

がんに及ぼす影響はないものと判断された。雄の SDM 投与群では肺腺腫及び腺癌の発生頻度の増加がみられたか、その機序は明らかではなかった。

(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]

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 は殆どの *in vitro* 試験では毒性を示さなかったのに対し、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。以上より、AA の毒性の本体はその代謝物である GA であると考えられた。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。動物を用いた *in vivo* の AA と GA の突然変異試験では、それぞれ 100、500ppm の飲水投与で、4 週間後に両化合物で同程度の肝臓での遺伝子突然変異の誘発が報告されている。また、CYP2E1-null のマウスを用いて、AA に対するコメット試験、小核試験を実施したところ、正常マウスに比べて反応性が低かったとの報告もある。*In vitro* では、CYP2E1 を高発現する V79 細胞を用い、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。これらの報告より、AA は CYP2E1 により GA に変換され、毒性の直接的な原因となるとの判断が示されている。しかし、今回実施した CYP2E1 を発現するサルモネラ菌株を用いた *umu* 試験により、CYP2E1 の関与を確認したが、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示唆された。同様の結果は、今回実施したヒト培養細胞を用いた研究からも得られた。即ち、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が確認されたことから、AA の代謝様式の解明には S9 の系は不適切であると判断された。そこで、CYP2E1 を高発現するトランスジェニック細胞である h2E1v2 と MCL-5 を用いて、AA および GA の小核試験および TK 遺伝子突然変異誘発試験を実施した。CYP2E1 を発現する h2E1v2 細胞では、その対照細胞である AHH-1 細胞に比べて AA による細胞毒性、遺伝毒性に差は見られなかった。しかし、CYP2E1 により代謝活性化される DMN を暴露したところ、h2E1v2 細胞は、細胞毒性、小核誘発、遺伝子突然変異のいずれについても AHH-1 に比し強い反応性を示した。これらの結果より、h2E1v2 細胞は CYP2E1 を高発現していることが確認されたが、AA に対しては反応しないことが示された。その理由として、AA は CYP2E1 以外の代謝酵素により代謝される、あるいは AA の代謝活性化には CYP2E1 だけでなく他の酵素も関与することが考えられる。TK6 細胞を高用量の AA で処理すると僅かではあるが N7-GA-Gua 付加体が生成されたことより、細胞内に GA を代謝する要因のあることが示唆され、今後これら因子の解明が必要である。MCL-5 細胞においても AA は毒性を示さなかった。GA は mEpoxide hydrolase によって分解する可能性があり、MCL-5 細胞を用いた実験結果に関与している可能性が考えられた。

Manjanatha はトランスジェニック BigBlue マウスを用いて AA と GA を 100 及び 500 ppm 濃度で 4 週間飲水投与し、肝臓での突然変異を検索した結果を報告している。両化合物とも突然変異が有意に上昇し、AA でその誘発率が高く、突然変異スペクトルは両化合物とも 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。我々の今回の実験は、AAによる毒性を考慮し、*gpt delta* ラットあるいはSDラットを用いて、20-200 ppm濃度で実施した。全群において顕著な体重増加抑制および摂水量の変化はみられなかった。また、病理学組織学的にも検索した諸臓器に異常は認められなかった。末梢、骨髄における小核に関しては、*gpt delta* 成熟ラットでは顕著な小核誘発は認められなかったが、Manjanathaらの報告で100 ppm群においては骨髄小核の誘発は認められていないことと一致した。*gpt delta* 幼若ラットを用いた試験では統計的に末梢血、骨髄で有意差が認められた。しかし、SDラットでは、幼若および成熟ラットともに有意差が認められ、AAは造血系に対して弱い遺伝毒性を示すが、幼若ラットで特に強い影響があるとは考えにくい。一方、肝臓ではコメット、*gpt* 突然変異が試験された。コメットは僅かながら陽性反応を示したが、幼若および成熟ラットで顕著な差は認められなかった。一般にコメット試験では、処理直後に試験を実施しないとDNA修復が働くため、DNA損傷の検出が困難であるとされているが、今回の実験で、飲水投与のような長期暴露によるDNA損傷も検出できることが明らかとなった。*gpt* 突然変異に関しては全ての用量で無処理群と比して突然変異の増加は観察されなかった。Manjanathaの報告でも100 ppmでは突然変異の誘発は顕著でなく、我々の80 ppm群で突然変異の誘発がみられなかったことと一致する。

