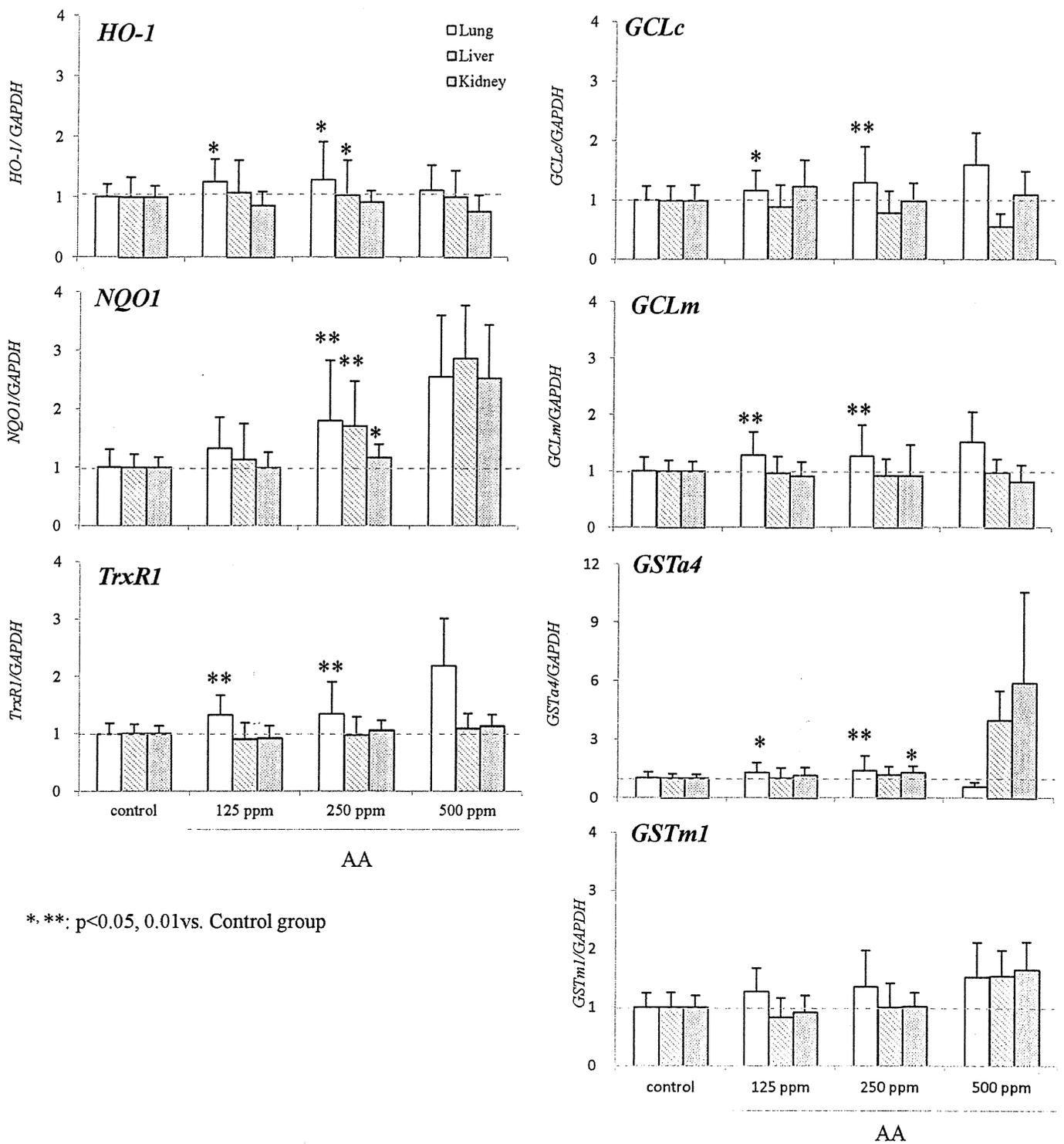


Fig. 4 N7-GA-Gua levels in the lungs DNA of *gpt* delta mice (A). Data represent means \pm S.D. (n=5). MRM chromatograms in lung DNA of Control mice (B) and 125 ppm AA treated mice (C).



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

Fig. 5 Expression of Nrf2 related-genes. Data represent means \pm S.D. (n=5). **, *: p<0.01, 0.05 vs. Control group

Table 1 Water consumption for *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 *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
Absolute (g)				
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
Relative (g%)				
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, 0.01vs. Control group.

Table 3 Specific mutant frequency of the lungs of *gpt* delta mice treated with AA

	Basal diet	125 ppm	250 ppm	500 ppm
Base substitution				
Transversions				
GC-TA	0.11 ± 0.15	0.06 ± 0.09	0.28 ± 0.30	0.05 ± 0.06
GC-CG	0	0.02 ± 0.05	0	0
AT-TA	0	0	0.14 ± 0.15*	0.19 ± 0.14
AT-CG	0.03 ± 0.05	0	0	0
Transitions				
GC-AT	0.16 ± 0.12	0.26 ± 0.13	0.27 ± 0.16	0.30 ± 0.30
AT-GC	0	0.14 ± 0.16	0.02 ± 0.04	0.05 ± 0.06
Deletion				
Single bp	0.03 ± 0.05	0.20 ± 0.33	0.14 ± 0.19	0.23 ± 0.17
Over 2bp	0.03 ± 0.07	0	0.03 ± 0.08	0.04 ± 0.06
Insertion	0	0	0.03 ± 0.08	0
Complex	0	0	0	0
Total	0.35 ± 0.27	0.69 ± 0.48	0.92 ± 0.41	0.86 ± 0.20

*: p<0.05 vs. Control group.

Table 4 Specific mutant frequency of the livers of *gpt* delta mice treated with AA

	Basal diet	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

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

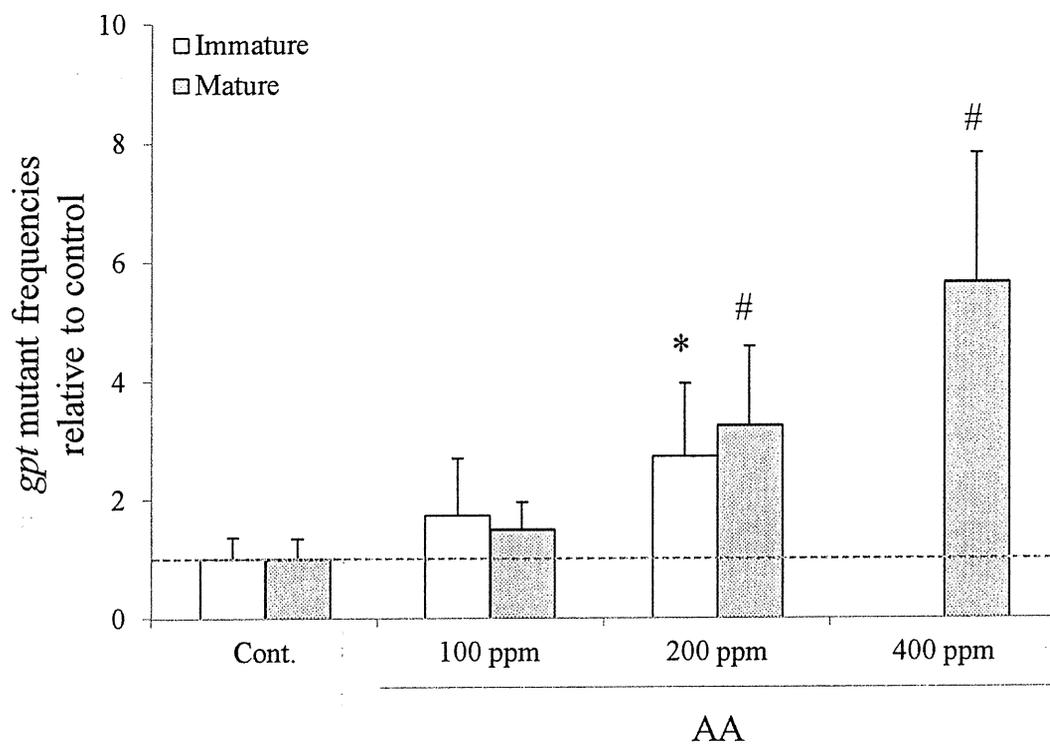


Fig. 6 *gpt* mutant frequencies in the lungs of AA-treated immature and mature *gpt* delta mice. Data represent means \pm S.D. (n=5). *: p<0.01 vs. Control group (immature). #: p<0.01 vs. Control group (mature).

