

2003/207

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15年度総括報告書

主任研究者 三森 国敏

平成16（2004）年3月31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	-----	17
	松田えり子		
III	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	28
IV	研究成果の刊行物・別刷	-----	29

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 15 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

前年度の研究でフルメキン(FL)の肝発がんプロモーションメカニズム解析として、FLを4週間混餌投与したマウス肝組織のマイクロアレイ解析を実施し、本年度は発現変動がみられた遺伝子について、1、4および8週間FLを混餌投与したマウスの肝組織を用いた定量的解析によりその発現変動を確認した。その結果、GST $\alpha$ 、GST $\mu$ 、ERK5、MEK5、BTG1、PKC $\epsilon$ 、CDK5R、ERK6の発現上昇およびCYP2E1、NIP3の発現減少がみられた。また、タンパクレヘルでの変動解析では、ERK5に時間依存的なタンパクの増加が認められた。以上の成績から、FLのマウスに対する肝発がんプロモーションメカニズムには、細胞増殖活性の亢進、アポトーシスの抑制および酸化ストレスの関与が示唆された。

ジサイクラニル(DC)については、肝発がんプロモーションメカニズムを解析するため、DCをマウスに2週間混餌投与し、マイクロアレイ解析を実施した。さらに、DMNによるイニシエーション処置を施した2/3肝部分切除マウスにDCを7週間混餌投与しプロモーション作用を検討した結果、GGT陽性細胞の増加とともに、CYP1A1、1A2、GST $\mu$ およびTrxR1など遺伝子の発現上昇が、2週間投与実験と同様に認められた。以上の成績より、DCには肝発がんプロモーション作用があり、その肝発がんメカニズムには酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。

合成抗菌剤カルバドックス代謝物、エンロフロキサシン、シプロ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(DC)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おり、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、FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会(JECFA)において、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。しかし、最近の報告では、FL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、これまで非遺伝毒性に起因するとされてきた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。また、FLの肝発がんプロモーションメカニズムを解析するため、FLを4週間混餌投与したマ

ウスの肝組織を用いてマイクロアレイにより解析した結果、GST、ERK、MEK、CDK、CYPなどの mRNA 発現変動がみられた。そこで本年度は、FL を 1、4 および 8 週間混餌投与したマウス肝組織を用い、これらの遺伝子について確認実験を実施した。また、これらの遺伝子および一部のタンパクを定量解析し、経時的な変動を観察した。DC については、前年度の研究において、DC の DNA 損傷性ならびにイニシエーション活性がいずれも陰性であり、DC の肝発がんには非遺伝毒性メカニズムが関与することが示唆された。そこで今年度は、DC の非遺伝毒性発がんメカニズムを解明するため、DC を 2 週間混餌投与したマウスの肝組織を用いたマイクロアレイ解析を実施した。また、マウスを用いた二段階肝発がんモデルに対する DC 投与による肝発がんメカニズムについても検討した。

また、食の安全を確保するためには、国内の試験検査機関において実施可能な信頼性の高い試験法が必須である。本研究では、公定試験法として汎用性、信頼性の高い試験法の開発を目的として研究を実施した。畜産物に残留するカルバトックスについては、食品衛生法においてすでに残留基準値および試験法が規定されているが、その残留形態および毒性評価において新たな知見が示され、残留基準値および試験法の改訂が求められている。これに対応すべく、カルバトックスおよび代謝物の試験法の検討を行った。また、養殖ウナギに使用されるおそれのある、キノロン系合成抗菌剤の試験法についても検討した。

## B 研究方法

FL の発がんプロモーションメカニズムの検討として、FL を単独投与した C3H/He マウス肝を用いたマイクロアレイ解析で変動がみられた遺伝子について、リアルタイム RT-PCR を用いた定量解析を行った。さらに、FL を C3H マウスに 1、4、8 週間投与したマウスの肝臓を用いて、遺伝子の変動について経時的な定量解析を行った。また、GST $\alpha$  および ERK5 についてはウエスタンブロッティングによるタンパクレベル

の定量を実施した。

DC の非遺伝毒性発がんメカニズムに関する検討として、DC を 2 週間混餌投与した ICR マウス肝を用いマイクロアレイ解析を行った。これらの解析で変動が見られた遺伝子に関しては RT-PCR を用いた半定量解析を実施した。さらに、DC のプロモーションメカニズムを解明するため、マウスを用いた二段階肝発がんモデルに 7 週間 DC を混餌投与し、そのプロモーション作用の検討および 2 週間投与試験で変動がみられた遺伝子についてリアルタイム RT-PCR を用いた定量解析を行った。

キノロン系合成抗菌剤のエンロフロキサシン、シプロフロキサシンについて、ウナギおよびウナギ加工食品中の残留物をモニタリング検査法(合成抗菌剤の一斉分析法) および食品衛生法の食品・添加物等の規格基準中のサラフロキサシンおよびタノフロキサシン試験法によりそれぞれ検討した。また市販されている豚の筋肉、肝臓に残留しているカルバトックスおよび代謝物については、食品衛生法に規定されているキノキサリン-2-カルボン酸試験法をもとにして、複数の測定条件により定量下限を引き下げるべく検討した。

## C 研究結果

FL を投与したマウス肝組織中 mRNA を用いたマイクロアレイ解析の確認試験をリアルタイム RT-PCR 法を用い実施した結果、GST $\alpha$ 、GST $\mu$ 、CEK5R、FGF7、ERK5、MEK5、BTG1、MEK5、ERK6 の増加および LMP7、CYP2E1、NIP3、TDAG51 の発現減少が確認された。さらに、ERK5 の経時的な発現増加がタンパクレベルでも確認された。

また、DC の 2 週間混餌投与した肝組織中 mRNA を用いたマイクロアレイ解析により CYP1A1、CYP1A2、GST $\mu$ 、TrxR1 などの薬物代謝および酸化ストレス関連遺伝子の発現増加がみられ、これらの変動は DC を投与したマウス二段階肝発がんモデルでも認められた。さらにマウス前がん病変マーカーである  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) 陽性細胞巢の顕著な増加も認めら

れた。

エンロフロキサシン、シプロフロキサシンの残留検査法を開発し、各化合物の定量下限は 0.01 ppm であった。さらに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 3% 以内であった。また、キノキサリン-2-カルボン酸の残留検査法を開発し、その定量下限は豚の筋肉で 0.001 ppm、肝臓で 0.005 ppm 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。

