

血液中放射能濃度は投与 10 分後から上昇傾向を示し、1 時間後に最高数値に達した。その後徐々に数値は低下したが、投与 6 時間後以降は長時間同じ濃度を保ち、投与 72 時間後でも薬物換算値は $0.21 \mu\text{g eq/mL}$ で、投与 6 時間後の $0.32 \mu\text{g eq/mL}$ とほぼ変わらない数値を示した。

血漿中放射能濃度は、投与後 10~30 分後に最高値を示したが 6 時間後には 50% 以下に低下し、投与後 72 時間後には薬物換算値は $0.01 \mu\text{g eq/mL}$ と低数値であった。

[2,3- ^{14}C]Acrylamide 経口投与後成獣ラットの血液・血漿中放射能濃度を表 Table 2 および Fig. 1 に示した。

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、その後も高濃度を長時間保ち続けた。投与 72 時間後でも血液中放射能濃度は高値を示し、薬物換算値は $0.54 \mu\text{g eq/mL}$ であった。

血漿中放射能濃度は、投与 10 分後に最高値を示したがその後緩やかな下降傾向を示し、6 時間後には 50% 以下に低下した。投与後 72 時間後では約 3% まで低下し、薬物換算値は $0.02 \mu\text{g eq/mL}$ と低数値であった。

Table 3 には 6-24 時間ならびに 24-72 時間の濃度変化から計算した半減期 ($T_{1/2}$ 、時間) を示した。血液は用量 2.5mg/kg のときと同様に成獣の半減期が幼若ラットより約 2 倍大きい半減期を示した。一方、血漿は成獣および幼若ラットともに用量 2.5mg/kg のときと同様、いずれも血液よりはるかに小さい半減期であった。これより [2,3- ^{14}C]Acrylamide は血球成分に強く吸着されることが示された。

3.3 尿・糞・呼気中放射能排泄率

[2,3- ^{14}C]Acrylamide 経口投与後幼若ラットの尿・糞・呼気中放射能排泄率を Table 4 および Fig. 2 に示した。

尿・糞・呼気中放射能排泄率は、幼若ラットの場合、投与 72 時間後までに尿中に 69.3%、糞中に 8.4%、呼気中に約 7.5% の排泄が認められ、総回収率は 85.2% であった。

呼気中には投与後 3 時間までに 1.7% が排泄され、投与後 24 時間までには 5.1% が排泄された。

尿中へは投与後 3 時間までに 27.1% が排泄され、投与後 24 時間までには 65.1% が排泄され、尿中排泄率の約 39% が投与後 3 時間までに排泄され、94% が投与後 24 時間までには排泄されたことになる。

[2,3- ^{14}C]Acrylamide 経口投与後成獣ラットの尿・糞・呼気中放射能排泄率を Table 5 および Fig. 3 に示した。

成獣ラットでは、投与後 72 時間までに尿中に 63.0%、糞中に 7.1%、呼気中に約 3.1% の排泄率が認められ、総回収率は 73.2% であった。

呼気中には投与後 3 時間までに 1.3% が排泄され、投与後 24 時間までには 2.7% が排泄された。

尿中へは投与後 3 時間までに 19.1% が排泄され、投与後 24 時間までには 59.4% が排泄され、尿中排泄率の約 30% が投与後 3 時間までに排泄され、94% が投与後 24 時間までには排泄されたことになる。

本試験の尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定で得られた数値は、幼若ラットおよび成獣ラット共に、用量 [2,3- ^{14}C]Acrylamide

2.5mg/kg を用いた試験データを裏付ける結果となった。

3.4 全身オートラジオグラフィ

[2,3-¹⁴C]Acrylamide 0.5mg/kg 経口投与後 72 時間の幼若ラット (Fig. 4) および成獣ラット (Fig. 5) の全身オートラジオグラフィを行った。オートラジオグラフィにおける 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、低濃度および極低濃度レベルに分けて評価した。

【投与後 72 時間】

高濃度レベル： 血液、眼球、皮膚 (毛根)
中濃度レベル： 肝、肺、腎、脾
低濃度レベル： 大脳、小脳、脳中枢部
極低濃度レベル： 骨格筋、心筋、消化管内平滑筋

投与後 72 時間では体内分布の特異性が明瞭である。いずれも血液、眼球の濃度が高く、成熟ラットでは背部皮膚の毛の一部および鼻毛根にも特異的な分布が認められた。

3.5 乳汁中放射能濃度 (授乳中ラットから乳仔ラットへの移行性)

[2,3-¹⁴C]Acrylamide 0.5 および 2.5mg/kg を経口投与後の乳汁中放射能濃度を Fig. 6 に示した。

乳汁中放射能濃度は、それぞれ投与後 30 分で 0.05-0.37 $\mu\text{g eq/mL}$ と低数値を示し、その後上昇傾向にあり、投与後 6 時間で最高値は 0.14-0.57 $\mu\text{g eq/mL}$ であった。その後ゆっくり減少し、投与 72 時間後にはピーク時の約 10% 程度であった。これは別途 [2,3-¹⁴C]Acrylamide を経口投与した成熟

雌性ラットの血漿中濃度に近い値であった。投与した [2,3-¹⁴C]Acrylamide の放射能は母親ラットの乳汁から乳仔へ低濃度移行した。

D. 考察

[2,3-¹⁴C]Acrylamide を 0.5mg/kg で経口投与した雌性ラットの血液中放射能濃度は全ての時点で高い濃度を示し、幼若ラットは投与 1 時間後、成獣ラットは 6 時間後に最高数値に達し、その後 72 時間後でも高濃度を長時間保ち続けた。一方、血漿では速かに減少することから投与した [2,3-¹⁴C]Acrylamide の放射能は血球成分に強く吸着されることが示された。

