

20020978

別添 2

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

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14年度総括報告書

主任研究者 三森国敏

平成15（2003）年 4月7日

別添 3

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	-----	1
三森国敏		
II 分担研究報告書		
1 残留動物医薬品の毒性に関する研究	-----	5
三森国敏		
2 残留動物用医薬品の検査方法の確立	-----	14
松田えり子		
III 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	22
IV 研究成果の刊行物・別刷	-----	23

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 14 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 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

フルメキン（FL）の 62.5 ないし 31.3 mg/kg の単回強制経口投与による DNA 損傷性を新生児マウスおよび 2/3 肝部分切除を行ったマウスにおいて検討したが、いずれも陰性であった。また、ラットを用いて肝イニシエーションアッセイを行ったが、1000 ないし 500 mg/kg の用量では肝イニシエーション活性は認められなかった。その他、マイクロアレイ解析で発現上昇がみられた ERK-5 や PKC ϵ などの mRNA およびリン酸化タンパクの定量を開始した。以上の成績から、FL はラットの肝に対してイニシエーション活性を示さず、マウスに対する FL の DNA 損傷性には閾値（125 と 62.5 mg/kg の間）があり、62.5 mg/kg 以下の投与では遺伝子を傷害しないことが明確となった。

ジサイクラニルについては、最高用量を 200 mg/kg としたマウスを用いたコメットアッセイと、最高用量を 75 mg/kg としたラットを用いた肝イニシエーションアッセイを行ったが、いずれもこれらの投与量では陰性であった。

抗生物質のゲンタマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、ネオマイシンおよび合成抗菌剤のサラフロキサシン、ダノフロキサシンについて畜水産食品中の残留検査法を検討した結果、有用な検査法を確立した。本研究で確立した残留検査法は、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。

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 松田 りえ子
国立医薬品食品衛生研究所 食品部室長

A. 研究目的

抗菌剤のフルメキン（FL）や昆虫成長調節剤のジサイクラニルはマウスの肝臓に対して発がん性を示すことが報告されている。FL は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会（JECFA）において、遺伝毒性を示さず、肝細胞の壊死・再生がみられることから、その発がんは非遺伝毒性メカニズムに起因するものとして許容一日摂取量（ADI）を設定している（WHO、1997）。しかし、最近の報告では、本物質にイニシエーション作用を示唆する成績が得られてい

ることから（Yoshida ら、1999；Takizawa ら、2001）、その発がんメカニズムについてはさらに解明すべき点が残されている。前年度の研究で FL がコメットアッセイにおいて 125 mg/kg 以上の単回強制経口投与により、胃、結腸、膀胱と肝で陽性を示したことから（Kashida ら、2002）、今年度は、新生児マウスおよび 2/3 肝部分切除を行ったマウスに FL を同様に投与し、コメットアッセイにより、FL の DNA 損傷性の閾値を検索した。加えて FL のイニシエーション作用をさらに確認するため、ラットを用いて肝イニシエーションアッセイを行った。その他、肝発癌プロモーションメカニズムをさらに解析するため、FL をマウスに混餌投与し、マイクロアレイ解析で発現上昇がみられた遺伝子の mRNA およびリン酸化タンパクの定量を行った。また、ジサイクラ

ニルによる肝発がんには、肝細胞の壊死と再生の反復による非遺伝毒性メカニズムが関与するものと JECFA は評価し、ADI を設定しているが、そのようなメカニズムを支持する明確な実験は今までになされていない。そこで、今年度は、マウスを用いたコメットアッセイとラットを用いた肝イニシエーションアッセイを行い、ジサイクラニルの遺伝子傷害性ないしイニシエーション活性の有無を検索した。

平成7年12月、平成9年3月、平成11年11月、平成12年6月、平成13年10月、平成14年12月に食品衛生法が改正され、計27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た。本研究では、平成14年12月に残留基準が設定された、抗生物質のゲンタマイシン、スペクチノマイシン及びネオマイシン、合成抗菌剤のサラフロキサシン、ダノフロキサシン、また新たに答申が得られた、抗生物質のストレプトマイシンについて残留検査法を検討した。

B. 研究方法

FL の DNA 傷害性の閾値を検索するため、幼若マウスおよび部分肝切除成熟マウスに 62.5、31.3 ないし 0 mg/kg の FL を単回経口投与し、幼若マウスは投与 3 及び 24 時間後に、部分肝切除成熟マウスは投与後 3 時間に屠殺して、それぞれ摘出した肝臓および再生肝を用いてコメットアッセイを実施した。また、FL のイニシエーション作用を確認するため、2/3 肝部分切除ラットに 1000、500 ないし 0 mg/kg の FL をそれぞれ単回経口投与し、摘出した再生肝における組織学的検討および前癌病変である GST-P 陽性細胞の数と面積を基にイニシエーション作用を評価した。さらに、FL の肝発癌プロモーションメカニズムを解析するため、4000 ppm の FL を 4 週間混餌投与したマウスにおけるマイクロアレイ解析を実施し、発現上昇がみられた ERK-5、PKC ϵ 、Cdk 5、FGF7、Wnt receptor などの mRNA についてはリアルタイム RT-PCR を用いて発現量を解析した。また、ERK-5、PKC ϵ などの細胞内シグナル伝達物質につ

いてはリン酸化タンパクの検出および定量を実施した。

その他、ジサイクラニルの DNA 傷害性検討のため、マウスに 200、100 ないし 0 mg/kg のジサイクラニルを経口投与し、投与 3 及び 24 時間後に屠殺して、摘出した胃、結腸、肝臓、腎臓、膀胱、肺、脳、骨髄の 8 臓器を用いコメットアッセイを実施した。さらに 2/3 肝部分切除ラットに 75 ないし 0 mg/kg のジサイクラニルを経口投与し、摘出した再生肝の用いてイニシエーション作用を検討した。