精巣に関しては、SDラットの実験で、成熟、幼若ラットとともに小核、コメットの用量依存性の増加が観察された。また、この増加は幼若ラットで顕著であった。*gpt delta* ラットにおける*gpt* 突然変異でも80 ppmの最高用量群の幼若ラットのみで有意に増加した。これらの結果より、精巣については幼若ラット

がAAの遺伝毒性に強い感受性を示すことが明らかとなった。DNA付加体の結果はこのことを裏付けるものである。GAはN7-G-GA、N3-A-GA、N1-A-GAの3種類のDNA付加体を生成することが知られているが、N7-G-GAが全体の90%以上を占めるため、今回、この付加体に注目して測定した。精巣でのN7-G-GAは幼若、成熟ラットともに用量依存的に増加し、特に幼若ラットでは成熟ラットに比較し5倍以上の蓄積がみられた。これまでの報告において、精巣にはAAのアダクトが蓄積しやすく、その原因としてプロタミンとの結合が考えられている。また、その約5%はDNAとも付加体を形成するとされている。また、AAは精巣細胞に強い遺伝毒性を示し、転座型の染色体異常を示すこと、低い濃度でも優性致死試験で陽性を示すことが知られている。このようにAAは特に生殖細胞に遺伝毒性を示し、それが付加体の生成と相関するものと考えられる。更に今回、我々の実験ではこの傾向が幼若ラットで顕著に現れることが示された。この原因については今後の詳細な検討が必要である。また、乳腺でも高いDNA付加体が観察された。乳腺はAAの発がん標的組織の一つであり、今後雌ラットなどでの検証も必要である。

E. 結論

(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]

尿糞中排泄率や体内分布等から、0.5-2.5 mg/kg 体重の用量で経口投与された[2,3-¹⁴C]AAはラットにおいて速やかに吸収され、大動・静脈を経て全身に分布し、大半は尿より排泄されることが確認された。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。幼若ラットでは成熟ラットよりAAの吸収、代謝および排泄が速いことが推定された。経口

投与した[2,3-¹⁴C]AAの放射能は母親ラットの乳汁から児ラットへ用量依存的に低濃度移行した。

(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]

AA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経乳暴露の程度が低く、児動物に神経障害を生じるには不十分であることが示された。また、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AA摂取量に相関するものと考えられた。精巢毒性に対する感受性は、離乳前及び成熟期では低く、発育期では高い可能性が示唆された。

(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]

AAの乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん実験を行った結果、本実験条件下ではAAのラット乳幼児期における投与は、甲状腺及び乳腺をはじめとするAAの標的臓器を含む各臓器、組織における前がん病変及び腫瘍性病変の発生に影響を明らかな及ぼさないことが示された。

(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]

AAは薬物代謝酵素CYP2E1によってGAに代謝され、遺伝毒性を発現すると考えられている。しかし、S9による代謝活性化法、CYP2E1を発現するサルモネラ菌株、ヒト培養細胞を用いて検討した結果、CYP2E1単独ではAAからGAへの代謝は進行せず、AAの代謝におけるCYP2E1以外の薬物代謝酵素の関与や、CYP2E1とその他の酵素との共同での代謝がAAの遺伝毒性発現に重要であることが示された。また、幼若及び成熟ラットを用いた実験では、精巣におけるDNA損傷の蓄積、小核の誘発、遺伝子突然変異の誘発が幼若ラットで顕著であった。また、それに対応したDNA

付加体量の増加も観察された。今後、ライフステージを勘案した生殖細胞に対するAAの遺伝毒性メカニズムを解明すると同時に、低年齢層に対するAAの遺伝毒性リスクについて考慮する必要があると考えられた。

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 of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. *Arch. Toxicol.* 80: 820-828 (2006)
- 2) Kurebayashi, H., Ohno, Y.: Metabolism and cytotoxicity of acrylamide in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. *Drug Metabol. Rev.* 39 S1: 246 (2007)
- 3) 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: 1507-1515 (2007)
- 4) 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: 11-24 (2008)
- 5) 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).

