

がみられたが、その頻度及び数に対する AA 投与の影響は認められなかった。肝臓の肝細胞癌が AA20ppm 群の 20 例中 2 例に、腎臓の腎芽腫が 20ppm 群及び対照群の各々 20 例中 1 例に、悪性リンパ腫が 40ppm 群及び対照群の各々 20 例中 1 例にみられた。甲状腺、肺、食道及び膀胱においては、対照群を含む各群に腫瘍を含む増殖性病変は認められなかった。

[MNU モデル] 途中死亡/切迫屠殺が AA40ppm 群の 20 例中 4 例及び対照群の 20 例中 1 例にみられた。40ppm 群における 4 例中 1 例については、下肢麻痺による一般状態の悪化のため切迫屠殺した。40ppm 群における 4 例中 3 例及び対照群の 1 例の途中死亡/切迫屠殺の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。体重については、40ppm 群において対照群と比し軽微な増加抑制傾向がみられた。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 4.95 及び 2.28mg/kg 体重/day であった。触診による乳腺腫瘍の経時的観察では、AA の 40、20ppm 群及び対照群において各々 AA 投与開始 6、8 及び 12 週後に腫瘍の発生がみられた。その発生頻度及び数について 40 及び 20ppm 群において増加傾向がみられ、体積については AA 投与による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 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 20 例中 10 例 (50%) に 1.00 ± 1.34 個/ラットの腺癌の発生がみられ、40ppm 群では 20 例中 16 例 (80%) と有意に ($p < 0.05$) 発生頻度が増加し、発生数についても 2.10 ± 2.53 個/ラットと増加傾向を示した。20ppm 群では発生頻度及び数において各々 20 例中 13 例 (65%) 及び 1.75 ± 1.97 個/ラットと増加傾向を示したが統計学的に有意な差ではなかった。腎臓における腎芽腫、膀胱における乳頭腫、肺における肺胞上皮過形成、前胃における単純性/乳頭状過

形成など種々の臓器に腫瘍を含む増殖性病変がみられたが AA 投与による影響は認められず、甲状腺ではいずれの群にも腫瘍を含む増殖性病変は認められなかった。

(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)

死亡率に関しては対照群で 20 例中 5 例、HTHQ 群で 2 例、Tocopherol 群で 3 例、PEITC 群で 4 例、Chlorophyllin 群で 1 例の途中死亡/切迫屠殺がみられたが、主な死因は乳腺腫瘍からの出血とそれに伴う貧血、一般状態の悪化であった。体重については、HTHQ 群で実験開始 5 週目以降有意な ($p < 0.05$ または 0.01) 増加抑制が認められたことから実験開始 18 週目から投与濃度を 0.5 から 0.25% に変更した。その結果、回復傾向を示して 22 週目より投与終了時まで統計学的有意差は消失した。最終体重においては対照群と比べ Tocopherol 群で有意な増加を示した。摂水量に関しては AA 投与期間を通して群間の差はみられず、AA の摂取量はいずれの群においても平均 5 mg/kg 体重/day 程度であった。摂餌量については Tocopherol 群で対照群に比べ増加したが、他の群では明らかな変化は認められなかった。各群における被験物質の平均摂取量は HTHQ-194.9, Tocopherol-624.6, PEITC-28.5, Chlorophyllin -567.5 mg/kg 体重/day であった。臓器重量については PEITC, Chlorophyllin 群において対照群と比べて肝臓の実重量または相対重量が有意に ($p < 0.05, 0.01$) 減少した。また PEITC 群の甲状腺実重量が有意に ($p < 0.05$) 増加した。

触診による乳腺腫瘍の経時的観察において、PEITC 群における発生頻度及び数が 12-15 週目以降実験期間を通して低く、16 週目には有意な ($p < 0.05$) 低値を示した。HTHQ 群についても 12-16 週目以降実験期間を通して発生頻度および数が低下傾向を示したが、統計学的有意差