#### D 考察

これまでの研究から、FL は肝発がんにおいて、イニシエーション作用とプロモーション作用の両方を有する可能性が示唆されている。今回の研究では、プロモーション作用に関わると思われる mRNA の変動について検討した。その結果、GST $\alpha$ 、GST $\mu$  等のストレス応答遺伝子および ERK5 等の MAP キナーゼ類の mRNA 増加が顕著であった。ERK5 については、ウエスタンブロッティングにおいても mRNA と同様、経時的な増加傾向が認められた。本成績は、FL 投与による直接的な酸化ストレスに対して ERK5 を主とした MAP キナーゼシグナル伝達系が活性化し、GST $\alpha$ 、GST $\mu$  等の特異的なストレス応答遺伝子が過剰発現しているものと考えられた。また、酸化的ストレスが FL 誘発肝発がんの重大な因子であるとの報告もある。従って、FL 処置による酸化的ストレスが肝発がん過程において、イニシエーションおよびプロモーションの両方に関わる可能性が考えられた。

ジサイクラニルについても、プロモーション作用を認めると共に、その発がんメカニズムには酸化的ストレスが関与する可能性を示す成績が得られた。DC には直接的な DNA 損傷性が認められていないことから、その発がんメカニズムには長期投与による慢性的な酸化的ストレスに起因した二次的な DNA 傷害、細胞増殖活性亢進などの可能性が考えられるか、その詳細については不明であり、更なる検討が必要であると

思われる。

合成抗菌剤であるエンロフロキサシン、シプロフロキサシンの残留検査法を開発した。本検査法はウナキおよびウナキ加工食品への適用が可能であったか、ウナキ蒲焼きはタレの部分が混入すると夾雑物が多くなり、目的物ピークの測定を妨害し、測定値の再現性が低くなる傾向がみられた。一方、抗生物質カルハドックスの代謝物であるキノキサリン-2-カルボン酸の残留検査法を開発し、本法によりその定量下限を、豚筋肉中で 0.001 ppm、豚肝臓中で 0.005 ppm と、従来法の 1/5 まで引き下げることができた。今回確立したこれら方法は、残留検査法として有用であると考えられる。

#### E 結論

FL を混餌投与したマウスの肝組織を用いてマイクロアレイにより解析した結果、GST、ERK、MEK、CDK、CYP など細胞増殖、アポトーシス、および酸化的ストレス関連遺伝子の mRNA 発現変動が確認された。また、1、4 および 8 週間混餌投与したマウス肝においてもこれら遺伝子ならびに一部タンパクの発現変動が確認された。以上の成績より、FL の肝発がんプロモーションメカニズムには細胞増殖活性の亢進、アポトーシスの抑制、酸化的ストレスの関与が示唆された。

DC については、2 週間混餌投与したマウスの肝組織を用いたマイクロアレイ解析により CYP1A1、1A2、GST $\mu$  などの薬物代謝および酸化的ストレス関連遺伝子の mRNA 発現増強が確認され、これらは、マウス二段階肝発がんモデルにおいても発現増強が認められた。また、同モデルでは GGT 陽性細胞巣が有意に増加し、DC のプロモーション作用が認められた。以上の成績より、DC による肝発がんメカニズムには、酸化的ストレス関与の可能性が示唆された。

残留動物用医薬品の検査方法に関する研究としては、合成抗菌剤エンロフロキサシン、シプロフロキサシンおよび抗生物質カルハドックスの代謝物キノキサリン-2-

カルボン酸の検査法をそれぞれ確立した。

F 健康危機情報  
特になし

G 研究発表

1 投稿論文

Moto M, Sasaki YF, Okamura M, Fujita M,  
Kashida Y, Machida N, Mitsumori K  
Absence of *in vivo* genotoxicity and  
liver initiation activity of dicyclanil  
J Toxicol Sci 2003 28 173-179

2 学会発表

Watanabe T, Kashida Y, Sasaki YF,  
Takahashi A, Mitsumori K Does  
flumequine have a promoting effects on

liver in mice ? Society of Toxicology,  
42nd annual meeting March, 2003

Moto M , Okamura M , Mutoh T , Watanabe  
T , Kashida Y , Machida N , Mitsumori K  
Mechanistic study using cDNA microarray  
on enhanced hepatocarcinogenesis in ICR  
mice fed diet containing dicyclanil 第  
20 回日本毒性病理学会 / 第 5 回国際毒性  
病理学会合同国際会議 2004 年 2 月

樫田陽子, 高橋明子, 新井克彦, 町田登,  
三森国敏 フルメキンのマウス肝発がん  
におけるプロモーション作用の検討, 第 137  
回日本獣医学会学術集会 2004 年 4 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 15 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) の肝発がんプロモーションメカニズム解析として、4000 ppm の FL を 4 週間混餌投与したマウス肝組織のマイクロアレイ解析を実施し、GST $\alpha$ 、GST $\mu$ 、ERK5、MEK5、BTG1、PKC $\epsilon$ 、CDK5R、ERK6 の発現上昇および CYP2E1、NIP3 の発現減少がみられた。本年度は、これら遺伝子の発現変動を確認するため、1、4 および 8 週間 FL を混餌投与したマウスの肝組織を用い、リアルタイム PCR により定量解析した結果、これら遺伝子の発現変動が確認された。また、GST $\alpha$  および ERK5 についてタンパクレベルの変動を解析した結果、ERK5 では mRNA と同様、時間依存的なタンパクの増加が認められたが、GST $\alpha$  の変動は明らかではなかった。以上の成績から、FL のマウスに対する肝発がんプロモーションメカニズムには細胞増殖活性の亢進、アポトーシスの抑制、酸化ストレスが関与していることが示唆された。

ジサイクラニル (DC) については、前年度の研究でイニシエーションアッセイが陰性であり、DC によるマウスにおける肝発がんにはプロモーション作用の関連性が推察された。今年度は DC による肝発がんプロモーションメカニズムを検索するため、まず 1500 ppm の DC をマウスに 2 週間混餌投与し、マイクロアレイ解析を実施した。その結果、CYP1A1、1A2、GST $\mu$  および TrxR1 など遺伝子の発現上昇が認められた。さらに、DMN によるイニシエーション処置を施した 2/3 肝部分切除マウスに 1500 ppm の DC を 7 週間混餌投与しプロモーション作用を検討した結果、GGT 陽性細胞の増加とともに、これら遺伝子の発現上昇が認められた。以上の成績より、DC にマウス肝発がんに対するプロモーション作用を認めると共に、そのメカニズムには酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。

