 2 例に $0.04\sim 0.06\mu\text{g/ml}$ と僅かに代謝物が検出された。DHPN+DMA 3000ppm 群および DMA 3000ppm 群の血漿中 DMA 濃度は、それぞれ 0.27 ± 0.26 あるいは $0.49\pm 0.17\mu\text{g/ml}$ であった。一方、DHPN+DMA 300ppm 群の血漿中 DMA 濃度は 10 例中 3 例に $0.04\sim 0.05\mu\text{g/ml}$ と僅かに検出された。

実験II：一般状態では明らかな変化は認められなかったが、雌雄の rash2 および Non-Tg マウスともに DMA 投与群で体重の増加が認められなかった。なお、雄の rash2 マウスの DMA 投与群で実験終了までに 2 匹の動物が死亡した。剖検時、肉眼的に DMA 投与に起因する病変は認められなかった。

残留検査法：トリクラベンダゾールの定量下限は、肝臓、筋肉及び脂肪においてそれぞれ 0.01ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率は平均で 85%以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 5%以内であった。モキシデクチンの定量下限は、筋肉、脂肪、肝臓及び牛乳においてそれぞれ 0.005ppm であった。添加回収試験を行った結果、各試料に対する回収率は平均で 90%以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 5%以内であった。

D. 考察

実験Iでは、DHPN+DMA 3000ppm 群において鼻腔腫瘍の誘発が増強されたことから、DMA に鼻腔腫瘍プロモーション作用が存在することが明確となった。DMA は血流を介して鼻腔組織に高濃度に分布することが報告されていることから、この DMA の鼻腔標的性が鼻腔腫瘍発現に関与しているであろうことが推察されている。今回、DMA を投与した DHPN+DMA 3000ppm 群および DMA 群においては血漿中に DMA が高濃度に検出され、また、組織学的に嗅腺の萎縮ならびに炎症反応がみられたことから、これらの病変が DMA による直接

的な毒性病変と考えられ、この障害の持続により腫瘍誘発が増強されたものと考えられた。しかし、DHPN+XZ 群においては代謝物の DMA は 10 例中 2 例において僅かに検出されたのみであり、また、DMA による毒性病変と思われる鼻腔の病変も認められず、鼻腔腫瘍の増加も認められていないことから XZ が鼻腔腫瘍誘発に対してプロモーターとなり得る可能性は非常に低いものと推察された。一方、今回、DHPN+XZ 群で甲状腺の過形成および腫瘍が有意に増加した。DHPN による甲状腺二段階発癌モデルを用いた実験で甲状腺腫瘍プロモーターである thiourea を反復投与することにより甲状腺に過形成および腫瘍が増加することが報告されている。XZ の代謝物の一つに N-(2,6-dimethylphenyl) thiourea が含まれていることが報告されており、今回の実験で認められた甲状腺の肥大ならびに増殖性病変はこの物質により修飾を受けたものと推察された。

食品の新たな規格基準に対応しうる分析検査方法が国内外において研究されているが、操作性、精度ともに優れた実用的な方法は少ない。今回の検討により、トリクラベンダゾールやモキシデクチンについて実用的な検査方法の開発が可能になったことから、多数の地方衛生研究所、指定検査機関等での規制にこれらが非常に有用なものになると考えられる。また、本研究で確立した残留検査法は、コーデックス委員会の検査法評価基準に適合しており、畜水産食品中の残留動物用医薬品の検査法として実用に適すると

考えられる。

E. 結論

動物用医薬品の残留基準値設定に必要な資料として代謝物の安全性に関する情報が要求されている。今回、家畜の鎮静剤として用いられている xylazine (XZ) およびその代謝物である 2,6-dimethylaniline (DMA) の鼻腔腫瘍プロモーション作用の検討ならびに rash2 マウスを用いた DMA の鼻腔腫瘍誘発の有無の検討を行った。その結果、DMA の鼻腔腫瘍プロモーション作用が示唆されたが XZ においては確認されなかった。一方、XZ には甲状腺腫瘍プロモーション作用があることが明らかとなった。

残留検査法に関しては、FAO/WHO から国際規格として勧告されている各種動物薬については、我が国もそれらの物質についての規格設定が必要であり、今回の動物薬についての分析法の確立はその残留規制を円滑にするものである。

F. 研究発表

投稿論文

T. Koujitani, K. Yasuhara, H. Kobayashi, A. Shimada, H. Onodera, H. Takagi, M. Hirose and K. Mitsumori : Tumor promoting

activity of 2,6-dimethylaniline in a two-stage nasal carcinogenesis model in N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-treated rats. Cancer Letters 1999 in press.

2. 学会発表

糀谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄 : N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN)を用いた二段階発癌モデルにおける 2,6-dimethylaniline のラット鼻腔発癌プロモーション作用の検討. 第 15 回日本毒性病理学会 (1999).

T. Koujitani, K. Mitsumori, K. Yasuhara, H. Kobayashi, H. Onodera, H. Takagi and M. Hirose, : Tumor promoting activity of xylazine and its metabolite, 2,6-dimethylaniline(DMA), in a two-stage nasal carcinogenesis model in rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN). 38th SOT (1999)

糀谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 池田尚子, 今沢孝喜, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄 : DHPN を用いたラット二段階発癌モデルにおける DMA 誘発鼻腔増殖性病変の病理学的検討. 第 127 回日本獣医学会 (1999)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書（平成 10 年度）

畜水産食品中の化学物質残留防止対策に関する研究

—残留動物用医薬品に関する情報収集—

分担研究者 三森国敏 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨

2,6-dimethylaniline (DMA) はラット鼻粘膜に高濃度に分布し、鼻腔腫瘍を誘発することが報告されている。一方、DMA は家畜の鎮静剤として用いられている α_2 アドレナリン受容体刺激剤 xylazine (XZ) の代謝物でもあることから、畜産食品中に残留することによるヒトへの影響が懸念されている。本年度は、この XZ ないし DMA に鼻腔腫瘍プロモーション作用が存在するか否かを検討するための実験を行った。実験 I : 鼻腔腫瘍プロモーション作用を明らかにするために発癌物質である N-bis (2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) 2400 mg/kg をイニシエーターとしてラットに単回投与後、1000ppm XZ ないし 300 あるいは 3000ppm DMA 混餌飼料を 52 週間にわたり投与した。DHPN+DMA 3000ppm 群では鼻腔に対して発癌プロモーション作用が認められたが、その他の群では認められなかった。一方、DHPN+XZ 群では甲状腺に対し発癌プロモーション作用を示す成績が得られた。実験 II : DMA の発癌性の有無を、短期発癌試験系の動物モデルとして遺伝毒性発癌物質の検出に非常に感受性が高いことが示されているヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (rash2 マウス) に DMA 3000ppm 混餌飼料を 26 週間自由に摂取させる実験を継続中である。

A. 研究目的

国際食糧農業機関 (FAO) と世界保健機構 (WHO) 合同食品規格委員会では、畜産食品中に残留する動物用医薬品および抽出困難なそれらの結合型残留物や代謝物の毒性学的な評価を含めた新しい評価法に基づく残留基準値 (MRL) の策定が進行中である。我国においてもこの FAO/WHO の勧告を考慮し、輸入食品に含まれるこれらの動物用医薬品についての残留基準値の設定作業が進められている。

動物用医薬品の食品内残留基準値の設定上、最も重要かつ問題となる点としては、畜産物中に残留する代謝物や結合型残留物の安全性が全て明確にされていないことがあげられ、 α_2 アドレナリン受容体刺激剤である xylazine (XZ) は動物の輸送時における鎮静剤として国際的に

汎用されているが、その代謝物の 2,6-dimethylaniline (DMA) はラットの鼻腔に対して発癌性を示し¹⁾、畜産食品中への残留によるヒトへの影響が懸念されていることから、XZ の国際基準の策定は未だなされていない²⁾。この食品中の安全性確保のために、本年度は、XZ および DMA の鼻腔腫瘍プロモーション作用の有無を明確にすることを目的として以下の実験を行った。

また、ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (Tg マウス) は短期間の被験物質投与により遺伝毒性発がん物質の検出に非常に感受性が高いことが示されていることから、本年度は、DMA の発がん性の有無をこれらの動物を用いて検討した。

B. 研究方法

1. 被験物質

XZ は水溶性の白色結晶性粉末である塩酸塩 (Sigma, Fig.1) を使用した。DMA (和光純薬、Fig.1) は茶褐色粘性の液体で水、有機溶剤に不溶であった。N-bis (2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) はナカライテスクの製品を用いた (Fig.1)。

2. 動物および飼育条件

ラットは日本チャールスリバー (厚木) より 4 週齢の雄 F344/DuCrj ラットを購入し、1 週間の順化飼育後実験に供した。マウスは (財) 実験動物中央研究所 (川崎) より 8 週齢の雌雄のヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したトランスジェニック (rasH2) CB6F1 マウスおよび同腹仔の非導入野生型 (Non-Tg) CB6F1 マウスを購入し、1 週間の順化飼育後実験に供した。

飼料はオエンタル酵母 (東京) の CRF-1 粉末飼料を使用し、飲料水は水道水を自由に与えた。動物は室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時間、12 時間照明/消灯に設定されたバリアーシステム下の動物飼育室で飼育した。

3. 投与量および投与方法

実験 I : XZ および DMA に鼻腔腫瘍プロモーション作用が存在するか否かを明らかにするため、5 週齢の雄性 F344 ラット 120 匹を 2 群に分け 85 匹に遺伝毒性発癌物質である DHPN^{3,4,5)} 2400 mg/kg をイニシエーターとして背部皮下に単回投与した。35 匹には溶媒の生理食塩水を同様に投与した。DHPN あるいは溶媒投与後 1 週に、DHPN を投与した動物をさらに 4 群に分け、XZ 1000ppm (20 匹)、DMA 300 (15 匹) あるいは 3000ppm (30 匹) 混餌飼料を、また、一群 (20 匹) には基礎飼料のみを 52 週間にわたり自由に摂取させた。溶媒を投与した動物もさらに 3 群に分け XZ 1000ppm (10 匹) あるいは DMA 3000ppm (15 匹) 混餌飼料を、また、一群 (10 匹) には基礎飼料のみを同様に自由に摂取さ