はみられなかった。その他の群については発生頻度、数及び体積の推移に明らかな変化は認められなかった。病理組織学的検索においては、対照群を含む各群で20例中13-17例(65-85%)に乳腺腫瘍の発生が認められ、その頻度に明らかな群間の差は認められなかった。発生数については対照群の 1.5 ± 1.3 個/ラットに対し、Tocopherol 群では 2.4 ± 1.6 個/ラットで有意な ($p < 0.05$) 増加がみられた。また体積については対照群の $11.1 \pm 21.4 \text{ cm}^3/\text{個}$ に対し、PEITC 群では $2.6 \pm 4.7 \text{ cm}^3/\text{個}$ と有意に ($p < 0.05$) 減少した。その他の群については発生数及び体積に明らかな変化は認められなかった。

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

(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)

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を更に0.075%に、LA 群については実験開始5週目から0.15を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。GRA 及び I3C 群では有意な差はみられなかった。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 $4.9-6.3 \text{ mg/kg 体重/day}$ の範囲で、群間の明らかな違いはみられなかった。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。各群における被験物質の平均摂取量は LA-67.9, GRA-69.0, I3C-63.2, DSF-46.6 mg/kg 体重/day であった。臓器重量については対照群と比べて GRA 群における甲状腺の実重量が有意に ($p < 0.05$) 減少したが、相対重量では有意な差はみられなかった。また DSF 群の肝臓及び腎臓の実重量が有意に ($p < 0.01$) 減少し、肝臓及び甲状腺の相対重量が有意に ($p < 0.01$) 増加した。

触診による乳腺腫瘍の経時的観察において、発生頻度及び数が対照群に比べ LA, GRA 及び I3C 群で14あるいは15週目から低値傾向を示し始め、LA 群では18週目以降の発生数、GRA 群では15, 20 及び 21 週目の発生頻度及び19週目以降の発生数、I3C 群では20週目以降の発生数が有意な ($p < 0.05$) 低値を示した。DSF 群では発生頻度は12週目以降、発生数は14週目以降から低値傾向を示し始め、発生頻度は14週目以降、発生数は15週目以降から有意な ($p < 0.05-0.001$) 低値を示した。体積の推移については群間の有意な差はみられなかった。病理組織学的検索により、乳腺腫瘍は全て腺癌と診断された。腺癌の発生頻度は対照群の20例中18例(90%)に比べ、LA, GRA 及び I3C 群ではそれぞれ18例(90%), 13例(65%)及び15例(75%)で明らかな差はみられなかったが、DSF 群では8例(40%)であり有意な ($p < 0.01$) 低値を示した。腺癌の発生数は対照群の 3.5 ± 3.0 個/ラット

に対し、GRA 群では 1.8 ± 1.9 、I3C 群では 1.7 ± 1.5 及び DSF 群では 0.8 ± 1.3 個/ラットで有意な ($p < 0.05$, 0.01) 減少がみられた。体積については群間の明らかな差はみられなかった。

その他の臓器の増殖性病変として DSF 群で肺の肺胞上皮過形成及び前胃の扁平上皮過形成の発生率が対照群に比べ有意に ($p < 0.01$, 0.001) 増加した。その他の臓器に関しても各群で種々の増殖性病変がみられたが、それらの発生頻度に群間の明らかな差はみられなかった。

D. 考察

AA の発がん性に対する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。まず、SD 系雌ラットに DMBA 及び DHPN による処置を行った後、AA を 40 及び 20ppm 濃度で 22 週間飲水投与したが、乳腺に対する発がん促進作用は認められなかった。また、甲状腺においては、対照群を含むいずれの群でも増殖性病変は認められなかった。次に、MNU による処置を行った後、AA を 40 及び 20ppm 濃度で 30 週間飲水投与した。その結果、40ppm 投与により乳癌の発生頻度の有意な ($p < 0.05$) 増加が認められ、発生数については、統計学的有意差はなかったものの明らかな増加がみられた。甲状腺における増殖性病変は対照群を含むいずれの群にも認められなかった。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早期発がんモデルが適していると考えられた。今回実施した AA の発がん性早期検出モデルの作製においては、乳腺あるいは甲状腺に対して標的性を示す化学発癌物質によりラットを処置した後、食品中に含まれる AA を投与した際の発がん促進作用を検討した。文献的

には、今回の検討と同様に化学発癌物質による処置後、加熱した魚肉食品中に最も多く含まれる変異原/発がん物質であるヘテロサイクリックアミン (HCA) をラットに投与した際の発がん促進作用について種々の報告がみられる。肝発癌物質である diethylnitrosamine による処置後、HCA の一つである 2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-*f*] quinoxaline (MeIQx) を混餌投与した際に肝前癌病変である glutathione *S*-transferase placental form 陽性細胞巢の数及び面積が著明に増加 (Fujita et al., 2002)、大腸発癌物質である 1,2-dimethylhydrazine による処置後、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) を混餌投与した際に大腸腫瘍の発生数が著明に増加する (Hirose et al., 1999) などの報告がみられる。一方、前投与する発癌物質の種類、あるいは標的臓器により HCA による発がん促進作用が異なることも報告されている (Imaida, et al., 2001; Shirai, et al., 2002)。今回検討した実験デザインにおいて、DMBA と MNU による前処置により AA の乳腺発がん促進作用に違いがみられるとともに、MNU 及び DHPN のいずれの甲状腺発がんモデルでも AA の作用はみられなかった。従って、AA についても HCA の場合と同様、前投与する発癌物質、あるいは標的臓器による特異性があることが示された。

AA による乳腺発がんに対する抑制物質のスクリーニング (その 1) では、MNU-AA 乳腺早期発がんモデルを用いて、実際に AA の発がん作用に対する抑制物質の検索を試みた。その結果、CYP2E1 阻害、第 II 相酵素誘導作用をもつ PEITC 群において、触診による乳腺腫瘍の経時的観察で、その発生頻度及び数が 12-15 週目以降実験期間を通して低値を示し、16 週目には有意な抑制が認められた。また病理組織学的検査で確認された乳腺腫瘍の体積が有意に減少した。以

上の結果から、PEITC は本モデルにおいて AA による乳腺腫瘍の発生、増殖に対し抑制作用を有する可能性が示された。抗酸化作用をもつ Tocopherol 群では摂餌量の増加に伴う有意な体重増加促進が認められ、病理組織学検査で確認された乳癌の発生数が有意に増加した。乳腺腫瘍の発生、増殖は、摂餌量あるいは体重増加の影響を受けることが報告されており (Thompson et al., 2004), Tocopherol 群における摂餌量及び体重の増加が腫瘍の発生数増加に関連しているものと考えられた。その他の群については触診及び病理組織学検査により確認された乳癌の発生頻度、発生数及び体積について明らかな変化は認められなかった。

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

PEITC の前胃に対する作用については、今後更なる検討を要する。また AA 吸着作用の期待された Chlorophyllin については肝臓の実、相対重量の有意な減少が認められたが病理組織学的検索において明らかな変化は認められず、その意義は不明であった。

AA による乳腺発がんに対する抑制物質のスクリーニング (その 2) では、(その 1) において PEITC の AA 乳腺発がんに対する抑制効果を示す結果が得られたことから、CYP2E1 阻害、第 II 相酵素誘導作用をもつ物質、あるいは AA の神経、精巣毒性に対する抑制作用を示した抗酸化物質を中心に検索した。その結果、抗酸化作用をもつ LA, 抗酸化及び CYP2E1 阻害作用をもつ GRA, 抗酸化及び第 II 相酵素誘導作用をもつ I3C の投与により、触診による乳腺腫瘍の経時的な観察で、その発生頻度及び発生数が 14 あるいは 15 週目以降で低値傾向あるいは有意な低値を示した。病理組織学的検査では GRA 及び I3C 群で腺癌の発生数の有意な減少がみられた。以上の結果から、LA, GRA, I3C は本モデルにおいて AA による乳腺発がんに対し抑制作用を有することが示された。DSF 群では発生頻度は 12 週目以降、発生数は 14 週目以降で低値傾向あるいは有意な低値を示し、病理組織学的には発生頻度及び発生数が有意に減少した。しかし、同群では摂餌量の低下を伴う著明な体重増加抑制がみられた。乳腺発がんに対して、摂餌量あるいは体重増加量は大きな影響を与えることが報告されており (Thompson et al., 2004), DSF による摂餌量の低下及び体重増加抑制が腫瘍の発生頻度及び発生数の減少に関与している可能性が否定できないと考えられた。

他臓器の病理組織学的検索において DSF 群で肺の肺胞上皮過形成及び前胃の扁平上皮過形成の発生頻度が対照群に比べ有意に増加した。DSF は *N*-nitrosodibutylamine との同時投

与により肺に腺癌及び扁平上皮癌を (Schweinsberg et al., 1982), 亜硝酸ナトリウムとの同時投与により前胃に基底細胞癌及び乳頭腫を (Lijinsky et al., 1980) 誘発することが報告されている。今回の実験でイニシエーターとして用いた MNU は肺及び前胃を含む諸臓器に発がん標的性を示すことが報告されており、プロモーション期に DSF を投与したことにより増殖性病変の発生が促進されたものと考えられた。DSF 群では肝臓及び甲状腺の相対重量が有意に増加し、肝臓における種々の代謝酵素の誘導の関連している可能性が考えられた。しかし、肝臓及び甲状腺において重量の変化に関連する病理組織学的変化はみられなかった。

E. 結論

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モデルとして、MNU を 50mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した後、AA を 40ppm 濃度にて飲水投与するラット乳腺早期発がんモデルを確立した。

本モデルを用いて、抗酸化作用のある HTHQ, Tocopherol 及び LA, 抗酸化及び CYP2E1 阻害作用のある GRA, 抗酸化及び第 II 相酵素誘導作用のある I3C, CYP2E1 阻害, 第 II 相酵素誘導作用のある PEITC 及び 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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takizawa T, Mitsumori K, Takagi H, Nasu M, Yasuhara K, Onodera H, Imai T, Hirose M. Sequential analysis of testicular lesions and serum hormone levels in rats treated with a *Psoralea Corylifolia* extract. Food Chem Toxicol, 42, 1-7 (2004)
- (2) Imai T, Onose J, Hasumura M, Ueda M, Takizawa T, Hirose M. Sequential analysis of development of invasive thyroid follicular cell carcinomas in inflamed capsular regions of rats treated with sulfadimethoxine after *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiation. Toxicol Pathol, 32, 229-236 (2004)
- (3) Takizawa T, Imai T, Onose J, Ueda M, Tamura T, Mitsumori K, Izumi K, Hirose M. Enhancement of hepatocarcinogenesis by kojic acid in rat two-stage models after initiation with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine or *N*-diethylnitrosamine. Toxicol. Sci., 81, 43-49 (2004)
- (4) Ueda M, Imai T, Takizawa T, Onodera H, Mitsumori K, Matsui T, Hirose M. Possible enhancing effects of atrazine on growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. Cancer Sci, 96, 19-25 (2005)
- (5) Imai T, Hasumura M, Onose J, Ueda M, Takizawa T, Cho YM, Hirose M. Development of invasive follicular cell carcinomas in a rat thyroid carcinogenesis model: biological impact of capsular inflammation and reduced cyclooxygenase-2. Cancer Sci, 96, 31-37 (2005)
- (6) Cho YM, Imai T, Hasumura M, Onose J, Ueda

