

別添1

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

食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 今井 俊夫

平成19（2007）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究 -----	1
今井俊夫	
II. 分担研究報告	
1. ライフステージによるアクリルアミドの体内動態の特性 -----	12
紅林秀雄	
2. ライフステージによるアクリルアミドの神経毒性及び精巣毒性の病理解析 ----	27
渋谷 淳	
3. ライフステージによるアクリルアミドの発がん感受性に関する研究 -----	43
今井俊夫	
4. 生体内代謝機構を考慮したアクリルアミド遺伝毒性抑制物質の探索 -----	52
本間正充	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	61
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	
1. Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors.	
2. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells.	
3. Lack of preventive effects of dietary fibers or chlorophyllin against acrylamide toxicity in rats.	

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 18 年度 総括研究報告書

食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究

主任研究者 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

食品からのアクリルアミド（AA）の摂取量は、成人よりも小児の方が高いと推定されている。本研究では、動物の胎児・乳幼児～春機発動期における AA の体内動態及び毒性を成熟期と比較検討し、小児を含むヒトに対するリスク管理に資するデータを構築する。更に、遺伝毒性を指標とした AA の毒性抑制物質の探索により AA の毒性発現機序を明らかにし、代謝の種差を考慮したリスク管理に寄与することを目的とする。18 年度、ライフステージによる AA の体内動態の特性については、[紅林] 4 週齢の SD 雌ラットに [2, 3-¹⁴C] AA を 2.5mg/kg 体重の用量で 1 回強制経口投与した結果、72 時間後までに尿中に 80%、糞中に 8%、呼気中に 4%の排泄が確認された。組織中放射能濃度は、大部分の測定臓器で 30 分後には最高値に達し、血液では 72 時間後でも高値が確認されたが、毒性標的臓器の坐骨神経などでは特に高い集積性はみられなかった。毒性に関しては、[渋谷] SD ラットの妊娠 10 日目から出産 3 週後の離乳時まで、AA を 50、100、200ppm の用量で飲水投与した結果、児動物の雄では 50ppm 以上、雌では 100ppm 以上において、出生直後より用量に依存した体重増加抑制がみられたが、明らかな神経毒性および精巣毒性作用は認められなかった。[今井] AA の乳幼児期投与による多臓器中期発がん性試験の実施に先立ち、F344 ラットの出生時から 12 週間、AA を 10、20、40ppm の用量で飲水投与した結果、体重、摂水量などに明らかな影響はみられなかったが、40ppm 群の雄で精巣毒性、雌では成熟期投与では報告のない心臓毒性を示唆する所見が得られた。遺伝毒性を指標とした AA の代謝に関しては、[本間] ヒトリンパ芽球細胞株 AHH-1 あるいは TK6 に比し、CYP2E1 を高発現する遺伝子導入細胞 h2E1ver2 では AA の遺伝毒性は増強されず、CYP2E1 ほか CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4 及び mEpoxyde hydrolase を高発現する MCL-5 では AA による強い遺伝毒性を示したことから、AA の代謝活性化に CYP2E1 以外の代謝酵素の関与していることが示唆された。

分担研究者

- 1) 紅林 秀雄 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長
- 2) 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所・病理部・室長
- 3) 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・室長

A. 研究目的

食品に含まれる遺伝毒性発がん物質に対するリスク管理措置を検討する一般原則として、これまでは主に ALARA の原則が採用されてきた。しかし、種々の汚染物質を対象とするリスク管理活動において、優先順位を決めるための勧告としては十分ではなかった。

そこで、ヒトの推定摂取量と発がん性の強さを比較した数値がより役立つとの観点より、2005年2月のJECFAにおいて、リスク管理の優先度を示す値として暴露マージンを採用することとされた。食品の調理過程においてアクリルアミド(AA)、ヘテロサイクリックアミンなど遺伝毒性発がん物質の生成することが報告されているが、JECFAでは特にAAに関し、一般人の平均摂取量として1 μ g/kg体重/日、小児など高摂取者については4 μ g/kg体重/日であり、動物の発がん性試験データとの対比により、その暴露マージンは300-75と比較的小さいことから、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性が否定できず、今後も食品中のAA濃度を低減するための努力をすべきであると結論され、我が国としても低減法に関する取組みが行われてきた。

AAは、実験的に神経毒性、精巣毒性、遺伝毒性及び発がん性を示すことが知られ、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。現在、米国を中心にAAあるいはその代謝物で生体内活性の高いグリシドアミド(GA)の発がん性試験及び発達期神経毒性試験により低用量長期間投与による毒性評価を目的とした研究が行われており、それらの結果が明らかにされた際に再度リスク評価をすべきであるとされている。一方、現時点におけるAAの実験的毒性研究の課題として、これまでの研究では職業的暴露に対するリスク評価が主な目的であったことから、動物モデルとして主に成熟ラットなどを用いた研究結果を中心に報告され、胎児期、乳幼児期あるいは春機発動期におけるデータの極めて少ないことが挙げられる。胎児・幼若期の動物は化学物質の代謝様式や臓器組織の発育速度、成熟度のみならず、臓器への血流量や血液-脳関門の機能など生理的な違いにより化学物質に対する毒性反応も

成熟動物と異なる可能性がある。AAの高摂取者が小児であり、またAAは母親から胎児へ胎盤移行する可能性も示されていることから、当該期投与による毒性の比較評価を早急に実施することが重要である。

一方、食品に含まれるAAのヒトへのリスクを評価するため、動物から得られたデータを適切にヒトに外挿するための取組みも不可欠である。最近、ヒトの暴露量あるいは代謝様式を明らかにするため、AA、GAのヘモグロビン付加体、あるいは尿中のAA、GA由来の代謝物を解析した報告がなされている。ヘモグロビン付加体を指標とした解析では、AAからGAに代謝される比率が、動物に比してヒトでは低いとされている。また、食品から摂取される程度の暴露量において、健常なヒトの場合、尿に含まれるAA由来の抱合体の比率はGA由来の抱合体に比して8倍あるいはそれ以上とされ、AAを速やかに排泄するために十分な代謝能力を有していると考えられる。ところが、AAの毒性に関して、AAあるいはGAの何れに因るのか不明な点が多く、AAの毒性発現機序を明らかにするための実験データの蓄積が必要である。

そこで本研究では、胎児期、幼若期、春機発動期、成熟期など各ライフステージにおけるAAの体内動態を成熟期と比較するとともに、AAの当該期暴露による神経毒性、精巣毒性及び発がん性の特性及び感受性の成熟期暴露との違いについて実験的に明らかにする。特に用量反応性を考慮した検索を行うことにより、AAの高摂取群とされる小児を含むヒトに対するリスク管理に資する情報を得ることが可能となる。さらに、AAの毒性抑制物質の探索により、代謝に関連したAAの毒性発現機序を明らかにし、代謝の種差を考慮したリスク管理に寄与することを目的とする。まずは遺伝毒性を指標とした細胞を用いた検出系を

用いて、抗酸化作用あるいは代謝酵素に影響する化学物質を探索し、毒性抑制作用が期待される物質につき、動物を用いて神経毒性、精巣毒性あるいは発がん性を指標とした検討を加える。

B. 研究方法

(1) ライフステージによる AA の体内動態の特性 [紅林]

