

ジュネーブで開催された **FAO/WHO** 会議報告の抜粋

2002年6月25日から27日にスイスのジュネーブで「Health Implications of Acrylamide in Food」というタイトルで会議が開催された。この中で毒性に関する部分を要約した。

アクリルアミドの毒性

- ・ アクリルアミドの神経毒性の NOAEL は 0.5mg/kg/day である。
- ・ 繁殖率の NOAEL は末梢神経毒性より4倍高く、神経毒性を押さえることにより、生殖毒性を押さえることが期待される。
- ・ ヒトでの暴露は 1ug/kg のオーダーであり、NOAEL の 500 倍あり、食品中のアクリルアミドのレベルで神経毒性は起こりそうもない。
- ・ アクリルアミドがヒトに発癌性がある可能性があるとの IARC Group2A の分類を支持する。

2002年6月にジュネーブの **FAO/WHO** 会議で推奨された研究

1)代謝とカイネティクス

- 1)ヒトでの経口暴露での吸収、分布、代謝、排泄のより多くのデータを得ること。
- 2)食品中のアクリルアミドのバイオアベイラビリティを明らかにすること。
- 3)毒性、分布、DNA や高分子に対する結合に対する、アクリルアミドとグリシダミドの用量反応の特徴についてさらに調べる。
- 4)ヘモグロビンと DNA 付加体の関係を異なった臓器で調べる。

2)遺伝毒性:

- 1)毒性と発癌リスクのマーカーとしてのグリシダミドの形成と DNA との結合についてより明らかにする。
- 2)体細胞と生殖細胞に対する遺伝毒性を genome-wide expression プロファイリングで調べる。

3)生殖/発生毒性

生殖細胞傷害に対するアクリルアミドとグリシダミドの作用の機序と用量反応について調べる。

4)発癌性

グリシダミドの毒性と発癌性を調べる。

5)神経毒性

神経毒性症状や高いヘモグロビン付加体レベルの高暴露群(職業暴露)のヒトでの癌の疫学や、精巣毒性を調べる。

6)疫学

- 1)感受性のリスク要因としてリスクに関する遺伝的代謝の相違、年齢、性、その他を明らかにする。
- 2)科学的利点の根拠と不確実性評価について定量的リスクアセスメントモデルで調べる。

内外で実施あるいは計画中の実験リスト

1)代謝とカイネティクス	<p>1)Cyp2E1 欠失マウスにおけるアクリルアミドの代謝、分布、付加体形成の比較(米国 NIEHS、NTP)</p> <p>2)アクリルアミドの代謝並びにヘモグロビン、DNA 付加体の検出(フランス SNF-Floerger)</p> <p>3)マウス、ラットを用いた飲水及び混餌投与でのアクリルアミドのバイオアバイラビリティの比較(米国 NCTR)</p> <p>4)ヒトボランティアでのアクリルアミドの尿中代謝物並びにヘモグロビン付加体の検出(フランス SNF-Floerger)</p>
2)遺伝毒性:	アクリルアミド投与マウス、ラットでのアクリルアミド関連 DNA 及び蛋白付加体の同定(米国 NCTR)。
3)生殖/発生毒性	Cyp2E1 欠失マウスにおけるアクリルアミドの優勢致死試験(米国 NIEHS、NTP)
4)発癌性	<p>1)初代培養アストロサイトに対するアクリルアミドの影響(フランス SNF-Floerger)</p> <p>2)培養甲状腺細胞に対するアクリルアミドの影響(フランス SNF-Floerger)</p> <p>3)F-344 ラットに対するアクリルアミドの細胞増殖作用の検索(フランス SNF-Floerger)</p> <p>4)アクリルアミドとグリシダミドの亜慢性毒性試験、慢性発癌性試験、メカニズム試験(米国 NTP)</p>
5)神経毒性	<p>1)Cyp2E1 欠失マウスにおけるアクリルアミドの神経行動/神経毒性試験(米国 NIEHS、NTP)</p> <p>2)ラットで抗酸化物質と phase II 酵素誘導剤によるアクリルアミドの神経毒性抑制(日本、NIHS)</p>
6)疫学	ヒトでのアクリルアミド暴露をモニタリングするためのアクリルアミド関連蛋白付加体の用いた評価(米国 CDC)
7)その他	ラットでの付加体のデータと食事中のバックグラウンドレベルや喫煙によるアクリルアミド暴露されたヒトの付加体測定との関連付け(米国 NCTR)

引用文献

Barber, DS, JR Hunt, MR Ehrich, et al. (2001). "Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing." *NeuroToxicology* 22:341-353.

Bull, RJ, M Robinson, RD Laurie, et al. (1984a). "Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and

A/J mice." *Cancer Res* 44(1): 7-11.

Burek, J.D., R.R. Albee, J.E. Beyer, et al. (1980). "Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery." *J. Path. Tox.* 4: 157-182.

Collins, J, G Swaen and et al (1989). "Mortality patterns among workers exposed to acrylamide." *J Occup Med* 31: 614-617.

Deng,H, F He, S zhang, et al. (1993) "Quantitative measurement of vibration threshold in healthy adults and acrylamide workers." *Int. Arch. Occup. Environ Health* 65, 53-56.

Environmental Health Criteria 49 "Acrylamide" (1985) World Health Organization.

Field, EA, CJ Price, RB Sleet, et al. (1990). "Developmental toxicity evaluation of acrylamide in rats and mice." *Fundam Appl Toxicol* 14: 502-12.

Friedman, M, L Dulak and M Stedham (1995). "A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide." *Fundam Appl Toxicol* 27: 95-105.

Hashimoto, K, J Sakamoto and H Tanii (1981). "Neurotoxicity of acrylamide and related compounds and their effects on male gonads in mice." *Arch Toxicol* 47: 179-189.

He, F, S Zhang, H Wang, et al. (1989). "Neurological and electroneuromyographic assessment of the adverse effects of acrylamide on occupationally exposed workers." *Scand. J. WorkEnviron. Health* 15: 125-129.

IARC monograph volume 60 (1994) "Acrylamide".

Ikeda, G, E Miller, P Sapienza, et al. (1987). "Comparative tissue distribution and excretion of fl-¹⁴C]acrylamide in beagle dogs and miniature pigs." *Food Chem. Toxic.* 25(11): 871-875.

Johnson, KA, SJ Gorzinski, KM Bodner, et al. (1986). "Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats." *Toxicol Appl Pharmacol* 85(2): 154-168.

LoPachin, R. M., J. F. Foss and Lehning E. J. (2002). "Nerve Terminals as the Primary Site of

Acrylamide Action: A Hypothesis." *NeuroToxicology* 23: 43-59.

Marlowe, C, MJ Clark, RW Mast, et al. (1986). "The Distribution of (14C)Acrylamide in Male and Pregnant Swiss-Webster Mice by Whole Body Autoradiography." *Toxicol and Appl. Pharmacol* 86: 457-465.

Marsh, G, L Lucas, A Youk, et al. (1999). "Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up." *J Occup Environ Med* 56: 181-190.

McCollister, D, F Oyen and V Rowe (1964). "Toxicology of acrylamide." *Toxicol. Appl. Pharmacol* 6: 172-181.

Miller, MJ, DE Carter and IG Sipes (1982). "Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 Rats." *Toxicology and Applied Pharmacology* 63: 36-44.

Mucci LA, Dickman PW et al. (2003) "Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: Absence of an association in a population-based study in Sweden" *Br.J. Cancer* 88:84-89.

Myers, JE and I Macun (1991). "Acrylamide neuropathy in a South African factory: an epidemiologic investigation." *American Journal of Industrial Medicine* 19(4): 487-493.

Paulet, G. V. (1975). "De la toxicite de quelques esters acryliques et methacryliques de l'acrylamide et des polyacrylamides." *Arch Mal Prof* 36: 58-60.

Robinson, M, RJ Bull, GL Knutsen, et al. (1986). "A combined carcinogen bioassay utilizing both the lung adenoma and skin papilloma protocols." *Environ Health Perspect* 68: 141-5.

Sega, G, E Generoso and P Brimer (1990). "Acrylamide exposure induces a delayed unscheduled DNA synthesis in germ cells of male mice that is correlated with the temporal pattern of adduct formation in testis DNA." *Environ Mol Mutagen* 16: 137-142.

Segeberck, D, J Calleman, J Schroeder, et al. (1995). "Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and rat following intraperitoneal administration of 14C acrylamide." *Carcinogenesis* 16: 1161-1165.

Sickles, D.W., J.D. Stone and M.A. Friedman (2002). "Fast axonal transport: A site of acrylamide neurotoxicity." *Neurotoxicology* 23: 223-251.

Sumner, SCJ, JP MacNeela and TR Fennell (1992). "Characterization and quantitation of urinary metabolites of {1,2,3-¹³C}acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Chem Res Toxicol* 5: 81-9.

Sumner, SCJ, L Selvaraj, SK Nauhaus, et al. (1997). "Urinary Metabolites from F344 Rats and B6C3F1 Mice Coadministered Acrylamide and Acrylonitrile for 1 or 5 Days." *Chemical Research In Toxicology* 10(10): 1152-1160.

Suzuki, K, Pfaff, L (1973). "Acrylamide neuropathy in rats. An electron microscopic study of degeneration and regeneration." *Acta Neuropathol* 24: 197-203. 35

Sumner, SCJ, A Bahman, CC Williams, et al. (2001). Acrylamide, Metabolism, Distribution, and Hemoglobin Adducts in Male F344 Rats and B6C3F1 Mice Following Inhalation Exposure and Distribution and Hemoglobin Adducts Following Dermal Application to F344 Rats. Research Triangle Park, NC, CIIT.

Tyl, RW, MA Friedman, PE Losco, et al. (2000a). "Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water." *Reproductive Toxicology* 14(5): 385-401.

Tyl, RW, MC Marr, CB Myers, et al. (2000b). "Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats." *Reproductive Toxicology* 14(2): 147-57.

Tyl, RW, MA Friedman (2003). "Effects of acrylamide on rodent reproductive performance" *Reproductive Toxicology* 17: 1-13.

Wise, L, L Gordon, K Soper, et al. (1995). "Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dawley rats." *Neurotox. Teratol.* 17(2): 189-198.

11892 の化学商品(1992)化学工業日報社

Ⅱ. 分担研究報告書

5. アクリルアミドの遺伝毒性に関する文献的調査

分担研究者 林 眞

アクリルアミドの遺伝毒性に関する文献的調査

分担研究者 林 真 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部長

研究要旨

アクリルアミド（AA）の遺伝毒性に関する公表論文を収集し、その遺伝的影響に関して総合的に評価を行った。バクテリアを用いた遺伝子突然変異試験（エームス試験）ではすべて陰性を示したのに対して、真核生物を用いたほとんどの試験系では *in vitro*、*in vivo* 試験とも陽性結果が得られている。特に、染色体異常誘発性、DNA 損傷性が明らかであることから AA は染色体異常誘発物質(Clastogen)と言える。特筆すべき点としては、優性致死試験結果をはじめ、生殖細胞に対する染色体異常誘発性が示されていることであり、がん原性と共に後世代への遺伝的影響に関しても注意が必要であろう。AA は明らかに遺伝毒性を示すことから、今後そのメカニズムの解明や、ヒトに対する正しいリスク評価が必要である。

研究協力者

本間正充 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部

A. 研究目的

アクリルアミド（AA）1950年代より工業生産されている。重合によりゲル状のポリアクリルアミドとなることから、この性質を利用して水処理凝集剤、土壌凝固剤、粘着テープの材料、モルタル剤、そして、分子生物学実験における電気泳動の担体などに用いられてきた。日常の生活において工業製品としての AA を暴露する可能性は極めて低く、その生産や使用に携わる労働者に関しては皮膚からの吸収や、吸気によって慢性的に暴露する可能性がある。発がん性、遺伝毒性を含む生体影響に関しては EC/USEPA のワークショップで論議され

てきており、遺伝毒性のワークグループは 1994 年に AA の遺伝毒性に関するレビューを行っている[1-4]。IARC での発がん性の評価では AA はヒトでの発がん性の証拠は不十分であるものの、ラット、マウスにおいて発がん性が認められることからグループ 2A にランクされている。

2002 年の 3 月にスウェーデンの研究者より、一部の食品の高温調理により AA が自然発生することが報告され、工業労働者だけでなく一般消費者までが日常的に AA に暴露されている可能性が指摘された。これを受け、現在 FAO/WHO の専門家会議において食品中の AA をできるだけ減らすような方向で対策を進めている。本研究ではこのような状況の下、これまでの AA に関する遺伝毒性の研究報告をレビューし、今後の AA の健康リスク評価に役立てること

を目的とする。

B. 研究方法

AA の遺伝毒性試験に関する学術論文をメドラインによって検索し、収集した。また、IARC、USNTP データベース、Toxline も利用してその遺伝毒性に関する情報を収集した。収集した学術論文、他の情報をレビューし、現時点における AA の遺伝毒性の評価を行った。

C. 研究結果

1980 年より今日まで AA の遺伝毒性に関する学術文献、データを約 50 種収集した。これら文献うち主だったものをレビューした結果、AA に関して以下のような遺伝毒性の評価を行った。

1) バクテリアを用いた遺伝毒性試験

サルモネラ菌、大腸菌、クレブシユラ菌を用いた遺伝子突然変異試験では AA は S9 存在下、非存在下ともすべて陰性であった。特にサルモネラ菌を用いたエームス試験ではすべての菌株で、100mg/plate 以上の極めて高濃度においても突然変異の誘発は認められなかった[5-7]。

2) 培養細胞を用いた遺伝毒性試験

チャイニーズハムスター V79 細胞を用いた hprt 遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異試験では陰性の報告があるが[6]、tk 遺伝子をターゲットとしたマウスリンフォーマ試験 (MLA) においては陽性であった[8]。この違いは AA が誘発する突然変異のタイプによるものと考えられる。Hprt では点突然変異を主とする比較的小さい突然変異しか検出できないのに対して、MLA では点突然変異だけでなく大きな遺伝子の

欠失や、相同染色体の組換えによるいわゆる LOH 型の突然変異の検出が可能であるからである。MLA ではこのような変異体は増殖性の遅い small colony (SC) 変異体として観察されるが、事実、Moore らは AA が SC 変異体のみを特異的に誘発することを報告している[9]。

染色体異常試験はチャイニーズハムスター-CHL、V79、初代繊維芽細胞を用いた試験報告があるが、いずれも陽性の結果である[6;7;10;11]。AA は染色体の構造異常だけでなく異数性も誘発することから、細胞分裂毒としての作用も指摘されている[6;11;12]。

これらの結果から AA は *in vitro* では点突然変異よりもむしろ、染色体の構造異常、数的異常を含む比較的大きな遺伝子損傷を誘発するものと考えられる。

3) ほ乳類動物における体細胞での *in vivo* 遺伝毒性試験

LacZ を遺伝子突然変異のターゲットとしたトランスジェニックマウスであるミュータマウスに AA を 50mg/kg で 5 日間投与すると、骨髄での lacZ での突然変異がわずかに増加した (2 倍弱) [13]。マウススポットテストにおいても陽性の結果が報告されているが、MLA の時と同様、ここでの突然変異は点突然変異だけでなく、染色体レベルの欠失や転座、もしくは染色体全体の消失や組換えが関与しているものと考えられる[14]。AA による *in vivo* での相同組換え反応については Murti らが報告している[15]。彼らは *in vivo* において相同組換え能を評価しうるトランスジェニックマウスを開発し、AA を検討したが、AA はコントロール以上に相同組換えを誘発しなかった。

マウス末梢血、骨髓細胞での染色体異常試験、小核試験はすべて陽性結果が報告されている。ほとんどが 50-150mg/kg の単回、ip 投与の実験であるが、50mg/kg で異常が観察される[7:16-19]。一方、脾臓においては染色体異常の誘発は観察されないとの報告があるが、小核の誘発は認められている[20:21]。

以上の結果から AA は *in vitro* 同様、*in vivo* においても染色体レベルの遺伝子損傷を優先的に誘発するものと考えられ、またこの反応には相同組換えは関与しないものと考えられた。

4)ほ乳類動物における生殖細胞での *in vivo* 遺伝毒性試験

マウスおよびラットを用いた優性致死試験において、AA はいかなる投与ルートにおいても (ip 投与、強制経口投与、飲水、皮膚吸収) 陽性反応を示すことが報告されている [22-26]。比較的低濃度である 9.2mg/kg/day の 20 日間飲水摂取によっても優性致死をもたらす。優性致死をもたらす遺伝子傷害性は、精子細胞期から精子形成期のかなり後期に起こることが示されている。

マウス生殖細胞においても AA が染色体異常や、小核の誘発を引き起こすことが多く報告されている。優性致死試験同様、これら異常は精母細胞よりも精子形成後期に観察され、染色体異常は精母細胞に (22)[16]、小核は精子細胞に [16:19:27-29] 高頻度に観察される。おそらくこの時期のこれら異常は第一次精母細胞の分裂時の G1-S 期に起こる遺伝子損傷に由来するものと考えられる。また、小核試験においては AA が動原体を含む小核を効率に誘発す

ることが報告されており、このことから AA による *in vivo* での異数性の誘発が証明されている[27]。In vivo 異数性は生殖細胞でのシネプトネマ複合体の形成不全による間接的な影響によるもの考えられる[20]。優性致死試験が陽性結果を示すことから、安定型の染色体異常が高頻度に誘発されていることが予想され、実際に AA 投与により遺伝性の染色体転座の誘発が確認されている。Shelby らは 40-50mg/kg/day で 5 日間投与により転座が 10~20 倍誘発されることを示し[30]、Adler らは 50mg/kg、100mg/kg の単回投与で 16~80 倍の転座の誘発、50mg/kg/day の 5 日間連続投与で約 640 倍も染色体転座が誘発されることを示している[16:31]。

以上の結果から AA は生殖細胞に対して安定型の染色体異常を誘発し、その時期は精子形成の比較的後期に起こることが示された。

5)その他の遺伝毒性

DNA 損傷試験では AA はおおむね陽性反応を示すようである。枯草菌を用いたレックアッセイでは陽性を示した[7]。In vitro UDS 試験ではラット初代肝細胞では陽性および陰性の両者の結果が報告されているが、ヒト乳腺由来の初代繊維が細胞で陽性結果が報告されている[3:8]。In vivo UDS ではラット肝臓では陰性であるが、ラット、マウスの生殖細胞では陽性反応を示した[3:32]。AA の DNA アダクトはマウス精巣、ラット肝臓で検出されている[32]。アルカリ溶出法によって生殖細胞に DNA 損傷がもたらされることが示されている [33]。

SCE の誘発も In vitro 試験においては

V79 細胞で、*in vivo* 試験においてはマウス脾臓、マウス生殖細胞で観察されている[6;7;20;21]。生殖細胞における SCE も精母細胞、精子細胞など精子形成後期で起こるようである[19]。

ショウジョウバエを用いた体細胞遺伝子突然変異、伴性劣性致死試験の報告もある。両差とも幼虫への AA 摂取により誘発が観察されている[7;34;35]。

D. 考察

AA は *in vitro*、*in vivo* とも遺伝毒性を示すが、その内容は点突然変異のような小さな遺伝子損傷ではなく、DNA の欠失や転座を伴う比較的大きな染色体レベルの損傷が主であると考えられる。このことはエームス試験および、*hprt* 遺伝子突然変異試験が陰性であるのもかかわらず、MLA で陽性、しかも染色体レベルの異常の誘発を示唆する SC 変異体の誘発が顕著であることから強く支持されるものである。一方、組換え型の突然変異は誘発されなかった。これらの結果から単純に考えると、AA による遺伝毒性は放射線等によってもたらされる DNA の 2 本鎖切断に由来する遺伝子損傷と極めて類似している。詳細な遺伝子損傷のメカニズムに関しては変異体の分子生物学的解析を必要とするが、AA の遺伝毒性の特徴としてはこのような *radiomimic* な染色体異常誘発性が挙げられる。また、染色体の異数性も誘発することから細胞分裂毒としての作用も有するものと考えられる。

一方、AA は体細胞のみならず生殖細胞への遺伝的影響が顕著であることが示されている。特に優性致死試験においては

9.2mg/kg/day の 20 日間飲水摂取という比較的低用量の実験条件下においても陽性反応が観察されたことは特筆に値する。AA は生殖率の低下をもたらすことも報告されていることから、がん原性だけでなく生殖毒性や後世代への遺伝的影響に関しても注意が必要であろう。

E. 結論

AA はエームス試験ではすべての菌株で陰性を示したのに対して、真核生物を用いたほとんどの試験系では *in vitro*、*in vivo* 試験とも陽性結果が得られている。特に、染色体異常誘発性、DNA 損傷性が明らかであることから AA は染色体異常誘発物質 (Clastogen) と言える。特筆すべき点としては、優性致死試験結果をはじめ、生殖細胞に対する染色体異常誘発性が示されていることであり、がん原性と共に後世代への遺伝的影響に関しても注意が必要であろう。AA は明らかに遺伝毒性を示すことから、今後そのメカニズムの解明や、ヒトに対する正しいリスク評価が必要である。

F. 健康危険情報

AA がもたらすヒト健康への影響は否定できないが、そのリスク評価には今後の研究動向を見極めて慎重に対処することが必要である。

G. 参考文献

- [1] M.D.Waters, C.Nolan. EC/US workshop report: assessment of genetic risks associated with exposure to ethylene oxide, acrylamide,

- 1,3-butadiene and cyclophosphamide, *Mutat. Res.*, 330, (1995) 1-11.
- [2] M.D.Waters, C.Nolan. Meeting report of the EC/US workshop on genetic risk assessment: "human genetic risks from exposure to chemicals, focusing on the feasibility of a parallelogram approach", *Mutat. Res.*, 307, (1994) 411-424.
- [3] B.E.Butterworth, S.R.Eldridge, C.S.Sprankle, P.K.Working, K.S.Bentley, M.E.Hurt. Tissue-specific genotoxic effects of acrylamide and acrylonitrile, *Environ.Mol.Mutagen.*, 20, (1992) 148-155.
- [4] K.L.Dearfield, C.O.Abernathy, M.S.Ottley, J.H.Brantner, P.F.Hayes. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity, *Mutat. Res.*, 195, (1988) 45-77.
- [5] E.Zeiger, B.Anderson, S.Haworth, T.Lawlor, K.Mortelmans, W.Speck. Salmonella mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals, *Environ.Mutagen.*, 9 Suppl 9, (1987) 1-109.
- [6] H.Tsuda, C.S.Shimizu, M.K.Taketomi, M.M.Hasegawa, A.Hamada, K.M.Kawata, N.Inui. Acrylamide; induction of DNA damage, chromosomal aberrations and cell transformation without gene mutations, *Mutagenesis*, 8, (1993) 23-29.
- [7] A.G.Knaap, P.G.Kramers, C.E.Voogd, W.G.Bergkamp, M.G.Groot, P.G.Langebroek, H.C.Mout, J.J.van der Stel, H.W.Verharen. Mutagenic activity of acrylamide in eukaryotic systems but not in bacteria, *Mutagenesis*, 3, (1988) 263-268.
- [8] Barfknecht.T, D.Mecca, R.Naismith. The genotoxic activity of acrylamide, *Environ.Mol.Mutagen.*, 11(suppl.11), (1988) 9.
- [9] M.M.Moore, A.Amtower, C.Doerr, K.H.Brock, K.L.Dearfield. Mutagenicity and clastogenicity of acrylamide in L5178Y mouse lymphoma cells, *Environ.Mutagen.*, 9, (1987) 261-267.
- [10] T.Sofuni, M.Hayashi, A.Matsuoka, M.Sawada. Mutagenicity test on organic chemical concomitants in city water and related compounds II. Chromosome aberration tests in cultured mammalian cells., *Eisei Shiken Hok.*, 103, (1985) 77-89.
- [11] T.J.Warr, J.M.Parry, R.D.Callander, J.Ashby. Methyl vinyl sulphone: a new class of Michael-type genotoxin, *Mutat. Res.*, 245, (1990) 191-199.
- [12] I.D.Adler, R.Zouh, E.Schmid. Perturbation of cell division by acrylamide in vitro and in vivo, *Mutat. Res.*, 301, (1993) 249-254.
- [13] A.J.Hoorn, L.L.Custer, B.C.Myhr, D.Brusick, J.Gossen, J.Vijg. Detection of chemical mutagens using Muta Mouse: a transgenic mouse model, *Mutagenesis*, 8, (1993) 7-10.

- [14] A.Neuhauser-Klaus, W.Schmahl. Mutagenic and teratogenic effects of acrylamide in the mammalian spot test, *Mutat.Res.*, 226, (1989) 157-162.
- [15] J.R.Murti, K.J.Schimenti, J.C.Schimenti. A recombination-based transgenic mouse system for genotoxicity testing, *Mutat.Res.*, 307, (1994) 583-595.
- [16] I.D.Adler. Clatogenic effects of acrylamide in different germ-cell stage of male mice., in: J.Allen, B.Bridges, M.LyonM.Moses, L.Russel (Eds.), *Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis*, Banbury Report Vol. 34, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1990, pp. 115-131.
- [17] R.Cihak, M.Vontorkova. Cytogenetic effects of acrylamide in the bone marrow of mice, *Mutat.Res.*, 209, (1988) 91-94.
- [18] R.Cihak, M.Vontorkova. Activity of acrylamide in single-, double-, and triple-dose mouse bone marrow micronucleus assays, *Mutat.Res.*, 234, (1990) 125-127.
- [19] A.Russo, G.Gabbani, B.Simoncini. Weak genotoxicity of acrylamide on premeiotic and somatic cells of the mouse, *Mutat.Res.*, 309, (1994) 263-272.
- [20] L.C.Backer, K.L.Dearfield, G.L.Erexson, J.A.Campbell, B.Westbrook-Collins, J.W.Allen. The effects of acrylamide on mouse germ-line and somatic cell chromosomes, *Environ.Mol.Mutagen.*, 13, (1989) 218-226.
- [21] A.D.Kligerman, A.L.Atwater, M.F.Bryant, G.L.Erexson, P.Kwanyuen, K.L.Dearfield. Cytogenetic studies of ethyl acrylate using C57BL/6 mice, *Mutagenesis*, 6, (1991) 137-141.
- [22] Y.Shiraishi. Chromosome aberrations induced by monomeric acrylamide in bone marrow and germ cells of mice, *Mutat.Res.*, 57, (1978) 313-324.
- [23] P.K.Working, K.S.Bentley, M.E.Hurt, K.L.Mohr. Comparison of the dominant lethal effects of acrylonitrile and acrylamide in male Fischer 344 rats, *Mutagenesis*, 2, (1987) 215-220.
- [24] M.Dobrzynska, M.Lenarczyk, A.K.Gajewski. Induction of dominant lethal mutations by combined X-ray-acrylamide treatment in male mice, *Mutat.Res.*, 232, (1990) 209-215.
- [25] U.H.Ehling, A.Neuhauser-Klaus. Reevaluation of the induction of specific-locus mutations in spermatogonia of the mouse by acrylamide, *Mutat.Res.*, 283, (1992) 185-191.
- [26] G.A.Gutierrez-Espeleta, L.A.Hughes, W.W.Piegorsch, M.D.Shelby, W.M.Generoso. Acrylamide: dermal exposure produces genetic damage in male mouse germ cells, *Fundam.Appl.Toxicol.*, 18, (1992) 189-192.
- [27] B.W.Collins, D.R.Howard, J.W.Allen. Kinetochores-staining of spermatid micronuclei: studies of mice treated with

- X-radiation or acrylamide, *Mutat. Res.*, 281, (1992) 287-294.
- [28] J.Lahdetie, A.Suutari, T.Sjoblom. The spermatid micronucleus test with the dissection technique detects the germ cell mutagenicity of acrylamide in rat meiotic cells, *Mutat. Res.*, 309, (1994) 255-262.
- [29] Y.Xiao, A.D.Tates. Increased frequencies of micronuclei in early spermatids of rats following exposure of young primary spermatocytes to acrylamide, *Mutat. Res.*, 309, (1994) 245-253.
- [30] M.D.Shelby, K.T.Cain, L.A.Hughes, P.W.Braden, W.M.Generoso. Dominant lethal effects of acrylamide in male mice, *Mutat. Res.*, 173, (1986) 35-40.
- [31] I.D.Adler, P.Reitmeir, R.Schmoller, G.Schriever-Schwenmer. Dose response for heritable translocations induced by acrylamide in spermatids of mice, *Mutat. Res.*, 309, (1994) 285-291.
- [32] G.A.Sega, E.E.Generoso, P.A.Brimer. Acrylamide exposure induces a delayed unscheduled DNA synthesis in germ cells of male mice that is correlated with the temporal pattern of adduct formation in testis DNA, *Environ.Mol.Mutagen.*, 16, (1990) 137-142.
- [33] G.A.Sega, E.E.Generoso. Measurement of DNA breakage in specific germ-cell stages of male mice exposed to acrylamide, using an alkaline-elution procedure, *Mutat. Res.*, 242, (1990) 79-87.
- [34] M.Batiste-Alentorn, N.Xamena, A.Creus, R.Marcos. Genotoxicity studies with the unstable zeste-white (UZ) system of *Drosophila melanogaster*: results with ten carcinogenic compounds, *Environ.Mol.Mutagen.*, 18, (1991) 120-125.
- [35] N.K.Tripathy, K.K.Patnaik, M.J.Nabi. Acrylamide is genotoxic to the somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.*, 259, (1991) 21-27.

H. 研究発表

特になし

1. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

6. 加工食品中でのアクリルアミドの生成機序に関する研究

分担研究者 奥田 晴宏

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)
分担研究報告書

加工食品中でのアクリルアミドの生成機序に関する研究

分担研究者 奥田晴宏 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

研究要旨

高温で調理されたある種の食品中にアクリルアミドが存在することが2002年にスウェーデン研究者らにより報告された。毒性物質であるアクリルアミドの低減方法を早急に開発するための基礎的知見を得るためにも、本化合物の食品中での生成機構解明のための試みが各国の研究者によってなされつつある。本研究では、アクリルアミドの生成機構に関する文献調査を行い、本化合物はアスパラギンが関与する高温でのメイラード反応により生成することを報告する。メイラード反応は古くから食品中の褐変を引き起こす反応として研究されており、本反応とこの反応を制御する因子についてもあわせて報告する。アクリルアミド生成阻害に関する研究も実施されているものの、食品加工現場等で実際に実施可能な低減のための方策は発表されていない。

A. 研究目的

ある種の食品を高熱で加熱調理するとアクリルアミドが相当量生成することがスウェーデン政府とストックホルム大学の研究者から2002年4月に発表された。¹⁻³アクリルアミドは発ガン性や神経毒性が報告されていることから、その生成機序を解明し、食品中のアクリルアミド含量を低減する方策を見つけることが求められている。本研究では文献情報収集を行い、食品中のアクリルアミドの生成機構を明らかにし、さらに生成に関与するメイラード反応の制御とアクリルアミド生成阻害についての知見を報告することを目的とする。

B. 研究方法

データベースとして PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) および Chemical Abstract 並びにインターネット上で検索エンジン Google を用い、食品中のアクリルア

ミド (AA) の生成機構に関する論文等を収集し、AA の生成機序およびその制御に関して考察した。検索にも用いたキーワードは (acrylamide AND food)、(acrylamide AND food AND formation)、(Maillard reaction AND (sulfite OR control)) および (acrylamide AND reactivity AND review) である。

(倫理面の配慮) 公開されている文献情報に基づく化学的事項に関する調査研究なので倫理面に配慮すべき事項はない。

C. 研究結果

生成するアクリルアミドの含量は食品によって異なり、炭水化合物含量の高いポテトに相当量検出されること、又揚げた食品や焙煎した食品に多く含まれるなど、調理法や調理時間に依存的であることが本研究に着手した時点で既に判明している。¹⁻³

一方、アクリルアミドが食品中に存在すること

が報告された後、比較的早い時期に、スウェーデンの専門家グループはアクリルアミド生成に関する総説の中で、生成機構に関する仮説を提案し、インターネット上で発表している。以下その概略を記載する。⁴

生成機構 1：アクロレインを前駆体とし、アミノ酸から生成したアンモニアと反応してアクリルアミドが生成する機構

生成機構 2：アミノ酸、タンパク質が多段階の反応を経て、アクロレインを経由しないでアクリルアミドを生成する機構

生成機構 1 においてアクロレインは、①脂質由来、②アミノ酸、タンパク質の分解、③炭水化合物の分解、④アミノ酸、タンパク質、炭水化合物のメイラード反応などの経路で生成することが想定されていた。また生成機構 2 としては加水分解、転移、脱炭酸反応、脱アミノ化反応など多段階の反応が関与することが想定され、例えばアスパラギンの脱炭酸と脱アミノ化反応やデヒドロアラニンの転移反応などが生成ルートとして考えられていた。(結果的には後述するように、アクロレインからアクリルアミドが生成する経路は少なくとも主たる生成経路ではなく、アスパラギンからアクロレインを経由しないでアクリルアミドが生成する経路が主生成経路として証明された。)

スウェーデンの研究者グループは、アクリルアミドの食品中の生成が冒頭に記載したように温度時間依存的であることおよび炭水化合物の関与が考えられることから、メイラード反応が生成の鍵反応ととらえ、上記総説においてもメイラード反応を制御する因子について詳細な報告を行っている。

その後、2002 年 9 月にロサンゼルスで開催された AOAC 年会においてカナダ政府の研究者グループがアスパラギン関与のメイラード反応

依存的なアクリルアミドの生成を報告した⁵ (その詳細は 2003 年 1 月に J. Agric. Food Chem. に発表された (別添 16))。また 10 月に Nature 誌で英国リーディング大学 (別添 27) とスイスのネッスル研究センター (別添 38) の研究者がそれぞれ独自にアスパラギン関与のメイラード反応によるアクリルアミド生成を報告した。別添 1-3 にその概要を記載する。その中で英国の研究者グループは、ジャガイモは他の穀類などと比べて遊離のアミノ酸に占めるアスパラギンの割合が高いことが、ポテトチップス、ポテトフライにアクリルアミドが相当量存在する理由であろうと考察している。⁷

食品中のアクリルアミドの研究情報等を交換する目的で WHO/FAO ACRYLAMIDE IN FOOD NETWORK (<http://www.who.int/fsf/acrylamide/research/htm>) が設立され、食品中のアスパラギン含量に関する文献調査結果が報告されている。⁹

現在までの論文発表等では主たるアクリルアミド生成機構はアスパラギンを前駆体とし、還元糖とのメイラード反応によるとされている。一方、Nature 誌に報告された 2 つの論文においてもアスパラギン以外のアミノ酸からもメイラード反応によりアクリルアミドが生成することが報告されており、食品によってはアスパラギン以外のアミノ酸との反応もある程度寄与している可能性もある。

メイラード反応は還元糖とアミノ酸、タンパク質との反応により最終的に褐色物質を生成する反応で、古くから食品の着色着香に関与する反応として知られ、総説にまとめられている。¹⁰⁻¹⁵ 別添 4 にメイラード反応について総説を中心に概説する。また別添 5 でメイラード反応を制御する因子について記載する。

メイラード反応を制御する方法は何通りか発

表されているが、調査した限りでは褐変の進行を指標として研究されており、これら研究結果をアクリルアミドの制御に応用するには慎重な検討が必要であると考えられる。実際にカナダの研究者は比較的低温では褐変が進行してもアクリルアミドの生成が認められないことを報告している（別添1）。⁶

食品調理時のアクリルアミド生成反応の阻害に関する研究は現在多くの研究者によって試みられている模様であるが、まだ研究段階であり、製造時または家庭での調理時に有効な方策は得られていない。ただし、実験室的にはジャガイモをゆでた後アスパラギナーゼ処理をすることによりマイクロウェーブ処理条件で生成するアクリルアミドを99%以上抑制できたとすることが報告されている。（FAO/WHO seminar on Acrylamide in food: Current State of Affairs, 2003年3月16日、Barbara Petersenの報告）。

16

食品中のアクリルアミド含有量を評価する際に注意すべきことは、本化合物の反応性である。アクリルアミドは反応性に富みラジカル反応経路でポリマーを形成するとともにミカエルアクセプターとして機能し、各種求核試薬と反応する。例えば、ヘモグロビンタンパク質のバリンのアミノ基との付加体が報告されている。¹⁷加熱条件下では生成したアクリルアミドは、一方で他のアミノ基などを有する化合物と反応し、消失していると考えられる。実際カナダ政府の研究者グループはモデル系を用いた実験で反応時間が長くなるとむしろ経時的にアクリルアミドの生成量が減少することを報告している。⁵

別添1 「Becalsky A., Lau B. P-Y, Lewis D., and Seaman S.; Acrylamide in food: Occurrence, sources and modeling. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 802-808 (2003).」の要約

本論文は1) ポテトチップ等の食品中に含まれるアクリルアミド含量の測定、2) アクリルアミドの生成機構とその生成量を修飾する因子に関する研究である。

著者等は、ポテトチップスおよびフレンチフライからスウェーデン研究者等の報告した値と同程度の高濃度アクリルアミドを検出している。

ポテトチップを高温でフライにしたときの油、添加物のアクリルアミド生成に及ぼす効果が検討された。著者らはパラフィン中でフライにしてもコーンオイルやオリーブオイルと同様アクリルアミドが生成することを明らかにし、この結果からアクリルアミド生成には、油中のトリグリセリドから生成したアクリル酸が関与しているのではないと結論している。興味深いことに著者らは併せてフライ時に使用するオイルとしてオリーブオイルはコーンオイルよりもアクリルアミドを生成しやすいことおよびローズマリーの添加はアクリルアミドの生成を減少させると報告している。

著者等はアミノ酸とグルコースとのメイラード反応におけるアクリルアミド生成を検討し、ジャガイモ中のアミノ酸組成と同一アミノ酸 (Asn, Asp, Gln, Glu, Lys, Val) 混合物とグルコースとの反応によりポテトチップ中に存在する量と同程度のアクリルアミドが生成することを確認し、さらにアスパラギンがその中心的な役割を果たしていることを明らかにした。

アスパラギンとグルコースによるモデル反応系を用いた実験で、反応温度が120-140℃では、メイラード反応は進行し、褐色の泡状物質は生成するもののアクリルアミドは生成しないこと、またアスパラギンのグルコースに対する比が0.5から1のときアクリルアミドの生成が最大になることを報告している。また高温下長時間の加熱はむしろアクリルアミドの生成を減少させること、お

よびリジンの添加はアクリルアミドの生成を40% 低下させることを報告した。

また ^{15}N アミド窒素標識アスパラギンを用い、アクリルアミドに ^{15}N が取り込まれることを示した実験から、アクリルアミドの窒素元素はアンモニア分子に由来するのではなく、アスパラギンのアミドの窒素に由来することが証明された。

別添2 「Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448-449 (2002).」の要約

本論文は、アクリルアミドがメイラード反応に関連しておこるストレッカー反応により生成すること明らかにすることを目的としている(図1)。アスパラギンは側鎖に炭素原子2個および窒素原子1個を有しており、アクリルアミド生成に最も適当なアミノ酸であることから、アスパラギンを中心にグルコースとのメイラード反応が解析されている。

アスパラギンとグルコースの等モル混合物をリン酸緩衝液中で 185°C 、20分加熱すると相当量(221mg/mol)のアクリルアミドが生成する。アクリルアミド生成は温度に依存し、 100°C 以上で反応は進行する(図2)。アスパラギンの代わりにグリシン、システイン、メチオニンも反応させても、アクリルアミドの生成は確認できなかったが、グルタミンやアスパラギン酸をグルコースと反応した場合には極少量ではあるが生成することが明らかとされた。

水非存在下でアスパラギンをグルコースと反応させた場合には、アクリルアミドの生成は減少した。著者らはその理由として試料が十分均一に混合しないためとしている。グルタミンとアスパラギン酸は非水条件下グルコースと反応して、極少量ではあるがアクリルアミドを生成した。

反応機構を明らかにするため、メイラード反応

で生成するジカルボニル化合物の一つである2,3-ブタンジオンとアミノ酸との反応(ストレッカー反応)が解析され、アスパラギンとの反応によりアクリルアミドが40mg/mol(水非存在下)及び63mg/mol(緩衝液中)生成することが示された。アスパラギンの加熱のみではアクリルアミドの生成は認められなかった。

これらの結果から、ストレッカー反応によって生じるストレッカーアルデヒド、3-オキソプロピオンアミドがアクリルアミドの前駆体になっていると推定されている。なお、メチオニンを除いて他のアミノ酸と2,3-ブタンジオンの反応ではアクリルアミドの生成は認められない。メチオニンとの反応では中間体として生成したアクロレインとアンモニアからアクリルアミドが生成する機構が提唱されている。

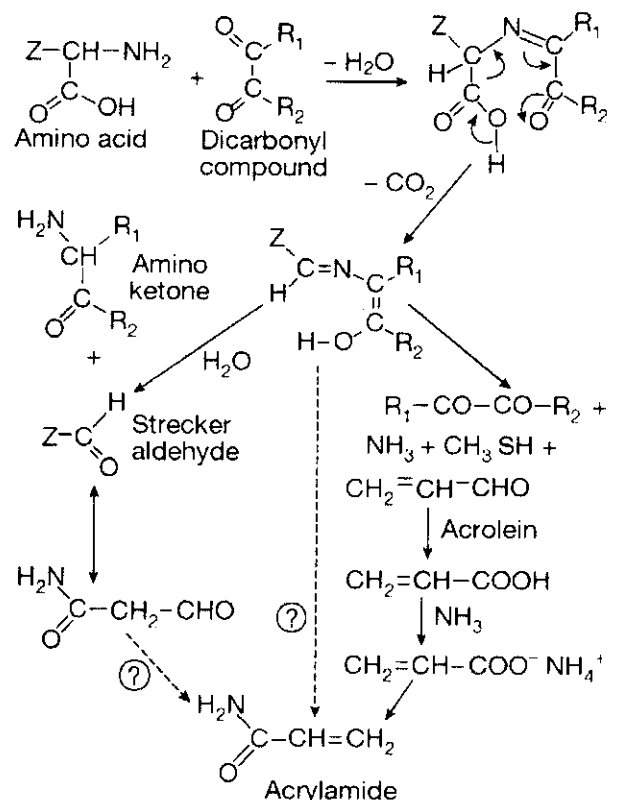
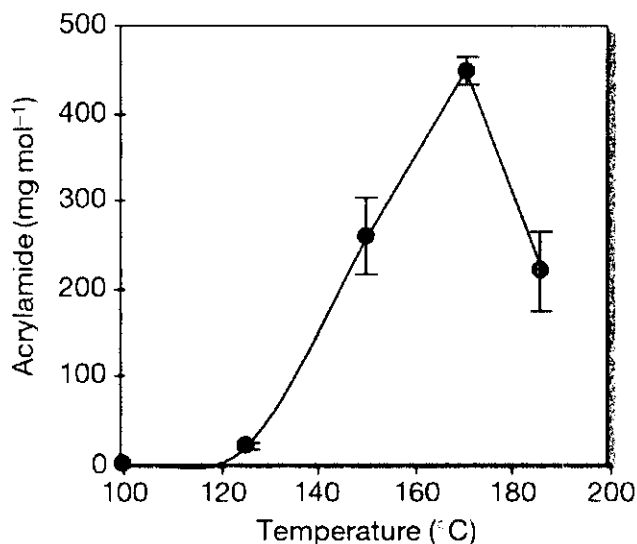


図1 Proposed pathways for the formation of acrylamide after Strecker degradation of the amino acids asparagine and methionine in

the presence of dicarbonyl products from the Maillard reaction. In asparagine, the side chain Z is $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$; in methionine, it is $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$.



⊠ 2 Temperature-dependent formation of acrylamide (mg per mol of amino acid) from asparagine (0.1 mmol) and glucose (0.1 mmol) in 0.5 M phosphate buffer (100 μl , pH 5.5) heated in a sealed glass tube for 20 min. Error bars represent standard deviations ($n = 3$). Acrylamide produced in the reaction was extracted with ethyl acetate and analysed by gas chromatography with mass spectrometry after derivatization to 2,3-dibromopropanamide⁷, using 2-methylacrylamide as the internal standard. Selected ion monitoring was used to detect the analytes, with m/z 150 and 152 for acrylamide and m/z 120 and 122 for methylacrylamide. The presence of acrylamide in selected samples was confirmed in full mass spectra.

別添3 「Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S.: Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419, 449-450 (2002).」の要約

本論文はアスパラギンの N-グリコシドがアクリルアミド生成の前駆体であることを明らかにした論文である。

20 種のアミノ酸をそれぞれ 180°C で 30 分加熱したところ、メチオニンとアスパラギンを加熱した場合に少量(それぞれ 3.6 μ mol/mol および 0.56 μ mol/mol) アクリルアミドの生成を確認した。等モル量のグルコースとアスパラギンを反応させた場合にはアクリルアミドは 368 μ mol/mol 生成し、アスパラギン 1 水和物を用いるか少量の水を添加するとアクリルアミドの生成は 960 μ mol/mol まで増大した。メチオニン、グルタミンについても等モル量のグルコースとの反応でアクリルアミドの生成の増大は増大した。さらにシステインもグルコース存在下加熱処理することによりアクリルアミドを生成した。

炭水化合物の種類とアクリルアミド生成について検討がされた。アスパラギン、グルタミン、メチオニンおよびシステインは等モル量のフルクトース、ガラクトース、ラクトース、およびスクロースとの加熱反応によりそれぞれ相当量のアクリルアミドを生成した。

初期段階におけるメイラード反応生成物である N-グリコシドが上記熱分解反応におけるアクリルアミドの前駆体となっているか否かが検討された(図3)。検討対象となった N-グリコシドは①N-(D-グルコース-1-イル)-1-アスパラギン、②N-(D-フルクトース-1-イル)-1-アスパラギン、③N-(D-グルコース-1-イル)-1-グルタミン、④N-(D-グルコース-1-イル)-1-メチオニンの4種である。いずれもこれら N-グリコシドは加熱処理により相当量のアクリルアミドを生成し (μ mol/molN-

グリコシド当り①1,305, ②1,419, ③14, ④8.1)、アミノ酸と還元糖との反応によるアクリルアミド生成量に匹敵した。また①の N-グリコシドについてはアスパラギンとグルコースとの熱処理により生成することが高分解能質量分析により確認されている。

^{13}C で標識したグルコースを用いた実験からアクリルアミド炭素はアミノ酸に由来することが明らかとされた。また ^{15}N でアミド窒素を標識したアスパラギンを用いると、 ^{15}N の殆どはアクリルアミドに取り込まれた。

これらのことから N-グリコシドから速やかに脱炭酸反応とヘテロリティックな炭素-窒素結合の解裂が生じ、アクリルアミドが生成すると考えられる。

食品加工中では高温下、脱水が進行するので、アミノ酸と還元糖から N-グリコシドは容易に生成すると考えられ、これがアクリルアミド生成の最初の前駆体と考えられる。

(その後 Yaylayan らはアスパラギンと還元糖との反応を詳細に追跡し、アクリルアミドはアスパラギンとのグルコースのシッフ塩基体からオキサゾリジン-5-オン中間体を經由して生成することが報告された。¹⁸