

20131012A

厚生労働科学研究費補助金

食品の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 23 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成 24年 3月 31日

厚生労働大臣 殿

住 所 〒154-0002 東京都世田谷区下馬3-20-2
フリカ ナ イ ト オ
研究者 氏 名 今井 俊夫 (印)
(所属研究機関 独立行政法人国立がん研究センター)

平成 23年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の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 14,290,000 円也 (うち間接経費 3,297,000 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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成24（2012）年 3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. Acrylamide genotoxicity in young vs. adult <i>gpt</i> delta male rats.	
3. Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems.	
4. 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（食品の安全確保推進研究事業）

平成 23 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 動物実験支援施設長

研究要旨

加工食品中に含まれるアクリルアミド (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。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の関与の可能性が指摘され、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た。[今井] 膵管発がん感受性を示すハムスターを用いた AA の飲水投与による長期投与試験において、前胃の乳頭腫/扁平上皮がんが誘発されたが、膵管がんは誘発されなかった。ラットを用いた長期投与実験では、乳腺組織において細胞増殖が活性化したが、組織中グルタチオン濃度に変化はなかった。[梅村] *gpt delta* マウスを用いた AA の飲水投与実験において、特異的 DNA 付加体の *N7-GA-Gua* 量は、肺および肝臓で用量依存的に増加したが、酸化ストレス応答因子 Nrf2 に転写制御を受ける遺伝子群は、肺で僅かに増加した程度に留まった。酸化 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine の上昇がみられなかった昨年度の結果を考慮すると、AA は酸化ストレスを惹起するが DNA の酸化傷害は誘発せず、AA の遺伝毒性に対する直接的な DNA 損傷の関与が示唆された。[本間] 幼若及び成熟 *gpt delta* マウスに AA を飲水投与した結果、赤血球の *Pig-a* 遺伝子及び精巢の *gpt* 遺伝子突然変異は増加したが、幼若及び成熟動物間で差はみられなかった。一方、精巣における DNA 付加体量は幼若マウスで顕著に増加し、ライフステージによる AA 代謝の違いに関連するものと考えられた。以上の結果と昨年度までに得られた研究成果より、AA の遺伝毒性および発がんメカニズムについて、直接的な DNA 損傷の影響が示唆され、内分泌環境に対する影響あるいは酸化ストレスが関与している可能性は低いと考えられた。

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。遺伝毒性メカニズムとしては、*N7*-GA-Gua を主体とした DNA 付加体の形成が直接的な原因であると考えられている。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。一方、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)、酸化ストレスが発がんに寄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膀胱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、

膀胱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膀胱に着目し、ニトロソ化合物の BOP に対し膀胱発がん感受性を示すハムスターを用いた AA の長期投与試験を実施し、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、酸化ストレス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 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、更に酸化ストレス応答因子 Nrf2 に転写制御を受ける遺伝子群の発現量を比較検討する。(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実施した。

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長期投与試験

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、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/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。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)、膵臓、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行った。

・統計解析方法 病理組織学的所見の発生頻度については、各臓器・組織毎に、対照群を含む何れかの群で前がん/腫瘍性病変が最初にみられた時点以降の動物を有効匹数とし、カイ二乗法により有意差検定を行った。

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31、30、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週投与後剖検群より得られた結果については、昨年度既に報告した。

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°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。

・最終剖検群の対照群6例(乳腺腫瘍なし)および3.0 mg/kg 群5例(乳腺腫瘍なし)、更に3.0 mg/kg 群の切迫屠殺4例(78~90週、乳腺腫瘍あり)から採取した乳腺組織中のグルタチオン濃度をGSH Quantification Kit(同仁化学研究所、熊本)を用いて測定した。

