

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K00571

研究課題名(和文) 小型魚類を用いたアクリルアミドの毒性研究：小胞体ストレスとDOHaDの視点から

研究課題名(英文) Toxicological studies of acrylamide in small teleost: Perspectives for endoplasmic reticulum stress and DOHaD.

研究代表者

蒋池 勇太 (Komoike, Yuta)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70386556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アクリルアミドはさまざまな毒性が懸念されているが、高温調理により食品中で生成される身近な有害化学物質として認知されつつある。しかし、食品に含まれる程度の濃度での毒性は、実験研究的には明らかにされていなかった。そこで、食品中の含量に相当する低濃度アクリルアミドを含む餌をゼブラフィッシュ成魚に約1か月間与えたところ、外見上の異常は観察されなかったが、脾臓が著しく肥大し、嚢胞形成、異常なヘモジデリン鉄の蓄積、炎症、マクロファージの泡沫化、感染の可能性、サイトカイン遺伝子の発現増加など、免疫系の亢進を伴う毒性が脾臓で発現することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、食を介したアクリルアミドの摂取によって健康影響が生じること、アクリルアミド曝露により脾毒性が生じることを明らかにした最初の実験による根拠を示すものである。また、ゼブラフィッシュの脾臓に注目した研究報告が極めて少なく、毒性学的な見地に立った報告はこれが初めてである。さらにゼブラフィッシュの脾臓マクロファージについては、その存在も含め一切報告がなかったが、本研究によって初めてその存在が強く示唆され、かつ、細胞表面抗原発現にヒトをはじめとする哺乳類との類似性が見られることが示された。

研究成果の概要(英文)：Acrylamide (AA) has recently been recognized as an immediate hazardous chemical compound owing to its various toxicities and unavoidable contamination of certain daily foods prepared at a high temperature. AA in foods is thus a worldwide concern; however, its toxicity at the dietary relevant concentration has yet to be experimentally elucidated. To determine whether dietary AA intake causes adverse health effects, adult zebrafish were fed a diet containing AA at a relevant dose for one month. Although AA-fed zebrafish showed no superficial abnormalities, the intake of AA-containing food caused splenic damages, including cyst formation, hemorrhage, and inflammation, which were accompanied by immune responses as indicated by the appearance of a melanomacrophage center, activation of macrophages, and upregulation of major inflammatory cytokines in the spleen. Collectively, for the first time, we provided experimental evidence of the splenic toxicity caused by dietary AA intake.

研究分野：環境毒性学

キーワード：アクリルアミド ゼブラフィッシュ 脾臓

1. 研究開始当初の背景

(1) アクリルアミド

モノアクリルアミド(以下アクリルアミド)は、さまざまな製品の原料として広く用いられている一方、神経毒性が古くから知られ、発がん性、遺伝毒性が懸念されている。近年、「イモ類などの炭水化物を多く含む食材を高温で調理することによりアクリルアミドが生成される」という驚くべき報告¹がなされ、「食の安全」への意識の高まりとともに、「誰もが曝露される身近な有害化学物質」として広く認知されるようになりつつあった。本研究課題採択の前年、(平成28年)には、内閣府食品安全委員会が加熱時に生じるアクリルアミドに係る食品健康影響評価の結果を政府に通知し、加工食品中のアクリルアミドに係るファクトシートが更新されるなど、国民に向けての公表がなされた。このように、アクリルアミドによる健康影響への関心は日ごとに高まってはいたが、その毒性発現機序についてはほとんど明らかにされていなかった。当時の先行研究の大部分は、急性中毒に該当するような高濃度での曝露の影響を検討したものであり、加工食品中のアクリルアミドのリスクを正確に評価するためには、食品に含まれるのと同程度に微量で、かつ長期的な曝露による毒性に関する情報がより多く必要であると考えられた。また、遺伝毒性が懸念されていることから、妊婦の摂食による胎児への影響についても検討されるべきであるが、アクリルアミドによる継世代影響に関する研究成果は全く報告されていなかった。