4週齢のSD雌ラット14匹に[2, 3-¹⁴C]AA(比放射能4 mCi /mmol)を140 μCi (2.5mg) /kg体重の用量で1回強制経口投与した。血液及び血漿中の放射能濃度を測定するため、AA投与10、30分、1、6、24、48及び72時間後に心採血を行った。測定には液体シンチレーションカウンター(LSC1000、ALOKA)を用いた。また、尿、糞、呼気中放射能排泄率及び体内放射能残存率を測定するため、AA投与後に動物を呼気回収装置のついたガラス製代謝ケージに收容し、所定区間毎の呼気を捕集すると同時に尿および糞を分別採取した。呼気中の二酸化炭素は捕集液(モノエタノールアミン、プロピレングリコール、メタノールを等量混合)に吸収させ、その一部を採集して放射能を測定した。尿及び糞は均一化した後、一部を秤取して放射能を計測した。全身オートラジオグラフは、AA投与10、30分、1、6、24及び72時間後にラットを放血致死させた後、液体窒素で凍結して薄切、凍結乾燥させた後、イメージングプレート及びバイオイメーjingグアナライザー(BAS2000、富士写真フィルム)により画像化し、PSL値から半定量的黒化度として可視的に各臓器組織における集積性を高濃度、中濃度及び低濃度の3段階に分けて評価した。組織中放射能濃度は、ラットを放血致死させた後、卵巣、子宮、副腎、甲状腺、下垂体、坐骨神経、腸間膜リンパ節、脾臓及び乳腺を摘出し、均一化した後に一部を精秤

して液体シンチレーションカウンターを用いて放射能を計測した。定量限界はバックグラウンドの2倍とした。

(2) ライフステージによる AA の神経毒性及び精巣毒性の病理解析 [渋谷]

SD:IGS妊娠ラット12匹を各群3匹の4群に分け、妊娠10日目から離乳まで、AAを0(対照)、50、100、200 ppmの用量で飲水投与した。用量設定は、飲水投与で4週間以内に神経障害を生じることが知られている200 ppmを最高用量とした。母動物及び児動物について体重、摂餌量、摂水量を測定し、一般状態の観察を行った。児動物は、生後3週で離乳させたが、この時点で雌雄半数例を剖検した。残りの半数は水道水で生後11週まで飼育して解剖した。剖検時、脳、脊髄、三叉神経、坐骨神経、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体、骨格筋を採取し、脳、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体については重量を測定した。各臓器につきパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。坐骨神経についてはエボン包埋切片を作製し、トルイジンブルー染色を行った。小脳及び骨格筋については、シナプス前終末マーカーのsynaptophysin (SYP)に対する免疫染色を併せて行った。SYPは小脳分子層における神経終末障害の間接的マーカーとして、AAを投与したラットで異常な点状染色像として増加するとの報告がある。骨格筋では神経筋接合部に陽性を示す。坐骨神経および小脳分子層については通常の病理組織学的検索に加えて、画像解析ソフトによる定量的な検討を行った。

(3) ライフステージによる AA の発がん感受性に関する研究 [今井]

乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験法の実施に先立ち、乳幼児～思春期投与による予備実験を実施した。即ち、妊娠F344ラット12匹を各群3匹の4群に分け、

出産直後より3週後の離乳まで、AAを0（対照）、10、20及び40 ppmの用量で飲水投与した。離乳後は、母動物はエーテル麻酔下で屠殺した。離乳後の各群の児動物には母動物と同様の方法でAAを9週間投与した。最高投与量の40 ppmは、ラットの長期試験における発がん用量である（Johnson KA et al., 1986; Friedman MA et al., 1994）。実験期間中は、一般状態を毎日観察し、体重、摂餌量、摂水量は週1回測定した。12週間の投与期間終了後は、全動物をエーテル深麻酔下で大動脈より放血屠殺して剖検を行った。脳、甲状腺、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓及び精巣については摘出後、重量を測定した。これらの臓器に加え、鼻腔、気管、大動脈、下垂体、唾液腺、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膵臓、膀胱、精巣上部、前立腺、精囊、卵巣、子宮、膈、乳腺、皮膚、リンパ節、胸骨、大腿骨（含骨髓）、坐骨神経、三叉神経脊髄、眼球、ハーダー腺、大腿筋についても摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定、常法に従ってパラフィン包埋切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、対照及び40 ppm群について病理組織学的検索を行った。組織学的にAA投与に起因することが疑われた臓器については10及び20 ppm群についても観察した。

乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験については、妊娠F344ラット36匹を各群6匹の1~6群に分け、1~4群の母動物には出産直後より3週後の離乳まで、AAを0（対照）、20、40及び80 ppm濃度で飲水投与している。5、6群については実験途中より抗甲状腺剤処置を行うサテライト群として、各0及び40 ppm濃度のAAを投与している。AAの投与量は、乳幼児~思春期投与の予備実験で一般状態、体重、摂餌量及び飲水量に明らかな影響のみられなかった20及び40 ppmに

加え、より高い用量として80 ppmを設定した。現在、生後5週が経過し、実験を継続している。

(4) 生体内代謝機構を考慮したAA遺伝毒性抑制物質の探索 [本間]

ヒトリンパ芽球細胞株 AHH-1 と、それを基礎とした CYP2E1 遺伝子導入細胞である h2E1V2、ならびにヒトリンパ芽球細胞株 TK6 と5つの代謝酵素 CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1 及び mEpoxide hydrolase を高発現する MCL-5 (BD bioscience の Dr. Crespi から供与) を使用した。これらの細胞における CYP2E1 タンパク量は抗ラット CYP2E1 抗体(第一化学薬品)を用いたウェスタンブロット法により、CYP2E1 酵素活性は Chlorzoxazone (CZX) を基質として 6-OH CZX の HPLC 法により定量した。細胞に対する AA あるいは GA 処理に関しては、増殖期の細胞濃度を調整してフラスコに播種し、AA あるいは GA を 1% 添加し、24 時間連続処理した。小核試験では、被験物質処理した細胞を正常培地で 48 時間培養し小核標本を作製した。観察直前にアクリジンオレンジ溶液を滴下して染色し、B 励起による蛍光顕微鏡下で 1000~2000 細胞あたりの小核を有する細胞の数を計数した。TK 遺伝子突然変異試験では、被験物質処理終了直後と発現時間終了 (3 日) 後にコロニー形成率を算出した。また処理終了直後から発現時間終了まで毎日細胞数を計測、相対増殖率を算出した。発現時間終了後にトリフルオロチミジン (TFT) 下で 96well プレートに細胞を播種し、14 日目に突然変異コロニー (TFT 耐性コロニー) の数を計数して突然変異率を算出した。

(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、

使用する動物数は最小限に止め、投与は主に経口投与により実施し、屠殺はエーテル深麻酔下で大動脈ないし心臓からの脱血により行うことにより動物に与える苦痛を可能な限り軽減するなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、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あり、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) ライフステージによる AA の体内動態の特性 [紅林]

血液中放射能濃度は投与後 10 分において既に高濃度を示し、投与 30 分から 1 時間後に最高値 (AA 換算値、 $2.64 \mu\text{g eq/mL}$) を示した。その後漸減したものの 72 時間後でも $1.02 \mu\text{g eq/mL}$ であった。血漿中濃度は、投与後 10~30 分後に最高値 $2.36 \mu\text{g eq/mL}$ を示したが、72 時間後には $0.04 \mu\text{g eq/mL}$ であった。尿、糞及び呼気中排泄率に関しては、投与後 24 時間までに尿中に 76.03%、糞中に 7.89%、呼気中に 3.23% の排泄が認められた。投与後 72 時間までには尿中に 79.96%、糞中に 8.44%、呼気中に約 4.30% の排泄率が認められ、総回収率は 92.70% となった。