尿・糞・呼気中放射能排泄率については、幼若ラットの場合 (Table 4 & Fig. 2)、投与 72 時間後までに尿中に 69.3%、糞中に 8.4%、呼気中に約 7.5% の排泄率が認められ、総回収率は 85.2% であった。

成獣ラットの場合 (Table 5 & Fig. 3)、投与後 72 時間までに尿中に 63.0%、糞中に 7.1%、呼気中に約 3.1% の排泄率が認められた。投与後 72 時間までの [2,3-¹⁴C]Acrylamide の総回収率は 73.2% であった。いずれも高い尿中排泄率があり吸収率の良いことが確認された。

成獣ラットに比べ幼若ラットでは尿・糞・呼気中の総回収率がやや高い傾向が見られた。成熟ラットで尿・糞・呼気中の回収率が少ないのは、体外排泄ルート複雑化に幾分影響されていると示唆されるが、何れの場合も体重の差、若令の代謝速度の差も加味すれば相対的な排泄バランスが大きく変化したかは定かではない。

呼気中排泄率については、幼若ラットで成

獣ラットより高い傾向が見られた。呼気中排泄は ^{14}C として 6% 排泄が見られた K. Hashimoto ら²⁾ (1970) の雄性ラットの場合と同様 ^{14}C として 3.1-7.5% のゆっくりした排泄が見られた。単炭素としてエネルギー代謝に取り込まれたのではなく、一部のアクリルアミドがタンパク質等の高分子に結合し、それが分解代謝されたためとも考えられた。

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・排泄が成熟ラットより幼若ラットで速いことが推定されたが、一般的には排泄の速い幼若ラットで解毒が速いので安全とも考えられた。但し、ここでのように呼気にまで分解して排泄される長い過程に危険が潜んでくる可能性も考慮しておく必要もあると思われる。

[2, 3- ^{14}C]Acrylamide 0.5mg/kg 経口投与後 72 時間の幼若ラット (Fig. 4) および成獣ラット (Fig. 5) の全身オートラジオグラフィでは、いずれも血液中濃度は高く、次いで眼球、肝臓、肺、腎臓、皮膚、脾臓が高濃度臓器であった。一方、標的臓器と考えられる甲状腺ならびに乳腺で集積性は認められなかった。但し、神経系細胞として脳への集積性が若干認められている。

[2, 3- ^{14}C]Acrylamide 0.5-2.5mg/kg を経口投与後の授乳中ラットから乳仔ラットへの移行性を検討した結果 (Fig. 6)、乳汁中放射能濃度は、投与後 30 分でも低濃度存在し投与後 6 時間で最高値を示し、その後ゆっくり減少した。投与した [2, 3- ^{14}C]Acrylamide の放射能は母親ラットの乳汁から乳仔へ低濃度移行した。投与後長時間経てば未変化体での移行の可能性

は少ないと思われるが、投与後短時間においては未変化体 [2, 3- ^{14}C]Acrylamide で乳汁に移行し、乳仔に吸収される可能性も考えられた。

E. 結論

[2, 3- ^{14}C]Acrylamide は経口投与後速やかに小腸から吸収され門脈から血液に入り、全身組織へ廻り、代謝を経て大半は尿より速やかに排泄されることが明らかとなった。また、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・排泄が成熟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

1) Kurebayashi H, Nakazawa K, Ohno Y. Metabolism of bisphenol A in hepatocytes from rats, monkeys and humans. Drug Metabolism Reviews. 40 S2: 113 (2008)

2. 学会発表

1) 2nd Asian Pacific Regional ISSX Meeting (Shanghai, China 2008.5) 第 2 回アジア太平洋 I S S X 学会 (上海市 2008.5) Metabolism of bisphenol A in hepatocytes from rats, monkeys, and humans : H. Kurebayashi, K. Nakazawa, Y. Ohno
2) 第 35 回日本トキシコロジー学会年会 (2008.6) 成熟雌性ラットにおける

[2, 3-¹⁴C]Acrylamide 2.5mg/kg 経口投与後の体内動態：紅林秀雄 1、南部尚美 2、浜井夏子 2、重松昭世 2、今井俊夫 1、中澤憲一 1、大野泰雄 1： 1 国立衛研、 2 生体科学研究所

3) 48th SOT 2009 Meeting (Baltimore, USA 2009.3) Disposition of [2, 3-¹⁴C]acrylamide orally dosed to juvenile and adult female rats: H. Kurebayashi, N. Nanbu, Y. Hamai, A. Shigematsu, T. Imai, K. Nakazawa, Y. Ohno

4) 日本薬学会第 129 年会 (2009.3) : ビスフェノール A のヒト、サル、ラットの凍結肝細胞を用いた代謝：紅林秀雄、奥平和穂、中澤憲一、大野泰雄

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Fig 1. Blood and plasma concentration of radiolabel following oral administration of [2,3-¹⁴C]Acrylamide 0.5mg/kg to juvenile and adult female rats

