

201033026A

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 22 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成 23 (2011) 年 5 月

## 報告書の修正について

報告書に個人情報に記載されているため、以下の通りページ削除いたしました。

文献番号：201033026A

課題番号：H21-食品・一般-012

補助金名：厚生労働科学研究費補助金

研究事業名：食品の安心・安全確保推進研究

年度・研究成果の区別：平成22年度 総括・分担研究報告書

研究課題名：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

研究代表者名：今井 俊夫

### 【修正理由】

表紙次ページ「様式A(8)」

個人情報に記載されているため削除する。

年月日：平成30年7月9日

研究代表者 今井 俊夫



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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成23(2011)年 5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 -----	13
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 -----	27
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 -	43
本間正充	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	
1. Juvenile rats do not exhibit elevated sensitivity to acrylamide toxicity after oral administration for 12 weeks.	
2. Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems.	
3. Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity.	

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22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 （独）国立がん研究センター 研究所 動物実験支援施設 支援施設長

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、ヒトにおける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摂取量と乳がんや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ている。そこで本研究では、[今井] AAの発がん性の種差、[梅村] AAによる酸化DNA損傷の発がんへの関与、[本間] AAの遺伝毒性発現の機序について解析し、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する。本年度は、[今井] 膵管発がん感受性を示す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実施し、最終剖検を終了した。肉眼観察では、AA投与群で前胃結節の発生頻度が増加した。ラットを用いたAAの長期飲水投与実験では、乳腺組織におけるERKの活性化を示す所見を得た。[梅村] *gpt delta* マウスを用いたAAの4週間飲水投与実験により、AAの肺及び肝発がん機序として遺伝毒性メカニズムの関与が示されたが、酸化DNA損傷はそれに関与しないことを示唆する結果を得ている。[本間] 幼若及び成熟ラットにAAを1週間強制経口投与した際の精巣でのコメット試験において、コメットは顕著に増加したが週齢間の差はみられず、DNA付加体量は幼若ラットで高値を示したことから、精巣におけるAAに対する感受性は幼若動物で高いことが示唆された。

分担研究者

- 1) 今井 俊夫 （独）国立がん研究センター・研究所・動物実験支援施設・支援施設長
- 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における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 (GST) 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、乳がん (Pedersen GS ら、2010)、子宮内膜がんや卵巣がん (Wilson KM ら、2010) の発生率が高いとする報告もみられ、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、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。

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 に対し膵管発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 週間の馴化飼育後に各群 30 匹の 3 群に分け、6 週齢で実験に供した。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た。現在、雌雄とも最終剖検を終了し、組織標本の作製および病理組織学的評価を進めている。

### ii) ラットを用いた発がん機序解析実験

F344 ラット (5 週齢、雌 91 匹) を日本チャールス・リバーより購入し、1 週間の馴化飼育後に各群 30 匹 (対照群のみ 31 匹) の 3 群に分け、6 週齢で実験に供した。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52週間あるいは104週間投与した。

各群10匹の52週投与群については、エーテル麻酔下にて剖検し、脳、肝臓、腎臓、副腎、下垂体及び甲状腺の重量を測定、これらの臓器に加え膵臓、乳腺、卵巣、子宮及び膣について病理組織学的検索を行った。採血により得られた血清については、乳腺発がんに関与する可能性がある生理活性物質としてエストラジオール、インシュリン、IGF-I、レプチン及びアディポネクチン、甲状腺関連ホルモンとしてT4及びT3の濃度を測定した。また、甲状腺及び乳腺組織のパラフィン包埋切片に対して Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 免疫組織化学を行い、濾胞上皮及び終末導管における陽性率を算出し細胞増殖活性を評価した。

各群20匹 (対照群のみ21匹) の104週間投与群については、全生存例につきイソフルラン麻酔下にて脱血により安楽死させ、乳腺組織及び肉眼的異常部位を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。また、一部の組織については液体窒素にて凍結後、-80℃にて保存した。なお、104週間投与群については、実験途中において長径が概ね20mm以上の皮下腫瘍が確認された段階で切迫屠殺し、最終剖検時と同様に試料を採取した。切迫屠殺例の一部より採取し、凍結保存した乳腺及び乳腺腫瘍組織からタンパクあるいはDNAを抽出、増殖シグナルの活性化状態を評価するため、Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2 及び phospho(リン酸化)-ERK-1/2 の発現解析、あるいは乳腺腫瘍の発生に対する *H-ras* 遺伝子変異の関与の有無を検索するため、エクソン1 (コドン12、13) 及びエク

ソン2 (コドン61) についてシーケンス解析を行った。

(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]

i) 若齢マウスを用いた4週間投与実験

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20匹) を用いた。AAの飲水中濃度は 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。投与終了時にはイソフルラン麻酔下にて剖検し、肺、肝臓および腎臓を採取した。その一部を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、その他を8-OHdG測定および *gpt* 及び *Spi*<sup>-</sup> assay 用の試料として液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

ii) 幼若及び成熟マウスを用いた4週間投与実験

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雌性 C57BL/6 系 *gpt delta* マウスと日本 SLC 社から購入した雄性 C3H/He 系マウスを用いて B6C3F<sub>1</sub> 系 *gpt delta* マウスを作出し、3週齢及び11週齢のマウス各40匹をそれぞれ幼若期及び成熟期動物として実験に供した。AAの飲水中濃度は実験 i) の500 ppm 群で強い神経毒性が認められたことから、400 ppm を最高用量とし、公比2で除した中用量を200 ppm、低用量を100 ppm と設定した。試料採取、保存等は実験 i) と同様の方法で行った。