(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

C57BL/6 *gpt delta* マウス(6週齢、雄)にAAを0、125、250及び500 ppmの濃度で4週間飲水投与し、肺、肝臓及び腎臓を採取後、液体窒素により凍結し、 -80°C で保存した試料をN7-GA-Gua測定に用いた(動物実験は平成21年度に実施)。抽出したDNAの吸光度測定により濃度を算出し、 $50\mu\text{g}$ のDNAを測定に用いた。DNA溶液はN7-GA-Guaが最大の脱塩基量を示す条件下(37°C 、48時間)でインキ

ユベートし、内標準物質である $^{15}\text{N}_5$ -*N7*-GA-Gua を添加した後、限外濾過膜で 12,000xg、50 分間遠心分離した。ろ液は凍結乾燥させ、分析時に 10 μL の超純水で再溶解しサンプルとした。LC-MS/MS システムには Agilent 社製 1100 シリーズ LC システムと Micromass 社製 Quattro Ultima Pt を用いた。

Nrf2 関連遺伝子の発現解析では、組織より RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA 合成を行った後、7900HT Fast リアルタイム PCR システムにより解析した。遺伝子発現は Nrf2 によって転写調節される *HO-1*、*NQO1*、*TrxR1*、*GSTa4*、*GSTm1*、*GCLc* 及び *GCLm* について検索した。

・統計解析方法 遺伝子発現レベルについては、極度の一般状態の悪化が認められた 500 ppm 群を除き、Bartlett の等分散検定と Dunnett の多重比較検定で行った。

ii) 幼若及び成熟マウスを用いた 4 週間投与実験

3 及び 11 週齢の雄性 B6C3F₁ 系 *gpt delta* マウスを作成し、AA を 0、100、200 及び 400 ppm の濃度で 4 週間飲水投与し、肺を採取後、液体窒素により凍結し、8-OHdG、*N7*-GA-Gua 測定、*gpt* 及び Spi⁻ assay 用のサンプルとして -80°C で保存した（動物実験は平成 22 年度に実施）。

gpt assay : 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* mutant frequency (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⁻ 欠失変異の検出 : ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA (P2) 株) に感染させ、Spi⁻ 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⁻ 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⁻ 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。

肺 DNA 中 8-OHdG の測定では、DNA を抽出し、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/10⁵dG 量として算出した。

・統計解析方法 8-OHdG レベル、*gpt* 及び *red/gam* MF については、Bartlett の等分散検定と Dunnett の多重比較検定で行った。また、全身状態の悪化が認められた幼若マウスの 400 ppm AA 投与群はすべての解析から除外した。

iii) 抗酸化剤を用いた検討

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 系マウスを交配して得られた B6C3F₁ 系 *gpt delta* マウスを 6 週齢で実験に供した。

抗酸化剤はアスコルビン酸 (AsA)、 α -トコフェロール (TCP)、*N*-アセチルシステイン

(NAC) をそれぞれ 1%の濃度で飼料に混じ、AA の投与開始 1 週間前から投与した。AA の濃度はこれらまでの研究結果から 200 ppm を最適とし、脱イオン水に混じて 4 週間自由に摂取させた。対照群には AA を含まない脱イオン水を同期間自由に摂取させた。実験期間中、水の交換ならびに飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を毎日実施した。また、体重、飲水量ならびに摂餌量の測定は週 1 回行った。

4 週間の投与後、動物はイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肺、肝臓および腎臓を採取し、それぞれの重量を測定した。各臓器の一部を 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 assay 用のサンプルとして液体窒素により凍結し、測定まで -80°C で保存した。

(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]

国立医薬品食品研究所内で繁殖した *gpt* delta マウス (3 及び 10 週齢、雄) を用いて、AA を 0、100、200、400 ppm の用量で 28 日間飲水経口摂取させた。

Pig-a 遺伝子突然変異試験：Pig-a 遺伝子突然変異試験は Miura らの方法に従った。蛍光標識抗体 (抗 TER119/Erythroid Cells-PE/Cy7、及び抗 CD24-FITC) で赤血球を標識した。フローサイトメータによる解析には BD 社の FACS Canto II を使用した。

gpt 遺伝子突然変異試験：精巣の一部を採取、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。

DNA 付加体の定量：精巣一部を、液体窒素により凍結し冷凍保存した。後日 DNA を抽出し、DNA 付加体の定量用サンプルとした。AA による主たる DNA 付加体である *N7*-GA-Gua を

