

**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 (H26 年度)**

**畜水産食品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ルール (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の解明を目指す。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) の遺伝毒性発現機序への酸化ストレスの関連性を検討することを目的とし、*Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスとその野生型に、NFT 並びに NFT の構成物質であり化学構造としてニトロフラン骨格 5 位にアルデヒド基を有するニトロフルフルール (NAF) を 13 週間強制経口投与し、*in vivo* 変異原性試験を実施した。その結果、*Nrf2* ホモ欠損マウスの NFT 投与群のみで *gpt* 変異体頻度 (MF) が有意に上昇したことから、NFT の遺伝毒性発生機序には酸化ストレスの関与が示唆され、NRF2 が NFT の遺伝毒性に防御的に機能していることが示唆された。一方、NFA は何れの遺伝子型マウスにおいても遺伝毒性を示さず、NFT の遺伝毒性発生機序にはニトロフラン骨格の側鎖構造が大きく影響することが示唆された。また、NFT の *in vivo* 変異原性への抗酸化剤による修飾効果を検討するため、前年度に実施した用量設定試験の結果を基に、F344 系 *gpt delta* ラットに NFT と抗酸化剤の *N*-アセチルシステイン (NAC)、アスコルビン酸 (SAA) あるいは  $\alpha$ -トコフェロールをそれぞれ 4 週間併用投与した。NFT と各抗酸化剤についてはそれぞれの単独投与群を設けた。NFT の単独投与群および NAC あるいは SAA との併用投与群で溶媒対照群より体重が減少し腎相対重量が増加した。また、NAC 単独投与でも腎相対重量が増加した。今後は遺伝子突然変異頻度および酸化的 DNA 損傷の定量解析を実施する。これらの結果より NFT の遺伝毒性と酸化ストレスの関連性の詳細を検討し、NF 類の安全性評価への貢献を目指す。

**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使用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。我々のこれまでの研究で、*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 とその構成物質でありニトロフラン骨格を有するニトロフルフルール (NAF) およびヒドラジド誘導体の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 でレポーター遺伝子突然変異頻度

が上昇した。また NFT では G:C:T:A トランスバージョン 変異の上昇、腎 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの上昇が確認され、NFT の遺伝毒性発現機序には酸化ストレスが関与する可能性が示唆された。従って本研究では、NFT の *in vivo* 変異原性と酸化ストレスとの関連性について、さらなる検討を行い、NF 類の遺伝毒性発現機序の詳細を明らかにする。

本年度は、NFT の遺伝毒性に対する NRF2 の役割を検討するため、*Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスに NFT あるいは NFA を 13 週間投与し、*in vivo* 変異原性試験を実施した(実験 1)。また、NFT の遺伝毒性への抗酸化剤の修飾効果を検討する目的で、F344 系 *gpt delta* ラットに NFT と 3 種類の抗酸化剤をそれぞれ 4 週間併用投与する動物実験を実施した(実験 2)。

## B. 研究方法

実験 1 :

6 週齢、雄の C57BL/6J 系統 *Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウス並びにその野生型に、NFT および NFA を methyl cellulose (MC) に懸濁し、各群 6 例に、連続 5 日間の強制経口投与を 13 週間行った。投与用量は、NFT は最大耐量の 70 mg/kg 体重 およびその 1/2 量である 35 mg/kg 体重、NFA は NFT と同モル相当量の 41 および 21 mg/kg 体重の用量に、それぞれ設定した。対照群には MC のみを投与した。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。

凍結したサンプルを用いて、*gpt* および *Spi* 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* 変異体

頻度 (MF) を算出した。*Spi* 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* 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* 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* プラーク数を回収した総プラーク数で除して *Spi*MF を算出した。

実験 2 :

6 週齢、雄の F344 系 *gpt delta* ラット、各群 5 例に、NFT と抗酸化剤の *N*-アセチルシステイン (NAC)、アスコルビン酸 (SAA) あるいは  $\alpha$  トコフェロール ( $\alpha$ -TP) をそれぞれ 4 週間併用投与した。NFT は MC に懸濁し、ラット腎発がん用量の 125 mg/kg 体重の用量で、連続 5 日間、強制経口投与した。NAC、SAA 及び  $\alpha$ -TP はそれぞれ 1%の用量で、NFT 投与開始の 1 週前から実験終了まで粉末基礎飼料に混じて自由に摂取させた。対照群には MC のみを投与した。また NFT と抗酸化剤 3 種については、単剤での影響を確認するため、それぞれの単独投与群を設けた。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 1 週間ごとに測定した。解剖時は、腎臓を採取し、重量を測定した後、長軸にそって切断し、弓状動脈を境界に皮質部と髄質部を分離した。採材した皮質および髄質部のそれぞれ一部をホルマリン固定し、残りを凍結保存した。

(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と実験は全て強制

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* ホモ欠損 *gpt delta* マウスとその野生型マウスに、NFT を 35 および 70 mg/kg 体重、NFA を NFT の同モル相当の 21 および 41 mg/kg 体重で 13 週間強制経口投与した結果、投与期間中、*Nrf2* ホモ欠損マウスのみ死亡例が認められた。NFA 高用量群で開始 1 週目に 1 例、NFA 低用量群で 9 週目に 1 例、NFT 高用量群で 10 週目以降に 2 例の死亡動物が認められた。一方、野生型ではいずれの群でも投与に起因する死亡例は生じなかった。

体重および摂餌量は、いずれの遺伝子型でも、全ての投与群において対照群と同様に推移し、NFT および NFA の投与による影響は認められなかった (Fig. 1)。また、腎重量についても、いずれの遺伝子型でも、NFT および NFA の 13 週間の投与による明らかな変化は見られなかった (Table 1)。

腎臓における *gpt* および *Sp1* assay の結果を Table 2 および 3 に示す。*Nrf2* 野生型マウスにおける *gpt* MF は、対照群 0.50、NFT 投与群では低用量群 0.55、高用量群 0.82、NFA 投与群では、低用量群 0.38、高用量群 0.48 であり、統計学的有意差は無いものの NFT 高用量群のみで対照群より上昇する傾向が見られた。*Sp1* MF は、いずれの投与群でも対照群と比較し明らかな変化は認められなかった (Table 2)。一方、*Nrf2* ホモ欠損マウスにおける *gpt* MF は、対照群 0.83、NFT 投与群では低用量群 0.69、高用量群 1.65、NFA 投与群では、低用量群 1.09、高用量群 0.83 であり、NFT 高用量群では対照群の約 2 倍の高値となり、統計学的にも有意な変化となった。*Sp1* MF はいずれの投与群においても対照群と比較し明らかな変化は認められなかった (Table 3)。また、遺伝子型間での比較では、*Nrf2* ホモ欠損マウスの高用量群の *gpt* MF は野生型と比較して統計学的に有意に高かった (Fig.

2)。

#### 実験 2 :

F344 系 *gpt delta* ラットに、NFT と抗酸化剤 NAC、SAA 及び  $\alpha$ -TP をそれぞれ 4 週間併用投与した結果、NFT の投与開始から 3 週目以降で、NFT 単独群、NFT/NAC および NFT/SAA 併用群において、溶媒対照群に比べて体重の低値が認められ、これらの群では最終体重では溶媒対照群に対し約 10% 程度減少した。摂餌量は全ての投与群で溶媒対照群と同様の推移を示した (Fig. 3)。

腎重量は、相対重量において NFT 単独群、NFT/NAC、NFT/SAA および NFT/ $\alpha$ -TP 併用群で、溶媒対照群より有意に増加した。各抗酸化剤の単独群では、NAC 単独群のみで腎相対重量が増加した (Table 4)。

### D. 考察

#### 実験 1 :

NFT とその構成物質でありニトロフラン骨格を共有する NFA を C57BL/6J 系統の *Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスおよびその野生型に 13 週間強制経口投与したところ、両遺伝子型共に NFT の 70 mg/kg 体重の投与でレポーター遺伝子突然変異頻度が上昇する傾向がみられた。その程度は、*Nrf2* 野生型マウスでは上昇傾向を示す程度に留まったが、*Nrf2* ホモ欠損マウスでは 2 倍程度上昇し、統計学的にも有意な変化となった。また、遺伝子型間での比較でも、*Nrf2* ホモ欠損マウスで野生型よりも統計学的に有意な高値を示していたことから、NFT の遺伝毒性に NRF2 は防衛的に機能している可能性が示唆され、そ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、NFA の投与では、両遺伝子型共にレポーター遺伝子突然変異頻度の上昇は認められず、ラットとマウスで異なる結果となった。化学構造の視点では、ニトロフラン骨格の 5 位にアゾメチン結合を介して側鎖としてアミノヒダントインを有する NFT と、5 位にアルデヒド基を有する NFA では、今回の遺伝毒性試験で異なる結果を示した。NFT の遺

