

201131012B

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 21～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成 24 (2012) 年 3 月

様式A (10)

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書

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 イイ トオ
研究者 氏 名 今井 俊夫
(所属研究機関 独立行政法人国立がん研究センター)

平成 21年度から実施した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 50,014,000 円也 (※研究期間の総額を記載すること。)
(うち間接経費 11,541,000 円)

1. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金総合分担研究報告書 (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21～23年度 総合研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 分担総合研究報告	
1. アクリルアミドの発がん性の種差に関する研究	21
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	49
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 ..	77
本間正充	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	87
IV. 研究成果の刊行物・別刷	
1. Increased <i>H-ras</i> mutation frequency in mammary tumors of rats initiated with <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitroso-urea (MNU) and treated with acrylamide.	
2. Juvenile rats do not exhibit elevated sensitivity to acrylamide toxicity after oral administration for 12 weeks.	
3. Acrylamide genotoxicity in young vs. adult <i>gpt</i> delta male rats.	
4. Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems.	
5. 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 21-23 年度 総合研究報告書

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、血清検査では内分泌環境への影響を示す変化はみられず、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、肺では *gpt* mutation frequency (MF) が、肝臓では *red/gam* MF が上昇し、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 の上昇はみられなかったことから、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 SD ラットに AA を飲水投与した結果、末梢血、骨髄の小核、赤血球での Pig-a 突然変異、肝臓のコメットは増加したが、幼若及び成熟動物間で差はみられなかった。一方、精巣の小核は成熟ラットに比し、幼若ラットで増加した。また、精巣における DNA 付加体は、幼若ラットで顕著な蓄積を認めた。AA を飲水投与した幼若及び成熟 *gpt delta* マウスの精巣においても同様の結果が得られ、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。また、マウスの赤血球の Pig-a 突然変異や幼若期の精巣における DNA 付加体については特に用量反応性が顕著であった。

以上、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)、酸化的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 の発がん機序及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。

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臓に着目し、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、酸化的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、更に酸化的ストレス応答因子 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]

(1) ハムスターを用いた亜急性予備試験

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飼育室で、木材製床敷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、脱イオン水に混じて飲水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)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -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。眼球及びその付属器、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)、膵臓、膀胱、精嚢、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。1ケージあたり3匹ずつ収容して飼育した。動物の飼育環境はハムスターを用いた亜急性予備試験と同様とした。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78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。雌雄とも投与終了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、ハムスターを用いた亜急性予備試験と同様の臓器・組織及び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。途中死亡/切迫屠殺例についても可能な限り同様に検査した。

・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、カイニ乗法により有意差検定を行った。

(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。1ケージあたり2~3匹ずつ収容して飼育した。動物の飼育環境はハムスターを用いた亜急性予備試験と同様とした。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。脾臓、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°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 (Mercodia ; 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 (T4、T3) の濃度はSRL (東京) に委託して測定した。

・甲状腺及び乳腺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。

・統計解析方法 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°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) についてシークエンス解析を行った。

- ・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。

- ・統計解析方法 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。

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]

(1) 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 6 週齢の C57BL/6 系 *gpt* delta 雄マウスを用いた。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行い、室内の環境は温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間の明暗サイクル制御とした。動物はポリカーボネート製ケージに 5 匹ずつ収納し、床敷はソフトチップ (三共ラボサービス、東京) 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、公比 2 で除した中用量を 250 ppm、低用量を 125 ppm と設定した (Manjanatha MG ら、2006)。AA は各濃度で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与えた。飲水の交換は週 1 回、一般状態観察を毎日実施した。体重および飲水量の測定は週 1 回行った。投与終了後、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、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、一部は遺伝子発現解析用の試料とし、残りを *gpt* 及び Spi⁻ assay ならびに N7-GA-Gua 及び 8-OHdG 測定用試料として -80°C で保存した。

