

令和2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

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 *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 (TGR 試験) を行った。AA を 28 日間飲水投与したマウス肝臓において DNA 付加体量が用量依存的に直線的に増加したのに対して、遺伝子突然変異頻度は低用量群 (30 ppm) で有意に増加するが頭打ちの用量反応性を示した。ベンチマークドーズの信頼区間 (BMDL-BMDU) は DNA 付加体量、変異頻度、発がんにおいてほぼ重なっていた。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が、用量反応性が異なる特徴を示したことから、AA 発がんのメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。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系は重要であり、従来の *gpt delta* ラットより λ EG10 ベクターの回収効率が大幅に高い新規 *gpt delta* ラットの作出と評価を行った。EG10 をホモに持つ新規 *gpt delta* ラット (Wistar Hannover 系統) は、従来の F344 *gpt delta* ラット (EG10 ヘテロ) と比較して 5 倍高い回収効率を示した。BaP および ENU 投与により、肝臓と骨髄の *gpt* 点突然変異頻度は有意に増加した。 λ EG10 はラットゲノム 1 番染色体に多コピー挿入されていた。新規 *gpt delta* ラットは *in vivo* 遺伝子突然変異試験に有用であることが示唆された。

キーワード: 遺伝子突然変異, アクリルアミド, BMD, *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。今年度は DNA 付加体量および遺伝子突然変異頻度の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* ラットの評価を行う。今年度は新規ラットの変異頻度測定を行う。

B. 研究方法

1. AA 投与 *gpt delta* マウスの遺伝毒性と用量相関の解析

雄 9 週齢の *gpt delta* マウス (C57BL/6J) に AA (300, 100, 30 ppm) を 28 日間飲水投与した。(AA 100 ppm は 1.4 mM に相当。) 投与終了後 3 日目に組織を採取し、 -80°C で凍結保存した。各群 5 匹を DNA 付加体測定および遺伝子突然変異試験に使用した。肝臓、肺、精巣からゲノム DNA を調製し、LC-MSMS による DNA 付加体 (N7-GA-Gua) 量および *gpt* 遺伝子突然変異体頻度の測定を行い用量反応データを取得した。得られた用量反応データから PROASTweb (<https://proastweb.rivm.nl/>) を用いてベンチマークドーズを算出した。用量反応曲線において有意な影響があるとされる反応レベル (BMR: 今回は 10%、50% の 2 通りで計算) をもたらす用量をベンチマークドーズ (BMD) という。BMD は 95% 信頼区間 (BMDL-BMDU) の範囲として示した。計算にあたり、model averaging は有効とした。また DNA 付加体量の陰性対照値がゼロの場合は対数変換できず計算ができないため、

LC-MSMS の検出限界値 $170/10^8$ base を陰性対照値として用いた。AA の発がん性のベンチマークとして、食品安全委員会評価書 (2016) で採用している 2 年間マウス発がん試験 (NTP2012) で最も感受性が高かった雄 *harderian gland tumor* のデータを用いた。

2. 新規 *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性試験の評価

現行の *gpt delta* マウス・ラットで用いられている λ EG10 シャトルベクターをゲノムに導入した新規 *gpt delta* ラット (Wistar Hannover 系統) を作出した (SLC 社が実施)。新系統が λ EG10 をホモに持つことを PCR で確認した。従来の *gpt delta* ラット (ヘテロ系統) の 5 倍高いパッケージング効率を示した新系統 (homo) を用いて変異原物質投与実験を行った。雌雄各 5 匹の *gpt delta rat (homo)* にベンツピレン

(BaP) (0, 62.5, 125 mg/kg) を 28 日間強制経口投与し、最終投与の 3 日後に組織を採取して凍結保存 (-70°C 以下) した。陽性対照として ENU (50mg/kg) を 5 日間連続で腹腔内投与し、最終投与から 26 日後に組織採取して凍結保存した。動物数が限られていたため、実験は ENU 投与群、BaP 投与群の雄、BaP 投与群の雌の 3 回に分けて実施された。肝臓と骨髄からゲノム DNA を調製し、*gpt* アッセイを行い点突然変異頻度を測定するとともに、得られた変異体のシーケンス解析を実施して変異スペクトルの解析を行った。また、次世代シーケンサーを用いてラットゲノム中の λ EG10 挿入部位を決定し、導入コピー数を推定した。

(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 投与 *gpt delta* マウスの遺伝毒性と用量 相関の解析

雄 *gpt delta* マウスに AA を 28 日間飲水投与した。最高用量 300 ppm 群において有意な体重増加抑制が認められた。AA 30, 100, 300 ppm 投与群の肝臓、肺、精巣における DNA 付加体形成量と *gpt* 突然変異体頻度を、AA 飲水量から換算した AA 投与量に対してプロットした結果を図 1 に示した。DNA 付加体量はいずれの組織においても用量依存的に直線的な増加を示した。肝臓の変異頻度は陰性対照群と比較して 2~3 倍有意に増加したが、100, 300 ppm 群では 30 ppm 群とほぼ同様の値を示し、頭打ちの用量反応曲線を示し、用量依存性は明らかでなかった。AA 投与群の肺における変異頻度は肝臓と同等であったが、陰性対照群の標準偏差が大きく統計学的に有意な増加は確認できなかった。精巣の変異頻度は 3 ppm 投与群で約 2 倍、300 ppm 群で約 3 倍の有意な増加が見られた。

得られた用量反応データを用いてベンチマークドーズを算出した結果を図 2 に示した。BMD 信頼区間 (BMDL-BMDU) は付加体量、変異頻度、発がん概ね重なっていた。肝臓と精巣の変異頻度については BMDL 値が極端に低く、PoD の妥当性に疑問がある。肺では用量依存的な変異頻度の増加が確認できず BMD は算出できなかった。

2. 新規 *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性試験 の評価

λ EG10 をホモに持つ新規 *gpt delta* ラットのレポーター遺伝子回収効率率は現行ラット (ヘテロ) と比較して約 5 倍高かった。新規 *gpt delta* rat (homo) に BaP を 28 日間経口投与した。陽性対照として ENU (50mg/kg) を 5 日間腹腔内投与した。肝臓と骨髄からゲノム DNA を調製し、*gpt* 点突然変異頻度を測定した。突然変異頻度の結果を図 3 に示した。BaP 投与群の肝臓と骨髄において、*gpt* 突然変異体頻度は用量依存的に有

意に増加した。また、ENU 投与群でも有意に増加した。BaP 投与群の肝臓では雌の変異頻度がやや高い傾向があったが、骨髄および ENU 投与群では雌雄差はみられなかった。肝臓由来の *gpt* 変異体のシーケンス解析を行い、変異スペクトル解析を実施した。無処理群では G:C to A:T, G:C to T:A および 100 bps 以下の欠失が主であった。BaP 投与群では G:C to T:A 変異の有意な増加がみられた。ENU 投与群では A:T 塩基対の塩基置換変異の有意な増加がみられた。

また、次世代シーケンサーを用いてラットゲノム中の λ EG10 挿入部位を決定し、導入コピー数を推定した。 λ EG10 はラット 1 番染色体の *B3gnt6* 遺伝子のイントロン部分にマルチコピーで導入されていた。挿入部位には短い欠失、挿入、逆位がみられた。挿入された λ EG10 のコピー数は 30~44/haploid と推定された。

D. 考察

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、DNA 付加体 (N7-dG-GA 等) を形成する。AA の発がん AOP は、分子的初期イベント (MIE) として DNA 付加体の形成、キーイベント (KE) として遺伝子突然変異の誘発、有害事象 (AO) として発がんを設定する。*gpt delta* マウスを用いた AA 飲水投与実験の結果、AA 投与群の肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は陰性対照群の約 3 倍に増加したが、3 用量群で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。AA の付加体量が投与量に依存して増加するのに対して、遺伝子突然変異頻度は有意に増加するが 30 ppm 以上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、MIE である DNA 付加体形成と下流の KE である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。一方で、発がん性標的組織において用量依存的な発がんがみられることから、AA 発がんのメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝

毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。他の要因としては、マイナーな付加体、非遺伝毒性 MoA、系統差の影響などが考えられる。BMD 信頼区間は DNA 付加体量、変異頻度、発がんについて概ね重なっていたが、変異頻度については BMDL 値が極端に低かった。これは動物実験の用量設定に対して想定される PoD がより低用量であること、および各用量群の標準偏差が大きいことを示唆している。この問題は BMR に大きな値を設定することでやや改善された。(例えば BMD10 より BMD50 の方が信頼区間が狭い。) 変異頻度の増加幅が小さく、用量依存性が明瞭でない場合、BMD 算出の妥当性には注意する必要がある。AA の発がん標的の一つは肺だが、今回、変異頻度の有意な用量反応データが得られず BMD が算出できなかった。今後は他の発がん標的における PoD との比較を検討予定である。

遺伝毒性と発がんの量的相関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* ラットはレポーター遺伝子の回収効率が低い欠点があった。そこで、レポーター遺伝子の導入コピー数が多く、かつレポーター遺伝子をホモに持つ新規 *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* ラットは従来の F344 *gpt delta* ラット (ヘテロ) 系統と比較して 5 倍高い回収効率を示した。この結果は TGR 試験の効率化をもたらすものと期待される。BaP および ENU を投与し、突然変異頻度を測定した結果、肝臓と骨髄の *gpt* 点突然変異頻度は有意に増加し、従来の *gpt delta* ラットと同等の感受性を示した。BaP に特徴的な G:C to T:A 変異および ENU に特徴的な A:T 塩基対の塩基置換変異の有意な増加がそれぞれ確認された。 λ EG10 トランスジーンはラットゲノムの 1 番染色体に 30~44 コピー挿入されており、新規 *gpt delta* ラット (homo) は *in vivo* 遺伝子突然変異試験に有用であることが示唆された。今後は、欠失変異を検出する Spi-アッセ

イの検討を行う予定である。

E. 結論

AA 投与 *gpt delta* マウスの肝臓における *gpt* 突然変異体頻度は投与群で有意に増加したが、DNA 付加体量および発がんとの用量相関性は低かった。AA 発がんメカニズムは特定の DNA 付加体による遺伝毒性 MoA のみでは十分説明できない可能性が示唆された。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低い新規 *gpt delta* ラット (homo) を作出し、*in vivo* 遺伝毒性試験に有用であることを示した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masumura K, Yatagai F, Ochiai M, Nakagama H, Nohmi T. Effects of the *scid* mutation on X-ray-induced deletions in the brain and spleen of *gpt delta* mice. *Genes Environ.* 2020;42:19.
2. Chen R, You X, Cao Y, Masumura K, Ando T, Hamada S, Horibata K, Wan J, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y. Benchmark dose analysis of multiple genotoxicity endpoints in *gpt delta* mice exposed to aristolochic acid I. *Mutagenesis.* 2020;geaa034.
3. Ishii Y, Takasu S, Grúz P, Masumura K, Ogawa K, Nohmi T, Umemura T. The role of DNA polymerase ζ in benzo[*a*]pyrene-induced mutagenesis in the mouse lung. *Mutagenesis.* 2021;geab007.
4. Hagio S, Tsuji N, Furukawa S, Takeuchi K, Hayashi S, Kuroda Y, Honma M, Masumura K. Effect of sampling time on somatic and germ cell mutations induced by acrylamide in *gpt delta* mice. *Genes*

Environ. 2021;43:4.

2. 学会発表

1. 増村健一，安東朋子，鶴飼明子，藤原聖，横瀬重雄，高木久宜，能美健彦，本間正充：遺伝子突然変異試験において高いレポーター遺伝子回収効率を実現する新規 *gpt delta* ラット. 第79回日本癌学会学術総会(2020.10)
2. 増村健一，安東朋子，石井雄二，杉山圭一，本間正充：アクリルアミド投与 *gpt delta* マ

ウスを用いた DNA 付加体と点突然変異の用量相関に関する研究. 日本環境変異原学会第49回大会 (2020.11)

H. 知的所有権の取得状況

なし

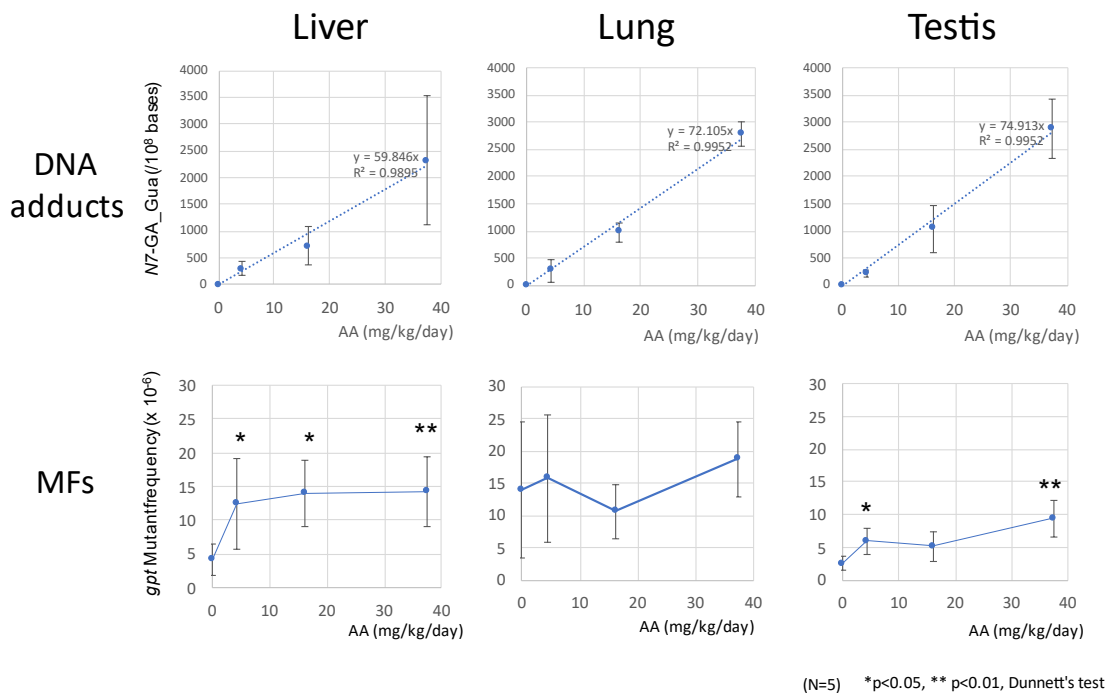


図1. AA投与マウス組織におけるDNA付加体量と *gpt* 突然変異体頻度

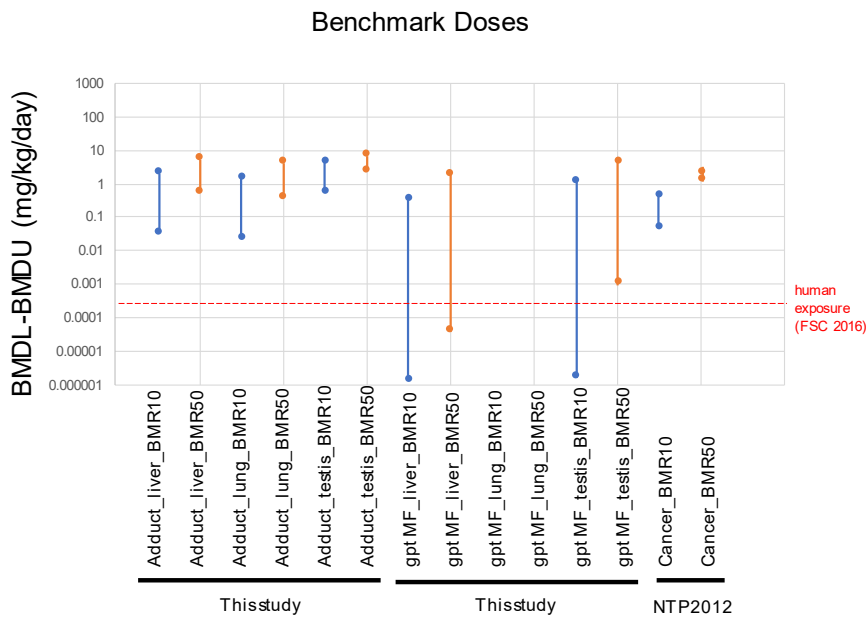


図2. ベンチマークドーズ法によるPoD算出 (BMD10およびBMD50)

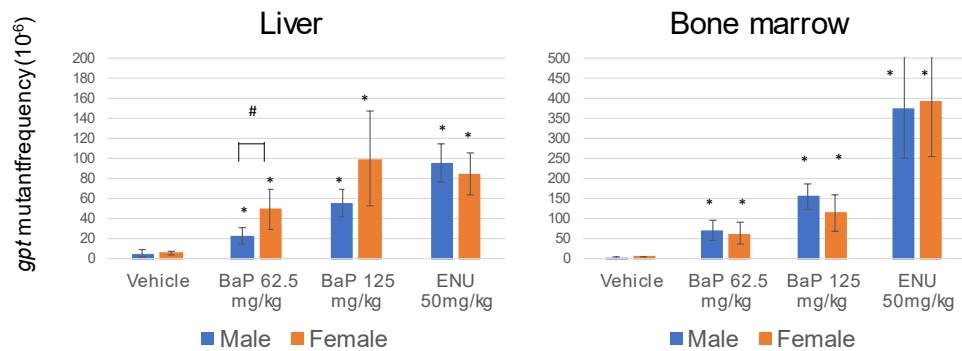


図3. 新規 *gpt delta* ラット (homo) の BaP, ENU 誘発 *gpt* 突然変異体頻度