

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（総合）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

食品の安全性において問題となっているアクリルアミド(AA)について、その遺伝毒性メカニズムと、その対抗する有効な抑制手段を見ることを目的とし、ヒト細胞、ヒト代謝系を基礎とする *in vitro* 遺伝毒性試験を実施した。AA の *in vitro* での遺伝毒性は弱く、染色体レベルの大きな欠失などを引き起こす、いわゆる *clastogen* の性質を持つものと考えられた。一方、AA の主たる代謝物であるグリシダミド(GA)はAA より低濃度で強い細胞毒性、および高い遺伝毒性誘発率を示し、主として塩基対置換などの点突然変異を誘発することがわかった。AA が CYP2E1 によって代謝され、その毒性を発現すると考えられているが、ラット S9、ヒト S9、ヒトマイクロゾーム画分の添加によってその毒性は増強されなかった。また、CYP2E1 を発現する細胞でもその増強作用は認められなかった。これらのことから、AA の代謝様式と、それを利用した毒性抑制についてはさらなる検討が必要と考えられた。食物繊維による AA の毒性抑制作用も検討したが、その効果は無かった。

A. 研究目的

アクリルアミド (AA) 1950 年代より工業生産されている。重合によりゲル状のポリアクリルアミドとなることから、この性質を利用して水処理凝集剤、土壌凝固剤、粘着テープの材料、モルタル剤などに用いられてきた。日常の生活において工業製品としての AA を暴露する可能性は極めて低く、その生産や使用に携わる労働者に関しては皮膚からの吸収や、吸気によって慢性的に暴露する可能性がある。発がん性、遺伝毒性を含む生体影響に関しては

EC/USEPA のワークショップで論議されてきており、遺伝毒性のワークグループは 1994 年に AA の遺伝毒性に関するレビューを行っている

これまでの知見によると、AA はバクテリア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。特に、染色体異常誘発性、DNA 損傷性が明らかであることから AA は染色体異常誘発物質(*Clastogen*)と考えられている。特筆すべき点としては、優性致死試験結果をはじめ、

生殖細胞に対する染色体異常誘発性が示されていることである。一方、IARCでの発がん性の評価では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。

2002年の3月にスウェーデンの研究者より、一部の食品の高温調理によりAAが自然発生することが報告され、工業労働者だけでなく一般消費者までが日常的にAAに暴露されている可能性が指摘された。これを受け、現在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ことを目的とする。具体的には以下の点を中心に研究を行った。

- ・ヒトリンパ芽球細胞株を用いて、AAとその代謝物であるグリシダミド(GA)について、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た。
- ・AAおよびGAによって誘発される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を明らかにした。
- ・ラットおよびヒトS9を試験系に加えたり、薬物代謝酵素を発現する細胞などを用いたりして、AAの生体内での代謝機構と、遺伝毒性発現の関連性を明らかにした。
- ・食物繊維の添加によるAAの*in vitro*遺伝毒性抑制効果を検討した。

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。

2) 外的薬物代謝試験系

薬物代謝の影響を検討するため活性値の異なる2種類のラット肝臓由来S9、および2種類のヒト肝臓由来S9、およびヒト肝臓由来マイクロゾーム画分を用いた。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) 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シジェニック細胞、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、mEpoxide 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。

4) 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。

5) 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 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。AA は濃度依存的に細胞毒性を示し、14 mM (1 mg/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 11.2 mM 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。

また、AA、GA の DNA 損傷性をコメット試験によって検討した。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 0.5 mM の低濃度から損傷性が認められ、用量依存的に増加した。

2) AA、GA によって誘発される遺伝子突然変異の特徴

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。SG 変異体のすべては LOH 型変異を示すことが知られている。AA は全てのタイプの突然変異を誘発するが、特にヘミ型 LOH を顕著に誘発することがわかった。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。

3) 薬物代謝による影響 (I)

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。In vitro 遺伝毒性試験系について、2つのラット肝臓由来 S9 (induced rat S9 および、normal rat S9) と、ヒト肝臓由来 S9 (HLS-059 および、pooled S9) を加え試験を行った。このうち、rat induced S9 と、ヒト HLS-059 は薬物代謝活性が高い薬剤誘導型 S9 である。遺伝子突然変異、小核誘発、コメットとも S9 の添加により遺伝毒性の増強が観察されたが、S9 間の

効果性に関しては、はっきりとした結論は得られなかった。

さらに、ヒト HLS-059 から調整されたマイクロゾーム画分を用いて試験を行った。これは、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添加による顕著な差は認められなかった。

4) 薬物代謝による影響(II)

ヒトリンパ球細胞株 AHH-1 は 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。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。

5) 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。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。

D. 考察

AA は TK6 細胞において用量依存的に遺伝子突然変異と、小核の誘発を示したことから、*in vitro* において明らかに遺伝毒性を有する。TK6 細胞における突然変異頻度を 2 倍増加させる濃度は 800ug/ml と計算され、これは強変異原物質である MNNG の 2 万倍、MMS の 800 倍に相当する。また、遺伝毒性試験は通常 5000ug/ml もしくは 10mM の低い方を最高濃度に行っているが、この場合 AA の最高試験の濃度は 710ug/ml (10mM) となるが、この濃度までの突然変異、小核誘発率遺伝毒性は低い。異常のことを考慮すると、AA による遺伝毒性の程度は極めて弱いものと判断される。

AA の代謝物と考えられる GA も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。

TK 変異体の遺伝子解析の結果、AA は点突然変異よりもむしろ、染色体レベルの大きな欠失などを主とする遺伝的変化を引き起こすことが予想された。このことは、従来 AA がエームス陰性であるにもかかわらず、強い染色体異常誘発性を持

つことを説明するものである。AAの示した変異スペクトルは、放射線によって引き起こされる突然変異のそれとよく似ていたことから、AAは放射線のようにDNAの2本鎖切断を誘発するのかもしれない。DNA2本鎖切断による細胞死や修復にはp53遺伝子が関与しており、p53の低レベルの発現は、その後を大きなDNA損傷に有利に働くことが知られている（適応応答）。このことが証明されれば、低レベルのAAや、他の弱い変異原物質の暴露が、その後のAAによる遺伝毒性の誘発に大して抑制的に働くかもしれない。

一方、GAによって引き起こされる突然変異の特徴はAAと全く異なるものであった。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。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、AAはS9存在下、マイクロゾーム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Manjanath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、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。

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。

E. 結論

- ・ヒト培養細胞に対して AA は明らかに遺伝

毒性を示すが、その程度は低い。一方、AA の代謝物である GA は AA より 8 倍程度高い細胞毒性、遺伝毒性を示す。

- ・AA は DNA に直接作用せず、LOH 等の染色体異常を引き起こす Clastogen であるが、GA は塩基対置換などの点突然変異を主として引き起こす Mutagen である。

- ・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が重要である。

- ・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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Moore, M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellow, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myher, B., O'Donovan, M., Oliver, J., Omori, T., Oudelhkim, M., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, F. Thakur, A., Wakuri, S., and Yoshimura, I. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: International workgroup report-Plymoth, UK 2002. *Mutat. Res.*, 540, 127-140 (2003)

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)

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)

Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu de S, Zhang LS, Suzuki T, Hayashi M, Honma M., Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res.*, 557, 1-6. (2004)

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

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)

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.*, 603, 151-158 (2006)

2. 学会発表

M. Honma, T. Kato, F. Yatagai, M. Hayashi

Characterization of the genomic instability in mismatch repair deficient human lymphoblastoid cell lines. The Environmental Mutagen Society 34th 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・ラジャグル、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)

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)

薬 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)

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., Kinai 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

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（総合）研究報告書（平成15-17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：15年度はアクリルアミド(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、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による抑制効果に関する検討を行い、16年度も引き続いて、そのメカニズム解析のために、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。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0.2% α -lipoic acid (ALA)、1.0% α -tocopherol (TP)、0.1% 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) の0.05%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の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年度には更に、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、食物繊維等の併用投与による毒性抑制作用の有無を検討した。実験は同モデルを用いて、2.5% sodium alginate, 5% glucomannan, 5% fibersol, 2.5% chitin, 1% chlorophyllinの混餌によるACRとの併用投与を行った。その結果、何れのものでも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、この実験条件下では生じていないと判断された。17年度は、部分的にでも有効であった抗酸化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。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。解析の結果、ALAとの併用投与では、PEITC、TPいずれ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な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代謝あるいは酸化ストレス関連酵素の発現検索の発現検索により, 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

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 0.02% 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 0.2%, TP は 1.0%, DAS は 0.1%, PEITC は 0.05% 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 μm 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 $< 3 \mu\text{m}$) 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。

神経系における代謝あるいは酸化ストレス関連酵素の発現検索として、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 の免疫染色による局在、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% Glucosamin, 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)。

B- 3. 抗酸化物質の併用投与実験 (実験 3)

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投与実験を行った。即ち、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 (Fig. 3)。

(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 (実験開始 2 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、あるいは低値傾向が認められ、3 週目では ACR+TP 以外で有意な低値を示し、4 週目では ACR 全群で低値を示した (Fig. 4)。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 (実験開始 3 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. 5)。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. 5)。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-1 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. 6)。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. 7)。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. 7)。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。

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. 8)。他の併用群では染色性に明らかな変動を認めなかった。GPX は ACR 群で、小脳歯状核ニューロン、橋・延髄に分布するニューロンで強く陽性を示したが、抗酸化物質の併用により、陽性像が減弱した (例外は、ALA 併用例での小脳歯状核)。

NSGP はアストロサイトに陽性を示し、ACR 単独群で、大脳皮質、海馬、小脳皮質顆粒細胞層で発現増強を示したが、抗酸化物質の併用によるそれらの発現変動は殆どなく、TP 併用群顆粒細胞層で増強を示したのみであった。その他の酸化ストレス関連蛋白質 (HO-1, Cu/Zn SOD, EC SOD, thioredoxin, Mn SOD, iNOS) についても発現検索を行った結果、ACR 投与により有意差のある変動は認められなかった。

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、肝臓と精巣での酸化ストレス関連蛋白質の発現を検討した (Fig. 9, Table 7, 8)。HO-1 は肝臓、精巣で構成的に発現を示し、ACR 投与群間では、肝臓において ALA 併用で up-regulation, DAS 併用で down-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。Cu/Zn SOD は、肝臓、精巣とも、いずれの投与によっても強い発現変動を示さなかった。GCS は肝臓で TP, DAS, PEITC 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有意な変動が散見されるも、弱い変動であった。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、投与群間で明らかな発現変動はなく、精巣においては、ACR 投与各群で発現は減少したものの、化学物質の併用による変動は認めなかった。精巣においても CAT は構成的発現を示したが、DAS や 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若干の発

現減少を示した。TRX は肝臓において無処置群で構成的発現を示し、TP, PEITC 群では対照群と比較して発現レベルが減少した。同様に ACR 投与によっても発現が減少したものの、TP, DAS, PEITC のそれぞれの併用により発現は増加した。TRX は精巣では発現は検出限界以下であった。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。ACR との併用群では ACR 群に比し、ALA, TP 併用例で若干の増加を認め、PEITC 併用例では強い減少を示した。

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 9)。実験期間中の体重の推移として (Fig. 10)、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 10)。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 11)。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 11)。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 12)。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 $3\mu\text{m}$ 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 13)。

C- 3. 抗酸化物質の併用投与実験 (実験 3)

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. 11)。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 14)。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 15)。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 16)。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 17)。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 17)。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 SYP 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 17)。

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、これらの抑制に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。

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glycidamide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。

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。一方、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。中枢神経での検索により、これらの抑制に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。

精巣毒性は、ALAとPEITCで著効を示したが、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。

消化管内でのACRの吸着作用を期待して食物繊維やクロロフィリンなどの併用投与を行ったが、いずれの物質でもACR誘発神経障害および精巣障害を抑制できなかった。

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

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

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. 韓国食品衛生学会シンポジウム, 2003年, 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

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

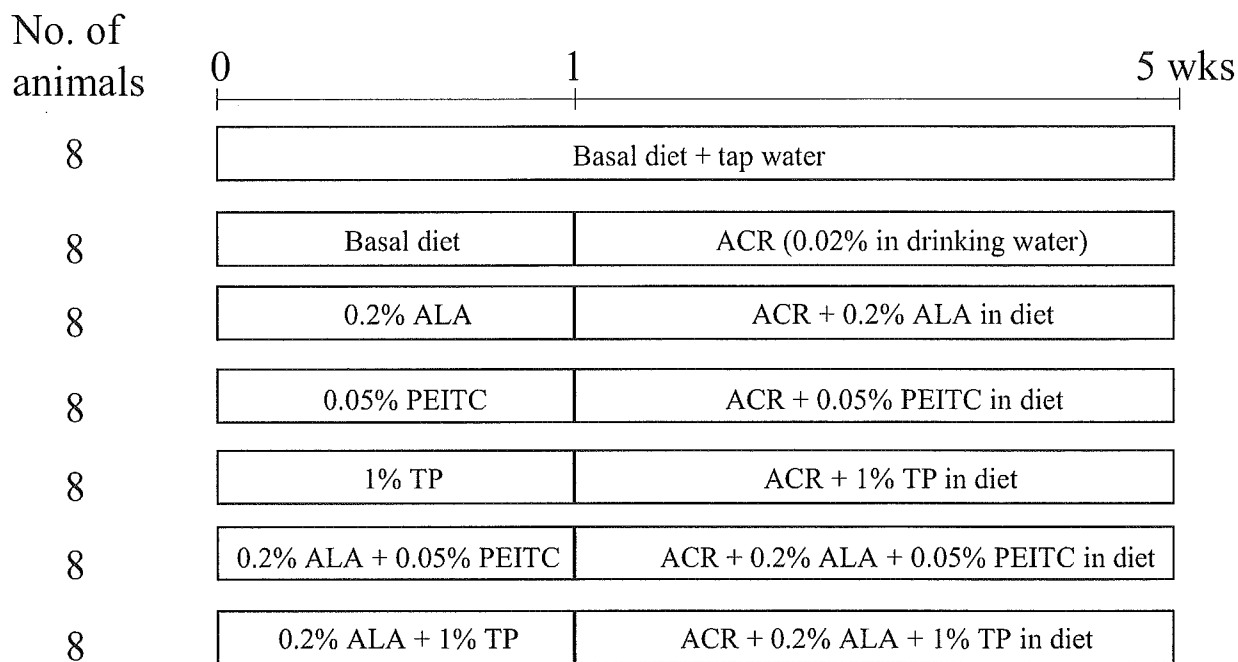
特になし。

No. of animals	0	1	5 wks
10	Control (Basal diet)		
5	ALA 0.2% in diet		
5	TP 1% in diet		
5	DAS 0.1% in diet		
5	PEITC 0.05% in diet		
10	Basal diet	ACR 0.02% in drinking water	
10	ALA	ACR + ALA	
10	TP	ACR + TP	
10	DAS	ACR + DAS	
10	PEITC	ACR + PEITC	

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

No. of animals	0	1	5 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).



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

Fig. 3.
Experimental design for the study of combined effect of anti-oxidative agents on the protection of ACR-induced toxicity (Experiment 3).