

200734025A

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19年度 総括研究報告書

主任研究者 今井 俊夫

平成20(2008)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 -----	13
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 ----	33
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 -----	42
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 -----	54
本間正充	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	64
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	
1. Metabolism and cytotoxicity of acrylamide in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors.	
2. Lack of preventive effects of dietary fibers or chlorophyllin against acrylamide toxicity in rats.	
3. Pathological assessment of the nervous and male reproductive systems of rat offspring exposed maternally to acrylamide during the gestation and lactation periods - a preliminary study.	

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 19 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。19 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 及び 14 週齢の SD 雌ラットに [2, 3-<sup>14</sup>C]AA を 2.5 mg/kg 体重の用量で 1 回強制経口投与した結果、72 時間後までに幼若ラットでは 80%、成熟ラットでは 65% の尿中排泄が確認された。また、72 時間時点で幼若ラットに 3%、成熟ラットに 8% の血液残留がみられ、AA の代謝、排泄は成熟ラットに比し幼若ラットで速いことが推察された。精巣、神経毒性に関しては、[渋谷] SD ラットの妊娠 6 日目から出産 3 週後の離乳時まで、AA を 25、50、100 ppm の用量で飲水投与した結果、母動物では用量依存的な神経症状と神経病変が確認されたが、児動物には神経毒性及び精巣毒性は認められず、AA の乳汁移行の少ないことが原因の一つと考えられた。発がん性に関しては、[今井] F344 ラットの乳幼児期に AA を 20、40、80 ppm の用量で飲水投与した後、*N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素による処置を行う、多臓器を対象としたラット中期発がん性試験の剖検を終了した。肉眼所見においては、AA による明らかな影響は認められていない。遺伝毒性に関しては、[本間] 11 週齢の *gpt delta* 雄ラットに AA を 20、40、80 ppm の用量で 2 日あるいは 4 週間飲水投与した結果、2 日間投与の骨髄、抹消血で用量依存的な小核増加、4 週間投与の肝臓でコメット試験による DNA 損傷が確認された。20 年度は 3 週齢の *gpt delta* ラットを用いた解析を行う。

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 東京農工大学大学院・共生科学技術研究院・動物生命科学部門
- 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、一般成人の平均推定摂取量として 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日、小児など高摂取群については 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日であること、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た。我が国においても加工食品中の AA 濃度に関する実態調査及び調理過程で生成される AA の低減法について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。しかしながら、AA の職業暴露に対するリスク評価を主な目的とした実験データは多数報告されているものの、食品からの暴露を想定した毒性データは十分ではない。そこで、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もう一つの課題として、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、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、乳幼児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。特に AA に関しては、小児は高摂取群であり (JECFA, 2005 ; Dybing E ら、

2005)、また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 (Sorgel F ら、2002 ; Schettgen T ら、2004)、胎児期を含む小児への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。

また、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 (Fennell ら、2005)。また、食品から摂取される程度の暴露量において、健康なヒトの場合、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 (Fuhr U ら、2006)。ところが、AA の毒性に関して、AA あるいは GA の何れに因るのかが不明な点が多く、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、発がん性及び遺伝毒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。また、遺伝毒性を指標とした細胞を用いた検索系により、代謝に関連した AA の毒性発現機序の解析を行う。

## 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 週齢及び 14 週齢の SD 雌ラット各 14 及び 11 匹に [2, 3-<sup>14</sup>C]AA (比放射能 4-5 mCi /mmol) を 2.5 mg (50-140  $\mu$ Ci) /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、一部を正確に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 時間後にラットを安楽死させた後、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ジングアナライザー (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、ラットより採血、放血致死させた後、4 週齢のラットについては卵巣、子宮、副腎、甲状腺、下垂体、坐骨神経、腸間膜リンパ節、脾臓、乳腺、消化管及び膀胱内容物、14 週齢のラットについては更に肝臓、腎臓、肺、心臓、脳、筋肉及び褐色脂肪を摘出し、均一化した後に一部を正確に秤取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。定量限界はバツ

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 16 匹を各群 4 匹の 4 群に分け、妊娠 6 日目から出産 3 週後 (21 日目) の離乳時まで、AA を 0 (対照)、25、50、100 ppm の用量で飲水投与した。用量設定は、18 年度に母動物の神経障害が確認された 100 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。母動物は、出産 3 週後に腹大動脈よりヘパリン加採血した後剖検した。血球及び血漿は褐色瓶、-80℃にて凍結保存した。また、子宮を摘出して着床痕の数を記録した。児動物は、生後 14 日目に各腹雌雄各 1~2 匹の腹大動脈よりヘパリン加採血、放血により安楽殺した。血球及び血漿は褐色瓶、-80℃にて凍結保存した。生後 3 週目には残りの全児動物を剖検した。剖検時、脳、三叉神経、坐骨神経、精巣、精巣上体を採取し、脳、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ポ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 (Lee KY ら、2005)。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、画像解析ソフトによる定量的な検討を行った。血漿中の AA 濃度及び血球中の AA-ヘモグロビン付加体については、(財) 日本食品分析センターにて各々高速液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ-質量分析法により測定した。

SD:IGS 妊娠ラット 2 匹については無処置のまま出産させ、児動物に対して生後 2 日目から離乳時まで、AA を 50 mg/kg 体重/日の用量で週 3 回腹腔内投与した後、飲水投与群と同様の検索を行い比較検討した。投与量、投与期間及び投与方法は、6 週齢の SD 雄ラットに坐骨神経の軸索変性を誘発することが報告されているものに準じた (Saita K ら、1996)。