伝毒性機序に酸化ストレスの大きく関与している可能性を考慮に入れると、NFTの酸化ストレス産生機序にはニトロフラン骨格の側鎖が大きく影響していることが示唆された。次年度では、*gpt* 変異体の変異スペクトラムおよび 8-OHdG レベルを測定し解析を行う。また、NRF2 は heme oxygenase (HO-1)、NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、 $\gamma$ -glutamylcysteine ligase ( $\gamma$ -GCL)、glutathione peroxidase (GPx)、thioredoxin (TRX) などの様々な抗酸化酵素群および薬物代謝酵素群を制御する転写因子である。従って、今後 NRF2 制御下のこれら酵素群の mRNA 発現解析および蛋白発現解析を実施する。これらの解析により、NFT の遺伝毒性発現への酸化ストレス関与の詳細を検討する予定である。

#### 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、NFT と抗酸化剤の NAC、SAA あるいは  $\alpha$ -TP を 1% の用量でそれぞれ 4 週間併用投与した。その結果、NFT の単独投与では、溶媒対照群に対して、約 10% 程度の体重減少および腎相対重量の増加が認められ、これまでに実施した NFT をラットに投与した実験と同様な結果が得られた。抗酸化剤との併用投与群では、NFT/NAC および NFT/SAA で NFT 単独群と同程度の体重減少および腎相対重量の増加が見られ、NFT 投与による影響と考えられた。一方、NFT/ $\alpha$ -TP 群では体重減少は認められなかったが腎相対重量は増加した。各抗酸化剤の単独投与では、全ての単独群で体重に変化は認められなかったが、腎相対重量は NAC 投与群のみ溶媒対照群より増加した。*gpt delta* ラットに NFT を 4 週間投与すると、体重および腎重量に影響を与える他、腎 DNA 中の 8-OHdG レベルを有意に上昇させ、レポーター遺伝子突然変異頻度が上昇傾向を示すことが確認されている。また、*gpt delta* ラットへ NFT を発がん用量で 13 週間混餌投与した実験において、腎皮質部位でより顕著にレポーター遺伝子突然変異頻度が上昇することも確認されている。従って、今後は採取した腎皮質部位における 8-OHdG レベルの

測定および *in vivo* 変異原性試験を実施し、NFT の遺伝毒性への抗酸化剤による修飾効果を検討する予定である。

#### E. 結論

*Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスならびにその野生型に高用量の NFT を 13 週間投与したところ、レポーター遺伝子突然変異頻度は野生型では上昇傾向を示す程度であったが、*Nrf2* ホモ欠損では有意に上昇し、その値は同じ群の野生型に比して有意な高値となった。従って、転写因子 NRF2 は NFT の遺伝毒性に防御的に作用していることが明らかとなり、NFT 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。一方、NFT の構成物質である NFA は、マウスでは遺伝毒性を示さないことが示され、NFT の酸化ストレス産生機序にはニトロフラン骨格の側鎖が大きく影響していることが示唆された。

F344 ラットに NFT と NAC、SAA あるいは  $\alpha$ -TP を 1% で 4 週間併用投与した実験では、今後実施する 8-OHdG レベルの測定および *in vivo* 変異原性試験の結果を加えて、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評価する。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究成果

##### 1. 論文発表

Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Matsushita, K., Kuroda, K., Hibi, D., Suzuki, Y., Nohmi, T., Umemura, T.: Chemical structure-related mechanisms underlying *in vivo* genotoxicity induced by nitrofurantoin and its constituent moieties in *gpt delta* rats. *Toxicology*, 331, 125–135, 2015.

##### 2. 学会発表

木島綾希、石井雄二、高須伸二、横尾 諭、土屋卓磨、児玉幸夫、梅村隆志：ニトロフラントインの *in vivo* 変異原性における *Nrf2* の役割、日本環境変異原学会、

第 43 回大会、東京、2014. 12. 4-5

木島綾希、石井雄二、高須伸二、横尾 諭、土屋卓磨、  
梅村隆志 : *Nrf2* 欠損 *gpt delta* マウスを用いたニトロ  
フラントインの *in vivo* 変異原性機序の解析、第 31  
回日本毒性病理学会、東京、2015. 1. 29-30

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし