

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

Treatment	Water consumption (ml/animal/day)			
	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
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

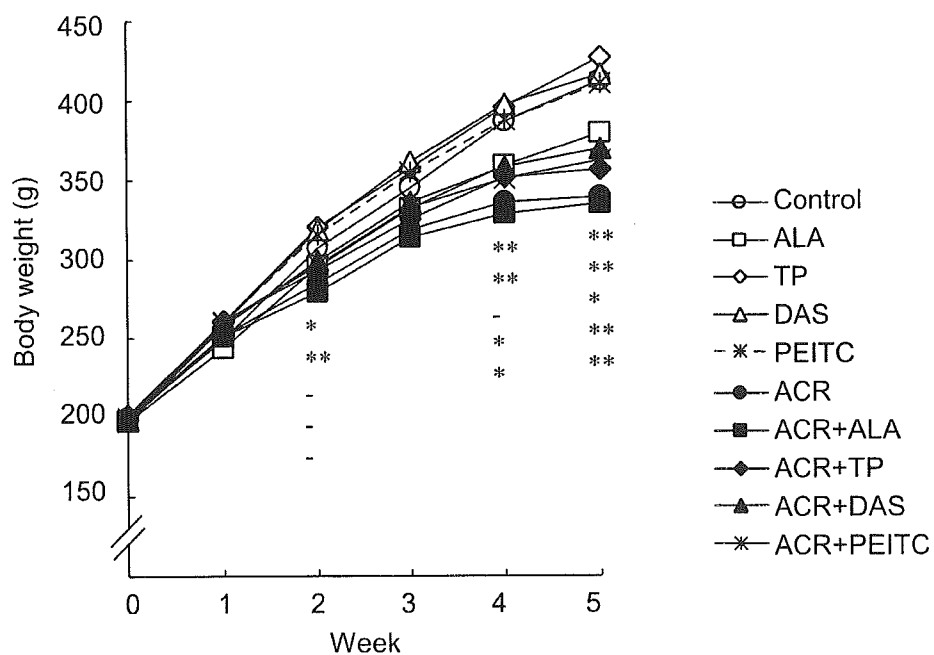


Fig. 4.
Body weight changes during the experiment (Experiment 1).

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 2	Week 3	Week 4	Week 5
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.

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

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).

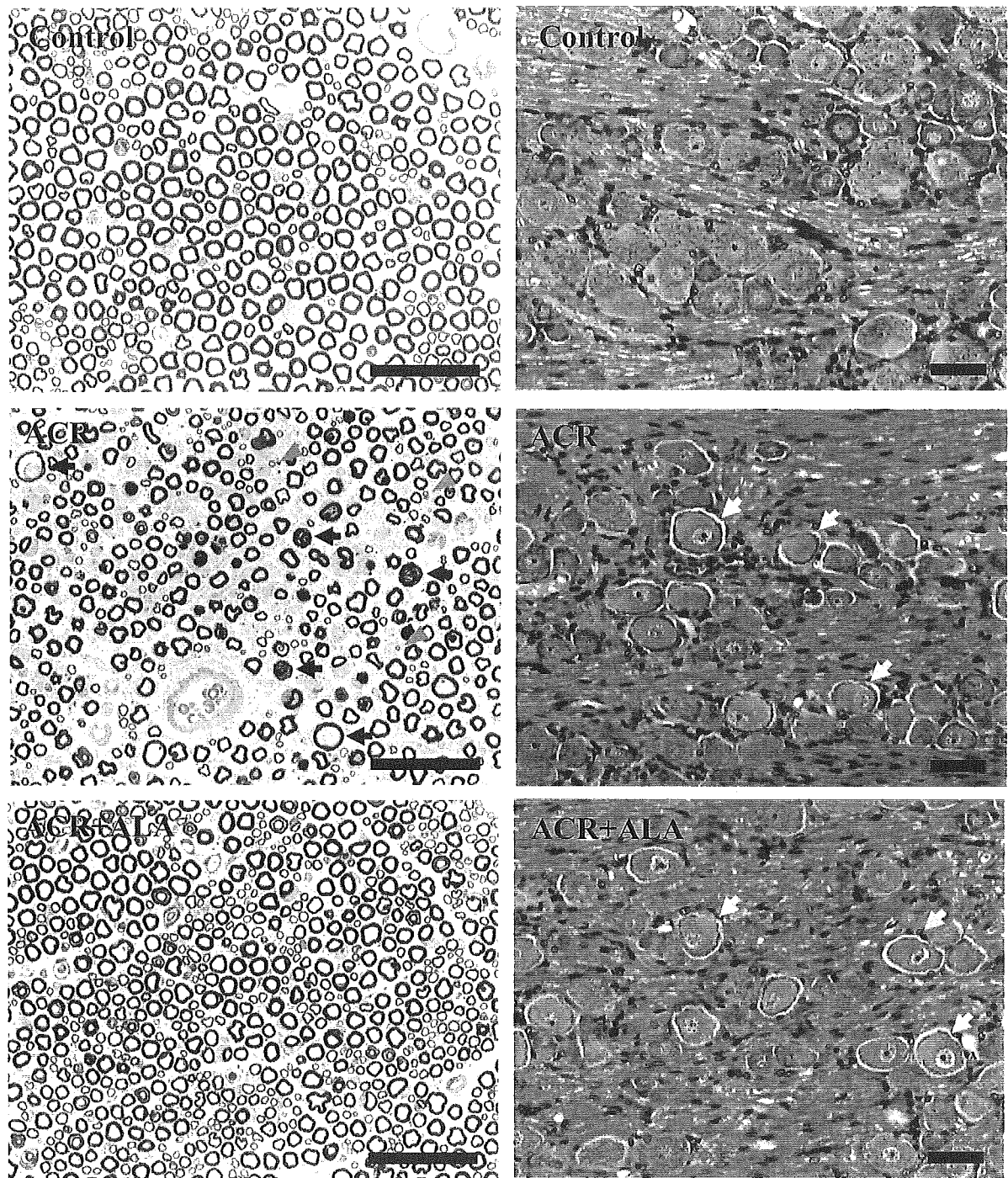
Table 5.
Data for morphometry of the lesions developed in the nervous and gonadal systems (Experiment 1).

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 (/ μm corte	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 [#]

^aMean \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 μ m以下の軸索 Bar=50 μ m ◀ : 中心性色質融解 Bar=50 μ m

Fig. 5. Histopathological changes in the sciatic and trigeminal nerves (Experiment 1).

