

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。50 週目における雄の切迫屠殺例には肝細胞腺腫、36 週目における雌の切迫屠殺例には肝細胞変異細胞巣及び上皮小体過形成がみられたことから、以降の切迫屠殺/死亡例を発がん性評価の有効数にすることとした。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継続する。

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。また、後述する 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。本実験で得られた試料を用いて、乳腺組織に対する AA の影響について引続き詳細に検討する。

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が、検索例数を増やすなど検討を継続する必要がある。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、本実験で得られた試料を用いた検討を要する。一方、内分泌系などを介する間接的な影響についてもプロジェステロンなど今回検索しなかった血清ホルモン濃度の測定や 104 週投与群に対する検索など引続き検討を行う必要がある。

## E. 結論

ハムスターを用いた発がん性試験については、雌雄とも78週の投与期間後の最終剖検を終了した。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ため、投与期間については的確に見極められたと考えられる。現在、組織標本の作製ならびに病理組織学的検査を進めている。ラットを用いた発がん機序解析実験では、AAの長期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 の発現上昇がみられたことから、AAの乳腺組織における酸化ストレスの誘発など直接作用及び内分泌系などへの影響を介する間接作用の両面より解析を継続する。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kitahashi T, Mutoh M, Tsurusaki M, Iinuma G, Suzuki M, Moriyama N, Yoshimoto M, Wakabayashi K, Sugimura T, Imai T. Imaging study of pancreatic ductal adenocarcinomas in Syrian hamsters using X-ray micro-computed tomography (CT). *Cancer Sci* 101, 1761-1766 (2010).
2. Kitahashi, T, Yoshimoto, M, Imai, T. Novel immunohistochemical marker, integrin  $\alpha_v\beta_3$ , for BOP-induced early lesions in hamster pancreatic ductal carcinogenesis. *Oncol. Lett.* 2, 229-234 (2011)
3. Hirata-Koizumi, M, Fujii, S, Ono, A, Hirose, A, Imai, T, Ogawa, K, Ema, M, Nishikawa, A. Two-generation

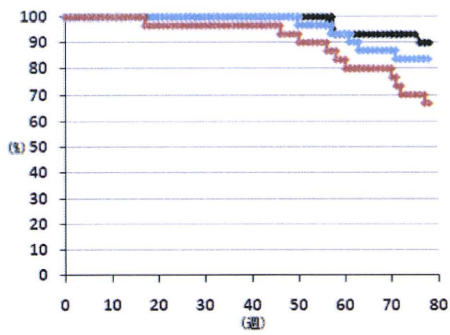
reproductive toxicity study of aluminium sulfate in rats. *Reprod. Toxicol.* 31, 219-230 (2011)

4. Teraoka, N, Mutoh, M, Takasu, S, Ueno, T, Nakano, K, Takahashi, M, Imai, T, Masuda, S, Sugimura, T, Wakabayashi, K. High susceptibility to azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in obese KK-A(y) mice. *Int. J. Cancer* (In press)
5. 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* (In press)
6. Takami, S, Imai, T, Cho, YM, 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)

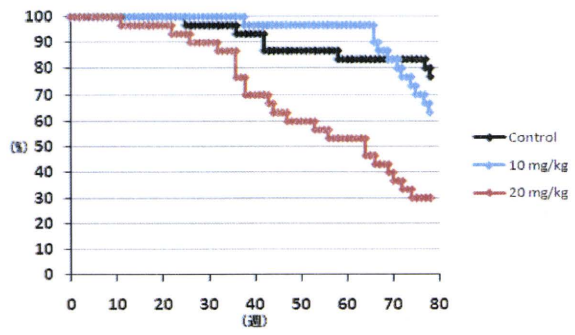
### 2. 学会発表

1. 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. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology. ワシントンD.C. (2011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。

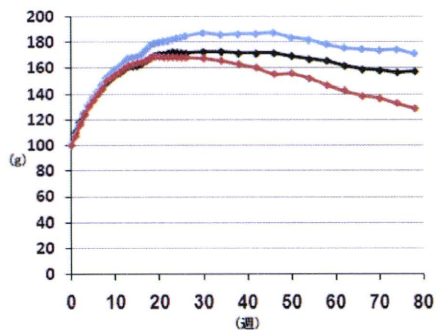


(雄)

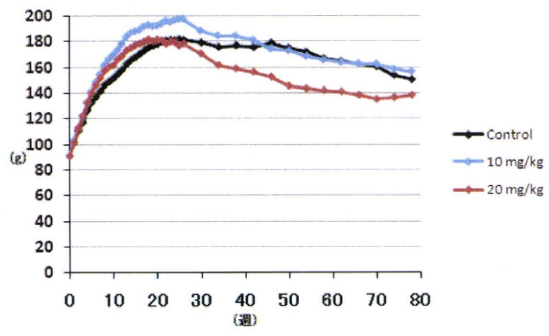


(雌)

図1 生存率の推移 (ハムスター発がん性)

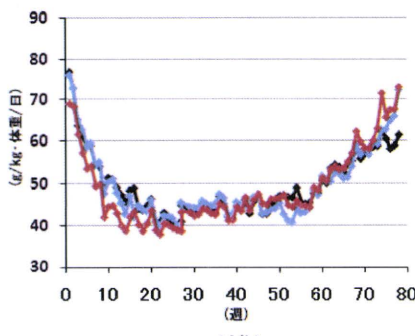


(雄)

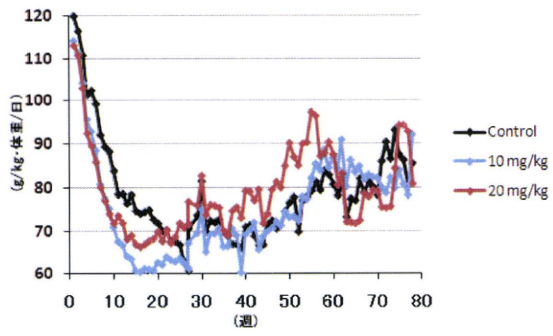


(雌)

図2 体重の推移 (ハムスター発がん性)



(雄)



(雌)

図3 摂水量の推移 (ハムスター発がん性)

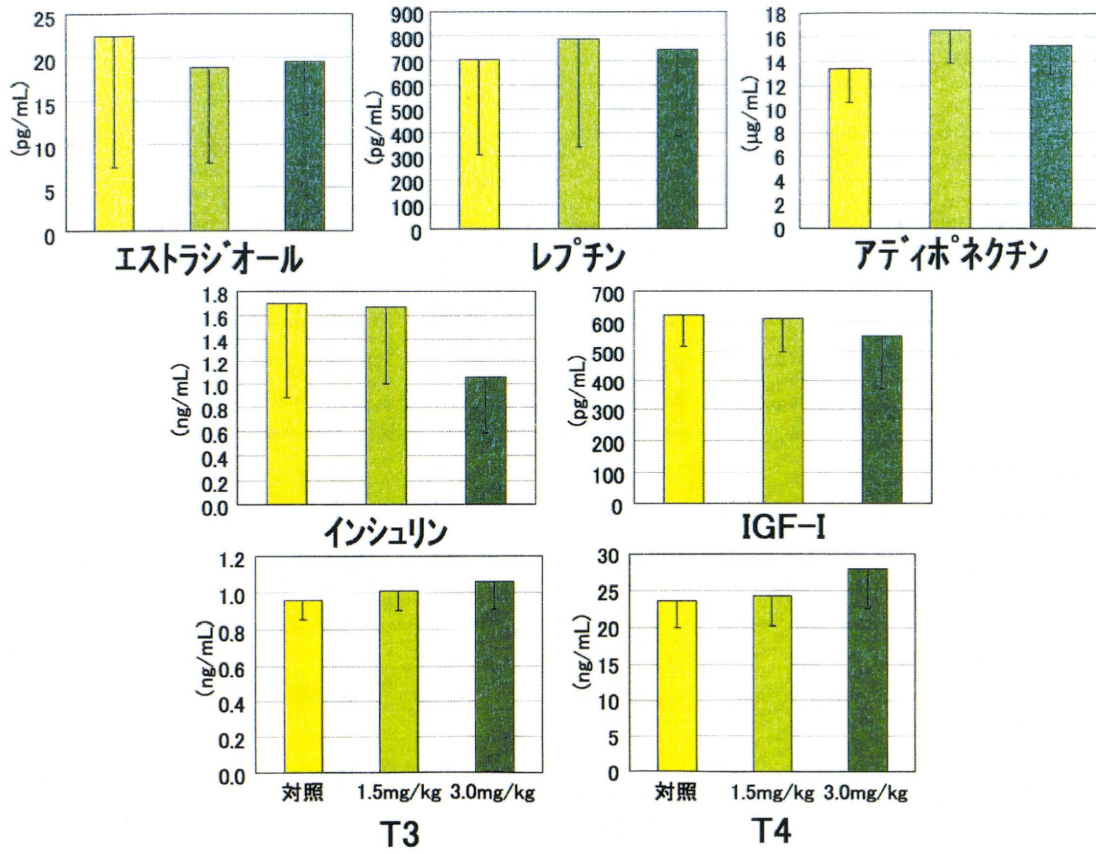


図 4 52 週剖検時の血清生化学検査値 (ラット発がん機序解析)

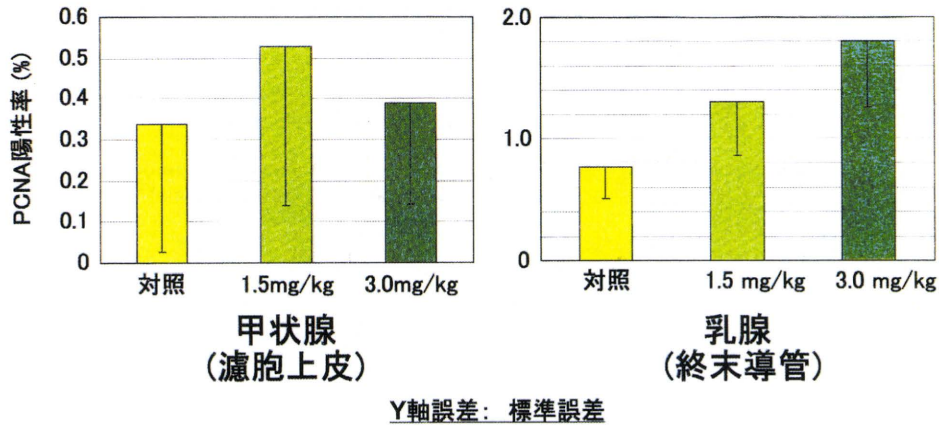


図 5 52 週剖検時の甲状腺及び乳腺における細胞増殖活性 (ラット発がん機序解析)

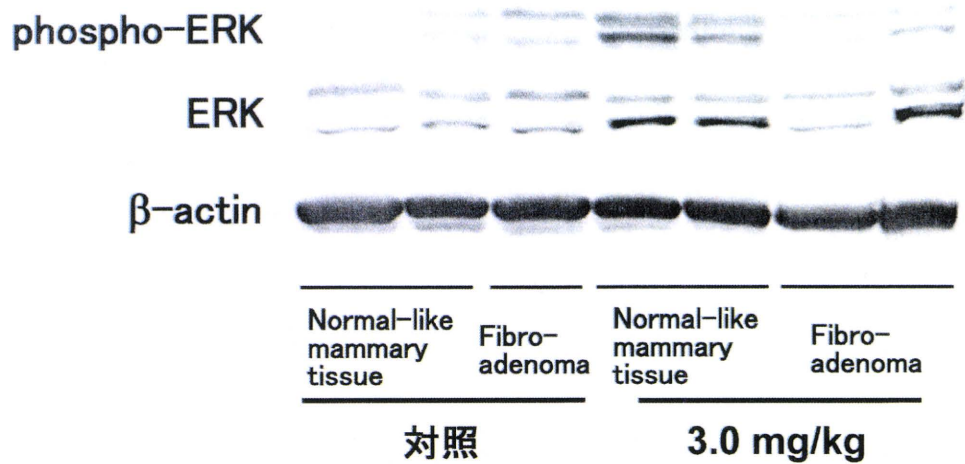


図6 104週群の切迫屠殺例にみられた乳腺組織/腫瘍におけるERKの活性化  
(ラット発がん機序解析)

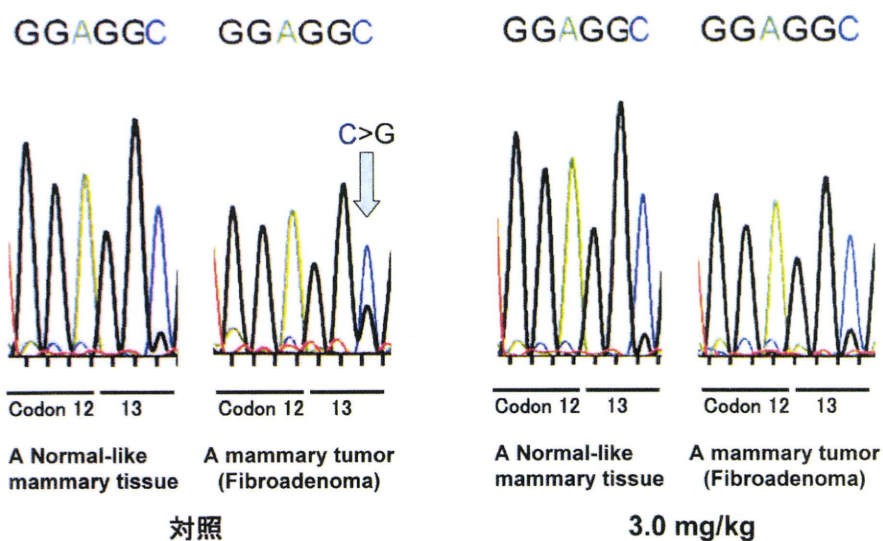


図7 104週群の切迫屠殺例にみられた乳腺組織/腫瘍におけるH-ras遺伝子の変異  
(ラット発がん機序解析)

表1 最終剖検時の主な肉眼所見の発生頻度 (%) (ハムスター発がん性)

	雄		雌	
	群 (mg/kg 体重/日)	動物数	群 (mg/kg 体重/日)	動物数
	0 (対照)	27	20	0 (対照)
	10	25	19	10
	20	19	23	19
	30	19	23	9
臓器・所見				
肝臓 腫瘤	4 (15)	3 (12)	3 (16)	2 (9)
膵臓 結節	4 (15)	2 (8)	6 (32)	7 (30)
前胃 結節	4 (15)	7 (28)	5 (26)	5 (26)
脾臓 腫瘤	1 (4)	1 (4)	0	1 (4)
甲状腺 結節	0	0	0	2 (9)
副腎 結節	2 (7)	11 (44)	2 (11)	2 (9)
子宮 腫瘤	-	-	-	1 (4)
				1 (5)
				20
				0
				5 (26)
				6 (66)
				0
				0
				2 (22)
				0
				1 (5)
				0

表 2 52週剖検時の絶対臓器重量 (ラット発がん機序解析)

絶対重量	群 (mg/kg 体重/日)		
	0 (対照)	1.5	3.0
	動物数		
	10	10	10
脳	1.83 ± 0.03	1.81 ± 0.03	1.83 ± 0.04
肝臓	6.67 ± 0.83	6.20 ± 0.46	6.17 ± 0.27
腎臓	1.51 ± 0.10	1.42 ± 0.09	1.43 ± 0.08
副腎	53.3 ± 4.0	47.4 ± 17.2	51.0 ± 2.5
下垂体	19.4 ± 9.3	15.6 ± 1.9	15.5 ± 2.4
甲状腺	15.4 ± 2.4	14.9 ± 2.0	15.4 ± 1.9

年

表 3 52週剖検時の体重比臓器重量 (ラット発がん機序解析)

剖検時体重 (g)	群 (mg/kg 体重/日)		
	0 (対照)	1.5	3.0
	動物数		
	10	10	10
剖検時体重 (g)	221.4 ± 15.0 <sup>a</sup>	217.2 ± 12.3	212.6 ± 10.2
体重比重量 (/100g 体重)			
脳	0.83 ± 0.06	0.83 ± 0.05	0.86 ± 0.04
肝臓	3.00 ± 0.21	2.86 ± 0.13	2.91 ± 0.11
腎臓	0.68 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.67 ± 0.04
副腎	24.2 ± 2.4	24.2 ± 1.7	24.0 ± 1.7
下垂体	8.6 ± 3.4	7.2 ± 0.7	7.2 ± 1.1
甲状腺	7.0 ± 1.2	6.9 ± 0.9	7.3 ± 1.0

<sup>a</sup> 平均値 ± S.D.

表 4 切迫/途中死亡/104 週剖検時の主な肉眼所見の発生頻度 (%) (ラット発がん機序解析)

臓器・所見	雌			
	群 (mg/kg 体重/日)	0 (対照)	1.5	3.0
動物数		21	19	20
皮下 腫瘤/結節		5 (24)	3 (16)	13 (65)*
下垂体 結節/班		10 (48)	7 (37)	7 (35)
甲状腺 結節		2 (10)	1 (5)	4 (20)
副腎 腫瘤/結節		0	1 (5)	0
子宮 腫瘤		7 (33)	7 (37)	8 (40)
舌/口腔 腫瘤/結節		0	1 (5)	2 (10)

\* p<0.01



平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安心・安全確保推進研究事業) 分担研究報告書

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

分担課題：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 病理部第一室長

研究要旨

アクリルアミド (AA) のマウス肺及び肝発がんにおける遺伝毒性メカニズムと酸化ストレスの関与を検討するため、【実験 1】では、平成 21 年度に実施した *gpt delta* マウスを用いた AA の *in vivo* 変異原性の検索を継続した。AA の代謝物グリシドアミド (GA) の発がん標的臓器である肝臓では *gpt* 遺伝子突然変異頻度 (MF) の上昇傾向と、*red/gam* MF の有意な上昇が認められ、非標的臓器である腎臓では変化は認められなかった。昨年度の結果を考慮すると、AA の肺及び肝発がん機序には遺伝毒性メカニズムの関与が示唆されたが、*gpt* 及び *red/gam* MF の上昇と一致する 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの変化は認められなかったことから、AA の遺伝毒性メカニズムに酸化的 DNA 損傷は関与しないことが示唆された。【実験 2】では、ヒトにおける AA 暴露実態から若年層への高濃度暴露の可能性が考えられることから、幼若 *gpt delta* マウスを用いて、AA の *in vivo* 変異原性ならびに酸化ストレスの関与について検討した。雄性 3 及び 11 週齢の B6C3F<sub>1</sub> *gpt delta* マウスに AA を 0、100、200 及び 400 ppm の濃度で 4 週間飲水投与した。AA 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、本年度は幼若マウスの肺 DNA 中の *gpt* 及び *red/gam* MF の検索を行った。一般状態観察では、幼若マウスの AA 400 ppm 群において神経毒性に起因する後肢麻痺が成熟マウスより強く認められ、幼若マウスは AA の神経毒性に対して感受性が高いことが示唆された。また、幼若マウスの肺で *gpt* MF 及び *red/gam* MF の有意な上昇が認められた。今後、遺伝毒性及び酸化ストレスに対する感受性の違いを明らかにし、AA の遺伝毒性メカニズムにおける酸化ストレスの関与の有無、さらにはこれらに対する幼若動物の感受性の差異を明らかにする。

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、種々の変異原性試験に陽性を示し、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代謝物のグリシドアミド (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、酸化ストレスを介した発がん機序との関連性も疑われている。事実、AA は glutathion-S-transferase (GST) を介して、もしくは還元型グルタチオン (GSH) と直接反応して、抗酸化能を有する細胞内 GSH を枯渇させる。また、AA を投与したラットの肝臓、腎臓及び精巣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 の発がん性への関与は明らかになっていない。また、平成 21 年度の本研究において雄性 C57BL/6 *gpt delta* マウスを用いて AA を 4 週間飲水投与した結果、AA 500 ppm 群において肝 DNA 中 8-OHdG レベルが有意に上昇することを明らかにしたが、肝臓の *in vivo* 変異原性については明らかになっていない。

今年度は【実験 1】として、昨年度実施した AA を投与した *gpt delta* マウスの肝臓と腎臓の *in vivo* 変異原性について検索した。

【実験 2】では、幼若期のマウスを用いて、酸化ストレスならびに *in vivo* 変異原性への影響、また成熟マウスとの感受性の違いを検討した。

## B. 研究方法

【実験 1】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 系 *gpt delta* マウスを用い、実験に供した。

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、DW 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  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

肺、肝臓および腎臓の DNA 中 8-OHdG の測定では、DNA を DNA エキストラクター WB キット (和光純薬社製) で抽出し、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/10<sup>5</sup>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* 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* 欠失変異の検出では、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。

(統計学的処理方法)

最終体重、臓器重量、8-OHdG レベル、*gpt* 及び *red/gam* MF 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。

【実験 2】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 系マウスを用いて B6C3F<sub>1</sub> 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、解剖時の処置ならびにサンプル採取、保存等は実験 1 と同様の方法で行った。また、*gpt* assay、*Spi* assay ならびに 8-OHdG 測定についても実験 1 と同様の方法で行った。

(統計学的処理方法)

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。*gpt* 及び *red/gam* MF については、Williams 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、動物はすべてイソフルラン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。実験動物に関しては、「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

【実験 1】平成 22 年度の研究結果において、8-OHdG レベルは 500 ppm 群の肝臓においてのみ対照群に比べ有意な上昇が認められた。発がん標的臓器である肺では AA 投与群において AT-TA transversion 及び AT-GC transition を伴う *gpt* MF の上昇と、*red/gam* MF の用量依存的な上昇が認められた。本年度は病理組織学的検索と、肝臓及び腎臓における *in vivo* 変異原性の解析を実施した。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。肝臓及び腎臓の *gpt* MF を Fig. 1 に示す。有意な変化ではなかったものの、AA 処置群では肝臓において *gpt* MF の上昇傾向が認められたが、腎臓では変化は認められなかった。*gpt* 変異コロニーのスペクトラム解析から各変異における特異的変異頻度を算出した結果、肝臓では 250 ppm 群で Single base pair (bp) deletion の有意な上昇が認められた (Table 1)。腎臓においても Single bp deletion の増加が認められたが有意な変化ではなかった (Table 2)。さらに、Spi assay の結果、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。また、腎

臓では 500 ppm 群においてのみ約 3 倍程度の有意な上昇が認められた (Fig. 2)。

【実験 2】試験期間中の一般状態観察結果から、幼若マウスでは試験開始 1 週目より、成熟マウスでは試験開始 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、幼若マウスでは投与開始 2 週目以降に 6 例の途中死亡が認められた。また試験期間中の体重推移は、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、対照群に比べ有意な低値を示した (1 週目  $p < 0.05\%$ 、2 週目以降  $p < 0.01\%$ )。試験期間中の飲水量及び AA 暴露量を Table 3 に示す。すべての投与群において対照群に比べ飲水量の低下が認められ、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/day で、成熟マウスでは 22.5、38.6 及び 59.2 mg/kg/day であった。また、幼若ならびに成熟動物の最終体重および臓器重量をそれぞれ Table 4 及び 5 に示す。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 で腎臓絶対重量が有意な低値を示したが、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有意な低値と、肺相対重量の有意な高値が認められた。

幼若マウスの肺における *gpt* MF を Fig. 3 に示す。AA 100 ppm から *gpt* MF の上昇傾向が認められ、200 ppm 以上の群では対象群に比べ約 3 倍の有意な上昇が認められた。

さらに、Spi assay の結果、AA 200 ppm から *red/gam* MF の上昇傾向が認められ、400 ppm 群では対照群に比べ約 3 倍の有意な上昇が認められた (Fig. 4)。

#### D. 考察

【実験 1】昨年度の肺に引き続き、本年度は、AA を 4 週間投与した *gpt delta* マウスの肝臓及び腎臓における *in vivo* 変異原性について検査を実施した。昨年度の研究結果で報告した各臓器 DNA 中 8-OHdG レベルは、500 ppm 投与群の肝臓においてのみ有意に上昇したが、今回、肝臓の *in vivo* 変異原性を検索した結果、有意な上昇が低用量より認められた。また、変異体のスペクトラム解析では、8-OHdG が引き起こす代表的な突然変異である GC-TA transversion 変異頻度に変化は認められなかったことから、肝臓の *gpt* 及び Spi MF の上昇に 8-OHdG は関与しないことが示された。AA のマウス肝発がん性はこれまで報告されていないが、AA の代謝物である GA は肝発がん性を有し、特異的 DNA 付加体の生成も報告されていることから、本研究で認められた肝臓における AA の変異原性は GA を介した作用であることが考えられた。また、AA の非発がん標的臓器である腎臓においても 500 ppm 群でのみ有意な上昇が認められたが、ばらつきも大きいことから、一般状態の悪化に起因する可能性も考えられた。本研究結果では AA の遺伝毒性メカニズムに酸化的 DNA 損傷の関与は明らかとはならなかったが、今後、酸化ストレス関連遺伝子の発現解析を実施し、より詳細な解析を継続する。また、AA 特異的 DNA 付加体の定量的解析も併せて実施する。

【実験 2】本年度は幼若及び成熟マウスを用いた 4 週間の AA 投与実験を終了し、幼若マウスの肺における *gpt* assay 及び Spi assay を実施した。400 ppm 群の体重あたりの AA 摂取量は成熟マウスで幼若マウスに比して高いにもかかわらず、AA の神経毒性に起因すると考えられる後肢麻痺は幼若マウスでより強く認められ、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唆された。*gpt* assay 及び Spi assay による *in vivo* 変異原性の検索では、幼若マウスにおいて AA の発がん標的臓器である肺の *gpt* MF 及び *red/gam* MF の有意な上昇が認められた。今後、AA の遺伝毒性に対する感受性の違いについては、成熟マウスの解析結果をもって考察する。また、肝臓、腎臓についても同様の解析を実施するとともに、各臓器における 8-OHdG レベルの測定により酸化ストレスへの感受性の違いを明らかにすることで、AA の発がんメカニズムにおける酸化ストレスの役割を明らかにする。

#### E. 結論

【実験 1】AA とその代謝物である GA のマウス発がん標的臓器である肺と肝臓において、AA 投与によりレポーター遺伝子の点突然変異頻度ならびに欠失変異頻度の上昇が認められたことから、マウスにおける AA の発がん機序に遺伝毒性メカニズムの関与が強く示唆された。一方、AA の遺伝毒性メカニズムに酸化的 DNA 損傷の関与は明らかとはならなかった。

【実験 2】本年度の結果から、幼若マウスでは AA の神経毒性に対して感受性が高いことが示唆された。また、AA の発がん標的臓

器である肺において点突然変異頻度ならびに欠失変異頻度の有意な上昇が認められた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 学会発表 Yuji Ishii, Yuta Suzuki, Daisuke Hibi, Meila Jin, Yukio Kodama, Takehiko Nohmi, Kiyoshi Fukuhara,

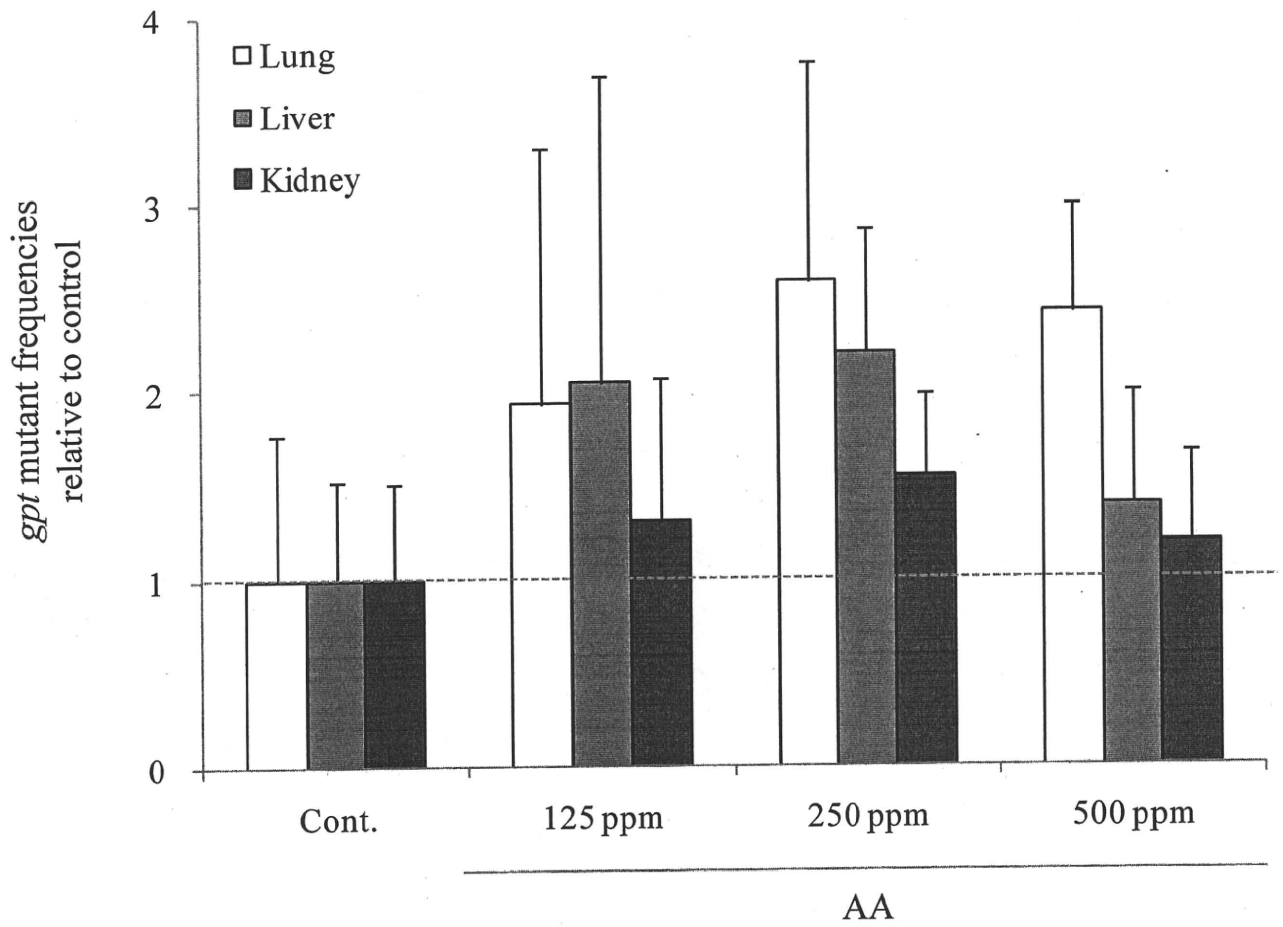
Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa: Possible participation of oxidative DNA damage in acrylamid-induced in vivo mutagenicity. 69<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Osaka, 2010. 9)

なし

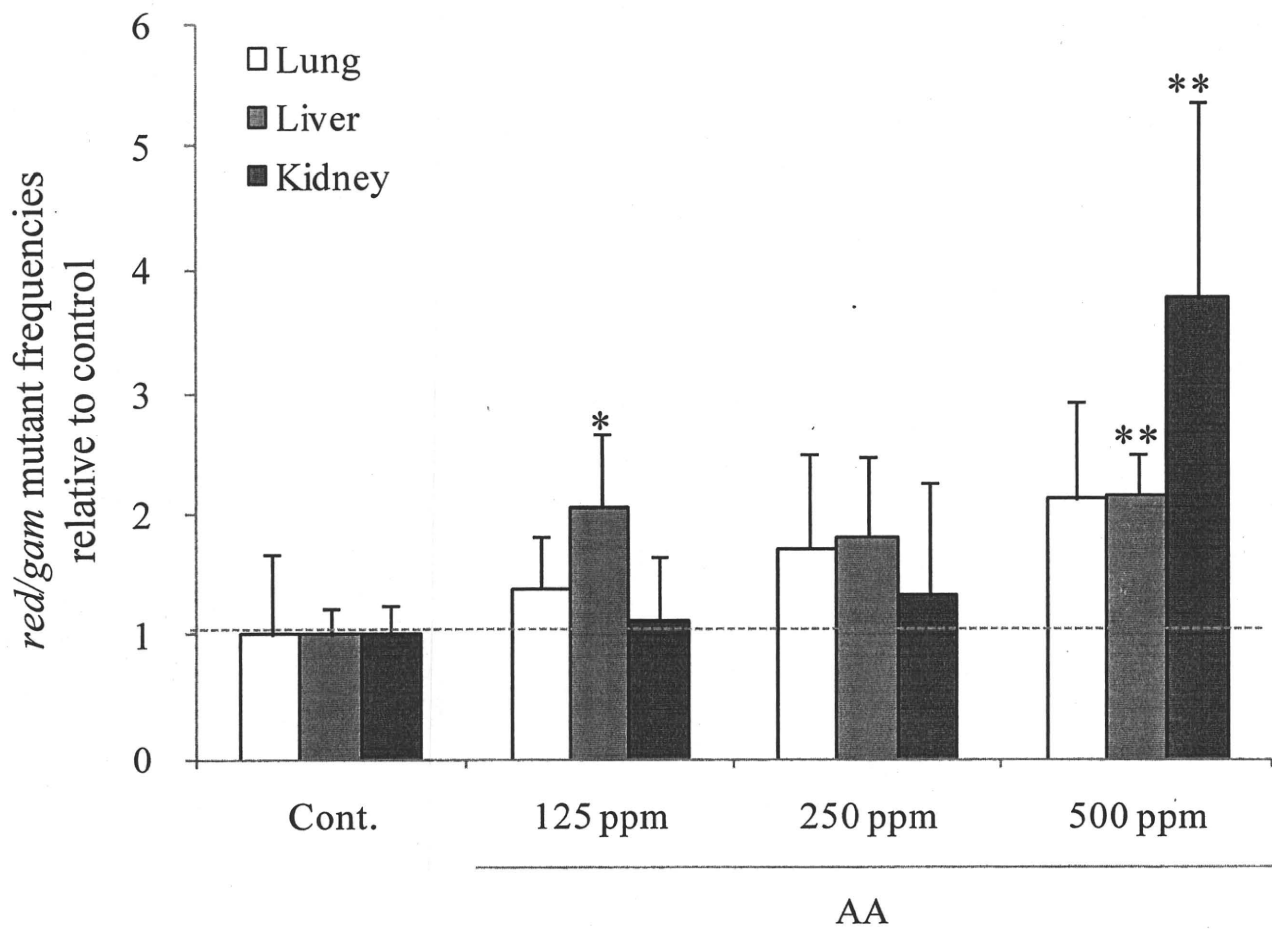
G-2. 発表論文

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

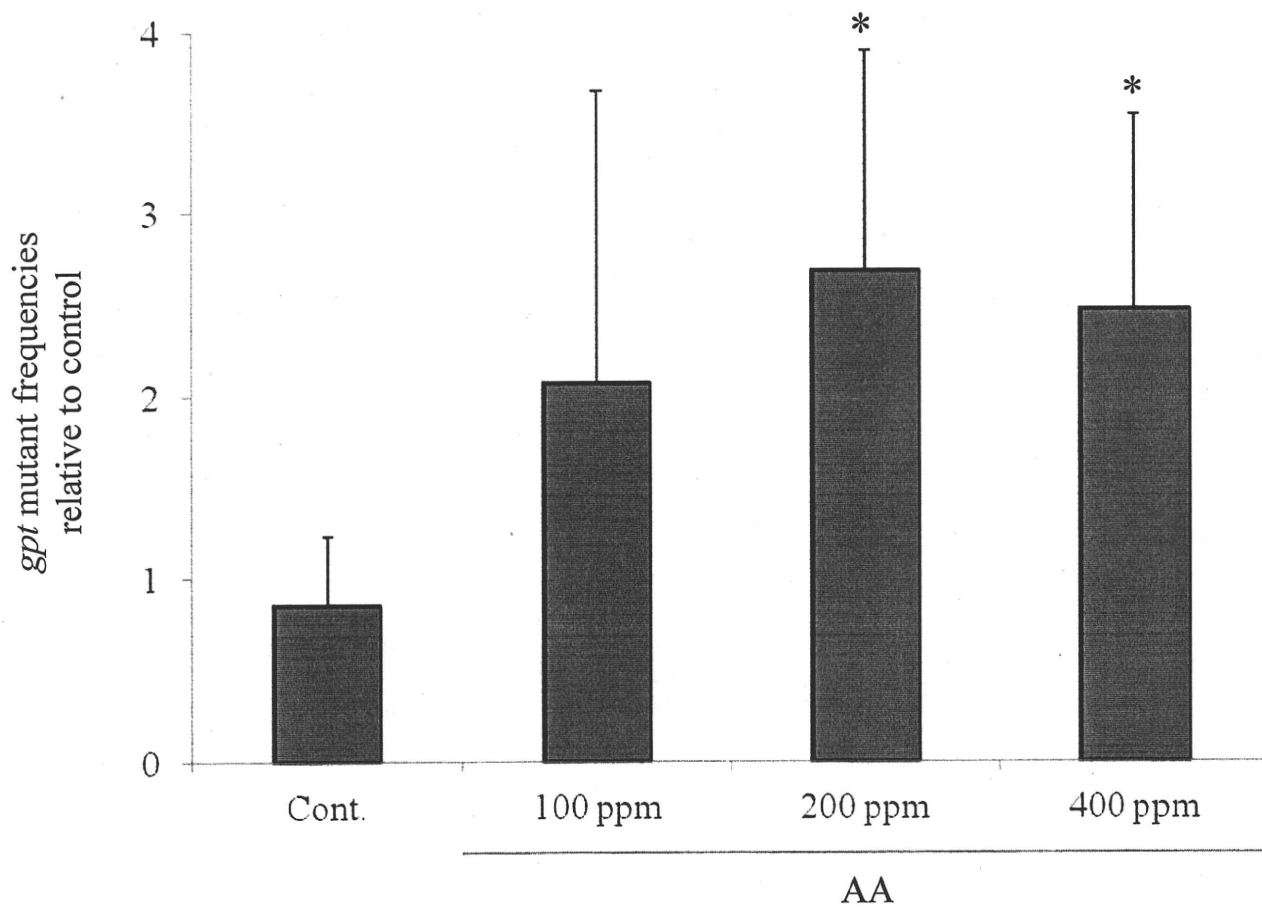


**Fig. 1** *gpt* mutant frequencies in the lung, liver and kidney of male *gpt* delta mice. Data represent means  $\pm$  S.D. (n=5).

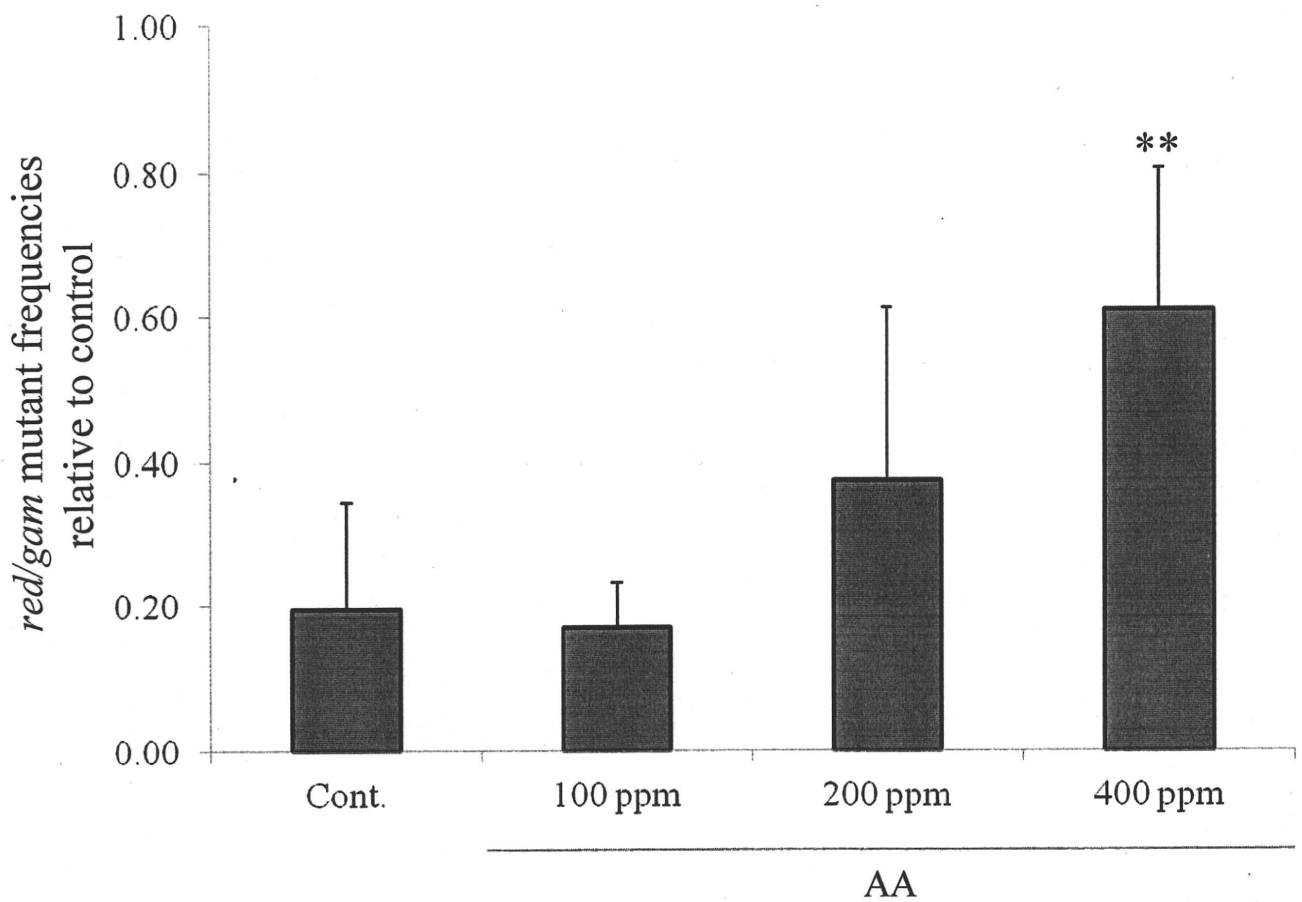


**Fig. 2** *red/gam* mutant frequencies in the lung, liver and kidney of male *gpt* delta mice. Data represent means  $\pm$  S.D. (n=5). \*, \*\*:  $p < 0.05$ ,  $0.01$  vs. Control group.





**Fig. 3** *gpt* mutant frequencies in the lung of young male *gpt* delta mice . Data represent means  $\pm$  S.D. (n=5). \*: p<0.05 vs. Control group.



**Fig. 4** *red/gam* mutant frequencies in the lung of young male *gpt delta* mice. Data represent means  $\pm$  S.D. (n=5). \*\*: p<0.01 vs. Control group.

**Table 1 Mutant spectra of the liver of mice treated with AA**

	Basal diet	AA		
		125 ppm	250 ppm	500 ppm
Base substitution				
Transversions				
GC-TA	0.06 ± 0.10	0.07 ± 0.06	0.14 ± 0.05	0.17 ± 0.13
GC-CG	0.01 ± 0.03	0.05 ± 0.07	0.05 ± 0.07	0
AT-TA	0.06 ± 0.06	0.05 ± 0.07	0.06 ± 0.09	0.06 ± 0.08
AT-CG	0.03 ± 0.04	0.06 ± 0.06	0.05 ± 0.07	0.01 ± 0.02
Transitions				
GC-AT	0.18 ± 0.11	0.24 ± 0.21	0.31 ± 0.23	0.19 ± 0.12
AT-GC	0.03 ± 0.04	0.16 ± 0.21	0.04 ± 0.05	0.01 ± 0.02
Deletion				
Single bp	0.05 ± 0.04	0.19 ± 0.08	0.26 ± 0.19*	0.11 ± 0.09
Over 2bp	0	0	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.03
Insertion	0	0.01 ± 0.02	0	0.01 ± 0.02
Complex	0	0.03 ± 0.06	0	0
Total	0.42 ± 0.22	0.86 ± 0.69	0.93 ± 0.28	0.59 ± 0.26

The number of colonies with independent mutations is shown.  
 ( ): specific mutant frequency ( $\times 10^{-5}$ )

**Table 2 Mutant spectra of the kidney of mice treated with AA**

	Basal diet	AA		
		125 ppm	250 ppm	500 ppm
Base substitution				
Transversions				
GC-TA	0.07 ± 0.08	0.05 ± 0.08	0.03 ± 0.02	0.07 ± 0.08
GC-CG	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.05	0.01 ± 0.02
AT-TA	0.04 ± 0.08	0	0.06 ± 0.06	0.03 ± 0.04
AT-CG	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.05	0	0.03 ± 0.02
Transitions				
GC-AT	0.06 ± 0.03	0.11 ± 0.06	0.09 ± 0.06	0.08 ± 0.02
AT-GC	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.02
Deletion				
Single bp	0.01 ± 0.02	0.08 ± 0.08	0.12 ± 0.06	0.05 ± 0.02
Over 2bp	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0
Insertion	0.01 ± 0.01	0	0	0
Complex	0	0	0.01 ± 0.02	0
Total	0.23 ± 0.12	0.30 ± 0.18	0.36 ± 0.10	0.28 ± 0.11

The number of colonies with independent mutations is shown.  
 ( ): specific mutant frequency (x 10<sup>-5</sup>)