

体量を検討した。実投与量の比較において、飲水投与試験の 200ppm における AA の 1 日摂取量は 11 週齢ラットで 18 mg/kg 体重/日、3 週齢ラットで 25 mg/kg 体重/日であったことから、今回の強制経口投与量の 25 及び 50 mg/kg 体重/日はその倍以上の AA を 7 日間投与したことになる。

小核試験では AA による小核の誘発は 4 及び 6 週齢の動物において顕著ではなく、コメントは全ての週齢で誘発が確認された。飲水投与試験でも小核の誘発は顕著でなく、コメントは用量依存的に誘発されたことから、同様の傾向を示すことが確認された。しかし、従来の報告では AA は精巣において強い染色体異常を誘発することが示されており、効率的な精巣での遺伝毒性の検出には更なる検討が必要と考えられた。

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。4 週齢での 25mg/kg と 50mg/kg 群の差は明らかでなく、高濃度では付加体生成/蓄積が飽和していることが示唆された。幼若ラットでの付加体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、解毒されるとされ、幼若ラットの精巣における付加体量の増加は、低 GSH 活性に関連していることが示唆された。

マウス飲水投与試験 (3) については、幼若ラットの精巣における AA の遺伝毒性に対する高感受性について、マウスを用いて検証する目的で実施した。3 及び 10 週齢の *gpt delta* 雄マウスに 0、100、200、400ppm の AA を 28 日間飲水投与し、赤血球の Pig-a 遺伝子突然

変異と精巣の *gpt* 遺伝子突然変異を検討した。また、精巣では AA の特異的 DNA 付加体である *N7-GA-Gua* 量も解析した。その結果、200ppm 以上で Pig-a (赤血球) 及び *gpt* (精巣) 突然変異とも増加したが、週齢間で差は見られなかった。一方、DNA 付加体生成量 (精巣) は用量依存的に増加し、幼若マウスではその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見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。DNA 付加体量が成熟、幼若動物で顕著である一方、他の遺伝毒性指標の差は顕著ではない原因については不明であるが、今回の実験では幼若及び成熟マウスの AA 摂取量に顕著な差がなく、幼若マウスは AA の毒性に対して高感受性であることが示された。

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ストレス DNA 損傷を含む修飾塩基の関与 [梅村]

AA のマウス肺発がんに遺伝毒性メカニズム

が関与することを明らかにした。その発現機序には直接的な DNA 損傷の関与が示唆され、酸化的 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]

幼若及び成熟動物での遺伝毒性反応性は、骨髄や肝臓では顕著ではなかったが、精巣においては、幼若動物において高い傾向にあり、DNA 付加体生成量は、幼若マウスの精巣で顕著であった。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) Cho Y., M., Imai, T., Hasumura, M., Watanabe, N., Ushijima, T., Hirose, M., Nishikawa, A. Increased H-ras mutation frequency in mammary tumors of rats initiated with N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and treated with acrylamide. J Toxicol Sci, 34: 407-412, 2009.
- 2) 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)

3) 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)

4) 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、河野聡美、早川拓也、北橋 宗、アクリルアミドのシリアンハムスターにおける3ヶ月間経口投与毒性試験、第26回日本毒性病理学会、金沢市（2010年2月）
- 2) 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. 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology. ワシントン D.C. (2011年3月)
- 3) 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）
- 4) Imai, T., Hayakawa, T., Nishikawa, A.:

- 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)
- 5) Ishii, Y., Suzuki, Y., Hibi, D., Jin, M., Kodama, Y., Nohmi, T., Fukuhara, K., Umemura, T., Nishikawa, N.: Possible participation of oxidative DNA damage in acrylamid-induced in vivo mutagenicity. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Osaka, 2010. 9)
- 3) Ishii, Y., Hibi, D., Jin, M., Kodama, Y., Ogawa, K., Nishikawa, A., Umemura, T.: *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) Ishii, Y., Takasu, S., Suzuki, Y., Hibi, D., Jin, M., Kodama, Y., Ogawa, K., Nishikawa, A., Umemura, T.: *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) Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T., Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Masumura, K., Horibata, K., Masuda, S., Kinae, N., Nohmi, T., Honma, M.: Child-adult difference in evaluation of in vitro genotoxicity of acrylamide. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)
- 7) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、井上薫、吉田緑、今井俊夫、渋谷淳、鈴木拓也、増村健一、堀端克良、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充: ライフステージ(週齢)を考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第38回大会. (2009. 11)
- 8) 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 21-23 年度 分担総合研究報告書

