

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 30 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、発がん条件下で標的臓器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 を投与した *gpt delta* マウスの肺、ハーダー腺及び肝臓における DNA 付加体量と変異原性を検索した結果、N7-GA-Gua はこれらすべての臓器で検出され、*gpt* 変異体頻度（MFs）は投与 16 週目の肺及びハーダー腺で有意に上昇し、G:C-T:A transversion 及び一塩基欠失を特徴とする変異パターンが認められたことから、発がん標的臓器では、発がん用量の AA が DNA 損傷を介した突然変異を誘発することが確認された。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 28 日間投与し、肺における DNA 付加体測定と変異原性の検索を実施した。両遺伝子型とも N7-GA-Gua は 50 ppm 群から検出され用量依存的に増加し、*gpt* MFs は 150 ppm 群から有意に上昇したものの、N7-GA-Gua 量、MF 及び変異スペクトラムにおいて遺伝子型間の差は認められなかったことから、AA の突然変異誘発性に Pol は関与しないことが示唆された。

以上から、AA のハーダー腺及び肺における発がん性には特異的 DNA 付加体形成を介した突然変異誘発性が寄与していることが明らかとなった。

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 CYP2E1 によりグリシドアミド（GA）に代謝され、DNA と高い結合性を示す^{1,2)}。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^{3,4)}。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いることから⁵⁾、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ト

一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⁶⁾。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検討した。

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

化を明らかにすることとした。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 I 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こととした。

平成 29 年度は, 実験 1 において *gpt delta* マウスに発がん用量の AA (50 ppm) を 4, 8 及び 16 週間飲水投与し, 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, 病理組織学的検索を行った。実験 2 において *gpt delta* マウスと Pol KI *gpt delta* マウスに AA を 50, 150 及び 300 ppm の濃度で 28 日間飲水投与し, 肺と肝臓を採取し, 病理組織学的検索を行った。平成 30 年度は, 両実験において採取した各臓器について DNA 付加体 N7-GA-Gua の定量解析と *gpt assay* 及び *Spi assay* による変異原性の検索を実施した。

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. *in vivo* 変異原性の検索

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* 遺伝子変異体頻度 (MFs) を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコロニーは Thermo Fisher Scientific 社製 3730xl DNA Analyzer にて *gpt* 遺伝子の塩基配列解析を行い、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 Spi^+ MF を算出した。

B-2-2. N7-GA-Gua の定量解析

組織からの DNA 抽出には DNA Extractor® WB Kit (富士フィルム和光純薬株式会社製) 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 (Sartorius 社製, Vivacon®500, 10kDa) で 14,000 x g, 40 分間遠心分離した。ろ液を凍結保存し、分析時に再溶解し測定サンプルとした。N7-GA-Gua の測定には液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた。LC は Agilent 社製 1100 シリーズ LC システムを使用し、2 mM 酢酸アンモニウム/メタノールを移動相に用い、ODS カラム (関東化学社製, Mightysil) にて分離した。MS/MS (Waters 社製, Quattro Ultima Pt) はエレクトロスプレーイオン化法を用い、ポジティブイオンモードで測定を行った。N7-GA-Gua 及び $^{15}\text{N}_5$ -N7-GA-Gua の検出に用いたプリカーサーイオン及びフラグメントイオンはそれぞれお 252 > 152 及び 257 > 157 とした。MRM クロマトグラムから得られたピーク面積から標準法によって各付加体の定量値を算出した。

(統計学的処理方法)

gpt MFs、 Spi^+ MFs 及び *gpt* 変異体の特異的変異頻度の統計学的処理は、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 Dunnett 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。

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

各臓器における N7-GA-Gua の測定結果を図 1 に示す。いずれの臓器においても投与

4 週目から N7-GA-Gua が検出され、ハーダー腺、肺及び肝臓における投与 4 週目の N7-GA-Gua 量 ($\times 10^{-6}$) は 39.9 ± 7.7 , 55.6 ± 6.6 及び 39.0 ± 3.5 で、ハーダー腺及び肝臓に比して肺では高値を示した。また、投与 8 週目はいずれの臓器においても 4 週目に比して変化は認められず、16 週目のハーダー腺、肺及び肝臓の N7-GA-Gua 量 ($\times 10^{-6}$) は 34.5 ± 4.0 , 42.3 ± 7.9 及び 30.7 ± 4.8 といずれの臓器においても 4 週目に比して減少傾向が認められた。一方、対照群ではいずれの臓器においても N7-GA-Gua は検出されなかった。

ハーダー腺における *gpt* assay の結果を図 2-A に示す。4, 8 及び 16 週目における対照群の MFs ($\times 10^{-5}$) は 0.59 ± 0.38 , 0.46 ± 0.21 及び 0.43 ± 0.28 だったのに対し、AA 投与群では 0.66 ± 0.27 , 0.59 ± 0.12 及び 1.37 ± 0.62 となり、16 週目の *gpt* MFs は対照群に比して有意 ($p < 0.05$) に上昇した。変異スペクトラム解析の結果、MFs が上昇した AA 投与群の 16 週目では G:C-T:A transversion (0.30 ± 0.15) 及び一塩基欠失 (0.26 ± 0.11) の頻度 ($\times 10^{-5}$) が対照群に比して上昇傾向を示した (図 3-A)。

肺における *gpt* assay の結果を図 2-B に示す。4, 8 及び 16 週目における対照群の MFs ($\times 10^{-5}$) は 0.72 ± 0.42 , 0.54 ± 0.34 及び 0.52 ± 0.38 だったのに対し、AA 投与群では 0.55 ± 0.20 , 0.58 ± 0.20 及び 1.90 ± 0.87 となり、16 週目の *gpt* MFs は対照群に比して有意 ($p < 0.01$) に上昇した。変異スペクトラム解析の結果、MFs が上昇した AA 投与群の 16 週目では G:C-T:A transversion (0.49 ± 0.26 , $p < 0.01$) 及び一塩基欠失 (0.33 ± 0.25 , $p < 0.01$) の

頻度 ($\times 10^{-5}$) が対照群 (0.19 ± 0.13 , 0.03 ± 0.06) に比して有意な高値を示した (図 3-B)。

肝臓における *gpt* assay の結果を図 2-C に示す。4, 8 及び 16 週目における対照群の MFs ($\times 10^{-5}$) は 0.55 ± 0.34 , 0.60 ± 0.29 及び 0.54 ± 0.28 だったのに対し、AA 投与群では 0.81 ± 0.27 , 0.58 ± 0.36 及び 0.68 ± 0.46 となり、いずれの投与期間においても AA 投与による変化は見られなかった。また、変異スペクトラム解析においても、AA 投与による変化は認められなかった (図 3-C)。

各臓器における Spi⁻ assay の結果を図 4 に示す。いずれの臓器、いずれの投与期間においても AA 投与による Spi⁻ MFs の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

肺における N7-GA-Gua の測定結果を図 5 に示す。両遺伝子型ともに N7-GA-Gua は 50 ppm 投与群から検出され、用量依存的に増加したが、遺伝子型間の差は認められなかった。

gpt delta マウスの肺における *gpt* assay の結果を図 6-A に示す。MFs ($\times 10^{-5}$) は $150 (1.52 \pm 0.58, p < 0.01)$ 及び $300/200$ ppm 群 ($1.44 \pm 0.26, p < 0.05$) において対照群 (0.55 ± 0.34) に比して有意に上昇した。変異スペクトラム解析の結果、MF が上昇した 150 及び 300/200 ppm 群では、G:C-T:A transversion (0.26 ± 0.22 及び 0.33 ± 0.28) 及び一塩基欠失 (0.26 ± 0.26 及び 0.21 ± 0.12) の頻度 ($\times 10^{-5}$) が対照群 (0.13 ± 0.14 , 0.05 ± 0.11) に比し

て上昇傾向を示した(図 7-A). Spi⁻ assay の結果を図 8-A に示す. MFs ($\times 10^{-5}$) は 300/200 ppm 群 (0.63 ± 0.24) において対照群 (0.27 ± 0.09) に比して上昇傾向が認められたものの, 有意な差は認められなかった.

Pol⁻ KI *gpt delta* マウスの肺における *gpt* assay の結果を図 6-B に示す. MFs ($\times 10^{-5}$) は 150 ($1.52 \pm 0.76, p<0.01$) 及び 300/200 ($1.61 \pm 0.43, p<0.05$) ppm 群において対照群 (0.45 ± 0.16) に比して有意に上昇した. 変異スペクトラム解析の結果, MFs が上昇した 150 ppm 群では, G:C-T:A (0.38 ± 0.27), G:C-C:G (0.19 ± 0.11) 及び A:T-T:A transversion (0.35 ± 0.20) が, 300/200 ppm 群では, G:C-T:A transversion (0.38 ± 0.10), A:T-G:C transition (0.15 ± 0.11) 及び一塩基欠失 (0.42 ± 0.10) の頻度 ($\times 10^{-5}$) が対照群 (G:C-T:A transversion; 0.02 ± 0.04 , G:C-C:G transversion; 0.02 ± 0.04 , A:T-T:A transversion; 0.04 ± 0.05 , A:T-G:C transition; 0.02 ± 0.04 , 一塩基欠失; 0.08 ± 0.08) に比して有意に上昇した(図 7-B). Spi⁻ assay の結果を図 8-B に示す. MFs ($\times 10^{-5}$) は 300/200 ppm 群 (0.63 ± 0.42) において対照群 (0.26 ± 0.23) に比して上昇傾向が認められたものの, 有意な差は認められなかった.

gpt delta マウス及び Pol⁻ KI *gpt delta* マウスを比較した結果, *gpt* MFs 及び Spi⁻ MFs に遺伝子型間の差は認められなかった. また, Pol⁻ KI *gpt delta* マウスでは種々の変異が 150 及び 300/200 ppm 群で有意に上昇したものの, いずれも *gpt delta* マウスとの間に統計学的有意差は認められなかつた.

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

gpt assay の結果, 非発がん臓器である肝臓において投与期間の延長による MF の変化は認められなかったのに対し, AA の発がん標的臓器であるハーダー腺及び肺では投与 16 週目に MF が有意に上昇したことから, AA のマウスハーダー腺及び肺における発がん性には, その突然変異誘発性が寄与していると考えられた.

変異スペクトラム解析の結果, *gpt* MFs の上昇が認められた投与 16 週目のハーダー腺及び肺では, G:C-T:A transversion 及び一塩基欠失の頻度が上昇していた. これらの変異は特異的 DNA 付加体の形成とそれに伴う脱塩基部位 (AP site) の形成によって生じる変異と考えられ, 高用量の AA を投与した際に肺で生じた変異パターンと一致した.

一方, N7-GA-Gua は AA の投与開始 4 週目から検出されたものの, 投与期間に伴う DNA 損傷の増加は認められなかった. これは, DNA 付加体が形成する一方で, 損傷塩基の修復又は脱塩基が生じていることを示す結果と考えられた. また, その形成量は肺でわずかに高値を示したものの, 発がん標的臓器と非発がん標的臓器に大きな差は認められなかったことは, AA の突然変異誘発性に特異的付加体の形成だけでなく, その他の因子が関与することを示唆するものと考えられた. また, NTP で実施されたマウス発がん性試験において AA の代謝物 GA は肝発がん性を有することが報告されているこ

とから、発がん標的臓器と同程度の DNA 付加体形成が確認されたマウス肝臓は、AA の潜在的な発がん標的臓器であることが示唆された。

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

肺における *gpt* assay 及び Spi⁻ assay の結果、*gpt* delta マウスと Polz Kl *gpt* delta マウスの間に差は認められなかった。また、N7-GA-Gua 量は AA の投与濃度依存的に増加したものの、その形成量に遺伝子型間の差は認められなかった。*In vitro*において酵母 Pol は AP site に挿入された誤った塩基から伸長反応を行うことが報告されているが⁷⁾、変異スペクトラム解析の結果、その働きを示す特徴的なタンデム変異の生成は認められなかった。以上より、Pol は AA の突然変異誘発には寄与していないことが明らかになった。

E. 結論

発がん用量の AA の突然変異誘発性の有無を検討した結果、*in vivo* 変異原性試験の投与期間を延長することにより、発がん用量の AA が発がん標的臓器であるマウスハーダー腺及び肺において DNA 付加体形成と突然変異を引き起こすことが明らかとなり、AA の発がん性にその突然変異誘発性が寄与することが示された。

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) Ghanayem, B.I., McDaniel, L.P., Churchwell, M.I., Twaddle, N.C., Snyder, R., Fennell, T.R. and Doerge, D. R. Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol. Sci.*, 88, 311-318, 2005.
- 2) Kotova, N., Jurén, T., Myöhänen, K., Cornelius, M., Abramsson-Zetterberg, L., Backman, J., Menzel, U., Rydberg, P., Kronberg, L., Vähäkangas, K., Segerbäck, D.³²P-HPLC analysis of N1-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)deoxyadenosine: a DNA adduct of the acrylamide-derived epoxide glycidamide. *Toxicol. Lett.*, 207, 18-24, 2011.
- 3) Koyama, N., Yasui, M., Kimura, A., Takami, S., Suzuki, T., Masumura, K., Nohmi, T., Masuda, S., Kinoshita, N., Matsuda, T., Imai, T., Honma, M. Acrylamide genotoxicity in young versus adult *gpt* delta male rats. *Mutagenesis*, 26, 545-549, 2011.
- 4) Mei, N., McDaniel, L. P., Dobrovolsky, V. N., Guo, X., Shaddock, J.G., Mittelstaedt, R.A., Azuma, M., Shelton, S.D., McGarrity, L.J., Doerge, D.R., Heflich, R.H. The genotoxicity of acrylamide and glycidamide in big blue rats. *Toxicol. Sci.*, 115, 412-421, 2010.
- 5) 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. Rep. Ser.
- 6) 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.
- 7) Haracska, L., Unk, I., Johnson, R.E., Johansson, E., Burgers, P.M., Prakash, S., Prakash, L. Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev.* 15, 945-954.

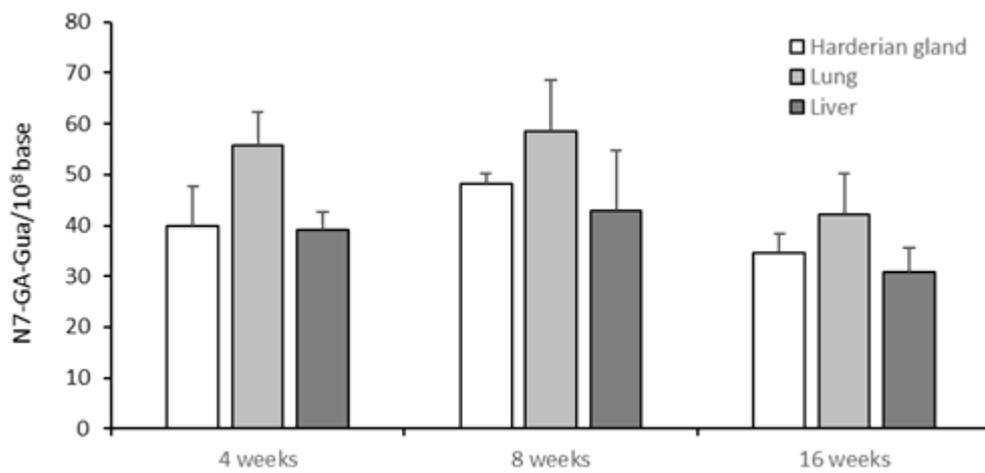


Figure 1 N7-GA-Gua levels in the harderian gland (A), lung (B) and liver (C) of *gpt* delta mice treated with acrylamide for 4, 8 and 16 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group).

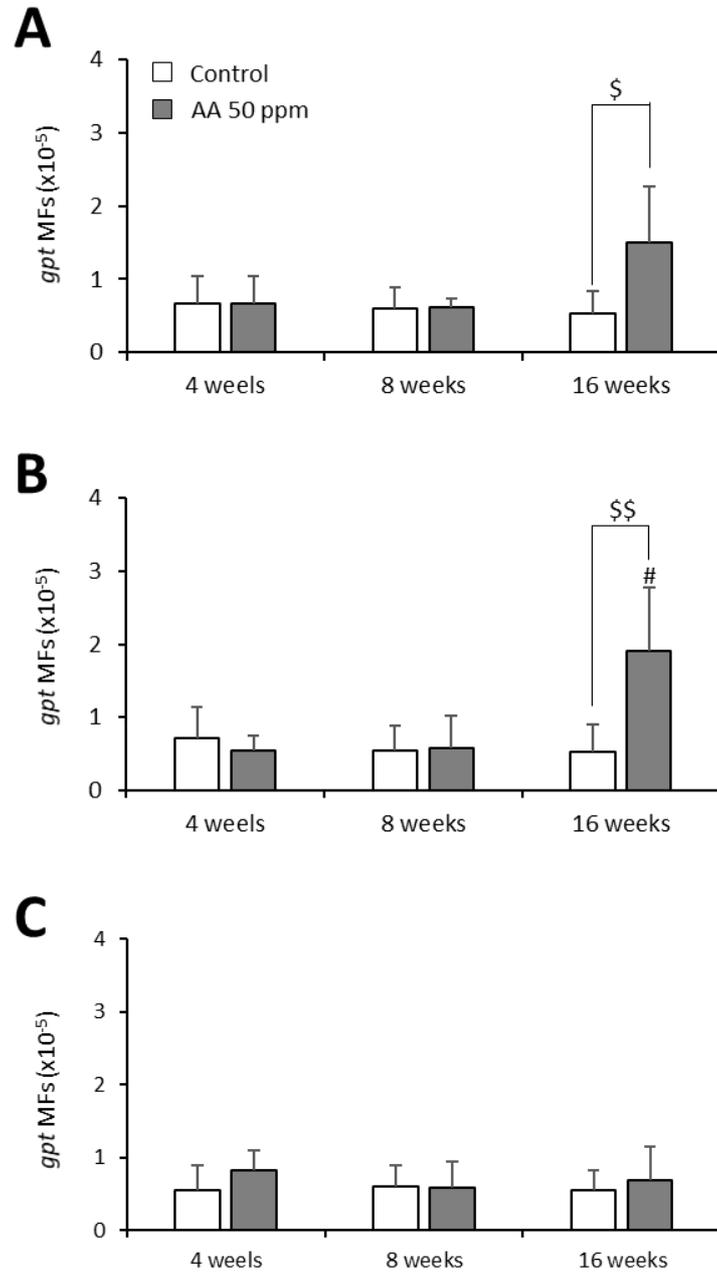


Figure 2 *gpt* mutant frequencies in the harderian gland (A), lung (B) and liver (C) of *gpt* delta mice treated with acrylamide for 4, 8 and 16 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group). # p < 0.05 vs 4 weeks group of AA treated mice using Dunnett ' s test. \$, \$\$, p < 0.05, 0.01 vs control group using Tukey ' s test.

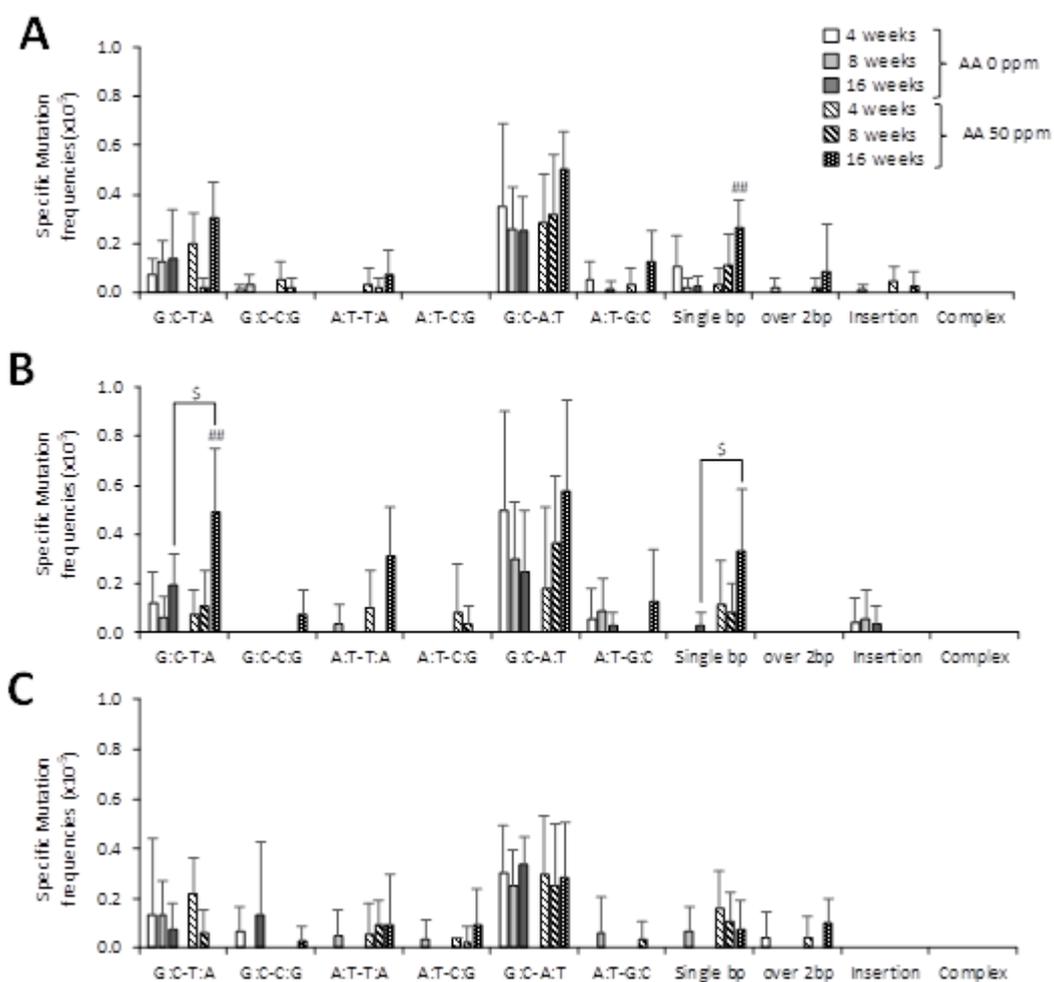


Figure 3 Mutation spectra of *gpt* mutant obtained from harderian gland (A), lung (B) and liver (C) of *gpt* delta mice treated with acrylamide for 4, 8 and 16 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group). ### p < 0.01 vs 4 weeks group of AA treated mice using Dunnett's test. S, p < 0.05 vs control group using Tukey's test.

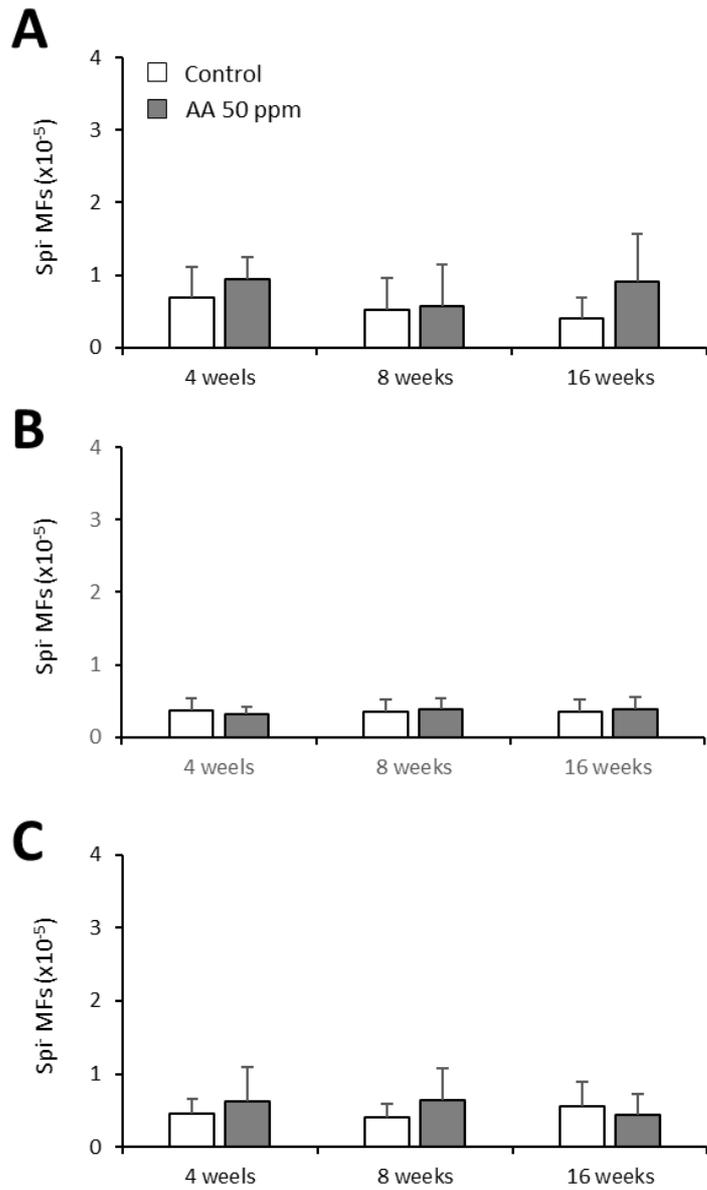


Figure 4 Spi⁻ mutant frequencies in the harderian gland (A), lung (B) and liver (C) of *gpt* delta mice treated with acrylamide for 4, 8 and 16 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group).