6) Cho, Y.M., Imai, T., Hasumura, M., Watanabe, N., Ushijima, T., Hirose, M., Nishikawa, A.: Increased *H-ras* mutation frequency in mammary tumors of rats initiated with *N*-methyl-*N*-nitrosourea and treated with acrylamide. J. Toxicol. Sci. (In press)

7) Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. Mutat. Res., 603, 151-158 (2006)

2. 学会発表

1) Kurebayashi, H., Ohno, Y.: Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. 16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (2006.9)

2) 紅林秀雄、中澤憲一、大野泰雄: *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。日本薬学会第127年会 (2007.3)

3) Kurebayashi, H., Ohno, Y.: Metabolism and cytotoxicity of acrylamide in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. 8th International ISSX Meeting (2007.10)

4) 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[2,3-¹⁴C]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)

5) 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: 成熟雌性ラットにおける[2,3-¹⁴C]Acrylamide 2.5 mg/kg 経口投与後の体内動態。第35回日本トキシコロジー学会年会 (2008.6)

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

7) 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 (2007.9)

8) 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)

9) 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. 47th Meeting of the Society of Toxicology (2008.3)

10) Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Shibutani, M., Nishikawa, A.: Susceptibilities to acrylamide-induced neurotoxicity and testicular toxicity between young and adult rats. 6th European Congress of Toxicologic Pathology (2008.9)

11) 高見成昭、今井俊夫、曹永暎、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)

12) Imai, T., Takami, S., Cho, Y.M., Hirose, M., Nishikawa, A.: A 12-week toxicological study of orally administered acrylamide in juvenile rats. 47th Meeting of the Society of Toxicology (2008. 3)

13) 高見成昭、今井俊夫、曹永暎、広瀬雅雄、西川秋佳：アクリルアミドのラット乳幼児期投与による発がん感受性への影響。第67回日本癌学会総会 (2008. 10)

14) Takami, S., Imai, T., Cho, Y.M., Maeda, M., Hirose, M., Nishikawa, A.: Effects of prepubertal exposure to acrylamide on *N*-methyl-*N*-nitrosourea induced multi-organ carcinogenesis in rats. 48th Meeting of the Society of Toxicology (2009. 3)

15) 小山直己、加藤竜也、本間正充、林 真、増田修一、木苗直秀：ヒトリンパ芽球トランスジェニック細胞を用いたアクリルアミドおよびグリシダミドの遺伝毒性試験。日本環境変異原学会第35回大会 (2006. 11)

16) Koyama N., Yasui M., Sakamoto H., Sakuraba M., Masuda S., Kinoshita N., Matsuda T., Hayashi M., and Honma M: Genotoxicity of acrylamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

17) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、今井俊夫、山本歩、汲田和歌子、増村健一、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充：ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価

日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし。

(資料1)

厚生労働科学研究補助金 (医薬安全総合研究事業)

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)

総合分担研究報告書

「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」

(平成 18-20 年度)

[2, 3-¹⁴C]Acrylamide を用いた放射性 ¹⁴C トレーサー実験法による
アクリルアミドの幼若および成熟雌性ラットにおける体内動態

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

成獣および幼若ラットに[2, 3-¹⁴C]Acrylamide を用量 0.5 ないし 2.5mg/kg で経口投与して尿・糞・呼気中放射能排泄を検討した。

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。糞中には、72 時間までに 7.1-9.0% の排泄が認められ、呼気中には投与後 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。総排泄率は、投与後 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。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。一方、成獣ラットに比べ幼若ラットで総排泄率および呼気中排泄率は高い傾向が見られ、幼若ラットでは成熟ラットよりアクリルアミドの吸収、代謝および排泄が速いことが推定された。

