

図 4 反応溶液中のAAm生成率

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

アクリルアミドの生成抑制及び毒性抑制に関する研究

「アクリルアミドの代謝と毒性抑制に対する研究」

分担研究者 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター薬理部

(研究協力者:小泉 修一(同上))

研究要旨

アクリルアミド及びその代謝産物のエポキシド体(グリシダミド)の中樞神経系に対する有害作用を検討した。初代培養海馬神経細胞を用いて、アクリルアミド及びグリシダミドの細胞毒性を評価し、各種薬物の保護作用を検討した。アクリルアミド及びグリシダミド共に高濃度(1 mM 以上)で、神経細胞の cell viability を低下させたが、アクリルアミドよりもグリシダミドの方がより強い細胞毒性を呈した。In vitro のアクリルアミドの有害作用には、N-アセチルシステイン、 α リポ酸及びビタミン C 等の抗酸化作用を呈する薬物の前処置が有効であった。また、短期のシナプス伝達に及ぼすアクリルアミド及びグリシダミドの作用を検討したところ、やはり両薬物とも高濃度でシナプス伝達阻害作用を呈したが、阻害作用はグリシダミドでより顕著であった。シナプス伝達阻害作用は、特に神経終末に対する作用が強いことが示唆された。

A 研究目的

アクリルアミド及びその代謝産物グリシダミドの中樞神経細胞への有害作用を評価し、そのメカニズム及び回避方法を追求する。

B 研究方法

細胞:既報に従い、ラット海馬胎児から神経細胞を、また新生ラットからアストロサイトの初代培養を行った。

生細胞数測定(Cell viability 測定):生細胞数の測定にはMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium)アッセイを用いた。これは、MTT が細胞内ミトコンドリアの脱水素酵素の基質となり、生存能の高い細胞程多くのMTTが還元され、その結果生じるホルマザン量が生存細胞数とよく対応する事に基づいた方法である。アッセイには、測定キットを用いた。シナプス伝達に対する作用:既報(Koizumi et al., PNAS, 2003)により海馬神経細胞で惹起される Ca^{2+} 振動を指標として、シナプス伝達に対する作用を評価した。細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は、fura2 法を用いた。

C 研究結果

MTT アッセイ法を用い、初代培養海馬培養神経細胞に対するアクリルアミド及びグリシダミドの影響を検討した。両薬物とも、添加後24時間後から神経細胞の cell viability 低下を引き起

こし、これは48時間後にはさらに顕著であった。グリシダミドの毒性が約 3 倍程度強く、その LD50 値(海馬神経細胞の cell viability を 50 %低下させる濃度)は、グリシダミド 0.87 mM に対しアクリルアミド 2.5 mM であった。

抗酸化物質である、N-アセチルシステイン、 α リポ酸及びビタミンCの作用を検討した。N-アセチルシステインは 100-1000 μ M の比較的高濃度で、アクリルアミドの細胞毒性を統計学的に抑制したが、グリシダミドの細胞毒性には拮抗しなかった。また、N-アセチルシステインは、細胞にあらかじめ前処置するのではなく、アクリルアミドと同時に添加しても、強い細胞保護作用を示した。 α リポ酸は 10 及び 100 μ M でアクリルアミドの細胞毒性を抑制した。しかし、グリシダミドに対しては有効ではなかった。また、 α リポ酸はあらかじめ細胞に前処置(24 時間)すると、その作用が非常に効果が強くなることが明らかとなった。ビタミンCは 10-300 μ M の濃度でアクリルアミド及びグリシダミドの細胞毒性を軽減させた。これら3種の抗酸化物質にアクリルアミドによる細胞毒性に対する抑制作用が観察されたが、その作用は軽度であり、30 %程度に低下した cell viability を 40-50%に回復させる程度であった。

海馬初代培養神経細胞で観察される自発的 Ca^{2+} 振動を指標として、シナプス伝達に対するアクリルアミド及びグリシダミドの作用を検討した。アクリルアミド及びグリシダミドは10mM という非常に高い濃度でシナプス伝達阻害作用を示した。両薬物を投与すると、直後数分は、 Ca^{2+} 振動の振幅及び頻度に全く変化は認

められないが、60 分後には著名な振幅及び頻度の減少が観察され、これらは 120 分後にはほぼ消失した。このとき、シナプス後細胞の細胞応答性の低下は認められないことから、アクリルアミド及びグリシダミドは特に神経終末に作用し、その機能を阻害するものと考えられる。

D 考察

アクリルアミドの毒性は、主に肝臓の薬物代謝酵素 CYP2E1 による代謝産物グリシダミドによって引き起こされると考えられている。しかし、本研究結果では、アクリルアミド自身も神経細胞の cell viability を低下させ、またシナプス伝達を阻害した。しかしその作用はグリシダミドよりも弱かった(約1/3)。CYP2E1 は脳内にも存在し、最近の報告では酸化ストレス等に曝された際にその活性は上昇する(J Leukocyte Biology, 78, 1223-1232, 2005)。従って、本研究で観察されたアクリルアミドの神経毒性が、脳内 CYP2E1 により代謝されたグリシダミドによって引き起こされた可能性も完全には否定出来ない。しかし、肝臓と比較するとその発現レベルが極端に低いこと、アクリルアミドのシナプス伝達阻害作用は曝露後 60 分といった比較的早い時間から観察されること等を考えると、アクリルアミド自身が神経細胞に作用してシナプス伝達阻害及び cell viability の低下を引き起こしたものと推測される。

抗酸化作用を有する物質がアクリルアミド及びグリシダミドによる神経細胞の cell viability 低下を抑制した。N-アセチルシステインによって抑制された。N-アセチルシステインは、酸化ストレス等を抑制する細胞内毒性防御物質であるグルタチオンを増加させる。また、N-アセチルシステインは、アクリルアミド及びエポキシド体と結合能を有し、これらのスカベンジャーとしても働く。N-アセチルシステインの細胞保護作用は前処置無しでも認められたことは、一部には本薬物がスカベンジャーとして機能した可能性も考えられる。また、N-アセチルシステイン及び α リポ酸は、アクリルアミドの毒性には比較的效果を示したが、グリシダミドにより惹起される cell viability 低下には顕著な効果を示さなかった。これには、(1)アクリルアミド及びグリシダミドの毒性発現機序が異なる、(2)グリシダミドの毒性が弱いため保護効果が観察されにくい、の2つの可能性が考えられるが、現在のところ詳細は不明である。ビタミンCがアクリルアミド及びグリシダミド両者の毒性を抑制したことを考慮すると、単に(2)だけでは説明ができない可能もある。

食品から摂取するアクリルアミド及びグリシダミドが、本実験のように中枢神経系で mM オーダーに達することは考えにくい。本 *in vitro* 実験系では mM オーダーでない神経細胞毒性が観察されなかった。抗酸化物質による神経保護効果は、比較的軽度で、cell viability を 10-20%改善する程度であった。し

かし使用したアクリルアミドがこのように高濃度であったことを考慮すると、これら抗酸化物質の作用は意味のあるものであると考えることができる。中枢神経系が食品由来のアクリルアミド及びグリシダミドにより低濃度でより長期間に渡って曝露された際の神経細胞障害に対しても、抗酸化物質の摂取が有効であるか否かは今後の検討課題である。

E 結論

アクリルアミド及びその代謝産物グリシダミドは、共に高濃度で、*in vitro* で中枢神経毒性を示した。その毒性発現の強さは、グリシダミドが約3倍程度強力であった。アクリルアミド及びグリシダミドの細胞毒性発現は先ず神経終末で引き起こされること、またこれらは抗酸化物質により保護できる可能性が示唆された。

F 健康危険情報

特筆事項無し

G 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue, K., Denda, M., Tozaki, H., Fujishita, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 124, 756-763.
2. Narita, M., Miyatake, M., Shibasaki, M., Tsuda, M., Koizumi, S., Narita, M., Yajima, Y., Inoue, K. and Suzuki, T. (2005) Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. *J. Neurochem.*, 93, 1383-1392.
3. Nasu-tada, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) The involvement of α 1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA. *Glia*, 52, 98-107.
4. Fujishita, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2006) Upregulation by retinoic acid of P2Y2 receptors in normal human epidermal keratinocytes. *Purinergic Signaling*, in press.
5. Nasu-Tada, K. *, Koizumi, S. *, Tsuda, M. *, Kunifusa, E. and Inoue, K. (2006) Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X₄, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia*, in press. (*equal contribution)
6. 小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀(2006) ATP を介した皮膚ケラチノサイト間情報連絡と痛み、*Pain Research*, 印刷中

2. 学会発表

1. Koizumi, S. and Inoue, K. Dynamic astrocyte-to-neuron

- communication mediated by astrocytic ATP in hippocampal cultures. Euroglia Meeting, 17-21 May 2005, Amsterdam, Holland.
2. 小泉修一、大野泰雄、井上和秀、アストロサイトによるシナプス伝達制御(シンポジウム)、日本薬理学会関東部会、2005年6月18日、東京
 3. Koizumi, S. Astrocytes function as an interface of neurovascular system (Symposium), 26-28, July, Neuro2005, Tokyo
 4. Koizumi, S., Fujishita, K. Inoue, K. Tsuda, M. and Inoue, K. ATP を介した表皮ケラチノサイト間情報連絡と痛み(シンポジウム)、第27回日本疼痛学会、7月26-27日、宇都宮
 5. Koizumi, S., Fujishita, K. and Inoue, K. Glia-to-vascular communication mediated by extracellular ATP (Symposium). 第48回日本神経化学会、28-30 Oct., Fukuoka
 6. Koizumi, S., Tsuda, M. and Inoue, K. Mechanical allodynia induced by P2Y2 receptor activation. Society for Neuroscience, Washington DC, 12-16 Nov, 2005
 7. Tsuda, M. Kunifusa, E., Nasu-Tada, K., Hasegawa S., Koizumi, S. and Inoue, K. Fibronectin increases expression of P2X₄ receptors in microglia. Society for Neuroscience, Washington DC, 12-16 Nov, 2005.
 8. 小泉修一、藤下加代子、末石浩二、高田芙友子、片岡泰文、ATP 受容体を介するアストロサイト-ペリサイト系による毛細血管制御(シンポジウム)、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
 9. 津田誠、国房恵巳子、多田薫、小泉修一、井上和秀、フィブロネクチンはミクログリアにおける P2X₄ 受容体の発現を増強する、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
 10. 藤下加代子、末石浩二、片岡泰文、井上和秀、小泉修一、血管周費細胞ペリサイトに発現するP2受容体の生理的役割、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
 11. 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀、アストロサイトにおける P2Y₁ 受容体活性化を介した酸化ストレス誘導製細胞死シグナリングに対する拮抗作用、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
 12. 多田薫、斉藤秀俊、井上和秀、小泉修一、アストロサイトの pinocytosis における P2Y₆ 受容体の関わり、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
 13. 大久保聡子、多田薫、斉藤秀俊、小泉修一、ラットアストロサイトにおけるリポポリサッカライドによるP2受容体の変化、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
 14. 戸崎秀俊、津田誠、小泉修一、井上和秀、レチノイン酸による初代培養ミクログリアの P2X₄ 受容体発現増強、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
無し
 3. その他
無し

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
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

アクリルアミドの遺伝毒性抑制に関する研究

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

研究要旨

昨年までの研究で、アクリルアミド(AA)の遺伝毒性はそれほど強くはないが、その代謝物であるグリシダミド(GA)は点突然変異を主とする遺伝子突然変異を強く誘発することを明らかにした。AAは生体内で薬物代謝酵素CYP2E1によってエポキシ体であるGAに変換されることが知られている。TK6細胞を用いて、AAをラットS9、もしくはヒトS9(高CYP2E1)存在下で試験したが、細胞毒性、小核誘発性、突然変異誘発性は促進されなかった。また、CYP2E1を高発現するヒトトランスジェニック細胞h2E1ver2、MCL-5を用いて細胞毒性を検討したが、その程度は、親細胞のAHH-1との違いは認められなかった。一方、同じCYP2E1の基質であるジメチルニトロサミン(DMN)に対してはこれら細胞は強い感受性を示した。これらの結果は、AAがCYP2E1により代謝されるというこれまでの報告と異なるものである。AAの毒性抑制を考えるには、その代謝様式を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

食品の高温調理により自然発生することが報告されているアクリルアミド(AA)が、人の健康にどれだけの影響を与えるかが問題となっている。

AAはヒトでの発がん性の証拠は不十分であるものの、ラット、マウスにおいて発がん性が認められることからグループ2Aにランクされている。遺伝毒性に関しては細菌を用いた遺伝子突然変異試験(エームス試験)ではすべて陰性を示し、真核生物を用いたほとんどの試験系ではin vitro、in vivo 試験とも陽性結果が得られている。我々のこれまでの研究では、AAの代謝物で

あるグリシダミド(GA)が、ほ乳類細胞において、強い遺伝子突然変異誘発性を示すことが明らかになり、AAの生体摂取は遺伝毒性、発がんリスクを増加させることが示された。このようなことから、日常生活に置いて、できるだけAAの摂取量を減らすこと、また、AAが生体内で速やかに解毒させることが、そのリスクを低減させることに重要であることが示唆された。

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ことを目的とする。昨年度までは、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) AA から GA への代謝モデルとして、ヒト肝マイクロゾーム画分を添加した *in vitro* 試験系を用い、AA の毒性、および代謝機構を検討すること。
- 2) AA から GA への代謝モデルとして、薬物代謝酵素を高発現するヒトトランスジェニック細胞を用い、AA の毒性、および代謝機構を検討すること。

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)、は、滅菌蒸留水で調整した。

2) 外来的代謝活性化試験系

外来的代謝活性化実験では、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 と、ラット肝臓由来 S9 (オリエンタル酵母) を、ヒト肝臓由来マイクロゾーム画分を用いた。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 で 4 時間処理し、細胞毒性 (Relative Survival; RS) を評価し、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。尚、ヒトマイ

クロゾーム画分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) 内因的代謝活性化試験系

ヒトリンパ芽球細胞株 AHH-1 と、それを基礎としたトランスジェニック細胞、h2E1V2 と、MCL-5 を用いた。h2E1V2 は CYP2E1 を、MCL-5 は 5 つの代謝酵素 CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1、mEpoxyde hydrolase を高発現する。これら細胞は、BD Bioscience の Dr. Crespi から供与された。

(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 の細胞毒性に及ぼす、ヒトマイクロゾーム画分の影響

TK6 細胞を用いて、AA による細胞毒性、TK-遺伝子突然変異誘発性、小核誘発性をヒトマイクロゾーム画分存在下、非存在下で比較した (Fig.1)。ヒトマイクロゾーム画分非存在下で、AA は濃度依存的に細胞毒性を示し、15 mM で約 80% の細胞毒性を示した。TK 突然変異のわずかな誘発と、小核の誘発が観察された。この結果はこれまでの結果と再現性のあるものであった。ヒトマイクロゾーム画分は、高活性 CYP2E1 を持つヒト S9 (lot#HLS104) から調整されたもの

であり、通常のラット誘導型 S9 の 7 倍程度の CYP2E1 活性をもつ。同様に、ヒトマイクロゾーム画分存在下で試験したが、両者に顕著な差は認められなかった。

2) CYP2E1 発現細胞の AA 感受性

AA は CYP2E1 によって特異的に代謝されて GA に変換されてその毒性を発現すると考えられていることから、CYP2E1 高発現細胞を用いて AA 感受性を検討した。ヒトリンパ球細胞株 AHH-1 はもともと Aromatic hydrocarbon によって CYP1A1 を誘導しやすい細胞株である。この細胞を基礎として、h2E1V2 は CYP2E1 を、MCL-5 は 5 つの代謝酵素 CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1、mEpoxide hydrolase を高発現するように改変されたトランスジェニック細胞である。CYP2E1 の最適な基質であるジメチルニトロサミン (DMN) についても感受性を比較した (Fig. 2)。h2E1V2、MCL-5 細胞は DMN に対して、強い感受性を示したが、AA に対しては親株の AHH-1 と同程度であった。

D. 考 察

これまでの我々の研究で、AA と GA の遺伝毒性について比較したところ、GA の方が遺伝毒性が強く、その性質も極めて異なることを報告した。

AA は CYP2E1 により、エポキシ環をもつ GA に変換され、強い遺伝毒性物質に変わったことが予想される。NCTR の Manjanatha らは、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。また、突然変異スペクトルを比較したところ、AA も GA も GC>TA のトランスポージョンを主体とする点突然変異であることが示された。このことは、AA は in vivo で代謝を受け、毒性が増強されるということをサポートしている。

しかしながら、前回の実験では 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。今回、高い CYP2E1 活性をもつヒトマイクロゾーム画分を用いて試験したが、やはり AA 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。そこで、CYP2E1 を高発現するトランスジェニック細胞を用いて、AA に対する感受性を比較した。これら細胞は、同じ CYP2E1 で代謝をうけるジメチルニトロサミン (DMN) に対しては、顕著な毒性の増強がみられたが、AA に対しては同程度の感受性しか示さなかった。

これらの結果から、CYP2E1 が AA の主たる代謝酵素であるとも結論は得られなかった。Ghanayem らは CYP2E1-null のマウスを用いて、AA に対する遺伝毒性をコメット試験、小核試験で観察している。また、Glatt らは CYP2E1 を高発現する V79 細胞を用いて、AA の遺伝毒性を、SCE を指標にして評価している。これらの動物や細胞の結果は、正常のものに比べて差はあるが、その違いは顕著ではない。一方、DMN では強い差が見られる。AA は CYP2E1 によって代謝されるが、その寄与率は低く、もっと他の代謝経路があるのかもしてない。その経路の解明が、新しい解毒方法の確立に重要であるのかもしれない。

E. 結論

AAはin vitroで、代謝活性化法で活性化を受けなかった。また、CYP2E1活性をもつ細胞でもAAの毒性は増強されなかったことから、AAの主たる代謝経路はCYP2E1以外の経路が考えられた。AAの毒性軽減法の確立のためにはこの代謝系路の解明と、それを利用したin vitro試験系の構築が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Honma, M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 162-176 (2005)

Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, (in press)

Matsura-Eisaki, K., Sakamoto, H., Sofuni, T., Hayashi, M. and Honma, M. In vitro genotoxicity of inorganic arsenics and their genotoxic risk through food intake. *Environ. Mutat. Res.*, 27, 153-160 (2005)

2. 学会発表

Hakura A., Oka H., Takasaki W., Sasaki YF, Suzuki S, Satoh T., and Honma M., Establishment of humanized in vitro genotoxicity test system: combined system

using human cell lines and human S9. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Koyama N., Sakamoto H., Sakuraba M., Koizumu T., Takashima Y., Hayashi M., Matsufuji H., Yamagata K., Masuda S., Kinae N. and Honma M., Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Matsufuji H., Inoue M., Chino M., Honma M., Hayashi M., and Yamagata K., Genotoxicity of quercetin in the presence of oxygen species and human liver S9 in human lymphoblastoid TK6 and WTK-1 cells. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Hayashi M., Interallelic homologous recombination and target intergration induced by DNA double strand breaks. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Neuwirth EAH, Honma M. and Grosovsky AJ., High frequencies of crossing-over associated with long tract gene conversion in human cells. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Honma M., DNA double strand break repair and cells cycle in human lymphoblastoid cell line. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Honma M., Genotoxic risk assessment for synthetic and natural chemicals in foods. The 2nd international Conference on the Modernization of Traditional Chinese Medicine. (2005.9)

高島良生、櫻庭真弓、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 日本環境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

欒洋、本間正充、スレッシュテイルパッテイー、小木美恵子、山口照英、鈴木孝昌 CGH および SNP アレイを用いた染色体解析 日本環境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

真田和尚、坂本浩子、櫻庭真弓、小泉朋子、高島良生、林真、本間正充 p53 に依存したスピンドルポイズンの in vitro 遺伝毒性 日本環境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

木本崇文、坂本浩子、櫻庭真弓、小泉朋子、高島良生、小林恒文、笠原義典、林真、本間正充 ヒトリンパ球細胞 TK6 を用いたフラボノイド系サプリメント化合物の in vitro 遺伝毒性 日本環境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

本間正充、高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、林真 DNA2 本鎖切断によって誘発される相同染色体組換え、および遺伝子ターゲッティング 境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

松藤寛、井上真由美、千野誠、本間正充、林真、山形一雄 ヒトリンパ球細胞株 TK6 を用いた抗酸化フラボノイドおよびその酸化物の遺伝毒性 境変異原学会第 34 回大

会 (2005.11)

Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Hayashi M., Interallelic homologous recombination and target intergration induced by DNA double strand breaks. The 22nd Radiation Biology Center International Symposium. (2005.9)

本間正充 ヒト型遺伝毒性試験と、ヒト発がん性の予測 日本動物代替法学会第 19 回大会 (2006.12)

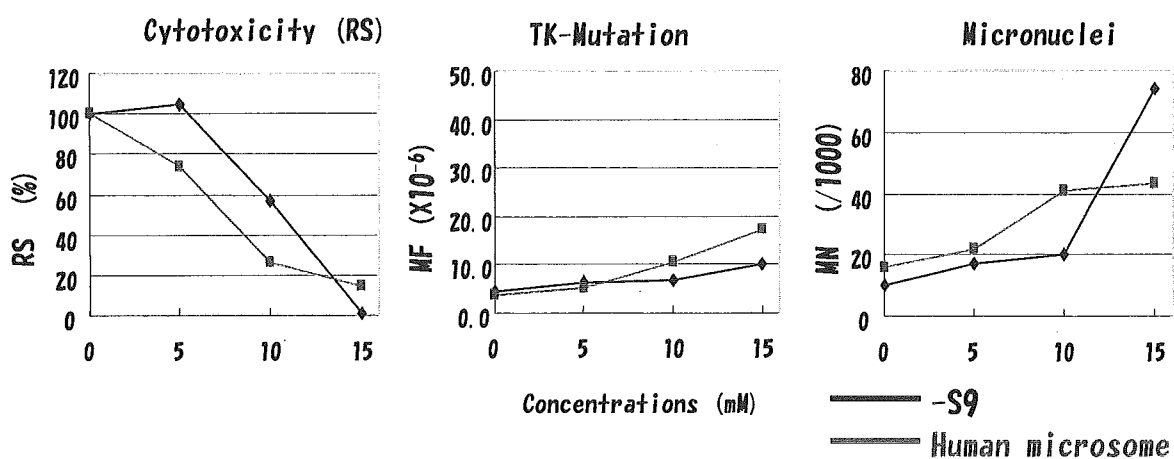
本間正充、高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、林真 DNA2 本鎖切断によって誘発されるヒト細胞での相同組換え反応 第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、林真、本間正充 ヒト細胞における制限酵素によって切断された DNA2 本鎖切断修復の細胞周期依存性 第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

G. 知的所有権の取得状況

なし

Cytotoxic and Genotoxic Responses to Acryamide in TK6 Cells with or without human microsome fraction



Metabolic system	CYP2E1 activity (pmol/mg/min)
Rat non-induced S9	431
Rat Induced S9	1295
Human S9 (HLS104)	755
Human microsome (HLS104)	2917

Fig.1

Cytotoxic response to AA and DMN among human cell lines

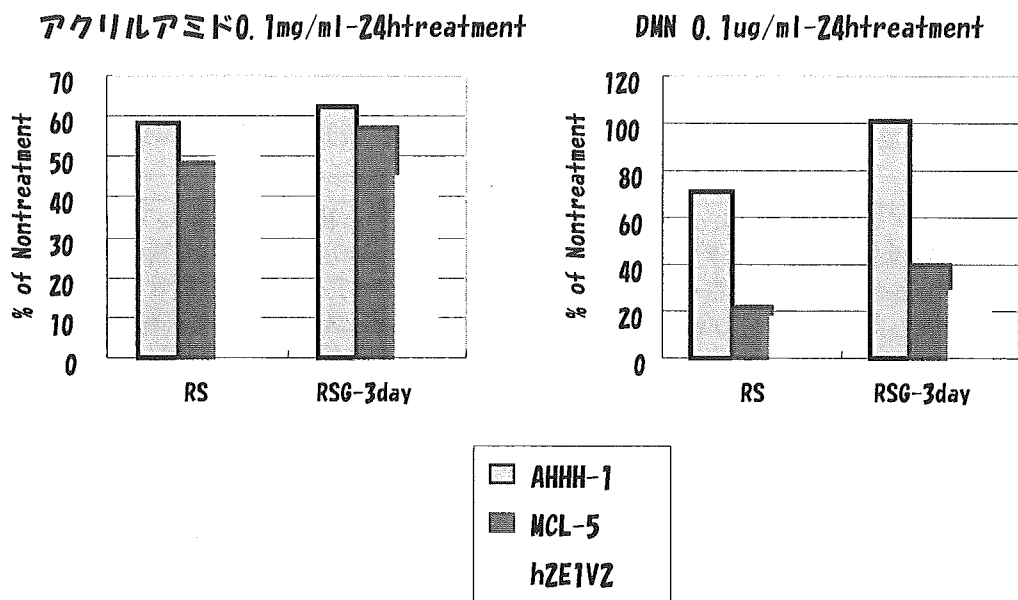


Fig.2

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
 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17年度）
 アクリルアミド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
 （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、15-16年度に抗酸化作用／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行ったが、最終年度である今年度は、それらの物質の毒性抑制効果に対する、組み合わせの投与による相加・相乗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0.02%飲水投与して神経毒性を誘発するモデルを用いた。ACRによる毒性の抑制物質として、既に効果の有無を確認している0.2% α -lipoic acid (ALA), 0.05% phenylethyl isothiocyanate (PEITC), 1.0% α -tocopherol (TP)の混餌投与を、ACR投与1週間前より行った。毒性抑制物質の組み合わせとして、神経及び精巣障害に対して明らかな抑制効果の見られた0.2% ALAに対して、神経障害に部分的な抑制効果を示した1.0% TP, 神経障害に部分的で、精巣障害には著効を示した0.05% PEITCの併用群を設定した。検索パラメーターは、実験期間中の体重と神経症状スコアの推移、解剖時臓器重量、中枢・末梢神経、精巣・精巣上体の病理解析とした。解析の結果、ALAとの併用投与により、PEITC, TPとも神経障害についてはALAによる末梢神経毒性抑制作用以上の効果は見出せなかった。また、精巣障害に対する抑制作用に関しては、ALAとPEITCの組み合わせで、病理形態学的な相加作用が確認された。

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。

本班研究において、15-16年度はラットを用いた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保護効果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、以前に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。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。16年度は更に、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、食物繊維やchlorophyllin等の併用投与実験を行った結果、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、用いた実験条件下では生じていないと判断された。最終年度である17年度は、これまで解析を進めてきた抗酸化物質の毒性抑制効果に対して、組み合わせの投与による相加・相乗作用の有無を検討した。

B. 研究方法

6週齢の雄SD:IGSラットを7群、各8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の単独投与群の他、ACRに加えて、昨年度までACR誘発毒性に対する抑制効果の有無が確認されている0.2% ALA, 0.05% PEITC, 1% TPの混餌による併用投与群、更には、組み合わせとして0.2% ALA+0.05% PEITC、あるいは0.2% ALA+1% TPのACRとの併用投与群を設定した。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、エポン包埋後、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、細胞残層の出現した精細管の数を測定した。

免疫染色として、中枢神経系のシナプス傷害の指標として、synaptophysin (SYP) について、小脳分子層での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。

(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

投与期間中の体重の推移を検討した結果、対照群と比較し、有意な低値が、ACR+ALA 群で実験開始 1 週目から、ACR+PEITC 群で 2 週目から、ACR+ALA+TP 群で 3 週目から認められ、最終週 (第 5 週) では ACR を投与した全群で認められた (Fig. 2)。ACR+ALA 群での体重低値は、1 週目から ACR 群との間でも有意であった。ALA と共にもう 1 種類の抗酸化物質を併用した実験群のうち、PEITC 併用では実験期間を通じて、TP 併用では 1,2,5 週目に、ACR+ALA 群に比べて有意に高値を示した。

ACR を投与した各群で飲水量 (ACR 摂取量) を比較した結果、実験を開始して 2-3 週で、ACR+ALA 以外の ACR 併用群で、ACR 単独群に比較して高値を示した (Table 1)。4-5 週目では、ACR+ALA+TP 群で、ACR 単独群及び ACR+ALA 群に比較して高値を示した。この時期では、ACR+ALA+PEITC 群でも ACR+ALA 群に比較して飲水量の高値を示した。

Gait score に関しては、ACR 単独投与群では、経時的にスコアが増加 (症状が増悪) を示した (Table 2)。ACR 単独投与群に比べて、ALA を併用した全群で実験 4 週目 (ACR 投与 3 週目) よりスコアが有意に低値を示したが、ALA+TP 群では実験 5 週目のスコアは有意ではなかった。また、第 5 週の時点で ACR+ALA+PEITC 群のスコアは ACR+PEITC 群より低値を示した。

実験期間を通じての摂餌量は、ACR+ALA 群は無処置対照に比べて有意な低値を示したが、更に TP の併用によっては ACR+ALA 群に比較して有意に増加した (Table 3)。また、実験期間を通じての体重当たりの ACR 摂取量は投与群間に明らかな差を認めなかった。最終体重は、無処置対照に比べ、ACR 投与各群で有意に低値を示したが、ACR+ALA 群では ACR 単独群に比し有意に低値を示し、ACR+ALA+PEITC 群では ACR+ALA 群に比し有意な高値を示した。

病理組織学的解析のうち、坐骨神経に現れた変化として、ACR 投与群では、軸索変性の程度、形態計測に

よるその割合、萎縮した有髄線維の割合のいずれもが増加した (Table 4)。ALA の併用により、軸索変性は依然として認められ無処置対照との間で有意であるが、明らかにその程度は抑制され、変性軸索や萎縮有髄線維の割合も ACR 単独群に比べ有意に抑制され、無処置対照に近い値を示した。PEITC の併用でも同様に軸索変性の程度、変性軸索の割合、萎縮有髄線維の割合が抑制されたが、軸索変性の程度と変性軸索の割合は無処置対照との間で有意であった。TP の併用によっては、軸索変性の程度の抑制に有意差はつかなかったものの、変性軸索の割合、萎縮有髄線維の割合は ACR 単独群に比し有意に抑制された。ただし、PEITC 併用群と同様、変性軸索の割合は無処置対照との間で有意であった。ALA と共に PEITC を併用した場合、軸索変性の程度、変性軸索の割合共に ACR 単独群、ACR+PEITC 群に比べ有意に抑制されたが、ACR+ALA 群に比べて有意な変動は認めなかった。萎縮有髄線維の割合には、いずれの群との間でも有意差はつかなかった。ALA と共に TP を併用した場合、軸索変性の程度、変性軸索の割合、萎縮有髄線維の割合共に ACR 単独群に比べ有意に抑制されたが、ALA あるいは TP のみの併用群との間では有意差はなかった。三叉神経 ganglion 細胞の ACR により誘発された中心性色質融解に関しては、いずれの物質の投与あるいはそれらの併用によっても明らかな抑制効果は認められなかった。

精巣の病理変化に関して、精上皮細胞の脱落が ACR を投与した各群で認められたが、その程度は ALA 投与した各群で抑制された (Table 4)。更に、ALA と共に PEITC を併用した群では、その抑制が各々の単独併用投与群に比べて更に有意に強く現れた。ALA と共に TP を併用した群では、各々の単独併用投与群に比べて有意な変動は認めなかった。変性した精細管の割合を形態計測した結果、ACR 投与によりその割合は増加したが、ALA ないし PEITC 併用群では ACR 群に比較して有意に抑制された。ALA 併用各群では、無処置対照との間に有意差は消失したものの、PEITC のみを併用した群では有意であった。更に、変性精細管の割合は ALA+PEITC ないし ALA+TP 群で、それぞれ PEITC、TP のみを併用した群より抑制が強く現れた。ACR 投与により出現した精巣上体管における細胞残屑の程度に

関しては、弱い抑制傾向は認められるものの、いずれの物質の投与あるいはそれらの併用によっても有意な抑制効果は認められなかった。

次に、ACR 投与により出現した小脳皮質分子層における synaptophysin 陽性の点状構造の分布を測定した結果、ALA のみの併用投与、あるいは ALA+PEITC の併用投与により、ACR 単独群に比べ有意な抑制効果が認められたが、複合併用投与による増強作用は認めなかった(Table 4)。

D. 考察

昨年までの解析により、ACRによる神経毒性は、ALA、TP、PEITCにより部分的に抑制され、ALAでより明らかであった。ACRによる精巣障害に関しては、ALAとPEITCで著効を示した。今回のACR誘発神経障害および精巣障害に対する各種抗酸化物質の複合抑制効果の検討では強い増強作用が期待されたが、神経障害については中枢及び末梢神経においても、ALAによる抑制作用以上の効果は見出せなかった。精巣障害に対する抑制作用に関しては、ALAとPEITCの組み合わせで、病理形態学的な相加作用が確認されたのみであった。

昨年までの中枢神経での解析により、用いたそれぞれの抗酸化物質による抑制作用に関して、catalaseによるH₂O₂消去系の活性化、更にALAによる抑制にはGCS発現増加による内因性GSH産生の亢進している可能性が示唆された。このことから、ALAによる抑制作用以上の効果は見出せなかったことは、抑制作用には、catalaseによるH₂O₂消去系の活性化よりも、内因性GSH産生亢進の役割が大きいものと考えられた。

精巣毒性に対して効果のあったPEITC、ALAに関しては、PEITCはCYP2E1の阻害による遺伝毒性の強いglycidamide生成抑制による精上皮細胞障害の抑制、ALAに関しては内因性GSH生成促進による保護作用の増加が考えられ、この違いが相加的に作用したものと考えられた。

E. 結論

ACR誘発神経障害および精巣障害に対する各種抗酸化物質の複合抑制効果の検討により、神経障害につい

てはALAによる抑制作用以上の効果は見出せなかった。精巣障害に対する抑制作用に関しては、ALAとPEITCの組み合わせで、病理形態学的な相加作用が確認されたのみであった。

F. 研究発表

1. 論文発表

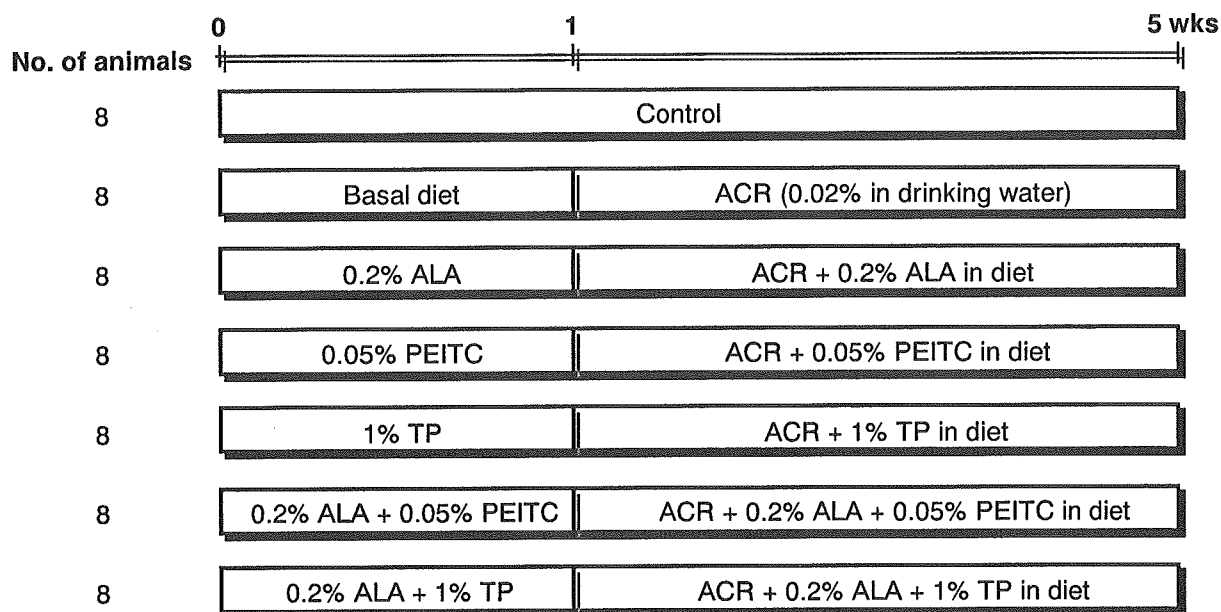
Lee, K-Y, Shibutani, M., Kuroiwa, K., Takagi, H., Inoue, K., Nishikawa, H., Miki, T., Hirose, M.: Chemoprevention of acrylamide toxicity by antioxidative agents in rats – Effective suppression of testicular toxicity by phenylethyl isothiocyanate. Arch Toxicol. 79(9): 531-541, 2005.

2. 学会発表

該当無し

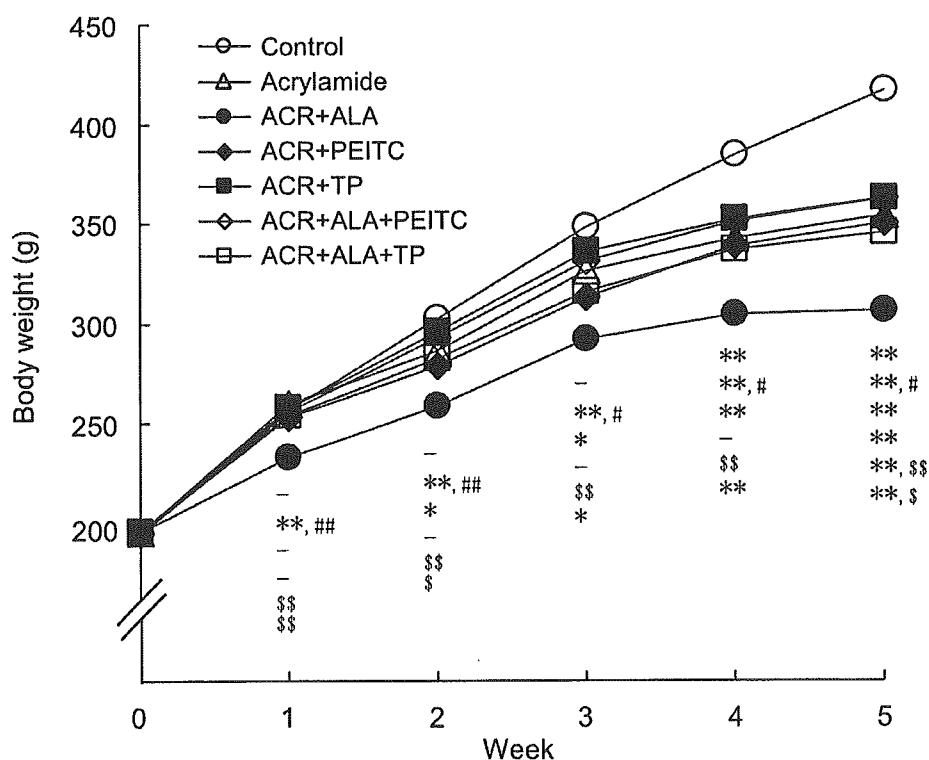
F. 知的所有権の取得状況

特になし。



ALA, α -lipoic acid; TP, α -tocopherol; PEITC, phenylethyl isothiocyanate

Fig. 1
Effect of co-administration of anti-oxidative agents on the protection of ACR-induced toxicity in rats. Experimental design.



*** 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 ACR+ALA group (\$ p <0.05, \$\$ p <0.01).

Fig. 2
Body weight changes during the experiment.

Table 1
Time course of water consumption in ACR-treated groups

Group	Treatment	Water consumption (ml/animal/day)			
		Week 1-2	Week 2-3	Week 3-4	Week 4-5
2	ACR	38.6 ± 0.8	42.5 ± 0.7	36.8 ± 1.9	30.4 ± 4.4
3	ACR+ALA	40.9 ± 4.2	43.4 ± 0.1	38.2 ± 7.5	29.3 ± 4.4
4	ACR+PEITC	47.3 ± 4.6	57.4 ± 0.1 ^{##}	48.0 ± 2.3	41.0 ± 0.9
5	ACR+TP	45.0 ± 3.5	48.4 ± 0.4 [#]	43.7 ± 9.1	39.7 ± 3.8
6	ACR+ALA+PEITC	44.2 ± 6.8	49.7 ± 2.3 [#]	43.2 ± 6.6	42.1 ± 4.9 ^{\$}
7	ACR+ALA+TP	45.0 ± 5.2	59.4 ± 3.0 ^{##}	47.1 ± 3.8	43.4 ± 0.3 ^{#, \$}

Note. Mean±SD.

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

^{\$. \$\$}Significantly different from the ACR+ALA group (^{\$}*p*<0.05, ^{\$\$}*p*<0.01).

Table 2
Time course of change in gait scores for ACR-treated rats with and without antioxidants

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

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

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

[·] Significantly different from the ACR+PEITC group (*p*<0.05, *p*<0.01).

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

Group	Treatment	No. of animals examined	Food intake (g/rat/day)	ACR intake (mg/kg/day)	Body weight (g)	Relative organ weights (g/100g body weight)		
						Liver	Testes	Epididymis
1	Control	8	24.8 ± 2.5	0	410.5 ± 34.8	3.91 ± 0.21	0.80 ± 0.08	0.26 ± 0.04
2	ACR	8	21.5 ± 2.2	22.8 ± 4.5	350.9 ± 27.9**	3.92 ± 0.21	0.94 ± 0.06**	0.26 ± 0.02
3	ACR+ALA	8	17.7 ± 2.0**	26.3 ± 5.5	304.1 ± 19.1**.#	4.03 ± 0.22	1.11 ± 0.10**.#	0.28 ± 0.02
4	ACR+PEITC	8	20.6 ± 1.1	30.5 ± 5.9	347.3 ± 33.8**	3.80 ± 0.24	0.93 ± 0.07 [†]	0.26 ± 0.02
5	ACR+TP	8	22.7 ± 2.1	26.4 ± 3.9	360.9 ± 25.1**	3.68 ± 0.18	0.94 ± 0.08**	0.23 ± 0.02
6	ACR+ALA+PEITC	8	22.2 ± 1.2	26.9 ± 3.6	356.3 ± 28.0** ^{§§}	3.95 ± 0.28	0.86 ± 0.09 ^{§§}	0.25 ± 0.02
7	ACR+ALA+TP	8	24.6 ± 2.4 [§]	30.5 ± 5.4	340.8 ± 36.4**	3.93 ± 0.35	0.93 ± 0.07 ^{§§}	0.24 ± 0.03 [§]

Note. Mean±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).

§,§§Significantly different from the ACR+ALA group ([§]*p*<0.05, ^{§§}*p*<0.01).