全身オートラジオグラフィーでは、大部分の測定臓器組織で投与 30 分後には最高値に達し、血液では 72 時間後でも高値が確認されたが、坐骨神経、甲状腺、乳腺を含む他の臓器組織に特に高い集積性はみられなかった。組織中放射能濃度測定では、投与 10 分後において、測定臓器組織のうち脾臓で最も高い値を、乳腺で最も低い数値を認めた。尿は投与後 1 時間、糞は投与後 6 時間、その他の観察臓器は投与後 30 分で最高濃度値を示した。投与後 1 時間では尿と糞を除く観察臓器は減少

傾向を示し、投与後 6 時間では卵巣、子宮、副腎、甲状腺、下垂体、坐骨神経、腸間リンパ節、乳腺では投与後 30 分で示した最高値の半分以下の数値であった。脾臓及び血液は全ての時点で高い濃度を示し、投与後 72 時間でも血液は圧倒的に高濃度であることが確認された。しかし乳腺は他の部位に比べ、すべての時点で低い濃度であった。

(2) ライフステージによる AA の神経毒性及び精巣毒性の病理解析 [渋谷]

投与期間中の母動物の体重及び摂餌量は 50 ppm 以上の群で用量依存的に増加抑制あるいは減少を示し、摂水量は 100 ppm 以上の群で減少した。妊娠・授乳期間を通した AA の平均摂取量は 50、100、200 ppm の各群で、9.9、16.7、22.2mg/kg 体重/日であった。100 ppm 以上の群では神経症状が観察された。病理組織学的検索では、三叉神経の神経節細胞の中心性色質融解の用量依存的な増加、坐骨神経における神経線維密度の減少、変性軸索/萎縮した有髄神経線維の増加、小脳分子層の SYP 陽性の点状染色像の増加が観察された。骨格筋では神経筋接合部の分布に群間の差は認められず、肝臓、脾臓、腎臓、脊髄に AA 投与による変化はみられなかった。

児動物については、生後 2 日目の体重が雄の 50 ppm 以上、雌の 100 ppm 以上で用量依存的に有意に低値を示した。生後 3 週の離乳時まで一般状態に異常は認められなかった。生後 3 週の剖検時、100 ppm 以上の児動物の胃内には乳汁が少量しか認められず、脾臓の絶対/相対重量の減少をはじめとした諸臓器の重量変化がみられた。病理組織学的には、小脳外顆粒層細胞の残存と小脳顆粒細胞のアポトーシスが 50 あるいは 100 ppm より用量に伴い増加傾向を示した。肝臓および脾臓の髄外造血は用量依存性に減少し、200 ppm では肝細胞内グリコーゲンの枯渇や褐色色素の沈着

が観察された。精巣では精子形成はまだ行われていないが、対照群では精母細胞が3~4層みられるのに対し、100 ppm以上では1~2層あるいはセルトリ細胞のみしか認められず、精巣の発育遅延が明らかであった。坐骨神経において、AAの用量に伴い神経線維密度及び萎縮した有髄神経線維数の増加傾向を示した。三叉神経、腎臓、精巣上体、骨格筋においてはAA投与による影響は認められなかった。離乳から生後11週までの一般状態についても異常は認められなかったが、体重は雄の100 ppm以上、雌の200 ppmで有意に低値を示したまま推移した。生後11週の剖検時、50 ppm以上で精巣上体絶対重量の減少をはじめとした緒臓器の重量変化がみられた。病理組織学的検索では、いずれの臓器においてもAA投与による影響は明らかではなかった。

(3) ライフステージによるAAの発がん感受性に関する研究 [今井]

乳幼児~思春期投与による予備実験においては、実験期間を通して、AA投与に起因すると考えられる死亡及び一般状態の異常は認められなかった。体重については、雄では群間の明らかな差はみられなかったが、雌の20及び40 ppm群において生後3~9週目に僅かながら、統計学的に有意な低値を示した。摂餌量及び摂水量にAA投与による明らかな影響は認められず、摂水量より算出した10、20及び40 ppm群におけるAA摂取量は、雄では各1.0、2.1及び4.4 mg/kg体重/日、雌では各1.2、2.5及び4.9 mg/kg体重/日であった。剖検時の臓器重量については、雄ではAA投与による影響はみられなかったが、雌の40 ppm群において、対照群と比し有意な甲状腺及び脾臓相対重量の増加が認められた。病理組織学的には、精巣、精巣上体及び心臓においてAA投与による、あるいはAA投与によることが疑われる変化が認められた。即ち、精巣で

は両側性の精細管萎縮の発生頻度が40 ppm群で有意に増加し、関連する変化として精巣上体では、精巣上体管内にみられる剥離精上皮の発生頻度が40 ppm群で有意に増加した。心臓では、心筋炎が雌雄の対照群の各2/7例及び2/17例の乳頭筋あるいは左心室壁などに散発性にみられたが、いずれも軽度な変化であった。一方、40 ppm群においては雌雄各4/12例にみられた対照群と同等の軽度な心筋炎に加え、雄の5/12例には右心室壁心底側、心外膜下の中等度の心筋炎が認められた。その他の臓器組織における病理組織学的変化に関しては、AA投与による明らかな影響は認められなかった。

乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験については、現在のところ、児動物は生後5週間を経過したが、何れの群においてもAA投与に起因すると考えられる死亡は認められていない。体重については、生後2週目より、雌雄の全てのAA投与群において用量反応性のある体重増加抑制がみられ、摂餌量及び摂水量も減少傾向を示している。

(4) 生体内代謝機構を考慮したAA遺伝毒性抑制物質の探索 [本間]

AHH-1に対してCYP2E1遺伝子を導入したh2E1v2では5倍以上、TK6に対しMCL-5では2倍以上のCYP2E1タンパク量が確認できた。CYP2E1の酵素活性については、AHH-1に対しh2E1v2では3.5倍、TK6に対しMCL-5では0.7倍であった。AHH-1とh2E1v2に対しAAを0.7~5.6 mM濃度で曝露したところ、同程度の細胞毒性を示した。また、小核誘発頻度、遺伝子突然変異頻度にも差は認められなかった。GAに曝露した場合においても両細胞に顕著な差はみられなかった。TK6とMCL-5に対しAAを0.7~5.6 mMの濃度で曝露した結果、MCL-5はTK6に比べて細胞毒性、小核誘発性に対してわずかに感受性を示し、TK突然変異

に対して強い反応性を示した。GA に対しては大きな差は認められなかった。CYP2E1 により代謝活性化される代表的な化学物質であるジメチルニトロサミン (DMN) に対する h2E1v2 と AHH-1 の反応性を比較したところ、h2E1v2 は AHH-1 に比べ極めて強い細胞毒性、小核誘発性、遺伝子突然変異誘発性を示しことから、h2E1v2 での CYP2E1 活性は機能していることが示された。

D. 考察

(1) ライフステージによる AA の体内動態の特性 [紅林]

幼若期の雌ラットに [2, 3-¹⁴C]AA を 2.5mg/kg 体重の用量で強制経口投与した結果、血液中放射能濃度は投与後 10 分において既に高濃度を示し、30 分から 1 時間に最高数値に達し、その後も長時間高濃度を維持した。一方、血漿では、投与後 10~30 分後に最高値を示したが、その後急速に低下した。血液に比し血漿中放射能濃度が低かったことから AA は血球に強く吸着されることが示唆された。尿、糞、呼気中放射能排泄率では、72 時間後までに尿中に約 80%、糞中に 8%、呼気中に 4% の排泄が確認され、特に尿中排泄の 95% は投与後 24 時間までにみられ、AA は投与後速やかに吸収され、大半は速やかに尿より排泄されることが明らかとなった。呼気中排泄は ¹⁴CO₂ として 8 時間までに 6%、その後ゆっくりした排泄も見られた Hashimoto らの雄性ラットを用いた報告と一致した (Biochem Pharmacol 19: 2591-604, 1970)。単炭素としてエネルギー代謝に取り込まれたのではなく、一部の AA がタンパク等の高分子に結合し、それが分解代謝されたものと考えられる。全身オートラジオグラフィにおける半定量的レベルあるいは組織中放射能濃度測定では、脾臓および血液は全ての時点で高い濃度を示し、