[2, 3-¹⁴C]Acrylamide を雌性ラットに経口投与したとき、血液は全ての時点で高い濃度を示し、投与後 72 時間でも高濃度を示し、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された。

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。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。

尿糞中排泄率や体内分布等から、経口投与された[2, 3-¹⁴C]Acrylamide はラットにおいて速やかに吸収され血流を経て全身に分布し、大半は尿より排泄されることが確認された。

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。

経口投与された[2,3-¹⁴C]Acrylamide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。

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 らの精巣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。WJ. Waddel らのマウス全身マクロオートラジオグラフィ-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。そこで成熟した雌性 SD ラット (14 週齢) および幼若雌性 SD 系ラット (4 週齢) に [2,3-¹⁴C]Acrylamide を用量 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。また同様に [2,3-¹⁴C]Acrylamide を低用量 0.5mg/kg で経

口投与し、体内動態の特徴とその差異などを検討する。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。

また、乳児期での暴露が危惧されているため、授乳中ラットに [2,3-¹⁴C]Acrylamide を投与した時の乳汁移行性を検討し乳仔ラットへの影響を考察する。

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。

使用動物の個体数の削減 (H18/6/1 厚労省課長通達)

高感度 ¹⁴C 放射能検出法の活用

観察時点数の最小限化

の 3 項について留意した。

(参照文献)

- 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 [¹⁴C] 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, 3-¹⁴C]Acrylamide
化学式 : CH₂=CHCONH₂
供給者 : 室町薬品株式会社
性状 : 70%エタノール溶液 (無色透明)
比放射能 : 4 or 5 mCi/mmol (185 MBq/mmol)
濃度 : 0.1 mCi/mL
放射化学的純度 : 99%
入手量 : 750 μCi (27.75 MBq)
保存場所 : 被験物質保管庫 (-20°C)
保存条件 : 冷凍 (-20°C)、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
保存条件 : 常温
取扱上の注意 : 特になし

2. 試験動物

2.1 動物種、系統 : SD 系統雌性ラット、
3 週齢および 13 週齢 (購入時)

微生物レベル : SPF

1.5.1 幼若ラット

購入時週齢 : 3 週齢

微生物レベル : SPF

購入動物数 : 18 匹

投与開始時週齢 : 4 週齢

1.5.2 成獣ラット

購入時週齢 : 13 週齢

微生物レベル : SPF

購入動物数 : 15 匹

投与開始時週齢 : 14 週齢

1.5.3 哺乳ラット (乳仔付き)

購入時週齢 : 13 週齢 (交配時週齢 9 週)

微生物レベル : SPF

購入動物数 : 4 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
收容し、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 : 4 週齢および 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 : 幼若ならびに成獣ラット
は経時血液採取目的で 2 匹づつ、全身オート
ラジオグラフィーでは 1 匹づつ、組織中放射
能濃度測定で 1 匹づつ 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
射能濃度測定の見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 : 35 μCi/0.5mg
ないし 50 μCi/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 を追加し、最終濃

度を調製した。

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：0.5 ないし 2.5mg/kg [放射能用量：35-50 μ 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 μ L の血液を採集した。そのうち 20 μ 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°C、3000rpm、15 分) して血漿を調製し、20 μ 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 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量の割合 (% 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、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 (ハイオニックフロー、パッカード) 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. 乳汁中放射能濃度測定

母獣ラット(2匹)に被験物質を投与後、所定の観察時点に授乳中の乳仔ラットより胃内容物を採取した。乳仔ラットを安楽死させ、胃内容物を約100 μ L採取し、放射能計測用試料とした。計測値から乳汁中放射能濃度を算出した。

