

研究課題の概要

研究課題名	ヒト肝組織を用いたアクリルアミドの変異原性の評価とその関連遺伝子の解析
主任研究者	笹野 公伸
所属機関	東北大学
研究成果の概要	<p>アクリルアミドは、高温調理されたでんぷん含有食品などに含まれており発癌性が疑われている為、食の安全の立場からは完全に不安が払拭出来ない化合物である。毒性試験には一般に実験動物が用いられるが、実際のヒトへの影響を知る上では個人差や人種差がある為、ヒト組織を用いた試験が絶対的に必要になる。本研究では病理組織学的に検討した日本人の肝組織を用いてAmes試験および染色体異常試験によって毒性を評価し、さらにマイクロアレイ、PCRといった遺伝子解析を行うことでアクリルアミドの遺伝毒性の総合的評価を行った。遺伝子解析の結果、ヒト肝代謝能は個人差が大きいことがわかった。アクリルアミドはAmes試験においては「陰性」染色体異常試験においては「陽性」ではあるものの、試験に用いたアクリルアミド濃度が高用量ということ、肝代謝能の個人差、他の欧米での研究報告を合わせて考慮すると、実際に食品として想定される摂取量においては当初危惧されていた重大な危険性は日本人においても無いと考えられる。</p>

評価所見	<p>ヒト肝組織を用いたAmes試験と遺伝子およびタンパク質発現を解析することによるアクリルアミドの変異原性の評価については、「当初危惧されていた重大な危険性は日本人においても無いと考える」という確実な結論を得るには、データや考察が不十分である。また、基礎研究としての目的や方法は有用だが、本方法論をリスク評価に活用するには、抽出ヒト組織を使用する点など汎用性は高くないと考えられる。</p>
評価結果	目標の達成は不十分であった。

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	ヒト肝組織を用いたアクリルアミドの変異原性の評価とその関連遺伝子の解析
主任研究者名	所属： 東北大学大学院医学系研究科 氏名： 笹野 公伸（研究課題番号：0702）

アクリルアミドは高温調理されたでんぷん含有食品などに含まれていて発癌性が疑われている。この為、食の安全の立場からは完全に不安が払拭出来ない化合物である。毒性試験には一般に実験動物が用いられるが、実際のヒトへの影響を知る上では個人差や人種差がある為、ヒト組織を用いた試験が絶対的に必要になる。そこで、本研究では病理組織学的に検討した日本人の肝組織を用いて Ames 試験および染色体異常試験によって毒性を評価し、さらにマイクロアレイ、PCR といった遺伝子解析を行うことでアクリルアミドの遺伝毒性の総合的評価を行った。アクリルアミドの Ames 試験においては「陰性」染色体異常試験においては「陽性」ではあるが、個人差や人種差、また試験に用いた濃度と実際に食品として摂取すると想定される量を考慮すると、当初危惧されていた程の重大な危険性はないと考えられる。

本実験では、実験動物や市販のヒト肝では得られない実際のヒト肝組織を用いることによって個人差の大きさが再認識され、ヒトへの影響を知る上で非常に有用であったと考えられる。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	ヒト肝組織を用いたアクリルアミドの変異原性の評価とその関連遺伝子の解析 (研究期間：平成19年度～21年度)
主任研究者名	所属： 東北大学大学院医学系研究科 氏名： 笹野 公伸（研究課題番号 0702）

1. 研究の概要

アクリルアミド (acrylamide : CAS#79-06-1) は高温調理されたでんぷん含有食品などに含まれ現在のところ Ames 試験での変異原性では陰性に位置づけられている。しかし、その他の手法を用いた研究では遺伝子に影響を及ぼすことも示唆されてきた。一般に多くの化合物は肝臓での代謝を受けその構造・性質が変化する。この為 Ames 試験では肝ホモジェネート (S9) による代謝活性化法を併用することが極めて重要となる (Fig. 1)。毒性試験においては一般にげっ歯類が汎用されているが、化合物の影響を知る上でヒトに外挿する際に種差を考慮に入れなければ正しい結果は得られない。この点については Ames 試験も同様であり、前述の S9 はラット肝組織が用いられ、さらにイヌやサル S9 による Ames 試験が試みられているが、実際のヒトへの影響を知る上ではヒト S9 の検討が必要となる。ヒトにおいては数例の肝組織からのプールド S9 が用いられることはあるが、遺伝的均一化にある実験動物とは異なり、ヒトでは個人差の問題を絶対に避けることができない。従って可能な限り多くの症例を用いて、アクリルアミドの変異原性を検討する必要があると考えられる。

そこで本研究では最初に日本人のヒト肝組織から S9 を調製し、アクリルアミドを *in vitro* 系で反応させた代謝物を用いた Ames 試験を実施した。また、同様に S9 を用いて染色体異常試験を実施し、Ames 試験と合わせて遺伝毒性試験の総合的評価を行った。本研究ではさらに Ames 試験陽性対照物質である 2-Aminoanthracene (2-AA) と Benzo[a]pyrene (B[a]P) の結果から、本邦でのヒト肝代謝能の個人差 (以下、個人差とする) を明らかにした。その後、この結果の背景をさらに検討する為に網羅的な遺伝子発現解析を実施し、アクリルアミドの毒性と個人差、特に種々の影響を受ける日本人が保有する遺伝子マーカーを探索することで本邦でのアクリルアミドの遺伝毒性の総合的評価を行い、アクリルアミドの安全性を確立させる事を主目的とした。本研究ではさらに日本人肝細胞での代謝能の個人差についても追究していく事も計画した。

病理組織学的評価、実験デザインは笹野 (主任) が担当し、その他のサンプリングおよび予備検討については三木 (分担) が担当した。また、実務全般の遂行にあたり、専任研究員 (産学官連携研究員) を配置した。本研究ではヒト肝組織を用いて以下の実験を実施した。

- 1) ヒト肝組織からの S9 mix の調製：東北大学附属病院病理部で実施された剖検および東北大学附属病院で実施された転移性肝臓癌の手術における正常肝臓の部位から肝組織を採取した。本検討で対象とした肝組織は、すべてその病理組織学的所見を詳細に検討した。ヒト肝からの S9 調製はラットでの調製方法に準じて行った。なお本研究は剖検および手術材料を用いた双方の検討で東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を得た後に実施した。
- 2) ヒト S9 を用いたアクリルアミドの Ames 試験：1)で得られた各症例の S9 を用いて、アクリルアミドの Ames 試験を行った。Ames 試験には *Salmonella typhimurium* TA100 株を用いた DNA の塩基置換型変異、および TA98 株を用いた DNA のフレームシフト型変異をそれぞれ検討した（食品安全性評価センターにて実施）。陽性対照として 2-Aminoanthracene (2-AA) および IARC での評価がアクリルアミドと同じ Group 2A で尚且つ食品中に含まれているものとして Benzo[a]pyrene (B[a]P) を用いた。
- 3) ヒト肝組織を用いたマイクロアレイ解析（肝代謝における個人差の検討）：1)で得られた肝組織から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を実施した。得られた結果は、薬物代謝に関する遺伝子を検討した全遺伝子から抽出し、クラスター解析を行った。薬物代謝酵素関連遺伝子群については網羅的な定量的 PCR を行い、マイクロアレイの結果のバリデーションとした。
- 4) ヒト肝 S9 を用いたアクリルアミドの染色体異常試験：1)で得られた各症例の S9 を用いて、アクリルアミドの染色体異常試験を行った（食品安全性評価センターにて実施）。染色体異常試験にはチャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を用い検討した。陽性対照は Cyclophosphamide を用いた。

2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

1) 平成19年度研究成果の概要

① 平成19年度研究の目的

ヒト肝組織の採取から病理組織学的評価およびヒト肝 S9 の調製までの一連の手技を確立すること、アクリルアミドの Ames 試験陽性例を確保することを主に達成すべき目標に掲げた。

② 平成19年度研究の方法

肝組織の採取：肝組織（約 10-30g）は肉眼的に異常が認められない部位を採取し、ホルマリン固定標組織（病理解析）および凍結組織（S9 調製、遺伝子発現解析）としてそれぞれ保存した。これらの作業は、作業員への汚染と周囲環境への汚染が決してないように注意して行った。

肝組織の病理組織学的評価：10%ホルマリン固定標組織はパラフィン包埋後、3 μ m に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。ヒト肝臓代謝酵素である CYP3A（ヒト抗

CYP3A 抗体 ; Chemicon International, Inc., Temecula, CA) およびアクリルアミド代謝に関わる CYP2E1 (ヒト抗 CYP2E1 抗体 ; Chemicon) の発現を免疫組織化学にて評価した。また、肝線維化の評価にはエラスチカ・マッソン染色を、胆汁うっ滞の評価にはヨード法をそれぞれ施行し組織化学的に検討を行った。

ヒト S9 mix を用いたアクリルアミドの Ames 試験 : 肝組織から定法に従って S9 分画を採取した (Fig. 2.)。Ames 試験については、財団法人食品安全性評価センター (以下、安評センター) に委託した (試験番号 B010 ; GLP 非適用)。Ames 試験では TA100 株を用いた DNA の塩基置換型変異を、TA98 株を用いた DNA のフレームシフト変異をそれぞれ検討した。また、本研究の実施に先立ち、市販ヒト肝 S9 (特定非営利活動法人 エイチ・イー・ビー (HAB) 研究機構、Ames 試験用ヒト肝 S9 [Lot No. HLSP-E2] およびプールドヒト肝 S9 [Lot No. HLSP-8]) を用いた予備検討試験 (試験番号 A986 ; GLP 非適用) を行った。

③ 平成 19 年度研究の成果

肝組織の採取 : 肝組織は東北大学病院病理部で実施された剖検 (15 例) 及び東北大学付属病院で実施された転移性肝臓癌 (7 例) から採取した。実験の遂行にあたってはそのプロトコールについて、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会 (受付番号 : 2007-90) 及び東北大学利益相反マネジメント委員会の審査を受け、いずれにおいても承認を受けた。

肝組織の病理組織学的評価 : 肝組織は病理組織学的に異常のない症例を対象とした。CYP3A の免疫組織化学では、胎児例では肝細胞にび漫性に、生後から成人例では中心静脈を中心とした発現を認め、その発現には極めて大きな個人差が発現量、発現分布動態双方の点で認められた。CYP2E1 では、CYP3A と同様にその発現には個人差が認められた。

ヒト S9 を用いたアクリルアミドの Ames 試験 : 市販ヒト肝 S9 を用いた予備試験の結果、アクリルアミドは検討したいずれの濃度 (5000, 2500, 1250, 625, 313 $\mu\text{g}/\text{Plate}$) においても陽性所見は得られなかった。本試験でも予備試験の結果と同様に、全ての症例でアクリルアミド (5000, 2500, 1250 $\mu\text{g}/\text{Plate}$) に対する陽性所見は得られなかった。しかし、陽性対照に用いた 2-Aminoanthracene (2-AA) についても 14 例中 4 例が陰性だった。これら 4 例の特徴としては、2 例は CYP3A の発現が低く、他の 2 例は胎児だった。

以上、平成 19 年度では肝組織の採取とその病理組織学的評価、S9 の調製および Ames 試験について実施し、各過程の手技・評価法を確立することができた。アクリルアミドの Ames 試験陽性例を確保することができなかったが、病理組織学的に正常な肝組織においても個々の症例で代謝機能が大きく異なることが判明した。

2) 平成20年度研究成果の概要

① 平成20年度研究の目的

平成19年度に引き続き肝組織のサンプリングを行い、ヒト肝 S9 を用いたアクリルアミドの Ames 試験、Ames 試験による代謝機構の個人差の解明、網羅的な遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにすることを目標として掲げた。

② 平成20年度研究の方法

肝組織の採取と病理組織学的評価：剖検（7例）および転移性肝臓癌（3例）から肝組織を採取し、前年度に準じた評価を行った。免疫組織化学については陽性対照物質である 2-AA と Benzo[a]pyrene (B[a]P) の代謝活性に関わる CYP1A (Chemicon) の発現検討を全症例について追加した。

ヒト S9 を用いたアクリルアミドの Ames 試験：ヒト肝組織から前年度に構築した方法に従って S9 を調製した。Ames 試験は陽性対照に 2-AA (1, 0.5 µg/Plate) を用い、アクリルアミドを 3 濃度 (5000, 2500, 1250 µg/Plate)、また陽性対照化合物として新たに B[a]P を 3 濃度 (10, 5, 2.5 µg/Plate) 加えて実施した（安評センター；試験番号 B389；GLP 非適用）。

ヒト肝組織を用いたマイクロアレイ解析：肝組織 23 例から RNA を定法にて抽出し、マイクロアレイ (Human 1A, 44,000 遺伝子；アジレントテクノロジー) および階層的クラスタ解析 (GeneSpring) を行った。Ames 試験の結果と対応させ、特徴的な遺伝子発現および個人差をそれぞれ確認した。

③ 平成20年度研究の成果

肝組織の採取と病理組織学的評価：CYP1A の免疫組織化学の結果、2-AA の代謝活性に関与する CYP1A2 は肝細胞にび漫性に発現し、その発現には CYP3A および CYP2E1 と同様、個人差が認められた。また、B[a]P の代謝活性に関与する CYP1A1 は肝臓での発現は認められなかった。

ヒト S9 mix を用いたアクリルアミドの Ames 試験：すべての症例でアクリルアミドに対する陽性所見は得られなかったが、陽性対照の 2-AA および B[a]P については個人差が認められた。また、S9 のタンパク濃度測定 (Protein Assay Rapid Kit, 和光純薬工業) では各症例間にタンパク濃度の著しい差がなく、Ames 試験の症例間差は個人差によるものと判断した。

ヒト肝組織を用いたマイクロアレイ解析：23 例の日本人肝臓における遺伝子のプロファイリング、すなわち特異的な発現パターンを得ることができた。さらに、Ames 試験で得られた 2-AA の個人差を基に 4 グループに分け、GeneSpring を用いた階層的クラスタ解析を行い、グループに特異的な遺伝子群を抽出した。その発現に個人差が知られている代謝酵素関連遺伝子については、23 例について定量的 RT-PCR (SABiosciences) を行い、マイクロアレイ解析の結果のバリデーションを行うことができた（結果の詳細な解析は平成21年度に行った）。

以上、平成20年度はAmes試験にて評価した「肝代謝の個人差」に関連する遺伝子群の抽出方法を確立した。

3) 平成21年度研究成果の詳細

① 平成21年度研究の目的

平成20年度までのアクリルアミドのAmes試験ではいずれの症例においても陰性だった為、他の方法にて遺伝子への影響を検討すべきとの指摘を受けた（平成20年度中間評価）。平成21年度では、さらにアクリルアミドの遺伝子への影響を追究する為に染色体異常試験を実施し、アクリルアミドの遺伝毒性試験の総合的評価を行った。さらに平成20年度から継続しているマイクロアレイ解析により、遺伝子レベルでの個人差を明らかにする。このことからアクリルアミドの毒性、特に遺伝子に対して影響を受ける可能性を有する日本人の保有するマーカーを総合的に探索することが可能となる。

② 平成21年度研究の方法

肝組織の採取と病理組織学的評価：剖検（2例）から肝組織を採取した。標本の処理および病理組織学的評価について、前年度に準じて検討を進めた。さらに免疫組織化学については、CYP3A、CYP2E1、CYP1A2 および CYP1A1 の発現を検討した。さらに、G0 以外のすべての細胞周期にある細胞を認識するヒト抗 Ki-67 抗体 (DakoCytomation Co. Ltd., Kyoto Japan) および同様に増殖細胞を認識すると考えられているヒト抗 DNA topoisomerase II alpha (Topo II alpha) 抗体 (Dako) を用いた免疫組織化学を行った。

ヒト肝組織を用いた Ames 試験の個人差とマイクロアレイ解析：前年度行ったマイクロアレイ解析の結果について、GeneSpring を用いた階層的クラスタ解析を行い、さらに詳細な検討を加えた。

ヒト S9 を用いたアクリルアミドの染色体異常試験：アクリルアミドの Ames 試験を行った 23 症例のうちアクリルアミド、2-AA および B[a]P すべてを試験した 8 症例と年齢のばらつきを考慮して 2 症例追加し、計 10 症例について、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を用いた染色体異常試験を行った（安評センター；試験番号 B863；GLP 非適用）。アクリルアミドの染色体異常試験ではまず、検討試験としてプールドヒト肝 S9（HAB 研究機構；Lot No. HLSP-8）を用い、アクリルアミドおよび陽性対照に用いる化合物とその濃度を検討した（安評センター；試験番号 B862；GLP 非適用）。その結果、本試験において、アクリルアミドは 3 濃度（1000, 700, 490 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）陽性対照物質は Cyclophosphamide (CP) を 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で用いた。

③ 平成21年度研究の成果

肝組織の採取と病理組織学的評価：CYP3A、CYP2E1 および CYP1A の発現については前年度までの結果と同様の結果が得られ再現性が確保されたと判断した。

ヒト肝組織を用いた Ames 試験の個人差とマイクロアレイ解析：前年度において、23 例の日本人肝臓における遺伝子のプロファイリング、すなわち特異的な発現パターンを得ることができた。Ames 試験は通常、陰性対照の 2 倍以上のコロニーが検出され、尚且つ用量依存性が認められる場合、陽性と判定する。Ames 試験において陽性対照として用いた 2-AA について、陽性反応に顕著な個人差が見られた為、この 2-AA の個人差を基に 4 つのグループに分けた。すなわち、2-AA が ① 陰性、② TA100 株、TA98 株のうち一方が陽性、③ 陰性対照の 2 倍以上 10 倍未満の陽性、④ 陰性対照の 10 倍以上の陽性とした。この 4 つのグループにより GeneSpring を用いた階層的クラスタ解析を行い、グループ① に特異的な低発現および高発現な遺伝子群を抽出した (Fig. 3.)。グループ① では薬物代謝酵素遺伝子群の発現が低く、逆に細胞周期などに関わる遺伝子群 (ARID3A, ORC6L, RAD51AP1, NCAPH, MAD2L1, CHEK1, MND1, RRM2, SPC2, RAD54L, CDC2, BUB1, DLG7, CDC25C, TOP2A, CDCA3, TACC3) の発現が高かった。Ames 試験で 2-AA が陰性であった 5 症例は、2-AA の代謝活性に関与する CYP1A2 の発現が低い傾向が認められた (Fig. 4.)。グループ④は代表的な薬物代謝酵素の発現が顕著に高い結果であった (Fig. 4.)。さらに B[a]P の Ames 試験 (8 例) について陰性群と陽性群の 2 群に分け比較してもまた、同様な傾向が認められた (Fig. 5.)。

以上のマイクロアレイの結果から肝細胞増殖と代謝能との関連をさらに検討する目的で、細胞増殖に関わる代表的なマーカーである Ki-67 と Topo II alpha の免疫組織化学を行った。その結果を Table 1 に示す。Ki-67 および Topo II alpha 共にその発現動態には個人差が認められたが、2-AA のグループ分けによる顕著な差は認められなかった。Ki-67 は増殖の程度を表す MIB-1 index としてよく知られており、一般的に用いられている細胞増殖マーカーであり、白血病患者の自己抗体として発見されたものであるが、乳癌、胃癌、大腸癌および子宮癌など多くの腫瘍における細胞増殖マーカーとしてよく用いられていて診断治療に大きな貢献をしている。Topo II alpha もまた、種々の悪性腫瘍において組織化学的な増殖マーカーとして用いられている。その為、Ki-67 および Topo II alpha 共に白血病の症例および何例かの転移性肝癌の症例においては肝細胞でも陽性細胞が認められた。また、肝臓の成長途上である胎児および幼児も 3 症例中 2 例において陽性であった。

ヒト S9 を用いたアクリルアミドの染色体異常試験：染色体異常試験の解析は、染色体異常細胞の出現頻度に濃度依存性があり、尚且つ、その出現頻度が 10%以上の場合に陽性と判定される。アクリルアミドは、ラット S9 mix を用いた染色体異常試験において 500 から 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で構造異常の誘発が報告されている。このことから、予備検討試験では市販のプールドヒト肝 S9 (Lot No. HLSP-8) を用いて 125、250、500 および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に設定して行っ

た。また、同様にラット肝 S9 mix についても陰性対照とともに 500 および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で検討した。その結果を Table 2 に示す。アクリルアミド処理群の染色体構造異常出現頻度 [表中の Total (-gap)] は 250、500 および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 2.0、6.0 および 46.0%であり、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においてのみ陰性対照群（生理食塩水）と比較して明確な増加が見られた。なお、相対細胞増殖率 (Relative cell growth) は 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において 58.1%であった。また、倍数性細胞 (Polyploid cells) の出現頻度は、陰性対照群と同程度であった。染色体異常試験用ラット肝 S9 mix によるアクリルアミド処理群の構造異常出現頻度は、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 6.0%、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 76.0%を示した。なお、相対細胞増殖率は 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても 51.1%であった。また、倍数性細胞の出現頻度は、いずれも陰性対照と同程度であった。ヒト肝 S9 mix 処理群の陽性対照物質 CP は 6.25、12.5、25.0 および 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ いずれにおいても染色体構造異常は誘発されなかった。以上の結果から、アクリルアミドに関してはヒト肝 S9 およびラット肝 S9 共に 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において明確な染色体構造異常の誘発が認められたと考えられ、本試験における処理濃度の設定に必要な情報を得ることができた。

しかしながら、プールドヒト肝 S9 (Lot No. HLSP-8) を用いた陽性対照群 CP において 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも染色体異常の誘発が認められなかったことから、実際のヒト肝 S9 を用いた場合の適切な陽性対照物質を検討する為、さらに B[a]P を 20.0、40.0 および 80.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ならびに CP を 100 および 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定して追加検討試験を行った。その結果を Table 3 に示す。プールドヒト肝 S9 (Lot No. HLSP-8) による B[a]P および CP 処理群の構造異常出現頻度は、CP の 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においてわずかに増殖したものの、いずれの濃度においても陰性対照群と比較して明確な増殖は認められなかった。また、倍数性細胞の出現頻度は、陰性対照群と同程度であった。

プールドヒト肝 S9 (Lot No. HLSP-8) を用いた陽性対照群において、B[a]P における 20.0、40.0 および 80.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ならびに CP における 100 および 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のいずれにおいても明確な染色体異常の誘発が認められなかったことから、さらに Aflatoxin (AT) を 1.56 および 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10 μM 相当) ならびに CP を 400、800 および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定して追加検討試験を行った。その結果を Table 4 に示す。プールドヒト肝 S9 (Lot No. HLSP-8) による AT 処理群の構造異常出現頻度は 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 4.0%、3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 10.0%を示し、CP 処理群では 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 12.0%、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 48.0%、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 62.0%を示し、いずれにおいても濃度依存的に増加が認められた。なお、相対細胞増殖率は AT 処理群では 1.56 および 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 72.5 および 61.5%、CP 処理群では 400、800 および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 91.6、83.9 および 72.0%であった。また、倍数性細胞の出現頻度は、いずれも陰性対照群と同程度であった。

以上より予備検討試験においてはプールドヒト肝 S9 およびラット肝 S9 いずれを用いてもアクリルアミドの遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定された。また、プールドヒト肝 S9 を用いた陽性対照群に関しては、CP の 800 および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において明確な染色体構造異常の誘発が認められた。

ヒト S9 mix を用いた本試験において、アクリルアミドは3濃度 (1000, 700, 490 µg/mL) 陽性対照物質は CP を 1000 µg/mL の濃度で行った。その結果を Table 5~14 に示す。アクリルアミドについては、いずれの症例においても濃度依存性を伴う陽性反応が認められた。しかし、陽性対照の CP については、検討試験においてプールドヒト肝 S9 で確実に陽性反応が認められている濃度を用いたにも関わらずその陽性反応が認められたのは 10 症例中 2 例に過ぎなかった。この 2 症例に関してもプールドヒト肝 S9 とは異なり、陽性反応は低い結果 (O-5; 10%, O-6; 11%) であった。

4) 3年間の研究成果のまとめ

① 研究全体の目的

2002年、スウェーデン国立食品局は、高温調理されたでんぷん含有食品（フライドポテトやパン）中にアクリルアミドが高濃度で検出されたと報告した (National Food Administration: Acrylamide is formed during the preparation of food and occurs in many foodstuff)。アクリルアミドはアクリル酸を母体とするアミドの一種であり、動物試験においては神経毒性が近年注目されており、さらに発癌性、遺伝毒性、生殖および発生毒性などを有することが報告されている。アクリルアミドの発癌性は国際がん研究機関 (IARC: International Agency for Research on Cancer) の評価では Group 2A、アメリカ合衆国環境保護庁 (EPA: United States Environmental Protection Agency) の評価では B2 にカテゴライズされており、つまり「ヒトに対しておそらく発癌性を示す」とされている。また、現在のところアクリルアミド自体は Ames 試験での変異原性では陰性に位置づけられているが、その他の手法を用いた研究では遺伝子に影響を及ぼすことが明らかになってきている (Toda M, *et al.*, *Bull Natl Inst Health Sci*, 2005)。アクリルアミドは主にシトクローム P450 (CYP) 2E1 によってグリシダミド (Fig. 1.) に代謝される (Blasiak J, *et al.*, *Chem Biol Interact*, 2004) が、このグリシダミドはアクリルアミドで陰性である Ames 試験において陽性である。現時点ではアクリルアミド摂取による遺伝毒性は主にグリシダミドによるものと推測されている (Toda M, *et al.*, *Bull Natl Inst Health Sci*, 2005)。

このようにアクリルアミドの代謝は CYP2E1 に注目されているが、実際はいくつかの代謝を受けることが知られており、グリシダミドも抱合反応を経て代謝されて無毒化される (Kurebayashi H and Ohno Y, *Arch Toxicol*, 2006; Zodl B, *et al.*, *Toxicology*, 2006)。従って、ヒトの体内ではいくつかの代謝酵素がアクリルアミドの毒性に関与する事になり、最終的な代謝産物の影響を検討しない限り、ヒトへの影響を評価することはできない。以上よりアクリルアミドは食の安全の立場からは完全に不安が払拭出来ない化合物であると位置づけられる。

ところで化合物の変異原性に関しては Ames 試験が広くその評価に用いられている。この試験は食品添加物や医薬品などの化合物の安全性の初期の段階でのスクリーニングをする意味

でも重要な手法として位置づけられている。一般に多くの化合物は肝臓で代謝されその構造・性質を異にするため、この Ames 試験では肝ホモジネート (S9) による代謝活性化法を併用することが極めて重要となる。毒性試験においては一般にげっ歯類が汎用されているが、旧くはサリドマイドのヒトに対する被害にみられたように、化合物の影響を知る上でヒトに外挿する際に種差を考慮に入れなければ正しい結果を得ることができないのは言うまでもない。この点については Ames 試験も同様であり、前述の S9 はラット肝組織が用いられ、さらにイヌやサル S9 による Ames 試験が試みられているが、実際のヒトへの影響を知る上ではヒト S9 が必要となる。ヒトにおいては数例の肝組織からのプール S9 が用いられることはあるが、遺伝的均一化にある動物実験とは異なりヒトでは個人差の問題を避けることができない。またその個人差こそがヒトへの影響を知る上で重要となる。従って可能な限り多くの症例を用いてアクリルアミドの変異原性を検討する必要があると考えられる。

以上のことから本実験ではまず、原発性の肝疾患が臨床的に無い剖検および転移性肝癌の手術例から得られたヒト肝組織を用いてヒト S9 を調製し、アクリルアミドを *in vitro* 系で反応させた代謝物を用いて Ames 試験を実施した。ヒトに対する化合物の影響の個人差は、その代謝機構に起因するものも多い。従って本研究ではさらに広範な遺伝子発現の異常を検討出来るマイクロアレイ解析を行い、ヒト肝代謝の個人差に関わる遺伝子群の抽出を試みた。さらにアクリルアミドによる陽性所見が得られる染色体異常試験を併せて検討し、アクリルアミドの遺伝毒性の総合的評価を行った。また、各症例の遺伝子発現プロファイルを明らかにし、遺伝毒性評価の結果から肝代謝能に関連する遺伝子群を推定した。以上より本研究課題では、アクリルアミドの安全性を確立させる事を主目的とし、さらにヒト肝代謝能の個人差についても探求することを最終目的とした。

病理組織学的評価、実験デザインは笹野（主任）が担当し、その他のサンプリングおよび予備検討については三木（分担）が担当した。また、実務全般の遂行にあたり、専任研究員（産学官連携研究員）を配置した。

② 研究全体の方法

1) ヒト肝組織からの S9 の調製：東北大学附属病院病理部で実施される剖検および東北大学附属病院で実施される転移性肝臓癌の手術における正常肝臓の部位から肝組織を採取し、速やかに液体窒素にて凍結して-80℃にて保存した。

2) ヒト肝組織の病理組織学的評価：本検討で対象とした肝組織は、その病理組織学的所見を詳細に検討した。パラフィン包埋肝組織は 3μm に薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、顕微鏡観察に用いた。代表的なヒト肝臓代謝酵素である CYP3A を評価するため

に CYP3A、アクリルアミドの代謝活性に関与する CYP2E1、2-Aminoanthracene (2-AA) と Benzo[a]pyrene (B[a]P) の代謝活性に関与する CYP1A、さらに、細胞周期に関与する Ki-67 および Topo II alpha を用いた免疫組織化学を行った。また、肝線維化の評価にはエラスチカ・マッソン染色を、胆汁うっ滞の評価にはヨード法をそれぞれ行った。

3) ヒト S9 mix を用いたアクリルアミドの Ames 試験：1) で得られた各症例（計 23 例）の S9 を用いて、アクリルアミドの Ames 試験を行った。Ames 試験には *Salmonella typhimurium* TA100 株を用いた DNA の塩基置換型変異、および TA98 株を用いた DNA のフレームシフト型変異をそれぞれ検討した。陽性対照として 2-AA および IARC での評価がアクリルアミドと同じ Group 2A で尚且つ食品中に含まれているものとして B[a]P を用いた。これらの試験は安評センターに委託して行った。

4) ヒト肝組織を用いたマイクロアレイ解析（肝代謝における個人差の検討）：1) で得られた肝組織から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析（アジレントテクノロジー）を実施した。得られた結果は、薬物代謝に関する遺伝子を全遺伝子から抽出し、クラスター解析を行った。薬物代謝酵素関連遺伝子群については網羅的な定量的 PCR (SABiosciences) を行い、マイクロアレイの結果のバリデーションとした。

5) ヒト肝 S9 を用いたアクリルアミドの染色体異常試験：1) で得られた各症例の S9 を用いて、アクリルアミドの染色体異常試験を行った。染色体異常試験にはチャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を用い検討した。陽性対照として最終的に Cyclophosphamide (CP) を用いた。これらの試験は安評センターに委託して行った。

以上のように、本研究ではアクリルアミドの変異原性の有無を日本人のヒト肝 S9 を用いた Ames 試験にて明らかにし、加えて、染色体異常試験を行うことによってアクリルアミドの遺伝毒性の総合的評価を行った。

③ 研究成果

1) ヒト肝組織からの S9 mix の調製：平成 19 年度から平成 21 年度の 3 年間にかけて、東北大学病院病理部で実施された剖検（24 例）及び東北大学附属病院で実施された転移性肝臓癌（10 例）から肝組織を採取した。実験の遂行にあたってはそのプロトコールについて、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会（受付番号：2007-90）及び東北大学利益相反マネジメント委員会の審査を受け、いずれにおいても承認を受けた。なお、肝炎ウイルスやその他感染症の症例、臨床検査で肝炎ウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス感染に関する検査が行われていない症例からは採取しなかった。

2) ヒト肝組織の病理組織学的評価：死後融解が著しかった症例を除外した他は、重度の肝障害

を病理学的に示す症例はなかった。CYP3A の免疫組織化学では、胎児例では肝細胞にび漫性に、生後から成人では中心静脈を中心とした発現を認めたが、その強度を相対的に 3 段階（1+、2+ および 3+）で評価すると発現には個人差が認められた。CYP2E1 では、CYP3A と同様に、その発現動態において個人差が認められた。CYP1A については、2-AA の代謝活性に関与する CYP1A2 は肝細胞にび漫性に発現し、その発現には CYP3A および CYP2E1 と同様、個人差が認められた。また、B[a]P の代謝活性に関与する CYP1A1 は肝臓での発現がほとんど認められなかった。免疫組織化学による発現の個人差を Fig. 6. にまとめた。

3) ヒト S9 mix を用いたアクリルアミドの Ames 試験：Ames 試験は剖検（16 例）および転移性肝臓癌（7 例）計 23 例を用いて行った。予備検討試験（プールド S9 を使用）にて用いたアクリルアミド濃度（5000, 2500, 1250, 625, 313 $\mu\text{g}/\text{Plate}$ ）および本試験（5000, 2500, 1250 $\mu\text{g}/\text{Plate}$ ）いずれにおいてもヒト肝 S9 では陽性所見は得られなかった。しかし、すべての症例でアクリルアミドに対する陽性所見は得られなかったが、陽性対照の 2-AA および B[a]P については個人差が認められた。また、検討に用いた S9 のタンパク濃度測定では、各症例間での濃度差はなかった。ヒト肝 S9 を用いた Ames 試験の詳細結果を Table 15~37、それをまとめたものを Table 38 に示した。

日本人の薬物の有効性と安全性の予測試験において、手術切除肝組織の研究への提供を組織的に行う試みがなされている（簾内ら, *Bull Natl Inst Health Sci*, 2005）。本課題では患者からの肝組織の採取、臨床・病理評価、さらに実際の研究に供する試料調製までを単独施設で構築することができた。

4) ヒト肝組織を用いたマイクロアレイ解析（肝代謝における個人差の検討）：剖検（16 例）および転移性肝臓癌（7 例）計 23 例を用いてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子のプロファイリング、すなわち特異的な発現パターンを得ることができた。さらに、Ames 試験で得られた 2-AA の個人差を基に 4 グループに分け、GeneSpring を用いた階層的クラスタ解析を行い、個々のグループにおいて特異的な遺伝子群を抽出した。グループ①に特異的な低発現群は主に薬物代謝酵素で、高発現群は細胞周期などに関わる遺伝子であった。Ames 試験で 2-AA が陰性であった 5 症例は、2-AA の代謝活性に関与する CYP1A2 の発現が低い傾向が認められた。グループ④は代表的な薬物代謝酵素の発現が顕著に高い結果であった。さらに B[a]P の Ames 試験（8 例）について 2 群に分け比較してもまた、同様な傾向が認められた。本研究により、マイクロアレイ解析において Ames 試験にて評価した「肝代謝の個人差」に関連する遺伝子群の抽出方法を確立した。Ames 試験およびマイクロアレイ解析を行った 23 症例について、特に重要な役割を果たしているとも考えられる代謝酵素関連遺伝子を SABiosciences 社の PCR アレイシステムを用いて定量的 PCR 解析を行い、マイクロアレイ解析の結果のバリデーションを行うことができた (Fig. 7.)。