(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中期発がん性試験の実施に先立ち、平成 18 年度に乳幼児～春機発動期における AA の飲水投与による予備実験を 0 (対照)、10、20 及び 40 ppm の用量で実施した。その結果、40 ppm 群の精巣において軽度な精上皮の変性/壊死がみられたほか、雄の心臓における心筋炎の発生頻度及び程度が有意に増強された。従って、AA はその幼若期投与により、成熟期投与では報告されていない心臓毒性を誘発する可能性が示唆された。そこで、その再現性の確認のため、動物数を増すとともに、血清生化学的検査を加えた再実験を行った。即ち、妊娠 F344 ラット 10 匹を各群 5 匹の 2 群に分け、出産直後より 3 週後の離乳時まで、AA を 0 (対照) 及び 40 ppm の用量で飲水投与した。離乳後、母動物はエーテル麻酔下にて屠殺した。離乳後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。40 ppm は、先に実施した予備実験で心臓に対する影響が示唆された用量であり、また、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、体重、摂餌量、摂水量を測定し、一般状態の観察を行った。12 週間の投与期間終了後は、全動物の大動脈より採血、放血屠殺した後に剖検を行った。心臓を摘出後、重量を測定し、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、病理組織学的検索を行った。血清生化学検査では、AST、ALT、CK 及び LDH を測定した。

乳幼児期投与による多臓器を対象としたラット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 匹の第 1 群～第 6 群に分け、第 1 群～第 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 濃度で飲水投与した。第 5 群、第 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 を投与した。AA の投与量は、乳幼児～春機発動期投与の予備実験で耐量と判断された 20 及び 40 ppm に加え、より高い用量として 80 ppm を設定した。離乳後、母動物はエーテル麻酔下にて屠殺した。離乳後の各群の児動物には母動物と同様の方法で AA を 3 週間投与し、その 1 週後の 7 週齢時に発がん物質処置として肝臓、腎臓、肺、甲状腺、乳腺など多臓器に発がん標的性を示す *N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素 (MNU) を第 1 群～第 6 群の児動物に 40 mg/kg 体重の用量で 1 回腹腔内投与した。第 5 群、第 6 群には、8 週齢時以降、抗甲状腺剤のスルファジメトキシンを 125 ppm 濃度で飲水投与した。実験期間中、体重、摂餌量、摂水量を測定し、一般状態の観察を行った。また、MNU 投与後は触診により乳腺腫瘍の発生状況を週 1 回観察してその大きさを測定した。50 週齢時に実験を終了して剖検を行い、肝臓、腎臓、肺、脾臓、胸腺、リンパ節、甲状腺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、脳、乳腺、膀胱及び肉眼的異常部位を摘出した。現在、病理組織標本の作製及び病理組織学的解析を進めている。

(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 CYP2E1 により代謝されてグリシドアミド (GA) になり、強い遺伝子突然変異誘発性を示すとの報告がある。しかし、平成 18 年度までの本研究では、1) AA の遺伝毒性は CYP2E1 が含まれるラット S9 存在下で増強されなかった 2) CYP2E1 を高発現するトランスジェニック細胞 h2E1V2 でもその遺伝毒性は増強されなかった 3) CYP2E1 を含む 5 種類の薬物代謝酵素を発現する MCL-5 細胞では AA の細胞毒性、遺伝子突然変異誘発性等が増強されたことから、AA の遺伝毒性の発現には CYP2E1 以外の代謝酵素の関与していることが示唆された。そこで MCL-5 細胞での突然変異誘発のメカニズムを明らかにするため、AA で誘発された遺伝子変異体の遺伝子解析を行い、その突然変異スペクトルを検索した。また、ヒト型 CYP2E1 を発現するサルモネラ菌株を用いて umu 試験を行い、CYP2E1 の関与を再検討した。具体的には、in vitro ほ乳類細胞試験においては、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 と 5 つの代謝酵素 (CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1、mEpoxide hydrolase) を高発現するトランスジェニック細胞 MCL-5 を用いて小核試験及び TK 遺伝子突然変異試験を行った。umu 試験については、サルモネラ菌株の親株として、TA1535/PSK1002 とヒト型 CYP1A1、CYP2E1 を各々高発現する NM7001、OY1002/2E1 を用いて、大阪府公衛研で開発されたマイクロプレートを用いる発光 umu 試験を行った。

また、AA の幼若期及び成熟期投与による in vivo での遺伝毒性の違いを明らかにする目的で、*gpt delta* トランスジェニックラットを用いた多臓器、マルチエンドポイントの遺伝毒性試験を開始した。即ち、11 週齢の *gpt delta* 雄ラット 20 匹を各群 5 匹の 4 群に分け、AA を 0 (対照)、20、40、80 ppm の用量で 4 週間飲水投与した。投与開始 2 日目には尾静脈より途中採血を行った。小核試験について

は抹消血及び精巣、アルカリコメット試験については肝臓及び胃、*gpt* 遺伝子突然変異試験については肝臓及び精巣を採取し、更に肝臓、精巣、甲状腺、乳腺、胃の一部については DNA 付加体検出用の試料とした。また、肝臓及び精巣の一部については常法に従って病理組織学的検索を行った。なお、投与開始 2 日目の解析結果には、24 週齢の F344 雄ラットを用いた予備検討で得られたデータを加えた。

#### (倫理面への配慮)

本研究における動物実験では、使用する動物数は最小限に留めた。投与実験は飲水による経口投与が主体であり、また動物は全て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屠殺し、その他の実験手技、方法についても動物の愛護に十分配慮して行った。実験の開始に当っては、「国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規定」に従い、事前に動物実験委員会に計画書を提出して実施承認を得た。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、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。また実験は「国立医薬品食品衛生研究所 研究倫理審査委員会規定」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、4 週齢の動物では投与後 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、2.6  $\mu$ g eq/mL) を示した。14 週齢の動物では投与後 10 分から高値を示し、投与 6 時間後に最高値 (3.3  $\mu$ g eq/mL) を示した。放射能濃度は最高値に達した後漸減したが、14 週齢の動物

