

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業) 分担研究報告書

畜水産食品中に含まれる動物用医薬品等の安全性確保に関する研究

分担課題：ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

分担研究者 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 第一室長

### 研究要旨

合成抗菌剤ニトロフラン類 (NF 類) は、発がん性が報告されているものもあり、現在国内での動物用医薬品としての使用は禁止されているが、側鎖のヒドラジド誘導体を替えた新規合成抗菌剤の報告は現在も続いている。NF 類を構成するニトロフルフラール (NFA) とヒドラジド誘導体は、それぞれ酸化的 DNA 損傷と特異的 DNA 付加体生成の可能性が考えられている。本研究では *gpt delta* 動物を用いて NF 類とその構成物質についてレポーター遺伝子変異原性解析と酸化的 DNA 損傷の定量解析を組み合わせ、NF 類の化学構造に依存した *in vivo* 変異原性ならびにその発現機序を解明し、NF 類の包括的安全性評価法の確立を目指す。本年度は、ラット腎臓に発がん性が報告されているニトロフラントイン (NFT) の遺伝毒性機序を検索するため、C57BL/6J 系統の *Nrf2* 欠損 *gpt delta* マウスを作製した。予備的検討として、このマウスに NFT を 8 週間投与後、*gpt* および *Spi* assay を実施した結果、*gpt* 変異体頻度 (MF) は、何れの遺伝子型マウスにおいてもそれぞれの対照群に比して有意な高値を示し、遺伝子型間の比較では野生型よりホモ欠損型で高かった。従って、*Nrf2* は NFT の遺伝毒性機序に防御的に機能していることが明らかとなり、NFT の遺伝毒性発現機序には酸化ストレスの関与が強く示唆された。一方、*Spi* MF は欠損型のみで軽度上昇した。これらの結果に基づき、各群の動物数を増やし、NFA 投与群も加えた本試験を実施する。また、NFT の遺伝毒性に対する抗酸化剤の修飾効果を検討するための予備試験を実施した。F344 ラットに NFT を強制経口投与し、同時に *N*-アセチルシステイン、アスコルビン酸あるいは  $\alpha$ -トコフェロールを 1 及び 2% の濃度で餌に混じて 2 週間併用投与した結果、抗酸化剤による明らかな毒性影響は見られなかった。この結果を参考に、今後はこの用量で F344 系 *gpt delta* ラットに NFT と抗酸化剤のそれぞれを 4 および 13 週間投与し、NFT が引き起こす遺伝毒性に対する抗酸化剤の修飾効果を検討する。

### A. 研究目的

動物用医薬品として使用される合成抗菌剤であるニトロフラン類 (NF 類) は、ニトロフランを基本骨格に隣接するヒドラジド誘導体の違いにより多くの種類が知られている。その中には遺伝毒性ならびに発がん性が報告されているものもあり、現在、ニトロフラントイン (NFT)、ニトロフラゾン、フラゾリドン、フラルタドンの 4 種については国内での畜産動物への使用は禁止されているが、様々なヒドラジド誘導体を用いた新規合成抗菌剤の報告は現在も続いている。従って、NF 類の発がん機序を解明することはこの種の動物用医薬品に対するヒト安全性の確保にとって重要な課題である。

NF 類の構成物質であるニトロフランとヒドラジド誘導体は、それぞれ酸化的 DNA 損傷と特異的 DNA 付加体生成の可能性が考えられている。これまでに、*gpt delta* ラットを用いて、ラット腎臓に発がん性の報告のある NFT とその構成物質のニトロフルフラール (NFA) およびアミノヒダントイン (AHD) の *in vivo* 変異原性を検索したところ、NFT と NFA で陽性結果を示し、NFT では GC-TA トランスバージョン変異の上昇、腎 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの上昇も確認された。従って本研究では、NFT の *in vivo* 変異原性と酸化ストレスの関連性を検討して、NF 類の酸化ストレスを介した遺伝毒性機序の詳細を明らか

にすることを目的とする。本年度は、NFT の遺伝毒性機序と Nrf2 の関連性を検索する目的で、*nrf2* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスを作製し、この動物を用いた解析のための予備実験を行った(実験 1)。また、NFT の遺伝毒性に対する抗酸化剤の修飾効果を検討する目的で、NFT と併用投与する抗酸化剤の用量設定のための予備試験を実施した(実験 2)。

## B. 研究方法

実験 1: *Nrf2* ホモ欠損 (*Nrf2*<sup>-/-</sup>) *gpt delta* マウスは、何れも C57BL/6J 系統の *gpt* をホモに導入した個体と *Nrf2* をホモに欠損した個体を交配し、両遺伝子のヘテロ型を作出し、この雌雄の交配により生じた 9 種類の遺伝子型の中から *gpt* をホモに持ち、*Nrf2* をヘテロに欠損した雌雄個体をさらに交配して作出した。*Nrf2*<sup>-/-</sup> *gpt delta* マウスの雄 8 匹に、NFT を methylcellulose (MC) に懸濁し、最大耐量の 70 mg/kg bw で、4 及び 8 週間、連続 5 日間の強制経口投与を行った。対照群には MC のみを投与した。同腹の野生型 (*Nrf2*<sup>+/+</sup>) にも NFT を同様に投与した。この *Nrf2*<sup>+/+</sup> については、今回総計で 5 匹しか作出できなかったため、維持用に継代している C57BL/6J 系 *gpt delta* マウス 11 匹を加え、総数 16 匹を対照群と NFT 投与の各群 8 匹に配した。剖検時は、腎臓を採取し、重量を測定した後、一部をホルマリン固定し、残りを凍結保存した。投与 8 週目の腎臓を用いて、*gpt* および Spi<sup>+</sup> assay を実施した。*gpt* assay は、ファージを大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離後、再度 6-TG と Cm を含むプレートで生育することを確認した。またファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* MF を算出した。Spi<sup>+</sup> assay では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA (P2) 株) に感染させ、Spi<sup>+</sup> プラークの候補については、さらに他の P2 溶原

菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の Spi<sup>+</sup> プラークを検出した。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の Spi<sup>+</sup> プラーク数を回収した総プラーク数で除して Spi<sup>+</sup>MF を算出した。

実験 2: 雄の F344 系ラット、各群 3 匹に NFT をラット腎臓がん用量の 125 mg/kg bw で連続 5 日間の強制経口投与を 2 週間行った。NFT は MC に懸濁し、対照群には MC のみを投与した。抗酸化剤の *N*-アセチルシステイン (NAC)、アスコルビン酸 (SAA) 及び  $\alpha$  トコフェロール ( $\alpha$ -TP) はそれぞれ 1 及び 2% の用量で、NFT 投与の 1 週間前から実験終了まで餌に混じて自由に摂取させた。投与期間中は、連日一般状態の観察を行い、体重及び摂餌量は 4 日ごとに測定した。解剖時、腎重量測定後、一部をホルマリン固定、残りを凍結保存した。対照群と NFT 単独投与群については、腎 DNA 中の 8-OHdG (8-OHdG/10<sup>5</sup> dG) レベルを HPLC-DECD システム (Coulochem; ESA, Bedford, MA, USA) を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組み換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組み換え実験安全管理規定」に従い、遺伝子組み換え執権計画書を作成し、審査を受けた。また、本研究における動物への投与実験は全て強制経口投与で行ったが、投与は短時間で行い、動物にあたる苦痛を最小限に抑えた。また、解剖時はイソフルラン深麻酔下で疼痛を軽減させ放血致死させた。

