

20031185

別添2

厚生労働科学研究研究費補助金

食品安全確保研究事業

アクリルアミトの生成抑制及び毒性抑制に関する研究

平成15年度 総括 分担研究報告書

主任研究者 今井 俊夫

平成16（2004）年 4月

目 次

| | | | |
|-----|------------------------------------|-------|----|
| I | 総括研究報告 | | |
| | アクリルアミトの生成抑制及び毒性抑制に関する研究 | ----- | 1 |
| | 今井俊夫 | | |
| II | 分担研究報告 | | |
| 1 | 馬鈴薯加工食品中のアクリルアミトの生成条件および生成抑制に関する研究 | -- | 9 |
| | 古賀秀徳 | | |
| 2 | アクリルアミトの代謝と毒性抑制に関する研究 | ----- | 19 |
| | 大野泰雄 | | |
| 3 | アクリルアミトの遺伝毒性抑制に関する研究 | ----- | 22 |
| | 本間正充 | | |
| 4 | アクリルアミトの神経毒性抑制に関する実験的研究 | ----- | 27 |
| | 広瀬雅雄 | | |
| 5 | アクリルアミトの発がん性抑制に関する実験的研究 | ----- | 30 |
| | 今井俊夫 | | |
| III | 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 34 |

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
総括研究報告書

アクリルアミトの生成抑制及び毒性抑制に関する研究

主任研究者 今井 俊夫 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 第三室長

研究要旨

炭水化物を多く含む食品を焼く、揚げることによりアクリルアミト(AA)が生成され、広く加工食品中に含まれることが明らかにされ、現在、その含有量からヒトにおける毒性リスクが解析されている。AAは実験的に神経毒性、精巣毒性のほか、遺伝毒性を伴う発がん性を示すことから、ヒトに対する影響は否定できない。本研究では、AA含量が高いとされる食品について生成量を低減化する方法を明らかにすること、生体に摂取されたAAの代謝過程を明らかにし、各毒性の発現を抑制する方法を実験的に確立することを目的とする。[古賀]食品中におけるAAの生成については、ガラス繊維濾紙を用いたモデル系により、アスパラギン(Asn)の存在下ではフルクトースの濃度が大きく影響し、Asnが特にインステインと共存すると生成率を低減し、水分残存率が高い場合はフライ油温度が高くても揚げ種が100℃に保たれるため殆ど生成されないことを明らかにした。毒性に関しては、[大野]細胞培養液中でのAA及び代謝物として予想されるクリントアミト(GA)の分析法を確立し、ラット遊離肝細胞を用いた実験では、AAからGAへの代謝にCYP2E1が関与し、AAにより細胞内のGSHが低下することを示した。[本間]ヒト細胞、ヒト代謝系を基礎とする遺伝毒性試験系により、AAは塩基対置換などの点突然変異よりも染色体レベルの大きな欠失を引き起こす、いわゆるclastogenの性質をもつこと、代謝活性化系により遺伝毒性の増強がみられることを明らかにした。[広瀬]神経毒性抑制物質として、抗酸化作用、第Ⅱ相解毒酵素誘導あるいはCYP2E1阻害作用を有する物質についてラットを用いて検討し、AAによる精巣障害を部分的に抑制し、神経毒性に抑制効果を示す物質を見出した。[今井]AAの発がん性を抑制する物質を探索するため、AAのラット乳腺早期発がんモデルを確立した。

分担研究者

広瀬 雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理
部長

大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 薬理
部長

本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異
遺伝部・第一室長

古賀 秀徳 カルビー株式会社 CRM クルー
プ 品質保証室・エキスパート（日本ホテト

チノブ協会)

A 研究目的

アクリルアミト(AA)の毒性については、暴露された労働者に神経症状が確認されているほか、実験的には神経毒性、精巣毒性、遺伝毒性、がん原性について多数報告されている。これまでは、ヒトに対するAAの暴露はコントロール可能であると考えられてきたが、炭水

