

**Table 3 Data for histopathological grading of the lesions developed in the peripheral nerves of dams.**

Organ	Findings	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
Trigeminal nerve	Central chromatolysis of ganglion cells (+/+/+/+) <sup>a</sup>	0	0	4 (3/1/0)	4 (0/3/1)	0

<sup>a</sup> Grade of change: +, mild; ++, moderate; +++, severe.

**Table 4 Data for morphometry of the lesions developed in the nervous tissues of dams.**

	No. of animals examined	ACR in drinking water (ppm)			
		0	25	50	100
	examined	4	0	0	4
Sciatic nerve (distal portion)					
Density	(/100 $\mu\text{m}^2$ )	1.82 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	NE	NE	1.97 $\pm$ 0.12
Degenerated axons	(%)	0.39 $\pm$ 0.09	NE	NE	1.93 $\pm$ 0.64*
Myelinated axons, <3 $\mu\text{m}$ in diameter	(%)	10.41 $\pm$ 1.14	NE	NE	13.03 $\pm$ 1.32*
Average diameter of myelinated axons	( $\mu\text{m}$ )	6.68 $\pm$ 0.15	NE	NE	5.99 $\pm$ 0.21**
Cerebellar cortex, molecular layer					
SYP-immunoreactive aberrant dots	(/mm cortex)	0.38 $\pm$ 1.50	NE	NE	1.50 $\pm$ 0.56*

<sup>a</sup> mean $\pm$ SD

\*, \*\*: p<0.05, p<0.01 vs. 0 ppm group (Student's *t*-test)

Abbreviations: SYP, synaptophysin; NE, not examined.

**Table 5 Body and organ weights of F1 offspring at weaning.**

		Acrylamide in drinking water (ppm)				Acrylamide
		0	25	50	100	50 mg/kg/day, i.p.
<i>Males</i>	No. of animals examined	3	4	8	5	4
	Body weight (g)	57.6 ± 4.9 <sup>a</sup>	58.2 ± 9.1	52.7 ± 7.3	33.3 ± 2.6**	31.3 ± 9.0**
	Brain (g)	1.45 ± 0.08	1.46 ± 0.03	1.48 ± 0.04	1.33 ± 0.06*	1.10 ± 0.07**
	(g%)	2.53 ± 0.08	2.55 ± 0.40	2.85 ± 0.35	4.00 ± 0.23**	3.71 ± 0.90
	Testes (g)	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.05	0.20 ± 0.02	0.14 ± 0.01*	0.14 ± 0.04
	(g%)	0.38 ± 0.02	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.05	0.42 ± 0.03	0.46 ± 0.04*
	Epididymides (g)	0.035 ± 0.004	0.036 ± 0.003	0.029 ± 0.002*	0.026 ± 0.004**	0.022 ± 0.003
	(g%)	0.060 ± 0.000	0.063 ± 0.010	0.055 ± 0.008	0.076 ± 0.011	0.075 ± 0.017
<i>Females</i>	No. of animals examined	7	6	6	3	5
	Body weight (g)	58.8 ± 3.9	49.6 ± 18.3	53.5 ± 7.2	31.9 ± 1.7*	36.8 ± 4.6**
	Brain (g)	1.44 ± 0.06	1.37 ± 0.15	1.43 ± 0.08	1.32 ± 0.02	1.13 ± 0.03*
	(g%)	2.46 ± 0.13	3.19 ± 1.47	2.71 ± 0.36	4.13 ± 0.20*	3.10 ± 0.34

<sup>a</sup> mean±SD

\*, \*\*: p&lt;0.05, p&lt;0.01 vs. 0 ppm group.

**Table 6 Data for histopathological analysis of F1 offspring at weaning.**

		Acrylamide in drinking water (ppm)				Acrylamide
		0	25	50	100	50 mg/kg/day, i.p.
<i>Males</i>	Number of animals examined	3	4	8	5	4
	Cerebellum					
	External granule layer (+/+/+/+) <sup>a</sup>	3 (3/0/0)	4 (3/1/0)	8 (1/7/0)	5 (1/3/1)	4 (0/3/1)
	Trigeminal nerve					
	Central chromatolysis of ganglion cells (+/+/+/+) <sup>a</sup>	0	0	0	0	4 (3/1/0)
	Testis					
	Retardation of spermatogenesis (+/+/+/+) <sup>a</sup>	0	0	0	5 (3/2/0)	4 (2/2/0)
<i>Females</i>	Number of animals examined	7	6	6	3	5
	Cerebellum					
	Remained external granule layer (+/+/+/+) <sup>a</sup>	7 (5/2/0)	6 (3/3/0)	6 (3/3/0)	3 (0/3/0)	5 (1/3/1)
	Trigeminal nerve					
	Central chromatolysis of ganglion cells (+/+/+/+) <sup>a</sup>	0	0	0	0	5 (4/1/0)

<sup>a</sup> Grade of change: +, mild; ++, moderate; +++, severe.