LC/MS/MS により測定した。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 \times 3.0mm) を用いた。

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 \times 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長期投与試験

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、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、各々適宜切迫屠殺した。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。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。

体重、摂餌量及び摂水量：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の低下傾向を示し、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。

剖検：対照群を含む各群の肝臓、脾臓、前胃、副腎などに腫瘍/結節が散見され、雌雄の 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：脾臓では、雌雄の対照群を含む各群にラ氏島由来の腫瘍性病変が高頻度にみられたが、脾管由来の腫瘍については、雌の 20 mg/kg 群の 1 例に腺がんが認められたのみであった。一方、前胃では、雌の 10 及び 20 mg/kg 群で乳頭腫および乳頭腫+扁平上皮がんの発生頻度が増加し、雄の 10 及び 20 mg/kg 群では、乳頭腫の発生頻度が増加傾向を示した。盲腸の腺がんが雌の 10 及び 20 mg/kg 群の各 1 例にみられたが、対照群には認められなかった。肺においても、対照群では細気管支/肺胞腺腫及び腺がんはみられな

かったが、雌雄の 10 及び 20 mg/kg 群で増加傾向を示した。その他の臓器・組織の前がん/腫瘍性病変の発生頻度に AA 投与による影響は認められなかった。また、非増殖/腫瘍性病変として、坐骨神経における軸索変性あるいは線維化を伴う神経線維萎縮が雌雄の 10 及び 20 mg/kg 群に用量反応性をもって認められた。

ii) ラットを用いた発がん機序解析実験

剖検：104 週投与後の剖検時、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。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。

乳腺組織におけるグルタチオン濃度：104 週投与群における最終剖検時の対照 6 例（乳腺腫瘍なし）および 3.0 mg/kg 投与群 5 例（乳腺腫瘍なし）、更に 3.0 mg/kg 群の切迫屠殺 4 例（乳腺腫瘍あり）から採取した乳腺組織中のグルタチオン濃度を測定した結果、対照および 3.0 mg/kg 投与群の間で差はみられなかった。また、乳腺腫瘍の有無による各個体での乳腺組織でのグルタチオン濃度にも差は認められなかった。

(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

N7-GA-Gua は、AA を投与したすべてのマウスの肺、肝臓及び腎臓で検出され、何れの臓器においても用量依存的な増加が確認された。生成量は腎臓が最も多く、続いて肺、肝臓の順であった。Nrf2 関連遺伝子の発現解析では、*HO-1*、*NQO1*、*TrxR1*、*GCLc*、*GCLm*、*GSTa4* の遺伝子発現レベルが肺において有意に増加した

ものの、その程度は僅かであった。

ii) 幼若及び成熟マウスを用いた4週間投与実験

幼若マウスの肺における *gpt* MF は GC-CG transversion、single bp 及び over 2 bp の欠失変異とともに 200 ppm 群で上昇し、Spi assay では 200 ppm 群で上昇傾向が認められた。成熟マウスにおいても *gpt* MF の上昇が 200 ppm 群から認められ、スペクトラム解析の結果、GC-TA transversion、AT-GC transition、single bp 及び over 2 bp の欠失変異頻度の有意な上昇が認められた。Spi assay では 200 ppm 群から上昇傾向が認められ、400 ppm 群において有意に上昇した。

