

Table 3 Water consumption data and intake of AA

Group	Water consumption (ml/mouse/day)	AA intake	
		(mg/mouse)	(mg/kg/day)
Young			
Control	4.9	-	-
100 ppm	4.2	11.7	21.8
200 ppm	3.0	17.0	41.2
400 ppm	1.2	11.1	46.2
Adult			
Control	8.2	-	-
100 ppm	6.4	17.9	22.5
200 ppm	5.4	30.1	38.6
400 ppm	3.8	42.1	59.2

Table 4 Final body, absolute and relative lung, liver and kidney weights of young male *gpt* delta mice

Item	Control	AA		
		100 ppm	200 ppm	400 ppm
No. of animals	10	10	10	4 ^a
Body weight (g)	23.21 ± 0.76	21.52 ± 1.07*	18.08 ± 1.62**	7.63 ± 0.53**
Absolute (g)				
Lungs	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.02**	0.07 ± 0.01**
Liver	1.20 ± 0.07	1.10 ± 0.11	0.96 ± 0.16**	0.32 ± 0.04**
Kidneys	0.34 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.27 ± 0.05	0.13 ± 0.02**
Relative (g%)				
Lungs	0.58 ± 0.04	0.60 ± 0.06	0.63 ± 0.08	0.93 ± 0.11
Liver	5.19 ± 0.24	5.10 ± 0.39	5.29 ± 0.53	4.26 ± 0.62
Kidneys	1.45 ± 0.05	1.48 ± 0.06	1.50 ± 0.14	1.63 ± 0.10

*, **: p<0.05, 0.01 vs. Control group

^a : Of the mice treated with 500 ppm AA, six animals died at 2 to 4 weeks.

Table 5 Final body, absolute and relative lung, liver and kidney weights of adult male *gpt* delta mice

Item	Control	AA		
		100 ppm	200 ppm	400 ppm
No. of animals	10	10	10	10
Body weight (g)	30.57 ± 1.43	28.57 ± 1.69	28.36 ± 1.84	19.68 ± 2.21**
Absolute (g)				
Lungs	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.01**
Liver	1.51 ± 0.15	1.47 ± 0.13	1.43 ± 0.16	0.78 ± 0.12**
Kidneys	0.43 ± 0.05	0.43 ± 0.06	0.41 ± 0.05	0.27 ± 0.02**
Relative (g%)				
Lungs	0.52 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.55 ± 0.04	0.65 ± 0.05**
Liver	4.94 ± 0.31	5.12 ± 0.62	5.05 ± 0.35	3.94 ± 0.27**
Kidneys	1.42 ± 0.12	1.51 ± 0.21	1.45 ± 0.09	1.39 ± 0.10

*, **: p<0.01 vs. Control group

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長期間低暴露の遺伝毒性影響に関する研究

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： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室
堀端克良 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、ベビーフード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。これまでの我々のラットを用いた研究では、精巣において、幼若ラットは成熟ラットと比較し、わずかな突然変異の誘発と、顕著な DNA アダクトの蓄積が認められたことから、幼若期の精巣での AA の遺伝毒性感受性が指摘された。本年度は、さらに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検討する目的で、4、6、10 週齢の SD ラットに 25、もしくは 50mg/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 アダクト量を検討した。各週齢間で小核の誘発は観察されなかったが、コメットは用量依存的に増加した。しかしながら、週齢間で差は見られなかったが、一方、DNA アダクト生成量は、用量依存的に増加し、また幼若になるほどその蓄積量は増加した。以上のことから、AA の精巣に対する感受性は、幼若になるほど増加することが確認された。今後、マウスを用いてこの現象を確認すると同時に、ライフステージの違いによる精巣傷害性の差を解明したい。

キーワード；アクリルアミド(AA)、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 IARC ではグループ 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、強い遺伝子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ことが示唆された。

AAは生体内で薬物代謝酵素CYP2E1によって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。また、GAはグルタチオン転移酵素のによって解毒される。従って両酵素のバランスによって発がんリスクが決定されると考えられるが、これら酵素は新生児期と成熟期では、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。