**Table 7 Data for morphometry of the lesions developed in the nervous tissues of F1 offspring at weaning.**

		Acrylamide in drinking water (ppm)				Acrylamide
		0	25	50	100	50 mg/kg/day i.p.
<i>Males</i>	No. of animals examined	3	0	0	5	4
Sciatic nerve (distal portion)						
Density	(/100 $\mu\text{m}^2$ )	4.35 $\pm$ 0.34	NE	NE	4.21 $\pm$ 0.39	4.00 $\pm$ 0.27
Degenerated axons	(%)	0.59 $\pm$ 0.53	NE	NE	0.44 $\pm$ 0.21	2.99 $\pm$ 0.63**
Myelinated axons, <3 $\mu\text{m}$ in diameter	(%)	28.45 $\pm$ 4.34	NE	NE	31.23 $\pm$ 4.17	48.97 $\pm$ 4.34**
Average diameter of myelinated axons	( $\mu\text{m}$ )	3.62 $\pm$ 0.12	NE	NE	3.62 $\pm$ 0.13	3.17 $\pm$ 0.14**
Cerebellar cortex, molecular layer						
SYP-immunoreactive aberrant dots	(/mm cortex)	0.31 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	NE	NE	0.31 $\pm$ 0.08	0.50 $\pm$ 0.24
<i>Females</i>	No. of animals examined	5	0	0	3	5
Sciatic nerve (distal portion)						
Density	(/100 $\mu\text{m}^2$ )	4.46 $\pm$ 0.19	NE	NE	4.32 $\pm$ 0.18	4.39 $\pm$ 0.50
Degenerated axons	(%)	0.53 $\pm$ 0.27	NE	NE	0.33 $\pm$ 0.01	2.02 $\pm$ 0.22**
Myelinated axons, <3 $\mu\text{m}$ in diameter	(%)	30.19 $\pm$ 3.62	NE	NE	28.03 $\pm$ 2.72	44.24 $\pm$ 4.87**
Average diameter of myelinated axons	( $\mu\text{m}$ )	3.58 $\pm$ 0.15	NE	NE	3.80 $\pm$ 0.13	3.21 $\pm$ 0.13**
Cerebellar cortex, molecular layer						
SYP-immunoreactive aberrant dots	(/mm cortex)	0.23 $\pm$ 0.06	NE	NE	0.18 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.13

<sup>a</sup> mean  $\pm$  SD

\*, \*\*: p<0.05, p<0.01 vs. 0 ppm group (Student's *t*-test)

Abbreviations: SYP, synaptophysin; NE, not examined.

**Table 8 Draft data for GC/MS analysis of ACR·Hb adducts in dams and male offspring after maternal exposure to ACR.**

ACR in drinking water (ppm)	ACR adducts		Concentration of ACR per blood cell <sup>a</sup>	
	( $\mu\text{mol}/\text{Hb g}$ )	( $\mu\text{mol}/\text{g}$ )	( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	
Dams	0	0.23 <sup>b</sup>	0.06	4
	0	0.22 <sup>b</sup>	0.04	3
	25	3.19	0.75	53
	25	3.56	0.91	64
	50	5.00	1.11	79
	50	4.42	0.79	56
	100	4.92	0.89	63
	100	6.11	1.16	82
	100	4.74	1.31	93
	100	7.20	1.22	87
Offspring	0	0.18 <sup>b</sup>	0.024	1.7
	0	0.13 <sup>b</sup>	0.030	2.1
	25	0.31	0.071	5.0
	25	0.32	0.061	4.3
	50	0.28	0.038	2.7
	50	0.50	0.100	6.8
	100	0.20	0.032	2.3
	100	0.36	0.061	4.3
	100	0.30	0.043	3.1

<sup>a</sup> Calculated as monomer

<sup>b</sup> Measurable level of Hb adducts was observed in untreated animals.

(0.15 (0.14-0.17)  $\mu\text{mol}/\text{Hb g}$ , Bergmark, E. et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 1991

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 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発がん感受性に関する研究

分担研究者 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

本研究では、アクリルアミド(AA)の乳幼児期投与による発がん感受性に及ぼす影響を実験的に明らかにし、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を目的とする。18、19年度は、多臓器を標的としたラット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～春期発動期における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、一般状態、体重、摂餌量及び飲水量に明らかな影響はみられなかった。病理組織学的にも40 ppm群の精巣において軽微な変化のみであったことから、40 ppmは耐量であると判断された。そこで、中期発がん性試験においては、AAを乳幼児期に20、40及び80 ppm濃度で飲水投与し、その後7週齢時に多臓器に対して標的性を示す発がん物質の*N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素を1回投与し、更に43週間飼育して剖検した。現在、その病理組織学的解析を進めている。

A. 研究目的

加工食品中に種々の濃度で含まれていることが明らかにされたアクリルアミド(AA)については、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ている。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、食品を介する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。またAAの発がん性については、乳腺、甲状腺、副腎、子宮などに標的性を示すことから、遺伝毒性のみならず、内分泌系に対する影響の関与している可能性が指摘されている。第47回米国トキシコロジー学会(2008年3月、シアトル)では、AAの甲状腺発がんに関する機序解析の結果が発表された。即ち、AAを2.5-50 mg/kg体重/日の用量で14日間飲水投与し、甲状腺の病理組織学的、細胞動態学的あるいは遺伝子発現解析及び血清ホルモン値の測定を行った結果、甲状腺における発がん性の機序を説明し得る変化は認められなかったとされている(Deorge DRら)。今後、乳腺など他臓器に対する影響についての解析を要する。

一方、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）、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。

本研究では、AAの乳幼児期投与による発がん感受性に及ぼす影響を実験的に明らかにすることを目的としている。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。

## B. 研究方法

(1) 乳幼児～春期発動期投与による予備実験  
—先に実施した実験でAAの影響が疑われた心臓及び腎臓における変化を確認するための再実験—

18年度にラットの乳幼児～春期発動期における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、雄の心臓において、対照群と同等の軽度な心筋炎が4/12例にみられたのに加え、5/12例の右心室壁心底側、心外膜下に中等度の心筋炎が認められ、統計学的にも有意に（ $p < 0.01$ ）増加した。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。ま

た、雌の腎臓においては、石灰沈着が対照群の16/17例にみられたのに対し、40 ppm群では6/12例と有意に（ $p < 0.05$ ）減少した。そこで、心臓及び腎臓における変化の再現性を確認するため、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。

