

令和元年度 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 変異遺伝部第三室 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

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を試みる。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、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、雄 *gpt delta* マウスを用いたトランスジェニック遺伝子突然変異試験を行った。AA を 300, 100, 30 ppm の用量で 28 日間飲水投与した。肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は AA 投与群で陰性対照群の約 3 倍に増加したが、3 用量群ではほぼ同程度の変異体頻度を示し、用量依存性は明確でなかった。肝臓において AA の DNA 付加体量が投与量に依存して増加するのに対して、遺伝子突然変異の頻度は低用量群（30 ppm）で有意に増加するがそれ以上の用量では頭打ちの用量反応性を示すことから、遺伝毒性発がん AOP において、分子的初期イベント（DNA 付加体形成）と下流のキーイベント（遺伝子突然変異誘発）が定性的に相関するが、用量反応性が異なる特徴を示す場合があることが示唆された。遺伝毒性と発がん AOP の研究において発がん試験データが豊富なラットを用いた試験が重要だが、従来の *gpt delta* ラットはレポーター遺伝子の回収効率が低く実験コストが高い欠点があった。この問題を克服するため、トランスジーン λ EG10 の導入コピー数が多く、かつホモに持った新規 *gpt delta* ラットの評価を行った。Wistar Hannover 系統の新規 *gpt delta* ラットは従来の λ EG10 ヘテロ F344 系統と比較して約 5 倍高い回収効率が得られたことから、ラットを用いた TGR 試験の効率化が期待できる。

キーワード: 遺伝子突然変異, アクリルアミド, *gpt delta* マウス, *gpt delta* ラット

A. 研究目的

本研究では、香料等化学物質の安全性を階層的に評価する評価系を構築し、食品香料等の効率的か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。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) 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た。昨年度は体組織における DNA 付加体形成量を測定した。今年度は 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。また、AOP を考慮した TGR 試験の実施においては、発がん試験データが豊富なラットを用いた試験も重要だが、従来の *gpt delta* ラットはマウスと比べてゲノム中のトランスジーンのコピー数が少ない上、トランスジーンをヘテロに持つため、実験コストが高い欠点があった。この問題を克服するため、導入コピー数を増やしてレポーター遺伝子の回収効率を高めた新規 *gpt delta* ラットの作出と評価を行う。

B. 研究方法

1. AA 飲水投与実験

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、雄 9 週齢の *gpt delta* マウス (C57BL/6J) に 28 日間飲水投与した。(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°C で凍結保存した。さらに投与終了後 100 日目に各群 5~6 匹を安楽死させて同様に組織を採取し凍結保存した。

2. 遺伝子突然変異頻度の測定

AA 投与個体の組織からゲノム DNA を調製して *gpt* 遺伝子突然変異体頻度を測定した。肝臓、肺、精巣から RecoverEase DNA Isolation Kit (Agilent) を用いて長鎖 DNA を調製した。Transpack packaging extract (Agilent) を用い

て λ *in vitro* パッケージングによりゲノム DNA 中のトランスジーン λ EG10 を λ フェージとして回収した。回収した λ フェージを Cre 組換え酵素を発現する大腸菌 YG6020 株に感染させると、 λ EG10 DNA 中のレポーター遺伝子を含む領域が Cre-lox 組換え反応によって切り出され、マルチコピーのプラスミドとして保持される。プラスミド上には変異検出のレポーター遺伝子である大腸菌 *gpt* 遺伝子とクロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子が存在する。*In vitro* パッケージングで回収したフェージを YG6020 に感染させ、6-チオグアニン (6-TG) と Cm を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で 4 日間培養し、6-TG 耐性コロニー数をカウントした。また、Cm を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で 3 日間培養し、総形質転換コロニー数をカウントした。6-TG 耐性コロニー数を総形質転換コロニー数で除して突然変異体頻度を算出した。AA 飲水投与実験の肝臓 (最終投与 3 日後及び 100 日後) を用いて *gpt* 突然変異体頻度の用量反応データを取得した。

3. 新規 *gpt delta* ラットのレポーター遺伝子の回収効率の評価

λ EG10 フェージの液体 lysate からフェージ DNA を調製した (QIAGEN)。 λ EG10 DNA を Wistar Hannover ラット受精卵にマイクロインジェクションし、産仔について PCR で λ EG10 のゲノムへの導入を検索し、導入が確認された個体については交配して λ EG10 をホモに持った系統を作出した (SLC 社が実施)。新規 *gpt delta* ラット候補のラインについて、導入遺伝子の回収効率 (パッケージング効率) の測定を実施した。肝臓組織から 2. と同様に長鎖 DNA を調製し、 λ *in vitro* パッケージングを行った。大腸菌 *E.coli*C 株に感染させ、 λ 寒天培地にまいて 37°C で一晩培養し、フェージプラーク数をカウントして 1 回のパッケージングあたりのプラーク数 (p.f.u.) を算出した。また、回収したフェージを YG6020 に感染させ、Cm を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で 3 日間培養し、総形質

転換コロニー数をカウントした。2つのラインについてパッケージング効率を測定し、従来の *gpt delta* ラット (F344, λ EG10 ヘテロ) と比較した。

(倫理面への配慮)

マウスの実験は国立医薬品食品衛生研究所の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。ラットの実験は実施機関 (SLC) の規程を遵守し、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* マウスに AA を 28 日間飲水投与した。300 ppm 群において投与 1 週目以降に体重増加抑制がみられ、投与 2~4 週目は 0 ppm 群と比較して有意な体重増加抑制が認められた。最終投与の 3 日後および 100 日後に組織を採取し凍結保存した。最終投与 3 日後の体重、肝臓および肺の絶対重量は全群で有意な変化がなかったが、300 ppm 群において精巣重量が 0 ppm 群と比較して有意に減少した。最終投与 100 日後では全群に差は認められなかった。

2. 遺伝子突然変異頻度の測定

AA28 日間投与後 3 日目の肝臓において、0, 30, 100, 300 ppm 群の *gpt* 突然変異体頻度はそれぞれ $4.2 \pm 2.3 \times 10^{-6}$ 、 $12.4 \pm 6.8 \times 10^{-6}$ 、 $14.0 \pm 4.9 \times 10^{-6}$ 、 $14.2 \pm 5.2 \times 10^{-6}$ であった (各群 5 匹の平均値 \pm SD)。3 投与群において陰性対照群と比較して変異頻度の有意な増加がみられた

($p < 0.05$, Dunnett's test)。最終投与 100 日後の肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は 0, 30, 100, 300 ppm 群でそれぞれ $9.0 \pm 4.4 \times 10^{-6}$ 、 $23.4 \pm 6.9 \times 10^{-6}$ 、 $18.5 \pm 9.1 \times 10^{-6}$ 、 $19.3 \pm 2.7 \times 10^{-6}$ であった (各群 5~6 匹の平均値 \pm SD)。3 投与群において陰性対照群と比較して変異頻度の有意な増加がみられた ($p < 0.05$, Dunnett's test)。また、全群において、投与後 3 日目と比較して突

然変異頻度は高値を示した。AA 飲水量から換算した AA 投与量に対して *gpt* 突然変異体頻度をプロットしたグラフを図 1 に示した。最終投与 3 日後および 100 日後のいずれにおいても、変異体頻度は 30 ppm 群で有意に増加し、100, 300 ppm 群では 30 ppm 群とほぼ同様の値を示し、プラトー様の用量反応曲線を示した。

3. 新規 *gpt delta* ラットのレポーター遺伝子の回収効率の評価

新規 *gpt delta* ラット候補ラインのレポーター遺伝子回収効率を測定した。 λ EG10 遺伝子のゲノム中への導入が PCR で確認された個体から、交配によって導入遺伝子をホモに持つ系統を作出した。候補 2 系統 (ライン 1、ライン 2) について、それぞれ 3 個体を用いて肝臓 DNA を調製し、各 DNA 10 μ L を使用して λ *in vitro* パッケージングを行った。*E.coli*C および YG6020 を用いてパッケージング効率 (1 回のパッケージングで回収されたファージプラーク数または形質転換コロニー数) を測定した。各個体サンプルについて 3 回測定を行った。結果を図 2 に示した。*E.coli*C を用いたパッケージング効率は、新規ライン 1 で $3.9 \pm 0.8 \times 10^5$ 、ライン 2 で $8.0 \pm 0.2 \times 10^5$ 、従来の F344 ヘテロ系統で $1.0 \pm 0.7 \times 10^5$ であった (各群 3 匹の平均値 \pm SD)。従来の *gpt delta* ラットと比較して、新規ライン 1 では約 3 倍、ライン 2 では約 5 倍の高い回収効率を得られた。また、YG6020 を用いたパッケージング効率は、ライン 1 で $3.9 \pm 1.4 \times 10^5$ 、ライン 2 で $7.6 \pm 0.9 \times 10^5$ であった (各群 3 匹の平均値 \pm SD)。ライン 1 と比較してライン 2 の方が 2 倍程度高い効率を示した。

D. 考察

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) によってグリシドアミドに代謝された後、グリシドアミド DNA 付加体 (N7-dG-GA, N3-dA-GA, N1-dA-GA 等) を形成する。グリシドアミドのげっ歯類発がん試

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おり、AA の発がん AOP として、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。 *gpt delta* マウスを用いた AA の飲水投与実験を実施した。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 日後に組織採取した。肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は AA 投与群で陰性対照群の約 3 倍に増加したが、3 用量群でほぼ同程度の変異体頻度を示し、用量依存性は明確でなかった。一方、AA 投与量依存的に DNA 付加体 (N7-dG-GA) 量は直線的に増加することが昨年示されている。DNA 付加体と遺伝子突然変異頻度の用量相関性が異なる原因として、肝臓は細胞のターンオーバーが遅い臓器であることから、投与後 3 日目の時点では DNA 付加体が DNA 修復および複製を経て突然変異として固定される時間が十分でなかった可能性が考えられた。そこで、28 日間投与の 100 日後に採取した肝臓を用いて *gpt* 突然変異体頻度の測定を行った結果、突然変異体頻度は AA 投与群で陰性対照群の 2~3 倍に増加したものの用量依存性は明確でなく、投与後 3 日目と同様の結果が得られた。無処理群と投与群の最終投与 100 日後の変異体頻度はそれぞれ 3 日後と比較して高い値を示したことから、肝臓で突然変異が固定されるための発現時間は十分と考えられた。以上の結果から、肝臓において AA の付加体量が投与量に依存して増加するのに対して、遺伝子突然変異の頻度は低用量群 (30 ppm) で有意に増加するがそれ以上の用量では頭打ちの用量反応性を示すことが示唆された。遺伝毒性発がん AOP において、分子的初期イベント (DNA 付加体形成) と下流のキーイベント (遺伝子突然変異誘発) が定性的に相関する一方で、用量反応性が異なる特徴を示す場合があることが示唆された。AA の発がんメカニズムにおいて N7-dG-GA 付加体以外の要素が関与している可能性が考えられた。今後は、他の臓器に

についても用量反応データを取得し、BMD 法等を用いて遺伝毒性の定量的評価における異なるエンドポイントの比較を行う。

遺伝毒性と発がん AOP の研究においては発がん試験データが豊富なラットを用いた TGR 試験が重要だが、従来の *gpt delta* ラットはゲノム中のトランスジーンのコピー数が少なく、またトランスジーンをヘテロに持つため、レポーター遺伝子の回収効率が低く実験コストが高い欠点があった。この問題を克服するため、導入コピー数が多く、かつトランスジーンをホモに持った新規 *gpt delta* ラットの作出と評価を行った。Wistar Hannover 系統の λ EG10 ホモ化 *gpt delta* ラット 2 ラインを候補としてパッケージング効率を測定した結果、従来の F344 ヘテロ系統と比較して約 5 倍高い回収効率を得た。この結果は、ラットを用いた TGR 試験の効率化をもたらすものと期待される。より回収効率が高いライン 2 を選択し、今後は変異原物質 (ENU およびベンツピレン) 投与実験を実施して、突然変異頻度を測定し、変異原物質に対する感受性を確認する。

E. 結論

gpt delta マウスを用いた AA の 28 日間飲水投与実験を実施した。肝臓の *gpt* 突然変異体頻度は投与群で有意に増加したが、用量依存性が明らかでないという特徴を示した。ラットを用いた TGR 試験の効率化のため、従来の系統と比べてレポーター遺伝子回収効率が約 5 倍高い新規 *gpt delta* ラットの評価を行った。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoki Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Masumura K, Nohmi T. Mutant frequency is not increased in mice orally

- exposed to sodium dichromate. Food Safety. 2019;7:2–10.
2. Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in F344 *gpt* delta transgenic rats. *Mutagenesis*. 2019;34:279-287.
 3. Lynch AM, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Marchetti F, Masumura K, Pacchierotti F, Schuler M, Tweats D. Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res*. 2019;847:403025.
 4. Pacchierotti F, Masumura K, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Lynch AM, Schuler M, Tweats D, Marchetti F. Chemically induced aneuploidy in germ cells. Part II of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res*. 2019 Nov;848:403023.
 5. T Tweats D, Eastmond DA, Lynch AM, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Marchetti F, Masumura K, Pacchierotti F, Schuler M. Role of aneuploidy in the carcinogenic process: Part 3 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res*. 2019;847:403032.
 6. Hori H, Shimoyoshi S, Tanaka S, Momonami A, Masumura K, Yamada M, Fujii W, Kitagawa Y, Hayashi M. Multiple-endpoint genotoxicity assay for colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Mutat Res*. 2020;849:503130.
 7. Aoki Y, Taniguchi Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Ohno M, Masumura K, Sasaki S, Tsuzuki T, Yamamoto M, Nohmi T. Oxidative-stress-driven in vivo mutagenesis induced by oral administration of potassium bromate in the small intestines of *gpt* delta mice. *Mutat Res*. 2020;850-851:503136.
2. 学会発表
1. Masumura K, Ando T, Ishii Y, Honma M: Dose response of DNA adduct formation and gene mutation induced by acrylamide in *gpt* delta mice. 50th annual meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) (2019.09)
 2. Masumura K, Ando T, Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A, Nohmi T, Honma M: Analyses of ENU-induced germ cell mutations in male mice and inherited germline mutations in the offspring. The 47th annual meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS) (2019.05)
 3. Masumura K, Ando T, Ukai A, Fujiwara S, Suzuki T, Yokose S, Takagi H, Nohmi T, Honma M: New strain of *gpt* delta transgenic rat is homozygous for transgene and highly improved packaging efficiency. The Joint Meeting of the 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) (2019.11)
 4. 増村健一 : Detection of *de novo* germline mutations in the offspring of mutagen-exposed male mice by whole exome/genome

sequencing. 日本放射線影響学会第 62 回大会 (2019.11)

H. 知的所有権の取得状況
なし

Comparison of dose response of *gpt* MF in the liver (28+3d vs 28+100d)

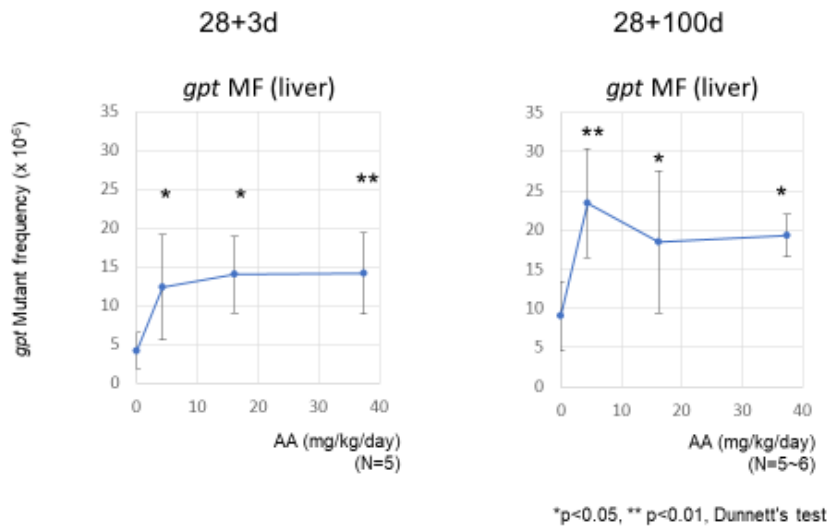


図1. AA 投与マウス肝臓における *gpt* 突然変異体頻度

Packaging efficiencies of new *gpt* delta rat (homo) candidates (E. coli C and YG6020)

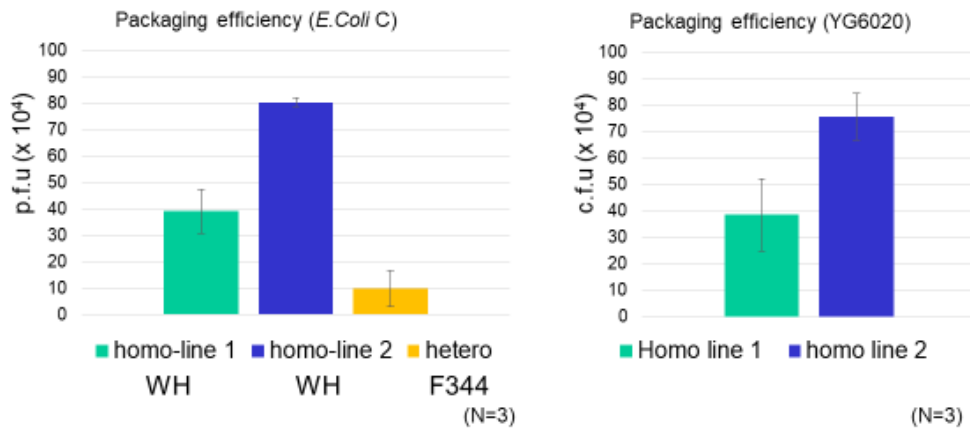


図2. 新規 *gpt* delta ラットのレポーター遺伝子の回収効率