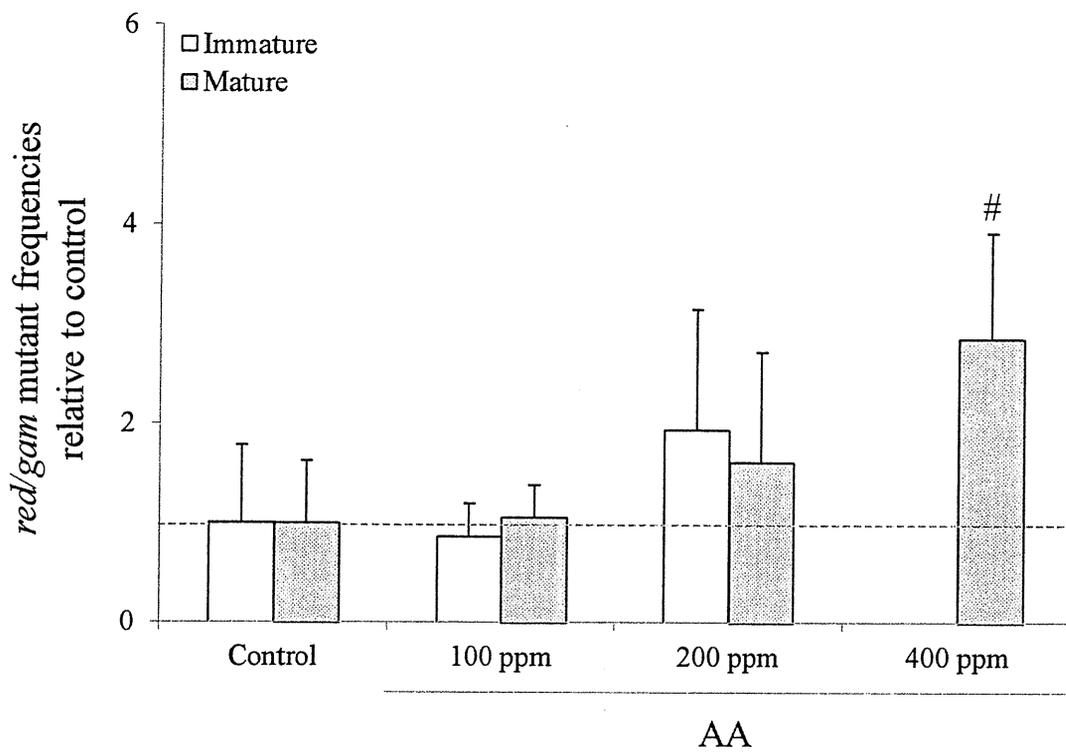


Fig. 7 *red/gam* mutant frequencies in the lungs of AA-treated immature and mature *gpt delta* mice. Data represent means \pm S.D. (n=5). #: $p < 0.01$ vs. Control group (mature).

