

後 30 分、成熟ラットでは 1 時間の臓器が多く、成熟ラットでの吸収の若干の遅れが見られている。成熟ラットの場合、投与後 6、24、72 時間の組織中放射能濃度は幼若ラットに比べ 1.5 倍程度高く、減少速度の遅れが見られている(表 5)。

全身オートラジオグラフィーについては、投与後 30 分では、胃腔内ならびに小腸上部内容物で最大濃度を示したが、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。投与後 6 時間では、高濃度分布が盲腸および膀胱内容物に観察された。中濃度レベルで血液は黒化濃度が高く、皮膚は血液と同程度の分布が見られ、特に背部の毛組織に集中し皮膚より一層奥に高い黒化が確認されたので、毛根もしくは分泌線レベルと考えられた。投与後 72 時間の画像でも皮膚(毛根らしき)に血液と同レベルの濃度を確認し、血液は体重の大凡 7%で、皮膚の全量が体重の約 10%とすると、血液の放射能回収率が約 8%であったので皮膚での回収率は約 11%と概算される。尿・糞・呼気への回収率が約 75%で、血液・皮膚と合算すると約 94%程度であった。

幼若ラットおよび成獣ラットいずれでも血液は高い蓄積を示し、幼若ラットでは眼球、成獣ラットで皮膚への分布が特徴的であった。成獣ラットでは、汗腺もしくは皮脂線等を経路した排泄が推定される。

これらの結果を踏まえ、[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide はラットにおいてほぼ投与量を吸収し全身にほぼ均一に分布し、大半は尿より排泄されるが、成熟ラットでは幼若ラットよりアクリルアミドの吸収、代謝および排泄が遅いことが判明した。

今回は昨年度の幼若雌性ラットに続き成熟雌性ラットを用いてアクリルアミドを中用量で投与して実験した。次回以降、成熟および幼若ラットでヒトが摂取すると考えられる程度の低用量でアクリルアミドを経口投与し、その生体内動態と尿糞中への排泄の割合を調べ、中用量の場合とを比較することで、各

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検討する予定である。

#### E. 結論

[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide を 2.5mg/kg で雌性ラットに経口投与したとき 3 日間で成獣ラットで 65%、幼若ラットで 80%の尿中排泄が認められ、主排泄経路は尿中排泄であり、吸収率の良いことが確認された。血液は全時点で高濃度値を示し、投与後 72 時間でも成獣ラットで投与量の 8%、幼若ラットで 3%が残留した。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された。尿糞中排泄率や体内分布等から、Acrylamide の吸収・分布・代謝・排泄は成獣ラットより幼若ラットで速いことが推定された。

#### 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

Toxicol. 80: 820-828. (2006)

5) 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. 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(NAcCys)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

5) 8th International ISSX Meeting (2007.10) Metabolism and cytotoxicity of acrylamide in isolated rat hepatocytes:

protective effects of GSH precursors. Kurebayashi H, Ohno Y.

6) 日本薬学会第128年会(2008.3.27)

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: 紅林秀雄<sup>1</sup>, 南部尚美<sup>2</sup>, 浜井憂子<sup>2</sup>, 重松昭世<sup>2</sup>, 今井俊夫<sup>1</sup>, 中澤憲一<sup>1</sup>, 大野泰雄<sup>1</sup>. <sup>1</sup>国立衛研, <sup>2</sup>生体科学研究所

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 20年度計画

幼若ラット及び成熟ラットに放射性炭素を標識した[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide をより低い用量(前記用量の1/20-1/10)で経口投与し, その生体内動態と尿糞呼気中への排泄速度やその割合を比較検討することで, これらの用量範囲における吸収代謝排泄等での飽和の可能性を検証する。

一方, 授乳中の母親ラットにそれぞれの用量で投与し, その乳汁から乳幼児ラットに[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide の放射能が移行する可能性を検討することで, 乳児ラットへの影響を考察する。

図1. 成熟雌性ラットに[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide, 2.5mg/kg単回経口投与後の  
血液・血漿中放射能濃度変化

