

2008370/3B

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 18～20 年度 総合研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成 21 (2009) 年 4 月

平成 21 年 4 月 10 日

厚生労働大臣 殿

住 所 〒152-0021 東京都目黒区東が丘1-22-3-103
フリカ ナ イマイ トオ
研究者 氏 名 今井 俊夫
(所属機関 国立がんセンター研究所)

平成 18 年度から実施した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) に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) :

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)

国庫補助金精算所要額 : 金 39,000,000 円也 (※研究期間の総額を記載すること。)
(うち間接経費 0 円)

1. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添4のとおり)
5. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況 (総合研究報告書の中に書式に従って記入した。)

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18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総合研究報告書		
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 今井俊夫	-----	1
(資料1) 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 紅林秀雄	-----	22
(資料2) 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 渋谷 淳	-	32
(資料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 今井俊夫	-----	56
(資料4) ライフステージを勘案したアクリルアミドの遺伝毒性誘発機構の解析 本間正充	-----	67
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	82
III. 研究成果の刊行物・別刷		

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）
総合研究報告書

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

研究代表者 今井 俊夫 国立がんセンター 研究所 実験動物管理室 室長

研究要旨

本研究では、食品中の遺伝毒性を有する有害物質としてアクリルアミド(AA)を対象にした。食品からの AA 摂取量は、成人よりも小児の方が多いと推定されていることから、その体内動態及び毒性に関し、胎児期、乳幼児期、春機発動期、成熟期など各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検討した。用量反応性を考慮した解析により、小児を含むヒトに対するリスク管理に資するデータの構築を目指した。体内動態に関しては、[紅林] 4 及び 14 週齢の雌ラットに[2,3-¹⁴C]AA を 0.5 及び 2.5 mg/kg 体重の用量で 1 回強制経口投与した。その結果、投与 72 時間後までに 73-85% の尿・糞・呼気中排泄が認められ、成熟ラットに比べ幼若ラットで総排泄率が高い傾向が見られた。また、血液に残留がみられたが、その濃度は成熟ラットに比し幼若ラットで低かったことから、AA の代謝、排泄は成熟ラットより幼若ラットで速やかであることが推察された。神経毒性、精巣毒性に関しては、[渋谷] 雄ラットの胎児期、乳幼児期、発育期あるいは成熟期に、AA を 25-200 ppm の用量で各 4 週間飲水投与した。その結果、幼若期と発育期との比較において、神経毒性については感受性差を認めなかったが、精巣毒性については特に高用量群で幼若期に高感受性であることを示す所見が得られた。発がん性に関しては、[今井] 雌雄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、7 週齢時に N-メチル-N-ニトロソ尿素による処置を行い 50 週齢まで飼育した。その結果、AA の乳幼児期投与による甲状腺、乳腺を含む諸臓器、組織における腫瘍性病変の発生頻度への影響はみられなかった。[本間] 3、7 及び 11 週齢の雄ラットに AA を 20-200 ppm の用量で 4 週間飲水投与した。その結果、幼若ラットの精巣において、成熟ラットの 5 倍以上の DNA 付加体の蓄積がみられ、コメット試験、小核試験、遺伝子突然変異解析でも幼若ラットの高感受性を示す結果が得られた。検索した他の臓器、組織では成熟、幼若ラットの違いはみられなかった。以上、AA の幼若期投与による体内動態、神経毒性及び発がん性について、成熟動物に比して幼若動物の感受性が高いことを示唆する結果は得られなかったが、精巣毒性および精巣における遺伝毒性については幼若期に高感受性であり、DNA 付加体が精巣毒性に関与している可能性が示された。

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 | 学技術研究院・准教授 |
| 2) 渋谷 淳 東京農工大学大学院・共生科 | 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。

そこで本研究では、幼若期における 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神経毒性、精巣毒性、発がん性あるいは遺伝毒性の特性及び感受性について成熟期と比較し、その違いを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。

B. 研究方法

(1) 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 [紅林]

4 週齢及び 14 週齢の SD 雌ラット各 18 及び 15 匹に $[2, 3-^{14}\text{C}]$ AA (室町薬品株式会社、比放射能 $4-5 \text{ mCi}/\text{mmol}$) を 0.5 あるいは $2.5 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重の用量 (放射能用量: $35-50 \mu\text{Ci}/\text{kg}$) で 1 回強制経口投与した。動物の個別

用途として、4週齢及び14週齢のラットは経時的な血液採取の目的で各2匹、全身オートラジオグラフィでは各3匹、組織中放射能濃度測定では各時点各1匹ずつ合計各6匹を使用した。尿・糞・呼気中放射能排泄率の測定で用いた各2匹は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の最終時点の動物とした。乳児を伴う14週齢のSD哺乳ラット2匹には、0.5及び2.5 mg/kg体重（放射能用量：35-50 μ Ci/kg）の用量でAAを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（LSC-1000、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ィは、2.5 mg/kg体重のAA投与した30分、6時間及び72時間後のラットを安楽死させ、液体窒素で凍結し、ミクロトーム（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、バイオイメージングアナライザー（BAS2000、富士写真フィルム）のPSL値から半定量的黒化度として測定し、高濃度、中濃度、低濃度及び極低濃度の4段階に分けて評価した。組織中放射能濃度測定は、ラットを放血により安楽死させた後、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、腸間膜リンパ節、褐色脂肪、乳腺の20組織を摘出して均一化した後に一部を精秤し、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た。

