

表6 臓器重量一雌 (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		
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.

表7 病理組織学的検査一雄 (ハムスター亜急性予備試験)

Dose level (mg/kg body weight/day)		0 (control)	20	30	50
No. of animals		9	9	9	9 <sup>a</sup>
Organ					
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.

表 8 病理組織学的検査—雌 (ハムスター—亜急性予備試験)

Dose level (mg/kg body weight/day)		0 (control)	20	30	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.

表9 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

表 10 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)

前胃	性 (有効該当週)	雄 (56 週~)			雌 (69 週~)		
	群 (mg/kg 体重/日)	0 (対照)	10	20	0 (対照)	10	20
	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)	雄 (78 週)			雌 (38 週~)		
	有効数	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
脾 (ラ氏島)	性 (有効該当週)	雄 (71 週~)			雌 (66 週~)		
	有効数	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&lt;0.001

表 10(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	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	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 11 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)	↓		

表 12 52 週剖検時の絶対臓器重量 (ラット発がん機序解析)

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

表 13 52 週剖検時の体重比臓器重量 (ラット発がん機序解析)

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	g	0.83	± 0.06	0.83	± 0.05	0.86	± 0.04
肝臓	g	3.00	± 0.21	2.86	± 0.13	2.91	± 0.11
腎臓	g	0.68	± 0.05	0.65	± 0.05	0.67	± 0.04
副腎	mg	24.2	± 2.4	24.2	± 1.7	24.0	± 1.7
下垂体	mg	8.6	± 3.4	7.2	± 0.7	7.2	± 1.1
甲状腺	mg	7.0	± 1.2	6.9	± 0.9	7.3	± 1.0

<sup>a</sup> 平均値 ± S. D.

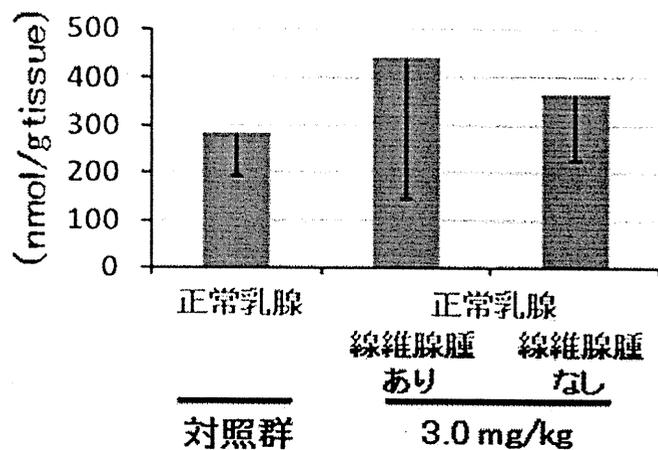


図11 乳腺組織中グルタチオン濃度 (ラット発がん機序解析)

47

表14 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) 分担総合研究報告書

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。【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突然変異誘発性、N7-GA-Gua レベル、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベル及び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。肺では *gpt mutant frequency* (MF) が肝臓では *red/gam* MF の有意な上昇が認められたことから AA が臓器により異なる変異パターンを示すことが明らかとなった。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ことから、AA の投与は酸化的ストレスを引き起こすものの核内 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、幼若及び成熟 *gpt delta* マウスに AA を投与し、肺における突然変異誘発性、N7-GA-Gua レベル及び 8-OHdG レベルの解析を行った。幼若及び成熟マウスの肺では *gpt* 及び *red/gam* 遺伝子 MF の有意な上昇が認められたが、その程度に差異は認められなかった。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】として、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  $\alpha$ -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的 DNA 損傷の関与の可能性も考えられている。

【実験 1】として、*gpt delta* マウスに AA を 4 週間飲水投与し、AA の標的臓器である肺及び肝臓と、陰性対照として腎臓における病理組織学的検索、遺伝子突然変異誘発性、N7-GA-Gua レベル、8-OHdG レベル及び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。【実験 2】として、幼若及び成熟 *gpt delta* マウスに AA を投与し、発がん標的臓器である肺の *gpt* 及び Spi<sup>+</sup> 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】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±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。

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、一部は遺伝子発現解析用の試料として isogen<sup>®</sup>による処理を行い、残りを *gpt* 及び Spi<sup>+</sup> assay ならびに N7-GA-Gua 及び

8-OHdG 測定用試料として-80°Cで保存した。

*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* 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。

肺、肝臓および腎臓の DNA 中 8-OHdG の測定は Nakae 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-OHdG / 10<sup>5</sup>dG 量として算出した。

