

DR ら、U.S. National Center for Toxicological Research)。第 48 回米国トキシコロジー学会 (2009 年 3 月、ボルティモア) における情報交換では、GA のラットにおける発がん性試験においても AA と同様の発がん標的性がみられたとされている (George DR)。しかし、AA 投与による内分泌系への影響、特に長期投与によるデータは未だ乏しく、今後の研究成果が期待される。

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～春機発動期投与による予備実験

妊娠 F344 ラット 12 匹を日本チャールスリバーより購入し、各群 3 匹の 4 群に分けた。出生後の児動物は、雌雄各群 12 例に揃えたが、雌

雄の出生児数が均等でなかった群については、動物数を雌雄合わせて 24 匹とした。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)、10、20 及び 40 ppm 濃度で飲料水に混じて自由摂取させた。離乳後の母動物はエーテル麻酔下で屠殺した。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 (Johnson KA et al., 1986; Friedman MA et al., 1994)。実験期間中は、一般状態を毎日観察し、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を行った。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、膀胱、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮、膈、乳腺、皮膚、リンパ節、胸骨、大腿骨 (含骨髓)、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、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、対照群及び 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。

上記予備実験において、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、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。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。離乳後の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～春機発動期投与による予備実験で心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。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実験

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 40 ppm 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。摘出臓器、組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本作製、病理組織学的解析を実施した。なお、次の式により、触診及び剖検時に測定した腫瘍(腫瘍)の大きさから体積を計算した。

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

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。

C. 研究結果

(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 ($p < 0.05$, 0.01) 低値を示した。摂餌量及び飲水量に AA 投与による明らかな影響は認められず、飲水量より算出した AA の 10、20 及び 40 ppm 群における AA 摂取量は、雄では各 1.0、2.1 及び 4.4 mg/kg 体重/日、雌では各 1.2、2.5 及び 4.9 mg/kg 体重/日であった。剖検時の臓器重量については、雄では AA 投与による影響はみられなかったが、雌の 40 ppm 群において、対照群と比し有意な甲状腺 ($p < 0.01$) 及び脾臓 ($p < 0.05$) 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、対照群と比し 40 ppm 群で有意に ($p < 0.01$) 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 群で有意に ($p < 0.05$) 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有意に ($p < 0.05$) 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 ($p < 0.01$, 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。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。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。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の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、80 ppm 群において低値傾向を示し、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。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有意な ($p < 0.05, 0.01$) 低値を示した。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ず、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 (Table 1, 2)。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 (Table 1)。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 (Table 1, 2)。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 (Table 1)。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 (Table 2)。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。

D. 考察

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、飲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、飲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 40ppm 群において精巣の精細管萎縮及び精巣上体における剥離精上皮の発生頻度が、対照群と比して有意に増加した。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 H 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も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 誘発発がんに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、摂餌量及び飲水量が低値傾向を示したが、飲水量より算出した平均 AA 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有意な低値がみられたが、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 の肺発がんには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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ota, Y., Hasumura, M., Okamura, M., Takahashi, A., Ueda, M., Onodera, H., Imai, T., Mitsumori, K., Hirose, M.: Chronic toxicity and carcinogenicity of dietary administered ammonium sulfate in F344 rats. Food Chem. Toxicol., 44, 17-27 (2006)
- (2) Takizawa, T., Imai, T., Ueda, M., Onodera, H., Hirose, M.: Comparison of enhancing effects of different goitrogen treatments in combination with β -estradiol-3-benzoate for establishing a rat two-stage thyroid carcinogenesis model to detect modifying effects of estrogenic compounds. Cancer Sci., 97, 25-31 (2006)
- (3) Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y.M., Hirose, M.: A new medium-term rat colon bioassay applying neoplastic lesions as endpoints for detection of carcinogenesis modifiers-validation with known modifiers. Cancer Lett., 232, 272-8 (2006)
- (4) Imai, T., Onose, J., Hasumura, M., Takizawa, T., Hirose, M.: Indomethacin induces small intestinal damage and inhibits amitrole-associated thyroid carcinogenesis in rats initiated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. Toxicol. Lett., 164, 71-80 (2006)
- (5) Cho, Y.M., Onodera, H., Ueda, M., Imai, T., Hirose, M.: A 13-week subchronic toxicity study of dietary administered morin in F344 rats. Food Chem. Toxicol., 44, 891-897 (2006)
- (6) Cho, Y.M., Imai, T., Hasumura, M., Hirose, M.: Lack of enhancement of susceptibility to mammary and thyroid