乳汁中放射能濃度測定は、哺乳ラットに $[2, 3-^{14}C]$ AAを1回強制経口投与後、所定の観察時間後に授乳中の児動物を安楽死させ、胃内容物を約100 μ L採取して、放射能濃度を計測した。

試験結果の表現法として、放射能濃度より未変化体換算した薬物換算濃度を以下の式で算出した。また、全ての試験は株式会社生体科学研究所で実施した。

$$\text{薬物換算濃度 } (\mu\text{g eq. / mL}) = \frac{\text{試料中放射能濃度 (dpm/mL)}}{\text{投与放射能 (dpm) / 投与薬物量 } (\mu\text{g})}$$

(2) 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 [渋谷]

1) 胎児・授乳期投与による神経・精巣毒性の評価 (実験1)

妊娠10日目のSD雌ラット12匹を各群3匹ずつ4群に分け、AAを0、50、100、200 ppm濃度で離乳（出産後21日）まで飲水投与した。離乳後、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週に解剖した。実験期間中は定期的に体重、摂餌量および摂水量を測定し、臨床症状の観察を行った。神経症状については、各個体について姿勢などを観察し、スコア化した。解剖時には脳、脊髄、三叉神経、坐骨神経、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体、骨格筋を採取し、脳、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体の重量を測定した。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、

精巣はブアン固定液にて固定し、脳、脊髄、肝臓、脾臓、腎臓、精巣上体、三叉神経、骨格筋は10%リン酸緩衝ホルマリンで固定した。それぞれ常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 μ m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。坐骨神経および小脳分子層については、デジタルカメラ付顕微鏡により組織写真を撮影し、画像解析ソフトによる計測を行った。坐骨神経においては、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の数を計測した。小脳分子層においては、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、皮質の長さに対する点状染色像の数を算出した。

2) 母体を介したAA暴露量の検討 (実験2)

妊娠6日目のSD雌ラットを各群4匹ずつ4群に分け、AAを0、25、50、100 ppm濃度で離乳まで飲水投与した。AAの投与用量は、実験1において母動物に神経障害が確認された100 ppmを最高用量とした。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50 mg/kg体重/日の用量でAAを週3回腹腔内投与した。動物の飼育、観察、測定は実験1に準じて行った。生後14日目に各腹1~2匹/性の児動物から血漿、血球および胃内乳汁を採取し、-80℃で凍結保存した。母動物の血漿および血球は、投与終了時に採取した。母動物、児動物ともに脳、三叉神経、坐骨神経、精巣、精巣上体を採取し、実験1と同様に組織学的検索を実施した。坐骨神経および小脳分子層に関しては、0および100

ppm群の母動物と児動物、および腹腔内投与した児動物について、実験1と同様の方法で形態計測を行った。血漿および血球サンプルについては、日本食品分析センターにて、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) により血漿中AA濃度を、ガスクロマトグラフ-質量分析法 (GC/MS) により血球中のAA-ヘモグロビン (Hb) 付加体量を測定した。

3) 発育期投与による神経・精巣毒性の評価 (実験3)

発育期投与群として生後21日齢、成熟期投与群として7週齢のSD雄ラットを各群10匹ずつ4群に分け、AAを0、50、100、200 ppm濃度で4週間飲水投与した。実験期間中、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。解剖時には脳、三叉神経、坐骨神経、精巣、精巣上体を採取し、実験1、2と同様に組織学的検索および形態計測を実施した。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。

(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 [今井]

1) 乳幼児~春機発動期投与による予備実験

妊娠F344ラット12匹を各群3匹の4群に分けた。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、10、20及び40 ppm濃度で飲水投与した。離乳後の母動物は安楽殺した。離乳後の各群の児動物には母動物と同様の方法でAAを9週間投与した。最高投与量の40 ppmは、ラットの長期試験における発がん用量である。実験期間中は、一般状態を毎日観察し、体重、摂餌量、摂水量は週1回測定した。12週間の投与期間終了後は、全動物をエーテル深麻酔下で大動脈より放血屠殺して剖検した。脳、甲状腺 (含上皮小体)、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓及び

精巣については摘出後、重量を測定した。これらの臓器に加え、鼻腔、気管、大動脈、下垂体、唾液腺、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膵臓、膀胱、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮、膺、乳腺、皮膚、リンパ節、胸骨、大腿骨（含骨髄）、坐骨神経、三叉神経、脊髄、眼球、ハーダー腺、大腿筋及び肉眼的異常部位についても摘出し、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、HE染色標本作製し、0及び40 ppm群について病理組織学的検索を行った。組織学的にAA投与に起因することが疑われた臓器については10及び20 ppm群についても観察した。この予備実験において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AA投与に起因することが疑われる心筋炎が認められ、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、心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。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週後の離乳まで、AAを0及び40 ppm濃度で飲料水に混じて自由摂取させた。離乳後の母動物は安楽殺した。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。実験期間中、一般状態は毎日観察し、体重、摂餌量、摂水量は週1回測定した。12週間の投与期間終了後、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、HE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実験

妊娠F344ラット36匹を6群に分けた。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、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及び40 ppm濃度で飲水投与した。AAの投与量は、先の予備実験で、一般状態、体重、摂餌量及び摂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、母動物は安楽殺した。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、肺及び甲状腺、乳腺などの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(SDM)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皮下結節/腫瘍の発生状況を週1回観察し、大きさを測定した。50週齢時に実験を終了し、動物を放血殺した。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、膵臓、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。摘出臓器、組織を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いHE染色標本作製、病理組織学的に解析した。

