

2009 39046 A

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

食品中成分から生成されるアクリルアミドのリスク管理対策に関する研究

平成 21 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成 22 (2010) 年 4 月

様式A (7)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成 22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 ト オ  
研究者 氏 名 今井 俊夫  
(所属研究機関 国立がんセンター研究所)

平成 21年度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) : 食品中成分から生成されるアクリルアミドのリスク管理対策に関する研究  
(H21-食品一般-012)

国庫補助金精算所要額 : 金 17,862,000 円也 (うち間接経費 4,122,000 円)

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (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括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添4のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況  
(総括研究報告書、分担研究報告書の中に、書式に従って記入した。)
7. 健康危険情報  
(総括研究報告書、分担研究報告書の中に、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

食品中成分から生成されるアクリルアミドのリスク管理対策に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成 22 (2010) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
食品中成分から生成されるアクリルアミドのリスク管理対策に関する研究-----	1
今井俊夫	
II. 分担研究報告	
1. アクリルアミドの発がん性の種差に関する研究 -----	11
今井俊夫	
2. アクリルアミドの発がん過程への酸化的DNA損傷を含む修飾塩基の関与 -----	25
梅村隆志	
3. ライフステージを勘案したアクリルアミドの長期間低暴露の遺伝毒性影響に関する研究 -	35
本間正充	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	
1. Increased H- <i>ras</i> mutation frequency in mammary tumors of rats initiated with <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea (MNU) and treated with acrylamide.	
2. Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems.	

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

平成 21 年度 総括研究報告書

食品中成分から生成されるアクリルアミドのリスク管理対策に関する研究

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

加工食品中に種々の濃度で含まれているアクリルアミド (AA) は遺伝毒性発がん物質あり、そのヒトへのリスクが懸念されている。一方、AA の発がん機序として、実験的には遺伝毒性のほか内分泌環境の変化や酸化的ストレスが関与している可能性が指摘され、疫学的にも食品からの AA 摂取量と子宮内膜がん発生率との関連性を示す報告がみられ内分泌環境の関与が示唆される。また、AA の職業暴露と膵がんとの関連性が否定できないとする報告があるが、マウス、ラットを用いた発がん性試験では、膵管がんの発生はみられない。従って、動物における AA の発がん機序およびヒトへの外挿性について更に詳細な検討が必要と考えられる。そこで本研究では、AA の発がん性の種差 [今井]、AA による酸化的 DNA 損傷の発がんへの関与 [梅村]、および AA の遺伝毒性発現の機序 [本間] について解析し、ヒトにおける AA のリスク管理対策に寄与することを目的としている。本年度の成果として、[今井] 膵管発がん感受性を示すハムスターと非感受性のマウス、ラットにおける発がん標的臓器を比較検討するため、ハムスターを用いた AA の飲水投与による発がん性試験を開始した。その予備試験では、ハムスターにおける AA の精巣毒性や血液毒性に対する感受性がラットに比して低いことを明らかにした。[梅村] *gpt delta* マウスを用いた AA の 4 週間投与実験により、発がん標的である肺では変異原性を示すが、その発現機序に酸化的ストレスの関与の可能性は低く、変異原性を示すとされる肝臓では酸化的 DNA 損傷が誘発され、臓器特異性のあることを示した。[本間] 幼若及び成熟ラットに AA を 4 週間投与した際の赤血球での *pig-A* 突然変異、精巣での小核、DNA 付加体生成量などを比較し、幼若ラットの精巣における小核発生数と DNA 付加体生成量が成熟ラットに比し高値を示したことから、両者に関連性のあることが示唆された。

分担研究者

- 1) 今井 俊夫 国立がんセンター研究所・実験動物管理室・室長
- 2) 梅村 隆志 国立医薬品食品衛生研究所・病理部・室長
- 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

加工食品中に種々の濃度で含まれているアクリルアミド (AA) 及びその活性代謝物のグリシドアミド (GA) は、*in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験で陽性を示す。また、ラットを用いた AA あるいは GA の飲水投与による発がん性試験において腹膜中皮、乳腺、甲状腺、副腎、子宮などに、マウスでは肺、前胃、乳腺などに腫瘍性病変を誘発すること

から、遺伝毒性発がん物質としてヒトへのリスクが懸念されている。また、AA あるいは GA の発がん標的臓器に内分泌・生殖器官が含まれていることから、発がん機序として遺伝毒性のほか、内分泌環境に対する影響が関与している可能性が指摘されている。更に、AA は glutathion-S-transferase により酸化型グルタチオンと結合し、あるいは直接的に還元型グルタチオン (GSH) と結合して抗酸化能を有する細胞内 GSH を枯渇させ、ラットの肝臓、腎臓および精巣において脂質過酸化を誘導するとの報告があり (Yosef MI ら、2006)、酸化的ストレスが発がんに関与している疑いもある。

食品からの AA 摂取量と発がんに関する疫学調査が欧米にて広く実施され、それらの結果は概ね陰性であるが、喫煙経験がなく AA 摂取量の多い女性では、AA 摂取量の少ない女性に比し、子宮内膜がんや卵巣がん等の発生率が高いとする報告もみられ (Hogervorst JG ら、2007)、内分泌環境の関与が示唆される。また、職業暴露については膵がんとの関連性が否定できないとする報告がみられるが (Swaen GM ら、2007)、マウス、ラットを用いた発がん性試験では、膵管がんの発生はみられない。従って、AA の動物における発がん機序およびヒトへの外挿性について更に詳細な検討が必要と考えられる。

本研究では、(1) 疫学研究において AA の発がん標的の一つとして懸念される膵臓に着目し、ニトロソ化合物の BOP に対し膵管がん感受性を示すハムスターを用いた AA の発がん性試験を実施し、既に報告されている非感受性のマウス、ラットにおける結果との比較により発がん性に対する種差を検討する。更に、ラットを用いた AA の長期投与実験を行い、AA の発がん標的臓器における細胞動態及び内分泌環境に対する影響と発生した腫瘍にお