10. 試験結果の表現法

放射能濃度を指標として、未変化体換算した薬物換算濃度は以下の式で算出した。

薬物換算濃度 (μ g eq./mL) =

試料中放射能濃度 (dpm/mL)

投与放射能 (dpm) / 投与薬物量 (μ g)

11. 試験実地施設:

株式会社 生体科学研究所

C. 研究結果

1. 尿・糞・呼気中放射能排泄

成獣および幼若ラットに[2,3-¹⁴C]Acrylamideを用量0.5ないし2.5mg/kgで経口投与して尿・糞・呼気中放射能排泄を検討した。

[2,3-¹⁴C]Acrylamideを成獣および幼若ラットに用量0.5ないし2.5mg/kgで経口投与後の尿中放射能排泄率をFig.1に示した。

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、主排泄経路であることが確認された。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%が排泄された。いずれも高い尿中排泄率で吸収率の良いことが確認された。一方、成獣ラットに比べ幼若ラットで尿中排泄率がやや高い傾向が見られた。

[2,3-¹⁴C]Acrylamideを成獣および幼若ラットに用量0.5ないし2.5mg/kgで経口投与後の糞中排泄率をFig.2に示した。

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。成獣および幼若ラットで用量0.5より2.5mg/kgでやや高い傾向が見られた。

[2,3-¹⁴C]Acrylamideを0.5ないし2.5mg/kgで経口投与後の呼気中排泄率をFig.3に示した。

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。成獣および幼若ラットで用量2.5より0.5mg/kgで高い傾向が見られた。一方、成獣ラットに比べ幼若ラットで呼気中排泄率は高い傾向が見られた。

[2,3-¹⁴C]Acrylamideを0.5ないし2.5mg/kgで経口投与後の尿・糞・呼気中排泄率の和、総排泄率をFig.4に示した。

総排泄率は投与後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。成獣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。

2. 血液・血漿中放射能濃度

成獣および幼若ラットに[2,3-¹⁴C]Acrylamideを用量0.5ないし2.5mg/kgで経口投与後の血液・血漿中放射能濃度をFig.5に示した。

血液中放射能濃度は投与10分後から上昇しており、幼若ラットでは投与後1時間(2.6

$\mu\text{g eq/mL}$)で、成獣ラットでは投与後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。減少速度は両用量とも、幼若ラットで成獣ラットより速い傾向が見られた。

血漿中放射能濃度は、投与後30分後に最高値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、それ以降の半減期は成獣ラットと変わらない。

血液に比べ血漿中放射能濃度が低いことから[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. 組織中放射能濃度と半減期

成獣ラットに[2,3- ^{14}C]Acrylamide 2.5mg/kgで経口投与後の組織中放射能濃度をTable 1およびFig. 6 & 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。

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、Table 1に示した24-72時間の濃度変化から計算した終末半減期($T_{1/2}$ 、時間)の大きい臓器は、血液、肺、背部皮膚であった(Table 4)。さらに、坐骨神経、甲状腺、脾臓等が続いた。

幼若ラットに[2,3- ^{14}C]Acrylamide 2.5mg/kgで経口投与後の組織中放射能濃度をTable 2およびFig. 6 & 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認めた。その他のほとんどの観察臓器は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72時間後でも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。

更に、成獣ラットに[2,3- ^{14}C]Acrylamide 2.5mg/kgで経口投与後の組織中放射能濃度を幼若ラットに[2,3- ^{14}C]Acrylamide 2.5mg/kgで経口投与後の組織中放射能濃度で割った値をTable 3に示した。10分から1時間ではあまり差は見られないが、6時間以降では成獣ラットの臓器濃度が高い傾向が見られた。これは24-72時間の濃度変化から計算した終末半減期($T_{1/2}$ 、時間)で成獣ラットが幼若ラットより大きいことにも反映していた(Table 4)。