化物を多く含む食品を焼く、または揚げることにより AA が生成され、広く加工食品中に含まれることかストックホルム大学とスウェーデン政府による研究で明らかにされた。その後、各国で種々の加工食品について AA 含有量の調査が行われた結果、AA は焼く、揚げる等の加熱加工を伴う多くの食品、またそれらを原料とする飲料等から広く検出された。その含有量からヒトにおける毒性リスクが現在解析されている段階であるか、特に AA の示す発がん性には遺伝毒性を伴うことを考えると、ヒトに対する影響は否定できず、IARC では Group 2A と判断されている。本研究では、AA 含量が高いとされる食品について生成量が低減てきるような方法を明らかにすること、生体に摂取された AA の代謝過程を明らかにし、各毒性の発現を抑制する方法を実験的に確立することを目的とする。その結果、流通する加工食品中の AA 含有量の低減化が可能となる。更に、生活習慣の改善や毒性抑制物質の積極的な摂取により、AA の摂取により懸念される生体影響を軽減てきることか期待される。

B 研究方法

(1)馬鈴薯加工食品中の AA の生成条件及び生成抑制に関する研究 [古賀]

カラス繊維濾紙にリン酸緩衝液で調製した還元糖溶液および遊離アミノ酸溶液を浸透させたものを加工食品モデル系とし、フライ加工に供したものを溶液フライ系サンプルとした。また、その浸透させた濾紙をフリーストライし、乾体とした状態でオーブンにて5分間加熱したものを非水分オーブン系サンプルとした。それら加熱後サンプルの AA 含量を臭素誘導体化後 GC/MS にて測定した。

(2)AA の代謝と毒性抑制 [大野]

ラットの遊離肝細胞は未処理ないし飲料水として0.1%アセトン水を5日間投与した雌性

SD 系ラットよりコラケナーセ環流法を用いて調製した。細胞培養液は AA を含む Krebs-Ringer-HEPES 緩衝液(pH7.4)中、37°C でインキュベート後、その遠沈上清を HPLC (UV 検出器)を用いて分析した。その溶出溶媒は 10%MeOH, 0.5 mL/min とし、プレカラム及び本カラムとして capcell pak MF 及び Inertsil ODS-3, ないしは GF-310 4B 及び Hypercarb を用いた。また、肝細胞の毒性指標の一つとして、細胞画分のグルタチオン含量を測定した。また、細胞内外の乳酸デヒドロゲナーゼ活性を測定し、細胞死の指標とした。さらに細胞培養液中へ N-アセチルノステインを添加してその影響を観察した。

(3)AA の遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

AA の遺伝毒性誘発機構を明らかにするため、ヒトリノバ芽球細胞株 TK6 及び WTK-1 を用いた。両細胞は同一由来細胞株であるか、WTK-1 は p53 遺伝子に突然変異をもつ。両細胞ともチミンノキナーゼ (TK) 遺伝子かヘテロであり、この遺伝子をターゲットした遺伝子突然変異試験か可能である。対数増殖期にある細胞を AA で 4 時間処理し、細胞毒性、DNA 損傷性 (コメット試験) を評価した。その 48 時間後に小核試験による染色体異常誘発性を、72 時間後に TK 試験による遺伝子突然変異誘発性を評価した。次に、WTK-1 細胞を用いた試験系に活性値の異なる 2 種類のラット肝臓由来 S9 及び 2 種類のヒト肝臓由来 S9 を加え、代謝活性化による AA の遺伝毒性を評価した。さらに、AA により誘発された TK 遺伝子突然変異体 44 種、自然誘発突然変異体 56 種をクローニングした。TK 遺伝子のエクソン 4 とエクソン 7 の多型性部位を、コントロールである β クロビン部位と共に定量的 PCR を行い、GeneScan 解析により LOH 型突然変異の有無とタイプを同定した。

(4)AA の神経毒性抑制に関する実験的研究

[広瀬]

SD IGS 雄ラットを8群, 各10匹に分け, 各種の候補物質は混餌により, AAは飲水により投与した。AAの投与濃度は, 飲水投与により数週間以内に神経障害が生じるとされる文献値を参考に200 ppmとした。被験物質として, 神経細胞に対する抗酸化作用を示し, 糖尿病性ニューロパチーなどに対して抑制作用を示すことか知られている α -lipoic acid (ALA), 強い抗酸化作用を示す α -tocopherol (TP), ニンニク由来の第II相解毒酵素の誘導剤でありCYP 2E1の阻害剤であるdiallyl sulfide (DAS)を用いた。被験物質を7日間前投与の後, 28日間被験物質とAAを併用投与した。毎処置対照群, AAないし被験物質の単独投与群も併せて設定した。投与期間中, 神経症状(Gait score)を週1回モニターし, 各個体について90x90x20cmのプラスチック製の箱に静置, 姿勢などを観察し, Normal gaitを1点, Slightly abnormal gait (slight ataxia, hopping gait, foot splay)を2点, Moderately abnormal gait (obvious ataxia, foot splay, limb abduction)を3点, Severely abnormal gait (inability to support body weight and foot splay)を4点としてカウントした。実験終了時には解剖を行い, 肝臓, 精巣, 精巣上体, 脳(小脳と延髄を含む), 頸髄, 胸髄, 腰髄, 三叉神経, 坐骨神経を採取, 肝臓, 精巣, 精巣上体については重量を測定した。坐骨神経はエポン包埋後, トルインフルー染色を行い, 他の臓器はパラフィン包埋切片につき, ヘマトキニン・エオン染色を行って病理組織学的に観察した。