## C. 研究結果

実験 1: *Nrf2*<sup>-/-</sup> の NFT 投与群で、開始 2 日目に死亡

例が1例認められたが、その他の群に投与に起因する死亡は見られなかった。NFT 投与群では、*Nrf2*<sup>-/-</sup>のみで投与 5 週目から体重の低値が認められた。(Fig. 1) 腎重量では、いずれの遺伝子型でも、NFT 投与群で 4 および 8 週で明らかな変化は見られなかった (Table 1) 投与 8 週目の腎臓における *gpt* および *Spi* assay の結果を Table 2 に示す。*gpt* MF は、*Nrf2*<sup>+/+</sup>では、対照群では 0.77、NFT 投与群では 1.35 で、対照群より約 1.8 倍増加した。*Nrf2*<sup>-/-</sup>では、対照群では 0.81、NFT 投与群は 2.30 であり、約 2.8 倍増加した。両遺伝子型間の対照群の *gpt* MF に差異は認められなかったが、NFT 投与群の *gpt* MF は、統計学的有意差はなかったものの *Nrf2*<sup>-/-</sup>では *Nrf2*<sup>+/+</sup>に比して高値傾向を示した。一方、*Spi* MF は、NFT 投与により何れの遺伝子型においても軽度な上昇となったが、統計学的には *Nrf2*<sup>-/-</sup>のみで有意な変化となった。

実験 2 : 抗酸化剤の NAC、SAA 及び  $\alpha$ -TP を 1 及び 2%の用量で NFT の投与開始 1 週間前から混餌投与した結果、いずれの抗酸化剤投与群でも、摂餌忌避は示さなかった (Fig. 2) NFT 投与 14 日目の体重は、NFT 単独群、NAC の 1%及び  $\alpha$ -TP の 2%投与群で対照群より低値がみられた (Fig. 2) 腎相対重量は、対照群と比較して、NAC の 1 および 2%、AsA および  $\alpha$ -TP の 2%投与群で有意に増加した。NFT 単独群と抗酸化剤併用投与群との比較では、NAC の 2%群で有意に増加した (Table 3) 溶媒対照群と NFT 単独群で、腎 DNA 中の 8-OHdG レベルを測定した結果、NFT 群で有意に増加した (Fig. 3)

#### D. 考察

実験 1 : C57BL/6J 系統の *Nrf2*<sup>-/-</sup> *gpt* delta マウスに NFT を 8 週間投与し、*gpt* および *Spi* assay を実施したところ、何れの遺伝子型ともに、NFT 投与により *gpt* MF が有意に上昇した。また、遺伝子型間の比較で、*Nrf2*<sup>-/-</sup>で *Nrf2*<sup>+/+</sup>よりも *gpt* MF が上昇する傾向が見られたことから、Nrf2 は NFT の遺伝毒性に対し防御的に作用している可能性が示唆された。Nrf2 は -グルタミルシステイン合成酵素 (GCL)、グルタ

チオンペルオキシダーゼ (GPx)、チオレドキシシン (TRX)、ヘム酸素添加酵素 (HO-1)など一連の抗酸化酵素群を制御する転写因子として知られている。今回、*Nrf2*<sup>-/-</sup>で *gpt* MF の感受性が増強したことや、これまでの実験で、NFT を投与した *gpt* delta ラットの腎臓で 8-OHdG の上昇が確認されていることから、NFT の遺伝毒性には酸化ストレスが関与する可能性が強く考えられた。さらに Nrf2 はグルタチオン S - 転移酵素 (GST) や NF 類が共通して有するニトロ基の還元にも関与する NAD (P) H キノン還元酵素 (NQO1) などの薬物および化学物質などの異物代謝酵素群を制御していることも知られている。従って、NFT の代謝過程において、*Nrf2*<sup>-/-</sup>ではこれらの反応阻害により蓄積した中間活性化体が、DNA、蛋白質または脂質などに付加するなど、何らかの分子機構を介して、遺伝毒性に対する感受性が増強したことも考えられた。また、これまでの実験では NFT の構成物質でありニトロ基を有する NFA でも遺伝毒性陽性結果が得られ、NFT の遺伝毒性発現機序には化学構造的にニトロ基が重要である可能性も示唆されている。従って今後は、*Nrf2*<sup>-/-</sup> *gpt* delta マウスに NFT と NFA を投与し、NFT の化学構造依存的な遺伝毒性発現機序を探る実験を行う予定である。具体的には、C57BL/6J 系統の *Nrf2*<sup>-/-</sup> *gpt* delta マウス、各群 5 匹に NFT と NFA を 8 週間、強制経口投与する。用量は今回の用量に低用量群を加え、NFT は 70 および 35 mg/kg bw、NFA は NFT と同モルに相当する量として 41.3 および 17.5 mg/kg bw を投与する。検索項目として、*in vivo* 変異原性試験、酸化的 DNA 損傷の定量解析、Nrf2 の下流遺伝子の発現解析などを予定しており、現在、動物実験を開始した。