投与後 72 時間でも血液は圧倒的に高濃度であることが確認された。一方、毒性標的臓器の坐骨神経、甲状腺、乳腺などにおいて特に高い集積性は認められなかった。以上の結果より、AA は投与後速やかに吸収され、血流を経て全身にほぼ均一に分布、その後徐々に代謝系の臓器に集められ、大半は尿より排泄されることが明らかとなった。以上の結果についても、雄性ラットを用いた報告と矛盾していない。Miller らの報告では、1、10、100 mg/kg 体重の 3 投与量で投与した際、糞尿中に [2, 3-¹⁴C]AA 由来の放射能は 24 時間で 53-67%、7 日間で 65-82% が排泄され、糞中排泄は 7 日間で 6% であった。尿中に 90% 以上が排泄され、1 日当りの排泄量の割合は用量に依存していなかったため、1-100 mg/kg 体重の用量で経口投与した際の吸収、分布、代謝及び排泄は飽和していないと結論している。また、10mg/kg 体重の用量で静脈内投与した場合、[2, 3-¹⁴C]AA の放射能の生体内分布に於いて肝臓、脂肪、腎臓、精巣等の分布濃度ピークは 1 時間後に見られ、2 相性で減少し、その半減期は 5 時間と 8 日間であった。後者はタンパクとの結合分解産物と推測されている。Waddel らの報告では、雄性マウスの全身オートラジオグラフィにより、精巣への特異的な分布を示している。今後、幼若雌ラットにおける AA の生体内動態と尿糞中への排泄速度やその割合について、ヒトにおける食品からの推定摂取量と同等の低用量域を含む用量反応性を検索し、成熟ラットとを比較検討する。

(2) ライフステージによる AA の神経毒性及び精巣毒性の病理解析 [渋谷]

母動物において、50 ppm (平均摂取量 9.9 mg/kg/日) 以上の群で用量依存的に体重、摂餌量の増加抑制あるいは減少を示し、摂水量は 100 ppm (16.7 mg/kg/日) 以上の群で減少

した。100 ppm 以上の群では神経症状を呈し、病理組織学的にも用量依存的に神経障害を示す変化が認められた。文献的に、SD ラットの妊娠 7 日から離乳までの摂餌制限により、10%制限した場合の母動物の体重は 1-5%、30%制限では 10-20%、50%制限では 17-32%、対照と比し低値を示したとされ (Carney et al., *Toxicol Sci* 82, 237-249, 2004)、本研究における母動物の体重増加抑制あるいは減少と摂餌量減少の推移と類似していた。摂餌量及び摂水量の減少は、神経障害の進行に伴う栄養状態の悪化によるものと推察された。児動物では、雄の 50 ppm 以上、雌の 100 ppm 以上で、出生直後より用量依存的に体重が有意に低値を示した。生後 3 週の離乳時まで一般状態に異常は認められなかった。生後 3 週の剖検時、100 ppm 以上の児動物の胃内には乳汁が少量しかみられなかった。文献的に、SD ラットの妊娠 6 日から授乳 10 日まで AA を 5、10、15、20 mg/kg/日の用量で経口投与した実験で、母動物の神経症状がみられた 15 mg/kg/日よりも低い用量から児動物の体重増加抑制がみられ、胎児期の AA 投与による発達毒性作用は児動物の体重に最も鋭敏に現れることが示されている (Wise et al., *Neurotoxicol Teratol* 17, 189-198, 1995)。一方、授乳中の Wistar 系母ラットに AA を 25 mg/kg/日の用量で経口投与した実験では、母動物の体重、摂餌量、摂水量の減少、雄の児動物の生後 4 日以降の体重増加抑制がみられ、児動物の胃内に乳汁が殆ど含まれなかったことから、児動物の体重に対する影響は、母体の栄養不良に起因すると結論されている (Friedman et al., *Reprod Toxicol* 13, 511-520, 1999)。本研究で、雄の 50 ppm 群の児動物にみられた体重増加抑制は、胎児期に投与された AA の発達毒性作用が関与するものと考えられる。一方、100 ppm 以上の群で

は母動物の体重が著しく減少していたことから、児動物の体重には母体の栄養不良も大きく影響していたものと推測される。一方、児動物に母動物で認められたような明らかな神経症状は認められなかった。文献的に、妊娠 7 日から生後 22 日まで 10 mg/kg/日の用量で経胎盤あるいは強制経口投与することにより確実に児動物に AA を暴露した場合、何らかの行動異常を生じることが示されている (Garey et al., *Neurotoxicol Teratol* 27, 553-563, 2005)。本研究では、生後 3 週の剖検時、100 ppm 以上の児動物の胃内には乳汁が少量しかみられなかったことから、授乳期の乳汁を介した暴露が極めて少なかったものと考えられる。生後 3 週の剖検時、坐骨神経においては、AA の用量に伴い神経線維密度及び萎縮した有髄神経線維数の増加傾向を示したが、神経線維が全体的に小型化していたことから、全身の発達遅延に伴う変化であると考えられた。その他、小脳外顆粒層細胞の残存と小脳顆粒細胞のアポトーシス、肝臓および脾臓の髄外造血の減少、精巣の発達遅延など全身の発達遅延や栄養不良を示唆する所見が用量依存的に認められたが、母動物の全身状態悪化による影響と AA の児動物への直接作用を判別することは困難であった。今後、AA による神経、精巣毒性の発達期における感受性を規定する要因の有無を明らかにする目的で、母動物の全身状態への影響が比較的少なく、4 週間の投与で成熟動物に神経毒性を誘発する 100 ppm の用量で、異なる発達期のステージ (胎児期+乳児期; 離乳時から 4 週間; 生後 7 週から 4 週間; 胎児期+乳児期+離乳後 4 週間) での暴露を行い毒性の発現状況を検索する。

(3) ライフステージによる AA の発がん感受性に関する研究 [今井]

AA の乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験の実施に先立ち、乳幼児～思春

期における AA の飲水投与による予備実験を行った。その結果、雌雄のいずれの群においても AA 投与に起因すると考えられる死亡、一般状態の異常はみられなかった。また、雌雄の摂餌量、飲水量及び雄の体重に明らかな変化は認められなかったが、雌の 20 及び 40 ppm 群において生後 3~9 週目に僅かな体重増加抑制がみられた。しかし、投与期間終了時には、雌のいずれの群にも体重への影響は殆ど認められなかったことから、AA の乳幼児~思春期投与において、40 ppm は耐量であると判断された。

臓器重量に関しては、雌の 40 ppm 群において、甲状腺及び脾臓の重量増加がみられたが、いずれにおいても AA 投与に関連する病理組織学的な異常は認められず、原因は明らかではなかった。病理組織学的所見に関しては、雄の 40ppm 群において精巣の精細管萎縮及び精巣上皮における剥離精上皮の発生頻度が、対照群と比して有意に増加した。AA のラットにおける精巣毒性に関しては、7-8 週齢の SD ラットに対する 5 日間投与では 5 mg/kg 体重/日の用量で病理組織学的変化の発現することが報告されている (Yang H et al., 2005)。今回の実験における雄の 40ppm 群の実投与量の算出値が 4.4 mg/kg 体重/日であることから、乳幼児期の AA 投与による精巣毒性に対する感受性は思春期投与とほぼ同等であると推測されたが、ラットの系統あるいは投与期間などを合わせた実験での比較が必要である。心臓については、雌の 40ppm 群において、右心室壁心底側、心外膜下の巣状心筋炎が 5/12 例に認められた。F344 ラットにおける自然発生病変として、心尖、乳頭筋あるいは左心室などに散発性にみられる心筋炎は広く知られており、本実験においても雌雄の対照群の少数例に認められた。しかし、雌の 40 ppm 群にみられた病変については、右心室心底側と部

