

2002年3月にAAが食品に含まれることが指摘されて以来、FAO/WHOの専門家会議において食品中からのAAを摂取量できるだけ減らすような方向で対策を進めている。

本研究ではこのような状況の下、AAによる遺伝毒性誘発機構を解明し、その対抗する有効な抑制手段を見るけることを目的とする。昨年度は、AAによる遺伝毒性の誘発機構の解明のため、1) ヒトリンパ芽球細胞株を用いて、遺伝子突然変異試験、小核試験、コメット試験を行い、*in vitro*での遺伝毒性誘発性を明らかにし、また、2) ラットおよびヒトS9を試験系に加え、薬物代謝による遺伝毒性への影響を検討し、さらに、3) AAによって誘発された突然変異体のクローニングし、遺伝子解析の結果から突然変異誘発のメカニズムの解析を行った。

本年度は、昨年度の研究結果を踏まえて、以下の研究を行った。

- 1) 昨年度に確立したヒト型 *in vitro* 試験系を用いて、食物繊維の添加によるAAの毒性抑制効果を検討すること。
- 2) AAの代謝物であるグリシダミド(GA)に関して、昨年度同様に遺伝毒性誘発性を明らかにし、その誘発機構を解明すること。

B. 研究方法

1) 試験化合物

アクリルアミド(AA) (M.W. 71, シグマ)、グリシダミド(GA) (M.W. 87, LKT Laboratory)は、滅菌蒸留水で調整した。食物繊維である、アルギン酸ナトリウム(ALG; 和光純薬、イヌリン(INU; 和光純薬)、グル

コマンナン(GM; 和光純薬)、デキストラン(ファイバーゾル2)(DEX; 松谷化学)、キチン(CHI; 和光純薬)、メチルセルロース(MC; 和光純薬)は生理食塩水で規定の濃度で調整した。

2) ヒト細胞試験系

ヒトリンパ芽球細胞株TK6を用いた。TK6はチミジンキナーゼ(TK)遺伝子がヘテロであるため、この遺伝子をターゲットした、遺伝子突然変異試験が可能である。対数増殖期にある細胞を、AA、もしくは4時間処理し、細胞毒性(Relative Survival; RS)、DNA損傷性(コメット試験)を評価した。その48時間後に、小核試験による染色体異常誘発性を、72時間後にTK試験による遺伝子突然変異誘発性を評価した。代謝活性化の系としてはラット肝臓由来S9(オリエンタル酵母)を、および2種類のヒト肝臓由来S9を加え、代謝活性化によるAAの遺伝毒性を評価した。なお、ヒトS9は非営利団体であるHuman and Animal Bridges(HAB)より、研究目的で供与されたものである。

3) 食物繊維による影響

規定の濃度で調整された食物繊維と、細胞浮遊液を等量混合し、3時間培養した。その後、AAを最終濃度1mg/mlで添加し、さらに4時間培養した。培養後、細胞を洗浄し、新鮮な培地で48時間培養後、小核を観察した。また、細胞毒性は全培養期間中の相対細胞増殖率から求めた。

4) 突然変異体の遺伝子解析

AAによって誘発されたTK遺伝子突然変異体44種、および自然誘発突然変異体56種をクローニングし、定法に従いDNAを抽出した。TK遺伝子のエクソン4とエクソン7の多型性部位を、コントロールであるβ

グロビン部位と共に定量的PCRを行い、GeneScan解析によりLOH型突然変異の有無と、タイプを同定した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用したヒト細胞は米国American Type Culture Collection (ATCC)に登録済みの株化細胞で、国際的に広く普及している細胞であり、倫理上問題はない。また、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) AAの細胞毒性、遺伝毒性に及ぼす食物繊維の影響

TK6細胞を一定濃度の食物繊維と培養し、その後、AAを最終濃度1mg/mlで4時間培養し、AAの細胞毒性、小核誘発性に対するそれら食物繊維の抑制効果を検討した。それぞれの食物繊維の処理濃度は以下の通りであり、これは滅菌調整し細胞に添加可能な最高濃度である。ALG(0.25%)、INU(0.5%)、GLU(0.05%)、DEX(0.25%)、CHI(0.25%)、MC(0.25%)。AA単独処理で、細胞毒性は約90%、小核は無処理の約3倍程度の誘発が見られた。全ての食物繊維は単独ではほとんど細胞毒性を示さず、AAの細胞毒性に対してもほとんど影響を与えなかった(Fig.1)。小核誘発に関しても、食物繊維単独では小核の顕著な誘発は認められなかった。AAによる小核の誘発に関しては、GM、DEXで逆に小核誘発を増強させる傾向が見られたが、抑制的効果は全く認められなかった(Fig.1)。

2) AAとGAの細胞毒性、遺伝毒性の比較

TK6細胞を用いて、AAとGAによる細胞毒性、TK-遺伝子突然変異誘発性、小核誘発性を比較した(Fig.2)。AAは濃度依存的に細胞毒性を示し、14mM(1mg/ml)で約80%の細胞毒性を示した。TK突然変異の誘発は最高濃度のみで有意であり、小核も11.2mM以上の高濃度で誘発が見られた。一方、GAはAAより低濃度において、細胞毒性が観察され、またTK突然変異、小核とも、さらに低濃度から誘発が観察された。

AA、GAのDNA損傷性をコメット試験によって検討した(Fig.3)。AAは全ての用量でDNA損傷性が認められなかったのに対して、GAは0.5mMの低濃度から損傷性が認められ、用量依存的に増加した。

3) AA、GAによって誘発される遺伝子突然変異の特徴

昨年度、解析した自然誘発、およびAA誘発によって得られたTK変異体の遺伝子解析の結果に加えて、GAによって誘発された変異体の解析を行った。TK変異体は増殖の早いNG(normal growth)変異体と、増殖の遅いSG(slow growth)変異体に分類できる。2.2mMで4時間処理して、NG変異体を28個、SG変異体を16個クローニングし、TK遺伝子のLOH解析を行った。結果をTable1に示す。解析結果とSG変異体の比から得られた、TK突然変異の変異スペクトルをFig.4に示す。昨年度の結果ではAAへミ型LOHを顕著に誘発することがわかったが、対照的にGAはLOH突然変異よりはむしろ非LOH型変異を主として誘発した。このことは、GAは染色体レベルの大きな異常よりも、点突然変異等の遺伝子変異を誘発することを示唆するものである。

4) S9によるAAの代謝活性化

AAは一般に、薬物代謝酵素(CYP2E1)に代謝され、GAに変換されることが知られている。AAをS9処理し、その細胞毒性と、小核誘発性をS9非存在下での結果と比較した(Fig.5)。その結果、S9は両者に何ら影響を与えなかった。

D. 考察

AAが齧歯類動物で発がん性が指摘されていることから、できるだけ食物中からのAA摂取、吸収を減少させる方策が検討されている。食物繊維は消化管運動を活発化させたり、食物成分の消化吸收を低下させたりすることから、毒物の排泄を促進させ効果が期待できる。また、胆汁酸などを始め、無機質やビタミンを吸着させ排出させる能力をも持つ。このような吸着、不活化作用の*in vitro*での報告はない。もしその作用が確認できれば、*in vivo*での効能試験のスクリーニングとして有用と考えられる。昨年度、ヒト*in vitro*試験系において、AAによる細胞毒性、遺伝毒性を効率的に検出できることがわかった。本試験系を用いて6種類の水溶性、非水溶性食物繊維、6種ALG(0.25%)、INU(0.5%)、GLU(0.05%)、DEX(0.25%)、CHI(0.25%)、MC(0.25%)について検討を行ったが、全てにおいて抑制効果は無かった。ほとんどが難溶性であるため、試験可能な最大濃度での試験であること、処理条件が比較的短時間の1条件であることなどから、この試験だけで効果を全く否定することはできないが、その可能性は極めて低いものと考えられる。