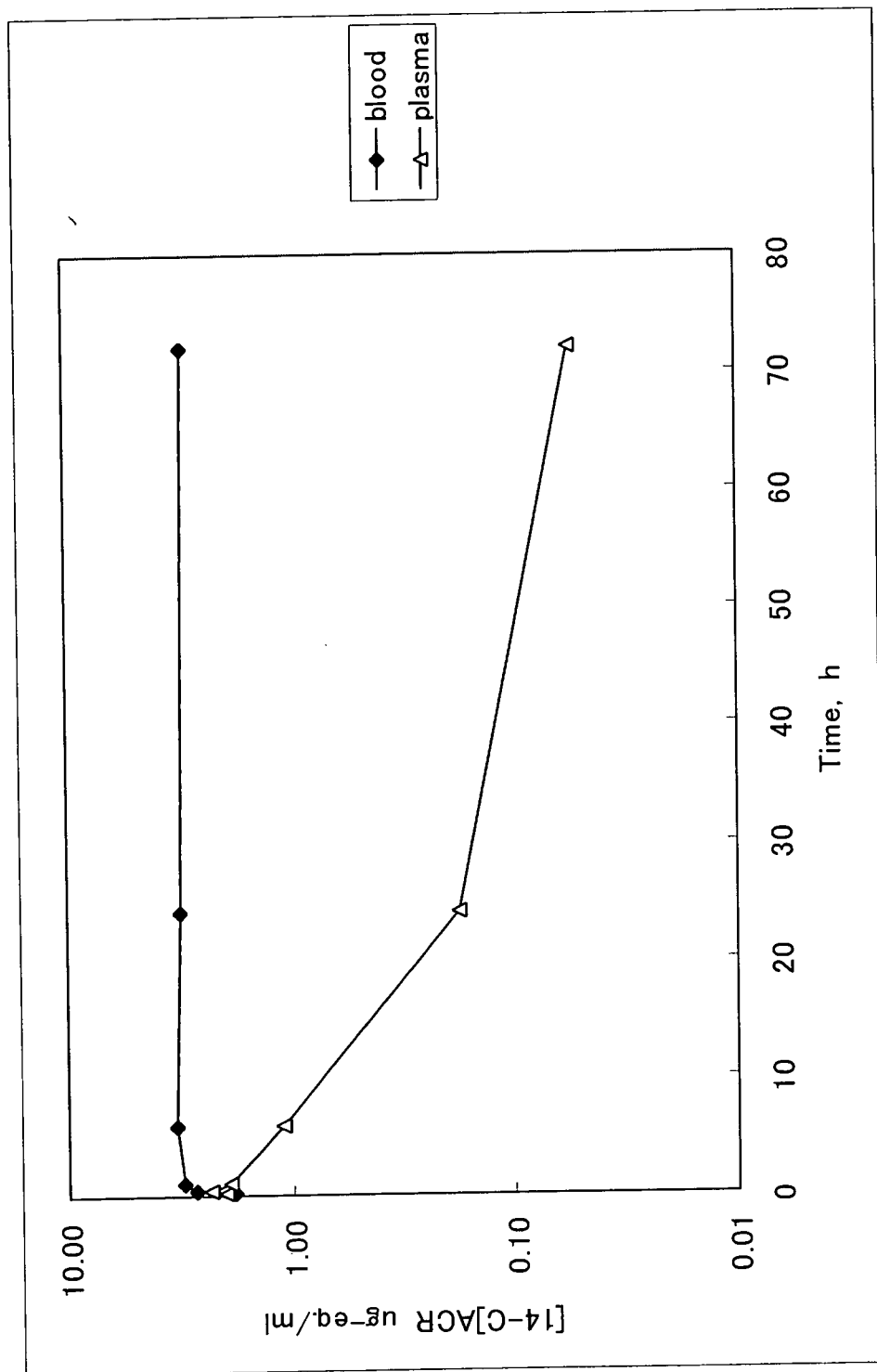


図2. 幼若雌性ラット[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide, 2.5mg/kg単回経口投与後の血液・血漿中放射能濃度変化; (\*幼若期の体重増による補正)

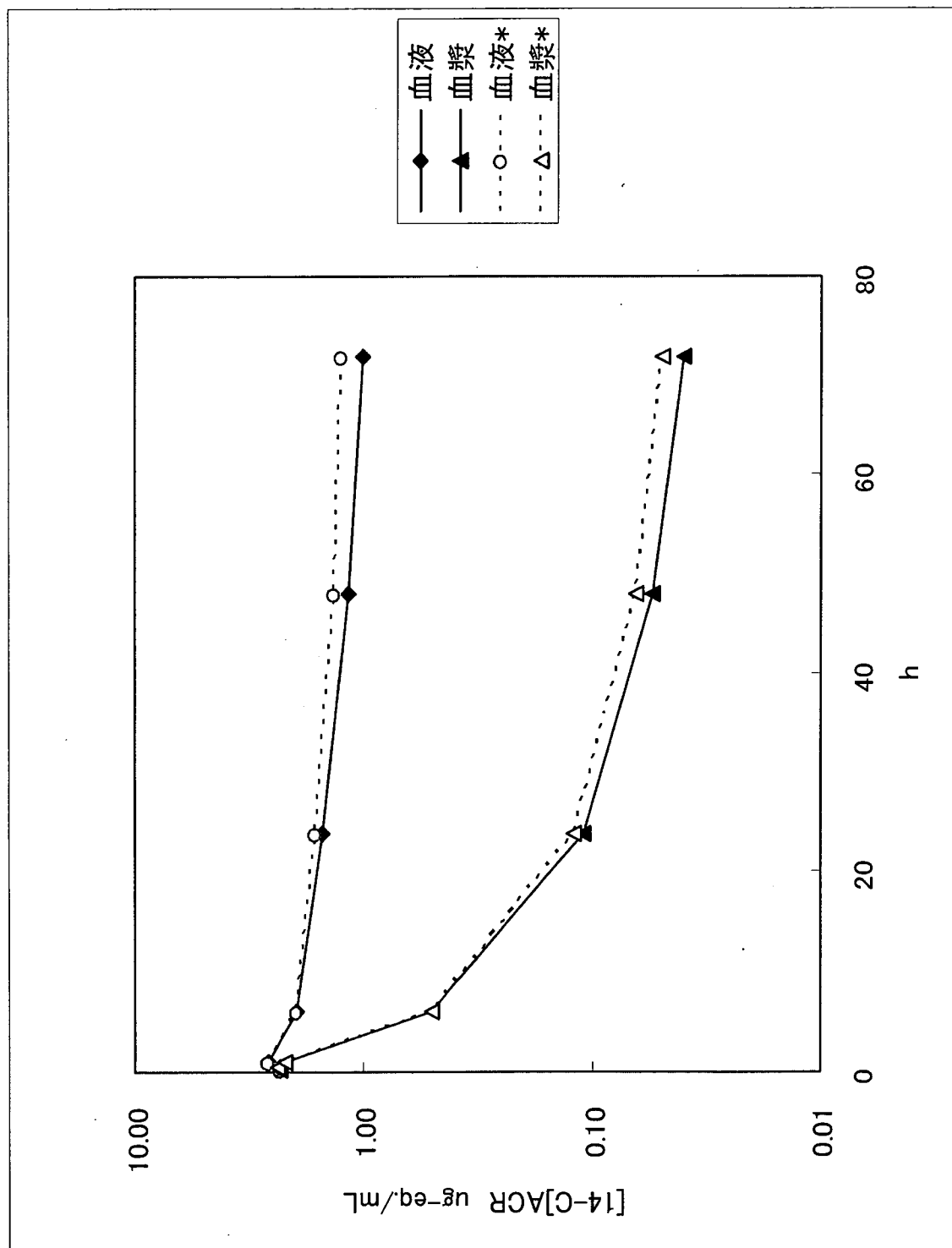


図3.雌性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -acrylamide 2.5 mg/kg単回経口投与後の尿・糞・呼  
 気中への放射能排泄率(%):左、成熟ラット;右、幼若ラット