位的に特徴があり、その程度も対照群に比して強かったことから、AA 投与の影響であることが否定できない。今後、当該変化が AA の乳幼児期投与に特異的であるのか、成熟期投与でも誘発されるのか、あるいはその感受性を含め、更に詳細な検討を加える必要がある。雌において腎臓の石灰沈着が対照群の 15/17 例に比し、40 ppm 群では 6/12 例とその発生頻度が有意に ($p < 0.05$) 減少したが、その毒性学的意義は明らかではなかった。

乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験については、生後 5 週が経過した段階であり、今後の経過観察を要するが、生後 2 週目より、雌雄の全ての AA 投与群において用量反応性のある有意な体重の低値及び摂餌量、飲水量の減少傾向がみられている。乳幼児~思春期の 12 週間投与による予備実験では、特に雄の 40ppm 群においては体重、摂餌量、飲水量のいずれにも影響はみられなかったことから、本中期発がん性試験で AA の影響が比較的強く現れている。その原因として、各群の動物数が多く、ばらつきの比較的小さいことが考えられるが、詳細については不明である。

(4) 生体内代謝機構を考慮した AA 遺伝毒性抑制物質の探索 [本間]

これまでの我々の研究で、AA と GA の *in vitro* での遺伝毒性について比較したところ、AA は殆ど毒性を示さなかったのに対して、GA の遺伝毒性は強く、主として点突然変異を主体とする DNA 損傷作用を示した。このことから、AA の遺伝毒性の本体は代謝物である GA であると結論した。BigBlue マウスに AA と GA を各々 10、50 ppm 濃度で 50 日間飲水投与し、4 週間後に肝臓での突然変異を検索した結果、AA 及び GA により突然変異誘発率は有意に上昇し、GA に比し AA で高かったとの報告がある。また、突然変異スペクトルは、AA、GA と

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、毒性が増強されるということを支持している。CYP2E1-null マウスを用いて、AA に対する遺伝毒性をコメット試験、小核試験により検索したところ、正常マウスに比べて反応性が低いとの報告もある。In vitro では CYP2E1 を高発現する V79 細胞を用いて、SCE を指標とした AA の遺伝毒性を評価したところ、高い反応性が観察されている。これらの結果より AA は CYP2E1 により GA に代謝され、毒性を発現すると考えられている。しかし、我々のこれまでの実験では AA は S9 存在下でも毒性の増強作用は観察されず、AA の代謝様式の解明には S9 を用いた系は不適切であること、AA は CYP2E1 以外の薬物代謝酵素により代謝される可能性が示された。

今回、CYP2E1 を高発現する遺伝子導入細胞の h2E1v2 と MCL-5 を用いて、AA および GA の遺伝毒性を小核誘発能、TK 遺伝子突然変異誘発頻度を指標として検索した。その結果、h2E1v2 細胞と対照細胞である AHH-1 細胞との間で AA による細胞毒性、遺伝毒性に差はみられなかった。しかし h2E1v2 細胞は、CYP2E1 により代謝活性化される DMN の暴露により、AHH-1 よりも強い細胞毒性、小核誘発及び遺伝子突然変異を示した。h2E1v2 細胞では、CYP2E1 のタンパク発現、酵素活性の高いことが確認されたが、AA に対する反応性に変化がみられない原因として、AA は従来より考えられてきた CYP2E1 ではなくそれ以外の代謝酵素により代謝される、あるいは AA の代謝活性化には CYP2E1 だけでなく他の酵素も関与することが示唆された。MCL-5 は CYP2E1 だけでなく、CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、mEpoxide hydrolase を高発現する遺伝子導入細胞であり、対照細胞である TK6 細胞と比べて、AA に対する細胞毒性、遺伝毒性に対して高感受性

を示した。このことから、AA の代謝経路は、CYP2E1 以外にも酵素が存在している可能性が考えられた。今後、他の酵素 (CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、mEpoxide hydrolase 等) を責任酵素として考え研究する必要がある。AA の代謝経路の解明が、新しい解毒方法の確立に重要と考えられる。

E. 結論

(1) ライフステージによる AA の体内動態の特性 [紅林]

[2, 3-¹⁴C] AA を 2.5mg/kg で 4 週齢の雌性ラットに 1 回強制経口投与した際、組織中放射能濃度は、多くの臓器で投与後 10 分から高濃度を示し、投与後 30 分で最高濃度を示した。尿、糞、呼気中への [2, 3-¹⁴C] AA の放射能の排泄率は、投与後 72 時間までに尿中に 80%、糞中に 8%、呼気中に 4% が排泄され、投与後 24 時間までに尿中排泄率の 95% が排泄された。これらの結果から、AA は経口投与後速やかに吸収され、全身組織へ分布し代謝され、大半は尿より速やかに排泄される。但し、その一部は血液などの臓器および組織中に残存し、ゆっくりと排泄されることが示された。一方、標的臓器と考えられる神経系細胞、甲状腺ならびに乳腺では特に高い集積性は認められなかった。今後、成熟ラットとの比較を要する。

(2) ライフステージによる AA の神経毒性及び精巣毒性の病理解析 [渋谷]

妊娠 10 日目から出産 3 週後の離乳時まで母ラットに AA を飲水投与した結果、100 ppm 以上の用量で、母動物には神経症状が誘発されたが、児動物では誘発されず、明らかな精巣毒性もみられなかった。胎児・乳児期暴露では、AA の毒性標的が発達途上であり、低感受性あるいは高い可塑性を示す可能性が示唆された。一方、児動物の体重増加抑制には AA

の発達毒性作用が部分的に関与するものの、授乳期間中の母動物の全身状態悪化による影響が大きく、乳汁を介したAAの児動物への移行が少なかったことが、毒性の発現しなかった原因である可能性が示唆された。

(3) ライフステージによるAAの発がん感受性に関する研究 [今井]

AAの乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験の実施に先立ち、その用量設定のため、乳幼児～思春期におけるAAの飲水投与による予備実験を10、20、40 ppm濃度で実施した。その結果、いずれの用量においても一般状態、体重、摂餌量及び摂水量に明らかな影響はみられず、AAの乳幼児～思春期投与において40 ppmは耐量であると判断された。また、病理組織学的には、40 ppm群の雄で精巢毒性、雌では成熟期投与では報告のない心臓毒性を示唆する所見が得られ、今後の詳細な検討を要する。現在、AAの20、40、80 ppmの乳幼児期飲水投与による多臓器中期発がん性試験を開始し、継続している。

(4) 生体内代謝機構を考慮したAA遺伝毒性抑制物質の探索 [本間]

AAは*in vitro*で、CYP2E1を高発現する遺伝子導入細胞でも代謝活性化による毒性の増強が観察されなかったことから、AAはCYP2E1以外の経路によって代謝されるか、もしくはGAへの代謝には、それに加えた他の代謝酵素の関与が考えられた。複数の薬物代謝酵素を発現するMCL-5細胞では毒性の増強が観察されたことはその仮説を支持するものである。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. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kurebayashi, H., Ohno, Y.: Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. Arch. Toxicol., 80, 820-828, 2006.