ける遺伝子変異を検索することにより、発がん機序の解析を行う。(2) AA の発がん過程に対する酸化的 DNA 損傷および DNA 付加体形成の関連性を明らかにするため、*gpt delta* マウスを用いて、AA の発がん標的である肺、肝臓と非標的である腎臓での遺伝子突然変異、8-hydroxyguanosine (8-OHdG) および DNA 付加体量を比較検討する。(3) 幼若および成熟ラットに AA を投与し、多臓器 (末梢血、骨髄、肝臓、精巣) マルチエンドポイント (*pig-A* 遺伝子突然変異、小核、コメット) の遺伝毒性試験を行うことにより、AA の遺伝毒性の発現機序を明らかにする。以上により、ヒトにおける AA のリスク管理対策に寄与するデータを構築することを目的としている。

## B. 研究方法

(1) アクリルアミドの発がん性の種差に関する研究 [今井]

i) ハムスターを用いた発がん性予備試験

シリアンハムスター (5 週齢、雌雄各 36 匹) を日本エスエルシーより購入し、1 週間の馴化飼育後、6 週齢で実験に供した。体重に基づく層別化法により各群 9 匹の 4 群に分けた。AA の投与用量は、本予備試験に先立って実施した 2 週間投与実験の結果をもとに 0 (対照)、20、30 及び 50 mg/kg 体重/日とし、飲水に混じて 13 週間投与した。実験期間中、一般状態及び死亡動物の有無を毎日 (週 5 日) 観察し、体重、摂餌量及び飲水量を 1 週間に 1 回測定した。投与終了時には、エーテル深麻酔下にて採血した後、脱血により安楽殺した。血液学的検査および血清生化学検査については、下記の項目について測定した。

血液学的検査：赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数及び白血球数

血清生化学的検査：総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、トリグリセライド、総コレステロール、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ、アラニントランスアミナーゼ、アルカリホスファターゼ (ALP)、尿素窒素、カルシウム、無機リン、ナトリウム、カリウム及びクロール

剖検時には、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓及び精巣を摘出し、重量を測定した。また、これらの臓器に加え下記の臓器・組織を摘出した。

眼球及びその附属器、気管、大動脈、唾液腺、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、膵臓、膀胱、精囊、前立腺、精巣上体、卵巣、子宮、陰、坐骨神経、三叉神経、骨格筋、皮膚、乳腺、脊髄、リンパ節、骨及び骨髄

摘出した臓器・組織については、常法に従ってパラフィン包埋切片を作製、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、坐骨神経については更に NFP-LFB 染色を実施し、全例について病理組織学的検査を行った。

#### ii) ハムスターを用いた発がん性試験

シリアンハムスター (5 週齢、雌雄各 90 匹) を日本エスエルシーより購入し、1 週間の馴化飼育後、6 週齢で実験に供した。体重に基づく層別化法により各群 30 匹の 3 群に分けた。AA の投与用量は、予備試験の結果をもとに雌雄ともに 0 (対照)、10 及び 20 mg/kg 体重とし、飲水に混じて投与している。現在、雄については 28 週間、雌については 22 週間が経過した。実験期間中、一般状態及び死亡動物の有無を毎日 (週 5 日) 観察し、体重及び摂餌量は投与 26 週目までは週 1 回、その後は 4 週間に 1 回測定している。飲水は 1 週間に 1 回交換し、その都度、飲水量を測定している。

#### iii) ラットを用いた発がん機序解析実験

F344 ラット (5 週齢、雌 90 匹) を日本チャールス・リバーより購入し、1 週間の馴化飼育後、6 週齢で実験に供した。体重に基づく層別化法により各群 30 匹の 3 群に分けた。AA の投与用量は、既に報告されている F344 ラットを用いた 2 年間の発がん性試験における乳腺をはじめとする諸臓器・組織での発がん用量 (Friedman MA ら、1995) をもとに 0 (対照)、1.5 及び 3.0 mg/kg 体重/日とし、飲水に混じて投与している。現在、50 週間が経過した。実験期間中、一般状態及び死亡動物の有無を毎日 (週 5 日) 観察し、体重及び摂餌量は投与 13 週目までは週 1 回、その後は 4 週間に 1 回測定している。飲水は 1 週間に 1 回交換し、その都度、飲水量を測定している。

#### (2) アクリルアミドの発がん過程への酸化的 DNA 損傷を含む修飾塩基の関与 [梅村]

動物は国立医薬品食品衛生研究所・病理部で系統維持している C57BL/6 *gpt delta* マウス (6 週齢、雄 40 匹) を用いた。

AA の濃度は BigBlue マウスの肝臓で *cII* 遺伝子突然変異頻度の上昇が認められた 500 ppm を最高用量とし (Manjanatha MG ら、2006)、公比 2 で中用量を 250 ppm、低用量を 125 ppm とし、飲水に混じて 4 週間自由に摂取させた。0 ppm 群を対照とした。飲水は週 1 回交換した。実験期間中、一般状態を毎日観察し、体重および飲水量は週 1 回測定した。投与終了時には、動物をエーテル麻酔下にて放血致死させ、肺、肝臓および腎臓を採取し、重量を測定した。8-OHdG 測定および *gpt* 及び *Spi* assay 用のサンプルは液体窒素により凍結し、測定まで -80°C で保存した。

#### i) 8-OHdG の測定

肺、肝臓および腎臓の DNA 中 8-OHdG の測定は Nakae (Nakae et al., Cancer Lett., 1995) らの方法を参考にした。8-OHdG 値は 8-OHdG /

10<sup>5</sup>dG 量として算出した。

ii) *gpt* 及び Spi<sup>-</sup>アッセイ

肺から採取したゲノム DNA と Transpack (Stratagene) を用いて、λ フェージの *in vitro* パッケージング反応を行い、ゲノム DNA から λ EG10DNA をフェージ粒子として回収した。*gpt assay* では回収したフェージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、フェージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総フェージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総フェージ数で除して *gpt* 変異頻度 (MF) を算出した。また、6-TG 耐性コロニーの *gpt* 遺伝子配列を決定して変異スペクトラムを同定した。