4. 全身オートラジオグラフィ

[2,3- ^{14}C]Acrylamide 2.5mg/kg 経口投与後30分、6時間、および72時間の幼若ラットおよび成獣ラットの全身オートラジオグラフィ

一を行った。

投与後 30 分の幼若ラット (Fig. 8) および成獣ラット (Fig. 11) 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おり、組織中放射能濃度を反映していることを確認できた。

投与後 6 時間の幼若ラット (Fig. 9) および成獣ラット (Fig. 12) でも組織中放射能濃度と同様の臓器分布濃度を示した。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組織に集中した分布が発見できた。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 時間の幼若ラット (Fig. 10) および成獣ラット (Fig. 13) 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。いずれも血液、眼球の濃度が高く、成獣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。

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. 14 に示した。

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 μ 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 μ 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投与用量に応じた低濃度移行がみられた。

D. 考察

今回、成熟雌性 SD 系ラットに [2, 3-¹⁴C]Acrylamide を 0.5 ないし 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 63-64%、糞中に 7-9%、呼気中に 1.9-3.1% の排泄が認められ、投与後 72 時間までの総回収率は 73-75% 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 69-70%、糞中に 8-9%、呼気中に 3.7-7.5% の排泄率が認められ、総排泄回収率は 83-85% 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。総排泄率で用量 [2, 3-¹⁴C]Acrylamide 2.5 と 0.5mg/kg の差は見られず、一方、成獣ラットに比べて幼若ラットで尿・糞・呼気中の総回収率が高い傾向が見られた。

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、ここでのように呼気にまで分解される長い過程中に危険が潜んでく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% 排泄が見られた K. Hashimoto ら²⁾ (1970) の雄性ラットの場合と同様 ¹⁴CO₂ として 3.1-7.5% のゆっくりした排泄が見られた。呼気中排泄率については、用量 2.5 より 0.5mg/kg で高く、ある種の飽和がみられた。また幼若ラットで成獣ラットより高い傾向が見られた。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

えられるが、定かではない。

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、血液で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 $[2, 3\text{-}^{14}\text{C}]$ Acrylamide は血球成分に強く吸着されることが示された。

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。その他の臓器分布での最高濃度時間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。

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。血液以外では皮膚は、特に背部の皮膚（毛根らしき）に血液と同レベルの濃度を確認した。そこで、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、汗腺もしくは皮脂腺等を経路した排泄が推定される。これらの結果を踏まえ、 $[2, 3\text{-}^{14}\text{C}]$ Acrylamide は投与後 10 分でも肝臓を経て、更に大動・静脈を経てほぼ全身に分布する。

その後も代謝系の臓器に集められ、肝内脈を経て、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。

$[2, 3\text{-}^{14}\text{C}]$ Acrylamide $0.5\text{-}2.5\text{mg/kg}$ 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. 14)、投与した $[2, 3\text{-}^{14}\text{C}]$ Acrylamide 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 $[2, 3\text{-}^{14}\text{C}]$ Acrylamide で乳汁に移行し、乳仔に吸収される可能性も考えられる。

E. 結論

尿糞中排泄率や体内分布等から、用量 $0.5\text{-}2.5\text{mg/kg}$ で経口投与された $[2, 3\text{-}^{14}\text{C}]$ Acrylamide はラットにおいて速やかに吸収され大動・静脈を経て全身に分布し、大半は尿より排泄されることが確認された。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。幼若ラットでは成熟ラットよりアクリルアミドの吸収、代謝および排泄が速いことが推定された。経口投与した $[2, 3\text{-}^{14}\text{C}]$ Acrylamide 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (2005 年度-)

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. 抽出ヒト組織・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. 抽出ヒト組織・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)

6) 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 (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, 3-¹⁴C]Acrylamide 経口投与後の体内動態の特性: 紅林秀雄¹, 南部尚美², 浜井憂子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

