

Table 1 Hematology in male rats treated with AA for 13 weeks

	Dose level (mg/kg body weight/day)		
	0 (control)	20	30
No. of animals	8	8	9
RBC	916.4 ± 45.4	899.5 ± 28.5	869.7 ± 90.6
Hb	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	58.9 ± 1.5	60.6 ± 1.4	60.6 ± 2.1
MCH	20.8 ± 0.7	20.6 ± 0.5	20.4 ± 0.5
MCHC	35.0 ± 0.9	34.3 ± 0.5	33.9 ± 0.6 **
Plat	24.3 ± 3.7	26.2 ± 4.5	24.6 ± 4.6
WBC	7787.5 ± 2248.5	8375.0 ± 1018.1	8122.2 ± 1003.5

Table 2 Hematology in female rats treated with AA for 13 weeks

	Dose level (mg/kg body weight/day)		
	0 (control)	20	30
No. of animals	9	9	9
RBC	854.9 ± 33.8	812.7 ± 50.2	804.1 ± 19.7 *
Hb	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	61.0 ± 1.9	62.3 ± 2.0	64.3 ± 1.1 **
MCH	20.9 ± 0.6	21.6 ± 0.7	21.2 ± 0.4
MCHC	34.2 ± 0.7	34.6 ± 1.4	33.3 ± 0.7
Plat	32.6 ± 6.3	30.0 ± 8.9	29.9 ± 4.7
WBC	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

Table 3 Serum biochemistry in male rats treated with AA for 13 weeks

	Dose level (mg/kg body weight/day)		
	0 (control)	20	30
No. of animals	8	8	9
TP	6.8 ± 0.5	7.1 ± 0.3	6.5 ± 0.4
Alb	3.6 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.6 ± 0.2
T-Bil	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T-Cho	180.8 ± 20.5	204.6 ± 25.8	180.2 ± 22.0
TG	269.3 ± 109.2	353.0 ± 142.1	207.2 ± 84.7
γ-GTP	3.3 ± 0.5	3.8 ± 0.7	3.9 ± 0.3
AsT	88.6 ± 45.1	82.1 ± 29.8	67.9 ± 26.4
AIT	144.6 ± 50.3	173.3 ± 57.7	90.9 ± 22.3
ALP	310.1 ± 52.9	330.8 ± 52.3	371.7 ± 24.2*
BUN	24.3 ± 2.4	23.8 ± 1.5	23.8 ± 2.0
Ca	11.0 ± 0.8	11.1 ± 0.4	10.9 ± 0.9
IP	8.0 ± 1.5	7.0 ± 0.8	6.9 ± 0.9
Na	135.1 ± 3.4	135.6 ± 2.4	137.6 ± 3.9
K	5.2 ± 0.7	4.9 ± 0.6	4.5 ± 0.7
Cl	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  $p < 0.05$

Table 4 Serum biochemistry in female rats treated with AA for 13 weeks

	Dose level (mg/kg body weight/day)		
	0 (control)	20	30
	No. of animals		
	9	9	9
TP	6.8 ± 0.6	7.0 ± 0.4	7.3 ± 0.7
Alb	3.3 ± 0.3	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.3
T-Bil	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0
T-Cho	220.4 ± 26.7	224.1 ± 28.3	212.9 ± 29.2
TG	422.0 ± 150.1	420.6 ± 109.3	429.1 ± 162.8
γ-GTP	3.1 ± 0.3	4.1 ± 0.9 *	4.4 ± 1.1 *
AsT	54.6 ± 20.7	47.3 ± 18.4	39.2 ± 11.4
AIT	115.0 ± 42.5	178.0 ± 113.2	89.6 ± 28.2
ALP	361.0 ± 48.7	356.0 ± 70.0	416.2 ± 72.0
BUN	22.0 ± 3.2	24.0 ± 4.7	24.7 ± 4.9
Ca	11.6 ± 1.1	11.8 ± 0.8	11.3 ± 0.7
IP	7.7 ± 1.4	7.7 ± 1.2	7.2 ± 1.4
Na	134.9 ± 4.1	136.0 ± 3.9	136.1 ± 3.9
K	5.9 ± 0.8	5.7 ± 0.9	5.4 ± 0.5
Cl	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  $p < 0.05$

