

19990648

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 11 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 11 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

家畜の鎮静剤キシラジン (XZ) の代謝物である 2,6-ジメチルアニリン(DMA)はラットの鼻腔に対して発癌性を示すことから、XZ と DMA について 1 年間のラット二段階発癌実験を行った結果、DMA は鼻腔に対して発癌プロモーション作用を示したが、XZ では甲状腺に対して発癌プロモーション作用を示す成績が得られた。本年度は、この DMA の発癌プロモーションメカニズムを検討するため、ジイソプロパノールニトロソアミン (DHPN) でイニシエーション後 3000 ppm の DMA を 52 週間ラットに混餌投与した。その結果、ボウマン腺が DMA の標的組織であり、DHPN でイニシエーションされたその組織にボウマン腺由来の鼻腔腫瘍が誘発されることを見出した。また、XZ の発癌プロモーションメカニズムを解明するため、ラットに 1000 ppm の XZ を 4 週間混餌投与した結果、XZ の甲状腺プロモーション作用は血中 T4 の減少に基づく TSH の上昇に起因することが明らかとなった。さらに、XZ の甲状腺ヨウ素取り込みないし有機化阻害の有無を検討するため、ラットに 1000 ppm の XZ を混餌投与し、投与 7、14 日目にヨウ素を腹腔内に投与した結果、T4 の減少は甲状腺へのヨウ素取り込みないし有機化阻害に起因することが示唆された。

遺伝毒性発がん物質に著しく感受性が高いヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニックマウス(rash2 マウス)を用いて DMA を 26 週間反復投与した結果、何等発癌性は認められなかった。

抗生物質のオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの残留検査法を検討した。定量下限はオキシテトラサイクリン、テトラサイクリンが 0.02 ppm、クロルテトラサイクリンが 0.03 ppm であった。各試料に対する回収率は平均で 75~100%であり、相対標準偏差はいずれの試料も 5%以内であった。抗コクシジウム剤のジクラズリル及びナイカルバジンの残留検査法を検討した。定量下限はジクラズリル 0.1 ppm、ナイカルバジン 0.02 ppm であった。各試料に対する回収率は平均で 80%以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 3%以内であった。本研究で確立した残留検査法は、5 試験研究機関による標準化の結果、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評価された。

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。我々は DMA と XZ について 1 年間のラット鼻腔および甲状腺二段階発癌実験を行った結果、DMA は鼻腔に対して発癌プロモーション作用を示したが、XZ では甲状腺に対して発癌プロモーション作用を示す成績が得られた。本年度は、ラットにおける DMA の鼻腔発癌プロモーションメカニズムおよび XZ の甲状腺発癌プロモーションメカニズムを解明することを目的とした。

また、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 遺伝子導入トランスジェニックマウス (rasH2 マウス) を用いてこのマウスが DMA に対して発癌感受性を示すか否かを検討した。

平成 7 年 12 月、平成 9 年 3 月、平成 11 年 11 月に食品衛生法が改正され、計 15 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 5 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。本年度は、新たに諮問された 5 品目の動物用医薬品、抗生物質のオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン、抗コクシジウム剤のジクラズリル及びナイカルバジンについて残留検査法を検討した。

B. 研究方法

実験 I : DMA の鼻腔発癌プロモーションメカニズムを解明するため、雄 F344 ラッ

トにイニシエーターとして 2400 mg/kg の DHPN を背部皮下に単回投与した。投与 1 週より鼻腔発癌量である DMA 3000ppm 混餌飼料を 52 週間自由に摂取させた。DMA 投与 4、13、26 および 52 週に動物を放血屠殺し、鼻腔横断面の薄切標本について病理組織学的観察を行った。また、一部の鼻腔組織について電子顕微鏡により超微形態学的に観察を行った。

実験 II : XZ の甲状腺発癌プロモーションメカニズムの解明を目的として血清甲状腺関連ホルモン濃度の測定を行うために、雄 F344 ラットを 2 群に分け、一方には基礎飼料、他方には XZ の最大耐量である 1000ppm 混餌飼料を 4 週間自由に摂取させた。実験開始 1、2、4 週に動物を剖検し、甲状腺、下垂体および肝臓を摘出、臓器重量を測定すると共に、血清について甲状腺関連ホルモン T3、T4 および TSH 濃度を測定した。

実験 III : XZ の甲状腺発癌プロモーションメカニズム解明のため甲状腺におけるヨウ素の取り込みと有機化率を測定するために、雄 F344 ラットを 2 群に分け、一方には基礎飼料、他方には XZ 1000ppm 混餌飼料を 2 週間自由に摂取させた。投与開始 7 日および 14 日に、対照群および XZ 群各 10 匹に Na^{125}I を 0.4 ml/rat 腹腔内に投与した。 Na^{125}I 投与 24 時間後に致死させ、甲状腺を摘出してガンマカウンターで甲状腺全体の放射エネルギーを測定し、ヨウ素の取り込み量と有機化率を測定した。

実験 IV : 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。実験開始 26 週に生存動物を屠殺し、諸臓器をホルマリン液に浸漬固定し、病理組織学的に観察を行った。

残留検査法 : 既にオキシテトラサイクリンに対する残留基準値が設けられ、試

験法が規定されているが、コーデックス委員会においてオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンに対するグループADIが設定されたのを受けて、これら3種類の分別定量法を検討した。また、既に規定されているオキシテトラサイクリン試験法では、クロルテトラサイクリンの定量下限が不十分であるため、改良を試みた。オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの標準品をそれぞれリン酸緩衝液に溶解し、検量線作成用標準溶液とした。検量線作成用標準溶液及び試験溶液のそれぞれ20 mlをHPLCにより測定し、ピーク面積による絶対検量線法により定量した。

ナイカルバジンの検査法としては、既に合成抗菌剤の一斉分析法（厚生省生活衛生局監修：「食品衛生検査指針追補I」、（社）日本食品衛生協会、pp.314~329、1993）があるので、これを基にしてジクラズリル及びナイカルバジンの検査法としての最適化を試みた。ジクラズリル標準品は、*N,N*-ジメチルホルムアミド及びメタノールに、ナイカルバジンは、*N,N*-ジメチルホルムアミド及びアセトニトリルに溶解した後、それぞれメタノールで適宜希釈して、検量線作成用標準溶液とした。検量線作成用標準溶液及び試験溶液のそれぞれ10 mlをHPLCにより測定し、ピーク面積による絶対検量線法により定量した。