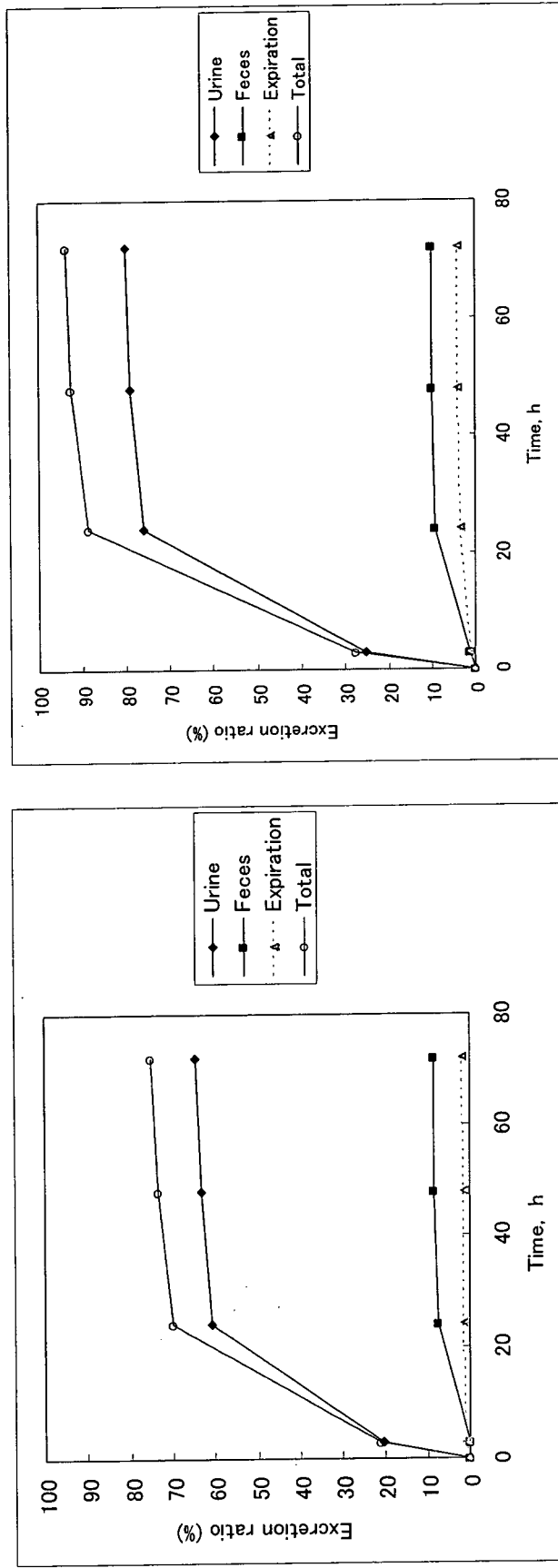


図4 [2,3-<sup>14</sup>C] Acrylamide を単回経口投与後30分の成獣雌性ラット全身オートラジオグラフィ

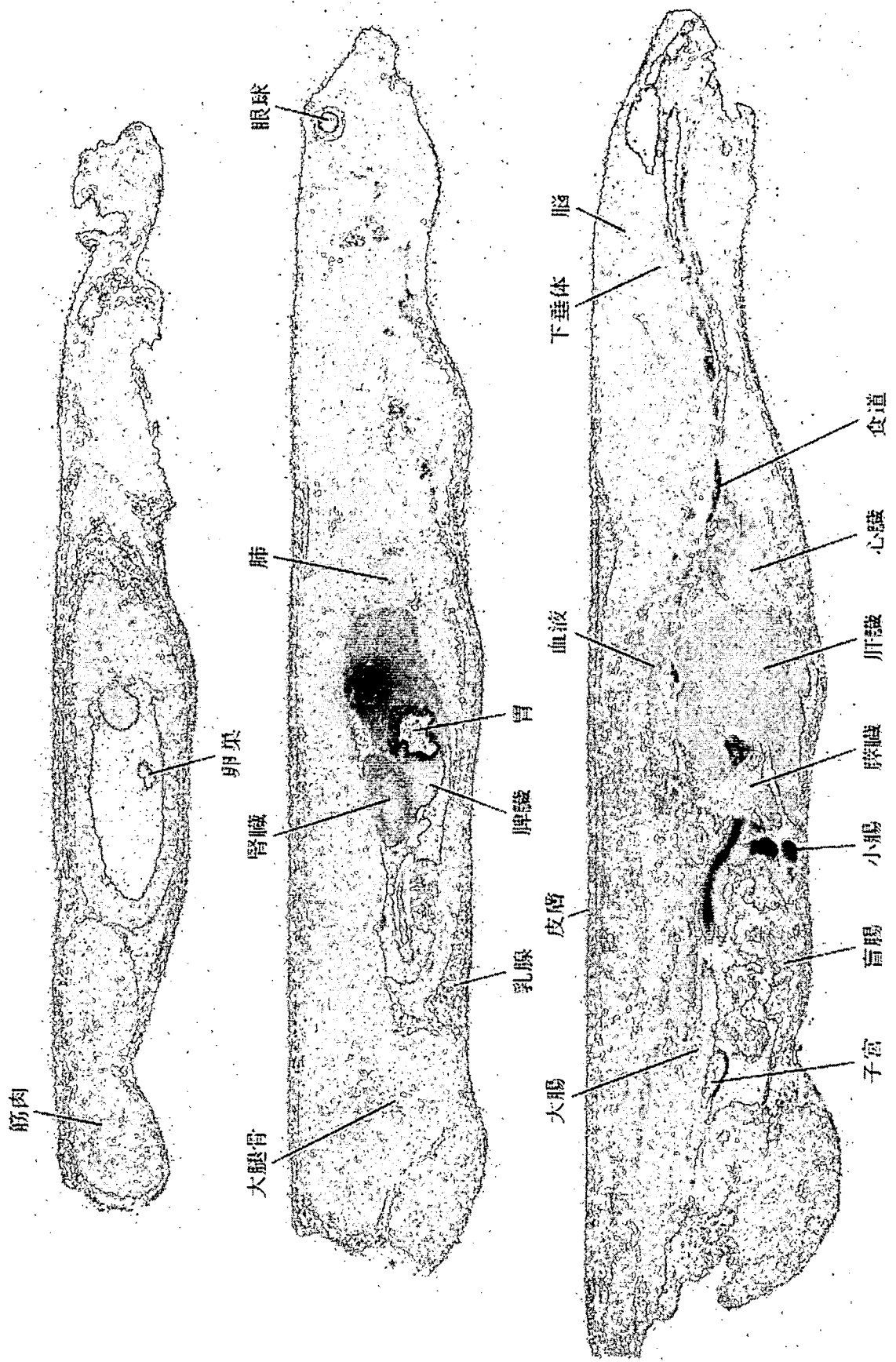


図5 [2,3-<sup>14</sup>C] Acrylamide を単回経口投与後6時間の成獣雌性ラット全身オートラジオグラフィ