Table 5 Organ weights in male rats treated with AA for 13 weeks

	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

Table 6 Organ weights in female rats treated with AA for 13 weeks

	Dose level (mg/kg body weight/day)		
	0 (control)	20	30
No. of animals	9	9	9
Final body weight (g)	171.7 ± 21.4	180.6 ± 24.8	167.4 ± 24.3
Relative organ weights (/100g body weight)			
Brain g	0.64 ± 0.09	0.60 ± 0.08	0.63 ± 0.10
Pituitary mg	4.9 ± 1.0	4.8 ± 0.8	5.2 ± 1.2
Thyroids mg	5.8 ± 1.6	5.6 ± 1.0	6.2 ± 2.4
Thymus mg	37.1 ± 4.6	38.2 ± 3.4	40.3 ± 5.4
Lungs g	0.48 ± 0.09	0.53 ± 0.07	0.54 ± 0.05
Heart g	0.34 ± 0.14	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.03
Spleen g	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.02
Liver g	4.63 ± 0.39	4.63 ± 0.33	4.61 ± 0.23
Adrenals mg	13.7 ± 2.8	12.4 ± 2.0	12.9 ± 1.6
Kidneys g	0.73 ± 0.07	0.71 ± 0.03	0.76 ± 0.06

Each value represents the mean ± S.D.

Table 7 Microscopic findings in sciatic nerve of male rats treated with AA for 13 weeks

	Dose level (mg/kg body weight/day)	0 (control)	20	30	50
Organ	No. of animals	9	9	9	9 <sup>a</sup>
Finding					
Sciatic nerve					
Axonal/myelin degeneration (axonal loss, demyelination)					
± (slight)	0	4	5	0	
+ (moderate)	0	0	4	5	
++ (severe)	0	0	0	4	

<sup>a</sup> All animals were sacrificed at week 5-9.

Table 8 Microscopic findings in sciatic nerve and spinal cord of female rats treated with AA for 13 weeks

	Dose level (mg/kg body weight/day)	0 (control)	20	30	50
No. of animals		9	9	9	9 <sup>a</sup>
Organ					
Finding					
Sciatic nerve					
Axonal/myelin degeneration (axonal loss, demyelination)					
± (slight)		0	4	3	0
+ (moderate)		0	1	4	7
++ (severe)		0	0	1	2
Atrophy of nerve fibers (fibrosis)					
+ (moderate)		0	0	0	5
++ (severe)		0	0	0	1
Spinal cord					
Axonal degeneration (axonal swelling/loss)					
± (slight)		0	0	2	3
+ (moderate)		0	0	0	2

<sup>a</sup> All animals were sacrificed at week 7-12.

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

分担研究者 梅村 隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨

アクリルアミド (AA) の発がん過程に対する DNA の直接傷害性と酸化ストレスの関与を明らかにするため、*gpt delta* マウスを用いて AA の *in vivo* 変異原性を検索するとともに、酸化的 DNA 損傷と AA 特異的 DNA 付加体生成について検討した。雄性 6 週齢の C57 BL/6 *gpt delta* マウスに AA を 0, 125, 250 及び 500 ppm の濃度で 4 週間飲水投与した。マウスの標的臓器である肺及び肝臓と、陰性対照として腎臓を採取し、本年度は各臓器の DNA 中 8-OHdG レベルの測定と肺 DNA 中の *gpt* 及び *red/gam* 遺伝子突然変異頻度の検索を行った。8-OHdG レベルは 500 ppm 群の肝臓において対照群に比べ有意な上昇が認められた。肺の *gpt* 遺伝子突然変異頻度は AA 処置群で上昇が認められ、*gpt* 変異コロニーのスペクトラム解析の結果、AA 投与群において AT-TA transversion 及び AT-GC transition の変異頻度が対照群に比べ有意に上昇した。また、*red/gam* 遺伝子突然変異頻度は用量依存的な上昇が認められた。以上の結果から、AA はマウス肺の *in vivo* 変異原性を誘発することが示されたが、その機序に酸化ストレスの関与の可能性は低いと考えられた。一方、肝臓では酸化的 DNA 損傷が引き起こされていることが明らかとなり、今後、肝臓の *in vivo* 変異原性についても検討する予定である。