C. 研究結果

実験I：光顕的には、DHPN 単回投与後DMA 投与により鼻腔の嗅上皮粘膜部に病変が認められた。DMA 投与4週より、ボウマン腺の萎縮、嗅上皮の配列不整がみられ、13週ではボウマン腺の拡張および増殖、嗅

上皮細胞の変性および未分化嗅上皮細胞の増殖も認められた。26週では、さらに嗅上皮の過形成、異形成巣および腺腫も認められ、52週では癌も認められた。癌の電顕観察では、腫瘍細胞間にデスマゾームがみられ、その細胞質内に正常のボウマン腺の分泌顆粒に酷似する分泌顆粒がみられた。腫瘍細胞からなる腺管構造の外側には基底膜構造も認められた。管腔を形成する腫瘍細胞は微絨毛を持ち、分泌顆粒も多数認められた。

実験II：臓器重量（比重量）では、XZ群で甲状腺および肝臓とも対照群に比し1、2、4週とも有意に増加した。血清T3は1週で有意に減少したが、T4は1、2、4週とも有意に減少した。TSHは1週時のみ有意に増加した。

実験III：甲状腺重量は1、2週とも有意に増加した。ヨウ素の取り込みならびに有機化率は1週で減少傾向、2週では有意に減少した。

実験IV：雄 *rasH2* マウスのDMA群で実験終了までに2匹の動物が切迫殺あるいは死亡した。病理組織学的には、対照群を含む雌雄の *rasH2* マウスに散発的に腫瘍がみられたが、DMA投与による増殖性病変の誘発は雌雄の *rasH2* および Non-Tg マウスともに認められなかった。DMAを投与した全動物に非腫瘍性病変として背鼻道部鼻腔粘膜を中心に嗅上皮の萎縮、配列不整、呼吸上皮化生が、嗅上皮基部には好酸性細胞の集簇が散発的に認められた。また、嗅腺の萎縮/消失および腺管の増生ならびに拡張が認められ、これらの腺管には呼吸上皮化生を伴うものも認められた。更に、嗅神経束の萎縮/消失が認められた。これらの病変の程度は雌雄とも Non-Tg マウスに比べ *rasH2* マウスで重篤であった。

残留検査法：既に規定されているオキシテトラサイクリン試験法では、検体10gを抽出用緩衝液100 mlでホモジナイズし、その50 mlを精製、濃縮して最終的な試験溶液2.5 mlを得ているが、定量下限

を引き下げるために、濃縮率を2.5倍に上げた。本調製法により、既法の精製効率を損なうことなく定量下限を改良することができた。鶏の筋肉、肝臓、鶏卵、エビ、牛乳に対する添加回収試験の結果は、鶏の筋肉に0.2 ppm添加の時、回収率がオキシテトラサイクリン94~98%、クロルテトラサイクリン75~80%、テトラサイクリン88~90%、肝臓に0.6 ppm添加の時、オキシテトラサイクリン100~105%、クロルテトラサイクリン85~88%、テトラサイクリン87~90%であり、相対標準偏差は1~5% (n=3)であった。本法による定量下限はオキシテトラサイクリン、テトラサイクリンが0.02 ppm、クロルテトラサイクリンが0.03 ppmであり、残留基準値の1/60~1/3であった。

ジクラズリル、ナイカルバジン共に水にほとんど溶けない化合物であるため、負荷時の溶液を50 mMリン酸一ナトリウム-メタノール (4:1) とする事により回収率を上げることができた。また、溶出液には水-メタノール (1:4) を用い、脂質等の溶出を防いだ。これによりジクラズリル及びナイカルバジンの回収率を上げると共に、十分な精製効果を得ることができた。鶏の筋肉、肝臓に対する添加回収試験の結果は、ジクラズリルが筋肉に0.5 ppm添加のとき回収率76-83%、肝臓に3 ppm添加のとき86-92%、ナイカルバジンが筋肉に0.2 ppm添加のとき回収率81-85%、肝臓に0.2 ppm添加のとき81-96%であり、相対標準偏差は1~3% (n=3)であった。本法による定量下限はジクラズリル0.1 ppm、ナイカルバジン0.02 ppmであり、残留基準値の1/30~1/5であった。

D. 考察

実験 I では、病変は主に鼻腔嗅上皮粘膜

に認められた。DMA 投与初期の4週より、高度なボウマン腺の萎縮と嗅上皮の配列不整、続いてボウマン腺の拡張および増殖、嗅上皮の変性および未分化嗅上皮細胞の増殖、さらに、嗅上皮の過形成、異形成巣、腺腫および癌が認められた。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おり、実験 I の成績から、嗅上皮粘膜のボウマン腺がDMAの標的部位であることが示唆された。また、嗅上皮の配列不整、変性および未分化嗅上皮細胞の増殖などの病変はボウマン腺の萎縮に続いてみられており、ボウマン腺の変性・壊死に続発して嗅上皮の変性が生じるとの報告もあることから、嗅上皮に生じる病変はボウマン腺の変化に続く二次的な変化であると推察された。さらに、超微形態学的観察では、癌は腺様増殖を示し、基底膜構造、細胞間のデスモゾームおよび管腔側に微絨毛が確認されたことから、本腫瘍が上皮性腫瘍であると考えられた。また、正常のボウマン腺細胞にみられる分泌顆粒に酷似した分泌顆粒が腫瘍細胞に認められたことから、本腫瘍はボウマン腺に由来することが示唆された。

実験 II では、XZ を投与したラットにおいて血清 T4 の有意な減少は1、2、4週で認められた。血清甲状腺ホルモンは視床下部・甲状腺系を介するネガティブフィードバック機構により調節されており、持続した血清甲状腺ホルモンの減少に伴い下垂体からのTSHの分泌は亢進し、甲状腺は肥大することが報告されている。今回、血清TSHは1週のみ有意に増加したが、甲状腺重量の有意な増加は1、2、4週で認められており、血清T4の減少に続き二次的に肥大したものと推察された。また、血清甲状腺ホルモンの減少メカニズムとしては甲状腺におけるヨウ素の取り込みおよび有機化阻害あるいは肝臓における甲状腺ホルモンの排泄亢進によることが報告されている。実験 III において、XZ 投与開始2週では甲状腺の単位重量あたりのヨウ素取込み量および甲状腺の単位蛋白量当た