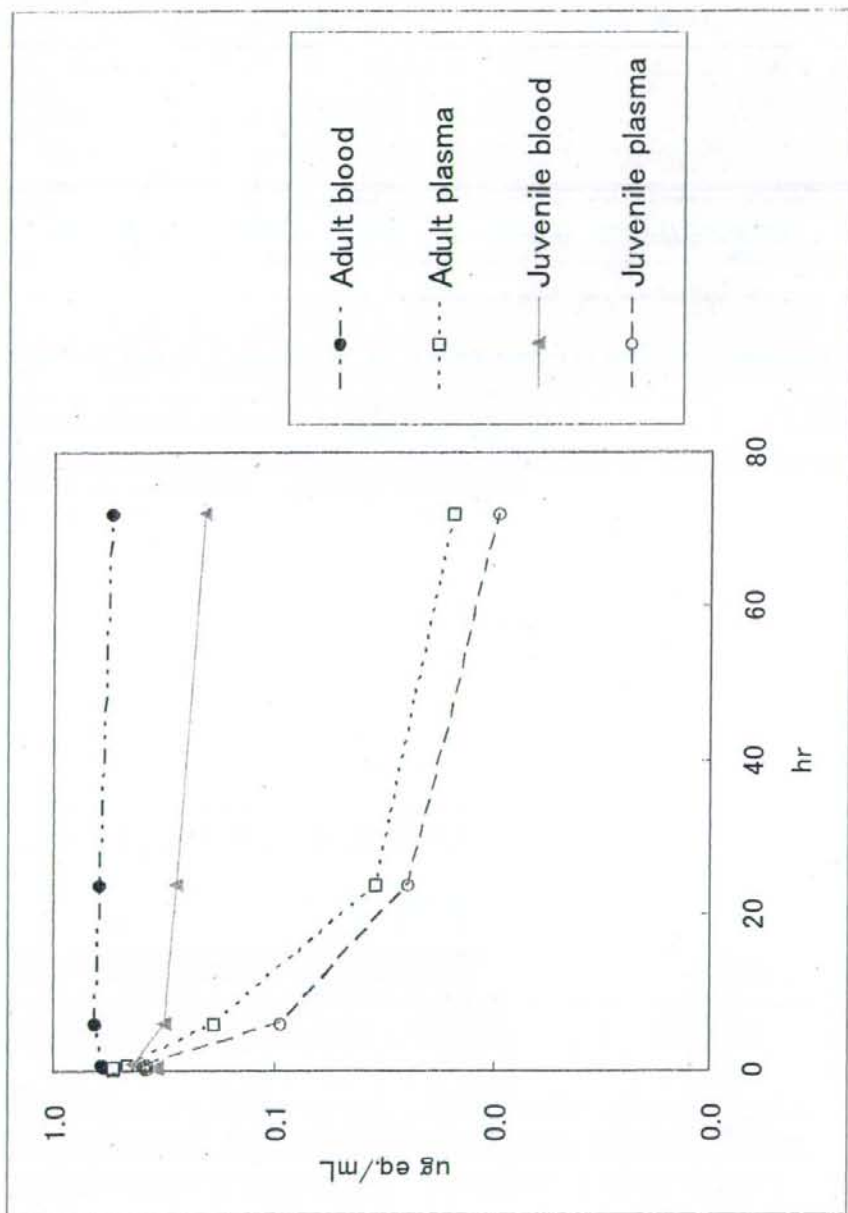


Fig 2. Cumulative excretion of radioactivity (%) in urine, feces and expiration of as $^{14}\text{CO}_2$ after a single oral administration of [2,3- ^{14}C]Acrylamide 2.5mg/kg to juvenile female rats. The results are the means of two rats.

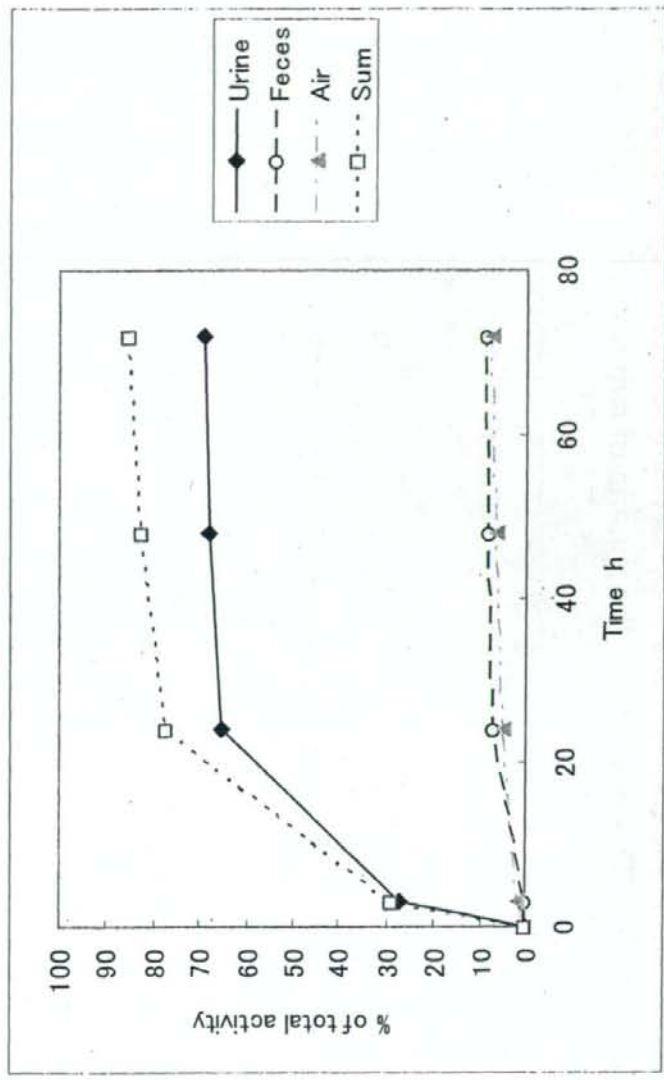
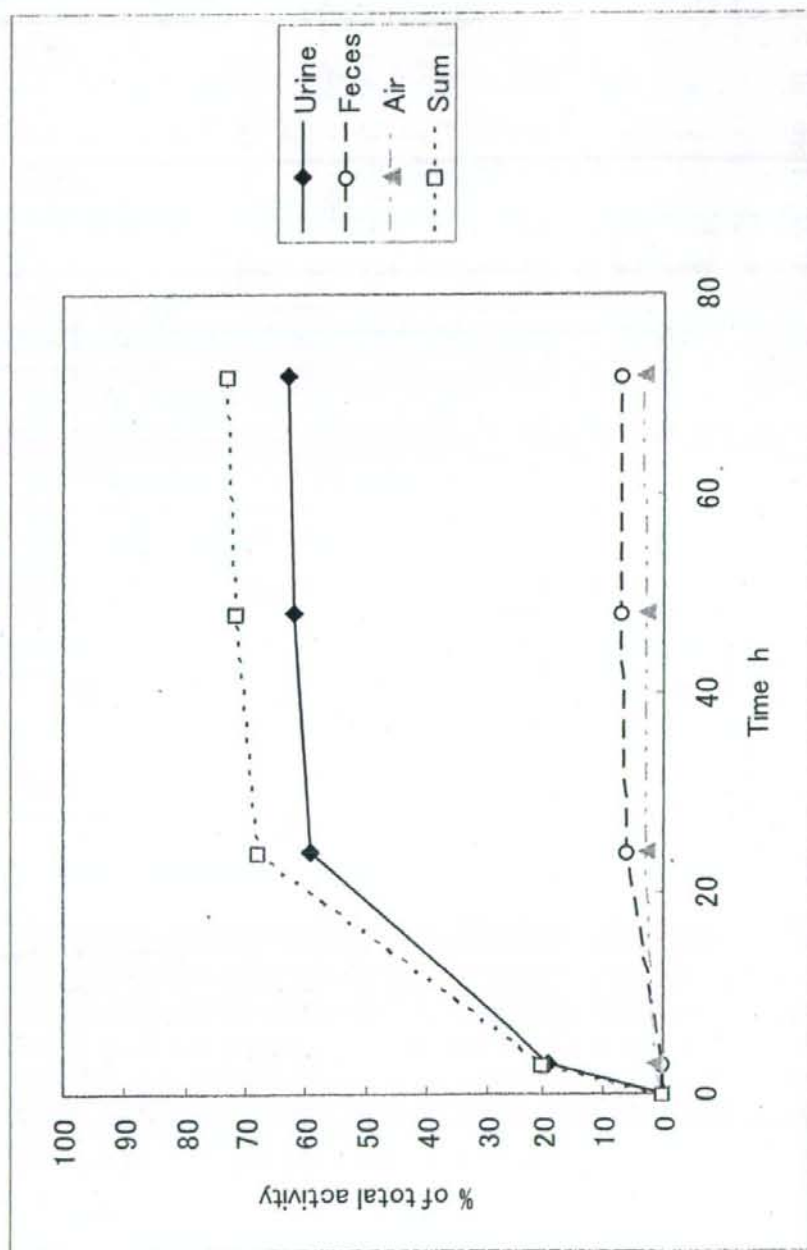


Fig 3. Cumulative excretion of radioactivity (%) in urine, feces and expiration of as $^{14}\text{CO}_2$ after a single oral administration of $[2,3-^{14}\text{C}]\text{Acrylamide } 2.5\text{mg/kg}$ to adult female rats. The results are the means of two rats.



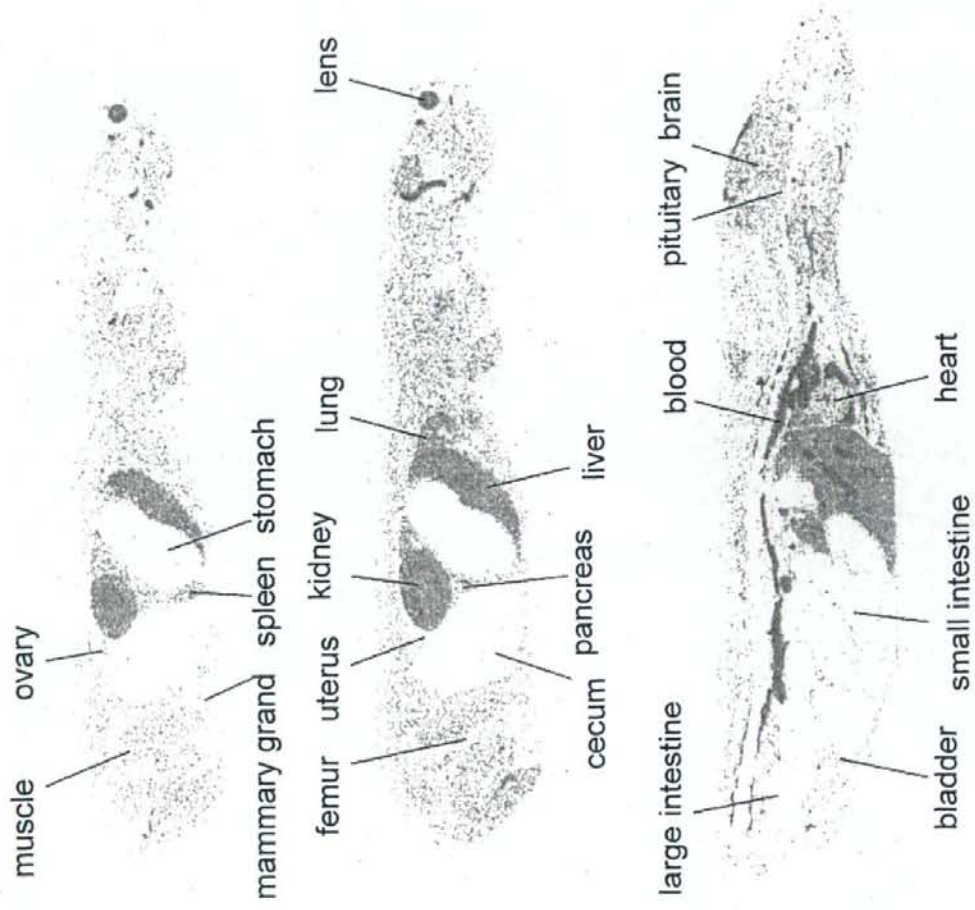


Fig.4. A whole-body autoradiograph of a 30- μ m-thick section from a juvenile female SD rat which was frozen 72 hr after receiving 0.5 mg/kg [2,3- 14 C]acrylamide po.