ゲンタマイシンゲンタマイシン、スペクチノマイシンおよびネオマイシン、は 1.0%メタリン酸で抽出し、オクタデシル化シリカゲルにて精製後、高速液体クロマトグラフィー/質量分析装置による検査法を検討した。また、サラフロキサシンおよびダノフロキサシンは、0.3%メタリン酸-アセトニトリル (6:4) 混液で抽出し、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体にて精製後、高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光度検出による検査法を検討した。

C. 研究結果

FL のコメットアッセイでは、新生児および 2/3 肝部分切除マウスへの 62.5 ないし 31.3 mg/kg の単回投与では陽性結果は得られなかった。肝イニシエーションアッセイでは FL の 1000 ないし 500 mg/kg の単回経口投与では、GST-P 陽性巢面積および個数が対照群に比し増加傾向を示したが、統計学的に有意な差は認められなかった。リアルタイム RT-PCR を用いた肝発癌プロモーションメカニズムの解析に関しては現在解析中である。また、ジサイクラニルの 200 ないし 100 mg/kg の単回経口投与によるマウスにおけるコメットアッセイ、ならびに 75 mg/kg の単回経口投与によるラットにおける肝イニシエーションアッセイはいずれも陰性であった。

残留検査法：ゲンタマイシン、スペクチノマイシンおよびネオマイシンの、牛の筋肉、肝臓に対する添加回収試験の結果は、

筋肉に 0.1~0.5ppm 添加の時、回収率 64~80%、肝臓に 0.5~2.0ppm 添加の時、回収率 69~83%、相対標準偏差は 4.7~8.3% (n=3) であった。なお、本法による定量下限は 0.02ppm であった。また、サラフロキサシンおよびダノフロキサシンの、鶏の筋肉、肝臓に対する添加回収試験の結果は、筋肉に 0.01~0.2ppm 添加の時、回収率 90~95%、肝臓に 0.08~0.4ppm 添加の時、回収率 93~99%、相対標準偏差は 3.3~3.9% (n=3) であった。なお、本法による定量下限は 0.005ppm であった。

D. 考察

FL による DNA 損傷のメカニズムには酸化ストレスが重要であり、FL 誘発肝発癌の重大な因子であると結論づけている。また、FL による DNA 損傷が考えられるもう一つのメカニズムは、DNA トポイソメラーゼに対する抑制作用である。事実、トポイソメラーゼ II 抑制剤は DNA 鎖を損傷し、その結果として DNA の一本鎖及び二本鎖を切断する。コメットアッセイは修復メカニズムによって直接的に生じた DNA 損傷、あるいはアルカリ置換活性病変を通じて生じた DNA 損傷を検出できる。さらにトポイソメラーゼ II 阻害剤による DNA 鎖切断の誘発を検出することが可能である。今回の成績から、FL はラットの肝に対してイニシエーション活性を示さないが、マウスに対しては DNA 損傷性に閾値 (125 と 62.5 mg/kg の間) があり、62.5 mg/kg 以下の投与では遺伝子を傷害しないことが明確となった。しかし、FL の肝イニシエーション作用の原因として、FL のトポイソメラーゼ II 抑制が二次的に DNA の二本鎖を切断することがあげられるが、その両者の関連性を明確にした研究はなされていない。よって、両者の関連性をさらに明確にするための研究が今後必要である。

ジサイクラニルについては、遺伝毒性ないし肝イニシエーション作用はないことが明らかになったことから、その肝発癌メカニズムとして、この物質が有している肝細胞の壊死・再生作用や肝細胞の増殖活性増加作用が肝腫瘍誘発に関与していると

推察される。

抗生物質のゲンタマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシンおよびネオマイシンの残留検査法を開発した。各化合物の定量下限は 0.02ppm 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 64%以上であり、相対標準偏差はいずれの試料も 9%以内であった。また、合成抗菌剤のサラフロキサシンおよびダノフロキサシンの残留検査法も開発した。各化合物の定量下限は 0.005ppm であった。添加回収試験の結果、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。本研究において検査法の一部に LC/MS を採用したが、今後、LC/MS を用いることにより、操作の迅速、簡便性の向上、試験法としての精度の向上が期待される。

E. 結論

FL の 62.5 ないし 31.3mg/kg の単回投与による新生児マウスおよび 2/3 肝部分切除成熟マウスにおけるコメットアッセイ、加えて、1000 ないし 500 mg/kg の単回経口投与によるラットを用いた肝イニシエーションアッセイにより FL の DNA 損傷性および肝イニシエーション活性をそれぞれ検討した結果、FL はラットの肝に対してはイニシエーション活性を示さず、マウスに対しては FL の DNA 損傷性に閾値があり、62.5 mg/kg 以下の投与では遺伝子を傷害しないことが明確となった。また、ジサイクラニルについては、マウスを用いたコメットアッセイとラットを用いた肝イニシエーションアッセイを行ったが、いずれも陰性であり、本物質には遺伝子傷害性はないことが確認された。

抗生物質のゲンタマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン及びネオマイシン、合成抗菌剤のサラフロキサシン、ダノフロキサシンの残留検査法を確立した。

F. 健康危機情報

今回の研究から、FL の DNA 阻害性には閾

値があることが明らかとなった。しかし、遺伝子傷害性発癌物質の可能性が考えられるので、その発癌機序についての更なる研究が必要である。

G. 研究発表

1. 投稿論文

Kashida, Y., Sasaki, Y.F., Ohsawa, K., Nakagawa, S., Takahashi, A., Watanabe, T. and Mitsumori, K.: Mechanistic study on flumequine hepatocarcinogenicity focusing on DNA damage in mice. *Toxicol. Sci.* 69: 317-321. 2002.

