

Benzimidazole 系化合物反復投与ラットにおける肝腫瘍プロモーション作用の強さ

小野寺博志・三森 国敏・畝山智香子・安原加壽雄
竹川 潔・高橋 道人

Intensity of Liver Tumor Promotion Effects in Rats Given Repeated Oral Administrations of Benzimidazole Compounds

Hiroshi Onodera, Kunitoshi Mitsumori, Chikako Uneyama, Kazuo Yasuhara,
Kiyoshi Takegawa and Michihito Takahashi

Liver tumor-promoting effects of anthelmintic agents, febantel (Feb), fenbendazole (Fen) or oxfendazole (Oxf), were investigated in a rodent 2-stage carcinogenesis model. Five-week-old male F344 rats were initiated with or without diethylnitrosamine (DEN) and one week later given diet containing Fen (3600, 1800, 600, 200 or 70 ppm), Feb (2000, 1000, 500 or 100 ppm) or Oxf (500, 250, 100 or 10 ppm) for 8 weeks. Induction of CYP1A1/2 was observed in treated groups of DEN+Feb and DEN+Oxf groups, and its induction was most marked in DEN+Oxf groups. CYP2B1 and CYP4A1 were also induced in these treated groups. The number or area of Cx32 positive spots per hepatocyte was significantly decreased in treated groups except for DEN+Oxf 100 ppm group, as compared to DEN alone group. GST-P positive foci was significantly increased in DEN+Fen groups treated with 1800 ppm or more, DEN+Feb groups treated with 1000 ppm Feb or more and DEN+Oxf groups treated with 250 ppm Oxf or more. These results suggest that these three compounds have liver tumor promotion effects and the promoting action in Oxf is most strong among them.

Keywords : Fenbendazole, Febantel, Oxfendazole, connexin 32, tumor promoter
(Received May 31, 1996)

緒 言

残留動物用医薬品の安全性については米国食品医薬品局 (FDA), ヨーロッパ連合 (EU) や国連食糧農業機構 (FAO) と世界保健機構 (WHO) の合同食品規格委員会などにおいて各々評価を行っているが, 各国により事情が異なり, 各薬品ごとに残留基準値 (MRL) を一律に設定することは困難な場合がある。近年, 親化合物に加えてその代謝物についても毒性評価を行うべきである事が指摘されてきている。Benzimidazole 系動物用内寄生虫駆除薬の fenbendazole (Fen) は暫定 MRL が設定されてはいるものの, ラットに肝腫瘍が誘発される事が報告されている¹⁾。しかし, その催腫瘍性の発現機序や代謝物の安全性については不明な点が多く, 今後の研究に負うところが大きい。また, Fen のプロドラックである febantel (Feb) や Fen の主代謝物である oxfendazole (Oxf) に関しては, すでに実施された発癌性試験では用量が低かったことに起因するものと考えられるが, 肝に催腫瘍性がないと報告されている²⁾。一方, これらの物質を動物に投与することにより, いずれも肝細胞が肥大する事実から肝に対し腫瘍プロモーション作用を有する可能性が推察される。そこで今回, 肝二段階発がんモデルを用い, これらの物質を 8 週間ラットに投

与して肝臓での形態変化を観察するとともに, 肝 P450 分子種の誘導, 細胞間結合蛋白 (connexin 32: Cx32) の変動や肝胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巢を指標として, これらの物質の肝におけるプロモーション作用の有無とその強さについて比較検討した。

実験方法

1. 被験物質

被験物質の構造式を Fig. 1 に示した。Fen は淡褐色をおびた白色粉末, Oxf は白色粉末で, いずれも林純薬工業 (大阪) から購入した。純度はいずれも 99% 以上であった。Feb (商品名 Rintal) はバイエル社 (ドイツ) より入手し, 白色粉末で純度は 98% であった。diethylnitrosamine (DEN) は Nacalai Tesque (京都) より購入した。

2. 動物および飼育条件

日本チャールスリバー (厚木) より 4 週齢の雄性 F344/DuCrj ラットを購入し, 一週間の順化飼育後実験に供した。飼料はオリエンタル酵母 (東京) の CRF-1 粉末飼料を用い, 飲料水は水道水を自由に与えた。動物は, 室温 23±2°C, 湿度 55±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。

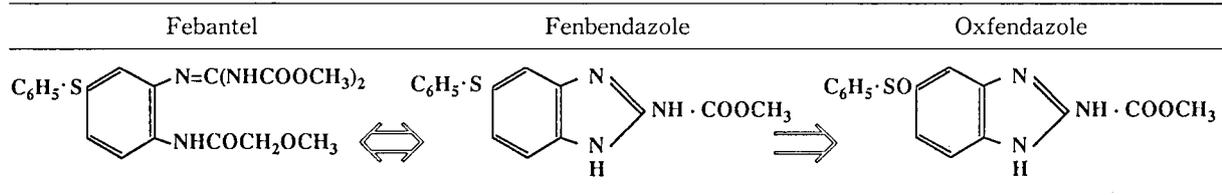


Fig. 1. Chemical structures metabolic pathway of anthelmintic agents, febantel, fenbedazole and oxfendazole

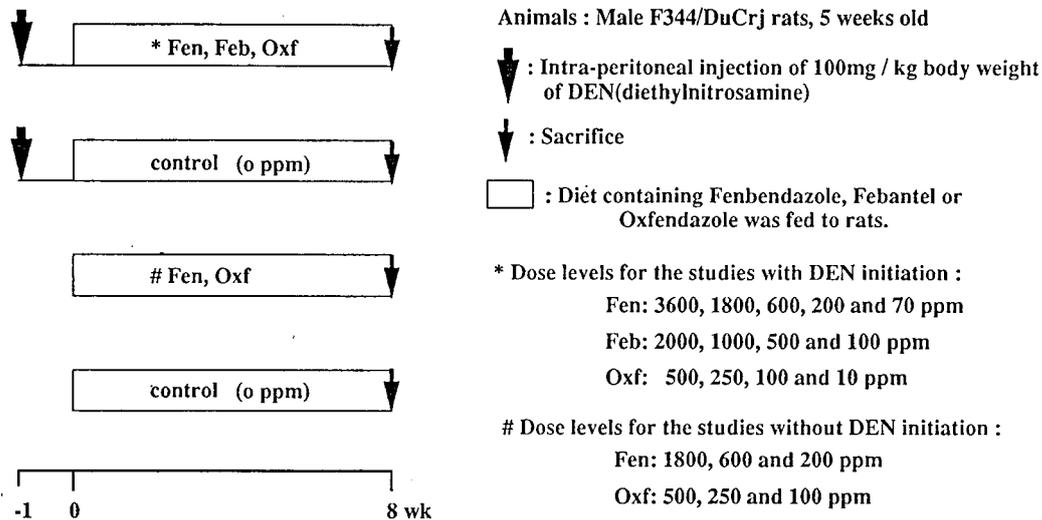


Fig. 2. Experimental design

3. 投与量および投与方法 (Fig. 2)

5週齢の動物に生理食塩水に溶解したDENを100 mg/kg体重量で一回腹腔内に投与し、その一週間後より、Fenは3600, 1800, 600, 200および70 ppm, Febを2000, 1000, 500および100 ppm, Oxfを500, 250, 100および10 ppm含有する粉末飼料を自由に与え、8週後に屠殺解剖した。各被験物質の用量は、既に報告されている慢性毒性試験の無影響量 (NOEL) を最低用量とし、次にそれぞれの肝肥大最少発現量の近似値を設定し、その他の用量は公比2から3を用いて高用量を設定した¹⁾。また、DENを処置しない群も設け、それらはFen 1800, 600および200 ppmとOxf 500, 250および100 ppm含有飼料を同様に8週間投与した。対照群には基礎粉末飼料を同様に与えた。