7) 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

8) 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、浜井憂

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

9) 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

10) 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

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18-20年度：総合報告書）

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

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：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明らかにするため、18-19年度には発達期のACR暴露について、児動物の感受性および母体を介したACR暴露の程度を検討した。20年度には、春機発動期を含む発育期のACR暴露について検討を行った。発達期暴露ではSD:IGSラットの妊娠～授乳期に最高200ppmの用量でACRを飲水投与し、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組織学的検索を行った。飲水投与との比較のため、一部の児動物には授乳期にACR 50 mg/kg/dayを週3回腹腔内投与した。飲水投与群の母動物および児動物について、それぞれ離乳時（出産後21日）および生後14日に血漿、胃内乳汁中のACR濃度および血球中のACR-ヘモグロビン（Hb）付加体の測定を行った。発育期暴露では、生後21日および7週齢の雄性SD:IGSラットに最高200ppmの用量でACRを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。神経毒性に関して、発達期暴露では、100ppm以上で母動物の神経障害が明らかであったが、児動物には神経毒性作用は確認されず、児動物体内のACR-Hb付加体量は母動物の1/10以下であった。一方、直接腹腔内投与を受けた児動物では成熟動物と同様の神経障害が認められた。これらの結果から、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経乳暴露の程度が低く、児動物に神経障害を生じるには不十分であることが示唆された。発育期暴露では、成熟動物と同様に100ppm以上で神経障害を示し、歩行異常のスコア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。精巣毒性に関しては、発達期暴露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、両群とも精細胞に対する障害作用は確認されず、離乳前はACRの精巣毒性に対する感受性が低い可能性が考えられた。一方、発育期暴露では、ACR摂取量に対して著しく重度で多様な病変が観察され、発育期には成熟動物に比べ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。平成18年度には、胎児期と授乳期を通じた発達期の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。その結果、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ず、母動物の全身状態悪化に伴う乳汁を介したACR暴露の減少が疑われた。19年度には、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。20年度に

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

B-1. 発達期暴露による神経・精巣毒性の評価 (実験 1)

妊娠 10 日目の雌性 SD:IGS ラット 12 匹を、各群 3 匹ずつ 4 群に分け、ACR (Sigma) 0、50、100、200 ppm を離乳 (出産後 21 日) まで飲水投与した。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)。児動物は生後 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 3 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 日で離乳させ、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 週に解剖を行った。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、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、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 (4°C, overnight)、精巣はブアン固定液 (室温, overnight) にて固定し、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、エポキシ包埋後、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。抗体は Anti-synaptophysin rabbit polyclonal antibody (Ab-4, LAB VISION corporation,

$\times 200$ dilution) を用い、ABC 法 (Vector; Elite kit) により DAB 発色を行った。骨格筋については、抗原抗体反応前の抗原賦活化のため、オートクレーブ処置を 120°C、5 分実施した。

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各個体 1 枚の組織写真を撮影し、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、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 $< 3\mu$ m) の数を計測した。小脳分子層においては、12.5 あるいは 20 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。

B-2. 母体を介した ACR 暴露量の検討 (実験 2)

妊娠 6 日目の雌性 SD:IGS ラットを、各群 4 匹ずつ 4 群に分け、ACR 0、25、50、100 ppm を離乳まで飲水投与した。ACR の飲水投与用量は、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 ACR 50 mg/kg/day を週 3 回 (全 9 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°C 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、および腹腔内投与を受けた児動物について、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、(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 (HPLC) による血漿中の ACR の測定、およびガスクロマトグラフ-質量分析法 (GC/MS) による血球中の ACR-ヘモグロビン (Hb) 付加体の測定を行った。

B-3. 発育期暴露による神経・精巣毒性の評価 (実験 3)

発育期曝露群として生後 21 日齢、成熟期曝露群として 7 週齢の雄性 SD:IGS ラットを各群 10 匹ずつ 4 群に分け、ACR 0、50、100、200 ppm を 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。