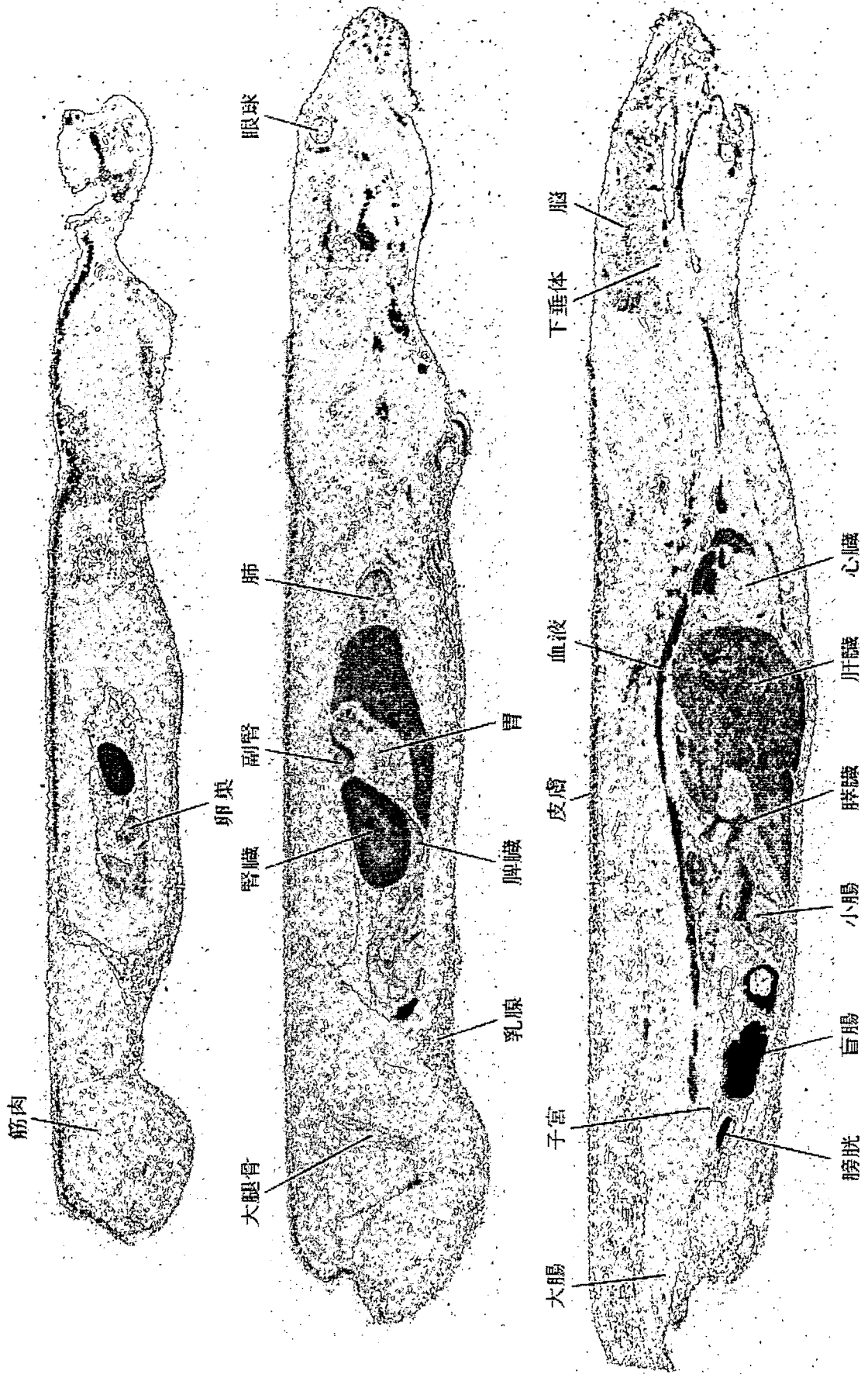


図6 [2,3-<sup>14</sup>C] Acrylamide を単回経口投与後72時間の成獣雌性ラット全身オートラジオグラフ

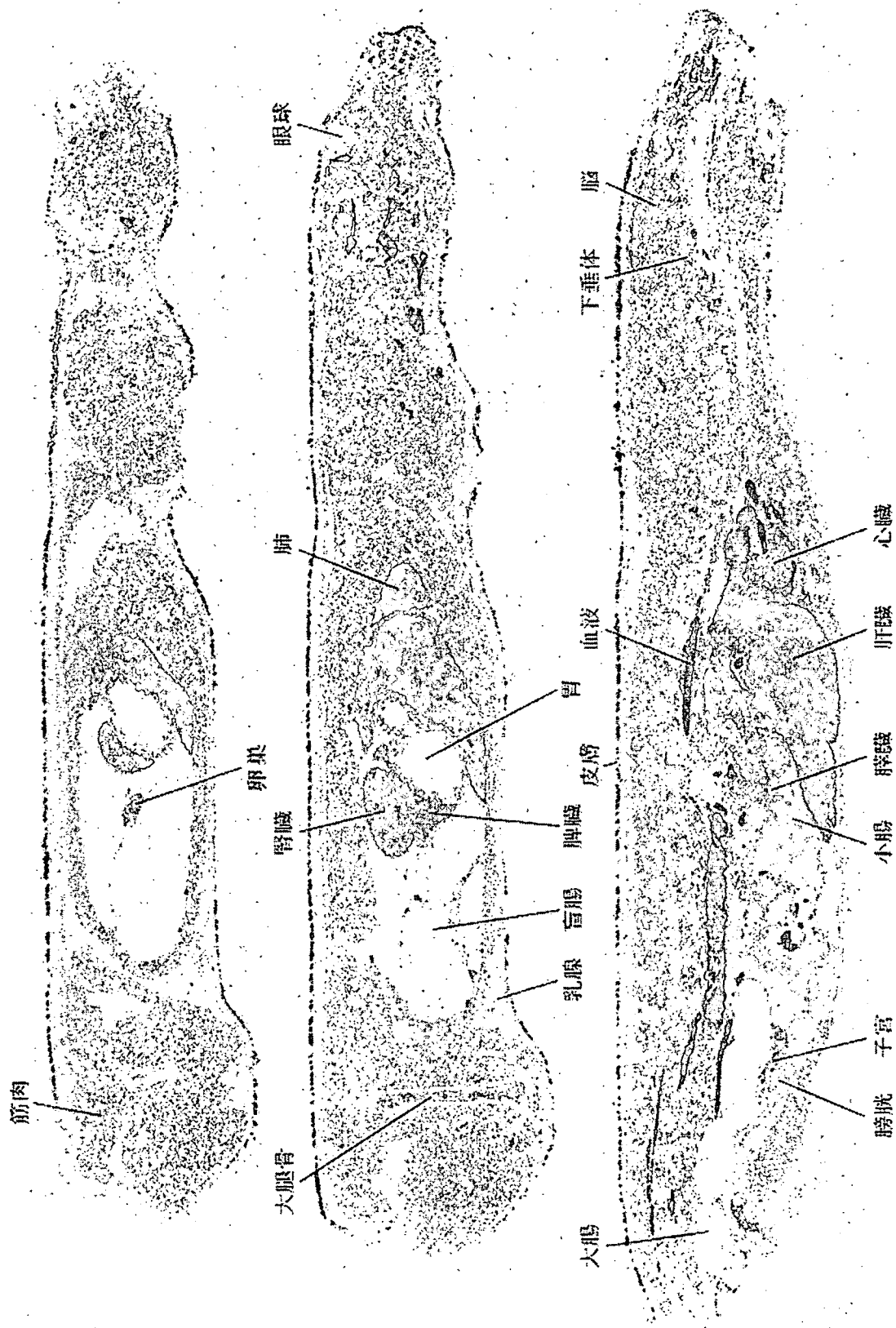




図7. 成熟雌性ラット [2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide、2.5mg/kg単回経口  
投与後の組織中放射能濃度変化

