

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

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12年度総括研究報告書

主任研究者 三森国敏

平成13(2001)年4月9日

目 次

I 研究報告書	
畜水産食品中の化学物質残留防止対策に関する研究 三森国敏	----- 1
II 分担研究報告	
1. 残留動物用医薬品に関する情報収集 三森国敏	----- 7
2. 動物用医薬品の検査方法の確立 豊田正武	----- 25
III 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 37
IV 研究成果の刊行物・別刷	----- 38

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 東京農工大学農学部獣医学科 家畜病理学講座 教授

研究要旨

キシラジン(XZ)の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値およびDMA誘発鼻腔腫瘍の病理発生を明らかにするため、以下の実験を行った。実験Ⅰ：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処置したラットに0、250、500および1000ppm XZを26週間混餌投与し検索した結果、500ppm以上の群で増殖性病変が誘発され閾値は250ppm(14.2±6.2 mg/kg/day)であることが明らかとなった。実験Ⅱ：DHPNでイニシエーション処置したラットに3000ppmジメチルアニリン(DMA)を52週間混餌投与し誘発された鼻腔増殖性病変を免疫組織化学的および超微形態学的に解析した結果、ボウマン腺由来を支持する結果が得られた。実験Ⅲ：遺伝毒性発がん物質に感受性が高いと言われているp53癌抑制遺伝子の片側のアレルが欠損した(p53K0)マウスにDMAを26週間混餌投与した結果、何等発癌性は認められなかった。

抗生物質のチルミコシン、寄生虫用剤のエプリノメクチン及びレバミゾールについて、畜水産食品中の残留検査法を検討した。定量下限はFAO/WHO合同食品規格委員会(コーデックス委員会)が設定したコーデックス規格の1/2ないし1/10を目標として検討した。エプリノメクチンの定量下限は0.005ppmであった。添加回収試験の結果は平均回収率92%以上、相対標準偏差はいずれの試料も5%以内であった。チルミコシンの定量下限は、肉、脂肪、肝臓でそれぞれ0.05ppm、乳で0.02ppmであった。添加回収試験の結果は平均回収率90%以上、相対標準偏差はいずれの試料も5%以内であった。レバミゾールの定量下限は0.01ppmであった。添加回収試験の結果は平均回収率78%以上、相対標準偏差はいずれの試料も6%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
東京農工大学農学部獣医学科 教授
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、 $\alpha 2$ 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。

本年度は、XZ の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値および N-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) でイニシエーション処置後 DMA 投与により誘発される鼻腔腫瘍が全てボウマン腺に由来するか否かを明らかに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 *p53* 癌抑制遺伝子の片側のアレルが欠損した C57BL マウス (*p53*KO 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、平成 12 年 6 月に食品衛生法が改正され、計 19 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、抗生物質のチルミコシン、寄生虫用剤のエプリノメクチン及びレバミゾールについて残留検査法を検討した。また、検査法を評価するために、試験研究機関 5 カ所により添加回収試験及び残留実態調査を行った。

B. 研究方法

キシラジンについての実験 I では、雄性 F344 ラット 95 匹を 2 群に分け、55 匹には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、40 匹には溶媒の生理食塩水を同様に投与した。投与 1 週目にこれらの動物はそれぞれさらに 4 群に分けられ、3 群には XZ の最大耐量である 1000ppm 混餌飼料、半量の 500ppm 混餌飼料、さらにその判量の 250ppm 混餌飼料を、また、1 群には基礎飼料を 26 週間自由に摂取させた。実験 II では、DHPN 処置後 DMA

投与により誘発される鼻腔増殖性病変の病理発生を明らかにするため、雄性 F344 ラット 50 匹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、1 週目にこれらの動物を 2 群に分け一方に鼻腔発癌量である DMA 3000ppm 混餌飼料、他方に基礎飼料を 52 週間自由に摂取させた。実験 III では、癌抑制遺伝子の *p53* をノックアウト (KO) した *p53*KO あるいは wild マウスをそれぞれ 3 群に分け、2 群には DMA 3000 あるいは 1500 ppm 混餌飼料あるいは基礎飼料を 26 週間自由に摂取させた。

エプリノメクチンの検査法は、イベルメクチン及びモキシデクチン試験法に準じて、高速液体クロマトグラフィーによる検査法を検討した。チルミコシンの検査法は、スピラマイシン試験法に準じて、高速液体クロマトグラフィーによる検査法を検討した。レバミゾールの検査法は、塩基性条件下抽出、陽イオン交換体ミニカラムによる精製後、高速液体クロマトグラフィーによる検査法を検討した。

(倫理面への配慮)

残留動物用医薬品の毒性に関する研究では、ラットやトランスジェニックマウスを用いるため、飼育や動物の安楽死法については米国国立衛生研究所 (NIH) が推奨している動物倫理に関するガイドラインに準拠して実験を実施した。検査方法開発に関する研究においては、倫理を考慮すべき実験は行わなかった。

C. 研究結果

実験 I : 体重では XZ1000 および DHPN+XZ1000 群において増加抑制が認められた。臓器重量では、甲状腺で 500ppm 以上の XZ を投与した各群において、また、肝臓では 1000ppm の XZ を投与した各群において有意な増加がみられた。血清甲状腺関連ホルモンレに関しては、T3 が XZ 1000 群において、また、T4 が XZ 250 群におい