8-OHdGの測定：肺、肝臓および腎臓のDNA中8-OHdGの測定では、DNAを抽出した後に、*nuclease P1* と *alkaline phosphatase* により

消化した。得られた試料は HPLC/ECD 法を用いて測定し、8-OHdG 値は 8-OHdG/10<sup>6</sup>dG 量として算出した。

*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、 $\lambda$  ファージの *in vitro* パッケージング反応を行い、ゲノム DNA から  $\lambda$  EG10DNA をファージ粒子として回収した。*gpt assay* では回収したファージ粒子を大腸菌 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、ファ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ァージ数（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ァージ数で除して *gpt* 遺伝子突然変異頻度 (MF) を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコロニーの *gpt* 遺伝子配列を決定して変異部位を同定した。

Spi<sup>-</sup>欠失変異の検出では、ファージは 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 ファ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* MF 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]

雄性 SD 系ラットを日本エスエルシーより購入し、馴化飼育後、4、6、10 週齢で実験に供した。各週齢の動物は各群 5 匹の 3 群に分けた。AA の投与用量は、0 (対照)、25 及び 50 mg/kg 体重とし、蒸留水で 250 mg/mL に調製した投与検体を 7 日間強制経口投与した。投与 4 日目と剖検時に体重を測定した。剖検は最終投与 24 時間後に行った。

小核試験：精巢の片側 1/3 を試料とした。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：精巢の片側 1/3 を試料とした。試験法は JaCVAM コメット試験共同研究のプロトコールに従った。

DNA 付加体の定量：精巢の片側 1/3 を、液体窒素を用いて急速凍結し冷凍保存した。後日 DNA を抽出して試料とした。AA による主たる DNA 付加体である *M7-GA-Gua* を LC/MS/MS により測定した。*M7-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 (75×3.0mm) 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あるいはイソフルラン麻酔下で脱血により屠殺し、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「国立がん研究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試験

一般状態及び生存率：20 mg/kg 群の雄 1 例が投与開始 18 週目に死亡した。死因は不明であった。また、20 mg/kg 群の雌 1 例は 11 週目に闘争による外傷により死亡した。以降、闘争のみられた動物は適宜個別に飼育した。20 mg/kg 群の雄 2 例は投与開始 50 あるいは 62 週より、雌 2 例は 42 あるいは 54 週より神経症状（後肢開脚）を呈した。また、20 mg/kg 群の雄では 46 週以降、雌では 23 週以降、急激な体重減少あるいは自発運動低下などを伴う一般状態の悪化した動物が散見され、適宜切迫屠殺した。AA 投与に関連した結節/腫瘍の発生はみられなかった。雄では AA 投与による生存率の顕著な差はみられなかったが、雌では 36 週以降、20 mg/kg 群の明らかな生存率低下がみられた。

体重、摂餌量、飲水量：20 mg/kg 群の雌雄では、投与開始 30 週目から対照群に比し体重が低下傾向を示し、以降実験終了時まで低値を示した。摂餌量は、20 mg/kg 群の雄において、投与 38 週以降、対照群に比し低下傾向を示したが、雌においては群間の違いはみられなかった。飲水量については、AA 投与による影響はみられなかった。

剖検：対照群を含め肝臓、脾臓、前胃、副腎などに腫瘍/結節が散見され、雌雄とも 10、20 mg/kg 群の前胃結節の発生頻度が対照群に

比し増加傾向を示した。

病理組織学的検査：50 週目における雄の切迫屠殺例に肝細胞腺腫、36 週目における雌に肝細胞変異細胞巣及び上皮小体過形成がみられたことから、以降の切迫屠殺/死亡例を発がん性評価の有効数にすることとした。現在、組織標本の作製ならびに病理組織学的評価を進めている。

#### ii) ラットを用いた発がん機序解析実験

一般状態及び生存率：52 週間投与群において、AA 投与に起因する死亡及び一般状態の変化はみられなかった。104 週投与群については、0、1.5 及び 3.0 mg/kg 群において、各々 80、84 及び 71 週目より皮下結節/腫瘍が発生し、実験終了時までの発生頻度は各々 5/20 (25%)、2/20 (10%) 及び 12/20 (60%) であった。また、1.5 及び 3.0 mg/kg 群に腹腔内腫瘍や飲水障害を伴う舌腫瘍がみられるなど、腫瘍性病変の発生を示唆する所見が散見された。途中死亡及び結節/腫瘍発生に伴う切迫屠殺により、最終剖検時における生存率は、0、1.5 及び 3.0 mg/kg 群において、各々 18/20 (90%)、11/20 (55%) 及び 7/20 (35%) であった。

体重、摂餌量、飲水量：AA 投与に起因する明らかな変化はみられなかった。

剖検、臓器重量：52 週投与後の剖検において、対照群の 1 例の子宮および別の 1 例の下垂体に腫瘍/結節がみられた以外、肉眼的変化は認められなかった。臓器重量に群間の明らかな差はみられなかった。104 週投与後の剖検では、皮下結節/腫瘍のほか、下垂体結節/暗赤色班、子宮腫瘍など、種々の増殖性/腫瘍性病変の発生を示唆する変化が認められた。皮下結節/腫瘍の発生頻度は 3.0 mg/kg 群において対照群に比し増加した。甲状腺結節も 3.0 mg/kg 群において増加傾向を示し、舌/口