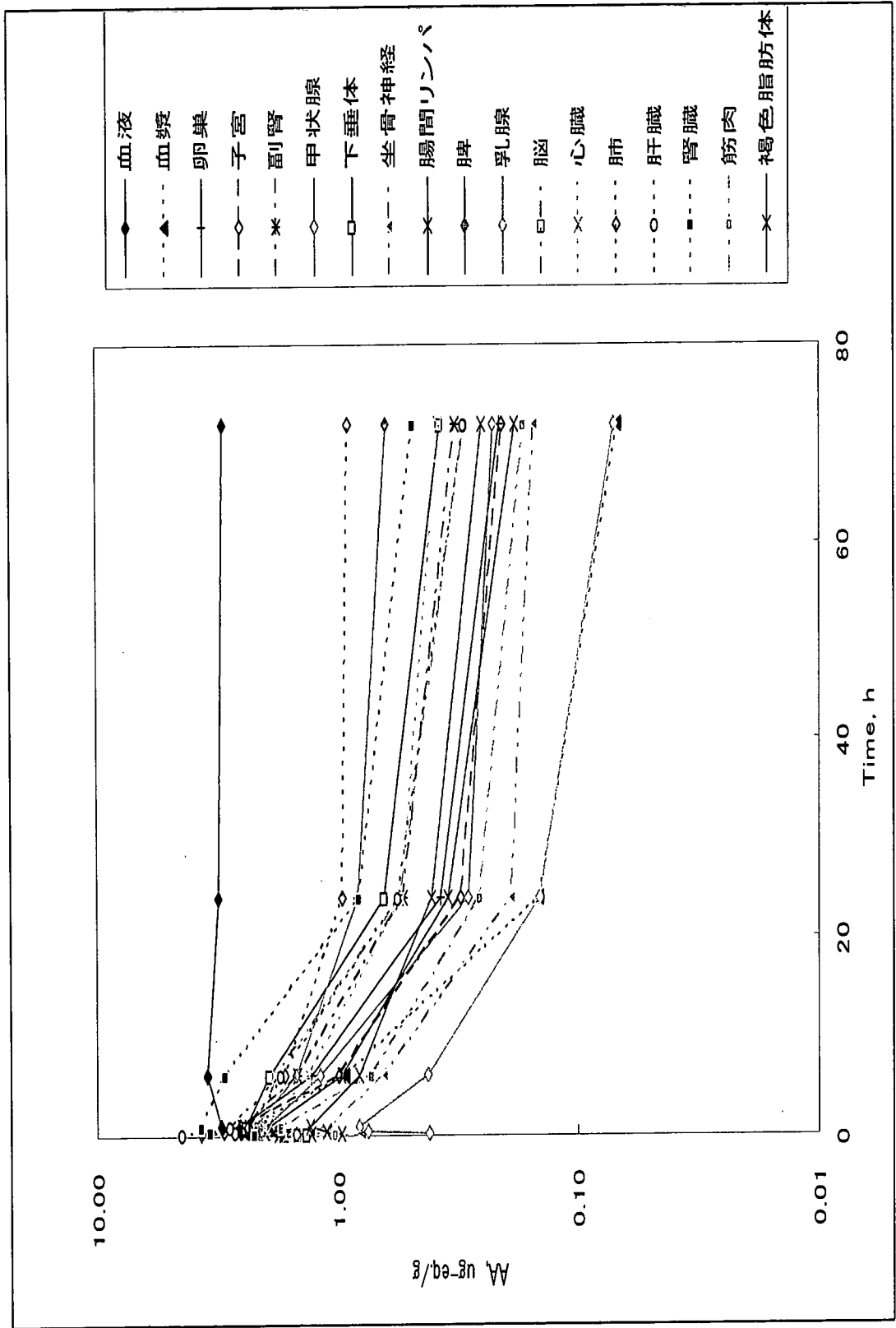


表1 [2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide経口投与後の血液・血漿中放射能濃度(n=2)

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 ( $\mu$ g eq./mL)
血液	10min	77400	74.80	1.83
	30min	113825	110.00	2.70
	1hr	127650	123.37	3.03
	6hr	138825	134.17	3.29
	24hr	132460	128.02	3.14
	72hr	128740	124.42	3.05
	血漿	10min	83600	80.80
30min		97925	94.64	2.32
1hr		80825	78.11	1.92
6hr		46290	44.74	1.10
24hr		7320	7.08	0.18
72hr		2205	2.13	0.06

\* 同一個体から各時点(計6時点)採血する方法に従った。

表2 [2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide経口投与後の尿・糞・呼気中放射能排泄率(n=2)

試料	観察区間(時間)	平均回収率(%)	累積回収率(%)
尿	0~3	20.38	
	3~24	40.52	60.9
	24~48	2.37	63.27
	48~72	1.2	64.47
糞	0~3	0	
	3~24	7.58	7.58
	24~48	1.03	8.61
	48~72	0.07	8.68
呼気	0~3	0.76	
	0~24	0.62	1.38
	0~48	0.15	1.53
	0~72	0.33	1.86
総回収率			75.01

表 3. 成熟雌性ラット [2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide, 2.5mg/kg 単回経口投与後の組織中放射能濃度