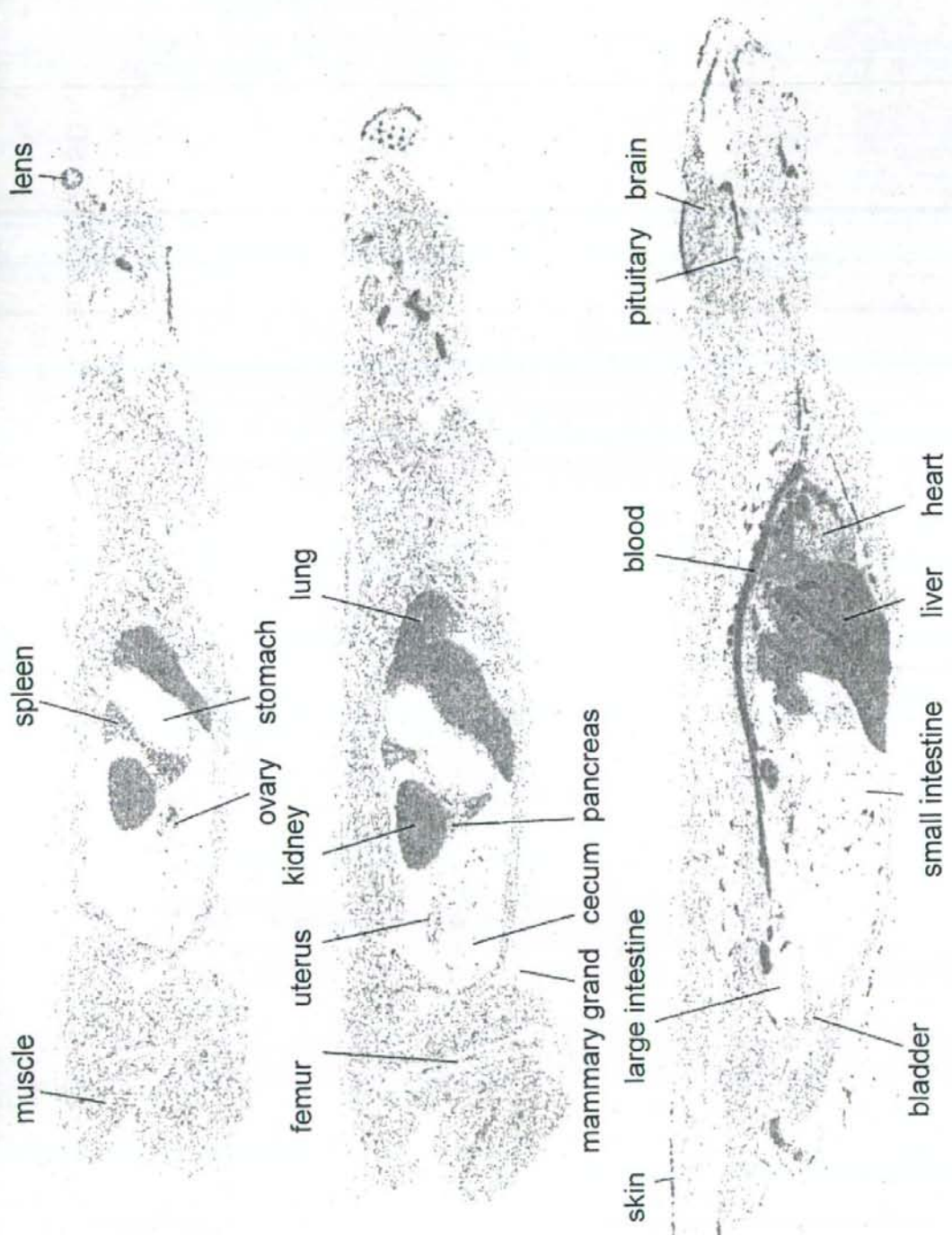


Fig.5. A whole-body autoradiograph of a 30- μ m-thick section from an adult female SD rat which was frozen 72 hr after receiving 0.5 mg/kg [2,3- 14 C]acrylamide po.

Fig 6. Concentration of radioactivity to milk after a single oral administration of [2,3-¹⁴C]Acrylamide 0.5 (circle green) and 2.5 (red rectangular) mg/kg to lactating female rats