(4) ライフステージを勘案したアクリルアミドの遺伝毒性誘発機構の解析 [本間]

1) *In vitro* 試験：サルモネラ菌による *umu* 試験

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。*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。1 時間 37°C で試験検体とインキュベーション後、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。

2) *In vitro* 試験：ヒト培養細胞による *TK* 遺伝子突然変異試験、小核試験

ヒトリンパ芽球細胞株 TK6、AHH-1 と、トランスジェニックヒト細胞 h2E1v2、MCL-5 を用いた。h2E1v2 は CYP2E1 を、MCL-5 は 5 種類の代謝酵素 (CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1、mEpoxide hydrolase) を高発現する。AHH-1 とトランスジェニック細胞は、BD Bioscience のクレプシ博士から供与された。TK6 細胞は、ハーバード大学衛生学部リトル教授より分与された。増殖期の細胞に用時調製した生理食塩水で調整した AA 溶液を 1% 添加し、24 時間連続処理した。その後、細胞を正常培地で 48 時間培養し小核の標本を作製した。小核標本に 20 μg/mL のアクリジンオレンジ溶液をスライドガ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。処理終了 72 時間後に 96 well プレートに細胞を 3 μg/mL トリフルオロチミジン (TFT) 下で播種し、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。

3) *In vivo* 試験

F344 を背景とする 3 及び 11 週齢の *gpt* delta トランスジェニック雄ラット及び SD 雄ラットを使用した。*gpt* delta ラットは各群 5 匹の 4 群に分け、0、20、40、80 ppm の AA を

28 日間飲水投与した。SD ラットについては各群 10 匹の 4 群に分け、0、50、100、200 ppm の AA を 28 日間飲水投与した。小核試験については投与開始 2 日及び 28 日後 (最終投与日) に、尾静脈または心臓から血液を約 100 μL 採取して実施した。また、投与開始 28 日後に精巣を摘出し、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。アルカリコメット試験については、投与開始 28 日後に安楽殺して解剖し、肝臓の左葉の一部及び胃を採取して実施した。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。*gpt* delta ラットについてのみ実施した遺伝子突然変異試験は、アルカリコメット試験用のサンプル採取後、肝臓及び精巣の一部を採取し、DNA を抽出してサンプルとした。*gpt* 遺伝子試験は増村らの方法に従って行った。その他、肝臓、精巣、甲状腺、乳腺の一部から DNA を抽出し、DNA 付加体検出用サンプルとした。また、肝臓、精巣の一部から病理組織標本を作成し、病理組織学的に検討した。

4) DNA 付加体量の定量

AA 投与により形成される主たる DNA 付加体である *N7*-GA-Gua を LC/MS/MS により測定した。*N7*-GA-Gua およびその安定同位体は Gamboa da Costa らの方法に従い合成した。LC/MS/MS は Waters-Micromass 社の Quattro Ultima Pt を用い、HPLC のカラムは Shim-pack XR-ODS (75×3.0mm) 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安楽殺し、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」あるいは「国立がんセンターにおける動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験（倫理）委員会に計画書を提出して実施承認を得た。また、使用したヒト肝細胞は米国 NPO 団体 TTT が倫理法に基づいて調製し実験材料として市販され、あるいはヒトリンパ芽球細胞は米国 American Type Culture Collection (ATCC) に登録済みの株化細胞であり、ヒト肝臓由来 S9 は非営利団体である Human and Animal Bridges (HAB) より研究目的で供与されたものであり倫理上問題はない。またヒト細胞を用いる全ての実験は国立医薬品食品衛生研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

(1) 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 [紅林]

[2, 3-¹⁴C]AA を成熟および幼若ラットに 0.5 あるいは 2.5 mg/kg 体重の用量で経口投与した結果、尿中には、投与後 3 時間までに 19-27%、24 時間までに 59-67%、72 時間までに 63-70% の排泄が認められた。また、成熟ラットに比し幼若ラットで尿中排泄率がやや高い傾向がみられた。糞中には、24 時間までに 6.1-8.5%、72 時間までに 7.1-9.0% の排泄が認められた。成熟および幼若ラットで 0.5 mg/kg 体重に比し 2.5 mg/kg 体重で糞中排泄率がやや高い傾向を示した。呼気中には投与後 3 時間までに 0.9-1.7%、24 時間までに 1.6-5.1%、72 時間までに 1.9-7.5% の排泄が認められた。成熟および幼若ラットで 2.5 mg/kg 体重に比し 0.5 mg/kg 体重で呼気中排泄率が高い傾向が見られた。また、成熟ラットに比し幼若ラットで高い傾向がみられた。総排泄率としては、投与後 3 時間までに 20-29%、24 時間までに 68-78%、72 時間までに 73-85% の排泄が認められた。成熟ラッ

トに比し幼若ラットで総排泄率が高い傾向がみられた。

血液中放射能濃度については、投与 10 分後から上昇し、幼若ラットでは投与後 1 時間 (2.6 $\mu\text{g eq/mL}$)、成熟ラットでは投与後 6 時間 (3.4 $\mu\text{g eq/mL}$) で最高値に達し、その後は非常にゆっくりと減少したが 72 時間後でも高濃度を保ち続けた。減少速度は両用量とも、成熟ラットに比し幼若ラットで速い傾向を示した。血漿中放射能濃度は、投与後 30 分に最高値 2.4 $\mu\text{g eq/mL}$ を示したがその後下降し、6 時間後には約 50% に低下し、投与後 72 時間後では約 2-3% まで低下した。幼若ラットでは投与後 6 時間までの減少は速いが、それ以降の半減期については成熟ラットと違いはみられなかった。