2. 学会発表

渡邊隆夫、佐々木有、檜田陽子、高橋明子、三森国敏：フルメキンのマウスにおける肝イニシエーション作用及びDNA損傷性の検討。第29回日本トキシコロジー学会学術年会。2002年6月

高橋明子、佐々木有、新井克彦、檜田陽子、町田登、三森国敏：Flumequineのマウスにおける肝発癌機序に関する研究。第134回日本獣医学会学術集会。2002年9月

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 14 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

—残留動物用医薬品の毒性に関する研究—

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

前年度の研究でフルメキン (FL) がコメットアッセイにおいて 125 mg/kg 以上の単回強制経口投与により、胃、結腸、膀胱および肝で陽性を示したことから、今年度は、新生児マウスおよび 2/3 肝部分切除を行ったマウスに 62.5 ないし 31.3 mg/kg の FL を同様に投与し、コメットアッセイにより FL の DNA 損傷性を検索した。しかし、これらの投与群では陽性結果は得られなかった。また、FL のイニシエーション作用をさらに確認するため、ラットを用いて肝イニシエーションアッセイを行ったが、1000 および 500 mg/kg の用量では肝イニシエーション活性は認められなかった。その他、肝発癌プロモーションメカニズムをさらに解析するため、4000 ppm の FL をマウスに 4 週間混餌投与し、マイクロアレイ解析で発現上昇がみられた ERK-5 や PKC ϵ などの mRNA およびリン酸化タンパクの定量を開始した。以上の成績から、FL はラットの肝に対してイニシエーション活性を示さず、マウスに対しては FL の DNA 損傷性には閾値 (125 と 62.5 mg/kg の間) があり、62.5 mg/kg 以下の投与では遺伝子を傷害しないことが明確となった。ジサイクラニルについては、最高用量を 200 mg/kg としたマウスを用いたコメットアッセイと、最高用量を 75 mg/kg としたラットを用いた肝イニシエーションアッセイを行ったが、いずれもこれらの投与量では陰性であった。

A. 研究目的

抗菌剤のフルメキン (FL) や昆虫成長調節剤のジサイクラニルはマウスの肝臓に対して発がん性を示すことが報告されている。FL は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) において、遺伝毒性を示さず、肝細胞の壊死・再生がみられることから、その発がんは非遺伝毒性メカニズムに起因するものとして許容一日摂取量 (ADI) を設定している (WHO, 1997)。しかし、最近の報告では、本物質にイニシエーション作用を示唆する成績が得られていることから (Yoshida ら、1999 ; Takizawa ら、2001)、その発がんメカニズムについてはさらに解明すべき点が残さ

れている。前年度の研究で FL がコメットアッセイにおいて 125 mg/kg 以上の単回強制経口投与により、胃、結腸、膀胱と肝で陽性を示したことから (Kashida ら、2002)、今年度は、新生児マウスおよび 2/3 肝部分切除を行ったマウスに FL を同様に投与し、コメットアッセイにより、FL の DNA 損傷性の閾値を検索した。また、FL のイニシエーション作用をさらに確認するため、ラットを用いて肝イニシエーションアッセイを行った。その他、肝発癌プロモーションメカニズムをさらに解析するため、FL をマウスに混餌投与し、マイクロアレイ解析で発現上昇がみられた遺伝子の mRNA およびリン酸化タンパクの

定量を開始した。

ジサイクラニルによる肝発がんには、肝細胞の壊死と再生の反復による非遺伝毒性メカニズムが関与するものと JECFA は評価し、ADI を設定しているが、そのようなメカニズムを支持する明確な実験は今までになされていない。そこで、今年度は、マウスを用いたコメットアッセイとラットを用いた肝イニシエーションアッセイを行い、ジサイクラニルの遺伝子傷害性ないしイニシエーション活性の有無を検索した。

B. 研究方法

1) FL のコメットアッセイ：5 週齢の幼若雄 ddY マウス（日本エスエルシー株式会社）を 3 群に分け、62.5、31.3 ないし 0 mg/kg の FL（協和発酵工業株式会社）を単回経口投与した。幼若マウスは処置後 3 及び 24 時間に屠殺し、肝臓を摘出した。もう一つの実験として、8 週齢の雄マウス（日本エスエルシー株式会社）をエーテルで麻酔し、肝臓の主な 3 つの葉である外側左葉、内側左葉及び外側右葉を摘出した。部分肝切除後 4 日目に、マウスに同用量の FL を単回経口投与し、その 3 時間後に屠殺して再生肝を摘出した。摘出した再生肝を遠心し、単離した核より作製したスライドを冷 lysing 溶液に移し（Sasaki ら、2000）、次に冷アルカリ溶液（300 mM NaOH, 1mM Na₂EDTA, pH13）に 0°C、暗所下で 10 分間浸した。電気泳動は 0°C、暗所下で 25 V (0.96 V/cm)、約 250 mA の条件で 15 分間通電した。スライドを中和した後、50 µL の 20 µg/mL エチジウムブロミドで染色し、蛍光顕微鏡を用いて 200 倍の倍率下で 1 スライドあたり 50 個の核を数え、写真撮影を実施した。コメットの長さとして頭部の直径を一匹の 1 臓器あたり 50 個の核について測定し、50 個の核そ

れぞれの長さに対する直径の差として移動を算出した。これを基にそれぞれの臓器における核の平均移動を動物個々に算出した。処置群 4 匹の平均値と非処置群 4 匹の平均値の差を一元配置分散分析後に Dunnett 検定を実施し、有意水準 5 % 以下を有意差ありとした。

