

Ⅱ. 分担研究報告書

3. アクリルアミドによる毒性影響の抑制に関する実験的研究

分担研究者 広瀬 雅雄

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)

分担研究報告書

アクリルアミドによる毒性影響の抑制に関する実験的研究

分担研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所病理部 部長

研究要旨:

アクリルアミド(AA)によって誘発される神経障害ないし精巣障害に対する、種々の化学物質の併用投与による抑制効果について検討を行った。動物は SD:IGS ラットを用い、AA を 200ppm 飲水投与し、同時に抱合体の基質となる N-acetylcystein (NAC, 10000ppm), 解毒酵素を誘導する 2-phenethyl isothiocyanate (PEITC, 500 ppm), 抗酸化剤であり、かつ cytochrome P450 の阻害作用のある 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ, 1000ppm)の混餌投与を行った。その結果、AA による神経障害に関しては、今回の検索では、Gait score では HTHQ が部分的に神経症状を改善したものの、病理組織学的検索では、抑制効果は明らかではなかった。一方、精巣障害に対しては、病理組織学的に PEITC、HTHQ が部分的に障害を抑制する事が明らかとなった。

A. 研究目的

アクリルアミド(AA)は主に紙力増強剤、合成樹脂、合成繊維、排水中等の沈殿物凝集剤、土壌改良剤、接着剤、塗料、土壌安定剤らの原料として用いられており、職業上 AA に暴露された作業員等に対して神経障害を引き起こすことや、雄の動物を用いた実験で、繁殖障害を示すことが確認されている。また、この物質は遺伝毒性を示し、発がん性が懸念されており、International Agency for Research on Cancer (IARC)による発がん性分類において、AA は2A (人に対しておそらく発がん性がある)に分類されている。

近年、スウェーデン政府により、ストックホルム大学と共同で行った研究の結果、炭水化物を多く含むイモ等を焼く、または揚げることにより、AA が生成されるという発表があったため、直ちにわが国に流通する加工食品中の AA 含量の検討と、未だ詳細が解明されていない AA の毒性評価等や生成機序の検討等に必要データ収集も行うため、緊急の研究班が組織された。

AAは炭水化物食品を120℃以上に加熱した際、それに含まれるアスパラギン等のアミノ酸と糖の反応により

生成され、ポテトチップス類の製造過程で多量に生成される(1312 μg/kg)。ヒトでの一日当たりの平均摂取量を検討した結果、0.8~6.0 μg/kg 体重(短期摂取の場合)、0.3~0.8 μg/kg 体重(長期摂取の場合)であることが判明した。

AAによる神経毒性は、Na⁺,K⁺-ATPaseを標的とした fast axonal flow の阻害による軸索傷害を主体としている。病理組織学的には、sensorimotor neuron の遠位端からの障害を特徴としており、central and peripheral distal axonopathy を生じ、病変の進行とともに強い運動失調を招く。実験的に求められた神経障害の NOEL は 0.5 mg/kg/day となっている。

雄性生殖障害は、神経障害に起因した運動障害による二次的な影響の他、減数分裂後の精子に対する DNA 付加体形成による影響が考えられている。この生殖障害の NOEL は 2 mg/kg/day となっている。

生体に取り込まれた AA は、チトクローム P450 酵素によりグリシダミドとなり各種の細胞に DNA 付加体を形成し遺伝子を傷害する。このグリシダミドはグルタチオン

抱合を受けて解毒される。

本研究は、経口的に摂取された AA による毒性影響に対する抑制作用を検討する目的で、神経毒性と精巢毒性を標的として、抱合体の基質となる N-acetylcystein (NAC)、解毒酵素を誘導する 2-phenethyl isothiocyanate (PEITC)、抗酸化剤であり、かつ cytochrome P450 の阻害作用のある 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) の併用投与による影響を検討した。

B. 研究方法

6 週齢の雄 SD:IGS ラットを 8 群に分け、無処置対照群の他、AA は飲水により、各種化学物質は混餌により投与を行った。AA の投与濃度は、飲水投与により投与数週間以内に神経障害が生じることが知られている文献値を参考に 200ppm とした。AA ないし化学物質の単独投与群の他、両者の併用投与群を設定した。化学物質として、抱合体の基質となる N-acetylcystein (NAC, 10000ppm)、解毒酵素を誘導する 2-phenethyl isothiocyanate (PEITC, 500 ppm)、抗酸化剤である 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ, 1000ppm) を選択した。投与期間は 28 日間とし、投与期間中、摂餌量、摂水量 (ACR 投与群のみ) と神経症状 (Gait score) を週一回の割合でモニターした。Gait score は、各個体について 60 x 45 x 45 cm のプラスチック製の箱に静置し、姿勢などを観察し、Normal gait を 1 点、Slightly abnormal gait (slight ataxia, hopping gait, foot splay) を 2 点、Moderately abnormal gait (obvious ataxia, foot splay, limb abduction) を 3 点、Severely abnormal gait (inability to support body weight and foot splay) を 4 点としてカウントした。実験終了時に、各群 8 例について、定法に従い解剖を行い、肝臓、腎臓、精巢、精巢上体、脳(小脳と延髄を含む)、頸髄、胸髄、腰髄、三叉神経、座骨神経、腓骨神経を採取し、肝臓、腎臓、精巢については重量を測定した。精巢以外の臓器は 10% 磷酸緩衝ホルマリンで固定し、精巢はブアン固定し、それぞ

れパラフィン包埋切片につき、ヘマトキシリン・エオジン染色。また、無処置対照 3 例と AA を投与した全群の各 5 例につき、心臓から 4% paraformaldehyde/0.1 M PB にて灌流固定を行い、頸髄と末梢神経をエポン包埋し、1 μ m 切片を作成し、トルイジンブルー染色を行った。(倫理面への配慮)

倫理面への配慮として、主な動物投与実験は経口投与により行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。また、動物はエーテル深麻酔下で大動脈ないし心臓からの脱血ないしにより屠殺したため、動物に与える苦痛は最小限にとどめた。

