

Characterization of the genomic instability in mismatch repair deficient human lymphoblastoid cell lines  
The Environmental Mutagen Society 34<sup>th</sup> Annual Meeting (2003 5)

MM Moore, M Honma  
Measures of cytotoxicity in the mouse lymphoma assay (MLA) Implication for data comparison with in vitro cytogenetic assays  
33rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2003 8)

M Honma, M Izumi, M Sakuraba, S Tadokoro, H Sakamoto, W Wang, F Yatagai, M Hayashi  
Deletion rearrangement, and gene conversion, the genetic consequences of chromosomal double strand breaks in human cells  
33rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2003 8)

T Suzuki P Rajaguru, J Kanno, H Sakamoto M Hayashi, T Yamaguchi, and M Honma  
GeneChip analysis on transcriptional changes induced in human lymphoblastoid (TK6) cells by six genotoxic chemicals  
33rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2003 8)

鈴木孝昌、小原有弘、山田勉也、佐伯憲一、本間正充、山口照英、林 真  
ニトロソアミン類がマウスに誘発する突然変異の多様性

第 62 回日本癌学会総会 (2003 9)

M Honma  
DNA double strand break repair and chromosome instability in mammalian cells  
日本放射線学会第 46 回大会(2003 10)

本間正充、泉雅子、桜庭真弓、田所聡、坂本浩子、王文晟、谷田貝文夫、林真  
Targeted Mutagenesis によるヒトゲノム中の DNA2 本鎖切断修復の解析  
日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003 11)

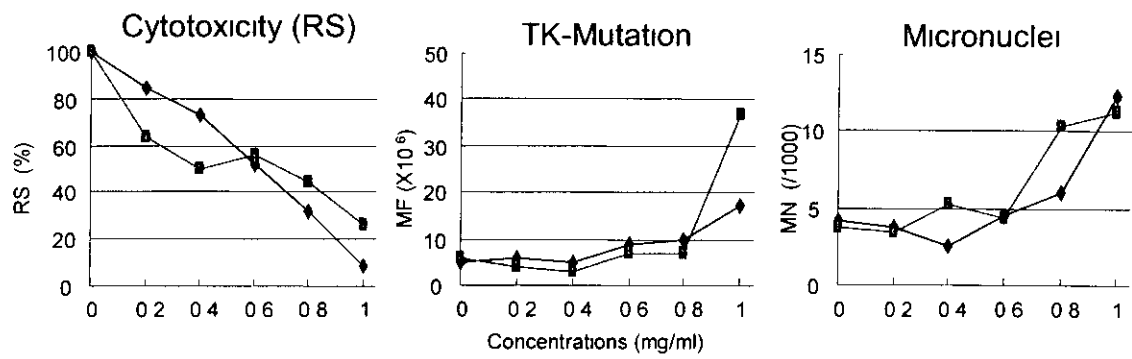
坂本浩子、本間正充、羽倉昌志  
ヒト細胞を基礎とした新しい in vitro 遺伝毒性評価系の構築 ヒト S9 の適応 (JEMS/MMS 第 2 回ヒト細胞共同研究)  
日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003 11)

パラニサミー・ランヤクル、鈴木孝昌、坂本浩子、菅野 純、林 真、本間正充  
ヒトリンパ腫由来 TK6 細胞における遺伝子傷害性物質による遺伝子発現変化の解析  
日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003 11)

本間正充  
ほ乳類細胞における DNA2 本鎖切断修復と遺伝的不安定性  
第 26 回日本分子生物学会(2003 12)

G 知的所有権の取得状況  
なし

**TK6 Cells (wild-type p53)**



**WTK-1 Cells (mutant p53)**

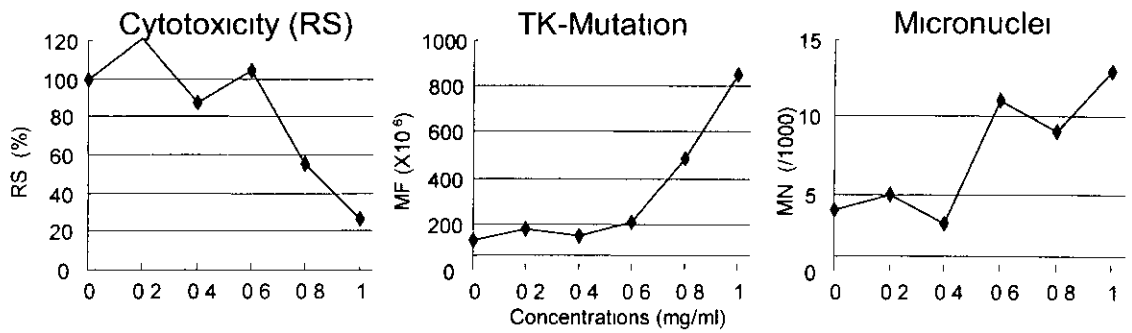


図1 TK6,WTK-1 細胞でのアクリルアミトに対する遺伝毒性

**WTK-1 Cells (mutant p53)**

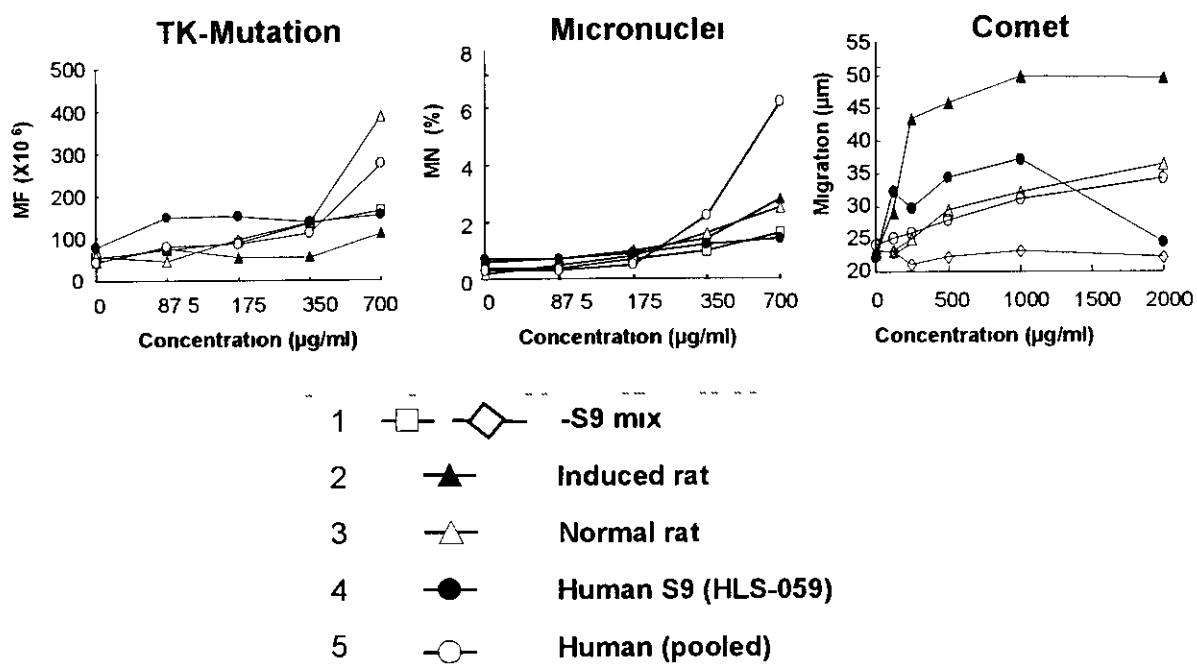


図2 WTK-1細胞での、ラットおよび、ヒト肝臓由来S9を用いたアクリルアミドに対する遺伝毒性試験

表1 自然誘発、および AA 誘発 TK 突然変異体の LOH 解析結果

Treatment	Cytotoxic and mutational response			LOH analysis at <i>TK</i> gene			
	RS	MF	% SG	No analyzed	None LOH	Hemi LOH	Homo LOH
Spontaneous	100	2.19	56	56			
NG mutants				19	14 (74)	3 (16)	2 (11)
SG mutants				37	0 (0)	9 (24)	28 (76)
AA-induced	40	18.9	54	43			
NG mutants				20	11 (55)	9 (45)	0 (0)
SG mutants				23	0 (0)	12 (52)	11 (48)

\* 1 mg/ml for 4 h

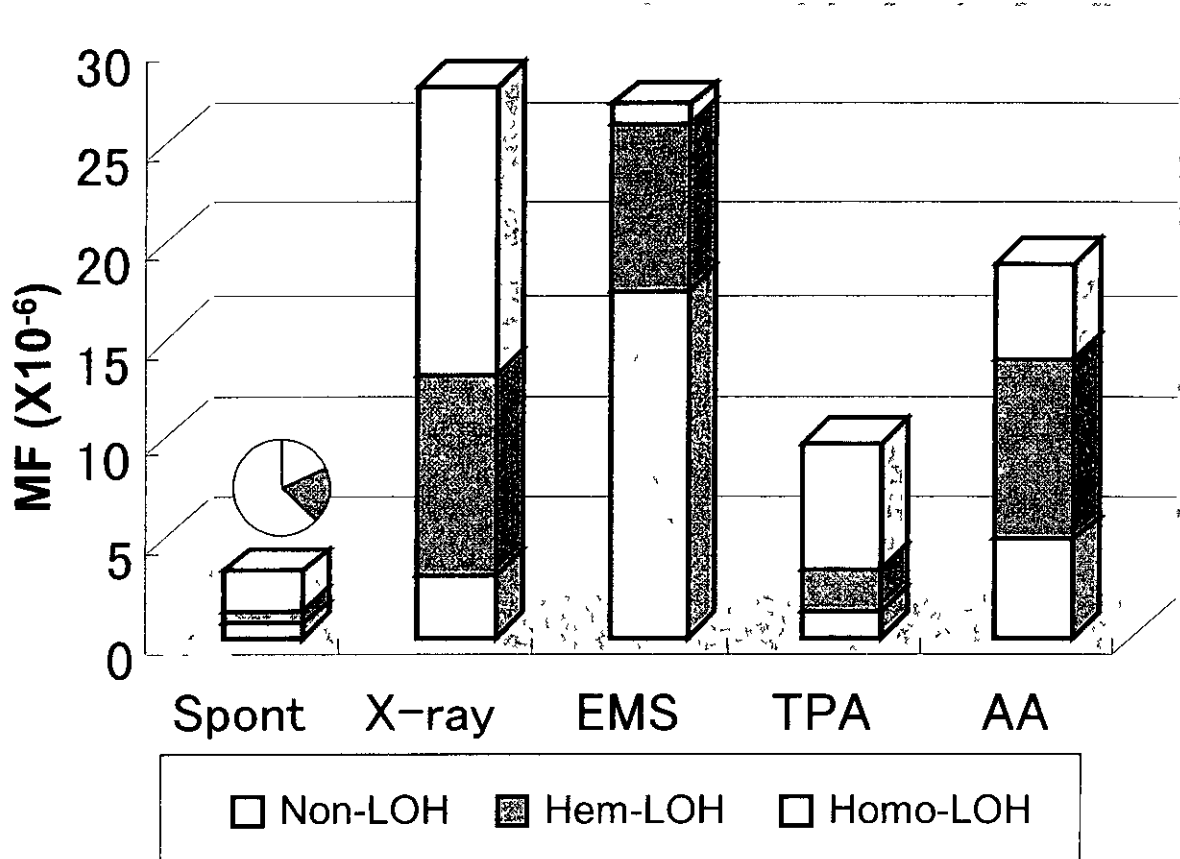


図3 TK6細胞のTK突然変異体の遺伝子変異スペクトル

厚生労働科学研究費補助金（生活安全確保研究事業）

分担研究報告書（平成15年度）

アクリルアミトの神経毒性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 アクリルアミト(ACR)によって誘発される精巣障害ないし神経障害に対して、抗酸化作用あるいは解毒酵素の誘導ないし阻害作用のある化学物質の併用投与か抑制効果を示すかどうかの検討を行った。動物はSD IGS ラットを用いて、ACRを28日間200 ppm 飲水投与して神経障害を誘発するモデルを用いた。ACRによる障害抑制の候補物質として、2000 ppm  $\alpha$ -lipoic-acid (ALA), 10000 ppm  $\alpha$ -tocopherol (TP), 1000 ppm diallyl sulfide (DAS)の混餌投与を、ACR投与に先立つ1週間前より行った。その結果、ACRによる精巣障害に対しては、病理組織学的にALA, TP, DASが部分的に障害を抑制する事が明らかとなった。神経障害に関しては、ALAがgait scoreに対し、部分的に神経症状を改善とともに、病理組織学的検索でも抑制効果が明らかとなった。

A 研究目的

アクリルアミト(ACR)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ACR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、ACR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、ACRが生成されるという発表があったため、昨年度の厚生労働科学研究において、わが国に流通する加工食品中のACR含量の検討と、未だ詳細が不明なACRの毒性評価等や生成機序の検討等に必要なたータ収集を行うため、緊急の

研究班が組織された経緯がある。

ACRは炭水化物食品を120°C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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/kg 体重（短期摂取の場合）、0.3~0.8  $\mu$ g/kg 体重（長期摂取の場合）であることが判明した。

ACRによる神経毒性は、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase と neurofilament 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 を生じるか、末梢の病変の進行とは関係なく強い運動失調を招く。最近の研究結果では、軸索末端が障害の最初の標的部位と考えられている。実験的に求められた神経障害のNOAEL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 NOAEL は 2 mg/kg/day となっている。

生体に取り込まれた ACR は、チトクローム P450(CYP) 2E1 によりクリシタミト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。このクリシタミトは ACR と同様にクルタチオン抱合を受けて代謝される。

昨年度の班研究において、ラットを用いた ACR の 28 日間にわたる飲水投与による神経障害誘発モデルにおいて、クルタチオン抱合の基質である N-acetylcystein (NAC), 第 II 相解毒酵素の誘導と共に CYP 2E1 を阻害することか知られている phenylethyl isothiocyanate (PEITC), CYP 阻害作用か知られている 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) について、ACR と共にそれぞれ同時投与した結果、PEITC と HTHQ において有意差はないものの精巣障害に対する抑制作用と HTHQ においては神経障害に対する部分的な抑制作用を見出した。今年度の本研究では、昨年の研究班で行われた研究と同様に、経口的に摂取された ACR による神経毒性と精巣毒性に対する抑制作用を検討する目的で、神経細胞に対する抗酸化作用を示し、糖尿病性ニューロパチーなどに対して抑制作用を示すことか知られている  $\alpha$ -lipoic acid (ALA), 強い抗酸化作用を示す  $\alpha$ -tocopherol (TP), ニンニク由来の第 II 相解毒酵素の誘導剤であり CYP 2E1 の阻害剤である diallyl sulfide (DAS) 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、各 10 匹に分け、無処置対照群の他、各種の候補物質は混餌により、ACR は飲水により投与を行った (Table 1)。ACR の投与濃度は、飲水投与により投与数週間に

内に神経障害が生じることか知られている文献値を参考に 200 ppm とした。ACR ないし被検物質の単独投与群の他、両者の併用投与群を設定した。投与濃度は、ALA は 2000 ppm, TP は 10000 ppm, DAS は 1000 ppm とした。投与期間は被検物質を 7 日間前投与の後、28 日間被検物質と ACR を併用投与した。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 90 x 90 x 20 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、定法に従い解剖を行い、肝臓、精巣、精巣上部、脳 (小脳と延髄を含む)、頸髄、胸髄、腰髄、三叉神経、座骨神経を採取し、肝臓、精巣、精巣上部については重量を測定した。精巣以外の臓器は 10% 磷酸緩衝ホルマリンで固定し、精巣はブアン固定し、それぞれパラフィン包埋切片につき、ヘマトキシリン・エオシン染色。また、座骨神経は摘出の前に 2.5% glutaraldehyde の点滴固定を行った後採取し、エポキシ包埋後、1  $\mu$ 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、体重については、ACR 投与開始後 1 週目より ACR 投与を行った全群で、無処置対照

群に比し体重の低値傾向が認められ、4週目では有意な低値を示した(Table 2)。また、Gait score に関しては、投与3週目までACR投与各群の間で明らかな差は認められなかったか、ACR+ALA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へ明らかな低値を示した(Fig 1)。他のACRとの併用投与群ではACR単独投与群との間に明らかな差は認められなかった。また、ACR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。

解剖時の臓器重量(相対)は、DAS単独投与群で肝臓重量の減少、ACR単独投与群、ACR+ALA、ACR+DAS投与群で精巣重量の増加、またACR+ALA、ACR+DAS投与群で精巣上体重量の増加を認めた(Table 3)。

病理組織学的検索の結果、ACR投与により精巣精細管での精上皮細胞の脱落が管腔内に認められ、その程度は、ACR単独に比へ、ACR+ALA、ACR+TP、ACR+DAS投与群で明らかに弱かった(Table 4)。また、ACR投与各群で精巣上体管内での細胞残屑が認められ、その程度は、ACR単独に比へ、ACR+DAS投与群で明らかに弱かった(Table 4)。神経毒性を検索した結果、ACR投与各群で末梢神経の軸索の変性と萎縮を認めたものの、その程度はACR単独投与群に比へACR+ALA投与群で明らかに弱いことが確認された(Table 4)。他のACRとの併用投与群ではACR単独投与群との間に明らかな差は認められなかった。

以上の結果から、ACRによる精巣障害に対しては、ALA、TP、DASが部分的に障害を抑制する事が明らかとなった。このことは、これらの物質の投与によって、ACRによるフリーラシカルの生成が抗酸化作用により抑制されるとともに、遺伝毒性代謝産物であるクリンダミトの生成抑制あるいは解毒亢進が生している可能性が考えられる。神経障害に関しては、Gait scoreではALAが部分的

に神経症状を改善し、坐骨神経の病理組織学的検索でもALAによる抑制効果が認められた。ALAは神経好性の抗酸化物質として注目されており、以上の結果は、ACRによるニューロン内でのフリーラシカルの生成が抑制された可能性を示唆している。今後、これらの実験材料について、病変の定量計測とともに酸化的障害の検索を行い、ACRの毒性作用に対するこれらの物質による修飾作用を精査する予定である。

## D 結論

ACRによる精巣障害に対しては、ALA、TP、DASが部分的に障害を抑制することが明らかとなった。神経障害に関しては、ALAが部分的に抑制効果を示すことが明らかになった。

## E 研究発表

1 論文発表  
特になし。

2 学会発表

Masao Hirose Japan's Reaction to the Acrylamide in Foods Issue and Key Research Effort on Prevention of Acrylamide-induced Neuronal and Reproductive Toxicities in Rats 食品中アクリルアミトの健康問題に関する国際シンポジウム, 2003年8月, 韓国, ソウル

Masao Hirose Prevention of Acrylamide Induced Toxicity in Rats 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学会, 2004年2月, 神戸

## F 知的所有権の取得状況

特になし。

Table 1 Experimental design

Group	No of animals	28 days	
		7	0
1	10	Basal diet	
2	10	0 2% ALA in diet	
3	10	1%TP in diet	
4	10	0 1% DAS in diet	
5	10	Basal diet	200 ppm ACR in water
6	10	0 2% ALA	0 2% ALA in diet + 200 ppm ACR in water
7	10	1% TP	1% TP in diet + 200 ppm ACR in water
8	10	0 1% DAS	0 1% DAS in diet + 200 ppm ACR in water

Table 2 Body weight changes in rats exposed to ACR and/or ALA, TP or DAS

	0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Control	249 8 ± 11 7	307 0 ± 17 3	344 6 ± 21 2	387 0 ± 28 0	412 5 ± 30 0
ALA	243 7 ± 12 4	295 7 ± 21 8	331 5 ± 27 8	358 7 ± 31 3	379 2 ± 35 5
TP	260 0 ± 8 1	320 5 ± 6 2	357 0 ± 8 7	395 9 ± 11 7	427 0 ± 17 7
DAS	259 5 ± 13 0	318 7 ± 14 4	360 9 ± 29 1	397 1 ± 29 6	416 3 ± 43 7
ACR	252 2 ± 9 7	285 0 ± 12 3**	318 2 ± 14 8*	335 7 ± 17 0**	339 3 ± 19 1**
ACR+ALA	250 9 ± 11 6	279 0 ± 19 7**	313 7 ± 30 5	328 5 ± 32 7**	334 6 ± 36 5*
ACR+TA	260 8 ± 14 2	293 0 ± 23 0	325 1 ± 27 7	351 1 ± 40 1*	356 1 ± 42 8*
ACR+DAS	257 7 ± 13 7	298 4 ± 21 0	335 5 ± 28 2	358 2 ± 33 5	369 6 ± 37 1*

\* Significantly different from control,  $p < 0.05$



Table 3 Intakes of food and ACR, and final body and relative organ weights

	BW (g)	Food intake (g/day)	Relative organ weights (g/100g BW)		
			Liver	Testes	Epididymis
Control	418.1 ± 30.6	21.7 ± 0.7	3.75 ± 0.36	0.77 ± 0.06	0.24 ± 0.02
ALA	381.9 ± 36.4	21.9 ± 1.5	3.75 ± 0.36	0.77 ± 0.06	0.24 ± 0.02
TP	426.1 ± 17.0	24.0 ± 2.0	3.80 ± 0.20	0.74 ± 0.09	0.25 ± 0.02
DAS	414.6 ± 46.6	23.0 ± 0.5	3.30 ± 0.26*	0.78 ± 0.15	0.26 ± 0.03
ACR	342.8 ± 19.0**	19.7 ± 1.2	3.75 ± 0.23	0.96 ± 0.09**	0.27 ± 0.02
ACR+ALA	330.7 ± 35.3**	20.2 ± 1.5	3.95 ± 0.28	0.97 ± 0.11**	0.28 ± 0.04**
ACR+TP	355.8 ± 41.9**	21.2 ± 3.0	3.73 ± 0.19	0.86 ± 0.12	0.26 ± 0.03
ACR+DAS	367.3 ± 34.7**	21.5 ± 0.6	3.58 ± 0.22	0.89 ± 0.08*	0.28 ± 0.03*

\*, \*\* Significantly different from the controls, \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 4 Effect of co-exposed ALA, TP or DAS on the ACR-induced histopathological changes in male genital organs and sciatic nerves

	Control	ACR	ACR+ALA	ACR+TP	ACR+DAS
Testis					
Exfoliation of spermatocytes or spermatids ( $\pm$ /+/+/+/+)	(10/0/0)	(0/3/6/1)	(4/6/0/0)**	(4/4/2/0)*	(3/6/1/0)**
Epididymis					
Desquamated cell debris in duct ( $\pm$ /+/+)	(10/0/0)	(2/7/1)	(7/2/1)	(6/3/1)	(7/3/0)*
Sciatic nerve					
Axonal atrophy (+/+/+/+)	0	(2/6/2)	(8/2/0)*	(5/5/0)	(2/7/1)
Axonal degeneration (+/+/+/+)	0	(3/5/2)	(7/1/0)*	(2/8/0)	(4/3/3)

\* Significantly different from the controls,  $p < 0.05$

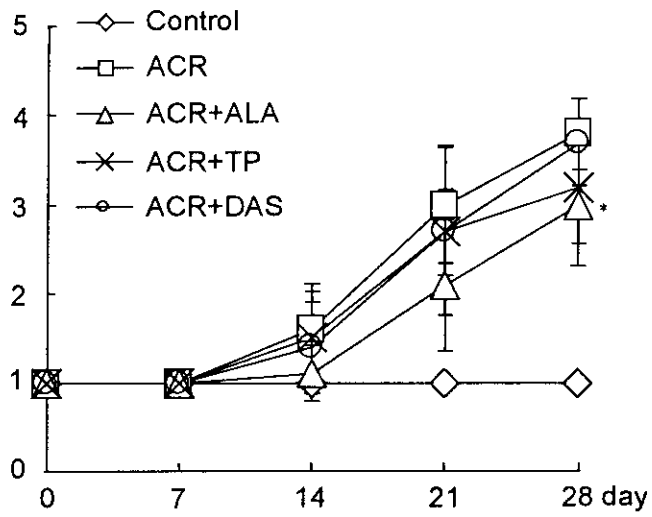


Fig 1 Effect of co-exposed ALA, TP or DAS on the gait scores in rats exposed to ACR  
 \*, Significantly different from the ACR alone

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
分担研究報告書

アクリルアミトの発がん性抑制に関する実験的研究

分担研究者 今井 俊夫 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 第三室長

研究要旨

本研究では、アクリルアミト(AA)の発がん性を抑制する物質を見出すことにより、AA 摂取による発がんリスクを低減させる方法を実験的に確立することを目的とする。今年度は具体的な発がん抑制物質のスクリーニングに先立ち、AA のラットにおける発がん標的臓器である乳腺及び甲状腺について、早期発がんモデルの確立を試みた。まず、雌性SDラットに乳腺発癌物質である7,12-dimethylbenz(a)anthracene 及び甲状腺発癌物質である*N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine で処置した後、40及び20ppm濃度でAAを22週間飲水投与したか、乳腺及び甲状腺いずれにおいてもAA投与による発がん促進作用は認められなかった。次に、雌性SDラットに乳腺及び甲状腺をはじめ種々の臓器に発癌標的性を示す*N*-methyl-*N*-nitrosourea(MNU)で処置した後、40及び20ppm濃度でAAを30週間飲水投与した。その結果、AAの40ppm投与により乳癌の発生頻度が有意に( $p < 0.05$ )増加し、発生数は増加傾向を示した。しかし、甲状腺についてはAA投与による作用は認められなかった。以上より、AAの発がん性に対する抑制物質のスクリーニングを行う場合、MNUを用いた乳腺発がんモデルが適していると考えられた。

A 研究目的

炭水化物を多く含む食品の加熱調理によりアクリルアミト(AA)が生成され、広く加工食品中に含まれることが発表され、我が国を含む各国で種々の加工食品についてその含有量が調査された。その結果、国内の市販加工食品から最高3544ng/gのAAが検出された(Takatsuki, Maitani et al, 2003)。AAの毒性として、ヒトでは神経毒性、実験的には神経毒性、精巣毒性、遺伝毒性及び発がん性が知られ、中でも遺伝毒性を伴う発がん性のヒトへのリスクが懸念される。AAの発がん性については、これまでSencarマウスあるいはM/Jマウスにおける皮膚及び肺に対する発がん性(Bull et al,

1984)のほか、F344ラットにおける2年間飲水投与による発がん性試験において、乳腺、甲状腺あるいは精巣外膜中皮をはじめとした諸臓器組織に対して発がん性を示すことが報告されている(Johnson et al, 1986, Friedman et al, 1995)。しかし、AAの発がん性を抑制する方法については殆ど報告されていない。本研究では、AAの発がん性を抑制する物質を見出すことにより、AA摂取による発がんリスクを低減させる方法を実験的に確立することを目的とする。今年度は具体的な発がん抑制物質のスクリーニングに先立ち、AAによる乳腺及び甲状腺に対する早期発がんモデルの確立を試みた。

## B 研究方法

[DMBA-DHPN モデル] 雌性 SD ラット 60 匹に甲状腺発癌物質である *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を 2800mg/kg 体重の用量で単回皮下投与した 1 週間後に乳腺発癌物質である 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) を 50mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与した。その後ラットを 3 群に分け、AA を 40, 20 及び 0 (対照) ppm 濃度で 22 週間飲水投与した。AA の投与量は、報告されている 2 年間の発がん性試験において乳腺及び甲状腺に発がん性かみられた用量にもとづいて設定した (Johnson et al, 1986, Friedman et al, 1995)。AA 投与期間中は週 1 回、触診により乳腺腫瘍の発生状況を観察してその大きさを測定した。投与期間終了後は、エーテル深麻酔下にて動物を放血屠殺、剖検した。剥皮後、皮下結節/腫瘍を詳細に観察し、甲状腺、肝臓については摘出後重量を測定した。さらに腎臓、肺、食道、膀胱についても摘出し、病理組織学的検索を行った。

[MNU モデル] 雌性 SD ラット 60 匹に、乳腺及び甲状腺をはじめ種々の臓器に発がん標的性を示す *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) を 50 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した後ラットを 3 群に分け、AA を 40, 20 及び 0 (対照) ppm 濃度で 30 週間飲水投与した。AA 投与期間中は週 1 回、触診により乳腺腫瘍の発生状況を観察してその大きさを測定した。投与期間終了後は、エーテル深麻酔下にて動物を放血屠殺、剖検した。剥皮後、皮下結節/腫瘍を詳細に観察し、甲状腺、肝臓については摘出後重量を測定した。さらに腎臓、肺、食道、膀胱、胃 (前胃)、脾臓、胸腺、脾臓、脳についても摘出し、病理組織学的検索を行った。

[統計方法] 死亡率については Cochran Armitage の傾向検定を、体重及び乳腺腫瘍の

発生数については F 検定の後、Student あるいは Welch の t 検定を、乳腺腫瘍の発生頻度については Fisher の直接確率検定法を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

## C 研究結果

[DMBA-DHPN モデル] 生存率および体重において AA 投与による有意な変化は認められなかった (Table 1, Figs 1, 2)。AA の 40 及び 20ppm 群において各々 20 例中 3 及び 1 例の途中死亡/切迫屠殺例かみられたか、主な原因は乳腺腫瘍の大型化に伴う出血及び貧血、一般状態の悪化であった。触診による乳腺腫瘍の経時的観察において、その発生頻度、数及び体積の推移に AA 投与による著明な変化は認められなかった (Fig 3)。剖検時の肝臓及び甲状腺重量にも AA 投与による影響はみられなかった (Table 1)。乳腺腫瘍の組織学的検索において、対照群の 19 例中 16 例 (84%) に  $5.11 \pm 4.37$  個/ラットの腺癌の発生かみられたか、その頻度及び数に対する AA 投与の影響は認められなかった (Table 2)。肝臓の肝細胞腺癌か AA20ppm 群の 20 例中 2 例に、腎臓の腎芽腫か 20ppm 群及び対照群の各々 20 例中 1 例に、悪性リンパ腫か 40ppm 群及び対照群の各々 20 例中 1 例にみられた。甲状腺、肺、食道及び膀胱においては、対照群を含む各群に腫瘍を含む増殖性病変は認められなかった。

[MNU モデル] 途中死亡/切迫屠殺か AA40ppm 群の 20 例中 4 例及び対照群の 20 例中 1 例にみられた (Fig 4)。40ppm 群における 4 例中 1 例の切迫屠殺は、下肢麻痺による一般状態の悪化のため実施した。40ppm 群における 4 例中 3 例及び対照群の 1 例の途中死亡/切迫屠殺の主な原因は乳腺腫瘍の大型化に伴う出血及び貧

血、一般状態の悪化であった。体重では、40ppm群において対照群と比し軽微な体重増加抑制傾向がみられた (Table 3, Fig 5)。触診による乳腺腫瘍の経時的観察では、AA の 40、20ppm 群及び対照群において各々 AA 投与開始 6、8 及び 12 週後に腫瘍の発生がみられた。その発生頻度及び数において 40 及び 20ppm 群において増加傾向がみられ、体積については AA 投与による変化は認められなかった (Fig 6)。剖検時の肝臓及び甲状腺重量に AA 投与による影響はみられなかった (Table 3)。乳腺腫瘍の組織学的検索において、対照群の 20 例中 10 例 (50%) に  $1.00 \pm 1.34$  個/ラットの腺癌の発生がみられ、40ppm 群では 20 例中 16 例 (80%) と有意に ( $p < 0.05$ ) 発生頻度が増加し、発生数についても  $2.10 \pm 2.53$  個/ラットと増加傾向を示した。20ppm 群では発生頻度及び数において各々 20 例中 13 例 (65%) 及び  $1.75 \pm 1.97$  個/ラットと増加傾向を示したか統計学的に有意な差ではなかった (Table 4)。腎臓における腎芽腫、膀胱における乳頭腫、肺における肺胞上皮過形成、前胃における単純性/乳頭状過形成など種々の臓器に腫瘍を含む増殖性病変がみられたか AA 投与による影響は認められず、甲状腺ではいずれの群にも腫瘍を含む増殖性病変は認められなかった。

#### D 考察

今回、AA による乳腺及び甲状腺に対する早期発がんモデルの確立を試みた。先ず、DMBA 及び DHPN による処置を行った後、AA を 40 及び 20ppm 濃度で 22 週間飲水投与したか、乳腺に対する発がん促進作用は認められなかった。また、甲状腺においては、対照群を含むいずれの群でも増殖性病変は認められなかった。次に、MNU による処置を行った後、AA を 40 及び 20ppm 濃度で 30 週間飲水投与した。その結果、40ppm 投与により乳癌の発生頻度の有意な ( $p < 0.05$ )

増加が認められ、発生数については、統計学的有意差はなかったものの明らかな増加がみられた。甲状腺における増殖性病変は対照群を含むいずれの群にも認められなかった。文献的には DMBA 及び MNU により誘発されたラット乳癌の遺伝子異常の検索により、DMBA 乳癌では 11 染色体におけるマイクロサテライト不安定性 (MSI) が高頻度にみられ (Yu et al, 2000)、MNU 乳癌では H-ras 遺伝子のコドン 12 における点突然変異が高頻度にみられるが (Kito et al, 1996)、MSI、ヘテロ接合体喪失あるいは遺伝子重複といったアレル不均衡の頻度は低いことか報告されている (Haag et al, 1999)。一方、種々の遺伝毒性試験において、AA は突然変異誘発性よりも、染色体異常誘発性が強いことか知られている。従って、今回の実験においては H-ras 遺伝子の点突然変異が高頻度にみられる MNU 乳癌モデルに対して、染色体異常誘発性を有する AA の発がん促進作用が比較的短期間で検出され、MSI が高頻度にみられる DMBA 乳癌モデルに対して AA は明らかな影響を及ぼさなかったものと推察された。

今回の実験では、乳腺あるいは甲状腺に対して標的性を示す化学発癌物質によりラットを処置した後、食品中に含まれる AA を投与した際の発がん促進作用を検討した。文献的には、化学発癌物質による処置後、加熱した魚肉食品中に最も多く含まれる変異原/発がん物質であるヘテロサイクリンクアミン (HCA) をラットを投与した際の発がん促進作用について種々の報告がみられる。肝発癌物質である diethylnitrosamine による処置後、HCA の一つである 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) を混餌投与した際に肝前癌病変である glutathione S-transferase placental form 陽性細胞巢の数及び面積が著明に増加 (Fujita et al, 2002)、大腸発癌物質である 1,2-dimethylhydrazine による処置

後、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-f]pyridine(PhIP)を混餌投与した際に大腸腫瘍の発生数が著明に増加する(Hirose et al, 1999)などの報告がみられる。一方、前投与する発癌物質の種類、あるいは標的臓器によりHCAによる発がん促進作用が異なることも報告されている(Imaida, et al, 2001, Shirai, et al, 2002)。今回、乳癌モデルにおいて、DMBAとMNUによる前処置によりAAの乳腺発がん促進作用に違いがみられるとともに、MNU及びDHPNのいずれの甲状腺発がんモデルでもAAの作用はみられなかった。従って、AAについてもHCAの場合と同様、前投与する発癌物質、あるいは標的臓器による特異性があることが示された。

#### E 結論

AAの発がん性に対する抑制物質のスクリーニングを行うための早期発がんモデルとして、MNUを50mg/kgの用量で単回腹腔内投与した後、AAを40ppm濃度にて飲水投与すると同時に候補物質を投与するラット乳腺発がんモデルが適していると考えられた。

#### F 健康危険情報

該当なし。

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

該当なし。

##### 2 学会発表

該当なし。

#### H 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

該当なし。

**Table 1 Final Body and Organ Weights of Rats Treated with DHPN and DMBA followed by Acrylamide (AA) Administration**

Treatment	Body weight (g)	Liver (g) (% for BW)	Thyroid (g) (% for BW)
Acrylamide 40ppm	325.2 ± 53.1	11.0 ± 2.1 (3.4 ± 0.4)	0.019 ± 0.005 (0.006 ± 0.002)
Acrylamide 20ppm	320.7 ± 44.2	11.3 ± 2.2 (3.5 ± 0.5)	0.018 ± 0.003 (0.006 ± 0.001)
Control	331.7 ± 29.6	11.7 ± 2.2 (3.5 ± 0.7)	0.021 ± 0.005 (0.006 ± 0.001)

**Table 2 Incidence and Multiplicity of Mammary Tumors in Rats Treated with DHPN and DMBA followed by Acrylamide (AA) Administration**

Treatment	No of rats	Fibroma		Fibroadenoma		Adenocarcinoma	
		Incidence (%)	Multiplicity (No/rat)	Incidence (%)	Multiplicity (No/rat)	Incidence (%)	Multiplicity (No/rat)
AA 40ppm	20	0	0.05 ± 0.22	1 (5)	0.05 ± 0.22	18 (90)	3.90 ± 2.92
AA 20ppm	20	2 (10)	0.10 ± 0.31	0	0	20 (100)	6.35 ± 3.76
Control	19	0	0	0	0	16 (84)	5.11 ± 4.37

**Table 3 Final Body and Organ Weights of Rats Treated with MNU followed by Acrylamide (AA) Administration**

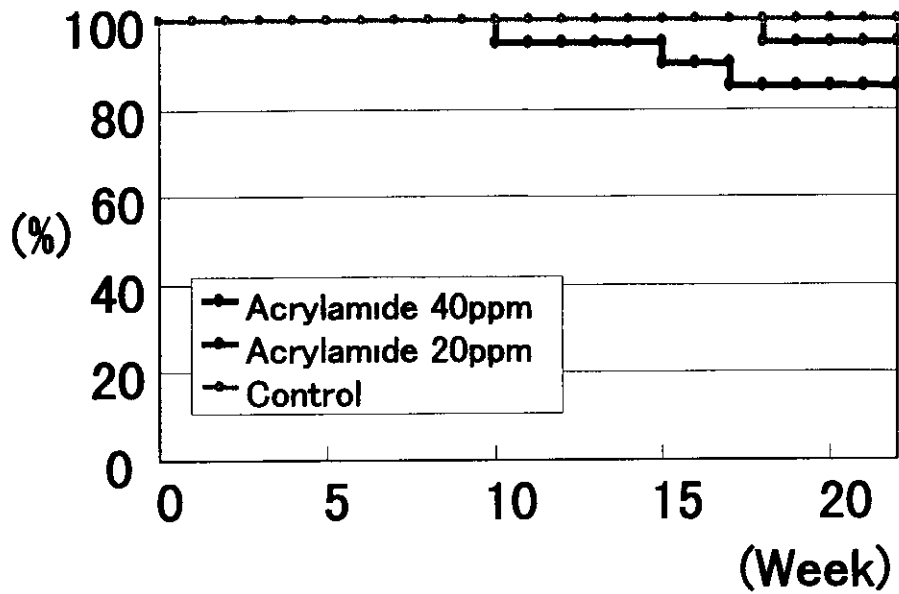
Treatment	Body weight (g)	Liver (g) (% for BW)	Thyroid (g) (% for BW)
Acrylamide 40ppm	359 4 ± 57 5	11 9 ± 2 4 (3 3 ± 0 4)	0 024 ± 0 007 (0 007 ± 0 002)
Acrylamide 20ppm	375 5 ± 55 8	11 7 ± 2 0 (3 1 ± 0 4)	0 026 ± 0 003 (0 007 ± 0 002)
Control	377 6 ± 56 7	12 4 ± 2 3 (3 3 ± 0 4)	0 028 ± 0 006 (0 007 ± 0 001)

**Table 4 Incidence and Multiplicity of Mammary Tumors in Rats Treated with MNU followed by Acrylamide (AA) Administration**

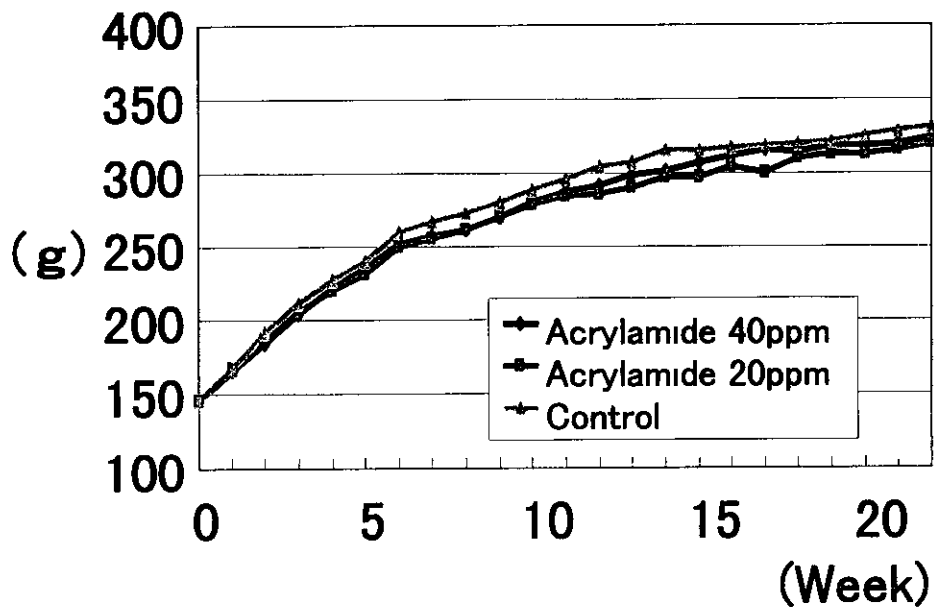
Treatment	No of rats	Fibroadenoma		Adenocarcinoma	
		Incidence (%)	Multiplicity (No / rat)	Incidence (%)	Multiplicity (No / rat)
AA 40ppm	20	1 (5)	0 05 ± 0 22	16* (80)	2 10 ± 2 53
AA 20ppm	20	0		13 (65)	1 75 ± 1 97
Control	20	0		10 (50)	1 00 ± 1 34

\* p < 0.05 (Fisher's exact probability test)