実験 2 : NFT のラット腎における遺伝毒性への抗酸化剤の修飾効果を検討するために、その予備試験を実施した。NFT を 2 週間強制経口投与し、抗酸化剤の NAC、SAA および  $\alpha$ -TP を 1 および 2%の用量で NFT の投与 1 週間前から混餌投与した結果、投与期間中に抗酸化剤添加による明らかな摂餌忌避は見られなかった。最終体重では、NAC の 1%及び  $\alpha$ -TP

の 2%群で低値が見られたが、NFT 単独群でも低値を示した。この 3 群は同ポイントで摂餌量が低値を示していることから、偶発的に生じた摂餌量の変化に関連した変化であると考えられた。腎相対重量では、溶媒対照群との比較で NAC の 1 および 2%、SAA の 2%、NAC の 2%で増加した。NFT 単独群と抗酸化剤投与群との比較では NAC の 2%のみで有意に増加した。これらの腎重量の変化については、統計学的に有意であるものの、比較的軽微な変化であり、さらに各群 3 例と動物数が少なかったため、明らかな投与による影響とは判断できなかった。従って、今後予定する試験での抗酸化剤の用量は、今回明らかな摂餌忌避や体重減少が生じなかった 1 および 2%が妥当であると判断した。また、溶媒対照群と NFT 単独群で腎 DNA 中の 8-OHdG レベルを測定した結果、NFT 単独群で有意に増加したことから、NFT は投与 2 週目から 8-OHdG レベルを上昇させる可能性が示唆された。しかし、その値は軽微な変動であったことから、抗酸化剤併用投与群での修飾効果の検討には不十分であった。従って、今後は 8-OHdG および *gpt* MF の上昇が明らかとなっている 4 および 13 週間に投与期間を延長し、NFT の遺伝毒性への修飾効果を検討する予定である。

#### E. 結論

NFT は 8 週間の投与で C57BL/6J 系統の *Nrf2*<sup>-/-</sup> *gpt* delta マウスならびにその野生型の腎 DNA 中の *gpt* MF を有意に上昇させた。また *Nrf2*<sup>-/-</sup> でより高感受性を示したことから、その遺伝毒性発現機序に酸化ストレスが関与することが強く示唆された。本結果を踏まえ、今後は C57BL/6J 系統の *Nrf2*<sup>-/-</sup> *gpt* delta マウスに NFT あるいはその構成物質である NFA を 8 週間投与して、NF 類の酸化ストレスを介した遺伝毒性発現機序の詳細を明らかにする。また、F344 ラットに NFT と NAC、SAA 及び  $\alpha$ -TP を 1 及び 2%で 2 週間併用投与した結果、この用量での各抗酸化剤投与に起因する明らかな摂餌忌避や毒性影響を示さないことが明らかとなった。今後は投与期間を 4 ならびに 13 週間に延長して、NFT のラット腎における遺

伝毒性への抗酸化剤の修飾効果を明らかにする。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究成果

G-1. 学会発表

なし

G-2. 発表論文

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし