

平成 30 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

研究課題名：香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究

分担研究課題名：AOPと定量的評価を取り入れた遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化

研究分担者：増村健一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
協力研究者：安東朋子 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

総合型遺伝毒性発がんリスク評価法を確立するため、OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法（AOP）」を取り入れた遺伝毒性評価系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指すとともに、遺伝毒性の定量的な評価に取り組むことを目的とする。化学物質によって誘発される DNA 初期損傷（DNA 付加体形成）と遺伝子突然変異の量的相関を明らかにするため、食品に含まれる遺伝毒性発がん物質であるアクリルアミド（AA）をモデル化合物として、雄 C57BL/6J *gpt delta* マウスを用いた飲水投与実験を実施した。AA は 300, 100, 30 ppm の用量で 28 日間飲水投与し、最終投与 3 日後に組織を採取し凍結保存した。最高用量 300 ppm 群では顕著な体重増加抑制が見られたことから、300 ppm が最大耐用量付近と考えられた。飲水量から換算した AA 摂取量は 30, 100, 300 ppm 群でそれぞれ 4.32 ± 0.2 、 16.2 ± 0.6 、 37.4 ± 0.6 mg/kg/day であった。肝臓、肺、精巣からゲノム DNA を調製し、質量分析装置（LC-MS/MS）を用いて DNA 付加体量の測定を行った。AA はグリシドアミドに代謝されてグアニン塩基と結合し DNA 付加体を形成することから、代表的な付加体の一つである N7-GA-Gua 付加体を測定した。肝臓、肺、精巣のいずれにおいても AA 用量依存的に N7-GA-Gua 付加体量は増加した。用量反応関係はほぼ直線的であり、組織による明らかな感受性の差は認められなかった。直線近似から求めた AA 1 mg/kg/day あたりの N7-GA-Gua 付加体量は 60 ~ 75 個/ 10^8 塩基であった。AA 飲水投与による DNA 付加体形成量は AA 用量依存的であり組織によって顕著な差がないことが示唆された。

キーワード: DNA 付加体, アクリルアミド, *gpt delta* マウス

A. 研究目的

本研究では、香料化学物質の安全性を階層的に評価する評価系を構築し、食品香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価の推進に資することを目的とする。OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカ

ニズムを関連づけて説明する手法（AOP）」を取り入れた遺伝毒性評価系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指すとともに、遺伝毒性の定量的な評価に取り組む。化学発がんの分子的初期イベントである DNA 初期損傷（DNA 付加体形成）およびこれに続くキーイベントである

遺伝子突然変異誘発に関して、これらの *in vivo* における量的相関を明らかにするため、トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験 (TGR 試験) を用いたマルチエンドポイント試験を行う。食品に含まれる遺伝毒性発がん物質であるアクリルアミド (AA) は、グリシドアミドに代謝されてグアニン塩基等と結合して DNA 付加体を形成し、遺伝子突然変異を誘発すると考えられている。AA をモデル化合物として、*gpt delta* マウスを用いた飲水投与実験を実施し、体組織における DNA 付加体形成量を測定するとともに、TGR 試験によって遺伝子突然変異頻度を測定し、用量反応関係を比較する。

B . 研究方法

1 . AA 飲水投与実験

雄 9 週齢の *gpt delta* マウス (C57BL/6J) を用いて AA 飲水投与実験を実施した。アクリルアミド (CAS 79-06-1, MW=71.08) (純度 99%, Sigma-Aldrich) を Milli-Q 水に溶解して 300, 100, 30 ppm 溶液に調製し、給水瓶で自由摂取させた。(AA 100 ppm は 1.4 mM に相当する。) 1 群 10~11 匹のマウスを用いて 28 日間の飲水投与を行った。給水瓶は週 1 回交換し、飲水量と体重を毎週測定した。各群 5 匹を DNA 付加体測定および遺伝子突然変異試験用として、投与終了後 3 日目に安楽死させて組織 (肝臓、肺、精巣) を採取し、-80 で凍結保存した。

2 . LC-MS/MS を用いた DNA 付加体測定

2 - 1 . DNA 調製

凍結組織から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を調製した。調製法は以下の点を一部改変して行った。調製時には RNase 処理を行った。Proteinase K 処理は 37 で 3 時間インキュベーションした。最終溶出の溶媒は Milli-Q 水とした。最終標品の DNA 濃度を biospectrometer (eppendorf) または Qubit (Invitrogen) で測定した。

2 - 2 . サンプル処理 (脱塩基処理)

DNA 5 μ g または 10 μ g を Milli-Q 水で希釈した後、内部標準物質 [¹⁵N⁵]N7-GA-Gua 溶液を定量添加した。N7-GA-Gua 付加体を十分に脱塩基させる条件として 37 で 48 時間インキュベーションした。限外ろ過 (Amicon Ultra Ultracel-3K) を行ってサンプルを回収した後、濃縮遠心機で減圧濃縮した。濃縮した標品は粘性のある液状になった。使用時まで -80 で保存し、使用直前に Milli-Q 水に溶解して LC-MS/MS の測定に用いた。また、N7-GA-Gua 検量線作成に用いる標準液を調製した。N7-GA-Gua 標準液 100 nM 原液を Milli-Q 水で希釈して希釈系列を調製し、内部標準物質 [¹⁵N⁵]N7-GA-Gua 溶液と Milli-Q 水で一定量に調製した。標準液は前処理操作をせずに -80 で保存した。前処理サンプルと検量線作成用標準液それぞれに内部標準物質を同量添加していることにより、絶対量の換算が可能になる。

2 - 3 . DNA 付加体測定

LC-MS/MS は Waters 社製の Ultra performance LC Aquity、Quattro Premier XE システムを使用した。測定条件は資料 1 にまとめた。脱塩基処理したサンプルの検出ピーク面積を求め、N7-GA-Gua 標準液を用いて作成した検量線との比較から N7-GA-Gua 付加体濃度を求めた。dsDNA 中の 1bp の平均分子量 =616 として、DNA 中の付加体量を算出した。

(倫理面への配慮)

動物実験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程を遵守し、動物実験委員会の審査と承認を受けて実施した。

C . 研究結果

1 . AA 飲水投与実験

雄 *gpt delta* マウスを用いて AA の 28 日間飲水投与実験を行った。投与 1 週目以降に最高用量 300 ppm 群において体重増加抑制がみられ、投与 2 週目以降は 0 ppm 群と比較して有意な体重増加抑制が認められた (図 1)。最高用量 300 ppm 群において、0 ppm 群と比較して飲水量の減少が見られた。飲水量から換算した AA 摂取量は 30, 100,

300 ppm 群でそれぞれ 4.32 ± 0.2 、 16.2 ± 0.6 、 37.4 ± 0.6 mg/kg/day であった。最終投与の3日後に組織を採取した。最高用量 300 ppm 群において精巣重量が 0 ppm 群と比較して有意な減少がみられた。DNA 付加体測定および遺伝子突然変異測定のため肝臓、肺、精巣を凍結保存した。

2. LC-MS/MS を用いた DNA 付加体測定

2-1. N7-GA-Gua 標準液を用いた検量線と検出感度

N7-GA-Gua 標準液 50 ~ 0 nM の希釈系列を用いて検量線を作成した結果、1.25 nM 以上はピーク検出可能であり、0.63 nM 以下はバックグラウンドノイズによりピークが検出されなかった。従って本実験条件における DNA 付加体検出下限はおよそ 150 ~ 300 個/ 10^8 塩基と考えられた。

3. AA 投与マウス組織における DNA 付加体形成量の測定

DNA 付加体定量法の条件検討のため、肝臓 DNA を抽出する際の RNase 処理の影響を検討した。同じ組織量から調製した DNA 標品を同容量用いて DNA 付加体測定を行った結果、RNase 処理有の標品では付加体量が約 65% に減少した。RNA 画分にも N7-GA-Gua 付加体が存在していると考えられたことから、抽出時に RNase 処理を行った DNA 標品を以降の実験に用いることとした。

AA 300, 100, 30 ppm の用量で 28 日間飲水投与した雄 *gpt delta* マウスの肝臓、肺、精巣についてゲノム DNA を調製し、脱塩基処理を行って、N7-GA-Gua 付加体形成量を測定した。各群 5 匹の組織サンプルについて測定を行った(図 2)。組織 DNA の脱塩基サンプルを用いた際の、本実験条件における DNA 付加体検出下限は約 160 個/ 10^8 塩基であった。

肝臓では、最高用量 300 ppm 投与群における付加体量は 2335 ± 1204 個/ 10^8 塩基であった。肺では、最高用量 300 ppm 投与群における付加体量は 2781 ± 224 個/ 10^8 塩基であった。精巣では、

最高用量 300 ppm 投与群における付加体量は 2886 ± 552 個/ 10^8 塩基であった。用量反応関係はほぼ直線的であり、組織による明らかな感受性の差は認められなかった。陰性対照群の付加体量をゼロとした時の直線近似から求めた AA 1 ppm あたりの付加体形成量は 8 ~ 10 個/ 10^8 塩基であった。飲水量から換算した AA 1 mg/kg/day あたりの付加体形成量は 60 ~ 75 個/ 10^8 塩基であった。

また、一部個体について最終投与後 100 日目に採取した組織について N7-GA-Gua 付加体を測定したところ、肝臓、肺、精巣いずれにおいても付加体のピークは検出されなかった。

D. 考察

AA は食品に含まれる遺伝毒性発がん物質であり、ヒトおよびげっ歯類において、AA は肝臓のチトクローム P450 (CYP2E1) によって反応性の高い代謝物であるグリシドアミドに代謝される。グリシドアミドは細胞内でヘモグロビン付加体及び DNA 付加体 (N7-dG-GA, N3-dA-GA, N1-dA-GA 等) を形成する。発がん性については、マウスを用いた試験において、ハーダー腺、乳腺、肺、胃等で、ラットを用いた試験において、乳腺、甲状腺、精巣等で発がん頻度の有意な増加がみられている。また、グリシドアミドの試験において、AA と同等の投与量で同様の臓器に発がん性がみられている。従って、AA の発がん AOP としては、分子的初期イベントとして DNA へのグリシドアミド付加体の形成、キーイベントとして遺伝子突然変異の誘発を設定することができる。マウスを用いた AA の 28 日間飲水投与実験を実施して組織サンプルを取得した。最高用量 300 ppm 投与群では体重増加抑制が認められたことから、最大耐用量は 300 ppm と考えられた。DNA 付加体形成量を測定した結果、N7-dG-GA 量は AA 用量依存的にほぼ直線的に増加した。肝臓、肺、精巣において DNA 付加体量に顕著な差はなく、組織が AA 代謝物に全身的に曝露されていることが示された。本実験では OECD が推奨する TGR 試験の標準的プロトコルに従い、28 日間投与の 3 日後に

組織採取しているため、投与終了後の休薬期間に一部の付加体が消失している可能性があるが、この時点であっても AA 投与量と DNA 付加体量の相関性は非常に高く、直線近似式の R^2 値は 0.98 以上であった。一方、最終投与 100 日後には組織中の付加体は検出限界以下であった。N7-dG-GA 付加体は水中で脱塩基が進み DNA から除かれることを反映していると考えられた。脱塩基部位は AP site になるため、付加体の寿命は遺伝子突然変異誘発に影響する要因の一つと考えられる。今後は、DNA 付加体量を測定した同一組織サンプルを用いて TGR 試験を実施し、*gpt* 遺伝子突然変異の用量反応データを取得する。

E . 結 論

AA の発がん AOP を構成する DNA 初期損傷および遺伝子突然変異の用量反応データを取得することを目的に、マウスを用いた 28 日間飲水投与実験を実施した。組織における DNA 付加体形成量を測定した結果、N7-dG-GA 量は AA 用量依存的に増加した。組織の違いによる DNA 付加体量の顕著な差は認められなかった。

F . 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1 . 論文発表

1. You X, Ando T, Xi J, Cao Y, Liu W, Zhang X, Honma M, Masumura K, Luan Y. Gene mutation and micronucleus assays in *gpt* delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether. *Mutagenesis*. 2018, 33:153-160
2. Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. *In vivo* positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats.

Archives of Toxicology. 2018, 92:3207-3221

3. Aoki Y, Nakajima D, Matsumoto M, Yagishita M, Matsumoto M, Yanagisawa R, Goto S, Masumura K, Nohmi T. Change over time of the mutagenicity in the lungs of *gpt* delta transgenic mice by extract of airborne particles collected from ambient air in the Tokyo metropolitan area. *Genes and Environment*. 2018,40:25
4. Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka Y, Momonami A, Masumura K, Yamada M, Fujii W, Kitagawa Y. Integration of micronucleus tests with a gene mutation assay in F344 *gpt* delta transgenic rats using benzo[a]pyrene. *Mutation Research*. 2019, 837:1-7
5. Tennant RE, Guesné SJ, Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Honma M, Masumura K, Morita T, Stalford SA, Williams RV. Extrapolation of *in vitro* structural alerts for mutagenicity to the *in vivo* endpoint. *Mutagenesis*. 2019, 34:111-121

2 . 学会発表

1. 増村健一: IWGT 報告 - Aneugen に関する試験 . 日本環境変異原学会 MMS 研究会第 72 回定例会 焼津(2018.6)
2. 増村健一: Ames 試験陽性のフォローアップと *in vivo* 試験 . 日本環境変異原学会 BMS 研究会第 57 回定例会 熱川 (2018.7)
3. 増村健一、安東朋子、豊田尚美、鶴飼明子、能美健彦、本間正充: マウス雄性生殖細胞と次世代個体ゲノムの点突然変異頻度の比較 . 日本環境変異原学会第 47 回大会 京都 (2018.11)
4. 増村健一: 清涼飲料水中の六価クロムの安全性評価について . 第 16 回食品安全フォーラ

△ 東京(2018.12)

5. Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ando T, Ukai A, Nohmi T, Honma M: Absence of selection against ENU-induced point mutations in male germ cells during transmission to the next generation. 49th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society. San Antonio, USA. (2018.9)

H. 知的所有権の取得状況

なし

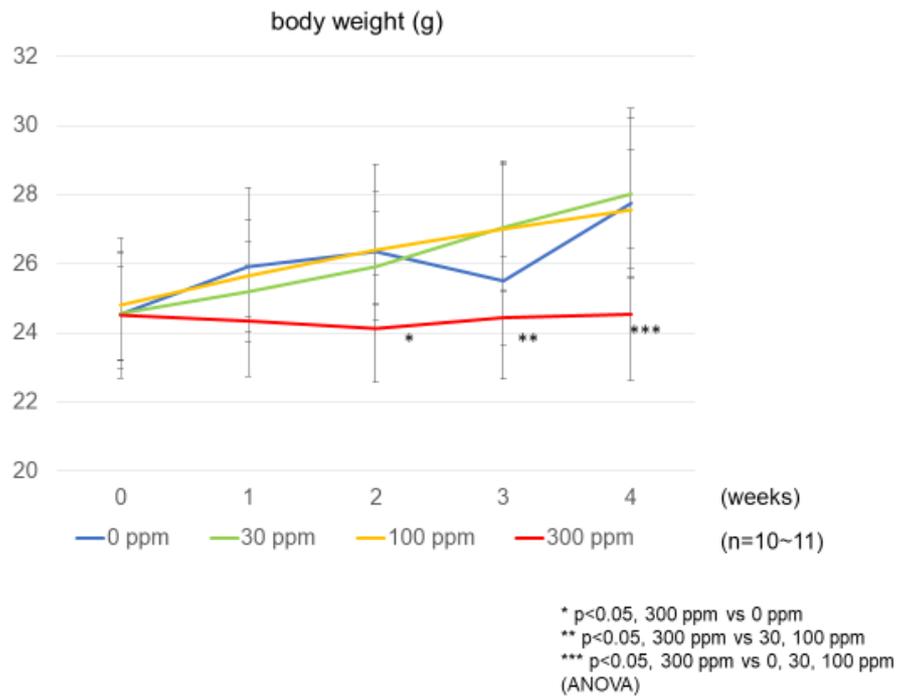


図 1 . 体重推移

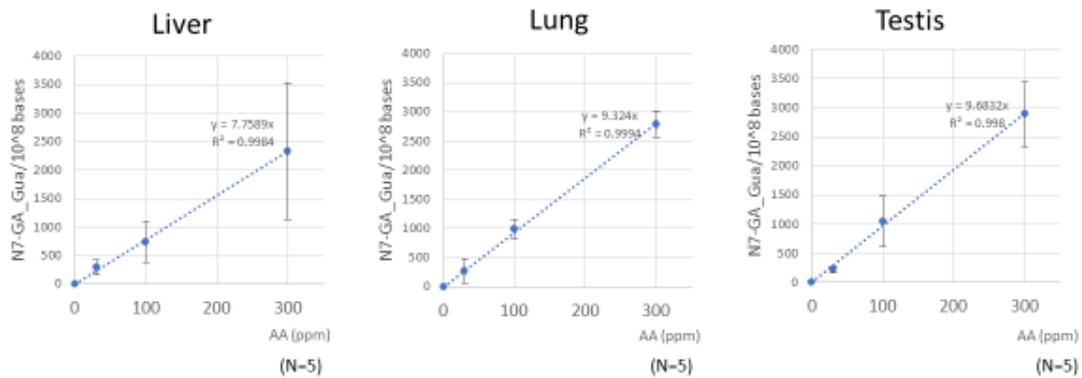


図 2 . AA 投与マウス組織における N7-GA-Gua 付加体量

資料 1 : DNA 付加体測定条件

LC-MS/MS : Ultra-performance LC Aquity、Quattro Premier XE システム (Waters)

HPLC 用カラム : Mightysil RP-18 MS 150-2.0 (5 μ m) (Cat. No 26075-96 関東化学)

移動相 A : Water/ 2 mM ammonium acetate

移動相 B : MeOH/ 2 mM ammonium acetate

Flow rate : 0.2 mL/min

Gradient:

(min)	A (%)	B (%)
0	100	0
10	90	10
11	0	100
20	0	100
21	100	0

Type: MRM

Ion mode: ES+

Capillary (kV)	3.00
Cone (V)	30
Extractor (V)	2
RF Lens (V)	0.0
Source Temperature ()	120
Desolvation Temperature ()	400
Cone Gas Flow (L/Hr)	40
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	500
Collision Cell Pressure (m bar)	< 1e-4
Collision Gas Flow (mL/Min)	0.20

DNA 付加体パラメーター

Adduct	<i>m/z</i>
N7-GA-Gua	239>152
[¹⁵ N ⁵]N7-GA-Gua	244>157