肺の *N7-GA-Gua* は幼若、成熟マウスともに 100 ppm 群から検出され、用量依存的に増加した。一方、幼若マウスの肺 DNA 中 8-OHdG レベルに変化は認められなかった。

iii) 抗酸化剤を用いた検討

一般状態観察では、何れの群においても AA の神経毒性に関連する症状は認められなかった。また、実験期間中の体重推移は、抗酸化剤投与群において投与開始1週間後から実験終了まで有意な低値が認められたのに対し、AA 単独群では最終体重においてのみ低値を示した。飲水量及び AA 暴露量については、AA 単独群及び抗酸化剤併用群ともに対照群に比し飲水量の変化は認められず、AA 単独群、TCP、AsA 及び NAC 併用群の AA 暴露量は、40.4、43.8、44.2 及び 41.9 mg/kg 体重/日であった。最終体重および臓器重量については、AA 単独群では肺絶対及び相対重量の高値が、TCP 併用群では幼若マウスの肺絶対及び相対重量の高値に加え、腎絶対重量の低値と肝相対重量の高値が認められた。AsA 併用群では肺絶対及び相対重量の高値と肝及び腎絶対重量の低値が、NAC 併用群では肺及び腎相対重量の高値と肝

絶対重量の低値が認められた。

(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]

一般状態及び体重：10週齢の *gpt delta* マウスでは、400 ppm 群で強い毒性と体重抑制が観察され、3週齢のマウスでは、200 ppm 以上から強い毒性と顕著な体重抑制が観察された。幼若マウスでの 400 ppm は毒性が強く、一部のマウスが死亡したため、その後の投与量を 300 ppm に減じた。個体当たり、体重当たりの AA 摂取量は 200 ppm までは 3 及び 10 週齢の動物間に差は認められなかった。400 ppm では 10 週齢の動物で AA 摂取量が多かったが、これは 3 週齢の動物では強い毒性により飲水行動が困難だったためと考えられる。

赤血球の Pig-a 突然変異：3 及び 10 週齢のマウスともに、200 ppm 以上で顕著な遺伝子突然変異の誘発が観察されたが、週齢による差は認められなかった。また、400 ppm による突然変異頻度の抑制は細胞毒性に起因するものと考えられた。

精巣での *gpt* 突然変異：3 及び 10 週齢のマウスともに、200 ppm 以上で遺伝子突然変異の誘発が観察されたが、10 週齢では統計学的有意差がなかった。また、週齢による差も認められなかった。

精巣での *N7-GA-Gua* 付加体量：3 及び 10 週齢のマウスともに、用量依存的に *N7-GA-Gua* 付加体量が増加した。200 ppm 以上で週齢差が観察され、400 ppm では 10 週齢のマウスに比し、3 週齢のマウスにおいて 10 倍程度の *N7-GA-Gua* の蓄積が観察された。

D. 考察

(1) アクリルアミドの発がん性の種差に関する

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投与試験では、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えられる。また、雌雄とも 78 週間の投与期間の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。

病理組織学的検査では、膵臓において、雌雄の対照群を含む各群にラ氏島由来の腫瘍性病変が高頻度にみられたが、膵管由来の腫瘍は雌の 20 mg/kg 群の 1 例に認められたのみであり、AA はハムスターの膵管に対し発がん性を示さないことが明らかとなった。一方、前胃では、雌の 10 及び 20 mg/kg 群で乳頭腫及び扁平上皮がんの発生頻度が増加し、雄では

乳頭腫の発生頻度が増加傾向を示した。AA はその飲水投与によりラットの口腔粘膜（口唇、舌、歯肉を含む）に乳頭腫を (Johnson KA ら、1986)、マウスの前胃に乳頭腫/扁平上皮がんを (WHO、2011) 誘発することが報告されており、AA はラット、マウス及びハムスターの何れの動物種においても、その経口（飲水）投与により直接暴露される粘膜上皮に対して発がん性を示すことが明らかになった。今回のハムスターを用いた試験では、AA 投与群において少数例ながら盲腸においても腺がんが認められ、AA 投与による影響が否定できず、今後の詳細な検討を要する。肺においても、AA 投与により腺腫/腺がんが増加傾向を示し、マウスの発がん性試験の結果 (WHO、2011) との関連が示唆された。一方、乳腺、甲状腺など内分泌環境の影響を受ける臓器・組織での腫瘍性病変の発生頻度に変化はみられなかった。以上、ハムスターを用いて AA の飲水投与による長期投与試験を実施した結果、膵管発がんの誘発はみられなかったが、前胃において発がん性を示す結果が、肺においても発がん性を示唆する結果が得られた。従って、ラットにおいては AA の発がん性の機序として内分泌環境に対する影響が関与している可能性が否定できないものの、ハムスターにおいては遺伝毒性の直接的影響を考慮する必要があると判断された。