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実施した。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 体重の用量で行い、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り、内分泌環境の影響を受ける臓器・組織の腫瘍の誘発も認められなかった。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/酸化ストレスへの影響を解析した。その結果、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、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、乳腺組織におけるグルタチオン濃度の変化はみられなかった。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 (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膀胱を含む全身諸臓器・組織における発がん性の有無を明らかにすること計画し、AA の 78 週間飲水投与による長期投与試験を実施し、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、酸化ストレスの関与について解析した。

B. 研究方法

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 (ソフトチップ、日本エスエルシー) を敷いたプラスチックケージに 1 ケージあたり 3 匹ずつ収容して飼育し、ケージ及び床敷を週 2 回交換した。体重に基づく層別化法により各群 9 匹の 4 群に分けた。AA

の投与用量は、本予備試験に先立って実施した 2 週間投与実験の結果をもとに 0 (対照)、20、30 及び 50 mg/kg 体重とし、飲水に混じて 13 週間投与した。実験期間中、一般状態及び死亡動物の有無を毎日 (週 5 日) 観察し、体重、摂餌量及び飲水量を 1 週間に 1 回測定した。AA は飲料水中において 0.5~17 ppm の範囲では安定であることが報告されていることから (Friedman MA ら、1995)、混合飲料水は 1 週間に 1 回調製、交換し、交換時には飲水量を測定した。投与終了時には、一昼夜の絶食後、エーテル深麻酔下にて鎖骨下静脈および腹大動脈より、各々血液学的検査および血清生化学検査のために採血した後、脱血により安楽殺した。血液学的検査および血清生化学検査については、下記の項目についてエスアールエルに委託して測定した。

血液学的検査：赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度 (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ぺプチダーゼ (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)、膀胱、膀胱、精囊、

前立腺、精巣上体、卵巣、子宮、膣、坐骨神経、三叉神経、骨格筋、皮膚、乳腺、脊髄、リンパ節（頸部、腸間膜）、骨及び骨髄（胸骨、大腿骨）

摘出した臓器・組織は 10%中性緩衝ホルマリン液（精巣についてはブアン液）にて固定、常法に従ってパラフィン包埋切片を作製、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、坐骨神経については更に NFP-LFB 染色を実施し、全例について病理組織学的検査を行った。

2. ハムスターを用いた長期投与試験

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 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、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、カイ二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℃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(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°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。

・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 (図 1)。摂餌量は雄の 30 及び 50 mg/kg 群、雌の 50 mg/kg 群で一過性に低値傾向を示した (図 2)。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 (図 3)。

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 (表 1、2)。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 (表 3、4)。

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 (表 5、6)。

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 (表 7、8)。その他の臓器・組織においては、AA 投与による明らかな病理組織学的変化はみられなかった。

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 4 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 5 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 6)。

3) 剖検

最終剖検時における主な肉眼所見を表 9 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

主な臓器において認められた前がん/腫瘍性病変の発生頻度を表 10 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、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 (表 11)。

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 (表 12、13)。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/暗赤色斑、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 14 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。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 7)。

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、各々内膜間質ポリープ及び前葉のがんであった。

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 8)。

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 9)。

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10）。

8) 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11）。

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膀胱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、膀胱において、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、膀胱由来の腫瘍は雌の20 mg/kg 群の1例に認められたのみであり、AAはハムスターの膀胱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、膀胱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(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、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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Cho YM, Imai T, Hasumura M, Watanabe N, Ushijima T, Hirose M, Nishikawa A.

Increased *H-ras* mutation frequency in mammary tumors of rats initiated with *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) and treated with acrylamide. *J Toxicol Sci*, 34: 407-412, 2009.

