

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 29 年度総括研究報告書

アクリルアミドの発がん過程早期における遺伝子突然変異誘発性に関する研究

研究代表者 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨

食品の加熱調理で生成するアクリルアミド（AA）は、げっ歯類において発がん性を有し、種々の遺伝毒性試験において陽性を示すことから遺伝毒性発がん物質の一つと考えられている。しかしながら、発がん条件下で *in vivo* における突然変異を検出した報告はこれまでにない。本研究では、AA の投与期間の延長と遺伝子改変による *in vivo* 変異原性試験の高感度検出モデルを用いて、発がん過程早期における遺伝子突然変異の有無を検索し、AA の発がん過程における遺伝毒性機序の関与の有無を検討した。実験 1 では、発がん用量（50 ppm）の AA を OECD のテストガイドラインで推奨されている 4 週間に加え、8 及び 16 週間投与し、発がん標的臓器であるハーダー腺及び肺と非発がん標的臓器である肝臓を採取した。いずれの臓器においても臓器重量及び病理組織学的変化に AA 投与による変化は認められなかった。実験 2 では、DNA ポリメラーゼ（Pol）の複製忠実度を低下させた Pol KI *gpt delta* マウスと *gpt delta* マウスに AA を 50, 150 又は 300 ppm の濃度で 4 週間投与し、肺及び肝臓を採取した。いずれの臓器においても臓器重量及び病理組織学的に AA 投与による変化は認められず、遺伝子型間において差はみられなかった。平成 30 年度は両実験について各臓器の AA 特異的 DNA 付加体の測定と *in vivo* 変異原性の検索を実施し、投与期間の延長と Pol の複製忠実度の低下が DNA 損傷と遺伝子突然変異頻度に及ぼす影響から、AA の発がん過程早期における突然変異の有無を明らかにする。

A. 研究目的

食品の加熱調理で生成するアクリルアミド（AA）は、生体内においてグリシドアミドに代謝され、DNA と高い結合性を示す。遺伝毒性試験では、*in vitro* の復帰突然変異試験が陰性であるものの、染色体異常試験や *in vivo* の小核試験ならびにトランスジェニック動物を用いた突然変異試験において陽性を示す。また、National Toxicology Program（NTP）の発がん性試験では、マウスの肺及びハーダー腺において発がん性を有することが報告されており¹⁾、AA は遺伝毒性発がん物質の一つと考えられ

ている。

我々は平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金「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」において、マウスの発がん過程における遺伝毒性機序の関与を明らかにするため、OECD のテストガイドラインに従いレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* マウスに AA を 100, 200 又は 400 ppm の濃度で 28 日間飲水投与し、肺における DNA 付加体（N7-GA-Gua）測定と *in vivo* 変異原性の検索を実施した。その結果、DNA 付加体の用量依存的な増加に加え、遺伝子突然変異頻

度は 400 ppm 群で有意に上昇し, G:C-T:A transversion とフレームシフトを特徴とする変異パターンを示すことを明らかにした²⁾。しかしながら, NTP において実施された発がん性試験の最高用量は 7.0 mM (約 50 ppm) であり, 本試験で変異頻度の上昇が認められた 400 ppm は 8 倍の濃度にあたる。また, 発がん用量の 2 倍の濃度にあたる 100 ppm 群では, N7-GA-Gua が検出されたものの, 変異頻度の上昇は認められなかった。これらの結果から, AA がマウス肺において突然変異誘発性を有することは明らかになったものの, その発がん過程に突然変異が関与したかは未だ明らかではない。一方, 発がん用量付近の濃度で変異頻度の増加がみられなかった理由として, 発がん性試験に比べ投与期間が短いことや, 変異頻度の変化が *in vivo* 変異原性試験の検出感度以下である可能性も考えられる。そこで, 本研究では投与期間の延長と遺伝子改変による *in vivo* 変異原性試験の高感度化モデルを用いて, 発がん用量の AA 投与時の発がん標的臓器における突然変異頻度を検索し, その発がん過程における遺伝毒性機序の関与を明らかにする。