## 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 (DC) 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、FL 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 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 (Kashida ら、2002)。また、FL の肝発がんプロモーションメカニズムを解析するため、FL を 4 週間混餌投与したマウスの肝組織を用いてマイクロアレ

イにより解析した結果、GST、ERK、MEK、CDK、CYPなどのmRNA発現変動がみられた。そこで本年度は、これらの遺伝子について、リアルタイムRT-PCRを用いた確認を実施した。また、FLを1、4および8週間混餌投与したマウス肝組織においてもこれら遺伝子およびタンパクを定量し、経時的な変動を観察した。

一方、DC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。前年度の研究において、DCのDNA損傷性ならびにイニシエーション活性がいずれも陰性であり(Motoら、2003)、DCの肝発がんには非遺伝毒性メカニズムの関与が推察された。そこで今年度は、DCの非遺伝毒性発がんメカニズムを解明するため、DCを2週間混餌投与したマウスの肝組織を用いたマイクロアレイ解析を実施した。また、マウスを用いた二段階肝発がんモデルに対するDC投与による肝発がんメカニズムについても検討した。

## B 研究方法

1) 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C3H/Heマウス(日本エスエルシー株式会社)1匹に4週間投与し、エーテル麻酔下にて動物を放血屠殺し、肝臓を摘出した。基礎食のみを与えたマウス1匹を対照動物とし、同様に屠殺、肝臓を摘出した。これらの肝組織よりmRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行い(前年度実施)、発現上昇がみられたGST、FGF7、ERK等、10遺伝子および発現減少が見られたCYP、NIP3等、4遺伝子についてリアルタイムRT-PCRによる発現量の定量的解析を実施した。さら

に、雄C3H/HeマウスにFL 4000ppmを1(2匹)、4(3匹)および8週間(3匹)混餌投与した。基礎食のみを与えたマウスを対照動物とした。投与終了の各時点で肝臓を採取、mRNAを抽出して、マイクロアレイ解析で変動が見られた遺伝子についてリアルタイムRT-PCRによる定量解析を行った。また、GST $\alpha$ およびERK5についてはウエスタンブロッティングによるタンパクレベルの定量を実施した。

2) DC投与したマウス肝組織mRNAを用いたマイクロアレイ解析 5週齢の雄ICRマウス(日本エスエルシー株式会社)に1500ないし0 ppmのDCを14日間混餌投与した。投与終了後、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、mRNAを抽出してマイクロアレイ解析(Atlas mouse 38 I microarray, クロンテック社)を行った。

3) マウス二段階肝発がんモデルに対するDC投与による肝発がんメカニズムの検討 5週齢の雄ICRマウス(日本エスエルシー株式会社)に5 mg/kgのニトロソジメチルアミンを単回腹腔内投与してイニシエーション処置を施した。処置1週間後よりDCの1500ないし0 ppm混餌投与を開始した。混餌投与開始2週目に再生性の細胞増殖を誘導させるためエーテル麻酔下で2/3肝部分切除術を施し、その後5週間(合計7週間)混餌投与を行った。投与終了後に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、肝組織の一部は10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し組織学的検索用に、一部は凍結切片用に包埋して組織化学染色用に、一部は液体窒素に凍結させmRNA抽出用にそれぞれ保存した。組織学的検索は、固定生検材料を常法に従いパラフィン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。組織学的検索として  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) 染色を実施した。すなわち、7  $\mu$ m に薄切した切片を乾燥およびメタノールにて固定後、43°C に設定した伸展機上で GMNA を含有した基質液で 40 分間、43°C で反応させた。反応終了後、生理食塩液で洗浄し、0.1 M 硫酸銅水溶液に 2 分間浸漬した。生理食塩水で洗浄後、ヘマトキシリンで核染色および 10% クリセリンで封入し、単位面積当たりの GGT 陽性細胞数を計測した。mRNA の抽出は前述と同様に実施し、14 日間投与実験において変動がみられた主な遺伝子について RT-PCR を用いて発現変動を確認した。統計解析は、対照群と DC 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。

### C 研究結果

1) FL の肝発癌プロモーションメカニズムの解析 マイクロアレイの確認試験をリアルタイム RT-PCR 法を用い実施した結果、FL 4000ppm を 4 週間混餌投与したマウスの肝臓で、GST $\alpha$ 、GST $\mu$ 、CEK5R、FGF7、ERK5、MEK5、BTG1、MEK5、ERK6 の増加および LMP7、CYP2E1、NIP3、TDAG51 の発現減少が確認された (Table 1)。また、1、4 および 8 週間の FL 投与による経時的变化を検討した結果、GST $\alpha$ 、GST $\mu$ 、CEK5R、FGF7、ERK5、CDK5R の有意な増加および CYP2E1 の有意な減少が認められ、特に GST $\alpha$ 、GST $\mu$ 、ERK5、および CYP2E1 の変動が全ての時点において顕著であった (Fig 1)。さらに、ウエスタンブロッティングによるタンパクの解析では、ERK5 は mRNA と同様、経時的な増加傾向が認められたが、GST $\alpha$  の増加は明らかではなかった (Fig 2)。

2) DC 投与したマウス肝組織 mRNA を用いたマイクロアレイ解析 DC の 2 週間混餌投与した肝組織中 mRNA を用いたマイクロ

アレイ解析により CYP1A1、CYP1A2、GST $\mu$ 、TrxR1 などの薬物代謝および酸化ストレス関連遺伝子の発現増加がみられ、これらの発現を RT-PCR により確認した結果、マイクロアレイでの結果とおおむね類似した mRNA 発現が認められた (Table 2)。

3) マウス二段階肝発がんモデルに対する DC 投与による肝発がんメカニズムの検討 対照群に比し DC を投与したマウスの肝において GGT 陽性細胞数が有意に増加した (Fig 3)。また、これら肝組織中 mRNA についてリアルタイム RT-PCR 法により検証した結果、CYP1A1、CYP1A2、GST $\mu$  および TrxR1 の mRNA 発現増加が認められた (Fig 4)。