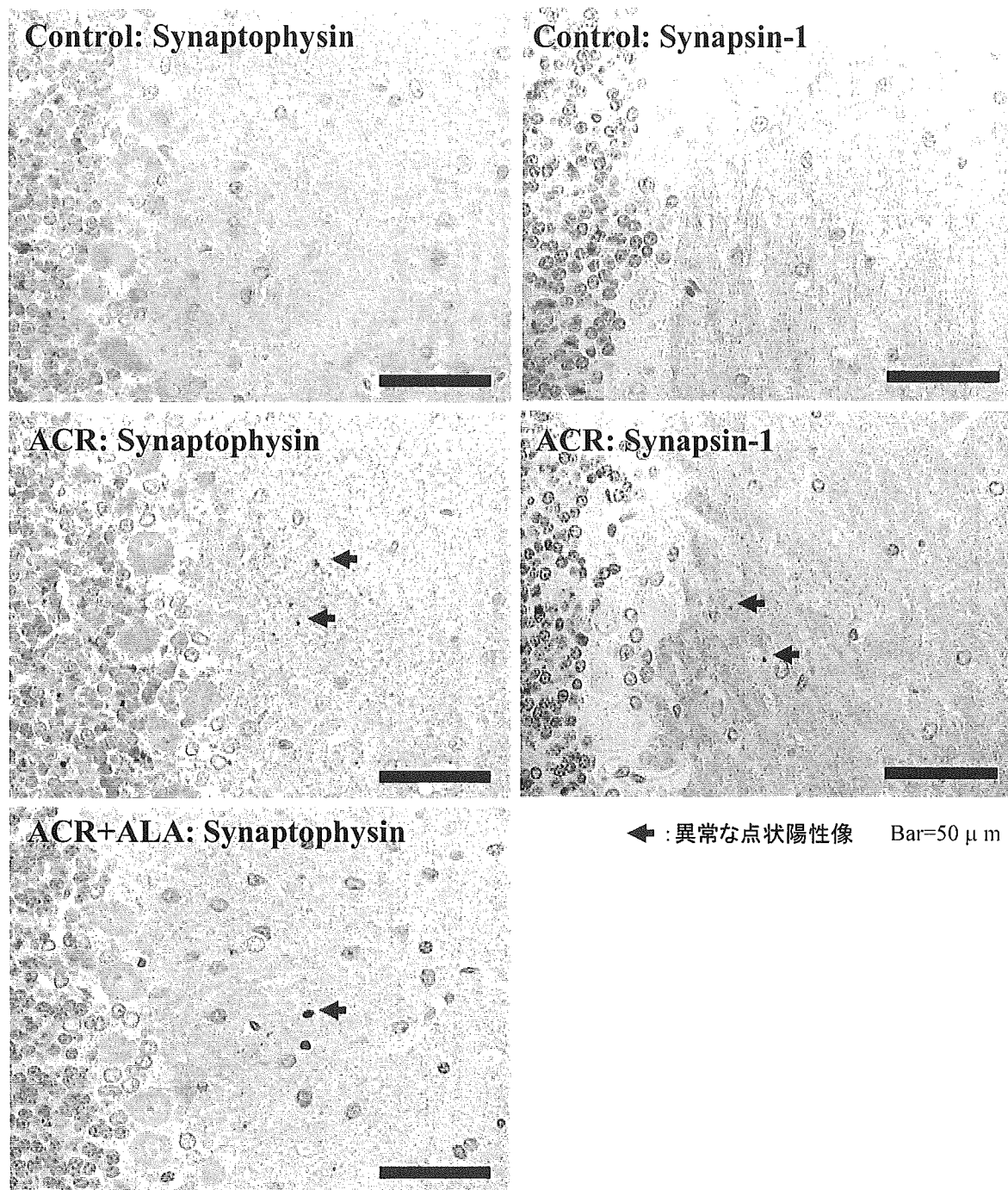
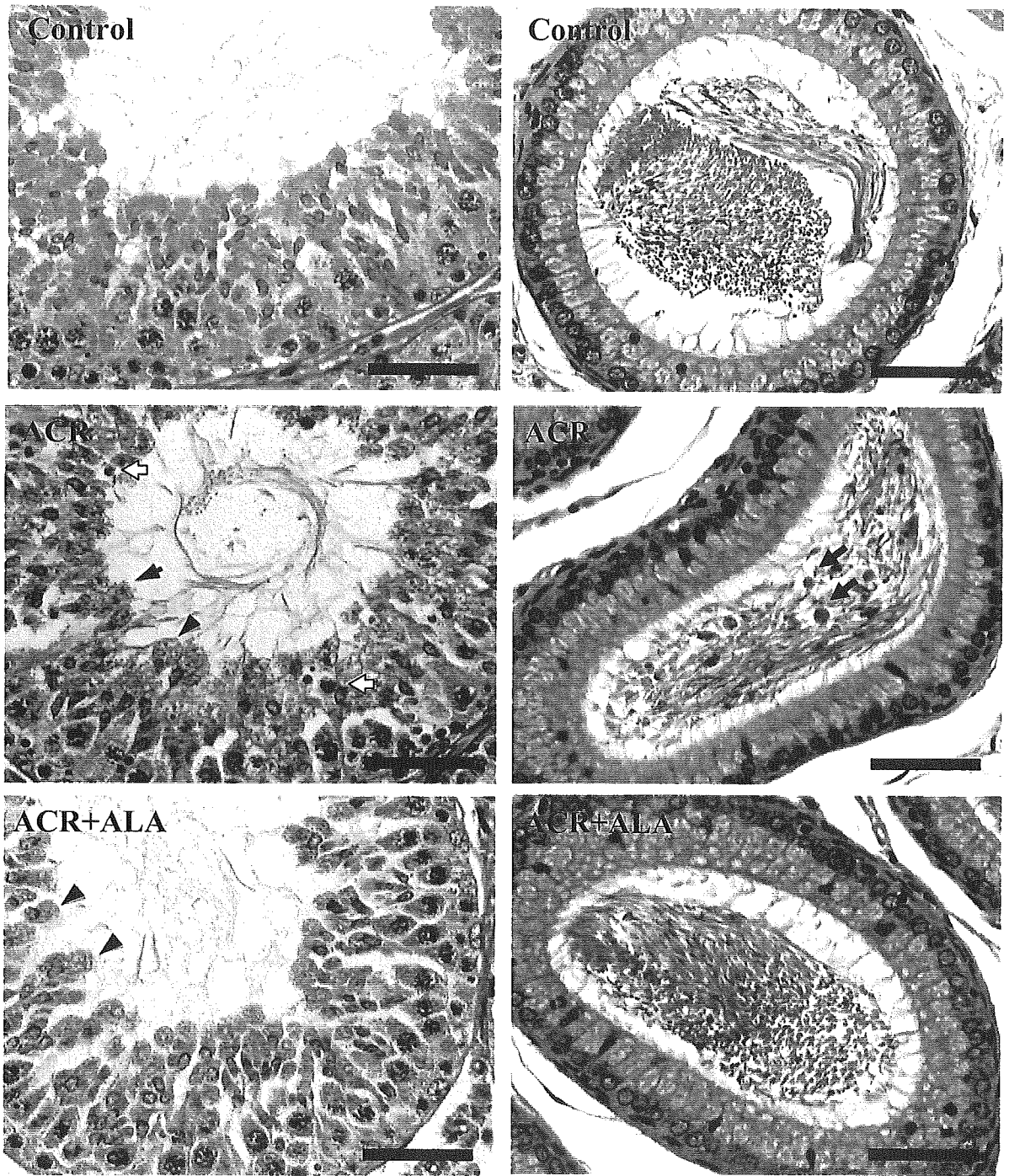