Ames 試験で得られたグループ①ではマイクロアレイ解析の結果、薬物代謝酵素遺伝子群の発現が低く、逆に細胞周期などに関わる遺伝子群 (ARID3A, ORC6L, RAD51AP1, NCAPH, MAD2L1, CHEK1, MND1, RRM2, SPC2, RAD54L, CDC2, BUB1, DLG7, CDC25C, TOP2A, CDCA3, TACC3) の発現が高かった。Ames 試験で 2-AA が陰性であった 5 症例は、2-AA の代謝活性に関与する CYP1A2 の発現が低い傾向が認められた (Fig. 4.)。グループ④は代表的な薬物代謝酵素の発現が顕著に高い結果であった (Fig. 4.)。さらに B[a]P の Ames 試験 (8 例) について陰性群と陽性群の 2 群に分け比較してもまた、同様な傾向が認められた (Fig. 5.)。肝細胞増殖と代謝能との関連を明らかにするため、細胞増殖に関わる代表的な免疫組織化学的マーカーである Ki-67 と Topo II alpha について検討した。その結果を Table 1 に示す。Ki-67 および Topo II alpha 共にその発現に個人差が認められたが、2-AA のグループ分けによる顕著な差は認められなかった。Ki-67 はその陽性細胞の割合を算出してその組織の増殖の程度とする MIB-1 index が臨床現場でも用いられている。この Ki-67 は元々白血病患者の自己抗体として発見されたものであるが、乳癌、胃癌、大腸癌および子宮癌など多くの腫瘍において細胞増殖マーカーとしての地位を確立してきた。Topo II alpha も同様に種々のヒト悪性腫瘍で増殖細胞を認識するマーカーとして広く認められてきている。今回の検討でも Ki-67 および Topo II alpha 共に白血病の症例および何例かの転移性肝癌の症例の肝細胞において陽性結果が得られた。また、肝臓の成長途上である胎児および幼児も 3 症例中 2 例において陽性細胞が認められた。今回の検討に用いた肝組織はいずれも病理学的な異常所見を認めなかったが、顕微鏡レベルでは判断し得ない遺伝子レベルでのみ検出できる段階での肝障害・再生 (増殖) が引き起こされている可能性は否定できないと結論された。肝再生過程における薬物代謝機構の変動は明らかではないが、ラット再生肝では CYP3A および CYP2E1 活性が減弱することが報告されている (Starkel P, *et al.*, *Liver*, 2000)。また、ラット初代肝培養細胞では、細胞周期の進行に伴って CYP1A1 および CYP2B1 の発現が抑制されることが報告されている (Henkens T, *et al.*, *Toxicology in Vitro*, 2007)。更なる検討が必要であるが、本研究結果から再生過程に薬物代謝機能が一過性に低下しこの経過中に薬物の代謝異常を生じる可能性も本研究から示唆された。

5) ヒト肝 S9 を用いたアクリルアミドの染色体異常試験：染色体異常試験の解析は、染色体異常細胞の出現頻度に濃度依存性があり、尚且つ、その出現頻度が 10%以上の場合に陽性と判定される。アクリルアミドは、ラット S9 mix を用いた染色体異常試験において 500 から 1000 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で構造異常の誘発が報告されている。予備検討試験では市販のプールドヒト肝 S9 を用い、アクリルアミド 1000 $\mu\text{g/mL}$ において明確な染色体構造異常の誘発が認められ、陽性対照物質は Cyclophosphamide (CP) 1000 $\mu\text{g/mL}$ に選定した。ヒト S9 mix を用いた本試験において、アクリルアミドは 3 濃度 (1000, 700, 490 $\mu\text{g/mL}$) 陽性対照物質は CP を 1000 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で行った。アクリルアミドについては、いずれの症例においても濃度依存性を伴う陽性反応が認めら

れた。しかし、陽性対照の CP については、検討試験においてプールドヒト肝 S9 で確実に陽性反応が認められている濃度を用いたにも関わらず、陽性反応が認められたのは 10 症例中 2 例であった。この 2 症例に関してもプールドヒト肝 S9 とは異なり、陽性反応は極めて低い結果 (O-5; 10%, O-6; 11%) であった。プールドヒト肝 S9 のドナー背景や肝組織の状態などの詳細は明らかにされていない。しかし今回用いた市販ヒト肝 S9 の由来となった肝組織の採取場所が米国機関であることから、今回の日本人の肝 S9 を用いたこの結果によって個人差のみならず人種差の存在も示唆された。CP の代謝活性には CYP2B6 が関与するが、日本人の CYP2B6 の発現は欧米白人と比較して低いことは臨床的にもよく知られている (Shimada T, *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther*, 1994)。今回使用した肝組織では、個人差はあるものの、いずれの症例においても CYP2B6 は低発現 (定量的 PCR) であり、その為陽性反応が得られなかったと考えられる。

本研究で得られたヒト肝組織における各試験結果を Table 39 に示した。

④ 今後のリスク評価への貢献、リスク評価との関係

Ames 試験及び染色体異常試験では化学物質によっては試験結果が異なることが知られており、また、ヒト肝 S9 を用いた染色体異常試験での個人差についても多くは検討されていない。この点では本研究は極めてユニークなアプローチであった。ヒト肝代謝研究では市販の S9 が用いられることが多いが、そのドナー背景は明らかにされていない為詳細な個人差に関する検討は不可能である。本研究に用いたヒト肝組織はいずれもドナー背景と病理組織学的背景が明らかであり、流通しているヒト S9 と比較しても生物資源としての価値は極めて大きいと判断された。また、本試験で得られた Ames 試験および染色体異常試験の結果と遺伝子発現プロファイルの結果は、日本人における食品・化合物の安全性や創薬・医薬品の安全性の評価において極めて貴重な情報となるため、種々の化合物の日本人への影響を考慮する今後の検討に貢献する目的でデータベースとしての公表を積極的に考えていきたい。

本課題では Ames 試験の結果に加え、染色体異常試験を行いアクリルアミドの遺伝毒性の総合的評価を行った。アクリルアミドの Ames 試験における陽性例の確保はできなかったが、陽性対照物質の個人差や染色体異常試験においては、すべての症例で陽性結果であったが、陽性対照物質において個人差が認められた。実験動物や市販のヒト S9 では得られない実際のヒト肝組織を用いることによって、個人差の大きさが再認識された。

実際に食品に含まれるアクリルアミドは、パン、フライドポテト、ポテトチップスなどでおよそ 30~3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ である。また高温で調理する程にアクリルアミドの濃度が上昇することもよく知られており、アクリルアミドの含有量も同様な食品でも製品毎に異なる (Tareke E, *et al.*, *J Agric Food Chem*, 2002)。また、シリアル製品、コーヒー、麦茶、みそ、しょうゆなどにも同様に含有量に幅があるものの、アクリルアミドが含まれている (農林水産省調べ)。

FAO/WHO 食品添加物専門家会議(JECFA)のリスク評価において、一般的なヒトの平均的なアク

リルアミドの摂取量は1日当たり 0.001 mg/kg 体重、および摂取量が多いヒトでも 0.004 mg/kg 体重と評価されている。ラットでの評価で NOEL(無作用量)が神経の形態変化が 0.2 mg/kg 体重/日、生殖及び発達への影響並びにその他非腫瘍性の病変が 2.0 mg/kg 体重/日と評価されており、また、ラットを用いて組織に腫瘍発生が対照群に比べて 10%増加する値(BMD と BMDL)を推計したところ、その中でもっとも低い値は乳腺腫の形成における 0.30 mg/kg 体重/日となっている[WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 55, Safety evaluation of certain contaminants in foods, Prepared by the Sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA); JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Seventy-Second meeting. Rome. 16-25 February 2010. SUMMARY AND CONCLUSIONS (JECFA/72/SC)]。また、最新のアクリルアミドおよびその代謝物であるグリシダミドのヒトへの影響についての報告では、アクリルアミドは高用量では発がん性はあるものの、食物として日々摂取されている量では発がんに影響しないと結論付けている(Tardiff RG, *et al.*, *Food Chem Toxicol*, 2010; Sweeney LM, *et al.*, *Food Chem Toxicol*, 2010)。

今回得られた Ames 試験では「陰性結果」、染色体異常試験では「人種差がある可能性」が示唆されたが、これらの試験はある程度の高濃度下で行われ（染色体異常試験においては試験用量として最高用量）、尚且つ、動物実験ではなく実際のヒトで行われたことによってヒトへの影響を知る上で非常に有用であったと考えられる。以上の知見と日本人の肝臓組織を用いた本研究の結果から、日頃食べている様々な食品中にアクリルアミドが含まれており摂取する機会は本邦でも多いものの、発がん性に関しては当初危惧されていた程の重大な危険性はないと考えられた。

Table 1 Ames 試験の個人差によるグループ分けおよび免疫組織化学の結果

Group	検体#	臨床診断	年齢	性別	免疫組織化学				
					CYP3A	CYP2E1	CYP1A2	Ki-67	Topo II alpha
1	A-3	突然死	70	♂	1+	2+	-	-	-
	A-5	多臓器不全	70	♂	1+	2+	1+	+	+
	A-8	超低出生体重	10	♀	3+	-	1+	+	+
	A-9	超低出生体重	10	♀	3+	1+	1+	-	-
	A-18	拡張型心筋症	40	♂	-	3+	2+	+	+
2	A-14	悪性リンパ腫	70	♂	2+	3+	2+	+	-
	A-17	心奇形	10	♂	2+	2+	2+	+	+
3	A-2	多発性脳梗塞	70	♂	2+	2+	2+	-	-
	A-6	誤嚥性肺炎	50	♂	2+	2+	2+	-	-
	A-12	肺癌	80	♀	3+	3+	2+	-	-
	A-15	骨髄性白血病	80	♀	3+	2+	2+	+	+
	O-4	胆管癌	50	♂	3+	3+	2+	+	+
4	A-1	卵巣癌	40	♀	3+	3+	2+	-	-
	A-4	腎不全	70	♂	3+	3+	2+	-	-
	A-10	突然死	20	♂	3+	3+	3+	-	-
	A-11	間質性肺炎	30	♂	3+	3+	1+	+	+
	A-13	大腸癌	70	♀	3+	3+	3+	-	-
	O-1	肺癌肝転移	70	♂	3+	2+	3+	-	-
	O-2	胆管癌	50	♂	3+	3+	3+	-	-
	O-3	胆管癌	60	♂	3+	3+	3+	-	+
	O-5	胆管癌	70	♂	3+	3+	3+	+	+
O-6	胆管癌	70	♀	3+	3+	3+	-	-	
O-7	胆管癌	60	♂	3+	3+	3+	+	+	

注) 検体#: A-1からA-18は剖検例、O-1からO-7は手術例から採取した。

年齢: 10; 0~19歳、20; 20~29歳、30; 30~39歳、40; 40~49歳、50; 50~59歳、60; 60~69歳、70; 70~79歳、80; 80~89歳

CYP3A, CYP2E1, CYP1A2: -は陰性、1+は弱陽性、2+は中程度陽性、3+は強陽性

Topo II alpha: DNA topoisomerase II alpha

Ki-67, Topo II alpha: -は陰性、+は陽性

Table 2

Results of chromosome aberration test with acrylamide
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
Acrylamide	250		66.9	100	0	2	0	0	0	0	2.0	100	1.0
	500		65.2	100	0	5	1	0	0	0	6.0	100	0.0
	1000	Pooled -human	58.1	100	3	28	29	0	0	0	46.0	100	0.0
CP	6.25		104.1	100	0	2	1	0	0	0	3.0	100	0.0
	12.5		102.1	100	0	1	2	0	0	0	3.0	100	0.0
	25.0		98.8	100	0	1	2	0	0	0	3.0	100	0.0
	50.0		107.4	100	0	1	3	0	0	0	4.0	100	0.0
Saline	0		100.0	50	0	0	0	0	0	0	0.0	50	0.0
Acrylamide	500	Rat	66.9	50	0	1	2	0	0	0	6.0	50	0.0
	1000		51.1	50	3	17	34	0	0	0	76.0	50	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

Time of exposure was 6 hours.