て対照群に比し有意に減少したが、TSHでは明らかな差は認められなかった。病理組織学的検査において、DHPN 単独群およびDHPN 処置後各濃度のXZを投与した各群において甲状腺濾胞上皮の過形成が観察された。発生率ではDHPN+XZ 500 およびDHPN+XZ 1000 群、また、発生個数ではDHPN+XZ 1000 群においてDHPN 単独群に比し有意に増加した。さらに、甲状腺濾胞上皮の腺腫がDHPN+XZ 500 およびDHPN+XZ 1000 群において観察された。なお、甲状腺濾胞上皮の肥大が500ppmのXZを投与した各群において極軽度に、また、1000ppmのXZを投与した各群において軽度に認められた。免疫組織化学的に甲状腺濾胞上皮細胞におけるBrdUの標識率は対照群を含む各群において、非増殖性病変部内にも標識細胞が認められ、これらの中でDHPN+XZ 1000 群は対照群ならびにDHPN 単独群に比し有意に増加した。また、BrdU標識率は過形成さらには腺腫で著しく増加した。

実験II：病理組織学的にボウマン腺の増殖、腺様過形成、異形成巣、腺腫および癌が主に鼻腔の嗅上皮部に認められた。免疫組織化学的にボウマン腺の増殖、腺様過形成、異形成巣および腺腫を構成している細胞はサイトケラチン抗体に対し陽性であったが、癌では陰性であった。腺様過形成、腺腫および癌を囲む基底膜は軽度に肥厚し、タイプIVコラーゲン抗体に陽性であった。いずれの鼻腔増殖病変もビメンチンあるいはニューロフィラメントプロテイン抗体に陰性であった。電子顕微鏡による観察では、腺様過形成を構成する細胞は正常のボウマン腺で見られるものに酷似する分泌顆粒が細胞質内に多数認められた。異形成巣ならびに腺腫を構成する細胞でも同様の大きさの分泌顆粒が細胞質内に認められた。癌細胞は基底膜およびデスマゾームを持ち、しばしば、正常のボウマン腺で観察されるものに酷似した分泌顆粒を持っていた。

実験III：DMAを投与した雌雄のp53K0およびWildマウスともに用量に相関して有意

な摂餌量の低下ならびに体重増加抑制が認められた。病理組織学的に、DMA投与によると思われる増殖性病変の誘発はp53K0およびWild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、ボウマン腺の萎縮/消失および腺管の増生ならびに拡張が認められた。更に、嗅神経束の萎縮/消失が認められた。なお、雌雄のp53K0およびWildマウスともにDMA-H群で背鼻道部に細胞崩壊物あるいはエオジンに淡く染まる物質の沈着が認められた。

残留検査法：エプリノメクチンは、イベルメクチンの類縁化合物であるため、すでに告示されているイベルメクチン及びモキシデクチン試験法を修正することなく適用することができた。牛の肉、脂肪、肝臓、乳に対する添加回収試験の結果は、肉に0.1ppm添加の時、回収率96~100%、脂肪に0.25ppm添加の時、回収率93~98%、肝臓に2.0ppm添加の時、回収率96~102%、乳に0.02ppm添加の時、回収率92~99%であり、相対標準偏差は0.3~5% (n=3)であった。本法による定量下限は0.005ppmであり、残留基準値の1/400~1/4であった。

チルミコシンは、スピラマイシンの類縁化合物であるため、すでに告示されているスピラマイシン試験法をほとんど修正することなく適用することができた。ただし、乳においては残留基準値が0.05ppmと低いため、検体10gを処理することにより濃縮率を上げ、定量下限を残留基準値より低くすることができた。牛の肉、脂肪、肝臓、乳に対する添加回収試験の結果は、肉に0.1ppm添加の時、回収率93~97%、脂肪に0.1ppm添加の時、回収率90~96%、肝臓に1.0ppm添加の時、回収率95~

100%、乳に 0.05ppm 添加の時、回収率 91~96%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、肉、脂肪、肝臓で 0.05ppm、乳で 0.02ppm であり、残留基準値の 1/30~2/5 であった。

レバミゾールが塩基性化合物であることを利用して、塩基性条件下で酢酸エチルで抽出後、塩酸で逆抽出した。酢酸エチルは強塩基性及び強酸性下において加水分解されるので、塩基性条件には飽和炭酸水素ナトリウム及び飽和炭酸ナトリウム (9:1) 混液、酸性逆抽出には 0.1 mol/L 塩酸を用い、可能な限り迅速に操作を行った。精製には Bond Elut SCX (強酸性陽イオン交換体ミニカラム) を用いることにより、十分な精製効果が得られた。牛、豚、鶏の肉、肝臓、腎臓に対する添加回収試験の結果は、肉に 0.01ppm 添加の時、回収率 78~83%、肝臓に 0.1ppm 添加の時、回収率 85~87%、腎臓に 0.01ppm 添加の時、回収率 82~83%であり、相対標準偏差は 2~6% (n=3) であった。本法による定量下限は 0.01ppm であり、残留基準値の 1/10~1/1 であった。

D. 考察

実験 I では、500ppm 以上の XZ を投与した各群において甲状腺重量の有意な増加が認められ、甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が認められた。さらに、DHPN+XZ 500 群では発生率において、DHPN+XZ 1000 群では発生率ならびに発生個数において濾胞上皮の過形成が有意に増加し、また、これらの群では腺腫も誘発され、XZ の発癌プロモーション作用が確認された。なお、免疫組織化学的にも甲状腺濾胞上皮細胞における BrdU 標識率は DHPN+XZ 1000 群で対照群あるいは DHPN 単独群に比べ有意に増加した。以上のことから XZ の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値は 250ppm (14.6 ± 6.2mg/kg/day) と推察された。

実験 II では、DMA 投与により誘発されたボウマン腺の増殖巣あるいは腺様過形成、嗅上皮粘膜下に認められた異形成巣、また、腺腫を構成する細胞はサイトケラチン抗体に対し陽性を示したが、ニューロフィラメントプロテインあるいはビメンチン抗体には陰性であり、誘発された増殖性病変はボウマン腺を含む上皮細胞に由来することが明らかとなった。また、超微形態学的には、上記増殖性病変を構成する細胞質内にはボウマン腺細胞質内に観察される分泌顆粒に類似した構造物が認められたことから、DHPN による鼻腔二段階発癌モデルに DMA を投与することにより誘発される増殖性病変は嗅上皮粘膜を構成するボウマン腺に由来する可能性が強く示唆された。

実験 III では、対照群を含む p53K0 および wild マウスともに自然発生と思われる増殖性病変が散発的に観察されたのみで、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。我々は既に短期発癌試験系の動物モデルとして推奨されているヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入した CB6F1 トランスジェニックマウス (rasH2 マウス) に 3000ppm DMA を 26 週間投与する実験を行い、今回と同様の成績を得ている。ラットでの発癌メカニズムとしてはボウマン腺の萎縮、再生や炎症性細胞浸潤等による修飾作用に起因する、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いる。今回、DMA を投与した p53K0 および wild マウスともに背鼻道部鼻腔粘膜に嗅上皮の配列不整およびボウマン腺の萎縮を主体とした病変が認められ、DMA の投与期間を延長することによりラット同様ボウマン腺の萎縮、再生や炎症性細胞浸潤による修飾作用に引き続き、鼻腔腫瘍が誘発される可能性が推察された。なお、p53K0 あるいは Wild マウスともに DMA の投与量に相関して病変の程度に差が認められ、また、誘発された病変の程度は p53K0 マウスにおいて Wild マウスよりも顕著であり、p53K0 マウスが DMA に対して感受性

が高いことが示唆された。

エプリノメクチンの検査法は、イベルメクチン及びモキシデクチン試験法に準じて、高速液体クロマトグラフィーによる検査法を検討した。エプリノメクチンの定量下限は 0.005ppm であった。添加回収試験の結果は平均回収率 92%以上、相対標準偏差はいずれの試料も 5%以内であった。

チルミコシンの検査法は、スピラマイシン試験法に準じて、高速液体クロマトグラフィーによる検査法を検討した。チルミコシンの定量下限は、肉、脂肪、肝臓でそれぞれ 0.05ppm、乳で 0.02ppm であった。添加回収試験の結果は平均回収率 90%以上、相対標準偏差はいずれの試料も 5%以内であった。

レバミゾールの検査法は、塩基性条件下抽出、陽イオン交換体ミニカラムによる精製後、高速液体クロマトグラフィーによる検査法を検討した。レバミゾールの定量下限は 0.01ppm であった。添加回収試験の結果は平均回収率 78%以上、相対標準偏差はいずれの試料も 6%以内であった。

E. 結論

家畜の鎮静剤として用いられている xylazine (XZ) の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値およびその代謝物である 2,6-dimethylaniline (DMA) の鼻腔発癌の病理発生ならびに短期発癌試験動物モデルとして p53K0 マウスを用いて DMA の鼻腔腫瘍誘発の有無の検討を行った。その結果、XZ の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値は 250ppm (14.6 ± 6.2mg/kg/day) と推測され、DMA により誘発される多くの増殖性病変はボウマン腺に由来する可能性が強く示唆された。一方、p53K0 マウスにおいて DMA 投与による腫瘍の誘発は認められなかった。

エプリノメクチン、チルミコシン、レバミゾール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、導入が可能であり、残留検査法として有用であると考えられる。

F. 健康危機情報

今回の研究からそのような情報は得られなかった。

G. 研究発表

1. 投稿論文

K. Yasuhara, H. Kobayashi, Y. Shimamura, T. Koujitani, H. Onodera, H. Takagi, M. Hirose and K. Mitsumori: Toxicity and blood concentrations of xylazine and its metabolite, 2,6-dimethylaniline, in rats after single or continuous oral administrations. *J. Toxicol. Sci.* 25: 105-113. 2000.

T. Koujitani, K. Yasuhara, T. Ikeda, T. Imazawa, T. Tamura, K. Toyosawa, A. Shimada, M. Hirose and K. Mitsumori: Sequential observation of 2,6-dimethylaniline-induced nasal lesions in a rat two-stage nasal carcinogenesis model after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 751-756. 2000.

K. Yasuhara, T. Koujitani, K. Takegawa, M. Nasu, H. Onodera, H. Takagi, M. Hirose and K. Mitsumori: Promoting effects of xylazine on development of thyroid tumors in rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and its mechanism. *Carcinogenesis* 22: in press. 2001

T. Koujitani, K. Yasuhara, K. Toyosawa, A. Shimada, H. Onodera, H. Takagi, T. Tamura, M. Hirose and K. Mitsumori: Immunohistochemical and ultrastructural studies on 2,6-dimethylaniline-induced nasal

proliferative lesions in a rat two-stage carcinogenesis model initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. Toxicol. Pathol. in press.

3. その他： なし

2. 学会発表

K. Yasuhara, K. Mitsumori, K. Takegawa, T. Koujitani, H. Onodera, H. Takagi and M. Hirose : Promoting activity of xylazine on rat thyroid carcinogenesis and its mechanism of action. The 39th Annual Meeting of Society of Toxicology. 2000. 3.

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 および代謝物 2,6-dimethylaniline 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 129 回日本獣医学会学術集会. 2000 年 4 月

糀谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 小野寺博志, 高木久宜, 田村啓, 広瀬雅雄: N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHP N) および 2,6-dimethylaniline (DMA) により誘発されるラット鼻腔嗅上皮粘膜初期病変の病理学的検討. 第 129 回日本獣医学会学術集会. 2000 年 4 月

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, 瀧澤保, 野村達次, 広瀬雅雄: p53 ヘテロ欠損マウスにおける 2,6-dimethylaniline (DMA) の発癌感受性. 第 59 回日本癌学会総会. 2000 年 10 月.

糀谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 小野寺博志, 高木久宜, 田村啓, 広瀬雅雄: 短期ラット二段階鼻腔発癌モデル確立のためのイニシエーターの検討. 第 17 回日本毒性病理学会. 2001 年 1 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得： なし
2. 実用新案特許： なし

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 12 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 東京農工大学農学部獣医学科 家畜病理学講座 教授

研究要旨

家畜の鎮静剤であるキシラジン（XZ）の甲状腺発癌プロモーション作用機序の検討を行った結果、甲状腺へのヨウ素取り込みないし有機化阻害による血中T4の減少に伴うTSHの上昇に起因すること、また、XZの代謝物である2,6-ジメチルアニリン(DMA)について鼻腔発癌標的組織の検討を行った結果、ボウマン腺由来の鼻腔腫瘍が誘発される可能性を明らかにした。さらには、ヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子導入マウスを用いてDMAの発癌感受性を検討したが、この発癌モデルでは腫瘍は誘発されないとの成績を得た。

本年度は、XZの甲状腺発癌プロモーション作用における閾値およびDMA誘発鼻腔腫瘍の病理発生を明らかにするため、以下の実験を行った。実験Ⅰ：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処置したラットに0、250、500および1000ppm XZを26週間混餌投与し検索した結果、500ppm以上の群で増殖性病変が誘発され閾値は250ppm(14.2±6.2 mg/kg/day)であることが明らかとなった。実験Ⅱ：DHPNでイニシエーション処置したラットに3000ppm DMAを52週間混餌投与し、誘発された鼻腔増殖性病変を免疫組織化学的および超微形態学的に解析した結果、ボウマン腺由来を支持する結果が得られた。実験Ⅲ：遺伝毒性発がん物質に感受性が高いと言われているp53癌抑制遺伝子の片側のアレルが欠損したマウス(p53KOマウス)にDMAを26週間混餌投与した結果、何等発癌性は認められなかった。

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^{5,6)}、作用機序の検討を行った結果、甲状腺へのヨウ素取り込みないし有機化阻害による血中T4の

減少に伴う TSH の上昇に起因するネガティブフィードバック機構が関与していることを明らかにした⁶⁾。また、DMA について鼻腔発癌標的性の検討を行い、ボウマン腺由来の鼻腔腫瘍が誘発される可能性を示唆する成績を得た⁷⁾。また、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を用いて DMA の発癌感受性を検討した結果、短期発癌試験系モデルでは鼻腔を含め何等発癌性は認められなかったことを明らかにした。

本年度は、XZ の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値および N-bis (2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) でイニシエーション処置後 DMA 投与により誘発される鼻腔腫瘍が全てボウマン腺に由来するか否かを明らかに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 p53 癌抑制遺伝子の片側のアレルが欠損した C57BL マウス (p53KO マウス)⁸⁾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) を使用した。DMA (和光純薬) は茶褐色粘性の液体で水、有機溶剤に不溶であった。DHPN はナカライテスクの製品を用いた。

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) より供与を受けた 8 週齢の雌雄の p53KO マウスおよび同系統の野生型 C57BL マウス (wild マウス) を使用した。

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 の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値の解明を目的として、5 週齢の雄性 F344 ラット 95 匹を 2 群に分け、55 匹には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、40 匹には溶媒の生理食塩水を同様に投与した。投与 1 週目にこれらの動物はそれぞれさらに 4 群に分けられ、3 群には XZ の最大耐量である 1000ppm 混餌飼料⁴⁾ (DHPN+XZ 1000 : 15 匹、XZ 1000 : 10 匹)、半量の 500ppm 混餌飼料 (DHPN+XZ 500 : 15 匹、XZ 500 : 10 匹)、さらにその判量の 250ppm 混餌飼料 (DHPN+XZ 250 : 15 匹、XZ 250 : 10 匹)、また、1 群には基礎飼料 (DHPN 単独群 : 10 匹、対照群 : 10 匹) を 26 週間自由に摂取させた。

実験 II : DHPN 処置後 DMA 投与により誘発される鼻腔増殖性病変の病理発生を明らかにするため、5 週齢の雄性 F344 ラット 50 匹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、1 週目にこれらの動物を 2 群に分け一方に鼻腔発癌量である DMA 3000ppm 混餌飼料¹⁾ (DHPN+DMA 群 : 30 匹)、他方に基礎飼料 (DHPN 単独群 : 20 匹) を 52 週間自由に摂取させた。

実験 III : 8 週齢の雌雄の p53KO あるいは wild マウスをそれぞれ 3 群に分け、2 群には DMA 3000 (H 群) あるいは 1500 ppm (L 群) 混餌飼料 (p53KO および wild マウス : 雌雄各 15 匹) あるいは基礎飼料 (対照群、p53KO および wild マウス : 雌雄各 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 ~ III と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 : 各濃度の XZ 投与 26 週に全ての動物をエーテル麻酔下に放血屠殺し、下垂体、甲状腺および肝臓を採取、臓器重量を測定すると共に肉眼的に観察した

後 10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定した。定法に従いパラフィン切片を作製、H-E 染色を施し、病理組織学的に観察すると共に誘発増殖性病変の発生頻度および発生個数の計測を行った。なお、解剖に先立ち各群 8 匹の腹腔内に 40 mg/kg の BrdU (Sigma) を単回投与後甲状腺を摘出、薄切標本を BrdU 抗体 (DAKO) で免疫染色を施し、甲状腺濾胞細胞における標識率を計測した。

実験 II : DMA 投与 52 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、鼻腔内にホルマリンを注入した後、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。また、一部の動物の鼻腔組織あるいは鼻腔腫瘍を伴った動物から腫瘍組織を採取、メチルアルコール・カルノア固定液に浸漬固定し、同様にパラフィンに包埋した。これらについては薄切標本を作製、H-E 染色あるいは PAS 染色を施し、病理組織学的に観察した。また、サイトケラチン、ビメンチン、ニューロフィラメントプロテイン (以上 DAKO) およびタイプ IV コラーゲン抗体 (Chemicon) により免疫組織化学的染色を施し検索した。さらに、一部の鼻腔組織について透過型電子顕微鏡 (JEM 100CX5、日本電子) により超微形態学的に観察を行った。

実験 III : 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、ハーダー腺、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。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。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後、病理組織学的に観察した。

血清甲状腺関連ホルモン濃度測定

実験 I : XZ 投与 26 週に各群 6 匹の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。

統計学的解析

下垂体・甲状腺・肝臓重量および血清 T3・T4・TSH 濃度については一元配置分散分析により群間比較を行い、有意水準 5% で有意な項目についてはさらに対照群あるいは DHPN 単独群との比較を Dunnett の検定を用いて行った。また、甲状腺増殖性病変の発生頻度は Fisher の直接確率計算法により、さらに、増殖性病変の発生個数および BrdU 標識率については Welch の *t* 検定により、DHPN 単独群と DHPN 処置後 XZ を投与した各群間の差を検定した。

C. 研究結果

実験 I : 一般状態では明らかな変化は認められず、摂餌量においても対照群あるいは DHPN 単独群に比べ差は認められなかったが、体重では XZ1000 および DHPN+XZ1000 群において増加抑制が認められた (Table. 1)。臓器重量では、甲状腺で 500ppm 以上の XZ を投与した各群において、また、肝臓では 1000ppm の XZ を投与した各群において有意な増加がみられたが、下垂体では明らかな差は認められなかった (Table. 2)。血清甲状腺関連ホルモンに関しては T3 が XZ 1000 群において、また、T4 が XZ 250 群において対照群に比し有意に減少したが、TSH では明らかな差は認められなかった (Table. 3)。病理組織学的検査において対照群および各濃度の XZ 単独群で増殖性病変は認められな

かったが、DHPN 単独群および DHPN 処置後各濃度の XZ を投与した各群において甲状腺濾胞上皮の過形成が観察された。発生率では DHPN+XZ 500 (60%) および DHPN+XZ 1000 群 (100%)、また、発生個数では DHPN+XZ 1000 群 (5.40 ± 2.33 個) において DHPN 単独群 (20%, 0.20 ± 0.42 個) に比し有意に増加した (Table. 4)。さらに、甲状腺濾胞上皮の腺腫が DHPN+XZ 500 (7%, 0.07 ± 0.26 個) および DHPN+XZ 1000 群 (40%, 0.47 ± 0.64 個) において観察された (Table. 4)。なお、甲状腺濾胞上皮の肥大が 500ppm の XZ を投与した各群において極軽度に、また、1000ppm の XZ を投与した各群において軽度に認められた (Table. 4)。免疫組織化学的に甲状腺濾胞上皮細胞における BrdU の標識率は対照群を含む各群において、非増殖性病変部内にも標識細胞が認められ、これらの中で DHPN+XZ 1000 群 ($0.30 \pm 0.25\%$) は対照群 ($0.06 \pm 0.09\%$) ならびに DHPN 単独群 ($0.09 \pm 0.09\%$) に比し有意に増加した (Table. 5)。また、BrdU 標識率は過形成さらには腺腫で著しく増加した (Table. 5)。

実験 II : 病理組織学的にボウマン腺の増殖、腺様過形成、異形成巣、腺腫および癌が主に鼻腔の嗅上皮部に認められ、それぞれの発生頻度は DHPN+DMA 群で 30/30、30/30、10/30、8/30 および 10/30 例、DHPN 単独群では 0/20、10/20、1/20、4/20 および 1/20 例であった (Table 6)。免疫組織化学的にボウマン腺の増殖、腺様過形成、異形成巣および腺腫を構成している細胞はサイトケラチン抗体に対し陽性であったが、癌では陰性であった (Table 7)。腺様過形成、腺腫および癌を囲む基底膜は軽度に肥厚し、タイプ IV コラーゲン抗体に陽性であったが、ボウマン腺の増殖および異形成巣の組織では基底膜が薄かったために陰性であった (Table 7)。いずれの鼻腔増殖病変もビメンチンあるいはニューロフィラメントプロテイン抗体に陰性であったが、粘膜固有層の線維芽細胞はビメンチン抗体に対し、また、神経線維および嗅細胞はニューロフィラメント

プロテイン抗体に対し陽性を示した (Table 7)。電子顕微鏡による観察では、腺様過形成を構成する細胞は正常のボウマン腺で見られるものに酷似する分泌顆粒が細胞質内に多数認められた。異形成巣ならびに腺腫を構成する細胞でも同様の大きさの分泌顆粒が細胞質内に認められた。癌細胞は基底膜およびデスモゾームを持ち、腔を形成するものでは腺腔内に微絨毛を伸ばし、しばしば、正常のボウマン腺で観察されるものに酷似した分泌顆粒を持っていた。

実験 III : 一般状態では明らかな変化は認められなかったが、DMA を投与した雌雄の p53K0 および Wild マウスともに用量に相関して有意な摂餌量の低下ならびに体重増加抑制が認められた (Table 8)。なお、p53K0 マウス雄の H 群および雌の L 群、また、Wild マウス雌の対照群において各 1 匹が実験途中で死亡した。これらの死亡動物は鼻腔の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数のマウスに散発的に腫瘍が観察されたが、DMA 投与によると思われる増殖性病変の誘発は p53K0 および Wild マウスともに認められなかった (Table. 9)。DMA を投与した全動物に用量あるいは遺伝子改変操作により程度の差は認められるが、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配列不整、呼吸上皮化生が、嗅上皮基底部には好酸性細胞の集簇が散発的に認められた (Table 10)。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、ボウマン腺の萎縮/消失および腺管の増生ならびに拡張が認められた (Table 10)。更に、嗅神経束の萎縮/消失が認められた (Table 10)。なお、雌雄の p53K0 および Wild マウスともに DMA-H 群で背鼻道部に細胞崩壊物あるいはエオジンに淡く染まる物質の沈着が認められ、これらの動物の中には拡張したボウマン腺腺管の中に細胞崩壊物が認められるものもあった (Table 10)。

D. 考察

XZ の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値（無影響量）を明らかにする目的で、各濃度の XZ を単独あるいは DHPN でイニシエーション処置後投与した実験 I では、500ppm 以上の XZ を投与した各群において甲状腺重量の有意な増加が認められ、組織学的にも甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が認められた。甲状腺は下垂体前葉から分泌される甲状腺刺激ホルモン（TSH）の持続した刺激に伴い肥大することが報告されている¹¹⁾。XZ による甲状腺肥大メカニズムとして甲状腺へのヨウ素取り込みならびに有機化阻害による血清 T3・T4 の減少に伴う TSH の上昇に起因することを我々は既に報告した⁶⁾。今回、血清甲状腺関連ホルモン量の測定において、XZ 250 群で対照群に比し T4 量の有意な減少がみられた。しかし、統計学的には有意であるが減少量は僅かであり、500 あるいは 1000ppm の XZ を投与した各群において明らかな減少は認められていないことから、この減少は偶発的なものと考えられた。また、XZ 1000 群において対照群に比し T3 量の有意な減少が認められたが、同様に 1000ppm の XZ を投与した DHPN+XZ 1000 群では明らかな減少は認められず、T4 量においても変化は認められなかった。さらに、血中 TSH 量においても群間に明らかな差は認められなかった。我々は先に 1000ppm の XZ を 4 週間混餌投与し 1、2、4 週に血清甲状腺関連ホルモン量の測定を行った結果、1 週目では有意な血中 T3、T4 の減少および TSH の増加が認められたが、4 週では T3 および TSH に明らかな差は認められず、T4 のみが有意に減少していたが、その減少も僅かであったことを報告した⁶⁾。また、抗甲状腺ホルモン剤を長期間投与した場合、投与初期には血中 T3、T4 および TSH ともに有意に増減するが投与期間の延長に伴いその変動も少なくなり、対照群の測定値に近似することも報告¹²⁾されている。今回の XZ を 26 週間投与したラットにおける

血清甲状腺関連ホルモン測定値においても対照群あるいは DHPN 単独群に比べ著しい増減は認められず、同様な傾向が認められたものと考えられた。組織学的検査において 500ppm 以上の XZ を投与した各群で甲状腺濾胞上皮細胞の肥大がみられ、さらに、DHPN でイニシエーション処置をした DHPN+XZ 500 群では発生率において、DHPN+XZ 1000 群では発生率ならびに発生個数において濾胞上皮の過形成が有意に増加し、また、これらの群では腺腫も誘発され、XZ の発癌プロモーション作用が確認された。なお、免疫組織化学的にも甲状腺濾胞上皮細胞における BrdU 標識率は DHPN+XZ 1000 群で対照群あるいは DHPN 単独群に比べ有意に増加した。以上のことから XZ の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値は 250ppm ($14.6 \pm 6.2 \text{mg/kg/day}$) と推察された。

我々は 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 でイニシエーション処置後 DMA3000ppm 混餌飼料をラットに投与し経時的に観察した結果、DMA 投与により鼻腔に誘発された腫瘍がボウマン腺に由来する可能性を報告した¹³⁾が、誘発された全ての増殖性病変がボウマン腺に由来するか否かを明らかにするための実験 II では、上皮系組織由来を確認する目的でサイトケラチン抗体、神経系としてはニューロフィラメントプロテイン抗体、また、間葉系としてはビメンチン抗体による免疫染色を施し検討した。DMA 投与により誘発されたボウマン腺の増殖巣あるいは腺様過形成、嗅上皮粘膜下に認められた異形成巣、また、腺腫を構成する細胞はサイトケラチン抗体に対し陽性を示したが、ニューロフィラメントプロテインあるいはビメンチン抗体には陰性であり、誘発された増殖性病変はボウマン腺を含む上皮細胞に由来することが明らかとなった。また、超微形態学的に観察した結果、上記増殖性病変を構成する細胞質内にはボウマン腺細胞質内に観察される分泌顆粒に類似した構造物が認められた。なお、腺癌は上記いず

れの抗体に対しても反応しなかったが、超微形態学的には上記増殖性病変で認められた分泌顆粒に類似した構造物が確認された。以上の結果より、DHPNによる鼻腔二段階発癌モデルにDMAを投与することにより誘発される増殖性病変は嗅上皮粘膜を構成するボウマン腺に由来する可能性が強く示唆された。

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p53KOマウス⁸⁾にDMAを投与した実験IIIでは、対照群を含むp53KOおよびwildマウスともに自然発生と思われる増殖性病変が散発的に観察されたのみで、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。我々は既に短期発癌試験系の動物モデルとして推奨されているヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子を導入したCB6F1トランスジェニックマウス(rasH2マウス)¹⁰⁾に3000ppmDMAを26週間投与する実験を行い、今回と同様の成績を得ている。ラットでの発癌メカニズムとしてはボウマン腺の萎縮、再生や炎症性細胞浸潤等による修飾作用に起因する、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いる³⁾。今回、DMAを投与したp53KOおよびwildマウスともに背鼻道部鼻腔粘膜に嗅上皮の配列不整およびボウマン腺の萎縮を主体とした病変が認められ、また、全ての動物ではないがDMA-H群で背鼻道部や拡張した腺管内に好中球などの細胞崩壊物が観察されており、DMAの投与期間を延長することによりラット同様ボウマン腺の萎縮、再生や炎症性細胞浸潤による修飾作用に引き続き、鼻腔腫瘍が誘発される可能性が推察された。なお、p53KOあるいはWildマウスともにDMAの投与量に相関して病変の程度に差が認められ、また、誘発された病変の程度はp53KOマウスにおいてWildマウスよりも顕著であり、p53KOマウスがDMAに対して感受性が高いことが示唆された。

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. 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. K. Yasuhara, H. Kobayashi, Y. Shimamura, T. Koujitani, H. Onodera, H. Takagi, M. Hirose and K. Mitsumori: Toxicity and blood concentrations of xylazine and its metabolite, 2,6-dimethylaniline, in rats after single or continuous oral administrations. *J. Toxicol. Sci.* 25: 105-113. 2000.
6. K. Yasuhara, T. Koujitani, K. Takegawa, M. Nasu, H. Onodera, H. Takagi, M. Hirose and K. Mitsumori: Promoting effects of xylazine on development of thyroid tumors in rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and its mechanism. *Carcinogenesis* 22: in press. 2001

7. T. Koujitani, K. Yasuhara, T. Ikeda, T. Imazawa, T. Tamura, K. Toyosawa, A. Shimada, M. Hirose and K. Mitsumori: Sequential observation of 2,6-dimethylaniline-induced nasal lesions in a rat two-stage nasal carcinogenesis model after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 751-756. 2000.
8. R. W. Tennant, J. E. French and J. W. Spalding: Identifying chemical carcinogens and assessing potential risk in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environ. Health Perspect.* 103: 942-950. (1995).
9. 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).
10. 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).
11. R. N. Hill, L. S. Erdreich, O. E. Paynter, et al.: Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12, 629-697 (1989).
12. T. Shimo, K. Mitsumori, H. Onodera, et al.: Time course observation of thyroid proliferative lesions and serum TSH levels in rats treated with thiourea after DHPN initiation. *Cancer Lett.* 85, 141-149 (1994).
13. T. Koujitani, K. Yasuhara, T. Ikeda, et al.: Sequential observation of 2,6-dimethyl-aniline-induced nasal lesions in a rat two-stage nasal carcinogenesis model after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 751-756. 2000.
- nasal carcinogenesis model after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 751-756. 2000.

E. 結論

家畜の鎮静剤として用いられている xylazine (XZ) の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値およびその代謝物である 2,6-dimethylaniline (DMA) の鼻腔発癌の病理発生ならびに短期発癌試験動物モデルとして p53KO マウスを用いて DMA の鼻腔腫瘍誘発の有無の検討を行った。その結果、XZ の甲状腺発癌プロモーション作用における閾値は 250ppm (14.6 ± 6.2mg/kg/day) と推測され、DMA により誘発される多くの増殖性病変はボウマン腺に由来する可能性が強く示唆された。一方、p53KO マウスにおいて DMA 投与による腫瘍の誘発は認められなかった。

F. 研究発表

1. 投稿論文

K. Yasuhara, H. Kobayashi, Y. Shimamura, T. Koujitani, H. Onodera, H. Takagi, M. Hirose and K. Mitsumori: Toxicity and blood concentrations of xylazine and its metabolite, 2,6-dimethylaniline, in rats after single or continuous oral administrations. *J. Toxicol. Sci.* 25: 105-113. 2000.

T. Koujitani, K. Yasuhara, T. Ikeda, T. Imazawa, T. Tamura, K. Toyosawa, A. Shimada, M. Hirose and K. Mitsumori: Sequential observation of 2,6-dimethylaniline-induced nasal lesions in a rat two-stage nasal carcinogenesis model after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 751-756. 2000.

K. Yasuhara, T. Koujitani, K. Takegawa, M. Nasu, H. Onodera, H. Takagi, M. Hirose and K. Mitsumori: Promoting effects of xylazine on development of thyroid tumors in rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and its mechanism. *Carcinogenesis* 22: in press. 2001

T. Koujitani, K. Yasuhara, K. Toyosawa, A. Shimada, H. Onodera, H. Takagi, T. Tamura, M. Hirose and K. Mitsumori: Immunohistochemical and ultrastructural studies on 2,6-dimethylaniline-induced nasal proliferative lesions in a rat two-stage carcinogenesis model initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol. Pathol.* in press.

2. 学会発表

K. Yasuhara, K. Mitsumori, K. Takegawa, T. Koujitani, H. Onodera, H. Takagi and M. Hirose : Promoting activity of xylazine on rat thyroid carcinogenesis and its mechanism of action. The 39th Annual Meeting of Society of Toxicology. 2000. 3.

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 および代謝物

2,6-dimethylaniline 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129回日本獣医学会学術集会. 2000年4月

糀谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 小野寺博志, 高木久宜, 田村啓, 広瀬雅雄 : N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) および 2,6-dimethylaniline (DMA) により誘発されるラット鼻腔嗅上皮粘膜初期病変の病理学的検討. 第129回日本獣医学会学術集会. 2000年4月

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, 瀧澤保, 野村達次, 広瀬雅雄 : p53 ヘテロ欠損マウスにおける 2,6-dimethylaniline (DMA) の発癌感受性. 第59回日本癌学会総会. 2000年10月.

糀谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 小野寺博志, 高木久宜, 田村啓, 広瀬雅雄 : 短期ラット二段階鼻腔発癌モデル確立のためのイニシエーターの検討. 第17回日本毒性病理学会. 2001年1月

Table 1 Survival rate, final body weights, average food consumption, and daily and total XZ intake in male rats fed diet containing XZ for 26 weeks with or without DHPN initiation (Exp. I)

Group	Number of animals examined	Survival rate (%)	Final body weights (g)	Average food consumption (g/day)	Daily XZ intake (mg/kg)	Total XZ intake (mg/animal)
Control	10	100	373.8 ± 12.5 ^a	13.7 ± 0.9 ^a	-	-
DHPN alone	10	100	376.4 ± 15.8	13.7 ± 1.1	-	-
XZ 250	10	100	368.8 ± 21.8	13.5 ± 0.8	13.2 ± 5.2 ^a	1900
DHPN+XZ 250	15	100	369.3 ± 14.4	14.2 ± 0.8	14.2 ± 6.2	2044
XZ 500	10	100	367.1 ± 16.5	13.6 ± 1.2	26.6 ± 9.0	3827
DHPN+XZ 500	15	100	362.3 ± 19.6	13.5 ± 1.1	27.5 ± 11.6	3952
XZ 1000	10	100	352.6 ± 19.8*	13.5 ± 2.1	53.6 ± 17.2	7709
DHPN+XZ 1000	15	100	351.0 ± 16.1** ##	13.5 ± 1.4	55.6 ± 19.7	7991

a : Mean ± SD.

*,** : Significantly different from the Control group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

: Significantly different from the NNK alone group at p<0.01.

Table 2 Body and organ weights in rats fed diet containing XZ for 26 weeks with or without DHPN initiation (Exp. I)

Groups	No. of Animals examined	Body weights (g)	Thyroid		Pituitary		Liver	
			Absolute (mg)	relative (mg%)	Absolute (mg)	relative (mg%)	Absolute (g)	relative (g%)
Control	10	373.8 ± 12.5	15.1 ± 1.2	4.0 ± 0.4	9.5 ± 1.0	2.5 ± 0.2	9.5 ± 0.5	2.5 ± 0.1
DHPN alone	10	376.4 ± 15.8	15.3 ± 2.4	4.1 ± 0.7	9.6 ± 1.1	2.6 ± 0.4	9.5 ± 0.6	2.5 ± 0.1
XZ 250	10	368.8 ± 21.8	15.8 ± 1.6	4.3 ± 0.4	9.6 ± 0.8	2.6 ± 0.2	9.2 ± 0.8	2.5 ± 0.1
DHPN+XZ 250	15	369.3 ± 14.4	15.2 ± 2.6	4.1 ± 0.6	9.9 ± 1.1	2.7 ± 0.3	9.3 ± 0.7	2.5 ± 0.1
XZ 500	10	367.1 ± 16.5	17.3 ± 2.1*	4.7 ± 0.6**	9.0 ± 0.8	2.5 ± 0.2	9.4 ± 0.7	2.5 ± 0.1
DHPN+XZ 500	15	362.3 ± 19.6	16.3 ± 1.7	4.5 ± 0.4**	9.5 ± 0.8	2.6 ± 0.2	9.4 ± 0.7	2.6 ± 0.1
XZ 1000	10	352.6 ± 19.8*	22.9 ± 2.7**	6.5 ± 0.8**	9.5 ± 0.2	2.7 ± 0.2	10.2 ± 0.8*	2.9 ± 0.1**
DHPN+XZ 1000	15	351.0 ± 16.1**##	26.0 ± 2.9**##	7.4 ± 0.8**##	9.2 ± 0.7	2.6 ± 0.2	10.0 ± 0.6*	2.9 ± 0.1**##

a : mean ± SD.

* , ** : significantly different from the Control group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

: significantly different from the DHPN alone group at p<0.01.

Table 3 Serum levels of T3, T4 and TSH in rats fed diet containing XZ for 26 weeks with or without DHPN initiation (Exp. I)

Groups	No. of Animals examined	Serum levels		
		T3 (ng/dL)	T4 (µg/dL)	TSH (ng/mL)
Control	6	95.9 ± 17.8	3.19 ± 0.56	2.98 ± 0.79
DHPN alone	6	78.4 ± 19.8	3.18 ± 0.42	2.74 ± 0.32
XZ 250	6	78.7 ± 8.9	2.67 ± 0.38 *	2.91 ± 1.00
DHPN+XZ 250	6	90.0 ± 14.9	3.16 ± 0.25	3.05 ± 1.31
XZ 500	6	77.7 ± 23.4	2.74 ± 0.26	4.01 ± 1.37
DHPN+XZ 500	6	83.9 ± 10.5	2.84 ± 0.37	2.60 ± 1.01
XZ 1000	6	74.2 ± 14.0 *	2.96 ± 0.56	2.96 ± 0.56
DHPN+XZ 1000	6	80.7 ± 11.5	3.10 ± 0.30	3.22 ± 0.86

a : mean ± SD.

* : significantly different from the Control group at p<0.05.

Table 4 Histological findings of thyroid gland in rats fed diet containing XZ for 26 weeks with or without DHPN initiation (Exp. I)

Groups	No. of Animals examined	Proliferative lesions				Non-proliferative lesions
		Follicular cell hyperplasia		Follicular cell adenoma		
		incidence ^a	multiplicity ^b	incidence ^a	multiplicity ^b	
Control	10	0	0	0	0	-
DHPN alone	10	20	0.20 ± 0.42	0	0	-
XZ 250	10	0	0	0	0	-
DHPN+XZ 250	15	13	0.20 ± 0.56	0	0	-
XZ 500	10	0	0	0	0	±
DHPN+XZ 500	15	60 [#]	1.20 ± 1.37	7	0.07 ± 0.26	±
XZ 1000	10	0	0	0	0	+
DHPN+XZ 1000	15	100 ^{##}	5.40 ± 2.32 ^{##}	40 [#]	0.47 ± 0.64	+

a : incidence of proliferative lesions (%)

b : mean ± SD.

c : severity of lesions (- negative; ± very slight; + slight)

#, ## : significantly different from the DHPN alone group at p<0.05 and p<0.01, respectively.