

Acetamide のラット肝発がん機序の解明 ～非遺伝毒性メカニズムの関与～

Investigation of mechanisms underlying acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rats ～ Possible involvement of non-genotoxic mechanism ～

菊池玲実花^{1,2)}、黒田奈々美^{1,2)}、藤内美佑紀^{1,2)}

指導教員 梅村隆志^{1,2)} 研究協力者 石井雄二²⁾、高須伸二²⁾

1) ヤマザキ動物看護大学 動物看護学部 動物看護学科 動物病理学研究室

2) 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

非意図的に食品中に混入することが知られている Acetamide はラット肝臓に発がん性を有しているがその機序は不明である。本研究では、今後予定されている遺伝毒性試験に先立ち、Acetamide のラット肝臓に対する毒性影響を検証し、肝障害後に生じる代償性細胞増殖活性の発がん機序への関与の可能性を探った。

キーワード： アセタミド、肝毒性、肝発がん性

【目的】アセタミドは、アセトニトリルの加水分解、または植物細胞壁からの酢酸アンモニウムの脱水によって形成されたアセテートエステルのアンモノリシスを伴う単純なアミドである。以前は香料および添加物として食品中に添加されていたが、ラットの肝臓に発がん性が有することが明らかとなり、国際がん研究機関もグループ 2B「おそらくヒトに発がん性がある」と分類したことなどを受けて、現在は意図的に食品中に添加することが禁止された。一方、近年の研究から食品加工中にアセタミドが検出されることが報告された。アセタミドは内因性の N アセチル化代謝産物とグルカンのアセタミドの親糖分子への熱分解から生じる。また NMR 分光法で検出可能レベルまで焙焼するとアセタミドのレベルが劇的に増加することが分かった。そのため依然としてアセタミドのヒト暴露の可能性が考えられている。そこで本研究では、アセタミドの発がん機序、特に非遺伝毒性発がん機序としての肝障害後の代償性細胞増殖の関与について検索する目的で、雄の F344 系ラットを用いた 28 日間反復投与毒性試験を実施し、肝障害マーカーを中心にして解析した。

【方法】5 週齢の雄 F344 系ラット 20 匹を日本エスエルシー株式会社（静岡県）から購入

し、1 週間の馴化後、各群 5 匹に配し、Control 群、1.25% Acetamide 群、2.5% Acetamide 群、5% Acetamide 群とした。本試験の最高用量は食品添加物安全性試験ガイドラインに準拠して 5% に設定をした。東京化成工業株式会社（東京都）から購入したアセタミドをオリエンタル酵母工業株式会社（東京都）から購入した基礎飼料の CRF-1 と混和し、試験期間中自由に摂取させた。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス株式会社（東京都）のソフトチップを用い、週 2 回の交換を行った。また試験期間中、一般状態観察を連日実施し、体重測定を週 1 回行った。剖検時には、イソフルラン麻酔科で腹部大動脈より採血し、血清生化学的検査を実施した。また、剖検後、肝臓を摘出し、重量を測定後、ホルマリン固定を行った。その後、常法に従ってパラフィン切片を作成し、病理組織学的検査のためにヘマトキシリソエオジン染色を行った。また肝発がん性予測のために肝前がん病変の Glutathione-S-transferase placental form (GST-P) および細胞増殖マーカーである Anti-Ki67 Antibody (Ki67) の免疫染色を行った。染色方法は、30% 過酸化水素 (H₂O₂) をメタノールで

10倍希釈したもの（3% H₂O₂メタノール）を用意し室温で30分浸漬し、内因性ペルオキシターゼ失活処理を行った。株式会社ニチレイバイオサイエンス（東京都）から購入したブロッキング試薬II（10%ヤギ正常血清）をスライドガラスに1枚あたり150μl滴下し、室温で30分静置した。株式会社医学生物学研究所（愛知県）で購入したAnti-GST-P pAbを一次抗体としスライドガラスに1枚あたり150μl滴下し、室温で1時間静置した。PBSで洗浄後、株式会社ニチレイバイオサイエンス（東京都）から購入したシンプルスティンラットMAX-PO(R)を二次抗体とし、十分量を滴下後、室温で30分静置した。PBSで洗浄後、PBS140ml、ジアミノベンジン（DAB）2mlをDAB用チャンバーに加えた。H₂O₂を反応直前に40μl加え、スライドガラスを2分浸漬した。後染色は、ヘマトキシリン染色液に3秒ほど浸し、すぐに流水洗浄を行った。その後、画像解析ソフトIPAP（住化テクノサービス株式会社（兵庫県））による定量解析を行った。Ki67染色の方法はGST-P染色と基本的には同様の方法で行った。関東化学株式会社から購入した10mMクエン酸緩衝液（pH6.0）に入れ、オートクレーブ（121°C）で15分間、抗原賦活化処理を行った。また、Abcam株式会社（UK）から購入したAbcam（Ab16667）Anti-Ki67 rabbitを一次抗体に用い、Dako株式会社（DK）から購入したDako抗体希釈液で250倍希釈を行い、4°C、オーバーナイトでインキュベーションした。株式会社ニチレイバイオサイエンス（東京都）から購入したヒストファイン（ラット組織用、ウサギ第一抗体用）を二次抗体とした。定量解析は顕微鏡下で肝細胞1000個当たりのKi67陽性細胞数を計測し、labelling index（LI）とした。

【結果】実験期間中に死亡動物は認められなかった。しかし5%投与群では4週目から体重減少が起こり、実験終了時の一般状態では著しい運動量の低下が認められた。また1.25%Acetamide群では3週目までControl群と同様の推移を示していたが、4週目から体重増加抑制が認められた。肝重量はControl群と5%Acetamide群と比較し有意な低値が認められ、相対肝重量ではControl群と投与群と比較し有意な低値が認められた。血清生化学

的検査では、alanine aminotransferase（ALT）、alkaline aminotransferase（ALP）およびaspartate aminotransferase（AST）は2.5%Acetamide群で統計学的に有意な高値となった。病理組織学的検査では、単細胞壊死、有糸分裂像の増加、細胞質内封入体、核の大小不同の出現および胆管増生が認められた。

【考察】5%Acetamide群では体重減少や一般状態の悪化などが認められたことから最大耐量を超えていたと考えられた。また、2.5%投与群では、血清中のALT、ALPおよびASTが有意な高値を示したことから肝障害が惹起されていると考えられた。一方、本用量は発がん用量の近傍であることから、GST-P陽性細胞巣の面積、数ともに有意に増加した事実はそれを裏付ける結果となった。以上よりアセタミドに起因した肝毒性はその肝発がん性機序に関与する可能性が明らかとなった。今後は、細胞増殖活性マーカー、Ki67の定量解析結果を加え考察する。また、今後実施予定の90日間反復投与試験の用量設定は、5%Acetamide群が最大耐量を超えていたこと、2.5%Acetamide群でも肝毒性認められていたことから、最高用量は2.5%で行う予定である。