

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500683
 研究課題名（和文） ヒト生体内におけるアクリルアミドの毒性発現および生成に対する食品成分の影響
 研究課題名（英文） Effect of food components on the toxicity and formation of acrylamide in the human body
 研究代表者
 増田 修一 (MASUDA SHUICHI)
 静岡県立大学食品栄養科学部・助教
 研究者番号：40336657

研究成果の概要：食品中発がん物質であるアクリルアミド(AA)を糖尿病発症時及び他の食品を摂取した場合の毒性変動、または AA 生成に対する他の食品素材の抑制効果を検定し、以下の知見を得た。(1)アルコール摂取ラット及び糖尿病ラットに AA を投与したところ、各臓器で遺伝毒性が増強した。(2)アスパラギンとグルコースの混合溶液に緑茶、ワサビを添加し、高温条件下で反応させたところ、AA 生成量は減少した。(3)マウスに AA と緑茶を経口投与したところ、AA の毒性は軽減した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食品衛生学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：アクリルアミド、グリシダミド、変異原性、CYP2E1、アルコール、緑茶、ワサビ

1. 研究開始当初の背景

発がんには変異・発がん物質などの化学的要因、ウイルスを含む生物的要因、紫外線、放射線などの物理的要因が考えられるが、大部分は外因性の環境内化学物質によるもので、日常食品や飲料水、それらに含まれる発がん性物質が重要な因子であると考えられている。現在、がん発症の35%は食事に、30%は喫煙に起因するとされている。特に食品中には焼き焦げ中の発がん物質として知られているヘテロサイクリックアミン (HCAs) やニトロソアミンなどの化学物質が存在していることから、これら変異・発がん物質の

生成機構、食品中含量の測定、ヒトの曝露量及びヒトに対するリスクを評価することは極めて重要である。さらに、これら変異・発がん物質の生成または毒性を抑制する食品素材を探索することはヒトの健康を維持する上で必要である。そこで、本研究では、食品中の変異・発がん物質として知られているアクリルアミド(AA)の生成及び遺伝毒性に対する他の食品成分の影響を検定するために実験を行った。

2. 研究の目的

2002年4月24日、スウェーデン政府は炭

水化物を多く含む食品を焼く、揚げる等の高温調理することにより、高濃度の AA が生成することを報告し、食品中の AA に対する関心が急速に高まり、また、同年 10 月、AA は食品成分であるアスパラギン等のアミノ酸と還元糖からメイラード反応を経由して生成されることが明らかにされた。AA は染色体異常誘発能、発がん性、生殖毒性、神経毒性を示し、国際がん研究機関 (IARC) では、「人におそらく発がん性があるもの」として 2A に分類されている。

ヒト生体内における AA の代謝経路としてグルタチオンとの直接抱合または、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) の作用を受けることでメルカプツール酸誘導体に代謝され、尿中に排泄される経路がある。また別の経路としては、酸化されエポキシ体であるグリンドアミド (GA) へ変換される経路がある。GA は小核試験、コメットアッセイ、不定期 DNA 合成 (UDS) 試験、遺伝子突然変異試験等において AA よりも強い毒性を示し、また DNA に対する反応性も強く、付加体を形成する。このように AA から GA への変換には CYP2E1 が必須であるが、その発現は食事、飲酒、喫煙、薬物等の外的要因により影響を受け、特にエタノール、アセトン、ニコチンの存在下で誘導される。したがって、食生活において飲酒など CYP2E1 活性を増強する因子による AA の毒性変動に影響を調べることは重要である。

一方、食品中の AA の生成にはいくつかの経路が存在する。食品中に含まれる脂質が分解して生成するアクロレインの酸化による経路や、アスパラギン酸から生成したアクリル酸がアンモニアと反応して生成する経路、セリンやシステインなどのアミノ酸から生成した乳酸がアンモニアと反応して生成する経路、アスパラギンの酵素的脱炭酸反応により生成した 3-アミノプロパンアミドが脱アミノ反応して生成する経路などがある。それら経路の中でも特にアスパラギンとグルコースのメイラード反応による主要であるとされている。現在、AA の生成抑制処理法に関する研究が進んでおり、加熱調理法やじゃがいもなど原材料となる食物の栽培品種の改良やその貯蔵法など検討されている。それらの中でも、特に新しい手法として、アミノ酸、タンパク質、炭酸水素塩類等を添加することで、AA の生成が抑制されるという新しい成果が報告されている。また、他の食品素材である植物抽出物が AA の生成を抑制効果することも報告されている。一方、静岡県の特産物で知られている緑茶の主要成分としてカテキン類は、発がん抑制作用、抗腫瘍作用、突然変異抑制作用、活性酸素消去作用、抗酸化作用、血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制作用など、多くの機能性を示す