- carcinogenesis in rats exposed to DMBA and DHPN following prepubertal iodine deficiency. *Cancer Sci.*, 97, 1031-1036 (2006)
- (7) 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)
- (8) 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)
- (9) 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 β -catenin accumulation for the onset of colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 28, 2199-2206 (2007)
- (10) 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*-butyl-phenyl)-benzotriazole in rats. *Drug Chem. Toxicol.*, 30, 327-341 (2007)
- (11) 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.*, 36, 459-464 (2008)
- (12) Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Ueda, M., Ozeki, Y., 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.*, 46, 2184-2189 (2008)
- (13) 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.*, 46, 2224-2229 (2008)
- (14) 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 rats. *Drug Chem. Toxicol.*, 31, 383-398 (2008)
- (15) Takasuka, T., Takahashi, M., Hori, Y., Kitahashi, T., Iigo, M., Imai, T., Yoshimi, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Promotion of mouse two-stage skin carcinogenesis by diacylglycerol-rich edible oil. *Cancer Lett.* 275, 150-157 (2009)
- (16) Imai, T., Takami, S., Cho, Y.M., Hirose, M., Nishikawa, A.: Modifying effects of prepubertal exposure to potassium

perchlorate and tetrabromobisphenol A on susceptibility to *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine- and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced carcinogenesis in rats.

Toxicol. Lett. 185, 160-167 (2009)

- (17) Ota, Y., Imai, T., Onose, J., Takami, S., Cho, Y.M., Hirose, M., Nishikawa, A.: A 55-week chronic toxicity study of dietary administered kojic acid in male F344 rats. J. Toxicol. Sci. (In press)
- (18) 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)

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, Y.M., Hirose, M., Nishikawa, A.: A 12-week toxicological study of orally administered acrylamide in juvenile rats. 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2008. 3)
- (3) 高見成昭、今井俊夫、曹永晩、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)
- (4) 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 Annual Meeting of the Society of Toxicology (2009. 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) 該当なし。

Table 1

Principal histopathological findings for male rats administered AA followed by MNU/SDM treatment

Organs	Findings	Groups						
		No. of animals						
		0 ppm (control)	20 ppm	40 ppm	80 ppm	0 ppm + SDM	40 ppm + SDM	
		23	23	21	23	23	20	
Thyroid								
	Focal hyperplasia	2 (9)	1 (4)	2 (10)	5 (22)	17 (74) ***	14 (70) ***	
	Follicular adenoma	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	10 (43) ***	4 (20) *	
	Follicular carcinoma	0 (0)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	1 (4)	3 (15)	
	Adenoma + Carcinoma	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (4)	10 (43) ***	7 (35) **	
Mammary gland								
	Fibroadenoma	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	
Testis/Epididymis								
	Mesothelioma	10 (43)	5 (22)	7 (33)	10 (43)	5 (22)	5 (25)	
Spinal cord								
	Malignant meningioma	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Malignant astrocytoma	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	
Pituitary								
	Adenoma	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	
Oral cavity								
	Squamous cell hyperplasia	2 (9)	3 (13)	2 (10)	3 (13)	8 (35) *	3 (15)	
	Papilloma	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

* ** ***: Significantly different from the control values at $P < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

Table 2

Principal histopathological findings for male rats administered AA followed by MNU/SDM treatment