投与期間の影響では, OECD のテストガイドラインで定められている 4 週間の投与に加え, 8 週間, 16 週間の投与群を設け, 発がん用量の AA 投与時の標的臓器における DNA 付加体量及び突然変異頻度の経時的変化を明らかにする。遺伝子改変による *in vivo* 変異原性試験の高感度化については, 平成 27 年度厚生労働科学研究「食品中遺伝毒性物質の「事実上の閾値」形成における DNA ポリメラーゼ の関与」において, Pol の複製忠実度を低下させた Pol KI *gpt*

delta マウスでベンゾ[a]ピレン (BaP) の突然変異誘発性が増強したことから, 本動物を *in vivo* 変異原性の高感度検出モデルとして用い, 発がん用量の AA 投与時の変異の有無について検討する。

平成 29 年度はこれら二つの試験の動物実験を実施し, 実験 1 においてはハーダー腺, 肺及び肝臓について, 実験 2 では肺及び肝臓について病理組織学的検索を実施した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

AA はシグマ アルドリッチ ジャパン (大阪) から購入した。

B-2. 動物実験操作

B-2-1. 投与期間の延長による突然変異誘発性の検索

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 マウスと日本エスエルシー株式会社 (静岡) から購入した雄性 C3H/He 系マウスを用いて B6C3F1 系 *gpt* delta マウスを作出し, 実験に供した。動物の飼育はバリヤース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。雄性 6 週令の B6C3F1 系 *gpt* delta マウス 120 匹を 60 匹ずつ 2 群に配し, 対照群と AA 投与群を設けた。AA は NTP のマウス発がん性試験

において肺及びハーダー腺に発がん性が認められた 50 ppm の濃度で脱イオン水 (DW 水) に混じて試験期間中自由に摂取させた。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。DW 水の交換は週 1 回、一般状態観察は連日実施した。また、体重及び飲水量の測定は週 1 回行った。投与開始から 4, 8 及び 16 週間後、各群 20 匹ずつをイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、ハーダー腺、肺、肝臓を採取し、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、残りを AA 特異的 DNA 付加体及び *in vivo* 変異原性の検索用サンプルとして液体窒素により凍結し、解析まで -80°C で保存した。

B-2-2. *in vivo* 変異原性試験の高感度化による突然変異誘発性の検索

動物は雌性 6 週齢の C57BL/6 系 Pol ζ KI *gpt* delta マウス及び *gpt* delta マウス各 20 匹を日本エスエルシー株式会社 (静岡) より購入した。動物の飼育はバリヤー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。各遺伝子型マウス 20 匹を各群 5 匹に配し、対照群と低用量群、中間用量群及び高用量群の計 4 群を設けた。低用量群、中間用量群及び高用量群には AA をそれぞれ 50, 150 及び 300ppm の濃度で混じた DW 水を 28 日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。DW 水の交換は週 1 回、一般状態観察は連日実施した。体重は開始から試験終了までは毎週 1 回測定した。最終投与後、3 日間の休薬期間を設け、動物は AA の投与開始から 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓、腎臓及び肺を採取し、重量を測定した。肝臓の外側左葉、右腎の半分及び肺の右葉を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、残りは AA 特異的 DNA 付加体及び *in vivo* 変異原性の検索用サンプルとして液体窒素により凍結し、-80°C で保存した。

(統計学的処理方法)

体重及び臓器重量の統計学的処理は、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合は Dunnet の多重比較検定により行った。また、遺伝子型間の比較には Tukey の多重比較を用い、有意水準は 5% 未満とした。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者が実施し、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