Spi<sup>-</sup>欠失変異の検出では、フェージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA (P2) 株) に感染させ、Spi<sup>-</sup>プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の Spi<sup>-</sup>プラークを検出した。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 フェージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の Spi<sup>-</sup>プラーク数を回収した総プラーク数で除して *red/gam* 遺伝子突然変異頻度を算出した。

(3) ライフステージを勘案したアクリルアミドの長期間低暴露の遺伝毒性影響に関する研

究 [本間]

SD ラット (雄 40 匹) を日本エスエルシーより購入し、馴化後、幼若期 (3 週齢) あるいは成熟期 (11 週齢) に AA の投与を開始した。各群 10 匹とし、0 (対照)、50、100、200 ppm の AA を 28 日間飲水に混じて投与した。

i) 小核試験

最終投与日に、動物の尾静脈または心臓から血液を採取し、動物をエーテル麻酔下にて放血致死させた後に骨髓と精巣を摘出した。小核試験は Hayashi らの方法に従って行った。

ii) アルカリコメット試験

肝臓の外側左葉の一部と精巣を採取し、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。

iii) pig-A 遺伝子突然変異試験

Phosphatidylinositol glycan-complementation group-A (pig-A) 遺伝子は X 染色体に存在する遺伝子で、突然変異によって GPI アンカータンパクが欠損し、この細胞を CD59 陰性細胞としてフローサイトメーターで分画することができる。実際には、抗凝固剤として EDTA を用いて採血した末梢血に CD45 抗体 (Cy5) と、CD59 (FITC) 抗体を反応させ、赤血球中の CD59 陰性細胞を pig-A 突然変異体としてフローサイトメーターで分画した。方法に関しては Miura らの方法に従った。

iv) DNA 付加体の定量

肝臓、精巣、甲状腺および乳腺について、AA による主な 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 Quattro Ultima Pt (Waters-Micromass) を用い、HPLC のカラムは Shim-pack XR-ODS (75×3.0 mm) を用いた。



(倫理面への配慮)

本研究における動物実験では、使用する動物数は最小限に留めた。投与実験は飲水による経口投与が主体であり、動物の苦痛を軽減するために適切な人道的エンドポイントを見極め、また動物は全てエーテル深麻酔下で大動脈ないし心臓からの脱血により屠殺し、その他の実験手技、方法についても動物の愛護に十分配慮して行っている。実験の開始に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規定」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、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

### C. 研究結果

(1) アクリルアミドの発がん性の種差に関する研究 [今井]

i) ハムスターを用いた発がん性予備試験

50 mg/kg 群の雌雄において AA 投与 4 週目より歩行異常がみられ、その後重症化したため全例を切迫屠殺した。その他の動物に異常は認められなかった。体重は、雄の 30 及び 50 mg/kg 群で低値を示し、雌の 50 mg/kg 群で低値傾向を示した。摂餌量は雄の 30 及び 50 mg/kg 群、雌の 50 mg/kg 群で一過性に低値傾向を示した。飲水量は雌雄の全ての AA 投与群で投与期間を通し、用量に応じて低値傾向を示した。

血液検査では、雌の 30 mg/kg 群において RBC、Hb の減少、MCV の増加が、雄の 30 mg/kg 群においては MCHC の減少がみられた。血清生化学検査では、雄の 30 mg/kg 群においては ALP が、雌の 20 及び 30 mg/kg 群では  $\gamma$ -GTP

が増加した。

雄の 30 mg/kg 群において胸腺、肺および腎臓の比重量増加がみられたが、体重の低下に伴う変化と考えられた。

病理組織学的検査では、雌雄の全ての AA 投与群で用量に対応した頻度及び程度にて坐骨神経の軸索/髄鞘変性が、雌の 50 mg/kg 群においては神経線維の萎縮がみられた。また、雌の 30 及び 50 mg/kg では、腰髄の軸索変性がみられた。その他の臓器・組織においては、AA 投与による明らかな病理組織学的変化はみられなかった。

ii) ハムスターを用いた発がん性試験

20 mg/kg 群の雄 1 例、雌 2 例が各々 11-22 週目に死亡した。死因は闘争による外傷と推察された。AA 投与に起因すると考えられる異常はみられていない。体重、摂餌量及び摂水量については、AA 投与に起因すると考えられる明らかな変化はみられていない。

iii) ラットを用いた発がん機序解析実験

何れの群においても AA 投与に起因すると考えられる一般状態の変化はみられていない。体重、摂餌量及び摂水量についても、AA 投与に起因した明らかな変化はみられていない。

(2) アクリルアミドの発がん過程への酸化的 DNA 損傷を含む修飾塩基の関与 [梅村]

一般状態では、500 ppm 群において投与開始 2 週目から、AA の神経毒性に起因すると考えられる後肢麻痺が認められ、投与開始 3 週目に 1 例の途中死亡が認められた。体重については、500 ppm 群で投与開始 1 週目から減少し、実験期間を通じて対照群に比し低値を示した。125 ppm 群では飲水量に変化は認められなかったが、250 及び 500 ppm 群では低下した。125、250 及び 500 ppm 群の AA 摂取量は 22.2、34.1 及び 62.9 mg/kg 体重/日であ

った。臓器重量は、500 ppm 群で肝臓相対重量の減少、肺相対重量の増加が認められた。また、陰性対照である腎臓は全ての AA 処置群で用量依存的な相対重量の高値が認められた。

#### i) 8-OHdG レベル

肺及び腎臓ではいずれの群においても変化は認められなかったのに対し、肝臓では 500 ppm 群で上昇した。

#### ii) *gpt* 及び *Spi*<sup>-</sup>アッセイ

肺の *gpt* 遺伝子突然変異頻度については、有意な変化ではなかったものの、AA 処置群で上昇傾向が認められ、250 及び 500 ppm 群では対照群に比べ約 2.5 倍の増加が認められた。*Gpt* 変異コロニーのスペクトラム解析より、変異種類ごとの頻度を算出した結果、250 及び 500 ppm 群で AT-TA transversion 変異頻度、125 及び 500 ppm 群で AT-GC transition 変異頻度の上昇が認められた。さらに、*Spi*<sup>-</sup> assay の結果、有意な変化ではなかったものの、用量依存的な *red/gam* 遺伝子突然変異頻度の増加が認められ、500 ppm 群では対照群の約 2 倍となった。