せた (Fig.2)。

実験 II : DMA の発癌性の有無を解明するために、9 週齢の雌雄の rasH2 あるいは Non-Tg マウスをそれぞれ 2 群に分け、一方には DMA 3000 ppm 混餌飼料 (rasH2 および Non-Tg : 雄各 16 匹、雌各 18 匹) あるいは基礎飼料 (rasH2 および Non-Tg : 雄雌各 10 匹) を 26 週間自由に摂取させた (Fig.3)。

4. 観察方法

一般状態観察

実験 I ~ II とともに毎日一般状態の観察を行うとともに、毎週 1 回あるいは 2 週に 1 回体重測定を行った。

病理組織学的観察

実験 I : 実験開始 53 週に生存動物をエーテル麻酔下に放血屠殺し、鼻腔を採取、鼻腔内にホルマリを注入した後、ホルマリン液に浸漬固定した。途中死亡動物および瀕死動物においても発見後速やかに鼻腔を採取し、同様にホルマリン液に浸漬固定した。固定後、鼻腔を 5% ギ酸により脱灰、長野らの方法⁶⁾により採切し、常法に従いパラフィンに包埋した。鼻腔横断面の薄切標本について H-E 染色を施し、病理組織学的に観察を行った。また、心、肺、肝、腎、脾、下垂体、甲状腺および副腎を採取、ホルマリン液に浸漬固定した後、H-E 染色を施し、病理組織学的に観察を行った。

実験 II : 実験開始 26 週に生存動物をエーテル麻酔下に放血屠殺し、鼻腔、脳、唾液腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、下垂体、甲状腺、副腎、舌、胃、十二指腸、小腸、大腸、膀胱、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、骨格筋、脊髄、リンパ節、胸骨、大腿骨、眼球、皮膚および肉眼的に変化が認められた器官・組織を採取しホルマリン液に浸漬固定した。鼻腔においては鼻腔内にホルマリを注入した後、ホルマリン液に浸漬固定した。途中死亡動物および瀕死動物においても発見後速やかに各臓器・組織を採取し、同様にホルマリン液に浸漬

固定した。なお、現在、組織標本を作製中である。

血漿中 XZ および DMA 濃度測定

実験 I について 53 週時に各群 10 匹からエーテル麻酔下に血液を採取、EDTA-2K (和光純薬) 処置により血漿を分離し、C18 ミニカラム (Varian) で精製した後、XZ および DMA 濃度を高性能液体クロマトグラフ (LC-6A、島津製作所) により 230nm で測定した。

C. 研究結果

実験 I : 一般状態では、DHPN+DMA 3000ppm 群で 40 週より自発運動の減少ならびに鼻部の隆起が 3 例に認められ、53 週までに 4 例の動物が鼻腔腫瘍により瀕死ないし死亡した。また、DHPN 群および DHPN+XZ 群で各 1 例、DHPN+DMA 300ppm 群では 3 例の動物が瀕死ないし死亡した。

体重では、対照群ないし DHPN 群に比べて DMA 3000ppm 群ないし DHPN+DMA 3000ppm 群で軽度増加抑制が認められた (Fig. 4)。

病理組織学的観察では、嗅腺の萎縮および背鼻道部への好中球浸潤が DMA を投与した DHPN+DMA および DMA 群でほとんどの動物に認められた (Table 1)。また、鼻腔においては鼻腔上皮細胞の過形成、嗅上皮粘膜下に好塩基細胞の集簇よりなる異形成巣、腺腫、腺癌および扁平上皮癌などがイニシエーション処置をした群で多数認められたが、上皮の過形成のみ DMA 群においても僅かに認められた (Table 1)。なお、異形成巣および腺癌の発生頻度は DHPN 群に比し DHPN+DMA 3000ppm 群で有意に増加した (Table 1)。しかし、DHPN+DMA 300ppm 群および DHPN+XZ 群においては、DHPN 群との間に明らかな差を認めなかった (Table 1)。

また、甲状腺濾胞上皮の過形成が DHPN 群および DHPN+DMA 各群に、さらに、甲状腺濾胞上皮の過形成および腺腫あるいは腺癌が XZ 群および DHPN+XZ 群で認められ、DHPN+XZ 群で誘発された甲状腺濾胞上皮の

増殖性病変は DHPN 群に比し有意に増加した (Table 2)。

血漿中 XZ および DMA の濃度測定では、XZ 群における親化合物 XZ および代謝物 DMA 濃度は検出限界値 ($0.02 \mu\text{g/ml}$) あるいは検出限界値以下 ($<0.02 \mu\text{g/ml}$) であった。DHPN+XZ 群では XZ 濃度は検出限界値 ($0.02 \mu\text{g/ml}$) あるいは検出限界値以下 ($<0.02 \mu\text{g/ml}$) であったが、DMA 濃度は 10 例中 2 例に $0.04 \sim 0.06 \mu\text{g/ml}$ と僅かに代謝物が検出された (Tables 3)。DHPN+DMA 3000ppm 群および DMA 3000ppm 群の血漿中 DMA 濃度は、それぞれ 0.27 ± 0.26 あるいは $0.49 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$ であった (Tables 4)。一方、DHPN+DMA 300ppm 群の血漿中 DMA 濃度は 10 例中 3 例に $0.04 \sim 0.05 \mu\text{g/ml}$ と僅かに検出された (Table 4)。

実験 II : 一般状態では明らかな変化は認められなかったが、雌雄の rash2 および Non-Tg マウスともに DMA 投与群で体重の増加が認められなかった (Fig. 5, 6)。なお、雄の rash2 マウスの DMA 投与群で実験終了までに 2 匹の動物が死亡した。

剖検時、肉眼的に DMA 投与に起因する病変は認められなかった。

D. 考察

実験 I では、DHPN+DMA 3000ppm 群において鼻腔腫瘍の誘発が増強されたことから、DMA に鼻腔腫瘍プロモーション作用が存在することが明確となった。DMA は血流を介して鼻腔組織に高濃度に分布することが報告されていることから、この DMA の鼻腔標的性が鼻腔腫瘍発現に関与しているであろうことが推察されている¹⁾。今回、DMA を投与した DHPN+DMA 3000ppm 群および DMA 群においては血漿中に DMA が高濃度に検出され、また、組織学的に嗅腺の萎縮ならびに炎症反応がみられたことから、これらの病変が DMA による直接的な毒性病変と考えられ、この障害の持続により腫瘍誘発が増強されたものと考えられた。しかし、DHPN+XZ 群において

は代謝物の DMA は 10 例中 2 例において僅かに検出されたのみであり、また、DMA による毒性病変と思われる鼻腔の病変も認められず、鼻腔腫瘍の増加も認められていないことから XZ が鼻腔腫瘍誘発に対してプロモーターとなり得る可能性は非常に低いものと推察された。一方、今回、XZ 群で甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が、さらに、DHPN+XZ 群で甲状腺の過形成および腫瘍が有意に増加した。DHPN による甲状腺二段階発癌モデルを用いた実験で甲状腺腫瘍プロモーターである thiourea を反復投与することにより甲状腺に過形成および腫瘍が増加することが報告されている⁷⁾。XZ の代謝物の一つに N-(2,6-dimethylphenyl) thiourea が含まれていることが報告されており⁸⁾、今回の実験で認められた甲状腺の肥大ならびに増殖性病変はこの物質により修飾を受けたものと推察された。

引用文献

1. National Toxicology Program Technical Report Series No. 278 (1990), Toxicology and carcinogenesis studies of 2,6-xylidine in Charles River CD rats, U.S. Department of Health and Human Services.
2. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, WHO food additives series 38. Pp. 45-75 (1996), World Health Organization, Geneva.
3. H. Yamazaki, Y. Mori, K. Toyoshi, H. Mori, S. Sugie, N. Yoshimi and Y. Konishi : Genotoxicity of carcinogenic N-nitrosopropylamine derivatives in the hepatocyte primary culture/DNA-repair test. *Mut. Res.* 144, 197-202 (1985).
4. H. Kitada, M. Tsutsumi, T. Tsujiuchi, M. Takahama, T. Fukuda, N. Narita and Y. Konishi : Frequent mutations

of Ki-ras but not mutations of Ha-ras and p53 in lung lesions induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Mol. Carcinog.* 15, 276-283 (1996).

5. U. Mohr, G. Reznik and P. Pour : Carcinogenic effects of diisopropanolnitrosamine in Sprague-Dawley rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 361-366 (1977).
6. 長野嘉介, 榎本眞, 山内勝彦, 相磯成敏, 片桐卓, 松本道男 : 上気道病変. *J. Toxicol. Pathol.* 1, 115-127 (1988).
7. T. Shimo, K. Mitsumori, H. Onodera, K. Yasuhara, M. Takahashi, M. Takahashi, Y. Ueno and Y. Hayashi : Time course observation of thyroid proliferative lesions and serum TSH levels in rats treated with thiourea after DHPN initiation. *Cancer Letters* 85, 141-149 (1994)
8. A.E. Mutlib, Y.C. Chui, L.M. Young and F.S. Abbott : Characterization of metabolites of xylazine produced in vivo and in vitro by LC/MS/MS and by GC/MS. *Drug Metab. Dispos.* 20, 840-848 (1992)

E. 結論

動物用医薬品の残留基準値設定に必要な資料として代謝物の安全性に関する情報も要求されている。今回、家畜の鎮静剤として用いられている xylazine (XZ) およびその代謝物である 2,6-dimethylaniline (DMA) の鼻腔腫瘍プロモーション作用の検討ならびに *rash2* マウスを用いた DMA の鼻腔腫瘍誘発の有無の検討を行った。その結果、DMA の鼻腔腫瘍プロモーション作用が示唆されたが XZ においては確認されなかった。一方、XZ には甲状腺腫瘍プロモーション作用があることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 投稿論文

T. Koujitani, K. Yasuhara, H. Kobayashi, A. Shimada, H. Onodera, H. Takagi, M. Hirose and K. Mitsumori : Tumor promoting activity of 2,6-dimethylaniline in a two-stage nasal carcinogenesis model in N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-treated rats. Cancer Letters 1999 in press.

2. 学会発表

糺谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄 : N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN)を用いた二段階発癌モデルにおける 2,6-dimethylaniline のラット鼻腔発癌プロモ

ーション作用の検討. 第 15 回日本毒性病理学会 (1999).

T. Koujitani, K. Mitsumori, K. Yasuhara, H. Kobayashi, H. Onodera, H. Takagi and M. Hirose, : Tumor promoting activity of xylazine and its metabolite, 2,6-dimethylaniline(DMA), in a two-stage nasal carcinogenesis model in rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN). 38th SOT (1999)

糺谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 池田尚子, 今沢孝喜, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄 : DHPN を用いたラット二段階発癌モデルにおける DMA 誘発鼻腔増殖性病変の病理学的検討. 第 127 回日本獣医学会 (1999).