ハムスターを用いた長期投与試験でみられた AA 誘発性の非増殖/腫瘍性病変として、坐骨神経における軸索変性あるいは神経線維萎縮が 20 mg/kg 群のみならず、10 mg/kg 群でも顕著であり、一般状態観察でみられた神経症状や自発運動低下を伴う一般状態の悪化との関連性が示唆された。本試験に先立って実施した 13 週間飲水投与による予備試験の 20 mg/kg 群では、一般状態に変化は認められず、神経毒性は、坐骨神経にみられた概ね軽度な

病理組織学的変化に留まっていたことから、AA の投与期間の長期化により神経毒性が重篤化したものと考えられた。

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、乳腺終末導管における細胞増殖活性が用量に対応した増加傾向を示し、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ことから、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唆されたが、血清検査では内分泌系への影響を示す結果が得られなかったことを昨年度までに報告した。一方、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ほか、AA には組織におけるグルタチオンの枯渇を介する酸化ストレスを誘発する作用を有することが示されており、乳腺組織では肝組織に比較してグルタチオン濃度が低く、グルタチオン-S-トランスフェラーゼの活性も肝臓の 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た。そこで今回、104 週投与群における最終剖検時の対照群および切迫屠殺例/最終剖検時の 3.0 mg/kg 群の乳腺組織中のグルタチオン濃度を測定した結果、対照および 3.0 mg/kg 群の間で差はみられず、3.0 mg/kg 群における乳腺腫瘍の有無による個体間の差も認められなかった。以上より、ラットにおける乳腺発がんについても内分泌環境に対する影響あるいは酸化ストレスが関与していることを支持するデータは得られず、遺伝毒性の直接的影響を考慮する必要があると判断された。

(2) アクリルアミドの発がん過程への酸化 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

昨年度までの研究結果では、AA の発がん標的臓器である肺で *gpt* 遺伝子突然変異頻度の上昇が、AA の代謝物である GA の発がん標的臓器である肝臓で *Spi* 遺伝子突然変異頻度の上昇が認められ、AA のマウス発がん性への遺伝毒性メカニズムの関与が示唆された。酸化 DNA 損傷の指標である 8-OHdG レベルの変化は何れの臓器でも認められなかったことから、遺伝毒性への酸化ストレスの関与の可能性は低いと考えられた。今回、AA 及び GA の直接的な DNA 傷害に関連する *N7-GA-Gua* は何れの臓器からも検出され、用量依存的に増加したことから、*N7-GA-Gua* の形成が AA の突然変異誘発性に関与することが示唆された。また、発がん非標的臓器においても *N7-GA-Gua* の生成が報告されており、本実験条件下においても、発がん性の報告がない腎臓の DNA 付加体量が最も高かった。これは AA 及び GA の腎排泄に起因する可能性が考えられたが、AA による遺伝子突然変異は DNA 損傷だけでなく、それらに働く修復/合成酵素レベルの臓器特異性等にも関連する可能性が考えられた。

Nrf2 関連遺伝子の発現解析では、*GSTm1* を除くすべての遺伝子が肺においてのみ有意に変化したことから、AA 投与により臓器特異的に酸化ストレスが生じた可能性が考えられた。しかし、これら遺伝子の発現変化は何れも僅かで、何れの臓器にも 8-OHdG レベルの変化がみられなかったことから、AA により生じる酸化ストレスは、その程度は低く、核内 DNA 損傷を引き起こさない可能性が示された。

ii) 幼若及び成熟マウスを用いた 4 週間投与実験

昨年度までの研究結果では、AA の神経毒性に起因すると考えられる後肢麻痺が幼若マウスで強く認められ、途中死亡も高頻度にみられたことから、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された。また、幼若マウスの肺における *gpt* MF は用量依存的に上昇し、200 ppm 群では有意な増加が認められた。今年度、成熟マウスの肺における *gpt* 及び *Spi*⁻ assay を実施した結果、*gpt* 及び *red/gam* MF は用量依存的に増加したものの、その程度は幼若マウスと同程度であった。また、*gpt* 変異コロニーでは欠失変異が高頻度に観察され、幼若マウスと同様の変化であったことから、暴露時期による変異頻度及び変異パターン之差は認められないことが明らかとなった。さらに、肺の *N7-GA-Gua* レベルは幼若、成熟マウスともに用量依存的な増加が認められたが、生成量はほぼ同程度であったことから、AA による DNA 損傷の程度についても暴露時期による違いはないものと考えられた。一方、幼若マウス肺の 8-OHdG レベルは実験 i) の結果と同様に何れの投与量においても変化は認められず、幼若マウスにおける AA の遺伝毒性メカニズムにおいても酸化的 DNA 損傷の関与は認められなかった。

iii) 抗酸化剤を用いた検討

AA 投与による体重増加抑制への抗酸化剤の併用投与の影響はみられなかった。また、各投与群において認められた臓器相対重量の変化は何れも絶対重量の変化を伴わず、体重の低値に起因する変化と考えられた。

(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]

これまでの我々のラットを用いた研究では、AA を幼若、成熟ラットに飲水投与もしくは強制経口投与すると、多くの組織で遺伝毒性が観察されたが、幼若、成熟間での差は認められなかった。しかし幼若ラットの精巣においては、成熟ラットに比して突然変異の誘発と

顕著な DNA 付加体の蓄積が認められた。今年度は、この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之差を確認する目的で、トランスジェニックマウスを用いて、AA の遺伝毒性感受性之差を検討した。その結果、200 ppm 以上で *Pig-a* (赤血球)、*gpt* (精巣) 突然変異とも有意に増加したが、週齢間で差は見られなかった。一方、精巣における DNA 付加体生成量は用量依存的に増加し、幼若マウスでは蓄積量が顕著に高かった。体重当たりの AA 摂取量に週齢間で差はみられなかったことから、幼若期の精巣での AA の高蓄積性はライフステージに依存した AA の代謝に関連するものと考えられた。幼若期の精巣での AA の高蓄積性はラットでも観察され、摂取量を考慮しても幼若期には *N7-GA-Gua* 付加体が特異的に多く生成されるものと考えられた。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-G-Gua*、*N3-GA-Ade*、*N1-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。一方、AA および GA はグルタチオントランスフェラーゼ (GST) による抱合反応により解毒される。従って、付加体生成量は CYP2E1 による代謝活性化と、GSH による解毒反応のバランスによって決定される。幼若ラットでのこれら代謝反応の寄与に関しては明らかではないが、最近 Takahashi らにより精巣中の GST 活性が幼若動物で有意に低いことが報告されており (Takahashi M ら、2011)、GSH 反応の低下により幼若動物の精巣での付加体量の増加を説明できる可能性がある。DNA 付加体形成が成熟に比して幼若動物で顕著である一方、他の遺伝毒性マーカーの差は顕著ではなく、その原因は明らかではなかった。

E. 結論

AA の遺伝毒性及び発がんメカニズムとして、直接的な DNA 損傷の関与が示唆され、内分泌環境に対する影響あるいは酸化ストレスが関与している可能性は低いと考えられた。

(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長期投与試験およびラットを用いた発がん機序解析実験の結果より、両動物種に対する AA の発がん性について、内分泌環境への影響あるいは酸化ストレスが関与していることを支持するデータは得られず、遺伝毒性の直接的影響を考慮する必要があると判断された。