全身オートラジオグラフィーでは、投与後 30 分の幼若および成熟ラットにおいて、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、血中に取り込まれ、全身の組織に分布していることが確認できた。投与後 6 時間の幼若および成熟ラットでも後述する組織中放射能濃度と同様の臓器分布濃度を示した。また、組織中放射能濃度でサンプリングしなかった眼球や皮膚の毛根組織に集中した分布が認められた。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。投与後 72 時間の幼若および成熟ラットでは、全身が低濃度化していたが、血液、眼球の濃度が高く、成熟ラットでは背部皮膚の毛根の一部および鼻毛根にも特異的な分布が認められたが、毒性標的臓器である甲状腺、乳腺などへの集積性は認められなかった。

組織中放射能濃度と半減期について、成熟ラットでは、投与後 10 分において、肝臓に次いで脾臓で高濃度値を認めた。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、血液を除く観察臓器は減少傾向を示した。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 $3.4 \mu\text{g eq/mL}$ 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。血液に次いで皮膚、肺、脾臓、腎臓、肝臓で高濃度を示し、さらに、脳、甲状腺、下垂体等が続いた。一方、毒性標的臓器である神経系組織、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、24-72 時間の濃度変化から計算した終末半減期の大きい臓器は、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。幼若ラットでは、投与後 10 分において、肝臓に次いで脾臓で最も高い数値を認めた。その他の殆どの観察臓器では 30 分で最高濃度値を示し、投与後 1 時間からは減少を示した。血液は投与後 1 時間で最高濃度値 $2.6 \mu\text{g eq/mL}$ を示し、投与後 72 時間でも $1.0 \mu\text{g eq/mL}$ と高濃度を示し、残留量は 3% と計算された。成熟ラットと幼若ラットにおける $[2, 3-^{14}\text{C}]$ AA を 2.5mg/kg の用量で経口投与後の組織中放射能濃度を比較すると、10 分から 1 時間では明らかな差はみられなかったが、6 時間以降では成熟ラットの臓器濃度が高い傾向を示した。これは 24-72 時間の濃度変化から計算した終末半減期が幼若ラットに比し成熟ラットで大きいことにも反映していた。

乳汁中放射能濃度は、投与用量に応じ投与後 30 分でそれぞれ 0.05 および $0.37 \mu\text{g eq/mL}$ 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 および $0.57 \mu\text{g eq/mL}$ であった。その後漸減し、投与 72 時間後にはピーク時の 10% 程度であった。これは別途 $[2, 3-^{14}\text{C}]$ AA 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。

(2) 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巢毒性の病理解析 [渋谷]

1) 胎児・授乳期投与による神経・精巢毒性の評価 (実験 1)

母動物の体重は、用量依存性に増加抑制傾向を示し、100 ppm 以上では授乳期において特に顕著であった。摂餌量および摂水量についても、用量依存性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 50、100、200 ppm 群において、各々 9.9、16.7、22.2 mg/kg 体重/日と算出された。臨床観察では、200 ppm 群では妊娠 20 日目から、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。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低値を示した。母動物の体重は 0 ppm 群 (323.6 g) に比し、100 ppm では 284.3 g (-12%)、200 ppm では 235.5 g (-27%) と低値を示した。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、坐骨神経の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の増加、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観察された。骨格筋では、神経筋接合部の分布に群間差は認められなかった。また、肝臓、脾臓、腎臓、脊髄に AA 投与による組織学的変化はみられなかった。離乳前の児動物の一般状態には群間の差はみられず、体重は出生直後より雄の 50 あるいは 100 ppm 以上、雌の 100 ppm 以上において用量依存性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た。児動物の体重は 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。病理組織学的検索では、雌雄ともに小脳外顆粒層細胞の残存の程度がAAの用量に伴い増加傾向を示した。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が観察された。精巣は0 ppm群では精母細胞が3~4層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AA投与による影響は認められなかった。形態計測では、生後3週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、AAの用量に伴って更に小型化する傾向がみられた。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AA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AA投与による変化は認められなかった。小脳分子層におけるSYP陽性の点状染色像および骨格筋における神経筋接合部の分布に群間の差は認められなかった。生後11週までの児動物の一般状態についても、群間差は認められなかった。200 ppm群の雌の児動物1例が生後4週に死亡した。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、雌では100あるいは200 ppmで、用量依存性に有意に低値を示したまま推移した。病理組織学的検索では、いずれの臓器においてもAA投与による影響は認められなかった。また、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ず、骨格筋における神経筋接合部の分布についても投与による変化は認められなかった。

2) 母体を介したAA暴露量の検討 (実験2)

母動物では、100 ppm群において出産後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AA平均摂取量は、25、50、100 ppm群において各々3.72、7.89、14.56 mg/kg体重/日であった。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、雄では25、50、100 ppm群で、雌では25 ppm群で、高値を示した。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。飲水投与群では臨床症状の異常を認めなかったが、腹腔内投与した児動物では、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。解剖時の母動物の体重は、100 ppm群で減少傾向を示した。飲水投与群の児動物の体重は、実験1と同様に、雌雄ともに100 ppmで減少した。腹腔内投与した児動物も有意な体重低値を示した。病理組織学的検索において、母動物では50 ppm以上で三叉神経の中心性色質融解が観察された。飲水投与群の児動物では、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。一方、腹腔内投与した児動物では、小脳外顆粒層細胞の残存に加えて三叉神経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。形態計測の結果、母動物では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の増加、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明らかであった。飲水投与群の児動物では、0及び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。腹腔内投与した児動物では、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の増加が認められた。