腔の結節/腫瘍は対照群にはみられなかったが、1.5及び3.0 mg/kg群にて各1及び2例に認められた。

血清生化学検査：52週投与後の血清を用いて、乳腺発がんに関与する可能性がある生理活性物質としてエストラジオール、インシュリン、IGF-I、レプチン及びアディポネクチンと甲状腺関連ホルモンであるT4及びT3の濃度を測定したが、AA投与による変化はみられなかった。

病理組織学的検査：52週投与群の検索対象臓器において、AA投与に関連する変化は認められなかった。対照群の1例の子宮および別の1例の下垂体の結節/腫瘍については、各々前葉のがん及び内膜間質ポリープであった。

発がん標的臓器における細胞増殖活性：52週投与群の甲状腺濾胞上皮と乳腺終末導管におけるPCNA陽性率を比較した結果、甲状腺にAA投与による影響はみられなかったが、乳腺において統計学的有意差はなかったが用量に対応して増加傾向を示した。

乳腺及び乳腺腫瘍におけるERKの活性化：104週投与群の切迫屠殺例から採取した対照群及び3.0 mg/kg群の正常(様)乳腺組織及び乳腺腫瘍(線維腺腫)の一部について、ERK-1/2及びリン酸化ERK-1/2の発現を比較検討した結果、3.0 mg/kg群の正常(様)乳腺組織において明らかな活性化がみられ、次いで対照群及び3.0 mg/kg群の乳腺腫瘍が軽度な活性化を示した。

乳腺腫瘍におけるH-ras遺伝子の変異：104週投与群の切迫屠殺例から採取した対照群の乳腺腫瘍(線維腺腫)の1/2例において、H-ras遺伝子コドン13におけるGGCからGGGへの変異を示す所見が得られたが、同一個体の正常(様)乳腺組織、3.0 mg/kg群の3例の正常(様)乳腺組織及び乳腺腫瘍(線維腺腫)の何れにも変異はみられなかった。

(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]

i) 若齢マウスを用いた4週間投与実験

昨年度の研究結果において、8-OHdGレベルは500 ppm群の肝臓においてのみ対照群に比べ上昇した。発がん標的臓器である肺ではAA投与群においてAT-TA transversion及びAT-GC transitionを伴うgpt MFの上昇と、red/gam MFの用量依存的な上昇がみられた。本年度は病理組織学的検索と、肝臓及び腎臓における*in vivo*変異原性の解析を実施した。病理組織学的に各臓器においてAA投与による変化は認められなかった。AA処置群では肝臓においてgpt MFの上昇傾向が認められたが、腎臓では変化は認められなかった。gpt変異コロニーのスペクトラム解析から、肝臓では250 ppm群でSingle base pair (bp) deletionの上昇が認められた。腎臓においてもSingle bp deletionの増加が認められたが有意な変化ではなかった。Spi<sup>-</sup> assayにおいては、125及び500 ppm群の肝臓で約2倍の上昇が認められた。また、500 ppm群の腎臓では約3倍程度の上昇が認められた。

ii) 幼若及び成熟マウスを用いた4週間投与実験

一般状態において、幼若マウスでは投与開始1週目より、成熟マウスでは3週目より、400 ppm群に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た。また、幼若マウスでは2週目以降に6例の途中死亡が認められた。体重については、幼若マウスでは、1週目から200 ppm以上の群で、2週目以降は100 ppmから対照群に比し低値を示した。成熟マウスでは400 ppm群でのみ投与開始1週目以降低値を示した。飲水量は、全投与群に

において対照群に比し低下し、幼若マウスにおける 100、200 及び 400 ppm 群の AA 投与量は 21.8、41.2 及び 46.2 mg/kg/日、成熟マウスでは 22.5、38.6 及び 59.2 mg/kg/日であった。また、臓器重量については、幼若マウスでは 200 ppm 以上で肺及び肝臓絶対重量が、400 ppm で腎臓絶対重量が低値を示したが、相対重量において有意な変化は認められなかった。成熟マウスでは 400 ppm で肺、肝臓及び腎臓絶対重量と肝臓相対重量の減少と、肺相対重量の増加が認められた。

幼若マウスの肺において AA 100 ppm から *gpt* MF の上昇傾向がみられ、200 ppm 以上で対象群に比べ約 3 倍の上昇が認められた。*Spi* assay については、200 ppm から *red/gam* MF の上昇傾向がみられ、400 ppm 群では対照群に比し約 3 倍の上昇が認められた。

### (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]

4、6、10 週齢 SD 系雄ラットに 0、25 及び 50 mg/kg 体重の用量で AA を強制経口投与し、最終投与 24 時間後に屠殺した。その結果、各週齢のラットとも AA の投与量に依存した体重増加抑制がみられた。その傾向は週齢に依存して 4 週齢より 6 週齢、6 週齢より 10 週齢で強い傾向を示した。精巣の小核については 10 週齢のラットでは用量依存的な増加が観察され、4、6 週齢では小核の誘発は観察されなかった。精巣のコメットは 4 週齢群では 50 mg/kg 投与群で、6、10 週齢群では 25、50 mg/kg 投与群で顕著な誘発が観察されたが、何れの群でも用量反応性は明らかではなかった。精巣における AA の主たる DNA 付加体である *M7-GA-Gua* を LC/MS/MS により測定した結果、全ての週齢において用量に応じた増加を示し