試料	組織中放射能濃度 (ug-eq./g) - 投与後						
	10min	30min	1 h	6 h	24 h	72 h	
血液	1.78	2.64	3.03	3.35	3.13	2.99	
血漿	1.88	2.37	2.06	1.04	0.16	0.06	
卵巣	1.75	2.33	2.56	1.29	0.37	0.21	
子宮	1.63	2.98	2.52	0.99	0.31	0.21	
副腎	1.76	2.01	2.50	1.48	0.53	0.32	
甲状腺	1.49	2.18	2.00	1.18	0.29	0.22	
下垂体	1.34	2.14	2.41	1.92	0.63	0.37	
坐骨神経	0.79	1.29	1.09	0.64	0.19	0.15	
腸間リンパ	1.28	1.86	1.95	0.96	0.34	0.18	
脾	3.71	2.13	2.22	1.48	0.82	0.62	
乳腺	0.41	0.74	0.81	0.42	0.15	0.07	
脳	1.46	2.10	2.08	1.81	0.55	0.30	
心臓	1.65	1.97	2.00	1.32	0.54	0.38	
肺	2.20	2.49	2.35	1.66	0.95	0.89	
肝臓	4.43	2.67	2.79	1.73	0.55	0.29	
腎臓	2.21	3.40	3.70	2.92	0.81	0.48	
筋肉	1.02	1.61	1.71	0.72	0.25	0.17	
褐色脂肪体	0.96	1.11	1.30	0.81	0.41	0.25	
尿	0.43	0.55	0.53	92.40	2.54	0.14	
腸内容物	-	1.42	1.83	1.33	0.35	0.06	

表 4. 成熟雌性ラット [2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide 2.5mg/kg 単回経口投与後の  
組織中放射能濃度の半減期 (hr)

	T1/2(14w)		
	1-6h	6-24h	24-72h
血液	-34	183	696
血漿	5	7	33
脳	25	10	54
下垂体	15	11	62
坐骨神経	6	10	153
甲状腺	7	9	137
心臓	8	14	96
肺	10	22	517
肝臓	7	11	53
腎臓	15	10	64
副腎	7	12	66
脾	9	21	117
腸間リンパ	5	12	52
卵巢	5	10	59
子宮	4	11	84
乳腺	5	12	46
筋肉	4	12	80

表5. 雌性ラット[2,3-<sup>14</sup>C]Acrylamide 2.5mg/kg単回経口投与後の組織  
中放射能濃度比(14w/4w)

試料	組織中放射能濃度比(14w/4w) - 投与後						
	10min	30min	1 h	6 h	24 h	72 h	
血液	0.77	1.14	1.15	1.69	2.09	2.58	
血漿	0.81	1.00	0.93	2.03	1.50	1.08	
脳	1.27	0.93	1.27	2.00	1.39	1.40	
下垂体	1.27	1.12	1.74	2.33	1.72	1.77	
甲状腺	0.93	1.00	1.43	1.06	0.82	1.51	
心臓	1.31	0.84	1.25	1.85	1.37	1.79	
肺	1.58	1.00	1.23	1.50	1.54	2.62	
肝臓	1.02	0.84	1.09	1.56	1.32	1.26	
腎臓	1.09	0.99	1.47	2.07	1.58	1.79	
副腎	1.30	0.76	1.25	1.62	1.42	1.82	
脾	1.26	0.75	1.13	0.93	1.31	1.86	
坐骨神経	0.82	0.65	0.82	1.25	0.76	1.24	
腸間リンパ	0.89	0.79	1.17	1.44	1.22	1.65	
卵巣	1.45	0.96	1.10	1.96	1.39	1.77	
子宮	1.52	1.29	1.38	1.71	1.09	1.92	
乳腺	0.88	0.75	1.09	2.13	1.25	0.95	
筋肉	1.03	0.70	1.16	1.41	1.02	1.14	
AV	1.13	0.91	1.22	1.68	1.34	1.66	
STDEV	0.26	0.17	0.21	0.39	0.32	0.47	

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（H18-食品-一般-013）

分担研究報告書（平成 19 年度）

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

分担研究者 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 准教授  
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) の神経毒性と精巣毒性に関して、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および感受性の違いを実験的に明らかにする。今年度は、発達期暴露に対する児動物の感受性の有無、および母体を介した ACR 暴露の程度を検討した。妊娠 6 日目の SD:IGS ラットに ACR を 0、25、50、100 ppm の用量で離乳（生後 21 日）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の病理組織学的検索を行った。また、生後 2 日から 21 日に ACR 50 mg/kg/day を週 3 回腹腔内投与した児動物についても同様の検索を行い、飲水投与群と比較した。生後 14 日に一部の児動物、離乳時に母動物から血液を採取し、血漿中の ACR 濃度および血球中の ACR-ヘモグロビン付加体の分析を行った。母動物では、50 ppm 以上で ACR の用量依存性に神経症状が進行し、病理組織学的検索では 50 ppm 以上で三叉神経ニューロンの中心性色質融解、100 ppm で坐骨神経の軸索変性が確認された。飲水投与群の児動物では、雌雄ともに 100 ppm で有意な体重低値を示したが、いずれの用量でも神経症状は観察されず、病理組織学的検索においても神経・精巣障害を示唆する所見は確認されなかった。一方、腹腔内投与を受けた児動物では、体重の低値とともに生後 15 日頃から成熟動物と類似した歩行異常が観察された。病理組織学的には三叉神経ニューロンの中心性色質融解や坐骨神経の軸索変性が認められたが、精巣障害については明らかではなかった。母動物、児動物ともに、血漿から ACR は検出されなかった。血球中の ACR-ヘモグロビン付加体は、母・児動物ともに用量に応じて増加を示したが、児動物での濃度は母動物の 1/10 あるいはそれ以下の程度で、母動物に較べると用量反応性は弱く、乳汁を介した暴露はかなり限られていると考えられた。また、100 ppm 群では児動物の ACR-ヘモグロビン付加体量はむしろ減少傾向を示し、母動物の神経症状に伴う乳汁摂取量の減少が推察された。以上の結果から、ACR の神経毒性作用に対して、離乳前児動物は感受性を有するが、母動物に対する飲水投与では、母動物毒性とは関係なく経乳暴露が成立していない可能性が示唆された。精巣毒性については、離乳前児動物では感受性の低い可能性が考えられるが、さらに検討が必要であると考えられた。

#### 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、一般的なヒト一日当たりの ACR 平均摂取量は、1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重とされている。一方、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が、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、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および感受性の違いを実験的に明らかにする。平成 18 年度には、胎児期と授乳期を通じた ACR 暴露による神経毒性および精巣毒性について評価を行った結果、児動物では体重低値および発達遅延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。胎児期および授

乳期では、ACRの標的とされている神経終末や精巣は発達途上の時期にあるため、この時期の児動物はACRに対する感受性の低い可能性もあるが、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。