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

AA のマウス肺発がん遺伝毒性メカニズムが関与することを明らかにした。その遺伝毒性発現機序には直接的な DNA 損傷の関与が示唆され、酸化 DNA 損傷関与の可能性は低いと考えられた。また、幼若期では神経毒性に対する感受性が高いことが示されたが、遺伝毒性に対する感受性の差は認められなかった。

(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]

幼若および成熟 *gpt delta* マウスを用いた実験において、AA 投与により Pig-a (赤血球)、*gpt* (精巣) 突然変異とも増加したが週齢間で差はみられず、精巣における DNA 付加体生成量は幼若マウスで顕著に高かった。幼若期の精巣での AA の高蓄積性はライフステージに依存した AA の代謝に関連するものと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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., Kimura, A., Takami, S., Suzuki, T., Masumura, K., Nohmi, T., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., Imai, T., Honma, M. Acrylamide genotoxicity in young vs. adult *gpt delta* male rats. *Mutagenesis* 26, 545-549 (2011)

3) 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)

4) 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.* 85, 1109-1120 (2011)

2. 学会発表

1) 今井俊夫、早川拓也、菅野和夫、石井雅己、西川秋佳：アクリルアミドのシリアンハ

ムスターにおける 78 週間経口投与毒性試験.
第 28 回日本毒性病理学会. 東京 (2012 年 2
月)

2) Toshio Imai, Takuya Hayakawa, Akiyoshi
Nishikawa: Effects of chronic acrylamide
exposure on digestive organs in hamsters.
51st Annual Meeting of the Society of
Toxicology. サンフランシスコ (2012 年 3
月)

3) Yuji Ishii, Daisuke Hibi, Meilan Jin,
Yukio Kodama, Kumiko Ogawa, Akiyoshi
Nishikawa, Takashi Umemura: *In vivo*
mutagenicity and DNA damage in the lungs,
livers, and kidneys of *gpt* delta mice
treated with acrylamide. EUROTOX2011. パ
リ (2011 年 8 月)

4) Yuji Ishii, Shinji Takasu, Yuta Suzuki,
Daisuke Hibi, Meilan Jin, Yukio Kodama,
Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi
Umemura: *In vivo* genotoxicity of immature
gpt delta B6C3F₁ mice exposed to acrylamide.
70th Annual Meeting of the Japanese Cancer
Association. 名古屋 (2011 年 10 月)

5) 石井雄二、高須伸二、松下幸平、金 美蘭、
児玉幸夫、小川久美子、西川秋佳、梅村隆志:
アクリルアミドのマウス肺発がん過程におけ
る酸化ストレスの関与の可能性. 日本環境変
異原学会第 40 回大会. 東京 (2011 年 11 月)

6) 小山直己、安井学、木村葵、高見成昭、鈴木
拓也、増村健一、能美健彦、増田修一、木苗直秀、
松田知成、今井俊夫、本間正充: *gpt* トランス
ジェニックラットを用いたライフステージ (週
齢) を考慮したアクリルアミドの遺伝毒性評価.
第 38 回日本トキシコロジー学会. 横浜 (2011 年
7 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（食品の安全確保推進研究事業）

平成 23 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を用いてアクリルアミド (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実施した。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長期投与試験を雌雄とも 0 (対照)、10、20 mg/kg 体重の用量で継続し、病理組織学的評価が終了した。その結果、雌雄の 10、20 mg/kg 群における前胃乳頭腫/扁平上皮がんの発生頻度が対照群に比し増加あるいは増加傾向を示した。一方、膵管がんは雌の 10 mg/kg 群の 1 例にみられたのみであった。また、F344 雌ラットに対し 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/酸化ストレスへの影響を解析した。昨年度、AA 投与による乳腺組織における細胞増殖の活性化を示す結果を得たが、血液検査では内分泌系への影響は認められなかったことを報告した。今年度実施した乳腺組織におけるグルタチオン濃度の測定でも影響はみられなかった。以上、AA の発がん性について、内分泌環境への影響あるいは酸化ストレスが関与していることを支持するデータは得られず、遺伝毒性の直接的影響を考慮する必要があると判断された。