に対し 4 週齢の動物における減少が比較的速やかであった。血漿中濃度は、4 週齢の動物では投与 10～30 分後に最高値 2.4  $\mu\text{g eq/mL}$  を示したが、72 時間後には 0.04  $\mu\text{g eq/mL}$  であった。14 週齢の動物では投与 30 分後に最高値 2.3  $\mu\text{g eq/mL}$  を示し、72 時間後には 0.06  $\mu\text{g eq/mL}$  であった。尿、糞及び呼気中排泄率に関しては、4 週齢の動物では投与後 72 時間までに、尿中に 80.0%、糞中に 9.9%、呼気中に 4.1% の排泄率が認められ、総回収率は 94.0% となった。14 週齢の動物では同じく尿中に 64.5%、糞中に 8.7%、呼気中に 1.9% の排泄率で、総回収率は 75.0% であった。

全身オートラジオグラフィーでは、4 週齢及び 14 週齢の動物ともに、血液では 72 時間後でも高値が確認され、14 週齢の動物では背部皮膚（表層ではなく、やや深層）に特異的な分布を示した。他の臓器組織に特に高い集積性はみられなかった。

組織中放射能濃度は、4 週齢の動物では投与 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、乳腺で最も低い値を示した。膀胱内容物は投与後 1 時間、消化管内容物は投与 6 時間、その他の観察臓器は投与 30 分後に最高濃度値を示した。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り、残留量は 3% と計算された。14 週齢の動物では投与 10 分後において、肝臓に次いで脾臓で最も高い値を、他のいずれの測定臓器でも高濃度を示した。血漿、子宮、甲状腺、坐骨神経、肺、脳は投与 30 分、血液と膀胱内容物は投与 6 時間、その他の臓器は投与 1 時間後に最高濃度値を示した。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り、残留量は 8% と計算された。

(2) ライフステージによる AA の神経毒性及

び精巢毒性の病理解析 [渋谷]

母動物については、100 ppm 群では出産 2 日後より歩行異常がみられ、神経症状の進行に伴って体重は低値傾向を示した。50 ppm 群においても出産 18 日以降、軽度の歩行異常を呈した。摂餌量及び摂水量は、100 ppm 群において授乳期間中に低値傾向を示した。妊娠、授乳期間を通した AA の平均摂取量は 25、50、100 ppm の各群で、3.7、7.9、14.6 mg/kg 体重/日であった。妊娠期間、着床痕数、児動物の生存率、性別については群間で明らかな差はみられなかった。病理組織学的検索では、50 ppm 以上で三叉神経の神経節細胞の中心性色質融解、100 ppm 群では坐骨神経の軸索変性、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。児動物については、生後 2 日目には AA 投与による明らかな体重の変化はみられなかったが、離乳時の体重は雌雄ともに 100 ppm 群で有意な低値を示した。一般状態に異常は認められず、病理組織学的にも、100 ppm 群で小脳外顆粒層細胞の残存と精巢における精上皮の発達遅延がみられたが、神経及び精巢毒性を示唆する所見は認められなかった。血漿中の AA については母動物、児動物ともに検出されず、血球中の AA-ヘモグロビン付加体については、母動物では用量に応じて増加したが、児動物では母動物の 1/10 あるいはそれ以下の濃度であり、用量反応性も明確ではなく、100 ppm 群の児動物では 50 ppm 群に比し低値を示した。

AA を腹腔内投与した児動物では、生後 15 日目から歩行異常が観察され、離乳時の体重は雌雄ともに有意な低値を示した。病理組織学的には、小脳外顆粒層細胞の残存に加えて三叉神経の神経節細胞の中心性色質融解、坐骨神経の軸索変性、萎縮した有髄神経線維の増加が認められた。精巢においては、飲水投



と群と同様に精上皮の発達遅延がみられた。

(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]

乳幼児～春機発動期投与による予備再実験において、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、AA 投与群の雌雄ともに実験期間を通して統計学的に有意な低値あるいは低値傾向を示したが、その程度は顕著ではなかった。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 40 ppm 群における AA 摂取量は、雄では 5.0 mg/kg 体重/日、雌では 5.5 mg/kg 体重/日であった。剖検時の心臓重量及び血清生化学検査で測定した全ての検査項目において AA 投与による影響はみられなかった。病理組織学的には、雌雄の対照及び 40 ppm 群の心臓に軽度あるいは中等度の心筋炎が認められたが、その程度及び頻度に AA 投与による影響はみられなかった。

乳幼児期投与による多臓器を対象としたラット中期発がん性試験においては、実験期間を通して AA 投与に起因すると考えられる児動物の死亡及び一般状態の変化は認められなかった。体重は生後 2 週目より実験期間を通し、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低値を示した。摂餌量及び摂水量には AA 投与による明らかな影響はみられなかった。摂水量より算出した児動物の AA 摂取量は、20、40 及び 80 ppm の各群において、雄では 3.4、7.0 及び 14.1 mg/kg 体重、雌では 3.6、7.2 及び 14.9 mg/kg 体重であった。触診により経時的に観察、測定した皮下腫瘍（乳腺腫瘍）の発現状況に関しては、最終的には病理組織学的な診断による確認を要するが、AA 投与による明らかな影響はみられていない。剖検時の主要な肉眼所見として、皮下腫瘍のほか甲状腺、肺、前胃などの結節