りのヨウ素の有機化率は有意に減少し、XZが甲状腺ホルモンの合成過程を抑制することが明らかとなった。よって、今回の実験IIおよびIIIより、XZの甲状腺発癌プロモーションメカニズムとしては、XZによる甲状腺のヨウ素取り込みならびに有機化阻害の結果として血清甲状腺ホルモンが減少し、視床下部・甲状腺系ネガティブフィードバック機構を介した血清TSHの上昇が甲状腺発癌プロモーションに関与していることが示唆された。

遺伝毒性発癌物質に対して感受性が高いことが報告されている *rasH2* マウスにDMAを投与した実験IVでは、DMA投与による腫瘍の誘発は如何なる臓器にも認められなかったが、DMAを投与した *rasH2* および *Non-Tg* マウスともにラット同様背鼻道部鼻腔粘膜に嗅腺の萎縮を主体とした病変が認められた。DMAのラットでの発癌メカニズムとしては嗅腺の萎縮、再生や炎症性細胞浸潤による修飾作用等による、非遺伝毒性発癌メカニズムが関与するものと考えられており、実験IVにおいてもDMAの投与期間を延長することにより嗅腺の萎縮や腺管の増生に続き鼻腔腫瘍が誘発される可能性が推察された。特に、鼻腔粘膜での病変が重篤であった *rasH2* マウスにおいては *Non-Tg* マウスより早期に鼻腔腫瘍が発現する可能性が推察された。

オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン、ジクラズリル及びナイカルバジンの残留検査法を確立した。今回確立した各方法の精度は、コーデックス委員会の検査法評価基準に適合している。また、操作、設備等の面でも、現在の各種検査機関において容易に実施、導入が可能であることが5試験研究機関において確認され、残留検査法として有用であると考えられる。

E. 結論

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) の発癌プロモーションメカニズムの検討ならびに *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の標的部位は鼻腔嗅上皮粘膜のボウマン腺で、誘発される腫瘍はボウマン腺に由来することが示唆された。一方、XZの甲状腺発癌プロモーション作用は甲状腺のヨウ素取り込みならびに有機化阻害による視床下部・甲状腺系ネガティブフィードバック機構を介した甲状腺の増殖に関与していることが示唆された。

オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン、ジクラズリル及びナイカルバジンの残留検査法を確立した。本研究で確立した残留検査法は、5試験研究機関による標準化の結果、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評価された。

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* 142, 161-172 (1999).

T. Koujitani, K. Yasuhara, H. Kobayashi, A. Shimada, H. Onodera, H. Takagi, T. Tamura, M. Hirose and K. Mitsumori: Absence of tumor promoting activity of *xylazine* in a two-stage nasal carcinogenesis model in N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-treated rats. *J. Toxicol. Pathol.* 12, 203-208 (1999).

2. 学会発表

安原加壽雄, 三森国敏, 小林裕子, 梶谷高敏, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄: ラ

ットにおける xylazine の鼻腔発癌修飾作用. 第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会 (1999)

安原加壽雄, 三森国敏, 竹川潔, 糺谷高敏, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄: Xylazine のラット甲状腺発癌プロモーション作用とそのメカニズム. 第 58 回日本癌学会総会 (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 誘発鼻腔病変の経時的検討. 第 58 回日本癌学会総会 (1999).

糺谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 豊沢かおる, 小野寺博志, 高木久宜, 田村啓, 広瀬雅雄: DHPN を用いたラット二段階発癌モデルにおける 2,6-dimethylaniline(DMA) 誘発増殖性病変の免疫組織化学的・超微形態学的検討. 第 16 回日本毒性病理学会 (2000).

安原加壽雄, 三森国敏, 糺谷高敏, 小野寺博志, 高木久宜, 田村啓, 広瀬雅雄: ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニックマウスにおける 2,6-dimethylaniline の発癌感受性. 第 16 回日本毒性病理学会 (2000).

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 11 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

家畜の鎮静剤キシラジン (XZ) の代謝物である 2,6-ジメチルアニリン(DMA)はラットの鼻腔に対して発癌性を示すことから、XZ と DMA について 1 年間のラット二段階発癌実験を行った結果、DMA は鼻腔に対して発癌プロモーション作用を示したが、XZ は鼻腔に対し何等修飾作用を示さなかった。しかし、XZ では甲状腺に対して発癌プロモーション作用を示す成績が得られた。

本年度は、この DMA ないし XZ の発癌プロモーションメカニズムを検討するため、以下の実験を行った。実験 I : DMA については、ジイソプロパノールニトロソアミン (DHPN) でイニシエーション後 3000 ppm の DMA を 52 週間ラットに混餌投与し経時的に観察した結果、ボウマン腺が DMA の標的組織であり、DHPN でイニシエーションされたその組織にボウマン腺由来の鼻腔腫瘍が誘発されることを見出した。実験 II : XZ については、ラットに 1000 ppm の XZ を 4 週間混餌投与し、甲状腺関連ホルモンの測定を行った結果、XZ の甲状腺プロモーション作用は血中 T4 の減少に基づく TSH の上昇に起因することが明らかとなった。実験 III : XZ の甲状腺ヨウ素取り込みないし有機化阻害の有無を検討するため、ラットに 1000 ppm の XZ を混餌投与し、投与 7、14 日目にヨウ素を腹腔内に投与した結果、T4 の減少は甲状腺へのヨウ素取り込みないし有機化阻害に起因することが示唆された。実験 IV : 遺伝毒性発がん物質に著しく感受性が高いヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入 Tg マウスを用いて DMA を 26 週間反復投与した結果、何等発癌性は認められなかった。

研究協力者 安原加壽雄
国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究協力者 小林裕子
植物防疫協会研究所