ことが知られている。さらに、カテキン類の機能の一つとして、薬物代謝酵素シトクローム P450 による代謝活性化の抑制が報告されており [54]、この作用はカテキン類の抗がん作用メカニズムの一つであると考えられている。これらのことより、静岡県産地場産品である緑茶やワサビ等が AA の生成や毒性発現に対し、抑制効果を示すことが考えられる。

本研究では、AA の遺伝毒性や生成に対して、変動及び抑制作用を示す食品成分の作用を検定するために以下の研究を行った。

3. 研究の方法

①アルコール摂取時における AA の遺伝毒性の変動

ICR マウス(8 週齢、♂)に 5、10、20%エタノール水溶液を 3 日間自由摂取させた後、AA(10mg/kg BW)を強制経口投与した。投与 24 時間後に採血および肝臓の摘出を行った。小核試験は以下の方法により行った。採取した血液をスライドガラスにのせ、直ちにカバーガラスをかぶせ均一に広げ、固定した。作製した標本を 4°C で 1 晩静置した後、蛍光顕微鏡(Blue 励起)を用いて、赤色の蛍光を発する幼若な網赤血球 1000 個につき、緑色の蛍光を発する小核を有する幼若赤血球の数を計測した。また、コメットアッセイにおいては、血液を等量の 30 mM EDTA-0.9% KCl 溶液で希釈し、試料とした。さらに、摘出した肝臓を切り取り、30 mM EDTA-0.9% KCl 溶液を加え、ホモジナイズした後、上清を試料とした。0.7% 寒天溶液でプレコートしたスライドガラス上に細胞試料と 1.4%アガー溶液を 1:1 で混合した細胞混濁液 65µl を滴下し、アガーを広げて静置した。固化後、1.4%アガー溶液と PBS-を 1:1 で混合した混合液を滴下し、同様にアガーを広げて静置した後、標本とした。Lysing solution 中に細胞標本を浸し、氷上で 1 時間以上静置し、水平型電気泳動槽に標本を並べ、細胞 DNA の unwinding とアルカリ不安定性部位発現のために 10 分間静置した。電気泳動後、アルカリ分を中和用緩衝液で中和し、100%エタノールで完全に脱水した。ethidium bromide 溶液を滴下し、カバーガラスをかけて、画像解析装置 (Comet Analyzer、YOU WORKS) を取り付けた蛍光顕微鏡 (Nikon) を用いて G 励起で観察した。スライド 1 枚につき、細胞 50 個をカウントし、Tail moment と Tail length を求めた。

CYP2E1 活性測定は、クロルゾキサゾンによる方法を用いた。0.5M リン酸カリウム緩衝液、クロルゾキサゾン溶液、肝ミクロソームを混合し、37°C、2 分間インキュベートした。NADPH 生成系を添加し、

37°Cで5分間インキュベートした。インキュベート後、氷冷アセトニトリルを添加し、反応を止めた。7-水酸化クマリンを添加し、5分間遠心し、上清をHPLC分析の試料とし、生成した7-水酸化クマリンを定量した。7-水酸化クマリン量を反応時間・蛋白量で除して、CYP2E1活性を求めた。

②in vitro メイラード反応モデル系におけるアクリルアミド生成に対する静岡県地場産品の抑制効果

D-グルコース、アスパラギンを200mMリン酸緩衝液に溶解し、この混合液を200mMリン酸緩衝液でさらに10倍希釈し、メイラード反応モデル溶液とした。反応モデル溶液に緑茶抽出物、POLYPHENOLS、わさび根茎抽出物、わさび葉抽出物、AIT標準品を加えて、121°Cで1時間オートクレーブを用いて加熱反応させた。反応液に内部標準として13C AAを添加し、コンディショニング済みのOasis-HLBカートリッジ、Oasis-MAXカートリッジを連結して、反応溶液を通水した。Oasis-HLBを外し、Oasis-MAXカートリッジにメタノールを流して、溶出液を回収した溶出液をLC/MS/MS分析用試料とし、生成したAA量を測定した。

