

Toxicol. 80: 820-828. (2006)

2. 学会発表 (2005 年度 -)

1) 日本薬学会第 125 年会 (2005. 3. 30)

アクリルアミドのラット肝細胞における代謝と毒性: 紅林秀雄, 大野泰雄

2) 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3. 29)

アクリルアミドおよびグリシダミドのラット肝細胞毒性: 紅林秀雄, 大野泰雄

3) 16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (Budapest, Hungary, 2006. 9. 3-7) METABOLISM OF ACRYLAMIDE TO GLYCIDAMIDE AND THEIR CYTOTOXICITY IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES : Hideo Kurebayashi, Yasuo Ohno

4) 日本薬学会第 127 年会 (2007. 3. 28)

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: 紅林秀雄, 中澤憲一, 大野泰雄

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

19 年度計画

成熟ラットに放射性炭素を標識した C14-アクリルアミドを同用量で経口投与し, 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, 幼若ラットの場合と比較検討する。また, いずれかの実験で用量反応性が飽和していない範囲を確認する。

20 年度計画

授乳ラットに標識 C14-アクリルアミドを投与し, 母体の血中濃度と乳汁濃度を測定し, 乳汁中から乳幼児期ラットへの移行の可能性を検討する。

幼若ラットの遊離肝細胞等を用いて, アクリルアミドの代謝に関与する酵素を検討し, 体内動態との関連性を検討する。

表1. [2,3-14C]Acrylamide経口投与(2.5mg/kg)後の血液・血漿中放射能濃度

試料	観察時点*	平均放射能濃度 (dpm/mL)	平均 F 値	平均薬物換算 ($\mu\text{g eq/mL}$)
血液	10min	290600	92.15	2.30
	30min	291600	92.50	2.31
	1hr	332925	106.61	2.64
	6hr	249825	79.25	1.98
	24hr	188890	59.91	1.50
	48hr	145310	46.09	1.15
	72hr	128560	40.76	1.02
血漿	10min	291325	92.41	2.31
	30min	297375	94.33	2.36
	1hr	278900	88.47	2.21
	6hr	64160	20.35	0.51
	24hr	14065	4.46	0.11
	48hr	6860	2.17	0.05
	72hr	4975	1.58	0.04

* 同一個体から各時点(計7時点)採血する方法に従った。

図1. [2,3-14C]Acrylamide経口投与(2.5mg/kg)後の血液・血漿中放射能濃度

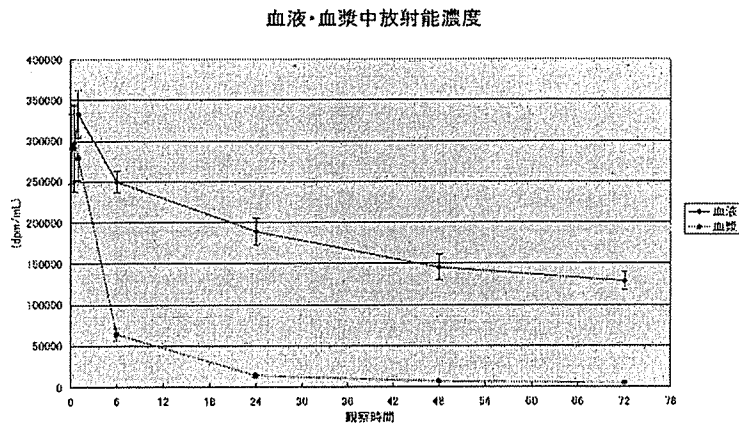
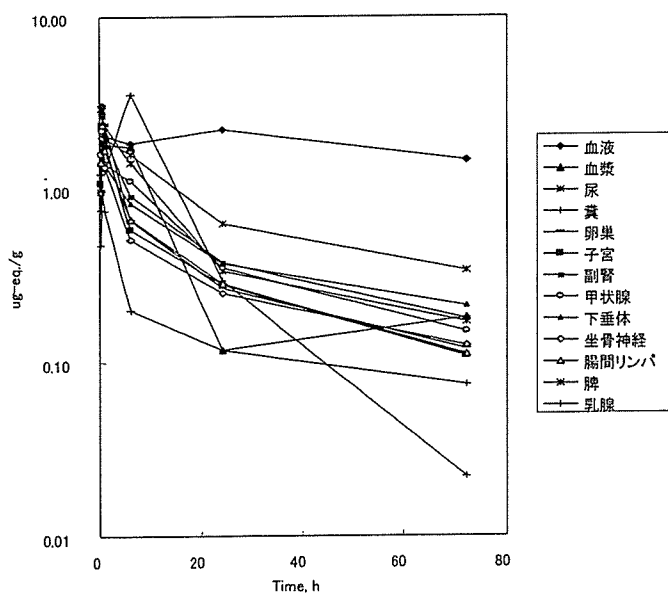


表2.[2,3-14C]Acrylamide経口投与後の尿・糞・呼気中放射能排泄率

試料	観察区間 (時間)	平均回収率 (%)	累積回収率 (%)
尿	0~3	25.19	
	3~24	50.84	76.03
	24~48	2.84	78.87
	48~72	1.09	79.96
糞	0~3	1.23	
	3~24	6.66	7.89
	24~48	0.43	8.32
	48~72	0.12	8.44
呼気	0~3	1.03	1.03
	0~24	3.23	3.23
	0~48	3.86	3.86
	0~72	4.30	4.30
総回収率			92.7

図2. [2,3-14C]Acrylamide経口投与後の組織中放射能濃度 (ug-eq/g)