た。DNA 付加体量は 4 週齢において最も多く、次いで、6 週齢、10 週齢と蓄積量が減少した。

### 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 の飲水投与による発がん性試験では、20 mg/kg 群の雌雄各 2 例に神経症状（後肢開脚）がみられ、雄では 46 週以降、雌では 23 週以降、急激な体重減少あるいは一般状態の悪化した動物が散見され、適宜切迫屠殺した。その結果、特に雌では 36 週以降、20 mg/kg 群の明らかな生存率低下がみられた。長期投与試験としては比較的早い段階において高用量の 20 mg/kg が耐量を超えていることが懸念され、これを下げる必要性について検討したが、本試験では低用量群との公比が 2 であること、10 mg/kg 群では体重への影響も含め毒性を示唆する所見が認められなかったことから、適切な用量設定は容易ではないと考えられた。また、詳細な症状観察を頻繁に行い、人道的エンドポイントを見極めることで動物愛護の点からは容認されると判断し、投与量の変更は行わなかった。雌雄とも 78 週間の投与期間後に最終剖検を行ったが、対照群を含む各群の諸臓器において増殖性/腫瘍性病変の発生を示唆する肉眼所見が認められた。50 週目における雄の切迫屠殺例には肝細胞腺腫、36 週目の雌には肝細胞変異細胞巣及び上皮小体過形成がみられたことから、以降の切迫屠殺/死亡例を発がん性評価の有効数にすることとした。

ラットを用いた AA の飲水投与による発がん機序解析実験の 52 週投与群では、血清中の乳腺発がんに関与する可能性がある生理活性物質であるエストラジオール、インシュリン、IGF-I、レプチン及びアディポネクチンと甲状

腺関連ホルモンである T4 及び T3 の濃度を測定したが、AA 投与による明らかな変化はみられず、AA の長期投与による内分泌系に及ぼす影響は確認できなかった。一方、甲状腺濾胞上皮と乳腺終末導管における細胞増殖活性を比較した結果、甲状腺においては AA 投与による影響はみられなかったが、乳腺において統計学的有意差はなかったが用量に対応した増加傾向を示した。また、後述する 104 週投与群の切迫屠殺例の乳腺組織では増殖シグナルの活性化状態を示すリン酸化 ERK-1/2 の発現上昇がみられた。本実験で得られた試料を用いて、乳腺組織に対する AA の影響について引き続き詳細に検討する。

ラットを用いた AA の飲水投与による発がん機序解析実験の 104 週投与群では、一般状態の観察により、3.0 mg/kg 群における皮下結節/腫瘍発生の早期化傾向および発生頻度の増加がみられ、既報のラットを用いた AA の飲水投与による発がん性試験 (Friedman MA ら、1995) における乳腺腫瘍の増加と関連していると考えられた。また、1.5 及び 3.0 mg/kg 群において少数例ながら舌腫瘍がみられ、3.0 mg/kg 群において甲状腺結節が増加傾向を示したことについても既報のデータと一致すると考えられた。切迫屠殺例から採取した対照群及び 3.0 mg/kg 群の正常 (様) 乳腺組織及び乳腺腫瘍 (線維腺腫) について、ERK-1/2 及びリン酸化 ERK-1/2 の発現を比較検討した結果、3.0 mg/kg 群の正常 (様) 乳腺組織について明らかな活性化がみられ、次いで対照群及び 3.0 mg/kg 群の乳腺腫瘍が軽度な活性化を示した点については、AA による乳腺組織に対する直接的あるいは内分泌系などを介する間接的な影響が示された。直接的な影響としては、AA の遺伝毒性による遺伝子突然変異に伴う変化の可能性があり、今回の実験においてもラット乳腺発がんに関与することが報

告されている *H-ras* 遺伝子の変異について、対照群及び 3.0 mg/kg 群の正常 (様) 乳腺組織及び乳腺腫瘍 (線維腺腫) を用いて比較検討した。その結果、限られた検索数の中では AA 投与による変異は観察されなかったが、検索例数を増やすなど検討を継続する必要がある。また、AA には組織におけるグルタチオンの枯渇を介する酸化的ストレスを誘発する作用を有することが示されているが、乳腺組織では肝組織に比較してグルタチオン濃度が低いと考えられ、GST の活性も肝臓の 1/20 程度とする報告もあることから (Fanelli SL ら、2010)、AA による影響と受けやすい可能性が考えられ、本試験で得られた試料を用いた検討を要する。一方、内分泌系などを介する間接的な影響についてもプロジェステロンなど今回検索しなかった血清ホルモン濃度の測定や 104 週投与群に対する検索など引き続き検討を行う必要がある。

(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]

i) 若齢マウスを用いた 4 週間投与実験

昨年度の肺に引き続き、本年度は、AA を 4 週間投与した *gpt delta* マウスの肝臓及び腎臓における *in vivo* 変異原性について検索した。昨年報告した各臓器 DNA 中 8-OHdG レベルについては、500 ppm 投与群の肝臓においてのみ上昇したが、今回、肝臓の *in vivo* 変異原性を検索した結果、低用量より上昇が認められた。また、変異体のスペクトラム解析では、8-OHdG が引き起こす代表的な突然変異である GC-TA transversion 変異頻度に変化は認められなかったことから、肝臓の *gpt* 及び *Spi-MF* の上昇に 8-OHdG は関与しないことが示された。AA のマウス肝発がん性はこれまで報告されていないが、AA の代謝物である GA は肝発