(5) AAの発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

SD IGS 雌ラット60匹に甲状腺発癌物質である*N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN, 2800mg/kg体重)を単回皮下投与した1

週後に乳腺発癌物質である7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA, 50mg/kg体重)を単回強制経口投与してラットを3群に分け, AAを40, 20及び0(対照)ppm濃度で22週間飲水投与した。AA濃度は, 報告されている2年間の発がん性試験で乳腺及び甲状腺に発がん性かみられた用量にもとついて設定した。次に, SD IGS 雌ラット60匹に, 乳腺及び甲状腺をはじめ諸臓器に発癌標的性を示す*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU, 50 mg/kg体重)を単回腹腔内投与した後ラットを3群に分け, AAを40, 20及び0(対照)ppm濃度で30週間飲水投与した。各実験につき, AA投与期間中は週1回, 触診により乳腺腫瘍の発生状況を観察してその大きさを測定した。投与期間終了後は, エーテル深麻酔下にて動物を放血屠殺, 剖検した。剥皮後, 皮下結節/腫瘍を詳細に観察し, 甲状腺, 肝臓については摘出後重量を測定した。さらに各発癌物質の他の標的臓器についても摘出し, 病理組織学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は, 「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い, 動物の愛護に十分配慮して行った。また, 使用したヒト肝臓由来S9は非営利団体であるHuman and Animal Bridges (HAB)より研究目的で供与されたものであり, 倫理上問題はない。また, 全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C 研究結果

(1) 馬鈴薯加工食品中のAAの生成条件及び生成抑制に関する研究 [古賀]

フライ調理過程における揚げ種中温度, 水分残存率, AA生成率を測定したところ, 水分が十分に残存している場合にはフライ油が170°C以上であっても揚げ種中温度は100°C程度に留まりAAは殆ど生成されないことか

分かった。次に、アスパラギン(Asn)量を一定にし、その量に対する還元糖の量をモル比で2倍、3倍と増やしたときのAA生成率を測定した結果、非水分オープン系でのAA生成率は溶液フライ系と比較して著しく低く、加熱時における水分の影響が示唆され、溶液フライ系におけるAA生成率はグルコース(Glc)ではその添加量がAsnに対して1:1程度までは増加したかその後は逆に減少した。しかしフルクトース(Fru)では添加量の増加に伴いAAが増加し、Asn存在下ではFruがAA生成に大きく影響することか示唆された。さらに種々の遊離アミノ酸のAA生成に及ぼす影響を検討した。GlcとAsnの反応系に遊離アミノ酸を共存させた場合、Gln, Val, Argなどは共存することでAA生成率が増加し、特にCysのほかGlu, Lys, AspなどはAA生成率を抑制することか分かった

(2)AAの代謝と毒性抑制 [大野]

AA及びその代謝物と推定されているエポキント体のクリンダミト(GA)の標品を用いてHPLC(UV検出器)での分析を検討した。プレカラム及び本カラムとしてcapcell pak MF及びInertsil ODS-3,あるいはGF-310 4B及びHypercarbを用いた場合のいずれもUV195-200nmで比較的高感度で検出されたか、細胞培養溶液で検討した場合、前者のカラム組合せでは妨害ピークが大きく、妨害ピークの少ない後者のカラムの組合せを用いることとした。測定感度はGAかAAより10倍以上低かった。ラット遊離肝細胞系にAAを6時間までインキュベートした場合、AA高濃度域ではHPLC上でそのピークの減少は観察できなかったか、GAの生成が認められ、このGA生成はほぼ2時間まで直線性が認められた。アセトンを投与したラットより調製した遊離肝細胞では、未処理ラットのものより3-4倍高い活性がみられ、その増減が顕著であった。