体重、摂餌量、摂水量、臓器重量、繁殖パラメータ、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。ただし、群数が 3 以下の場合には、各群の分散を確認後、Student あるいは Welch の *t* 検定によって 0 ppm 群との比較を行った。組織学的検索において認められた病変の発生率は Fisher 直接確率検定で、病変のグレードは Mann-Whitney U 検定によって比較した。

(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

C-1. 発達期曝露による神経・精巣毒性の評価 (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 (Fig. 1A)。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 (Fig. 1BC)。妊娠・授乳期間を通じた ACR の平均一日摂餌量は 50、100、200 ppm 群において、それぞれ 9.9 ± 0.5 、 16.7 ± 2.1 、 22.2 mg/kg/day 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 (Fig. 2)。200 ppm 群の母動物 1 例において、出産時に胎児が残存し全身状態が悪化したため、出産後 2 日目に安楽殺した。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有意に低値を示した (Table 1)。離乳時の母動物の体重および臓器重量を Table 2 に示す。母動物の体重は 0 ppm 群 (323.6 g) と比較して、100 ppm では 284.3 g (-12%)、200 ppm では 235.5 g (-27%) と大きく減少していた。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 (Table 3)。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 ACR 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、群間の差は認められなかった。体重は、出生直後より雄では 50 あるいは 100 ppm 以上、雌では 100 ppm 以上において用量依存性に有意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ていった (Fig. 3)。生後 3 週における児動物の体重および臓器重量を Table 4 に示す。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 ACR の用量に伴い増加傾向を示した (Table 5)。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 ACR 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、ACR 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 $<3\mu\text{m}$ の有髓神経線維数がACR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ACR投与による変化は認められなかった (Table 6)。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 (Fig. 4)。生後11週における児動物の体重および臓器重量をTable 7に示す。病理組織学的検索では、いずれの臓器においてもACR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 (Table 6)、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。

C-2. 母体を介したACR暴露量の検討 (実験2)

母動物は、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ACR平均一日摂取量は、25、50、100 ppm群においてそれぞれ 3.72 ± 0.28 、 7.89 ± 1.70 、 $14.56 \pm 2.47 \text{ mg/kg/day}$ 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群に対して有意に高値を示した (Table 8)。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、腹腔内投与を受けた児動物では、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、有意差はないものの100 ppmで減少傾向を示した (Table 9)。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

有意に減少した (Table 10)。腹腔内投与を受け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 (Table 11)。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、腹腔内投与を受けた児動物では、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髓神経線維の増加、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 (Table 12)。飲水投与群の児動物では、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 13)。腹腔内投与を受けた児動物では、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髓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による血漿中のACR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ACRは検出されなかった (検出限界: $1 \mu\text{g/ml}$)。同様に、100 ppm群の児動物の胃内乳汁からもACRは検出されなかった。GC/MSによる血球中のACR-Hb付加体の測定結果をTable 14に示す。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ACR-Hb付加体が検出された。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、個体ごとのACR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。

C-3. 発育期暴露による神経・精巣毒性の評価 (実験3)

発育期曝露群では、2週目以降100 ppm以上で体重増加抑制を示し (Fig. 5A)、200 ppmで摂餌量の減少がみられた (Fig. 5B)。摂水量は、両群とも200 ppmで低値を示した (Fig. 5C)。体重当たりのACR一日平均摂取量をTable 15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を示し、症状の進行および程度は用量に相関していた (Fig. 6)。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。

最終体重および臓器重量を Table 16 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。

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 17 に示す。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 で有意に増加した。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. 7 and Table 18)。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. 8A-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. 8D 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

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 ACR 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、母動物の飲水投与を介した曝露では、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。ACR 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 ACR に対する感受性が低い可能性が考えられたが、離乳前に直接 ACR の腹腔内投与を受けた児動物において、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。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。

血球中の ACR-Hb 付加体は、母動物、児動物とも ACR 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 ACR 濃度が検出限界以下であったことから、母動物の飲水投与を介した曝露では、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 ACR 曝露は成立していたと推測される。胎児期の ACR 投与