2. Koyama, N., Yasui, M., 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. 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. 学会発表

1. 今井俊夫、河野聡美、早川拓也、北橋 宗、アクリルアミドのシリアンハムスターにおける3ヶ月間経口投与毒性試験、第26回日本毒性病理学会、金沢市（2010年2月）
2. 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. 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology. ワシントンD.C. (2011年3月)
3. 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）
4. Imai, T., Hayakawa, T., Nishikawa, A.: 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）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
該当なし。

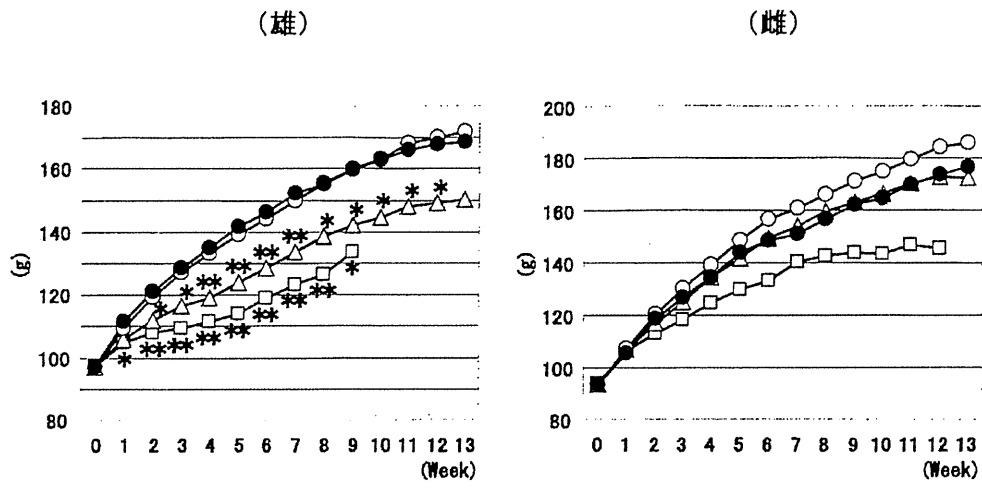


図1 体重の推移 (ハムスター亜急性予備試験)

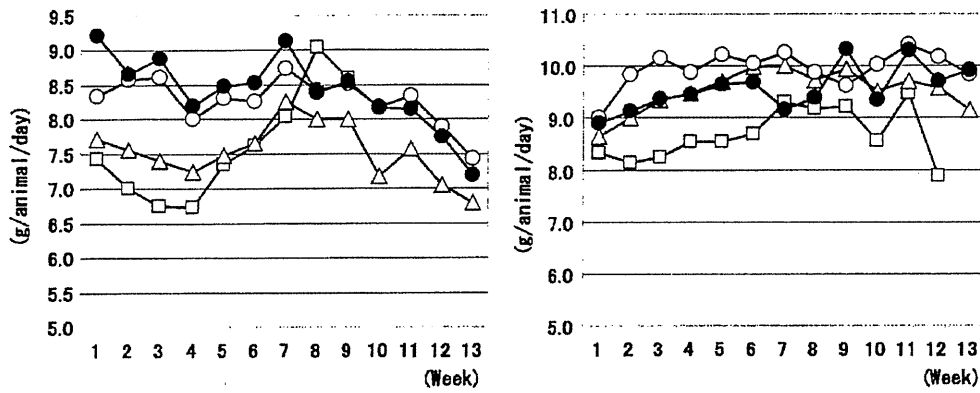


図2 摂餌量の推移 (ハムスター亜急性予備試験)