- M, Hirose M. Lack of prepubertal administration of ethinyl estradiol on susceptibility to multiple organ carcinogenesis in rats exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine during adolescence. *Cancer Lett*, 223, 37-46 (2005)
- (7) Hasumura M, Imai T, Takizawa T, Ueda M, Hirose M. Promoting effect of *para*-aminobenzoic acid on development of thyroid tumors in rats initiated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol Sci*, 86, 61-67 (2005)
- (8) Imai T, Cho YM, Hasumura M, Hirose M. Enhancement by acrylamide of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat mammary tumor development - possible application for a model to detect co-modifiers of carcinogenesis. *Cancer Lett*, 230, 25-32 (2005)
- (9) Takizawa T, Imai T, Ueda M, Onodera H, Hirose M. Comparison of enhancing effects of different goitrogen treatments in combination with β -estradiol-3-benzoate for establishing a rat two-stage thyroid carcinogenesis model to detect modifying effects of estrogenic compounds. *Cancer Sci*, 97, 25-31 (2006)
- (10) Onose J, Imai T, Hasumura M, Cho YM, Hirose M. A new medium-term rat colon bioassay applying neoplastic lesions as endpoints from detection of carcinogenesis modifiers - validation with known modifiers. *Cancer Lett*, 232, 272-278 (2006)
- (11) Imai T, Onose J, Hasumura M, Takizawa T, Hirose M. Indomethacin induces small intestinal damage and inhibits amitrole-associated thyroid carcinogenesis in rats initiated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)-nitrosamine. *Toxicol Lett* (in press)
- (14) Cho YM, Onodera H, Ueda M, Imai T, Hirose M. A 13-week subchronic toxicity study of dietary administered morin in F344 rats. *Food Chem Toxicol* (in press)
2. 学会発表
- (1) 曹 永晩, 蓮村麻衣, 今井俊夫, 広瀬雅雄: ラット乳腺及び甲状腺化学発がんモデルにおける acrylamide の発がん促進作用. 第 63 回日本癌学会, 2004 年 9 月, 福岡
- (2) 蓮村麻衣, 今井俊夫, 曹 永晩, 太田世志雄, 高見成昭, 広瀬雅雄: アクリルアミドのラット乳腺発がん作用に対する抑制物質の検索. 第 64 回日本癌学会, 2005 年 9 月, 札幌.
- (3) 高見成昭, 今井俊夫, 蓮村麻衣, 曹 永晩, 広瀬雅雄: アクリルアミドのラット乳腺発がん作用に対する抗酸化及び第 II 相酵素誘導物質の抑制効果. 第 22 回日本毒性病理学会, 2006 年 1 月, 鹿児島.
- (4) Imai T, Takami S, Cho YM, Hasumura M, Hirose M: Inhibitory effects of antioxidants and phase II-enzyme inducers on acrylamide-induced rat mammary carcinogenesis. The 45th Annual Meeting of Society of Toxicology, Mar. 2006, SanDiego, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
古賀秀徳	アクリルアミドの分析法, 実体, 低減法	伊藤, 川本, 杉山, 西島, 米谷	食品検査とリスク回避のための防御技術	シーエムシー出版	東京	2006	241-249

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishihara, K., Koga, H., et al.	Formation of acrylamide in a processed food model system, and examination of inhibitory conditions.	J. Food Hyg. Soc. Japan	46	33-39	2005
Ishihara, K., Koga, H., et al.	Examination of conditions inhibiting the formation of acrylamide in the model system of fried potato.	Biosci. Biotechnol. Biochem.	In press		2006
Koyama, N., Honma, M., et al.	Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells.	Mutat. Res.	603	151-158	2006
Lee, K-Y, Shibutani, M., Hirose, M., et al.	Chemoprevention of acrylamide toxicity by antioxidative agents in rats - Effective suppression of testicular toxicity by phenylethyl isothiocyanate.	Arch. Toxicol.	79	531-541	2005
Imai, T., Hirose M., et al.	Enhancement by acrylamide of <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced rat mammary tumor development -possible application for a model to detect co-modifiers of carcinogenesis.	Cancer Lett.	230	25-32	2005