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、肝臓および腎臓の DNA 中 8-OHdG の測定は Nakae らの方法を参考にした。DNA は DNA エキストラクター WB キット (和光純薬) を用いて抽出し、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。

N7-GA-Gua レベルの測定：DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。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) で反応させ、内標準物質である ¹⁵N₅-*N7-GA-Gua* を添加した後、限外濾過膜 (Millipore、Amicon Ultra Ultracel-3) で 12,000xg、50 分間遠心分離した。濾液は凍結乾燥させ、分析時に 10 mL の超純水で再溶解し試料とした。LC-MS/MS システムは Agilent 製 1100 シリーズ LC システムと Micromass 製 Quattro Ultima Pt を用いた。

Nrf2 関連遺伝子の発現解析：Isogen (ニッポンジーン) を用いて RNA の単離を行い、アガロースゲル電気泳動による確認と吸光度測定による濃度の算出を行った。得られた RNA は 0.02 ng/μL に調整した後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (アプライ

ドバイオシステムズ) を用いた逆転写反応により cDNA 合成を行った。RT-PCR は TaqMan gene Expression Assay (アプライドバイオシステムズ) を用いて、7900HT Fast リアルタイム PCR システムにより解析を行った。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 最終体重、臓器重量、*gpt* 及び *red/gam* MF、8-OHdG、*N7-GA-Gua* 及び遺伝子発現レベルについては、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 500 ppm 群は全ての解析から除外した。

(2) 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 系マウスを交配して得られた B6C3F₁ 系 *gpt* delta マウスを作出し、3 週齢及び 11 週齢のマウスをそれぞれ幼若期及び成熟期として実験に供した。動物の飼育ならびに投与方法は実験(1)と同様の方法で行った。

AA の濃度は実験(1)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。

一般状態観察、解剖時の処置、試料採取、保存等は実験(1)と同様の方法で行い、*gpt* assay、Spi⁻ assay、8-OHdG、*N7-GA-Gua* 測定についても実験(1)と同様の方法で行った。

・統計解析方法 最終体重、臓器重量 *gpt* 及び *red/gam* MF、8-OHdG 及び *N7-GA-Gua* 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、極度の一般状態の悪化が認められた成熟マウスの 400 ppm 群

は全ての解析から除外した。

(3) 抗酸化剤を用いた検討

動物は実験(2)と同様の方法で得られた B6C3F₁系 *gpt delta* マウスを6週齢で実験に供した。動物の飼育ならびに投与方法は実験(1)と同様の方法で行った。

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与えた。抗酸化剤にはアスコルビン酸、 α -トコフェロール、*N*-アセチルシステインをそれぞれ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。

一般状態観察、解剖時の処置ならびに試料採取、保存等は実験(1)と同様の方法で行った。

・統計解析方法 最終体重および臓器重量については一元配置の分散分析と Turkey の多重比較検定により行った。

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]

(1) ラット飲水投与試験

SD系雄ラットを日本エスエルシーより購入し、馴化後3週(幼若)及び11週齢(成熟)の動物を各10匹の4群に分けた。各群に蒸留水で調整した0、50、100、200 ppmのAAを28日間飲水投与した。末梢血、骨髄と精巣での小核試験、末梢血でのPig-a試験、肝臓、精巣でのコメット試験を実施した。

(2) ラット強制経口投与試験

SD系雄ラットを日本エスエルシーより購入し、馴化後4週、6週及び10週齢の動物を各5匹の3群に分けた。各群にAAを0、25及び50 mg/kg体重/日の用量で7日間連続強制経

口投与し、最終投与の翌日にラットを屠殺した。精巣における小核及びコメット試験、AAの主たるDNA付加体の *N*⁷-GA-Gua量の測定を行った。

(3) マウス飲水投与試験

国立医薬品食品研究所内で繁殖した *gpt delta* 雄マウスを使用した。3及び10週齢の動物を各10匹の4群に分け、AAを0、100、200、400 ppm濃度で蒸留水に混じて28日間飲水投与した。