が散見されたが、その発生頻度に群間の明らかな違いは認められなかった。

(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 の遺伝毒性に対する CYP2E1 の関与を再検討する研究に関して、TA1535-pSK1002 を用いた umu 試験では、S9 存在下、非存在下のいずれにおいても AA は陽性反応を示さなかった。また、ヒト型 CYP1A1、CYP2E1 を各々高発現する NM7001、OY1002/2E1 を用いた umu 試験では、AA は S9 非存在下で陽性反応を示さなかった。一方、TA1535-pSK1002 は GA に対して明らかな陽性反応を示した。5 種類の薬物代謝酵素を発現する MCL-5 細胞を用いた *in vitro* ほ乳類細胞試験では、対照細胞の TK6 に比し、AA による高い TK 突然変異の誘発を認めた。変異体の遺伝子解析の結果、MCL-5 細胞では AA は点突然変異を比較的多く誘発することが示された。

*gpl delta* ラットを用いた多臓器、マルチエンドポイントの遺伝毒性試験において、小核試験では、投与 2 日目に骨髄、抹消血での用量依存的な小核頻度の増加がみられた。一方、4 週間投与後の骨髄、抹消血に小核の誘発は認められなかった。コメント試験では、肝臓に僅かながら DNA 損傷がみられた。*gpl* 遺伝子突然変異試験及び DNA 付加体検出については、現在、解析を進めている。病理組織学的検索において、肝臓及び精巣に AA 投与による変化は認められなかった。

#### 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]

幼若及び成熟雌ラットに [2, 3-<sup>14</sup>C] AA を 2.5 mg/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幼弱ラットでは投与 30 分～1 時間後に、成熟ラットでは 6 時間後に最高値になり、吸収は速やかであることが示

された。最高値に達した後の血液中濃度は漸減したが、成熟ラットに比し幼弱ラットにおける減少が比較的速やかであった。一方、血漿中濃度は、幼弱ラットでは投与10～30分に成熟ラットでは30分後に最高値を示したが、その後急速に低下したことより、AAは血球に強く吸着されることが示唆された。

投与72時間後までの尿、糞、呼気中放射能排泄率は、幼若ラットでは尿中に80%、糞中に10%、呼気中に4%、成熟ラットでは尿中に65%、糞中に9%、呼気中に2%の排泄が確認され、吸収されたAAの大半は尿より排泄されることが示された。また、幼若及び成熟ラットにおける総回収率は各々94%及び75%であり、幼若ラットの排泄は成熟ラットよりも速やかであることが示唆された。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において、幼若及び成熟ラットともに、血液及び血液含有量の多い脾臓では全ての時点で高値を示し、血液に蓄積、残留することが明らかとなった。その他の臓器については、幼若ラットで投与30分、成熟ラットで1時間後に最高濃度を示すものが多く、成熟ラットにおける吸収の若干の遅れが示唆された。また、成熟ラットにおける投与6、24、72時間後の組織中濃度は、幼若ラットに比し1.5倍程度高く、減少速度も遅かった。投与72時間後の血液残留量は、幼若及び成熟ラットにおいて各々3%及び8%と計算されたことから、成熟ラットに比し、幼若ラットではAAの吸収、代謝及び排泄が速やかである可能性が示された。

成熟ラットでは、投与72時間後において、血液のほか背部皮膚に特異的な分布を示した。オートラジオグラフィにおける黒化は皮膚の表層ではなく、やや深層にみられたため、毛根における残留あるいは汗腺、皮脂腺からの排泄の可能性が示された。投与72時間後の

成熟ラットにおける血液残留が8%であったことから、体重に対する重量比が血液で7%、皮膚で10%とした場合、皮膚における残留は11%と概算され、尿、糞、呼気中放射能排泄率から計算した総回収率が75%と幼若ラットより低かった一つの原因と考えられた。

平成20年度は、幼若及び成熟ラットに対し、低用量域(0.1～0.25 mg/kg 体重)での生体内動態と尿、糞、呼気中への排泄速度やその割合について用量反応性を検討し、吸収、代謝、排泄の飽和の可能性を検証する。

(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〕

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報告されているが(Wiseら、1995)、本実験では生後2日目にはAA投与による明らかな体重の変化はみられなかった。

母動物については、100 ppm群では出産2日後より歩行異常が、50 ppm群においても出産18日以降、軽度の歩行異常がみられ、平成18年度とほぼ同様の結果が得られた。しかし、児動物については一般状態に異常は認められず、病理組織学的にも100 ppm群で小脳及び精巣に体重低値に伴う発達遅延の影響がみられたが、神経及び精巣毒性を示唆する所見は認められなかった。一方、AAを腹腔内投与した児動物では、生後15日目から歩行異常が観察され、病理組織学的には三叉神経の神経節細胞の中心性色質融解あるいは坐骨神経の軸索変性などがみられたことから、神経毒性に関しては離乳前の児動物もAAに対して感受性を有することが示された。精巣においては、飲水投与群と同様に精上皮の発達遅延がみら

れたが、精上皮に対する障害作用は確認されなかった。AAの精巣毒性については、精子形成が不完全な段階では感受性を示さない可能性があるが(Xieら、2006)、投与用量などを考慮した更なる検討を要する。

母動物、児動物ともにいずれの用量でも血漿中のAAは検出されなかったが、今回用いた高速液体クロマトグラフ法の感度が十分でなかったことによるものと考えられた。一方、ガスクロマトグラフ-質量分析法により解析した血球中のAA-ヘモグロビン付加体については、母動物では用量に応じた増加が確認された。しかし、児動物では母動物の1/10あるいはそれ以下の濃度であった。ヘモグロビン代謝における母動物と児動物の違いなどを考慮する必要があるが、AAの乳汁移行が少ないことが原因の一つと考えられた。また、100 ppm群の児動物の血球中のAA-ヘモグロビン付加体は50 ppm群に比し低値を示したが、母動物の神経症状の進行に伴う乳汁摂取量の減少によるものと推察された。