C. 研究結果と考察

投与期間中、群間で摂餌量を比較したところ、投与開始 1 週目から、AA 投与した各群で摂餌量の減少ないし減少傾向を認めた (Table 1)。摂水量は AA 投与群のみについて測定したが、群間に差はなく AA 摂取量についても群間に差は認められなかった (Fig. 1)。また、体重については、投与開始後 1 週目より AA 投与を行った全群で、無処置対照群に比し体重の低値を認めたが、AA+PEITC 及び AA+HTHQ 投与群では回復傾向がみられた (Table 2)。Gait score は、投与 3 週目まで AA 投与各群の間で明らかな差は認めなかったが、AA+HTHQ 群でスコアの低値傾向を認め、4 週目ではこの群で対照群に比べ明らかな低値を示した (Fig. 2)。AA 投与を行っていない群では、明らかな神経症状は認められなかった。

解剖時の相対臓器重量は、NAC 単独投与群及び HTHQ 単独投与群で肝臓重量、AA 単独投与群及び AA+NAC 投与群で精巢重量の増加を認めた (Table 3)。

病理組織学的検索の結果、AA 投与各群で末梢神経の軸索、脊髄背索の変性、三叉神経のニューロンの色質融解を認めたものの、その程度に群間に明らかな差は認められていない (Table 4)。精巢では AA 投与各群で精細管の精上皮細胞の脱落ない residual body 様の

構造が管腔内に認められ、その程度は、AA 単独に比べ、AA+PEITC と AA+HTHQ 投与群で明らかに弱かった。また、精巢上体では AA 投与各群で細胞残屑が認められたが、その程度は AA 単独に比べ、AA+PEITC 投与群で明らかに弱かった (Table 4)。

以上の結果から、神経障害に関しては、今回の検索では、Gait score では HTHQ が部分的に神経症状を改善したものの、病理組織学的検索では、抑制効果は明らかではなかった。AA による神経障害は、AA のモノマーが直接神経細胞に作用して毒性を及ぼすという仮説が提示されているが、抗酸化物質投与により、神経症状が部分的に改善されるという報告もある。一方、AA による精巣障害に対しては、PEITC 及び HTHQ が部分的に障害を抑制する事が明らかとなり、これらの化学物質が、代謝活性化あるいは解毒酵素の誘導に影響を及ぼしている可能性が示唆される。また、毒性発現に酸化性ストレスが関与している可能性も否定できない。今後、これらの実験材料について、病変の定量計測を追加検索し、AA の毒性作用に対する PEITC や HTHQ による修飾作用を精査する予定である。

D. 結論

AA による神経障害に関しては、今回の検索では、Gait score では HTHQ が部分的に神経症状を改善したものの、病理組織学的検索では、抑制効果は明らかではなかった。一方、精巣障害に対しては、PEITC、HTHQ が部分的に障害を抑制する事が明らかとなった。

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

F. 知的所有権の取得状況

特になし。

Table 1. Food intakes of animals treated with AA, or AA and NAC, PEITC or HTHQ in combination

	7 days	14 days	21 days	28 days
Control	21.4 ± 2.2	20.1 ± 7.6	34.7 ± 2.4	24.6 ± 3.1
NAC	20.9 ± 2.3	21.2 ± 8.6	30.6 ± 5.5	23.0 ± 9.3
PEITC	18.7 ± 0.7	17.3 ± 6.9	25.4 ± 0.4	18.5 ± 3.3
HTHQ	19.6 ± 2.2	17.0 ± 7.7	26.7 ± 1.8	20.3 ± 5.0
AA	16.8 ± 1.7 ^{**}	12.5 ± 4.5	24.9 ± 2.6	18.7 ± 2.3 ^{**}
AA+NAC	16.6 ± 1.5 ^{**}	16.2 ± 4.9	23.5 ± 3.6 [#]	19.8 ± 2.4 [*]
AA+PEITC	15.8 ± 1.5 ^{**}	16.0 ± 5.9	23.4 ± 2.0 ^{###}	20.2 ± 1.5 [*]
AA+HTHQ	16.2 ± 1.1 ^{**}	14.0 ± 4.4	25.0 ± 2.4	19.9 ± 2.9 [*]

Data expressed as mg/rat/day.

^{*,**}: p<0.05,0.01, parametric statistical method.

^{###}: p<0.05,0.01, nonparametric statistical method.

Table 2. Body weight changes of animals treated with AA, or AA and NAC, PEITC or HTHQ in combination

	0	7 days	14 days	21 days	28 days
Control	289.6 ± 17.3	327.7 ± 18.0	343.7 ± 43.8	395.5 ± 34.0	419.8 ± 35.0
NAC	286.9 ± 8.9	326.9 ± 8.5	341.0 ± 43.6	389.2 ± 24.0	393.2 ± 41.8
PEITC	285.8 ± 9.1	319.6 ± 7.0	319.0 ± 40.8	376.4 ± 20.0	388.7 ± 23.9
HTHQ	284.6 ± 11.3	320.5 ± 16.3	327.1 ± 51.0	386.6 ± 31.9	400.7 ± 49.4
AA	289.2 ± 15.0	300.5 ± 16.1 ^{**}	291.0 ± 20.5 ^{**}	331.3 ± 16.3 ^{###}	337.7 ± 17.6 ^{###}
AA+NAC	290.6 ± 15.4	301.2 ± 15.6 ^{**}	298.6 ± 36.8 ^{**}	328.4 ± 43.3 ^{###}	338.2 ± 43.4 ^{###}
AA+PEITC	288.6 ± 16.6	300.6 ± 18.2 ^{**}	310.6 ± 36.3 [*]	346.7 ± 27.0 [#]	358.1 ± 30.2 ^{###}
AA+HTHQ	286.0 ± 12.4	295.6 ± 12.7 ^{**}	294.4 ± 28.8 ^{**}	337.2 ± 23.5 ^{###}	348.4 ± 27.3 ^{###}

All weights given in grams.

^{*,**}: p<0.05,0.01, parametric statistical method.

^{###}: p<0.05,0.01, nonparametric statistical method.