・小核試験 尾静脈または心臓から約100 μ L採血し、小核試験を行った。また、屠殺後に精巣を摘出し小核試験を行った。小核試験は Hayashi らの方法に従って行った。

・アルカリコメット試験 肝臓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。

・Pig-a 遺伝子突然変異試験：抗凝固剤としてEDTAを用いて採血した。ラットでは、末梢血にCD45抗体(Cy5)と、CD59(FITC)抗体を反応させた。マウスでは抗TER119/Erythroid cells-PE/Cy7及び抗CD24-FITCで赤血球を標識した。Pig-a欠損細胞をMiuraらの方法に従い、フローサイトメータで分画した。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：組織の一部を採取し、DNAを抽出して試料とし、Masumuraらの方法に従って行った。

・DNA付加体の定量：組織の一部を、液体窒素を用いて凍結し冷凍保存した。後日DNAを抽出し、DNA付加体の定量用試料とした。AAによる主たるDNA付加体である *N*⁷-GA-GuaをLC/MS/MSにより測定した。LC/MS/MSはQuattro Ultima Pt (Waters-Micromass)を、HPLCのカラムはShim-pack XR-ODS(75 \times

3.0mm)を用いた。M7-GA-Gua 標品、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。

(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]

(1) ハムスターを用いた亜急性予備試験

1) 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。

2) 体重、摂餌量及び摂水量

体重は、雄の 30、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。摂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。

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、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 γ -GTP が増加した。

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。

5) 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。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。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

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。

3) 剖検

主な肉眼所見として、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。

4) 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/非腫瘍性病変として、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。

3. 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、皮下腫瘍あるいは体重減少や自発運動低下がみられた動物について適宜切迫屠殺した。

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。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週投与群において、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と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。

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 例の下垂体に腫瘤/結節については、各々内膜間質ポリープ及び前葉のがんであった。

6) 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。

7) 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。

8) 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。

9) 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。

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]

(1) 若齢マウスを用いた 4 週間投与実験

1) 一般状態

特記すべき変化は認められなかったが、500 ppm 群では投与開始 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。

2) 体重及び摂水量

体重の推移は、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 群では対照群に比し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、125、250 及び 500 ppm 群の AA 曝露量は 22.2、34.1 及び 62.9 mg/kg 体重/日であった。

3) 臓器重量

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 処置群で相対重量の高値が認められ、用量依存的な変化であった。病理組織学的検索の結果、各臓器において AA の投与による変化は認められなかった。

4) 遺伝子突然変異

gpt MF について、肺では 250 ppm 群において上昇が、肝臓では上昇傾向が認められ、腎臓では変化はみられなかった。*gpt* 変異コーンのスペクトラム解析を基に、各変異における特異的変異頻度を算出した結果、肺では AT-TA transversion 変異及び AT-GC transition 変異の上昇がみられ、肝臓では

single base pair (bp) deletion の上昇が認められた。Spi⁻ assay の結果について、肺では有意な変化ではなかったものの、用量依存的な *red/gam*MF の増加が、肝臓では 125 及び 500 ppm 群で約 2 倍の有意な上昇が認められた。

5) DNA 中 8-OHdG レベル

肺、肝臓及び腎臓において、何れの濃度でも変化は認められなかった。

6) N7-GA-Gua レベル

AA を投与した全てのマウスの肺、肝臓及び腎臓で検出され、何れの臓器においても AA の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、肺、肝臓の順であった。

7) Nrf2 関連遺伝子群の発現解析

HO-1、*NQO1*、*TrxR1*、*GCLc*、*GCLm*、*GSTa4* の mRNA 発現レベルが肺において僅かに増加した。

(2) 幼若及び成熟マウスを用いた 4 週間投与実験

1) 一般状態

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、何れも 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。

2) 体重及び摂水量

体重推移について、幼若マウスでは投与開始 1 週目から、AA 200 ppm 以上の群 ($p < 0.01\%$) では 2 週目以降 100 ppm ($p < 0.05\%$) から対照群に比べ有意な低値を示した。一方、成熟マウスでは 400 ppm 群でのみ投与開始 1 週目以降、対照群に比し低値を示した。摂水量については、何れの AA 投与群においても対照群に比して低下し、幼若マウスにおける 100、200 及び 400 ppm 群の AA 暴露量は 21.8、41.2 及

び 46.2 mg/kg 体重/日で、成熟マウスでは 22.5、38.6 及び 59.2 mg/kg 体重/日であった。

3) 臓器重量

幼若マウスでは 200 ppm 以上の群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低値と、肺相対重量の高値が認められた。

4) 遺伝子突然変異

幼若及び成熟マウスの肺における *gpt* MF は、100 ppm から上昇傾向が認められ、200 ppm 以上の群では対照群に比し約 3 倍に上昇した。*gpt* 変異コロニーのスペクトラム解析を基に、各変異における特異的変異頻度を算出した結果、幼若マウスでは GC-CG transversion、bp 及び over 2 bp の欠失変異頻度の上昇が、成熟マウスでは GC-TA transversion、AT-GC transition、bp 及び over 2 bp の欠失変異頻度の上昇が認められた。Spi⁻ assay においては、幼若及び成熟マウスともに AA 200 ppm から *red/gam*MF の上昇傾向が認められ、成熟マウスでは 400 ppm 群において対照群に比し約 3 倍に上昇した。

5) DNA 中 8-OHdG レベル

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。

6) N7-GA-Gua レベル

肺において、幼若、成熟マウスともに 100 ppm 群から検出され、AA の投与量依存的に増加した。

(3) 抗酸化剤を用いた検討

1) 一般状態

何れの群においても AA の神経毒性に起因する症状は認められなかった。

2) 体重及び摂水量

体重については、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低値を示したのに対し、AA単独群では最終体重においてのみ有意な低値を示した。摂水量については、AA単独群及び抗酸化剤併用群ともに対照群との明らかな差は認められず、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。

3) 臓器重量

AA単独群では肺絶対及び相対重量が高値を、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を示した。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みられた。

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]

(1) ラット飲水投与試験

末梢血のDNA小核は最高用量で僅かに増加したが、幼若(3週齢)及び成熟(11週齢)ラットでの差は認められなかった。また、骨髄のDNA小核についても同様であり、幼若ラットの最高用量では統計的に有意に増加したが、幼若、成熟ラットの差は顕著ではなかった。Pig-a試験についても末梢血のDNA小核のパターンと同様であり、最高用量の幼若ラットで有意な突然変異の増加を認めた。

肝臓についてはコメント試験を実施し、用量依存的に幼若、成熟ラットで増加したが、幼若ラットの方が増加率は低かった。

精巣に関しては小核、コメント試験を実施し、両試験において幼若ラットで用量依存的な反応性と、100、200 ppm投与群での有意な

誘発を認めた。また、小核については幼若、成熟ラット間で反応性の違いが観察され、幼若ラットでより増加した。

甲状腺、乳腺、肝臓、精巣におけるAAの主たるDNA付加体であるM7-GA-Guaは、全ての組織において用量依存的に増加したが、甲状腺、乳腺、肝臓においては幼若、成熟ラット間で差は認められなかった。一方、精巣においては、幼若ラットで顕著に高かった。

(2) ラット強制経口投与試験

精巣のDNA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。

精巣のコメントは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。

精巣におけるM7-GA-Gua量は、何れの週齢においても用量依存的に増加した。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。

(3) マウス飲水投与試験

幼若マウス(3週齢)では最高用量での毒性が強く、一部のマウスが死亡したため、投与量を400 ppmから300 ppmに変更した。個体当たり、体重当たりのAA摂取量は200 ppmまでは幼若および成熟(10週齢)では差が認められなかった。400 ppm群では成熟マウスのAA摂取量が多かったが、幼若マウスにおける毒性による飲水行動が困難だったためと推測された。

赤血球のPig-a突然変異について、200ppm以上で幼若、成熟マウスとも顕著な遺伝子突然変異の誘発を示したが、週齢による差は認められなかった。また、400ppmによる突然変異頻度の抑制がみられたが、細胞毒性に起因

するものと考えられた。

精巢での *gpt* 突然変異については、200ppm 以上で幼若、成熟マウスとも遺伝子突然変異の誘発を示したが、成熟マウスでは統計学的有意差はなかった。また、週齢による差も認められなかった。

精巣での *N7-GA-Gua* 付加体量については、幼若、成熟マウスともに用量依存的に増加した。200ppm 以上で週齢差が観察され、400ppm 以上では成熟動物に比し幼若動物において 10 倍程度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。

シリアンハムスターの長期飼育により膵管の増殖性病変のほか、上皮小体及び胆管の過

形成が発生することが報告されており (Birt DF ら、1985)、これらのデータを参照しながら病理組織学的評価を行った。その結果、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/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する発がん性が示された。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における陽性結果 (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、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。

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実験終了時までの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。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、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 (Faneli 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、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 投与群の間で差はみられず、3.0 mg/kg 投与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的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無視し得ないと判断された。

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]

若齢マウスを用いた 4 週間投与実験 (1) では、AA を 4 週間飲水投与した *gpt delta* マウスの肺、肝臓及び腎臓における病理組織学的検索、*in vivo* 変異原性の検索、8-OHdG ならびに N7-GA-Gua レベルの測定、Nrf2 関連遺伝子の発現解析を行い、AA の発がん過程に対する遺伝毒性メカニズムの関与ならびにその発現機序に対する酸化的ストレスの関与の可能性を検討した。ICR-Swiss 及び A/J マウスで発がん性が報告されている肺で AT-TA

transversion 変異を主体とした *gpt* MF の有意な上昇が認められたが、*red/gam* MF には変化は認められなかった。一方、AA の代謝物である GA の発がん標的臓器である肝臓では single bp の欠失変異を主体とした *gpt* MF の上昇傾向と共に、*red/gam* MF の有意な上昇が認められた。従って、AA に誘発される変異は標的臓器と代謝物の標的臓器においてその種類が異なることが示されたがその意義については不明である。

酸化 DNA 損傷の指標である 8-OHdG レベルはいずれの臓器においても変化は認められず、肺で認められた *gpt* 変異コロニーにおいても 8-OHdG が引き起こす代表的な突然変異である GC-TA transversion 変異頻度の変化は認められなかったことから、酸化ストレスの遺伝毒性への関与の可能性は低いと考えられた。一方、AA 及び GA による直接的な DNA 傷害によって生じる N7-GA-Gua は、いずれの臓器からも検出され、そのレベルは AA の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、発がん性の報告されていない腎臓の 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も考えられたが、AA による遺伝子突然変異が DNA 損傷だけでなく、それらに働く修復あるいは合成酵素レベルの臓器特異性等にも起因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、発がん標的臓器特異的に酸化ストレスが産生された可能性が考えられた。しかしながら、これら遺伝子の変化はいずれもわずかであったこと、いずれの臓器においても 8-OHdG レベルに変

化が認められなかったことから、AA によって生じる酸化ストレスの程度は低く、核内 DNA の酸化損傷を引き起こさない可能性が示された。

幼若及び成熟マウスを用いた 4 週間投与実験 (2) では、*gpt delta* マウスを用いて、AA の遺伝子突然変異誘発性に対する幼若期動物の感受性の違いについて検討した。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された。同様の現象はラットにおいても報告されているが、ラットでは AA の暴露量の違いが原因であり、感受性には差異はないとの報告がある。本実験では幼若及び成熟マウスでの暴露量に差は認められなかったことから、AA の神経毒性に対する感受性の違いはマウス特異的な変化である可能性が示された。

幼若及び成熟マウスの肺における *gpt* MF は幼若及び成熟マウスともに用量依存的な増加が認められ、200 ppm 以上の群で有意に上昇した。変異コロニーのスペクトル解析においても、幼若及び成熟ともに single bp の欠失変異が高頻度に検出された。また、*red/gam* MF も幼若、成熟ともに 200 ppm から上昇傾向が認められたが、その程度に差異はなく、暴露時期による変異頻度ならびに変異パターンに違い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 1 の結果と同様にいず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 DNA 損傷の関与

は明らかとはならなかった。

抗酸化剤を用いた検討(3)では、*gpt delta* マウスに AA と種々の抗酸化剤を併用投与した。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認められなかった。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いずれも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 AA の *in vivo* での飲水投与による遺伝毒性研究に関しては Manjanatha らによるトランスジェニック BigBlue マウスを用いた報告がある。彼らは雌雄のマウスに 100、500 ppm の飲水で 3-4 週間投与したところ、肝臓での突然変異が有意に増加し、GC>TA のトランスバージョンが主な変異であることを報告した。ラット飲水投与試験(1)においては、Manjanatha ら実験に比して低用量の 50、100 及び 200 ppm 濃度で行った。全ての試験動物について生育に伴う顕著な体重の抑制、飲水量の変化は認められなかった。また、28 日後の剖検においても顕著な病理的異常は認められなかった。

骨髄、末梢血に関しては、顕著な小核誘発は認められなかった。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。Pig-a 突然変異についても幼若ラット高用量群において有意差が認められ、飲水投与による慢性暴露が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が、幼若及び成熟動物間での差は顕著ではなかった。肝臓についても同様であり、造血器系及び肝臓に対して AA は弱い遺伝毒性を示すが、幼若ラットで特に高感受性を示すとは考えら

れなかった。以前に我々は *gpt* ラットを用いて 20-80 ppm 濃度で AA の飲水投与実験を行い、肝臓での突然変異を検討したが、幼若、成熟ラットとも突然変異の誘発は認められなかった。この結果は先の Manjanatha らの報告と矛盾するが、種差あるいは投与量の違いによる可能性が考えられた。何れにせよ、200 ppm 程度の AA の肝臓に対する遺伝毒性はそれほど強くはないと考えられた。

精巣に関しては、小核試験、コメット試験で成熟、幼若ラットとともに用量反応性を伴う増加が観察された。また、この増加は幼若ラットで顕著であった。DNA 付加体についても、このことを裏付ける結果が得られた。GA は *N7-GA-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が、*N7-G-GA* が全体の 90%以上を占めるため、今回はこの付加体を測定対象とした。精巣での *N7-G-GA* は幼若、成熟ラットともに用量依存的に増加し、特に幼若ラットでは成熟ラットに比し、最高用量 (200ppm) において 10 倍以上の付加体の生成/蓄積を示した。これまで、精巣には AA の付加体が蓄積しやすく、その原因としてプロタミンとの結合が考えられている。また、その約 5%は DNA とも付加体を形成する。AA は精巣細胞に強い遺伝毒性を示し、転座型の染色体異常を示すこと、低い濃度でも優性致死試験で陽性を示すことが知られている。このように AA は特に生殖細胞に遺伝毒性を示し、それが付加体の生成と相関するものと考えられる。さらに今回、我々の実験ではこの傾向が幼若ラットで顕著に現れることが示された。

ラット強制経口投与試験(2)については、飲水投与試験の結果を検証する目的で、4、6、10 週齢のラットに 25 及び 50 mg/kg 体重/日の AA を 7 日間強制経口投与し、精巣での遺伝毒性 (コメット試験、小核試験) と DNA 付加