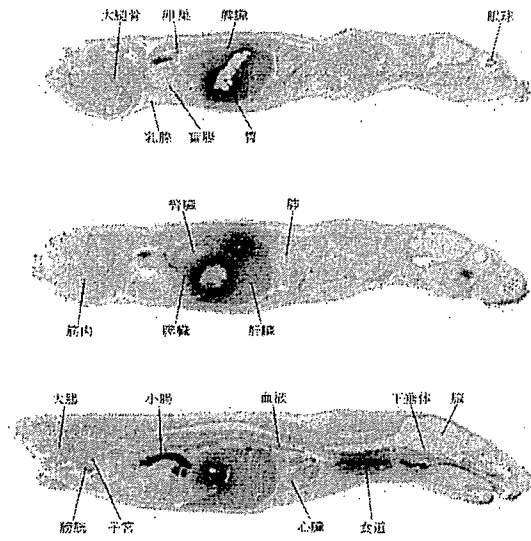


図3 [2,3-¹⁴C] Acrylamide を単回経口投与後 10 分の雌性幼若ラット全身オートラジオグラフ

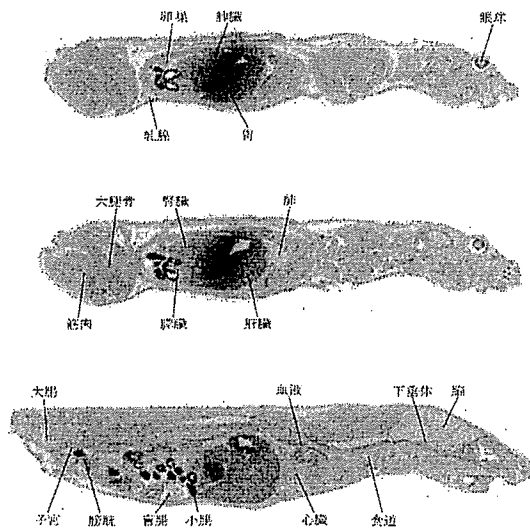


図4 [2,3-¹⁴C] Acrylamide を単回経口投与後 30 分の雌性幼若ラット全身オートラジオグラフ

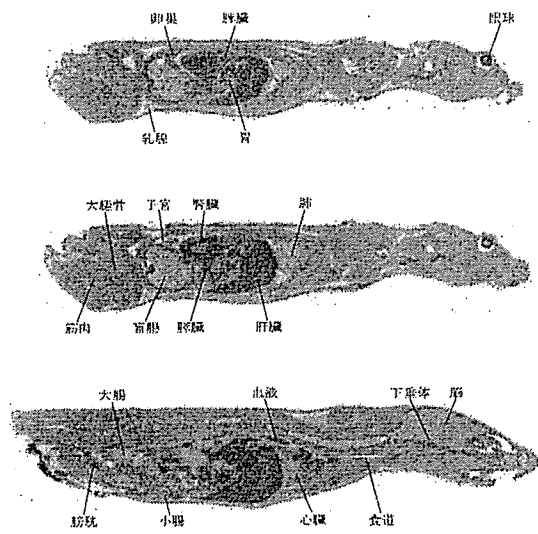


図5 [2,3-¹⁴C] Acrylamide を単回経口投与後1時間の雌性幼若ラット全身オートラジオグラフ

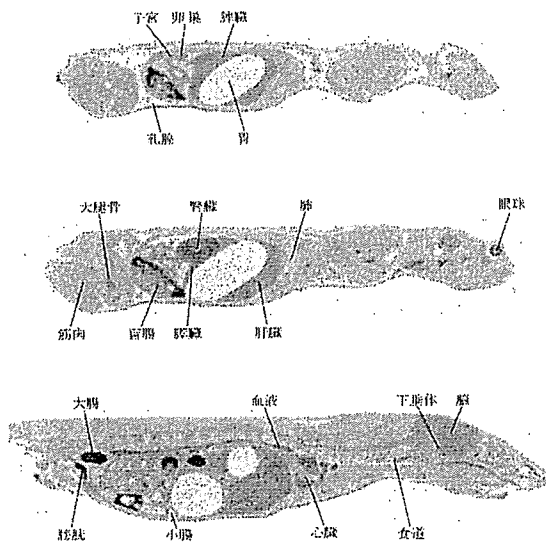


図6 [2,3-¹⁴C] Acrylamide を単回経口投与後6時間の雌性幼若ラット全身オートラジオグラフ

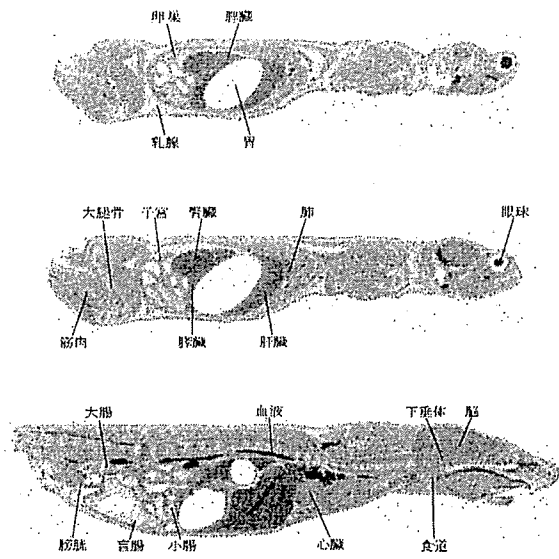


図7 [2,3-¹⁴C] Acrylamide を単回経口投与後 24 時間の雌性幼若ラット全身オートラジオグラフ

図8. [2,3-¹⁴C] Acrylamide を単回経口投与後 72 時間の雌性幼若ラット全身オートラジオグラフ

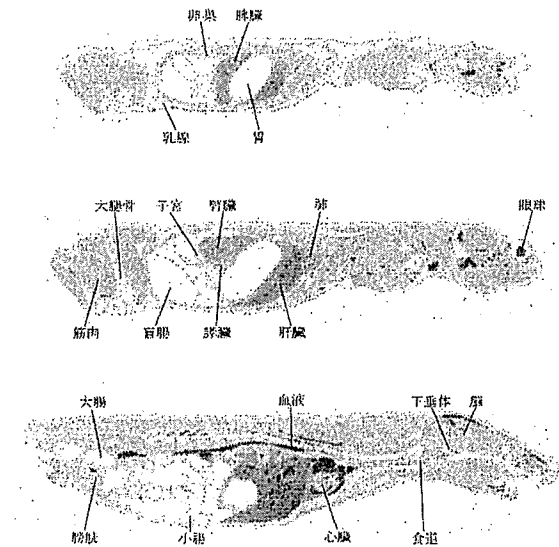


図9. 1,10,100mg/kg [2,3-¹⁴C] AA → male Fisher-334 rats
 Daily excretion of radiolabel in urine → 1日当りの尿中排泄率は用量に依存しない。
 文献1) Miller MJ, et al. Toxicol Appl Pharmacol 63:36-44(1982)より

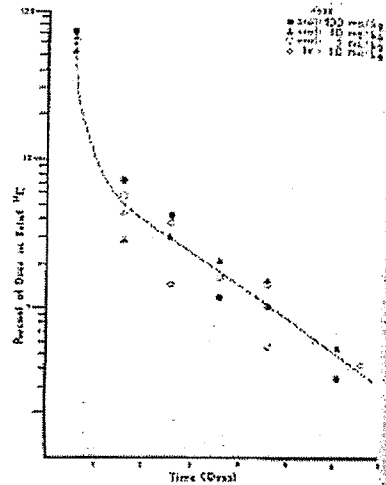


Fig. 9. Daily excretion of radiolabel in urine following oral administration of 100 (●), 10 (▲), 1 mg/kg (○), and iv administration of 10 mg/kg (◻) of acrylamide.

図10. [2,3-¹⁴C]Acrylamide経口投与 (120mg/kg) 後の雄性マウスのオートラジオグラム
 文献4) Waddell WJ, et al. Toxicol Appl Pharmacol 86:457-65(1986)より
 精巢実質組織 (3時間, 図左上) から細精管を通じて精巢上体頭部 (9時間, 図上右)
 、生殖管: 精巢上体尾部から陰茎部へ (9日後, 図下)

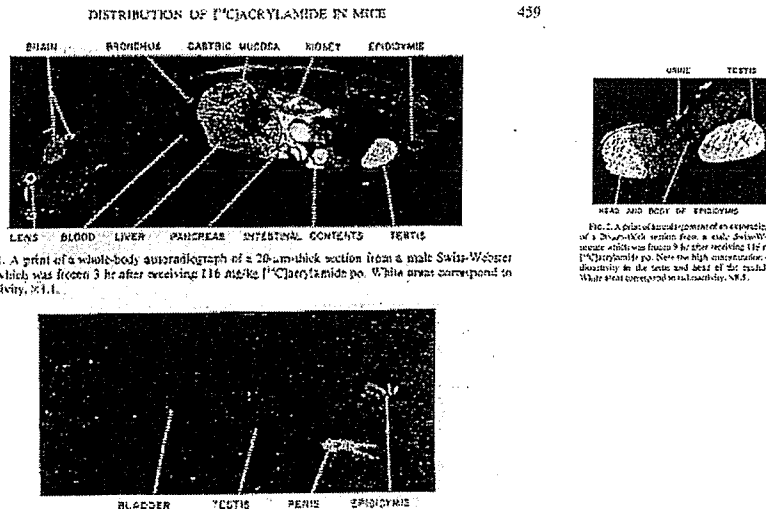


FIG. 1. A print of a whole-body autoradiograph of a 20-μm-thick section from a male Swiss-Webster mouse which was frozen 3 hr after receiving 116 mg/kg ¹⁴C acrylamide po. White areas correspond to radioactivity. X1.1.

FIG. 2. A print of an enlargement of an autoradiograph of a 20-μm-thick section from a male Swiss-Webster mouse which was frozen 9 hr after receiving 116 mg/kg ¹⁴C acrylamide po. Note the high concentration of radioactivity in the head and body of the epididymis. White areas correspond to radioactivity. X8.

FIG. 3. A print of an enlargement of an autoradiograph of a 20-μm-thick section from a male Swiss-Webster mouse which was frozen 9 days after receiving 120 mg/kg ¹⁴C acrylamide po. White areas correspond to radioactivity. X5.3.