Table 4
Effects of combined treatment of antioxidants on ACR-induced histopathological changes in nervous and male gonadal systems - Data for histopathological grading and morphometry

Organ/histopathological change	Control	ACR	ACR +ALA	ACR +PEITC	ACR +TP	ACR +ALA+PEITC	ACR +ALA+TP
No. of animals examined	8	8	8	8	8	8	8
Sciatic nerve (distal portion)							
Axonal degeneration (±/+/++/+++)	8/0/0/0	0/1/1/6**	0/6/2/0**.#	0/3/4/1**.#	0/1/5/2**	2/5/1/0**.#	2/5/1/0**.#
Densitv (/100 μm ²)	2.2 ± 0.2	2.3 ± 0.3	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2	2.3 ± 0.3
Degenerated axons (%)	2.0 ± 0.9	7.4 ± 2.0**	2.9 ± 1.5 ^{##}	5.0 ± 2.1**.#	4.4 ± 1.4**.#	2.8 ± 1.1 ^{##}	2.8 ± 0.7 ^{##}
Myelinated axons < 3 μm in diameter (%)	15.8 ± 4.6	24.3 ± 3.8**	16.3 ± 3.2 ^{##}	17.3 ± 5.0 ^{##}	16.5 ± 2.7 ^{##}	20.0 ± 3.6	18.7 ± 5.6 [§]
Trigeminal nerve							
Chromatolysis of ganglion cells (-/±/+/+++)	8/0/0/0	0/0/3/5**	0/0/4/4**	0/0/3/5**	0/0/2/6**	0/0/5/3**	0/0/4/4**
Testis							
Exfoliation of germ cells (±/+/++/+++)	8/0/0/0	0/2/2/4**	0/6/2/0**.#	0/3/3/2**	0/0/6/2**	4/4/0/0 ^{*,##,§}	2/5/1/0**.#
Degenerated tubules (%)	0.4 ± 0.2	2.1 ± 0.6**	0.9 ± 0.2 ^{##}	1.4 ± 0.5**.#	1.7 ± 0.4**	0.6 ± 0.3 ^{##}	0.9 ± 0.3 ^{##,§}
Epididymis							
Cell debris in the epididymal duct (±/+/++)	8/0/0	1/4/3**	4/3/1 [†]	3/4/1**	2/3/3**	4/3/1 [†]	3/4/1**
Cerebellar cortex, molecular layer							
Synaptophysin-immunoreactive dots (/mm cortex)	0.1 ± 0.1	5.9 ± 3.8**	2.6 ± 1.0 ^{*,##}	3.6 ± 0.7**	3.0 ± 0.6**	2.5 ± 1.8 ^{##}	3.1 ± 1.0**

Note. Grade of change; ±, minimal; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

*,**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 ACR+ALA group ([§]*p*<0.05, ^{§§}*p*<0.01).

[†] Significantly different from the ACR+PEITC group (*p*<0.05, *p*<0.01).

^{†,§}Significantly different from the ACR+TP group ([†]*p*<0.05, [§]*p*<0.01).

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
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 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 0.004% の濃度で飲水投与すると同時に、抗酸化作用を有する α -lipoic acid (LA)、抗酸化作用及び CYP2E1 阻害作用を有する 18 β -glycyrrhetic acid (GA)、抗酸化作用及び第 II 相酵素誘導作用を有する indole-3-carbinol (I3C) あるいは CYP2E1 阻害作用及び第 II 相酵素誘導作用を有する disulfiram (DSF) を 21 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べ LA、GA 及び I3C 群において乳癌の発生頻度あるいは発生数が有意に ($p < 0.05$) 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。DSF 群については、乳癌の発生頻度及び発生数は有意に ($p < 0.05 \sim 0.001$) 低下したが、顕著な体重増加抑制が乳腺発がんに影響している可能性を否定できず、評価から除外した。以上、MNU-AA ラット乳腺発がんモデルにおいて、抗酸化、CYP2E1 阻害あるいは第 II 相酵素誘導作用を有するものが AA の発がん作用に対する抑制物質として有用である可能性が示された。

A. 研究目的

炭水化物を多く含む食品を焼く、揚げるなどの高温で加熱調理すること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 3,544 ng/g の AA が検出された(Takatsuki 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 年間の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鞘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、SD系雌ラットに MNU でイニシエーション処置した後、AA を 0.004%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。今年度は、昨年度の結果より、AA のエポキシドであるグリシドアミド (GA) への代謝に関与する CYP2E1 の阻害作用、あるいは AA, GA の排泄に関与する第 II 相酵素の誘導作用をもつ天然物質、あるいは神経毒性及び精巣毒性に対する抑制作用が確認されている天然抗酸化物質を中心に AA の発がん性に対する抑制物質の検索を行なった。

B. 研究方法

SD 系雌ラット 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 週間後より各群に AA を 0.004% の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 α -lipoic acid (LA) を 0.15% (5 週目より 0.1%) , 18 β -glycyrrhetic acid (GA) を 0.1% , indole-3-carbinol (I3C) を 0.1% あるいは disulfiram (DSF) を 0.15% (2 週目より 0.1% , 5 週目より 0.075%) の用量で粉末基礎飼料 (CRF-1) に混じて 21 週間投与した。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)。実験期間中は週一回の頻度で、体重、摂餌量、摂水量及び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 \times よこ \times 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測定し、肝臓、腎臓及び甲状腺については摘出後 (甲状腺は固定後) に重量を測定した。その他、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 (腫瘤) 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、16 週目に I3C 群の 1 例が乳腺腫瘍からの出血とそれに伴う高度貧血、一般状態の悪化により切迫屠殺された。対照群を含むその他の群では切迫/死亡例はみられなかった。体重については、LA 及び DSF 群で実験開始 1 週目以降実験期間を通して、I3C 群で 4~15 週において対照群に比べ有意に ($p < 0.05, 0.01$) 低値を示した。体重増加抑制の状況から、DSF 群については実験開始 2 週目から投与濃度を 0.15 から 0.1% に、5 週目から 0.1 から更に 0.075% に、LA 群については実験開始 5 週目から投与濃度を 0.15 から 0.1% に変更した。その結果、回復するまでには至らなかったものの体重差が更に広がることはなかった。最終体重においては対照群と比べ LA 及び DSF 群で有意な ($p < 0.01$) 低値を示した。特に、DSF 群の最終体重は対照群に比べ著しく低く、約 50% の増加抑制であった。GA 及び I3C 群では有意な差はみられなかった (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 の平均摂取量についても 4.9 ~ 6.3 mg/kg 体重/day の範囲で、群間の明らかな違いはみられなかった (Table 2)。摂餌量については対照群に比べ DSF 群で低値傾向を示したが、他の群で明らかな差はみられなかった。