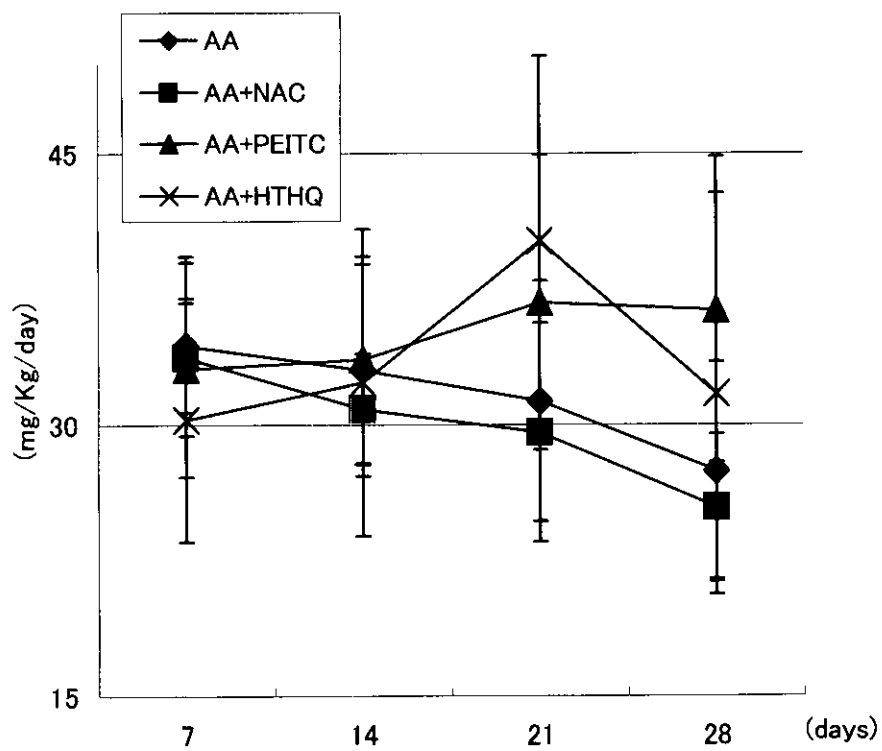


Fig. 1. Acrylamide intake. Statistically non-significant between groups

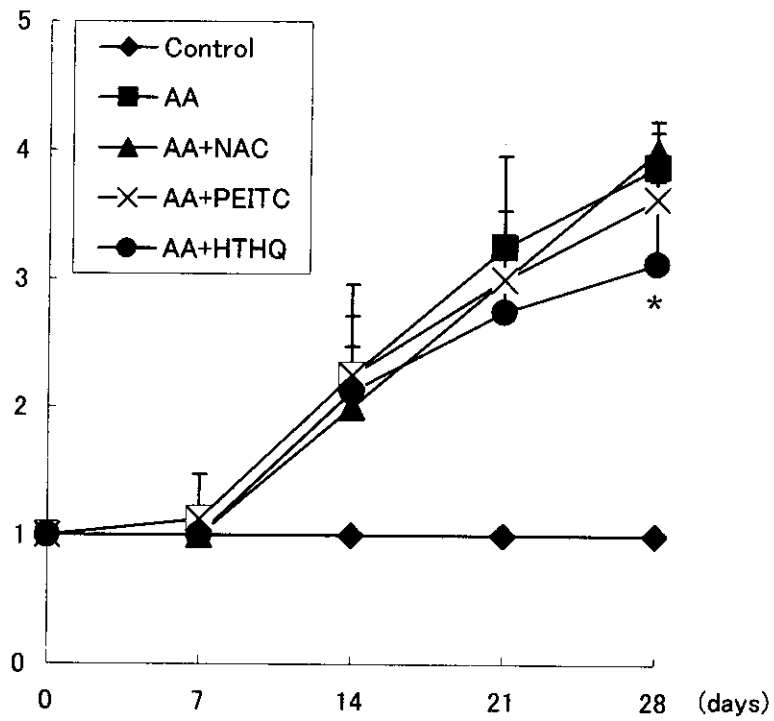


Fig. 2. The gait scoring of each treatment group during exposure experiment (n=8/group).

* : p<0.05 vs. control

Table 3. Relative liver and testis weights.

	Relative liver weight (g/100g bw)	Relative testis weight (g/100g bw)
Control	3.33 ± 0.23	0.81 ± 0.10
NAC	3.85 ± 0.19*	0.82 ± 0.07
PEITC	3.67 ± 0.39	0.79 ± 0.06
HTHQ	4.22 ± 0.08**	0.88 ± 0.06
AA	3.12 ± 0.21	0.98 ± 0.06*
AA+NAC	3.54 ± 0.40	0.99 ± 0.11*
AA+PEITC	3.54 ± 0.17	0.93 ± 0.05
AA+HTHQ	3.51 ± 0.25	0.93 ± 0.06

* , ** : p<0.05,0.01, parametric statistical method.

, ## : p<0.05,0.01, nonparametric statistical method.

Table 4. Histopathological changes of the testis and nervous system in acrylamide-treated animals in combination with NAC, PEITC or HTHQ.

	Control	AA	AA+NAC	AA+PEICTC	AA+HTHQ
No. of rats examined	8	8	8	8	8
Epididymis					
Desquamated cell debris in tubule (\pm /+/+/+++)	0	8(1/2/4/1)**	8(1/3/1/3)**	8(5/3/0/0)**, ^{##}	8(4/4/0/0)**
Testis					
Exfoliation of germ cell or residual body like structure in seminiferous tubule (\pm /+/+/+++)	0	8(1/2/4/1)**	8(2/1/5/0)**	8(7/1/0/0)**, ^{##}	8(5/3/0/0)**, ^{##}
Trigeminal nerve					
Chromatolysis (+/+/+++)	0	8(1/4/3)**	8(3/5/0)**	8(2/6/0)**	8(3/5/0)**
No. of rats examined	3	5	5	5	5
Sciatic Nerve					
Axonal degeneration (+/+/+++)	0	5(0/3/2)**	5(0/3/2)**	5(2/0/3)**	5(0/3/2)**
Spinal cord					
Axonal degeneration (+/+/+++)	0	5(0/2/3)	On going	On going	5(0/3/2)