図11. [2,3-¹⁴C]Acrylamide経口投与(120mg/kg)後の妊娠17.5日マウスのオートラジオグラム

文献4) Waddell WJ. Et al. Toxicol Appl Pharmacol 86:457-65(1986)より。
 マウス胎児では成獣と類似の腎臓、膀胱、肝臓、腸管、前胃粘膜、皮膚で高濃度放射能の分布がみられ(投与後3時間: 図上)、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(投与後24時間: 図下)。

462

MARLOWE ET AL.

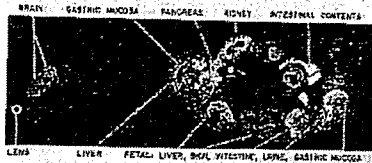


FIG. 7. A print of whole-body autoradiograph of a 20-µm-thick section from a 17.5-day pregnant Swiss-Webster mouse which was frozen 3 hr after receiving 120 mg/kg [¹⁴C]acrylamide po. White areas correspond to radioactivity. X1.1.



FIG. 8. A print of a whole-body autoradiograph of a 20-µm-thick section from a 17.5-day pregnant Swiss-Webster mouse which was frozen 24 hr after receiving 120 mg/kg [¹⁴C]acrylamide po. White areas correspond to radioactivity. X1.1.

分担研究報告書（平成 18 年度）

ライフステージによるアクリルアミドの神経毒性および精巣毒性の病理解析

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長

協力研究者 高橋 美和 国立医薬品食品衛生研究所病理部 研究員

研究要旨：本研究では、アクリルアミド(ACR)の神経毒性および精巣毒性に関して、胎児期、乳幼児期、春機発動期、成熟期など各々のライフステージにおける特性及び感受性の違いを実験的に明らかにする。今年度は、ヒトでの胎児期、乳児期に相当する時期での ACR による神経毒性および精巣毒性の感受性をラットを用いて検討した。方法としては、妊娠 10 日目の SD:IGS ラットに ACR を 0, 50, 100, 200 ppm の用量で離乳(生後 3 週)まで飲水投与し、母動物および児動物について神経系および雄性生殖器官を中心に組織学的検索を行った。半数の児動物は離乳後無処置のまま生後 11 週まで維持し同様に検索した。母動物においては、ACR の用量依存性に神経症状の進行および体重減少が認められ、病理組織学的検索や坐骨神経および小脳の形態計測においても、100 ppm 以上で神経障害を示唆する形態変化が確認された。児動物においては、雄では 50 ppm 以上、雌では 100 ppm 以上で出生直後より用量に依存した体重低値が認められ、体重低値は生後 11 週まで持続して認められた。しかし、児動物には神経症状は観察されず、組織学的検索においても、母動物の全身状態悪化に起因する発達遅延の影響が認められたものの、神経毒性および精巣毒性作用は確認されなかった。母動物を介した ACR の胎児・授乳期暴露による児動物の体重低値に関しては、ACR による発達期毒性作用のひとつと考えられており、ACR の胎盤通過性も確認されていることから、本研究においても、少なくとも胎児期暴露時での ACR の児動物影響と考えられた。また、成熟動物での ACR の標的である神経、精巣は、発達期においては ACR に対する感受性の低い可能性が指摘できるものの、母動物の全身状態の悪化に伴った乳汁を介した ACR 暴露の減少が、児動物に対して体重低値以外の明らかな臓器毒性を示さなかった原因のひとつと考えられた。

A. 研究目的

アクリルアミド(ACR)は紙力増強剤、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、土壌安定剤などの用途で工業的に広く用いられているが、2002 年 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って ACR 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 ACR に暴露されている可能性が指摘された。ACR はヒトやげっ歯類に対して神経毒性、生殖発生毒性および発がん性を示すことから、現在食品中の ACR のリスク評価が国際的に進められている。食品中の ACR の生成は、アスパラギンと糖類のメイラード反応によって生成していると考えられており、ポテトチップス類の製造過程等で多量に生成される(1312 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。一般的なヒト一日当たりの ACR 平均摂取量は、0.8~6.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重(短期摂取の場合)、0.3~0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重(長期摂取の場合)とされているが、体重 kg 当たりで表した場合、成人よりも乳幼児を含む小児の方が、摂取量が高くなるものと推測される。これまで ACR の毒性に関

する研究は、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、乳幼児期あるいは春機発動期におけるデータは乏しい。したがって、胎児・乳幼児期における代謝様式や臓器組織の成熟度など、成熟動物との生理的な違いを考慮した ACR の毒性評価を実施することは、ヒトに対するリスク評価を行う上で重要と考えられる。

そこで本研究では、ACR の毒性のうち特に神経毒性および精巣毒性に関して、胎児期、乳幼児期、春機発動期、成熟期など各々のライフステージにおける特性及び感受性の違いを実験的に明らかにする。また、ACR は多様な加工食品に含まれ、その摂取量をゼロにすることは極めて困難であることから、リスク軽減策の一つとして ACR の毒性を抑制する食品成分の探索を目指す。ACR の感受性に対する週齢の影響については、ラット、マウスを用いた研究報告が少数あるが(Kaplan and Murphy, Toxicol Appl Pharmacol., 1972, 22: 259-268; Ko et

al., *Exp Neurol.*, 1999, 158: 37-46), 報告によって結果は様々であり統一した見解は得られていない。妊娠ラットに ACR 4~5 mg/kg/day を投与すると児動物の体重抑制を生じることから, ACR は発達毒性作用を示すことは明らかであり, 母動物に神経症状を起こすような高用量暴露(15 mg/kg/day)では発達神経毒性を示すことも報告されている。しかし, 母体に対する ACR の毒性作用と児動物に対する ACR の影響を明確に区別することは難しく, 胎児期~授乳期のどの期間が発達毒性作用に重要であるのかは明らかにされていない(NTP-CERHR-Acrylamide-04, 2004)。今年度は, 器官形成期を含む胎児期と授乳期の全期間を通じた ACR 暴露による児動物に対する神経毒性および精巣毒性について評価を行ったので報告する。

B. 研究方法

実験デザインを Fig. 1 に示す。妊娠 3 日目の雌性 SD:IGS ラット 12 匹(日本チャールズリバー)を 1 週間馴化した後, 各群 3 匹ずつ 4 群に分け, 妊娠 10 日目から離乳(出産後 3 週目)までの間, ACR(Sigma) 0, 50, 100, 200 ppm を飲水投与した。ACR の投与濃度は, 飲水投与により 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 を最高用量として設定した(Lee et al., *Arch Toxicol.*, 2005, 79: 531-541)。母動物は各ケージに 1 匹ずつ収容して粉末基礎飼料(CRF-1: オリエンタル酵母)を自由に摂取させ, 胎児・授乳期にわたり定期的に体重, 摂餌量および摂水量を測定し, 臨床症状の観察を行った。児動物については, 生後 2 日目に出生児数, 体重の測定および性別の判定を行い, 生後 3 日目に母動物 1 匹あたり雌雄各 4 匹となるようにリッター・サイズを調整した。生後 3 週で離乳させ, この時点で母動物全例および児動物の雌雄半数を解剖した。残りの半数の児動物は水道水に切り替えて維持し, 生後 11 週に解剖を行った。実験期間中, 児動物についても定期的に体重測定および臨床症状の観察を行った。

3 週および 11 週の解剖時には, 母動物, 児動物ともに脳, 脊髄, 三叉神経, 坐骨神経, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 精巣, 精巣上部, 骨格筋を採取し, 脳, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 精巣, 精巣上部については重量を測定した。また, 母動物については子宮を摘出し着床痕の数を記録