妊娠F344ラット10匹を日本チャールスリバーより購入し、各群5匹の2群に分けた。出生後の児動物は、原則として雌雄各群20例に揃えた。各群の母動物には、出産直後より3週後の離乳まで、AAを0（対照）及び40 ppm濃度で飲料水に混じて自由摂取させた。離乳後は、母動物はエーテル麻酔下で屠殺した。離乳後の児動物には母動物と同様の方法でAAを9週間投与した。今回設定した40 ppmは、先に実施した乳幼児～春期発動期投与による予備実験で心臓あるいは腎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 ら、1986；Friedman MA ら、1994）。実験期間中、一般状態は毎日観察し、体重、摂餌量、飲水量は週1回測定した。12週間の投与期間終了後、エーテル深麻酔下にて、血清生化学検査のため全動物の大動脈より採血し、放血屠殺して剖検を行った。雌雄の心臓及び雌の腎臓を摘出、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・エオジン染色標本作製し、病理組織学的検索を行った。また、血清生化学検査では、雌雄のAST、ALT、CK及びLDH、雌のCa及びIPを測定した。

(2) 乳幼児期投与による中期発がん性試験

妊娠F344ラット36匹を日本チャールスリバーより購入し、各群6匹の第1群～第6群に分けた。出生後の児動物は、原則として雌雄各群24匹に揃えたが、第6群については母動物6匹中1匹の出産児数が1匹で、児動物の発育も不良であったことから除外したため、雌雄各

20匹となった。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濃度で飲料水に混じて自由摂取させた。第5群及び第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AAを0(対照)及び40ppm濃度で投与した。AAの投与量は、乳幼児～春機発動期投与の予備実験で一般状態、体重、摂餌量及び飲水量に顕著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。離乳後、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AAを母動物と同様の方法で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群の雌雄の児動物に40 mg/kg体重の用量で1回腹腔内投与した。第5群、第6群の雌雄には、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、一般状態は毎日観察し、体重及び摂餌量は生後20週齢までは週1回、その後は4週間に1回測定した。また、MNU投与後は触診により乳腺腫瘍の発生状況を週1回観察してノギスにてその大きさ(たて×よこ×高さ)を測定した。50週齢時に実験を終了し、エーテル深麻酔下にて動物を放血屠殺した。剖検時、雌については剥皮後、皮下結節/腫瘍を詳細に観察して大きさを測定するとともに、雌雄について肝臓、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。なお、触診及び剖検時に測定した腫瘍(腫瘤)の大きさより、次の式により体積を計算した。

$$\text{体積}=(\text{たて})\times(\text{よこ})\times(\text{高さ})\times\pi/6$$

統計方法：体重、臓器重量及び乳腺腫瘍の発

生数あるいは体積についてはBertlett検定の後、ANOVAあるいはKruskal Wallis検定を行い、群間差が認められた場合はDunnettの多重比較で判定した。乳腺腫瘍及び他臓器の病理組織所見の発生頻度についてはFisherの直接確率検定法を用いた。

(倫理面への配慮)

使用する動物は最小限に留めた。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からの脱血により屠殺し、その他の実験手技についても動物の愛護に十分配慮して行った。実験の開始に当たっては、「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。

## C. 研究結果

### (1) 乳幼児～春機発動期投与による予備実験

—先に実施した実験でAAの影響が疑われた心臓及び腎臓における変化を確認するための再実験—

母動物については、一般状態、体重、摂餌量及び飲水量にAA投与による明らかな影響はみられなかった。飲水量より算出した40 ppm群におけるAA摂取量は、7.9 mg/kg体重/日であった。

児動物については、40 ppm群の雌雄において、体重が実験期間を通して統計学的に有意( $p<0.01, 0.05$ )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(図1)。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。摂餌量及び飲水量にもAA投与による明らかな影響はみられず、飲水量より算出した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。心臓あるいは腎臓の

絶対重量は、40 ppm 群の雌雄で対照群に比して有意な ( $p < 0.01$ ) 低値を示したが、体重増加抑制によるものと考えられ、相対重量に影響はみられなかった (表 1)。血清生化学検査については、測定したいずれの検査項目においても AA 投与による影響はみられなかった (表 2)。病理組織学的には、雌雄の対照及び 40 ppm 群の心臓において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 (表 3)。雌の対照及び 40 ppm 群の腎臓においては軽度な石灰沈着がみられたが、その発生頻度に群間の違いはみられなかった (表 3)。

#### (2) 乳幼児期投与による中期発がん性試験

母動物については、一般状態に AA 投与による変化はみられず、体重についても分娩後 1-3 週目に 80 ppm 群で対照群に比し低値傾向を示したが、統計学的有意差はなかった。摂餌量及び飲水量は、分娩後 3 週目に 80 ppm 群において低値傾向を示した。飲水量より算出した母動物の平均 AA 摂取量は、20、40 及び 80 ppm の各群において、4.1、8.0 及び 14.7 mg/kg 体重/日であった。

児動物については、離乳前、雌雄の対照群を含む各群に死亡が散見されたが、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 ( $p < 0.05, 0.01$ ) 低値を示した (図 2)。摂餌量及び飲水量には AA 投与による明らかな影響はみられなかった。飲水量より算出した児動物の平均 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 (表 4)。

#### D. 考察

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、AA の幼若期投与による心臓毒性を示唆する結果が得られ、雌では腎臓における石灰沈着を軽減する可能性が示された。これらの作用は、成熟ラットに AA を投与した際の変化としては報告がみられないことより、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及び腎臓の相対重量の変化はみられず、血清生化学検査においても、心臓毒性あるいは腎臓の石灰沈着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、病理組織学的解析において心臓及び腎臓にみられた所見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及び腎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、摂餌量及び飲水量には AA 投与による明らかな変化は認められず、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。

## E. 結論

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、いずれの用量においても一般状態、体重、摂餌量及び飲水量に明らかな影響はみられず、病理組織学的にも 40 ppm 群の精巢において軽微な変化がみられたのみであったことから、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。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y.M., Onose, J., Hirose, M.: Depression of T cell-mediated immunity reduces sulfadimethoxine-induced capsular inflammation and inhibits associated development of invasive thyroid follicular cell carcinomas in rats. *Cancer Sci.*, 98, 294-298 (2007)
- (2) Hasumura, M., Ueda, M., Onose, J., Imai, T., Hirose, M.: Lack of a significant effect of arctiin on development of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Nutr. Cancer*, 57, 201-208 (2007)
- (3) Imai, T., Fukuta, K., Hasumura, M., Cho, Y.M., Ota, Y., Takami, S., Nakagama, H., Hirose, M.: Significance of inflammation-associated regenerative mucosa characterized by Paneth cell metaplasia and  $\beta$ -catenin accumulation for the onset of colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 28, 2199-2206 (2007)
- (4) Hirata-Koizumi, M., Watari, N., Mukai, D., Imai, T., Hirose, A., Kamata, E., Ema, M.: A 28-day repeated dose toxicity study of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)-benzotriazole in rats. *Drug Chem. Toxicol.*, 30, 327-341 (2007)
- (5) Cho, Y.M., Imai, T., Ota, Y., Hasumura, M., Takami, S., Hirose, M., Nishikawa, A.: A new medium-term rat colorectal bioassay applying neoplastic lesions as end points for detection of carcinogenesis modifier - Effects with weak or controversial modifiers. *Toxicol. Pathol.* (In press)
- (6) Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Ueda, M., Ozeki, K., Hirose, M.: Evaluation of subchronic toxicity of dietary administered Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* HD-1 in F344 male rats with chemically induced gastrointestinal impairment. *Food Chem. Toxicol.* (in press)

- (7) Takami, S., Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y.M., Onose, J., Hirose, M: Evaluation of toxicity of green tea catechins with 90-day dietary administration to F344 rats. Food Chem. Toxicol. (In press)
- (8) Hirata-Koizumi, M., Matsuyama, T., Imai, T., Hirose, A., Kamata, E., Ema, M.: Gender-related difference in the toxicity of ultraviolet absorber 2-(3', 5' -di-*tert*-butyl-2' hydroxyphenyl)-5-chloro-benzotriazole in rat. Drug Chem. Toxicol. (In press)

## 2. 学会発表

- (1) 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）
- (2) 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
該当なし。

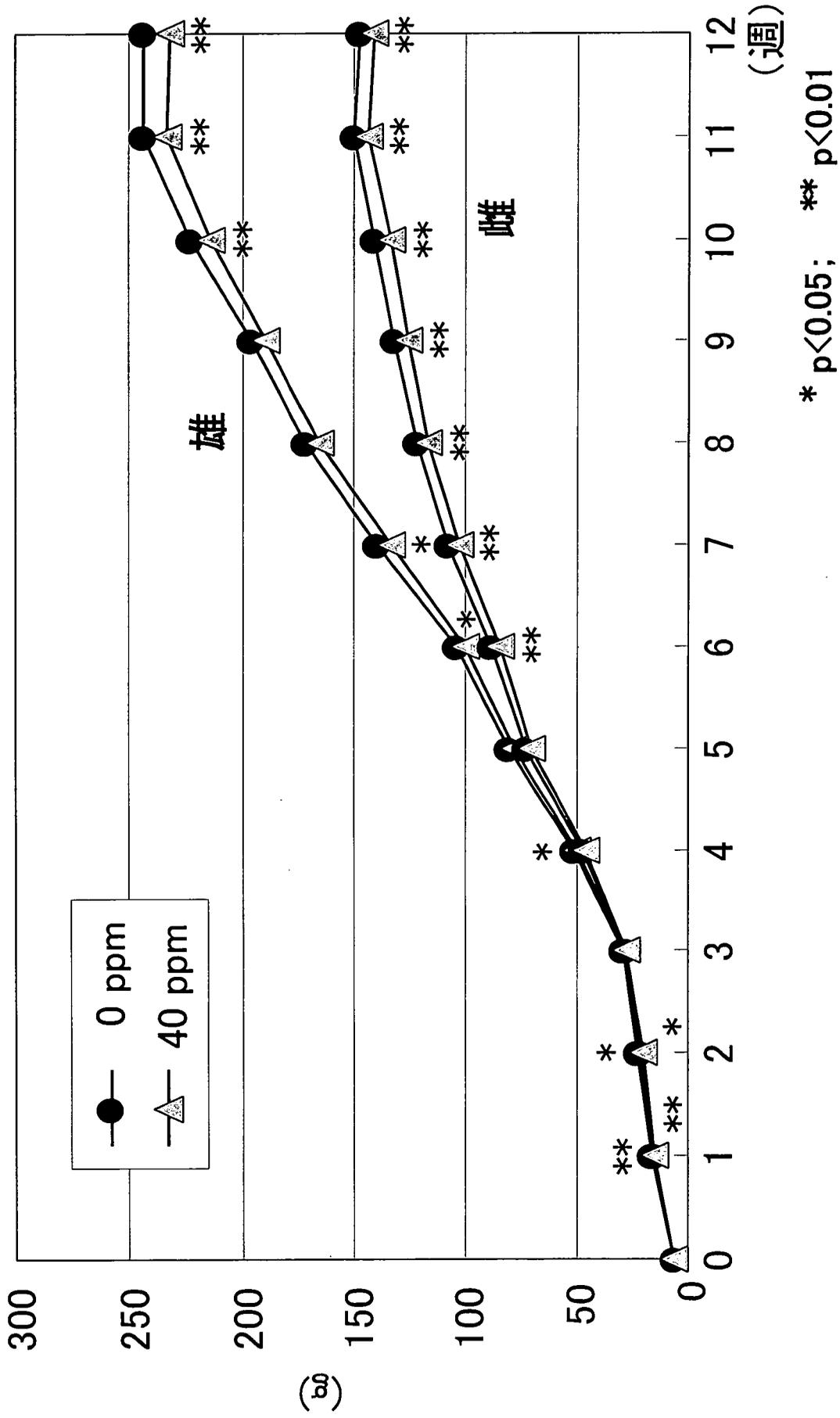
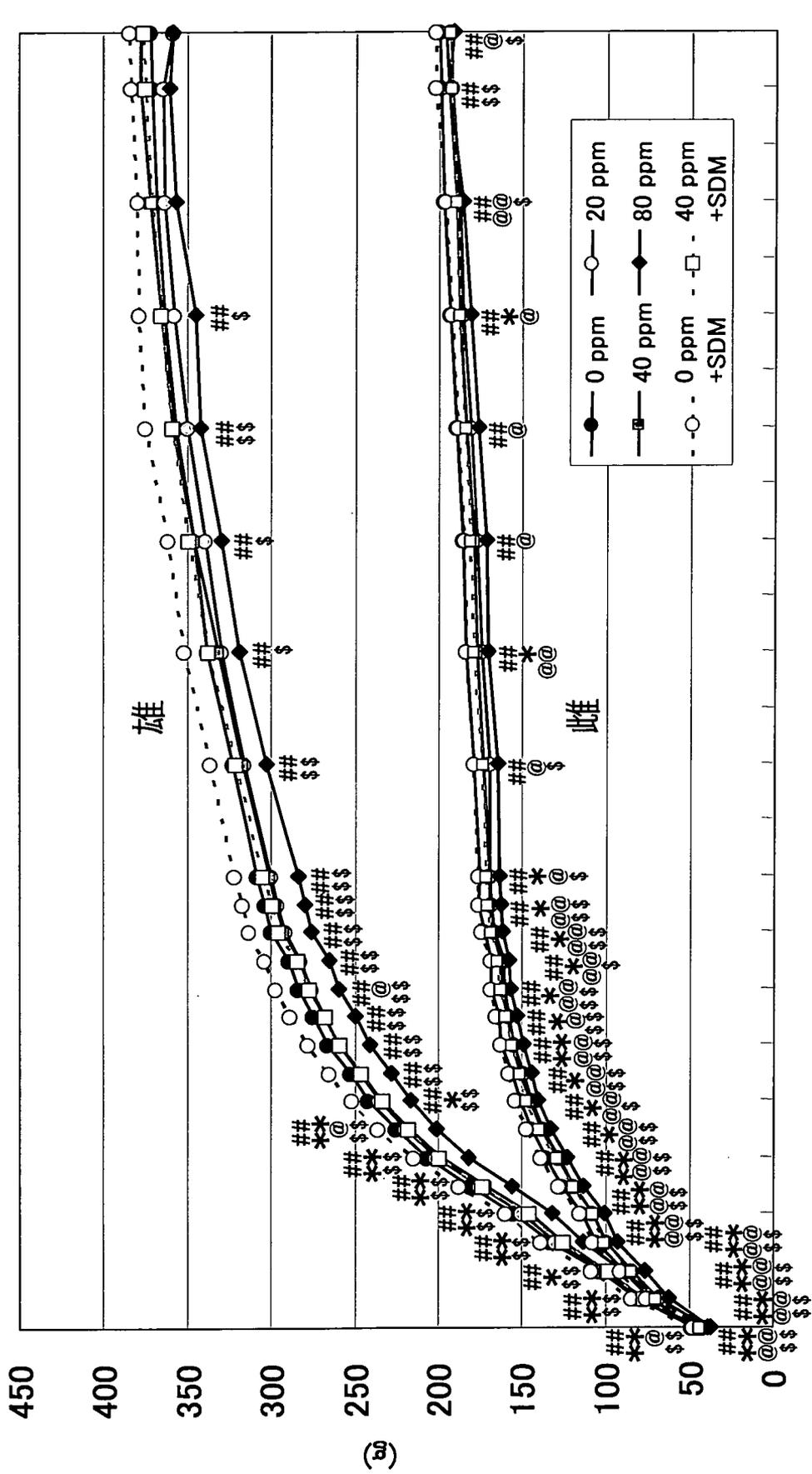


図1 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与したラットの体重曲線



@,\*,#,\$ p<0.05; @@,\*\*,###,\$\$ p<0.01 ( @ 20 ppm \* 40 ppm # 80 ppm \$ 40 ppm+SDM ) vs 0 ppm (週)

図2 アクリルアミドの乳幼児期によるラット中期発がん性試験における体重曲線

表1 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与したラットの臓器重量

	用量 (ppm)	0 (対照)	40
雄	動物数	19	20
最終体重		244 ± 9	233 ± 9 **
心臓 (絶対)		0.80 ± 0.05	0.76 ± 0.04 **
心臓 (相対-g/100g体重)		0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01
雌	動物数	20	20
最終体重		148 ± 6	141 ± 6 **
心臓 (絶対)		0.55 ± 0.04	0.51 ± 0.03 **
心臓 (相対-g/100g体重)		0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.01
腎臓 (絶対)		0.95 ± 0.04	0.91 ± 0.05 **
腎臓 (相対-g/100g体重)		0.65 ± 0.02	0.65 ± 0.02

平均値 ± S.D.      \*\* p < 0.01

表2 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与したラットの血清生化学検査値

	用量 (ppm)	0 (対照)	40
雄	動物数	19	20
AST	(IU/L)	91 ± 9	93 ± 7
ALT	(IU/L)	39 ± 3	39 ± 3
CK	(U/L)	676 ± 90	684 ± 127
LDH	(IU/L)	1142 ± 167	1218 ± 262
雌	動物数	20	20
AST	(IU/L)	81 ± 7	81 ± 5
ALT	(IU/L)	37 ± 3	38 ± 4
CK	(U/L)	486 ± 134	446 ± 108
LDH	(IU/L)	775 ± 247	754 ± 207
Ca	(mg/dL)	10.0 ± 0.5	9.9 ± 0.3
IP	(mg/dL)	7.4 ± 0.9	7.1 ± 0.8

平均値 ± S.D.

表3 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与した  
ラットの病理組織所見

	用量(ppm)	0(対照)	40
雄	動物数	19	20
心臓			
心筋炎 +		10 (53%)	9 (45%)
++		3 (16%)	3 (15%)
雌	動物数	20	20
心臓			
心筋炎 +		3 (15%)	4 (20%)
++		0	1 (5%)
腎臓			
石灰沈着 +		11 (55%)	9 (45%)

+ 軽度; ++ 中等度

表4 アクリルアミドの乳幼児期によるラット中期発がん性試験における  
主な肉眼所見

群	甲状腺結節(雄)(雌)	肺結節(雄)(雌)	皮下腫瘤(雌)
AA 0 ppm	0/23 0/22	8/23 (35%) 5/22 (23%)	9/22 (41%)
20 ppm	0/23 0/24	9/23 (39%) 5/24 (21%)	9/24 (38%)
40 ppm	1/21 (5%) 0/24	7/21 (33%) 0/24	6/24 (25%)
80 ppm	0/23 0/22	7/23 (30%) 2/22 (9%)	6/22 (27%)
AA 0 ppm + SDM	2/23 (9%) 1/24 (4%)	10/23 (43%) 6/24 (25%)	10/24 (42%)
40 ppm + SDM	1/20 (5%) 2/19 (11%)	11/20 (55%) 2/19 (11%)	7/19 (37%)

厚生労働科学研究費補助金・食品の安心・安全性確保推進研究事業  
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

分担研究報告書

生体内代謝機構を考慮したアクリルアミドの遺伝毒性抑制物質の探索

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

協力研究者： 小田美光 大阪府公衆衛生研究所

研究要旨

食品の安全性において、加熱調理等によって食品中に発生するアクリルアミド(AA)が問題となっている。AAは齧歯類動物に強い発がん性を示す。AAは薬物代謝によってグリシダミド(GA)に変換され、これが、遺伝毒性、発がん性の本体とされている。薬物代謝酵素としてCYP2E1の関与が指摘されているため、ヒトCYP2E1を発現するサルモネラ菌株OY1002/2E1を用いてAAのumu試験を行ったが、有意な陽性反応は得られなかった。このことから、CYP2E1単独ではAAからGA代謝は進行しないことが明らかとなった。一方、5種類の薬物代謝酵素を発現するMCL-5細胞(CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1、mEpoxide hydrolase)を用いてAAを試験したところ、非酵素発現細胞と比較し、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、点突然変異が多く、これは以前行ったGAの突然変異スペクトルと一致した。このことはMCL-5細胞ではAAからGAの代謝が起きていることを示すものである。現在、責任酵素の同定を試みている。

In vivoでのAAの遺伝毒性の特徴を明らかにするために、gplデルタトランスジェニックラットを用いて多臓器、マルチエンドポイントの遺伝毒性試験を行った。AAを28日間飲水投与し、肝臓、精巣における遺伝子突然変異、血液、精巣の小核、肝臓のコメット試験を行った。骨髄、末梢血での用量依存的な小核頻度の増加と、肝臓でのコメット試験によるDNA損傷が確認された。今後、突然変異との相関を明らかにする。さらに、幼若ラットを用いた試験も行い、ライフステージの違いによる遺伝毒性感受性の差も検討する予定である。

A. 研究目的

食品の高温調理により自然発生することが報告されているアクリルアミド(AA)が、人の健康にどれだけの影響を与えるかが問題となっている。

AAはヒトでの発がん性の証拠は不十分で

あるものの、ラット、マウスにおいて発がん性が認められることからグループ2Aにランクされている。遺伝毒性に関しては細菌を用いた遺伝子突然変異試験(エームス試験)ではすべて陰性を示し、真核生物を用いたほとんどの試験系ではin vitro、in

vivo 試験とも陽性結果が得られている。我々のこれまでの研究では、AAの代謝物であるグリシダミド(GA)が、ほ乳類細胞において、強い遺伝素突然変異誘発性を示すことが明らかになり、AAの生体摂取は遺伝毒性、発がんリスクを増加させることが示された。このようなことから、日常生活に置いて、できるだけAAの摂取量を減らすこと、また、AAが生体内で速やかに解毒させることが、そのリスクを低減させることに重要であることが示唆された。

AAはCYP2E1により代謝されGAに変換されることが通説となっている。しかしながらこれまでの我々の研究では、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こと、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こと、3)CYP2E1以外の複数の薬物代謝酵素も発現する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、などからAAの遺伝毒性の発現にはCYP2E1以外の代謝の関与を想定した。

本年度は、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に、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討した。また、ヒト型CYP2E1発現するサルモネラ菌株OY1002/2E1を用いてumu試験を行い、CYP2E1の関与を再検討した。また、今年度からはin vivoでのAAの遺伝毒性発現の特徴、代謝様式を明らかにするために、gplデルタトランスジェニックラットを用いて多臓器、マルチエンドポイントの遺伝毒性試験を行った。

## B. 研究方法

### 1) In vitro 試験

#### i) 試験化合物、細胞

アクリルアミド(AA) (M.W. 71、シグマ)は、滅菌蒸留水で調整した。umu試験用サルモネラ菌株には親株として、TA1535/PSK1002と、ヒト型CYP1A1、CYP2E1をそれぞれ高発現するNM7001、OY1002/2E1を用いた。In vitroほ乳類細胞試験には、ヒトリンパ芽球細胞株TK6と、トランスジェニック細胞MCL-5を用いた。MCL-5は5つの代謝酵素(CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1、mEpoxide hydrolase)を高発現する。MCL-5細胞は、BD BioscienceのDr. Crespiから供与された。

#### ii) umu 試験

umu試験には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試験を用いた。一時間37Cで試験検体とインキューベーション後、βガラクトシダーゼ活性を指標に遺伝毒性の強さを評価した。陽性対照として、4NQO、AF-2、DMNを用いた。

#### iii) in vitro 培養細胞被験物質処理

増殖期の細胞を振とうにより単一細胞にして細胞数を計数し、細胞濃度を調整しフラスコに播種し、用時調製した化合物溶液を1%添加し、24時間連続処理した。処理終了後、細胞懸濁液の一部を用いて、コールターカウンタで細胞数を測定し、細胞毒性作用の指標となる相対生存率(RS)測定のために細胞をプレーティングした。残りの細胞懸濁液については、後述の各実験に用いた。各群1つの細胞懸濁液を用いて処理を行い、必要に応じてその細胞懸濁液の一部を採取して、それぞれの実験に用いた。

#### iii) 小核試験

被験物質で処理した細胞を正常培地で 48 時間培養し小核の標本を作製した。培養細胞液を遠心して上澄を捨て、0.075 M KCl 水溶液を加えて室温で低張処理を行い、固定液（メタノール：氷酢酸=3：1、v/v）を静かに加えた。遠心（1000～1500 rpm、約 5 分）による固定液の更新を 2 回繰り返したのち、細胞を少量の固定液に浮遊させ、その懸濁液を伸展器上であらかじめ約 30℃ に暖めてあるスライドグラスに滴下し、小核標本を作製した。観察直前に 20 μg/mL のアクリジンオレンジ溶液をスライドグラス上に滴下して染色し、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。

#### iv) TK 遺伝子突然変異試験

処理終了直後と発現時間（3 日間）終了時に細胞懸濁液の一部を用いて、コロニー形成率（それぞれ PE0 および PE3）を算出した。また、処理終了直後から発現時間終了までの間毎日細胞数を計測し、各濃度における相対増殖率（RSG）を算出した。処理終了 3 日（発現時間終了）後に 96well プレートに細胞を 3 μg/mL トリフルオロチミジン（TFT）下ではん種し、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、突然変異率を算出した。

### 2) In vivo 試験

#### i) 動物

F344 を系統とする gpt デルタトランスジェニックラットを日本エスエルシー（株）より購入し、馴化後 11 週齢の動物を使用した。

#### ii) 投与

トランスジェニックラットを 4 群各 5 匹ずつに分けた。それぞれの群に蒸留水で調整した 0、20、40、80ppm の AA（M.W. 71、

シグマ）を、給水ビンで 28 日間飲水経口摂取させた。

#### iii) 小核試験

投与開始 2 日後、28 日後（最終投与日）に、動物の尾静脈または心臓から血液を約 100 μL 採取し、小核試験を行った。また、投与開始 28 日後（最終投与日）に、精巣を摘出して、小核試験を行った。小核試験は林らの方法に従って行った。

#### iv) アルカリコメット試験

最終投与日に屠殺後解剖し、肝臓の左側葉の一部及び胃を採取し、アルカリコメット試験を行った。アルカリコメット試験は JaCVAM コメット試験共同研究のプロトコールに従った。

#### v) 遺伝子突然変異試験

アルカリコメット試験用のサンプル採取後、肝臓の一部及び精巣の一部を採取し、DNA を抽出し、遺伝子突然変異用のサンプルとした。gpt 遺伝子試験は Masumura らの方法に従って行った。

#### vi) その他

肝臓、精巣、甲状腺、乳腺、胃の一部から DNA を抽出し、DNA アダクト検出用サンプルとした。また、肝臓、精巣の一部から病理切片標本を作成し、病理学的検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究で使用したヒト細胞は米国

American Type Culture Collection

(ATCC) に登録済み、もしくは市販の株化細胞で、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、動物実験を含む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) umu 試験

サルモネラ菌株 TA1535-pSK1002 を用いて S9 存在下、非存在下で AA に対して umu 試験を行った。10mM まで試験を行ったが、両条件で陽性反応は得られなかった。また、ヒト型 CYP1A1、CYP2E1 をそれぞれ高発現する NM7001、OY1002/2E1 を用いて S9 非存在下で AA に対して umu 試験を行ったが、同様に陽性反応は得られなかった。一方、TA1535-pSK1002 は GA に対して明らかな陽性反応を示し、また、OY1002/2E1 は陽性対照である DMN に対して陽性反応を示した。