2) Woo, G-H., Shibutani, M., Kuroiwa, K., Lee, K-Y, Takahashi, M., Inoue, K., Fujimoto, H., Hirose, M.: Lack of preventive effects of dietary fibers or chlorophyllin against acrylamide toxicity in rats. Food Chem. Toxicol. (in press).

2) 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

1) Hideo Kurebayashi, Yasuo Ohno : Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. 16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 2006年9月, Budapest, Hungary.

2) 紅林秀雄、中澤憲一、大野泰雄 : N-アセチルシステイン (NACys) はアクリルアミドの肝細胞毒性を抑制した。日本薬学会第127年会、2007年3月、富山。

3) 小山直己、加藤竜也、本間正充、林 真、増田修一、木苗直秀 : ヒトリンパ芽球トランスジェニック細胞を用いたアクリルアミドおよびグリシダミドの遺伝毒性試験。日本環境変異原学会第35回大会、2006年11月、堺。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）

平成18年度食品の安心・安全確保推進研究事業

「食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究」（H18-食品-一般-013）

（平成18年度）分担研究報告書

「ライフステージに対応したアクリルアミドの体内動態の特性」

[2, 3-¹⁴C]Acrylamide を用いた放射性 ¹⁴C トレーサー実験法による
アクリルアミドの雌性幼若ラットにおける体内動態試験 I

分担研究者：紅林秀雄 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

研究要旨

[2, 3-¹⁴C]Acrylamide を 2.5mg/2mL 水/kg で雌性 SD 系幼若ラットに経口投与したとき、その血液・血漿中放射能濃度測定、尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定、全身オートラジオグラフィーおよび組織中放射能濃度測定を行った。尿・糞・呼気中への [2, 3-¹⁴C]Acrylamide に由来する放射能の排泄率は、投与後 72 時間までに尿中に 79.96%、糞中に 8.44%、呼気中に約 4.30% の排泄が認められた。尿中へは投与後 3 時間までに尿中排泄率の約 30% が排泄され、投与後 24 時間までには 95% が排泄された。投与後 72 時間までの [2, 3-¹⁴C]Acrylamide の総回収率は 92.70% であった。組織中放射能濃度では、多くの観察臓器で投与後 10 分ですでに高濃度値を示し、投与後 30 分では最高濃度値を示した。脾臓および血液は全ての時点で高い濃度を示し、投与後 72 時間でも血液は圧倒的に高濃度数値が確認された。一方、標的臓器と考えられる神経系細胞、甲状腺ならびに乳腺で特に高い集積性は認められなかった。これらの結果を踏まえ、[2, 3-¹⁴C]Acrylamide は経口投与後速やかに末梢血管から吸収され、全身組織へほぼ均一に分布し、その後代謝系臓器を経て大半は尿より速やかに排泄されることが明らかとなった。但し、その一部は血液などの臓器および組織中に長時間残存し、非常にゆっくりと排泄される部分があることも示された。

A. 研究目的

アクリルアミドの食品からの推定摂取量は成人よりも小児の方が高いとされている。一方、胎児期、乳幼児期あるいは春機発動期等の幼若期の感受性も危惧されるところである。

アクリルアミドの体内動態試験について

は MJ. Miller ら、AM. Kadry ら、又は K. Hashimoto らの雄性ラットを用いた文献が既に公表されている。前者の場合 1, 10, 100mg/kg の 3 投与量で血中について低濃度群が明瞭でなく、また組織内分布は主要臓器のみであり、ラット 1 匹当たりの全投与量に対する分配比に重点が置かれ、詳細な点に不明

瞭なところも見られた。WJ. Waddell らのマウス全身マクロ ARG のデータは組織・器官の特異分布を明瞭に示す成績を公開していたが、用量の差による分布、また幼若の場合や代謝物と放射能濃度の関連についての記述がなかった。

一般に動物の体内動態試験のデータとしては雌性動物も小児期のものも少ない。そこで今回、ライフステージに対応したアクリルアミドの体内動態の特性を明らかにすることを目的として、発ガン試験が行れたラットの中でも幼若期の雌性ラットを用いて実験を行った。その雌性幼若ラットに放射性炭素を標識したアクリルアミドをヒトが摂取しているぐらいの低用量ないし中用量および高用量で経口投与し、その生体内動態と尿糞中への排泄速度やその割合を詳細に調べ、以後成熟雌性ラットの場合を比較する。即ち、雌性幼若ラットに [2, 3-¹⁴C] Acrylamide を強制経口投与して、血液・血漿中、尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定、全身オートラジオグラフィおよび組織中放射能濃度測定を行った。雌性ラットの体内分布では、発ガン試験で腫瘍が見つかった甲状腺や乳腺部位に注目することとした。

また、まず初年度は実験系を単純化しつつ低用量および高用量での薬物動態パラメータを正確に評価する準備のため、中用量のみについてアクリルアミドの幼若雌性ラットにおける体内動態を把握するための試験を行った。

実験系は簡便化と合理化とを試験資料の品質と制度を保持しつつ実施された。

- ① 使用動物の個体数の削除 (H18/6/1 厚労省課長通達)
- ② 高感度 ¹⁴C 放射能検出法の活用

- ③ 観察時点数の最小限化の3項について留意した。

(参照文献)

- 1) Miller MJ, Carter DE, Sipes IG. Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 63:36-44(1982).
- 2) Hashimoto K and Aldridge WN. Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochem Pharmacol* 19:2591-604(1970).
- 3) Kadry AM, Friedman MA, Abdel-Rahman MS. Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 7:127-33(1999).
- 4) Marlowe C, Clark MJ, Mast RW, Friedman MA, Waddell WJ. The distribution of [¹⁴C] acrylamide in male and pregnant Swiss-Webster mice studied by whole-body autoradiography. *Toxicol Appl Pharmacol* 86:457-65(1986).

B. 研究方法

1. 標識化合物

標識化合物名	: [2, 3- ¹⁴ C] Acrylamide
化学式	: CH ₂ =CHCONH ₂
供給者	: 室町薬品株式会社
ロット番号	: ARC-070110
比放射能	: 4 mCi /mmol (148 MBq /mmol)
放射化学的純度	: 99% (91%)
入手量	: 250 μCi (9.25 MBq)
保存条件	: 冷凍 (-20℃)、遮光

2. 実験動物種、系統： SPF Sprague-Dawley
系統雌性ラット、

3 週齢（購入時）、 4 週齢（投与時）

購入先 : 日本クレア（株）

3. 投与： 140 μ Ci/2.5mg/2mL 水/kg の投与
量で、経口ゾンデを用いて胃内に強制投与し
た。

用量 : 2.5mg/kg

[放射能用量：140 μ Ci /kg]

4. 血液・血漿中放射能濃度測定

投与後のラットより所定の時間にヘパリン
処理を施したシリンジにより心採血をし、
60 μ L の血液を採集した。そのうち 20 μ L を
測定用バイアルに正確に分取し、シンチレー
ションカクテル（生体科学研究所）を加えて
混合し測定用試料の調整を行った。残りの血
液を遠心分離（4℃、3000rpm、15分）して血
漿を調製し、20 μ L を適量のシンチレーショ
ンカクテル（生体科学研究所）を加えて混合
した。液体シンチレーションカウンター
（LSC1000、ALOKA）を用いて血液・血漿中の
放射能を計測した。

5. 尿・糞・呼気中放射能排泄率および体内
放射能残存率試験

投与後の動物を呼気回収装置のついたガ
ラス製代謝ケージ（特注品）に収容し、所定
区間毎の呼気を捕集すると同時に尿および
糞を分別採取した。呼気中の二酸化炭素は捕
集液（モノエタノールアミン、プロピレング
リコール、メタノールを1:1:1の割合）に
吸収させ、その一部を採集して放射能を測定
した。尿（ケージ洗液を含む）および糞は均
一化した後、その一部を正確に秤量し、放射

能を計測した。尿・糞・呼気中放射能排泄率
の結果は投与放射能に対する試料中放射
能の割合（% of dose）を求め、その区間
および累積値で表現した。

6. 全身オートラジオグラフの作製

投与後のラットを所定時間に安楽死させ、
液体窒素で凍結し、ミクロトーム
（CRYOMACROCUT, Leica）を用いて薄切り切
片を作製した。切片を凍結乾燥させた後、イ
メージングプレート（富士写真フィルム株式
会社）と密着露出させ、適正期間露出の後、
バイオイメージングアナライザー（BAS2000、
富士写真フィルム株式会社）により画像化し
た。

7. 組織中放射能濃度測定

放血死後所定の組織を摘出し、均一化した
後に一部を精秤した。適量の可溶化剤（ハイ
オニックフロー、パッカード）および、シン
チレーションカクテル（生体科学研究所）を
加え、液体シンチレーションカウンター
（LSC-1000、ALOKA）を用いて放射能を計測
し、組織内放射能濃度を算出した（dpm/g）。
観察組織は血液・血漿・尿・糞・卵巣・子宮・
副腎・甲状腺・下垂体・坐骨神経・腸間リン
パ節、脾、乳腺の13組織とした。測定用試
料は、必要に応じて過酸化水素による脱色を
した後に、可溶化剤を加えて処理し、計測を
行った。

定量限界はバックグラウンドの2倍とし、
この値未満をNDとした。

8. 試験実地施設：

株式会社 生体科学研究所

C. 研究結果

1. 血液・血漿中放射能濃度測定

[2, 3-¹⁴C]Acrylamide 経口投与後の血液・血漿中放射能濃度を表 1 および図 1 に示した。

血液中放射能濃度は投与後 30 分から 1 時間に最高数値 2.64 $\mu\text{g eq/mL}$ を示したが、投与後 10 分ですでに高濃度数値を認めた。最高数値後徐々に数値は低下したが長時間高濃度を保ち、投与 72 時間後でも薬物換算値は 1.02 $\mu\text{g eq/mL}$ であった。

血漿中放射能濃度は、投与後 10~30 分後に最高値 2.36 $\mu\text{g eq/mL}$ を示したが 6 時間後には約 22% に低下し、投与後 72 時間後には 0.04 $\mu\text{g eq/mL}$ と低数値であった。

[2, 3-¹⁴C]Acrylamide は経口投与後速やかに末梢血管から吸収され、全身組織へ分布し、血漿中放射能濃度とほぼ平行して減少した。一部は、その後長時間各臓器および組織中に残存し、非常にゆっくりと排出される傾向を示した。また、血液に比べ血漿中放射能濃度が低いことから [2, 3-¹⁴C]Acrylamide は血球成分に強く吸着されることが示唆された。

2. 尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定

[2, 3-¹⁴C]Acrylamide 経口投与後の尿・糞・呼気中放射能排泄率を表 2 に示した。

投与後 24 時間までに尿中に 76.03%、糞中に 7.89%、呼気中に 3.23% の排泄率が認められた。尿中へは投与後 3 時間までに尿中排泄率の約 30% が排泄され、投与後 24 時間までには 95% が排泄された。

投与後 72 時間までには尿中に 79.96%、糞中に 8.44%、呼気中に約 4.30% の排泄率が認められ、投与後 72 時間までの総回収率は

92.70% となった。

3. 組織中放射能濃度測定

[2, 3-¹⁴C]Acrylamide 2.5mg/kg 経口投与後の組織中放射能濃度を図 2 に示した。

投与後 10 分において、脾臓では最も高い数値を、乳腺では最も低い数値を認めたが、いずれの観察臓器でも高濃度値を示した。尿は投与後 1 時間、糞は投与後 6 時間、その他の観察臓器は投与後 30 分で最高濃度値を示した。

投与後 1 時間では尿と糞を除く観察臓器は減少傾向を示し、投与後 6 時間では卵巣、子宮、副腎、甲状腺、下垂体、坐骨神経、腸間リンパ、乳腺では投与後 30 分で示した最高値の半分以下の数値であった。

脾臓および血液は全ての時点で高い濃度を示し、投与後 72 時間でも血液は圧倒的に高濃度数値が確認された。しかし乳腺は他の部位に比べ、すべての時点で低い濃度であった。

これらの結果を踏まえ、[2, 3-¹⁴C]Acrylamide は投与後 10 分でも大動・静脈を経て全身にほぼ均一に分布する。その後徐々に代謝系の臓器に集められ、肝内脈を経て、投与後 1 時間以降に速やかに全身を巡り、大半は尿より排泄されることが明らかとなった。但し、その一部は血液などの臓器および組織中に残存し、ゆっくりと排泄されることが示された。一方、標的臓器と考えられる神経系細胞、甲状腺ならびに乳腺では特に高い集積性は認められなかった。

4. 全身オートラジオグラフィー

[2, 3-¹⁴C]Acrylamide 2.5mg/kg 経口投与後 10 分、30 分、1 時間、6 時間、24 時間、およ

び 72 時間の全身オートラジオグラフィーを
図 3-8 に示した。オートラジオグラフにおけ
る BAS2000 の PSL 値から半定量的黒化度とし
て測定し、可視的に高濃度、中濃度、および
低濃度レベルの 3 段階に分けて評価した。

投与後 10 分 (図 3)

高濃度レベル： 胃内壁、小腸内 (腎面、正
中面)、食道壁 (汚染)

中濃度レベル： 肝、腎、骨膜、筋膜、眼球
(水晶体)、下大動脈壁、心房、脾、皮膚

低濃度レベル： 白色脂肪体、体腔、小腸下
部内容物、舌筋、鼻腔粘膜、卵巣、副腎、硝
子体

投与後 30 分 (図 4)

高濃度レベル： 腎内壁、小腸内容物

中濃度レベル： 皮膚、水晶体、骨膜、骨髄、
骨格筋、下大動脈壁、心房、鼻腔、腎、副腎、
脾、肝、心筋、胸腺、卵巣、肺、大脳、小脳、
脾

低濃度レベル： 体腔、脊髄神経、鼻腔

投与後 1 時間 (図 5)

高濃度レベル： 尿

中濃度レベル： 肝、腎皮質、腎動脈、眼球
(水晶体)、皮膚、血球、褐色脂肪体、脾、
脾、卵巣、骨格筋、胸腺、大脳、小脳、食道
壁、下大動脈、骨膜

低濃度レベル： 鼻腔、食道、体腔、脊髄腔、
胸腔、白色脂肪体

投与後 6 時間 (図 6)

高濃度レベル： 盲腸内容物、水晶体、直腸
内容物

中濃度レベル： 肝、大脳、小脳、心房、延

髓、卵巣、脊髄、腎皮質、腎髓質、血液、肝
静脈、下大動脈、下大静脈、脾、脾、肺、腸
管粘膜、骨間軟骨

低濃度レベル： 胃内容物、体腔、肺、心室

投与後 24 時間 (図 7)

高濃度レベル： 心房、血液、下大動脈下大
静脈、肝静脈、水晶体

中濃度レベル： 卵巣、肝、腎、脾、脾、大
脳、小脳、骨格筋、心筋、胸腺、腸管、舌筋、
骨髄、唾腺

低濃度レベル： 大腸管壁、骨間軟骨

投与後 72 時間 (図 8)

