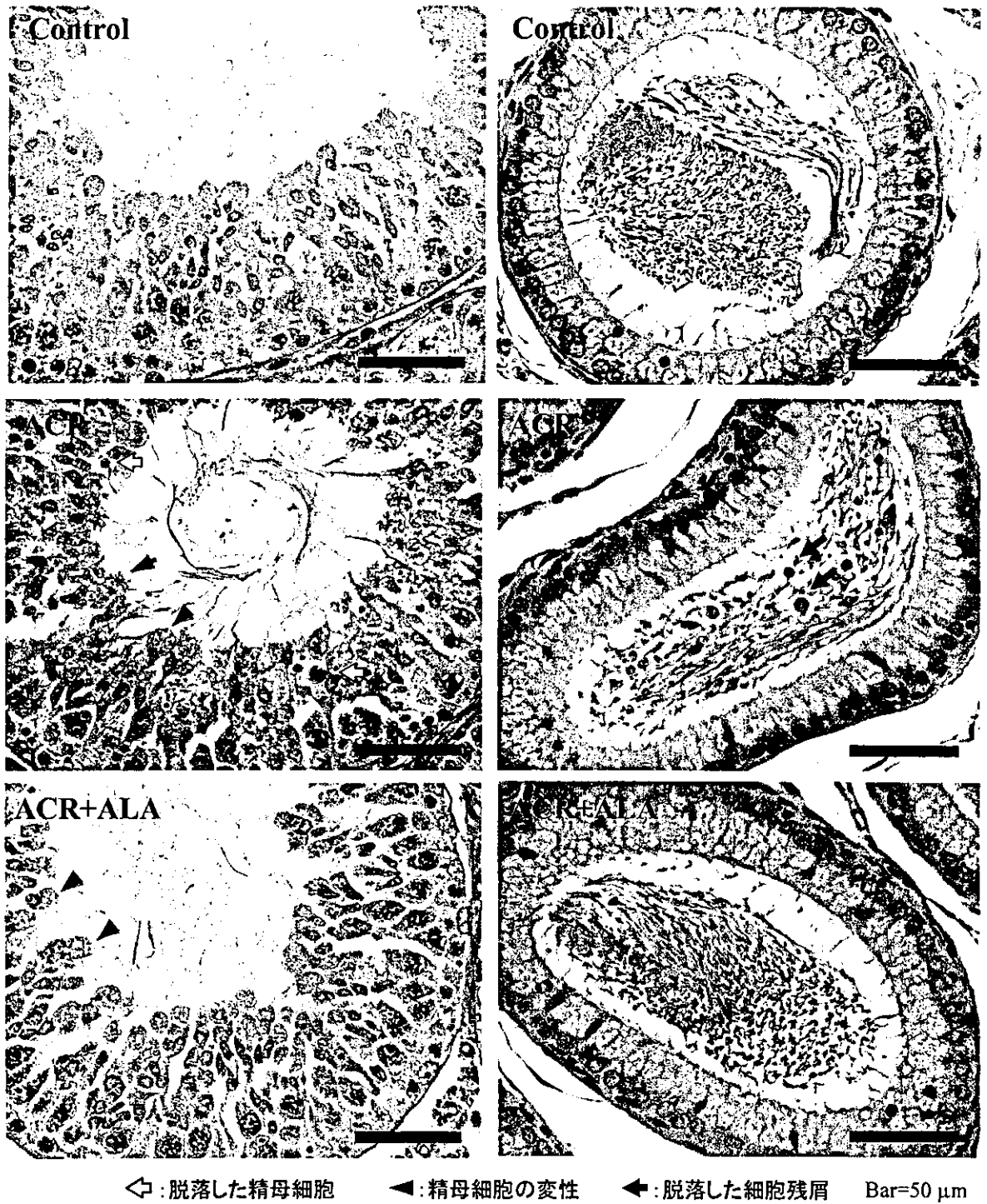


**Fig. 5.**  
**Immunoreactivity of synaptophysin and synapsin-1 in the cerebellar molecular layer (Experiment 1).**



**Fig. 6. Histopathological changes in the male gonadal system (Experiment 1).**

**Table 6.**

**Summary of immunohistochemistry results regarding antioxidant systems in the central nervous system (Experiment 1)<sup>a</sup>.**

	Control	ACR	ACR+ALA	ACR+TP	ACR+DAS	ACR+PEITC
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5
<b>CAT</b>						
<b>Cerebrum (-/±/+)</b>						
Neuron (cytoplasm)	5/0/0	3/2/0	2/3/0 <sup>*</sup>	5/0/0	5/0/0	1/1/3 <sup>*</sup>
<b>Cerebellum (-/±/+/++)</b>						
Neuron <sup>d</sup> (cytoplasm)	2/3/0/0	1/4/0/0	0/0/0/5 <sup>***,SS</sup>	0/0/2/3 <sup>**,#</sup>	0/3/2/0	0/1/1/3 <sup>*,#</sup>
<b>Pons / medulla oblongata (-/±/+)</b>						
Neuron (cytoplasm)	1/4/0	3/1/1	4/0/1	2/0/3	1/2/2	1/1/3
<b>Trigeminal nerve (-/±/+)</b>						
Neuron (cytoplasm)	5/0/0	5/0/0	3/2/0	4/1/0	1/2/2 <sup>*,#</sup>	1/2/2 <sup>*,#</sup>
<b>TRX</b>						
<b>Cerebrum (-/±/+/++)</b>						
Neuron (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm), oligodendrocyte (nucleus)	5/0/0/0	2/1/2/0	1/0/2/2 <sup>*</sup>	1/3/1/0 <sup>*</sup>	1/0/3/1 <sup>*</sup>	0/2/1/2
<b>Cerebellum (-/±/+/++)</b>						
Neuron <sup>e</sup> (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm), oligodendrocyte (nucleus)	1/3/1/0	0/1/4/0	0/0/2/3 <sup>*,#S</sup>	1/3/1/0 <sup>#</sup>	0/3/2/0	0/3/1/1
<b>Pons / medulla oblongata (-/±/+)</b>						
Neuron (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm), oligodendrocyte (nucleus)	4/1/0	0/0/5 <sup>**</sup>	0/0/5 <sup>**,S</sup>	1/3/1 <sup>#</sup>	1/2/2	1/0/4
<b>Trigeminal nerve (-/±/+)</b>						
Neuron (cytoplasm)	1/0/4	2/0/3	4/0/1	0/0/4 <sup>b</sup>	0/0/3 <sup>c</sup>	0/0/4 <sup>b</sup>
<b>GCS</b>						
<b>Cerebrum (-/+)</b>						
Neuron <sup>d</sup> (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm, nucleus), oligodendrocyte (nucleus)	3/2	3/2	2/3	3/2	3/2	2/3
<b>Cerebellum (±/+/++)</b>						
Neuron <sup>d</sup> (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm, nucleus), oligodendrocyte (nucleus)	0/5/0	0/5/0	0/1/4 <sup>*,#S</sup>	1/4/0	2/3/0	2/3/0
<b>Pons / medulla oblongata (-/+)</b>						
Neuron <sup>d</sup> (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm, nucleus), oligodendrocyte (nucleus)	0/5	1/4	0/5	0/5	1/4	1/4
<b>Trigeminal nerve (-/+)</b>						
Neuron (cytoplasm, nucleus)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/4 <sup>b</sup>	0/5

<sup>a</sup>There were no changes in the immunoreactivity of HO-1, CuZn SOD, Mn SOD and EC SOD between the control, ACR alone and ACR+chemical groups.