AA低濃度域ではHPLC上でそのピークの減少と同時にGAの生成が認められた。また、細胞内GSH含量の変化を検討した結果、AA低濃度域ではGSH量の減少はコントロールと差が認められなかったか、AA高濃度域ではGSH量の減少はコントロールでの減少量より顕著で、AAによる影響が見られた。また、培地中にN-アセチルシステインを添加することでGSH含量の減少が顕著に抑制された。また、LDH法による細胞死の変動を観測した結果、細胞死の変動において、アクリルアミトの濃度の変化(0-3mM)やN-アセチルシステイン等の添加による影響が認められなかった。

(3)AAの遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

TK6, WTK-1細胞とも、AAは1mg/mlまでの濃度で用量依存的に細胞毒性を示し、それに対応して遺伝子突然変異、小核頻度の誘発が認められた。最大突然変異誘発率は7~8倍、最大小核誘発率は3倍程度で両細胞に違いは認められなかったか、細胞毒性に関してはWTK-1が若干抵抗性を示した。次に、WTK-1細胞の試験系について2つのラット肝臓由来S9(induced rat S9及びnormal rat S9)とヒト肝臓由来S9(HLS-059及びpooled S9)を加え試験を行った。Induced rat S9とHLS-059は薬物代謝活性が高い薬剤誘導型S9である。遺伝子突然変異、小核誘発、コメントともS9の添加によりわずかな遺伝毒性の増強が観察されたか、S9間の効果性に関しては明確な結論は得られなかった。ただし、遺伝子突然変異と小核に関してはヒトpooled S9が最も効果的であった。自然誘発及びAA誘発により得られたTK変異体の遺伝子解析については、TK変異体は増殖の早いNG(normal growth)変異体と遅いSG(slow growth)変異体に分類でき、SG変異体のすべてはLOH型変異を示すことか知られているか、AAは全てのタイプの突然変異を誘発し、特にヘミ型LOHを顕著に誘発す

ることかわかった。

(4) AA の神経毒性抑制に関する実験的研究 [広瀬]

Gait score に関し、投与 3 週目まで AA 投与各群の間で明らかな差は認められなかったか、AA+ALA 群で低値傾向を認め、4 週目ではこの群で AA 単独群に比へ明らかな低値を示した。他の併用群では AA 単独群との間に明らかな差は認められなかった。AA 投与を行っていない群では、明らかな神経症状は認められなかった。解剖時、DAS 単独群で肝重量の減少、AA 単独群、AA+ALA、AA+DAS 群で精巣重量の増加、AA+ALA、AA+DAS 群で精巣上体重量の増加を認めた。病理組織学的には、AA 投与により精巣精細管での精上皮細胞の脱落が認められ、その程度は AA 単独に比へ、AA+ALA、AA+TP、AA+DAS 群で明らかに弱かった。また、AA 投与各群で精巣上体管内での細胞残屑が認められ、その程度は AA 単独群に比へ、AA+DAS 群で明らかに弱かった。神経毒性を検索した結果、AA 投与各群で末梢神経の軸索の変性と萎縮を認めたものの、その程度は AA 単独群に比へ AA+ALA 群で明らかに弱いことか確認された。他の AA との併用群では AA 単独群との間に明らかな差は認められなかった。

(5) AA の発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

DMBA-DHPN モデルでは、触診による乳腺腫瘍の観察において、その発生頻度、数及び体積の推移に AA 投与による著明な変化はみられず、剖検時の甲状腺及び肝重量、組織学的検索にもとづく乳腺腫瘍の頻度及び数に対しても AA 投与の影響は認められなかった。甲状腺においては、対照群を含む各群に腫瘍を含む増殖性病変は認められず、他臓器の腫瘍についても AA 投与による影響はみられなかった。MNU モデルにおいて、触診による乳腺腫瘍の観察では、40 及び 20ppm 群において、その発

生頻度及び数に増加傾向がみられた。剖検時の甲状腺及び肝重量に AA 投与による影響はみられなかった。乳腺腫瘍の組織学的検索において、対照群の 20 例中 10 例 (50%) に 1.00 ± 1.34 個/ラットの腺癌がみられ、40ppm 群では 20 例中 16 例 (80%) と有意に ($p < 0.05$) 発生頻度が増加し、発生数についても 2.10 ± 2.53 個/ラットと増加傾向を示した。20ppm 群では発生頻度及び数が増加傾向を示した。甲状腺では対照群を含む各群に腫瘍を含む増殖性病変は認められず、他臓器の腫瘍についても AA 投与による影響はみられなかった。