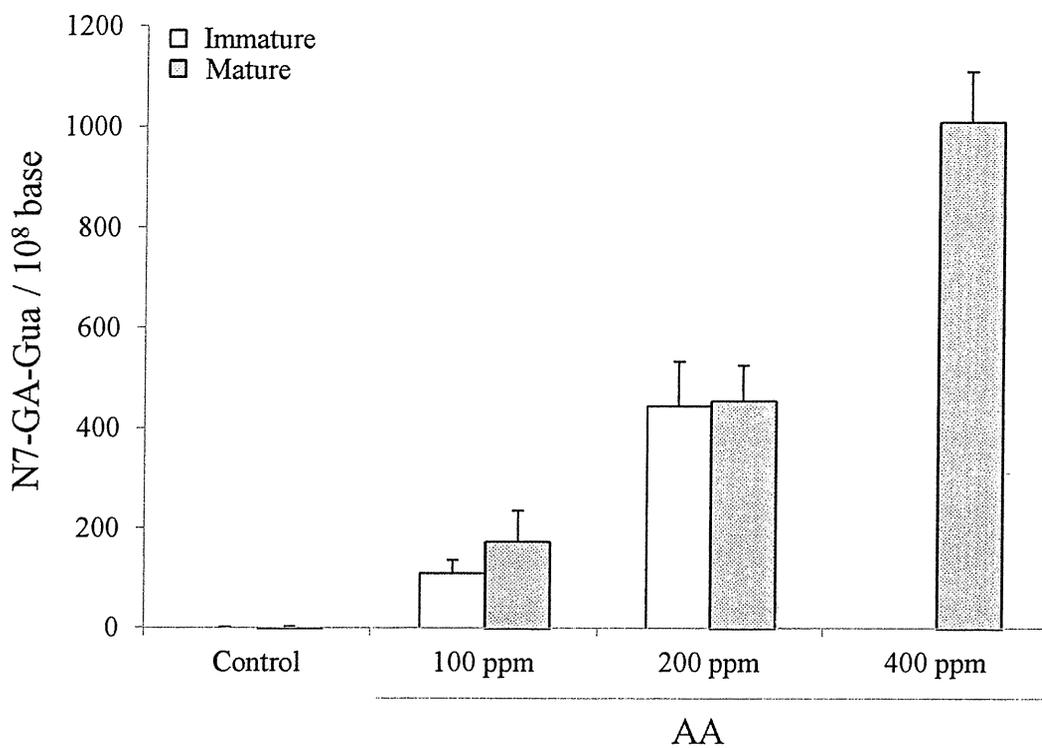


Fig. 8 N7-GA-Gua levels in the lungs DNA of immature and mature *gpt* delta mice. Data represent means \pm S.D. (n=5).

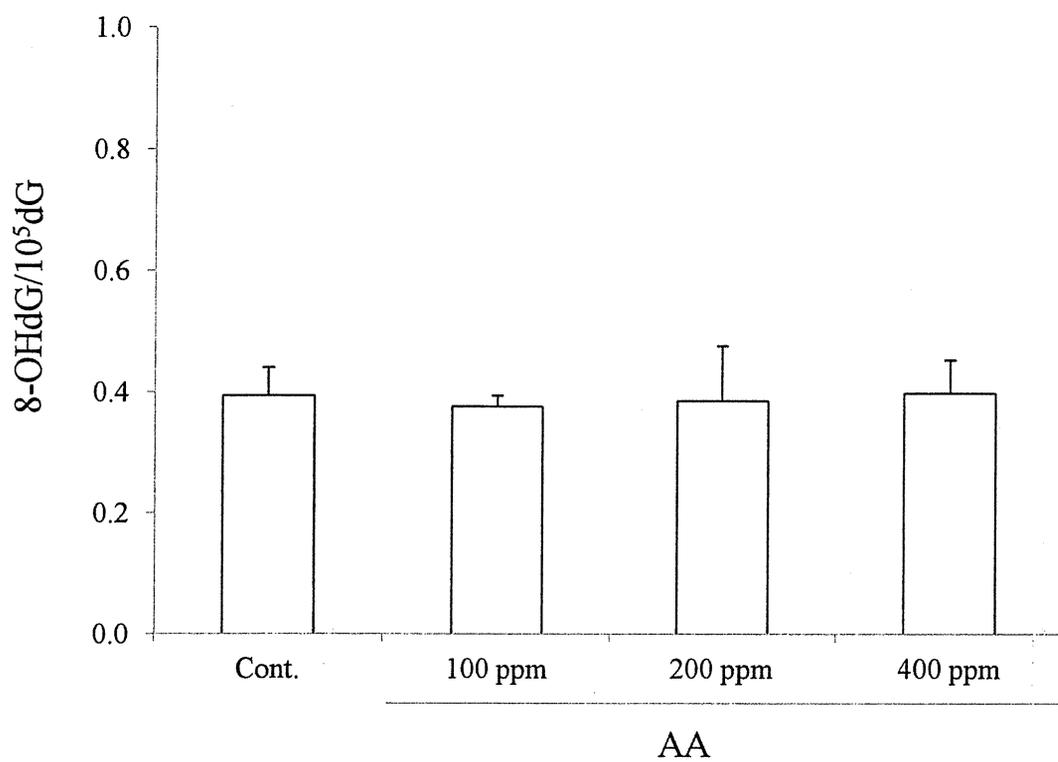


Fig. 9 8-OHdG levels in the lungs of immature *gpt* delta mice treated with AA for 4 weeks. Data represent means \pm S.D. (n=5).

Table 5 Data of Water consumption data and intake of AA

Group	Water consumption (ml/mouse/day)	AA intake	
		(mg/mouse)	(mg/kg/day)
Young			
Control	4.9	-	-
100 ppm	4.2	11.7	21.8
200 ppm	3.0	17.0	41.2
400 ppm	1.2	11.1	46.2
Adult			
Control	8.2	-	-
100 ppm	6.4	17.9	22.5
200 ppm	5.4	30.1	38.6
400 ppm	3.8	42.1	59.2

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

Item	Control	AA		
		100 ppm	200 ppm	400 ppm
No. of animals	10	10	10	—
Body weight (g)	23.21 ± 0.76	21.52 ± 1.07*	18.08 ± 1.62**	—
Absolute (g)				
Lungs	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.02**	—
Liver	1.20 ± 0.07	1.10 ± 0.11	0.96 ± 0.16**	—
Kidneys	0.34 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.27 ± 0.05	—
Relative (g%)				
Lungs	0.58 ± 0.04	0.60 ± 0.06	0.63 ± 0.08	—
Liver	5.19 ± 0.24	5.10 ± 0.39	5.29 ± 0.53	—
Kidneys	1.45 ± 0.05	1.48 ± 0.06	1.50 ± 0.14	—

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

Table 7 Final body, absolute and relative lung, liver and kidney weights of mature *gpt* delta mice

Item	Control	AA		
		100 ppm	200 ppm	400 ppm
No. of animals	10	10	10	10
Body weight (g)	30.57 ± 1.43	28.57 ± 1.69	28.36 ± 1.84	19.68 ± 2.21**
Absolute (g)				
Lungs	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.01**
Liver	1.51 ± 0.15	1.47 ± 0.13	1.43 ± 0.16	0.78 ± 0.12**
Kidneys	0.43 ± 0.05	0.43 ± 0.06	0.41 ± 0.05	0.27 ± 0.02**
Relative (g%)				
Lungs	0.52 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.55 ± 0.04	0.65 ± 0.05**
Liver	4.94 ± 0.31	5.12 ± 0.62	5.05 ± 0.35	3.94 ± 0.27**
Kidneys	1.42 ± 0.12	1.51 ± 0.21	1.45 ± 0.09	1.39 ± 0.10

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

Table 8 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 9 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 10 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 11 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

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
食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究

平成 21-23 年度 分担総合研究報告書

ライフステージを勘案した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

研究分担者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 第一室長
研究協力者： 堀端克良 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 第一室
安井 学 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、AAはスナック菓子、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、AAの遺伝毒性反応性を幼若、成熟動物で比較検討した。ラットにおいては3、11週齢のSDラットを用いた50~200ppm、28日間の飲水投与試験と、4、6、10週齢のSDラットを用いた25、50mg/kgの1週間強制経口投与試験を行い、Pig-a突然変異(赤血球)、小核(末梢血、骨髓、精巢)、コメット(肝臓、精巢)試験と、各種臓器でのDNAアダクト量を測定した。マウスにおいては、3週、および10週齢のgpt deltaマウス(雄)を用いた0、100、200、400ppmの28日間飲水投与試験を行い、赤血球のPig-a突然変異と精巢のgpt遺伝子突然変異を行い、DNAアダクト量を測定した。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、末梢血、骨髓の小核、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、両方で顕著な差は認められなかった。精巢では飲水投与、強制経口投与とも小核、コメット試験で、成熟と幼若ラット間でわずかな差が観察された。一方、DNAアダクトの解析結果においては、精巢においては顕著に幼若ラットで蓄積を認めた。同様の結果はマウス飲水投与の精巢でも観察された。すなわち、gpt遺伝子突然変異頻度誘発は成熟、幼若マウスの両方でわずかであり、その差も顕著ではなかったが、DNAアダクト生成量は、幼若マウスで顕著であった。幼若期のラット、マウス精巢でのAAのDNAアダクトの高蓄積性はライフステージに依存したAAの代謝に関連するものと考えられる。種間で共通して観察されたことから、ヒトに対する影響も考えられ、AAの発がんリスク評価には、小児に対しては特別の配慮が必要と考えられた。

キーワード；アクリルアミド、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。

AAはCYP2E1により代謝されGAに変換される。CYP2E1の酵素活性は新生時期と成熟期で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。そのため、*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、これまで3(幼若)、11(成熟)週齢のgptトランスジェニックラット(F344)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(gpt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。その結果、AAの発がん標的組織と考えられる精巣で幼若ラットでの強い精巣遺伝毒性と、DNAアダクト量の顕著な蓄積を観察した。

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更に検討する目的で、非トランスジェニックSDラットと、トランスジェニックgptマウスを用いて、AAの遺伝毒性反応性を幼若、成熟動物で比較検討した。

B. 研究方法

i) 動物

SDラット(雄)を日本エスエルシー(株)より購入した。飲水投与では馴化後3週(幼若)、および11週齢(成熟)の動物を使用した。強制経口投与では馴化後4週、6週、および10週齢の動物を使用した。gpt deltaマウス(雄)を国立医薬品食品研究所内で繁殖し、3週、および10週齢の動物を使用した。

ii) 投与

ラット飲水投与試験：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。

ラット強制経口投与試験：各週齢SDラットを3群各5匹ずつに分け、陰性対照群、25mg/kg投与群、50mg/kg投与群とした。AAを蒸留水で250mg/mlに調整し、連続7日間強制経口投与を行った。最終投与、24時間後にラットを屠殺した。

マウス飲水投与試験：3週、および10週齢のgpt deltaマウス(雄)をそれぞれ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、100、200、400ppm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

動物の尾静脈または心臓から血液を約100uL採取し、小核試験を行った。また、精巣

を抽出して、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

肝臓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。ラットでは、末梢血に CD45 抗体 (Cy5) と、CD59(FITC)抗体を反応させた。マウスでは抗 TER119/Erythroid Cells- PE/Cy7、及び抗 CD24-FITC で赤血球を標識した。Pig-a 欠損細胞を Miura らの方法に従い、フローサイトメータで分画した。解析には BD 社の FACS Canto II を使用した。

vi) gpt 遺伝子突然変異試験

組織の一部を採取し、DNA を抽出し、遺伝子突然変異用のサンプルとした。gpt 遺伝子試験は Masumura らの方法に従って行った。

vii) DNA アダクトの定量

組織の一部を、液体窒素を用いて急速凍結し冷凍保存した。後日 DNA を抽出し、DNA アダクトの定量用サンプルとした。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。LC/MS/MS は Waters-Micromass 社の Quattro Ultima Pt を用い、HPLC のカラムは Shim-pack XR-ODS(75×3.0mm)を用いた。N7-GA-Gua 標品、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 を用い、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

i) ラット飲水投与試験：

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 を、給水ビンで 28 日間飲水経口摂取させ、末梢血と精巣での小核試験、末梢血での Pig-a 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。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。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。

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、むしろ幼若ラットの方が増加率は低かった。

精巣に関しては小核、コメット試験を実施した (図 1、図 2)。両試験において幼若ラットで用量依存的な反応性と、100、200ppm 投与群での有意な誘発を認めた。また、小核に関しては幼若、成熟ラット間で顕著な反応性の違いが観察された。