Table 1 Incidences of nasal lesions in rats fed diet containing XZ or DMA for 52 weeks with or without DHPN initiation (Exp. I)

Groups	DHPN	DHPN + XZ 1000ppm	DHPN + DMA 3000ppm	DHPN + DMA 300ppm	XZ 1000ppm	DMA 3000ppm	Cont.
No. of animals examined	20	20	30	20	10	15	10
Non-proliferative lesions							
Atrophy of Bowman's gland	0	0	30 ^a (100)	0	0	15 (100)	0
Inflammation in dorsal meatus	0	0	30 (100)	0	0	14 (93)	0
Proliferative lesions							
Epithelial hyperplasia	18 (90)	18 (90)	30 (100)	20 (100)	0	3 (20)	0
Dysplastic focus	1 (5)	2 (10)	10 (33) ^b	2 (10)	0	0 (0)	0
Adenoma	4 (20)	5 (25)	8 (27)	4 (20)	0	0 (0)	0
Adenocarcinoma	1 (5)	2 (10)	10 (33) ^b	1 (5)	0	0 (0)	0
Squamous cell carcinoma	0 (0)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	0
No. of animals with tumor	4 (20)	6 (30)	16 (53) ^b	5 (25)	0	0 (0)	0

a : Number of animals with lesions (%).

b : Significantly different from the DHPN group (Fisher's exact test, p<0.05).

Table 2 Incidence of thyroid lesions in rats fed diet containing XZ or DMA for 52 weeks with or without DHPN initiation (Exp. I)

	DHPN	DHPN + DMA 3000ppm		DHPN + DMA 300ppm		DHPN + XZ 1000ppm		DMA 3000ppm		XZ 1000ppm		Cont.
		20	30	20	20	20	20	15	10	10	10	
No. of animals examined	20	30	20	20	20	20	15	10	10	10	10	
Follicular cell hyperplasia(focal) cystic type	8 (40)	14 (47) ^a	8 (40)	20 (100) ^b	20 (100) ^b	2 (20)	0 (0)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Follicular cell adenoma	0 (0)	0 (0)	0 (0)	12 (60) ^b	12 (60) ^b	1 (10)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Follicular cell carcinoma	0 (0)	0 (0)	1 (5)	5 (25) ^c	5 (25) ^c	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Follicular cell hypertrophy(diffuse)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (100) ^b	20 (100) ^b	10 (100) ^d	0 (0)	10 (100) ^d	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
C cell hyperplasia(focal)	4 (20)	5 (17)	6 (30)	2 (10)	2 (10)	1 (10)	3 (20)	1 (10)	3 (20)	1 (10)	3 (30)	
C cell adenoma	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

a : Number of animals with lesions (%).

b, c : Significantly different from the DHPN group (Fisher's exact test. $p < 0.01$, $p < 0.05$).

d : Significantly different from the Cont. group (fisher's exact test, $p < 0.01$).

Table 3 Plasma concentrations of XZ and its metabolite DMA in rats fed diet containing XZ for 52 weeks with or without DHPN initiation (Exp. I)

Groups	DHPN	DHPN + XZ	XZ	Cont.
No. of animals examined	10	10	10	10
Analytical chemicals	XZ/DMA	XZ DMA	XZ DMA	XZ/DMA
Concentration (µg/ml)	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	0.04	<0.02	<0.02
	<0.02	<0.02	0.02	<0.02
	<0.02	<0.02	0.02	<0.02
	<0.02	0.06	<0.02	<0.02
	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02

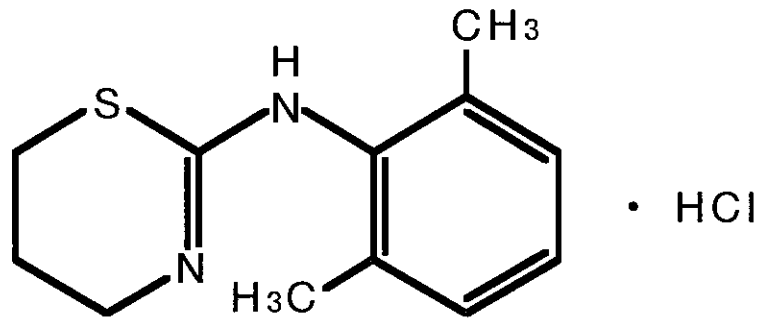
<0.02 : below the detection limit.