D 考察

(1) 馬鈴薯加工食品中の AA の生成条件及び生成抑制に関する研究 [古賀]

今回得られた結果及びこれまでの研究報告より、加工食品中の AA 生成機序を推定し、主に 2 つ以上の生成経路があると考えられた。1 つは Asn と還元糖が反応しグリコントを經由し AA を生成する経路 (経路 1)、1 つは Gln などの反応性の高い遊離アミノ酸がまず還元糖と反応しシカルホニル化合物 (3-DG, 1-DG) を生成、または Fru が単独でシカルホニル化合物に変化し、これらのシカルホニル化合物と Asn とか反応することて生成する経路 (経路 2) であり、経路 2 の方が経路 1 より Asn に対する AA 生成率は高いと推測された。遊離アミノ酸組成については、反応性の高い十分な Gln などと Asn が共存した場合には、まず還元糖と Gln などが反応し (結果 Asn が温存されて)、シカルホニル化合物を生成し、そのシカルホニル化合物と残存していた Asn とか十分に反応できることて AA が増加すると推測された。それに反し、反応性が Asn と同じかまたは低い Glu のような遊離アミノ酸が多く共存した場合には、経路 1 の反応で Asn が消費され、その後のシカルホニル化合物と反

応するための十分な Asn が無く、またその際には残存している他の Glu のような反応性の低い遊離アミノ酸が競合的に作用し、経路 2 の AA の生成を抑制すると考えられた。

(2) AA の代謝と毒性抑制 [大野]

ラットの遊離肝細胞系を用いて AA と 6 時間までインキュベートし、HPLC 上で GA の生成が認められた。また、未処理ラットの遊離肝細胞より、アセトン水を投与して CYP2E1 を誘導したラットの遊離肝細胞では GA の生成が 3-4 倍と高い活性が確認され、従来言われている AA は CYP2E1 によって GA へ代謝されるという報告 (Susan et al, 1999) と一致した。AA により肝細胞内の GSH 含量は、1-3mM という高濃度域ではコントロールの減少量より顕著に減少し、影響が見られた。この濃度域は AA がラット全身に一樣に分布したとした仮定したときのラットでの急性毒性の経口 LD50 値の 124-251mg/kg に匹敵し興味深い。また、この時添加した N-アセチルンステインは細胞内に取り込まれ GSH の原料として働き GSH 含量の減少を抑制したものと考えられる。一方、漏出 LDH を指標とする LDH 法により AA による遊離肝細胞の細胞死を観劇したか、対照群との差が認められなかった。これらの結果は AA 単独では急性の肝細胞毒性は無いと考えられることを示している。しかし、肝臓が局所的に高濃度に曝された場合や細胞内 GSH により毒性発現が抑えられているアセトアミノフェンなどの薬物との併用によりそれらの毒性が増強される可能性のあることを示唆している。GSH 低下抑制作用のある N-アセチルンステイン等の添加はこのような相互作用による障害を抑制すると思われる。

(3) AA の遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

AA は TK6, WTK-1 の両細胞において用量依存的に遺伝子突然変異と小核の誘発を示したことから、in vitro において明らかに遺伝毒性

を有する。TK6 細胞における突然変異頻度を 2 倍増加させる濃度は 800ug/ml と計算され、これは強変異原物質である MNNG の 2 万倍、MMS の 800 倍に相当する。食品中のモノクロタリン、コウシ酸などについても遺伝毒性や発がん性が懸念されているか、それらの値は 2000 ug/ml と計算され、分子量を考慮するとほぼ同程度の遺伝毒性物質と考えることかてきる。また、遺伝毒性試験は通常 5000ug/ml もしくは 10mM の低い方を最高濃度にするか、この場合 AA の最高試験の濃度は 710ug/ml (10mM) となるか、この濃度までの突然変異、小核誘発率遺伝毒性は低い。以上のことを考慮すると、AA による遺伝毒性の程度は極めて弱いものと判断される。AA による遺伝毒性はラットもしくはヒト肝臓由来 S9 の添加により増強されたことから、遺伝毒性の一部は代謝物によりものと予想された。AA は薬物代謝により、エポキソ環をもつ GA に変換されるものと考えられている。GA は構造的にも強い遺伝毒性を持つことか予想され、実際 GA はエームス試験でも陽性を示す。このことから、GA が遺伝毒性の原因とも考えられる。しかし、この反応に関係する代謝酵素である CYP2E1 は S9 調製後は急速に失活することか知られており、S9 の系で AA と GA の遺伝毒性に対する寄与率を推定することは困難である。ヒト型 CYP2E1 を介した薬物代謝の系による AA の遺伝毒性の系と、GA そのもののヒト細胞に対する遺伝毒性の評価が必要と考えられる。TK 変異体の遺伝子解析の結果、AA は点突然変異よりもむしろ、染色体レベルの大きな欠失などを主とする遺伝的変化を引き起こすことか予想された。このことは、従来 AA がエームス陰性であるのにもかかわらず、強い染色体異常誘発性を持つことを説明するものである。