した。脳はメタカーン固定液(4℃, overnight), 精巣はブアン固定液(室温, overnight)にて固定し, 脊髄, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 精巣上部, 三叉神経, 骨格筋は 10%リン酸緩衝ホルマリンで固定した。それぞれ定法に従ってパラフィン包埋切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施した。坐骨神経は摘出前に 2.5%グルタルアルデヒドの点滴固定を行った後採取し, エポキシ包埋後, 1μm 切片を作成し, トルイジンブルー染色を行った。

小脳および骨格筋については, synaptophysin(SYP)に対する免疫染色を実施した。SYP はシナプス前終末マーカーとして知られ, 骨格筋では神経筋接合部に陽性を示す。また, 神経終末障害の間接的マーカーとして, 小脳分子層における SYP 陽性の異常な点状染色像が ACR 投与によって増加することが報告されている(Lee et al., *Arch Toxicol.*, 2005, 79: 531-541)。抗体は Anti-synaptophysin rabbit polyclonal antibody (Ab-4, LAB VISION corporation, x200 dilution)を用い, ABC法(Vector; Elite kit)により DAB 発色を行った。抗原抗体反応前の抗原賦活化のため, 骨格筋についてはオートクレーブ処置を 120℃, 5 分を行った。

坐骨神経および小脳分子層については, Fujix Digital Camera System (Fujifilm)を備えた Vanox-S microscope (Olympus Optical Co., Ltd.)により各個体 1 枚の組織写真を撮影し, MacSCOPE image analysis software package (Version 3.61, Mitani Corp)による計測を行った。坐骨神経においては, 400 倍視野で撮影した画像について, 変性軸索の割合, 神経線維密度, 萎縮した有髄神経線維(径 < 3μm)の数を計測した。小脳分子層においては, 200 倍視野で撮影した画像上で小脳皮質の長さを求めた後, 同じ範囲について顕微鏡下で SYP 陽性の異常な点状染色像の個数を計測し, 皮質の長さ(mm)に対する点状染色像の数を算出した。

母動物の摂水量, 摂餌量, 体重, 臓器重量, 繁殖パラメーター, 坐骨神経および小脳分子層の形態計測値については各群の分散を確認後, StudentあるいはWelchの*t*検定によって比較を行った。児動物の体重, 臓器重量, 坐骨神経および小脳分子層の形態計測値については各群の分散を Bartlett の方法で検定し, 等分散の場合は一元配置の分散分析を行い, 不等分散の場合は

Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合、その多重比較は Dunnett の方法で ACR 0 ppm 群と 50, 100, 200 ppm 群の間で有意差検定を行った。組織学的検索で認められた病変の発生率は Fisher 直接確率検定で、病変のグレードは Mann-Whitney U 検定によって比較を行った。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮として、主な動物投与実験は経口投与により行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。また、動物はエーテル深麻酔下で大動脈ないし心臓からの脱血ないしにより屠殺したため、動物に与える苦痛は最小限にとどめた。

C. 研究結果

投与期間中の母動物の摂水量は、200 ppm 群では妊娠・授乳期間を通して低値を示したまま推移し、100 ppm 群においても授乳期間を通して低値を示した(Fig. 2)。母動物の摂餌量は、ACR 投与期間中を通して用量依存性に低値傾向を示し、その傾向は授乳期間の後期になるにつれ顕著になった(Fig. 3)。母動物の体重は妊娠から用量依存性に増加抑制傾向を示し、100, 200 ppm 群では授乳期において大きく低値を示し、体重の増加を認めなかった(Fig. 4)。妊娠・授乳期間を通じた ACR の平均一日摂取量は 50, 100, 200 ppm 群において、それぞれ 9.9 ± 0.5 , 16.7 ± 2.1 , 22.2 mg/kg/day と算出された。200 ppm 群では妊娠 20 日目より軽度の神経症状が現われ、経時的に症状が進行し、授乳開始 14 日以降重度の神経症状を呈した。100 ppm 群では授乳開始 14 日から軽度の神経症状が観察され、その後中等度～重度に進行した。0 および 50 ppm 群では神経症状は確認されなかった。200 ppm 群の母動物 1 例において、出産時に胎児が体内に残存し全身状態の悪化が認められたため出産後 2 日目に安楽殺した。妊娠期間、着床痕数、児動物の生存率、児動物の性別については群間で明らかな差を認めなかったが、生後 2 日目の児動物の体重は雄では 50 ppm 以上、雌では 100 ppm 以上で用量依存性に有意に低値を示した(Table 1)。解剖時の母動物の体重および臓器重量を Table 2 に示す。母動物の体重は 0 ppm 群(323.6 g)と比較して、100 ppm では 284.3 g (-12%)、200 ppm では 235.5 g (-27%)と大幅に減少した。また、

100 ppm 以上では肝臓、脳、脾臓、腎臓絶対重量が減少し、相対重量では脳では増加傾向、肝臓では減少傾向を示した。

離乳(生後 3 週)までの児動物の観察においては、一般状態に群間の差は認められなかった。児動物の体重は、出生直後より雄では 50 あるいは 100 ppm 以上、雌では 100 ppm 以上において用量依存性に有意に低値を示したまま生後 3 週まで推移し、その差は日齢が進むにつれて広がっていった(Fig. 5A, B)。生後 3 週の解剖時における児動物の体重および臓器重量を Table 3 に示す。児動物の体重は、0 ppm (雄; 59.73 g, 雌; 56.00 g)と比較して 100 ppm では雄で 33.65 g (-44%)、雌で 34.03 g (-39%)、200 ppm では雄で 15.38 g (-74%)、雌で 16.30 g (-71%)と 100 ppm 以上で著しく低値を示し、解剖時の観察において、100 ppm 以上の児動物では胃内の乳汁が少量しか認められなかった。オスでは 100 ppm 以上で脳、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体の絶対重量および脾臓の絶対/相対重量の減少と脳相対重量の増加が認められた。また、200 ppm において肝臓相対重量が減少し、腎臓相対重量が増加した。雌においても、100 ppm 以上において肝臓、腎臓の絶対重量および脾臓の絶対/相対重量の減少と、脳相対重量の増加が認められた。200 ppm では更に、脳の絶対重量が減少し、腎臓相対重量が増加した。肝臓相対重量は用量依存性に減少傾向を示した。

離乳から生後 11 週までの児動物の一般状態についても群間の差は認められず、神経症状を示す個体は確認されなかった。200 ppm 群の雌の児動物 1 例が、生後 4 週に死亡したが、死因は特定できなかった。児動物の体重はいずれの群も一定の増加傾向を示したが、雄では 100 ppm 以上で用量依存性に有意に低値を示したまま推移した(Fig. 6A)。雌においても同様の推移を示し、生後 4, 5 週では 100 ppm 以上、その後は 200 ppm 群で有意に低値を示した(Fig. 6B)。生後 11 週の解剖時には、雄の児動物の体重は 0 ppm (473.5 g)と比較して 100 ppm で 342.4 g (-28%)、200 ppm で 299.6 g (-37%)と有意に低値を示した。また、50 ppm 以上で精巣上体絶対重量の減少、100 ppm 以上で脳、肝臓、脾臓、精巣の絶対重量の減少および脳相対重量の増加、200 ppm で腎臓絶対重量の減少および精巣相対重量の増加が認められた(Table 4)。雌では 200 ppm で体重(191.8 g, -29%)、脳、肝

臓、腎臓絶対重量の減少が認められ、100 ppm で脾臓の相対重量が増加した(Table 4)。

病理組織学的検索の結果、母動物では三叉神経において神経節細胞の中心性色質融解が用量依存性に増加した(Table 5)。坐骨神経および小脳分子層の形態計測においても、ACR 投与量に相関して、神経線維密度の減少、変性軸索の増加、萎縮した有髄神経線維(径 $<3\mu\text{m}$)の増加、SYP 陽性の異常な点状染色像の増加が観察された(Table 6)。骨格筋では神経筋接合部の分布に群間の差は認められなかった。また、肝臓、脾臓、腎臓、脊髄にACR 投与による組織学的変化はみられなかった。