2) FL の肝イニシエーションアッセイ：7 週齢の雄の F344 ラット（日本エスエルシー株式会社）にエーテル麻酔下で 2/3 肝部分切除術を施し、その 12 時間後に全個体を 3 群に分け、FL を 1000、500 mg/kg および溶媒である 0.5 %カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）溶液をそれぞれ強制経口投与した。なお投与量は、予備実験において FL の経口 LD50 値である 2000 mg/kg および 1250 mg/kg の投与により死亡例が高率にみられたため、1000 および 500 mg/kg と設定した。投与 2 週間後より 0.015 % の 2-acetylaminofluorene (2-AAF) を含む飼料（日本クレア株式会社にて調製）を 10 日間自由摂取させた。その間、給餌開始 6 日目にコーンオイルにて 2 倍希釈した CCl₄ を 0.8 mL/kg の容量で単回強制経口投与した。さらに 11 日間の休薬期間をおき、全生存動物をエーテルによる深麻酔下で放血屠殺して肝臓を摘出した。摘出直後に尾状葉頭部・尾状葉尾部・外側右葉・尾側右葉の 4 葉より採材し 10 %中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。それらをパラフィンブロック包埋および薄切後にヘマトキシリン・エオシン染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。また同様に作製した切片については、ヒストファイン SAB-PO (R) キット（株式会社ニチレイ）および GST-P 一次抗体（ダコ・ジャパン株式会社）を用いて免疫染色を施した。すなわち、キシレンにて脱パラ後、100 %エタノールにて脱水し、蒸留

水で5分×2回洗浄した。0.5%過ヨウ素酸にて内因性ペルオキシダーゼを失活させた(室温、30分)後、蒸留水で5分×2回、リン酸緩衝食塩水(PBS)で5分×2回洗浄した。非特異的反応を防止するため希釈正常血清でブロッキング(37℃、30分)して希釈正常血清を拭き取った後、0.5%カゼインで1500倍希釈した一次抗体を4℃で12時間反応させた。PBSで5分×5回洗浄して余分な一次抗体を除去した後、希釈ビオチン化二次抗体を37℃で30分反応させた。さらにPBSで5分×5回洗浄した後、ABC試薬を37℃で30分反応させた。PBSで5分×5回洗浄後、DABにて発色させ、超純水にて反応を停止してマイヤーのヘマトキシリンで核染色(室温、20分)を施した。次いで洗浄、脱水、透徹後、ビオライトにて封入した。GST-P免疫染色を施した切片については、画像処理により切片上の肝面積、GST-P陽性肝細胞小増殖巣の面積および数を測定し、対照群とフルメキン投与群との間のF-t検定を実施し、有意水準5%以下を有意差ありとした。

3) FLの肝発癌プロモーションメカニズムの解析: 4000 ppmのFLを雄C3/Heマウス(日本エスエルシー株式会社)に4週間混餌投与し、マイクロアレイ解析で発現上昇がみられたERK-5、PKC ϵ 、Cdk5、FGF7、Wnt receptorなどのmRNAについてリアルタイムRT-PCRを用いてその発現量を解析した。また、ERK-5、PKC ϵ などの細胞内シグナル伝達物質についてはリン酸化タンパクの検出および定量を実施した。

4) ジサイクラニルのコメットアッセイ: 8週齢の雄ddYマウスを4群に分け、200、100ないし0 mg/kgのジサイクラニルを単回経口投与した。マウスを投与3及び24時間後に屠殺して、胃、結腸、肝

臓、腎臓、膀胱、肺、脳、骨髄の8臓器を摘出してコメットアッセイ用のスライドをそれぞれの時間毎に作製した。電気泳動は0℃、暗所下で25V(0.96V/cm)、約250mAの条件で15分間通電した。エチジウムブロミドで染色後、蛍光顕微鏡を用いて写真撮影を実施し、コメットの長さと同部の直径を一匹の1臓器あたり50個の核について測定した。

5) ジサイクラニルの肝イニシエーションアッセイ: 7週齢の雄F344ラットを用いて、2/3肝部分切除により再生性の細胞増殖を誘導させた。肝部分切除12時間後に、75 mg/kgのジサイクラニルまたはCMCを単回経口投与した。試験開始2週間目より2週間0.015% 2-AAF混餌投与と3週目のCCl₄を0.8 mL/kg経口投与を組み合わせたプロモーション処置を行った。試験は5週間で終了し、摘出された肝臓各葉の組織切片を作製した。免疫染色を施した切片上のGST-P陽性巣の数および面積を計測し、ジサイクラニル群と対照群との間のF-t検定を実施し、有意水準5%以下を有意差ありとした。

C. 研究結果

1) FLのコメットアッセイ: 新生児マウスおよび2/3肝部分切除を行ったマウスへの62.5ないし31.3 mg/kgの単回投与では、肝に陽性結果は得られなかった(Table 1, 2)。

2) FLの肝イニシエーションアッセイ: FLの強制経口投与12時間後の時点で、FL 500 mg/kg投与群では10例中4例に、FL 1000 mg/kg投与群では20例中14例に死亡が認められた。その後の実験は、対照群10例、FL 500 mg/kgおよび1000 mg/kg投与群それぞれ6例で継続した。単位面積あたりのGST-P陽性巣面積および個数については、対照群に比しFL投与群で増

加傾向を示したが、統計学的に有意な差は認められなかった (Table 3)。

3) FL の肝発癌プロモーションメカニズムの解析：解析中である。

4) ジサイクラニルのコメットアッセイ：最高用量を 200 mg/kg としたマウスを用いたコメットアッセイでは、いずれの投与量でも陽性結果は得られなかった (Table 4)。