しかし、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。

HPLC による血漿中 AA 濃度の測定では、母動物、児動物ともに、いずれの用量群においても AA は検出されなかった (検出限界: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。同様に、100 ppm 群の児動物の胃内乳汁からも AA は検出されなかった。GC/MS による血球中の AA-Hb 付加体の測定結果については、過去の報告と同様に (Bergmark et al., Toxicol Appl Pharmacol., 1991)、0 ppm 群においても微量の AA-Hb 付加体が検出された。母動物では AA の投与用量に応じて付加体量は増加傾向を示し、個体ごとの AA 摂取量と高い相関性を示した。児動物においても用量に応じた増加傾向を示したが、その量は母動物の 1/10 以下であった。

3) 発育期投与による神経・精巣毒性の評価 (実験 3)

発育期投与群では、2 週目以降 100 ppm 以上で体重増加抑制を示し、200 ppm で摂餌量の減少がみられた。摂水量は、両群とも 200 ppm で低値を示した。体重当たりの AA 摂取量は、いずれの用量群においても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を示し、症状の進行および程度は用量に相関していた。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みられた。神経系組織の病理組織学的検索および形態計測の結果については、発育期、成熟期のいずれも 100 ppm 以上で、三叉神経の中心性色質融解が明らかであった。また、坐骨神経における変性軸索の割合は 100 ppm 以上で、小脳分子層における SYP 陽性点状染色像の個数は 200 ppm で増加した。萎縮した有髄神経線維数の割合は、200 ppm で増加傾向を示した。高用量群では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。精巣

の病理組織学的観察では、発育期投与群において、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 以上で明らかであった。また、性細胞の剥離や多核巨細胞の出現も散見され、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、成熟期投与群では、性細胞の剥離が 100 ppm 以上で増加したが、発育期ラットで認められた精子細胞の変性や消失は殆ど観察されなかった。

神経毒性に関わるパラメーターとして、4 週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 AA 摂取量との関係を比較した結果、発育期および成熟期投与群ともに、いずれのパラメーターも AA 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、精上皮の障害を認めた精細管の割合と体重当たりの AA 摂取量との関係をみると、成熟期ラットでは、障害を認めた精細管の割合は AA 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。

(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 [今井]

1) 乳幼児～春機発動期投与による予備実験

実験期間を通して、いずれの群においても 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、雄では群間の明らかな差はみられなかったが、雌の 20 及び 40 ppm 群において生後 3-9 週目に僅かながら、統計学的に有意な低値を示した。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 AA の 10、20 及び 40 ppm 群における平均摂取量は、雄では各 1.0、2.1、4.4 mg/kg 体重/日、雌では各 1.2、2.5、4.9 mg/kg 体重/日であった。剖検時の臓器重量については、

雌の 40 ppm 群において、甲状腺及び脾臓の相対重量の増加が認められた。病理組織学的には、精巣、精巣上体及び心臓において AA 投与による、あるいは AA 投与によることが疑われる変化が認められた。即ち、精巣では両側性の精細管萎縮の発生頻度が 40 ppm 群で増加し、関連する変化として精巣上体では、精巣上体管内にみられる剥離精上皮の発生頻度が 40 ppm 群で増加した。心臓では、心筋炎が雌雄の対照群の各 2/7 例及び 2/17 例の乳頭筋あるいは左心室壁などに散発性にみられたが、いずれも軽度な変化であった。一方、40 ppm 群においては雌雄各 4/12 例にみられた対照群と同等の軽度な心筋炎に加え、雄の 5/12 例には右心室壁心底側、心外膜下の中等度の心筋炎が認められた。雌において腎臓の石灰沈着が対照群の 15/17 例に比し、40 ppm 群では 6/12 例とその発生頻度が減少した。その他の臓器組織における病理組織学的変化に関しては、AA 投与による明らかな影響は認められなかった。上記予備実験でみられた、心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。その結果、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、40 ppm 群の雌雄において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も AA 投与による明らかな影響はみられず、摂水量より算出した 40 ppm 群における AA の平均摂取量は、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。血清生化学的検査については、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。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。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。

2) 乳幼児期投与による中期発がん実験

母動物については、AA 投与による一般状態の変化はみられず、体重についても 80 ppm 群で低値傾向を示したが、統計学的有意差はなかった。摂餌量及び摂水量は、80 ppm 群において低値傾向を示し、摂水量より算出した母動物の AA の平均摂取量は、20、40 及び 80 ppm の各群において、4.1、8.0、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。実験期間中の死亡率の推移に群間の明らかな差は認められなかった。体重は、生後 3 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を伴う低値を示した。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ず、摂水量より算出した児動物における AA の平均摂取量は、20、40 及び 80 ppm の各群において、雄では 3.4、7.0、14.1 mg/kg 体重、雌では 3.6、7.2、14.9 mg/kg 体重であった。触診により経時的に観察、測定した皮下に形成された乳腺腫瘍の発現状況に関し、AA 投与による明らかな影響はみられなかった。剖検時の臓器重量については、雌の 40 ppm 群の肝臓及び 40 ppm 以上の群の腎臓相対重量が低値、80 ppm 群の肝臓相対重量が高値を示した。対照群と 0 ppm+SDM 群の比較では、雌の腎臓相対重量の低値、雌雄の甲状腺相対重量の高値がみられた。SDM 投与群で

は AA の投与により雄の肝臓相対重量が高値を示し、雌雄の甲状腺相対重量が低値傾向を示した。病理組織学的検索では、対照群に比し、雄の 0 ppm+SDM 群及び 40 ppm+SDM 群において甲状腺における濾胞上皮の巣状過形成、腺腫及び腺腫/腺癌の発生頻度が、雌の 0 ppm+SDM 群において巣状過形成、40 ppm+SDM 群において巣状過形成、腺腫及び腺腫/腺癌の発生頻度が増加した。SDM を投与しなかった雄の 80 ppm 群では、対照群に比し甲状腺の濾胞上皮の巣状過形成の発生頻度が増加傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。SDM を投与した群間の比較において、雄では AA 投与による影響はみられず、雌では 0 ppm+SDM 群に比し 40 ppm+SDM 群で腺腫及び腺腫/腺癌の増加傾向がみられたが、統計学的有意差はなかった。雄の 0 ppm+SDM 群において口腔における扁平上皮過形成の発生頻度が増加したが、40 ppm+SDM 群に影響はみられなかった。雌の 40 ppm+SDM 群において巣状の子宮腺過形成が増加したが、0 ppm+SDM 群との間に統計学的有意差はなかった。肺においては、雄の 20 及び 80 ppm 群で肺胞上皮過形成の発生頻度が低下したが、80 ppm 群では肺腺癌の発生頻度が増加した。雄の 0 ppm+SDM 群及び 40 ppm+SDM 群においては、肺胞上皮過形成の発生頻度が低下したが、腺腫、腺癌あるいは腺腫/腺癌の発生頻度は増加した。その他、AA の標的臓器を含む多臓器において種々の頻度で前がん病変あるいは腫瘍の発生が認められたが、AA あるいは SDM 投与による明らかな影響は認められなかった。

(4) ライフステージを勘案したアクリルアミドの遺伝毒性誘発機構の解析 [本間]

1) サルモネラ菌による 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 の umu 試験を行った。10mM まで行ったが、両条件で陽性反応は得られなかつ

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 の 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) ヒト培養細胞による TK 遺伝子突然変異試験、小核試験

ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いて AA を試験した。試験は、直接法及びラット S9、ヒト S9、もしくはヒトマイクロゾーム分画存在下で行った。全ての試験において、AA の遺伝子突然変異、小核誘発性は低く、また代謝活性化の影響はみられなかった。同様の試験を代謝物の GA で行った結果、顕著に遺伝毒性を示したが、S9 はその遺伝毒性を増強しなかった。CYP2E1 を高発現する h2E1v2 を用いて AA と DMN の遺伝毒性を評価した。DMN は AA と同様に CYP2E1 により代謝活性化されることが知られている。AA に関しては h2E1v2 と親株の AHH-1 で、細胞毒性及び遺伝毒性（遺伝子突然変異、小核）に大きな差は無かった。一方、DMN は h2E1v2 で高い遺伝子突然変異誘発性を示した。また、小核誘発性に関しても h2E1v2 は高い感受性を示した。MCL-5 でも同様の結果で、特に AA に対して高い細胞毒性、遺伝毒性は示さなかった。TK6 細胞、MCL-5 を AA もしくは GA で 4 時間処理後、DNA を回収して付加体の N7-GA-Gua を測定した。AA の高濃度処理 (14mM) で TK6 に僅かな付加体生成が観察された。GA 処理では低用量から用量依存的な多量の付加体生成が観察された。MCL-5 細胞では GA、AA 処理で付加体生成は観察されなかった。

3) トランスジェニック F344 ラットでの in vivo 試験

gpt delta 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。各群に0、20、40、80 ppmの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。肝臓では僅かであるがコメット試験によるDNA損傷が確認されたが、幼若ラットと成熟ラットの顕著な差は認められなかった。一方、骨髄での小核の誘発に関しては成熟ラットでは顕著な誘発は認められなかったが、幼若ラットでは最高用量で統計的有意差が認められた。gpt突然変異に関しては、すべての解析はまだ終了していないが、これまでのところ成熟、幼若ラットにおけるAAによる肝臓での突然変異の誘発性は認められず、また成熟、幼若の差も認められなかった。精巣に関しては幼若ラットの最高用量群で突然変異の誘発に有意差が認められた。AAの主たるDNA付加体であるM7-GA-Guaについて、肝臓、甲状腺、乳腺、精巣の解析を行い、肝臓、乳腺および精巣で用量依存的な増加を観察した。乳腺では成熟、幼若ラット共に同程度の高い付加体形成が観察された。肝臓、精巣では成熟、幼若ラットにとも用量依存的な増加を示し、さらに幼若、成熟ラットで差が観察された。特に、精巣においては幼若ラットで5倍以上もの付加体の蓄積が観察された。

4) SDラットでの*in vivo*試験

SDラットの各群に0、50、100、200 ppmのAAを28日間飲水投与し、末梢血と精巣での小核試験、肝臓、精巣でのコメット試験を実施した。末梢血での小核は200 ppm群で僅かに増加したが、幼若、成熟ラットの差は認められなかった。肝臓でのコメットも用量依存的に両群で増加したが、むしろ幼若ラットの方が増加率は低かった。一方、精巣に関しては小核、コメットともに幼若ラットでのみ用量依存的な反応性と、有意な誘発を認めた。

D. 考察

(1) 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 [紅林]

成熟SD雌ラットに[2,3-¹⁴C]AAを0.5ないし2.5mg/kgで経口投与した際の投与後72時間までの尿・糞・呼気中への放射能排泄率は、尿中に63-64%、糞中に7-9%、呼気中に1.9-3.1%であり、総排泄率は73-75%であった。幼若ラットでは、投与後72時間までに尿中に69-70%、糞中に8-9%、呼気中に3.7-7.5%の排泄が認められ、総排泄率は83-85%であった。何れにおいて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。また、総排泄率において用量による差はみられなかった。一方、成熟ラットに比し幼若ラットで尿・糞・呼気中の総排泄率が高い傾向がみられた。一般的には排泄の速い幼若ラットでは解毒が速いので安全とも考えられる。但し、本実験で示されたように、呼気に排泄されるまでの過程に危険が潜んでいる可能性も考慮する必要があると思われる。呼気中排泄は¹⁴CO₂として6%の排泄がみられたとするHashimotoら(1970)による雄ラットの報告と同様に、¹⁴CO₂として3.1-7.5%のゆっくりした排泄がみられたと考えられる。呼気中排泄率については、2.5 mg/kg体重の投与に比し0.5 mg/kg体重で高く、ある種の飽和がみられた。また、成熟ラットより幼若ラットで高い傾向がみられた。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AAがタンパク質などの高分子に結合し、それが分解代謝されたためとも考えられるが、詳細は明らかではない。

成熟雌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時間後に最高値に達したが、その後も同レベルの濃度を長時間保ち続けた。一方、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。幼若ラットに比し、成熟ラットでは血液での減少速度に数倍の遅れがみられた。また、血液に比べ血漿中放射能濃度が低いことから $[2, 3-^{14}\text{C}]$ AAは血球成分に強く吸着されることが示された。

雌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、肝臓と脾臓で最高値を示した。その他の臓器では、幼若ラットで投与後30分、成熟ラットでは30分または1時間に最高濃度に達する場合が多く、成熟ラットでの吸収の若干の遅れのあることが示唆された。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、減少速度の遅れがみられた。

全身オートラジオグラフィについては、経口投与のため、胃、小腸ならびに盲腸などの消化管内容物で高濃度分布が観察された。血液以外では皮膚、特に背部皮膚の毛根と考えられる部位に血液と同レベルの濃度を確認した。幼若および成熟ラットいずれでも血液に高い蓄積を示し、幼若ラットでは眼球、成熟ラットで皮膚への分布が特徴的であった。成熟ラットでは、汗腺もしくは皮脂線等を経路とした排泄が推定される。

以上より、 $[2, 3-^{14}\text{C}]$ AAは投与後10分でも肝臓を経て、更に大動・静脈を経てほぼ全身に分布し、その後大半は尿より排泄されることが明らかとなった。また、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組織、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。

授乳中ラットに $[2, 3-^{14}\text{C}]$ AAを0.5及び2.5 mg/kg 体重の用量で経口投与した際の児ラットへの移行性を検討した結果、投与した $[2, 3-^{14}\text{C}]$ AAの放射能は母親ラットの乳汁か

ら乳仔へ用量依存的に低濃度移行した。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 $[2, 3-^{14}\text{C}]$ AAで乳汁に移行し、乳仔に吸収される可能性も考えられた。

(2) 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巢毒性の病理解析 [渋谷]

神経毒性については、実験1、2において、母動物では100 ppm以上でAAの用量依存性に神経症状の進行が認められ、組織学的にも神経障害を示唆する形態変化が確認された。一方、母動物の乳汁を介した曝露では、児動物に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、神経毒性作用は確認されなかった。AAの標的と考えられている神経終末は、胎児期あるいは乳児期には発達途上であるため、成熟動物に比べAAに対する感受性が低い可能性が考えられたが、離乳前にAAを腹腔内投与した児動物において、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、離乳前の児動物も感受性を有することが確認された。発育期曝露では、成熟動物と同様に100 ppm以上で歩行異常と神経障害を示す形態変化を示し、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。しかし、体重当たりのAA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AA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AA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AA摂取量に相関するものと考えられた。

血球中のAA-Hb付加体は、母動物、児動物ともAAの投与用量に応じた増加を示したが、児動物の付加体量は母動物の1/10以下であ

った。母動物と児動物の赤血球代謝や曝露期間の違いを考慮すると、両者の曝露レベルが同程度の場合、児動物の付加体量は母動物よりも低くなると想定されるが、検出された児動物の付加体量は予想を大きく下回っていた。胃内乳汁中の AA 濃度が検出限界以下であったことから、母動物に対する飲水投与による乳汁を介した曝露量が少なく、児動物に神経障害を生じるには不十分であったと考えられた。一方、ヒトの報告等から胎児期の AA 曝露は成立していたと推測される。胎児期の AA 投与によって児動物の体重抑制を生じることから (Wise et al., Neurotoxicol Teratol. 1995)、実験 1 で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 AA の発達毒性作用が関与した可能性が考えられた。実験 2 では、逆に生後 2 日目の児動物体重が一部で高値を示したが、これは一腹当たりの産児数や妊娠期間の偏りに起因し、毒性的意義は乏しいと考えられた。授乳期およびその後の体重低値と発達遅延には、母動物の神経症状進行に伴う一般状態悪化が大きく影響していると推測された。

精巣では、飲水投与群および腹腔内投与群ともに精細管上皮の発達遅延がみられたが、両群とも性細胞に対する障害作用は確認されなかった。飲水投与群では、神経毒性と同様に、乳汁を介した AA 曝露量が精巣毒性を生じるのに不十分であった可能性が高い。腹腔内投与群については、成熟動物に対する同じ投与方法による報告がないため正確な比較はできないが、成熟雄ラットに 60 mg/kg 体重/日を 5 日間強制経口投与した場合、多核巨細胞の出現や性細胞の消失等が報告されている (Yang et al., 2005)。AA 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 AA に対して感受性を示さ

ない可能性が考えられた。一方、発育期曝露では、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 AA 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 AA の精巣毒性に高い感受性を持つことが示唆された。AA 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、精子形成開始以前の精巣における感受性の有無や、発育期と成熟期における感受性差については、更に検討が必要である。

(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 [今井]

AA の乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん実験の実施に先立ち、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、40 ppm 濃度で実施し、一般状態の観察、体重、摂餌量、摂水量及び臓器重量の測定、全身の諸臓器組織の病理組織学的検索を行った。その結果、雌雄のいずれの群においても AA 投与に起因すると考えられる死亡、一般状態の異常はみられず、雌雄の摂餌量、摂水量及び雄の体重にも明らかな変化は認められなかったが、雌の 20 及び 40 ppm 群において生後 3～9 週目に僅かな体重増加抑制がみられた。しかし、投与期間終了時には、雌のいずれの群にも体重への影響は殆ど認められなかった。臓器重量に関しては、雌の 40 ppm 群において、甲状腺及び脾臓の重量増加がみられたが、いずれにおいても AA 投与に関連する病理組織学的な異常は認められず、原因は明らかではなかった。病理組織学的所見に関しては、雄の 40 ppm 群において精巣の精細管萎縮及び精巣上皮における剥離精上皮の発生頻度が増加した。AA のラットにおける精巣毒性に関しては、7-8 週齢の SD ラットに対する 5 日間投与では 5 mg/kg 体重/日の用量で病理

組織学的変化の発現することが報告されている (Yang II et al., 2005)。今回の実験における雄の 40 ppm 群の実投与量の算出値が 4.4 mg/kg 体重/日であることから、乳幼児期の AA 投与による精巣毒性に対する感受性は春機発動期投与とほぼ同等であると推測されたが、ラットの系統あるいは投与期間などを合わせた実験での比較が必要である。心臓については、雌の 40 ppm 群において、右心室壁心底側、心外膜下の巣状心筋炎が 5/12 例に認められた。F344 ラットにおける自然発生病変として、心尖、乳頭筋あるいは左心室などに散発性にみられる心筋炎は広く知られており、本実験においても雌雄の対照群の少数例に認められた。しかし、雌の 40 ppm 群にみられた病変については、右心室心底側と部位的に特徴があり、その程度も対照群に比して強かったことから、AA 投与の影響であることが否定できないと考えられた。雌において腎臓の石灰沈着が対照群の 15/17 例に比し、40 ppm 群では 6/12 例とその発生頻度が有意に ($p < 0.05$) 減少したが、その毒性学的意義は明らかではなかった。上述の心臓にみられた変化が AA の幼若期投与による影響か否かを再確認するため、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。その結果、AA 投与に起因すると考えられる心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における所見については、偶発的なものであると考えられた。以上より、AA の乳幼児～春機発動期投与において 40 ppm は耐量であると判断された。

AA の乳幼児期投与による MNU 誘発発がん

及ぼす影響を検索する中期発がん実験において、母動物では、授乳期間中の 80 ppm 濃度での AA 投与により、体重、摂餌量及び摂水量が低値傾向を示したが、摂水量より算出した AA の平均摂取量は 20、40 及び 80 ppm の各群において用量に応じた増加を示した。児動物については、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低値がみられたが、その程度は最大約 5% の増加抑制であり、摂餌量及び摂水量には 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。雌雄の SDM 投与群における甲状腺相対重量の高値は、SDM の抗甲状腺作用によるものと考えられた。雌雄の 0 ppm+SDM 群に比し 40 ppm+SDM 群で甲状腺相対重量が低値傾向を示した原因は明らかではなかった。肝臓及び腎臓における相対重量の変化については用量反応性がなく、病理組織学的変化を伴っていないことからその意義は乏しいものと考えられた。

病理組織学的検索において、甲状腺では雌雄ともに SDM の投与により濾胞上皮の巣状過形成あるいは腺腫の発生頻度が増加したが、AA 投与による明らかな影響はみられなかった。雄の 0 ppm+SDM 群における口腔の扁平上皮過形成の増加については、40 ppm+SDM 群では対照群と差がみられなかったため、偶発的なものと考えられた。雌の 40 ppm+SDM 群では対照群に比し巣状の子宮腺過形成の発生頻度が増加したが、0 ppm+SDM 群との比較において有意差はみられず、AA による影響とは判断されなかった。肺では雄の AA 投与群において肺胞上皮過形成の発生頻度の低下がみられたが用量反応性に乏しく、80 ppm 群において肺腺癌の発生頻度が逆の変動を示し、肺腺腫と肺腺癌を合わせて評価した場合には群間に差が認められなかったことから、AA の肺発