### D 考察

これまでの研究から、FL は肝発癌において、イニシエーション作用とプロモーション作用の両方を有する可能性が示唆されている。そこで今回の研究では、プロモーション作用に関わると思われる mRNA の変動について、マイクロアレイ解析、リアルタイム RT-PCR およびウエスタンブロッティングを用いて検討した。その結果、GST $\alpha$ 、GST $\mu$  等のストレス応答遺伝子および ERK5 等の MAP キナーゼ類の mRNA 増加が顕著であった。ERK5 については、ウエスタンブロッティングにおいても mRNA と同様、経時的な増加傾向が認められた。GST $\alpha$  については、mRNA の顕著な増加とは対照的に、タンパクレベルの増加は認められなかった。代謝過程で活性酸素種を産生する CYP450 酵素類については増加がみられずむしろ減少傾向であったことから、FL による直接的な酸化ストレスに対して ERK5 を主とした MAP キナーゼシグナル伝達系が活性化し、GST $\alpha$ 、GST $\mu$  等の特異的なストレス応答遺伝子が過剰発現しているものと考えられた。Yoshida ら (1999) は FL による DNA 損傷のメカニズムに関連して、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誘発肝発がんの重大な因子であると結論づけている。従って、FL 処置による酸化ストレスは肝発がんにおいて、イニシエーションおよびプロモーションの両方に関わる可能性が考えられた。

シサイクラニルについては、昨年の我々の研究で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の関与が推察されている (Moto ら、2003)。今回、DC の投与によって正常マウスならびにイニシエーション処理を施した 2/3 肝切除マウスの肝臓では薬物代謝酵素群である CYP 1 A1、1 A2 および GST $\mu$ 、酸化ストレス関連酵素である TrxR1 の mRNA の発現増加が認められた。これらの成績は、DC の投与により薬物代謝の第一相酵素である CYP1A1、1A2、第二相酵素である GST の活性化され、これら酵素の働きにより DC が代謝・排泄されている可能性を示唆している。さらに、これら反応は酸化還元反応を介しており、この代謝経路の活性化により過酸化水素や反応性活性酸素種が生成されることされている。

(Nishikawa ら、2002, Puntarulo ら、1997)。また、TrxR1 は、酸化ストレスの応答酵素である酸化型 Trx の還元酵素であるが、今回認められた TrxR1 の mRNA 発現増加は、酸化ストレスにより増加した酸化型 Trx を還元型に戻すための生体応答であるものと考えられる。酸化ストレスは、肝がんを誘発する化学物質であるヒ素やダイオキシンなどでも認められており、肝発がん過程への関連性が明らかにされつつある (Shen ら、2003,

Senft ら、2002)。さらに今回、二段階肝発がんモデルにおいて DC 投与により前がん病変マーカーである GGT 陽性細胞巢の顕著な増加が認められ、DC による肝発がんプロモーション作用が認められた。これらを考慮すると、今回の成績は、DC 投与により生じた酸化ストレスが肝発がんメカニズムに関与している可能性を示唆するものと考えられる。DC の長期投与による慢性的な酸化ストレスが、二次的な DNA 傷害、細胞増殖活性などに影響を及ぼしている可能性が考えられるが、その詳細については未だ不明であり、更なる検討が必要であると思われる。

#### 引用文献

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

Moto M, Sasaki YF, Okamura M, Fujita M, Kashida Y, Machida N, Mitsumori K (2003) Absence of *in vivo* genotoxicity and liver initiation activity of dicyclanil *J Toxicol Sci*, 28, 173-179

Nishikawa T, Wanibuchi H, Ogawa M, Kinoshita A, Morimura K, Hiroi T, Funae Y, Kishida H, Nakae D, Fukushima S (2002) Promoting effects of monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and trimethylamine oxide on induction of rat liver preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci A possible reactive oxygen species mechanism *Int J*

Cancer, 100, 136-139

Puntaruto S, Cederbaum AI (1997) Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes Free radical Biol Med, 24, 1324-1330

Shen J, Wanibuchi H, Salim EI, Weil M, Kinoshita A, Yoshida K, Endo G, Fukushima S (2003) Liver tumorigenicity of trimethylarsine oxide in male Fischer 344 rats - association with oxidative DNA damage and enhanced cell proliferation Carcinogenesis, 24, 1827-1835

Senft AP, Dalton TP, Nebert DW, Genter MB, Hutchinson RJ, Shertzer HG (2002) Dioxin increases reactive oxygen production in mouse liver mitochondria Toxicol Appl Pharmacol, 178, 15-21

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

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, 39, 63-75

Yoshida M, Miyajima K, Shiraki K, Ando J, Kudoh K, Nakae D, Takahashi M,

Maekawa A (1999) Hepatotoxicity and consequently increased cell proliferation are associated with flumequine hepatocarcinogenesis in mice Cancer Letter, 141, 99-107

## E 結論

FL を 4 週間混餌投与したマウスの肝組織を用いてマイクロアレイにより解析した結果、GST、ERK、MEK、CDK、CYP などの mRNA 発現変動が確認された。また、FL を 1、4 および 8 週間混餌投与したマウス肝においてもこれら遺伝子の発現変動が確認された。以上の成績より FL の肝発がんプロモーションメカニズムには酸化ストレスが関与する可能性が示唆された。

DC については、2 週間混餌投与したマウスの肝組織を用いたマイクロアレイ解析により CYP1A1、1A2、GST $\mu$  などの薬物代謝および酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現増強が確認され、これらは、マウス二段階肝発がんモデルにおいても発現増強が認められた。また、同モデルでは GGT 陽性細胞巢が有意に増加し、DC のプロモーション作用が認められた。以上の成績より、DC による肝発がんメカニズムには、酸化ストレス関与の可能性が示唆された。

## F 健康危機情報

特になし

## G 研究発表

### 1 投稿論文

Moto M, Sasaki YF, Okamura M, Fujita M, Kashida Y, Machida N, Mitsumori K  
Absence of in vivo genotoxicity and liver initiation activity of dicyclanil J Toxicol Sci 2003 28 173-179

### 2 学会発表

Watanabe T, Kashida Y, Sasaki YF,

Takahashi A, Mitsumori K Does flumequine have a promoting effects on liver in mice? Society of Toxicology, 42nd annual meeting March, 2003

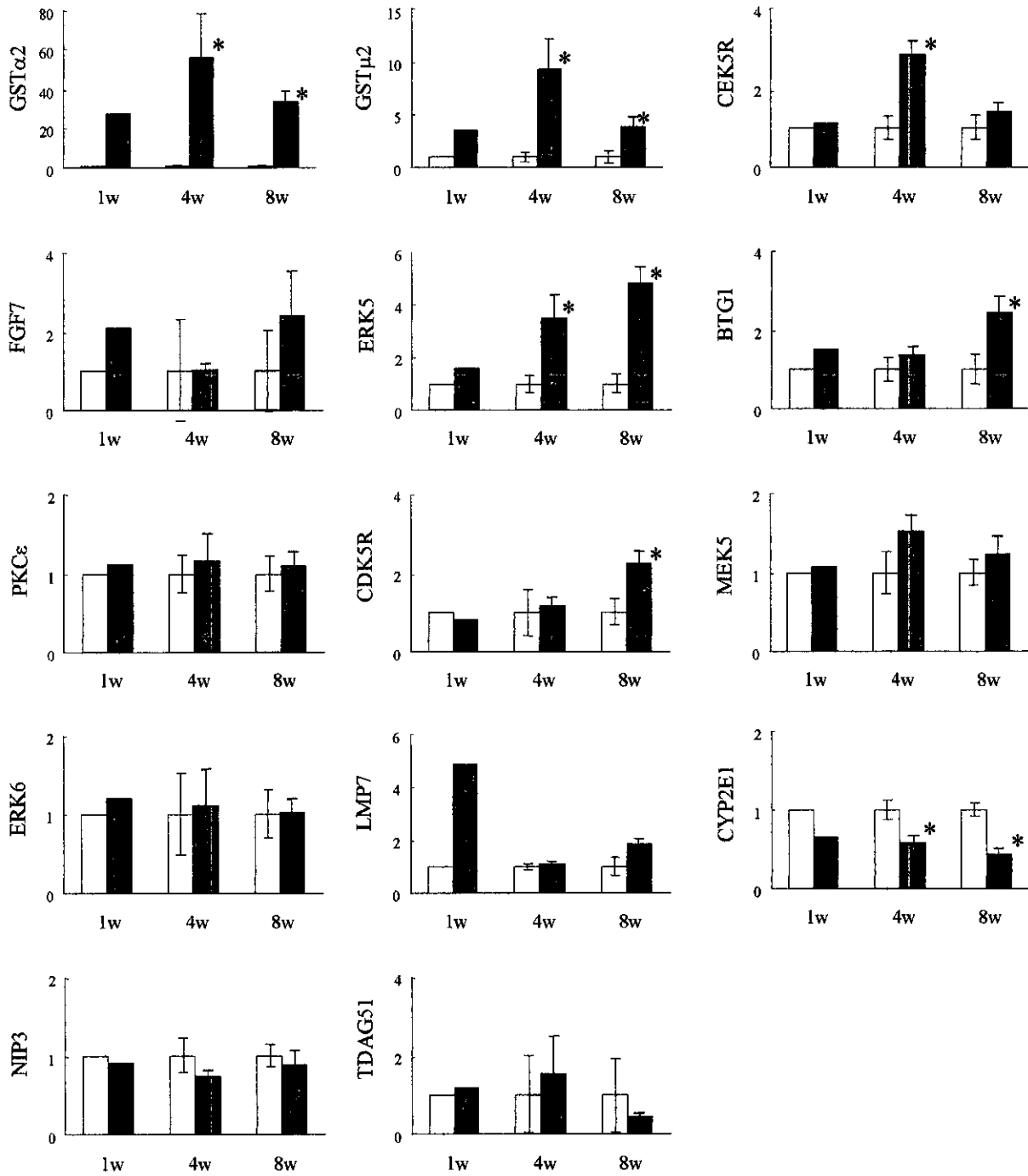
Moto M, Okamura M, Mutoh T, Watanabe T, Kashida Y, Machida N, Mitsumori K Mechanistic study using cDNA microarray on enhanced hepatocarcinogenesis in ICR mice fed diet containing dicyclanil 第20回日本毒性病理学会／第5回国際毒性病理学会合同国際会議 2004年2月

榎田陽子, 高橋明子, 新井克彦, 町田登, 三森国敏 フルメキンのマウス肝発がんにおけるプロモーション作用の検討, 137回日本獣医学会学術集会 2004年4月

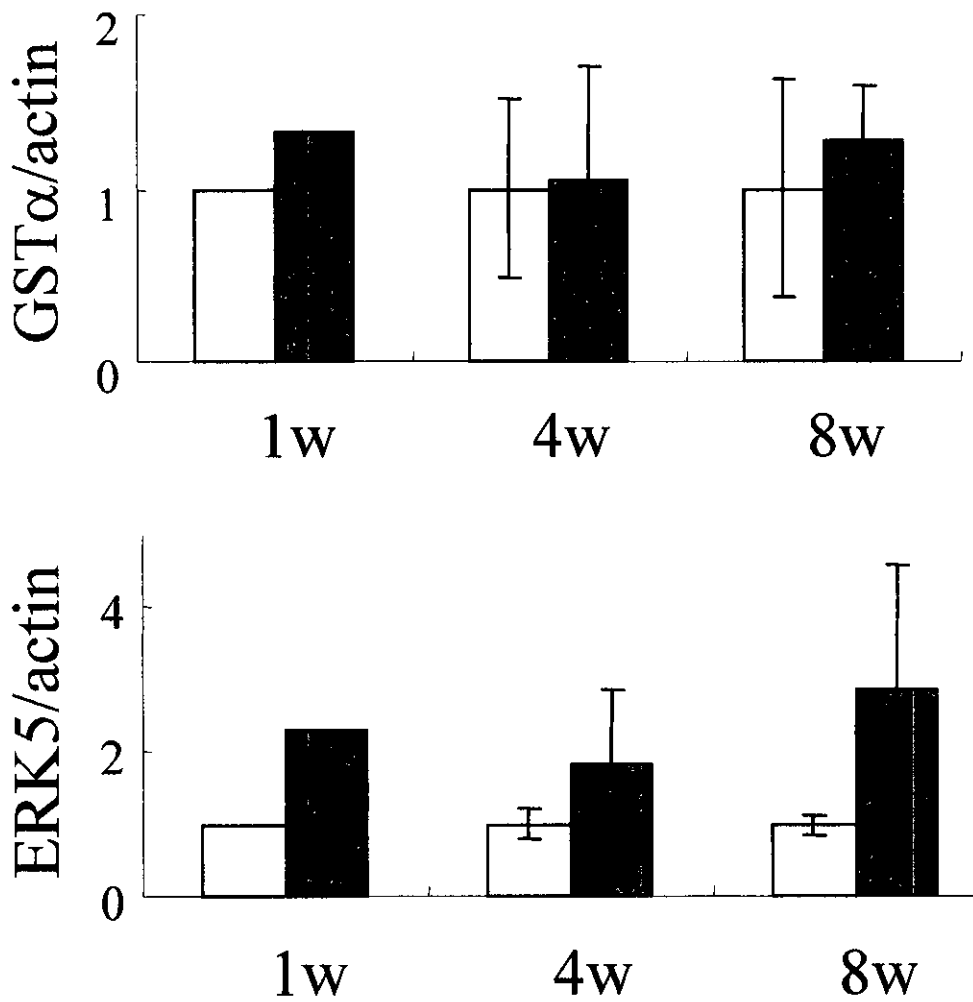
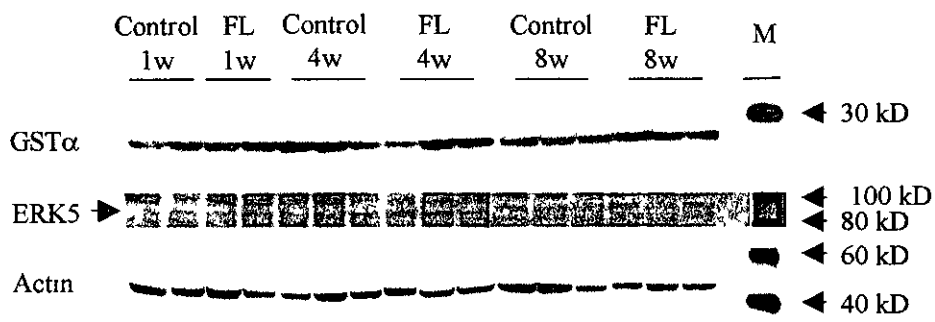
**Table 1 Gene expression analyses by cDNA microarray (Atlas mouse 1.2 cancer array) and real time RT-PCR in the liver of male mice fed flumequine for 4 weeks**