4. 観察方法

P450 Western blotting

解剖時に肝重量を測定後、一部の肝臓をwestern blottingとCx32抗体による免疫蛍光染色用に液体窒素で凍結した。DEN+Fen, DEN+OxfとOxf群の動物の凍結肝よりmicrosomeを抽出後、SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。ニトロセルロース膜に転写した後、一次抗体として抗ラットCYP1A1/2, 2B1, 2E1, 3A2, 4A1ヤギ抗体 (第一化学薬品, 東京) で反応させ、二次抗体をペルオキシダーゼ結合抗ヤギIgGで反応後HRPで発色

させた。

免疫組織化学

GST-P染色については、肝のパラフィン切片を脱パラ後、抗GST-P抗体 (MBL, 名古屋) を2000倍で希釈し、常法によりABC法で処理後、DABで発色させた。

Cx32免疫蛍光染色には、DEN+Fen, DEN+FenやDEN+Oxf群の肝の凍結切片に対し、一次抗体として抗Cx32抗体 (IARCの山崎博士より供与)、二次抗体としてビオチン標識ウサギIgG (VECTER, 米国) を用い反応させ、FITCストレプトアビジン (VECTER, 米国) と反応後、蛍光顕微鏡下で写真撮影をした。Cx32陽性スポット数と面積は病理画像解析装置IPAP (住化テクノス, 大阪) を用いて測定した。

光学顕微鏡的観察

全動物の肝を10%中性ホルマリンで固定後、常法に従いHE染色標本を作製し、顕微鏡観察を行った。

結 果

解剖時における体重と肝重量をTable 1に示した。DEN+Fenでは600 ppm以上の投与群で体重の増加抑制が軽度ではあるが有意かつ用量相関性に認められた。DEN+Fenでは500 ppm以上の投与群で増加抑制が認められたが、DEN+Oxf群では有意な変動はみられなかった。肝の実重量ではDEN+Fenの1800 ppm群とDEN+

Table 1. Body weight, absolute and relative liver weight of rats given diet containing fenbendazole, febantel or oxfendazole with or without DEN initiation

Dose levels (ppm)	Body weight (g)	Liver weight	
		Absolute (g)	Relative (g/%)
DEN+Fen			
3600	275.3± 8.2***#	9.30±0.18	3.38±0.05**
1800	285.2± 7.3**	9.57±0.22*	3.36±0.08**
600	287.7± 5.9*	9.27±0.45	3.22±0.11**
200	301.7± 6.4	9.31±0.25	3.09±0.06*
70	309.8±12.3	9.57±0.66	3.09±0.09*
DEN+Feb			
2000	286.8± 9.7*	10.68±0.56**	3.72±0.09**
1000	285.6±17.7*	8.95±0.72	3.13±0.10*
500	277.8±10.6**	8.37±0.65	3.01±0.15
100	292.6±15.2	8.41±0.83	2.87±0.14
DEN+Oxf			
500	280.8±10.9	9.87±0.44**	3.52±0.07**
250	289.1±21.1	9.51±0.90	3.28±0.10**
100	288.1± 7.4	8.40±0.38	2.92±0.08
10	281.0±10.4	8.09±0.30	2.88±0.06
DEN alone			
	304.7±12.0	9.04±0.50	2.97±0.11
Fen			
1800	294.8±11.0	10.17±0.47**	3.43±0.03**
600	296.1±14.2	9.57±0.82*	3.23±0.12**
200	300.1±11.6	9.16±0.52*	3.05±0.06*
Oxf			
500	302.8±24.6	10.51±0.85**	3.47±0.08**
250	295.4±33.5	9.20±1.39	3.10±0.14**
100	305.6±22.0	9.16±0.62*	3.00±0.09*
Control	283.8±46.2	7.95±1.28	2.81±0.18

*: Mean±S.D

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

Feb, DEN+Oxf の最高用量群で有意な増加を認めた。肝の相対重量では、DEN+Fen の全群、DEN+Feb の 1000 ppm 以上の投与群、DEN+Oxf の 250 ppm 以上の投与群で有意に増加した。DEN の処置を行わなかった投与群では体重変化には有意な変動は認められなかったが、肝の実重量と相対重量は全 Fen および Oxf 投与群で増加傾向が認められた。