③静岡県地場産品のAA誘導遺伝毒性に対する抑制効果

ICRマウスを1週間馴化させた後、AAまたはAA+緑茶抽出物溶液を経口投与した。また、陰性対照(control)としてMilliQ水、陽性対照にはMMCを投与した。AA及び緑茶抽出物投与24時間後に尾静脈より血液を採取し、スライドガラスにのせ、直ちにカバーガラス(MATSUNAMI)をかぶせ均一に広げ、固定した。作製した標本を4°Cで1晩静置した後、蛍光顕微鏡(Blue励起)を用いて、赤色の蛍光を発する幼若な網赤血球1000個につき、緑色の蛍光を発する小核を有する幼若赤血球の数を計測した。また、骨髄においては、試料投与24時間後にと殺し、左右の大腿骨を取り出し、牛胎児血清で骨髄を勢いよくエッペンチューブ洗い出した。遠沈後、沈澱:上澄み=1:1になるよう上澄みを除去し、残った血清と沈澱を単細胞浮遊液になるまでピペティングした。スライドガラスに細胞浮遊液を滴下し、血球計算盤用の厚手のカバーガラスを用いて塗布した。次いで70%エタノールに10分間漬け、固定した。作製した標本を常温で一晩乾燥させた後、0.0025%AO溶液を滴下し、直ちにカバーガラスをかけた。蛍光顕微鏡(Blue励起)を用いて、赤色の蛍光を発する幼若な網赤血球1000個について、緑色の蛍光を発する小核を有する幼若赤血球の数を計測した。

4. 研究成果

①エタノール摂取時におけるAAによる染色体異常誘発能を末梢血を用いた小核試験で検定した。各濃度のエタノール+AA投与群においては対照群に比較して有意な値の増加がみられ、10%エタノール+AA投与群および20%エタノールAA投与群においては、有意な値の増加がみられ、エタノール濃度依存的に小核誘発能の増加が観察された。肝臓におけるDNA損傷性をコメットアッセイで検定したところ、Tail lengthの結果においては、5%および10%エタノール単独投与群では、対照群に比較して有意差は認められず、DNA損傷は見られなかった。しかし、20%エタノール単独投与群、AA単独投与群、各濃度のエタノール+AA投与群においては、対照群に比較して有意な上昇がみられた。また、AA単独投与群と比較して、5%エタノール+AA投与群は、有意な値の差が見られなかったが、10%エタノール+AA投与群と20%エタノール+AA投与群においては、有意な値の増加が見られ、DNA損傷性が増強された。Tail momentの結果では、5%エタノール単独投与群では対照群に比較して有意な値の変化はみられず、DNA損傷は観察されなかったが、10%、20%エタノール単独投与群においては対照群に比較して有意な値の増加がみられ、DNA損傷性が観察された。AA単独投与群と比較して、5%エタノール+AA投与群、10%エタノール+AA投与群においては有意な値の差は観察されなかったが、20%エタノール+AA投与群においては、有意な値の増加がみられ、DNA損傷の増強が観察された。エタノール摂取によるCYP2E1活性の変動をクロルゾキサゾンを用いて検定した。対照群に比較して、5%エタノール投与群において有意な変化は見られなかったが、10%エタノール投与群、20%エタノール投与群においては有意なCYP2E1活性の上昇が見られた。その活性はエタノール濃度依存的に上昇し、10%エタノール投与群においては対照群の約2.11倍、20%エタノール投与群においては、約2.96倍のCYP2E1活性の上昇が観察された。

②メイラードモデル反応液中でのAAの生成に対する緑茶抽出物の抑制効果を調べたところ、緑茶抽出物の添加濃度が0.02mg/mlで55.2%、0.2mg/mlで87.4%、2.0mg/mlで89%、20mg/mlで99%、AAの生成が阻害された。メイラードモデル反応液中でのAAの生成に対するカテキン混合物であるPOLYPHENOLSの抑制効果においては、添加濃度が0.02mg/mlで25.7%、0.2mg/mlで5.1%、2.0mg/mlで39.6%、20mg/mlで73.9%、AAの生成が阻害された。わさび根茎抽出物の抑制効果は、わさび根茎水面分において、添加濃度が0.02mg/mlで46.8%、0.2mg/ml

で49.9%、2.0mg/mlで39.4%、AAの生成が阻害された。また、エーテル画分においては、添加濃度が0.02mg/mlで40.6%、0.2mg/mlで63%、2.0mg/mlで89.7%、AAの生成が阻害された。わさび葉抽出物の抑制効果は、わさび葉水面分においては、添加濃度が0.02mg/mlで23%AAの生成が増加した。0.2mg/mlで45%、2.0mg/mlで55%、AAの生成が阻害された。また、エーテル画分においては0.02mg/mlで72.5%、0.2mg/mlで62%、2.0mg/mlで53.9%、AAの生成が阻害された。AIT標準品の抑制効果は、添加濃度が0.002mg/mlで8%、0.02mg/mlで92%、0.2mg/mlで99%、AA生成が阻害された。