### (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中期発がん性試験の実施に先立ち、平成18年度に乳幼児～春機発動期におけるAAの飲水投与による予備実験を10、20及び40 ppm濃度で実施した結果、40 ppm群の雄において、成熟期投与では報告されていない心臓毒性を誘発する可能性が示唆されたことより、AAの幼若期投与による影響か否かを再確認するため、今年度は動物数を増すとともに、血清生化学的検査を加えた再実験を行った。その結果、AA投与に起因すると考えられる心臓重量の変化はみられず、血清生化学検査においても、心臓毒性に関連すると考えられる検査項目に影響はみられなかった。更に、病理組織学的検査における心筋炎の発現状況についても、対照及びAA投与

群の間に違いは認められなかった。従って、先に実施した予備実験でAAの影響が疑われた心臓における所見については、偶発的なものであると判断された。

乳幼児期投与による中期発がん性試験においては、雌雄の全てのAA投与群において用量反応性を伴う体重の有意な低値がみられたが、その程度は重篤なものではなく、摂餌量及び摂水量にはAA投与による明らか変化は認められず、AAの摂取量あるいは諸臓器における発がん感受性の評価に著しく影響を及ぼすものではないと考えられた。触診による皮下腫瘍の発現状況及び最終剖検における肉眼所見において、AA投与に起因すると考えられる明らかな影響はみられていない。平成20年度には、病理組織学的解析を終了し、最終評価する。

### (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、AAはCYP2E1によりエポキシ環をもつGAに変換され、GAが遺伝毒性を発現することを示す*in vivo*及び*in vitro*の結果が報告されている。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を示さず、*in vitro*での代謝を再現することはできなかった。CYP2E1で代謝される他の物質は代謝活性化を受け、毒性を発現することから、AAの代謝様式の解析にはS9の系は不適切であること、もしくは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唆された。今回、CYP2E1を発現するサルモネラ菌株を用いてumu試験を行いCYP2E1の関与を確認したが、陽性反応は得られなかった。GAは親株のTA1535/PSK1002を用いたumu試験で陽性を示すことから、AAはCYP2E1単独ではGAに代謝されないことが確認された。MCL-5はCYP2E1を含む5種類の酵素を高発現する細胞であり、対照細胞であるTK6細胞に

比し 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。特に、TK 遺伝子突然変異に関しては対照細胞に対し 5 倍の突然変異の誘発が観察された。その変異体の遺伝子解析の結果、MCL-5 細胞では AA は点突然変異を誘発することが示された。我々の以前の研究において、薬物代謝能のない TK6 細胞では AA は LOH 型突然変異を、GA は点突然変異を多く誘発したことから、AA は MCL-5 細胞で GA に変換されたことが示唆された。以上より、AA には CYP2E1 以外の酵素が関与する代謝経路が存在している可能性が考えられた。今後、CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、mEpoxide hydrolase 等を責任酵素にした研究を要する。

今年度より、*gpt delta* ラットを用いて AA の多臓器、マルチエンドポイントの遺伝毒性試験を開始した。AA を 2 日間あるいは 4 週間飲水投与したところ、2 日間投与の骨髄、抹消血で用量依存的な小核増加、4 週間投与の肝臓でコメット試験による DNA 損傷が確認された。一方、4 週間投与後には骨髄、末梢血での小核の誘発は認められなかった。その原因として、長期投与により解毒能が活性化され、小核試験のような一過性の遺伝毒性発現が抑制されたことが考えられた。DNA 損傷試験であるコメット試験は、初期 DNA 損傷を検出するため解毒能、修復能に影響を受けず、また、突然変異は解毒能が獲得される以前の変異も固定され残っている。従って、AA のような化合物の長期投与による遺伝毒性の評価にはコメット試験、遺伝子突然変異試験が有用である可能性が示された。平成 20 年度は 3 週齢の *gpt delta* ラットを用いた解析を行い、AA の幼若期及び成熟期投与による *in vivo* の遺伝毒性の違いを明らかにする。

## 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-<sup>14</sup>C]AA を 2.5mg/kg で雌の幼若及び成熟ラットに 1 回強制経口投与した際の尿、糞、呼気中及び組織中放射能濃度の推移を解析した結果、吸収は速やかであり、主排泄経路は尿中排泄であるが、一部は血球、成熟ラットでは更に背部皮膚に残留することが示された。また、AA の吸収、分布、代謝及び排泄は、成熟ラットより幼弱ラットで速いことが推定された。

(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]

妊娠 6 日目から出産 3 週後の離乳時まで、AA を 25、50、100 ppm の用量でラットに飲水投与した結果、母動物では用量依存的な神経毒性がみられたが、児動物には認められなかった。血球中の AA-ヘモグロビン付加体については、母動物では用量に応じて増加したが、児動物では母動物の 1/10 あるいはそれ以下の濃度であったことから、AA の乳汁移行が少ないことが原因の一つと考えられた。

(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～春機発動期における AA の飲水投与による予備実験を 10、20 及び 40 ppm 濃度で実施した。その結果、40 ppm は耐量であると判断された。現在、20、40 及び 80 ppm 濃度で実施した乳幼児期投与による中期発がん性試験の病理組織学的解析を進めており、20 年度には AA の乳幼児期投与による発がん感受性に及ぼす影響について最終評価を行う。

(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]

CYP2E1 を発現するサルモネラ菌株及びその親株を用いて *umu* 試験を行った結果より、AA は *in vitro* において、CYP2E1 単独では GA に代

謝されないことが確認された。一方、CYP2E1を含む5種類の薬物代謝酵素を発現するMCL-5細胞を用いてAAを試験したところ、対照のTK6細胞と比較し、高いTK突然変異の誘発を認め、TK6細胞でのGAの突然変異スペクトルと同様の変異スペクトルを示したことから、AAにはCYP2E1以外の酵素が関与する代謝経路が存在している可能性が考えられた。*gpt delta* ラットを用いた多臓器、マルチエンドポイントの遺伝毒性試験については、平成20年度には幼若ラットを用いた解析を追加して検討を進める。

#### 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 and cytotoxicity of acrylamide in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. *Drug Metabolism Reviews* 39, S1: 246, 2007.
- 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.* 45 (8), 1507-1515, 2007.
- 3) Takahashi, M., Shibutani, M., Inoue, K., Fujimoto, H., Hirose, M., Nishikawa, A.: Pathological assessment of the nervous and male reproductive systems of rat offspring exposed maternally to acrylamide during the gestation and lactation periods - a preliminary study. *J. Toxicol. Sci.*, 33 (1), 11-24, 2008.

##### 2. 学会発表

- 1) Kurebayashi, H., Ohno, Y.: Metabolism and cytotoxicity of acrylamide in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. 8th International ISSX Meeting (2007.10)
- 2) 紅林秀雄, 南部尚美, 浜井憂子, 重松昭世, 今井俊夫, 中澤憲一, 大野泰雄: 幼若雌性ラットにおける[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide 経口投与後の体内動態の特性. 日本薬学会第128年会 (2008.3)
- 3) 渋谷 淳, 高橋美和, 井上 薫, 富士本 仁, 西川秋佳, 広瀬雅雄: アクリルアミドによって誘発される神経・精巢毒性の母動物を介した胎児・乳幼児期暴露による感受性の検討. 第144回日本獣医学会 (2007.9)
- 4) 高橋美和, 渋谷 淳, 井上 薫, 富士本 仁, 広瀬雅雄, 吉田 緑, 西川秋佳: アクリルアミドによって誘発される神経毒性の胎児・乳幼児期暴露による感受性の予備的検討. 第24回日本毒性病理学会 (2008.2)
- 5) Takahashi, M., Shibutani, M., Inoue, K., Fujimoto, H., Hirose, M., Yoshida, M., Nishikawa, A.: Pathological assessment of the nervous system of rat offspring exposed to acrylamide during the gestation and lactation periods - a preliminary study. 47<sup>th</sup> meeting of the society of toxicology (2008.3)
- 6) 高見成昭, 今井俊夫, 曹永晩, 広瀬雅雄, 西川秋佳: 幼若ラットにおけるアクリルアミドの12週間反復経口投与による毒性学的影響. 第24回日本毒性病理学会 (2008.2)
- 7) Imai T., Takami S, Cho YM, Hirose M, Nishikawa A: A 12-week toxicological study of orally administered acrylamide in juvenile rats. 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (2008.3)

8) Koyama, N., Yasui, M., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., Hayasi, M., Honma, M.: Genotoxicity of acrylamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007. 11)

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）

分担研究報告書

「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」

（平成 19 年度）

[2, 3-<sup>14</sup>C]Acrylamide を用いた放射性 <sup>14</sup>C トレーサー実験法による  
アクリルアミドの成熟雌性ラットにおける体内動態試験 II

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-<sup>14</sup>C]Acrylamide を 2.5mg/kg で成熟雌性ラットに経口投与したとき、生体内分布ピークは多くの臓器に於いて投与後 30 分または 1 時間後に見られたことから、経口投与後速やかに吸収され、全身に分布する。
- ・ 主排泄経路は尿中排泄で、61%は 1 日目で 3 日間で 64.5%が尿中排泄される。糞中排泄は 1 日目で 7.6%、3 日間で 8.7%が排泄される。呼気中排泄は 14CO<sub>2</sub>として 24 時間までに 1.4%、その後もゆっくりした排泄が見られる。投与後 72 時間までの総排泄回収率は 75.0%であった。
- ・ 血液は全ての時点で高い濃度を示し、投与後 6 時間で最高濃度値、投与後 72 時間でも圧倒的に高濃度を示し、投与量の 8%が残留した。一方、血漿では速かに減少することから血球に残留することが示唆された。
- ・ 血液に次いで高濃度の臓器は背部皮膚、肺、脾臓、腎臓、肝臓で、血液、皮膚、肺、脾臓については、終末半減期も他の臓器よりも大きい。
- ・ 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。
- ・ 尿・糞・呼気中排泄率、生体内分布及び血中残留率等から、Acrylamide の吸収・分布・代謝・排泄で成熟ラットは幼若ラットより遅いことが推定された。

#### A. 研究目的

食品に含まれると推定されるアクリルアミド (Acrylamide) の推定摂取量は成人よりも小児の方が高いとされており、そ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については MJ. Miller ら、AM. Kadry ら、又は K. Hashimoto らの精巢毒性が見られる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、詳細な点に不明瞭なところも見られた。W.J. 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のデータは雌性動物も小児期のものも少ない。そこで前年度は幼若雌性 SD 系ラット(4週齢)に[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide を経口投与したときの尿・糞・呼気中放射能排泄率および組織中放射能濃度測定を行った。これと比較する意味で、本年度は成熟した雌性 SD 系ラット(14 週齢)に[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamideを同用量の 2.5mg/kg で経口投与し、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および組織中放射能濃度測定を行い、幼若ラットと成熟ラットでのアクリルアミドの体内動態の特徴とその差異などを調べ幼若ラットへの影響を考察する。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。

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減(H18/6/1 厚労省課長通達)
  - ② 高感度 <sup>14</sup>C 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。

(参考文献)

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 [<sup>14</sup>C] 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. 被験物質

#### 1.1 標識化合物

名称 : [2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide  
化学式 : CH<sub>2</sub>=CHCONH<sub>2</sub>  
供給者 : 室町薬品株式会社  
ロット番号 : ARC-070904  
性状 : 70%エタノール溶液(無色透明)  
比放射能 : 5 mCi /mmol(185 MBq /mmol)  
濃度 : 0.1 mCi/mL  
放射化学的純度 : 99 %  
入手日 : 2007 年 11 月 6 日  
入手量 : 250 μ Ci (9.25 MBq)  
保存場所 : 被験物質保管庫(-20℃)  
保存条件 : 冷凍(-20℃)、遮光  
取扱上の注意 : 特になし