#### 2) 哺乳類培養細胞を用いる in vitro 試験

5 種類の薬物代謝酵素を発現する MCL-5 細胞 (CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1、mEpoxide hydrolase) を用いて AA を試験したところ、非酵素発現細胞と比較し、高い TK 突然変異の誘発を認めた (図 1)。

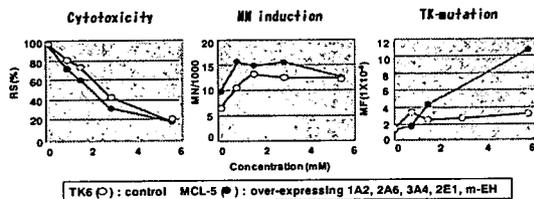


図 1

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 (図 2)。以前、薬物代謝能のない TK6 細胞では AA は LOH 型突然変異を、GA は点突然変異をが多く誘発することが示された (図 2) ことから、AA は MCL-5 細胞で GA に変換されたことを示すものである。

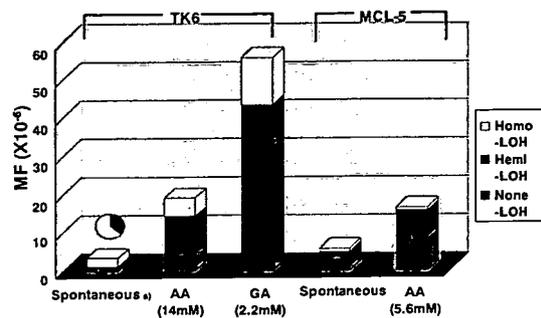


図 2

#### 3) gpt デルタトランスジェニックラットを用いる in vivo 試験

In vivo での AA の遺伝毒性の特徴を明らかにするために、gpt デルタトランスジェニックラットを用いて多臓器、マルチエンドポイントの遺伝毒性試験を行った。AA を 28 日間飲水投与し、肝臓、精巣における遺伝子突然変異、血液、精巣の小核、肝臓のコメット試験を行った。肝臓ではわずかであるがコメット試験による DNA 損傷が確認された (図 3)。

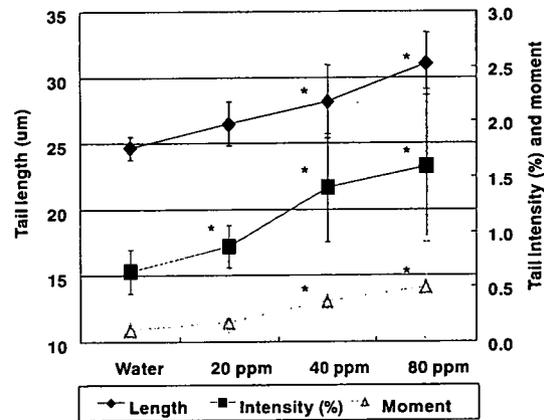


図 3

また、投与開始後 48 時間で骨髓、末梢血での用量依存的な小核頻度の増加が観察された (図 4)。一方、28 日間投与後では骨髓、末梢血での小核の誘発は観察されな

った。また、肝臓、精巣での突然変異の解析はまだである。

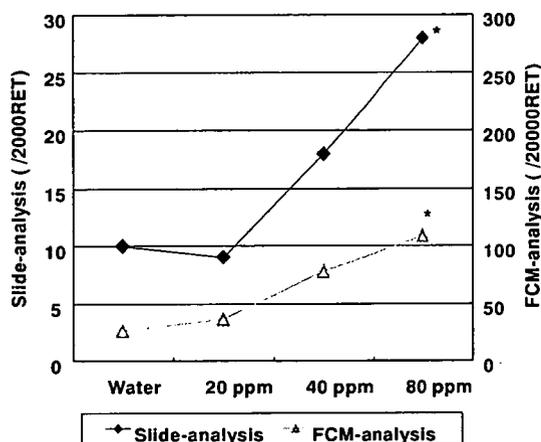


図 4

#### D. 考 察

これまでの我々の研究で、AA と GA の遺伝毒性について比較したところ、AA はほとんど *in vitro* では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 損傷作用を持つことを報告した。このことから、AA の毒性の本体はその代謝物である GA であると結論した。

AA は CYP2E1 により、エポキシ環をもつ GA に変換され、強い遺伝毒性物質に変わったことが予想される。トランスジェニック BigBlue マウスを用いた AA と GA の突然変異の結果では、それぞれ 10、50ppm の飲水で 50 日間投与し、4 週間後に肝臓での突然変異は、両化合物とも有意に上昇し、むしろ AA でその誘発率は高いとの報告がある。また、突然変異スペクトルを比較したところ、AA も GA も GC>TA のトランスバージョンを主体とする点突然変異であることが示された。また、CYP2E1-null のマウスを用いて、AA に対する遺伝毒性をコメット試験、

小核試験を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、AA の遺伝毒性を、SCE を指標として評価したところ高い反応性が観察されている。これらの事実は AA は CYP2E1 で代謝を受け GA に変換され、毒性を発現するという説を支持するものである。

しかしながら、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、*in vitro* での代謝を再現することはできなかった。CYP2E1 で代謝される他の薬物は代謝活性化を受け、毒性を発現することから、AA の代謝様式の解明には 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、やはり陽性反応は得られなかった。同じく CYP2E1 で代謝される DMN では明らかな陽性反応が得られたこと、また GA は親株である TA1535/PSK1002 を用いた *umu* 試験で陽性を示すことなどから、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 だけでなく、CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、mEpoxide hydrolase を高発現するトランスジェニック細胞である。この細胞は、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。特に、TK 遺伝子突然変異に関しては非トランスジェニック細胞に対して 5 倍の突然変異の誘発が観察された (図 1)。ここで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