Fig. 6.
Immunoreactivity of synaptophysin and synapsin-1 in the cerebellar molecular layer (Experiment 1).



◁: 脱落した精母細胞 ◀: 精母細胞の変性 ◀: 脱落した細胞残屑 Bar=50 μm

Fig. 7. Histopathological changes in the male gonadal system (Experiment 1).

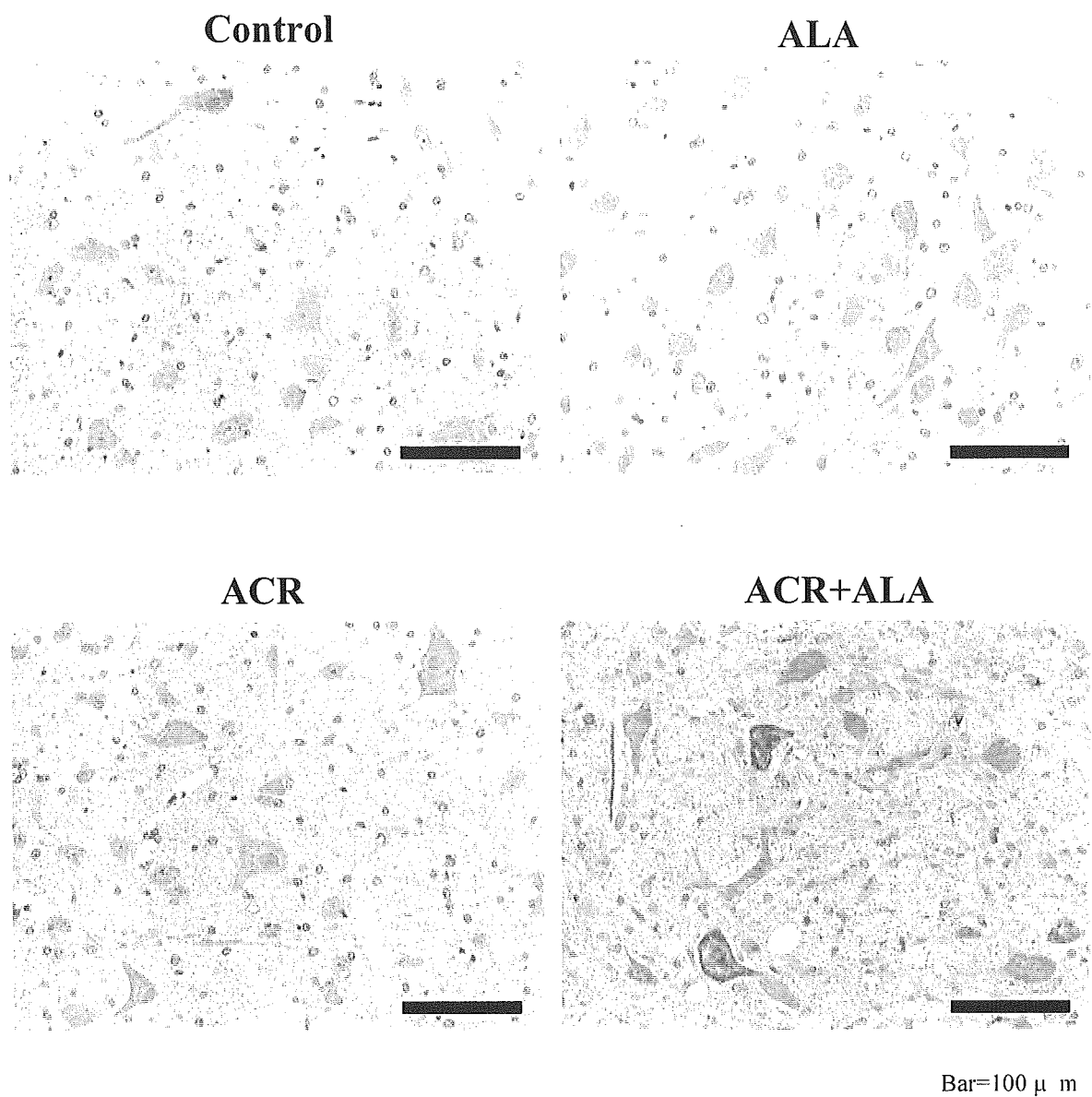


Fig. 8.
Immunohistochemical staining of γ -glutamylcysteine synthetase in the pontine tegmentum (Experiment 1).

Table 6.
Summary of immunohistochemical staining results regarding antioxidant systems in rats treated with ACR in combination with antioxidants.

	Control	ACR	ACR+ALA	ACR+TP	ACR+DAS	ACR+PEITC
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5
Catalase						
Cerebrum (-/±/+)						
Neuron (cytoplasm)	5(5/0/0)	5(3/2/0)	5(2/3/0) [†]	5(5/0/0) [§]	5(5/0/0)	5(1/1/3) [†]
Cerebellum (-/±/+/++)						
Neuron ^b (cytoplasm)	5(2/3/0/0)	5(1/4/0/0)	5(0/0/0/5) ^{**##,§§}	5(0/0/2/3) ^{**##}	5(0/3/2/0)	5(0/1/1/3) ^{*##,§}
Pons, medulla oblongata (-/±/+)						
Neuron (cytoplasm)	5(1/4/0)	5(3/1/1)	5(4/0/1)	5(2/0/3)	5(1/2/2)	5(1/1/3)
Trigeminal nerve (-/±/+)						
Neuron (cytoplasm)	5(5/0/0)	5(5/0/0)	5(3/2/0)	5(4/1/0)	5(1/2/2) ^{*#}	5(1/2/2) ^{*#}
Gamma Glutamylcysteine Synthetase (GCS)						
Cerebrum (-/+)						
Neuron (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm), oligodendrocyte (nucleus)	5(3/2)	5(3/2)	5(2/3)	5(3/2)	5(3/2)	5(2/3)
Cerebellum (±/+/++)						
Neuron ^b (cytoplasm)	5(0/5/0)	5(0/5/0)	5(0/1/4) ^{*#§}	5(1/4/0)	5(2/3/0)	5(2/3/0)
Pons, medulla oblongata (-/+)						
Neuron (cytoplasm, nucleus)	5(0/5)	5(1/4)	5(0/5)	5(0/5)	5(1/4)	5(1/4)
Trigeminal nerve (-/+)						
Neuron (cytoplasm, nucleus)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	4(0/4)	5(0/5)
Glutathione peroxidase (GPX)						
Cerebrum ; cortex (-/±/+/++)						
Neuron (membrane)	5(0/0/3/2)	5(1/0/0/4)	5(0/0/1/4) [§]	5(0/0/4/1)	5(0/0/2/3)	5(0/1/3/1)
Cerebrum ; basal ganglion (±/+/++)						
Neuron (cytoplasm)	5(0/4/1)	5(1/0/4)	5(0/1/4)	5(0/2/3)	5(2/3/0)	5(3/2/0) ^{*#§}
Cerebellum ; dentate nucleus (±/+/+/+/++)						
Neuron (cytoplasm, membrane)	5(0/5/0/0)	5(0/0/3/2) ^{**}	5(0/1/2/3) ^{*§}	5(2/2/1/0) [#]	5(0/3/2/0) [#]	5(2/3/0/0) ^{##}
Pons (-/±/+/+/+/++)						
Neuron (cytoplasm)	5(0/0/5/0/0)	4(0/0/0/1/3) ^{**}	4(0/2/1/1/0) [#]	4(1/3/1/0/0) ^{*#§}	3(0/2/1/0/0) ^{*#}	5(1/4/0/0/0) ^{**##,§}
Medulla oblongata (-/±/+/+/+/++)						
Neuron (cytoplasm)	5(0/5/0/0/0)	5(0/2/2/1/0)	5(0/1/0/3/1)	5(0/2/2/1/0)	5(4/1/0/0/0)	5(1/3/1/0/0)
Trigeminal nerve (-/±/+/++)						
Neuron (cytoplasm)	5(0/5/0/0)	5(2/3/0/0)	5(4/0/1/0)	4(1/0/1/2)	5(2/1/2/0)	4(2/1/1/0)
Neuron (nucleus)	5(0/5/0/0)	5(2/3/0/0)	5(5/0/0/0) ^{**##,§}	4(4/0/0/0) ^{**§}	5(2/0/2/1)	4(0/3/1/0)
Non-selenium glutathione peroxidase (NSGP)						
Cerebrum ; cortex (-/±/+/++)						
astrocyte (cytoplasm, nucleus)	5(5/0/0/0)	5(0/0/4/1) ^{**}	5(0/1/2/2) ^{**§§}	5(0/2/2/1) ^{**§§}	5(0/2/1/2) ^{**§§}	5(0/1/3/1) ^{**§§}
Cerebrum ; basal ganglion (±/+/++)						
astrocyte (nucleus)	5(5/0/0)	5(2/2/1)	5(0/2/3) ^{**§§}	5(0/2/3) ^{**§§}	5(0/2/3) ^{**§§}	5(1/2/2) ^{*§}
Cerebrum ; hippocampus (±/+/++)						
astrocyte (cytoplasm, nucleus)	3(3/0/0/0)	4(0/0/4/0) [†]	5(1/1/2/1) [§]	5(0/2/3/0) ^{§§}	4(0/2/2/0) ^{§§}	5(0/2/3/0) ^{*§§}
Cerebellum ; granular layer (±/+/+/+/++)						
astrocyte (nucleus)	5(3/2/0)	5(0/5/0) [†]	5(1/2/2)	5(0/2/3) ^{*#§}	5(1/3/1)	5(2/2/1)
Cerebellum ; white matter (±/+/+/+/++)						
astrocyte (cytoplasm, nucleus)	5(1/4/0)	5(0/5/0)	5(1/1/3)	5(0/3/2)	5(1/4/0)	5(1/4/0)
Cerebellum ; dentate nucleus (±/+/+/+/++)						
astrocyte (cytoplasm, nucleus)	5(1/4/0)	5(0/3/2)	5(1/1/3)	5(0/3/2)	3(0/3/0)	5(0/3/2)
Pons (-/±/+/+/+/++)						
astrocyte (cytoplasm, nucleus)	5(1/4/0)	5(0/4/1)	5(0/3/2)	5(0/3/2)	5(1/4/0)	5(0/3/2)
Medulla oblongata (+/+/++)						
astrocyte (cytoplasm, nucleus)	5(0/5/0)	5(0/3/2)	5(0/1/4) ^{*§}	5(0/4/1) [§]	5(3/2/0) [#]	5(1/3/1)
Trigeminal nerve (±/+/++)						
satellite cell (cytoplasm, nucleus)	5(3/2/0)	5(2/2/1)	5(3/1/1)	4(0/3/1) [§]	4(2/2/0)	4(0/1/3) ^{**§§}

[†]Grade of change: ±. minimal: +. slight: ++. moderate: +++. severe.

^bPositive in Purkinje cells and dentate nucleus neurons.

[†]Positive in Purkinje cells.

[†]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 ([§] $p < 0.05$, ^{§§} $p < 0.01$).

Table 6, continued.