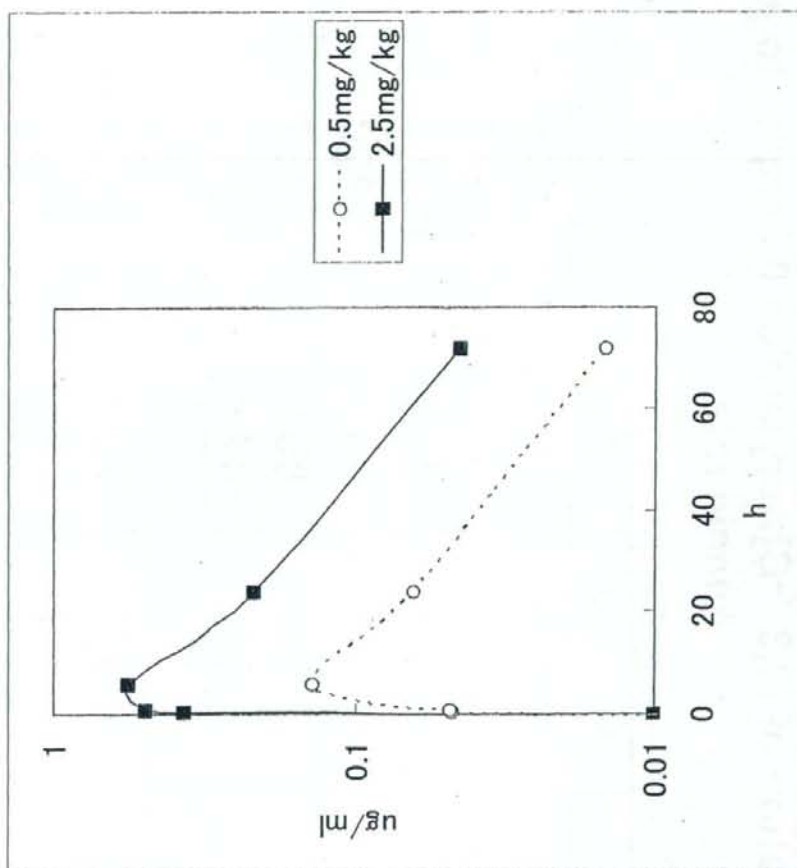


Table 1. Blood and plasma concentration of radiolabel following oral administration of [2,3-¹⁴C]Acrylamide 0.5mg/kg to juvenile female rats

血液	dpm/mL	F值	μg eq./mL
10min	54564	72.50	0.348
30min	54514	72.43	0.347
1hr	69201	91.95	0.441
6hr	50239	66.75	0.320
24hr	45005	59.80	0.287
72hr	33525	44.55	0.214
血漿			
10min	59552	79.13	0.379
30min	61432	81.63	0.391
1hr	59276	78.76	0.378
6hr	14868	19.76	0.095
24hr	3770	5.01	0.024
72hr	1479	1.96	0.009

Table 2. Blood and plasma concentration of radiolabel following oral administration of [2,3-¹⁴C]Acrylamide 0.5mg/kg to adult female rats

血液	dpm/mL	F值	μg eq./mL
10min	83814	111.37	0.534
30min	92162	122.46	0.587
1hr	94534	125.61	0.602
6hr	101609	135.01	0.647
24hr	96784	128.60	0.616
72hr	84886	112.79	0.541
血漿			
10min	83212	110.57	0.530
30min	83037	110.33	0.529
1hr	72811	96.75	0.464
6hr	29585	39.31	0.188
24hr	5293	7.03	0.034
72hr	2429	3.23	0.015

Table 3. Half lives of concentration of radioactivity in blood and plasma following oral administration of [2,3-¹⁴C]acrylamide 0.5 or 2.5 mg/kg to juvenile and adult female rats

Sample	dose mg/kg	juveniles (4w)		adults (14w)	
		$T_{1/2(6-24h)}$	$T_{1/2(24-72h)}$	$T_{1/2(6-24h)}$	$T_{1/2(24-72h)}$
blood	0.5	113	113	256	254
blood	2.5	111	84	183	696
plasma	0.5	9.1	36	7.2	43
plasma	2.5	8.1	33	6.8	33

Table 4. Cumulative excretion of radioactivity (%) in urine, feces and expiration of as $^{14}\text{CO}_2$ after a single oral administration of [2,3- ^{14}C]Acrylamide 2.5mg/kg to juvenile female rats. The results are the means of two rats.

Time	urine	feces	air	sum
0 h	0.0	0.0	0.0	0.0
3 h	27.1	0.0	1.7	28.7
24 h	65.1	7.1	5.1	77.3
48 h	67.9	7.9	6.6	82.4
72 h	69.3	8.4	7.5	85.2

Table 5. Cumulative excretion of radioactivity (%) in urine, feces and expiration of as $^{14}\text{CO}_2$ after a single oral administration of [2,3- ^{14}C]Acrylamide 2.5mg/kg to adult female rats. The results are the means of two rats.

Time	urine	feces	air	sum
0 h	0.0	0.0	0.0	0.0
3 h	19.1	0.0	1.3	20.3
24 h	59.4	6.1	2.7	68.1
48 h	62.0	6.7	3.0	71.7
72 h	63.0	7.1	3.1	73.2

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20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

研究分担者 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
研究協力者 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、春機発動時期を含む発育期の ACR 暴露について検討を行った。生後 21 日齢および 7 週齢の雄性 SD:IGS ラットに ACR を 0、50、100、200 ppm の用量で 4 週間飲水投与し、神経系および雄性生殖器の病理組織学的検索を行った。投与期間中、発育期、成熟期ラットともに 100 ppm 以上で同様の歩行異常を示した。神経系組織の病理組織学的検索および形態計測では、両群とも 100 ppm 以上で神経障害を示す形態変化が明らかであり、高用量群では成熟期ラットに比べ発育期ラットの方が神経障害の程度が強い傾向がみられた。体重当たりの ACR 摂取量は、成熟期ラットに比べ発育期ラットの方が高く、歩行異常や変性軸索の割合などの神経毒性パラメーターが ACR 摂取量に応じた増加を示したことから、発育期と成熟期では ACR の神経毒性に対する感受性の差は乏しいものと考えられた。精巣毒性については、成熟期ラットでは 100 ppm 以上で性細胞の剥離が散見された。一方、発育期ラットでは、ACR 摂取量に対して著しく重度で多様な病変が観察されたことから、性成熟前後の動物は成熟期と比べて ACR の精巣毒性に高い感受性を持つことが示唆された。以上の結果から、ACR の神経毒性については、発育期と成熟期の感受性差は乏しく、その障害の程度は体重当たりの ACR 摂取量に相関すると考えられた。一方、精巣毒性に関しては、発育期の方が高い感受性を持つことが示唆された。