DNA 中 N7-GA-Gua レベルの測定では、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社製) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA の吸光度を測定により濃度を算出し、50 mg 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 <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-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 分間遠心分離する。ろ液は凍結乾燥させ、分析時に 10 ml 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<sup>®</sup> (ニッポンジーン) 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/uL に調整した後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit<sup>®</sup> (アプライドバイオシステムズ) を用いた逆転写反応により cDNA 合成を行った。RT-PCR は TaqMan<sup>®</sup> gene Expression Assay (アプライドバイオシステムズ) 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)

最終体重、臓器重量、*gpt* 及び *red/gam* MF、8-OHdG、N7-GA-Gua 及び遺伝子発現レベルについては、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 500 ppm AA 投与群はすべての解析から除外した。

【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 系マウスを交配して得られた 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、N7-GA-Gua 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、臓器重量 *gpt* 及び *red/gam* MF、8-OHdG 及び N7-GA-Gua 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、極度の一般状態の悪化が認められた成熟マウスの 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【実験 2】と同様の方法で得られた B6C3F<sub>1</sub> 系 *gpt delta* マウスを 6 週齢で実験に供した。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。抗酸化剤にはアスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール、*N*-アセチルシステインをそれぞれ 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。

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。

(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。

(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。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】

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。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 処置群で相対重量の有意な高値が認められ、用量依存的な変化であった。

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。肺、肝臓及び腎臓の *gpt* MF を Fig.1 に示す。肺では 250 ppm 群において有意な上昇が、肝臓では上昇傾向が認められ、腎臓では変化は認められなかった。*gpt* 変異コーンのスペクトラム解析を基に、各変異における特異的変異頻度を算出した結果、肺では AT-TA transversion 変異及び AT-GC transition 変異の有意な上昇が認められ、肝臓では single base pair (bp) deletion の有意な上昇が認められた (Table 3 及び 4)。さらに、Spi assay の結果、肺では有意な変化ではなかったものの、用量依存的な *red/gam* MF の増加が、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 (Fig. 2)

肺、肝臓及び腎臓の DNA 中 8-OHdG レベルは、いずれの濃度においても変化は認められなかった (Fig.3)。

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、肺、肝臓の順であった (Fig. 4)。

Nrf2 関連遺伝子群の発現解析では、*HO-1*、*NQO1*、*TrxR1*、*GCLc*、*GCLm*、*GSTa4* の mRNA 発現レベルが肺において有意に増加した (Fig. 5)。

【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 曝露量を Table 5 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 曝露量は 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、幼弱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

れ Table 6 及び 7 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。

幼若及び成熟マウスの肺における *gpt* MF を Fig. 6 に示す。いずれも AA 100 ppm から上昇傾向が認められ、200 ppm 以上の群では対照群に比べ約 3 倍程度の有意な上昇認められた。*gpt* 変異コロニーのスペクトラム解析を基に、各変異における特異的変異頻度を算出した結果、幼若マウスでは GC-CG transversion、bp 及び over 2 bp の欠失変異頻度の有意な上昇が、成熟マウスでは GC-TA transversion、AT-GC transition、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 8 及び 9)。Spi assay の結果、幼若及び成熟マウスともに AA 200 ppm から *red/gam* MF の上昇傾向が認められ、成熟マウスでは 400 ppm 群において対照群に比べ約 3 倍の有意な上昇が認められた (Fig. 7)。

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. 8)。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. 9)。

#### 【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 10 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 11 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】では、AA を 4 週間飲水投与した *gpt delta* マウスの肺、肝臓及び腎臓における病理組織学的検索、*in vivo* 変異原性の検索、8-OHdG ならびに N7-GA-Gua レベルの測定、Nrf2 関連遺伝子の発現解析を行い、AA の発がん過程に対する遺伝毒性メカニズムの関与ならびにその発現機序に対する酸化的ストレスの関与の可能性を検討した。ICR-Swiss 及び A/J マウスで発がん性が報告されている肺で AT-TA transversion 変異を主体とした *gpt* MF の有意な上昇が認められたが、*red/gam* MF に変化は認められなかった。一方、AA の代謝物である GA の発がん標的臓器である肝臓では single bp の欠失変異を

主体とした *gpt* MF の上昇傾向と共に、*red/gam* MF の有意な上昇が認められた。従って、AA に誘発される変異は標的臓器と代謝物の標的臓器においてその種類が異なることが示されたがその意義については不明である。

酸化的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ず、肺で認められた *gpt* 変異コロニーにおいても8-OHdGが引き起こす代表的な突然変異であるGC-TA transversion 変異頻度の変化は認められなかったことから、酸化的ストレスの遺伝毒性への関与の可能性は低いと考えられた。一方、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も考えられたが、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が考えられた。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的ストレスの程度は低く、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】では、*gpt delta* マウスを用いて、AAの遺伝子突然変異誘発性に対する幼若期動物の感受性の違いについて検討した。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。同様の現象はラットにおいても報告されているが、ラットではAAの暴露量の違いが原因であり、感受性には差異はないとの報告がある。本実験では幼若及び成熟マウスでの暴露量に差は認められなかったことから、AAの神経毒性に対する感受性の違いはマウス特異的な変化である可能性が示された。