5) ジサイクラニルの肝イニシエーションアッセイ：最高用量を 75 mg/kg としたラットにおける肝イニシエーションアッセイでは、この投与量では陰性であった (Table 5)。

D. 考察

FL が肝発がんプロモーターではあるが、イニシエーターではないと考えられていたのは、*in vitro* での細菌或いは哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験や *in vivo* での哺乳類細胞を用いた染色体異常試験において遺伝毒性を示唆するデータが得られていなかったためである (WHO, 1997)。FL による DNA 損傷のメカニズムに関連して、Yoshida ら (1999) は 8-hydroxy-2' deoxyguanosine (8-OHdG) 染色を実施し、FL 処置したマウス肝臓においてより発現が増強していることを報告しており、酸化ストレスが FL 誘発肝発癌の重大な因子であると結論づけている。FL による DNA 損傷が考えられるもう一つの方法は、DNA トポイソメラーゼに対する抑制作用である。キノロン系抗菌剤は DNA ジャイレース (細菌性トポイソメラーゼ II) やトポイソメラーゼ IV の抑制によって効果を発現するが、生化学的メカニズムやこれら酵素間のアミノ酸配列が類似していること (Lynn ら, 1986) から、二本鎖 DNA の損傷/再結合反応を行っている哺乳動物の真性核に存在するト

ポイソメラーゼ II にもわずかに抑制効果をもつことが知られている (Wang ら, 2001)。事実、トポイソメラーゼ II 抑制剤は DNA 鎖を損傷し、その結果として DNA の一本鎖及び二本鎖を切断することが証明されている (Snyder, 2000)。コメットアッセイは修復メカニズムによって直接的に生じた DNA 損傷、あるいはアルカリ置換活性病変を通じて生じた DNA 損傷を検出することが出来る (Fairbairn ら, 1995)。そしてトポイソメラーゼ II 阻害剤による DNA 鎖切断の誘発を検出することが可能であることも既に報告されている (Godard ら, 1999)。また、トポイソメラーゼ阻害剤であるエトポシドは *in vitro* 及び *in vivo* のコメットアッセイにより、細胞分裂時に DNA 鎖切断を誘導することが示されている (Godard, 1999)。今回の成績から、FL はラットの肝に対してイニシエーション活性は示さないが、マウスに対しては DNA 損傷性に閾値 (125 と 62.5 mg/kg の間) があり、62.5 mg/kg 以下の投与では遺伝子を傷害しないことが明確となった。しかし、FL の肝イニシエーション作用の原因として、FL のトポイソメラーゼ II の抑制が二次的に DNA の二本鎖を切断することがあげられるが、その両者の関連性を明確にした研究はなされていない。よって、両者の関連性をさらに明確にするための研究が今後必要である。

ジサイクラニルについては、遺伝毒性ないし肝イニシエーション作用はないことが明らかになったことから、その肝発癌メカニズムとして、この物質が有している肝細胞の壊死・再生作用や肝細胞の増殖活性増加作用が肝腫瘍誘発に関与していると推察される。

引用文献

- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., and O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339, 37-59.
- Godard, T., Fessard, V., Huet, S., Mourot, A., Deslandes, E., Pottier, D., Hyrien, O., Sichel, F., Gauduchon, P., and Poul, J. (1999). Comparative in vitro and in vivo assessment of genotoxic effects of etoposide and chlorothalonil by the comet assay. *Mutat Res* 444, 103-16.
- Kashida, Y., Sasaki, Y.F., Ohsawa, K., Nakagawa, S., Takahashi, A., Watanabe, T. and Mitsumori, K. (2002). Mechanistic study on flumequine hepatocarcinogenicity focusing on DNA damage in mice. *Toxicol. Sci.* 69: 317-321.
- Lynn, R., Giaever, G., Swanberg, S. L., and Wang, J. C. (1986). Tandem regions of yeast DNA topoisomerase II share homology with different subunits of bacterial gyrase. *Science* 233, 647-9.
- Sasaki, Y. F., Sekihashi, K., Izumiyama, F., Nishidate, E., Saga, A., Ishida, K., and Tsuda, S. (2000). The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Crit Rev Toxicol* 30, 629-799.
- Snyder, R. D. (2000). Use of catalytic topoisomerase II inhibitors to probe mechanisms of chemical-induced clastogenicity in Chinese hamster V79 cells. *Environ Mol Mutagen* 35, 13-21.
- Takizawa, T., Mitsumori, K., Takagi, H., Onodera, H., Yasuhara, K., Tamura, T., and Hirose, M. (2001). Modifying effects of flumequine on dimethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in heterozygous p53 deficient CBA mice. *J Toxicol Pathol* 14, 135-143.
- Wang, H., Mao, Y., Chen, A. Y., Zhou, N., LaVoie, E. J., and Liu, L. F. (2001). Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA damage via a mechanism involving protein thiolation. *Biochemistry* 40, 3316-23.
- WHO (1997). Toxicological evaluation of certain veterinary drugs residues in food. The forty-eighth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). WHO Food Additives Series, No. 39: 63-75.
- Yoshida, M., Miyajima, K., Shiraki, K., Ando, J., Kudoh, K., Nakae, D., Takahashi, M., and Maekawa, A. (1999). Hepatotoxicity and consequently increased cell proliferation are associated with flumequine hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Lett* 141, 99-107.

E. 結論

新生児マウスおよび 2/3 肝部分切除を行ったマウスに 62.5 および 31.3 mg/kg の FL を投与し、コメットアッセイにより FL の DNA 損傷性を検索した結果、これらの投与群では陽性結果は得られなかった。FL のイニシエーション作用をさらに確認するため、ラットを用いて肝イニシエーションアッセイを行ったところ、1000 および 500 mg/kg の用量では、肝イニシエーション活性は認められなかった。以上の成績から、FL はラットの肝に対してはイニシエーション活性を示さず、マウス

に対してはFLのDNA損傷性には閾値があり、62.5 mg/kg以下の投与では遺伝子を傷害しないことが明確となった。ジサイクラニルについては、マウスを用いたコメットアッセイとラットを用いた肝イニシエーションアッセイを行ったが、いずれも陰性であり、本物質には遺伝子傷害性はないことが確認された。

F. 健康危機情報

今回の研究から、FLのDNA阻害性には閾値があることが明らかとなった。しかし、遺伝子傷害性発癌物質の可能性が考えられるので、その発癌機序についての更なる研究が必要である。

G. 研究発表

1. 投稿論文

Kashida, Y., Sasaki, Y.F., Ohsawa, K., Nakagawa, S., Takahashi, A., Watanabe, T. and Mitsumori, K.: Mechanistic study on flumequine hepatocarcinogenicity focusing on DNA damage in mice. *Toxicol. Sci.* 69: 317-321. 2002.

2. 学会発表

渡邊隆夫、佐々木有、樫田陽子、高橋明子、三森国敏：フルメキンのマウスにおける肝イニシエーション作用及びDNA損傷性の検討。第29回日本トキシコロジー学会学術年会。2002年6月

高橋明子、佐々木有、新井克彦、樫田陽子、町田登、三森国敏：Flumequineのマウスにおける肝発癌機序に関する研究。第134回日本獣医学会学術集会。2002年9月

Table 1. Migration of nuclear DNA from liver of infant mice treated with Flumequine.

Species	Dose (mg/kg)	Sampling time (h)	Migration (μm , Mean \pm SE of 4 mice)
			Liver
Infant mouse	0	0	0.80 \pm 0.32
	31.3	3	1.73 \pm 0.54
	62.5	3	1.92 \pm 0.39
	31.3	24	2.57 \pm 0.23
	62.5	24	1.88 \pm 0.32

Table 2. Migration of nuclear DNA from re-generating liver of mice treated with Flumequine.

Species	Dose (mg/kg)	Sampling time (h)	Migration (μm , Mean \pm SE of 4 mice)
			Liver
Mouse	0	3	1.17 \pm 0.44
	31.3	3	0.90 \pm 0.61
	62.5	3	2.80 \pm 0.67

Table 3. Areas and numbers of GST-P positive liver cell foci of rats treated with Flumequine.

Group	Dose (mg/kg)	Number of animals		Area of GST-P positive foci (mm^2/cm^2)	Number of GST-P positive foci (No./ cm^2)
		examined	survived		
Control	0	10	10	0.157 \pm 0.062 ^{a)}	1.280 \pm 0.430
Flumequine	500	10	6	0.167 \pm 0.073	1.452 \pm 0.663
	1000	20	6	0.698 \pm 0.443	1.575 \pm 1.140

a) mean \pm SE

Table 4. Migration of nuclear DNA from organs of mice treated with Dicyclanil by single gavage dosing.

Species	Dose (mg/kg)	Sampling time (h)	Migration (μm , mean \pm SE of 4 mice)							
			Stomach	Colon	Liver	Kidney	Bladder	Lung	Brain	Bone marrow
Mouse	0	3	6.35 \pm 0.52	3.93 \pm 0.58	0.93 \pm 0.34	0.77 \pm 0.29	5.34 \pm 0.94	0.65 \pm 0.37	0.67 \pm 0.46	0.72 \pm 0.45
	100	3	3.87 \pm 0.78	3.20 \pm 0.44	1.19 \pm 0.43	1.03 \pm 0.65	5.40 \pm 1.22	2.32 \pm 0.48	1.24 \pm 0.50	0.72 \pm 0.45
	200	3	6.41 \pm 1.29	4.59 \pm 0.96	2.38 \pm 0.47	1.19 \pm 0.48	4.39 \pm 0.60	1.55 \pm 0.61	0.59 \pm 0.41	0.52 \pm 0.30
Mouse	0	24	6.40 \pm 0.64	5.24 \pm 0.69	0.98 \pm 0.38	1.83 \pm 0.66	6.40 \pm 1.18	3.41 \pm 0.99	1.45 \pm 0.77	0.75 \pm 0.43
	100	24	5.94 \pm 0.77	4.06 \pm 0.66	1.26 \pm 0.42	2.19 \pm 0.37	4.21 \pm 1.18	2.48 \pm 0.32	1.75 \pm 0.38	1.03 \pm 0.43
	200	24	6.33 \pm 1.41	4.49 \pm 0.64	1.71 \pm 0.87	1.63 \pm 0.46	5.52 \pm 1.34	2.22 \pm 0.68	1.80 \pm 1.08	1.88 \pm 0.73

Table 5. Areas and numbers of GST-T positive liver cell foci in rats treated with Dicyclanil.