A. 研究目的

アクリルアミド (AA) は食品の加熱調理によって生成し、遺伝毒性を示すと共に発がん性を有することが知られている。IARC においてもグループ 2A (ヒトに対しておそらく発がん性を示す) に分類されており、ヒト健康に対する影響が懸念されている。

AA の遺伝毒性及び発がん性には、Cyp2E1 の代謝によって産生されるグリシドアミド (GA) を介して生成する DNA 付加体の関与が疑われている。中でも GA-N7-Gua は生成量が多く、GC-TA transversion 変異を引き起こすことから AA

の遺伝毒性の直接的な原因であると考えられている。しかしながら、GA-N7-Gua はげっ歯類において AA の標的以外の臓器でも検出されるだけでなく、その量と組織特異性が一致しないことから、酸化的ストレスを介した発がん機序との関連性も考えられている。事実、AA は glutathion-S-transferase (GST) を触媒として酸化型グルタチオンと結合し、あるいは直接、還元型グルタチオン (GSH) と反応し、いずれの場合も抗酸化能を有する細胞内 GSH の枯渇を招く。また、AA を投与したラットの肝臓、腎臓及び精巢で脂質過酸化の指標である TBARS



の上昇が報告されている (Yousef et al., Toxicology, 2006)。しかしながら、*in vivo* における酸化ストレスを介した DNA 損傷についての報告はなく、AA の発がん性への酸化 DNA 損傷の関与は明らかになっていない。

本研究では、AA の発がん過程に対する酸化 DNA 損傷と直接的 DNA 付加体の関与を明らかにするため、*gpt delta* マウスを用いて、マウスの標的臓器である肺及び肝臓と、非標的臓器である腎臓における *gpt* 遺伝子突然変異解析、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) および DNA 付加体の定量解析を行った。

## B. 研究方法

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 週齢の雄性 C57BL/6 *gpt delta* 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った。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 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。

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 et al., Environ. Mol. Mutagen., 2006)。被験物質は各用量で脱イオン水 (DW 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 DW

水を同期間自由に摂取させた。

試験期間中、飲水の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。また、体重および飲水量の測定は週 1 回行った。

4 週間の投与の後に動物はエーテル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。8-OHdG 測定および *gpt* 及び *Spi* assay 用のサンプルは液体窒素により凍結し、測定まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

肺、肝臓および腎臓の DNA 中 8-OHdG の測定は Nakae (Nakae et al., Cancer Lett., 1995) 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 (和光純薬社製) 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  $8\text{-OHdG} / 10^5\text{dG}$  量として算出した。

*gpt* 及び *Spi* assay では、肺から採取したゲノム DNA と Transpack (Stratagene) を用いて、 $\lambda$ ファージの *in vitro* パッケージング反応を行い、ゲノム DNA から  $\lambda$ EG10DNA をファージ粒子として回収した。

*gpt assay* では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* 変異頻度 (MF) を算出した。また、6-TG 耐性コロニーの *gpt* 遺伝子配列を決定して変異スペクトラムを同定した。

Spi<sup>-</sup>欠変異の検出では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株) に感染させ、Spi<sup>-</sup>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、*redgam* 遺伝子機能が不活化した真の Spi<sup>-</sup>プラークを検出した。また、パッケージ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<sup>-</sup>プラーク数を回収した総プラーク数で除して *redgam* 遺伝子突然変異頻度を算出した。

(統計学的処理方法)

最終体重、臓器重量、8-OHdG レベル、*gpt* 及び *redgam* 遺伝子突然変異頻度については、一元配置の分散分析と Tukey の多重比較検定により行った。*Gpt* 変異コロニーのスペクトラム解析から得られた特異的変異頻度については、Bartlett の等分散検定と Dunnett の多重比較検定で行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテル麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。動物実験に関しては、「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」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。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

試験期間中の動物の一般状態には、AA 500 ppm 群を除いて特記すべき変化は認められなかったが、AA 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 週目に一例の途中死亡が認められた。また、試験期間中の体重の推移は、AA 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べ有意な低値を示した。試験期間中の飲水量及び AA 曝露量を Table 1 に示す。125 ppm 群では対照群と比べ飲水量に変化は認められなかったが、250 及び 500 ppm 群では対照群に比べ飲水量の低下が認められ、125、250 及び 500 ppm 群の AA 曝露量は 22.2、34.1 及び 62.9 mg/kg/day であった。また、最終体重及び臓器重量を Table 2 に示す。臓器重量は、500 ppm 群で肝臓相対重量の有意な減少、肺相対重量の有意な増加が認められた。また、陰性対照である腎臓は全ての AA 処置群で用量依存的な相対重量の有意な高値が認められた。

DNA 中 8-OHdG レベルは、肺及び腎臓ではいずれの濃度においても変化は認められなかったのに対し、肝臓では 500 ppm 群で有意な上昇が認められた (Fig. 1)。肺の *gpt* 遺伝子突然変異頻度を Table 3 に示す。有意な変化ではなかったものの、*gpt* 遺伝子突然変異頻度は AA 処置群で上昇傾向が認められ、250 及び 500 ppm 群では対照群に比べ約 2.5 倍の増加が認められた。*Gpt* 変異コロニーのスペクトラム解析より、変異種類ごとの頻度を算出した結果、250 及び 500 ppm

群で AT-TA transversion 変異頻度、125 及び 500 ppm 群で AT-GC transition 変異頻度の有意な上昇が認められた (Table. 4)。さらに、Spi assay の結果、有意な変化ではなかったものの、用量依存的な *red/gam* 遺伝子突然変異頻度の増加が認められ、500 ppm 群では対照群の約 2 倍となった (Table 5)。

#### D. 考察

本研究では、AA の *in vivo* 変異原性とそれに対する酸化的 DNA 損傷の関与について明らかにすることを目的として、AA を 4 週間投与した *gpt delta* マウス肺における *gpt* ならびに *red/gam* 遺伝子変異頻度と、肺、肝臓及び腎臓における 8-OHdG レベルの測定を実施した。ICR-Swiss 及び A/J マウスで腫瘍誘発が報告されている肺において、AA による *gpt* 及び *red/gam* 遺伝子突然変異頻度の上昇傾向が認められ、AA は標的臓器マウス肺に対して遺伝毒性を有する可能性が示された。しかし、肺 DNA 中の 8-OHdG レベルに変化は見られなかったことから、この *in vivo* 変異原性には酸化的ストレスが関与している可能性は低いと考えられた。また、変異コロニーのスペクトラム解析の結果、N7-GA-Gua によって生じる GC-TA transversion 変異の上昇は認められず、AT-TA transversion 及び AT-GC transition 変異の有意な上昇が認められた。従って、肺における *gpt* 遺伝子突然変異頻度の上昇には Ade の付加体として報告されている N3-GA-Ade や N1-GA-Ade がむしろ深く関与している

ことが考えられた。

一方、BigBlue マウスで *cII* 遺伝子突然変異頻度の上昇が報告されている肝臓では、AA 500 ppm 群において 8-OHdG レベルが有意に増加した。今後は、肝臓における *in vivo* 変異原性試験を実施し、酸化ストレスとの関与について検討する予定である。

#### E. 結論

本年度の結果から、AA は標的臓器マウス肺に *in vivo* 変異原性を有している可能性が示された。しかし、その機序には酸化ストレスの関与は低いと考えられた。一方、肝臓では AA による酸化的 DNA 損傷が生じることが明らかとなり、今後は、肝臓ならびに腎臓での *gpt* 及び Spi assay を実施し、各臓器の病理組織学的検索を加え、AA の *in vivo* 変異原性の詳細について明らかにする。さらに、AA 特異的 DNA 付加体の定量的解析を行い、AA の *in vivo* 変異原性さらには発がん性に対する酸化的 DNA 損傷と直接的 DNA 傷害の関与について検討する。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究成果

##### G-1. 学会発表

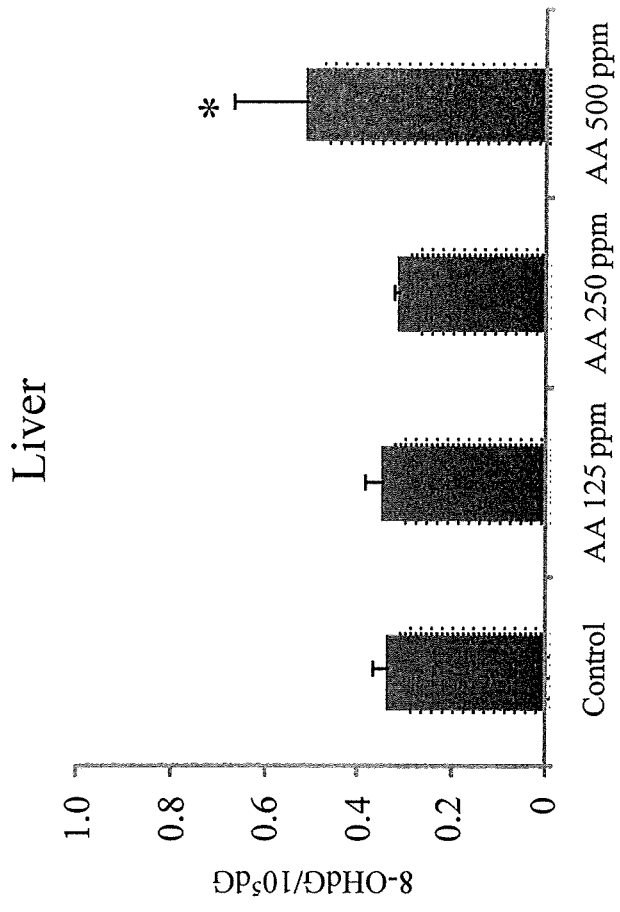
なし

##### G-2. 発表論文

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



\*: p<0.05 vs. Control group.

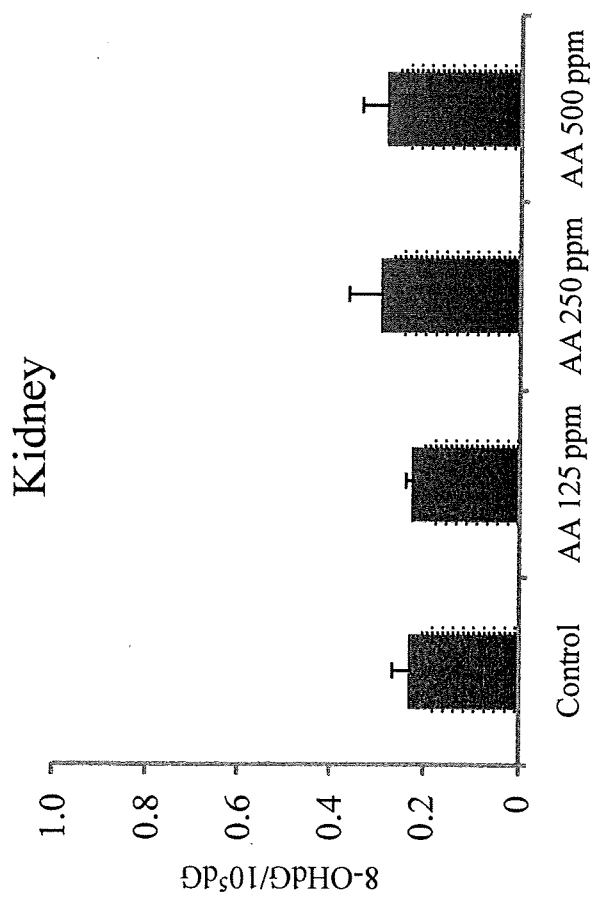
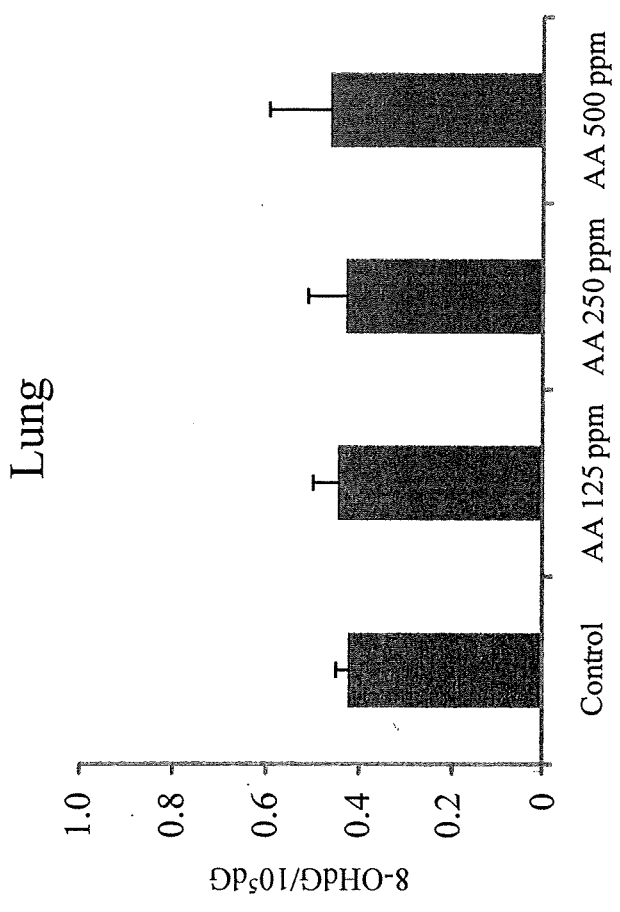


Fig. 1 8-OHdG levels in the lungs, livers and kidneys of C57BL/6 *gpt* delta mice treated with AA for 4 weeks

Table 1 Water consumption for C57BL/6 *gpt* delta mice treated with AA

Group	Water consumption		Intake of AA (mg/kg/day)
	ml/mouse/day	ml/kg/day	
Control	4.6	177.1	
125 ppm	4.5	177.9	22.2
250 ppm	3.4	136.3	34.1
500 ppm	2.6	125.8	62.9

Table 2 Body and organ weights of C57BL/6 *gpt* delta mice treated with AA for 4 weeks.

Item	Control	AA 125 ppm	AA 250 ppm	AA 500 ppm
No. of animals	10	10	10	9
Body weight (g)	27.03 ± 1.67	26.03 ± 1.51	25.34 ± 2.57	17.6 ± 3.40**
<b>Absolute (g)</b>				
Lung	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.01**
Liver	1.24 ± 0.12	1.28 ± 0.19	1.28 ± 0.17	0.71 ± 0.24**
Kidney	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.24 ± 0.04**
<b>Relative (g%)</b>				
Lung	0.51 ± 0.05	0.55 ± 0.04	0.58 ± 0.03	0.67 ± 0.09**
Liver	4.58 ± 0.38	4.90 ± 0.45**	5.05 ± 0.40**	3.95 ± 0.63**
Kidney	1.12 ± 0.05	1.23 ± 0.06**	1.24 ± 0.07**	1.39 ± 0.10*

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

Table 3 *gpt* mutant frequencies in the lungs of C57BL/6 *gpt* delta mice treated with AA for 4 weeks.

Treatment	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	1	9.68	7	0.72	<b>0.35 ± 0.15</b>
	2	0.90	0	— <sup>a</sup>	
	3	7.43	3	0.40	
	4	6.48	1	0.15	
	5	7.25	1	0.14	
AA 125 ppm	6	8.69	6	0.69	<b>0.69 ± 0.48</b>
	7	8.91	4	0.45	
	8	2.66	4	1.51	
	9	5.94	3	0.51	
	10	7.11	2	0.28	
AA 250 ppm	11	10.62	4	0.38	<b>0.92 ± 0.41</b>
	12	5.90	8	1.36	
	13	2.79	3	1.08	
	14	5.94	7	1.18	
	15	4.95	3	0.61	
AA 500 ppm	16	6.93	5	0.72	<b>0.86 ± 0.20</b>
	17	2.70	2	0.74	
	18	9.14	9	0.99	
	19	8.64	10	1.16	
	20	10.17	7	0.69	

<sup>a</sup>: The data were excluded for the calculation of the MF because of no detection of *gpt* mutant colony on the plate.

Table 4 Mutation spectra of *gpt* mutant colonies.

	Control	AA 125 ppm	AA 250 ppm	AA 500 ppm
<b>Base substitution</b>				
<b>Transversions</b>				
GC-TA	4 (0.09)	2 (0.06)	6 (0.28)	1 (0.05)
GC-CG	0	0 (0.02)	0	0
AT-TA	0	0	4 (0.14)*	8 (0.19)*
AT-CG	1 (0.02)	0	0	0
<b>Transitions</b>				
GC-AT	4 (0.11)	8 (0.26)	9 (0.27)	9 (0.30)
AT-GC	0	4 (0.14)**	1 (0.02)	2 (0.05)*
<b>Deletion</b>				
Single bp	2(0.24)	4 (0.20)	3 (0.14)	10 (0.23)
Over 2bp	1 (0.03)	0	1 (0.03)	2 (0.04)
Insertion	0	0	1 (0.03)	0
Complex	0	0	0	0
Total	13	18	25	32

The number of colonies with independent mutations is shown.

( ): specific mutant frequency ( $\times 10^{-5}$ )

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



Table 5 *red/gam* mutant frequencies in the lungs of C57BL/6 *gpt* delta mice treated with AA for 4 weeks.

Treatment	Animal No.	Plaques within		Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
		XL-1 Blue MRA (x)	XL-1 Blue MRA (P2)		
Control	1	3.60	2	0.56	<b>0.73 ± 0.50</b>
	2	2.70	4	1.48	
	3	8.28	1	0.12	
	4	6.21	4	0.64	
	5	6.93	6	0.87	
AA 125 ppm	6	8.10	10	1.23	<b>1.01 ± 0.33</b>
	7	11.07	15	1.36	
	8	4.32	3	0.69	
	9	7.11	8	1.13	
	10	14.31	9	0.63	
AA 250 ppm	11	17.37	28	1.61	<b>1.26 ± 0.57</b>
	12	9.63	11	1.14	
	13	5.40	10	1.85	
	14	7.47	10	1.34	
	15	2.79	1	0.36	
AA 500 ppm	16	8.01	17	2.12	<b>1.56 ± 0.60</b>
	17	1.53	0	— <sup>a</sup>	
	18	14.13	28	1.98	
	19	6.30	8	1.27	
	20	1.17	1	0.85	

<sup>a</sup>: The data were excluded for the calculation of the MF because of no detection of *gpt* mutant colony on the plate.

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  
平成21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。本研究は、ライフステージの違いによるAAの遺伝毒性感受性の差を検討する目的で、3(幼若)、11(成熟)週齢のSDラットにAAを50~200 ppmを28日間飲水投与し、各種臓器における遺伝毒性試験[pig-A 突然変異(赤血球)、小核(末梢血、骨髄、精巣)、コメット(肝臓、精巣)]を実施した。また、甲状腺、乳腺、肝臓、精巣でのDNAアダクトも測定した。成熟、および幼若ラットでの遺伝毒性反応性を比較すると、全てにおいて、幼若ラットの方で高い傾向にあったが、末梢血、骨髄の小核、赤血球でのpig-A 突然変異、肝臓のコメットに関しては、最高用量で統計的な有意差があるものの、顕著な差は認められなかった。一方、精巣での小核、コメット試験では用量依存的な陽性反応が観察され、成熟と幼若ラット間で顕著な差が観察された。DNAアダクトの解析結果においても、甲状腺、乳腺、肝臓では成熟と幼若ラット間で違いは認められなかったが、精巣においては顕著に幼若ラットで蓄積を認めた。AAは精巣で強い染色体異常が観察されることが報告されており、今後、精巣での遺伝毒性メカニズムや、ライフステージの違いによる遺伝毒性発現の差を解明したい。

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ダミド(GA)が、ほ乳類細胞において、強い遺伝素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 はグルタチオン還元酵素のよって解毒される。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、これら酵素は新生時期と成熟期では、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。

今年度は *in vivo* での AA の遺伝毒性発現の特徴と、ライフステージにおけるそれら違いを検討するために、3 (幼若) , 11(成熟) 週齢の SD ラットを用いて多臓器(末梢血、骨髄、肝臓、精巣) マルチエンドポイント (pig-A 遺伝子突然変異試験、小核試験、コメット試験) の遺伝毒性試験を行った。また、AA の発がん標的組織と考えられる甲状腺、乳腺、および遺伝毒性試験の対象となる肝臓、精巣での DNA アダクトの定量を行った。

## 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 3 週 (幼若)、および 11 週齢(成熟)の動物を使用した。

### ii) 投与

SD ラットを 4 群各 10 匹ずつに分けた。それぞれの群に蒸留水で調整した 0、50、100、200ppm の AA (M.W. 71、シグマ) を、給水ビンで 28 日間飲水経口摂取させた。

### iii) 小核試験

投与開始 28 日後 (最終投与日) に、動物の尾静脈または心臓から血液を約 100  $\mu$ L 採取し、小核試験を行った。また、投与開始 28 日後 (最終投与日) に、精巣を摘出して、小核試験を行った。小核試験は林らの方法に従って行った。

### iv) アルカリコメット試験

最終投与日に屠殺後解剖し、肝臓の左側葉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。

### v) pig-A 遺伝子突然変異試験

抗凝固剤として EDTA を用いて採血した末梢血に CD45 抗体 (Cy5) と、CD59(FITC) 抗体を反応させ、赤血球中の CD59 陰性細胞を pig-A 突然変異体としてフォローサイトメーターで分画した。方法に関しては Miura らの方法に従った。

### vi) DNA アダクトの定量

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 を使い、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

SD ラットのそれぞれの群に蒸留水で調整した 0、50、100、200ppm の AA (M.W. 71、シグマ) を、給水ビンで 28 日間飲水経口摂取させた。末梢血と精巣での小核試験、肝臓、精巣でのコメット試験を実施した。

末梢血での小核は最高用量でわずかに増加したが、幼若、成熟ラットでの差は認められなかった (図 1)。

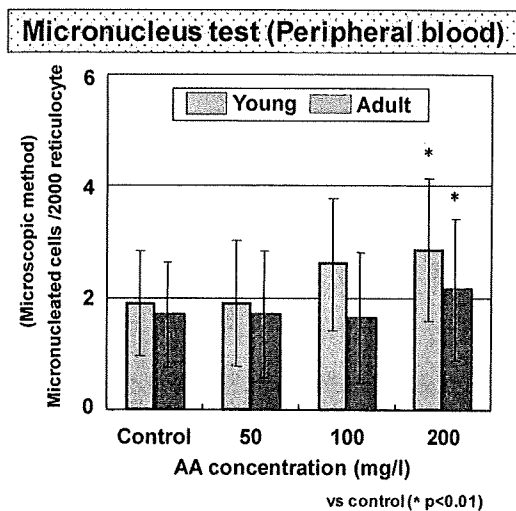


図 1

また、骨髄の小核についても同様であり、最高用量において幼若ラットで統計的に有意ではあったが、その増加と幼若、成熟ラットの差は顕著ではなかった (図 2)。

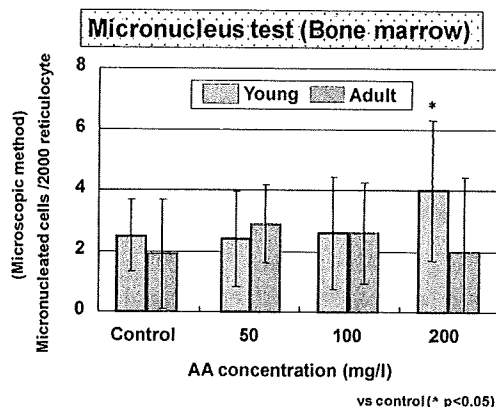


図 2

今回は新たに pig-A 遺伝子突然変異試験を行った。Pig-A (Phosphatidylinositol glycan complementation group-A) 遺伝子は X 染色体に存在する遺伝子で、突然変異によって GPI アンカータンパクが欠損し、この細胞を CD59 陰性細胞としてフローサイトメーターで分画することができる。Pig-A の結果は末梢血の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 (図 3)。

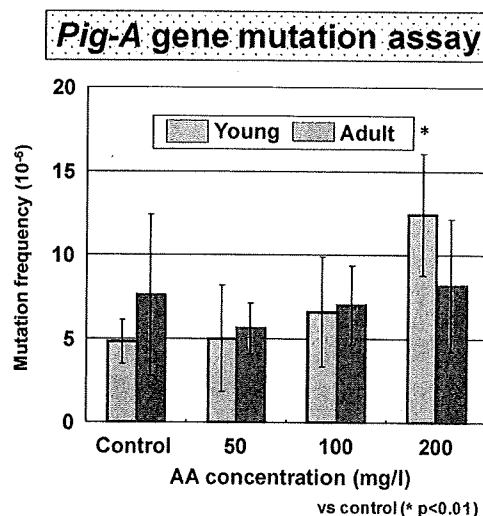


図 3

肝臓においてはコメット試験を実施した。コメットは用量依存的に両群で増加したが、