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⁾。

我々は DMA と XZ について 1 年間のラット鼻腔および甲状腺二段階発癌実験を行った結果、DMA は鼻腔に対して発癌プロモーション作用を示した³⁾が、XZ では、鼻腔発癌プロモーション作用は認められなかった⁴⁾ことを明らかにした。しかし、XZ には甲状腺に対して発癌プロモーション作用を示す成績が得られた。

本年度は、ラットにおける DMA の鼻腔発癌プロモーションメカニズムおよび XZ の甲状腺発癌プロモーションメカニズムを解明することを目的として以下の実験を行った。また、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 遺伝子導入トランスジェニックマウス (Tg マウス)⁵⁾を用いてこのマウスが DMA に対して発癌感受性を示すか否かを検討した。

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 あるいは 5 週齢の雄性 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 : DMA の鼻腔発癌プロモーションメカニズムを解明するため、5 週齢の雄性 F344 ラットにイニシエーターとして 2400 mg/kg の DHPN を背部皮下に単回投与した。投与 1 週より鼻腔発癌量である DMA 3000ppm 混餌飼料¹⁾を 52 週間自由に摂取させた。

実験 II : XZ の甲状腺発癌プロモーションメカニズムの解明を目的として血清甲状腺関連ホルモン濃度の測定を行うために、6 週齢の雄性 F344 ラットを 2 群に分け、一方には基礎飼料、他方には XZ の最大耐量である 1000ppm 混餌飼料⁴⁾を 4 週間自由に摂取させた。

実験 III : XZ の甲状腺発癌プロモーションメカニズム解明のため甲状腺におけるヨウ素の取り込みと有機化率を測定するために、6 週齢の雄性 F344 ラットを 2 群に分け、一方には基礎飼料、他方には XZ 1000ppm 混餌飼料を 2 週間自由に摂取させた。

実験 IV : 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。

4. 観察方法

一般状態観察

実験 I ~ IV ともに毎日一般状態の観察を行った。

病理組織学的観察

実験 I : DMA 投与 4、13、26 および 52 週に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。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、一部の鼻腔組織について電子顕微鏡により超微形態学的に観察を行っ

た。

実験Ⅳ：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、精嚢、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、病理組織学的に観察を行った。

血清甲状腺関連ホルモン濃度測定

実験Ⅱ：実験開始 1、2、4 週にそれぞれ対照群 6 匹および XZ 群 8 匹を剖検し甲状腺、下垂体および肝臓を摘出、臓器重量を測定すると共に、後大動脈より血液を採取、血清を遠心分離し甲状腺関連ホルモン T3 (Coat-A-Count Canine T3 Kit, Diagnostic Products Co., CA, USA)、T4 (DPC Total T4 Kit, Diagnostic Products Co., CA, USA) および TSH (Rat thyroid stimulating hormone[125I] assay system, Amersham Pharmacia Biotech, UK) 濃度を測定した。

甲状腺ヨウ素取込み／有機化率測定

実験Ⅲ：投与開始 7 日および 14 日に、対照群および XZ 群各 10 匹に Na¹²⁵I (NEN Research Products, Boston, U.S.A.) を日本薬局法・生理食塩液 (大塚製薬株式会社、東京) で希釈し、80 nCi/rat となるように 0.4 ml/rat の容量で腹腔内に投与した。Na¹²⁵I 投与 24 時間後に、最終体重を測定し、エーテル深麻酔により致死させた。甲状腺を摘出して秤量し、ガンマカウンター (1480 WIZARD3, Wollac, Turku, Finland) で甲状腺全体の放射エネルギーを測定した。甲状腺組織を 5 mL 用のホモジナイザー瓶に入れテフロンホモジナイザーを用いて 1.0 mL の 0.15 M NaCl-1 mM KI 中にホモジナイ

ズした。1.0 mL の 10%トリクロロ酢酸を加えて蛋白を沈澱させた後、1,300×g で 10 分間遠心し、上清を除いた。さらに、沈査に 0.5 mL の 5%トリクロロ酢酸を加えて攪拌し、1,300×g で 10 分間遠心した。上清を除き、沈査の放射エネルギーをガンマカウンターで測定した。沈査中の蛋白量を Lowry 法⁷⁾により測定した。以上のデータをもとに、よう素の取り込み量としては甲状腺 1 mg 当たりの放射エネルギーを、よう素の有機化率としては甲状腺蛋白 1 mg 当たりの放射エネルギーを投与した放射エネルギーに対する百分率で示した。

統計学的解析

甲状腺・下垂体・肝臓重量、血清 T3・T4・TSH 濃度、甲状腺単位重量当たりの放射エネルギー、および単位蛋白量当たりの放射エネルギーの各測定値については、Student の *t* 検定により、対照群と投与群の差を検定した。

C. 研究結果

実験Ⅰ：光顕的には、DHPN 単回投与後 DMA 投与により鼻腔の嗅上皮粘膜部に病変が認められた (Table 1)。DMA 投与 4 週より、ボウマン腺の萎縮、嗅上皮の配列不整がみられ、13 週ではボウマン腺の拡張および増殖、嗅上皮細胞の変性および未分化嗅上皮細胞の増殖も認められた。26 週では、さらに嗅上皮の過形成 (単純性、乳頭状および腺様過形成を含む、大部分は腺様過形成)、異形成巣および腺腫も認められ、52 週では癌も認められた。ボウマン腺の増殖、嗅上皮の配列不整、未分化嗅上皮細胞の増殖、嗅上皮の過形成、異形成巣、腺腫および癌については、その病変程度の増強あるいは発生数の増加が経時的に認められた。また、癌の電顕観察では、腫瘍細胞間にデスモゾームがみられ、その細胞質内に正常のボウマン腺の分泌顆粒に酷似する分泌顆粒がみられた。腫瘍細胞からなる腺管構造の外側には基底膜構造も認められた。管腔を形成する腫瘍細胞は微絨毛を持ち、分泌顆粒も多数認められた。

実験II：臓器重量（比重量）では、XZ群で甲状腺および肝臓ともControlに比し1、2、4週とも有意に増加したが、下垂体では明らかな変化は認められなかった(Fig. 2)。血清ホルモンレベルではT3は1週で有意に減少したが、2、4週では明らかな差は認められなかった。しかし、T4は1、2、4週とも有意に減少しました。TSHは1週で有意に増加したが、2、4週では明らかな差は認められなかった(Fig. 3)。