そこで今年度は、発達期暴露によるACRの神経毒性と精巣毒性について、児動物の感受性の有無、および母体を介したACR暴露の程度を検討した。

## B. 研究方法

妊娠1日目の雌性SD:IGSラット18匹を日本チャールズリバーより購入し、5日間馴化した後実験に供した。妊娠6日目に各群4匹ずつ4群に分け、離乳(出産後21日目)までの間、ACR(Sigma)0、25、50、100ppmを飲水投与した。ACRの飲水投与用量は、昨年度の実験において母動物に神経障害が確認された100ppmを最高用量として設定した。また、2匹は無処置のまま出産させ、生後2日から離乳までの間、新生児にACR50mg/kg/dayを週3回(全9回)腹腔内投与した。これと同様の処置により、6週齢の雄SDラットにおいて、坐骨神経の軸索変性が確認されている(Saita et al., J Pharmacol Exp Ther., 1996)。

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、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4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21日まで、定期的に体重測定および臨床症状の観察を行った。生後14日目には、各腹1~2匹/性の児動物について、腹大動脈からヘパリンを含むシリンジにて採血し、血漿および血球をそれぞれ褐色ガラス瓶に入れて-80℃で凍結保存した。また、胃内乳汁も褐色ガラス瓶に入れて-80℃で凍結保存した。

出産後21日目に全ての生存動物を解剖し、脳、三叉神経、坐骨神経、精巣、精巣上体を採取し、脳、精巣、精巣上体の重量を測定した。母動物については、解剖前に腹大動脈からヘパリンを含むシリンジにて採血し、血漿および血球をそれぞれ褐色ガラス瓶に入れて-80℃

で凍結保存した。また、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℃、一晚)、精巣はブアン固定液(室温、一晚)にて固定し、精巣上体、三叉神経は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、エポン包埋後、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)。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。

坐骨神経および小脳分子層に関しては、0および100ppm群の母動物と児動物、および腹腔内投与を受けた児動物について、デジタルカメラ付顕微鏡(DP71, Olympus Optical Co., Ltd.)により各個体1枚の組織写真を撮影し、WinROOF (Version 5.7.1, Mitani Corp.)による形態計測を行った。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、平均有髄軸索径を計測した。小脳分子層においては、12.5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。

血漿および血球サンプルについては、(財)日本食品分析センターに依頼し、高速液体クロマトグラフ法による血漿中のACRの分析、およびガスクロマトグラフ-質量分析法による血球中のACR-ヘモグロビン付加体の分析を行った。

母動物の体重、臓器重量、繁殖パラメーター、児動物の体重、臓器重量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 0 ppm 群との間で有意差検定を行った。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。

(倫理面への配慮)

実験中に動物に与える苦痛は最小限にとどめるよう配慮した。動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

### C. 研究結果

母動物では、100 ppm 群で出産後 2 日目から歩行異常が進行し、神経症状の発現に伴って授乳期間中の体重は低値傾向を示した。50 ppm 群においても、出産後 18 日以降、軽度の歩行異常を示した。摂餌量、摂水量は 100 ppm 群で授乳期間中、やや低値傾向を示した。妊娠・授乳期を通した母動物の ACR 平均一日摂取量は、25、50、100 ppm 群においてそれぞれ  $3.72 \pm 0.28$ 、 $7.89 \pm 1.70$ 、 $14.56 \pm 2.47$  mg/kg/day であった。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、雄児動物では 25、50、100 ppm 群で、雌児動物では 25 ppm 群で、0 ppm 群に比較して有意に高値を示した (Table 1)。解剖時の母動物の体重および脳重量は、群間で有意差は認められなかった (Table 2)。病理組織学的検索では、50 ppm 以上で三叉神経ニューロンの中心性色質融解が観察された (Table 3)。形態計測では、100 ppm 群において、坐骨神経における変性軸索および萎縮した有髄神経線維 (径  $< 3 \mu\text{m}$ ) の増加と平均有髄軸索径の減少、小脳分子層における SYP 陽性の異常な点状染色像の増加が認められた (Table 4)。

児動物では全ての群において、生後 8~12 日頃に死亡例が多発し、生存率が 63~88% に低下した。飲水投与群の児動物では、離乳時の体重は雌雄ともに 100 ppm で有意な低値を示した (Table 5)。臓器重量は、雄では 100 ppm 群で脳および精巣の絶対重量減少と脳の相対重量増加、50 および 100 ppm 群で精巣上体の絶対重量減少が認められた (Table 5)。雌では 100 ppm 群において、脳の相対重量が有意に増加した (Table 5)。飲水投

与群の児動物では、実験期間中いずれの用量においても神経症状は観察されず、病理組織学的検索では、100 ppm 群で小脳外顆粒層細胞の残存と精上皮の発達遅延が認められたのみで、神経・精巣障害を示唆する所見は得られなかった (Table 6)。形態計測においても、0 ppm 群と 100 ppm 群の間で、いずれのパラメーターも有意な差は認められなかった (Table 7)。

腹腔内投与を受けた児動物では、体重低値とともに生後 15 日頃から成熟動物と類似した歩行異常が観察された。解剖時には、一部統計学的に有意ではないが、体重減少、脳および精巣の絶対重量減少と相対重量増加、精巣上体の絶対重量減少が認められた (Table 5)。神経系組織の病理組織学的検索では、小脳外顆粒層細胞の残存に加えて三叉神経ニューロンの中心性色質融解が観察され、精巣では飲水投与群と同様に精上皮の発達遅延が認められた (Table 6)。形態計測では、雌雄ともに坐骨神経における変性軸索および萎縮した有髄神経線維 (径  $< 3 \mu\text{m}$ ) の増加と平均有髄軸索径の減少が認められた (Table 7)。一方、小脳分子層における SYP 陽性の異常な点状染色像の増加は明らかではなかった (Table 7)。

高速液体クロマトグラフ法による血漿中の ACR の分析では、母動物、児動物ともに、いずれの用量群においても ACR は検出されなかった (検出限界:  $1 \mu\text{g/ml}$ )。ガスクロマトグラフ-質量分析法による血球中の ACR-ヘモグロビン付加体の分析については、現在母動物および雄児動物の一部についてのみ結果が得られている。現在得られている結果では、0 ppm 群において母動物、児動物でそれぞれ  $0.22 \sim 0.23$ 、 $0.13 \sim 0.18 \mu\text{mol/Hb g}$  の付加体が検出され、母動物では ACR の投与用量に応じて付加体量は増加傾向を示した。児動物においても 50 ppm までは用量に応じた増加傾向を示し、その量は母動物の 1/10 程度あるいはそれ以下のレベルであった。一方、100 ppm 群の付加体量は 50 ppm 群よりも低値を示した (Table 8)。