生後3週の子動物では、雌雄ともに小脳外顆粒層細胞の残存の程度と小脳顆粒細胞のアポトーシスが、ACR の用量に伴い増加傾向を示した(Table 7)。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、0 ppm 群では精母細胞が3~4層程度重なっているのに対し、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、精上皮の発育遅延が明らかであった。三叉神経、腎臓、精巣上体においてはACR 投与による影響は認められなかった。生後11週の子動物の病理組織学的検索では、いずれの臓器においてもACR 投与による影響は明らかではなかった(Table 8)。生後3週の子動物の坐骨神経は母動物に比べて神経線維の径が全体的に小さく、ACR の用量に伴って更に小型化する傾向がみられた。形態計測の結果、雌雄ともに神経線維密度および径 $<3\mu\text{m}$ の有髄神経線維数がACR の用量に伴って増加傾向を示したが、変性軸索の割合についてはACR 投与による有意な変化は認められなかった(Table 9)。小脳分子層の形態計測においても、SYP 陽性の異常な点状染色像の数に群間の差は認められなかった。生後11週における坐骨神経および小脳分子層の形態計測では、いずれの項目においても群間の差は認められなかった(Table 10)。また、骨格筋における神経筋接合部の分布については、3週、11週とも群間の差は認められなかった。

D. 考察

本研究の母動物においては、ACR の用量依存性に神

経症状の進行が認められ、病理組織学的検索や坐骨神経および小脳の形態計測においても、100 ppm 以上で神経障害を示唆する形態変化が確認された。ACR 投与期間中、母動物の体重は用量依存性に抑制傾向を示し、解剖時の母動物の体重は、0 ppm 群に比べて100 ppm では-12%、200 ppm 群では-27%と大きく減少していた。過去の報告のうち、SD ラットの妊娠7日から離乳まで摂餌量制限を行い、その影響を検索した実験において、母動物の体重は摂餌量を10%制限した場合には1-5%、30%制限した場合には10-20%、50%制限した場合には17-32%減少し、本研究と類似した推移を示している(Carney et al., Toxicol Sci., 2004, 82, 237-249)。本研究においても、特に出産後の授乳期間中でのACR 投与量に依存して摂水量、摂餌量が大きく減少しており、神経障害の進行に伴って栄養状態の悪化を招いたものと推測される。妊娠期間、着床痕数、子動物の生存率、子動物の性別については群間の差を認めず、本研究の投与条件下ではACR による生殖・発生パラメーターに対する影響は乏しいものと考えられた。200 ppm 群の1例で母体内に胎児が残存したが、ACR 投与に起因するか否かは明らかではなかった。

本研究の子動物においては、雄では50 ppm以上、雌では100 ppm以上で出生直後より体重低値が顕著であり、生後11週まで持続して認められた。過去の報告で、SDラットの妊娠6日~授乳10日にACR 0, 5, 10, 15, 20 mg/kg/dayの用量で経口投与を行った実験では、母動物が神経症状を生じる用量(15 mg/kg/day)よりも低い用量から子動物の体重抑制が認められ、胎児期のACR投与による発達毒性作用は、子動物の体重に最も鋭敏に表れることが示されている(Wise et al., Neurotoxicol Teratol. 1995, 189-198)。一方、Wistarラットを用いて、授乳中の母動物にACR 25mg/kg/dayを経口投与した実験では、母動物の体重、摂餌量、摂水量の減少と共に、雄の子動物の体重が生後4日から有意に低値を示すことが報告されている(Friedman et al., Reprod. Toxicol. 1999, 511-520)。この実験では、子動物の胃内に乳汁が殆ど含まれなかったことから、乳汁を介したACRの暴露は極めて少なく、子動物の体重減少はACR投与による母体の栄養不良に起因すると結論されている。本研究では雄の子動物において、母動物が神経症状を示した用量

よりも低い50 ppm以上で生後2日から体重抑制が認められており、特に出生直後に認められた児動物の体重抑制には、胎児期に投与されたACRの発達毒性作用が関与するものと考えられる。その一方で、胎児期・乳児期に母ラットの摂餌量を30%制限した場合では生後7日以降、50%制限した場合では生後1日目から児動物の体重が有意に低値を示すことが報告されており (Carney et al., Toxicol. Sci. 2004, 237-249)、本研究においても100 ppm以上で母動物の体重が著しく減少していたことから、暴露期間中の児動物の体重抑制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。体重低値は生後11週まで持続して認められたが、このような推移は乳児期におけるACR暴露実験(Friedman et al.)や、胎児期・乳児期における食事制限の実験(Carney et al.)においても観察されており、ACRによる毒性影響を区別することは困難であった。

本研究では行動学的検査は行っていないが、一般的な臨床症状観察では、児動物に母動物で認められたような姿勢異常等の神経症状は認められなかった。組織学的検索では、生後3週において小脳外顆粒層細胞の残存や顆粒細胞のアポトーシス、肝臓および脾臓の髄外造血減少、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ACR投与と相関して認められたが、母動物の全身状態悪化による影響とACRの児動物への直接作用を判別することは困難であった。坐骨神経および小脳分子層の形態計測では、坐骨神経において神経線維密度および径 $< 3 \mu\text{m}$ の有髄神経線維数がACRの用量に伴って増加傾向を示したが、坐骨神経線維の径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。変性軸索やSYP陽性の異常な点状染色像については、生後3週、11週齢時ともに群間の差は認められず、生後11週では神経系・精巣を含むいずれの臓器においてもACRの影響を示唆する所見は得られなかった。

報告では、授乳期におけるACR暴露実験において、児動物に神経症状は認められていないが、これは母動物の栄養不良のために、児動物では乳汁を介したACRの暴露は極めて少なかったためと考えられている (Friedman et al., Reprod. Toxicol. 1999, 511-520)。本研究では、授乳期間中においては母動物の栄養状態あるいは

進行性の神経症状の影響は大きいと推察され、乳汁を介したACR暴露量はかなり少なかった可能性が高い。一方、ACRを胎児期・乳児期に投与した場合、母動物が神経症状を示す用量15 mg/kg/dayでは児動物においてmotor activityとauditory startle responseの減少が観察されている(Wise et al., Neurotoxicol Teratol. 1995, 189-198)。また、妊娠F344ラットに妊娠7日目～出産までACRを0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/kgの割合で経口投与し、更に生後1～22日まで同じ用量を児動物に経口投与した実験では、10 mg/kg/day群において生後21～22日にnegative geotaxis performance, linear trend in fall-time latencies on Rotarod performanceに対する作用が認められており(Garey et al., Neurotoxicol. Teratol. 2005, 553-563)、経胎盤あるいは経口投与により確実に児動物がACRに暴露されれば、何らかの行動異常を生じることが示されている。しかし、このような発達期暴露で生じる行動異常は、成熟動物、例えば今回の母動物への暴露によって明らかに観察された進行性の姿勢異常とは影響の質と程度が異なると考えられる。一方、ヒトにおいて、胎盤を介し胎児も母体と同程度のACR暴露を受けることが示唆されていることから(Schettgen et al., Int Arch Occup Environ Health, 2004, 77: 213-216)、本研究においても胎児期のACR暴露は成立していたと推測される。本研究の母動物における妊娠・授乳期間を通したACRの平均一日摂取量は、100 ppm群では16.7 mg/kg/day、200 ppmでは22.2 mg/kg/dayであり、過去の報告で母動物に神経症状を生じる用量と同程度の暴露量であった。成熟動物における神経障害の標的は神経終末と考えられているが、神経終末は今回の暴露実験においては発達途上の時期にあり、かつ可塑性が高いため、ACRに対する感受性を示さない、あるいは強い可塑性によりその障害が打ち消されてしまっている可能性がある。また、本実験モデルは成熟動物において4週間以内に進行性の神経症候を及ぼすものであるため、妊娠10日目から2週間に満たない期間(妊娠期間)での暴露では形態的に検出しえる神経変化を誘発しなかった可能性がある。今後は、ACRによる臓器毒性の発達期での感受性を規定する要因の有無を明らかにする目的で、母動物の全身状態を比較的保持し、4週間の投与で成熟動物に神経毒性を誘発することが示された100 ppm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（各4週間以上）、毒性の発現状態を検討する。ACRの精巣毒性には、減数分裂後の精上皮細胞に対するDNA付加体形成が関与すると考えられており、精子形成が始まる以前ではACRに対して感受性を示さない可能性も考えられるが、神経毒性と同様に母動物の影響が懸念されることから、発達期精巣での感受性の有無については更に検索が必要である。

E. 結論

母動物に対する ACR の飲水投与により、母動物に対して神経症状を誘発した 100 ppm 以上の投与濃度でも、児動物に対しては母動物にみられるような神経変化は誘発されないことが明らかとなった。同様に、成熟動物への暴露で生じる精巣毒性も生じないことが明らかとなった。これらの結果は、ACR の胎児期・乳児期暴露では、ACR の毒性標的が発達途上であるため、不感受性であったり、高い可塑性により保護されている可能性を示唆する。一方、児動物の体重抑制の一部には ACR の発達毒性作用が関与するものの、授乳期間中で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 ACR の児動物への移行が低いと考えられ、母動物毒性量での児動物に対する ACR の臓器毒性が見出されなかった原因のひとつと考えられた。胎児期暴露では、胎盤を介した ACR の胎児への移行は成立していたと考えられたが、2 週間に満たない暴露によっては毒性変化を形態学的に検出しえない可能性が指摘された。以上より、母動物を介した児動物に対する ACR の毒性評価や感受性の比較については、母動物毒性の影響を考慮する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. 学会発表

特になし。

F. 知的所有権の取得状況

特になし。

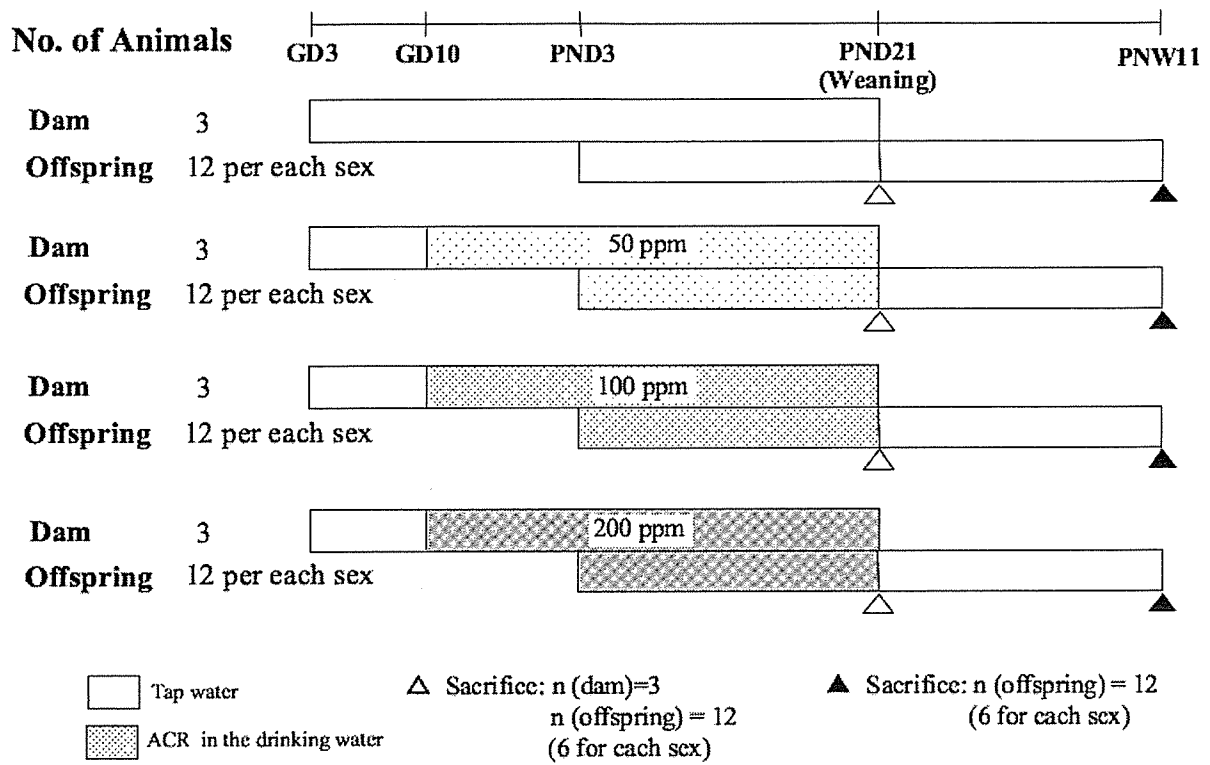


Figure 1. Experimental design.

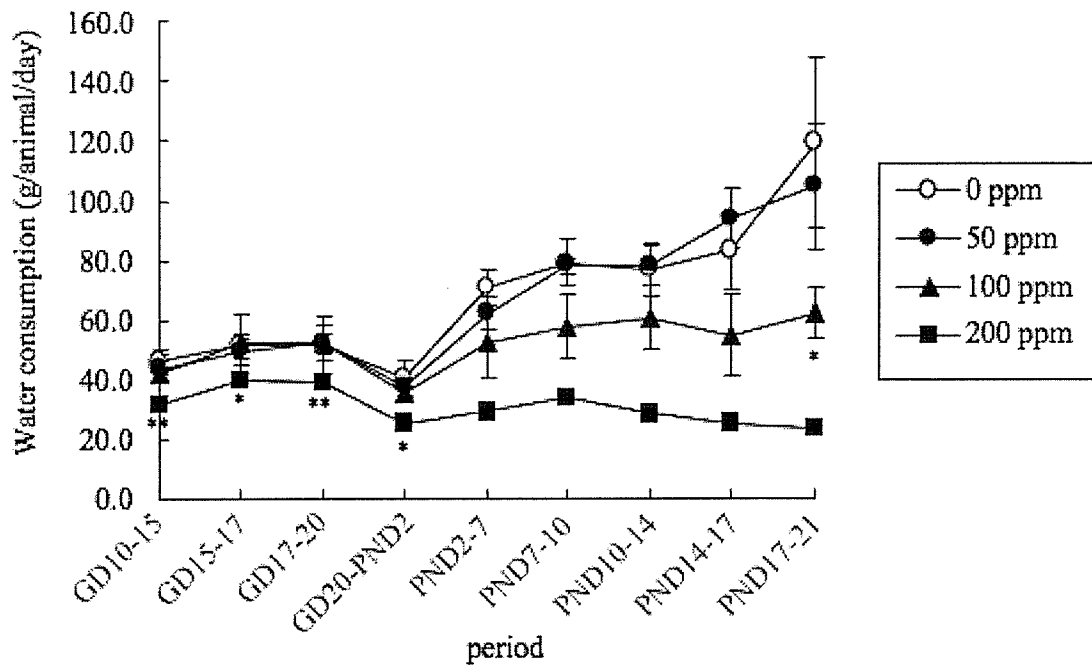


Figure 2. Time course of water consumption in dams given ACR in the drinking water for gestation and lactation periods.

* , ** : $p < 0.05$, $p < 0.01$ vs. 0 ppm group.