がん性を有し、特異的 DNA 付加体の生成も報告されていることから、本研究で認められた肝臓における AA の変異原性は GA を介した作用であることが考えられた。また、AA の非発がん標的臓器である腎臓においても 500 ppm 群でのみ上昇が認められたが、ばらつきも大きいことから、一般状態の悪化に起因する可能性も考えられた。本研究結果では AA の遺伝毒性メカニズムに酸化的 DNA 損傷の関与は明らかとはならなかったが、今後、酸化ストレス関連遺伝子の発現解析を実施し、より詳細な解析を継続する。また、AA 特異的 DNA 付加体の定量的解析も併せて実施する。

#### ii) 幼若及び成熟マウスを用いた 4 週間投与実験

本年度は幼若及び成熟マウスを用いた 4 週間の AA 投与実験を終了し、幼若マウスの肺における *gpt* assay 及び *Spi*<sup>-</sup> assay を実施した。400 ppm 群の体重あたりの AA 摂取量は幼若マウスに比し成熟マウスで高いにもかかわらず、AA の神経毒性に起因すると考えられる後肢麻痺は幼若マウスでより強く認められ、途中死亡も高頻度に認められたことから、幼若マウスでは AA の神経毒性に対する感受性が高いことが示唆された。*gpt* assay 及び *Spi*<sup>-</sup> assay による *in vivo* 変異原性の検索では、幼若マウスにおいて AA の発がん標的臓器である肺の *gpt* MF 及び *red/gam* MF の有意な上昇が認められた。今後、AA の遺伝毒性に対する感受性の違いについては、成熟マウスの解析結果をもって考察する。また、肝臓、腎臓についても同様の解析を実施するとともに、各臓器における 8-OHdG レベルの測定により酸化ストレスへの感受性の違いを明らかにすることで、AA の発がんメカニズムにおける酸化ストレスの役割を明らかにする。

(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]

昨年度、3 週齢 (幼若) 及び 11 週齢 (成熟) の SD 系ラットに AA を 28 日間飲水投与した結果、肝臓のコメット、末梢血の *pig-A* 突然変異などにおいて、幼若、成熟間の差は認められなかった。一方、精巣では幼若ラットにおける小核、コメットの明らかな誘発と、顕著な DNA 付加体の蓄積が認められた。

今年度は、ライフステージの違いによる AA の精巣での遺伝毒性感受性の差を更に詳細に検討する目的で、4、6、10 週齢の SD 系ラットに 25 及び 50 mg/kg の AA を 1 週間強制経口投与し、精巣での遺伝毒性 (コメット試験、小核試験) と DNA 付加体量を検討した。飲水投与に用いた最高濃度である 200 ppm では AA の 1 日摂取量は 11 週齢ラットで 18 mg/kg/日、3 週齢ラットで 25 mg/kg/日であったことから、今回の強制経口投与ではその 2 倍以上の AA を 1 週間摂取したことになる。

小核試験では AA による小核の誘発、また週齢差は顕著ではなかった。10 週齢に見られた有意な誘発は、陰性対照群が低値であったことに起因し、生物学的意味はないものと考えられる。コメットは全ての週齢で、AA による顕著な誘発が観察された。これまでの飲水投与の実験でも、小核の誘発は明らかでなく、コメットの誘発は用量依存的に誘発したことが観察された。精巣の遺伝毒性の評価にはコメット試験、遺伝子突然変異試験が有効であるのかもしれない。しかしながら、AA は本来、精巣で強い染色体異常が観察されることが報告されており、効率的な精巣での遺伝毒性の検出にはさらなる検討が必要と考えられる。

AA は生体内で CYP2E1 によって代謝活性化を受け、GA に変化する。GA は *N7-GA-Gua*、

N3-GA-Ade、M1-GA-Ade の 3 種類の DNA 付加体を生成することが知られている。この中で N7-GA-Gua が全体の 90%以上を占めるため、この付加体にも注目して測定した。精巣での N7-GA-Gua は全ての週齢のラットで用量依存的に増加し、特に 4 週齢でその蓄積量は高かった。また、6 週齢と 10 週齢の差は顕著ではなかった。昨年度行った実験では、3 週齢のラットに AA を飲水投与することにより、付加体の生成量が顕著に増加したことから、4 週齢以下の幼若ラットの精巣が特に AA に対して感受性が高いものと考えられる。また、4 週齢での 25 及び 50 mg/kg 投与での差は明らかでなく、25 mg/kg 以下の飲水投与では用量依存的な付加体の生成が観察されていることから、高濃度では付加体生成が飽和しているものと考えられる。

幼若ラットで付加体生成量が増加する機序は明らかではないが、最近 Takahashi らが精巣中の GST 活性が、幼若ラットで有意に低いことを報告している。AA や GA は GST によって抱合反応を受け、解毒されると考えられている。この解毒反応の低下が、幼若ラットの精巣での付加体量の増加を説明できるかもしれない。しかしながら、他の遺伝毒性マーカーの差は顕著ではない。その検出のタイミングが重要と考えられ、経時的な遺伝毒性のモニタリングが必要である。また、幼若期の精巣での高感受性をヒトへ外挿するためには、マウスを用いて同様に検証する必要がある。

## 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]

ハムスターを用いた発がん性試験については、雌雄とも 78 週の投与期間終了後の最終剖検を終了した。対照群を含む各群の諸臓器に

おいて増殖性/腫瘍性病変の発生を示唆する肉眼所見が認められたため、投与期間は的確に見極められたと考えられる。現在、組織標本の作製ならびに病理組織学的検査を進めている。ラットを用いた発がん機序解析実験では、AA の長期投与による乳腺組織における細胞増殖の活性化を示すリン酸化 ERK の発現上昇がみれたことから、AA の乳腺組織における酸化ストレスの誘発など直接作用及び内分泌系などへの影響を介する間接作用の両面より解析を継続する。

### (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]

6 週齢の C57BL/6 *gpt delta* マウスを用いた実験では、AA とその代謝物である GA のマウス発がん標的臓器である肺と肝臓において、AA 投与による点突然変異頻度ならびに欠失変異頻度の上昇が認められたことから、マウスにおける AA の発がん機序に遺伝毒性メカニズムの関与が強く示唆された。一方、AA の遺伝毒性メカニズムに酸化的 DNA 損傷の関与は明らかとはならなかった。

3 週齢及び 11 週齢の B6C3F<sub>1</sub> 系 *gpt delta* マウスを用いた実験では、幼若マウスは AA の神経毒性に対して感受性が高いことが示唆された。また、肺において点突然変異頻度ならびに欠失変異頻度の上昇が認められ、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。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]

4、6、10週齢のSDラットに25及び50mg/kg体重のAAを1週間強制経口投与し、精巣での遺伝毒性(コメット試験、小核試験)とDNA付加体量を検討した。DNA付加体生成量は用量に応じて増加し、また幼若になるほどその蓄積量は増加したことから、これまでの報告と同様に、AAは幼若期の精巣で、成熟期に比し高い感受性を示すことが示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takami, S., Imai, T., Cho, Y.M., Ogawa, K., Hirose, M., Nishikawa, A. Juvenile rats do not exhibit elevated sensitivity to acrylamide toxicity after oral administration for 12 weeks. J. Appl. Toxicol (In press)

2) Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinoue, N., Honma, M. Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. Environ Mol Mutagen. 52, 12-19 (2011)

3) Takahashi, M., Inoue, K., Koyama, N., Yoshida, M., Irie, K., Morikawa, T., Shibutani, M., Honma, M., Nishikawa, A. Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity. Arch Toxicol. (In press)

4) Koyama N, Yasui M, Kimura A, Takami S, Suzuki T, Masumura K, Nohmi T, Masuda S, Kinoue N, Matsuda T, Imai T, Honma M. Acrylamide

genotoxicity in young versus adult gpt delta male rats. Mutagenesis. (In press)

##### 2. 学会発表

1) Imai, T., Watari, T., Hayakawa, T., Kitahashi, T.: Effects of chronic acrylamide exposure on systemic hormonal environment and carcinogenic target organs in F344 female rats. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology. ワシントンD.C. (2011年3月)

2) Ishii, Y., Suzuki, Y., Hibi, D., Jin, M., Kodama, Y., Nohmi, T., Fukuhara, K., Umemura, T., Nishikawa, A.: Possible participation of oxidative DNA damage in acrylamid-induced in vivo mutagenicity. 69<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 大阪市 (2010年9月)

#### 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 22 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

独立行政法人国立がん研究センター研究所動物実験支援施設 支援施設長

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 78 週間飲水投与による発がん性試験を雌雄とも 0 (対照)、10、20 mg/kg 体重の用量で継続し、剖検が終了した。肉眼的には対照群を含め肝臓、膵臓、前胃、副腎などに結節/腫瘍が散見され、雌雄とも 10、20 mg/kg 群の前胃結節の発生頻度が対照群に比し増加傾向を示した。現在、組織標本の作製ならびに病理組織学的検査を進めている。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 52 週間及び 104 週間投与する実験では、AA の発がん機序を明らかにする目的で発がん標的臓器における細胞増殖活性あるいは内分泌環境への影響を解析している。その結果、乳腺組織における細胞増殖の活性化を示すリン酸化 ERK の発現上昇や細胞増殖率の増加傾向が示されたが、引続き検討を継続する。

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に対する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乳がん (Pedersen GS ら、2010)、子宮内膜がんや卵巣がん (Wilson KM ら、2010) の発生率が高いとする報告もみられ、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 (Swaen 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 に対し膵管発がん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脾臓を含む全身諸臓器・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、昨年度より継続しているハムスターを用いた AA の 78 週間飲水投与による発がん性試験について、今年度は最終剖検を終了した。また、F344 雌ラットに対して AA を発がん用量にて 52 週間及び 104 週間投与する実験を行った。ラットを用いた実験では、AA の発がん機序を明らかにする目的で、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解析している。

## B. 研究方法

### 1. 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、体重に基づく層別化法により各群 30 匹の 3 群に分け、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。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/日とし、飲水に混じて投与した。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。飲水中の AA 濃度は、平均体重と前週の飲水量に基づいて算出した。雌雄とも 78 週間の投与後にイソフルラン麻酔下にて脱血により安楽死させて剖検を行った。剖検時には、心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓、脳、眼球及びその付属器、下垂体、甲状腺及び上皮小体、副腎、気管、大動脈、縦隔、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)、脾臓、膀胱、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膣、坐骨神経、三叉神経、大腿筋、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)、肉眼的異常部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定、全例について常法に従い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、病理組織学的検査を進めている。

### 2. ラットを用いた発がん機序解析実験

F344 ラット (5 週齢、雌 91 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、体重に基づく層別化法により 31、30、30 匹の 3 群に分け、6 週齢で実験に供した。動物の飼育環境はハムスターを用いた発がん性試験と同様とした。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 52 あるいは 104 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 回測定した。飲水は 1 週間に 1 回交換し、その都度、飲水量を測定した。飲水中の AA 濃度は、平均体重と前週の飲水量に基づいて算出

した。

52 週投与後の剖検では、各群 10 匹の動物について、エーテル麻酔下にて腹大動脈より採血後、脱血により安楽死させた。脳、肝臓、腎臓、副腎、下垂体及び甲状腺を摘出、重量を測定後（副腎、下垂体及び甲状腺については固定後に測定）、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、全例について常法に従い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、病理組織学的に検索した。膵臓、乳腺、卵巣、子宮及び膣についても同様に病理組織学的検索を行った。また、一部の組織については液体窒素にて凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

・採血により得られた血清については、乳腺発がんに関与する可能性がある生理活性物質として市販の ELISA キットを用い、インシュリン (Merckodia ; Uppsala、スウェーデン)、IGF-I (R&D Systems ; MN、米国)、レプチン (矢内原研究所 ; 静岡) 及びアディポネクチン (AdipoGen ; Incheon、韓国) の濃度を測定し、エストラジオール及び甲状腺関連ホルモン (T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>) の濃度は SRL (東京) に委託して測定した。

・甲状腺及び乳腺組織のパラフィン包埋切片に対して Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 免疫組織化学 (一次抗体 : クローン PC10、ダコ・ジャパン ; 東京) を行い、濾胞上皮及び終末導管における陽性率を算出し細胞増殖活性を評価した。

・統計方法 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。

104 週間投与後の剖検では、各群 20 匹 (対照群のみ 21 匹) の動物のうち全生存例について、イソフルラン麻酔下にて脱血により安楽死させ、乳腺組織及び肉眼的異常部位を 10%中

性緩衝ホルマリン液にて固定した。また、一部の組織については液体窒素にて凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。なお、104 週間投与群については、実験途中において長径が概ね 20 mm 以上の皮下腫瘍が確認された段階で切迫屠殺し、最終剖検時と同様に試料を採取した。

・切迫屠殺例の一部より採取し、凍結保存した乳腺及び乳腺腫瘍組織からタンパクを抽出し、増殖シグナルの活性化状態を評価するため、ウエスタンブロッティングにより Extracellular signal-regulated kinase (ERK) -1/2 (一次抗体 : R&D Systems ; MN、米国) 及び phospho (リン酸化)-ERK-1/2 (同上) の発現を解析した。

・切迫屠殺例の一部より採取し、凍結保存した乳腺及び乳腺腫瘍組織から DNA を抽出し、乳腺腫瘍の発生に対する H-ras 遺伝子変異の関与の有無を検索するため、エクソン 1 (コドン 12、13) 及びエクソン 2 (コドン 61) についてシーケンス解析を行った。

・統計方法 肉眼所見の発生頻度について Fisher の直接確率検定法を用いて有意差検定を行った。

#### (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あるいはイソフルラン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。ハムスターを用いた発がん性試験では高用量群において重篤な神経症状がみられた場合あるいはハムスター及びラットの実験ともに急激な体重減少を含む一般状態の悪化がみられた場合には、人道的エンドポイントと判断して切迫屠殺した。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試験

#### 1) 一般状態および生存率

20 mg/kg 群の雄 1 例が投与開始 18 週目に死亡した。死因は不明であった。また、20 mg/kg 群の雌 1 例は 11 週目に闘争による側胸部外傷により死亡した。以降、闘争のみられた動物については適宜個別に飼育した。20 mg/kg 群の雄 1 例は投与開始 50 週より、別の 1 例は 62 週より、雌 1 例は 42 週より、別の 1 例は 54 週より神経症状（後肢開脚）を呈した。また、20 mg/kg 群の雄では 46 週以降、雌では 23 週以降、20%以上の急激な体重減少あるいは緩徐ではあっても著しい体重減少や自発運動低下を伴う一般状態の悪化した動物が散見され、適宜切迫屠殺した。AA 投与に起因すると考えられる結節/腫瘍の発生はみられなかった。雌雄各群の生存率の推移を図 1 に示した。雄では AA 投与による生存率の顕著な差はみられなかったが、雌では投与開始 36 週目以降、20 mg/kg 群の明らかな生存率低下がみられた。

#### 2) 体重、摂餌量及び摂水量

雌雄各群の体重の推移を図 2 に示した。20 mg/kg 群の雌雄では、投与開始 30 週目から対照群に比し低下傾向を示し、以降実験終了時まで低値を示した。摂餌量については、20 mg/kg 群の雄において、投与 38 週以降、対照群に比し低下傾向を示したが、雌においては群間の明らかな違いはみられなかった。摂水量については、AA 投与による影響はみられなかった（図 3）。

#### 3) 剖検

最終剖検時における主な肉眼所見を表 1 にまとめた。対照群を含め肝臓、膵臓、前胃、副腎などに腫瘍/結節が散見され、雌雄とも 10、20 mg/kg 群の前胃結節の発生頻度が対照群に比し増加傾向を示した。

#### 4) 病理組織学的検査

50 週目における雄の切迫屠殺例には肝細胞腺腫、36 週目における雌の切迫屠殺例には肝細胞変異細胞巣及び上皮小体過形成がみられたことから、以降の切迫屠殺/死亡例を発がん性評価の有効数にすることとした。現在、組織標本の作製ならびに病理組織学的評価を進めている。

### 2. ラットを用いた発がん機序解析実験

#### 1) 一般状態および生存率

52 週間の投与期間中において、AA 投与に起因すると考えられる死亡および一般状態の変化はみられなかった。104 週投与群については、0、1.5 及び 3.0 mg/kg 群において、各々投与開始 80、84 及び 71 週目より皮下結節/腫瘍が発生し、実験終了時までの発生頻度は各々 5/20 (25%)、2/20 (10%) 及び 12/20 (60%) であった。また、1.5 及び 3.0 mg/kg 群に腹腔内腫瘍や飲水障害を伴う舌腫瘍がみられるなど、増殖性/腫瘍性病変の発生を示唆する所見が散見された。その他、1.5 mg/kg 群には削瘦あるいは貧血を呈する動物もみられた。途中死亡および結節/腫瘍発生に伴う切迫屠殺などにより、最終剖検時における生存率は、0、1.5 及び 3.0 mg/kg 群において、各々 18/20 (90%)、11/20 (55%) 及び 7/20 (35%) であった。

#### 2) 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なかった。

#### 3) 剖検及び臓器重量

52 週投与後の剖検において、対照群の 1 例の子宮および別の 1 例の下垂体に腫瘍/結節がみられた以外、肉眼的に明らかな変化は認められなかった。臓器重量についても群間の明らかな差はみられなかった（表 2、3）。104 週投与後の剖検においては、皮下腫瘍/結節のほか、下垂体結節/暗赤色班、子宮腫瘍など、種々の

増殖性/腫瘍性病変の発生を示唆する変化が認められた。切迫/途中死亡例を含む 104 週投与群における剖検時の主な肉眼所見の発生頻度を表 4 にまとめた。皮下の腫瘍/結節の発生頻度は 3.0 mg/kg 群において対照群に比し増加した ( $p < 0.01$ )。甲状腺の結節についても 3.0 mg/kg 群において増加傾向を示し、舌/口腔の腫瘍/結節については対照群にはみられなかったが、1.5 及び 3.0 mg/kg 群にて各 1 及び 2 例に認められた。

#### 4) 血清生化学検査

52 週投与後の血清を用いて、乳腺発がんに関与する可能性がある生理活性物質としてエストラジオール、インシュリン、IGF-I、レプチン及びアディポネクチンと甲状腺関連ホルモンである T4 及び T3 の濃度を測定したが、AA 投与による明らかな変化はみられなかった (図 4)。

#### 5) 病理組織学的検査

52 週投与群の検索対象臓器において、AA 投与に関連する変化は認められなかった。対照群の 1 例の子宮および別の 1 例の下垂体に腫瘍/結節については、各々前葉のがん及び内膜間質ポリープであった。

#### 5) 発がん標的臓器における細胞増殖活性

52 週投与群の甲状腺濾胞上皮と乳腺終末導管における PCNA 陽性率を比較した結果、甲状腺においては AA 投与による影響はみられなかったが、乳腺において統計学的有意差はなかったが用量に対応して増加傾向を示した (図 5)。

#### 6) 乳腺及び乳腺腫瘍における ERK の活性化

104 週投与群の切迫屠殺例から採取した対照群 2 例の正常 (様) 乳腺組織、1 例の乳腺腫瘍 (線維腺腫)、3.0 mg/kg 群 2 例の正常 (様) 乳腺組織及び 2 例の乳腺腫瘍 (線維腺腫) について、ERK-1/2 及びリン酸化 ERK-1/2 の発現をウエスタンブロットにて比較検討した結果、

3.0 mg/kg 群の正常 (様) 乳腺組織において明らかな活性化がみられ、次いで対照群及び 3.0 mg/kg 群の乳腺腫瘍が軽度な活性化を示した (図 6)。

#### 7) 乳腺腫瘍における H-ras 遺伝子の変異

104 週投与群の切迫屠殺例から採取した対照群の乳腺腫瘍 (線維腺腫) の 1/2 例において、H-ras 遺伝子コドン 13 における GGC から GGG への変異を示す所見が得られたが、同一個体の正常 (様) 乳腺組織、3.0 mg/kg 群の 3 例の正常 (様) 乳腺組織及び乳腺腫瘍 (線維腺腫) の何れにも変異は認められなかった (図 7)。

### D. 考察

ハムスターを用いた AA の飲水投与による発がん性試験では、20 mg/kg 群の雌雄各 2 例に神経症状 (後肢開脚) がみられ、雄では 46 週以降、雌では 23 週以降、急激な体重減少あるいは緩徐ではあっても著しい体重減少や自発運動低下を伴う一般状態の悪化した動物が散見され、適宜切迫屠殺した。その結果、特に雌では 36 週以降、20 mg/kg 群の明らかな生存率低下がみられた。長期投与試験としては比較的早い段階において高用量の 20 mg/kg 体重が耐量を超えていることが懸念されたため、これを下げる必要性について検討したが、本試験では低用量群との公比が 2 であること、10 mg/kg 群では体重への影響も含め毒性を示唆する所見が認められなかったことから、適切な用量設定は容易ではないと考えられた。また、詳細な症状観察を頻繁に行い、人道的エンドポイントを見極めることで動物愛護の点からは容認されると判断し、投与量の変更は行わなかった。文献的にはシリアンハムスターの長期飼育を行った結果、平均生存期間が雄で 60 週間、雌で 41 週間とする報告もあり (Birt DF ら、1985)、本試験における飼養条件は適切であったと考