AAの代謝物と考えられるGAは用量依存的に細胞毒性、TK遺伝子突然変異、小核の

誘発を示した。また、その作用濃度、誘発率を考慮すると、その毒性は親化合物のAAよりかなり高いことが推測される。TK6細胞における突然変異頻度を2倍増加させる濃度は約55 ug/mlと計算され、800 ug/mlのAAの約15倍である。また、突然変異の特徴もAAとGAでは全く異なる。AAは遺伝毒性が低い上、TK突然変異スペクトルはヘミ型のLOHを主として示したのに対して、GAはLOH型の割合は低く、大部分は非LOH型変異であった。変異スペクトルはアルキル化剤であるEMSに類似しており、GAは主に点突然変異を誘発することを示している。エームス試験でもAAは陰性なのに対して、GAは陽性を示すことが報告されており、このことを支持するものである。コメット試験では、GAは低濃度から用量依存的に陽性反応を示したことから、GAはDNAに直接付加体などを形成し突然変異を誘発することが考えられる。一方、ヘミ型LOHを引き起こすAAは染色体切断等を引き起し、コメット陽性になることが期待されたが全くDNA損傷性は示さなかった。小核や、突然変異の誘発も大きくないことから、AA自体の遺伝毒性としてはDNAに直接影響を与えず突然変異を誘発することが考えられる。

AAはCYP2E1により、エポキシ環をもつGAに変換され、強い遺伝毒性を持つことが予想される。しかしながら、今回の実験ではAAはS9存在下で試験してもその毒性増強作用は認められなかった。CYP2E1は、S9調製後は急速に失活することも報告されているが、同じCYP2E1で代謝をうけるジメチルニトロサミン(DMN)の結果では顕著な毒性の増強がみられたことからS9中のCYP2E1の活性は十分であると考えられた。

AA と GA の *in vivo* の遺伝毒性に関しては最近、NCTR の Manjanatha らが BigBlue マウスを用いた HPRT、cII 突然変異試験の結果を報告している (Environmental Mutagen Society 35th Annual Meeting, Pittsburgh, 2004. 10)。10、50ppm の飲水で 50 日間投与し、4 週間後に肝臓での突然変異は、両化合物とも有意に上昇し、むしろ AA でその誘発率は高かった。このことは、AA は *in vivo* で代謝を受け、毒性が増強されることを示している。このように *in vivo* と、*in vitro* 試験での矛盾点の理由は明らかではないが、代謝様式やその速度に関係しているのかもしれない。S9 を用いた試験では長時間の処理が困難であるため、今後 CYP2E1 を発現するトランスジェニック細胞等を用いて、AA の代謝とその毒性発現様式を解明する必要がある。このような代謝機構の解明が、AA の毒性抑制のための方策に役立つことが期待される。

E. 結論

・食物繊維は *in vitro* で AA によって誘発されるヒト培養細胞への細胞毒性、遺伝毒性に対して何ら抑制効果を示さなかった。

・AA の代謝物である GA は、AA よりも強い遺伝毒性を示す。GA は直接 DNA に損傷を与え、点突然変異を誘発するものと考えられた。

・S9 存在下でも AA の毒性は増強されなかったことから、AA の代謝による影響は確認できなかった。S9 を用いた短時間試験の本試験系には限界があり、薬物代謝活性を持つ細胞による、AA の代謝、および毒性発現機構の解析が必要

と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Honma, M., Izumi, M., Sakuraba, M., Tadokoro, S., Sakamoto, H., Wang, W., Yatagai, F., and Hayashi, M. Deletion, rearrangement, and gene conversion; the genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 42, 288-298 (2003)

Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D., Zhang, L., Suzuki, T., Hayashi, M. and Honma, M. Genotoxicity of microcystine-LR in human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res.*, 557, 1-6 (2004)

Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K., Hayashi, M., Honma, M. and Enomoto, T. The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells. *Biochem. Biophys. Acta* 168, 137-144 (2004)

Yatagai F, Morimoto S, Kato T, Honma M. Further characterization of loss of heterozygosity enhanced by p53 abrogation in human lymphoblastoid TK6 cells: disappearance of endpoint hotspots. *Mutat. Res.*, 560, 133-145 (2004)

2. 学会発表

鈴木孝昌、パラニサミー・ラジャグル、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野純、山口照英 GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺

伝子傷害の臓器特異性を予測可能か 第 63
回日本癌学会総会 (2004. 9)

小山直己、坂本浩子、桜庭真弓、小泉朋子、
桜庭真弓、高島良生、林真、松藤寛、山形
一雄、本間正充 ヒトリンパ球芽細胞株 TK6
を用いたアクリルアミドの *in vitro* 遺伝毒
性誘発機構の解析 日本環境変異原学会第
33 回大会 (2004. 11)

欒 洋、パラニサミー・ラジャグル、本間
正充、林 真、鈴木孝昌 ヒト細胞におけ
る遺伝毒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 33 回大会
(2004. 11)

本間正充、桜庭真弓、小泉朋子、高島良生、
坂本浩子、林 真 ヒトゲノム中に生じた
DNA2 本鎖切断の運命 第 47 回日本放射線
影響学会 (2004. 11)

高島良生、桜庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、
林 真、本間正充 ヒト細胞における DNA2
本鎖切断修復の細胞周期依存性 第 47 回
日本放射線影響学会 (2004. 11)

桜庭真弓、本間正充、小泉朋子、高島良生、
坂本浩子、林 真 ヒトゲノム中に生じた
DNA2 本鎖切断の運命 第 27 回日本分子生
物学会 (2004. 12)

Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., and
Hayashi, M. The fate of chromosomal
double strand break in human cells.
Environmental Mutagen Society 35th Annual
Meeting (2004. 10)

Honma, M., Hakura, A., Oka, A., Takasaki,
W., Sasaki, YF., Suzuki, S., and Sato,
T. Establishment of humanized *in vitro*
genotoxicity system. Society of
Toxicology 44th Annual Meeting (2005. 3)