③末梢血におけるAAの小核誘発頻度に対する緑茶の抑制効果を調べたところ、AA投与群の小核誘発頻度はcontrol群に比べ有意に上昇したが、GTを50mg/kg BW投与した場合、小核誘発頻度はAA投与群に比べ有意に減少した。GT20mg/kg BW投与群では、小核誘発頻度が減少する傾向が見られた。骨髄におけるAAの小核誘発頻度及び、それに対する緑茶の抑制効果を調べたところ、GT20、GT50及びGT100mg/kg BW投与群の小核誘発頻度はAA投与群に比べ、有意に減少した。

以上の結果より、

- ① アルコール摂取時では、生体内において薬物代謝酵素であるCYP2E1の活性が増強することから、AAが代謝活性化を受け、より毒性の強いGAに変化することが明らかになった。
- ② グルコースとアスパラギンのメイラード反応モデル溶液に、緑茶またはわさび抽出物を添加すると、AA生成量が減少した。また、緑茶の含有成分であるカテキン類、わさびの含有成分であるAITを反応液に添加すると、AAの生成量は減少した。
- ③ マウスにAAと緑茶抽出物を同時に摂取させると、小核誘発頻度が有意に減少した。それ故、緑茶にはAAが発現する染色体異常に対し、抑制効果を示すことが明らかとなった。

現在、食品中で生成及び混在しているAAのヒトに対する安全性が大きな問題となっている。本研究結果より、AA暴露時にアルコールや緑茶等他の食品成分・素材を同時に摂取することにより、その遺伝毒性が大きく変動することが明らかになった。また、ポテトチップやフライドポテト生産時における加熱処理過程において、緑茶、わさび等を添加することにより、AAの生成を抑制することが明らかになった。

これらの知見は、AAのヒトの健康に対する影響を、他の食品素材の機能性や食習慣の影響という観点から明らかにしたものであ

り、これまでにこのような成果を出した研究報告はない。また、今回の成果では、食品加工技術分野においても、新たな有益な情報を提案している。したがって、今後他の食品中化学物質の安全性評価や食品加工分野で更なる発展が期待できると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Deguchi, Y., Wu, N.X., Toyoizumi, T., Masuda, S., Nagaoka, H., Watanabe, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Kinae, N.: Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity, *Environ. Toxicol.* 23(6) 720-727 (2008)、査読有
- ② Oya-Ito, T., Naitou, H., Masuda, S., Kinae, N., Ohashi, N. : Functional analyses of neutrophil-like differentiated cell lines under a hyperglycemic condition, *Molecular Nutrition and Food Research.*, 52(3), 360-369 (2008)、査読有
- ③ Toyoizumi, T., Deguchi, Y., Masuda, S., Kinae, N.: Genotoxicity and estrogenic activity of 3,3'-dinitro-bisphenol A in goldfish, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(8), 2118-2123 (2008)、査読有
- ④ Kinae, N., Oguni, I., Takabayashi, F., Masuda, S.: Effect of tea extracts on gastric mucosal erosion and hemorrhage in *Helicobacter pylori* infected Mongolian Gerbils, *J. Clin. Biochem. Nutri.*, 43, 22-23 (2008)、査読有

[学会発表] 計 (3) 件

- ① 小山直己、ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価、日本環境変異原学会第37回大会、2008年12月5日、沖縄県
- ② 平野元美、糖尿病発症時におけるアクリルアミドの遺伝毒性の変動、日本環境変異原学会第37回大会、2008年12月5日、沖縄県
- ③ 田里李奈、糖尿病誘発ラットにおけるニトロソアミンの生成と毒性変動に関する基礎的研究、日本環境変異原学会第37回大会、2008年12月5日、沖縄県

[図書] (計 2 件)

- (1) 増田修一、木苗直秀、フジメディカル出版、**Functional Food** —機能性食品の基礎から臨床へ— 2.糖尿病と機能性食品

(2008)、p12-16

- (2) 木苗直秀、増田修一、産業技術サービスセンター、食品機能性の科学、アブラナ科野菜(イソチオシアネートの生理活性)、「ワサビの生理的効果」、「アブラナ科野菜の安全性」「栄養への影響」(2008)、p252-266

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

増田 修一 (MASUDA SHUICHI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：40336657

(2)研究分担者

木苗 直秀 (KINAE NAOHIDE)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：20500711

(3)連携研究者