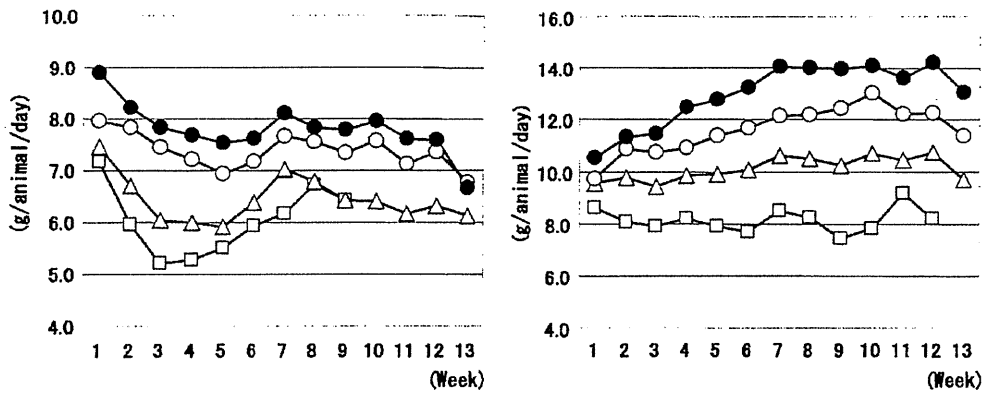


図3 摂水量の推移 (ハムスター亜急性予備試験)

● AA-0 mg/kg * p<0.05, ** p<0.01
 ○ AA-20 mg/kg
 △ AA-30 mg/kg
 □ AA-50 mg/kg

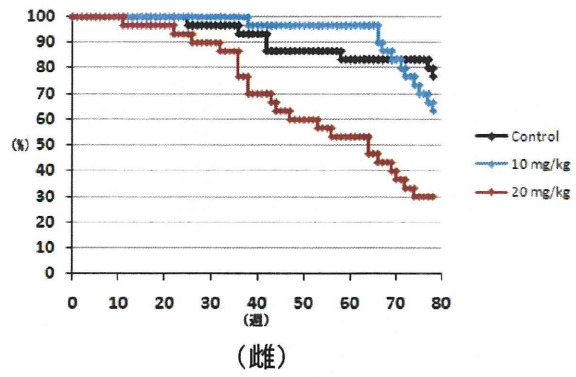
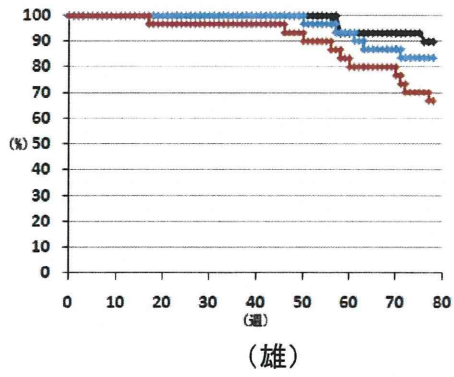


図4 生存率の推移 (ハムスター長期投与試験)

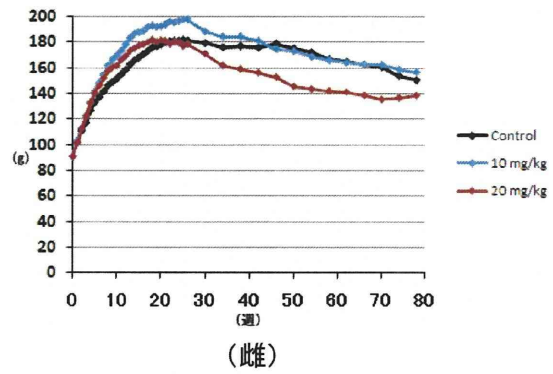
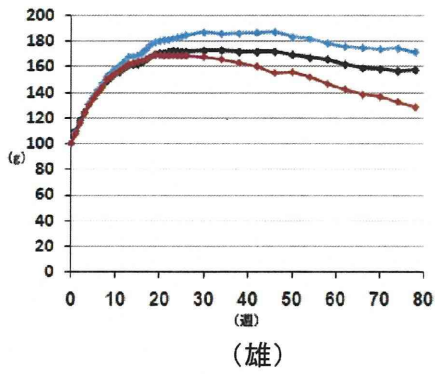


図5 体重の推移 (ハムスター長期投与試験)

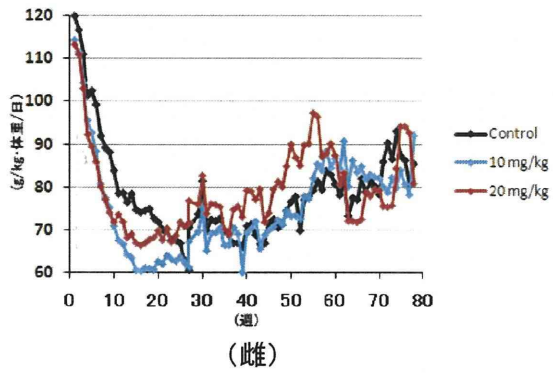
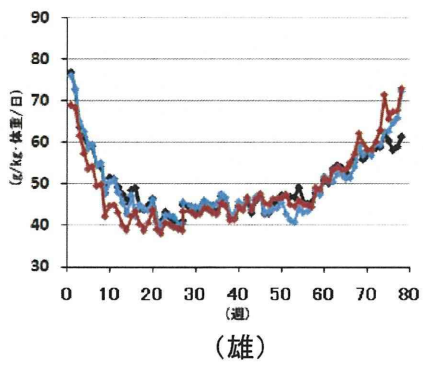


図6 摂水量の推移 (ハムスター長期投与試験)

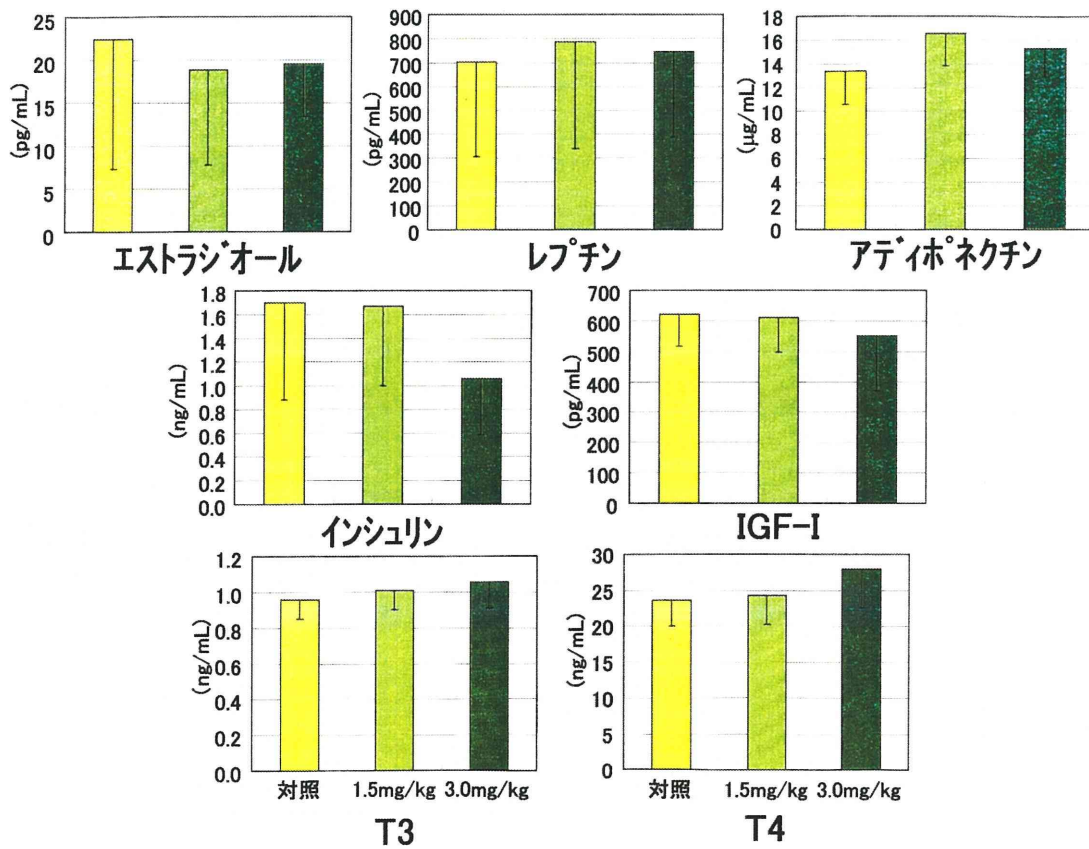


図7 52週剖検時の血清生化学検査値 (ラット発がん機序解析)