Organs	Findings	Groups				No. of animals				0 ppm + SDM				40 ppm + SDM											
		0 ppm (control)				20 ppm				40 ppm				80 ppm				0 ppm + SDM				40 ppm + SDM			
		22				24				24				22				24				19			
Thyroid	Focal hyperplasia	0 (0)				0 (0)				1 (4)				0 (0)				14 (58) ***				12 (63) ***			
	Follicular adenoma	0 (0)				0 (0)				0 (0)				0 (0)				2 (8)				4 (21) *			
	Follicular carcinoma	0 (0)				0 (0)				1 (4)				0 (0)				2 (8)				1 (5)			
	Adenoma + Carcinoma	0 (0)				0 (0)				1 (4)				0 (0)				4 (17)				4 (21) *			
Mammary gland	Fibroadenoma	0 (0)				1 (4)				0 (0)				1 (5)				1 (4)				0 (0)			
	Adenocarcinoma	9 (41)				9 (38)				7 (29)				8 (36)				16 (67)				7 (37)			
Brain	Malignant astrocytoma	0 (0)				1 (4)				0 (0)				0 (0)				0 (0)				1 (5)			
Spinal cord	Oligodendroglioma	0 (0)				0 (0)				0 (0)				1 (5)				0 (0)				0 (0)			
Pituitary	Focal hyperplasia	0 (0)				0 (0)				0 (0)				0 (0)				0 (0)				1 (5)			
Uterus	Cystic endometrial hyperplasia	4 (18)				3 (13)				3 (13)				4 (18)				4 (17)				4 (21)			
	Endometrial stromal polyp	1 (5)				3 (13)				1 (4)				1 (5)				4 (17)				1 (5)			
	Focal glandular hyperplasia	0 (0)				2 (8)				2 (8)				1 (5)				2 (8)				4 (21) *			
	Endometrial adenoma	0 (0)				0 (0)				0 (0)				0 (0)				1 (4)				0 (0)			
Clitoral gland	Adenoma	2 (9)				1 (4)				0 (0)				0 (0)				2 (8)				0 (0)			
	Carcinoma	2 (9)				1 (4)				2 (8)				1 (5)				1 (4)				1 (5)			
Oral cavity	Squamous cell hyperplasia	0 (0)				1 (4)				4 (17)				2 (9)				2 (8)				2 (11)			

*, ***, Significantly different from the control values at $P < 0.05$ and 0.001 , respectively.

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

総合分担研究報告書

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

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

安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室

小山直己 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室

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。特に、スナック菓子等に比較的多く含まれることが報告されて以来、小児への影響が懸念されている。AAは齧歯類動物に強い発がん性示す。AAは薬物代謝CYP2E1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。CYP2E1は新生時期と成熟期では、活性に差があることが知られていることから、小児と成人ではその発がんリスクの程度が異なることが考えられる。本研究ではCYP2E1のAAの遺伝毒性発現への関与と、小児と成人でのAAの遺伝毒性感受性の差を明らかにした。

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。また、CYP2E1を高発現するトランスジェニックヒトh2E1v2を用いてもAAによる突然変異、小核の誘発は認められなかった。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。ラットS9、ヒトS9を用いて試験しても突然変異の誘発は認められなかったが、わずかにDNAアダクトの生成が確認された。CYP2E1以外の責任酵素の同定が待たれる。

ライフステージの違いによるAAの遺伝毒性感受性の差を検討する目的で、3(幼若)、11(成熟)週齢の各群のトランスジェニック雄ラット(gpt delta F344、またはSDラット)にAAを20~80 ppmまたは50~200 ppmを28日間飲水投与し、各種臓器における遺伝毒性試験[突然変異(肝臓、精巣)、小核(末梢血、骨髓、精巣)、コメット(肝臓、精巣)]を実施した。また、甲状腺、乳腺、肝臓、精巣でのDNAアダクトも測定した。成熟、および幼若ラットでは末梢血もしくは骨髓での小核の用量依存的な増加と、肝臓でのコメット試験によるDNA損傷が確認されたが、成熟、および幼若ラットでこれら誘発性に顕著な差は認められなかった。また、肝臓でのgptでの突然変異は成熟、幼若ラット共に誘発は観察されなかった。一方、

精巣での gpt の突然変異は幼若ラットのみで観察された。精巣においてはコメット試験、小核試験でも幼若ラットで高い感受性が観察された。DNA アダクトに関しては、肝臓、乳腺、精巣で用量依存的な蓄積が認められ、特に精巣では幼若ラットで成熟ラットの 5 倍以上ものアダクトの蓄積を認めた。これらのことから、特に精巣に関してアダクトの蓄積量と相関する幼若ラットでの高い遺伝毒性感受性が明らかとなった。

キーワード ; アクリルアミド、遺伝毒性、DNA アダクト、精巣、小児影響

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から、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となり、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を示した。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。

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、AA を *in vitro* で代謝活性化

遺伝毒性を発現させた報告はない。本研究ではラット、ヒト S9、高代謝活性ヒトマイクロゾーム分画を用いた細胞外代謝活性化法、および CYP2E1 を高発現するサルモネラ菌、ヒト培養細胞を用いた細胞内代謝活性化法を用いて CYP2E1 の AA の遺伝毒性発現への関与を明らかにした。