高濃度レベル： 肝静脈血、心房、下大動脈
血、下大静脈血、卵巣、水晶体

中濃度レベル： 肝、骨格筋、褐色脂肪体、
舌筋、唾腺、大脳、小脳、脾、腎、副腎、肺

低濃度レベル： 小腸管壁、大腸管壁、胸腺、
硝子体、腸管内腔、胃腔、骨、脊髄、動脈壁、
皮膚、脊椎骨

これらの半定量的レベルの各器官、組織の
濃度の時間推移から血管内血液、骨膜、筋膜、
皮下等 mesenchima への ^{14}C 成分の親和性が強
く示唆された。

D. 考察

一般に動物の体内動態試験のデータとし
は雌性も小児期のものも少ない。アクリルア
ミドの食品からの推定摂取量は成人よりも
小児の方が高く、胎児期、乳幼児期あるいは
春機発動期等の幼若期の感受性も危惧され
るところである。そこで今回、発ガン試験が
行れたラットの中でも幼若期の雌性ラット

を用いて実験した。

ここでは雌性幼若ラットを用い [2, 3-¹⁴C] Acrylamide 2.5mg/kg の経口投与を行い、血液・血漿中放射能濃度測定、尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定、全身オートラジオグラフィおよび組織中放射能濃度測定を行った。

血液中放射能濃度は投与後 10 分ですでに高濃度を、30 分から 1 時間に最高数値 2.64 $\mu\text{g eq/mL}$ を示した。その後長時間高濃度を保ち、投与 72 時間後でも 1.02 $\mu\text{g eq/mL}$ であった。一方、血漿中放射能濃度は、投与後 10~30 分後に最高値 2.36 $\mu\text{g eq/mL}$ を示したが 6 時間後には約 22% に低下し、投与後 72 時間後には 0.04 $\mu\text{g eq/mL}$ と減少した。血液に比べ血漿中放射能濃度が低いことから [2, 3-¹⁴C] Acrylamide は血球成分に強く吸着されることが示唆された。

尿・糞・呼気中放射能排泄率は投与後 24 時間までに尿中に 76.03%、糞中に 7.89%、呼気中に 3.23% の排泄率が認められた。投与後 72 時間までに 79.96%、糞中に 8.44%、呼気中に約 4.30% の排泄率が認められ、総回収率は 92.70% であった。[2, 3-¹⁴C] Acrylamide は投与後速やかに吸収され、大半は速やかに尿より排泄されることが明らかとなった。呼気中排泄は ¹⁴CO₂ として 8 時間までに 6%、その後ゆっくりした排泄も見られた K. Hashimoto らの雄性ラットを用いた文献と一致した。単炭素としてエネルギー代謝に取り込まれたのではなく、一部のアクリルアミドがタンパク質等の高分子に結合し、それが分解代謝されたためと考えられる。

全身オートラジオグラフィは投与後 10 分で肝、腎、骨膜、筋膜、眼球（水晶体）、

下大動脈壁、心房、脾、皮膚に中濃度の黒化が確認された。その後非特異的に多数の臓器に残存が認められたが、投与後 72 時間で肝静脈血、心房、下大動脈血、下大静脈血、卵巣、水晶体で強い黒化が示された。これらの半定量的レベルの各器官、組織の濃度の時間推移から血管内血液、骨膜、筋膜、皮下等 mesenchima への ¹⁴C 成分の親和性が強く示唆された。

組織中放射能濃度では投与後 10 分において、脾臓では最も高い数値を、多くの臓器で高濃度値を示し、投与後 30 分では最高濃度値を示した。生体中での尿は投与後 1 時間、糞は投与後 6 時間で最高濃度値を示した。脾臓および血液は全ての時点で高い濃度を示し、投与後 72 時間でも血液は圧倒的に高濃度数値が確認された。一方、毒性の標的臓器と考えられる神経系細胞、甲状腺ならびに乳腺において特に高い集積性は認められなかった。

これらの結果を踏まえ、[2, 3-¹⁴C] Acrylamide は投与後速やかに吸収され、大動・静脈を経て全身にほぼ均一に分布する。その後徐々に代謝系の臓器に集められ、肝内脈を経て全身を巡り、大半は尿より排泄されることが明らかとなった。

以上これらの結果は精巣毒性の観点から雄性ラットを用いたアクリルアミドの体内動態についての既報と矛盾していない。M. J. Miller らの報告は、1, 10, 100mg/kg の 3 投与量で糞尿中排泄について [2, 3-¹⁴C] Acrylamide 由来の放射能は 24 時間で 53-67%、7 日間で 65-82% が排泄され、糞中排泄は 7 日間で 6% であった。そのうち 90% 以上が尿中に排泄され、3 投与量において 1 日当りの排泄量の割合は用量に依存してい

なかったため（図9）、経口投与1-100mg/kgの範囲で吸収・分布・代謝・排泄は飽和していないと結論している。また、静脈内投与10mg/kgの場合、[2,3-¹⁴C]Acrylamideの放射能の生体内分布に於いて肝臓、脂肪、腎臓、精巣等の分布濃度ピークは1時間後に見られ、2相性で減少し、その半減期は5時間と凡そ8日間であった。後者を蛋白との結合分解産物かと推論している。

W. J. Waddelらの報告は、雄性マウス全身マクロARGのデータから組織・器官の精巣毒性の特異分布を明瞭に示している（図10）。更に、雌性マウスにおいて妊娠13.5日及び17.5日に本物質を経口投与した場合、24時間後には胎児での分布がみられ、その後も胎児の皮膚において高い蓄積性が認められている（図11）。また、ラット、ウサギ、イヌ、ブタにおいても胎盤通過性を有することが報告されている。

今回はラットの中でも幼若期の雌性ラットを用いて実験した。次回以降、そのラットにアクリルアミドをヒトが摂取しているぐらいの低用量ないし中用量および高用量で経口投与し、その生体内動態と尿糞中への排泄速度やその割合を調べ、また成熟雌性ラットの場合とを比較することで、ライフステージに対応したアクリルアミドの体内動態の特性と用量反応性について研究する予定である。

E. 結論

[2,3-¹⁴C]Acrylamideを2.5mg/kgで雌性幼若ラットに経口投与したとき、ラット組織中放射能濃度は、多くの臓器で投与後10分から高濃度を示し、投与後30分で最高濃度を示した。尿・糞・呼気中への

[2,3-¹⁴C]Acrylamideの放射能の排泄率は、投与後72時間までに尿中に79.96%、糞中に8.44%、呼気中に4.30%が排泄され、投与後24時間までに尿中排泄率の95%が排泄された。これらの結果から、[2,3-¹⁴C]Acrylamideは経口投与後速やかに吸収され、全身組織へ分布し代謝され、大半は尿より速やかに排泄される。但し、その一部は血液などの臓器および組織中に残存し、ゆっくりと排泄されることが示された。一方、標的臓器と考えられる神経系細胞、甲状腺ならびに乳腺では特に高い集積性は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（2005年度一）

1) Kurebayashi H, Nagatsuka S, Nemoto H, Noguchi H, Ohno Y. Disposition of low doses of ¹⁴C-bisphenol A in male, female, pregnant, fetal, and neonatal rats. Arch Toxicol. 79(5):243-52. 2005.

2) 大野泰雄, 紅林秀雄: トキシコキネティクス Biphenyl. 摘出ヒト組織・細胞を用いた非臨床研究（大野/上川/杉山/山添編）エル・アイ・シー社 p329-333, 2005

3) 紅林秀雄: トキシコキネティクス IBP. 摘出ヒト組織・細胞を用いた非臨床研究（大野/上川/杉山/山添編）エル・アイ・シー社 p334-339, 2005

4) Kurebayashi H, Ohno Y. Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. Arch