	Control	ACR	ACR+ALA	ACR+TP	ACR+DAS	ACR+PEITC
No. of animals examined	5	5	5	5	5	5
Heme Oxygenase (HO)-1						
Cerebrum (-±/+/+/+/+)						
Neuron (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm), oligodendrocyte (nucleus)	5(0/0/3/2/0)	5(0/1/0/4/0)	5(1/1/1/2/0)	5(1/0/3/1/0)	5(0/1/2/2/0)	5(0/0/2/1/2)
Cerebellum (±/+/+/+/+)						
Neuron ^c (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm), oligodendrocyte (nucleus)	5(0/2/1/2)	5(1/1/2/1)	5(0/1/1/3)	5(0/2/3/0)	5(1/3/1/0)	5(0/1/2/2)
Pons, medulla oblongata (-/+)						
Neuron (cytoplasm)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)
Trigeminal nerve (-/+)						
Neuron (cytoplasm)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)
Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD)						
Cerebrum (-/+)						
Neuron (cytoplasm, nucleus), white matter	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)
Cerebellum (±/+/+/+/+)						
Neuron ^b (cytoplasm)	5(0/2/2/1)	5(0/2/1/2)	5(1/2/1/1)	5(0/1/2/2)	5(0/2/3/0)	5(0/0/3/2)
Pons, medulla oblongata (-/+)						
Neuron (cytoplasm, nucleus)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)
Trigeminal nerve (-/+)						
Neuron (cytoplasm, nucleus)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)
EC SOD						
Cerebrum (-/+/+)						
Neuron (cytoplasm)	5(1/0/4)	5(2/1/2)	5(1/2/2)	5(1/3/1)	5(2/0/3)	5(0/4/1)
Cerebellum (+/+/+/+/+)						
Neuron (cytoplasm)	5(1/2/2)	5(3/2/0)	5(2/3/0)	5(1/3/1)	5(3/2/0)	5(2/3/0)
Pons, medulla oblongata (-/+/+)						
Neuron (cytoplasm)	5(0/4/1)	5(0/4/1)	5(0/5/0)	5(0/5/0)	5(0/5/0)	5(0/5/0)
Trigeminal nerve (-/+)						
Neuron (cytoplasm)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)
Thioredoxin						
Cerebrum (-±/+)						
Neuron (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm), oligodendrocyte (nucleus)	3(0/0/3)	4(0/2/2)	4(1/1/2)	2(0/1/1)	2(0/0/2)	2(0/1/1)
Cerebellum (±/+)						
Neuron ^b (cytoplasm)	3(0/3)	4(0/4)	4(1/3)	2(0/2)	2(0/2)	2(0/2)
Pons, medulla oblongata (+/+/+)						
Neuron (cytoplasm)	3(2/1)	4(3/1)	4(4/0)	2(2/0)	2(2/0)	2(1/1)
Trigeminal nerve (-/+)						
Neuron (cytoplasm)	3(0/3)	3(0/3)	4(0/4)	2(0/2)	2(0/2)	2(0/2)
Mn SOD						
Cerebrum (-/+/+)						
Neuron (cytoplasm), astrocyte (cytoplasm), oligodendrocyte (nucleus)	2(2/0)	2(2/0)	4(3/1)	5(4/1)	5(3/2)	5(4/1)
Cerebellum (+/+/+/+/+)						
Neuron ^b (cytoplasm)	2(2/0)	2(2/0)	4(2/2)	5(5/0)	5(4/1)	5(3/2)
Pons, medulla oblongata (-/+)						
Neuron (cytoplasm)	2(0/2)	2(0/2)	4(1/3)	5(0/5)	5(0/5)	5(0/5)
Trigeminal nerve (-/+)						
Neuron (cytoplasm)	2(0/2)	2(0/2)	4(1/3)	5(1/4)	5(0/5)	5(0/5)
iNOS/NOS						
Cerebrum (-/+)						
Neuron (cytoplasm)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)
Cerebellum (-/+)						
Neuron ^d (cytoplasm)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)
Pons, medulla oblongata (-/+)						
Neuron (cytoplasm)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)
Trigeminal nerve (-/+)						
Neuron (cytoplasm)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)

^aGrade of change: ±, minimal; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

^bPositive in Purkinje cells and dentate nucleus neurons.

^cPositive in Purkinje cells.

^dPositive 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).

^{SS}Significantly different from the corresponding chemical-alone group (^{*}*p*<0.05, ^{SS}*p*<0.01).