Table 4 Plasma concentrations of DMA in rats fed diet containing DMA for 52 weeks with or without DHPN initiation (Exp. I)

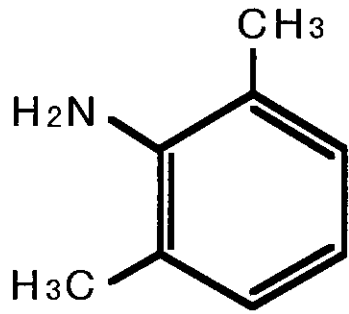
Groups	DHPN +DMA 3000ppm		DHPN +DMA 300ppm		DMA 3000ppm		Cont.
	10	10	10	10	10	10	
No. of animals examined	10	10	10	10	10	10	10
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	<0.02	0.57	0.04	0.78	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	0.47	<0.02	0.71	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	0.75	<0.02	0.41	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	0.10	0.05	0.44	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	0.40	<0.02	0.64	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	0.02	<0.02	0.41	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	0.03	0.02	0.31	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	0.13	0.02	0.51	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	0.05	0.04	0.27	<0.02	<0.02	<0.02
	<0.02	0.20	<0.02	0.40	<0.02	<0.02	<0.02
Average \pm SD	<0.02	0.27 \pm 0.26	\leq 0.02	0.49 \pm 0.17	<0.02	<0.02	<0.02

<0.02 : below the detection limit.

Xylazine hydrochloride



2, 6-Dimethylaniline (DMA : metabolite of xylazine)



N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)

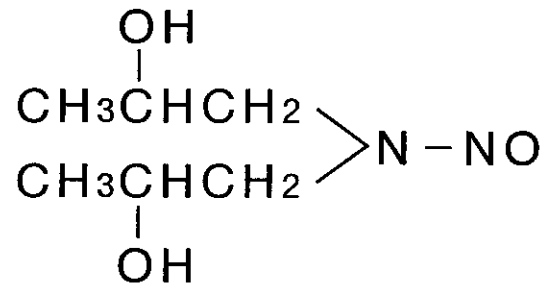
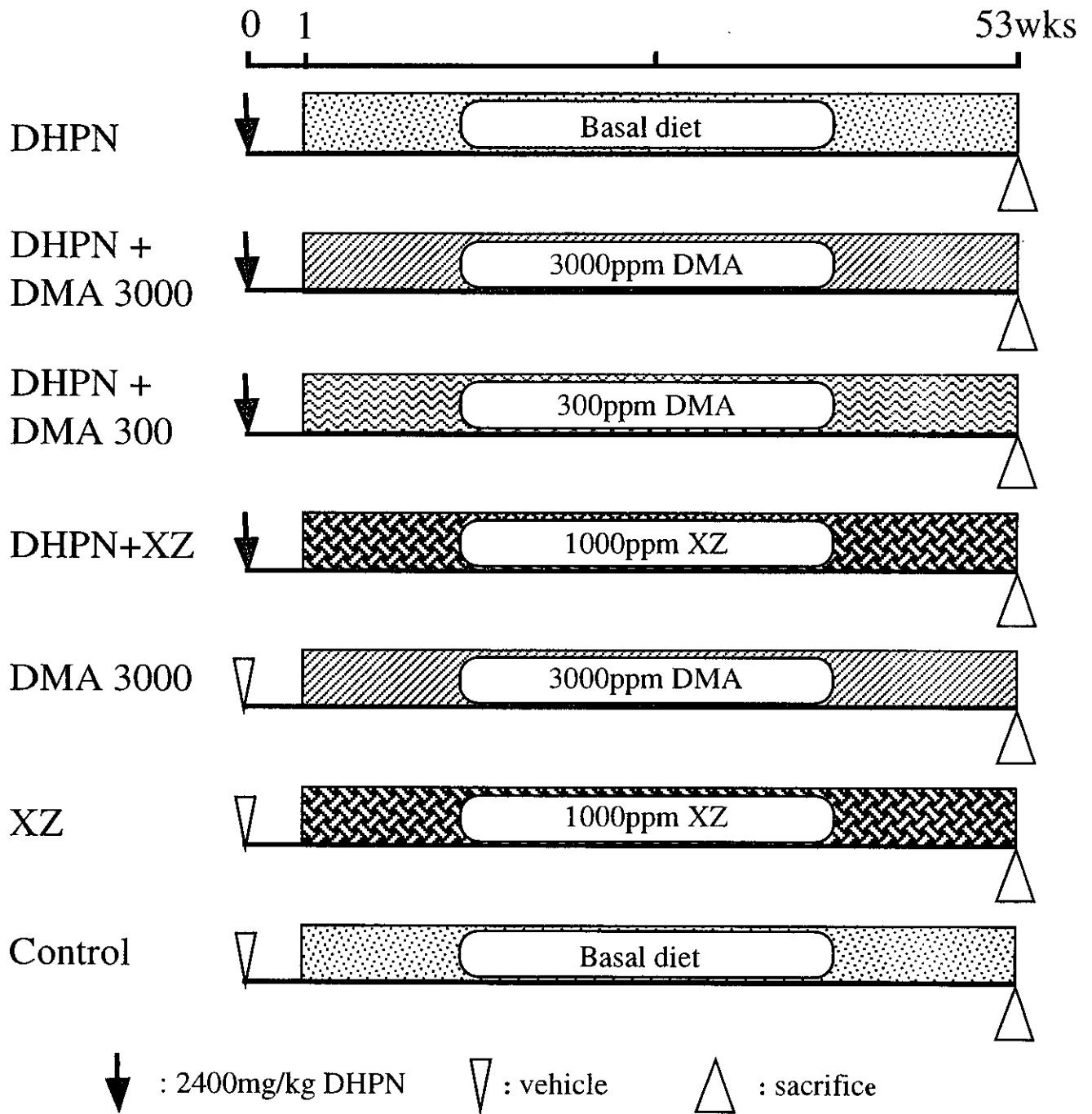


Fig. 1. Chemical structure of xylazine hydrochloride, DMA and DHPN.