幼若及び成熟マウスの肺における *gpt* MF は幼若及び成熟マウスともに用量依存的な増加が認められ、200 ppm 以上の群で有意に上昇した。変異コロニーのスペクトル解析においても、幼若及び成熟ともに *single bp* の欠失変異が高頻度に検出された。また、*red/gam* MF も幼若、成熟ともに200 ppm から上昇傾向が認められたが、その程度に差異はなく、暴露時期による変異頻度ならびに変異パターンに違い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 DNA 損傷の関与は明らかとはならなかった。

【実験 3】では、*gpt delta* マウスに AA と種々の抗酸化剤を併用投与した。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 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, 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)

2. 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)

3. 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. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Nagoya, 2011. 10)

4. 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

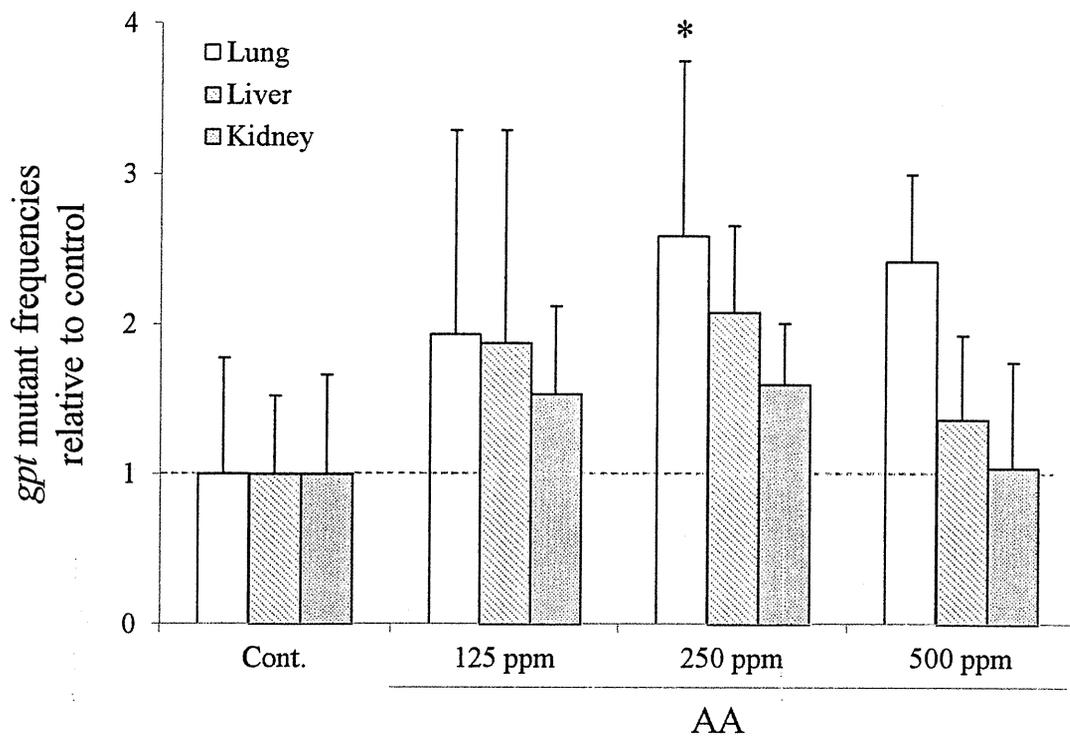


Fig. 1 *gpt* mutant frequencies in the lung, liver and kidney of male *gpt* delta mice. Data represent means  $\pm$  S.D. (n=5).

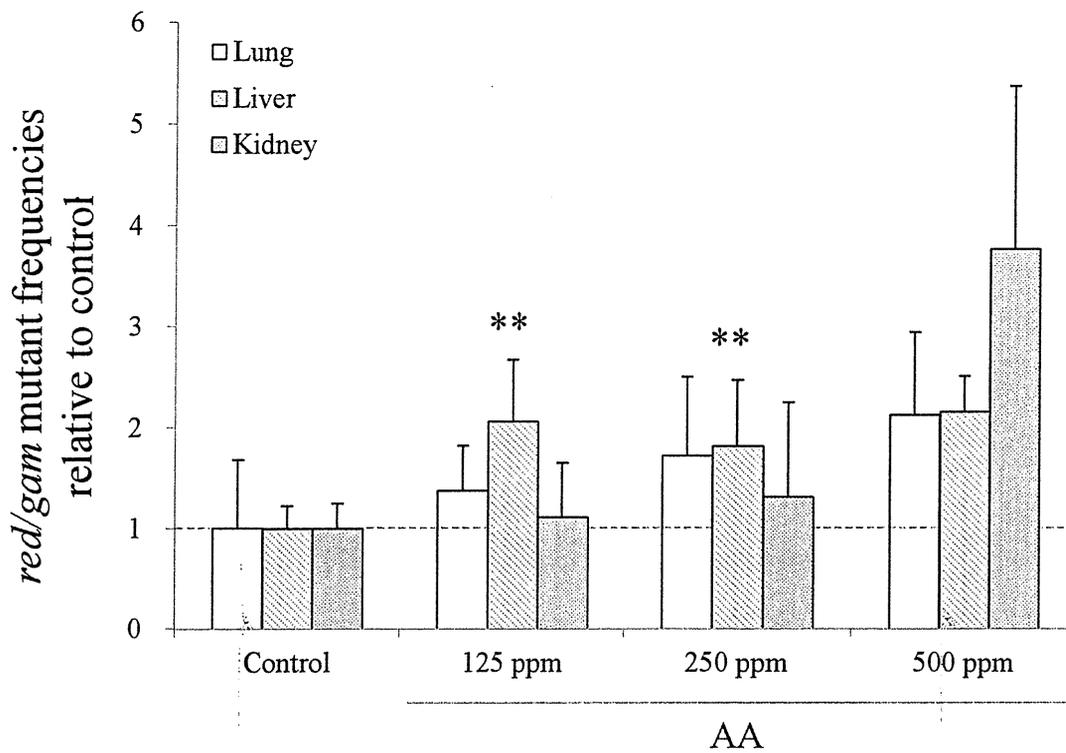


Fig. 2 *red/gam* mutant frequencies in the lung, liver and kidney of male *gpt* delta mice. Data represent means  $\pm$  S.D. (n=5). \*, \*\*: p<0.05, 0.01 vs. Control group.

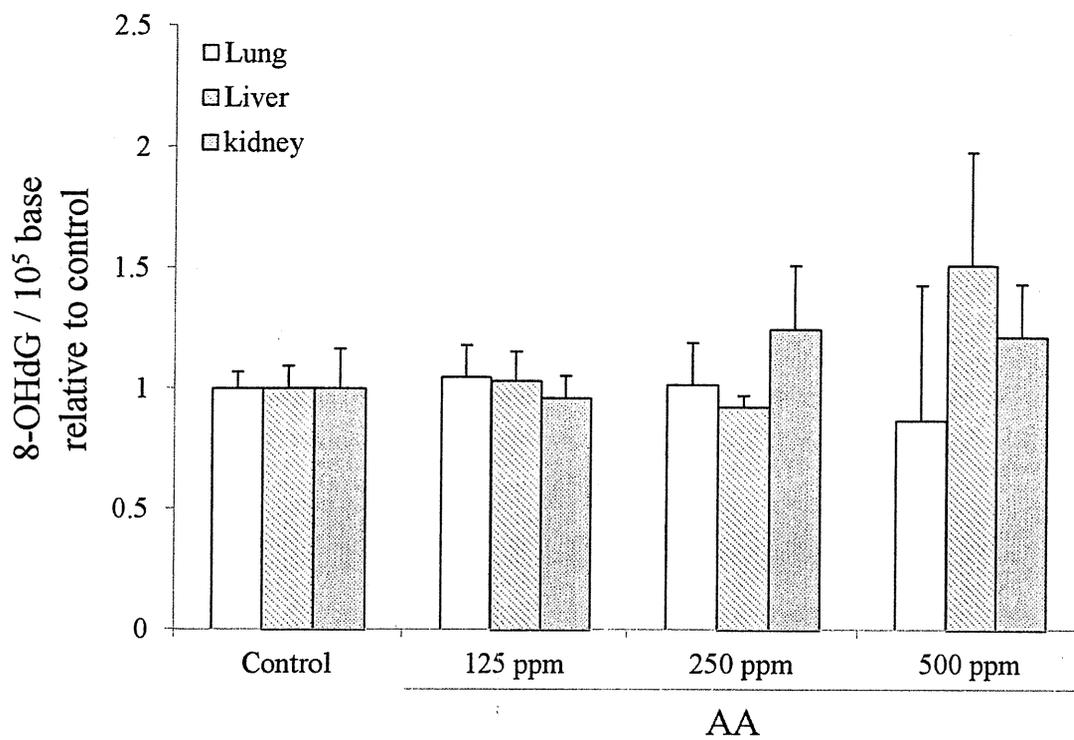


Fig. 3 8-OHdG levels in the lungs, livers and kidneys of *gpt* delta mice treated with AA for 4 weeks. Data represent means  $\pm$  S.D. (n=5).