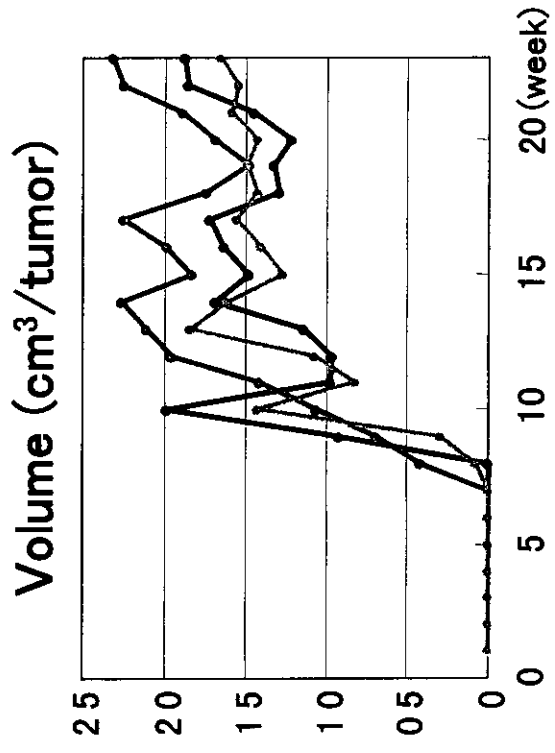
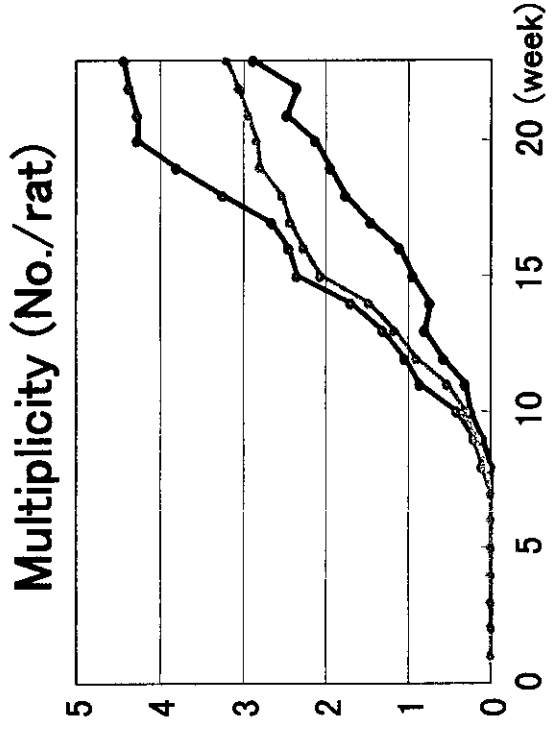
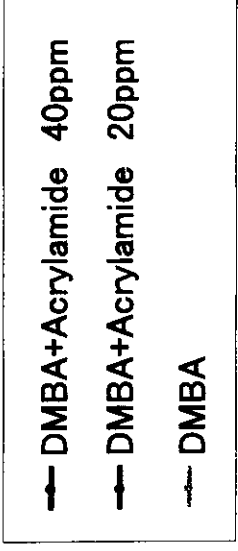
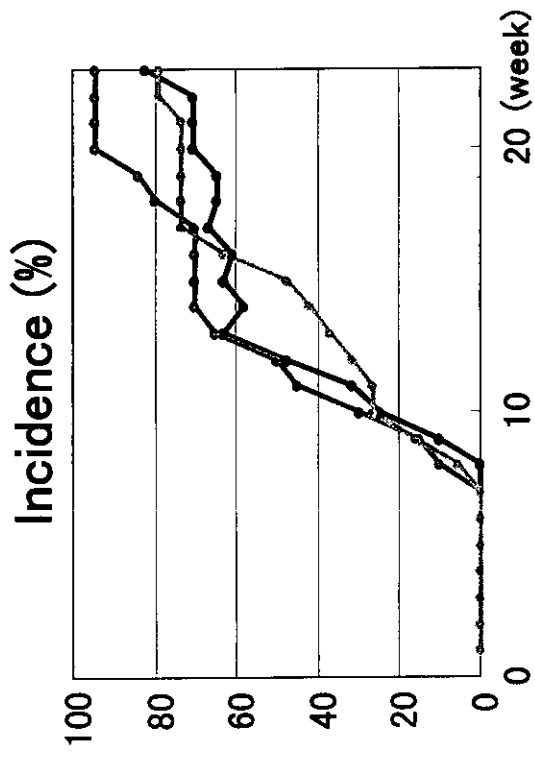




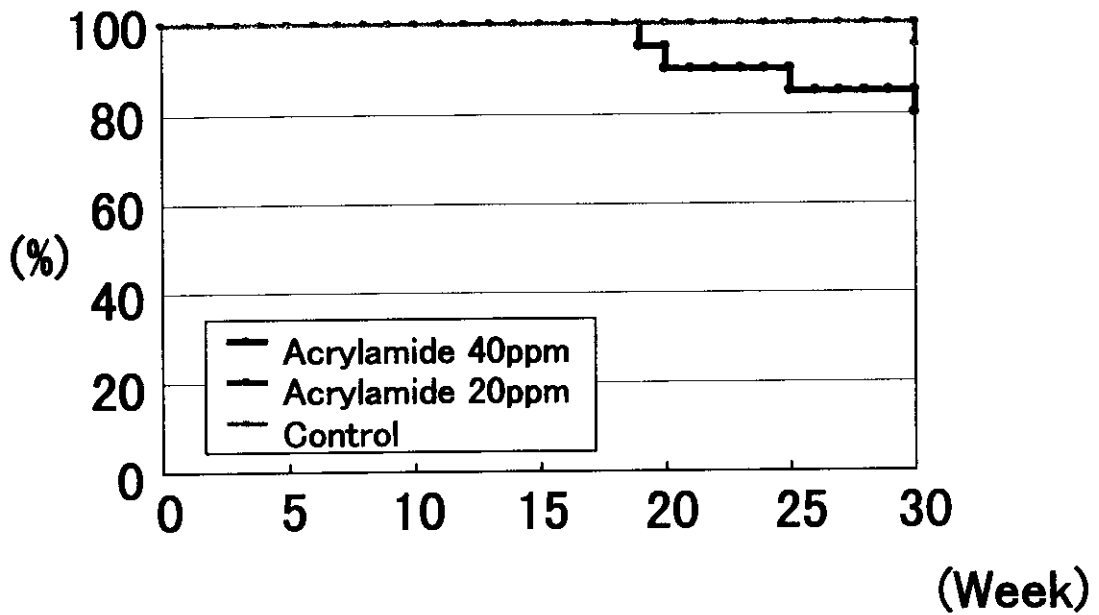
**Fig. 1 Survival Rate of Rats Treated with DHPN and DMBA Followed by Acrylamide Administration**