C-1. 投与期間の延長による突然変異誘発性の検索

試験期間中、対照群及び AA 投与群の摂水量は同様に推移した（図 1）。一般状態観察及び体重の推移において投与に起因する変化は認められなかった（図 2）。対照群の 4、8 及び 16 週までの平均摂水量はそれぞれ 5.4、4.6 及び 4.8 ml/animal/day だったのに対し、AA 投与群では 5.1、5.4 及び 4.6 ml/animal/day で、AA 投与による差は認められなかった。また、4、8 及び 16 週における AA の総暴露量はそれぞれ 7.2、15.1 及び 25.7 mg/animal だった（Table 1）。最終体重と肺、肝臓及びハーダー腺の重量を Table 2 に示す。肝臓及びハーダー腺の実重量及び相対重量は 4 週に比べて 16 週において有意な高値を示したが、いずれの臓器においても AA 投与群と対照群との間に差は認められなかった。病理組織学的検索の結果、いずれの臓器においても投与に起因した変化は認められなかった。

C-2. *in vivo* 変異原性試験の高感度化による突然変異誘発性の検索

試験期間中の体重の推移を図 3 に示す。両遺伝子型マウスにおいて、300 ppm 群では投与開始 1 週目から AA の神経毒性に由来する四肢の麻痺と体重の低下が認められ、2 週目の体重はさらに低値を示した。さらに、*gpt delta* マウスでは 2 週目に 1 例の死亡がみられたことから、3 週目以降、両遺伝子型マウスとも投与濃度を 300 ppm から 200 ppm に変更した。その結果、神経毒性は回

復し、体重も増加傾向を示した。試験期間中の摂水量の推移を図 4 に示す。両遺伝子型において 300 ppm 群では神経毒性による状態の悪化がみられた 3 週目において摂水量が低下した。試験期間中の AA の総暴露量において、遺伝子型間の差はみられなかった（Table 3）。最終体重と肺及び肝臓の重量を Table 4 に示す。最終体重は 300 ppm 投与群において有意な低値を示した。また、肝臓の相対重量は同群において高値を示した。病理組織学的検索の結果、いずれの臓器においても投与に起因した変化は認められなかった。

D. 考察

D-1. 投与期間の延長による突然変異誘発性の検索

これまでに AA を 100、200 及び 400 ppm の濃度で 4 週間 B6C3F1 系 *gpt delta* マウスに投与すると、肺における *gpt* 変異体頻度（MFs）は 200 ppm 群から上昇することを明らかにしている。その時の AA の総暴露量はそれぞれ 17.9、30.1 及び 42.1 mg/animal であった。一方、本試験における 4、8 及び 16 週投与群の AA の総暴露量は、それぞれ 7.2、15.1 及び 25.7 mg/animal であり、8 及び 16 週では 100 及び 200 ppm の 4 週間投与と同程度であることが確認された。今後、肺、ハーダー腺及び肝臓における *in vivo* 変異原性の検索を実施し、発がん用量の AA の突然変異誘発性に対し、投与期間の延長が及ぼす影響を明らかにする。

D-2. *in vivo* 変異原性試験の高感度化による突然変異誘発性の検索

300 ppm 群で投与 2 週目までに認められ

た四肢の麻痺及び体重の低下において遺伝子型間の差は認められなかった。また、200 ppm に変更後の体重の推移についても遺伝子型間の差はみられなかった。今後、肝臓及び肺における *in vivo* 変異原性の検索を実施し、発がん用量の AA の突然変異誘発性に対し、PoI の複製忠実度の低下が及ぼす影響を明らかにする。

Rep. Ser.
2) Ishii, Y., Matsushita, K., Kuroda, K., Yokoo, Y., Kijima, A., Takasu, S., Kodama, Y., Nishikawa, A., Umemura, T., Acrylamide induces specific DNA adduct formation and gene mutations in a carcinogenic target site, the mouse lung. *Mutagenesis* 30, 227-235, 2015.