(2) 小胞体ストレス応答

小胞体は、タンパク質の品質管理を行うなど、多くの生理機能を有する細胞内小器官である。虚血、低酸素、熱ショックなどのストレスを受けた細胞は、小胞体内に立体構造異常タンパク質が蓄積する「小胞体ストレス」の状態を呈する。細胞は、翻訳停止による小胞体内タンパク質量の抑制→異常タンパク質の構造を修復する小胞体シャペロンの発現→異常タンパク質の小胞体依存的分解を順次行い小胞体ストレスを減弱させるが、ストレスが細胞の許容を超える時には、アポトーシスによる細胞死を誘引し、ストレスにさらされた細胞自体を除去する²。この一連の「小胞体ストレス応答」により、小胞体は環境ストレスに応答するセンサーとして機能を有すると考えられているが、有害化学物質の毒性発現機序への小胞体ストレス応答の関与に着目した環境毒理学的研究は少なく、さらに、モデル動物を用いて行われた研究は申請者らによる2報の先行研究^{3,4}のほかにはほとんど例がなかった。

(3) DOHaD 説

1980年代後半、Barkerらは「低出生体重児はその成人期において、心血管障害を原因とする死亡リスクが高くなる」というBarker仮説を提唱した⁵。その後、今世紀初頭にGluckmanらはこの仮説を「胎生期・乳幼児期の環境が将来の健康と疾病罹患を規定する」というDevelopmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 仮説へと拡大させた⁶。以来、疫学研究を中心とした成果により、現在では「仮説」の域を超え「定説」となりつつある。一方、実験的研究については盛んに行われているとは言い難く、代表的なモデル動物であるげっ歯類を用いた研究成果ですら、本研究の助成申請当時では20報を数える程度であった。また、DOHaD説は、例えば栄養状態や化学物質や物理的因子への母胎内曝露など、発生期におけるさまざまな環境要因に広く適用できる概念であるが、実際には低栄養に関する研究がほとんどで、発生期の有害化学物質への曝露に関するDOHaD説に基づいた研究は少なかった。

2. 研究の目的

上述のように、アクリルアミドは食を介して誰もが曝露されうる身近な有害化学物質である。申請者はその先行研究の中で、環境毒理学の立場から、高濃度アクリルアミドの曝露による生体影響についてゼブラフィッシュを用いて検討し、細胞保護・細胞傷害の両方に重要な働きを持つ小胞体ストレス応答を介して神経毒性が発現していることを初めて明らかにした⁴。本研究では、申請者のそれまでの成果を発展させ、ゼブラフィッシュをモデル動物として用い、人々が実際に曝露されうる程度に低濃度なアクリルアミドの曝露による生体影響について明らかにすることを目的とした。具体的には、(1)低濃度アクリルアミドの慢性曝露により小胞体ストレス応答を介した神経毒性が発現するか？(2)低濃度アクリルアミドの曝露は、近年多くの疾患の発生機序においてその重要性が認識されつつあるDOHaDによりどのような継世代影響を及ぼすのか？という二点を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

(1)低濃度アクリルアミド慢性曝露により小胞体ストレス応答を介した神経毒性が発現するか？

アクリルアミドの曝露条件

低濃度アクリルアミドの神経毒性について注目するため、ゼブラフィッシュで形態学的に脳が十分完成している受精後1ヶ月程度の幼魚から、受精後3ヶ月程度の性成熟した成魚までを対象とする。曝露するアクリルアミドの濃度は、国連コーデックス委員会が2004年に開催したコーデックス食品添加物汚染物質部会におけるディスカッションペーパー⁷に示された食品中のアクリルアミド含量を参考にし、ゼブラフィッシュ飼育水中の濃度を調整し曝露する。脳の構造的な傷害およびアポトーシスによる神経細胞死を指標として、曝露する濃度と曝露の継続時間の組み合わせを決定する、という当初の予定であったが、のちに詳述する通り、飼育水ではなく餌を介した曝露に変更した。

小胞体ストレス応答経路の活性化

小胞体ストレス応答の経路には PERK-eIF2 経路、IRE1 経路、ATF6 経路が知られているが、本研究では PERK-eIF2 経路と IRE1 経路の活性化、小胞体ストレス応答のアウトプットとして GRP78、GRP94、CHOP の発現に注目し、これらのタンパク質あるいはリン酸化タンパク質を脳の切片に対する免疫染色法により検出する予定であったが、タンパク質ではなく遺伝子発現解析を中心とした計画に変更した。