病理組織学的には DEN+Fen では 200 ppm 以上の投与群で小葉中心性の肝細胞の肥大が認められ、最高用量でその程度は顕著であった。DEN+Feb では 500 ppm 以上の投与群で肝細胞の肥大が認められた。DEN+Oxf では同様の肝細胞の肥大が 10 ppm 群から認められ、かつ用量相関性をもってその程度は増強した。また、Fen や Feb 投与群で認められなかった脂肪と思われる空胞が散見され、

Table 2. Induction of liver P450 isozymes in rats given diet containing fenbendazole, febantel or oxfendazole with or without DEN initiation

Dose levels (ppm)/CYP	1A1/2	2B1	2E1	3A2	4A1
DEN+Feb					
2000	##	##	-	±	##
1000	+	±	-	-	+
500	+	-	-	-	±
100	+	-	-	-	-
DEN+Oxf					
500	##	+	-	±	+
250	##	+	-	±	+
100	##	+	-	±	+
10	##	+	-	±	+
DEN only					
	-	-	-	-	-
Oxf					
500	##	+	-	±	-
250	##	-	-	-	-
100	+	±	-	-	+
Control					
	-	-	-	-	-

##: Severe, #: moderate, +: mild, ±: weak, -: negative

その程度は用量に依存して増加した。DEN を処置していない Fen と Oxf でも同様の肝肥大が認められたが、Oxf における空胞化の出現頻度は軽度であった。

P450 アイソザイムの発現とその強さを Table 2 に示した。CYP1A1/2 はいずれの投与群でも誘導されたが、特に DEN+Oxf 群で強く誘導され、DEN の処置を行わなかった Oxf 群においても用量相関的に誘導された。CYP2B1 は DEN+Feb の 2000 ppm 群と DEN+Oxf 群で誘導されたが、明確な用量相関性は認められなかった。CYP4A1 は DEN+Feb の 1000 ppm 以上の投与群で用量相関的に、DEN+Oxf 群では用量相関性は認められないもののすべての用量群で誘導された。CYP2E1, 3A2 の誘導はいずれの投与群においても認められないか、あるいは軽微なものであった。

肝についての細胞間結合蛋白 (コネクシン 32: Cx32) 抗体による免疫蛍光染色の結果を Fig. 3 に示した。Fig. 3-1 は各投与群における Cx32 陽性スポット数の推移を DEN のみ投与した対照群を「1」とした時の割合で示した。全投与群で対照群に比し陽性スポット数が減少する傾向を認めたが、特に DEN+Fen の 1800 ppm 群以上と DEN+Feb の 2000 ppm 群での減少は著しく、また DEN+Oxf では用量相関性は認められなかったものの最低用量の 10 ppm 群でも有意に減少した。Fig. 3-2 は Cx32 陽性面積を数と同様に DEN 投与のみの対照群を「1」とした割合で示した。Cx32 陽性面積の減少も数と同様の傾向を示したが、DEN+Oxf 100 ppm 群、DEN+Fen 70 ppm 群および DEN+Feb 1000 ppm 群を除くすべての用量群で有意な陽性面積の減少を認めた。

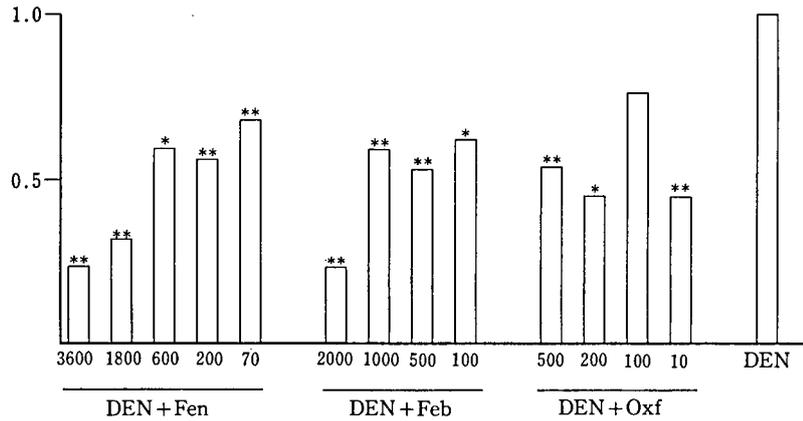


Fig. 3.1. Changes in number of Cx32 Spots per hepatocyte in rats given diet containing fenbendazole, febantel or oxfendazole with DEN initiation.