Abbreviation: GD, gestation day; PND, postnatal day

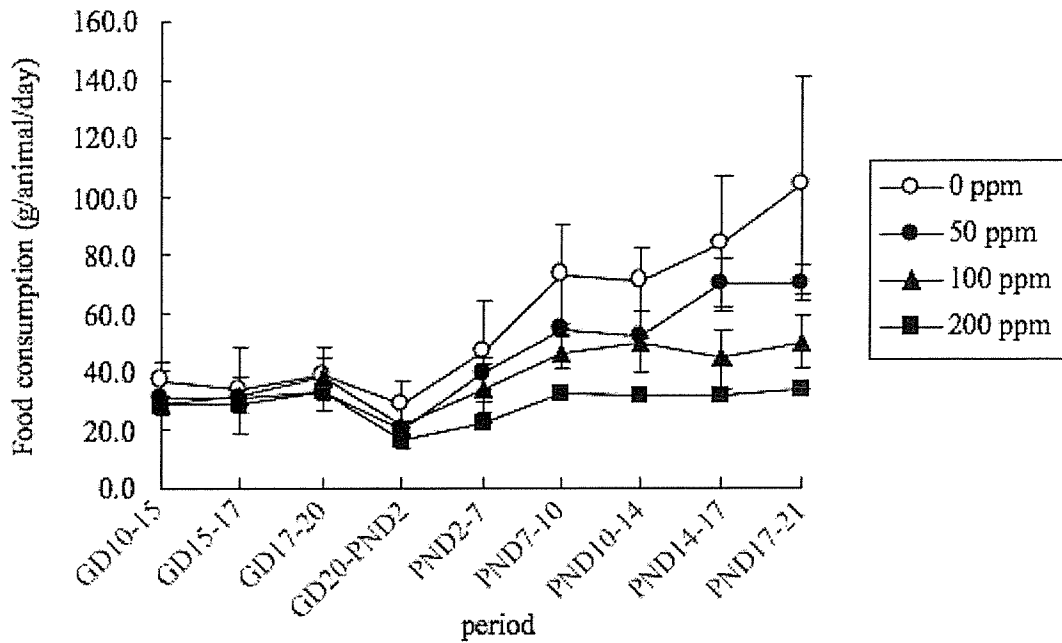


Figure 3. Time course of food consumption in dams given ACR in the drinking water for gestation and lactation periods.

Abbreviation: GD, gestation day; PND, postnatal day

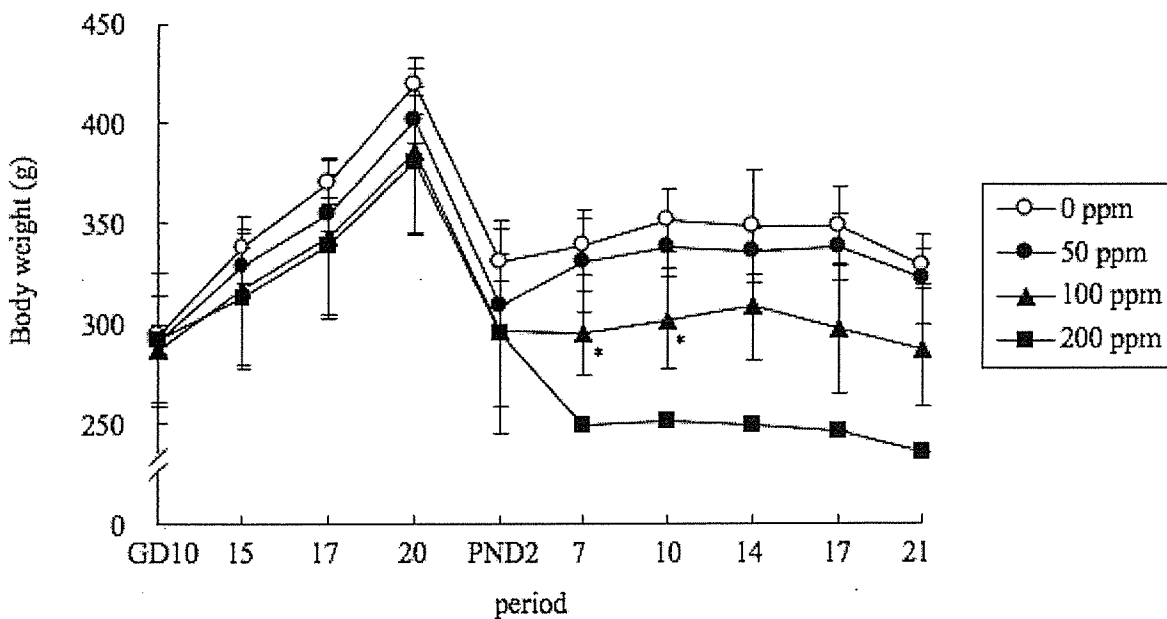


Figure 4. Body weight changes of dams given ACR in the drinking water for gestation and lactation periods.

*: $p < 0.05$ vs. 0 ppm group.

Abbreviation: GD, gestation day; PND, postnatal day

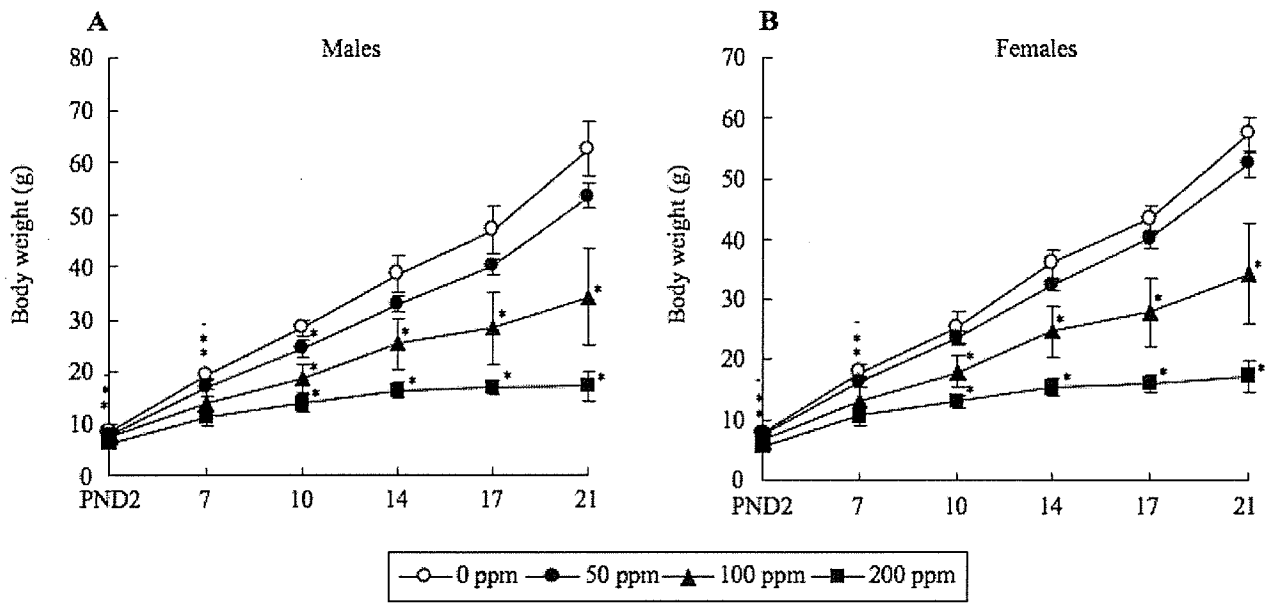


Figure 5. Body weight changes of F1 offspring before weaning.

* : $p < 0.01$ vs. 0 ppm group.