また、CYP2E1 の酵素活性は新生時期と成熟期で差があることが知られていることから、小児と成人ではその発がんリスクの程度が異なることが考えられる。そのため、*in vivo* での AA の遺伝毒性発現の特徴と、ライフステージにおけるそれら違いを検討した。3 (幼若)、11(成熟)週齢の gpt デルタトランスジェニックラット(F443)、と SD ラットを用いて多臓器(末梢血、骨髄、肝臓、精巣)マルチエンドポイント(gpt 遺伝子突然変異試験、小核試験、コメット試験)の遺伝毒性試験を行った。また、AA の発がん標的組織と考えられる甲状腺、乳腺、および遺伝毒性試験の対象となる肝臓、精巣での DNA アダクトの定量を行った。

B. 研究方法

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。一時間 37℃ 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。

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 つの代謝酵素 (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 Dr. Crespi から供与された。TK6 細胞は、ハーバード大学衛生学部ジョン・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 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。

3) 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 (雄) および SD ラ

ット (雄) を日本エスエルシー(株)より購入し、馴化後 3 週 (幼若)、および 11 週齢 (成熟) の動物を使用した。

ii) 投与：gpt ラットは 4 群各 5 匹ずつに分け、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。

SD ラットを 4 群各 10 匹ずつに分けた。それぞれの群に蒸留水で調整した 0、50、100、200ppm 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 (gpt ラットのみ)：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、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。

4) DNA アダクトの定量

AA による主たる DNA アダクトである 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)

本研究で特に倫理上問題になる実験はない。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) 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 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) ヒト培養細胞による TK 遺伝子突然変異試験、小核試験

ヒトリンパ芽細胞株 TK6 を用いて AA を試験した。試験は、直説法、およびラット 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見られなかった。同様の試験を代謝物の GA で行った。GA は顕著に遺伝毒性を示したが、S9 はその遺伝毒性を増強も、誘発もしなかった。

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、遺伝毒性 (遺伝子突然変異、小核) に大きな差はなかった。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 N7-GA-Gua のアダクトを測定した (図 1)。

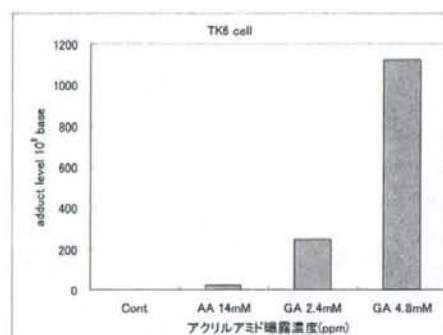


図 1

AA の高濃度処理 (14mM) で TK6 に僅かなアダクトの生成が観察された。GA 処理では低用量から用量依存的な多量のアダクトの生成が観察された。MCL-5 細胞では GA、AA 処理でアダクトの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 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。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。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損傷が確認されたが、幼若(3W)と成熟(11W)で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、幼若ラットのみにて最高用量で統計的に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。精巣に関しては最高用量のみ(80ppm)で幼若ラットで突然変異の誘発に有意差が認められた。

AAの主たるDNAアダクトであるN7-GA-GuaについてLC/MS/MSを用いて、肝臓、甲状腺、乳腺、精巣で解析を行った(図2)。肝臓、乳腺、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アダクトの生成が観察された。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倍以上ものアダクトの蓄積が観察された。

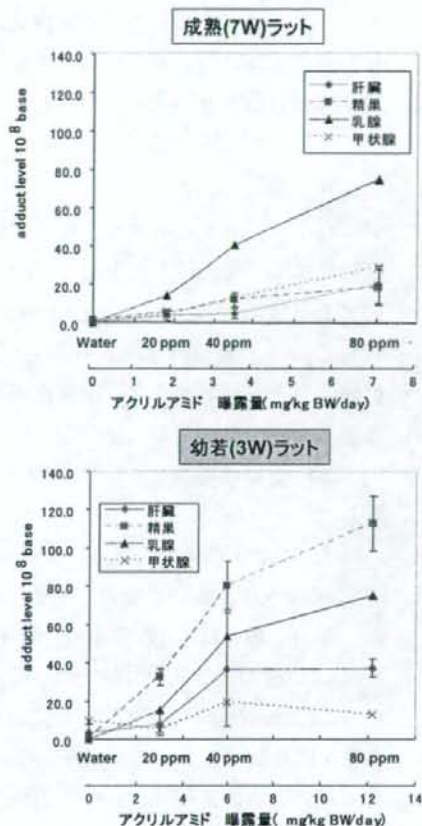


図2

4) SDラットでのin vivo試験

SDラットのそれぞれの群に蒸留水で調整した0、50、100、200ppm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。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。