GenBank acc No	Gene name	Abbreviations	Function	Fold change	
				Microarray	Realtime RT-PCR
J03958	Glutathione S-transferase alpha 2	GST $\alpha$	Xenobiotic metabolism, stress response	8.8	22.47
J04696	Glutathione S-transferase mu 2	GST $\mu$	Xenobiotic metabolism, stress response	4.3	3.69
U12983	Cek 5 receptor protein tyrosine kinase ligand	CEK5R	Signal transduction	3.7	1.95
Z22703	Fibroblast growth factor 7	FGF7	Signal transduction	3.1	1.71
U25278	Extracellular signal-regulated kinase 5	ERK5	Signal transduction	2.9	2.17
L16846	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	BTG1	Cell cycle regulation	2.8	1.22
AF028009	Protein kinase C epsilon	PKC $\epsilon$	Signal transduction	2.4	0.79
S82819	Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit	CDK5R	Cell cycle regulation	2.4	0.90
M93275	Adipose differentiation related protein		Extracellular transport/carrier protein	2.2	-
U43205	Frizzled homolog 3		Signal transduction	2.2	-
U25265	Mitogen-activated protein kinase kinase 5	MEK5	Signal transduction	2.1	1.07
Y13439	Extracellular signal-regulated kinase 6	ERK6	Signal transduction	2.1	1.06
M81483	Protein phosphatase 3 catalytic subunit beta isoform		Signal transduction	2.0	-
X55023	Heat shock 60-kDa protein		Protein processing, stress response	2.0	-
M13926	Granulocyte colony-stimulating factor		Signal transduction	2.0	-
X64449	Large multifunctional protease 7	LMP7	Protein turnover	0.29	0.57
L11650	Cytochrome P450 IIE1	CYP2E1	Xenobiotic metabolism, stress response	0.37	0.62
Z49086	Eph-related tyrosine-protein kinase receptor		Signal transduction	0.38	-
AF041054	NIP3, BCL2- & adenoviral E1B-interacting protein	NIP3	Apoptosis	0.43	0.52
D00725	Serine protease inhibitor 2		Protein turnover	0.43	-
M21019	Harvey rat sarcoma oncogene subgroup R protein		Oncogene	0.45	-
U60473	CD59 antigen		Extracellular transport/carrier protein	0.48	-
U44088	T-cell death-associated gene 51		Apoptosis	0.50	0.26
AF092734	Growth differentiation factor 11	TDAG51	Signal transduction	0.50	-

-, not determined by realtime RT-PCR



**Fig. 1 Real-time RT-PCR analysis in the liver of mice fed flumequine for 1, 4 and 8 weeks**



**Fig. 2 Western blotting analysis of GSTα and ERK5 in the liver of mice fed flumequine for 1, 4 and 8 weeks**

**Table 2 Gene expression analyses by cDNA microarray (Atlas mouse 3.8 I microarray) and RT-PCR in the liver of male mice fed dicyclanil for 2 weeks**