これまでの我々のラットを用いた研究で、AAを28日間、3(幼若)、11(成熟)週齢のSDラットに飲水投与すると、多くの組織では顕著な遺伝毒性と、幼若、成熟間での差は認められなかったが、精巣において、幼若ラットは成熟ラットと比較し、わずかな突然変異の誘発と、顕著なDNAアダクトの蓄積が認められた。今年度は、さらに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検討する目的で、4、6、10週齢のSDラットに25、もしくは50mg/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アダクト量を検討した。

B. 研究方法

i) 動物

SDラット(雄)を日本エスエルシー(株)より購入し、馴化後4週、6週、および10週齢の動物を使用した。

ii) 投与

各週齢SDラットを3群各5匹ずつに分け、陰性対照群、25mg/kg投与群、50mg/kg投与群とした。AAを蒸留水で250mg/mlに調整し、連続7日間強制経口投与を行った。最終投与、24時間後にラットを屠殺した。

iii) 精巣小核試験

精巣の片側1/3を小核用サンプルとした。小核試験は林らの方法に従って行った。

iv) 精巣アルカリコメット試験

精巣の片側1/3をコメット試験用サンプルとした。アルカリコメット試験はJaCVAMコメット試験共同研究のプロトコールに従った。

v) DNAアダクトの定量

精巣の片側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、DNAアダクトの定量用サンプルとした。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

4、6、10週齢SDラットに25mg/kg、も

しくは 50mg/kg の AA を強制経口投与し、最終投与 24 時間後に屠殺した。投与開始 4 日目と、屠殺時の体重変化を図 1 に示す。各週齢のラットとも AA の投与量に依存した体重増加の抑制が観察された。その傾向は週齢に依存して強く表れる傾向が観察された。

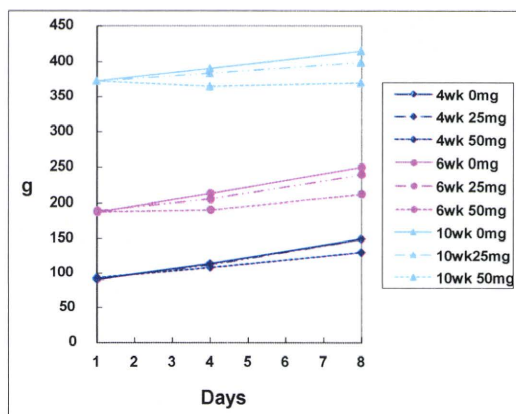


図 1 (体重変化)

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たが、4、6 週齢では小核の誘発は観察されなかった (図 2)。

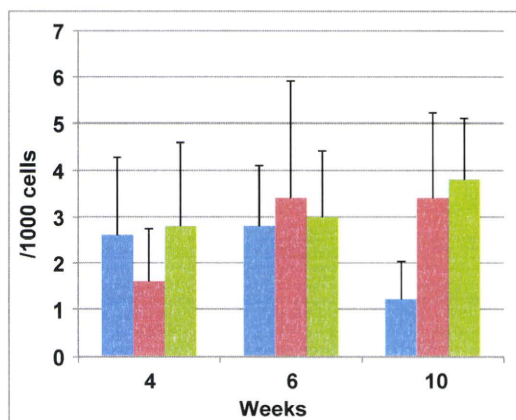


図 2 (精巣小核)

精巣のコメットは 4 週齢群では 50mg/kg

投与群で、6、10 週齢群では 25、50mg/kg 投与群で顕著な誘発が観察されたが、全ての群で用量依存性は明らかではなかった (図 3)。

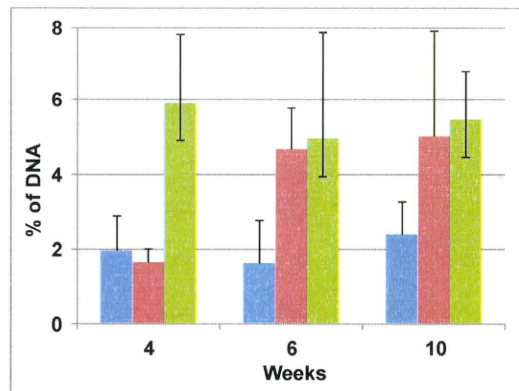


図 3 (精巣コメット)

精巣における AA の主たる DNA アダクトである *N7-GA-Gua* を LC/MS/MS により測定した。全ての週齢において DNA アダクトは用量依存的に増加した。DNA アダクト量は 4 週齢ラットが最も多く、次いで、6 週齢、10 週齢と蓄積量が減少した (図 4)。