(3) ライフステージを勘案したアクリルアミドの長期間低暴露の遺伝毒性影響に関する研究 [本間]

#### i) 小核試験

末梢血の小核は 200 ppm 群で僅かに増加したが、幼若、成熟ラットでの差は認められなかった。骨髄の小核についても同様であり、幼若ラットの 200 ppm 群において統計的に有意な増加がみられたが、その程度は顕著ではなく、幼若、成熟ラットの明らかな差も認められなかった。精巣については、幼若ラットで用量依存的な増加がみられ、100、200 ppm 群で有意差を認めた。更に、幼若、成熟ラット間で顕著な反応性の違いが観察された。

#### ii) コメット試験

肝臓においてコメットは用量依存的に増加したが、幼若ラットの方が増加率は低かった。精巣に関しては、幼若ラットで用量依存的な増加がみられ、100、200ppm 群で有意差を認めた。また、幼若、成熟ラット間で顕著な反応性の違いが観察された。

#### iii) *pig-A* 遺伝子突然変異試験

200 ppm 群の幼若ラットで有意な突然変異の増加を認めたが、末梢血の小核と同様、幼若、成熟ラットでの差は顕著ではなかった。

#### iv) DNA 付加体量

肝臓、精巣、甲状腺および乳腺の何れにおいても、AA の主たる DNA 付加体である *N*-7-GA-Gua は用量依存的に増加したが、特に精巣において、付加体量は成熟ラットに比し幼若ラットで顕著に多かった。

### D. 考察

(1) アクリルアミドの発がん性の種差に関する研究 [今井]

ハムスターを用いた AA の飲水投与による長期発がん性試験の予備試験として、13 週間反復投与毒性試験を実施した。その結果、AA 投与に起因すると考えられる変化として、50 mg/kg 群の雌雄でみられた歩行異常、用量に対応した頻度及び程度で雌雄の全投与群でみられた坐骨神経の軸索/髄鞘変性に特徴づけられる末梢神経障害のほか、雄の 30 mg/kg 以上及び雌の 50 mg/kg 群でみられた体重増加抑制、雌の 30 mg/kg の貧血傾向を示唆する血液学的検査所見、雄の 30 mg/kg 群において ALP の増加、雌の 20 及び 30 mg/kg 群において  $\gamma$ -GTP の増加がみられた。

F344 ラットにおける AA の飲水投与による 13 週間反復投与毒性試験 (用量: 0, 0.05, 0.2, 1, 5, 20 mg/kg 体重) においても 1 mg/kg

以上で用量に対応した頻度及び程度の末梢神経障害のほか、20 mg/kg の雌雄で貧血傾向、雌で ALP 活性の上昇、雄で精巣毒性を示すことが報告されている (Burek JD ら、1980)。従って、ハムスターにおける AA の反復投与による毒性所見は、質的にラットと概ね類似していることが示された。一方、今回のハムスターを用いた試験では最低用量を 20 mg/kg 体重/日としたため、末梢神経障害を指標としたラットとの感受性の比較はできないが、貧血傾向を示唆する血液学的検査所見を指標とした場合、ラットでは 20 mg/kg で影響がみられたのに対し、ハムスターでは 30 mg/kg であることから、やや低感受性である可能性が示された。更にラットでは 20 mg/kg でみられた精巣毒性が、ハムスターにおいては 50 mg/kg でも明らかではなかった。今後、ハムスターにおける AA の体内動態試験を実施し、これら感受性差の原因を明らかにする必要がある。

## (2) アクリルアミドの発がん過程への酸化的 DNA 損傷を含む修飾塩基の関与 [梅村]

AA のマウスに対する発がん性として、ICR-Swiss 及び A/J マウスにおいて肺腫瘍の誘発が報告されているが、*gpt delta* マウスの肺においては、*gpt* 及び *red/gam* 遺伝子突然変異頻度の上昇傾向が認められ、AA はマウスにおける発がん標的臓器の肺に対して遺伝毒性を示すことを明らかにした。しかし、肺 DNA 中の 8-OHdG レベルに変化は見られなかったことから、この *in vivo* 変異原性には酸化的ストレスが関与している可能性は低いと考えられた。また、変異コロニーのスペクトラム解析の結果、M-GA-Gua によって生じる GC-TA transversion 変異の上昇は認められず、AT-TA transversion 及び AT-GC transition 変異の上昇がみられた。従って、肺における *gpt* 遺伝子突然変異頻度の上昇には adenine

の付加体として報告されている M3-GA-Ade や M1-GA-Ade が関与していることが考えられた。一方、BigBlue マウスで *cII* 遺伝子突然変異頻度の上昇が報告されている肝臓では、AA 500 ppm 群において 8-OHdG レベルが増加した。今後は、肝臓における *in vivo* 変異原性試験を実施し、酸化ストレスとの関与について検討する予定である。

## (3) ライフステージを勘案したアクリルアミドの長期間低暴露の遺伝毒性影響に関する研究 [本間]

AA の *in vivo* の遺伝毒性に関する研究として、Manjanatha らによる BigBlue マウスを用いた報告がある。即ち、100 及び 500 ppm 濃度で 4 週間飲水投与した結果、肝臓での突然変異が増加し、GC-TA transversion が主な変異であることを報告した。今回の実験では Manjanatha ら実験と比較し、低い濃度 (50、100、200 ppm) での検討を行った。200 ppm 群での AA 摂取量は 20 mg/kg 体重/日に相当し、顕著な体重増加抑制、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肉眼的異常は認められなかった。

末梢血では、200 ppm 群の小核が僅かに増加したが、幼若、成熟ラットでの差は認められなかった。骨髄では、200 ppm 群の幼若ラットで有意差がみられたが、顕著な小核誘発ではなかった。Manjanatha らの報告でも、100 ppm では骨髄小核の誘発は認められていない。また、*pig-A* 突然変異についても 200 ppm 群の幼若ラットで有意差が認められた。*Pig-A* 突然変異試験は末梢血を用いた新規遺伝毒性試験であり、小核試験、コメット試験のような一過性の遺伝毒性を検出する系とは異なり、変異体は長期間体内に留まるため、本研究のような低用量、長期間暴露の試験系に適すると考えられている。今回の試験での *pig-A* を