Exp. I : Two-stage carcinogenicity study in rats



DHPN : N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine.
 DMA : 2, 6-dimethylaniline.
 XZ : xylazine hydrochloride.

Fig. 2 Experimental design of Exp. I

Exp. II : 26-week feeding study of DMA in rasH2 and Non-Tg mice

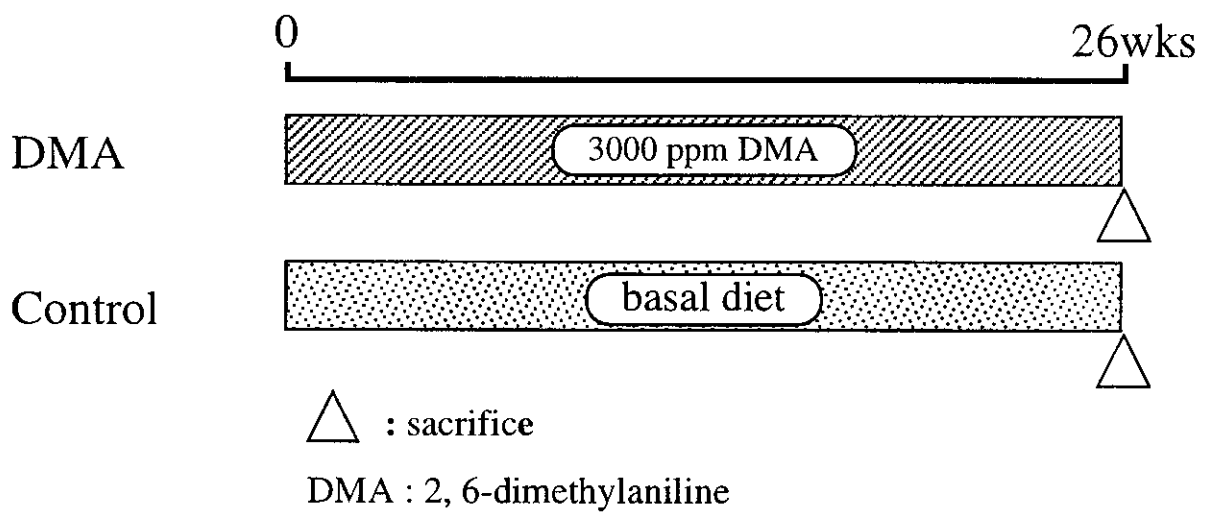