実験III：甲状腺重量は1、2週とも有意に増加した(Fig. 4)。ヨウ素の取り込みならびに有機化率は1週で減少傾向、2週では有意に減少した(Fig. 4)。

実験IV：一般状態では明らかな変化は認められなかったが、雄性 *rasH2* マウスのDMA群で実験終了までに2匹の動物が切迫殺あるいは死亡した。なお、死亡動物は死後変化が顕著なために組織学的検査から除外した。

病理組織学的に対照群を含む雌雄の *rasH2* マウスに散発的に腫瘍がみられたが、DMA投与による増殖性病変の誘発は雌雄の *rasH2* および Non-Tg マウスともに認められなかった (Table. 2)。DMAを投与した全動物に非腫瘍性病変として背鼻道部鼻腔粘膜を中心に嗅上皮の萎縮、配列不整、呼吸上皮化生が、嗅上皮基底部分には好酸性細胞の集簇が散発的に認められた。これらの細胞の一部にはアルシアンブルー染色に陽性を示すものも認められた。また、嗅腺の萎縮/消失および腺管の増生ならびに拡張が認められ、これらの腺管には呼吸上皮化生を伴うものも認められた。更に、嗅神経束の萎縮/消失が認められた。なお、これらの病変の程度は雌雄とも Non-Tg マウスに比べ *rasH2* マウスで重篤であった (Table 3)。

D. 考察

DMAの鼻腔発癌プロモーションメカニズムを解明する目的で、DHPN単回投与後DMA3000ppm混餌飼料をラットに投与した

実験Iでは、病変は主に鼻腔嗅上皮粘膜に認められた。DMA投与初期の4週より、高度なボウマン腺の萎縮と嗅上皮の配列不整、続いてボウマン腺の拡張および増殖、嗅上皮の変性および未分化嗅上皮細胞の増殖、さらに、嗅上皮の過形成、異形成巣、腺腫および癌が認められた。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おり¹⁾、実験Iにおいて投与初期より高度にボウマン腺の萎縮がみられたことより、嗅上皮粘膜のボウマン腺がDMAの標的部位であることが示唆された。また、嗅上皮の配列不整、変性および未分化嗅上皮細胞の増殖などの病変はボウマン腺の萎縮に続いてみられており、ボウマン腺の変性・壊死に続発して嗅上皮の変性が生じるとの報告^{8,9)}もあることなどから、嗅上皮に生じる病変はボウマン腺の変化に続く二次的な変化であると推察された。さらに、超微形態学的観察では、実験Iで誘発された癌は腺様増殖を示し、基底膜構造、細胞間のデスモゾームおよび管腔側に微絨毛が確認されたことから、本腫瘍が上皮性腫瘍であると考えられた。また、正常のボウマン腺細胞にみられる分泌顆粒に酷似した分泌顆粒が腫瘍細胞に認められたことから、本腫瘍はボウマン腺に由来することが示唆された。

XZの甲状腺発癌プロモーション作用を検討する目的で、血清甲状腺関連ホルモン濃度を測定した実験IIIでは、XZを投与したラットにおいて血清T3の有意な減少は1週で認められたのみであったが、T4の有意な減少は1、2、4週で認められた。血清甲状腺ホルモンは視床下部・甲状腺系を介するネガティブフィードバック機構により調節されており、持続した血清甲状腺ホルモンの減少に伴い下垂体からのTSHの分泌は亢進し、甲状腺は肥大することが報告されている¹⁰⁾。今回、血清TSHは1週では有意に増加したが、2および3週では明らかな増加は認められなかった。しかし、甲状腺重量の有意な増加は1、2、4週で認められており、血清T4の減少に起因し、二次

的に肥大したものと推察された。また、血清甲状腺ホルモンの減少メカニズムとしては甲状腺におけるヨウ素の取り込みおよび有機化阻害あるいは肝臓における甲状腺ホルモンの排泄亢進によることが報告されている¹⁰⁾。今回、甲状腺へのヨウ素取込みおよびヨウ素の有機化率を検討した実験Ⅳにおいて、XZ投与開始2週では甲状腺の単位重量あたりのヨウ素取込み量および甲状腺の単位蛋白量あたりのヨウ素の有機化率は有意に減少し、XZが甲状腺ホルモンの合成過程を抑制することが明らかとなった。よって、今回の実験ⅡおよびⅢより、XZの甲状腺発癌プロモーションメカニズムとしては、XZによる甲状腺のヨウ素取り込みならびに有機化阻害の結果として血清甲状腺ホルモンが減少し、視床下部・甲状腺系ネガティブフィードバック機構を介した血清TSHの上昇が甲状腺発癌プロモーションに関与していることが示唆された。

遺伝毒性発癌物質に対して感受性が高いことが報告されている *rash2* マウス⁵⁾ に実験Ⅰ同様 DMA を投与した実験Ⅳでは、DMA 投与による腫瘍の誘発は如何なる臓器にも認められなかったが、DMA を投与した *rash2* および Non-Tg マウスともにラット同様背鼻道部鼻腔粘膜に嗅腺の萎縮を主体とした病変が認められた。DMA のラットでの発癌メカニズムとしては嗅腺の萎縮、再生や炎症性細胞浸潤による修飾作用等による、非遺伝毒性発癌メカニズムが関与するものと考えられており³⁾、実験Ⅳにおいても DMA の投与期間を延長することにより嗅腺の萎縮や腺管の増生に続き鼻腔腫瘍が誘発される可能性が推察された。特に、鼻腔粘膜での病変が重篤であった *rash2* マウスにおいては Non-Tg マウスより早期に鼻腔腫瘍が発現する可能性が推察された。

引用文献

1. National Toxicology Program Technical Report Series No. 278 (1990), Toxicology and

- carcino-genesis 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. T. Koujitani, K. Yasuhara, H. Kobayashi, et al.: Tumor promoting activity of 2,6-dimethylaniline in a two-stage nasal carcinogenesis model in N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine-treated rats. *Cancer Letters* 142, 161-172 (1999).
4. T. Koujitani, K. Yasuhara, H. Kobayashi, et al.: Absence of tumor promoting activity of xylazine in a two-stage nasal carcinogenesis model in N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine-treated rats. *J. Toxicol. Pathol.* 12, 203-208 (1999).
5. S. Yamamoto, K. Urano, H. Koizumi, et al.: Validation of transgenic mice carrying the human prototype c-Ha-ras gene as a bioassay model for rapid carcinogenicity testing. *Environ. Health Perspect.* 106(suppl 1), 57-69 (1998)
6. 長野嘉介, 榎本眞, 山内勝彦, et al.: 上気道病変. *J. Toxicol. Pathol.* 1, 115-127 (1988).
7. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275 (1951).
8. M.V. Pino, M.G. Valerio, G.K. Miller, et al.: Toxicologic and carcinogenic effects of the type IV phosphodiesterase inhibitor RP 73401 on the nasal olfactory tissue in rats. *Toxicol. Pathol.* 27: 383-394. (1999).