末梢血での小核は最高用量でわずかに増加したが、幼若、成熟ラットで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。結果は AA に対する遺伝毒性に対して、特に幼若マウスで感受性が高いことが示された。

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。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 が CYP2E1 で代謝を受け GA に変換され、毒性を発現すると言う説を支持するものである。

しかしながら、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、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、ヒト培養細胞を用いた研究から得られた。すなわち、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 (h2E1v2、MCL-5) を用いて、AA および GA の遺伝毒性 (小核誘発能、TK 遺伝子突然変異誘発頻度) 試験を実施した。CYP2E1 を発現する h2E1v2 細胞は、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。しかしながら、CYP2E1 によって代謝活性化される DMN を暴露したところ、h2E1v2 細胞は、細胞毒性、小核誘発、遺伝子突然変異にいずれも AHH-1 よりも強い反応性を示した。これらの結果は、h2E1v2 細胞は間違いなく CYP2E1 高発現細胞であるのも係わらず、AA に対しては反応しないことを示す。この理由としては、a) AA は従来考えられてきた CYP2E1 以外の代謝酵素により代謝される。b) 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 アダクトが生成されたことは、細胞内に GA を代謝させる要因があることを示唆しており、今後これら因子の解明が必要である。

MCL-5 細胞は CYP2E1 だけでなく、CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、mEpoxyde hydrolase を高発現するトランスジェニック細胞である。

本来この細胞は多くの基質に反応するスクリーニング細胞として開発されたが、AAに関しては毒性を示さず、またDANアダクトの生成も観察されなかった。GAはmEpoxide hydrolaseによって分解する可能性があり、本細胞の利用性の難しさを示すものである。

ManjanathaはトランスジェニックBigBlueマウスを用いてAAとGAの突然変異の検討を行った。雄雌ラットそれぞれに100、500ppmの飲水で4週間間投与し、肝臓での突然変異を見たところ、両化合物とも有意に上昇し、むしろAAでその誘発率が高いと報告している。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のトランスポ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このManjanathaらの報告に基づいて行った。しかしながら、100、500ppmの飲水投与は非常に毒性が強く、特に幼若ラットでの生存性に問題があると判断したため、20-200ppmの低濃度領域で試験を行った。尚、100ppmの飲水投与でのAA摂取量は10mg/kg/dayに相当し、これはこれまでのAAでの毒性試験の1/10程度の量に相当する。全ての試験動物について生育に伴う顕著な体重の抑制、飲水量の変化は認められなかった。また、28日後の剖検においても顕著な病理的異常は認められなかった。

骨髄、末梢血に関しては、予想通り顕著な小核誘発は認められなかった。Manjanathaらの報告でも、100ppmでは骨髄小核の誘発は認められていない。我々のgptラットを用いた試験では統計的には幼若ラットでのみ末梢血、骨髄で有意差が認められた。また、SDラットでは両者で有意差が認められ

た。従って、造血系に対してAAは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2回の実験で用量依存的な陽性反応を示した。一般にコメット試験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言われているが、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わかった。gpt突然変異に関しては全ての用量で無処理群と比較して突然変異の増加は観察されなかった。Manjanathaの報告でも100ppmでは突然変異の誘発は顕著でなく、我々の80ppmでは突然変異の誘発がないことはこのことを支持するものである。

精巣に関しては、SDラットの実験で、成熟、幼若ラットと共に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ラットでの突然変異でも80ppmの最高用量において両者で突然変異の増加が観察された。また、この増加は幼若ラットのみで有意であった。これらの結果は、少なくとも精巣に関しては幼若ラットがAAの遺伝毒性に強い感受性を持つことを示している。

DNAアダクト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アダクト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、このアダクトにのみ注目して測定した。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80ppmで120/10⁸bpの増加量であ

った。これはバックグランドレベルの20倍で成熟ラットの場合と比較しても6倍以上高い。

これまで、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ともアダクトを形成する。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、それがアダクトの生成と相関するものと考えられる。さらに今回、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不明であり、今後の解明が待たれるが、少なくともAAの生殖細胞に対する遺伝毒性感受性には年齢が関係しており、幼年期でのAAの過剰摂取に関しては、注意が必要であると考えられる。