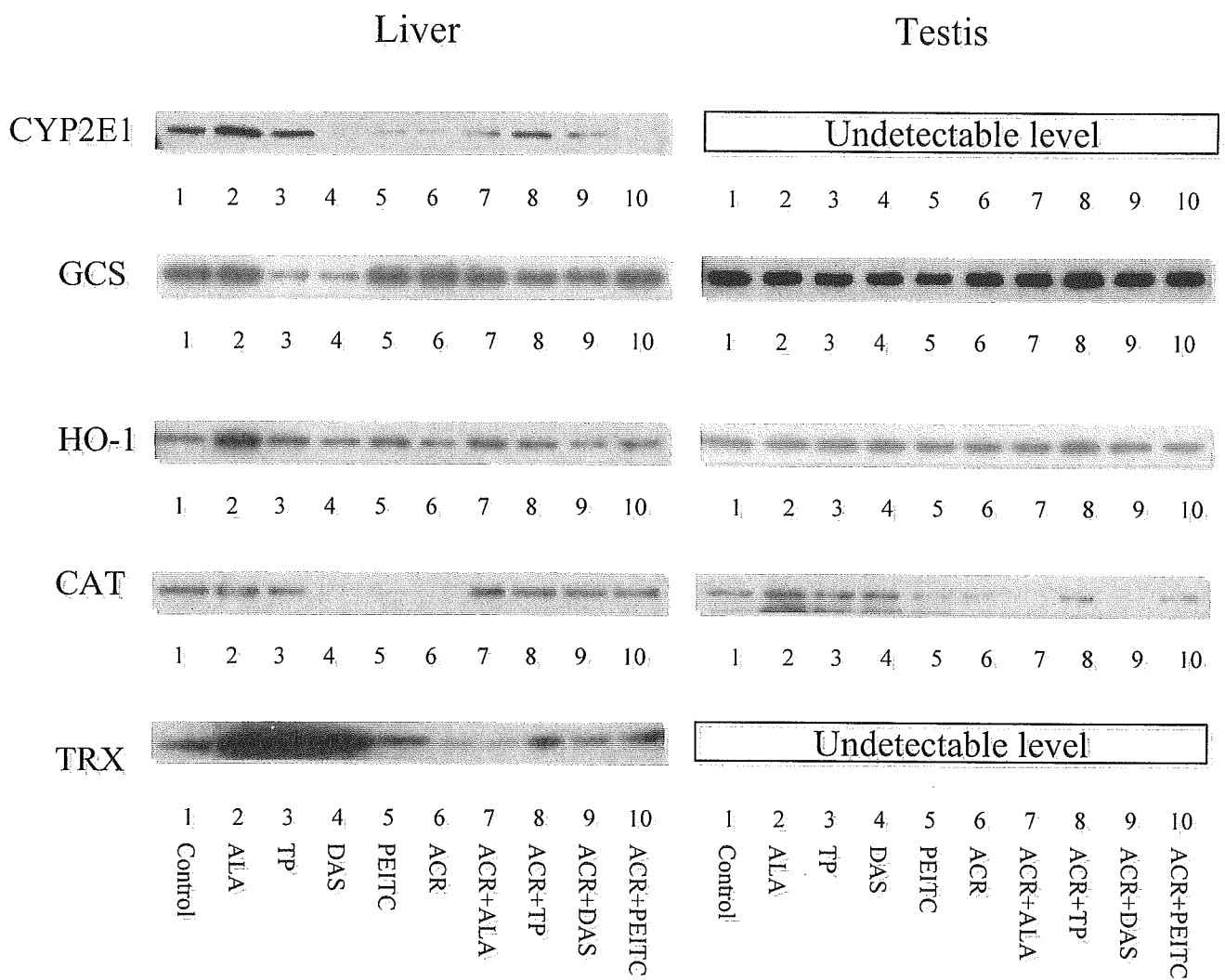


Fig. 9.
Western blot analysis of oxidative stress-related molecules in the liver and testis (Experiment 1).

Table 7.
Western blotting data of oxidative stress-related molecules
in the liver (Experiment 1).

		HO-1	Cu/Zn SOD	GCS	CAT	TRX	CYP2E1
No. of animals examined		3	3	3	3	3	3
Group	Treatment						
1	Control	1.00 ± 0.80	1.00 ± 0.28	1.00 ± 0.54	1.00 ± 0.67	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.42
2	ALA	1.58 ± 0.31 ^a	0.96 ± 0.77 ^a	1.08 ± 0.64 ^a	0.66 ± 0.38	0.85 ± 0.83	2.05 ± 1.69
3	TP	1.14 ± 0.98	1.44 ± 0.19	0.64 ± 0.43	1.21 ± 1.30	0.36 ± 0.16	1.05 ± 0.23
4	DAS	0.52 ± 0.41	1.50 ± 0.44	0.55 ± 0.41	0.90 ± 1.44	0.55 ± 0.22	0.16 ± 0.23 [*]
5	PEITC	0.94 ± 0.83	1.58 ± 0.07	0.55 ± 0.18	0.79 ± 1.30	0.36 ± 0.15	0.25 ± 0.31 [*]
6	ACR	0.45 ± 0.35	0.96 ± 0.23	0.61 ± 0.11	0.62 ± 1.18	0.49 ± 0.27	0.20 ± 0.27 [*]
7	ACR+ALA	1.00 ± 0.89	1.02 ± 0.20	0.70 ± 0.09	0.97 ± 0.72	0.72 ± 0.14	0.43 ± 0.53
8	ACR+TP	0.60 ± 0.48	0.93 ± 0.33	0.80 ± 0.28	0.97 ± 0.83	1.22 ± 0.53	0.43 ± 0.21 [§]
9	ACR+DAS	0.22 ± 0.33 [*]	0.94 ± 0.25	0.99 ± 0.73	0.95 ± 1.22	1.81 ± 1.53	0.29 ± 0.07 [*]
10	ACR+PEITC	0.44 ± 0.45	1.07 ± 0.26	0.95 ± 0.38	0.86 ± 1.01	1.43 ± 0.81	0.03 ± 0.04 [*]

Table 8.
Western blotting data of oxidative stress-related molecules
in the testis (Experiment 1).

		HO-1	Cu/Zn SOD	GCS	CAT
No. of animals examined		3	3	3	3
Group	Treatment				
1	Control	1.00 ± 0.64	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.84
2	ALA	0.96 ± 1.08	1.48 ± 0.41	0.94 ± 0.12	1.49 ± 0.92
3	TP	0.96 ± 1.15	1.39 ± 0.38	0.75 ± 0.12 [*]	1.12 ± 0.75
4	DAS	0.92 ± 1.22	1.23 ± 0.49	0.62 ± 0.24	0.32 ± 0.66
5	PEITC	0.85 ± 1.01	1.14 ± 0.47	0.63 ± 0.14 [*]	0.49 ± 0.78
6	ACR	0.95 ± 0.74	0.91 ± 0.41	0.83 ± 0.09	0.45 ± 0.62
7	ACR+ALA	1.00 ± 0.72	0.79 ± 0.40	0.84 ± 0.15	0.43 ± 0.67 [§]
8	ACR+TP	1.03 ± 1.02	0.74 ± 0.21	0.93 ± 0.33	0.78 ± 1.01
9	ACR+DAS	0.92 ± 0.70	0.72 ± 0.32	0.94 ± 0.14	0.66 ± 1.68
10	ACR+PEITC	0.81 ± 0.41	0.66 ± 0.20	1.00 ± 0.01 ^{#,§}	0.68 ± 0.89

Note. Mean±S.D.

^an=2

^{*}Significantly different from the untreated controls ($p < 0.05$ by Student's t-test).

[§]Significantly different from the ACR alone group ($p < 0.05$ by Student's t-test).

[#]Significantly different from the corresponding chemical-alone group ($p < 0.05$ by Student's t-test).

Table 9.
Time course of water consumption in ACR-treated groups
(Experiment 2).

Treatment	Water consumption (ml/animal/day)			
	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
ACR	30.8 ± 1.6 ^a	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+Glucomannan	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

^aMean ± SD.

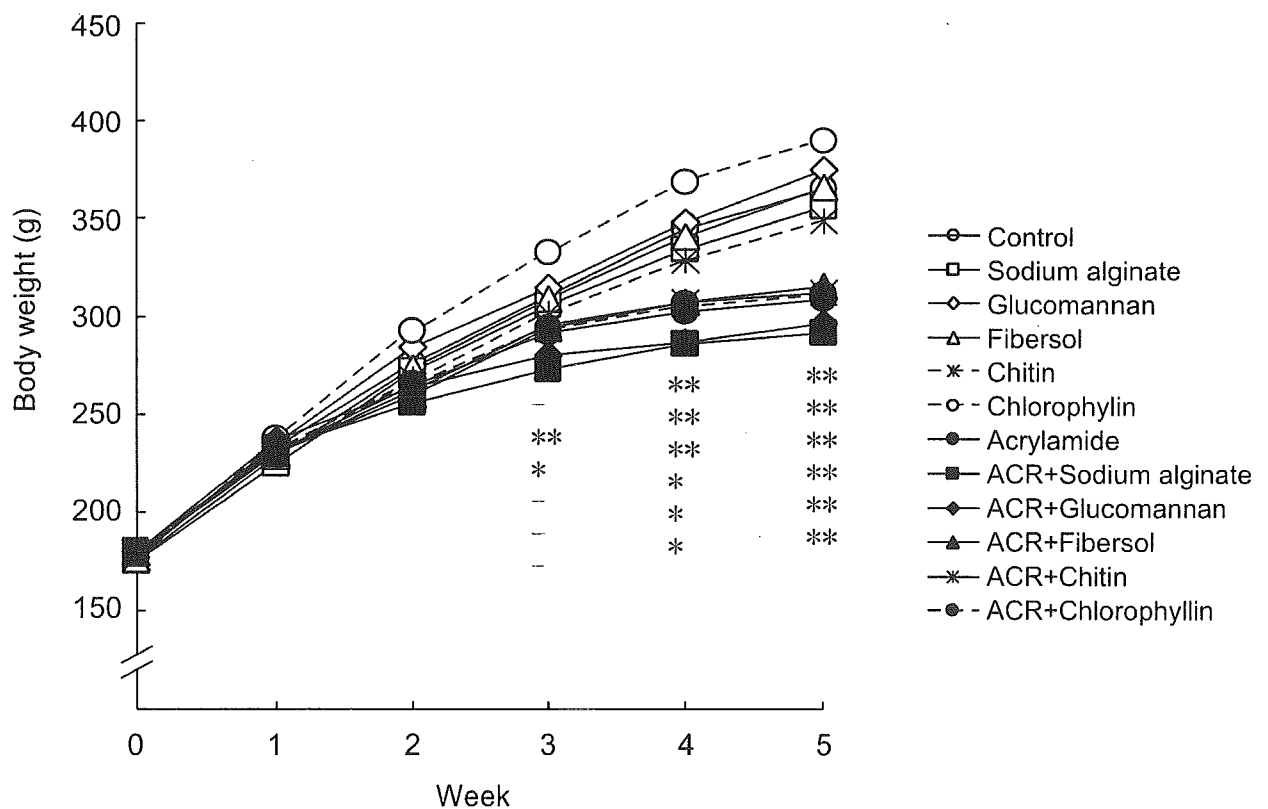


Fig. 10.
Body weight changes during the experiment (Experiment 2).

Table 10.
Time course of gait score changes (Experiment 2).

	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	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+Glucosaminan	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

^aThe 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 11.
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 ^a	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
Glucosaminan	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+Glucosaminan	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

^aMean ± SD. ***,**Significantly different from the untreated controls (*p<0.05, **p<0.01)

Table 12. Data for histopathological grading of the lesions developed in the peripheral nerves and gonads (Experiment 2).

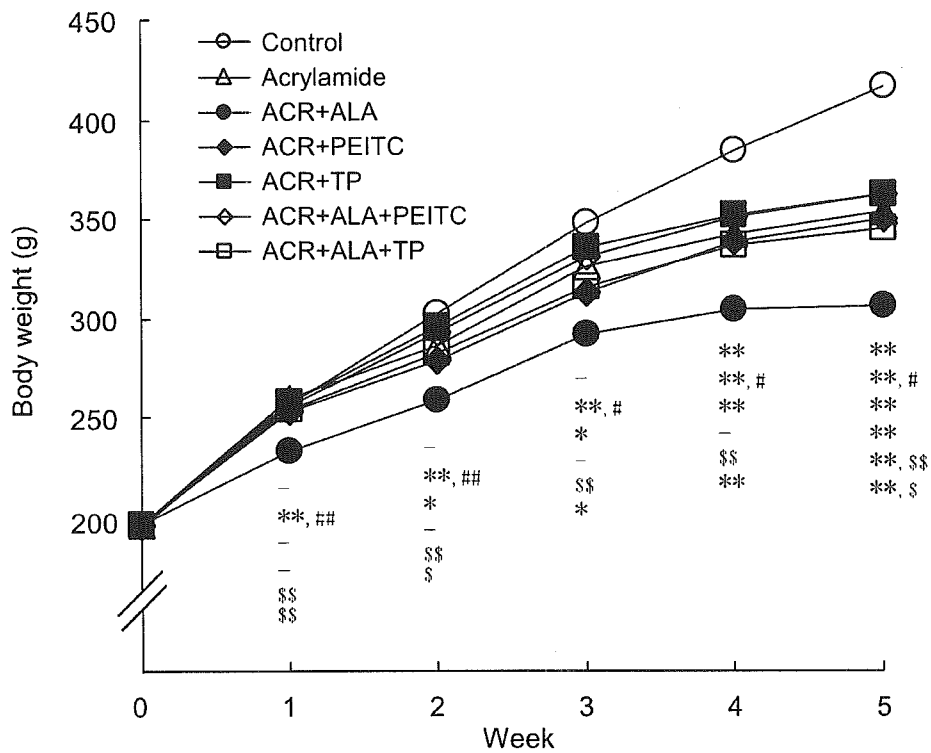
Organ/histopathological change	Control	ACR	ACR +Sodium alginate	ACR +GM	ACR +Fibersol	ACR +Chitin	ACR +Chlorophyllin
No. of animals examined	10	10	10	10	10	10	10
Sciatic nerve (distal portion)							
Axonal degeneration (\pm /+/+/+++)	10 ^a (10/0/0/0)	10(0/1/4/5)**	10(0/1/3/6)**	10(0/1/4/5)**	10(0/0/4/6)**	10(0/0/6/4)**	10(0/1/4/5)**
Trigeminal nerve							
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)**
Testis							
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)**
Epididymis							
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)**

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

Table 13. 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 +Chlorophyllin
No. of animals examined	10	10	10	10	10	10	10
Sciatic nerve (distal portion)							
Density (/100 μ m ²)	1.7 \pm 0.2 ^a	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 μ 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 **
Testis							
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
Cerebellar cortex, molecular layer							
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 **

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



*** 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).
 s.\$\$ Significantly different from the ACR+ALA group (§p<0.05, §§p<0.01).

Fig. 11.
Body weight changes during the experiment (Experiment 3).

Table 14.
Time course of water consumption in ACR-treated groups
(Experiment 3).

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 15.
Time course of change in gait scores for ACR-treated rats with
and without antioxidants (Experiment 3).

No. of animals examined	No. of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3/grade 4) ^a			
	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
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 axia, 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 16.

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

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**. ^{ss}	3.95 ± 0.28	0.86 ± 0.09 ^{ss}	0.25 ± 0.02
7	ACR+ALA+TP	8	24.6 ± 2.4 ^s	30.5 ± 5.4	340.8 ± 36.4**	3.93 ± 0.35	0.93 ± 0.07*. ^{ss}	0.24 ± 0.03 ^s

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).

^{s,ss}Significantly different from the ACR+ALA group (^sp<0.05, ^{ss}p<0.01).

Table 17.

Effects of combined treatment of antioxidants on ACR-induced histopathological changes in nervous and male gonadal systems - Data for histopathological grading and morphometry (Experiment 3).

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 ^{*,##,s}	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 ^{##,j}
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).

^{s,ss}Significantly different from the ACR+ALA group (^sp<0.05, ^{ss}p<0.01).

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

^{j, j}Significantly different from the ACR+TP group (^jp<0.05, ^jp<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）

平成15年度～17年度 分担（総合）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。15年度は具体的な抑制物質のスクリーニングに先立ち、AAのラットにおける発がん標的臓器である乳腺及び甲状腺に対し、その発がん性を比較的短期間で検出できるモデルの確立を試みた。即ち、SD系雌ラットに乳腺及び甲状腺をはじめ種々の臓器に標的性を示す *N*-methyl-*N*-nitrosurea (MNU) でイニシエーションした後、AAを40及び20ppm濃度で30週間飲水投与した。その結果、AAの40ppm投与により乳癌の発生頻度が有意に ($p < 0.05$) 増加し、発生数は増加傾向を示したが、甲状腺発がんに対するAAの影響は認められなかった。従って、AAの発がん性に対する抑制物質のスクリーニングを行う場合、SD系雌ラットにMNU投与後、AAを40ppm濃度で飲水投与する乳腺発がんモデルが適していると考えられた。16, 17年度は、MNU-AAラット乳腺発がんモデルを用いて、抗酸化作用のある 1-*O*-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ), α -tocopherol 及び α -lipoic acid (LA), 抗酸化及びCYP2E1阻害作用のある 18 β -glycyrrhetic acid (GRA), 抗酸化及び第II相酵素誘導作用のある indole-3-carbinol (I3C), CYP2E1阻害, 第II相酵素誘導作用のある phenethyl isothiocyanate (PEITC), disulfiram (DSF) あるいはAAの吸着作用を期待した chlorophyllin の効果を検討した。その結果、LA, GRA, I3C 及び PEITC のAA乳腺発がんに対する抑制効果が示された。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, AA の発がん性を比較的短期間で検出できるモデルを確立した後, そのモデルを用いて具体的な発がん抑制物質をスクリーニングすることにより, 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。実際には, 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作用を検索した。

B. 研究方法

(1) AA の発がん性を比較的短期間で検出できるモデルの確立

[DMBA-DHPN モデル] SD 系雌ラット 60 匹に甲状腺発癌物質である *N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) を 2800mg/kg 体重の用量で単回皮下投与した 1 週間後に乳腺発癌物質である 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) を 50mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与した。その後ラットを 3 群に分け, AA を 40, 20 及び 0 (対照) ppm 濃度で 22 週間飲水投与した。AA の投与量は, 報告されている 2 年間の発がん性試験において乳腺及び甲状腺に発がん性がみられた用量にもとづいて設定した (Johnson et al., 1986; Friedman et al., 1995)。AA 投与期間中は週 1 回, 体重及び摂水

量を測定し, さらに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, 剖検した。剥皮後, 皮下結節/腫瘍を詳細に観察し, 甲状腺, 肝臓については摘出後重量を測定した。さらに腎臓, 肺, 食道, 膀胱についても摘出し, 病理組織学的検索を行った。

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

(2) AA によるラット乳腺発がんに対する抑制物質のスクリーニング (その 1)

SD 系雌ラット 100 匹に, 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 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抗酸化作用のある 1-*o*-hexyl-2,3,5-trimethyl-hydroquinone (HTHQ) を 0.5% (18 週目より 0.25%) あるいは α -tocopherol (Tocopherol) を 1%, CYP2E1 阻害, 第 II 相酵素誘導作用のある phenethyl isothiocyanate (PEITC) を 0.05% あるいは AA の吸着作用を期待した chlorophyllin, sodium copper salt (Chlorophyllin) を 1% の濃度で粉

末基礎飼料(CRF-1)に混じて 39 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。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その大きさを測定した。投与期間終了後は、エーテル深麻酔下にて動物を放血屠殺した。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。

(3) AA によるラット乳腺発がんに対する抑制物質のスクリーニング (その 2)

SD 系雌ラット 100 匹に、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 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抗酸化作用のある α -lipoic acid (LA) を 0.15% (5 週目より 0.1%)、抗酸化及び CYP2E1 阻害作用のある 18 β -glycyrrhetic acid (GRA) を 0.1%、抗酸化及び第 II 相酵素誘導作用のある indole-3-carbinol (I3C) を 0.1% あるいは CYP2E1 阻害、第 II 相酵素誘導作用のある disulfiram (DSF) を 0.15% (2 週目より 0.1%、5 週目より 0.075%) の濃度で粉末基礎飼料(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。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その大きさを測定した。投与期間終了後は、エーテル深麻酔下にて動物を放血屠殺した。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] 死亡率については Cochran Armitage の傾向検定を、体重及び乳腺腫瘍の発生数、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)

動物実験に際し、化学物質の投与は混餌、飲水による経口投与が主体であり、動物の屠殺は全てエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により行って苦痛を最小限に留めるなど、動物愛護に十分配慮した。動物の飼育、管理に当たっては、研究所の利用規定に従った。

C. 研究結果

(1) AA の発がん性を比較的短期間で検出できるモデルの確立

[DMBA-DHPN モデル] 生存率および体重において AA 投与による有意な変化は認められなかった。摂水量より算出した AA の 40 及び 20ppm 群における AA 摂取量は、各々 5.62 及び 3.31mg/kg 体重/day であった。AA の 40 及び 20ppm 群において各々 20 例中 3 及び 1 例の途中死亡/切迫屠殺例がみられたが、主な原因は乳腺腫瘍の大型化に伴う出血及び貧血、一般状態の悪化であった。触診による乳腺腫瘍の経時的観察において、その発生頻度、数及び体積の推移に AA 投与による著明な変化は認められなかった。剖検時の肝臓及び甲状腺重量にも AA 投与による影響はみられなかった。乳腺腫瘍の組織学的検索において、対照群の 19 例中 16 例 (84%) に 5.11 ± 4.37 個/ラットの腺癌の発生