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。また、AA 投与によるグルタチオン (GSH) の枯渇による酸化ストレスが発がんに関与している可能性も否定できない。

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実施した。その目的のため、シリアンハムスターを用いて膵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、平成 21 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長期投与試験について、今年度は最終的な病理組織学的評価を終了した。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い、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た。昨年度までに AA 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 の発現上昇や細胞増殖率の増加傾向を示す結果が得られたが、今年度は酸化ストレスの関与の有無を明らかにするため、乳腺組織中のグルタチオン濃度を測定した。

B. 研究方法

1. ハムスターを用いた長期投与試験

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)、膵臓、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行った。

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長期投与試験と同様とした。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 週投与後剖検群より得られた結果については、昨年度既に報告した。

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°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。

・最終剖検群の対照群 6 例(乳腺腫瘍なし)および 3.0 mg/kg 群 5 例(乳腺腫瘍なし)、更に 3.0 mg/kg 群の切迫屠殺 4 例(78~90 週、乳腺腫瘍あり)から採取した乳腺組織中のグルタチオン濃度を GSH Quantification Kit (同仁化学研究所、熊本)を用いて測定した。

(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長期投与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長期投与試験

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、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、各々適宜切迫屠殺した。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。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。

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。対照群を含む各群の肝臓、脾臓、前胃、副腎などに腫瘤/結節が散見され、雌では 10、20 mg/kg 群の前胃結節の発生頻度が対照群に比し増加した ($p < 0.01$)。

4) 病理組織学的検査

主な臓器において認められた腫瘍性変化を含む増殖性病変の発生頻度を表 2 にまとめた。脾臓では、雌雄の対照群を含む各群にラ氏島由来の腫瘍性病変が高頻度にみられたが、脾管由来の腫瘍については、雌の 20 mg/kg 群の 1 例に腺がんが認められたのみであった。一方、前胃では、雌の 10 及び 20 mg/kg 群で乳頭腫および乳頭腫+扁平上皮がんの発生頻度が増加し ($p < 0.01$)、雄の 10 及び 20 mg/kg 群では、乳頭腫の発生頻度が増加傾向を示した。盲腸の腺がんが雌の 10 及び 20 mg/kg 群の各 1 例にみられたが、対照群には認められなかった。肺においても、対照群では細気管支/肺胞腺腫及び腺がんはみられなかったが、雌雄の 10 及び 20 mg/kg 群で増加傾向を示した。その他の臓器・組織の前がん/腫瘍性病変の発生頻度に AA 投与による影響は認められなかった。

また、非増殖/腫瘍性病変として、坐骨神経における軸索変性あるいは線維化を伴う神経線維萎縮が雌雄の 10 及び 20 mg/kg 群に用量反応性を伴って認められた (表 3)。

2. ラットを用いた発がん機序解析実験

1) 剖検

104 週投与後の剖検において、皮下腫瘤/結

節のほか、下垂体結節/暗赤色班、子宮腫瘤など、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 3 にまとめた。皮下の腫瘤/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/口腔の腫瘤/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。

2) 乳腺組織におけるグルタチオン濃度

104 週投与群における最終剖検時の対照 6 例 (乳腺腫瘍なし) および 3.0 mg/kg 投与群 5 例 (乳腺腫瘍なし)、更に 3.0 mg/kg 群の切迫屠殺 4 例 (乳腺腫瘍あり) から採取した乳腺組織中のグルタチオン濃度を測定した結果、対照および 3.0 mg/kg 投与群の間で差はみられなかった。また、乳腺腫瘍の有無による各個体での (正常様) 乳腺組織でのグルタチオン濃度にも差は認められなかった (図 4)。

D. 考察

ハムスターを用いた AA の飲水投与による長期投与試験では、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