(4) AA の神経毒性抑制に関する実験的研究 [広瀬]

今回の結果から、AAによる精巣障害に対しては、ALA、TP、DASが部分的に抑制することか明らかとなった。このことは、これらの物質の投与によって、AAによるフリーラシカルの生成が抗酸化作用により抑制されるとともに、遺伝毒性代謝産物であるGAの生成抑制あるいは解毒亢進が生じている可能性が考えられる。神経障害に関しては、gait scoreではALAが部分的に神経症状を改善し、坐骨神経の病理組織学的検索でもALAによる抑制効果が認められた。ALAは神経好性の抗酸化物質として注目されており、以上の結果は、AAによるニューロン内でのフリーラシカルの生成が抑制された可能性を示唆している。今後、これらの実験材料について、病変の定量計測とともに酸化障害の検索を行い、AAの毒性作用に対するこれらの物質による修飾作用を精査する予定である。

(5) AAの発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

AAによる乳腺及び甲状腺に対する早期発がんモデルの確立を試みた。まず、DMBA及びDHPNによる処置を行った後、AAを40及び20ppm濃度で22週間飲水投与したか、乳腺及び甲状腺に対する発がん促進作用は認められなかった。次に、MNUによる処置を行った後、AAを40及び20ppm濃度で30週間飲水投与した結果、40ppm投与により乳癌の発生頻度の有意な($p < 0.05$)増加が認められ、発生数については、明らかな増加がみられた。甲状腺における増殖性病変は対照群を含むいずれの群にも認められなかった。文献的にはDMBA及びMNUにより誘発されたラット乳癌の遺伝子異常の検索により、DMBA乳癌ではマイクロサテライト不安定性(MSI)が高頻度にみられ、MNU乳癌ではH-ras遺伝子の点突然変異が高頻度にみられるか、MSIなどのアレル不均衡の頻度は低いことか報告されている。一方、種々

の遺伝毒性試験において、AAは突然変異誘発性よりも、染色体異常誘発性が強いことか知られていることから、今回の実験においてはH-ras遺伝子の点突然変異が高頻度にみられるMNU乳癌モデルに対して、染色体異常誘発性を有するAAの発がん促進作用が比較的短期間で検出され、MSIが高頻度にみられるDMBA乳癌モデルに対してAAは明らかな影響を及ぼさなかったものと推察された。

E 結論

(1) 馬鈴薯加工食品中のAAの生成条件及び生成抑制に関する研究 [古賀]

ガラス繊維濾紙を用いたモデル系にて加熱加工食品中のAAの生成および抑制条件について検討した結果、Asnの存在下ではFruの濃度が大きく影響し、Asnが特にCysと共存すると生成率を低減し、水分残存率が高い場合はフライ油温度が高くても揚げ種温度が100℃に保たれるため殆ど生成されないことを明らかにした。

(2) AAの代謝と毒性抑制 [大野]

AAからGAへの代謝はCYP2E1によるとの考えを支持する結果が得られた。GAの生成や細胞内GSH量の減少は、肝細胞死につながるほど強くないか、AAによる細胞内GSH含量低下作用は、GSH存在下で解毒される某物の解毒を抑制する可能性がある。N-アセチルンステイン添加はこのGSHの減少を抑制すると考えられる。

(3) AAの遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

ヒト培養細胞に対してAAは明らかに遺伝毒性を示すかその程度は低く、AAの遺伝毒性はS9、特にヒトS9によりわずかであるか増強されたことから、遺伝毒性の一部は代謝物によるものと予想された。AAは塩基対置換などの点突然変異よりもむしろ、染色体レベルの大きな欠失などを主として引き起こすものと考えられた。

(4) AA の神経毒性抑制に関する実験的研究
[広瀬]