(2)低濃度アクリルアミドの曝露は、DOHaD によりどのような継世代影響を及ぼすのか？

アクリルアミドの曝露条件

ゼブラフィッシュの発達段階において哺乳類の着床から出生までに相当する、胞胚期中期の受精後約3時間から幼生前期の受精後7日までの間、継続的に曝露を行う。ゼブラフィッシュは受精後わずか2~3日で胚発生を終え孵化するが、孵化後4~5日までは卵嚢の栄養を吸収する従属栄養期であるため、魚類における孵化の生物学的意味は哺乳類の出生とは異なり、出生に相当するのは、自立摂食を始める幼生前期であると考えられる。アクリルアミド曝露濃度を食品中に含有される範囲に段階的に調整し、7日間曝露したのち、下記で異常が観察される濃度と観察されない濃度の範囲をそれぞれ決定し、観察されない濃度の範囲での検討を行う。

曝露直後の異常

曝露を終えた直後の幼生に、検出可能な何らかの異常が生じているかについて、行動異常、全身的な形態異常、器官・組織の形態異常、細胞毒性に絞り検討し、異常が観察される濃度と観察されない濃度の範囲をそれぞれ決定する。

成長後の異常

上記で決定した、曝露直後に異常が観察されない濃度のアクリルアミドに7日間曝露した幼生を、アクリルアミドの非存在下で1~3ヶ月飼育し、の各項目について同様に検討する。ただし、器官・組織の形態異常については、特にの解析により異常が観察された器官を摘出し、その切片を組織染色して検討する。

4. 研究成果

(1)低濃度アクリルアミド慢性曝露により小胞体ストレス応答を介した神経毒性が発現するか？

本研究では当初、飼育水を介してゼブラフィッシュを低濃度アクリルアミドに慢性曝露する計画を立て、飼育水中のアクリルアミド濃度を一定に保ちながら濾過する飼育装置を製作して用いる予定であったが、濾過を行うと、飼育水中のアクリルアミド濃度が速やかに、かつ著しく低下してしまうことが明らかになった。そこで、当初のアクリルアミドを飼育水に混和して曝露する計画は断念し、アクリルアミドをゼブラフィッシュに活餌として与えるアルテミアの幼生に取り込ませる方法を新たに検討し、確立することに成功した。このアルテミア幼生を給餌することにより、アクリルアミドを安定的に曝露することが可能になったとともに、食事による曝露をより忠実に再現することも可能となった。そこで、過去に報告された各種食品単位重量当たりのアクリルアミド含量から、最も高含量な食品として知られているフレンチフライ中の含量12.8 mg/kgに相当するアクリルアミドを取り込んだアルテミア幼生を調製し、給餌曝露実験を行うこととした。