#### 1.2 非標識化合物

名称 : Acrylamide  
供給者 : 和光純薬株式会社  
ロット番号 : LTJ4438  
保存場所 : 被験物質保管庫(常温)  
保存条件 : 常温  
取扱上の注意 : 特になし



## 2. 試験動物

### 2.1 成熟ラット

動物種、系統 : SD 系統雌性ラット、

13 週齢(購入時)

微生物レベル : SPF

購入動物数 : 11 匹

購入先 : 日本チャールズリバー株式会社

検疫、馴化 : 1 ケージ当たり 5 匹以下で収容し、被毛および皮膚、排泄物などの一般状態を 1 週間以上の予備飼育で観察して、健康状態の良好な動物を試験に使用した。

投与開始時週齢 : 14 週齢

動物の識別 : 動物入荷時に、動物の尾に番号を付け識別した。

動物の個別用途: 成獣ラットは経時血液採取目的で 2 匹、全身オートラジオグラフィーで 3 匹、組織中放射能濃度測定で 6 匹使用した(尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定で用いた 2 匹は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の最終時点の動物とした)。

## 3. 投与液の調製

3.1 投与液の設定濃度: 50  $\mu$  Ci/2.5mg/2ML 水/kg B.W.

### 3.2 調製方法

メスフラスコ中に採取し、窒素気流下(室温)でエタノールを留去したのち蒸留水で溶解し、非標識 Acrylamide を 8.95mg 追加し、最終濃度が 50  $\mu$  Ci/2.5mg/2mL 水溶液を調製した。

### 3.3 放射能濃度の確認

調製日に適量(n=3)をサンプリングし、エタノールで稀釈後に放射濃度を測定した。平均値が設定濃度の 90~110% の範囲内であることを確認した。

## 4. 投与

経路: 単回強制経口投与

方法: ステンレス製経口ゾンデを用い、胃内に強制投与した

用量: 2.5mg/kg [放射能用量: 50  $\mu$  Ci /kg]

## 5. 血液・血漿中放射能濃度測定

投与後のラット(2 匹)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  $\mu$  L の血液を採集した。そのうち 20  $\mu$  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  $\mu$  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(LSC-1000、ALOKA)を用いて血液・血漿中の放射能を計測した。

## 6. 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。

## 7. 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、マイクローム(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、パ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。

## 8. 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(ハイオニックフロロー、バックカード)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)。観察組織は肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓、脳、筋肉、血液、血漿、膀胱内容物、腸内容物、卵巣、子宮、副腎、甲状腺、下垂体、坐骨神経、腸間リンパ節、褐色脂肪体、乳腺の20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。

## 9. 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

[2,3-<sup>14</sup>C]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10分後から高値を示し、その後緩やかな上昇傾向にあり、投与後6時間で最高値3.3 μg eq/mLに達した。その後は非常にゆっくりと減少した。その終末半減期は他の臓器の10倍位であった。

血漿中放射能濃度は、投与後30分後に最高値2.3 μg eq/mLを示したがその後下降し、6時間後には約50%に低下した。投与後72時間後では約

2.5%まで低下し、薬物換算値は0.06 μg eq/mLと低数値であった。

血液に比べ血漿中放射能濃度が低いことから[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamideは血球成分に強く吸着されることが示された。

一方、[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamideを2.5mg/kgで幼若雌性ラットに強制経口投与したとき(図2)血液中放射能濃度は投与後1時間で最高値2.6 μg eq/mLに達した後ゆっくりと減少した。しかし、その減少速度は体重増加による補正をしても成熟ラットより速いことが判った。また、血漿中放射能濃度は、投与後30-60分後に最高値2.4 μg eq/mLを示したがその後速やかに低下した。

### 2. 尿・糞・呼気中放射能排泄率

[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamideを2.5mg/kgで経口投与後の尿・糞・呼気中放射能排泄率を表2および図3左に示した。

投与後24時間までに尿中に60.9%、糞中に7.6%、呼気中に約1.4%の排泄率が認められ、投与後72時間までに尿中に64.5%、糞中に8.7%、呼気中に約1.9%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32%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-<sup>14</sup>C]Acrylamideの総排泄回収率は75.01%であった。

一方、[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamideを2.5mg/kgで幼若雌性ラットに強制経口投与したとき(図3右)尿・糞・呼気中放射能排泄率は投与後3日間で尿中に80.0%、糞中に9.9%、呼気中に約4.1%の排泄が認められ、総排泄率は94.0%であった。いずれも成熟ラットの排泄率が低いことが判明した。また、主排泄経路は尿中排泄であった。

### 3. 全身オートラジオグラフィー

[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide 2.5mg/kg 経口投与後30分、

6時間、および72時間の全身オートラジオグラフィーを図4-6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30分(図4)

【投与後30分】

高濃度レベル: 胃内壁、小腸上部内容物

中濃度レベル: 口腔粘膜、血液、肝、胃、小腸、盲腸、子宮、皮膚、骨格筋、脾、腎皮質、卵巣、心臓、肺、脾、骨髄

低濃度レベル: 皮下脂肪体、腹部脂肪体

投与後30分では、画像の黒化濃度(PSL/mm<sup>2</sup>)は1mm<sup>2</sup>当たり飽和濃度を超えない露出時間に定めた場合、胃腔内ならびに小腸上部内容物で最大濃度を示した。この黒化度を基準とし、組織内の濃度を比較すると、ほぼ大部分の組織で平均して中濃度もしくはそれ未満であった。