AA による精巣障害に対しては, ALA, TP, DAS が部分的に障害を抑制することか明らかとなった。神経障害に関しては, ALA が部分的に抑制効果を示すことか明らかになった。

(5) AA の発がん性抑制に関する実験的研究
[今井]

AA の発がん性に対する抑制物質のスクリーニングを行うための早期発がんモデルとして, MNU による処置後, AA を 40ppm 濃度にて飲水投与すると同時に候補物質を投与するラット乳腺発がんモデルが適していると考えられた。

F 健康危険情報

該当なし。

G 研究発表

1 論文発表

該当なし。

2 学会発表

1) Masao Hirose Japan' s Reaction to the Acrylamide in Foods Issue and Key Research Effort on Prevention of Acrylamide-induced Neuronal and Reproductive Toxicities in Rats 食品中アクリルアミトの健康問題に関する国際シンポジウム, 2003 年 8 月, 韓国, ソウル

2) Masao Hirose Prevention of Acrylamide Induced Toxicity in Rats 第 20 回日本毒性病理学会・第 5 回国際毒性病理学会合同国際学会, 2004 年 2 月, 神戸

H 知的財産権の出願 登録状況 (予定を含む。)

該当なし。

厚生労働省科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

馬鈴薯加工食品中のアクリルアミトの生成条件および生成抑制に関する研究

分担研究者 古賀 秀徳 日本ポテトチップ協会

研究要旨

2002年4月、スウェーデンの研究者により炭水化物を多く含む食品を高温で調理することによりアクリルアミト (AAm) が生成されることか発表された¹⁾。その後、食品中の AAm 分析法か報告され²⁾³⁾、種々の加工食品中の AAm 含有量か調査されてきた^{4)~11)}。そして食品中のアスパラキソ (Asn) と還元糖の加熱により AAm か生成することか分かってきた^{12) 13)}が、その生成メカニソムの詳細およびその生成抑制については未解明の部分か多い。そこで本研究では、ガラス繊維濾紙を用いたモデル系における AAm の生成および抑制条件の検討を行った。

ガラス繊維濾紙にリン酸緩衝液で調製した還元糖溶液および遊離アミノ酸溶液を浸透させたものを加工食品モデル系とし、フライ加工に供したものを溶液フライ系サンプルとした。またその浸透させた濾紙をフリーストライし、乾体とした状態でオープンて5分間加熱したものを非水分オープン系サンプルとした。それら加熱後サンプルの AAm 含量を臭素誘導体化後 GC/MS にて測定した。

フライ調理過程における揚げ種中温度、水分残存率、AAm 生成率を測定したところ、水分か十分に残存している場合にはフライ油温度は 170℃以上であっても揚げ種中温度は 100℃程度に留まっており AAm はほとんど生成されないか、水分か少なくなると急激に揚げ種中温度か上昇し、それに伴って AAm か生成されることか分かった。

次に Asn 量を一定にし、その量に対する還元糖の量をモル比で 2 倍、3 倍と増やしたときの AAm 生成率を測定した。その結果、非水分オープン系での AAm 生成率は、溶液フライ系と比較して著しく低く、加熱時における水分の影響か示唆された。溶液フライ系における AAm 生成率はグルコース (Glc) ではその添加量か Asn に対して 1:1 程度までは増加したかその後は逆に減少した。しかしフルクトース (Fru) では添加量の増加に伴い AAm か増加した。Asn 存在下では Fru か AAm 生成に大きく影響することか示唆された。

さらに種々の遊離アミノ酸の AAm 生成に及ぼす影響を検討した。すなわち Glc と Asn の反応系に遊離アミノ酸を共存させた場合の Asn に対する AAm 生成率を測定した。その結果、Gln, Val, Arg などは共存することて AAm 生成率か増加し、生成を促進させることか分かった。一方で、Cys, Glu, Lys, Asp などは AAm 生成率を抑制することか分かった。

これらの結果より AAm 生成には、Asn と還元糖か反応しグリコントを經由して生成する経路と、Asn を含む遊離アミノ酸かまず還元糖と反応しンカルホニル化合物が生成し、このンカルホニル化合物と Asn とか反応して生成する系の少なくとも 2 経路あると推測した。

研究協力者

| | |
|------|----------|
| 石原克之 | カルビー株式会社 |
| 三好隆行 | カルビー株式会社 |
| 松永篤史 | カルビー株式会社 |
| 中村和哉 | カルビー株式会社 |