9. B.A. Wetmore, A.D. Mitchel, S.A. Meyer and M.B. Genter. : Evidence for site-specific bioactivation of alachlor in the olfactory mucosa of the Long-Evans rat. *Toxicol. Sci.* 49: 202-212. (1999).
10. R.N. Hill, L.S. Erdreich, O.E. Paynter, et al.: Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12, 629-697 (1989).

E. 結論

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) の発癌プロモーションメカニズムの検討ならびに 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 の標的部位は鼻腔嗅上皮粘膜のボウマン腺で、誘発される腫瘍はボウマン腺に由来することが示唆された。一方、XZ の甲状腺発癌プロモーション作用は甲状腺のヨウ素取り込みならびに有機化阻害による視床下部・甲状腺系ネガティブフィードバック機構を介した甲状腺の増殖が関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 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* 142, 161-172 (1999).

T. Koujitani, K. Yasuhara, H. Kobayashi,

A. Shimada, H. Onodera, H. Takagi, T. Tamura, M. Hirose and K. Mitsumori : Absence of tumor promoting activity of xylazine in a two-stage nasal carcinogenesis model in N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-treated rats. *J. Toxicol. Pathol.* 12, 203-208 (1999).

2. 学会発表

安原加壽雄, 三森国敏, 小林裕子, 糀谷高敏, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄 : ラットにおける xylazine の鼻腔発癌修飾作用. 第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会 (1999)

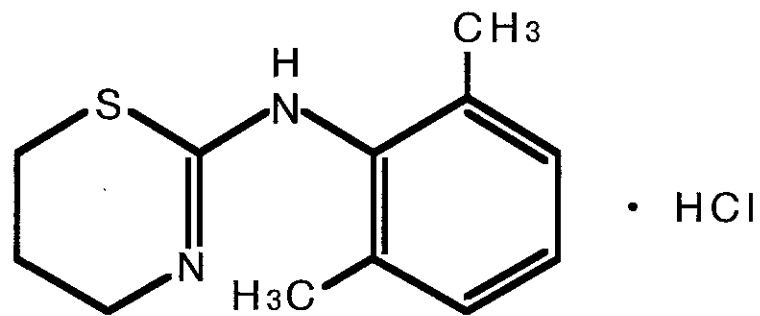
安原加壽雄, 三森国敏, 竹川潔, 糀谷高敏, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄 : Xylazine のラット甲状腺発癌プロモーション作用とそのメカニズム. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)

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 誘発鼻腔病変の経時的検討. 第 58 回日本癌学会総会 (1999).

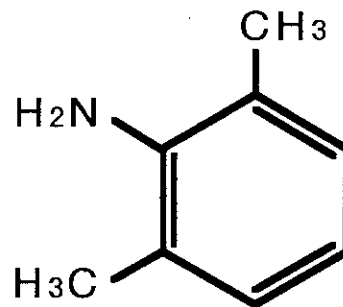
糀谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 豊沢かおる, 小野寺博志, 高木久宜, 田村啓, 広瀬雅雄 : DHPN を用いたラット二段階発癌モデルにおける 2,6-dimethylaniline (DMA) 誘発増殖性病変の免疫組織化学的・超微形態学的検討. 第 16 回日本毒性病理学会 (2000).

安原加壽雄, 三森国敏, 糀谷高敏, 小野寺博志, 高木久宜, 田村啓, 広瀬雅雄 : ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニックマウスにおける 2,6-dimethylaniline の発癌感受性. 第 16 回日本毒性病理学会 (2000).

Xylazine hydrochloride



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



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

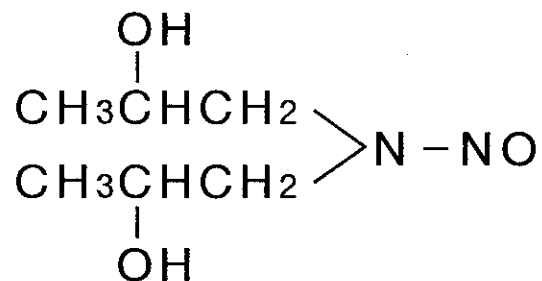


Fig. 1. Chemical structure of xylazine hydrochloride, DMA and DHPN.