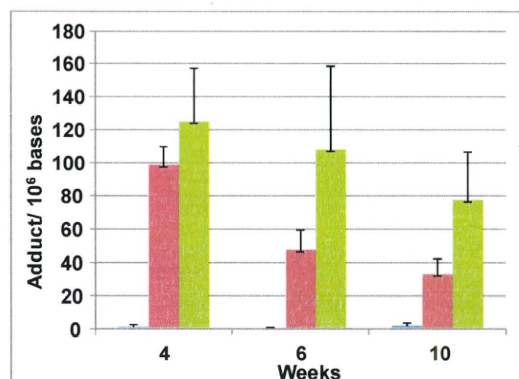


図 4 (精巣 DNA アダクト)

D. 考 察

これまでの我々のラットを用いた研究で、AA を 28 日間、3 (幼若)、11(成熟)週齢の SD ラットに飲水投与すると、多くの組織で

は顕著な遺伝毒性と、幼若、成熟間での差は認められなかったが、精巣において、幼若ラットは成熟ラットと比較し、わずかな突然変異の誘発と、顕著な DNA アダクトの蓄積が認められた。

今年度は、さらに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検討する目的で、4、6、10 週齢の SD ラットに 25、もしくは 50mg/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 アダクト量を検討した。飲水投与に用いた最高濃度である 200ppm では AA の一日摂取量は 11 週齢ラットで 18mg/kg/day、3 週齢ラットで 25mg/kg/day であったことから、今回の我々の強制経口投与量ではその倍以上の 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いる。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、グリシダミド (GA) に変化する。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。この中で N7-G-GA が全体の 90%以上を占めるため、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。これまでの我々の飲水投与の実験では 3 週齢のラットで、アダクトの生成量の顕著な増加が観察されたことから、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 25mg/kg と 50mg/kg 投与での差は明らかでなく、高濃度ではアダクト生成が飽和しているものと考えられる。飲水で行った、25mg/kg 以下の摂取量までの実験では用量依存的なアダクトの生成が観察されている。

幼若ラットでのアダクト生成の増加のメカニズムに関しては明らかではないが、最近 Takahashi らが精巣中のグルタチオントランスフェラーゼ (GST) の活性が、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アダクト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

4、6、10 週齢の SD ラットに 25、もしくは 50mg/kg の AA を 1 週間強制経口投与し、

精巢での遺伝毒性（コメット試験、小核試験）とDNAアダクト量を検討した。DNAアダクト生成量は、用量依存的に増加し、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は幼若期の精巢で、成熟期に比べ高い感受性を示すことが示唆された。AAの遺伝毒性のリスク評価には、低年齢層に対する特別な配慮が必要かもしれない。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.* 52, 12-19 (2011)

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.* (2011; in press)

Koyama N, Yasui M, Kimura A, Takami S, Suzuki T, Masumura K, Nohmi T, Masuda S, Kinae N, Matsuda T, Imai T, Honma M. Acrylamide genotoxicity in young versus adult gpt delta male rats. *Mutagenesis.* (2011; in press)

2. 学会発表

本間 正充；遺伝毒性試験とその科学的リレバンス 第11回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会 (2010.6)

Honma, M.; Novel approach for in vitro genotoxicity assessment

Novel Approaches in preclinical safety evaluation: Development and progress (2010.9)

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takami S, <u>Imai T</u> , et al.	Juvenile rats do not exhibit elevated sensitivity to acrylamide toxicity after oral administration for 12 weeks.	J Appl Toxicol	(in press)		
Koyama N, <u>Honma M</u> , et al.	Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems.	Environ Mol Mutagen	52	12-19	2011
Takahashi M, <u>Honma M</u> , et al.	Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity.	Arch Toxicol	(in press)		

Juvenile rats do not exhibit elevated sensitivity to acrylamide toxicity after oral administration for 12 weeks

Shigeaki Takami,^{a,*†} Toshio Imai,^{a,b} Young-Man Cho,^a Kumiko Ogawa,^a Masao Hirose^{a‡} and Akiyoshi Nishikawa^a