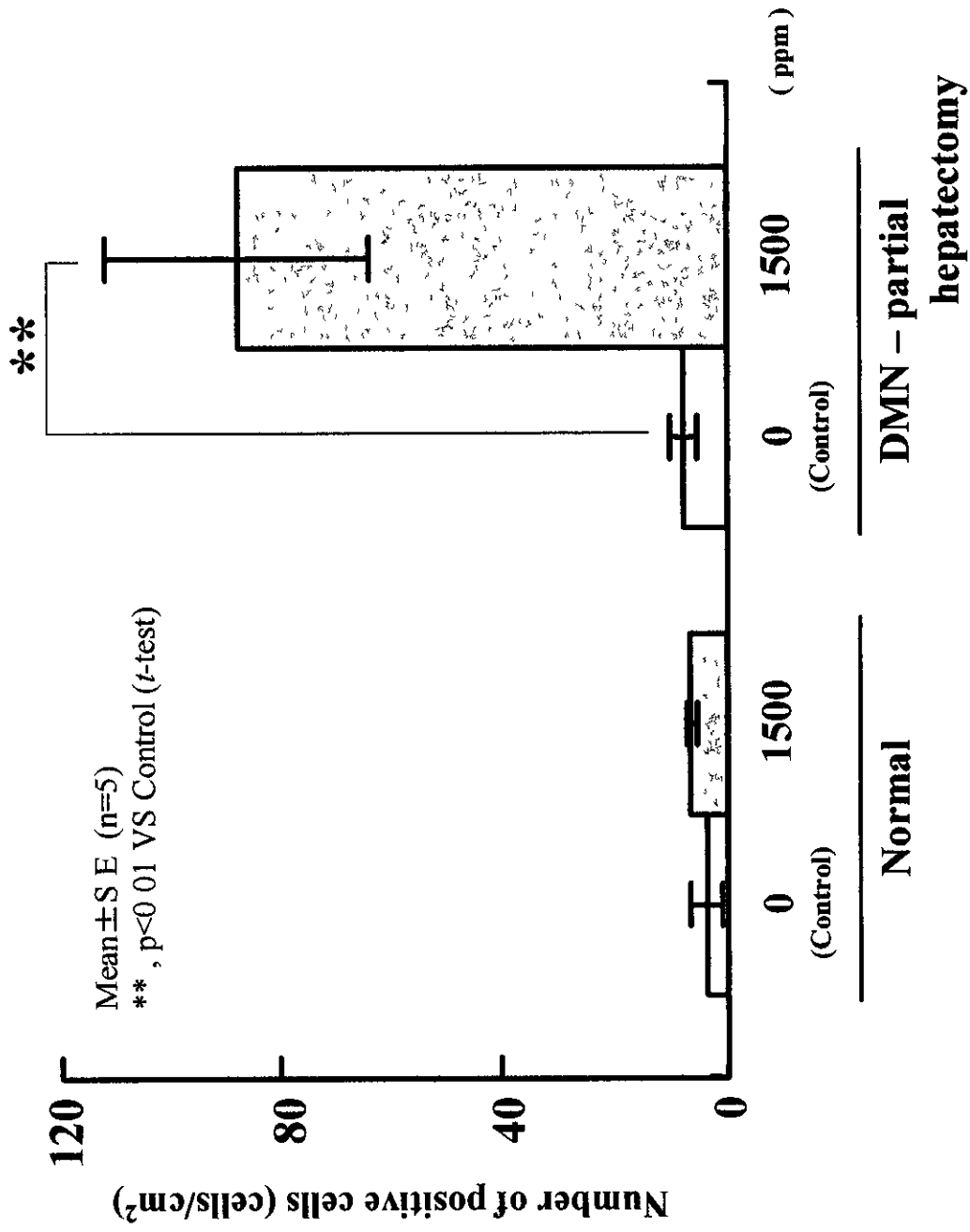
GenBank acc No	Gene name	Function	Fold change	
			Microarray	RT-PCR <sup>a)</sup>
NM_013467	Alcohol dehydrogenase family 1, subfamily A2	Metabolism	5.9	2.1 *
NM_007815	Cytochrome P450, 2c29	Metabolism	4.1	-
NM_009993	Cytochrome P450, 1a2	Metabolism	3.6	3.0 *
NM_011192	Proteaseome 28 subunit, 3	Protein turnover	3.3	1.0
NM_008184	Glutathione S-transferase, mu 2	Metabolism	3.2	-
NM_016774	ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F1	Protein turnover	3.1	2.0
NM_010001	Cytochrome P450, 2c37	Metabolism	3.1	-
NM_007690	Chromodomain helicase DNA binding protein 1	Transcription	3.1	2.2 *
NM_008160	Glutathione peroxidase 1	Metabolism	3.0	-
NM_009127	PI3516 stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Metabolism	2.6	1.4
NM_008997	RAB11B, member RAS oncogene family	Intracellular transducers	2.4	4.8 **
NM_009228	Synrophin, acidic 1	ECM proteins	2.3	-
NM_015762	Thioredoxin reductase 1	Metabolism	2.2	4.3 **
NM_009467	UDP-glucuronosyltransferase 2 family, member 5	Metabolism	2.1	-
NM_009412	Tumor protein D52	Stress response proteins	2.1	-
NM_009131	Stem cell growth factor	Cell signaling	2.1	1.5
NM_007791	Cysteine rich protein 1 (Csrp1)	Intracellular transducers	2.1	1.2
NM_007757	Coproporphyrinogen oxidase	Metabolism	2.1	-
NM_009992	Cytochrome P450, 1a1	Metabolism	-	4.7 **
NM_007415	ADP-ribosyltransferase 1	Apoptosis	0.1	0.1 **
NM_016698	Ring finger protein 10	Transcription	0.4	-
NM_009293	Steroid sulfatase	Metabolism	0.4	-
NM_012044	Phospholipase A2, group IIE	Stress response proteins	0.5	-
M12481	actin, beta, cytoplasmic	-	1.0	1.0

a) mean ratio (n=5)