指標とした遺伝毒性の発現は、骨髄の小核と同様、幼若ラットのみで有意な差を示し、AAの飲水投与による慢性暴露が弱いながら血球細胞に遺伝子突然変異をもたらすことが明らかとなった。しかし、幼若および成熟ラットでの差は顕著ではなく、幼若ラットで特に強い影響があるとは考えにくい。

一方、精巣に関しては、小核試験、コメット試験で成熟、幼若ラットと共に用量依存性の増加が観察され、この増加は幼若ラットで顕著であった。精巣においては、DNA付加体の *N7-G-GA* についても幼若、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 200 ppm 群で、成熟ラットに比し 10 倍以上高い付加体の生成が観察された。

これまで、精巣には AA の付加体が蓄積しやすく、主としてプロタミンとの結合が考えられている。一方、約 5% は DNA に付加体を形成するとされる。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、付加体形成が強く関与するものと考えられる。更に今回の実験では、この傾向が幼若ラットで顕著に現れることが示された。この原因は不明であるが、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、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。

## E. 結論

### (1) アクリルアミドの発がん性の種差に関する研究 [今井]

AA のハムスターを用いた発がん性試験における最大耐量は 20 mg/kg 体重以下であると判断された。AA の反復投与による毒性所見は、質的にハムスターとラットで概ね類似していることが示されたが、ラットに比しハムスターでは、血液毒性や精巣毒性に対して低感受

性であることが示唆された。現在、雌雄のハムスターを用いて、0、10、20 mg/kg 体重の用量で発がん性試験を実施している。また、F344 雌ラットに対して AA を 0、1.5、3 mg/kg 体重の用量で 12 ヶ月及び 24 ヶ月間投与する実験を開始し、AA の発がん標的臓器における細胞動態及び内分泌環境への影響と、発生した腫瘍における遺伝子変異を検索することにより、発がん機序の解析を行う予定である。

### (2) アクリルアミドの発がん過程への酸化的 DNA 損傷を含む修飾塩基の関与 [梅村]

AA はマウスにおける発がん標的臓器である肺に対し *in vivo* 変異原性を示すことを明らかにした。しかし、その機序には酸化ストレスの関与は低いと考えられた。一方、肝臓では AA による酸化的 DNA 損傷が生じることが明らかとなり、今後は、肝臓ならびに発がん非標的の腎臓での *gpt* 及び *Spi*<sup>-</sup> assay を実施し、AA の *in vivo* 変異原性の詳細について明らかにする。さらに、AA に特異的な DNA 付加体の定量解析を行い、AA の *in vivo* 変異原性及び発がん性に対する酸化的 DNA 損傷と直接的 DNA 傷害の関与について検討する。

### (3) ライフステージを勘案したアクリルアミドの長期間低暴露の遺伝毒性影響に関する研究 [本間]

50、100、200ppm 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 付加体形成を比較し、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。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、精巣では DNA 損傷、小核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、特に付加体量については、幼若ラットでは成熟ラットに比し 10 倍以上もの蓄積を認めた。以上より、

幼若ラットの精巣における小核発生数の増加について、DNA 付加体形成が強く関与していることが示唆された

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Cho YM, 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 (MNU) and treated with acrylamide. J Toxicol Sci, 34: 407-412, 2009.

2) Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinae, N., Honma, M. Genotoxicity of acrylamide *in vitro*: Acrylamide is not metabolically activated in standard *in vitro* systems. Environ Mol Mutagen. (in press)

##### 2. 学会発表

1) 今井俊夫、河野聡美、早川拓也、北橋 宗、アクリルアミドのシリアンハムスターにおける3ヶ月間経口投与毒性試験、第26回日本毒性病理学会、金沢市（2010年2月）

2) Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T., Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Masumura, K., Horibata, K., Masuda, S., Kinae, N., Nohmi, T., Honma, M. : Child-adult difference in evaluation of *in vitro* genotoxicity of acrylamide. 10th International Conference on Environmental Mutagens (Firenze, 2009. 8)

3) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、井上薫、吉田緑、今井俊夫、渋谷淳、鈴木

拓也、増村健一、堀端克良、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（週齢）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38回大会、静岡市（2009年11月）

4) Honma, M., Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Imai, T., Yamamoto, Y., Kumita, W., Masumura, K., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., and Nohmi, T.: Child-adult differences in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (Salt Lake City, 2009. 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし。

## 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）

平成 21 年度 分担研究報告書

## アクリルアミドの発がん性の種差に関する研究

研究分担者 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、膵管発がん感受性のハムスターと非感受性のラットにおけるアクリルアミド（AA）の発がん性に対する種差を検討し、ヒトにおける AA のリスク管理に資するデータを構築することを目的としている。今年度はハムスターを用いた AA の飲水投与による発がん性試験の実施に先立ち、13 週間の予備試験を実施した。投与用量は雌雄とも 20、30 及び 50 mg/kg 体重とした。その結果、30 及び 50 mg/kg 群の雌雄において歩行異常、体重増加抑制あるいは貧血傾向などがみられ、20 mg/kg 以上の各群では用量に対応した種々の程度の坐骨神経変性がみられた。以上の結果より、AA のハムスターを用いた発がん性試験における最大耐量は 20 mg/kg 体重以下であると判断された。現在、雌雄のハムスターを用いて、0、10、20 mg/kg 体重の用量で発がん性試験を実施している。また、F344 雌ラットに対して AA を 0、1.5、3 mg/kg 体重の用量で 12 ヶ月及び 24 ヶ月間投与する実験を開始した。ラットを用いた実験では、AA の発がん標的臓器における細胞動態及び内分泌環境への影響と発生した腫瘍における遺伝子変異を検索することにより、ラットにおける発がん機序の解析を行う予定である。

## A. 研究目的

加工食品中に種々の濃度で含まれているアクリルアミド（AA）及びその活性代謝物のグリシドアミドは、*in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験で陽性を示す。また、ラットの飲水投与による発がん性試験において腹膜中皮、乳腺、甲状腺、副腎、子宮などに、マウスでは肺、前胃、乳腺などに腫瘍性病変を誘発することから、遺伝毒性発がん物質としてヒトへのリスクが懸念されている。また、AA の発がん標的臓器に内分泌・生殖器官が含まれていることから、発がん機序として遺伝毒性のほか、内分泌環境に対する影響が関与してい

る可能性が指摘されている。

食品からの AA 摂取量と発がんに関する疫学調査が欧米で広く実施され、それらの結果は概ね陰性であるが、喫煙経験がなく AA 摂取量の多い女性の子宮内膜がんや卵巣がん等の発生率が高いとする報告もみられ（Hogervorst JG ら、2007）、一定の結論は得られていない。また、職業暴露については膵がんとの関連性が否定できないとする報告がみられる（Swaan GM ら、2007）。従って、AA の動物における発がん機序およびヒトへの外挿性の多角的な再評価が必要と考えられる。本研究では、疫学研究において AA の発がん標的の一つとして懸念される膵臓に着目し、ニトロソ化合物の

BOP に対し膀胱癌感受性を示すハムスターと非感受性のラットにおける AA の発がん性に対する種差を検討し、ヒトにおける AA のリスク管理に資するデータを構築することを目的としている。その目的のため、第一に、シリアンハムスターを用いて膀胱を含む全身諸臓器・組織における発がん性の有無を明らかにすること計画しており、今年度はハムスターを用いた AA の飲水投与による 13 週間の発がん性予備試験を実施し、その結果をもとに長期発がん性試験を開始した。また、F344 雌ラットに対して AA を発がん用量にて 12 ヶ月及び 24 ヶ月間投与する実験を開始した。ラットを用いた実験では、AA の発がん標的臓器における細胞動態及び内分泌環境に対する影響と発生した腫瘍における遺伝子変異を検索することにより、発がん機序の解析を行う予定である。

## B. 研究方法

### 1. ハムスターを用いた発がん性予備試験

シリアンハムスター (5 週齢、雌雄各 36 匹) を日本エスエルシーより購入し、1 週間の馴化飼育後、6 週齢で実験に供した。動物は温度  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 10\%$ 、換気回数 15 回/時間 (オールフレッシュ)、12 時間の明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの飼育室で、木材製床敷 (ソフトチップ、日本エスエルシー) を敷いたプラスチックケージに 1 ケージあたり 3 匹ずつ収容して飼育し、ケージ及び床敷を週 2 回交換した。体重に基づく層別化法により各群 9 匹の 4 群に分けた。AA の投与用量は、本予備試験に先立って実施した 2 週間投与実験の結果をもとに 0 (対照)、20、30 及び 50 mg/kg 体重とし、飲水に混じて 13 週間投与した。実験期間中、一般状態及び死亡動物の有無を毎日 (週 5 日) 観察し、体重、摂餌量及び飲水量を

1 週間に 1 回測定した。AA は飲料水中において 0.5~17 ppm の範囲では安定であることが報告されていることから (Friedman MA ら、1995)、混合飲料水は 1 週間に 1 回調製、交換し、交換時には飲水量を測定した。投与終了時には、一昼夜の絶食後、エーテル深麻酔下にて鎖骨下静脈および腹大動脈より、各々血液学的検査および血清生化学検査のために採血した後、脱血により安楽殺した。血液学的検査および血清生化学検査については、下記の項目についてエスアールエルに委託して測定した。

血液学的検査：赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数 (Plt) 及び白血球数 (WBC)

血清生化学的検査：総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、総ビリルビン (T-Bil)、トリグリセライド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AsT)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP) 尿素窒素 (BUN)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、ナトリウム (Na)、カリウム (K) 及びクロール (Cl)

剖検時には、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓及び精巣を摘出し、重量を測定した。また、これらの臓器に加え下記の臓器・組織を摘出した。

眼球及びその附属器、気管、大動脈、唾液腺、舌、食道、胃、十二指腸、小腸 (空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、膀胱、精囊、前立腺、精巣上体、卵巣、子宮、膣、坐骨神経、三叉神経、骨格筋、皮膚、乳腺、脊髄、リンパ節 (頸部、腸間膜)、骨及び骨髄 (胸骨、大腿骨)

摘出した臓器・組織は 10% 中性緩衝ホルマリン液 (精巣についてはブアン液) にて固定、常

法に従ってパラフィン包埋切片を作製、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、坐骨神経については更にNFP-LFB染色を実施し、全例について病理組織学的検査を行った。

## 2. ハムスターを用いた発がん性試験

シリアンハムスター（5週齢、雌雄各90匹）を日本エスエルシーより購入し、1週間の馴化飼育後、6週齢で実験に供した。動物の飼育環境は発がん性予備試験と同様とした。体重に基づく層別化法により各群30匹の3群に分けた。AAの投与用量は、予備試験の結果をもとに雌雄ともに0（対照）、10及び20 mg/kg体重とし、飲水に混じて投与している。現在、雄については28週間、雌については22週間が経過した。実験期間中、一般状態及び死亡動物の有無を毎日（週5日）観察し、体重及び摂餌量は投与26週目までは週1回、その後は4週間に1回測定している。飲水は1週間に1回交換し、その都度、飲水量を測定している。

## 3. ラットを用いた発がん機序解析実験

F344ラット（5週齢、雌90匹）を日本チャールス・リバーより購入し、1週間の馴化飼育後、6週齢で実験に供した。動物の飼育環境は発がん性予備試験と同様とした。体重に基づく層別化法により各群30匹の3群に分けた。AAの投与用量は、既に報告されているF344ラットを用いた2年間の発がん性試験における乳腺をはじめとする諸臓器・組織での発がん用量（Friedman MAら、1995）をもとに0（対照）、1.5及び3.0 mg/kg体重/日とし、飲水に混じて投与している。現在、50週間が経過した。実験期間中、一般状態及び死亡動物の有無を毎日（週5日）観察し、体重及び摂餌量は投与13週目までは週1回、その後は4週間に1回測定している。飲水は1週間に1回交換し、その都度、飲水量を測定している。