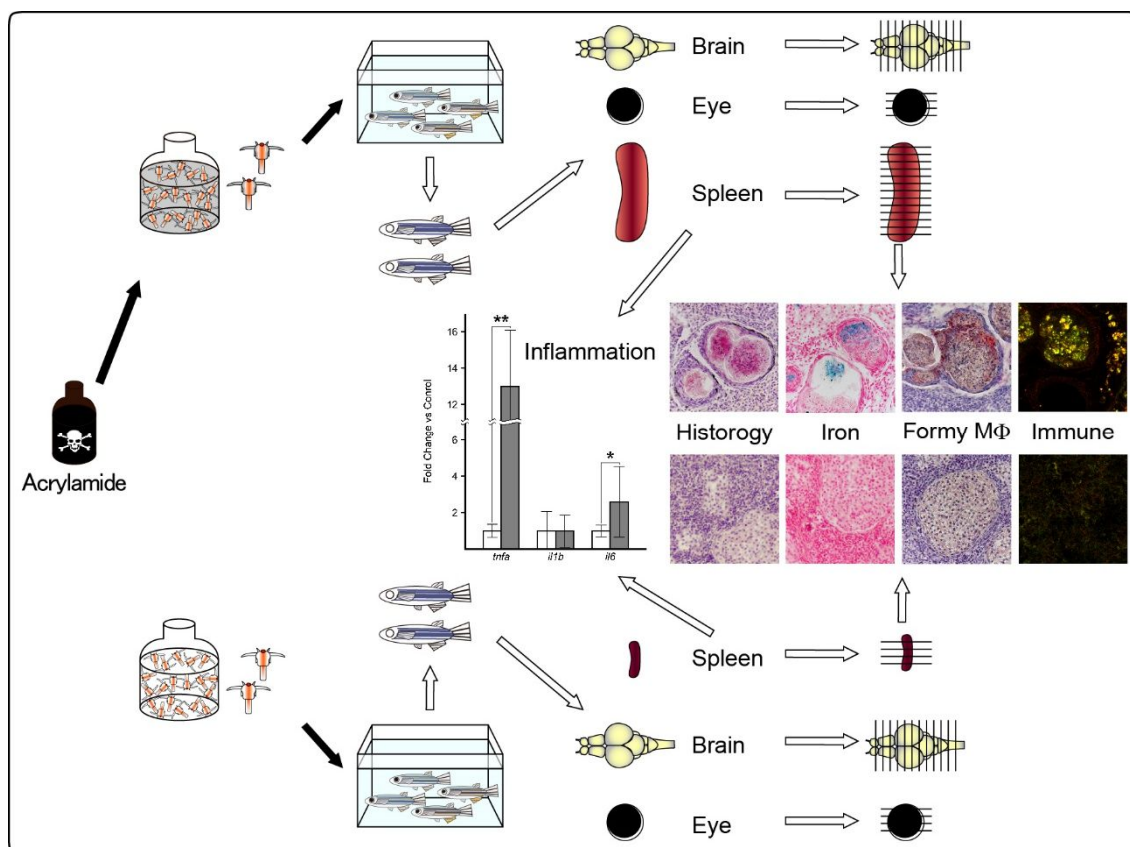
このアクリルアミドを取り込んだアルテミア幼生を、ゼブラフィッシュ成魚に1か月間給餌することによる低濃度アクリルアミド慢性曝露を独立に3回試行し、中枢神経系器官である脳および網膜を摘出し、小胞体ストレス応答関連遺伝子とそれと密接な関係のある酸化ストレス応答関連遺伝子、そのほかの細胞ストレス応答関連遺伝子、さらには炎症性サイトカインを含む

炎症反応関連遺伝子について、その発現変化をリアルタイム PCR 法により検討した。その結果、あくまで今回の曝露条件下では、中枢神経系において有意な遺伝子発現変化は見られなかった。そこで、摘出後に固定保存しておいた脳と網膜からパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン染色を行い、形態レベルでの組織の異常についても検討したが、いずれも明確な異常を確認することはできなかった。

一方、脳および網膜を摘出する際に、そのほかの器官についても観察および試料採集を行ったが、腹腔内臓器のうち脾臓に劇的な形態変化が生じることを見出した。そこで、摘出した脾臓について、小胞体ストレス応答関連遺伝子、酸化ストレス応答関連遺伝子、炎症性サイトカインを含む炎症反応関連遺伝子について発現解析を行うとともに、ヘマトキシリン-エオシン染色、Prussian blue 染色(鉄染色)、Oil red O 染色(脂肪染色)による組織染色および免疫組織化学法を用いて、組織形態学的、病理学的に検討した。その結果、重篤な脾嚢胞形成、出血に起因する異常なヘモジデリン鉄の蓄積、マクロファージの泡沫化、感染への脆弱性の増加、炎症とそれに伴うサイトカイン遺伝子の発現増加など、免疫系の亢進を惹起する毒性が脾臓で発現することを見出し、アクリルアミドの摂食により脾毒性が引き起こされることを明らかにした。この結果は英文原著論文として纏め、Environmental Health 誌にて発表した⁸。この成果はいくつかの全く新しい発見を含んでいる。第一に、アクリルアミドの脾毒性は、疫学研究でも高濃度曝露の動物実験でも報告されておらず、本研究のように普通の食事を介したアクリルアミド摂取を模した低濃度給餌曝露によって初めて明らかにされたものである。第二に、そもそもゼブラフィッシュの脾臓に注目した研究報告が極めて少なく、毒性学の見地に立った報告は申請者の知る限り、これが初めてである。そして第三に、ゼブラフィッシュを含め魚類については言うまでもなく、哺乳類以外の動物の組織マクロファージに関する研究はほとんど行われておらず、特に、ゼブラフィッシュの脾臓マクロファージについては、その存在も含め一切報告がなかったが、本研究によって初めてその存在が強く示唆され、かつ、細胞表面抗原である CD11b の発現にヒトをはじめとする哺乳類との類似性が見られることが示された。