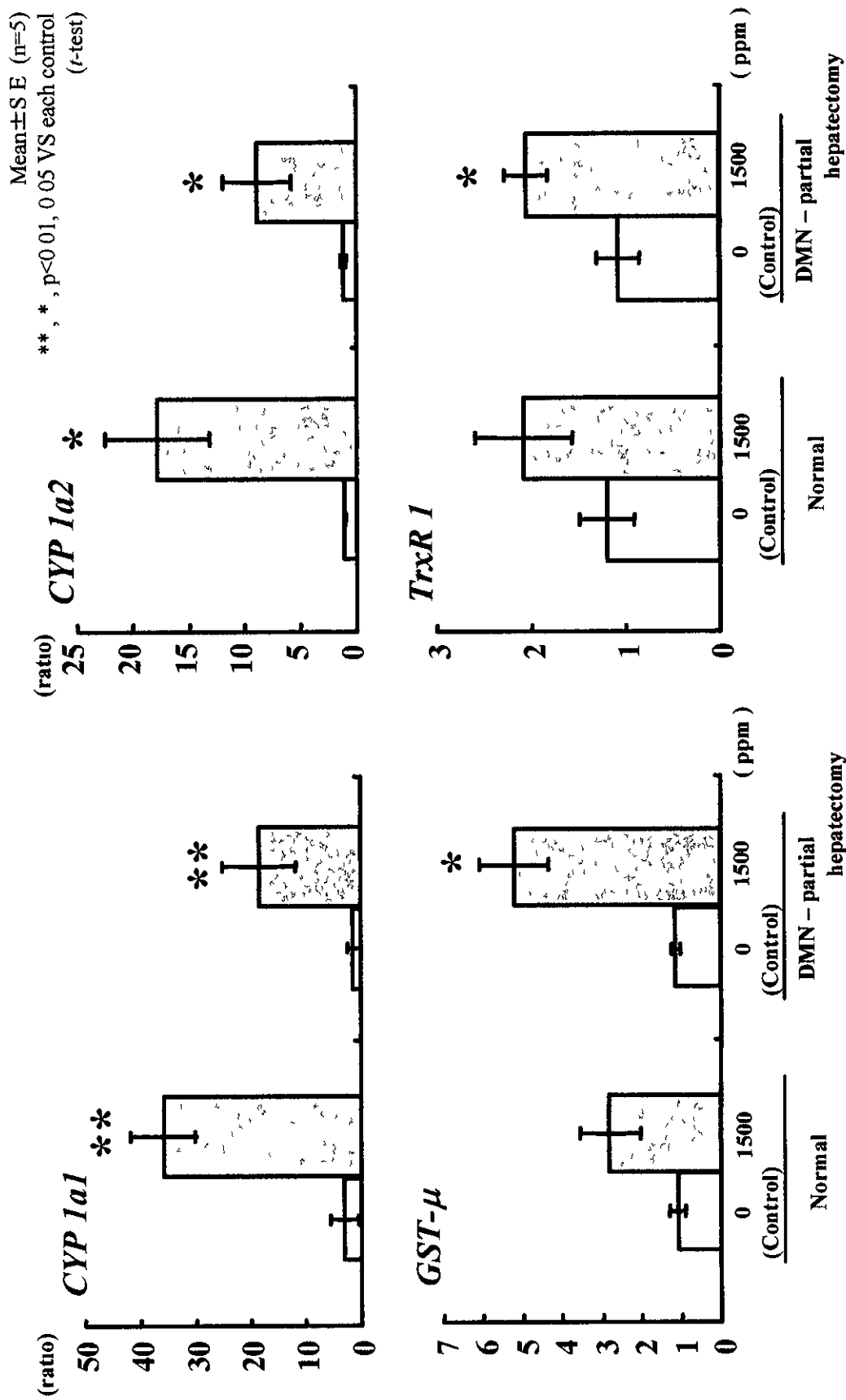
- not determined

\*, \*\* p<0.05 or 0.01 VS 0 ppm (control) group





**Fig. 3** Number of GGT-positive cells in the liver of mice fed DC for 7 weeks



**Fig. 4 Real-time RT-PCR analysis in the liver of mice fed dicyclanil for 7 weeks**

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 15 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検査法の確立—

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四室長

### 研究要旨

動物用医薬品のうち、合成抗菌剤のエンロフロキサシン、シプロフロキサシンについて、ウナキ中の残留検査法を検討した。また、カルハドックスの代謝物であるキノキサリン-2-カルボン酸の定量下限を引き下げるべく、検査法の再検討を行った。

エンロフロキサシン、シプロフロキサシンの検査法は、アセトニトリルで抽出し、ヘキサン分配により脱脂後、蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィーによる方法および 0.3%メタリン酸-アセトニトリル（6/4）混液でホモジナイス抽出した後、ジヒニルヘンゼン-N-ビニルピロリトン共重合体ミニカラムを用いてクリーンアップを行い、蛍光検出器付高速液体クロマトグラフにより測定する方法を検討した。両検査法共にエンロフロキサシン、シプロフロキサシンの定量下限は 0.01ppm であった。添加回収検査の結果は平均回収率 90~98%、相対標準偏差は 2.0~2.8% であった。

キノキサリン-2-カルボン酸の検査法は、質量分析器付高速液体クロマトグラフィーによる方法について検討したが、使用する装置により測定条件が異なる上に、UV 検出と比べて定量下限に差はなかった。したがって、従来法では UV 320 nm で測定していたところを 245 nm で測定することにした。本法による定量下限は、豚筋肉中で 0.001 ppm、豚肝臓中で 0.005 ppm まで引き下げることができた。

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

本研究では、養殖ウナキに使用される虞のある、合成抗菌剤のエンロフロキサシン、シプロフロキサシンについての残留検査法の確立を目的とする。

また、既に食品衛生法に残留基準が規定されている、カルハドックスの代謝物であるキノキサリン-2-カルボン酸試験法の定量下限を引き下げることを目的とする。

### I エンロフロキサシン、シプロフロキサシンの検査方法の検討

エンロフロキサシン、シプロフロキサシンはキノロン系合成抗菌剤である。これらの合成抗菌剤は、日本では使用が許可されていないが、諸外国に於いては畜水産物に使用されている。

残留検査法としては、モニタリング検査法（合成抗菌剤の一斉分析法<sup>1)</sup>）および食品衛生法の食品、添加物等の規格基準中のサラフロキサシンおよびダノフロキサシン試験法が適用可能と思われる。

本研究においては、両方法についてそれぞれ、ウナキおよびウナキ加工食

品への適用について検討した。

## I-B 研究方法

### I-B-1 実験材料

#### 1) 試料

市販されているウナギ、ウナギ白焼き、ウナギ蒲焼きを用いた。

#### 2) 試薬

- ・アセトニトリル、トリフルオロ酢酸（液体クロマトグラフ用）
- ・ヘキサン、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 (200 mL)
- ・ナス形フラスコ (50、200 mL)
- ・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 (蛍光検出器および紫外吸光度検出器付)

### I-B-2 試験方法

#### 検査法①

#### 1) 試料溶液の調製

細切均一化した検体 5 g を 100 mL 遠沈管にとり、アセトニトリル 30 mL、アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 20 mL および無水硫酸ナトリウム 10 g を加えてホモジナイズした後、3,000 rpm、5 分間遠心分離した。アセトニトリル層および n-ヘキサン層を 100 mL 分液ロートに移し、アセトニトリル層を 100 mL ナス形フラスコに移した。n-ヘキサン層を、先の 100 mL 遠沈管の残留物に加え、さらにアセトニトリル 20 mL を加えて激しく振り混ぜた後、3,000 rpm、5 分間遠心分離した。n-

ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を先の 100 mL ナス形フラスコに合わせ、n-プロパノール 10 mL を加えて、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。

残留物アセトニトリル-水 (2/3) 1 mL を加えて溶解し試験溶液とした。

#### 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 Cadenza CD-C18 (3 μm、3 mm×15 cm、Imtakt 製)

・カラム温度 40°C

・移動相 0.05%トリフルオロ酢酸-アセトニトリル (8/2)

・流速 0.4 mL/min

・測定波長 UV 280 nm

FL ex 280 nm、em 455 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により、ピーク面積による絶対検量線法により定量した。

#### 検査法②

#### 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°C 以下で減圧乾固した後、残留物をアセトニトリル-水 (1/4) 1 mL に溶解して試験溶液とした。

#### 2) HPLC 条件