ABSTRACT: Acrylamide (AA), a neurotoxic, testicular toxic, genotoxic and carcinogenic chemical, has been reported to be formed in processed food, and sensitivity to AA intoxication in childhood is a concern. In the present study, to clarify the general toxicological profile of AA in juvenile rats, subchronic toxicity was evaluated in F344 rats administered AA in the drinking water at 0 (control), 10, 20 and 40 ppm, presented to the dams (three per group) immediately after the birth of their litters, through lactation (3 weeks), and directly to the offspring in their drinking water after weaning for a further 9 weeks (12 weeks total). Treatment with AA caused a decrease in body weights in 20 and 40 ppm F₁ females, compared with the controls. Average AA intake throughout the treatment period for the 10, 20 and 40 ppm groups after weaning was equivalent to 1.0, 2.1 and 4.4 mg kg⁻¹ body weight per day, respectively, in males and 1.2, 2.5 and 4.9 mg kg⁻¹ body weight per day, respectively, in females. No toxicologically significant organ weight changes were observed. AA-induced histopathological changes were limited to focal degeneration and necrosis of the seminiferous epithelium in the testes and desquamated epithelium in the ducts of epididymides, noted only in 40 ppm males. Taken together with previous reports, juvenile rats are not necessarily more susceptible to AA-induced toxicity as compared with young adults. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: acrylamide; juvenile rats; histopathology

INTRODUCTION

Acrylamide (AA), a vinyl monomer that improves the aqueous solubility, adhesion and cross-linking of polymers, is used as a mobility control agent for oil recovery, a flocculant for wastewater treatment and soil stabilization and a reagent for scientific research (IARC, 1994). There are many reports demonstrating various toxic effects of AA in experimental animals, including neurotoxicity (Burek *et al.*, 1980; LoPachin *et al.*, 2003; Tyl *et al.*, 2000a), testicular toxicity (Burek *et al.*, 1980; Yang *et al.*, 2005), reproductive toxicity (Tyl *et al.*, 2000a, b) and genotoxicity (Maniere *et al.*, 2005; Paulsson *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005). In addition, AA increased the incidence of lung and skin tumors in mice and consistently induced mesotheliomas, thyroid follicular cell and mammary tumors in two carcinogenicity studies in rats (Bull *et al.*, 1984a, b; Friedman *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1986). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has determined that AA is probably carcinogenic to humans (group 2A; IARC, 1994).

There have been several peripheral neuropathy cases as a result of AA intoxication by potential occupational exposure in man (Garland and Patterson, 1967; IARC, 1994; Spencer and Schaumburg, 1974, 1975), but environmental exposure under natural conditions, except for cigarette smoking, was previously thought to be excluded and controllable in the general population (Bergmark, 1997; IARC, 1994; Spencer and Schaumburg, 1975). However, in 2002, new analytical data from Swedish scientists showed spontaneous AA formation in fried and baked foods at various concentrations, e.g. moderate levels of AA (5–50 µg kg⁻¹) were detectable in heated protein-rich foods and higher contents

(150–4000 µg kg⁻¹) were detectable in carbohydrate-rich foods, while AA could not be measured in unheated control or boiled foods (<5 µg kg⁻¹) (Tareke *et al.*, 2002). The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) concluded that the average AA intake for the general population and high consumers was approximately 1 and 4 µg kg⁻¹ body weight per day, respectively, with margin of exposure (MOE) values of 200 and 50 for morphological changes, such as demyelination and/or degeneration of axons in nerves in rats, 310 and 78 for induction of mammary tumors in rats and 180 and 45 for induction of Harderian gland tumors in mice. These MOE values are relatively low compared with other genotoxic contaminants in foods (JECFA, 2010). Furthermore, human exposure levels to AA from cooked foods during childhood are estimated to be higher than in adults

*Correspondence to: Shigeaki Takami, Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. E-mail: takami-shigeaki@anpyo.or.jp

†Present address: Pathology and Clinical Examination Laboratory, Safety Assessment Unit, Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides, 582-2 Shiohinden, Iwata, Shizuoka 437-1213, Japan

‡Present address: Food Safety Commission, Cabinet Office, Akasaka Park Building 22nd Floor, 5-2-20 Akasaka, Minato-ku, Tokyo 107-6122, Japan

^aDivision of Pathology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^bCentral Animal Laboratory, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan