

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。文献的にはシリアンハムスターの長期飼育を行った結果、平均生存期間が雄で60週間、雌で41週間とする報告もあり(Birt DFら、1985)、本試験における飼養条件は適切であったと考えられる。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。

病理組織学的検査では、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。

ハムスターを用いた長期投与試験でみられたAA誘発性の非増殖/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20 mg/kg群のみならず、10 mg/kg群でも顕著であり、一般状態観察でみられた神経症状(後肢開脚)や自発運動低下を伴う一般状態の悪化との関連性が示唆された。本試験に先立って実施した13週間飲水投与による予備試験の20 mg/kg群では、一般状態に変化は認められず、神経毒性は、坐骨神経にみられた概ね軽度な病理組織学的変化に留まっていたことから、AAの投与期間の長期化により神経毒性が重篤化したものと考えられた。

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、乳腺終末導管における細胞増殖活性が用量に対応した増加傾向を示した。また、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ことから、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唆されたが、血液検査では内分泌系への影響を示す結果が得られなかったことを昨年度までに報告した。一方、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ほか、AAには組織におけるグルタチオンの枯渇を介して酸化的ストレスを誘発することが示されており、乳腺組織では肝組織

に比較してグルタチオン濃度が低く、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。そこで今回、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. 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)
2. 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)
3. Cho, Y.M., Hasumura, M., Takami, S., Imai, T., Hirose, M., Ogawa, K., Nishikawa, A.: A 13-week subchronic toxicity study of hinokitiol administered in the diet to F344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1782-1786 (2011)
4. Hirata-Koizumi, M., Fujii, S., Ono, A., Hirose, A., Imai, T., Ogawa, K., Ema, M., Nishikawa, A.: Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of aluminium ammonium sulfate in a two-generation study in rats. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1948-1959 (2011)
5. 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* 129, 528-535 (2011)
6. 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)
7. Hori, M., Kitahashi, T., Imai, T., Ishigamori, R., Takasu, S., Mutoh, M., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Takahashi, M.: Enhancement of carcinogenesis and fatty infiltration in the pancreas in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-treated hamsters by high

- fat diet. *Panceras* 40, 1234-1240 (2011)
8. Hasumura, M., Imai, T., Cho, Y.M., Ueda, M., Hirose, M., Nishikawa, A., Ogawa, K.: Toxic effects of a horseradish extract and allyl isothiocyanate in the urinary bladder after 13-week administration in drinking water to F344 rats. *J. Toxicol. Sci.* 36, 763-74 (2011)
 9. 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)
 10. Yoshimoto, M., Hayakawa, T., Mutoh, M., Imai, T., Tsuda, K., Kimura, S., Umeda, I., Fujii, H., Wakabayashi, K.: *In vivo* SPECT imaging using ¹¹¹In-DOTA-c(RGDfK) to detect early pancreatic cancer in a hamster pancreatic carcinogenesis model. *J. Nucl. Med.* (In press)
 11. Ota, Y., Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y.M., Takami, S., Oyamada, T., Hirose, M., Nishikawa, A., Ogawa, K.: Prostaglandin synthases influence thyroid follicular cell proliferation but not carcinogenesis in rats initiated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol. Sci.* (In press)

2. 学会発表

1. 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）
2. 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。

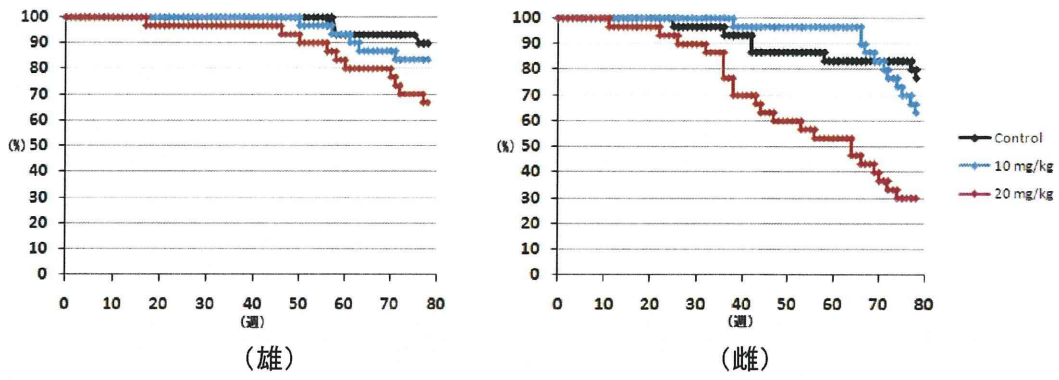


図1 生存率の推移 (ハムスター長期投与試験)

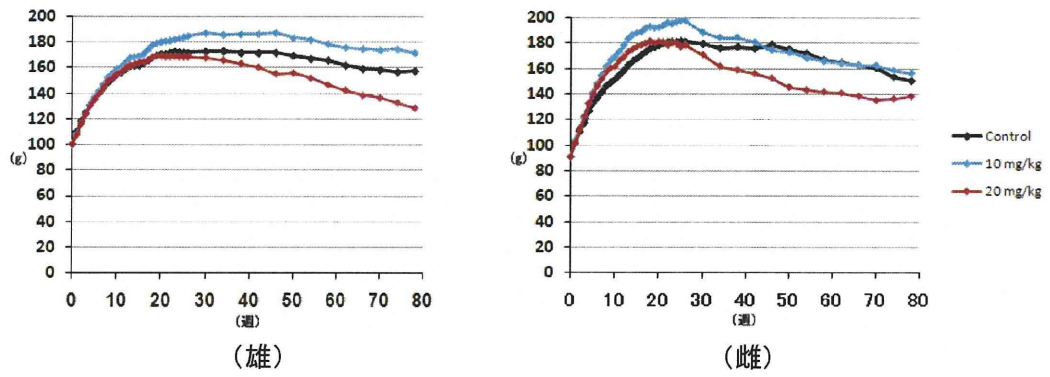


図2 体重の推移 (ハムスター長期投与試験)

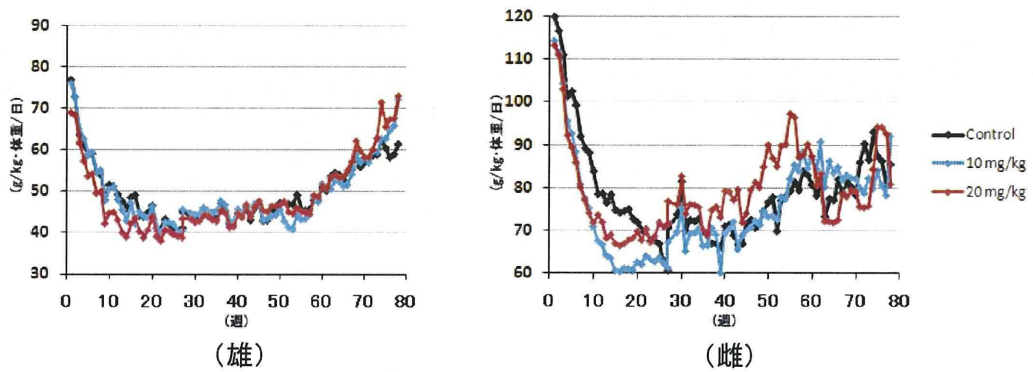


図3 摂水量の推移 (ハムスター長期投与試験)

表1 最終剖検時の主な肉眼所見の発生頻度 (%) (ハムスター長期投与試験)

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

* p<0.001

表2 主な臓器・組織における前がん/腫瘍性病変の発生頻度 (%) (ハムスター長期投与試験)

	性 (有効該当週) 群 (mg/kg 体重/日)	雄 (56週～)			雌 (69週～)		
		0 (対照)	10	20	0 (対照)	10	20
前胃	有効数	30	29	27	25	26	12
	P/N 過形成	6 (20)	5 (17)	14 (52)	8 (32)	8 (31)	5 (42)
	乳頭腫	2 (7)	4 (14)	8 (30)	1 (4)	5 (19) *	7 (58) *
	扁平上皮がん	0	1 (3)	1 (4)	0	0	2 (17)
	乳頭腫/扁平上皮がん	2 (7)	5 (17)	8 (30)	1 (4)	5 (19) *	7 (58) *
肺	性 (有効該当週) 有効数	雄 (78週)			雌 (38週～)		
		27	25	20	28	30	23
	巣状過形成	0	0	0	0	1 (3)	2 (9)
	腺腫	0	1 (4)	3 (15)	0	3 (10)	2 (9)
	腺がん	0	0	0	0	1 (3)	0
膵 (ラ氏島)	性 (有効該当週) 有効数	雄 (71週～)			雌 (66週～)		
		28	26	23	25	29	13
	腺腫	6 (21)	4 (15)	11 (48)	6 (24)	14 (48)	4 (31)
	がん	3 (11)	1 (4)	2 (9)	5 (20)	5 (17)	1 (8)
	腺腫/がん	9 (32)	5 (19)	12 (52)	10 (40)	17 (59)	5 (38)

* p<0.001

表 2(つづき) 主な臓器・組織における前がん/腫瘍性病変の発生頻度 (%) (ハムスター長期投与試験)

臓器	性 (有効該当週) 群 (mg/kg 体重/日)	雄 (50 週～)			雌 (36 週～)			
		0 (対照)	10	20	0 (対照)	10	20	
肝臓	有効数	30	30	28	29	29	25	
	変異細胞巢	7 (23)	7 (23)	6 (21)	13 (45)	9 (31)	5 (20)	
	肝細胞腫	7 (23)	5 (17)	1 (4)	0	1 (3)	0	
	肝細胞がん	0	0	2 (7)	0	0	0	
甲状腺	性 (有効該当週)		雄 (78 週)			雌 (78 週)		
	有効数	28	25	20	23	19	9	
	巢状過形成、濾胞	1 (4)	1 (4)	1 (5)	1 (4)	1 (5)	2 (22)	
	濾胞腺腫	0	0	1 (5)	0	1 (5)	1 (11)	
	巢状過形成、C 細胞	0	0	0	1 (4)	0	0	
	C 細胞腺腫	1 (4)	0	1 (5)	1 (4)	1 (5)	1 (11)	
	C 細胞がん	0	1 (4)	1 (5)	0	0	0	
上皮小体	性 (有効該当週)		雄 (50 週～)			雌 (36 週～)		
	有効数	29	30	28	29	29	26	
	巢状過形成	6 (21)	2 (7)	4 (14)	10 (34)	13 (45)	7 (27)	
	腺腫	3 (10)	0	3 (11)	11 (38)	11 (38)	9 (35)	
	がん	0	0	0	2 (7)	1 (3)	0	

表3 坐骨神経における病理組織学的変化 (%) (ハムスター長期投与試験)

性 群 (mg/kg 体重/日)	雄				雌			
	0 (対照)	10	20		0 (対照)	10	20	
有効数	30	29	29		29	29	24	
軸索変性								
軽度	2 (7)	12 (41)	1 1 (3)	1	2 (7)	8 (28)	1 6 (25)	1
中等度	2 (7)	2 (7)	* 17 (59)	***	0	5 (17)	* 8 (33)	***
重度	0	1 (3)	↓ 10 (34)	↓	0	0	↓ 6 (25)	↓
神経線維萎縮 (線維化を伴う)								
軽度	0	1 (3)	3 (10)	1	0	0	1 (4)	1
中等度	0	0	14 (48)	***	0	0	6 (25)	**
重度	0	0	7 (24)	↓	0	0	4 (17)	↓

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

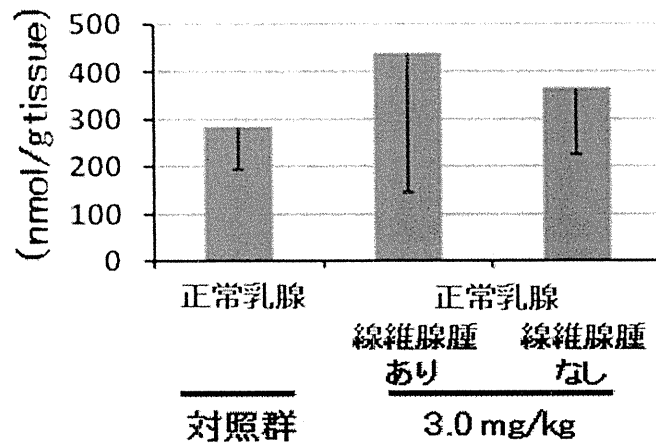


図4 乳腺組織中グルタチオン濃度 (ラット発がん機序解析)

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	群 (mg/kg 体重/日)	雌		
		0 (対照)	1.5	3.0
	動物数	21	19	20
皮下 腫瘍/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 腫瘍/結節		0	1 (5)	0
子宮 腫瘍		7 (33)	7 (37)	8 (40)
舌/口腔 腫瘍/結節		0	1 (5)	2 (10)

* p<0.01

平成 23 年度 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) 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

研究代表者 今井 俊夫 国立がん研究センター 研究所 動物実験支援施設長
研究分担者 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過程における遺伝毒性メカニズムの関与の可能性と遺伝子傷害性因子の探索を目的に実験を遂行してきた。今回、【実験 1】として、AA を投与した *gpt delta* マウスの肺、肝臓及び腎臓における特異的 DNA 付加体の N7-GA-Gua レベルと、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解析を行った。N7-GA-Gua は AA を投与したすべてのマウスの肺、肝臓及び腎臓で検出され、何れも用量依存的に増加した。また、Nrf2 関連遺伝子群はいずれも肺において有意に増加したものの、変化の程度は小さかった。酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の上昇が認められなかった昨年度の結果を考慮すると、AA の投与は酸化的ストレスを惹起するが核内 DNA の酸化的傷害を引き起こしていないと考えられ、AA の遺伝毒性メカニズムには直接的な DNA 損傷の関与が示唆された。【実験 2】として、幼若 *gpt delta* マウスへの AA 投与の影響を検索する実験を継続した。成熟マウスの肺では *gpt* 及び *red/gam* 遺伝子突然変異頻度 (MF) の有意な上昇が認められたが、その変化は幼若マウスとほぼ同定度の変化であった。また、N7-GA-Gua レベルは幼若及び成熟マウスの肺で用量依存的な増加が認められたが、暴露時期による差は認められなかったことから、AA の遺伝毒性に対して幼若マウスは高感受性ではないことが明らかとなった。また、肺における 8-OHdG レベルの変化は幼若マウスにおいても認められなかった。【実験 3】では、雄性 6 週齢の *gpt delta* マウスに 200 ppm の濃度の AA と抗酸化剤である α -トコフェロール、アスコルビン酸及び N-アセチルシステインを併用投与し、AA の遺伝毒性に対する抗酸化剤の併用投与の影響を検討するための動物実験を行った。

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で陽性を示し、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に関連性が認められない。AA は glutathion-S-transferase (GST) を介して、あるい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チオバルビツール酸反応物質 (TBARS) の上昇が報告されている (Yousef et al., Toxicology, 2006) ことから、遺伝毒性発現機序に酸化 DNA 損傷の関与の可能性も考えられている。しかしながら、平成 21、22 年度の本研究において、酸化 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルと遺伝子突然変異原頻度の上昇に相関性は認められていない。

本年度は【実験 1】として、AA を投与した *gpt delta* マウスの肺、肝臓及び腎臓における N7-GA-Gua レベルと、酸化ストレス応答因子 Nrf2 に転写制御を受ける遺伝子群の発現解析を行った。【実験 2】として、AA を投与した幼若及び成熟 *gpt delta* マウス肺の *gpt* 及び *Spi* assay と、N7-GA-Gua レベル及び 8-OHdG レベルを検索し、これらに対する幼若期暴露の感受性の違いを検討した。

【実験 3】として、*gpt delta* マウスを用いて AA の遺伝毒性に対する抗酸化剤併用投与の影響を検討するための動物実験を行った。

B. 研究方法

【実験 1】6 週齢の雄性 C57BL *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、肺、肝臓及び腎臓を採取後、液体窒素により凍結し、 -80°C で保存した試料を N7-GA-Gua 測定に用いた。(動物実験は平成 21 年度に実施)

組織からの DNA 抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社製) を用いた。抽出した DNA の吸光度測定により濃度を算出し、50 μg の DNA を測定に用いた。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) でインキュベートし、内標準物質である $^{15}\text{N}_5$ -N7-GA-Gua を添加した後、限外濾過膜 (Millipore 社製、Amicon Ultra Ultracel-3) で 12,000xg、50 分間遠心分離した。ろ液は凍結乾燥させ、分析時に 10 μl の超純水で再溶解しサンプルとした。LC-MS/MS システムには Agilent 社製 1100 シリーズ LC システムと Micromass 社製 Quattro Ultima Pt を用いた。

Nrf2 関連遺伝子の発現解析では、isogen[®] (ニッポンジーン社製) 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社製) 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社製) 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* (Mm00516005_m1)、*NQO1* (Mm01253561_m1)、*TrxR1*

(Mm00443675_m1) 、 *GSTa4*
(Mm00494803_m1) 、 *GSTm1*
(Mn00833915_g1)、*GCLc*(Mm00802655_m1)
及び *GCLm* (Mm00514996_m1) について検
索した。

(統計学的処理方法)

遺伝子発現レベルについては、極度の一
般状態の悪化が認められた 500 ppm 群を除
き、Bartlett の等分散検定と Dunnett の多重
比較検定で行った。

【実験 2】3 及び 11 週齢の雄性 B6C3F₁ *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、肺を採取後、
液体窒素により凍結し、8-OHdG、
N7-GA-Gua 測定、*gpt* 及び Spi assay 用のサ
ンプルとして -80°C で保存した。(動物実験
は平成 22 年度に実施)

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* 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。

肺 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/10⁵dG 量として算出した。

(統計学的処理方法)

8-OHdG レベル、*gpt* 及び *red/gam* MF 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幼若マウスの 400 ppm
AA 投与群はすべての解析から除外した。

【実験 3】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 6
週齢で実験に供した。

動物の飼育はバリエーションシステムの動物室に
で行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度
55±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。

抗酸化剤はアスコルビン酸 (AsA)、 α -トコフェロール (TCP)、*N*-アセチルシステイン (NAC) をそれぞれ1%の濃度で飼料に混じ、AAの投与開始一週間前から投与した。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 (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水の交換ならびに飼料の交換は週1回、一般状態観察を連日実施した。また、体重、飲水量ならびに摂餌量の測定は週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°Cで保存した。
(倫理面への配慮)

投与実験は飲水及び混餌投与が主体であり、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】N7-GA-Guaは、AAを投与したすべてのマウスの肺、肝臓及び腎臓で検出され、いず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、続いて肺、肝臓の順であった

(Fig.1)。Nrf2関連遺伝子の発現解析では、*HO-1*、*NQO1*、*TrxR1*、*GCLc*、*GCLm*、*GSTa4*の遺伝子発現レベルが肺において有意に増加した (Fig.2)。

【実験2】幼若及び成熟マウスの肺における*gpt* 及び*Spi* assayの結果をFig.3と4に示す。幼若マウス肺の*gpt* MFはGC-CG transversion、single bp 及びover 2 bpの欠失変異とともに200 ppm群で有意に上昇し

(Table 1)、*Spi* assayでは200 ppm群で上昇傾向が認められた。成熟マウスにおいても*gpt* MFの有意な上昇が200 ppm群から認められ、スペクトラム解析の結果、GC-TA transversion、AT-GC transition、single bp 及びover 2 bpの欠失変異頻度の有意な上昇が認められた (Table 2)。また、*Spi* assayでは200 ppm群から上昇傾向が認められ、400 ppm群において有意に上昇した。

肺のN7-GA-Guaは幼若、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 (Fig. 5)。一方、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 (Fig. 6)。

【実験3】試験期間中の一般状態観察の結果では、いずれの群においてもAAの神経毒性に起因する症状は認められなかった。また、試験期間中の体重推移は、抗酸化剤

投与群において投与開始1週間後から試験終了まで有意な低値が認められたのに対し、AA単独投与群では最終体重においてのみ有意な低値を示した。

試験期間中の飲水量及びAA暴露量をTable 3に示す。AA単独投与群及び抗酸化剤併用投与群ともに対照群に比べ飲水量の変化は認められず、AA単独群、TCP、AsA及びNAC併用投与群のAA暴露量は、40.4、43.8、44.2及び41.9 mg/kg/dayであった。また、最終体重および臓器重量をそれぞれTable 4に示す。AA単独群では肺絶対及び相対重量の有意な高値が、TCP併用投与群では幼若マウスの肺絶対及び相対重量の有意な高値に加え、腎絶対重量の有意な低値と肝相対重量の有意な高値が認められた。AsA併用投与群では肺絶対及び相対重量の有意な高値と肝及び腎絶対重量の有意な低値が、NAC併用投与群では肺及び腎相対重量の有意な高値と肝絶対重量の有意な低値が認められた。

D. 考察

【実験1】昨年度までの研究結果では、AAの発がん標的臓器である肺で *gpt* 遺伝子突然変異頻度の上昇が、AAの代謝物であるGAの発がん標的臓器である肝臓で *Spi* 遺伝子突然変異頻度の有意な上昇が認められ、AAのマウス発がん性に遺伝毒性メカニズムの関与が示唆された。酸化了的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なかったことから、遺伝毒性への酸化ストレスの関与の可能性は低いと考えられた。

今回、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が考えられたが、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も考えられた。

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了的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了的ストレスは、その程度は低く、核内DNAの酸化損傷を引き起こさない可能性が示された。

【実験2】昨年度までの研究結果では、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。また、幼若マウスの肺における *gpt* MFは用量依存的に上昇し、200 ppm群では有意な増加が認められた。本年度、成熟マウスの肺における *gpt* 及び *Spi* assayを実施した結果、*gpt* 及び *red/gam* MFは用量依存的に増加したものの、その程度は幼若マウスと同程度であった。また、*gpt*

変異コロニーでは欠失変異が高頻度に観察され、幼若マウスと同様の変化であったことから、暴露時期による変異頻度ならびに変異パターン之差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的 DNA 損傷の関与は認められなかった。

【実験 3】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絶対重量に変化は認められず体重の低値に起因する変化と考えられた。

E. 結論

AA のマウス肺発がんに関与するメカニズムが関与することを明らかにした。その遺伝毒性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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 学会発表

1. Yuji Ishii, Daisuke Hibi, Meilan Jin, Yukio Kodama, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura: *In vivo* mutagenicity and DNA damage in the lungs, livers, and kidneys of *gpt* delta mice treated with acrylamide. EUROTOX2011 (Paris, 2011, 8)
2. Yuji Ishii, Shinji Takasu, Yuta Suzuki, Daisuke Hibi, Meilan Jin, Yukio Kodama, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura: *In vivo* genotoxicity of immature *gpt* delta B6C3F₁ mice exposed to acrylamide. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Nagoya, 2011. 10)
3. 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. 11)

G-2. 発表論文

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 Specific Mutant frequency of the lungs of immature *gpt* delta mice treated with AA

	Control	AA 100 ppm	AA 200 ppm	AA 400 ppm
Base substitution				
Transversions				
GC-TA	0.11 ± 0.15	0.20 ± 0.21	0.26 ± 0.15	—
GC-CG	—	0.03 ± 0.04	0.16 ± 0.13**	—
AT-TA	0.06 ± 0.13	0.18 ± 0.21	0.36 ± 0.41	—
AT-CG	0.10 ± 0.14	0.04 ± 0.06	0.02 ± 0.05	—
Transitions				
GC-AT	0.25 ± 0.22	0.36 ± 0.40	0.37 ± 0.18	—
AT-GC	0.04 ± 0.10	0.19 ± 0.25	0.07 ± 0.06	—
Deletion				
Single bp	0.08 ± 0.11	0.19 ± 0.20	0.58 ± 0.56*	—
Over 2bp	—	—	0.04 ± 0.06*	—
Insertion	0.05 ± 0.11	—	—	—
Complex	—	—	—	—

*, **: p<0.05, 0.01 vs. Control group (immature)

Data represent means ± S.D. (n=5).

Table 2 Specific Mutant frequency of the lungs of mature *gpt* delta mice treated with AA

	Control	AA 100 ppm	AA 200 ppm	AA 400 ppm
Base substitution				
Transversions				
GC-TA	0.02 ± 0.04	—	0.19 ± 0.12 ^{##}	0.19 ± 0.13 ^{##}
GC-CG	0.03 ± 0.06	—	0.07 ± 0.08	0.05 ± 0.06
AT-TA	—	0.03 ± 0.05	0.04 ± 0.07	0.07 ± 0.10
AT-CG	—	0.06 ± 0.09	0.07 ± 0.10	0.04 ± 0.09
Transitions				
GC-AT	0.15 ± 0.10	0.08 ± 0.08	0.17 ± 0.10	0.24 ± 0.16
AT-GC	—	0.04 ± 0.09	0.05 ± 0.09	0.14 ± 0.18 [#]
Deletion				
Single bp	0.04 ± 0.08	0.16 ± 0.18	0.20 ± 0.23	0.60 ± 0.44 ^{##}
Over 2bp	0.02 ± 0.05	—	—	0.11 ± 0.15 [#]
Insertion	—	0.01 ± 0.03	0.04 ± 0.06	—
Complex	—	—	—	—

#: p<0.05, 0.01 vs. Control group (mature)

Data represent means ± S.D. (n=5).

Table 3 Data of water consumption data and intake of AA

Group	Water consumption (ml/mouse/day)	AA intake	
		(mg/mouse)	(mg/kg/day)
Young			
Control	5.7	-	-
AA	5.4	30.3	40.4
AA + TCP	5.8	32.2	43.8
AA + AsA	5.8	32.6	44.2
AA + NAC	5.4	30.3	41.9

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

Item	Control	AA	AA +TCP	AA + AsA	AA + NAC
No. of animals	10	10	10	4 ^a	4 ^a
Body weight (g)	28.84 ± 1.88	26.81 ± 1.54 ^{**}	26.25 ± 1.05 ^{**}	26.35 ± 1.60 ^{**}	25.79 ± 1.46 ^{**}
Absolute (g)					
Lungs	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01 ^{**}	0.15 ± 0.01 ^{**}	0.15 ± 0.01 [*]	0.14 ± 0.01
Liver	1.36 ± 0.09	1.32 ± 0.09	1.29 ± 0.08	1.20 ± 0.10 ^{**}	1.18 ± 0.10 ^{**}
Kidneys	0.41 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.02 [*]	0.38 ± 0.02 [*]	0.40 ± 0.03
Relative (g%)					
Lungs	0.48 ± 0.04	0.56 ± 0.03 ^{**}	0.57 ± 0.03 ^{**}	0.56 ± 0.03 ^{**}	0.56 ± 0.03 ^{**}
Liver	4.73 ± 0.16	4.92 ± 0.16	4.93 ± 0.18 [*]	4.55 ± 0.22	4.56 ± 0.23
Kidneys	1.42 ± 0.06	1.46 ± 0.05	1.46 ± 0.08	1.45 ± 0.06	1.53 ± 0.08 ^{**}

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

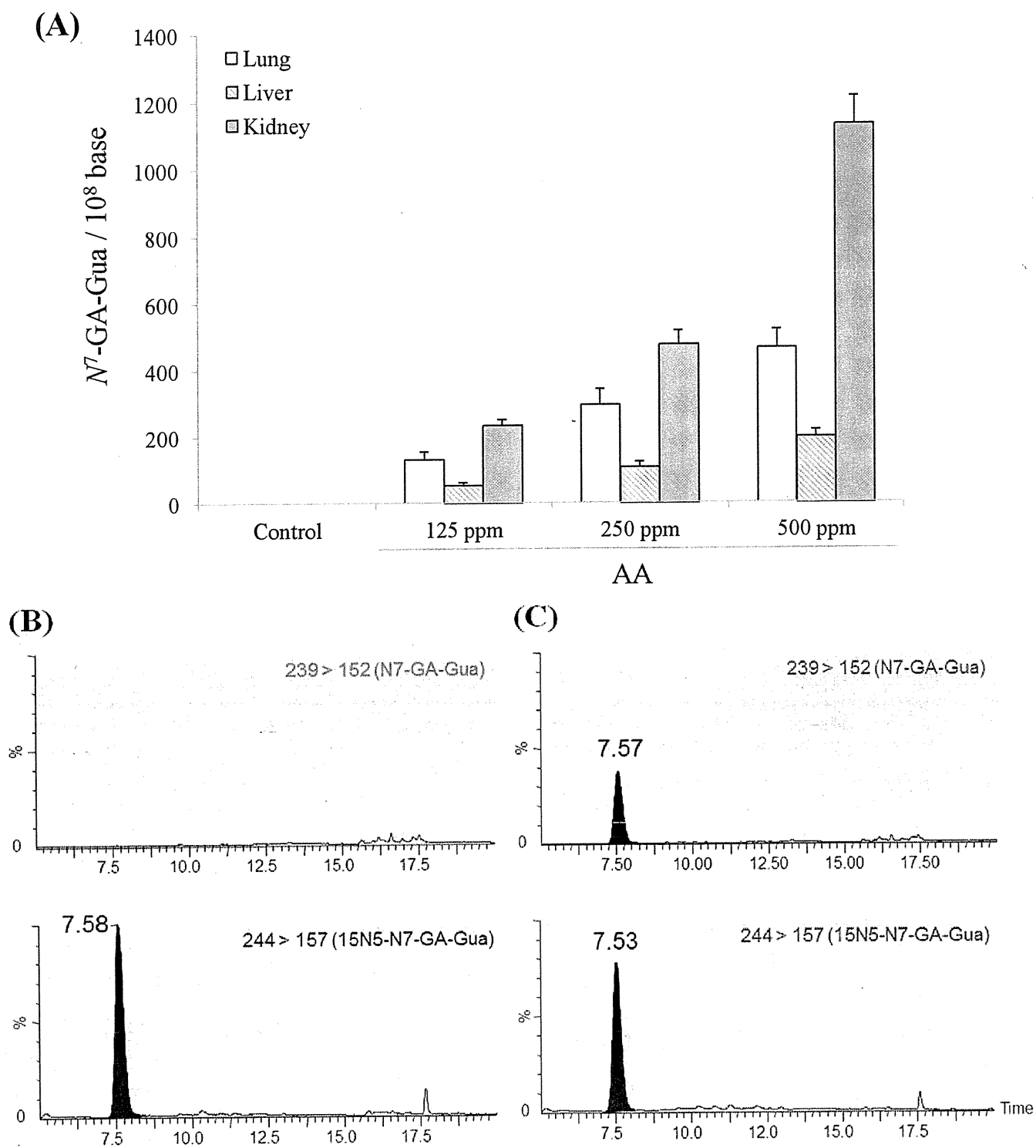


Fig. 1 N7-GA-Gua levels in the lungs DNA of *gpt* delta mice (A). Data represent means \pm S.D. (n=5). MRM chromatograms in lung DNA of Control mice (B) and 125 ppm AA treated mice (C).