Abbreviation: PND, postnatal day

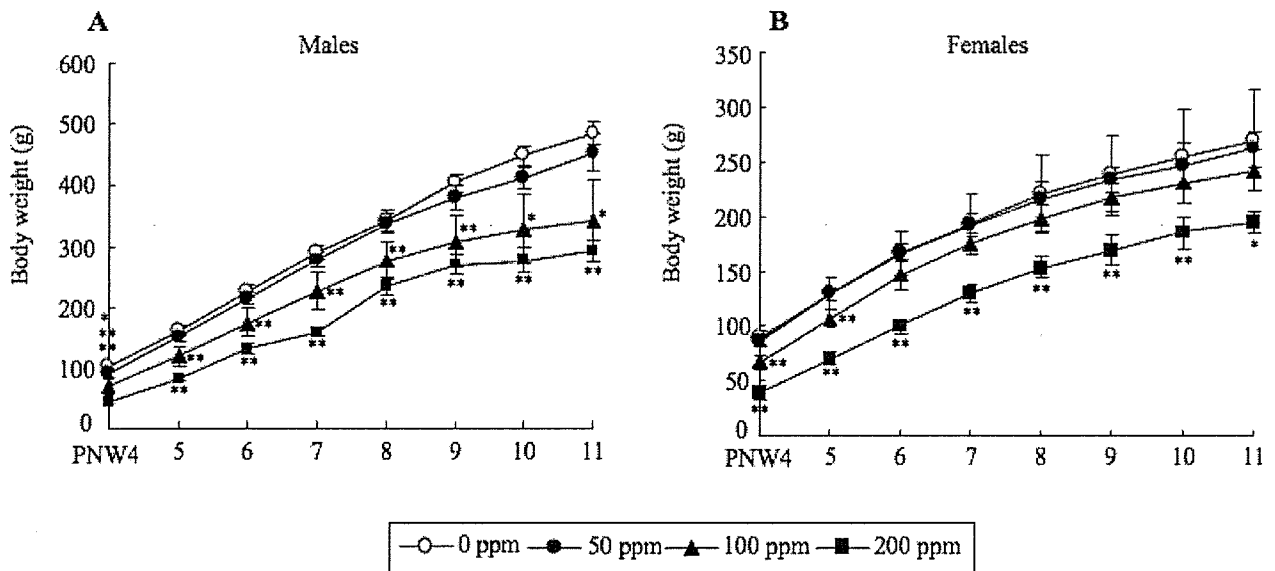


Figure 6. Postweaning body weight changes of F1 offspring.

*, **: $p < 0.05$, $p < 0.01$ vs. 0 ppm group.

Abbreviation: PNW, postnatal week

Table 1. Reproductive data.

	Acrylamide in the drinking water (ppm)			
	0	50	100	200
No. of animals	3	3	3	3
Gestational length (days)	22.0 ± 0.0 ^a	22.0 ± 0.0	21.3 ± 0.6	21.7 ± 0.6
No. of implantation/dam	13.3 ± 0.6	13.7 ± 1.2	13.7 ± 2.1	13.3 ± 2.1
Live birth (%) [#]	100	100	100	94
No. of live pups/litter ^b	12.7 ± 1.2	12.3 ± 2.5	11.3 ± 1.2	11.3 ± 3.8
No. of male pup ^b	8.7 ± 2.5	6.0 ± 4.6	5.0 ± 1.0	5.3 ± 2.3
No. of female pup ^b	4.0 ± 1.7	6.3 ± 3.2	6.3 ± 2.1	6.0 ± 3.6
Male ratio (%)	67.9 ± 15.6	46.7 ± 28.5	45.0 ± 13.6	49.1 ± 17.9
Male pup weight ^b (g)	8.27 ± 0.45	7.58 ± 0.66*	7.27 ± 0.65*	6.01 ± 0.39*
Female pup weight ^b (g)	7.97 ± 0.35	7.52 ± 0.43	6.67 ± 0.74*	5.59 ± 0.47*

^a: mean ± SD

^b: measured at PND2

[#]: Live birth (%)=No. of live pups delivered/Total no. of pups delivered×100

*: p<0.01 vs. 0 ppm group

Table 2. Body and organ weights of dams at weaning.

	Acrylamide in the drinking water (ppm)			
	0	50	100	200
No. of animals	3	3	3	2
Body weight (g)	323.6 ± 14.8 ^a	318.1 ± 23.9	284.3 ± 26.4	235.5
Brain (g)	1.90 ± 0.08	2.04 ± 0.04	1.86 ± 0.09	1.89
Brain (g%)	0.59 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.66 ± 0.03	0.82
Liver (g)	13.6 ± 0.7	13.95 ± 1.13	11.41 ± 1.69	8.67
Liver (g%)	4.20 ± 0.07	4.38 ± 0.06*	4.01 ± 0.46	3.75
Spleen (g)	0.62 ± 0.05	0.61 ± 0.06	0.51 ± 0.06	0.52
Spleen (g%)	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.00	0.22
Kidneys (g)	2.28 ± 0.1	2.32 ± 0.18	2.10 ± 0.32	1.82
Kidneys (g%)	0.71 ± 0.01	0.73 ± 0.01	0.74 ± 0.04	0.78

^a: mean ± SD

*: p<0.05 vs. 0 ppm group

Table 3. Body and organ weights of F1 offspring at weaning.

		Acrylamide in the drinking water (ppm)			
		0	50	100	200
<i>Males</i>					
No. of animals		6	6	6	4
Body weight	(g)	59.73 ± 5.84 ^a	52.03 ± 2.20	33.65 ± 9.71 [*]	15.38 ± 1.38 ^{**}
Brain	(g)	1.46 ± 0.04	1.52 ± 0.06	1.34 ± 0.09 [*]	1.14 ± 0.02 ^{**}
	(g%)	2.46 ± 0.21	2.92 ± 0.10	4.25 ± 1.11 [*]	7.46 ± 0.74 ^{**}
Liver	(g)	2.23 ± 0.15	1.96 ± 0.19	1.12 ± 0.30 ^{**}	0.46 ± 0.10 ^{**}
	(g%)	3.74 ± 0.20	3.76 ± 0.24	3.38 ± 0.21	2.99 ± 0.374 ^{**}
Spleen	(g)	0.27 ± 0.06	0.21 ± 0.04	0.10 ± 0.05 ^{**}	0.02 ± 0.01 ^{**}
	(g%)	0.45 ± 0.10	0.40 ± 0.07	0.28 ± 0.07 ^{**}	0.13 ± 0.06 ^{**}
Kidneys	(g)	0.64 ± 0.08	0.58 ± 0.04	0.37 ± 0.07 ^{**}	0.22 ± 0.04 ^{**}
	(g%)	1.08 ± 0.04	1.11 ± 0.05	1.12 ± 0.14	1.43 ± 0.15 ^{**}
Testes	(g)	0.25 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.14 ± 0.04 [*]	0.07 ± 0.00 ^{**}
	(g%)	0.42 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.43 ± 0.03
Epididymides	(g)	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01 ^{**}	0.01 ± 0.00 ^{**}
	(g%)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.02
<i>Females</i>					
No. of animals		6	6	6	4
Body weight	(g)	56.00 ± 1.24	50.63 ± 1.34	34.03 ± 7.98 [*]	16.30 ± 2.24 ^{**}
Brain	(g)	1.44 ± 0.04	1.44 ± 0.03	1.30 ± 0.10	1.11 ± 0.05 [*]
	(g%)	2.57 ± 0.06	2.85 ± 0.12	3.97 ± 0.80 [*]	6.85 ± 0.71 ^{**}
Liver	(g)	2.14 ± 0.08	1.92 ± 0.13	1.18 ± 0.27 [*]	0.55 ± 0.09 ^{**}
	(g%)	3.83 ± 0.13	3.79 ± 0.21	3.47 ± 0.13 [*]	3.40 ± 0.49
Spleen	(g)	0.24 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.10 ± 0.04 ^{**}	0.03 ± 0.01 ^{**}
	(g%)	0.43 ± 0.07	0.41 ± 0.04	0.27 ± 0.07 ^{**}	0.20 ± 0.04 ^{**}
Kidneys	(g)	0.63 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.39 ± 0.08 ^{**}	0.24 ± 0.019 ^{**}
	(g%)	1.12 ± 0.06	1.14 ± 0.10	1.17 ± 0.11	1.46 ± 0.16 ^{**}

^a: mean ± SD

^{*}, ^{**}: p<0.05, p<0.01 vs. 0 ppm group