### D. 考察

胎児期の ACR 暴露は、児動物の体重低値を生じることが報告されているが (Wise et al., Neurotoxicol Teratol. 1995)、本研究では生後 2 日目の児動物体重が、雄では

25、50、100 ppm 群で、雌では 25 ppm 群で、0 ppm 群に比較して有意に高値を示した。繁殖パラメーターに明らかな群間の差はないものの、25 ppm 群で一腹当たりの産児数がやや少なかったことや、100 ppm 群で妊娠期間が比較的長かったこと等に起因すると推測され、今回認められた児動物の体重増加には毒性学的意義は乏しいと考えられた。

本研究では生後 8~12 日頃に児動物の死亡が多発したが、死亡個体の発生状況や生存率に群間の差は見られなかったことから、おそらく飼育環境上の問題と推測され、ACR 投与には関連しないと考えられた。

飲水投与群では、昨年度の実験結果と同様に、母動物では用量依存性の神経毒性作用が認められたが、児動物では神経症状は観察されず、組織学的検索においても、体重低値に起因する発達遅延の影響が認められたのみで、神経毒性および精巣毒性作用は確認されなかった。一方、直接 ACR の腹腔内投与を受けた児動物では、成熟動物と類似した歩行異常や坐骨神経の軸索変性が認められたことから、神経毒性に関しては、離乳前の児動物も感受性を有することが確認された。腹腔内投与を受けた児動物では、飲水投与群母動物と比較して、小脳分子層における SYP 陽性の異常な点状染色像の発生が乏しかったが、この差を生じた原因については、週齢や投与経路、投与量の違いなど様々な要因が考えられ、特定はできなかった。精巣では、飲水投与群および腹腔内投与群ともに精上皮の発達遅延がみられたが、両群とも精細胞に対する障害作用は確認されなかった。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、投与用量等を検討しさらに検索が必要である。

血漿中の ACR の分析では、母動物、児動物ともに、いずれの用量群においても ACR は検出されなかったが、今回用いた方法では検出限界が比較的高かったためと推測された。血球中の ACR-ヘモグロビン付加体は、0 ppm 群の個体でも検出されたが、無処置動物でも微量の付加体が検出されることが報告されており、今回検出された付加体量は文献報告とほぼ同等であった。母動物では ACR の投与用量に応じて付加体量は増加傾向

を示し、ACR の暴露量を反映するものと考えられた。児動物においても 50 ppm までは用量に関連して付加体量の弱い増加が認められたが、その量は母動物の 1/10 あるいはそれ以下の程度であった。今回の検索では、母動物と児動物の赤血球、ヘモグロビンの代謝等の差異等を考慮する必要があるが、児動物の乳汁を介した ACR 暴露量は、母動物に比べかなり低いものと推察される。また 100 ppm 群では、母動物は用量に応じた付加体量の増加を示したのに対し、児動物では付加体量が減少傾向を示したことから、おそらく母動物の神経症状の進行に伴って児動物の乳汁摂取量が減少していたと考えられる。したがって、母動物の飲水投与を介した暴露では、母動物の神経毒性に関わらず、児動物の暴露量は低く、神経毒性や精巣毒性を生じるには不十分であると考えられた。また、100 ppm 群の児動物で観察された体重低値には、乳汁摂取不足が大きく影響していると推測された。今後は、引き続き ACR-ヘモグロビン付加体の分析を進め、経乳暴露の程度について明らかにしたい。

## E. 結論

ACR の神経毒性作用に対して、離乳前児動物は感受性を有するが、母動物に対する飲水投与では、母動物毒性とは関係なく経乳暴露の程度が著しく低い可能性が示唆された。精巣毒性については、離乳前児動物では感受性が低い可能性が考えられるが、さらに検討が必要である。

## 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.*, 45(8), 1507-1515, 2007.

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

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・精巣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 年 9 月、札幌

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 年 2 月、名古

屋

Miwa Takahashi, Makoto Shibutani, Kaoru Inoue, Hitoshi Fujimoto, Masao Hirose, Midori Yoshida, Akiyoshi Nishikawa: 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, March 2008, Seattle, USA

## F. 知的所有権の取得状況

特になし。

**Table 1. Reproductive data.**

	ACR in drinking water (ppm)				ACR 50 mg/kg/day, i.p.
	0	25	50	100	
No. of animals examined	4	4	4	4	2
Gestational period (days)	21.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	21.8 ± 0.5	21.8 ± 0.5	22.0 ± 0.0	21.5
No. of implantation/dam	15.5 ± 3.4	14.5 ± 1.3	14.0 ± 0.8	14.8 ± 0.5	15.0
Live birth (%) <sup>b</sup>	100	100	100	100	100
No. of live pups/litter <sup>c</sup>	13.5 ± 4.2	12.8 ± 1.0	13.8 ± 1.0	14.0 ± 1.2	14.0
No. of male pups <sup>c</sup>	7.0 ± 1.6	6.5 ± 1.3	6.8 ± 2.6	7.0 ± 2.7	6.0
No. of female pups <sup>c</sup>	6.5 ± 2.6	6.3 ± 0.5	7.0 ± 2.2	7.0 ± 2.2	8.0
Male ratio (%)	53.3 ± 6.8	50.7 ± 6.6	48.6 ± 17.8	49.5 ± 16.2	42.9
Male pup body weight <sup>c</sup> (g)	6.35 ± 0.56	7.27 ± 0.71**	6.96 ± 0.91**	7.00 ± 0.48**	6.73 ± 0.47
Female pup body weight <sup>c</sup> (g)	6.32 ± 0.68	7.01 ± 0.60**	6.68 ± 0.84	6.56 ± 0.55	6.50 ± 0.52

<sup>a</sup> mean±SD<sup>b</sup> Live birth (%)=No. of live pups delivered/Total no. of pups delivered×100<sup>c</sup> measured at PND2

\*\*: p&lt;0.01 vs. 0 ppm group

**Table 2. Body and brain weights of dams at weaning.**

	ACR in drinking water (ppm)				ACR 50 mg/kg/day, i.p.
	0	25	50	100	
No. of animals examined	4	4	4	4	2
Body weight (g)	316.3 ± 18.6 <sup>a</sup>	323.9 ± 21.2	315.9 ± 26.2	291.0 ± 18.3	317.5
Brain (g)	1.96 ± 0.09	1.92 ± 0.11	1.92 ± 0.06	1.85 ± 0.06	1.95
(g%)	0.62 ± 0.05	0.60 ± 0.04	0.61 ± 0.06	0.64 ± 0.05	0.62

<sup>a</sup> mean±SD