また、乳腺でも高いDNAアダクトが観察された。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

AAは薬物代謝酵素CYP2E1によってGAに代謝され、これが遺伝毒性を発現すると考えられるが、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た試験の結果から、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。これらの結果は、AAの代謝にはCYP2E1以外の薬物代謝酵素の関与や、CYP2E1とそ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を示して

いる。AAは標準的な遺伝毒性試験とその最高用量(10mM)までにおいて顕著な遺伝毒性を示さないことからin vivo特異的遺伝毒性物質といえる。

低用量(20-100ppm)のアクリルアミドを飲水で成熟、および幼若ラットに投与し、各種遺伝毒性と、DNAアダクト形成を比較し、ライフステージの違いによるAAの遺伝毒性感受性の差を検討したところ、多くの組織で、ライフステージの違いによる差は認められなかったのに対して、精巣に関しては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アダクト量の増加も観察された。特にアダクト量は、幼若ラットで成熟ラットの5倍以上もの蓄積を認めた。本来、AAには生殖細胞に対する強い遺伝毒性が報告されている。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の遺伝毒性リスクを考察すべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表

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)

Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil

- sensitivity in 3 cell lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)
- Umebayashi, Y., Honma, M., Abe, T., Ryuto, H., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., Yatagai, F. Mutation induction after low-dose carbon-ion beam irradiation of frozen human cultured cells. *Biological Sci. in Space*, 19, 237-241 (2006)
- Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat. Res.*, 627, 31-35 (2007)
- Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. L.F., Thakur, A.K., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat. Res.*, 627, 36-40 (2007)
- Ku, W.W., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, P.J., Hakura, A., Honma, M., Martus, H.-J., Obach, R.S., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing—Metabolic considerations. *Mutat. Res.*, 627, 59-77 (2007)
- Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3'-Azido-3'-deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, in press (2007)
- Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Sakamoto, H., and Hayashi, M. Non-homologous end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells. *DNA Repair*, 6, 781-188 (2007)
- Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat. Res.*, 619, 113-123 (2007)
- Newwirth, E., Honma, M., and Grossovsky, A., Interchromosomal crossover in human cell is associated with long gene conversion tracts. *Mol. Cell. Biol.*, 27, 5261-5274 (2007)
- Yatagai, F., Umebayashi, Y., Suzuki, M., Abe, T., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., and Honma, M. Influence of low-dose and low-dose-rate ionizing

radiation on mutation induction in human cells. *Advan. Space Res.*, 40, 470-473 (2007)

Yatagai, F., Umebayashi, Y., Honma, M., Sugawara, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F. Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008)

Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi, T., Hayashi, M., and Honma, M. Mismatch properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA Adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases. *J Mol Biol*, 377, 1015-1023 (2008)

Yatagai, F., Suzuki, M., Ishioka, N., Ohmori, H., Honma, M. Repair of I-SceI Induced DSB at a specific site of chromosome in human cells: influence of low-dose, low-dose-rate gamma-rays. *Radiat Environ Biophys* 47, 439-44 (2008)

Nohmi, T., Toyoda-Hokaiwado, N., Yamada, M., Masumura, K., Honma, M., and Fukushima, S. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds. *Genes and Environment*, 30, 101-107 (2008)

本間正充；遺伝毒性物質に閾値はあるのか？*ファルマシア* 45, 143-148 (2009)

2. 学会発表

本間正充 *In vitro* コメット試験は遺伝毒性のエビデンスになりうるか？日本環境変異原学会 MMS 研究会第 49 回定例会 (2006.5)

Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Error-prone and error-free nonhomologous end-joining for repairing DNA double strand breaks in human cells. 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2006.7)

Honma M., Yamakage K. *In vitro* Comet assay-A possible candidate as a member of the standard test battery. JaCVAM/MMS Joint Seminar -Pros & Cons of Comet Assay- (2006.8)

本間正充、高島良生、安井学、谷田貝文夫、鈴木雅雄、林 真 低放射線による相同組換え修飾効果 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

谷田貝文夫、梅林志浩、本間正充、阿部知子、鈴木ひろみ、島津徹、石岡憲昭、岩本正哉 ISS 利用実験計画：宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、安井学、林 真、本間正充 ヒト細胞に誘導された DNA 二重鎖切断修復とその細胞周期依存性 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

Kohara A., Ozawa Y., Ohtani A., Shioda S., Takeuchi K., Morita K., Hirano T., Honma M., Suzuki T., Masui T., Mizusawa H. High