統計方法：体重、血液・血清生化学的検査値及び臓器重量については、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行なった。群間に有意差が認められた場合の多重比較はDunnett法により有意差検定を行なった。

### （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ている。ハムスターを用いた発がん性予備試験では高用量群において重篤な神経症状がみられたため、人道的エンドポイントと判断し、全例を切迫屠殺した。実験の開始に当っては、「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. ハムスターを用いた発がん性予備試験 一般状態

50 mg/kg群の雌雄においてAA投与4週目より歩行異常（よろめき歩行）がみられ、その後重症化（後肢開脚）したため5週目～12週目において全例を切迫屠殺した。その他の動物に異常は認められなかった。

### 体重、摂餌量及び摂水量

体重は、雄の30及び50 mg/kg群で低値を示し（ $p < 0.05, 0.01$ ）、雌の50 mg/kg群で低値傾向を示した（Figure 1）。摂餌量は雄の30及び50 mg/kg群、雌の50 mg/kg群で一過性に低値傾向を示した（Figure 2）。飲水量は雌雄の全てのAA投与群で投与期間を通し、用量に応じて低値傾向を示した（Figure 3）。



## 血液学的検査及び血清生化学的検査

血液検査では、雌の 30 mg/kg 群において RBC、Hb の減少、MCV の増加が ( $p < 0.05$ ,  $0.01$ )、雄の 30 mg/kg 群においては MCHC の減少 ( $p < 0.01$ ) がみられた (Table 1, 2)。血清生化学検査では、雄の 30 mg/kg 群においては ALP が ( $p < 0.05$ )、雌の 20 及び 30 mg/kg 群では  $\gamma$ -GTP が ( $p < 0.05$ ) 増加した (Table 3, 4)。

## 臓器重量

雄の 30 mg/kg 群において 胸腺、肺および腎臓の比重量増加がみられたが、体重の低下に伴う変化と考えられた (Table 5, 6)。

## 病理組織学的検査

雌雄の全ての AA 投与群で、用量に対応した頻度及び程度にて坐骨神経の軸索/髄鞘変性が、雌の 50 mg/kg 群においては神経線維の萎縮がみられた。また、雌の 30 及び 50 mg/kg では、腰髄の軸索変性がみられた (Table 7, 8)。その他の臓器・組織においては、AA 投与による明らかな病理組織学的変化はみられなかった。

## 2. ハムスターを用いた発がん性試験

### 一般状態

20 mg/kg 群の雄 1 例、雌 2 例が各々 11-22 週目に死亡した。死因は闘争による外傷と推察された。AA 投与に起因すると考えられる異常はみられていない。

### 体重、摂餌量及び摂水量

AA 投与に起因すると考えられる明らかな変化はみられていない。

## 3. ラットを用いた発がん機序解析実験

### 一般状態

何れの群においても AA 投与に起因すると考えられる一般状態の変化はみられていない。

### 体重、摂餌量及び摂水量

AA 投与に起因すると考えられる明らかな変化はみられていない。

## D. 考察

ハムスターを用いた AA の飲水投与による長期発がん性試験の予備試験として、13 週間反復投与毒性試験を実施した。その結果、AA 投与に起因すると考えられる変化として、50 mg/kg 群の雌雄でみられた歩行異常、用量に対応した頻度及び程度で雌雄の全投与群でみられた坐骨神経の軸索/髄鞘変性に特徴づけられる末梢神経障害のほか、雄の 30 mg/kg 以上及び雌の 50 mg/kg 群でみられた体重増加抑制、雌の 30 mg/kg の貧血傾向を示唆する血液学的検査所見、雄の 30 mg/kg 群において ALP の増加、雌の 20 及び 30 mg/kg 群において  $\gamma$ -GTP の増加がみられた。

F344 ラットにおける AA の飲水投与による 13 週間反復投与毒性試験 (用量: 0, 0.05, 0.2, 1, 5, 20 mg/kg 体重) においても 1 mg/kg 以上で用量に対応した頻度及び程度の末梢神経障害のほか、20 mg/kg の雌雄で貧血傾向、雌でアルカリフォスファターゼ活性の上昇、雄で精巣毒性を示すことが報告されている (Burek JD ら、J Environ Pathol Toxicol 1980, 4: 157-82)。従って、ハムスターにおける AA の反復投与による毒性は、質的にラットと概ね類似していることが示された。一方、今回のハムスターを用いた試験では最低用量を 20 mg/kg 体重/日としたため、末梢神経障害を指標としたラットとの感受性の比較はできないが、貧血傾向を示唆する血液学的検査所見を指標とした場合、ラットでは 20 mg/kg で影響がみられたのに対し、ハムスターでは 30 mg/kg であることから、やや低感受性である可能性が示された。更にラットでは 20 mg/kg でみられた精巣毒性が、ハムスターにおいては 50 mg/kg でも明らかではなかった。今後、ハムスターにおける AA の体内動態試験を実施し、これら感受性差の原因を明らかにする必要がある。