以上の所見から経口投与後30分において、投与液中の大部分の標識体は胃腔を経て、小腸上部で吸収され、肝臓経由で血中に取り込まれ、全身にほぼ均一に吸収されていることを示した。この状況においては、幾分大血管系内血中濃度が他の組織より高めに分布していることも確認した。

投与後6時間(図5)

【投与後6時間】

高濃度レベル: 盲腸内容物、膀胱内容物

中濃度レベル: 皮膚、血液、口腔粘膜、食道粘膜、脳幹、脊髄、子宮、膀胱、腸管、肝、腎皮質、副腎、胃体部、肺

低濃度レベル: 硝子体、耳介内リンパ系組織、腹部脂肪体、皮下脂肪組織

投与後6時間では、最大に近い高濃度分布が盲腸および膀胱内容物に観察された。大血管内の

血液は投与後30分値より黒化濃度が高く、特に肝静脈内血液は肝実質組織に比べ高い濃度を示した。皮膚は、やや特異で、特に背部の毛組織に集中して血液と類似した分布が見られた。

投与後72時間(図6)

【投与後72時間】

高濃度レベル: 血液、皮膚(毛)

中濃度レベル: 肝、肺、腎、脾

低濃度レベル: 大脳、小脳、骨格筋、脳中枢部、心筋、消化管内平滑筋

投与後72時間では、全身低濃度化していたが、一層体内分布の特異性が明瞭である。いずれにしても血液中濃度は高いが、背部皮膚の毛に特異的な分布を示し、投与後6時間に比べ、毛の発育による黒化部の上部への移行が認められた。従って、毛の発生部(毛根)に多く標識化合物が分布していることが明らかになった。

#### 4. 組織中放射能濃度と半減期

[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide 経口投与後の組織中放射能濃度を表3および図7に示した。

投与後10分において、肝臓で次いで脾臓で最も高い数値を、いずれの観察臓器でも高濃度値を認めた。血漿、子宮、甲状腺、坐骨神経、脳、肺は投与後30分で、血液と膀胱内容物は投与後6時間で、その他の臓器は投与後1時間で最高値を示した。

投与後6時間では、血液と尿を除く観察臓器は減少傾向を示し、血漿、子宮、甲状腺、腸間リンパ、脾、肝、筋肉は最高値の半分以下の数値であった。尿は投与後6時間で非常に高い数値を示し、尿・糞・呼気中排泄率で投与後0~24時間区間の最も高い回収率という結果を肯定した。

血液は全ての時点で高い濃度を示し、投与後6時間で最高濃度値 3.3 μg eq/mL を示し、投与72

時間後でも 3.0  $\mu\text{g eq/mL}$  と圧倒的に高濃度を示し、残留量は 8.4% と計算された。

血液に次いで高濃度の臓器は皮膚、肺、脾臓、腎臓、肝臓であり、さらに、脳、甲状腺、下垂体等が続いた。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。

また、表 4 に示した 24-72 時間の濃度変化から計算した終末半減期(T1/2、時間)の大きい臓器は、血液、肺、背部皮膚であった。さらに、坐骨神経、甲状腺、脾臓等が続いた。

投与後 72 時間の体内濃度:

血液 > 背部皮膚 > 肺 > 脾 > 腎 > 肝臓、下垂体、脳 > 乳腺、血漿

終末半減期:

血液 > 背部皮膚 > 肺 > 脾 > 、下垂体、脳

これらの結果を踏まえ、[2,3- $^{14}\text{C}$ ] Acrylamide は投与後 10 分でも肝臓を経て、更に大動・静脈を経て全身にはほぼ均一に分布する。その後も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。

#### D. 考察

今回、成熟雌性 SD 系ラットに[2,3- $^{14}\text{C}$ ]Acrylamide を 2.5mg/kg で経口投与したとき、尿・糞・呼気中への放射能排泄率は、投与後 72 時間までに尿中に 64.47%、糞中に 8.68%、呼気中に約 1.86% の排泄が認められ、投与後 72 時間までの総回収率は

75.01% であった。

幼若雌性ラットでは投与後 72 時間までに尿中に 80.0%、糞中に 9.9%、呼気中に約 4.1% の排泄率が認められ、総排泄回収率は 94.0% であったことから、成熟ラットの各排泄率は幼若ラットより少ないことが判明した。但し、どちらも尿中へは投与後 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% 程度が排泄されている。

呼気中排泄は  $^{14}\text{CO}_2$  として 1.9-4.3% とゆっくりした排泄が見られ、6% の排泄を報告している Hashimoto らの雄性ラットの場合より少ない。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。

成熟雌性ラットの血液中放射能濃度は投与 10 分後から緩やかな上昇傾向を示し 6 時間後に最高数値に達したが、その後も同レベル濃度を長時間保ち続けた。血漿中放射能濃度は、投与後 30 分後に最高値を示したがその後下降し、6 時間後には約 50% に低下し、投与後 72 時間後には 0.06  $\mu\text{g eq/mL}$  と減少した。幼若ラットに比べ、血液の減少速度に数倍の遅れが見られた。また、幼若ラットの場合と同様血液に比べ血漿中放射能濃度が低いことから[2,3- $^{14}\text{C}$ ]Acrylamide は血球成分に強く吸着されることが示された。

成熟雌性ラットの組織中放射能濃度については、投与後 10 分において、肝臓と脾臓で最も高い数値を認めた。血漿、子宮、甲状腺、坐骨神経、脳、肺は投与後 30 分で、血液と尿及び腸内容物は投与後 6 時間で、その他の臓器は投与後 1 時間で最高値を示した。投与後 6 時間では、多くの観察臓器は減少傾向を示し、血漿、子宮、甲状腺、腸間リンパ、脾、肝、筋肉は最高値の半分以下の数値であった。脾、肝、腎、肺等の血液含有量の多い組織では全ての時点で高い濃度を示した。

臓器分布での最高濃度時間は幼若ラットで投与