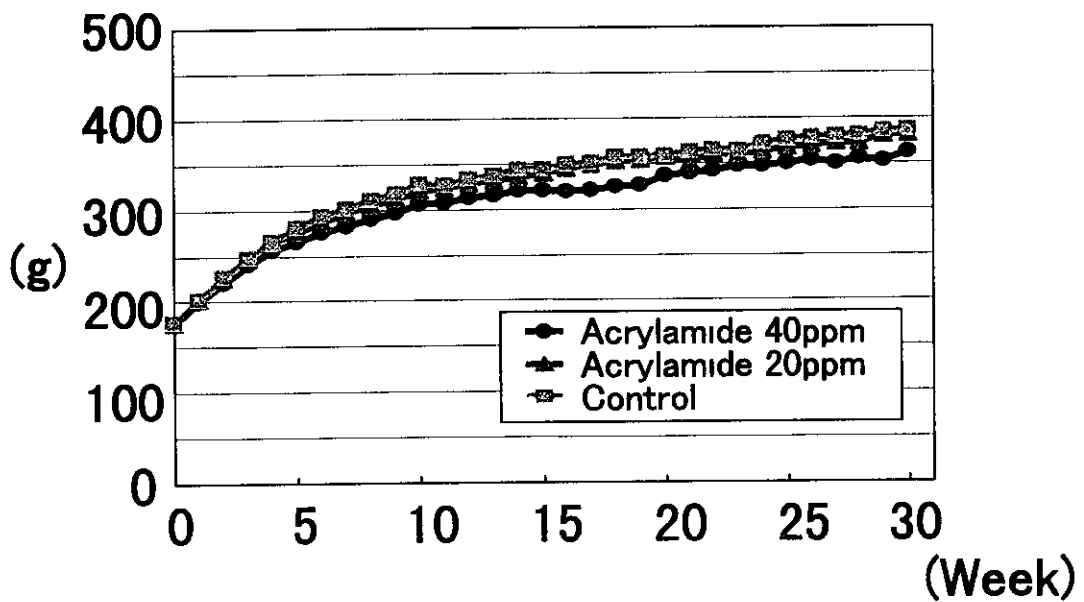
**Fig. 2 Body Weight Curves of Rats Treated with DHPN and DMBA Followed by Acrylamide Administration**



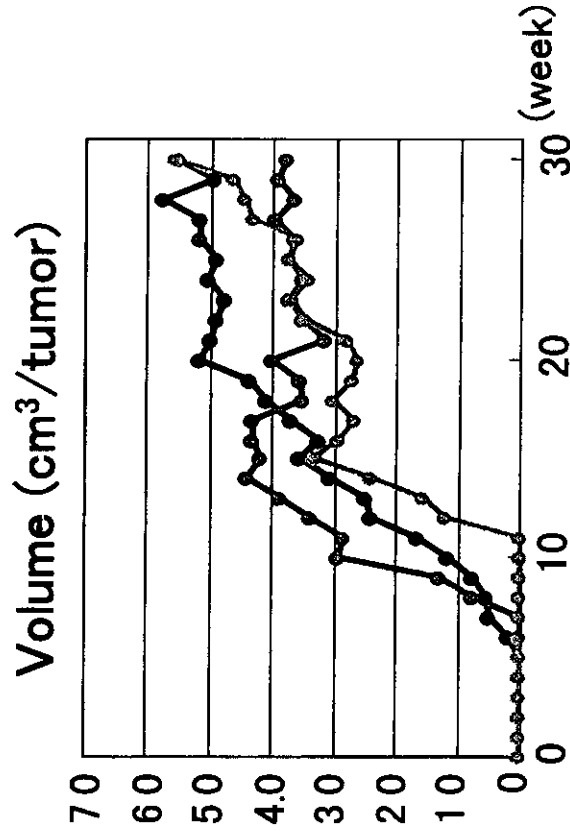
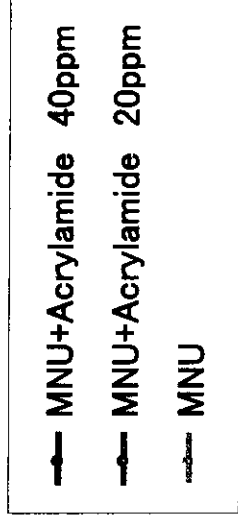
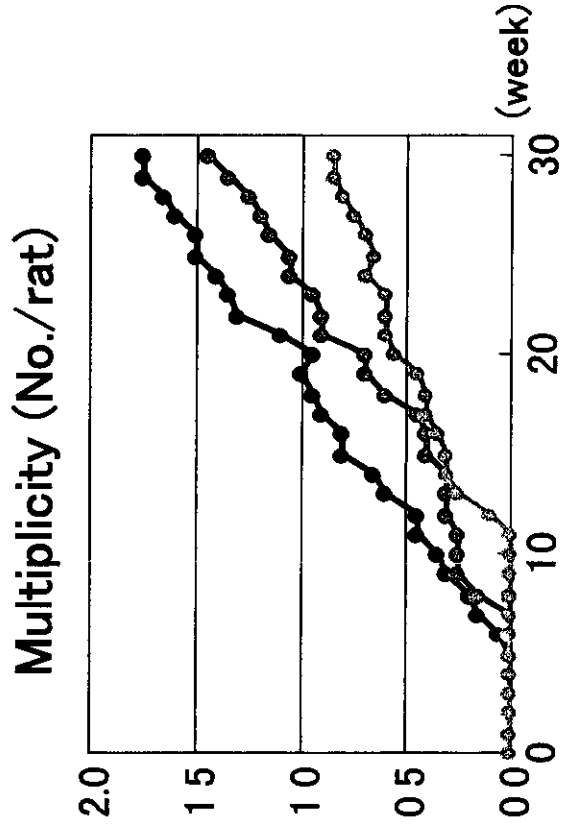
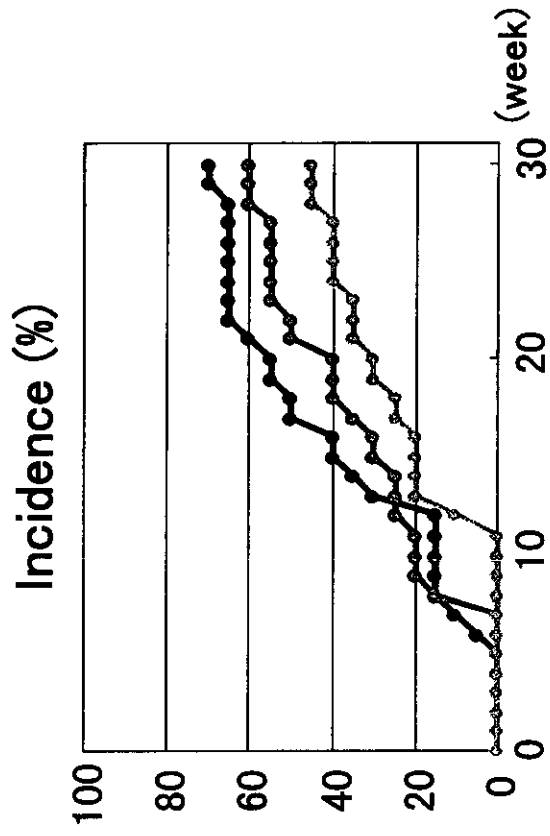
**Fig. 3 Incidence, Multiplicity and Volume of Mammary Tumors in Rats Treated with DHPN and DMBA followed by Acrylamide Administration**



**Fig. 4 Survival Rate of Rats Treated with MNU Followed by Acrylamide Administration**



**Fig. 5 Body Weight Curves of Rats Treated with MNU Followed by Acrylamide Administration**



**Fig. 6 Incidence, Multiplicity and Volume of Mammary Tumors in Rats Treated with MNU followed by Acrylamide Administration**