Fig. 3 Experimental design of Exp. II

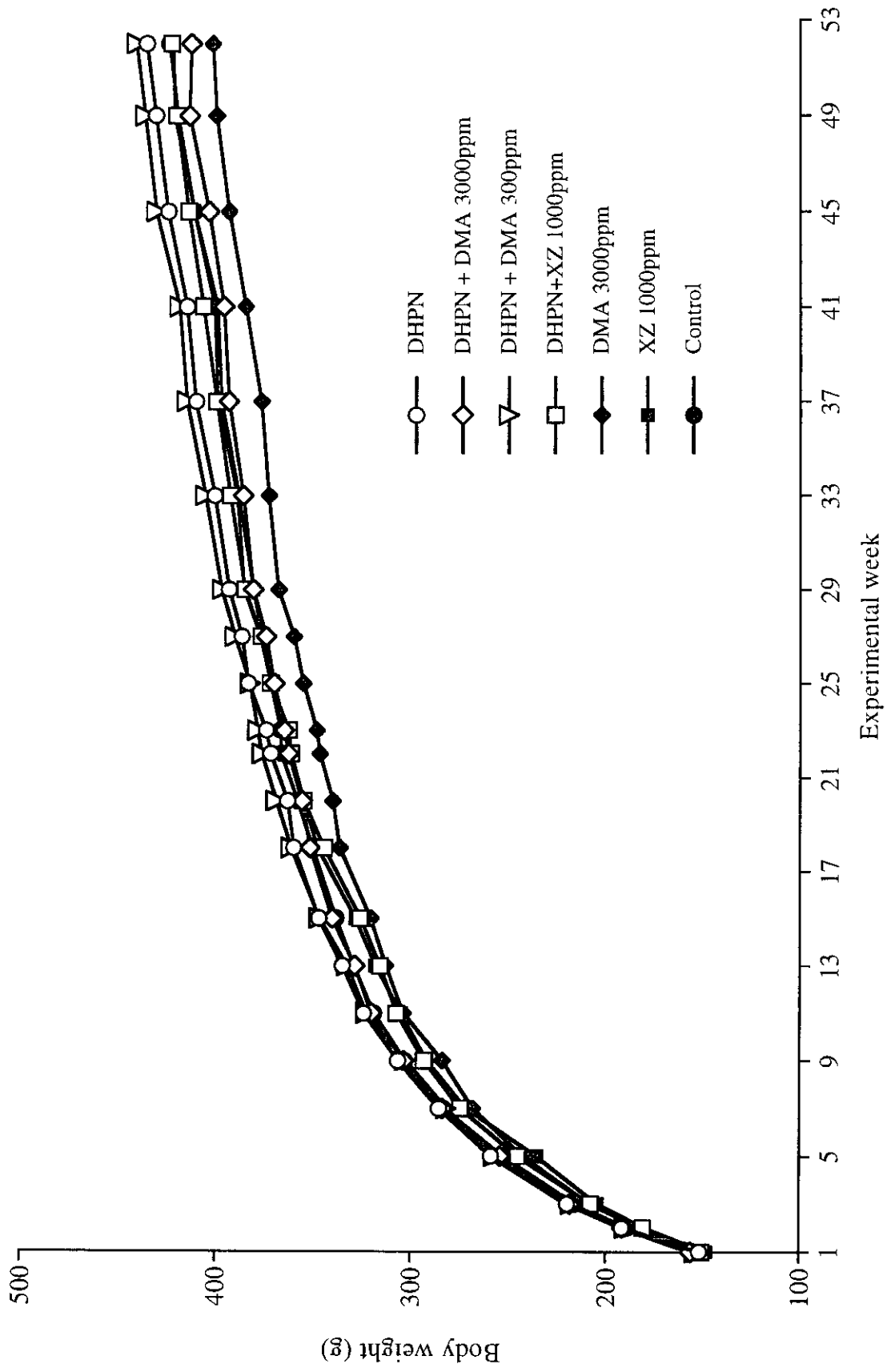


Fig. 4 Body weight curve in male rats treated with XZ or DMA after DHPN initiation (Exp. I)

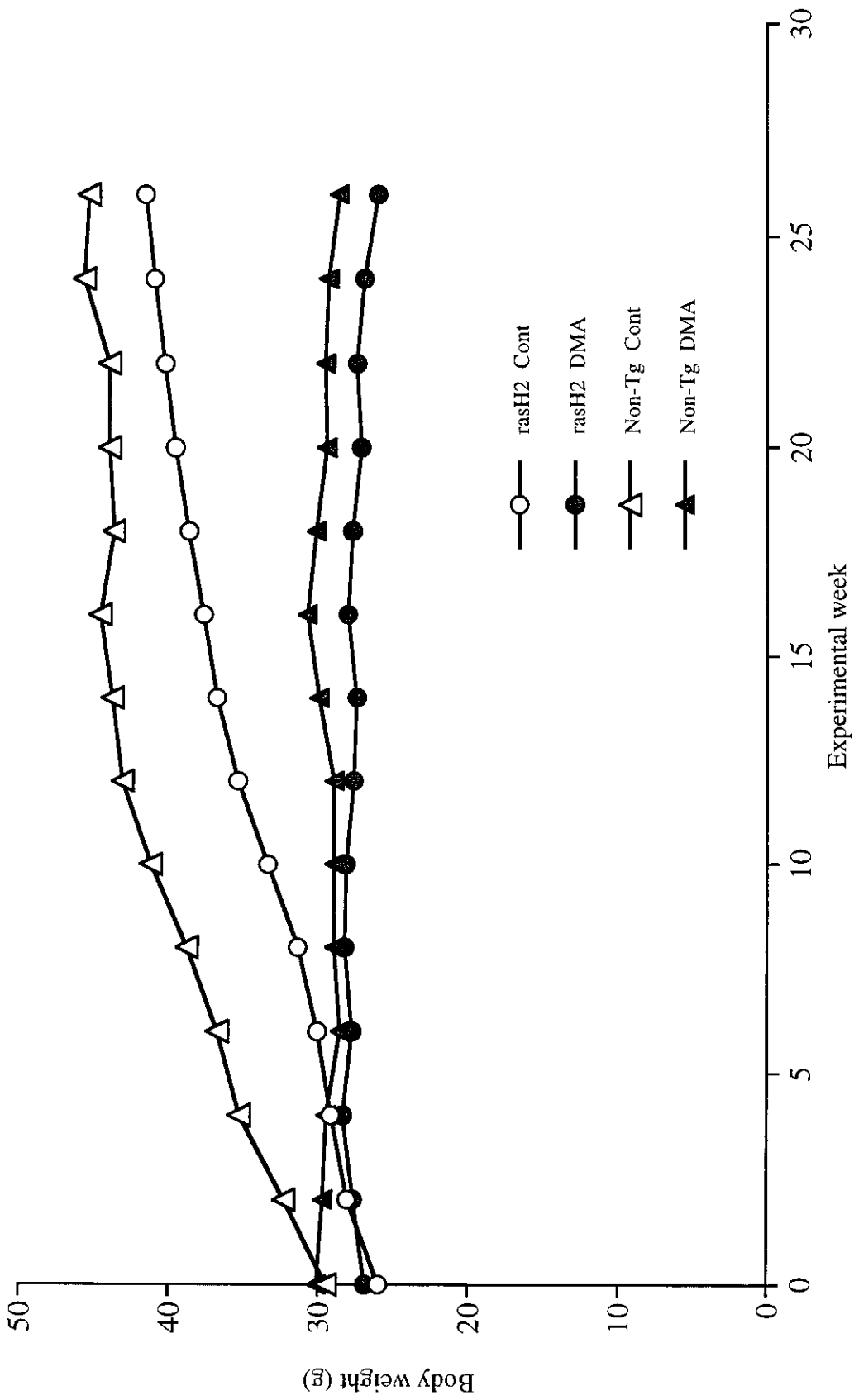


Fig. 5 Body weight curve in rasH2 or Non-Tg male mice treated with DMA for 26 weeks (Exp. II)