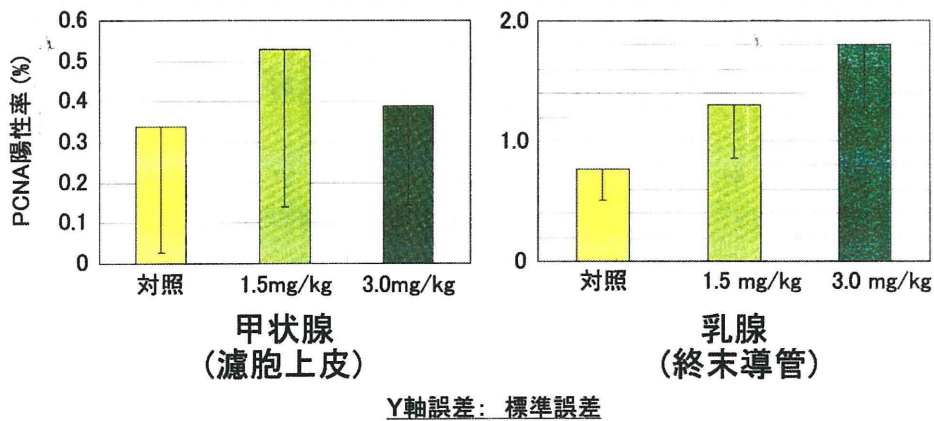


図8 52週剖検時の甲状腺及び乳腺における細胞増殖活性 (ラット発がん機序解析)

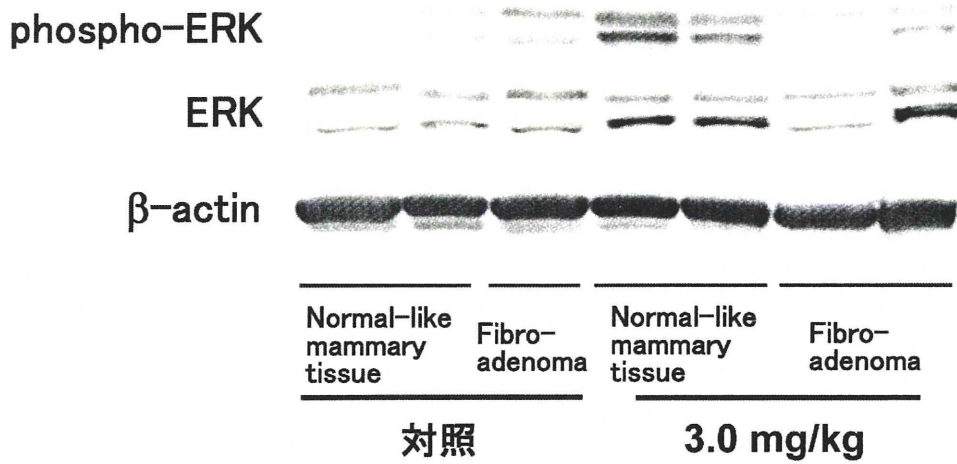


図9 104週群の切迫屠殺例にみられた乳腺組織/腫瘍におけるERKの活性化
(ラット発がん機序解析)

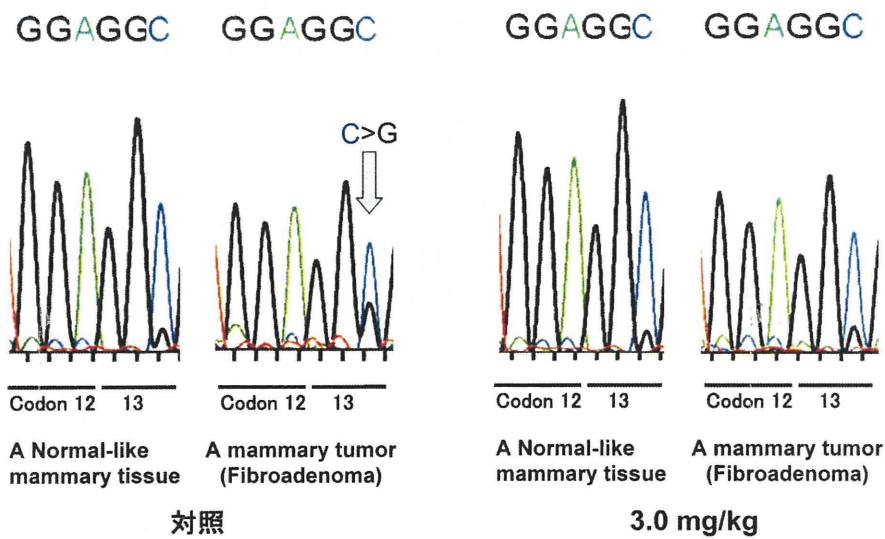


図10 104週群の切迫屠殺例にみられた乳腺組織/腫瘍におけるH-ras遺伝子の変異
(ラット発がん機序解析)

表1 血液学的検査—雄 (ハムスター亜急性予備試験)

Dose level (mg/kg body weight/day)		0 (control)		20		30	
No. of animals		8		8		9	
RBC	10 ¹⁰ /L	916.4	± 45.4	899.5	± 28.5	869.7	± 90.6
Hb	g/dL	18.8	± 0.5	18.7	± 0.4	17.9	± 1.6
Ht	%	53.9	± 1.6	54.5	± 1.5	52.5	± 4.4
HCV	fL	58.9	± 1.5	60.6	± 1.4	60.6	± 2.1
MCH	pg	20.8	± 0.7	20.6	± 0.5	20.4	± 0.5
MCHC	g/dL	35.0	± 0.9	34.3	± 0.5	33.9	± 0.6 **
Plat	10 ¹⁰ /L	24.3	± 3.7	26.2	± 4.5	24.6	± 4.6
WBC	10 ⁸ /L	7787.5	± 2248.5	8375.0	± 1018.1	8122.2	± 1003.5

表2 血液学的検査—雌 (ハムスター亜急性予備試験)

Dose level (mg/kg body weight/day)		0 (control)		20		30	
No. of animals		9		9		9	
RBC	10 ¹⁰ /L	854.9	± 33.8	812.7	± 50.2	804.1	± 19.7 *
Hb	g/dL	18.0	± 0.5	17.4	± 0.7	17.1	± 0.4 **
Ht	%	52.2	± 1.1	50.6	± 3.3	51.7	± 1.4
HCV	fL	61.0	± 1.9	62.3	± 2.0	64.3	± 1.1 **
MCH	pg	20.9	± 0.6	21.6	± 0.7	21.2	± 0.4
MCHC	g/dL	34.2	± 0.7	34.6	± 1.4	33.3	± 0.7
Plat	10 ¹⁰ /L	32.6	± 6.3	30.0	± 8.9	29.9	± 4.7
WBC	10 ⁸ /L	8044.4	± 2175.5	7311.1	± 1612.8	7755.6	± 1463.8

Each value represents the mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control at p<0.05 and p<0.01, respectively

表3 血清生化学的検査—雄 (ハムスター亜急性予備試験)