(2)低濃度アクリルアミドの曝露は、DOHaD によりどのような継世代影響を及ぼすのか？

食品中に含有されうる範囲内の数段階の濃度でアクリルアミドを含む飼育水を調製し、受精後 3 時間から 7 日まで曝露を行ったが、先述した最も多くアクリルアミドを含む食品中の含量である 12.8 mg/kg に相当する濃度まで上げて曝露を行っても、曝露終了時およびそれらの個体を 3 か月飼育したのちにも、明らかな行動異常および全身的な形態異常は観察されないことが明らかになった。このことから、さらなる探求は断念し、少なくとも本研究計画の曝露方法では、食品中に含まれる濃度下では DOHaD による影響は観察されないであろう、と結論付けた。



図：本研究の概要

〔引用文献〕

- 1: Tareke et al., 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem* **50**, 4998-5006.
- 2: Ron and Walter, 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-529.
- 3: Komoike and Matsuoka, 2013. Exposure to tributyltin induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in zebrafish. *Aquat Toxicol* **142-143**, 221-229.
- 4: Komoike and Matsuoka, 2016. Endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis by acrylamide exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* **310**, 68-77
- 5: Barker and Osmond, 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* **8489**, 1077-1081.
- 6: Gluckman and Hanson, 2004. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 183-187.
- 7: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCFAC/ccfac36/fa36_34e.pdf
- 8: Komoike et al., 2020. Intake of acrylamide at the dietary relevant concentration causes splenic toxicity in adult zebrafish. *Environ Res* **189**, 109977

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuta Komoike, Kaori Nomura-Komoike, Masato Matsuoka	4. 巻 189
2. 論文標題 Intake of acrylamide at the dietary relevant concentration causes splenic toxicity in adult zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Research	6. 最初と最後の頁 109977
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envres.2020.109977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuta Komoike and Masato Matsuoka	4. 巻 365
2. 論文標題 In vitro and in vivo studies of oxidative stress responses against acrylamide toxicity in zebrafish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Hazardous Materials	6. 最初と最後の頁 430-439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jhazmat.2018.11.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蔣池勇太、松岡雅人
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた微量鉛曝露による胚発生影響の解析
3. 学会等名 第92回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蔣池勇太、蔣池かおり、松岡雅人
2. 発表標題 食を介した微量アクリルアミド摂取による脾毒性
3. 学会等名 第91回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蒋池勇太
2. 発表標題 ゼブラフィッシュモデルの有用性
3. 学会等名 第62回 日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蒋池勇太、松岡雅人
2. 発表標題 アクリルアミドの毒性発現における酸化ストレス応答の保護的作用
3. 学会等名 第89回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蒋池勇太、松岡雅人
2. 発表標題 アクリルアミドの毒性発現に関わる細胞応答パスウェイの検索と酸化ストレス応答の保護的作用の検討
3. 学会等名 第13回 臨床ストレス応答学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蒋池勇太、松岡雅人
2. 発表標題 アクリルアミドの毒性発現に関わる細胞応答パスウェイの検索
3. 学会等名 第88回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蒋池勇太、松岡雅人
2. 発表標題 小胞体ストレス応答を介したアクリルアミドの神経毒性
3. 学会等名 第12回 臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京女子医科大学 業績データベース https://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?kyoinId=ymdigbgoggk 東京女子医科大学 衛生学公衆衛生学講座(環境・産業医学分野) ホームページ http://www.twmu.ac.jp/hygiene1/index.html</p>

6. 研究組織		
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)
		備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------