Table 3

Results of chromosome aberration test with acrylamide (Additional study 1)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
CP	100		118.3	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
	150	Pooled -human	83.4	100	1	1	3	0	0	0	4.0	100	0.0
B[a]P	20.0 +		79.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	1.0
	40.0 +		74.5	100	0	1	0	0	0	0	1.0	100	1.0
	80.0 +		75.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	1.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Cyclophosphamide

B[a]P: Benzo[a]pyrene

+: Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Time of exposure was 6 hours.

Table 4

Results of chromosome aberration test with acrylamide (Additional study 2)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		100.0	50	0	0	0	0	0	0	0.0	50	0.0
CP	400		91.6	50	0	3	4	0	0	0	12.0	50	0.0
	800	Pooled -human	83.9	50	1	9	18	0	0	0	48.0	50	0.0
	1000		72.0	50	0	13	27	0	0	0	62.0	50	0.0
AT	1.56		72.5	50	1	2	0	0	0	0	4.0	50	0.0
	3.12		61.5	50	1	4	1	0	0	0	10.0	50	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

CP: Cyclophosphamide

AT: Aflatoxin

Time of exposure was 6 hours.

Table 5

Results of chromosome aberration test with Acrylamide (Sample No.A-6)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0	+	6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
Acrylamide	490	+	6	62.3	100	0	2	0	0	0	0	2.0	100	2.0
	700	+ Human	6	62.6	100	0	7	7	0	0	0	14.0	100	2.0
	1000		6	57.6	100	2	30	36	0	0	0	52.0	100	0.0
CP	1000	+	6	89.2	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
Saline	0		6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	1.0	100	0.0
CP	12.5	Rat	6	90.2	100	0	10	22	0	0	0	27.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

+: Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 6

Results of chromosome aberration test with Acrylamide (Sample No.A-10)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
Acrylamide	490		6	56.6	100	0	1	1	0	0	0	2.0	100	3.0
	700	Human	6	50.6	100	0	4	2	0	0	0	5.0	100	0.0
	1000		6	60.8	100	2	15	26	0	0	0	33.0	100	0.0
CP	1000		6	90.8	100	0	4	1	0	0	0	5.0	100	0.0
Saline	0		6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	1.0	100	0.0
CP	12.5	Rat	6	90.2	100	0	10	22	0	0	0	27.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

Table 7

Results of chromosome aberration test with Acrylamide (Sample No.A-14)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		6	100.0	100	1	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
Acrylamide	490		6	91.1	100	0	4	2	0	0	0	4.0	100	1.0
	700	Human	6	105.6	100	1	12	16	0	0	0	24.0	100	0.0
	1000		6	88.2	100	3	40	52	0	0	0	67.0	100	0.0
CP	1000		6	103.1	100	0	1	0	0	0	0	1.0	100	0.0
Saline	0	Rat	6	100.0	100	1	1	0	0	0	0	1.0	100	0.0
CP	12.5		6	66.7	100	0	9	37	0	0	0	40.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

Table 8

Results of chromosome aberration test with Acrylamide (Sample No.A-15)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
Acrylamide	490		6	74.4	100	0	1	1	0	0	0	2.0	100	13.0
	700	Human	6	98.5	100	1	6	8	0	0	0	13.0	100	4.0
	1000		6	86.5	100	1	20	39	0	0	0	44.0	100	0.0
CP	1000		6	95.8	100	1	2	0	0	0	0	2.0	100	0.0
Saline	0	Rat	6	100.0	100	1	1	0	0	0	0	1.0	100	0.0
CP	12.5		6	66.7	100	0	9	37	0	0	0	40.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

Table 9

Results of chromosome aberration test with Acrylamide (Sample No.A-17)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		6	100.0	100	0	0	1	0	0	0	1.0	100	0.0
Acrylamide	490		6	56.8	100	0	0	2	0	0	0	2.0	100	0.0
	700	Human	6	60.7	100	0	7	4	0	0	0	10.0	100	0.0
	1000		6	57.0	100	2	25	26	0	0	0	40.0	100	0.0
CP	1000		6	86.2	100	0	1	0	0	0	0	1.0	100	0.0
Saline	0	Rat	6	100.0	100	0	0	1	0	0	0	1.0	100	0.0
CP	12.5		6	83.0	100	1	13	31	0	0	0	36.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

Table 10

Results of chromosome aberration test with Acrylamide (Sample No.A-18)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	1.0	100	0.0
Acrylamide	490		6	67.4	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	1.0
	700	Human	6	62.2	100	1	7	5	0	0	0	12.0	100	1.0
	1000		6	58.7	100	1	30	39	0	0	0	47.0	100	0.0
CP	1000		6	100.6	100	0	1	0	0	0	0	1.0	100	0.0
Saline	0	Rat	6	100.0	100	0	0	1	0	0	0	1.0	100	0.0
CP	12.5		6	83.0	100	1	13	31	0	0	0	36.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

Table 11

Results of chromosome aberration test with Acrylamide (Sample No.O-4)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
Acrylamide	490		6	61.8	100	0	1	0	0	0	0	1.0	100	7.0
	700	Human	6	63.4	100	0	6	4	0	0	0	10.0	100	0.0
	1000		6	57.1	100	0	15	15	0	0	0	26.0	100	0.0
CP	1000		6	95.4	100	1	1	1	0	0	0	2.0	100	0.0
Saline	0	Rat	6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
CP	12.5		6	91.5	100	1	13	38	0	0	0	44.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

Table 12

Results of chromosome aberration test with Acrylamide (Sample No.O-5)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
Acrylamide	490		6	63.3	100	0	0	1	0	0	0	1.0	100	1.0
	700	Human	6	64.3	100	0	4	5	0	0	0	8.0	100	1.0
	1000		6	62.7	100	1	23	35	0	0	0	44.0	100	0.0
CP	1000		6	102.5	100	1	3	6	0	0	0	10.0	100	0.0
Saline	0	Rat	6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
CP	12.5		6	91.5	100	1	13	38	0	0	0	44.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

Table 13

Results of chromosome aberration test with Acrylamide (Sample No.O-6)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
Acrylamide	490		6	65.9	100	0	1	0	0	0	0	1.0	100	1.0
	700	Human	6	66.9	100	0	5	1	0	0	0	6.0	100	0.0
	1000		6	61.9	100	1	18	44	0	0	0	46.0	100	0.0
CP	1000		6	93.7	100	0	7	4	0	0	0	11.0	100	0.0
Saline	0	Rat	6	100.0	100	0	0	1	0	0	0	1.0	100	0.0
CP	12.5		6	73.9	100	0	13	32	0	0	0	41.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

Table 14

Results of chromosome aberration test with Acrylamide (Sample No.O-7)
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline	0		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	100	0.0
Acrylamide	490		6	62.0	100	0	4	1	0	0	0	5.0	100	0.0
	700	Human	6	59.2	100	0	4	8	0	0	0	12.0	100	0.0
	1000		6	51.5	100	2	29	41	0	0	0	48.0	100	0.0
CP	1000		6	81.7	100	0	4	3	0	0	0	7.0	100	0.0
Saline	0	Rat	6	100.0	100	0	0	1	0	0	0	1.0	100	0.0
CP	12.5		6	73.9	100	0	13	32	0	0	0	41.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

Saline: Negative control (100 µL/mL)

CP: Positive control (Cyclophosphamide)

Table 15

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-1)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	119	44
		(N.C.)	112 (116)
Acrylamide	1250	103	27
	2500	105 (104)	38 (33)
	5000	83	28
	1	93 (88)	29 (29)
	0.5	82	32
2-AA	0.5	125 (104)	26 (29)
		(P.C.)	1341
P.C.	0.5	1347 (1344)	1174
		—	1089 (1132)

D.W. : Water for injection

N.C. : Negative control

2-AA : 2-Aminoanthracene

P.C. : Positive control

Table 16

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-2)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	111	38
(N.C.)		85 (98)	36 (37)
Acrylamide	1250	111	31
		106 (109)	22 (27)
	2500	103	31
		92 (98)	34 (33)
	5000	97	34
		71 (84)	24 (29)
	1	407	—
2-AA		391 (399)	—
(P.C.)	0.5	—	199
			224 (212)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 17

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-3)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	121	35
(N.C.)		109 (115)	32 (34)
Acrylamide	1250	114	32
		133 (124)	27 (30)
	2500	110	27
		115 (113)	23 (25)
	5000	109	37
		97 (103)	27 (32)
	1	140	—
2-AA		130 (135)	—
(P.C.)	0.5	—	46
			38 (42)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 18

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-4)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	119	36
(N.C.)		100 (110)	34 (35)
Acrylamide	1250	110	31
		110 (110)	30 (31)
	2500	125	33
		110 (118)	44 (39)
	5000	98	23
		102 (100)	29 (26)
	1	1148	—
2-AA		1016 (1082)	—
(P.C.)	0.5	—	631
			741 (686)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 19

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-5)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	104	36
(N.C.)		101 (103)	40 (38)
Acrylamide	1250	109	30
		100 (105)	31 (31)
	2500	117	27
		105 (111)	28 (28)
	5000	111	30
		102 (107)	25 (28)
2-AA	1	124	—
	(P.C.)	130 (127)	37
	0.5	—	25 (31)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 20

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-6)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	116	36
(N.C.)		131 (124)	45 (41)
Acrylamide	1250	146	40
		110 (128)	36 (38)
	2500	115	32
		125 (120)	35 (34)
	5000	101	22
		121 (111)	34 (28)
2-AA	1	418	—
	(P.C.)	403 (411)	260
	0.5	—	272 (266)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 21

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-8)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	119	25
(N.C.)		116 (118)	27 (26)
Acrylamide	1250	119	35
		111 (115)	36 (36)
	2500	107	37
		111 (109)	39 (38)
	5000	114	23
		110 (112)	32 (28)
2-AA	1	186	—
	(P.C.)	168 (177)	42
	0.5	—	37 (40)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 22

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-9)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	129	29
(N.C.)		115 (122)	36 (33)
Acrylamide	1250	96	37
		114 (105)	27 (32)
	2500	120	27
		104 (112)	34 (31)
	5000	104	22
		106 (105)	27 (25)
	1	126	—
2-AA		127 (127)	—
(P.C.)	0.5	—	52
			43 (48)

D.W. : Water for injection

N.C. : Negative control

2-AA : 2-Aminoanthracene

P.C. : Positive control

Table 23

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-10)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	103	32
(N.C.)		114 (109)	37 (35)
Acrylamide	1250	96	33
		118 (107)	31 (32)
	2500	104	19
		94 (99)	25 (22)
	5000	85	34
		106 (96)	23 (29)
	1	1218	—
2-AA		1207 (1213)	—
(P.C.)	0.5	—	950
			992 (971)

D.W. : Water for injection

N.C. : Negative control

2-AA : 2-Aminoanthracene

P.C. : Positive control

Table 24

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-11)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	115	37
(N.C.)		107 (111)	39 (38)
Acrylamide	1250	107	28
		105 (106)	36 (32)
	2500	112	20
		100 (106)	30 (25)
	5000	84	31
		92 (88)	34 (33)
	1	1095	—
2-AA		1155 (1125)	—
(P.C.)	0.5	—	881
			830 (856)

D.W. : Water for injection

N.C. : Negative control

2-AA : 2-Aminoanthracene

P.C. : Positive control

Table 25

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-12)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	108	42
(N.C.)		101 (105)	29 (36)
Acrylamide	1250	102	28
		110 (106)	26 (27)
	2500	103	30
		101 (102)	41 (36)
	5000	113	32
		117 (115)	28 (30)
	1	448	—
2-AA		494 (471)	—
(P.C.)	0.5	—	322
			356 (339)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 26

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-13)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	104	39
(N.C.)		97 (101)	35 (37)
Acrylamide	1250	99	30
		97 (98)	33 (32)
	2500	104	27
		96 (100)	24 (26)
	5000	103	35
		105 (104)	29 (32)
	1	1314	—
2-AA		1205 (1260)	—
(P.C.)	0.5	—	1026
			1073 (1050)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 27

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. O-1)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W.	0	96	31
(N.C.)		114 (105)	26 (29)
Acrylamide	1250	123	30
		136 (130)	37 (34)
	2500	114	35
		124 (119)	29 (32)
	5000	103	28
		96 (100)	30 (29)
	1	1607	—
2-AA		1616 (1612)	—
(P.C.)	0.5	—	1257
			1296 (1277)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 28

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. O-2)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W. (N.C.)	0	130 112 (121)	43 49 (46)
Acrylamide	1250	95 120 (108)	31 35 (33)
	2500	111 106 (109)	28 28 (28)
	5000	112 96 (104)	42 33 (38)
	1	4840	—
2-AA (P.C.)	0.5	4009 (4425) —	3233 4396 (3815)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 29

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. O-3)

Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)	
		Base-pair substitution	Frame-shift mutation
		TA100	TA98
D.W. (N.C.)	0	100 109 (105)	43 48 (46)
Acrylamide	1250	104 97 (101)	39 51 (45)
	2500	96 84 (90)	30 30 (30)
	5000	101 86 (94)	27 33 (30)
	1	3916	—
2-AA (P.C.)	0.5	4212 (4064) —	5505 4858 (5182)

D.W. : Water for injection
 N.C. : Negative control
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 P.C. : Positive control

Table 30

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-14)

S9 mix	Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)		
			Base-pair substitution	Frame-shift mutation	
			TA100	TA98	
Human	D.W.	0	119	40	
			114 (117)	42 (41)	
	Acrylamide	1250	125	37	
			124 (125)	33 (35)	
		2500	141	33	
			137 (139)	28 (31)	
		5000	143	38	
	Rat	DMSO	0	121	26
				116 (119)	29 (28)
		2-AA	1	844	—
910 (877)				—	
2-AA		0.5	—	420	
			—	414 (417)	
2-AA		0.5	363	—	
			331 (347)	—	
2-AA		0.5	—	86	
			—	74 (80)	
2-AA	2.5	186	34		
		163 (175)	45 (40)		
B[a]P	5	171	40		
		164 (168)	45 (43)		
	10	157	38		
		150 (154)	36 (37)		

D.W. : Water for injection
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 B[a]P : Benzo[a]pyrene
 DMSO : Dimethyl sulfoxide

Table 31

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-15)

S9 mix	Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)		
			Base-pair substitution	Frame-shift mutation	
			TA100	TA98	
Human	D.W.	0	105	35	
			92 (99)	43 (39)	
	Acrylamide	1250	109	39	
			135 (122)	43 (41)	
		2500	112	44	
			120 (116)	44 (44)	
		5000	148	32	
	Rat	DMSO	0	121	26
				116 (119)	29 (28)
		2-AA	1	844	—
910 (877)				—	
2-AA		0.5	—	420	
			—	414 (417)	
2-AA		0.5	304	—	
			319 (312)	—	
2-AA		0.5	—	129	
			—	122 (126)	
2-AA	2.5	155	50		
		151 (153)	55 (53)		
B[a]P	5	189	44		
		213 (201)	49 (47)		
	10	201	42		
		224 (213)	47 (45)		

D.W. : Water for injection
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 B[a]P : Benzo[a]pyrene
 DMSO : Dimethyl sulfoxide

Table 32

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-17)

S9 mix	Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)		
			Base-pair substitution	Frame-shift mutation	
			TA100	TA98	
	D.W.	0	133	22	
			127 (130)	23 (23)	
	Acrylamide	1250	103	34	
			122 (113)	24 (29)	
		2500	117	14	
			108 (113)	23 (19)	
		5000	135	20	
			120 (128)	31 (26)	
	Human	2-AA	1	220	—
			0.5	227 (224)	—
—			—	54	
B[a]P		2.5	—	—	47 (51)
			147	28	
		5	136 (142)	37 (33)	
			144	28	
		10	139 (142)	28 (28)	
			143	41	
		144 (144)	23 (32)		
Rat	DMSO	0	100	24	
	2-AA	1	117 (109)	40 (32)	
		789	—		
	0.5	718 (754)	—		
		—	—	340	
	365 (353)	—			

D.W. : Water for injection
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 B[a]P : Benzo[a]pyrene
 DMSO : Dimethyl sulfoxide

Table 33

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. A-18)

S9 mix	Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)		
			Base-pair substitution	Frame-shift mutation	
			TA100	TA98	
	D.W.	0	137	45	
			136 (137)	36 (41)	
	Acrylamide	1250	115	32	
			133 (124)	41 (37)	
		2500	134	48	
			115 (125)	47 (48)	
		5000	124	39	
			131 (128)	44 (42)	
	Human	2-AA	1	195	—
			0.5	178 (187)	—
—			—	51	
B[a]P		2.5	—	—	46 (49)
			107	38	
		5	127 (117)	41 (40)	
			117	27	
		10	111 (114)	28 (28)	
			111	38	
		96 (104)	34 (36)		
Rat	DMSO	0	116	38	
	2-AA	1	102 (109)	24 (31)	
		747	—		
	0.5	788 (768)	—		
		—	—	365	
	332 (349)	—			

D.W. : Water for injection
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 B[a]P : Benzo[a]pyrene
 DMSO : Dimethyl sulfoxide

Table 34

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. O-4)

S9 mix	Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)		
			Base-pair substitution	Frame-shift mutation	
			TA100	TA98	
	D.W.	0	135	39	
			109 (122)	39 (39)	
	Acrylamide	1250	125	26	
			124 (125)	30 (28)	
		2500	119	33	
			91 (105)	31 (32)	
		5000	95	36	
			110 (103)	30 (33)	
	Human	2-AA	1	377	—
			0.5	409 (393)	220
			—	247 (234)	
		2.5	124	39	
			131 (128)	33 (36)	
B[a]P		5	143	32	
			154 (149)	27 (30)	
		10	171	40	
			154 (163)	30 (35)	
Rat		DMSO	0	108	29
			102 (105)	36 (33)	
	2-AA	1	931	—	
		0.5	933 (932)	324	
			—	326 (325)	

D.W. : Water for injection
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 B[a]P : Benzo[a]pyrene
 DMSO : Dimethyl sulfoxide

Table 35

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. O-5)

S9 mix	Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)		
			Base-pair substitution	Frame-shift mutation	
			TA100	TA98	
	D.W.	0	117	31	
			119 (118)	38 (35)	
	Acrylamide	1250	103	32	
			131 (117)	36 (34)	
		2500	100	33	
			89 (95)	33 (33)	
		5000	89	34	
			111 (100)	30 (32)	
	Human	2-AA	1	2743	—
			0.5	2537 (2640)	2235
			—	2052 (2144)	
		2.5	321	80	
			382 (352)	91 (86)	
B[a]P		5	435	74	
			355 (395)	71 (73)	
		10	514	78	
			404 (459)	90 (84)	
Rat		DMSO	0	110	35
			104 (107)	29 (32)	
	2-AA	1	931	—	
		0.5	913 (922)	329	
			—	325 (327)	

D.W. : Water for injection
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 B[a]P : Benzo[a]pyrene
 DMSO : Dimethyl sulfoxide

Table 36

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. O-6)

S9 mix	Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)		
			Base-pair substitution	Frame-shift mutation	
			TA100	TA98	
	D.W.	0	128	35	
			133 (131)	41 (38)	
	Acrylamide	1250	153	39	
			124 (139)	27 (33)	
		2500	138	40	
			148 (143)	35 (38)	
		5000	141	31	
			130 (136)	39 (35)	
	Human	2-AA	1	8387	—
				8405 (8396)	—
		0.5	—	3395	
			—	3245 (3320)	
		2.5	480	68	
			466 (473)	75 (72)	
B[a]P		5	547	86	
			492 (520)	84 (85)	
		10	653	80	
			641 (647)	83 (82)	
Rat	DMSO	0	133	37	
			154 (144)	41 (39)	
	2-AA	1	1312	—	
			1203 (1258)	—	
		0.5	—	468	
			—	550 (509)	

D.W. : Water for injection
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 B[a]P : Benzo[a]pyrene
 DMSO : Dimethyl sulfoxide

Table 37

Results of Ames test with Acrylamide (Sample No. O-7)

S9 mix	Compound	Conc. (µg/plate)	Number of bacterial reverse mutation assays (colony/plate)		
			Base-pair substitution	Frame-shift mutation	
			TA100	TA98	
	D.W.	0	134	39	
			136 (135)	41 (40)	
	Acrylamide	1250	122	35	
			142 (132)	33 (34)	
		2500	132	34	
			126 (129)	35 (35)	
		5000	114	28	
			122 (118)	40 (34)	
	Human	2-AA	1	2046	—
				2008 (2027)	—
		0.5	—	1411	
			—	1741 (1576)	
		2.5	385	76	
			409 (397)	73 (75)	
B[a]P		5	463	68	
			432 (448)	74 (71)	
		10	448	78	
			474 (461)	66 (72)	
Rat	DMSO	0	153	37	
			152 (153)	41 (39)	
	2-AA	1	1203	—	
			1316 (1260)	—	
		0.5	—	447	
			—	517 (482)	

D.W. : Water for injection
 2-AA : 2-Aminoanthracene
 B[a]P : Benzo[a]pyrene
 DMSO : Dimethyl sulfoxide

Table 38 ヒト肝 S9 を用いた Ames 試験のまとめ

検体#	臨床診断	年齢 (歳代)	性別	Ames試験			
				2-AA		Acrylamide	
				TA100	TA98	TA100	TA98
A-1	卵巣癌	40	♀	◎	◎	—	—
A-2	多発性脳梗塞	70	♂	○	○	—	—
A-3	突然死	70	♂	—	—	—	—
A-4	腎不全	70	♂	○	◎	—	—
A-5	多臓器不全	70	♂	—	—	—	—
A-6	膜嚢性肺炎	50	♂	○	○	—	—
A-8	超低出生体重	10	♀	△	△	—	—
A-9	超低出生体重	10	♀	—	—	—	—
A-10	突然死	20	♂	◎	◎	—	—
A-11	間質性肺炎	30	♂	◎	◎	—	—
A-12	肺癌	80	♀	○	○	—	—
A-13	大腸癌	70	♀	◎	◎	—	—
O-1	肺癌肝転移	70	♂	◎	◎	—	—
O-2	胆管癌	50	♂	◎	◎	—	—
O-3	胆管癌	60	♂	◎	◎	—	—

検体#	臨床診断	年齢 (歳代)	性別	Ames試験					
				2-AA		Acrylamide		B[a]P	
				TA100	TA98	TA100	TA98	TA100	TA98
A-14	悪性リンパ腫	70	♂	○	△	—	—	—	—
A-15	骨髄性白血病	80	♀	○	○	—	—	○	—
A-17	心奇形	10	♂	△	○	—	—	—	—
A-18	拡張型心筋症	40	♂	—	—	—	—	—	—
O-4	胆管癌	50	♂	○	○	—	—	—	—
O-5	胆管癌	70	♂	◎	◎	—	—	○	○
O-6	胆管癌	70	♀	◎	◎	—	—	○	○
O-7	胆管癌	60	♂	◎	◎	—	—	○	△

注) 検体#: A-1からA-18は剖検例、O-1からO-7は手術例から採取した。
 年齢: 10; 0-19歳、20; 20-29歳、30; 30-39歳、40; 40-49歳、50; 50-59歳、
 60; 60-69歳、70; 70-79歳、80; 80-89歳
 TA100: DNAの塩基置換型変異、TA98: DNAのフレームシフト型変異
 —: 陰性対照の1.5倍未満, △: 陰性対照の1.5倍以上, 2倍未満,
 ○: 陰性対照の2倍以上, 10倍未満, ◎: 陰性対照の10倍以上

Table 39 採取したヒト肝組織の各試験結果のまとめ

検体#	臨床診断	年齢	性別	免疫組織化学					Ames試験				染色体異常試験			その他		
				CYP3A	CYP2E1	CYP1A2	Ki-67	Topo II alpha	2-AA		Acrylamide		B[a]P		Acrylamide		CP	
									TA100	TA98	TA100	TA98	TA100	TA98	700 (µg/mL)		1000 (µg/mL)	1000 (µg/mL)
A-1	卵巣癌	40	♀	3+	3+	2+	-	-	⊙	⊙	-	-					P, M	
A-2	多発性脳梗塞	70	♂	2+	2+	2+	-	-	○	○	-	-					P, M	
A-3	突然死	70	♂	1+	2+	-	-	-	-	-	-	-					P, M	
A-4	腎不全	70	♂	3+	3+	2+	-	-	○	⊙	-	-					P, M	
A-5	多臓器不全	70	♂	1+	2+	1+	+	+	-	-	-	-					P, M	
A-6	誤嚥性肺炎	50	♂	2+	2+	2+	-	-	○	○	-	-		+	+	-	P, M	
A-7	胎内死亡	10	♀	-	-	-	-	-									死後融解	
A-8	超低出生体重	10	♀	3+	-	1+	+	+	△	△	-	-					P, M	
A-9	超低出生体重	10	♀	3+	1+	1+	-	-	-	-	-	-					P, M	
A-10	突然死	20	♂	3+	3+	3+	-	-	⊙	⊙	-	-		-	+	-	P, M	
A-11	間質性肺炎	30	♂	3+	3+	1+	+	+	⊙	⊙	-	-					P, M	
A-12	肺癌	80	♀	3+	3+	2+	-	-	○	○	-	-					P, M	
A-13	大腸癌	70	♀	3+	3+	3+	-	-	⊙	⊙	-	-					P, M	
A-14	悪性リンパ腫	70	♂	2+	3+	2+	+	-	○	△	-	-	-	-	+	+	-	P, M
A-15	骨髄性白血病	80	♀	3+	2+	2+	+	+	○	○	-	-	○	-	+	+	-	P, M
A-16	突然死	50	♂	3+	3+	3+	-	-										-
A-17	心奇形	10	♂	2+	2+	2+	+	+	△	○	-	-	-	-	+	+	-	P, M
A-18	拡張型心筋症	40	♂	-	3+	2+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	P, M
A-19	突然死	50	♀	3+	3+	2+	-	-										-
A-20	肺癌肝転移	70	♂	-	3+	2+	+	+										-
A-21	肺炎	10	♀	3+	2+	1+	+	+										-
A-22	心不全	10	♀	3+	3+	3+	-	-										-
A-23	突然死	50	♂	-	2+	2+	+	+										-
A-24	骨髄性白血病	30	♂	1+	3+	3+	+	+										-
O-1	肺癌肝転移	70	♂	3+	2+	3+	-	-	⊙	⊙	-	-						P, M
O-2	胆管癌	50	♂	3+	3+	3+	-	-	⊙	⊙	-	-						P, M
O-3	胆管癌	60	♂	3+	3+	3+	-	+	⊙	⊙	-	-						P, M
O-4	胆管癌	50	♂	3+	3+	2+	+	+	○	○	-	-	-	-	+	+	-	P, M
O-5	胆管癌	70	♂	3+	3+	3+	+	+	⊙	⊙	-	-	○	○	+	+	+	P, M
O-6	胆管癌	70	♀	3+	3+	3+	-	-	⊙	⊙	-	-	○	○	+	+	+	P, M
O-7	胆管癌	60	♂	3+	3+	3+	+	+	⊙	⊙	-	-	○	△	+	+	-	P, M
O-8	胆管癌	70	♂	3+	3+	3+	+	+										-
O-9	胆管癌	60	♂	3+	3+	3+	+	+										-
O-10	胆管癌	50	♀	3+	3+	3+	+	+										-

注) 検体#: A-1からA-24は剖検例、O-1からO-10は手術例から採取した。
 年齢: 10; 0-19歳、20; 20-29歳、30; 30-39歳、40; 40-49歳、50; 50-59歳、60; 60-69歳、70; 70-79歳、80; 80-89歳

免疫組織化学
 CYP3A, CYP2E1, CYP1A2: -は陰性、1+は弱陽性、2+は中程度陽性、3+は強陽性
 Topo II alpha: DNA topoisomerase II alpha
 Ki-67, Topo II alpha: -は陰性、+は陽性

Ames試験
 2-AA: 2-Aminoanthracene B[a]P: Benzo[a]pyrene
 TA100: DNAの塩基置換型変異、TA98: DNAのフレームシフト型変異
 -: 陰性対照の1.5倍未満、△: 陰性対照の1.5倍以上、2倍未満、
 ○: 陰性対照の2倍以上、10倍未満、⊙: 陰性対照の10倍以上、空欄: 未実施

染色体異常試験
 CP: Cyclophosphamide
 +: 陽性、 -: 陰性、空欄: 未実施
 その他: PはPCR実施、Mはマイクロアレイ実施

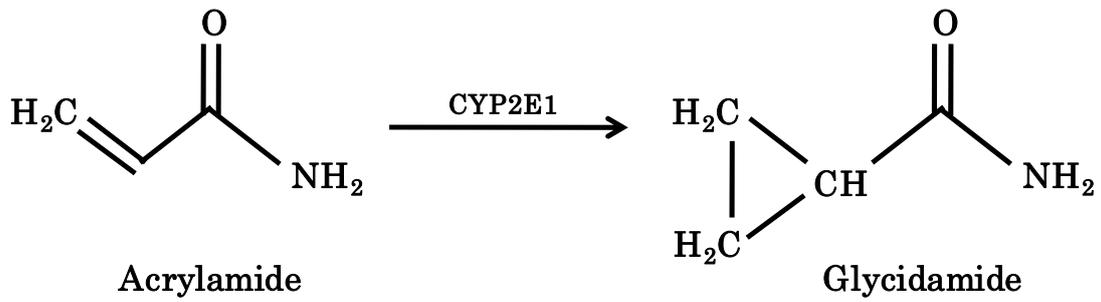
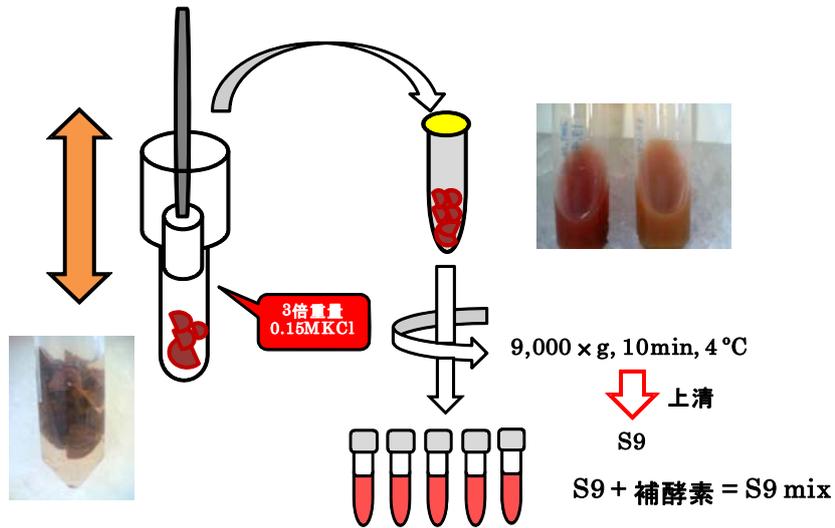
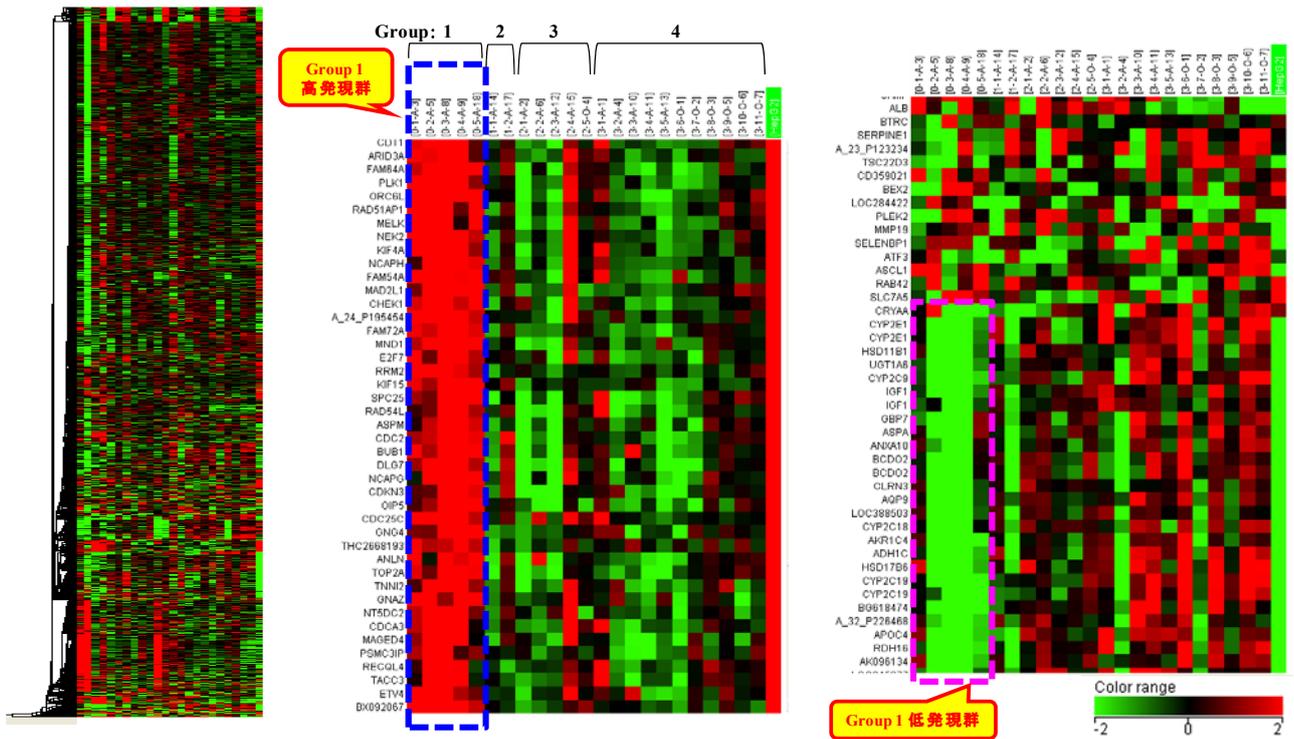


Fig. 1. Acrylamide の CYP2E1 による代謝



試験管内でアクリルアミドを代謝させ、変異原性を調べる

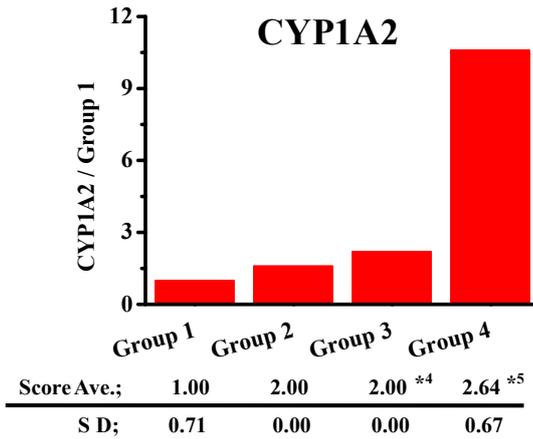
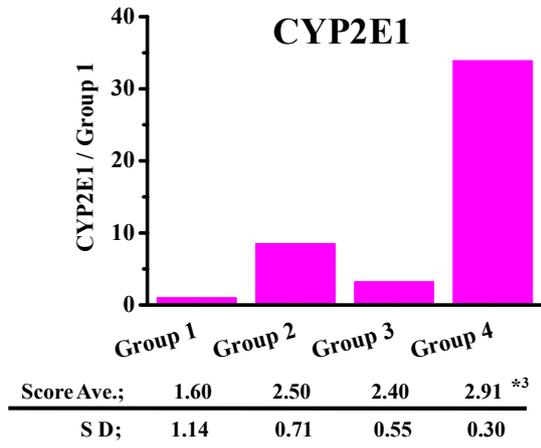
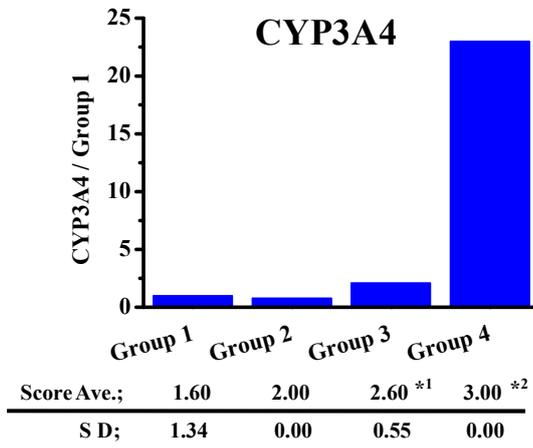
Fig. 2. ヒト肝組織からの S9 mix 調製方法



Ames試験2-AAによるGroup 1: 陰性、2: TA100株またはTA98株のうち一方が陽性、3: 陰性対照の2倍以上10倍未満の陽性、4: 陰性対照の10倍以上の陽性

Fig. 3. ヒト肝組織を用いたマイクロアレイ解析 (クラスター解析結果)

Group 1~4 は Ames 試験で得られた 2-AA の個人差による



*1; $p=0.028$, *2; $p=0.001$, *3; $p=0.00012$, *4; $p=0.014$, *5; $p<0.0001$

Fig. 4. ヒト肝組織を用いたマイクロアレイ解析 (Ames 試験 2-AA の結果でグループ分け)

Group 1 の発現量を 1 とした場合における各 Group の相対発現量

Score Ave. : 各免疫組織化学におけるスコア

Group	Patient #	Raw data	Score
Group 1	A-14	1225	2
	A-15	479	2
	A-17	536	2
	A-18	1040	2
	O-4	1855	2
Group 2	O-5	4463	3
	O-6	8669	3
	O-7	6449	3

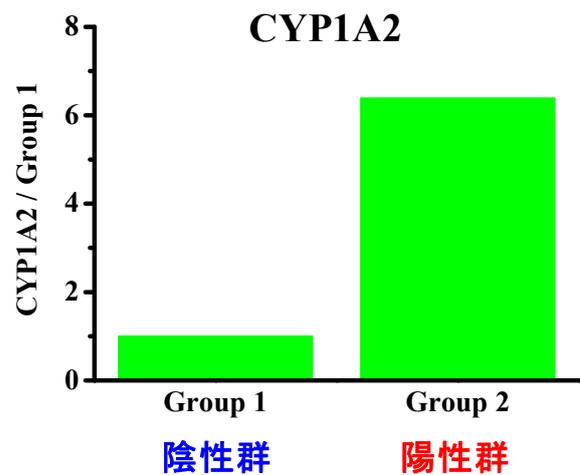


Fig. 5. ヒト肝組織を用いたマイクロアレイ解析 (Ames 試験 B[a]P の結果でグループ分け)

Score : 免疫組織化学におけるスコア

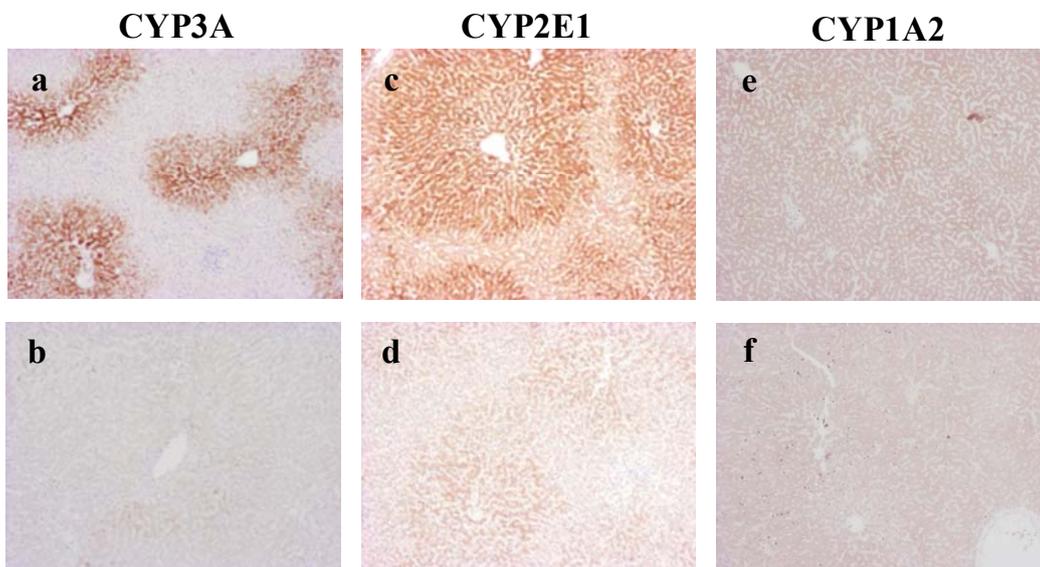


Fig. 6. 正常ヒト肝組織におけるCYP3A、CYP2E1およびCYP1A2の免疫組織化学による個人差
a, CYP3A (3+, # O-6); b, CYP3A (1+, # A-5); c, CYP2E1 (3+, # A-11); d, CYP2E1 (2+, # A-3); e, CYP1A2 (3+, # A-10); f, CYP1A2 (1+, # A-11).

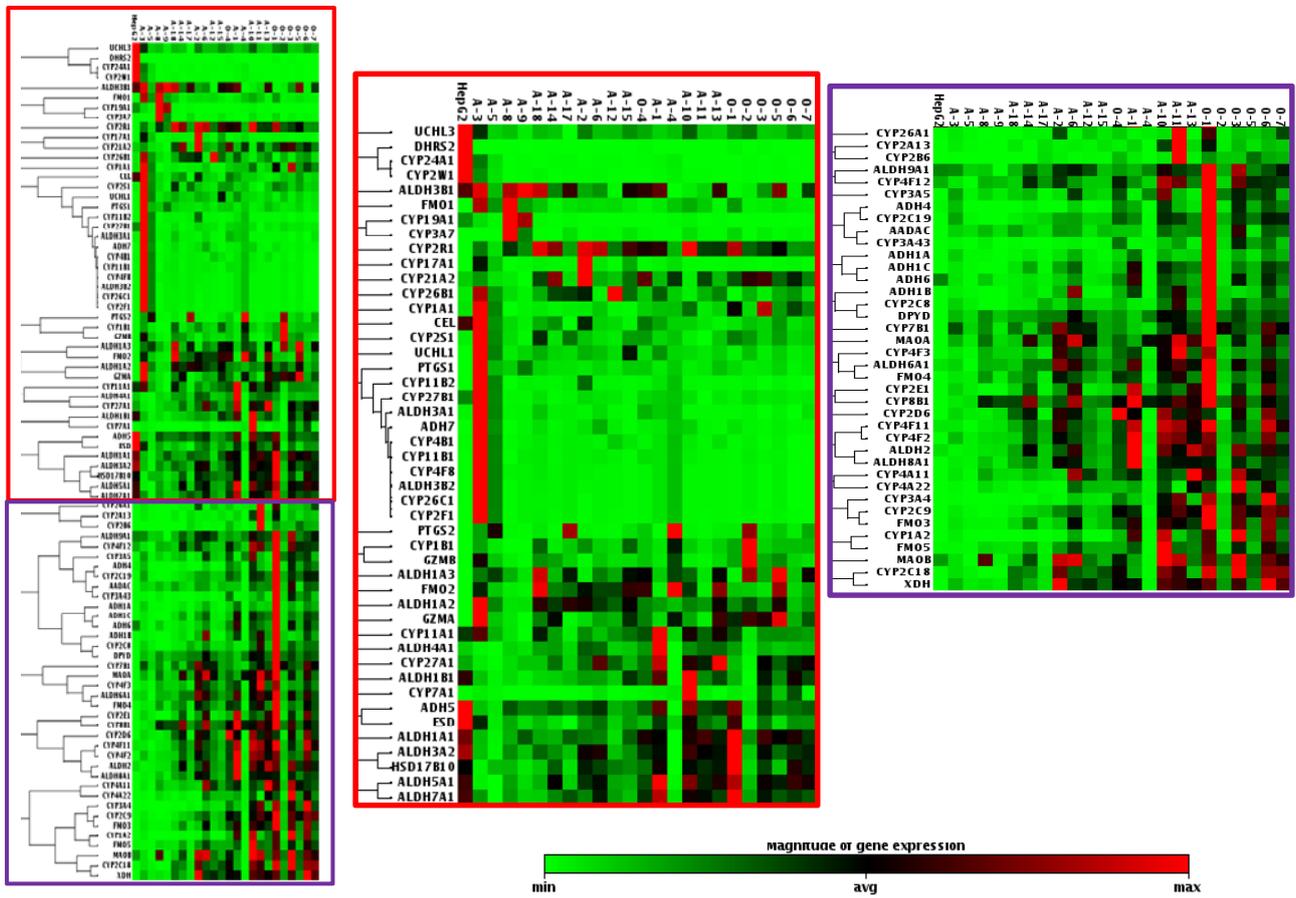


Fig. 7. ヒト肝組織を用いた定量的 PCR による薬物代謝酵素の発現状況 (クラスター解析結果)

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト (論文は、添付すること。)

- 1) Hata S, Miki Y, Fujishima F, Sato R, Okaue A, Abe K, Ishida K, Akahira J, Unno M, Sasano H. Cytochrome 3A and 2E1 in human liver tissue: individual variations among normal Japanese subjects. Life Sci. 86. 2010. 393-401.
- 2) Hata S, Miki Y, Sasano H. Expression of CYP 19A in human liver tissues. (仮題) 2010 年投稿予定
- 3) Miki Y, Hata S, Sasano H. Inter-individual variation in the mutagenic and clastogenic activation of chemicals by human liver. (仮題) 2010 年投稿予定

(3) 特許及び特許出願の数と概要

なし

(4) その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

なし

3 今後の問題点等

本研究において、肝組織のサンプリングは剖検例に多く依存するが、平成 19 年度から平成 21 年度にかけて実施された東北大学病院における病理解剖は年々減少しており、当初見込んだ程の症例数が確保できなかった。今回アクリルアミドの Ames 試験における陽性例の確保はできなかったが、陽性対照物質の個人差や S9 の Quality を考慮すると、試験系として成立していると考えられる為、さらに症例数を増やしても Ames 試験ではアクリルアミド陽性例は確保できないと思われる。しかしながら、Ames 試験とマイクロアレイ解析による代謝機構の個人差について、遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにすることができた。

Ames 試験および染色体異常試験では化学物質によっては試験結果が異なることが知られている。また、ヒト肝 S9 を用いた染色体異常試験での個人差についても多くは検討されていない為、これまでの Ames 試験の結果に加え、染色体異常試験を実施した。しかしながら、染色体異常試験は費用と労力および時間が予想以上に掛かり、10 症例しか実施できなかった。染色体異常試験においては、すべての症例で陽性結果であったが、陽性対照物質において個人差が認められた。実験動物や市販のヒト S9 では得られない実際のヒト肝組織を用いることによって、個人差の大きさが再認識された。