	Dose level (mg/kg body weight/day)	0 (control)	20	30
	No. of animals	8	8	9
TP	g/dL	6.8 ± 0.5	7.1 ± 0.3	6.5 ± 0.4
Alb	g/dL	3.6 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.6 ± 0.2
T-Bil	mg/dL	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T-Cho	mg/dL	180.8 ± 20.5	204.6 ± 25.8	180.2 ± 22.0
TG	mg/dL	269.3 ± 109.2	353.0 ± 142.1	207.2 ± 84.7
γ-GTP	IU/L	3.3 ± 0.5	3.8 ± 0.7	3.9 ± 0.3
AsT	IU/L	88.6 ± 45.1	82.1 ± 29.8	67.9 ± 26.4
AIT	IU/L	144.6 ± 50.3	173.3 ± 57.7	90.9 ± 22.3
ALP	IU/L	310.1 ± 52.9	330.8 ± 52.3	371.7 ± 24.2 *
BUN	mg/dL	24.3 ± 2.4	23.8 ± 1.5	23.8 ± 2.0
Ca	mg/dL	11.0 ± 0.8	11.1 ± 0.4	10.9 ± 0.9
IP	mg/dL	8.0 ± 1.5	7.0 ± 0.8	6.9 ± 0.9
Na	mEQ/L	135.1 ± 3.4	135.6 ± 2.4	137.6 ± 3.9
K	mEQ/L	5.2 ± 0.7	4.9 ± 0.6	4.5 ± 0.7
Cl	mEQ/L	97.8 ± 3.8	97.8 ± 3.0	100.2 ± 4.2

Each value represents the mean ± S.D.

*: Significantly different from the control at $p < 0.05$

表4 血清生化学的検査一雌 (ハムスター亜急性予備試験)

Dose level (mg/kg body weight/day)		0 (control)		20		30	
No. of animals		9		9		9	
TP	g/dL	6.8	± 0.6	7.0	± 0.4	7.3	± 0.7
Alb	g/dL	3.3	± 0.3	3.5	± 0.2	3.5	± 0.3
T-Bil	mg/dL	0.0	± 0.0	0.0	± 0.0	0.1	± 0.0
T-Cho	mg/dL	220.4	± 26.7	224.1	± 28.3	212.9	± 29.2
TG	mg/dL	422.0	± 150.1	420.6	± 109.3	429.1	± 162.8
γ-GTP	IU/L	3.1	± 0.3	4.1	± 0.9 *	4.4	± 1.1 *
AsT	IU/L	54.6	± 20.7	47.3	± 18.4	39.2	± 11.4
AIT	IU/L	115.0	± 42.5	178.0	± 113.2	89.6	± 28.2
ALP	IU/L	361.0	± 48.7	356.0	± 70.0	416.2	± 72.0
BUN	mg/dL	22.0	± 3.2	24.0	± 4.7	24.7	± 4.9
Ca	mg/dL	11.6	± 1.1	11.8	± 0.8	11.3	± 0.7
IP	mg/dL	7.7	± 1.4	7.7	± 1.2	7.2	± 1.4
Na	mEQ/L	134.9	± 4.1	136.0	± 3.9	136.1	± 3.9
K	mEQ/L	5.9	± 0.8	5.7	± 0.9	5.4	± 0.5
Cl	mEQ/L	96.0	± 4.2	96.9	± 3.5	97.1	± 6.0

Each value represents the mean ± S.D.

*: Significantly different from the control at $p < 0.05$

表5 臓器重量一雄 (ハムスター亜急性予備試験)

Dose level (mg/kg body weight/day)		0 (control)			20			30		
No. of animals		9			9			9		
Final body weight (g)		165.7	±	19.5	170.6	±	15.6	146.0	±	11.3 *
Relative organ weights (/100g body weight)										
Brain	g	0.65	±	0.07	0.62	±	0.07	0.71	±	0.06
Pituitary	mg	3.6	±	1.5	3.2	±	0.4	3.5	±	0.6
Thyroids	mg	6.0	±	2.3	5.7	±	1.3	4.8	±	1.1
Thymus	mg	28.0	±	6.5	26.9	±	5.2	32.4	±	7.7 *
Lungs	g	0.45	±	0.03	0.43	±	0.08	0.49	±	0.03 **
Heart	g	0.29	±	0.02	0.28	±	0.05	0.30	±	0.03
Spleen	g	0.09	±	0.01	0.11	±	0.06	0.09	±	0.02
Liver	g	4.18	±	0.27	4.06	±	0.36	3.99	±	0.22
Adrenals	mg	17.7	±	2.7	15.9	±	2.8	16.9	±	1.3
Kidneys	g	0.62	±	0.04	0.65	±	0.05	0.69	±	0.07 *
Testes	g	2.13	±	0.23	2.06	±	0.30	2.26	±	0.25

Each value represents the mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively