

機関番号：23803  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20500711  
 研究課題名(和文) 糖尿病発症時におけるがん誘発メカニズムに関する基礎的研究と食品成分による制御  
 研究課題名(英文) Induction Mechanism of carcinogenesis in diabetic status and inhibitory effect of food components on the cancer.  
 研究代表者  
 増田 修一 (MASUDA SHUICHI)  
 静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授  
 研究者番号：40336657

研究成果の概要(和文)：食品中の変異・発がん物質であるアクリルアミド(AA)を糖尿病モデルラットに摂取させたところ、正常ラットに比べ遺伝毒性が増強する傾向が確認できた。その要因として、糖尿病モデルラットにおける薬物代謝酵素 CYP2E1 の活性が増強し、それにより AA がより遺伝毒性の強いグリシダミドに代謝活性化されることが示唆された。また、アクリルアミドの遺伝毒性に対して緑茶およびワサビ抽出物が強い抑制効果を示すことが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Genotoxicities of acrylamide, which is a mutagen/carcinogen contained in foodstuffs, was increased in diabetic rats compared with those in normal rats. The activity of CYP2E1, known as a drug-metabolizing enzyme, in diabetic rats was stronger than that in normal rats. Therefore, AA was metabolic-activated to glycidamide by CYP2E1 in diabetic status. And green tea and Wasabi extracts showed the inhibitory effects against the genotoxicities of AA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、糖尿病、グリシダミド、変異原性、CYP2E1、緑茶、ワサビ

#### 1. 研究開始当初の背景

現在、がん(悪性新生物)、心疾患、脳血管疾患が3大死因に挙げられており、特にがんによる死亡率は昭和55年以降、日本人の死因の第1位を占めるようになってきている。したがって、がんの予防はヒトが健康な生活を営む上で極めて重要な課題となっている。発がん要因には主に、①自然に生じるDNA複製エラー、②発がん物質(細胞障害性・炎症性)、③放射線(紫外線を含む)、④発がん物質(DNA直接傷害性)、⑤ウイルス起源がん

遺伝子の導入が考えられているが、実際には主として外因性の環境中化学物質によるものが多く、日常食品や飲料水中に含まれる発がん物質が重要な発症因子である。1996年にハーバード大学のがん予防センターから発表されたアメリカ人のがん死亡要因は、喫煙(30%)、食事(30%)、運動不足(5%)、飲酒(3%)であり、全体の68%が生活習慣に関与するものである。食品中には植物の構成成分、加熱や調理過程等で生成される物質、さらに食品添加物や農薬、動物用医薬品、かび

毒、容器類からの溶出物、土壌や飲料水中の成分など多種多様な物質が含まれており、これらの中に発がん物質が存在している可能性は否定できない。食品中の遺伝毒性物質として注目されているものとして、ジャガイモなどアスパラギンと炭水化物を多く含む食品をフライなど高温で加熱調理した場合に生成するアクリルアミド (AA) がある。動物実験において、AA は染色体異常誘発能、発がん性、生殖毒性、神経毒性を示すことが確認されており、国際がん研究機関 (IARC) では、2A「人におそらく発がん性があるもの」に分類されている。AA はラットの乳腺、精巣、甲状腺、子宮などに対し、発がん標的性がある。

吸入、経皮、経口により摂取された AA は速やかに吸収され、各臓器へ分布するが、吸収された AA は、グルタチオン抱合により N-アセチル-S-(2-カルバモイルエチル) システインとなり、尿中に排泄される。または薬物代謝酵素である CYP2E1 により酸化されて、エポキシド体のグリシダミド (GA) となる。AA の代謝産物である GA は Ames 試験においても陽性であり、その変異原性は AA よりも強い。GA は *in vitro* 及び *in vivo* において DNA と付加体を形成することが報告され、さらにラットやマウスに AA を経口投与した場合、肝臓などで GA-DNA 付加体が観察されることから、現在では、AA 摂取による遺伝毒性は、主に GA によるものと考えられ、GA の生成に重要な役割を担う薬物代謝酵素がシトクロム P450 2E1 (CYP2E1) である。CYP2E1 をはじめとする薬物代謝酵素の活性は不変ではなく、種差、系統差、年齢差、性差、疾患の有無等の内的要因とともに、食事、飲酒、喫煙、薬物等の外的要因によっても大きな影響を受ける。近年その罹患者の増加が世界的な問題となっている糖尿病においても、CYP2E1 活性が高まる可能性が指摘されている。これまで、AA それ自身の毒性についての報告は数多く存在するが、AA とその毒性発現に関与する因子を組み合わせた複合的な毒性を評価した報告はほとんどない。それ故、日常生活における AA の発がんリスクを考える場合、AA の遺伝毒性に及ぼす CYP2E1 誘導因子の影響を調べる必要がある。疫学調査により、糖尿病罹患者のがん発症率の増加が報告されていることから、これらの要因には、食事に含まれる発がん物質が関与している可能性が十分に考えられる。そこで本研究では糖尿病発症時におけるがん誘発メカニズムを解明することを目的とし、糖尿病発症時にける食品中発がん物質である AA の遺伝毒性の変動を検討した。また、静岡県地場産品である緑茶およびわさび抽出物の AA 誘導遺伝毒性に対する抑制効果についても検討を行った。

## 2. 研究の目的

2002 年、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で、高濃度の AA が生成することが報告され、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によるメイラード反応を経由して生成することが明らかになった。ヒト生体内における AA の代謝経路としては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。別の経路としては、酸化されエポキシド体である 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。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ることから、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。

近年、内臓脂肪型肥満により、さまざまな病気が引き起こされる『メタボリックシンドローム』患者が増え、大きな社会問題となっている。この状態が続くと糖尿病、脳血管疾患 (脳出血、脳梗塞等)、虚血性心疾患 (狭心症、心筋梗塞) などの生活習慣病が発症し、ますます生活習慣病患者が増加する可能性がある。生活習慣病の一つである糖尿病患者は急増しており、糖尿病を放置すると網膜症・腎症・神経障害などの合併症を引き起こし、また、脳卒中、虚血性心疾患などの心血管疾患の発症、進展を促進することから、その対策は世界的にも重要な課題である。最近、津金らは生活習慣病などのリスク要因を調査し、長期追跡調査において、糖尿病とがん発症との間に有意な相関があることを明らかにした。この調査では糖尿病にかかると非糖尿病患者と比べてがん発症率が 20~30% 高くなる傾向があると報告されており、糖尿病罹患と肝臓がん・膵臓がんとの関連も指摘されている。しかし、糖尿病とがん発症の明確な因果関係はまだ解明されていない。

これまでに糖尿病により CYP の発現が変化することが知られており、糖尿病モデルラットにおける主要な CYP の発現を検討した報告によると、ラット肝臓中の CYP1A2、CYP1B1、CYP2E1 の発現量は上昇している。

このように AA は糖尿病において発現及び活性が増強されると考えられている CYP2E1 により強力な発がん物質である GA に代謝活性化されると考えられることから、糖尿病罹患者の発がん率の増加に AA をはじめとする食品由来の発がん物質の毒性変動が関与していることが示唆される。したがっ

て、糖尿病罹患者の食事の作製や医薬品開発において、このような CYP の発現変動を考慮する必要があると考えられる。

そこで本研究では糖尿病状態における AA の DNA 損傷性と小核誘発能の変動と AA の活性化や GA の解毒に関わる CYP2E1 発現及び活性、AA の主要な解毒酵素である GST の活性、GST の補因子である肝臓中の GSH、酸化ストレスへの曝露指標である GSSG 量、さらに血中の AA 濃度を調べた。

一方、静岡県の特産物で知られている緑茶やわさびには、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、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、緑茶及びわさび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いる。したがって静岡県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。そこで AA の遺伝毒性や生成に対する緑茶およびわさび抽出物の抑制効果についても検討した。

### 3. 研究の方法

(1)糖尿病発症時における AA の遺伝毒性の変動  
ストレプトゾトシンを Wistar ラット(8 週齢、♂)尾静脈に投与し、糖尿病を誘発させた。誘発 4 週間後に 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。小核試験では、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℃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、コメットアッセイでは、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 65  $\mu$ l 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。

糖尿病ラット肝臓における CYP2E1 活性測定にはクロルゾキサゾン法を用いた。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℃、2 分間インキュベートした。NADPH 生成系を添加し、37℃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。

(2)静岡県地場産品の AA 誘導遺伝毒性に対する抑制効果

Wistar ラットを 1 週間馴化させた後、AA または AA+緑茶及びわさび抽出物を経口投与した。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℃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一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)糖尿病発症時における AA の遺伝毒性の変動  
糖尿病発症時における 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。糖尿病ラットの AA 投与群においては正常群、正常群+AA 投与群及び糖尿病群に比較して有意な増加がみられた。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、糖尿病ラットの AA 投与群においては正常群、正常群+AA 投与群及び糖尿病群に

比較して有意な上昇がみられた(Fig.1)。糖尿病発症における 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、糖尿病群では有意な CYP2E1 活性の上昇が見られた。また、CYP2E1 の発現を PCR を用いて確認したところ、糖尿病群では正常群に比べて有意な発現が確認できた。

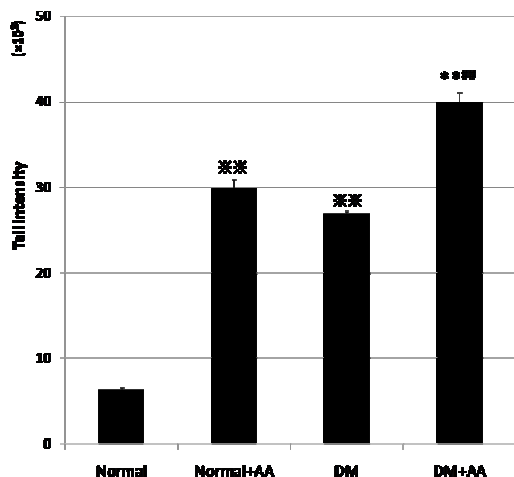


Fig.1 糖尿病ラット肝臓における AA 誘導 DNA 損傷性

(2)静岡県地場産品の AA 誘導遺伝毒性に対する抑制効果

Wistar ラットを 1 週間馴化させた後、AA または AA+緑茶及びわさび抽出物を経口投与し、小核試験及びコメットアッセイを用いて AA 誘導遺伝毒性に対する抑制効果を検討した。その結果、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、緑茶及びわさび抽出物を 50mg/kg BW で投与した場合、小核誘発頻度は AA 投与群に比べ有意に減少した(Fig.2)。また、20mg/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。また、骨髄における AA の小核誘発頻度に対する抑制効果を調べたところ、20 及び 50mg/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。

AA 誘導 DNA 損傷における緑茶及びわさび抽出物の抑制効果をコメットアッセイを用いて検定したところ、緑茶及びわさび抽出物は肝臓、骨髄及び血液における DNA 損傷性を抑制することが明らかになった。

以上の結果より、

(1)糖尿病発症時は、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。すると、AA の生成量は減少した。

(2)ラットに AA と緑茶またはわさび抽出物を同時に摂取させると、AA 誘導小核誘発能及

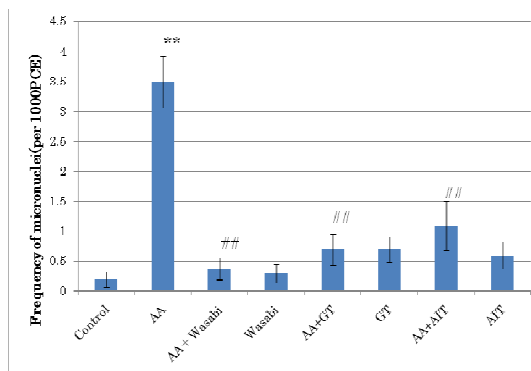


Fig.2 AA 誘導小核誘発に対する緑茶及びわさび抽出物の抑制効果

び DNA 損傷性が有意に減少した。それ故、緑茶及びわさびには AA が誘導する遺伝毒性に対して抑制効果を示す成分が含有している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、糖尿病患者に AA を含有するような食品を摂取させた場合、遺伝毒性が増強されることが明らかになったことから、糖尿病患者用の食事には CYP2E1 により毒性が発現する化学物質が含有しないように注意が必要である。また、AA が含有されるような食品を摂取した場合には、緑茶やわさびなどの他の食品成分・素材を同時に摂取して、その遺伝毒性を抑制することが重要である。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、緑茶やわさび抽出物を添加するなど、加工処理技術にも有効であることが明らかになった。

これらの知見は、AA の毒性は、ヒトの健康状態に影響され、また AA の毒性に対して他の食品素材の有効性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 Koyama N, Masuda S (10 名中 8 番目): Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ. Mol. Mutagen* (査読有り), [Epub ahead of print] (2010)
- ② Deguchi, Y., T., Masuda, S., Kinoue, N.

- (9名中4番目), Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity, Environ. Toxicol(査読有り), 23(6) 720-727 (2008).
- ③ Oya-Ito, T., Masuda, S., Ohashi, N.(5名中3番目) Functional analyses of neutrophil-like differentiated cell lines under a hyperglycemic condition, Molecular Nutrition and Food Research (査読有り), 52(3), 360-369 (2008).
- 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 (査読有り), 43, 22-23 (2008).

[学会発表] 計 11 件

- ① 加藤竜也, 増田修一: 肥満モデルマウスにおける酸化損傷に関する DNA 付加体生成の増加, 日本環境変異原学会 第 39 回大会 (つくば) 2010 年 11 月 16-17 日
- ② 森上三穂, 増田修一: メイラード反応生成物および日常食品の亜硝酸処理による変異原性の発現に関する研究, 第 64 回日本栄養・食糧学会大会 (徳島) 2010 年 5 月 21-23 日
- ③ 小山直己, 増田修一: ライフステージ(週齢)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 38 回大会 (静岡) 2009 年 11 月 26-27 日
- ④ 平野元美, 増田修一: 糖尿病状態及びアルコール摂取時におけるアクリルアミドの遺伝毒性の変動, 第 19 回日本メイラード学会 (金沢) 2009 年 11 月 20 日
- ⑤ 増田修一, 平野元美: 糖尿病発症時における変異・発がん物質の遺伝毒性の変動, 第 63 回日本栄養・食糧学会大会 (長崎) 2009 年 5 月 20-22 日
- ⑥ 横地俊輔, 増田修一: 糖尿病マウスにおける各臓器中の酸化的 DNA 損傷性の比較とそのメカニズム, 日本薬学会 129 年会 (京都) 2009 年 3 月 26-28 日
- ⑦ 小山直己, 増田修一: 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
- ⑧ 平野元美, 増田修一, 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
- ⑨ 田里李奈, 増田修一: 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
- ⑩ Kinae, N., Masuda, S.: Formation of Genotoxic Compounds under Physiological Conditions and their Relationship to Diabetic mellitus, The Eighth China-Japan International Symposium on Health Sciences (Zhejiang, China), November 17-18, 2008
- ⑪ 増田修一, 木苗直秀: 糖尿病発症時における変異・発がん物質の生成及び遺伝毒性の変動, 2007 US フォーラム (静岡), 2008 年 8 月 1 日-2 日

[図書] (計 4 件)

- ① 木苗直秀, 増田修一: 2.2.3 多環式芳香族炭化水素 (PAH)、食品安全の事典, (朝倉書店), p.232-234(2009)
- ② 木苗直秀, 増田修一: 6. 加工食品に含まれる化学物質の安全性、食品の安全性と対策, (社団法人 日本食品衛生協会), p.105-113 (2009)
- ③ 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
- ④ 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]

ホームページ等

<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/foodhygn/>