<sup>b</sup>n=4.

<sup>c</sup>n=3.

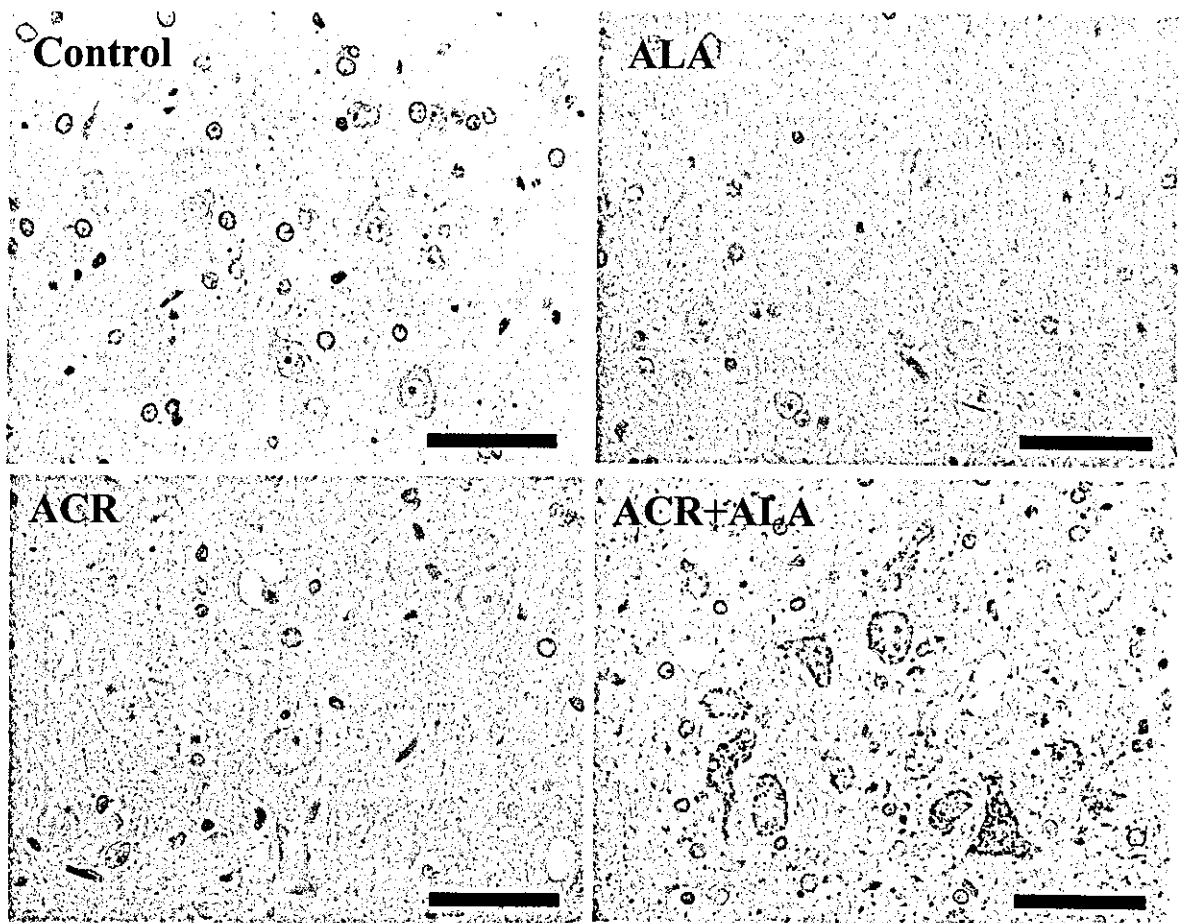
<sup>d</sup>Positive in Purkinje cells and dentate nucleus neurons.

<sup>e</sup>Positive in dentate nucleus neurons.

\*,\*\*Significantly different from the untreated controls (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

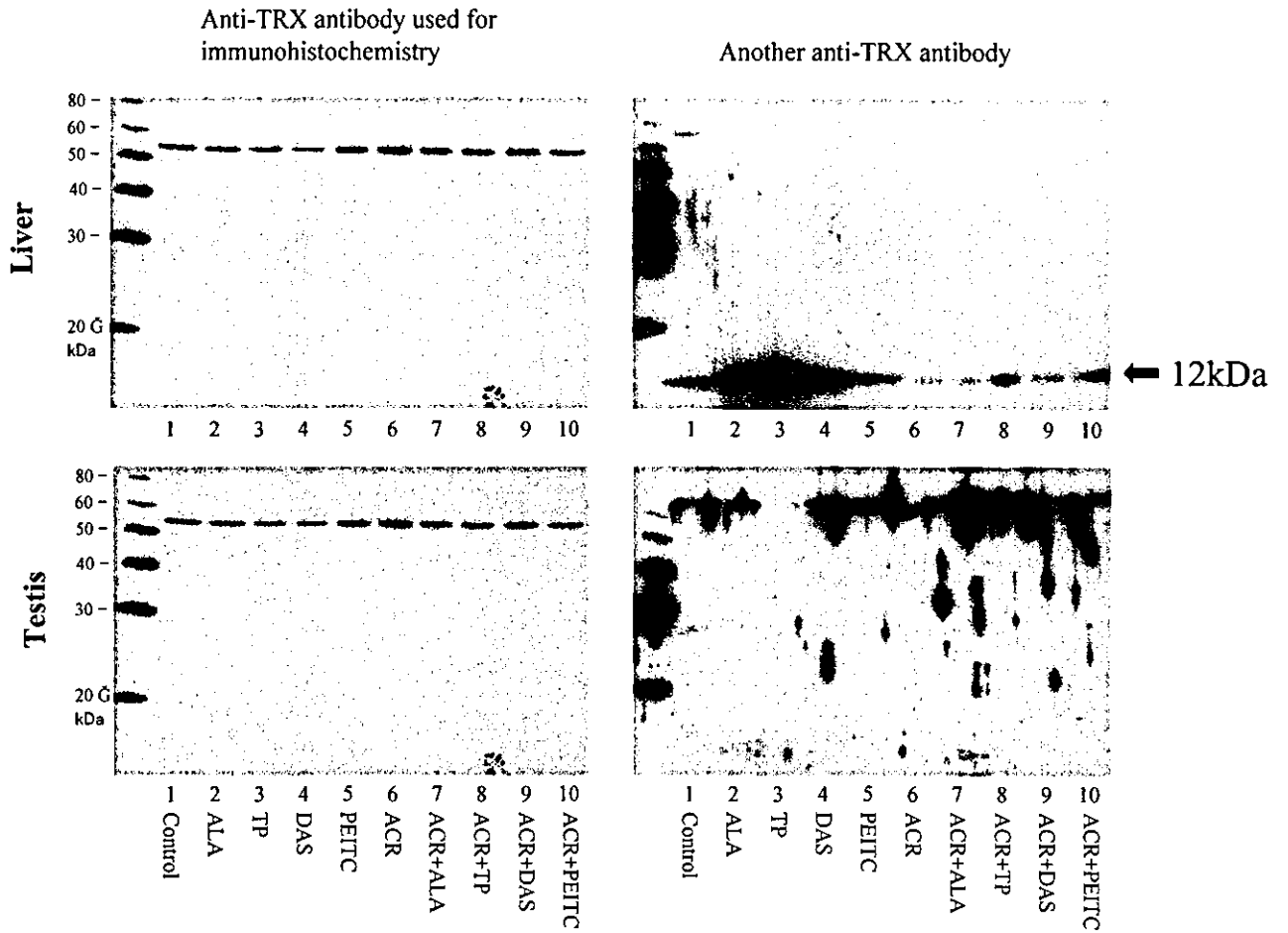
#,##Significantly different from the ACR alone group (#p<0.05, ##p<0.01).

§,§§Significantly different from the corresponding chemical-alone group (data not shown ; §p<0.05, §§p<0.01).

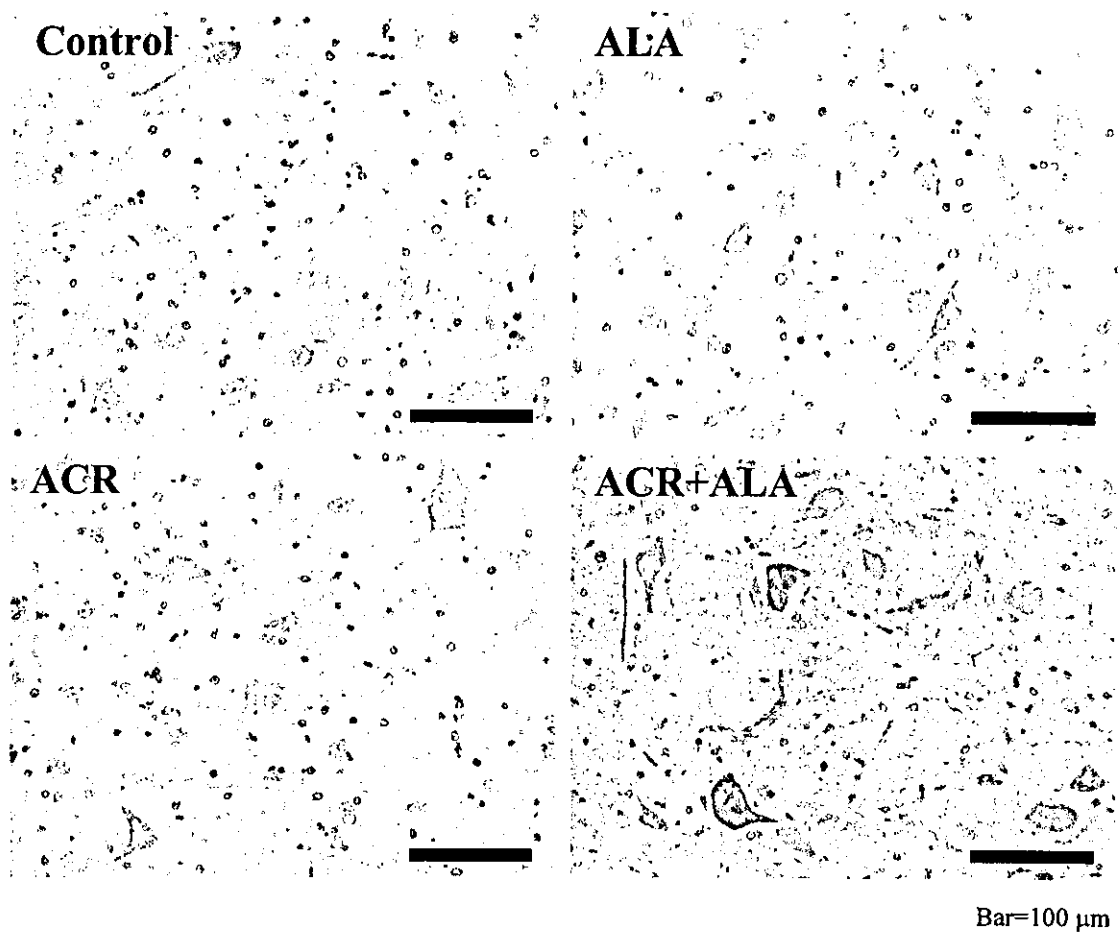


Bar=50  $\mu$ m

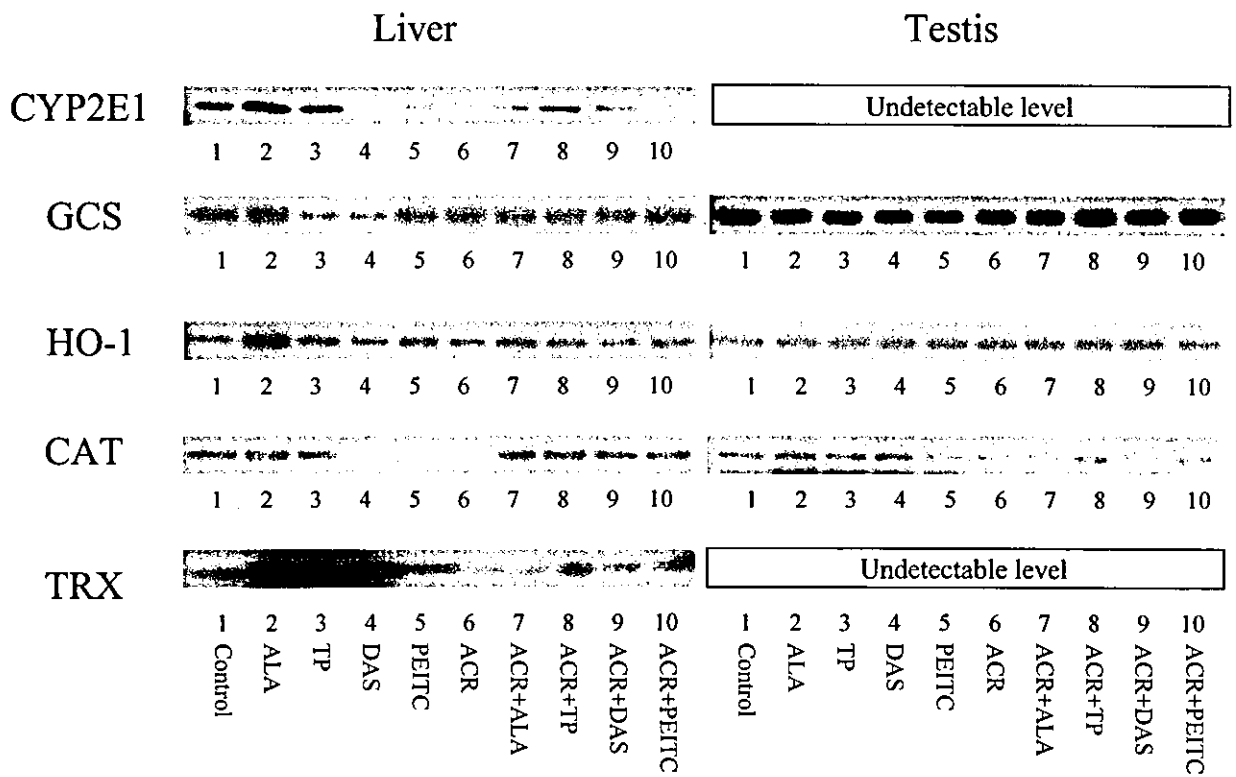
**Fig. 7.**  
**Immunoreactivity of thioredoxin in the cerebellar dentate nucleus (Experiment 1).**



**Fig. 8.**  
**Specificity analysis of the thioredoxin-immunoreactivity in the liver and testis (Experiment 1).**



**Fig. 9.**  
**Immunoreactivity of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthase in the pontine tegmentum (Experiment 1).**

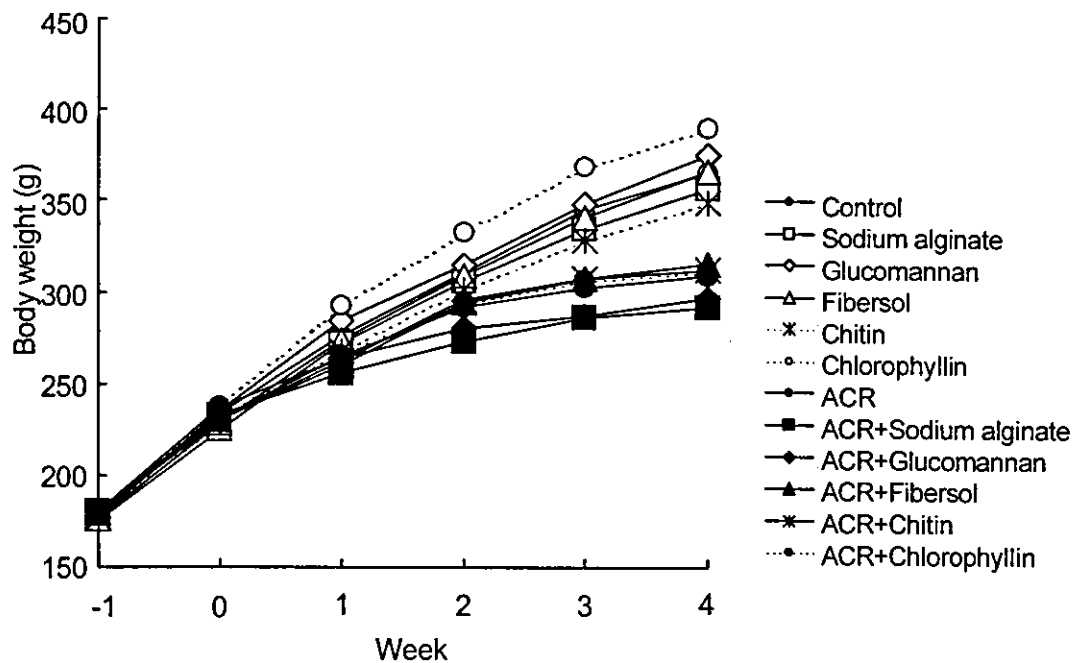


**Fig. 10.**  
**Western blot analysis of redox systems in the liver and testis (Experiment 1).**

**Table 7.**  
**Time course of water consumption in ACR-treated groups**  
**(Experiment 2).**

Treatment	Water consumption (ml/animal/day)			
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
ACR	30.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	38.3 ± 1.2	31.1 ± 1.5	24.8 ± 2.7
ACR+Sodium alginate	32.9 ± 6.8	36.7 ± 5.6	29.4 ± 4.9	21.7 ± 1.1
ACR+Glucosaminan	30.6 ± 5.7	33.8 ± 9.6	26.5 ± 2.4	22.4 ± 1.1
ACR+Fibersol	28.7 ± 1.3	35.2 ± 7.1	30.2 ± 2.7	24.1 ± 2.2
ACR+Chitin	29.5 ± 2.9	41.0 ± 6.3	31.5 ± 3.4	25.0 ± 1.1
ACR+Chlorophyllin	32.8 ± 2.8	37.6 ± 3.6	31.6 ± 3.0	25.8 ± 1.4

<sup>a</sup>Mean ± SD.



**Fig. 11.**  
**Body weight changes during the experiment (Experiment 2).**



**Table 8.**  
**Time course of gait score changes (Experiment 2).**

	No. of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3/grade 4) <sup>a</sup>			
	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	2/8/0/0	0/5/4/1	0/0/4/6
ACR+Sodium alginate	10/0/0/0	2/8/0/0	0/6/3/1	0/0/4/6
ACR+Glucomannan	10/0/0/0	0/10/0/0	0/0/10/0	0/0/4/6
ACR+Fibersol	10/0/0/0	0/10/0/0	0/0/9/1	0/0/0/10
ACR+Chitin	10/0/0/0	0/9/1/0	0/2/6/2	0/0/3/7
ACR+Chlorophyllin	10/0/0/0	1/9/0/0	0/2/8/0	0/0/2/8

<sup>a</sup>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).

**Table 9.**  
**Intakes of food and ACR, and final body and relative organ weights (Experiment 2).**

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	23.4 ±2.5 <sup>a</sup>	0	363.9 ±25.6	3.75 ±0.13	0.88 ±0.06	0.27 ±0.02
Sodium alginate	24.2 ±3.7	0	349.3 ±29.2	3.91 ±0.27	0.89 ±0.07	0.28 ±0.02
Glucomannan	24.7 ±3.0	0	378.5 ±22.4	3.98 ±0.14	0.91 ±0.09	0.28 ±0.03
Fibersol	22.7 ±2.4	0	361.4 ±30.6	3.68 ±0.32	0.74 ±0.28	0.25 ±0.08
Chitin	21.6 ±1.9	0	347.5 ±25.2	3.65 ±0.13	0.91 ±0.09	0.28 ±0.02
Chlorophyllin	24.3 ±2.7	0	389.4 ±17.6	3.45 ±0.06	0.84 ±0.09	0.26 ±0.01
ACR	18.8 ±1.3**	19.2 ±4.7	307.6 ±32.5**	3.69 ±0.28	1.03 ±0.13**	0.27 ±0.04
ACR+Sodium alginate	18.9 ±1.4*	17.9 ±5.4	285.6 ±32.5**	3.64 ±0.17	1.06 ±0.08**	0.28 ±0.03
ACR+Glucomannan	18.6 ±1.0*	17.2 ±4.7	295.3 ±17.3**	3.74 ±0.20	1.05 ±0.07**	0.29 ±0.02
ACR+Fibersol	18.8 ±1.4*	18.4 ±4.0	312.2 ±29.6**	3.60 ±0.25	0.99 ±0.11*	0.27 ±0.04
ACR+Chitin	21.3 ±2.9	17.9 ±4.8	308.8 ±31.6**	3.61 ±0.31	1.01 ±0.14*	0.28 ±0.04
ACR+Chlorophyllin	21.0 ±1.6	21.1 ±4.0	307.8 ±35.1**	3.58 ±0.23	0.98 ±0.10	0.28 ±0.03

<sup>a</sup>Mean ±SD. \*\*\*Significantly different from the untreated controls (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

**Table 10. Data for histopathological grading of the lesions developed in the peripheral nerves and gonads (Experiment 2).**

Organ/histopathological change	Control	ACR	ACR +SA	ACR +GM	ACR +FS	ACR +Chitin	ACR +CP
No. of animals examined	10	10	10	10	10	10	10
<b>Sciatic nerve (distal portion)</b>							
Axonal degeneration ( $\pm$ /+/+/+)	10 <sup>a</sup> (10/0/0/0)	10(0/1/4/5)**	10(0/1/3/6)**	10(0/1/4/5)**	10(0/0/4/6)**	10(0/0/6/4)**	10(0/1/4/5)**
<b>Trigeminal nerve</b>							
Chromatolysis of ganglion cells ( $\pm$ /+/+)	0	10(0/0/10)**	10(0/3/7)**	10(0/2/8)**	10(0/3/7)**	10(0/3/7)**	10(0/1/9)**
<b>Testis</b>							
Exfoliation of germ cells ( $\pm$ /+/+/+)	10(10/0/0/0)	10(0/1/5/4)**	10(0/2/7/1)**	10(0/3/6/1)**	10(0/0/4/6)**	10(0/2/3/5)**	10(0/3/5/2)**
<b>Epididymis</b>							
Cell debris in the epididymal duct ( $\pm$ /+/+)	10(10/0/0)	10(0/2/8)**	10(0/4/6)**	10(0/4/6)**	10(0/2/8)**	10(0/3/7)**	10(0/4/6)**

<sup>a</sup>Total number of animals with each finding. \*\*\*Significantly different from the untreated controls (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

**Table 11. Data for morphometry of the lesions developed in the nervous and gonadal systems (Experiment 2).**

Organ/histopathological change	Control	ACR	ACR +Sodium alginate	ACR +GM	ACR +Fibersol	ACR +Chitin	ACR +Chlorophyll
No. of animals examined	10	10	10	10	10	10	10
<b>Sciatic nerve (distal portion)</b>							
Density (/100 $\mu\text{m}^2$ )	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.3
Degenerated axons (%)	1.8 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 1.2 **	5.8 $\pm$ 2.0	8.2 $\pm$ 2.1 **	7.9 $\pm$ 2.1 **	8.3 $\pm$ 2.6 **	7.2 $\pm$ 1.6 **
Myelinated axons, <3 $\mu\text{m}$ in diameter (%)	11.9 $\pm$ 2.8	21.1 $\pm$ 4.0 **	19.8 $\pm$ 2.4 **	18.9 $\pm$ 2.4 **	21.5 $\pm$ 3.2 **	18.5 $\pm$ 2.8 **	22.4 $\pm$ 3.4 **
<b>Testis</b>							
Degenerated tubules (%)	0.3 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.9 **	1.8 $\pm$ 0.6	4.3 $\pm$ 1.6 *	3.4 $\pm$ 1.0 **	2.7 $\pm$ 0.6 **	2.8 $\pm$ 1.5 **
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5	5
<b>Cerebellar cortex, molecular layer</b>							
Synaptophysin-immunoreactive dots (/mm cortex)	0.1 $\pm$ 0.0	5.0 $\pm$ 0.4 **	4.9 $\pm$ 1.0 **	5.1 $\pm$ 0.9 **	5.9 $\pm$ 1.3 **	5.5 $\pm$ 1.9 **	5.6 $\pm$ 1.6 **

<sup>a</sup>Mean  $\pm$ SD. \*\*\*Significantly different from the untreated controls (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
分担研究報告書

アクリルアミド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、アクリルアミド(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、SD 系雌ラットに乳腺発癌物質である *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)でイニシエーション処置した後、AA を 40ppm 濃度で飲水投与すると同時に、抗酸化、Cyp1A2 阻害作用のある 1-*O*-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone(HTHQ), 抗酸化作用のある  $\alpha$ -Tocopherol, Cyp2E1 阻害、第 II 相酵素誘導作用のある Phenethyl isothiocyanate(PEITC)あるいは AA の吸着作用を期待した Chlorophyllin を 39 週間混餌投与することにより、各被験物質の AA 乳腺発がんに対する抑制効果を検討した。その結果、MNU と AA のみを投与した対照群に比し PEITC 群において乳癌の発生頻度、発生数及び体積が有意に( $p < 0.05$ )低下あるいは低下傾向を示し、AA の乳腺発がんに対する抑制効果が示された。

A. 研究目的

炭水化物を多く含む食品の焼く、揚げるなどの加熱調理によりアクリルアミド(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 3544 ng/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 A/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、昨年報告した雌ラットに MNU でイニシエーション処置した後 AA を 40ppm 濃度で飲水投与する AA の乳腺早期発がんモデルを用いて、具体的な乳腺発がん抑制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。

B. 研究方法

雌性 SD ラット 100 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 5

群に分け、MNU 投与 1 週間後より AA を 40ppm 濃度で飲水投与した。AA の投与開始とともに被験物質として 1-*o*-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) 0.5% (18 週目より 0.25%),  $\alpha$ -Tocopherol (Tocopherol) 1%, Phenethyl isothiocyanate (PEITC) 0.05%あるいは Chlorophyllin, sodium copper salt (Chlorophyllin) 1%を粉末基礎飼料(CRF-1)に混じて 40 週目まで投与した。MNU-AA 処置を行い基礎飼料のみを与えた群を対照とした(Fig. 1)。実験期間中、体重及び摂餌量を週 1 回測定した。また 14 週目まで週 1 回、以後隔週で触診により乳腺腫瘍の発生状況を観察してノギスにてその大きさ(たて×よこ×高さ)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した。剖検においては剥皮後、皮下結節/腫瘍を詳細に観察して大きさを、肝臓、腎臓、甲状腺については摘出後重量を測定した。さらに肺、胃、膀胱、胸腺、脾臓、脳及び肉眼的異常部位を摘出し、病理組織学的検索を行った。なお、触診及び剖検時に測定した腫瘍(腫瘍)の大きさより、次の式により体積を計算した。

$$\text{体積}=(\text{たて})\times(\text{よこ})\times(\text{高さ})\times\pi/6$$

統計方法：体重及び乳腺腫瘍の発生数、体積についてはF検定の後、StudentあるいはWelchのt検定を、乳腺腫瘍及び他臓器の病理組織所見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

死亡率に関しては対照群で20例中5例、HTHQ群で2例、Tocopherol群で3例、PEITC群で4例、Chlorophyllin群で1例の途中死亡/切迫

屠殺がみられたが(Table 1)、主な死因は乳腺腫瘍からの出血とそれに伴う貧血、一般状態の悪化であった。体重についてはHTHQ群で実験開始5週目以降有意な( $p<0.05$ または $0.01$ )体重増加抑制が認められたことから実験開始18週目から投与濃度を0.5から0.25%に変更した。その結果、回復傾向を示して22週目より投与終了時まで統計学的有意差は消失した。最終体重においては対照群と比べTocopherol群で有意な増加を示した(Table 1, Fig. 2)。摂水量に関してはAA投与期間を通して群間の差はみられず、AAの摂取量はいずれの群においても平均5mg/kg/day程度であった(Table 2)。摂餌量についてはTocopherol群で対照群に比べ増加したが、他の群では明らかな変化は認められなかった。各群の被験物質の摂取量はHTHQ-194.9, Tocopherol-624.6, PEITC-28.5, Chlorophyllin-567.5 mg/kg/dayであった(Table 2)。臓器重量についてはPEITC, Chlorophyllin群において対照群と比べて肝臓の実重量または相対重量が有意に( $p<0.05$ ,  $0.01$ )減少した。またPEITC群の甲状腺実重量が有意に( $p<0.05$ )増加した(Table 1)。

触診による乳腺腫瘍の経時的観察において、PEITC群における発生頻度及び数が12-15週目以降実験期間を通して低く、16週目には有意な( $p<0.05$ )低値を示した。HTHQ群についても12-16週目以降実験期間を通して発生頻度および数が低下傾向を示したが、統計学的有意差はみられなかった。その他の群については発生頻度、数及び体積の推移に明らかな変化は認められなかった(Fig. 3)。病理組織学的検索においては、対照群を含む各群で20例中13-17例(65-85%)に乳腺腫瘍の発生が認められ、その頻度に明らかな群間の差は認められなかった。乳腺腫瘍の発生数は対照群の $1.5\pm 1.3$ 個/ラットに対し、Tocopherol群では $2.4\pm 1.6$ 個/ラットで有意な( $p<0.05$ )増加がみられた

(Table 3)。また体積については対照群の  $11.1 \pm 21.4 \text{ cm}^3/\text{個}$  に対し、PEITC 群では  $2.6 \pm 4.7 \text{ cm}^3/\text{個}$  と有意に ( $p < 0.05$ ) 減少した (Table 3)。その他の群については発生数及び体積に明らかな変化は認められなかった。

その他の臓器の増殖性病変として、前胃の乳頭状/結節状過形成の発生頻度が対照群に比べ HTHQ 群で有意に ( $p < 0.01$ ) 増加し、前胃及び膀胱上皮の単純性過形成の発生頻度が PEITC 群で有意に ( $p < 0.05, 0.01$ ) 増加した (Table 4)。その他の臓器に関しても各群で種々の増殖性病変が認められたが、いずれも被験物質による影響と考えられる発現頻度の変化は認められなかった。

#### D. 考察

今回、SD 系雌ラットに MNU でイニシエーション処置した後 AA を飲水投与する乳腺早期発がんモデルを用いて、AA の発がん作用に対する抑制物質の検索を試みた。Cyp2E1 阻害、第 II 相酵素誘導作用をもつ PEITC 群において、触診による乳腺腫瘍の経時的観察で、その発生頻度及び数が 12-15 週目以降実験期間を通して低値を示し、16 週目には有意な抑制が認められた。また病理組織学的検査で確認された乳腺腫瘍の体積が有意に減少した。以上の結果から、PEITC は本モデルにおいて AA による乳腺腫瘍の発生、増殖に対し抑制作用を有する可能性が示された。抗酸化作用をもつ Tocopherol 群では摂餌量の増加に伴う有意な体重増加促進が認められ、病理組織学検査で確認された乳癌の発生数が有意に増加した。乳腺腫瘍の発生、増殖は、摂餌量あるいは体重増加の影響を受けることが報告されており (Thompson et al., 2004)、Tocopherol 群における摂餌量及び体重の増加が腫瘍の発生数増加に関連しているものと考えられた。その他の群については触診及び病理組織学検査により確認された乳癌の発

生頻度、発生数及び体積について明らかな変化は認められなかった。

他臓器の病理組織学的検索において HTHQ 群の前胃で乳頭状/結節状過形成の発生頻度が有意に増加した。HTHQ は前胃に対する発がんプロモーション作用を有することが知られており (Mizoguchi et al., 1998)、前胃に発がん標的性を有する MNU でイニシエーションした後 HTHQ を投与したことにより増殖性病変の発生頻度が増加したものと考えられた。PEITC に関しては肝臓の相対重量が有意に低下し、また甲状腺実重量が有意に増加した。しかし肝臓及び甲状腺に病理組織学的変化は認められず、その意義は不明であった。また PEITC 群において膀胱の単純性過形成の発生頻度が有意に増加したが、PEITC は膀胱への発がんプロモーション作用あるいは発がん作用を有することが知られており (Hirose et al., 1998; Akagi et al., 2003)、PEITC 投与による影響と考えられた。一方、PEITC 群では前胃の単純性過形成の発生頻度の有意な増加が認められた。文献的には benzo(a)pyrene で誘発されるマウス前胃発がんに対する PEITC の前処置による抑制作用が報告されているが (Lin et al., 1993)、マウスあるいはラット前胃発がんに対する促進作用の報告は見当たらない。従って今回みられた PEITC の前胃に対する作用については、今後更なる検討を要する。また AA 吸着作用をもつ Chlorophyllin については肝臓の実、相対重量の有意な減少が認められたが病理組織学的検索において明らかな変化は認められず、その意義は不明であった。

#### E. 結論

MNU をイニシエーターとして AA を 40ppm 濃度で飲水投与するラット乳腺発がんモデルを用いた検索において、Cyp2E1 阻害あるいは第 II 相酵素誘導作用をもつ PEITC が AA の乳腺発

がん作用に対する抑制物質として有用であることが示された。来年度は、Cyp2E1 阻害あるいは第II相酵素誘導作用をもつ天然物質、あるいは神経毒性および精巣毒性に対する抑制作用が確認されている天然物質を中心に、AAの発がん性に対する抑制物質の検索を継続する。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Imai T, Cho Y-M, Hasumura M, Hirose M. Enhancement by acrylamide of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat mammary tumor development -possible application for a model to detect co-modifiers of carcinogenesis. *Cancer Lett* (in press).
- (2) Cho YM, Imai T, Hasumura M, Onose J, Ueda M, Hirose M. Modifying effect of prepubertal exposure to ethinyl estradiol on multiorgan carcinogenesis in rats treated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Lett* (in press).
- (3) Imai T, Hasumura M, Onose J, Ueda M, Takizawa T, Cho YM, Hirose M. Development of invasive follicular cell carcinomas in a rat thyroid carcinogenesis model: biological impact of capsular inflammation and reduced cyclooxygenase-2. *Cancer Sci* (in press).
- (4) Ueda M, Imai T, Takizawa T, Onodera H, Mitsumori K, Matsui T, Hirose M. Possible enhancing effects of atrazine on growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced

mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Cancer Sci* (in press).

- (5) Takizawa T, Mitsumori K, Takagi H, Nasu M, Yasuhara K, Onodera H, Imai T, Hirose M. Sequential analysis of testicular lesions and serum hormone levels in rats treated with a *Psoralea Corylifolia* extract. *Food Chem Toxicol*, 42, 1-7 (2004)
- (6) Hasumura M, Yasuhara K, Tamura T, Imai T, Mitsumori K, Hirose M. Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. *Food Chem Toxicol*, 42, 439-444 (2004)
- (7) Imai T, Onose J, Hasumura M, Ueda M, Takizawa T, Hirose M. Sequential analysis of development of invasive thyroid follicular cell carcinomas in inflamed capsular regions of rats treated with sulfadimethoxine after *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiation. *Toxicol Pathol*, 32, 229-236 (2004)
- (8) Takizawa T, Imai T, Onose J, Ueda M, Tamura T, Mitsumori K, Izumi K, Hirose M. Enhancement of hepatocarcinogenesis by kojic acid in rat two-stage models after initiation with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine or *N*-diethylnitrosamine. *Toxicol. Sci.*, 81, 43-49 (2004)

##### 2. 学会発表

- (1) 第63回日本癌学会「ラット乳腺及び甲状腺化学発がんモデルにおける acrylamide の発がん促進作用」曹永暁、蓮村麻衣、今井俊夫、広瀬雅雄

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) 該当なし。

**Table 1. Mortality, final body and organ weights of rats initiated with MNU followed by acrylamide/test chemical treatment**

Treatment	N	Mortality (%)	Final body weight (g)	Liver (g) (g/100g b.w.)	Kidney (g) (g/100g b.w.)	Thyroid (mg) (mg/100g b.w.)
Control	20	5 (25)	333.1 ± 46.9	11.3 ± 1.4 (3.4 ± 0.3)	2.3 ± 0.3 (0.7 ± 0.1)	21.8 ± 3.9 (6.6 ± 1.3)
HTHQ	20	2 (10)	323.5 ± 33.2	10.9 ± 1.4 (3.4 ± 0.4)	2.7 ± 1.9 (0.9 ± 0.6)	22.0 ± 5.3 (6.9 ± 1.8)
Tocopherol	20	3 (15)	373.1 ± 56.1*	12.5 ± 2.9 (3.3 ± 0.5)	2.3 ± 0.4 (0.6 ± 0.1)	24.4 ± 3.8 (6.6 ± 1.3)
PEITC	20	4 (20)	354.5 ± 38.0	10.7 ± 0.9 (3.0 ± 0.3)**	2.3 ± 0.3 (0.7 ± 0.1)	25.1 ± 4.5* (7.1 ± 1.2)
Chlorophyllin	20	1 (5)	326.0 ± 37.0	10.1 ± 1.6* (3.1 ± 0.4)*	2.3 ± 0.3 (0.1 ± 0.1)	24.5 ± 4.7 (7.2 ± 2.2)

\* p<0.05, \*\* p<0.01 (Student's t-test)

**Table 2. Food and water consumption and chemical intakes of rats initiated with MNU followed by acrylamide/test chemical treatment**

Treatment	Food Consumption (g/rat/day)	Chemical Intake (mg/kg/day)	Water Consumption (g/rat/day)	Acrylamide Intake (mg/kg/day)
Control	16.7	-	36.1	4.92
HTHQ	15.3	194.9	39.8	5.80
Tocopherol	19.1	624.6	37.7	4.93
PEITC	16.7	28.5	38.4	5.24
Chlorophyllin	16.2	567.5	39.8	5.57



**Table 3. Incidence, multiplicity and volume of mammary tumors in rats initiated with MNU followed by acrylamide/test chemical treatment**

Treatment	No. of rats	Fibroadenoma			Adenocarcinoma			Combined		
		Incidence (%)	Multiplicity (No./rat)	Volume (cm <sup>3</sup> /tumor)	Incidence (%)	Multiplicity (No./rat)	Volume (cm <sup>3</sup> /tumor)	Incidence (%)	Multiplicity (No./rat)	Volume (cm <sup>3</sup> /tumor)
Control	20	2 (10)	0.1±0.3	48.7±65.7	15 (75)	1.4±1.3	8.3±14.6	16 (80)	1.5±1.3	11.1±21.4
HTHQ	20	2 (10)	0.2±0.5	1.0±0.1	13 (65)	1.4±1.5	5.5±14.3	14 (70)	1.6±1.6	5.0±13.7
Tocopherol	20	5 (25)	0.4±0.8	19.7±43.4	16 (80)	2.1±1.5	10.7±19.3	17 (85)	2.4±1.6*	12.2±23.9
PEITC	20	1 (5)	0.1±0.2	0.6	13 (65)	1.4±1.5	2.6±4.8#	13 (65)	1.5±1.5	2.6±4.7#
Chlorophyllin	20	1 (5)	0.1±0.2	20.7	12 (60)	1.7±1.8	6.3±9.5	13 (65)	1.8±1.8	6.7±9.7

\* p<0.05 (Student's t-test)

# p<0.05 (Welch's t-test)

Table 4. Histopathological findings in other organs of rats initiated with MNU followed by acrylamide/test chemical treatment

Organ	Finding	Grade	Group		HTHQ 20	Tocopherol 20	PEITC 20	Chlorophyllin 20
			N	Control 20				
Liver	Altered hepatocellular foci	+	2	2	0	2	3	3
	Histiocytic sarcoma		0	0	0	1	0	0
	Malignant lymphoma		0	0	0	0	1	1
Kidney	Transitional cell hyperplasia, focal, pelvis	+	0	0	1	0	1	0
	Nephroblastoma	+	1	1	1	1	0	0
	Malignant lymphoma		0	0	0	0	1	0
Lung	Alveolar/bronchiolar hyperplasia, focal	+	4	4	4	1	3	2
	Alveolar/bronchiolar adenocarcinoma		1	1	1	0	0	0
	Malignant lymphoma		0	0	0	0	0	1
Forestomach	Basal cell hyperplasia, focal	+	1	1	3	1	1	4
	Simple hyperplasia	+	2	2	7	3	8*	3
	Papillary/nodular hyperplasia	+	0	0	12**	0	1	2
	Papilloma	+	1	1	0	0	0	0
	Simple hyperplasia	+	0	0	0	1	8**	0
Thymus	Malignant lymphoma		0	0	0	0	1	0
Spleen	Histiocytic sarcoma		0	0	0	1	0	0
	Malignant lymphoma		0	0	0	0	1	1
Thyroid	Follicular cell hyperplasia, focal	+	0	0	0	1	0	0
	Follicular cell hyperplasia, diffuse	+	0	0	0	1	0	0
	C-cell hyperplasia, diffuse	+	0	0	0	1	0	0
Brain	Meningeal sarcoma		0	0	0	0	1	0
	Others (macroscopic abnormalities)							
Zymbal gland	Carcinoma		1	1	2	2	3	1
Uterus	Endometrial stromal polyp	+	1	1	0	0	0	3
Adrenal	Malignant lymphoma		0	0	0	0	0	1
Pituitary	Adenoma, anterior lobe		0	0	1	1	0	0
Tongue	Squamous cell papilloma	+	0	0	1	0	0	0

\*, \*\*: p<0.05, 0.01 (Fisher's exact probability test)

(week)

40

01

N



Acrylamide 40ppm

20



S

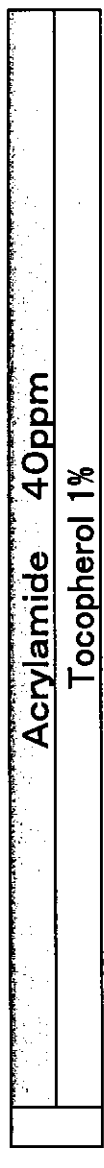


Acrylamide 40ppm  
1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone 0.5→0.25%

20

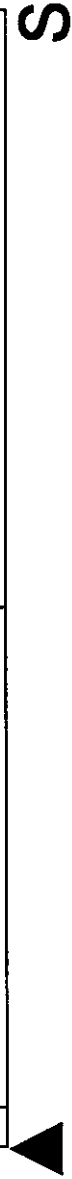


S

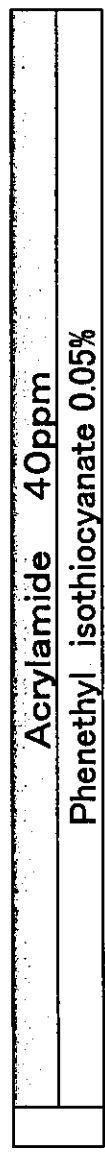


Acrylamide 40ppm  
Tocopherol 1%

20



S



Acrylamide 40ppm  
Phenethyl isothiocyanate 0.05%

20



S



Acrylamide 40ppm  
Chlorophyllin, sodium copper salt 1%

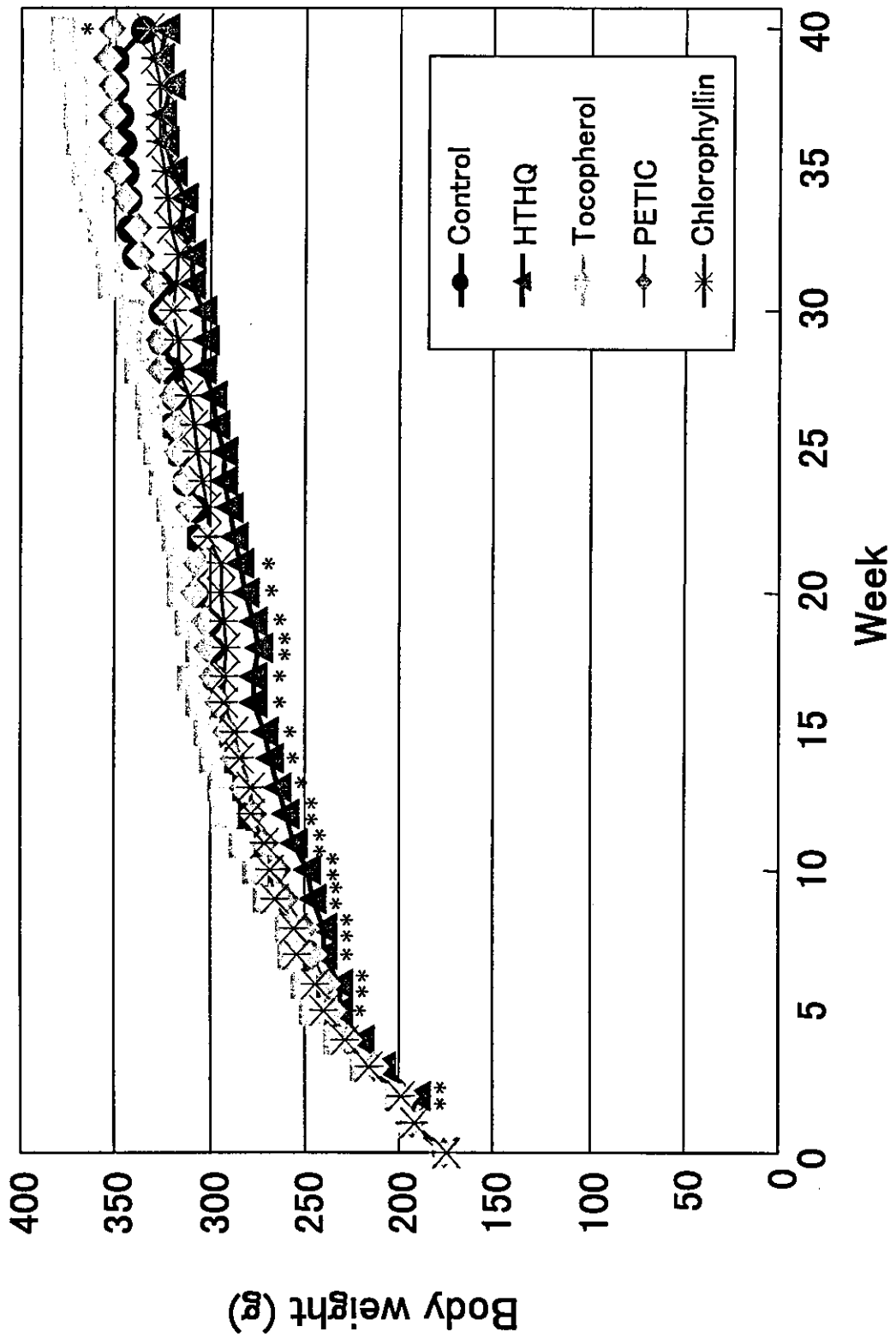
20



S

Animals : SD (IGS) female rats, 7-week old ▲ : MNU (50 mg/kg, i.p.) S : Sacrifice

Fig. 1 Experimental design



\*, \*\* p<0.05, 0.01 (Fisher's or Welch's test)

**Fig. 2 Body weight curves of rats initiated with MNU followed by acrylamide/test chemical treatment**