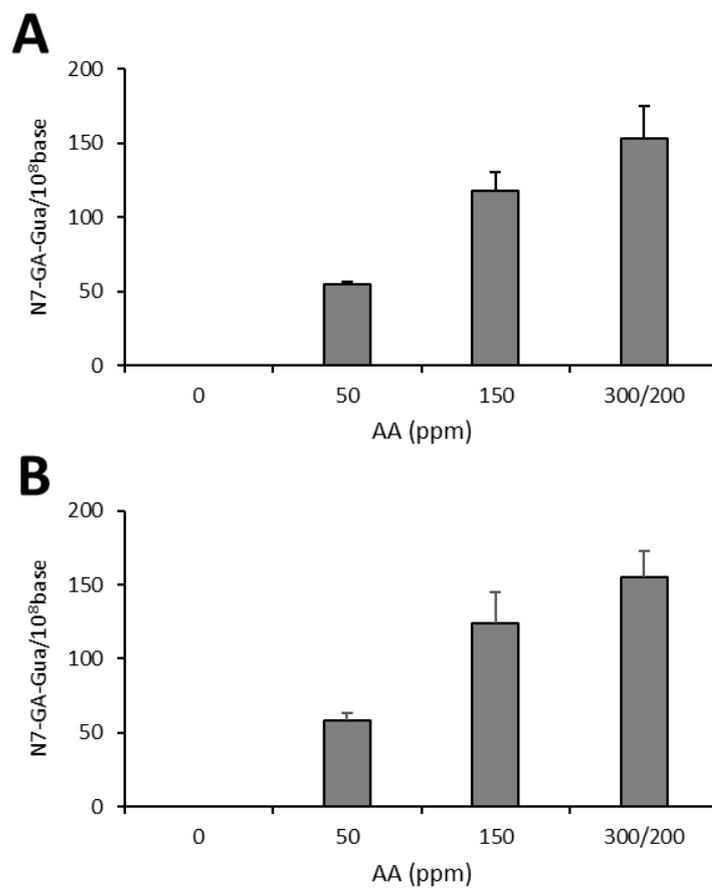


Figure 5 N7-GA-Gua levels in the lung of gpt delta mice (A) and Polz KI gpt delta mice (B) treated with acrylamide for 4 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group).

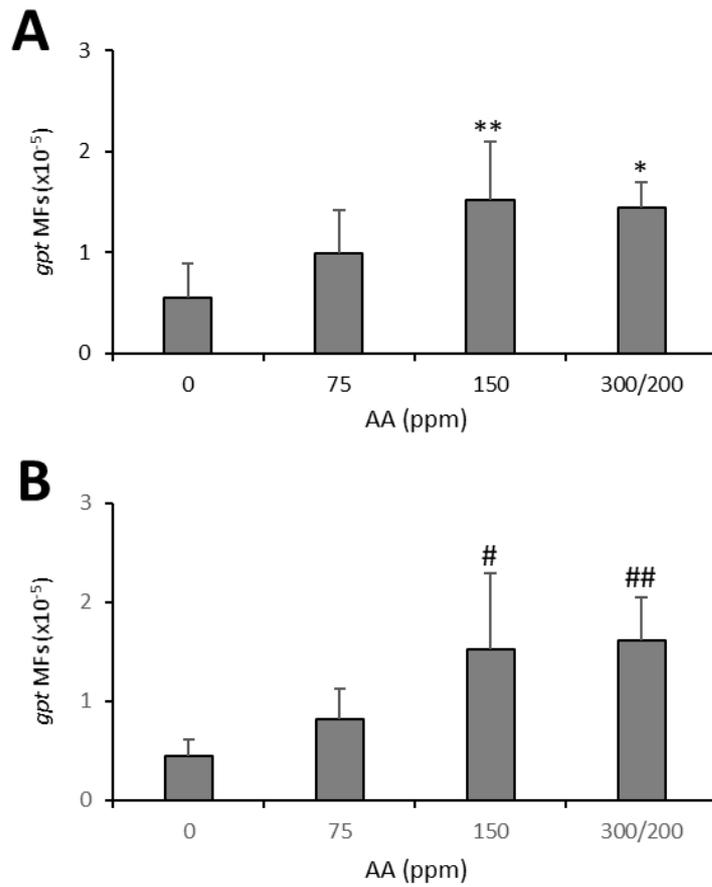


Figure 6 *gpt* mutant frequencies in the lung of *gpt* delta mice (A) and Polz KI *gpt* delta mice (B) treated with acrylamide for 4 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group). *, **p < 0.05, 0.01 vs control group of *gpt* delta mice using Dunnett 's test. #, ##, p < 0.05, 0.01 vs control group of Polz KI *gpt* delta mice using Dunnett 's test.

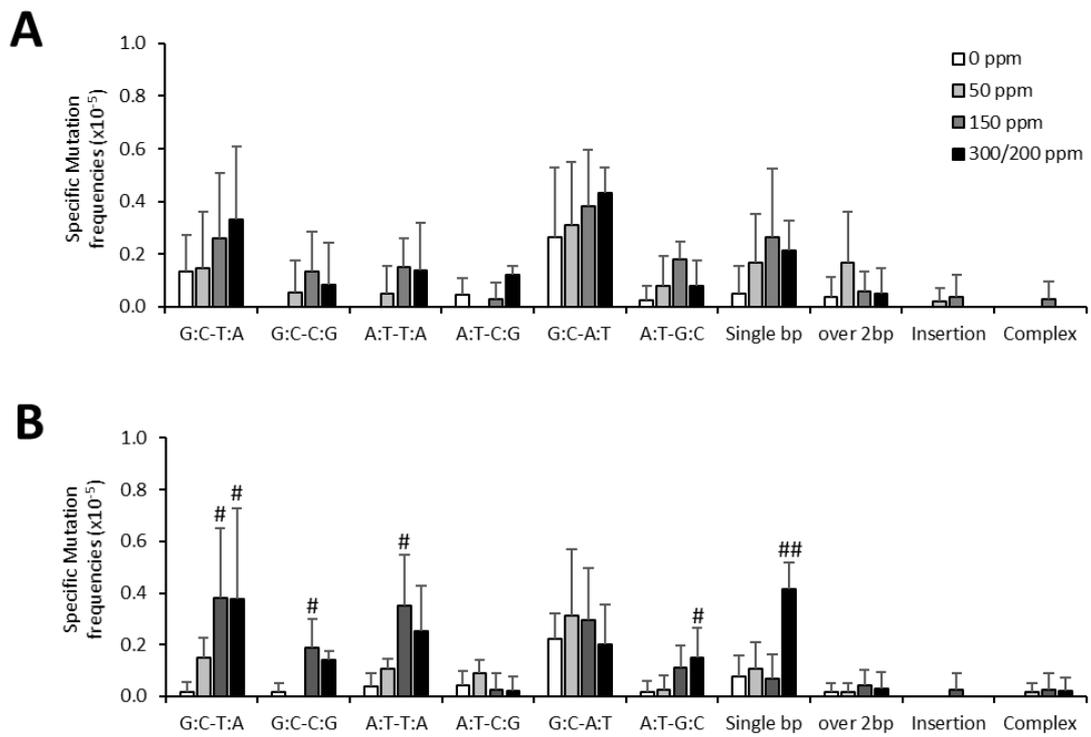


Figure 7 Mutation spectra of *gpt* mutant obtained from *gpt* delta mice (A) and Polz KI *gpt* delta mice (B) treated with acrylamide for 4 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group). #, ##, p < 0.05, 0.01 vs control group of Polz KI *gpt* delta mice using Dunnett ' s test.

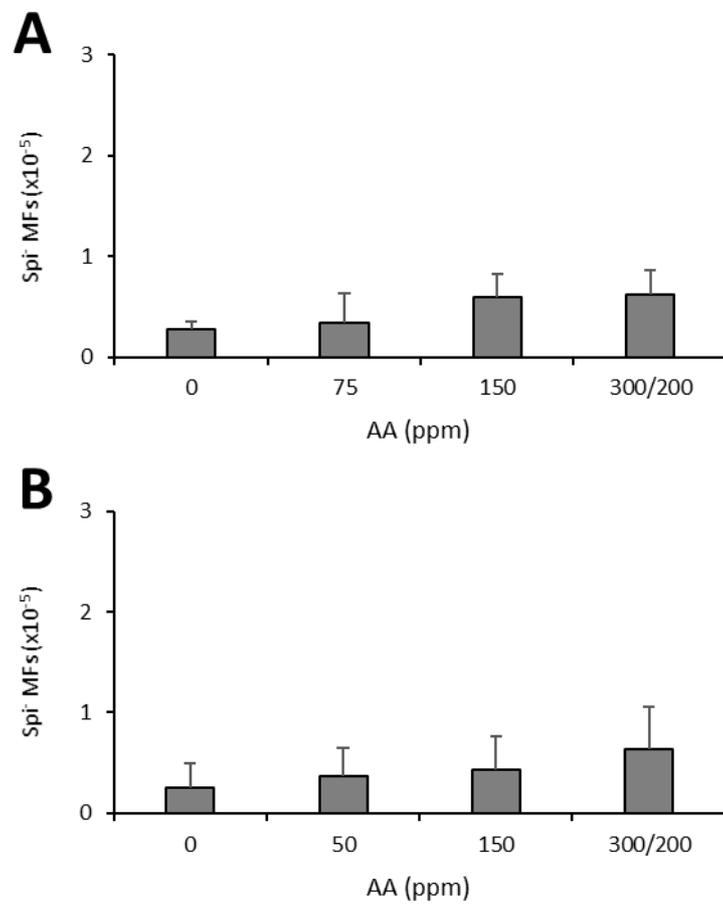


Figure 8 Spi⁻ mutant frequencies in the lung of *gpt* delta mice (A) and Polz KI *gpt* delta mice (B) treated with acrylamide for 4 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group).