## E. 結論

AA のハムスターを用いた発がん性試験における最大耐量は 20 mg/kg 体重以下であると判断された。AA の反復投与による毒性所見は、質的にハムスターとラットで概ね類似していることが示されたが、ラットに比しハムスターでは、血液毒性や精巣毒性に対して低感受性であることが示唆された。現在、雌雄のハムスターを用いて、0、10、20 mg/kg 体重の用量で発がん性試験を実施している。また、F344 雌ラットに対して AA を 0、1.5、3 mg/kg 体重の用量で 12 ヶ月及び 24 ヶ月間投与する実験を開始し、AA の発がん標的臓器における細胞動態及び内分泌環境への影響と、発生した腫瘍における遺伝子変異を検索することにより、発がん機序の解析を行う予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. Imai T, Takami S, Cho YM, 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.
3. Cho YM, 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 (MNU) and treated with acrylamide. *J Toxicol Sci*, 34: 407-412, 2009.
4. Imai T, Hasumura M, Cho YM, Ota Y, Takami S, Hirose M, Nishikawa A. Inhibitory effects of aminoguanidine on thyroid follicular carcinoma development in inflamed capsular regions of rats treated with sulfadimethoxine after *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiation. *Cancer Sci*, 100: 1794-1800, 2009.
5. Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinoshita N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part Fibre Toxicol*, 6: 23, 2009.
6. Takami S, Imai T, Cho YM, Hirose M, Nishikawa A. Lack of modifying effects of prepubertal exposure to acrylamide (AA) on *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)-induced multi-organ carcinogenesis in F344 rats. *J Toxicol Sci*, 35: 57-68, 2010.
7. Kitahashi T, Mutoh M, Tsurusaki M, Iinuma G, Suzuki M, Moriyama N, Yoshimoto M, Wakabayashi K, Sugimura T, Imai T. Imaging study of pancreatic ductal adenocarcinomas in Syrian hamsters using X-ray micro-computed tomography (CT). *Cancer Sci* (In press).

## 2. 学会発表

1. 今井俊夫、河野聡美、早川拓也、北橋 宗、  
アクリルアミドのシリアンハムスターに  
おける3ヶ月間経口投与毒性試験、第26回  
日本毒性病理学会、金沢市（2010年2月）  
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）  
該当なし。

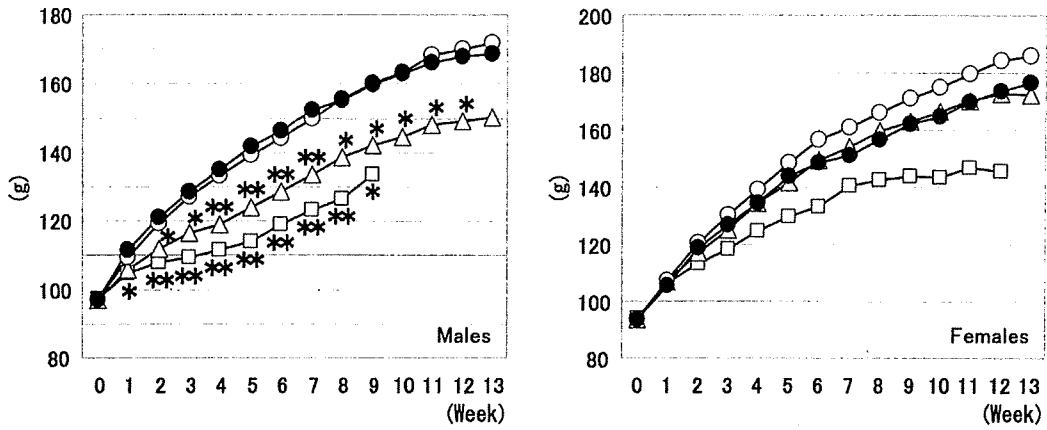


Figure 1 Body weight

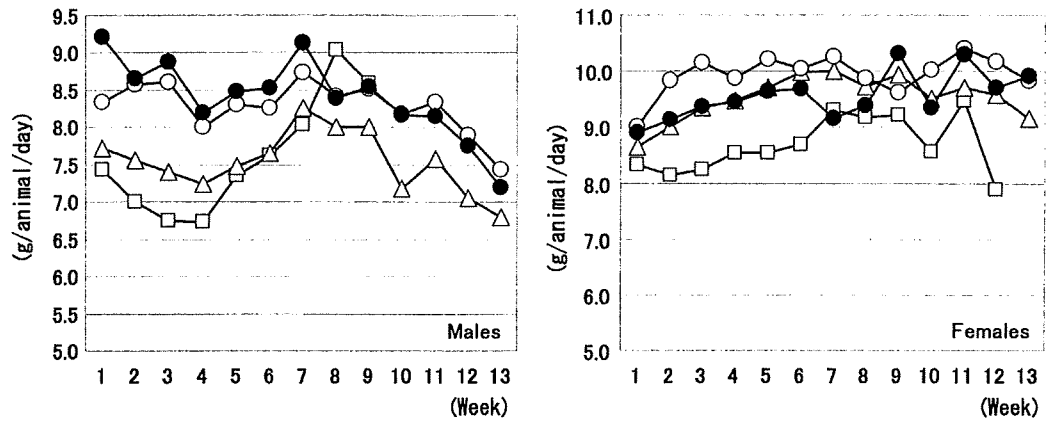


Figure 2 Food consumption

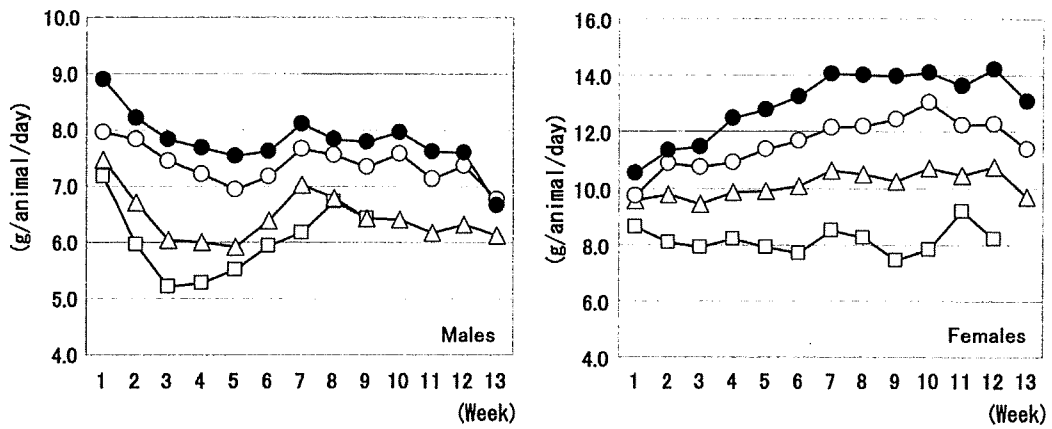


Figure 3 Water consumption

- AA-0 mg/kg
  - AA-20 mg/kg
  - △ AA-30 mg/kg
  - AA-50 mg/kg
- \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$