Asterisks represent significant differences from the DEN alone group values (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

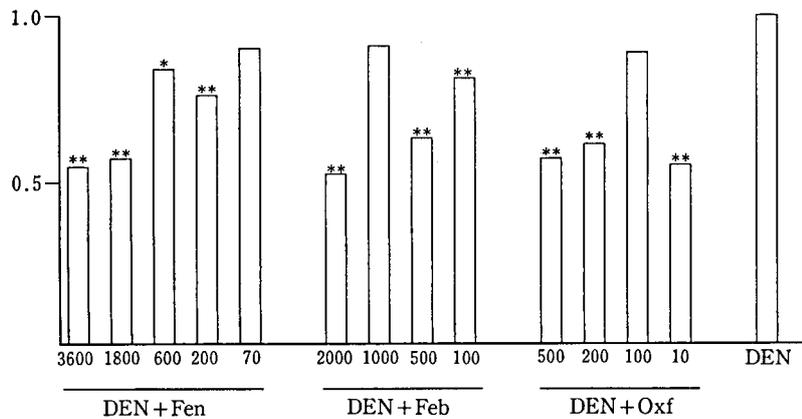


Fig. 3.2. Changes in area of Cx32 spots per hepatocyte in rats given diet containing fenbendazole, febantel or oxfendazole with DEN initiation.

Asterisks represent significant differences from the DEN alone group values (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

GST-P 免疫組織学的染色結果を Table 3 に示した。今回の実験ではすべての投与群で肝臓の GST-P 陽性巣が結節状増殖巣として認められることはなく、単細胞、あるいは数個の陽性細胞の集簇として認められた。各群、陽性単細胞数と 2 個以上の陽性細胞の集簇数、それらの合計陽性巣数を算定したところ、陽性単細胞数は DEN+Fen では 1800 ppm 以上の投与群、DEN+Feb では 1000 ppm 以上の投与群、DEN+Oxf では 250 ppm 以上の投与群で有意な増加が認められた。2 個以上の陽性細胞集簇および合計陽性巣数は、DEN+Fen の 1800 ppm 以上の投与群、DEN+Fen 2000 ppm 群、DEN+Oxf 250 ppm 群で有意に増加した。

考 察

Fen は畜産動物の内寄生虫駆除剤として日本を除く世界

各国で広く用いられており、輸入畜産食品中にはこれらの系統の薬物が残留している可能性がある。Fen をラットに大量長期間投与することにより肝腫瘍が誘発される報告があり、ヒトへの発がん性リスクが FAO/WHO の食品添加物専門家委員会 (JECFA) によって評価されている²⁾。それによると Fen には変異原性が認められない事から、遺伝子障害性発がん物質とは考えられず、肝に対する作用に閾値が存在するものと判定して、暫定 ADI (0~25 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{b.w.}$) が提案されている²⁾。一方、Fen のプロドラッグである Feb および両剤の体内での主代謝物である Oxf については、発がん性試験は実施されているが、発がん性は認められていないことから、これらの薬剤についても暫定 ADI が設定されている。

今回の実験では各被験物質の投与群において肝の相対重量の増加が低用量から認められたが、絶対および相対重量

Table 3. No. of liver GST-P positive foci in rats given diet containing fenbendazole, febantel or oxfendazole with or without DEN initiation

Dose levels (ppm)	Single cell	Multiple cells	Total
DEN+Fen			
3600	48.2±3.3*** [‡]	21.2±1.8**	69.4± 3.5**
1800	26.0±6.1**	8.2±1.5**	34.2± 7.3**
600	10.0±1.4	1.8±1.6	11.8± 2.3
200	11.0±2.6	5.0±1.2	16.0± 2.2
70	13.0±3.7	6.0±4.5	19.0± 7.9
DEN+Feb			
2000	21.8±9.9*	8.8±1.6**	30.6±10.7*
1000	12.8±0.8*	3.4±1.8	16.2± 1.1
500	14.8±4.0	3.8±2.2	18.6± 5.5
100	13.0±2.0	2.8±1.9	15.8± 2.2
DEN+Oxf			
500	14.8±4.1*	5.0±3.4	19.8± 7.5
250	22.6±8.2	13.8±6.8**	36.4±14.4*
100	10.8±4.1	4.2±3.0	15.0± 6.9
10	10.8±2.8	4.0±1.9	14.8± 3.4
DEN alone	11.4±2.3	4.6±2.2	16.0± 3.3

[‡]: Mean±S.D

***: Significantly different from DEN alone group values at p<0.01 and p<0.05, respectively.

の両者が有意に増加したのは、DEN 処置群では Feb 2000 ppm 群と Oxf 500 ppm 群のみであり、DEN を処置しなかった投与群 (Fen 200 ppm 以上の群) での変動と一貫性がなかった。これには DEN 処置による肝臓に対する傷害性が関連しているものと考えられた。最近、肝 P450 アイソザイムの誘導と肝腫瘍プロモーション作用との間に関連がある事が報告されている。特に CYP2B1 の誘導が肝腫瘍プロモーターであることを示唆する報告が多々なされている³⁾。今回の実験では、P450 アイソザイムの誘導は CYP1A1/2 を主体に CYP2B1 や CYP4A1 が誘導され、CYP2B1 の誘導能から、これらの物質にも肝腫瘍プロモーション作用が存在することが窺える。また、これらのアイソザイムが誘導される強さは Oxf で顕著であり、代謝物質の肝薬物

代謝酵素誘導能が最も強いことが示唆された。GST-P 免疫組織化学染色では、肝の前癌性病変と考えられている結節状変異陽性細胞巣は今回認められなかったが、陽性単細胞か数個の陽性細胞集簇の増加が各物質の高用量群でみられた。これは、DEN 処置後の被験物質の投与期間が短かった事およびプロモーション作用がそれ程強くない事に起因するものと考えられた。しかし、いずれの物質も高用量群で陽性細胞が増加する傾向を示した事から、これらの物質を長期間投与することにより、肝腫瘍が誘発される可能性が推察された。

近年、ギャップ結合細胞間連絡は組織の恒常性を維持する上で必須であることが知られており、その障害は発がん過程を促進する上で重要な役割を果たしていることが報告されている⁴⁾。事実、肝の前癌病変部位あるいはフェノバルビタールや DDT 等、肝腫瘍プロモーション作用を有する物質を投与された肝においては細胞間結合蛋白の変異や減少が認められている⁵⁻¹⁰⁾。また、発がん抑制物質を投与する事により、これらの蛋白が増加する事実も報告されている¹¹⁾。更に、P450 CYP2B1 が誘導される肝細胞では Cx32 の抑制が同時に認められる報告もあり、CYP2B1 を誘導し、かつ Cx32 を抑制する化学物質は肝腫瘍プロモーターである可能性が非常に高いとみなされる。今回の実験では、Fen で Cx32 の発現が各用量で抑制され、かつ変異原性陰性や GST-P 陽性細胞巣の増加も考え合わせると、Fen の肝における催腫瘍性は、この物質の腫瘍プロモーション作用によって発現したものと推察された。Fen のプロドドラッグである Feb やその代謝物である Oxf においても CYP2B1 が誘導されたことから、Feb や Oxf にも同様の肝腫瘍プロモーション作用が存在することが強く示唆された。Table 4 に示すように、Oxf の LD₅₀ 値は Feb や Fen に比べ約 1/2 倍とその毒性は高く、NOEL (無作用量) も Feb のそれより更に 1/6 倍低いことが報告されている。更に、P450 の誘導は Oxf で強く、Cx32 の抑制も Oxf の低い用量でみられた。したがって三物質中 Oxf が最も強いプロモーション作用を有するものと推察された。今回の実験では、各物質ともに既に実施された慢性毒性試験で NOEL と報告されている用量においても Cx32 の陽

Table 4. Summary of the toxicity and carcinogenicity of benzimidazole compounds

	Febantel	Fenbendazole	Oxfendazole
LD ₅₀ (mg/kg)	10605	10000	6400
Minimum dose inducing hepatocellular hypertrophy (mg/kg)	40(1/250)*	15(1/650)	7.8(1/800)
NOEL (mg/kg)	8(1/1300)	5(1/2000)	0.8(1/8000)
High dose in carcinogenicity study (mg/kg)	40(1/265)	135(1/75)	6.6(1/1970)
Result of carcinogenicity study	-	+	-

* Number in parenthesis represents the ratio of each value to LD₅₀ value.

-: negative, +: positive

性スポット数や面積が減少した。これは、従来の試験法より鋭敏に投与に関連する変化を検出し得る事を示すものであり、毒性試験のNOELを決定する手法として今後充分に検討すべき指標と考えられた。

以上の成績から、畜産食品中に残留する薬物については、親化合物のみならず、代謝物の毒性についても評価すべきであることが強く示唆された。残留動物用医薬品の代謝物についての毒性の評価に関する資料は今の所少なく、今回の実験成績は今後の安全性評価に重要な情報を提供するものであると考える。すでにFAO/WHOにおいて国際規格として勧告されている薬物の中には、代謝物についての安全性に関する資料が少ないものもあり、今後更にこの種の資料の蓄積が望まれる。

文 献

- 1) WHO Technical Report Series 815, pp. 13~30 (1991) "Evaluation of certain veterinary drug residues in food" World Health Organization, Geneva.
- 2) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: "Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food" WHO food additives series: 29 pp. 23~106 (1991), World Health Organization, Geneva.
- 3) Mark J. Neveu, Karlee L. Babcock, Elliot L. Hertzberg, David L. Paul, Bruce J. Nicholson and Henry C. Pitot.: Colocalized alteration in connexin32 and cytochrome P450IIB1/2 by phenobarbital and related liver tumor promoters. *Cancer Research*, **54**, 3145~3152 (1994)
- 4) I. V. Budunoval and G. M. Williams.: Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. *Cell Biology and Toxicology*, **10**, 71~116 (1994)
- 5) D. James Fitzgerald and Hiroshi Yamasaki.: Tumor Promotion: Models and Assay Systems "Assay Systems of Tumor Promotion" pp. 89~102 (1990) Programme of Multistage Carcinogenesis, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France
- 6) Marc Mesnil and Hiroshi Yamasaki.: Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: Evidence and hypothesis. *Molecular carcinogenesis*, **7**, 14~17 (1993)
- 7) Mark J. Neveu, James R. Hully, Karlee L. Babcock, Elliot L. Hertzberg, Bruce J. Nicholson, David L. Paul and Henry C. Pitot.: Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in rat liver. *Journal of Cell Science*, **107**, 83~95 (1994)
- 8) Shigeyuki Sugie, Hideki Mori and Masayoshi Takahashi: Effect of in vivo exposure to the liver promoters phenobarbital or DDT on the gap junctions of rat hepatocytes: a quantitative freeze-fracture analysis. *Carcinogenesis*, **8**(1), 45~51 (1987)
- 9) J. E. Trosko, C. C. Chang, B. V. Madhukar, J. E. Klaunig: Chemical, oncogene and growth factor inhibition of gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiology*, **58**, 265~278 (1990)
- 10) Marc Mesnil, Colette Piccoli and Hiroshi Yamasaki: An improved long-term culture of rat hepatocytes to detect liver tumour-promoting agents: results with phenobarbital. *European Journal of Pharmacology*, **248**, 59~66 (1993)
- 11) Kristi Sigler and Randall J. Ruch.: Enhancement of gap junctional intercellular communication in tumor promoter-treated cells by components of green tea. *Cancer Letters*, **69**, 15~19 (1993)