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 μg/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。今年度は、春機発動時期を含む発育期の ACR 暴露について検討を行った。

B. 研究方法

発育期曝露群として、妊娠 10 日目の雌性 SD:IGS ラット 13 匹を日本チャールズリバーより購入し、生後 21 日齢の雄児動物 40 匹を実験に供した。また、成熟期曝露群として、6 週齢の雄性 SD:IGS ラット 40 匹を日本チャールズリバーより購入し、1 週間馴化した。発育期曝露群では生後 21 日、成熟期曝露群では 7 週齢に、各群 10 匹ずつ 4 群に分け、ACR (Sigma) 0、50、100、200 ppm を 4 週間飲水投与した。ACR の投与濃度は、成熟雄ラットにおいて、飲水投与により 4 週間以内に神経および精巣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)。

動物は各ケージに 2~3 匹ずつ収容して固形基礎飼料

(CRF-1: オリエンタル酵母)を自由に摂取させ、週1回体重、摂餌量および摂水量を測定し、臨床症状の観察を行った。神経症状については、各個体について姿勢などを観察し、1=normal gait、2=slightly abnormal gait (slight ataxia, hopping gait, foot splay)、3=moderately abnormal gait (obvious ataxia, foot splay, limb abduction)、4=severely abnormal gait (inability to support body weight and foot splay)としてスコア化した。解剖時には脳、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。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、エボン包埋後、1 μm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、各群5例について、synaptophysin (SYP)に対する免疫染色を実施した。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、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<3 μm)の割合を計測した。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。

精巣は、各個体片側一断面について円形に切れている精細管を400~650個観察し、病変の認められた精細管の割合を算出した。

体重、摂餌量、摂水量、臓器重量、坐骨神経および小脳分子層の形態計測値、病変の認められた精細管の割合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。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

発育期曝露群では、2週目以降100ppm以上で体重増加抑制がみられたが、成熟期曝露群では実験期間を通して体重推移に群間差は認められなかった(Fig. 1A)。発育期ラットでは、200 ppmで摂餌量の減少がみられ(Fig. 1B)、摂水量は両群とも200 ppmで低値を示した(Fig. 1C)。体重当たりのACR一日平均摂取量をTable 1に示す。いずれの用量群においても、体重当たりのACR摂取量は、成熟期ラットよりも発育期ラットの方が高値であった。

投与期間中の臨床観察では、両群とも同様の歩行異常が観察され、症状の進行および程度は用量に相関していた(Fig. 2)。発育期ラットの方が、成熟期ラットよりも歩行異常の出現時期および症状の進行が早い傾向が認められた。

最終体重および臓器重量をTable 2に示す。発育期曝露群では、100 ppm以上で体重の有意な低値が認められた。100 ppm以上で脳、200 ppmで精巣、50および200 ppmで精巣上体の絶対重量が有意に減少した。また、200 ppmで脳相対重量の有意な増加を認めた。成熟期曝露群では、200 ppm群で精巣上体の絶対重量が有意に低値を示した。

神経系組織の病理組織学的検索および形態計測の結果をTable 3に示す。発育期、成熟期のいずれも100 ppm以上で、三叉神経節細胞の中心性色質融解が明らかであった。坐骨神経の神経線維密度は、発育期ラットの100 ppm群のみで高値を示した。両群とも、100 ppm以上で坐骨神経における変性軸索の割合が、200 ppmで小脳分子層におけるSYP陽性点状染色像の個数が有意に高値を示した。萎縮した有髄神経線維数の割合は、統

計学的に有意ではないが、200 ppm で増加傾向を示した。高用量群では成熟期ラットに比べ発育期ラットの方が、中心性色質溶解の程度や変性軸索の割合、SYP 陽性点状染色像の個数の値が大きく、神経障害の程度が強い傾向がみられた。

精巣の病理組織学的観察では、発育期曝露群において、精子細胞の変性、円形あるいは伸長精子細胞の減少・消失が 100 ppm 以上で明らかであり、精上皮の高度脱落により変性した精細管も多くみられた (Fig. 3 and Table 4)。また、性細胞の剥離や多核巨細胞の出現も散見された。精巣上体では管腔内に脱落した性細胞が多数認められた。一方、成熟期曝露群では、性細胞の剥離が 100 ppm 以上で有意に増加していたが、発育期ラットで認められた精子細胞の変性や消失はほとんど観察されなかった。セルトリ細胞の空胞化は、いずれの群においても散見され、その頻度に群間差は認められなかった。

神経毒性に関わるパラメーターとして、週 4 における歩行異常のスコア、坐骨神経における変性軸索の割合および小脳分子層における SYP 陽性点状染色像の個数と、体重当たりの ACR 摂取量との関係を Fig. 4A-C に示す。発育期および成熟期曝露群ともに、いずれのパラメーターも ACR 摂取量に応じた増加を示した。精巣毒性に関わるパラメーターとして、セルトリ細胞空胞化以外の精上皮の障害を認めた精細管(affected tubules)の割合と体重当たりの ACR 摂取量との関係を Fig. 4D に示す。成熟期ラットでは、障害を認めた精細管の割合は ACR 摂取量の増加に対してわずかに増えたのみであったのに対し、発育期ラットでは著しい増加を示した。

D. 考察

発育期ラットでは 100 ppm 以上で体重増加抑制を示し、200 ppm で摂餌量および摂水量の減少が認められた。これらの減少は、発育期ラットは体のサイズが小さいため、神経症状出現後、通常ケージでは餌や水の摂取が困難となったことが原因と考えられた。また、解剖時の臓器重量の変動は、体重増加抑制に起因すると考えられた。

投与期間中、発育期、成熟期ラットともに 100 ppm

以上で同様の歩行異常を示し、発育期ラットの方が、歩行異常の出現時期および症状の進行が早い傾向が認められた。また、病理組織学的検索および形態計測では、両群とも 100 ppm 以上で神経障害を示す形態変化が明らかであり、高用量群では成熟期ラットに比べ発育期ラットの方が神経障害の程度が強い傾向がみられた。体重当たりの ACR 摂取量は、成熟期ラットに比べ発育期ラットの方が高く、歩行異常や変性軸索の割合などの神経毒性パラメーターが ACR 摂取量に応じた増加を示したことから、発育期と成熟期の ACR の神経毒性に対する感受性の差は乏しく、その障害の程度は体重当たりの ACR 摂取量に相関するものと考えられた。

精巣毒性については、成熟期ラットでは過去の報告と同様に、100 ppm 以上で性細胞の剥離が観察された。一方、発育期ラットでは、精子細胞を主体とした障害が顕著であった。成熟動物に比べ ACR 摂取量に対して著しく重度で多様な病変が観察されたことから、性成熟前後の動物は成熟期と比べて ACR の精巣毒性に高い感受性を持つことが示唆された。ACR はキネシン等のモーター蛋白を障害することが知られており、これが精子細胞の障害に関与した可能性が考えられる。しかし、発育期と成熟期における精巣毒性の感受性差については、さらに検討が必要である。

E. 結論

ACR の神経毒性については、発育期と成熟期の感受性差は乏しく、その障害の程度は体重当たりの ACR 摂取量に相関するものと考えられた。一方、精巣毒性に関しては、発育期の方が高い感受性を持つことが示唆された。

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.

Takahashi, M., Shibutani, M., Nakahigashi, J., Sakaguchi, N., Inoue, K., Morikawa, T., Yoshida, M., Nishikawa, A.: Limited lactational transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods. *Arch Toxicol.* (in press).

2. 学会発表

Miwa Takahashi, Kaoru Inoue, Midori Yoshida, Makoto Shibutani, Akiyoshi Nishikawa: Susceptibilities to acrylamide-induced neurotoxicity and testicular toxicity between young and adult rats. 6th European Congress of Toxicologic Pathology, September 2008, Edinburgh, UK.

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

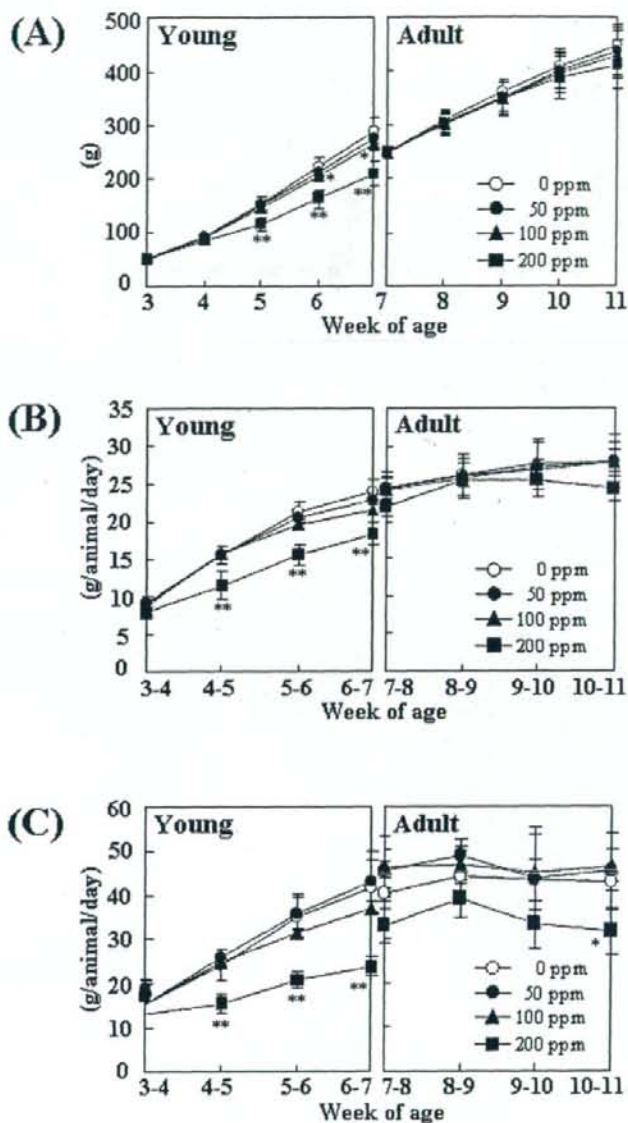


Fig. 1 Time course of body weight (A), food consumption (B) and water consumption (C) in young and adult rats given ACR in the drinking water for 4 weeks. Data are mean \pm SD. *, **: $p < 0.05$ and $p < 0.01$ vs. 0 ppm.

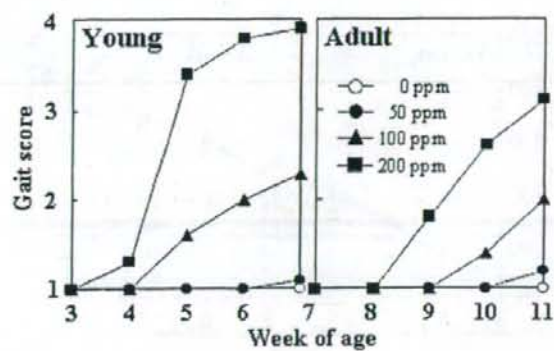


Fig. 2 Scores for gait abnormalities of young and adult rats given ACR in the drinking water for 4 weeks.