E. 結論

両試験において、発がん用量の AA 投与による一般状態及び各臓器の重量ならびに病理組織学的な変化について、投与期間の延長及び PoI の複製忠実度の低下による影響は認められなかった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

該当なし。

(参考文献)

1) National Toxicology Program (NTP). (2012) Toxicology and carcinogenesis studies of acrylamide (Cas No. 79-06-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed and drinking water studies). *Natl Toxicol. Prog. Tech.*

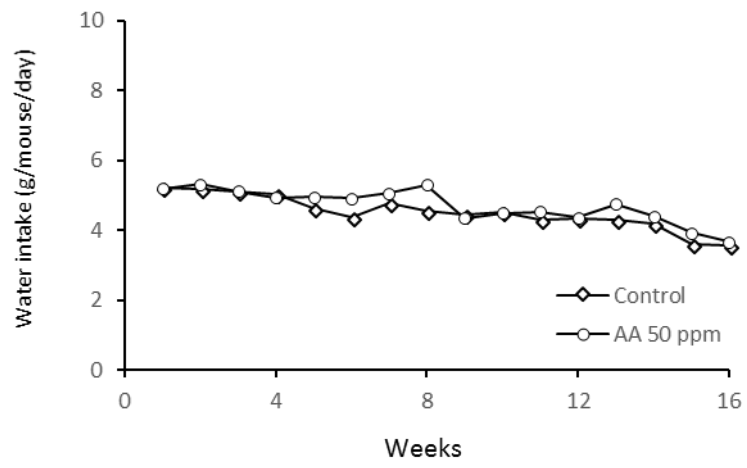


Figure 1. Daily water intake for B6C3F1 mice treated with AA at a dose of 50 ppm for 16 weeks.

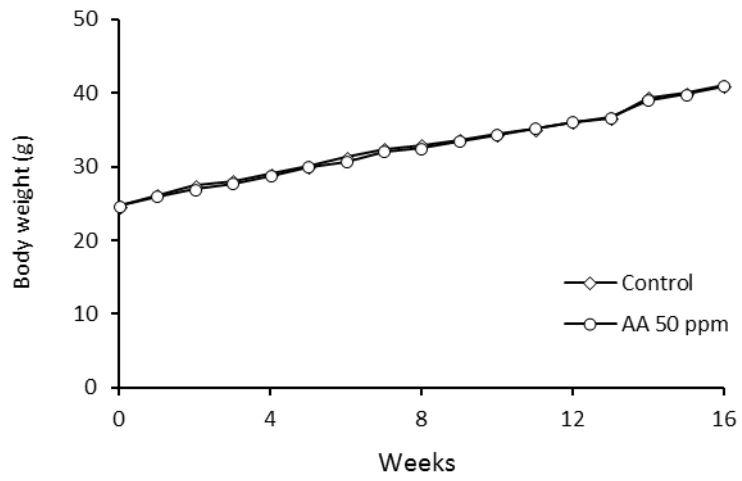


Figure 2. Body weight curves for B6C3F1 mice treated with AA at a dose of 50 ppm for 16 weeks.

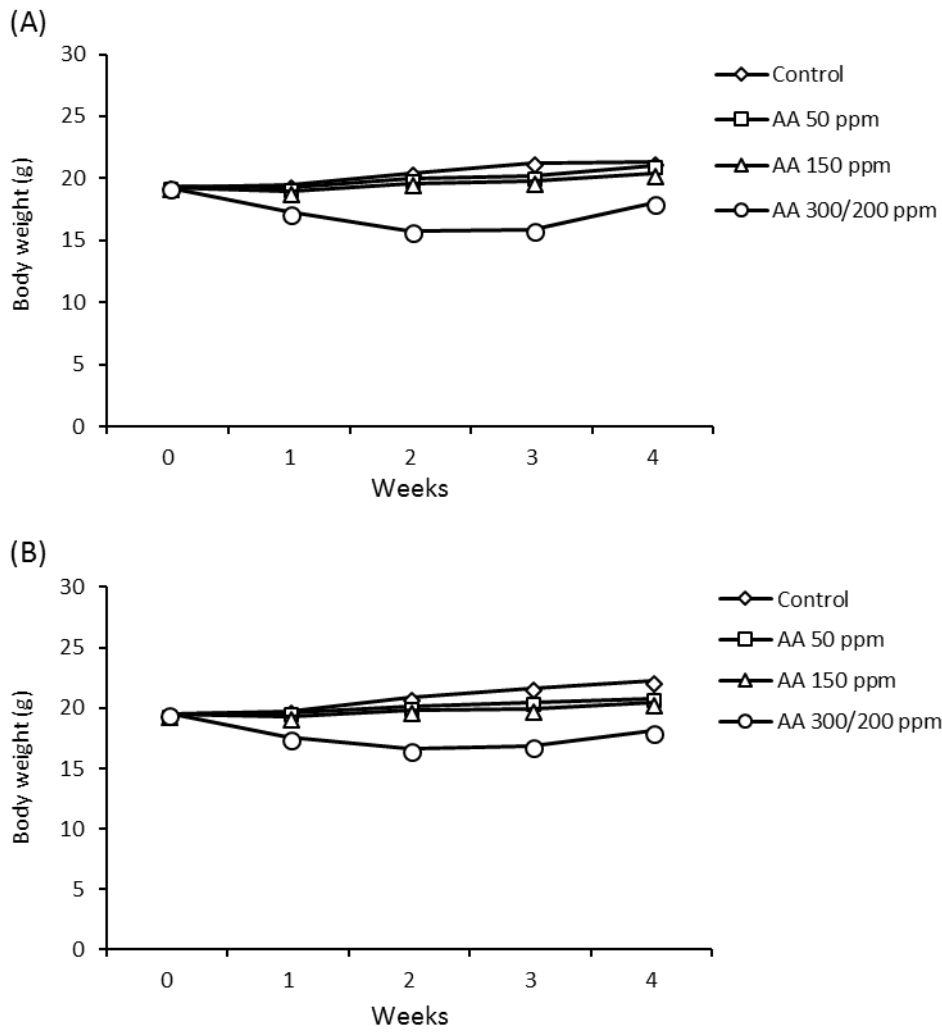


Figure 3. Body weight curves for (A) gpt delta mice and (B) Pol KI gpt delta mice treated with AA at doses of 50, 150 300/200 ppm for 4 weeks.

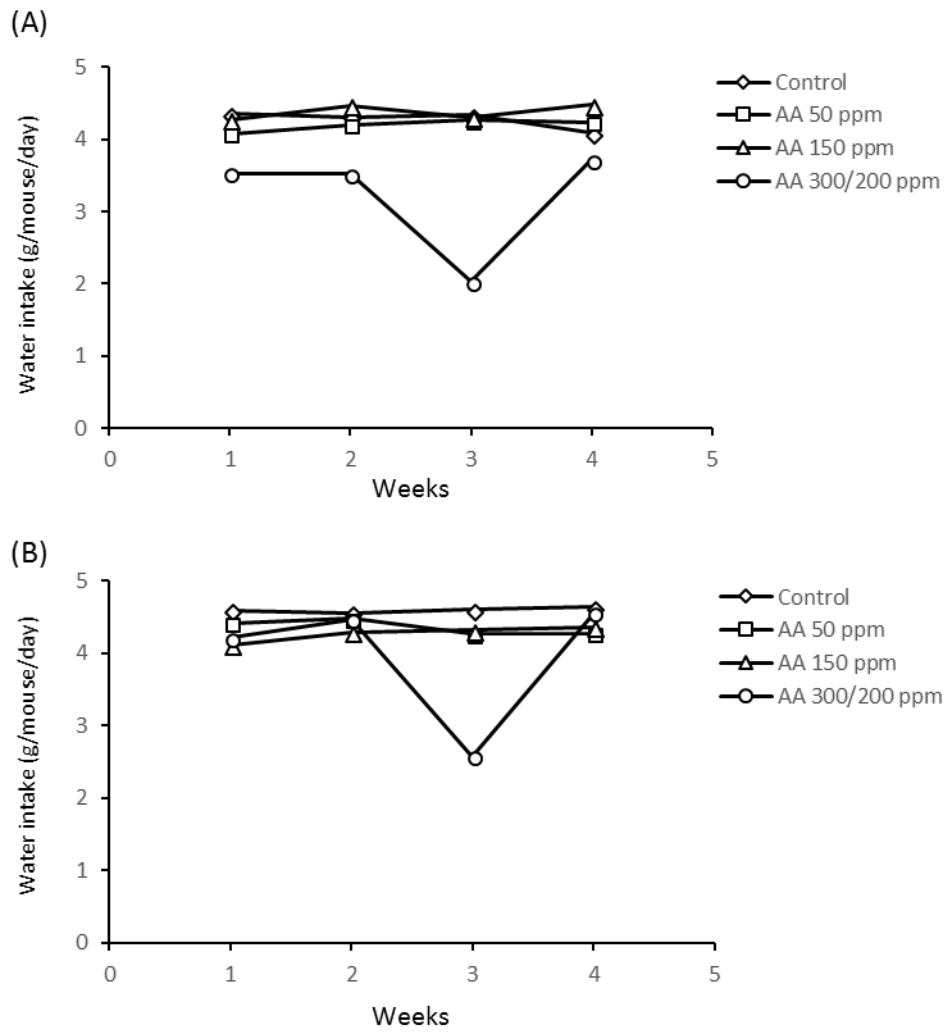


Figure 4. Daily water intake for (A) *gpt* delta mice and (B) Pol KI *gpt* delta mice treated with AA at doses of 50, 150 and 300/200 ppm for 4 weeks.

Table 1 Exposure levels of AA in the mouse treated at a dose of 50 ppm

	4weeks	8weeks	16weeks
AA intake (mg/animal)	7.2	15.1	25.7

Table 2 Final body weight and lung, liver and harderian gland weights

AA (ppm)	4 weeks		8 weeks		16 weeks	
	0	75	0	75	0	75
No. of animals	20	20	20	20	20	20
Body weight (g)	30.5 ± 2.6	29.4 ± 1.8	33.4 ± 2.9	32.7 ± 1.7	41.0 ± 3.2	40.9 ± 3.7
Absolute (g)						
Lung	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Liver	1.30 ± 0.12	1.19 ± 0.09	1.21 ± 0.11	1.19 ± 0.09	1.67 ± 0.21	1.66 ± 0.22
Harderian gland	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Relative (g%)						
Lung	0.49 ± 0.04	0.48 ± 0.03	0.42 ± 0.05	0.43 ± 0.02	0.52 ± 0.04	0.53 ± 0.05
Liver	4.24 ± 0.20	4.06 ± 0.16	3.64 ± 0.30	3.64 ± 0.14	5.77 ± 0.72	5.79 ± 0.80
Harderian gland	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01

Table 3 Exposure levels of AA in the mouse treated for 4 weeks

	50 ppm	150 ppm	300/200 ppm
<i>gpt</i> delta mice (mg/animal)	5.8	18.4	21.2
Pol ζ KI <i>gpt</i> delta mice (mg/animal)	6.1	17.9	22.6

Table 4 Final body, lung and liver weights

AA (ppm)	AA (ppm)			
	0	50	150	300/200
<i>gpt</i> delta mice				
No. of animals	5	5	5	4
Body weight (g)	21.2 ± 0.9	20.9 ± 1.1	20.7 ± 0.9	19.3 ± 1.5**
Absolute (g)				
Lung	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Liver	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.13	1.05 ± 0.03
Relative (g%)				
Lung	0.60 ± 0.05	0.59 ± 0.02	0.62 ± 0.06	0.61 ± 0.01
Liver	4.74 ± 0.27	4.75 ± 0.23	4.81 ± 0.66	5.40 ± 0.56
Polζ KI <i>gpt</i> delta mice				
No. of animals	5	5	5	5
Body weight (g)	22.2 ± 1.8	20.9 ± 1.9	20.8 ± 0.9	19.0 ± 0.9###
Absolute (g)				
Lung	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.01
Liver	1.00 ± 0.07	0.99 ± 0.12	0.94 ± 0.09	0.94 ± 0.14
Relative (g%)				
Lung	0.60 ± 0.04	0.63 ± 0.03	0.64 ± 0.07	0.66 ± 0.05
Liver	4.55 ± 0.52	4.72 ± 0.20	4.52 ± 0.57	4.94 ± 0.73

**; p < 0.01 vs control group of *gpt* delta mice

###; p < 0.01 vs control group of Polζ KI *gpt* delta mice