Grade of change; \pm , minimal; +, slight; ++, moderate; +++ severe

** Significantly different from the controls by Fisher's exact test ($p < 0.01$)

^{##} Significantly different from the ACR group by Mann Whitney's U-test ([#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$)

Ⅱ. 分担研究報告書

4. 加工食品中のアクリルアミドの毒性評価に関する研究

分担研究者 菅野 純

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)

分担研究報告書

加工食品中のアクリルアミドの毒性評価に関する研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

研究要旨

食品中に含まれるアクリルアミドのヒトへの毒性評価並びに今後の研究方向を探る目的で、アクリルアミドの毒性に関する文献調査を行った。アクリルアミドの主な毒性として、発癌性、神経毒性、生殖発生毒性が報告されているが、最も低用量で毒性が認められているのは神経毒性であった。アクリルアミドの発癌性や精巢毒性の作用機序として、アクリルアミドあるいはその代謝物のグリシダミドと DNA あるいは蛋白との付加体形成が関与していることが示唆されている。一方、現時点で、ヒトへの発癌性を示す疫学的データは報告されていなかった。

A. 研究目的

アクリルアミドの毒性に関しては、発がん性、神経毒性、生殖発生毒性などの毒性が既に報告されている。国際がん研究機関(IARC)は既に、発がん性分類においてアクリルアミドを2A(ヒトに対しておそらく発癌性がある)に分類している。しかし、低用量のアクリルアミドをヒトが食品中から摂取した場合にどの程度のリスクが有るか明らかではない。本研究では、リスクアセスメントに資することを目的に、アクリルアミドやその代謝物の発癌性、発がん機序の情報並びに、神経毒性、生殖・発生毒性、その他の種々の毒性(変異原性を除く)について、既知の報告から最新の論文まで幅広く収集し、アクリルアミドの毒性に関する知見をまとめた。

B. 方法

WHOのEHC(1985)やIARC(1994)を始め

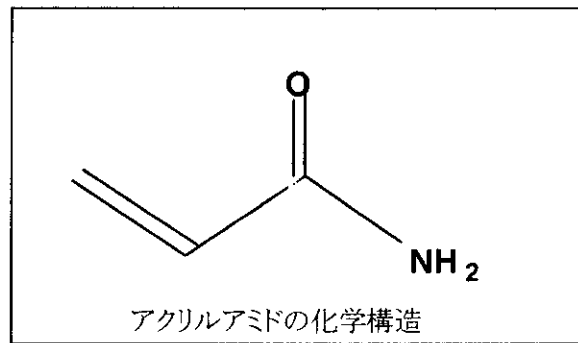
とする、国際機関や各国政府機関で行われていたアクリルアミドの健康リスク評価報告書並びにアクリルアミドの毒性に関する直近の論文までを収集し、アクリルアミドの毒性研究の現状について調査した。

C. 結果

1. アクリルアミドの物理化学的性質と用途

a)物理化学的性質

アクリルアミドは無臭、室温で白色結晶、分子式 C_3H_5NO 、分子量 71.08 である。アクリルアミドは容易に水(30度で2155g/l)及び極性溶媒(アセトン、メタノール、エタノール等)に溶ける。しかし、非極性溶媒(ベンゼン、四塩化炭素、ヘプタン等)には不溶である。比重 1.122(30度)、沸点は136度3.3kPa、融点は84.5度。アクリルアミドは親核性物質と反応する α 、 β 不飽和アミド系を有する。反応の主要な部位は蛋白、アミノ酸のSH基である。



b)用途

- 1) 凝集剤:工業排水、下水処理、化学工場での沈降促進にポリアクリルアミドの部分加水分解物が使用されている。
- 2) 土壌改良剤:土粒子を団粒化し、空気の流通性、水浸透性、保水性を改良するため、ポリアクリルアミドの部分加水分解物が使用されている。
- 3) 繊維の改質及び樹脂加工:合成繊維を含む各種繊維に対して、アクリルアミドをカルバモイル化、グラフト重合させ、繊維そのものの基礎物性を改良したり、セルロース系織物のシワ防止、防縮を目的とした樹脂加工として使用。
- 4) 紙力増強剤
- 5) 接着剤:ポリアクリルアミドをフェノール樹脂溶液とともに使用したガラス繊維の接着剤、合成ゴム系エマルジョンと併用した感圧接着剤。
- 6) 塗料:アクリル系熱硬化性塗料の原料
- 7) 石油回収剤:ポリアクリルアミド水溶液を地下油層に注入し、石油二次回収を行う。(以上、11892の化学商品1992より)
- 8) 電気泳動用ゲル

2. 実験動物に対する毒性

1)急性毒性

急性毒性試験結果から、経口でのアクリル

アミドのLD50値はマウス、ウサギ、モルモット、ラットとも約100-150mg/kgである(McCollister et al.1964, Paulet 1975, Hashimoto et al. 1981)

2)慢性毒性・発癌性

a)ラット

Johnsonらは(1986)、雌雄F-344ラットを用いたアクリルアミド2年間飲水投与試験を行なった。1群60匹のラットに0、0.01、0.1、0.5、2mg/kg/dayの濃度でアクリルアミドを2年間投与した。別の群として6、12、18ヶ月目に一群10匹ずつ解剖した。血液学的、臨床化学検査は3、6、12、18及び21ヶ月目を実施した。体重は、2mg/kg/day群の雌雄と0.5mg/kg/day群の雄で減少した。試験の最後の4ヶ月で、雌雄2mg/kg/day群で死亡率の増加が見られた。2mg/kg/day群で末梢神経の変性が認められた。雄では、鞘膜中皮腫の有意の増加が0.5及び2mg/kg/day群で認められた(0、0.01、0.1、0.5、2mg/kg/day群でそれぞれ、3/60、0/60、7/60、11/60、10/60)。0.1mg/kg/day群では有意差は無いが、増加傾向が認められた。雄の2mg/kg/day群で甲状腺腫が有意に増加した(0、0.01、0.1、0.5、2mg/kg/day群でそれぞれ、1/60、0/58、2/59、1/59、7/59)。また雄の2mg/kg/day群で副腎髄質腫が有意に増加した(0、0.01、0.1、0.5、2mg/kg/day群でそれぞれ

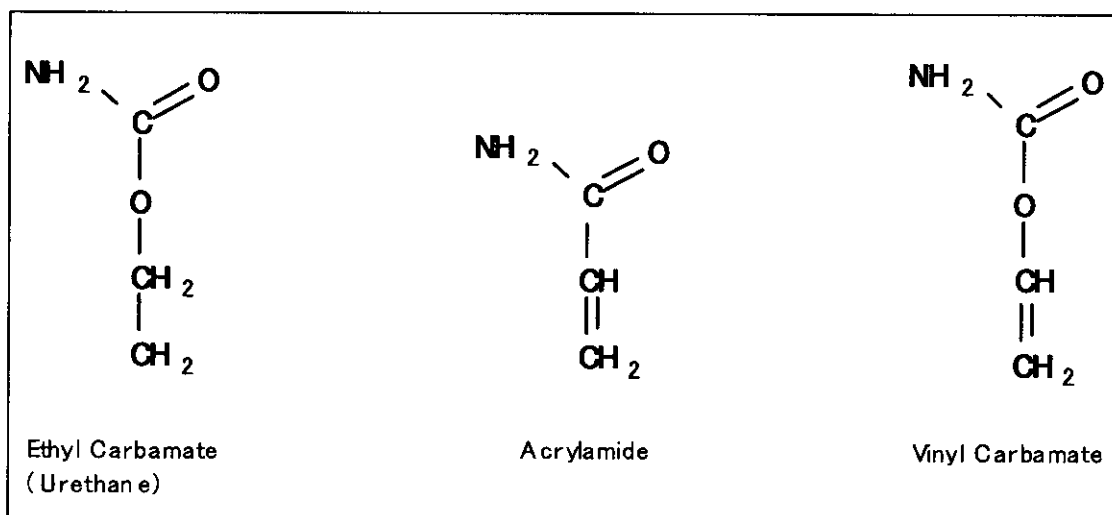
れ、3/60、7/59、7/60、5/60、10/60)。雌の2mg/kg/day 群で、乳腺、中枢神経系、甲状腺腺ろ胞上皮、口腔、子宮の腫瘍増加が認められたことを報告した。

Friedmanら(1995)は雄 F344 ラットに飲水中に 0(204 匹)、0.1(204 匹)、0.5(102 匹)、2mg/kg/day(75 匹)で 2 年間投与し、雌ラットに 0(100 匹)、1(100 匹)、3mg/kg/day(100 匹)で同様に投与した。外見上神経毒性は認められなかったが、座骨神経の変性が雌雄の高用量群で認められた。死亡率の増加が雄の高用量群で 17 ヶ月より、雌の高用量群の 24 ヶ月目で認められた。雄で精巣の鞘膜中皮腫が 2.0mg/kg/day 群で有意に増加したが、0.5mg/kg/day 群では有意な増加は認められなかった(0、0、0.1、0.5、2mg/kg/day 群でそれぞれ、4/102、1/102、9/204、8/102、13/75)。雄の 2mg/kg/day 群で甲状腺腫が有意に増加した。雌ラットでの乳腺線維腫が 1 及び 3mg/kg/day 群で有意に増加した(0、0、1.0、3.0mg/kg/day 群でそれぞれ、7/50、4/50、21/100、30/100)。雌 3.0mg/kg/day 群で甲状腺腺ろ胞腺腫と腺癌の合計で有意な増加が認められた(0、0、1.0、3.0mg/kg/day 群でそれぞれ、1/50、1/50、10/100、23/100)。その他の腫

瘍の増加は認められなかった。

b)マウス

ラット発癌試験に加えて、非標準の発癌試験であるがマウスの発癌性試験が行われている。Bull らは(1984) 肺腫瘍の増加を報告した。彼等は、アクリルアミドがエチルカルバメートの発がん構造であるビニルカルバメートに構造的に似ているとの仮説を基に実験を行った。その結果、アクリルアミドは雌の Sencar マウスの皮膚でエチルカルバメートと同程度イニシエーション作用を示した。アクリルアミドは雌雄 A/J マウスに対して、経口(6.25、12.5、25.0mg/kgを週3回8週間投与)、腹腔内投与(1、3、10、30、60mg/kgを週3回8週間投与)でそれぞれ、用量依存的に肺腺腫を起こした。肺腺腫を誘導する強さはエチルカルバメートの約1/7であった。ただし、肺腫瘍の診断は肉眼のみで顕微鏡で確認していない。Robinson らは(1986)、アクリルアミドを 50mg/kg 腹腔内投与後、週3回20週間 TPA を皮膚塗布した SENCAR マウス(遺伝的に腫瘍が出易いマウス)で皮膚の乳頭腫と肺腫瘍発生率の増加を報告したが、BALB/c、A/J、ICR 系マウスでは認められなかったことを報告している。



3) 神経毒性

a) Burek らは(1980)、1mg/kg/day 以上の用量で 90 日間投与したラットの末梢神経を電子顕微鏡調べたところ、形態変化が増加していることを報告した(ただし、一群 3 例である)。これらの影響は 20mg/kg/day 群を除いて、144 日の回復期間後に回復した。電子顕微鏡による観察で、0.05 と 0.2mg/kg/day 群では変化は認められなかった。2 年間の慢性/発癌性試験で、外観上の観察から、神経毒性症状は認められなかった。しかし、末梢神経の変性が 2mg/kg/day 以上を 2 年間投与したラットで見られた(Johnson et al., 1986, Friedman et al., 1995)。

b) 神経毒性の作用機序についてこの数十年間研究が行われてきたが、未だ結論には至っていない。LoPachi らは(2002)神経終末がアクリルアミドの最初の標的であり、シナプスの障害とその結果の変性がアクリルアミドの神経毒性に必要なかつ十分なステップであることを示唆した。一方、別の機序として Sickles らは(2002)、前方への軸索輸送の運動蛋白であるキネシンの阻害が軸索輸送を減少させることがアクリルアミドの神経毒性の重要な要因であると提案している。

4) 生殖・発生毒性

a) アクリルアミドを飲水で雌雄 F-344 ラットに、0.5、2.0、5mg/kg/day で 10 週間投与し、交配すると 5mg/kg/day 群で着床前、着床後の胎児の消失が起こり、母獣当たりの生存児の数が有意に減少することを報告されている(Tyl et al., 2000)。これらの作用は F0 と F1 世代の両方に見られる。ラットでの母獣当たりの生存児の消失率は F0 で約 34%、F1 で 23%であった。妊娠 6 日から授乳 10 日まで

アクリルアミドを 10mg/kg/day 及びそれ以下の用量で投与された雌ラットの児では臨床症状や児の生存は出生及び出生 21 日まで影響を受けなかった。この試験で、児の体重は 15mg/kg/day 群で減少、20mg/kg/day で児の生存の減少が見られている(Wise et al., 1995)。

b) CD-1 マウスにアクリルアミドを飲水で 3, 10, 30ppm の濃度で 27 週間投与した場合(30ppm 群で雄 8.8mg/kg/day、雌 8.8mg/kg/day)、30ppm 群で、生存児の有意な減少が報告されている(F0 で 11%の減少、F1 で 47%の減少)。30ppm 群では F0 及び F1 の親とも神経毒性が認められている(握力低下)。雄マウスにアクリルアミドを 30ppm の濃度で飲水投与し、非投与雌と交配すると、有意な初期胎児の吸収の増加が認められている。15mg/kg/day までのアクリルアミドを妊娠 6-20 日に雌ラットに投与あるいは 15mg/kg/day まで投与した雌マウス(妊娠 6-17 日)の胎児での生存率、成長、用量に依存した奇形の増加は見られなかった(Field et al., 1990)。

c) Tyl らは最近の総説で(Tyl et al., 2003)、考えられるアクリルアミドの生殖・発生毒性の機序を要約している。1)アクリルアミド and/or グリシダミドは精子細胞のプロタミンに結合し、優勢致死作用や(染色体異常による)、精子形態異常を起こす。2)アクリルアミドは motor 蛋白のキネシン、ダイネインに結合することにより、遠位の軸索変性(神経細胞体から軸索への分子輸送の障害による)を生じ、後肢の脱力、おそらくはペニスの麻痺を起こし、交尾、挿入、精子運動へ影響する。3)アクリルアミドは直接 DNA に結合しても(おそらく弱い)、生殖、神経毒性に影響を与えそう

も無い。グリシダミドも DNA に直接結合するが、アクリルアミドの生殖・神経毒性に直接関係しているようには思えないとしている。

3. トキシコキネティクス

1) 吸収

アクリルアミド経口投与ラットでの分布と排泄を調べた研究から、アクリルアミドはたやすく吸収されることが明らかになった。アクリルアミドを単回 20mg/kg/day 経口投与または、腹腔内投与 (50mg/kg/day) した実験で (Barber et al., 2001)、経口吸収の定量は行われなかったが、二つの投与経路間の AUCs の比較から経口吸収の定性的評価が行われた。経口暴露による吸収はグリシダミドへの多くの変換を伴って、腹腔内暴露よりやや少ないことが示唆された。

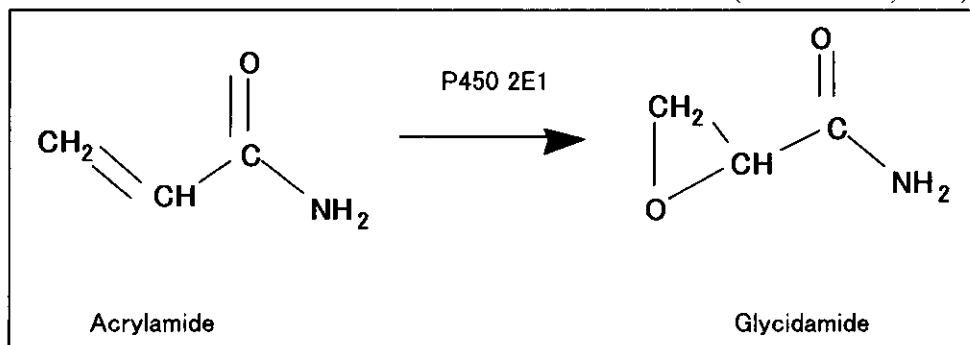
2) 分布

イヌとブタに 1mg/kg のアクリルアミドを経口投与すると、双方とも最大に分布するのは筋組織で投与量の 30-50% であった。イヌで筋組織分布後の最大の分布を示したのは肝臓 (-14%) であった。ブタでは筋組織分布後では胃腸管であった (-20%)。著者はブタはイヌよりアクリルアミドの吸収が遅いためではないかと推察している (Ikeda et al., 1987)。絶食した妊娠 Swiss Webster マウス (妊娠 13.5 日と 17.5 日) に 120mg の [2,3-¹⁴C]アクリルアミド/kg を経口投与すると、妊娠 13.5 日で調べた胎児では

脳にやや多く (この時期の胎児は他の化合物投与でも同じ分布になる)、他は均一にラベルされた。妊娠 17.5 日では分布様式は胎児皮膚に高いレベルで存在することを除いては母親の組織への分布と似ていた (Marlowe et al., 1986)。3ppm のアクリルアミドを 6 時間吸入暴露した後、24 時間後で、ラットでは大部分が血液、次いで、皮膚、脾臓、肺であった。同じ用量と暴露プロトコールで、マウスでは異なった分布パターンが見られた。最も多く分布したのは皮膚、次いで皮下脂肪、精巣、血液であった (Sumnar et al, 2001)。

3) 代謝

チトクローム P450 系を経て形成される主要な代謝物はグリシダミドである (Miller et al., 1982)。この代謝物を形成能に種差が報告されている。尿中代謝物に基づく結果から、マウスはラットより変換力が大きい (Sumner et al., 1997)。アクリルアミドは一旦吸収されるとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と包合し、N-acetyl-S-(3-amino-3-oxopropyl)cysteine になるか、CYP450 と反応してグリシダミドを生成する (Sumner et al, 1992)。ラット、マウスとも大部分の代謝物は N-acetyl-S-(3-amino-3-oxopropyl)cysteine でラットでは尿中代謝物の 70%、マウスでは 40% である (Sumner et al., 1997)。



4) 排泄

ラットでは親化合物としてのアクリルアミドの排泄は低く(2%以下)、主に尿中に見られる(Miller et al., 1982)。雄 SD ラットでの経口(20mg/kg)、腹腔内(50mg/kg)投与後の血漿中のアクリルアミドとグリシダミドの半減期は単回、繰り返し投与でも、約 2 時間であった(Barber et al., 2001)。

5) 蛋白及び DNA 付加体

アクリルアミドとグリシダミドは親電子性でありヘモグロビンや他の蛋白の SH 基と付加体を作ることができる(Barber et al., 2001)。アクリルアミドは親核性物質と Michael 付加により反応する α 、 β 不飽和系を有している。反応の主要部位は SH 基のシステインである。

Segaらは(Sega et al., 1990)、46mg/kgのアクリルアミドを単回腹腔内投与すると、精巣と肝臓の DNA のアルキル化が増加することを報告し、これはアクリルアミドよりグリシダミドによるものと考えている。Segeberckら(1995)は、アクリルアミド単回腹腔内投与したラット(46mg/kg)、マウス(53mg/kg)で、肝臓、肺、腎、脾臓、脳、精巣で N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl) guanine 付加体を同定した。マウスにおけるこの付加体形成はラットに比べ、全体に高かった。

4. 疫学調査

a) 神経毒性

中国や南アフリカでアクリルアミドの製造や使用に従事する職業暴露労働者に対する神経毒性影響が複数調べられている。Heらは(1989)、71人(男45人、女26人)年令17-41才、アクリルアミド製造工場で、1-18ヶ月雇用されたヒトを調べた。暴露されていない51人(男33人、女18人)を対照群とした。約73%がアクリルアミド毒性症状を示した。アクリルア

ミド暴露の初期症状は手の皮膚剥離で、続いて、脚力の低下、手と足の無感覚、足指の知覚障害、足首反射の消失である。活動電位の振幅減少、心電図での神経性異常などの神経心電図の異常と足首腱反射の延長などを認めた。症状を認めた大部分の労働者は27-30%のアクリルアミドモノマーの水溶液を取り扱っていた。Dengら(1993)は、0.2-1.58mg/m³の空气中濃度のアクリルアミドに0.5-8年暴露された化学工場の労働者に関するものである。振動閾値は他の非暴露の105人の同じ年令の大人に比較して有意に高かったことを報告した。Mayersらは(1991)、1985年南アフリカでの柔毛性ポリアクリルアミドを生産する工場での調査を報告した。この工場で5人が末梢神経症と診断された。このことから残りの66人について工業衛生と神経評価が行われた。空气中アクリルアミドのモノマーの濃度は0.02-0.75mg/m³であり、平均暴露期間は2年であった。全体としてアクリルアミドに関連性のあることが知られている異常は暴露群で67%、非暴露群で14%に見られた。さらに追加観察を行ったところ75人で感覚低下、足の痛み、手の皮膚剥離と発汗が認められた。外観的神経異常は見られなかった。振動閾値と暴露の間に関連性は無かった。

b) 発癌性

8845人の男性労働者中、2293人がアクリルアミドに暴露された。4工場が評価され、3工場は米国、1工場はオランダであった。コホートは1925年1月より1973年1月まで雇用された労働者からなる。喫煙歴は大部分のコホートで不明であった。アクリルアミド暴露は0.001mg/m³-year以上の累積暴露と定義した。米国とオランダの死亡率を比較した。調査期間は1994年まで延長された。死亡率から癌による死亡の優位な増加は見られなかった。1

工場で気管の癌の増加が報告されたが (Collins et al., 1989, Marsh et al., 1999)、この増加は労働者が *muriatric* 酸に暴露されたためとされた。暴露反応解析結果から $0.3\text{mg}/\text{m}^3$ 以上のアクリルアミドに暴露された労働者で膵臓癌による死亡増加が見られたが、より低い濃度では見られなかった。しかし、報告者らは膵臓癌の大きな要因である喫煙歴が利用出来ないことに言及している。暴露反応解析結果から食道、直腸、腎臓癌による死亡率とアクリルアミドに暴露に相関性はないことが示された。この結果、Marsh らは(1999)、この研究結果はアクリルアミドと癌死亡率との関係を示す証拠はほとんど無いと結論した。

スウェーデンでの最近の疫学調査からヒトでのアクリルアミド摂取量と大腸癌、膀胱癌、腎臓癌の発生率の間に相関は無いことが報告されている(Mucci et al., 2003)。スウェーデンで大腸癌 591 例、膀胱癌 263 例、腎臓癌 133 例と 538 例の健康なヒトでのアクリルアミド摂取量と癌になる確率を比較した。その結果、これらの癌の増加とアクリルアミド摂取量との間に相関は無かった。逆に、大腸癌との間に逆相関する傾向が見られた。他の癌や神経毒性との関連を見るにはさらなる疫学調査が必要であるとしている。

1) 考察

アクリルアミドの毒性に関しては既に膨大なデータがある。発癌性に関しては、ラットで陰嚢、甲状腺、副腎、乳腺、中枢神経、甲状腺、子宮等の種々の臓器に腫瘍が、マウスで肺腫瘍が報告されている。しかし、マウスでのデータは完全な発癌性試験でないので、参考データとしての扱いである。マウス肺腫瘍に関しては、米国 NTP でマウスの発癌性試験を行う予定なので、その結果が待たれる。ヒトでの疫学調査で、アクリルアミドとヒトの発癌を示すデ

ータは報告されておらず、また、スウェーデンでの最近の疫学調査からヒトでのアクリルアミド摂取量と大腸癌、膀胱癌、腎臓癌の発生率の間に相関は無いことが報告されている。よって、日常摂取レベルでのアクリルアミドがヒトへの発癌を誘導する可能性は高くないことが示唆されるが、結論づけるには、上記の追加的毒性データの吟味と、詳細な暴露量を踏まえた上での疫学データが必要である。

2) 結論

1)アクリルアミドの重要な毒性として、発癌性、神経毒性、生殖発生毒性があるが、最も低用量で毒性が認められるのは神経毒性である。2)アクリルアミドの発がん性や精巣毒性の発現機構として、アクリルアミドあるいはその代謝物のグリシダミドとDNAあるいは蛋白との付加体形成が関与することが示唆されている。3)現時点で、ヒトへの発癌性を示す疫学的データは報告されていない。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

毒性の要約

哺乳動物における吸収、分布、代謝、排泄

経口吸収	経口暴露による吸収はグリシダミドへの多くの変換を伴って、容易に吸収される。
分布	吸入暴露ラットでは大部分が血液、次いで、皮膚、脾臓、肺に、吸入暴露マウスでは皮膚、次いで皮下脂肪、精巣、血液に分布。
蓄積性	無し(神経毒性に関してはある)
排泄	雄ラットでの経口(20mg/kg)、腹腔内(50mg/kg)投与後の血漿中のアクリルアミドとグリシダミドの半減期は単回、繰り返し投与でも、約2時間。
代謝	アクリルアミドは一旦吸収されるとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と包合し、N-acetyl-S-(3-amino-3-oxopropyl)cysteineになるか、CYP4502E1と反応してグリシダミドを生成する。ラット、マウスとも大部分の代謝物はN-acetyl-S-(3-amino-3-oxopropyl)cysteineでラットでは尿中代謝物の70%、マウスでは40%である。
毒性学的に意味のある化合物	親化合物のアクリルアミドとその代謝物のグリシダミド

急性毒性

LD50 経口	100-150mg/kg (マウス、ラット、モルモット、ウサギ)
皮膚刺激	あり
眼粘膜刺激	あり

短期毒性

標的器官/重要な毒性	神経毒性症状並びに精巣毒性
経口での最も低い NOAEL	0.2mg/kg/day (ラット 90 日間) 末梢神経の変性像(電顕)

長期毒性及び発癌性

標的器官／重要な毒性

神経系における基質的变化

経口での最も低い NOAEL

0.2mg/kg/day (ラット 90 日間、神経毒性より)
0.1mg/kg/day (ラット 2 年間、体重減少より)

発癌性

- ・ 陰囊 (中皮腫)、甲状腺、副腎腫瘍 (経口 0.5 及び 2mg/kg/day、雄 F-344 ラット)
- ・ 乳腺、中枢神経、甲状腺、子宮腫瘍 (経口 2mg/kg/day、雌 -344 ラット)
- ・ 肺腫瘍の用量に相関した増加 (経口 6.25、12.5、25.0mg/kg/day または、腹腔内 1、3、10、30、60mg/kg/day 週 3 回 3 週間投与、7ヶ月後、雌雄 A/J マウス)

生殖毒性

生殖毒性標的器官／重要な毒性

F1、F2 での着床前後での胎児死亡増加

経口での最も低い NOAEL

2mg/kg/day、10-11 週間 (ラット、二世代試験)

発生毒性標的器官／重要な毒性

体重減少

経口での最も低い NOAEL

15mg/kg/day (ラット)
10mg/kg/day (マウス)

神経毒性

90 日間神経毒性: NOAEL

0.2mg/kg/day (ラット 90 日間) 末梢神経の変性像 (電顕)

参考資料

米国で開催されたワークショップ(2002.10.28-30)の議事報告書の抜粋

2002年10月28日から30日に米国「JIFSAN (Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition) 食品安全性応用栄養協同研究所: FDA の機関 /NCFST (National Center for Food Safety & Technology) 国立食品安全性技術センター "Acrylamide in Food: Scientific Issues, Uncertainties, and Research Strategies": 米国 JIFSAN/NCFST 合同開催『食品中のアクリルアミド: 科学的事項、不確かさ、研究戦略』が開催された。このワークショップには、スウェーデン、アメリカをはじめ、すでに食品中のアクリルアミドの調査を行っている国々の政府機関、大学、民間の専門家約170人が集まり、1.アクリルアミドの生成機構、2.分析法、3.暴露評価とバイオマーカー、4.毒性と代謝、5.リスクコミュニケーションという5つの分野のワーキンググループに分かれ、研究の現状及び問題点を抽出し、今後どのような方向で研究を進めるべきかを議論した。

4.の毒性と代謝のワーキンググループは1)代謝とカイネティクス、2)遺伝毒性、3)生殖/発生毒性、4)発癌性、5)神経毒性、6)疫学の6分野において今後必要な研究の優先順位を決定した。

米国 JIFSAN/NCFST 合同開催『食品中のアクリルアミド: 科学的事項、不確かさ、研究戦略』で推奨された研究のリスト

1) 代謝とカイネティクス

食物からのバイオアベイラビリティを含むヒトの代謝、カイネティクスデータを集めること。

2) 遺伝毒性:

特に腫瘍形成部位のような重要な標的器官や雄生殖細胞におけるアクリルアミドやグリシダミドの DNA 付加体や核蛋白(例えば、プロタミン、染色体 motor 蛋白等)付加体形成を調べること。

3) 生殖/発生毒性

1)食物中よりのアクリルアミド摂取量に相当する用量(低用量域)での生殖細胞毒性の用量反応データを得ること。
2)食物中よりのアクリルアミド摂取量に相当する用量で神経発生影響を検出出来、NOAEL を決めることが出来るようなより感度の高い指標を用いた神経発生毒性試験の改良

4) 発癌性

1)病理専門家による最新の診断基準での動物実験の組織スライドのレビュー
2)アクリルアミドによる甲状腺腫瘍発生機序を調べる。

5) 神経毒性

用量、期間、影響レベルと神経毒性の出現との関係の動物試験での評価

6) 疫学

以前に評価された作業員あるいは高濃度暴露された集団における精子の染色体異常(形態、質)を評価するための新しい疫学調査をデザインし、実行すること。