Group	Dose (mg/kg)	Number of animals examined	Area of GST-P positive foci (mm ² /cm ²)	Number of GST-P positive foci (No./cm ²)
Control	0	9	0.832 ± 0.175 ^{a)}	4.806 ± 0.848
Dicyclanil	75	13	1.230 ± 0.271	7.760 ± 1.681

a) mean ± SE

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書（平成 14 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
－動物用医薬品の検査方法の確立－

分担研究者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部第二室長

研究要旨

動物用医薬品のうち、抗生物質のゲンタマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン及びネオマイシン、合成抗菌剤のサラフロキサシン、ダノフロキサシンについて、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。また検査法の精度は、コーデックス委員会の検査法評価基準を参考に、コーデックス規格レベル濃度（規格レベル）での添加回収試験における回収率と相対標準偏差から評価した。

ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン及びネオマイシンの検査法は、1.0%メタリン酸で抽出し、オクタデシル化シリカゲルにて精製後、高速液体クロマトグラフィー／質量分析装置による検査法を検討した。各化合物の定量下限は 0.02ppm、添加回収試験の結果は平均回収率 64～83%、相対標準偏差は 4.7～8.3%であった。

サラフロキサシン、ダノフロキサシンの検査法は、0.3%メタリン酸-アセトニトリル（6:4）混液で抽出し、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体にて精製後、高速液体クロマトグラフィー／紫外吸光度検出による検査法を検討した。各化合物の定量下限は 0.005ppm、添加回収試験の結果は平均回収率 93～97%、相対標準偏差は 3.3～3.9%であった。

本研究で確立した残留検査法は、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。

A. 研究目的

平成 7 年 12 月、平成 9 年 3 月、平成 11 年 11 月、平成 12 年 6 月、平成 13 年 10 月、平成 14 年 12 月に食品衛生法が改正され、計 27 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た。

本研究では、平成 14 年 12 月に残留基準が設定された、抗生物質のゲンタ

マイシン、スペクチノマイシン及びネオマイシン、合成抗菌剤のサラフロキサシン、ダノフロキサシン、また新たに答申が得られた、抗生物質のストレプトマイシンについて残留検査法を検討した。

検査法の定量下限は、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 から 1/10 を目標とした。

I. ゲンタマイシン, ストレプトマイシン, スペクチノマイシン及びネオマイシンの検査方法の検討

I-B. 研究方法

ゲンタマイシン, ストレプトマイシン, ネオマイシンはアミノグリコシド系抗生物質で, スペクチノマイシンは化学的性質がアミノグリコシド系抗生物質と類似した抗生物質である。これらの抗生物質は, 残留動物用医薬品の従来の検査法で用いられているHPLC-吸光度検出あるいは蛍光光度検出では直接測定が困難である。

畜水産食品中の残留有害物質検査法においては, 微生物学的検査法が規定されているが, 一般に微生物学的検査法においては, ある系の抗生物質が検出された際には, その抗生物質を特定するためのさらなる試験が必要となる。アミノグリコシド系抗生物質の場合, 化合物を特定する手法として, マイクロバイオオートグラフィー, 蛍光誘導体化後 HPLC 等の方法が報告されているが, 畜水産食品中の微量成分に対する信頼性の高い定性, 定量方法としては, HPLC-質量分析法が適している。

本研究においては, 堀江らの方法¹⁾を基にして, HPLC-質量分析法を検討した。

I-B-1. 実験材料

1) 試料

市販されている牛の筋肉, 肝臓及び牛乳を用いた。

2) 試薬

・アセトニトリル (液体クロマトグラフ用)

・ヘプタフルオロ酪酸 (LC/MS 用)
・ヘプタンスルホン酸ナトリウム (イオンペアクロマトグラフィー用)
・メタノール, メタリン酸 (以上試薬特級)

・Bond Elut C18 (500 mg, Varian 製):
メタノール 5 ml, 水 10 ml の順に洗浄してから使用した。

3) 器具及び装置

・遠沈管 (50ml)
・ナス形フラスコ (50ml)
・超高速ホモジナイザー
・遠心分離機
・ロータリーエバポレーター
・高速液体クロマトグラフ (質量分析計付)

I-B-2. 試験方法

1) 試料溶液の調製

a ゲンタマイシン

細切均一化した試料 5 g を採り, 1.0%メタリン酸溶液 25 ml を加えて 2 分間ホモジナイズ (乳は振とう 5 分間) 後, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) した。上清を綿栓ろ過した後, Bond Elut C18 カートリッジに負荷し, 水で洗浄後, メタノール 20 ml で溶出した。溶出液を 40° 以下で減圧乾固した後, 残留物を 0.005 M ヘプタフルオロ酪酸-アセトニトリル (4:1) 1 ml に溶解して試験溶液とした。

b ストレプトマイシン, スペクチノマイシン及びネオマイシン

細切均一化した試料 5 g を採り, 1.0%メタリン酸溶液 25 ml を加えて 2 分間ホモジナイズ (乳は振とう 5 分間) 後, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) した。上清を綿栓ろ過した後, Bond Elut C18 カートリッジに負荷し, 水 5 ml で洗浄した。負荷液, 洗浄液を合

わせて、0.1 M ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 2 ml を加えた。先の Bond Elut C18 カートリッジをメタノール 5 ml ついで水 10 ml で洗浄後、先にヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液を加えた負荷液、洗浄液を負荷した。水 5 ml で洗浄後、メタノール 10 ml で溶出した。溶出液を 40° 以下で減圧乾固した後、残留物を 0.005 M ヘプタフルオロ酪酸-アセトニトリル (9:1) 1 ml に溶解して試験溶液とした。

2) HPLC 条件

- ・高速液体クロマトグラフ: alliance 2690 (Waters 製)
- ・検出器: micromass ZQ システム (Waters 製)
- ・カラム: Cadenza CD-C18 (粒径 3・ μ m, 内径 3 mm×長さ 15 cm, Imtakt 製)
- ・移動相: 0.005 Mヘプタフルオロ酪酸-アセトニトリル (1:9)
- ・流速: 0.4 ml/min
- ・測定質量 (m/z):
 - ゲンタマイシン; 322, 478, 464, 450
 - ストレプトマイシン; 263, 582, 584
 - スペクチノマイシン; 333
 - ネオマイシン; 615
- ・質量分析計条件:
 - 測定方式; ESI+
 - キャピラリ電圧; 3.5kV
 - コーン電圧; 40V
 - エクストラクター電圧; 5V
 - RF レンズ電圧; 0.1V
 - ソース温度; 100°
 - 脱溶媒温度; 350°
 - 窒素ガス流速; コーン 50 l/hr, 脱溶媒 350 l/hr

3) 定量方法

適宜希釈した各標準溶液を、注入量 10 μ l で高速液体クロマトグラフィーにより、ピーク面積による絶対検量線法により定量した。

I-C. 研究結果

1) 試料溶液の調製

検査法の操作条件は、堀江らの方法¹⁾に準じた。

ゲンタマイシンの抽出精製法においては、用いる C18 カラムのロットにより、他のアミノグリコシド系抗生物質とは保持、溶出の挙動が異なる場合があった。検討した結果、抽出溶液を C18 カラムに保持させた後、メタノールで溶出したほうが、より多くのロットにおいて回収率および再現性が優れていることが分かった。

2) 添加回収試験

牛の筋肉、肝臓に対する添加回収試験の結果は、筋肉に 0.1~0.5ppm 添加の時、回収率 64~80%、肝臓に 0.5~2.0ppm 添加の時、回収率 69~83%、相対標準偏差は 4.7~8.3% (n=3) であった。

本法による定量下限は 0.02ppm であった。

ゲンタマイシン定量法フローシート

検体 5 g

1.0%メタリン酸 25 ml
ホモジナイズ 2 分間 (乳は振とう 5 分間)
遠心分離 3,000 rpm, 10 min
綿栓ろ過

ろ液

Bond Elut C18 (500 mg) に負荷
水 5 ml で洗淨
メタノール 20 ml で溶出

溶出液

減圧乾固

残留物

0.005 M ヘプタフルオロ酪酸-アセトニトリル (4:1) 1 ml

高速液体クロマトグラフィー

ストレプトマイシン, スペクチノマイシン及びネオマイシン定量法フローシート

検体 5 g

1.0%メタリン酸 25 ml
ホモジナイズ 2 分間 (乳は振とう 5 分間)
遠心分離 3,000 rpm, 10 min
綿栓ろ過

ろ液

Bond Elut C18 (500 mg) に負荷
水 5 ml で洗淨

負荷液および洗淨液

0.1 M ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 2 ml
先の Bond Elut C18 (メタノール 5 ml, 水 10 ml で洗淨し再利用する) に
負荷

水 5 ml で洗淨
メタノール 10 ml で溶出

溶出液

減圧乾固

残留物

0.005 M ヘプタフルオロ酪酸-アセトニトリル (9:1) 1 ml

高速液体クロマトグラフィー

II. サラフロキサシン, ダノフロキサシンの検査方法の検討

II-B. 研究方法

サラフロキサシン, ダノフロキサシンはニューキノロン系の合成抗菌剤である。

キノロン系合成抗菌剤の分析法としては, モニタリング法 (合成抗菌剤の一斉分析法²⁾) があるが, 臓器等の検査において夾雑物の除去が完全でない場合があるため, より精製能力の高い検査法として堀江らの方法³⁾ を基に検討した。

II-B-1. 実験材料

1) 試料

市販されている鶏の筋肉, 肝臓及び牛乳を用いた。

2) 試薬

- ・アセトニトリル (液体クロマトグラフ用)
- ・ドデシルスルホン酸ナトリウム (イオンペアクロマトグラフィー用)
- ・メタノール, メタリン酸 (以上試薬特級)

・Oasis HLB (60 mg, Waters 製): メタノール 5 ml, 水 10 ml の順に洗浄してから使用した。

3) 器具及び装置

- ・遠沈管 (200ml)
- ・ナス形フラスコ (50, 200ml)
- ・超高速ホモジナイザー
- ・ロータリーエバポレーター
- ・高速液体クロマトグラフ (紫外吸光度検出器付)

II-B-2. 試験方法

1) 試料溶液の調製

細切均一化した試料 5 g を採り, 0.3% メタリン酸-アセトニトリル (6:4) 100 ml を加えて 2 分間ホモジナイズ後, ハイフロスーパーセルを敷いて吸引ろ過した。ろ液を Oasis HLB カートリッジに負荷し, 水 10 ml で洗浄後, メタノール 10 ml で溶出した。溶出液を 40° 以下で減圧乾固した後, 残留物を 0.005 M ドデシルスルホン酸ナトリウム含有 0.05 M リン酸緩衝液 (pH2.5) -アセトニトリル (7:3) 1 ml に溶解して試験溶液とした。

2) HPLC 条件

- ・高速液体クロマトグラフ: alliance 2690 (Waters 製)
- ・検出器: 996 Photodiode Array Detector (Waters 製)
- ・カラム: Wakosil-II 5C18 HG, 4.6 mm ID×150 mm (和光純薬工業製)
- ・移動相: 0.005 M ドデシルスルホン酸ナトリウム含有 0.05 M リン酸緩衝液 (pH2.5) -アセトニトリル (7:3)
- ・流速: 1.0 ml/min
- ・測定波長: 280 nm

3) 定量方法

適宜希釈した各標準溶液を, 注入量 10 µl で高速液体クロマトグラフィーにより, ピーク面積による絶対検量線法により定量した。

II-C. 研究結果

1) 試料溶液の調製

検査法の操作条件は, 堀江らの方法³⁾ に準じた。

2) 添加回収試験

鶏の筋肉, 肝臓に対する添加回収試験の結果は, 筋肉に 0.01~0.2ppm 添加の時, 回収率 90~95%, 肝臓に 0.08