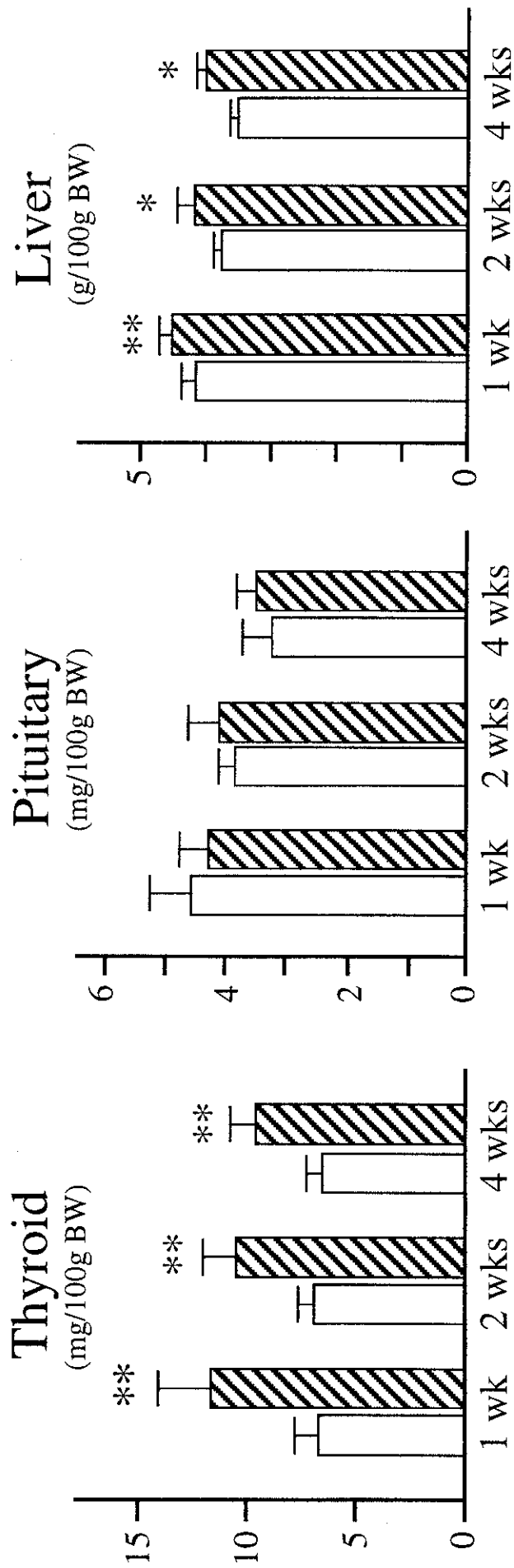


Fig. 2 Relative organ weights in rats treated with XZ for 4 weeks (Exp. II)

□ : 1000ppm XZ ▨ : Basal diet

*, ** : significantly different from the control value in Student's *t*-test at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

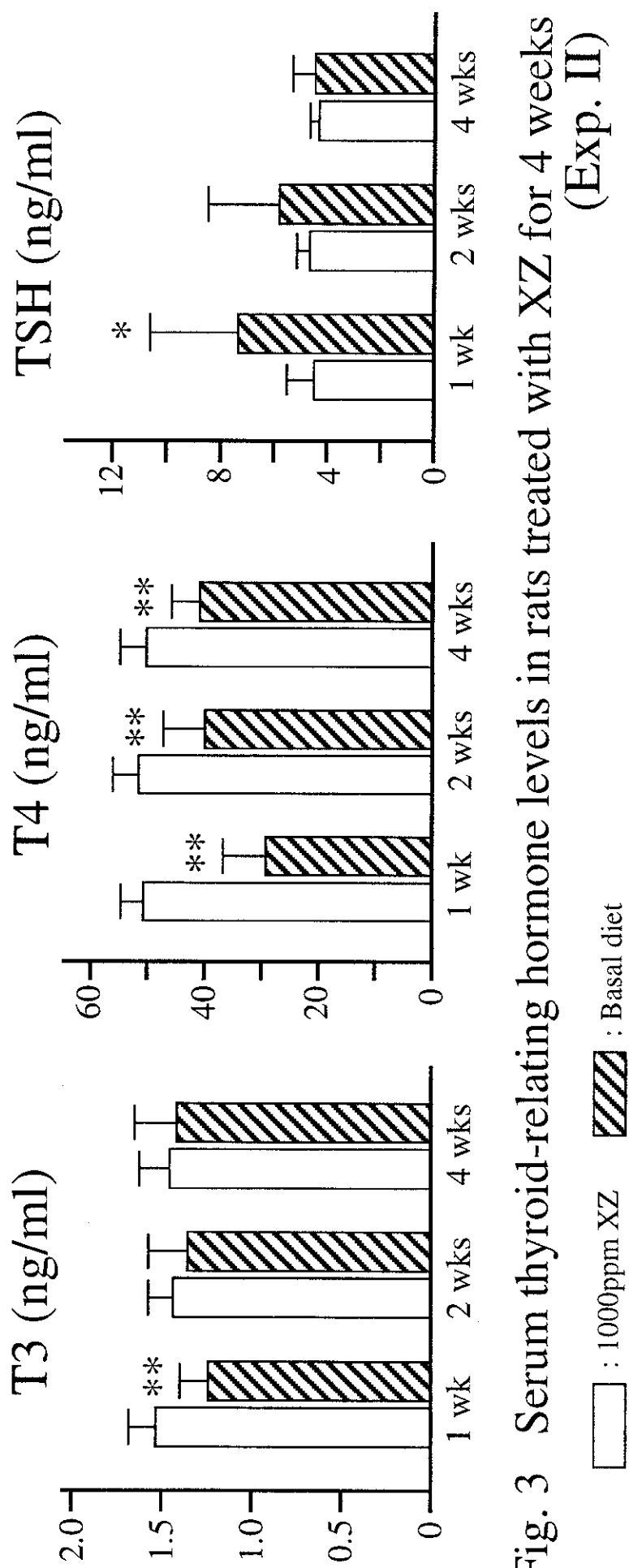


Fig. 3 Serum thyroid-related hormone levels in rats treated with XZ for 4 weeks (Exp. II)

□ : 1000ppm XZ ▨ : Basal diet
 *, ** : significantly different from the control value in Student's *t*-test at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

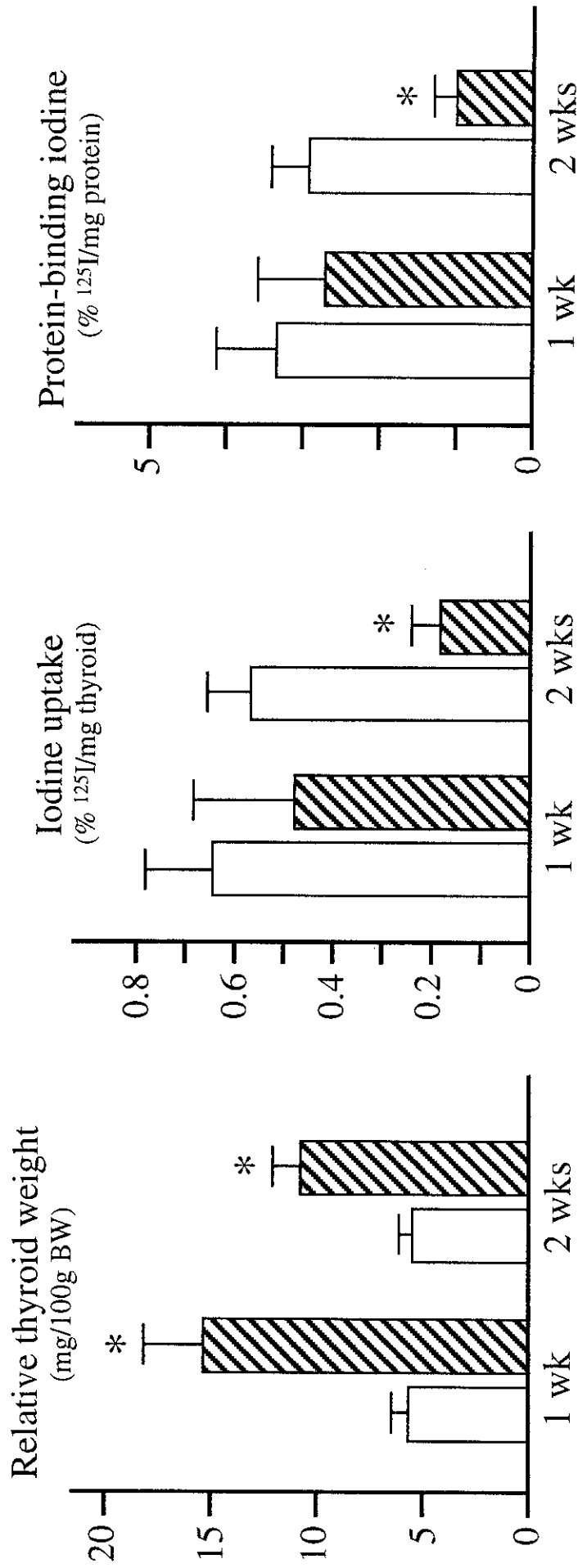


Fig. 4 Relative thyroid weights, and thyroid uptake and organification of ¹²⁵I in rats treated with XZ for 2 weeks (Exp III)

□ : Basal diet ▨ : 1000ppm XZ

* : significantly different from the control value in Student's *t*-test at $p < 0.01$.

Table 1 Summary of histopathological findings of olfactory mucosa in rats treated DMA for 4, 13, 26 or 52 weeks after DHPN initiation (Exp. I)

Histopathological findings	DHPN 2400 mg/kg (i.p.) + DMA 3000 ppm			
	4 weeks	13 weeks	26 weeks	52 weeks
Atrophy of Bowman's glands	+++	+++	+++	+++
Dilatation of Bowman's glands	-	+	+	+
Proliferation of Bowman's glands	-	+	++	++
Epithelial disarrangement	+	+	++	+++
Degeneration of epithelial cells	-	+	+	+
Proliferation of undifferentiated epithelial cells	-	+	++	++
Epithelial hyperplasias	-	-	6/10 ^a	30/30
Dysplastic foci	-	-	1/10	10/30
Adenomas	-	-	1/10	8/30
Carcinomas	-	-	-	10/30

- , negative or absence of lesion; +, slight change; ++, moderate change; +++ , severe change.
^a: Number of animals with lesion/No. of animals examined.

Table 2 Sites and types of proliferative lesions in rasH2 and Non-Tg mice treated with or without DMA (Exp. IV)

Sites and types of tumors	Group	No. of rats with proliferative lesions									
		Males				Females					
		rasH2	Non-Tg			rasH2	Non-Tg				
	Cont.	DMA	Cont.	DMA	Cont.	DMA	Cont.	DMA	Cont.	DMA	
<i>Effective no. of rats</i>											
Lung		10	15	10	16	10	20	10	20	10	20
Alveolar /bronchiolar adenoma		1(10) ^a	2(13)				2(10)				
Alveolar /bronchiolar hyperplasia							1(5)				
Forestomach											
Squamous cell papilloma							1(5)				
Squamous cell hyperplasia		1(10)				2(20)					
Spleen											
Hemangioma/sarcoma									3(15)		
Hematopoietic organ											
myeloblastic leukemia						1(7)					
Ovary											
Hemangioma/sarcoma									1(10)		
Skin											
Papilloma						2(13)					
Subcutis											
Sarcoma NOS											1(5)

a : Number of animals with proliferative lesion (%).

Table 3 Non-neoplastic lesions in rasH2 and Non-Tg mice treated with or without DMA (Exp. IV)

Group	Males				Females				
	rasH2		Non-Tg		rasH2		Non-Tg		
	Cont. DMA	DMA	Cont. DMA	DMA	Cont. DMA	DMA	Cont. DMA	DMA	
Effective no. of rats	10	15	10	16	10	20	10	20	
Dorsal meatus of Nasal cavity									
Olfactory epithelium									
Atrophy	+++	0	7 ^a	0	0	0	5	0	0
	++	0	7	0	8	0	13	0	6
	+	0	1	0	8	1	2	0	14
Disorganization	+++	0	10	0	1	0	8	0	1
	++	0	4	0	14	0	12	0	18
	+	0	1	0	1	0	0	0	1
	±	0	0	0	0	1	0	0	0
Respiratory metaplasia	+++	0	1	0	0	0	0	0	0
	++	0	9	0	0	0	5	0	0
	+	0	4	0	7	0	13	0	3
	±	0	0	0	0	0	2	0	5
Eosinophilic cell aggregation	++	0	1	0	6	0	0	0	14
	+	0	5	0	10	0	4	0	6
	±	0	8	0	0	0	5	0	0
Bowman's gland									
Atrophy/loss	+++	0	1	0	0	0	2	0	0
	++	0	13	0	16	0	17	0	19
	+	0	1	0	0	0	1	0	1
Ductal proliferation	++	0	9	0	0	0	8	0	0
	+	0	6	0	7	0	12	0	8
	±	3	0	0	8	5	0	0	12
Dilatation of duct	+	0	10	0	2	0	16	0	2
	±	1	4	0	7	1	4	0	6
Olfactory nerve bundle									
Atrophy/loss	+++	0	5	0	0	0	0	0	0
	++	0	10	0	1	0	17	0	1
	+	0	0	0	15	0	3	0	17
	±	0	0	0	0	0	0	0	2

Severity of lesions : ± very slight; + slight; ++ moderate; +++marked.
a : Number of animals with lesion.