G. 知的所有権の取得状況

なし

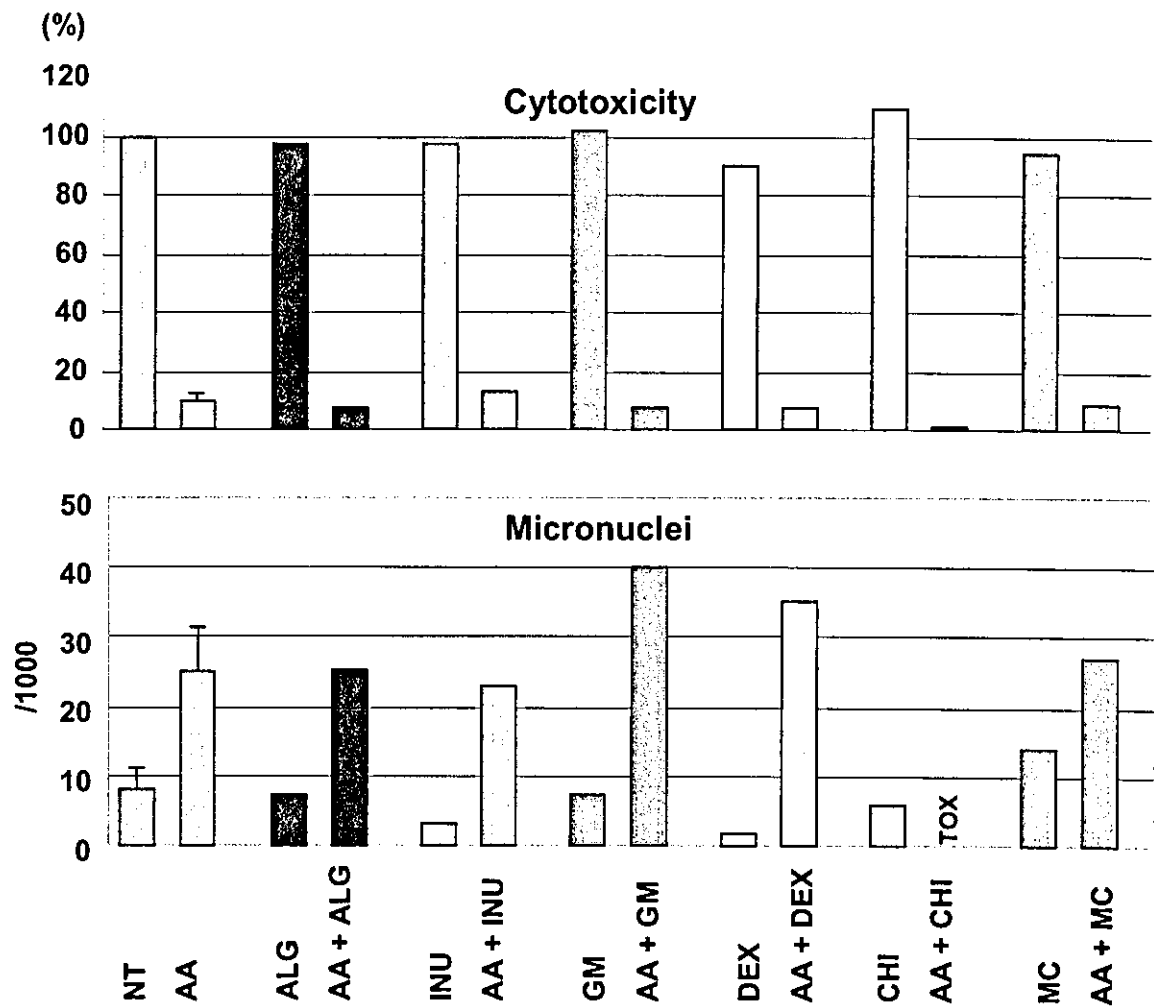


Fig. 1; Effects of diet fiber on the cytotoxicity and genotoxicity induced by AA

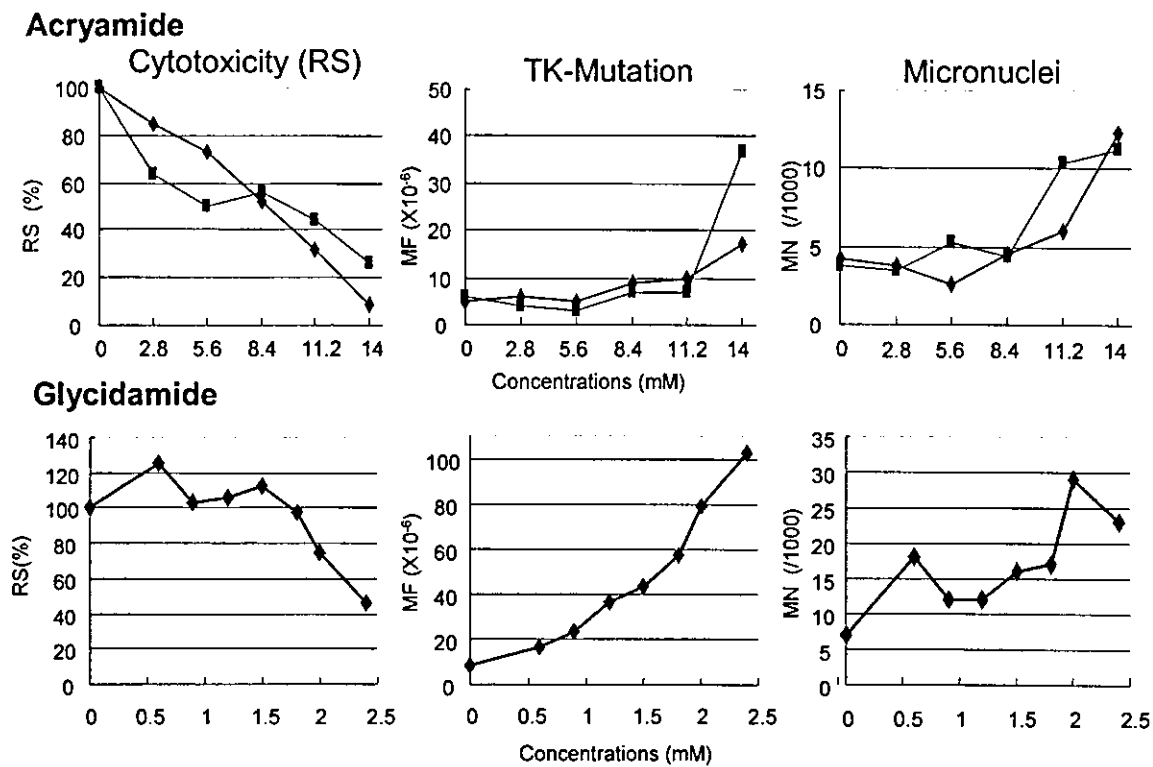


Fig. 2; Cytotoxic and Genotoxic Responses of Acrylamide and Glycidamide in TK6 Cells

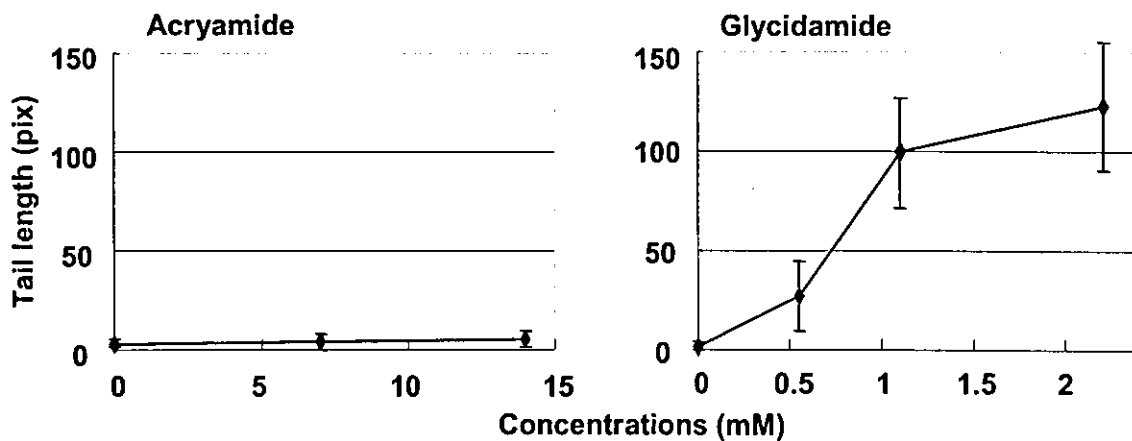


Fig. 3; Comet assay for Acrylamide and Glycidamide in TK6 Cells

Table 1; Results of LOH analysis of TK gene among spontaneous, AA-inducing, and GA-inducing TK mutants

Treatment	Cytotoxic and mutational response				LOH analysis at TK gene		
	RS	MF	% SG	No.	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)
GA-induced	12	55.5	36	44			
NG mutants				28	26 (93)	2 (7)	0 (0)
SG mutants				16	0 (0)	5 (31)	11 (69)

AA; 14 mM, 4h treatment
GA; 2.2 mM, 4h treatment

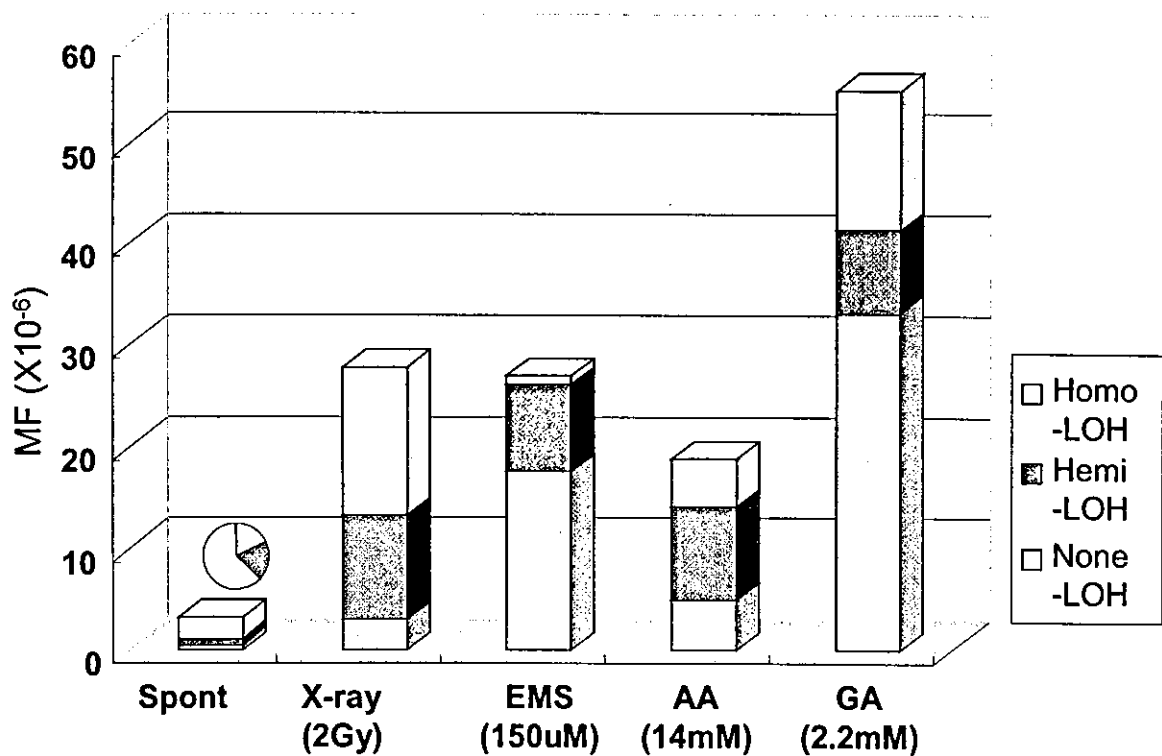


Fig. 4; Spectra of TK-Mutation Induced Mutagens in TK6 Cells

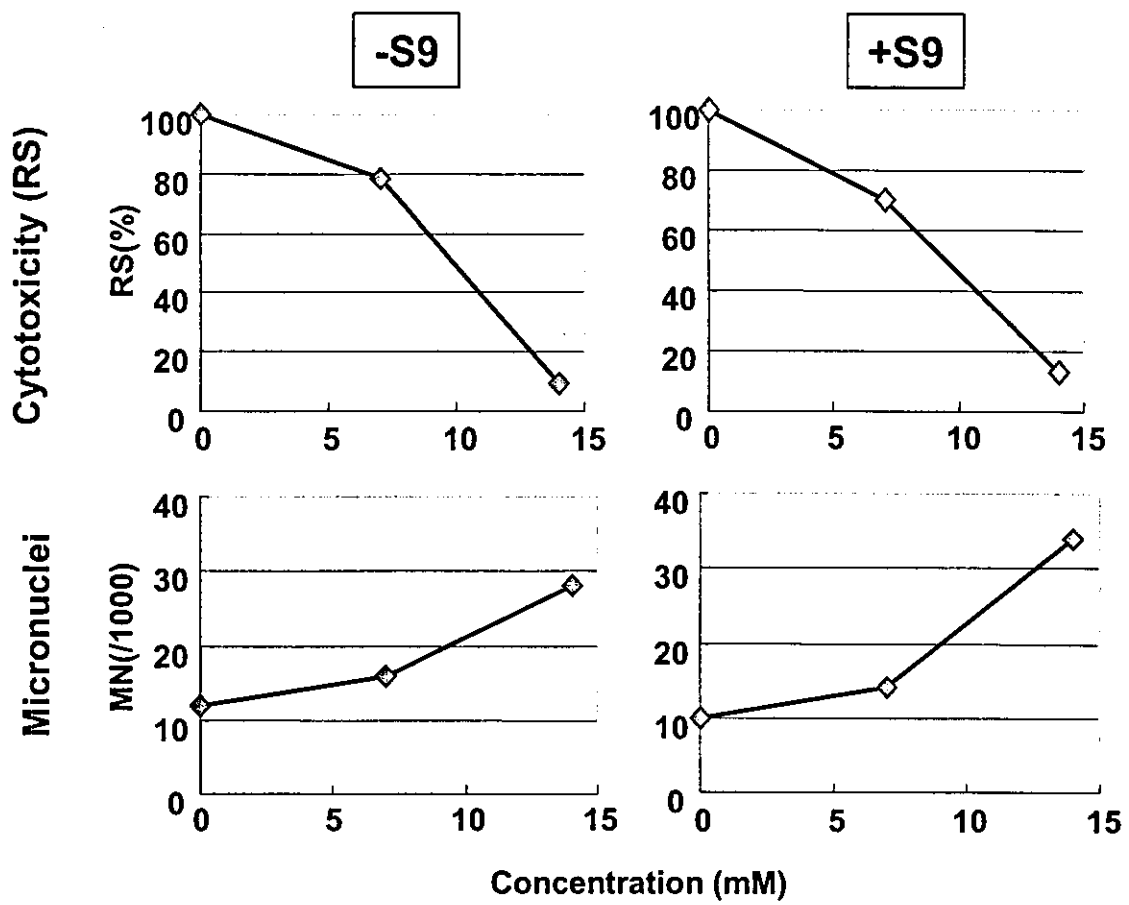


Fig. 5; Effect of S9 to AA-inducing cytotoxicity and micronuclei induction

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
アクリルアミドの生成抑制及び毒性抑制に関する研究

分担研究報告書（平成16年度）
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
（協力研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長）

研究要旨：アクリルアミド(ACR)によって誘発される神経障害ないし精巣障害に対して、昨年度から継続している抗酸化作用／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の抑制効果の有無に関する検討を終了し、これらについて神経系、肝臓、精巣における代謝あるいは抗酸化作用関連蛋白質の発現解析を行った。また、今年度は新たに、消化管内での ACR の吸着による消化管吸収阻害を期待して、食物繊維等の併用投与による毒性抑制作用の有無を検討した。動物は SD:IGS ラットを用いて、ACR を 28 日間 200ppm 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、抗酸化物質である 2000ppm α -lipoic-acid (ALA), 10000ppm α -tocopherol (TP), 1000ppm diallyl sulfide (DAS) の混餌投与を、ACR 投与 1 週間前より行った。ACR による精巣毒性抑制作用の陽性対照として、既に評価の終了している phenylethyl isothiocyanate (PEITC) 500ppm 投与群も設定した。次いで、食物繊維等の影響を検索する目的で、同系統のラットを用いて 2.5% sodium alginate, 5% glucomannan, 5% fibersol, 2.5% chitin, 1% chlorophyllin の混餌による併用投与を行った。その結果、抗酸化物質の効果に関しては、ACR による神経毒性は ALA により最も強く抑制され、TP と PEITC によっても部分的に抑制されることを見出した。中枢神経あるいは末梢神経での抗酸化作用関連蛋白質の発現検索により、これら ALA, TP, PEITC の抑制作用に関して、いずれもグルタチオン系のレドックス制御が介在していることが示唆された。精巣毒性に関しては、ALA と PEITC で明らかな抑制効果を示したが、肝臓、精巣での代謝あるいは酸化ストレス関連酵素の発現検索では、これらの化合物に特異的な抑制系は見出されなかった。また、食物繊維や chlorophyllin 等の併用投与の結果、何れの物質でも ACR 誘発神経障害および精巣障害を抑制できず、消化管内での食物繊維などによる ACR 吸収阻害作用は、今回の実験条件下では生じていないと判断された。

A. 研究目的

アクリルアミド(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、前々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、未だ詳細が解明されていない ACR の毒性評価等や生成機序の検討等に必要データ収集に関する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還元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 μ 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 μ g/kg 体重 (短期摂取の場合)、0.3-0.8 μ 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^+, K^+ -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 を生じるが、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、減数分裂後の精上皮細胞に対する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ACRと同様にグ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、抗酸化物質であり神経細胞に対して親和性を示し、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が知られている α -lipoic acid (ALA)、脂溶性の抗酸化物質であり、第I相酵素 (CYP1A1, 1A2, 2B1, 2C) の誘導作用も知られている α -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)について、ACRと共にそれぞれ同時投与し、ACRによる神経ないし精巣障害に対する抑制作用の有無に関する病理組織学的評価を実施した。また、前々年度にACR誘発精巣毒性に対する抑制作用が見出されたPEITCの投与群も設定した。今年度は昨年度に引き続き、これらの抗酸化物質影響の病理評価と形態計測による定量評価を終了し、更に抑制作用のメカニズムを推定する目的で、抗酸化関連蛋白質発現解析を行った。次に、ACRの吸着・トラップによる消化管吸収抑制を目的として、食物繊維等の併用投与による影響を検討した。

B. 研究方法

B- 1. 抗酸化物質投与実験 (実験1)

6週齢の雄SD:IGSラットを10群、各5ないし10匹に分け、無処置対照群の他、各種の抗酸化物質は混餌により、ACRは飲水により投与を行った (Fig. 1)。ACR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の生じることが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2000ppm、TPは10000ppm、DASは1000ppm、PEITCは500ppm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)、三叉神経、坐骨神経を採取し、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・エオジン (HE) 染色を行った。また、坐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、エボン包埋後、1 μ m切片を作成し、トルイジンブルー染色を行った。坐骨神経においては、軸索変性の数、神経線維密度、萎縮した有髄神経線維 (径 <3 μ m) の数の形態計測を実施し、精巣においては、細胞残屑の出現した精細管の数を測定した。

免疫染色として、大脳、小脳、橋・延髄、三叉神経について、catalase (CAT), thioredoxin (TRX), γ -glutamylcysteine synthase (GCS), heme oxygenase (HO)-1, CuZn superoxide dismutase (SOD), EC SOD, Mn SODの局在、発現強度の検討を行った。また、シナプス傷害の指標として、synaptophysin (SYP)の他、synapsin-1について、小脳分子層での染色性を検討し、SYPについては、ACRにより異常な染色性を示す点状構造の分布を計測した。

Western blotting解析として、精巣と肝臓におけるCYP2E1, GCS, HO-1, CAT, TRXの発現量を検索した。

B- 2. 食物繊維等の投与実験 (実験2)

実験1と同様の実験プロトコールで、同系統のラットを用いて2.5% Sodium alginate, 5% Glucomanan, 5%

Fibersol, 2.5% Chitin, 1% Chlorophyllin の併用投与を行い、ACR によって誘発される末梢神経障害、小脳分子層 SYP 陽性異常構造の分布、精巣障害に対する影響を検討した (Fig. 2)。

(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

C- 1. 抗酸化物質投与実験 (実験 1)

投与期間中、ACR を投与した各群で飲水量を比較した結果、群間で明らかな差を認めなかった (Table 1)。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 (Fig. 3)。また、ALA 投与によっても体重の低値が明らかで、4 週目で ALA 単独投与群では無処置対照群に比し明らかな低値を示し、ACR 併用投与群間では、他の併用投与群に比べて、ACR+ALA 群で ACR 単独群と同程度の体重の低値を示した。Gait score に関しては、ACR 投与により経時的にスコアが増加 (症状が増悪) を示したが、ACR 単独投与群に比べて、ALA 併用群で ACR 投与 2 週目よりスコアの低値を認め、TP 併用群では 4 週目に低値を示した (Table 2)。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。

摂餌量は群間で明らかな差を認めず、ACR 投与群間での ACR 摂取量にも明らかな差は認められなかった (Table 3)。解剖時の体重は ACR 投与各群で無処置対照と比べて低値を示したが、ACR 投与群の群間に明らかな差は認められなかった。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、ACR+PEITC 投与群で精巣重量の増加、また ACR+ALA、ACR+DAS、ACR+PEITC 投与群では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 投与各群で末梢神経 (坐骨神経) の軸索の変性を認めたものの、その程度

は ACR 単独投与群に比べ ACR+ALA、ACR+TP、ACR+PEITC の各群で明らかに弱いことが確認された (Table 4, Fig. 4)。ACR 投与により軸索変性と共に、神経線維密度の減少、有髄線維の萎縮を認めたが、形態計測の結果、密度の減少は ALA 併用群で有意に改善され、変性軸索数は ALA または TP 併用群で改善を示した (Table 5)。また、有髄線維の萎縮 (径 $< 3 \mu\text{m}$ の軸索数) は化学物質併用の各群で有意に改善した。ACR 投与により三叉神経の ganglion cell に認められた中心性色質融解は、化学物質の併用投与により改善効果を認めなかった (Table 4, Fig. 4)。ACR 投与により小脳皮質分子層における SYP 陽性の異常な点状染色像が増加を示したが、それとともに類似の染色性を示す synapsin-I 陽性像も ACR 投与により増加を示したことから、この SYP 陽性構造の分布は ACR によって誘発された presynaptic terminal の変化であると考えられた。この分布は ACR 単独群と比較して有意差はないものの、ALA 併用により若干の改善傾向を認めた (Table 5, Fig. 5)。以上より、ACR 誘発神経障害に関しては、中枢神経においては明らかな差ではないものの、末梢神経においては ALA 併用により明らかな改善が認められ、TP 及び PEITC 併用でも部分的な緩解が認められた。

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 単独に比べ ACR+ALA、ACR+PEITC 投与群で明らかに弱かった (Table 4, Fig. 6)。形態計測によっても脱落細胞の認められる精細管数は ALA ないし PEITC の併用で減少を示した (Table 5)。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 単独に比べ、ACR+ALA、ACR+TP、ACR+DAS、ACR+PEITC 投与群で明らかに弱かった (Table 4, Fig. 6)。以上の結果から、ACR による精巣障害に対しては、PEITC とともに ALA が部分的ではあるが最も強く抑制することが明らかとなった。

次に、中枢及び末梢神経において抗酸化作用関連蛋白質の免疫染色を行った結果、CAT は無処置群、ACR 群で小脳の Purkinje 細胞と歯状核ニューロン、橋・延髄に存在するニューロンの細胞質に若干の陽性を示したが、ALA 投与群では小脳ニューロンでの発現増強を認め、三叉神経や大脳皮質のニューロンも陽性像を示す

例が認められた (Table 6)。TP 併用群でも小脳ニューロンの陽性像の増強を認め、橋・延髄でも増強傾向を示した。DAS 併用群では CAT は三叉神経ニューロンで増強を示し、橋・延髄ニューロンでもその傾向を認めた。PEITC 併用群では大脳皮質、小脳、三叉神経のニューロンで CAT 陽性像が増強ないし出現し、橋・延髄ニューロンでも同様の傾向を示した。TRX はニューロンやアストロサイトの細胞質、オリゴデンドロサイトの細胞核に存在し、ACR 投与により、大脳皮質、小脳歯状核、橋・延髄で発現の増強を認め、ALA の併用により、小脳歯状核で陽性像が更に増強を示した (Table 6, Fig. 7)。TP 併用群ではむしろ小脳、橋・延髄で ACR 単独群に比べて陽性所見が減弱を示した。DAS ないし PEITC 併用群では ACR 単独群と比較し TRX の染色性に明らかな変動は認めなかった。ところが、TRX の免疫染色に用いた抗体で肝臓における Western blotting を行った結果、本来の 12 kDa の移動度を示すポリペプチドが認識されず、その特異性に問題が残った (Fig. 8)。GCS はニューロンの細胞質、アストロサイトの核と細胞質、オリゴデンドロサイトの細胞核に存在し、無処置対照と ACR 群で陽性所見に明らかな差を認めなかったものの、ALA 併用群の小脳 Purkinje 細胞、歯状核での陽性像が増強を示した (Table 6, Fig. 9)。他の併用群では染色性に明らかな変動を認めなかった。

精巣での ACR 誘発毒性に対する ALA ないし PEITC による保護作用を検討する目的で、肝臓と精巣での蛋白質発現を検討した結果、CYP2E1 は肝臓で構成的に発現を示したが、精巣では発現は検出限界以下であった。肝臓においては、この酵素活性の特異的な阻害剤である DAS と PEITC の単独投与により発現減少を示し、ACR 投与によっても発現減少を示した (Fig. 10)。ACR との併用群では ACR 群に比し、TP 投与例で若干の増加を認めた。GCS は肝臓で TP ないし DAS 単独投与群で対照群に比較して減少を示したが、ACR ないし ACR 併用投与群では明らかな変動を示さなかった。GCS は精巣では化学物質投与により明らかな発現変動を示さなかった。HO-1 は肝臓、精巣で構成的に発現を示し、肝臓において ALA 単独投与のみで up-regulation を示したが、他の群での肝臓、あるいは全ての群の精巣において明らかな発現変動を示さなかった。CAT は、肝臓

において無処置対照群でも構成的な発現を示したが、単独投与群のうち、DAS, PEITC 群では発現減少を示した (Fig. 10)。ACR 投与によっても発現は減少し、化学物質の併用によりその発現は回復した。ただし、投与物質に特異的な発現は認めなかった。精巣においても CAT は構成的発現を示したが、PEITC 単独投与によってその発現は減少を示し、ACR を投与した各群でも発現減少を示した。TRX (12kDa) は肝臓において無処置群で構成的発現を示し、PEITC 群では対照群と同等レベルであったものの、ALA, TP, DAS 単独群で明らかな発現増加を示した (Fig. 10)。ACR 投与によって TRX は発現減少を示したが、TP ないし PEITC の併用で若干発現の増強を認めた。精巣においては、TRX は検出限界以下であった。

C- 2. 食物繊維等の投与実験 (実験 2)

実験期間中の ACR 投与各群での飲水量は各群で ACR 単独群に比較して有意な変動を示さなかった (Table 7)。実験期間中の体重の推移として、無処置群に比較し、Sodium alginate, Glucomannan, Fibersol, Chitin 単独群では変動を認めなかったものの、Chlorophyllin では 1 週目より増加傾向を示した。また、ACR を投与した各群は 3 週目から明らかに低値を示した。また、ACR 投与各群での gait score は群間に明らかな差を認めず、実験期間の推移と共にスコアの増加を認めた (Table 8)。実験期間を通じての摂餌量は ACR 投与の各群で減少あるいは減少傾向を示し、ACR 群、ACR+Sodium alginate 群、ACR+Glucomannan 群、ACR+Fibersol 群で有意に低値を示した (Table 9)。ACR 各群での ACR 摂取量は群間で明らかな差を認めなかった。また、最終体重は ACR 投与の各群で明らかに減少を示した。肝臓、精巣、精巣上体の相対重量のうち化学物質投与により変動を示したものは精巣のみで、ACR 群、ACR+Sodium alginate 群、ACR+Glucomannan 群、ACR+Fibersol 群、ACR+Chitin 群で有意に高値を示した (Table 9)。病理組織学的検索により、対照群に比し ACR 投与の各群で認められた、坐骨神経の軸索変性、三叉神経 ganglion cells の中心性色質融解、精上皮細胞の変性・脱落、精巣上体管内への細胞残屑の出現は、ACR 投与各群でその発生頻度及び強度に差を認めなかった (Table 10)。同様に形態計測

の結果、坐骨神経の神経線維密度、変性軸索数、径3 μm 以下の萎縮を示す有髄線維数、精巣での変性・脱落を示す精細管の数、小脳皮質分子層における異常なSYP陽性構造はACR投与の各群でその数に明らかな差を認めなかった (Table 11)。

D. 考察

今回の抗酸化物質の検索により、ACRによる神経毒性は、ALAにより最も強く抑制され、TPとPEITCによっても部分的に抑制されることを見出した。中枢神経あるいは末梢神経での抗酸化作用関連蛋白質の発現検索により、ALAによる抑制にはTRX系とグルタチオン系、TPとPEITCではグルタチオン系のレドックス制御が介在していることが示唆されたが、TRXに関しては、用いた抗体の特異性に疑問が生じたため、再現性の確認をする予定である。

精巣毒性に関しては、ALAとPEITCで明らかな抑制効果を示したが、肝臓、精巣での代謝あるいは酸化ストレス関連酵素の発現に関する今回までの検索では、これらの化合物に特異的な抑制系は見出されなかった。また、DASとPEITCはCYP2E1に対して強い活性阻害作用のあることが知られているが、計5週間の投与により、肝臓におけるCYP2E1の発現自身も抑制されることが新たに見出された。更に、ACR投与によっても肝臓のCYP2E1の発現が強く抑制されたことは、ACR暴露に反応して、生体内でグリシダミドの生成を抑える防御作用の介在している可能性が示唆された。

消化管内でのACRの吸着作用を期待して食物繊維やchlorophyllinなど併用投与を行ったが、何れの物質でもACR誘発神経障害および精巣障害を抑制できなかったことから、消化管内での食物繊維などによるACR吸収阻害作用は、今回の実験条件下では生じていないと判断された。

E. 結論

ACRによる神経障害に関しては、ALA, TP, PEITCが部分的に抑制効果を示すことが明らかとなり、その中でALAが最も強い抑制作用を示した。精巣障害に対しては、ALAがPEITCと同様に部分的に障害を抑制することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Lee, K-Y, Shibutani, M., Kuroiwa, K., Takagi, H., Inoue, K., Nishikawa, H., Miki, T., Hirose, M.: Chemoprevention of acrylamide toxicity by antioxidative agents in rats – Effective suppression of testicular toxicity by phenylethyl isothiocyanate. Arch Toxicol. in press.

2. 学会発表

黒岩敬子, 渋谷 淳, 李 京烈, 井上 薫, 広瀬雅雄: Acrylamide による神経及び精巣毒性に対する抗酸化物質の予防効果の評価, 第21回日本毒性病理学会, 浜松, 第21回日本毒性病理学会講演要旨集: p52 (P-2), 1月, 2005

Hirose, M.: Current situation on research of chemicals in food including acrylamide in Japan. Workshop on risk analysis / risk communication related to the occurrence of emerging chemicals in food. Ottawa, Canada, March 23-24, 2005.

F. 知的所有権の取得状況

特になし。

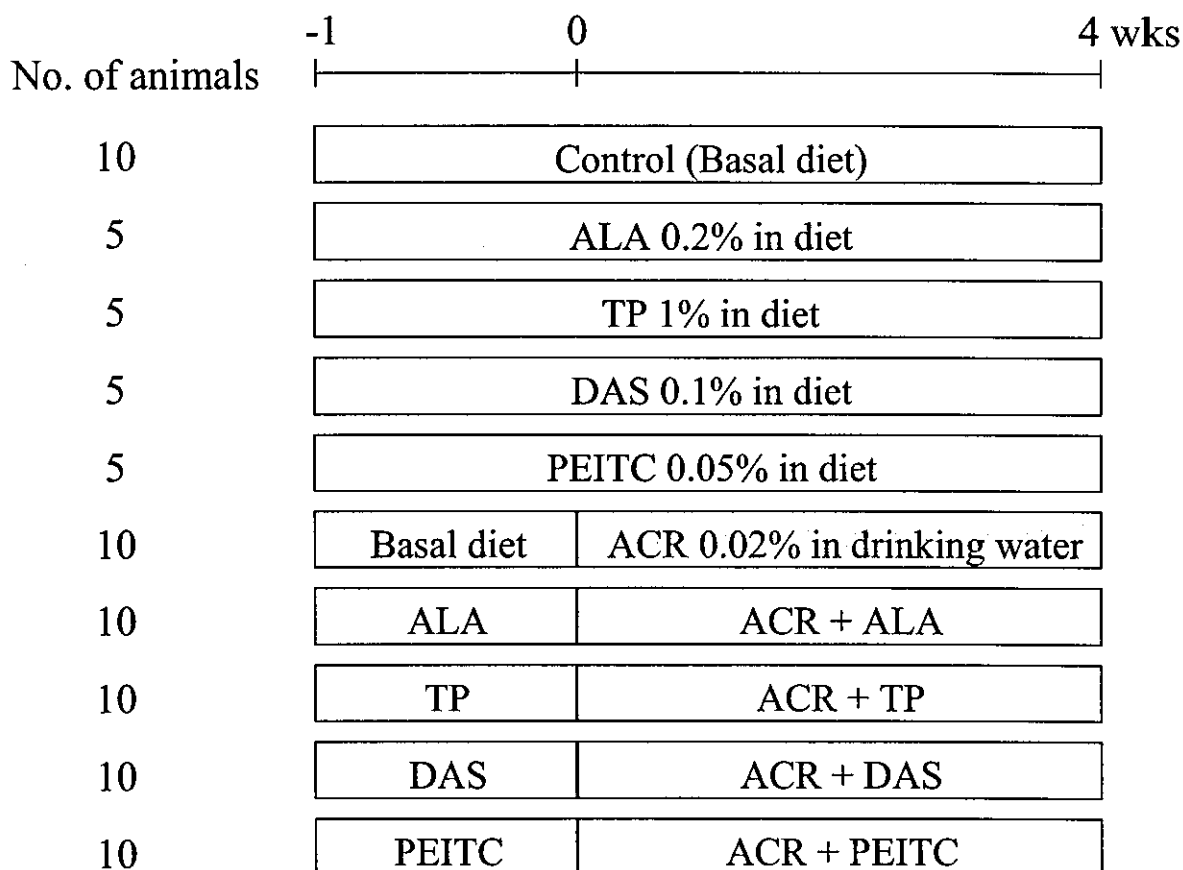


Fig. 1.
Experimental design for chemoprevention by antioxidative agents (Experiment 1).

No. of animals	-1	0	4 wks
10	Control (Basal diet)		
5	Sodium alginate 2.5% in diet		
5	Glucomannan 5% in diet		
5	Fibersol 5% in diet		
5	Chitin 2.5% in diet		
5	Chlorophyllin 1% in diet		
10	Basal diet	ACR 0.02% in drinking water	
10	Sodium alginate	ACR + Sodium alginate	
10	Glucomannan	ACR + Glucomannan	
10	Fibersol	ACR + Fibersol	
10	Chitin	ACR + Chitin	
10	Chlorophyllin	ACR + Chlorophyllin	

Fig. 2.
Experimental design for chemoprevention by dietary fibers and other adsorbents (Experiment 2).

Table 1.
Time course of water consumption in ACR-treated groups (Experiment 1).

Treatment	Water consumption (ml/animal/day)			
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
ACR	65.5 ±14.0 ^a	45.3 ±9.8	40.2 ±0.9	40.9 ±7.9
ACR+ALA	57.2 ±18.7	39.3 ±4.0	39.6 ±8.4	36.4 ±4.3
ACR+TP	52.5 ±3.0	43.8 ±3.8	40.4 ±7.1	33.9 ±5.7
ACR+DAS	73.7 ±4.1	49.4 ±0.2	45.9 ±9.3	42.7 ±14.1
ACR+PEITC	64.5 ±8.2	42.1 ±5.2	40.7 ±5.5	34.6 ±1.4

^aMean ±SD.

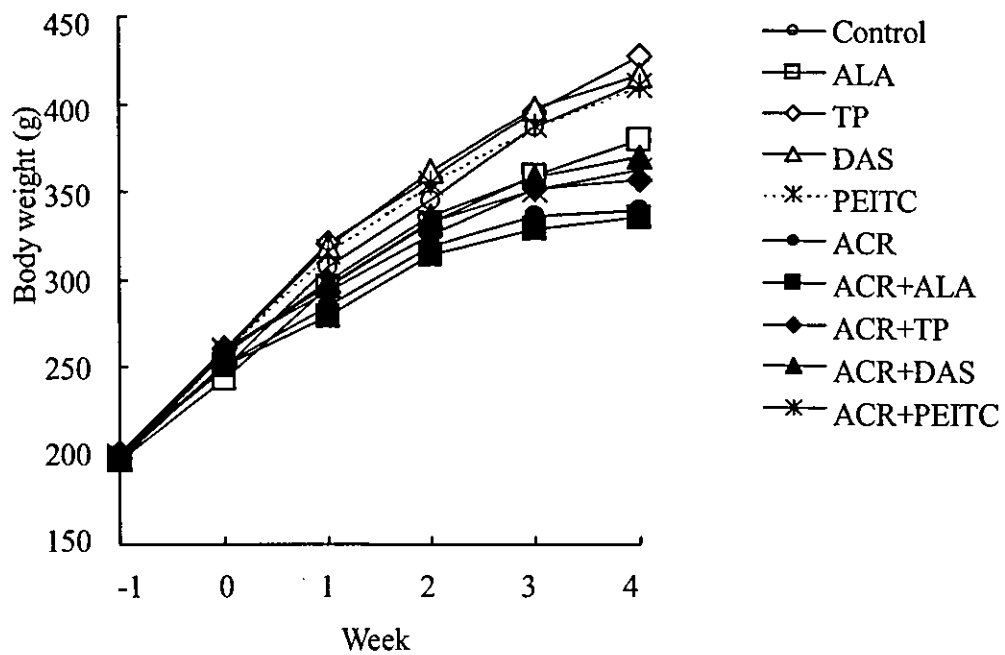


Fig. 3.
Body weight changes during the experiment (Experiment 1).

Table 2.
Time course of gait score changes (Experiment 1).

Treatment	No. of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3/grade 4) ^a			
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
No. of animals examined	10	10	10	10
Control	10/0/0/0	10/0/0/0	10/0/0/0	10/0/0/0
ACR	10/0/0/0	4/6/0/0	0/2/6/2	0/0/2/8
ACR+ALA	10/0/0/0	9/1/0/0 [#]	2/5/3/0 [#]	0/2/6/2 ^{##}
ACR+TP	10/0/0/0	5/5/0/0	0/6/1/3	0/1/6/3 [#]
ACR+DAS	10/0/0/0	6/4/0/0	0/3/7/0	0/0/3/7
ACR+PEITC	10/0/0/0	5/5/0/0	0/4/6/0	0/1/4/5

^a The degree of abnormalities: Grade 1, normal gait; Grade 2, slightly abnormal (slight degrees of ataxia, hopping gait, and foot splay); Grade 3, moderately abnormal (moderate degrees of ataxia, foot splay, and limb abduction); Grade 4, severely affected (inability to support the body weight as well as foot splay).

^{###}Significantly different from the ACR alone group ([#]p<0.05, ^{##}p<0.01).

Table 3.
Intakes of food and ACR, and final body and relative organ weights (Experiment 1).

Treatment	Food intake (g/rat/day)	ACR intake (mg/kg/day)	Body weight (g)	Relative organ weights (g/100g body weight)		
				Liver	Testes	Epididymides
Control	21.7 ±0.7 ^a	0	418.1 ±30.6	3.75 ±0.36	0.77 ±0.06	0.24 ±0.02
ALA	21.9 ±1.5	0	381.9 ±36.4	3.91 ±0.19	0.84 ±0.05	0.27 ±0.03
TP	24.0 ±2.0	0	426.1 ±17.0	3.80 ±0.20	0.74 ±0.09	0.25 ±0.02
DAS	23.0 ±0.5	0	414.6 ±46.6	3.30 ±0.26*	0.78 ±0.15	0.26 ±0.03
PEITC	22.5 ±0.8	0	409.1 ±24.7	3.77 ±0.29	0.79 ±0.05	0.27 ±0.02
ACR	19.7 ±1.2	30.5 ±10.4	342.8 ±19.0**	3.75 ±0.23	0.96 ±0.09**	0.27 ±0.02
ACR+ALA	20.2 ±1.5	27.8 ±8.7	330.7 ±35.3**	3.95 ±0.28	0.97 ±0.11**	0.28 ±0.04**
ACR+TP	21.2 ±3.0	26.1 ±7.2	355.8 ±41.9**	3.73 ±0.19	0.86 ±0.12	0.26 ±0.03
ACR+DAS	21.5 ±0.6	31.7 ±11.9	367.3 ±34.7**	3.58 ±0.22	0.89 ±0.08*	0.28 ±0.03*
ACR+PEITC	20.7 ±0.2	27.7 ±10.7	358.9 ±24.7**	3.67 ±0.27	0.91 ±0.09**	0.28 ±0.02**

^aMean±SD.

^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}Significantly different from the untreated controls

Table 4.
Data for histopathological grading of the lesions developed in the peripheral nerves and gonads (Experiment 1).

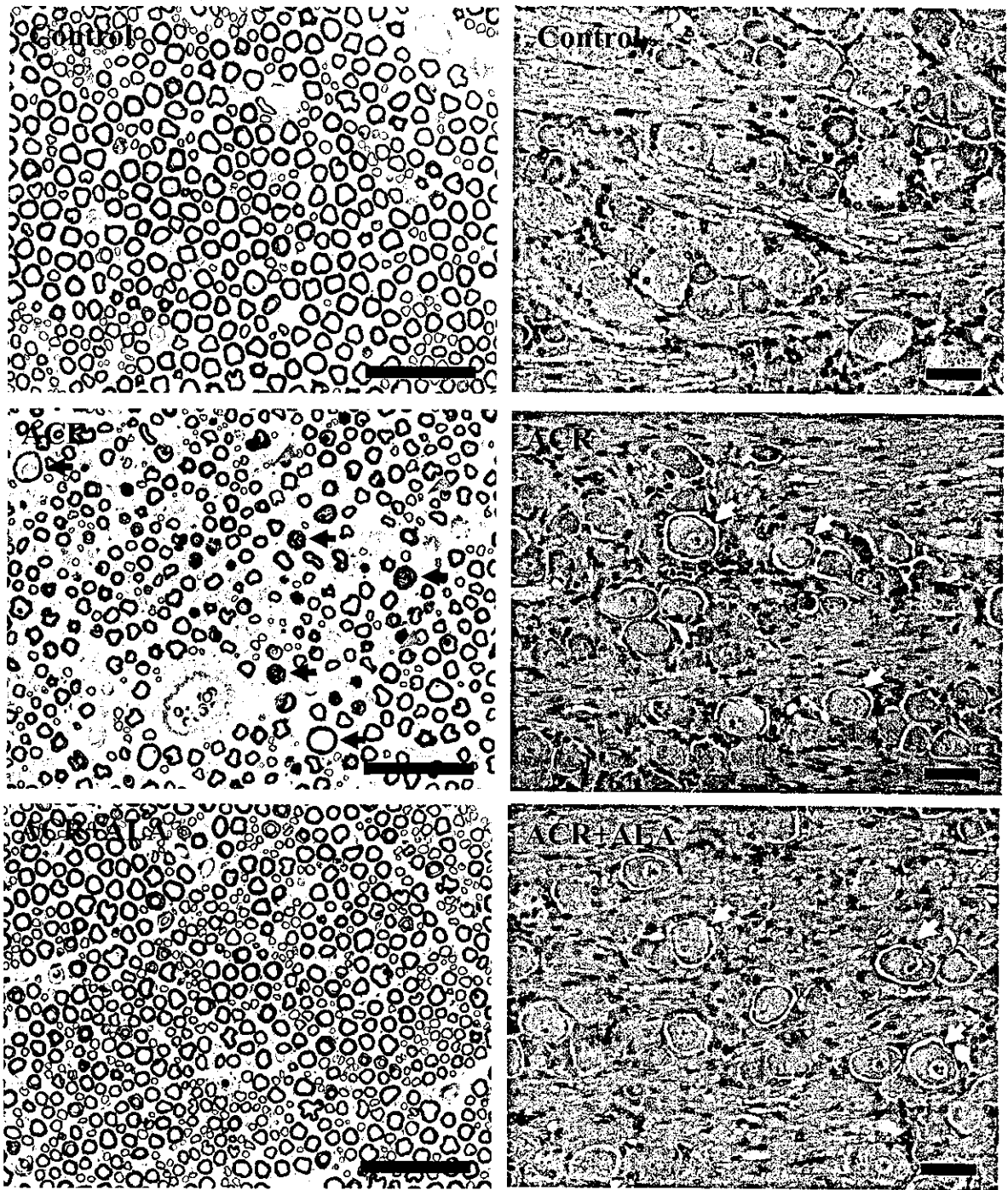
Organ/histopathological change	Control	ACR	ACR+ALA	ACR+TP	ACR+DAS	ACR+PEITC
No. of animals examined	10	10	10	10	10	10
Sciatic nerve (distal portion)						
Axonal degeneration (\pm /+/+/+/++)	10 ^a (10/0/0/0)	10(0/2/4/4)**	10(6/4/0/0)*,##	10(1/9/0/0)**,##	10(0/4/5/1)**	10(2/6/2/0)**,##
Trigeminal nerve						
Chromatolysis of ganglion cells (\pm /+/+)	0	10(0/0/10)**	10(0/0/10)**	10(0/1/9)**	10(0/1/9)**	10(0/0/10)**
Testis						
Exfoliation of germ cells (\pm /+/+/+/++)	10(9/1/0/0)	10(0/2/2/6)**	10(5/2/3/0)*,##	10(2/1/5/2)**	10(0/4/1/5)**	10(4/3/2/1)*,##
Epididymis						
Cell debris in the epididymal duct (\pm /+/+)	10(10/0/0)	10(2/7/1)**	10(7/2/1)	10(6/3/1) [#]	10(7/3/0) [#]	10(8/1/1)* [#]

^aTotal number of animals with each finding. *, **: Significantly different from the untreated controls (*p<0.05, **p<0.01). **#: Significantly different from the ACR alone group (# p<0.05, ## p<0.01).

Table 5.
Data for morphometry of the lesions developed in the nervous and gonadal systems (Experiment 1).

Organ/histopathological change	Control	ACR	ACR+ALA	ACR+TP	ACR+DAS	ACR+PEITC
No. of animals examined	10	10	10	10	10	10
Sciatic nerve (distal portion)						
Density (/100 μm^2)	1.51 \pm 0.10 ^{a, #}	1.27 \pm 0.178 [*]	1.49 \pm 0.19 [#]	1.46 \pm 0.11	1.27 \pm 0.25	1.36 \pm 0.22
Degenerated axons (%)	1.15 \pm 0.39 ^{##}	5.62 \pm 1.57 ^{**}	1.95 \pm 0.76 ^{##}	2.55 \pm 0.50 [#]	4.83 \pm 1.39 ^{**}	3.19 \pm 0.91 [*]
Myelinated axons, < 3 μm in diameter (%)	15.71 \pm 2.72 ^{##}	28.37 \pm 3.50 ^{**}	19.88 \pm 3.33 ^{*, ##}	20.21 \pm 2.26 ^{*, ##}	18.17 \pm 2.32 ^{##}	19.71 \pm 2.28 ^{*, ##}
Cerebellar cortex, molecular layer						
SYP-immunoreactive aberrant dots (/mm cortex)	1.10 \pm 0.55 ^{##}	6.60 \pm 1.64 ^{**}	4.30 \pm 1.74	5.53 \pm 2.50 ^{**}	6.77 \pm 2.36 ^{**}	6.85 \pm 2.17 ^{**}
Testis						
Degenerated tubules (%)	0.27 \pm 0.12 ^{##}	1.36 \pm 0.70 ^{**}	0.47 \pm 0.27 ^{##}	0.81 \pm 0.32 ^{**}	1.09 \pm 0.67 ^{**}	0.54 \pm 0.35 [#]

^a Mean \pm SD. *, **: Significantly different from the untreated controls (*p<0.05, **p<0.01). **#: Significantly different from the ACR alone group (# p<0.05, ## p<0.01).



◀ : 腫大・変性した軸索 ◀ : 径3 μm 以下の軸索 Bar=50 μm ◀ : 中心性色質融解 Bar=50 μm

Fig. 4. Histopathological changes in the sciatic and trigeminal nerves (Experiment 1).