A 研究目的

2002年4月、スウェーデンの研究者により炭水化物を多く含む食品を高温で調理することによりアクリルアミド (AAM) が生成されることか発表された¹⁾。その後、食品中の AAM 分析法が報告^{2) 3)}され、種々の加工食品中の AAM 含有量が調査されてきた^{4)~11)}。そして食品中のアスパラギン (Asn) と還元糖の加熱により AAM が生成することか分かってきた^{12) 13)}か、その生成メカニズムの詳細およびその生成抑制については未解明の部分が多い。そこで本研究では、カラス繊維濾紙を用いたモデル系における AAM の生成および抑制条件の検討を行った。

B 研究方法

1 試薬 試液

(サンプル調製用試薬)

0.02 mol/L リン酸二水素ナトリウム水溶液 リン酸二水素ナトリウム (和光純薬工業(株)製 特級) 3.120 g を超純水に溶解させ 1000 mL とした。

0.02 mol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液 リン酸水素二ナトリウム (関東化学(株)製 特級) 2.839 g を超純水に溶解させ 1000 mL とした。

0.02 mol/L リン酸緩衝液 0.02 mol/L リン酸二水素ナトリウム水溶液と 0.02 mol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液とを pH が 4.6, 5.6, 6.6 として 7.6 になるように混合した。

グルコース (Glc) 溶液 D(+)-Glucose (和光純薬工業(株)製 特級) 36.032 g を

0.02 mol/L リン酸緩衝液に溶解させ 100 mL とした (2 mol/L Glc 溶液) それを 0.02 mol/L リン酸緩衝液で希釈し 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02 として 0.01 mol/L の Glc 溶液を調製した。

1 mol/L NaOH 溶液 NaOH (和光純薬工業(株)製 特級) 4.000 g を 100 mL に溶解させた。

0.2 mol/L Asn 溶液 L-Asparagine (和光純薬工業(株)製 特級) 2.642 g を 0.02 mol/L リン酸緩衝液に溶解させ、1 mol/L NaOH と HCl (関東化学(株)製 原子吸光分析用)を用いて pH を 4.6, 5.6, 6.6 として 7.6 とし 100 mL に調製した。

フルクトース (Fru) 溶液 D(-)-Fructose (和光純薬工業(株)製 特級) 36.032 g を 0.02 mol/L リン酸緩衝液に溶解させ 100 mL とした (2 mol/L Fru 溶液) それを 0.02 mol/L リン酸緩衝液で希釈し、1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01 として 0.025 mol/L の溶液を調製した。

0.2 mol/L クリオキサール (Glyo) 溶液 40% Glyoxal Solution (和光純薬工業(株)製 化学用) 2.902 mL を 0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.6) と混合し 1 mol/L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL に調製した。

0.2 mol/L メチルクリオキサール (MeGlyo) 40% Methylglyoxal (ンクマアルトリノチンヤパン(株)) 3.603 mL を、0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.6) と混合し 1 mol/L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL に調製した。

0.2 mol/L ヒルヒンアルデヒド溶液 30~40% Pyruvaldehyde Solution (和光純薬工業(株)製 化学用) 4.117 mL を、0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.6) と混合し 1 mol/L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL

に調製した

0.2 mol / L ヒドロキシメチルフルフラール(HMF)溶液 5 (Hydroxymethyl) furfural (関東化学(株)製 純度 98%) 2.522 g を 0.02 mol / L リン酸緩衝液に溶解させ 1 mol / L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL に調製した

0.2 mol / L 3-デオキシグルコソン (3-DG) 溶液 3-deoxyglucosone (株同仁化学研究所製 蛋白糖化研究用) 10 mg を 0.02 mol / L リン酸緩衝液 (pH 6.6) 0.308 mL に溶解させた

遊離アミノ酸混合溶液 L-Asparagine 954.0 mg, L(+)-Glutamine (和光純薬工業(株)製 特級) 641.7 mg, L(+)-Glutamic acid (和光純薬工業(株)製 特級) 296.5 mg, L-Aspartic acid (和光純薬工業(株)製 特級) 224.6 mg, L(+)-Arginine (和光純薬工業(株)製 特級) 185.9 mg, L-Valine (和光純薬工業(株)製 特級) 118.8 mg, L(+)-Lysine (和光純薬工業(株)製 特級) 117.2 mg, L-Methionine (和光純薬工業(株)製 特級) 60.6 mg, L-Tryptophan (和光純薬工業(株)製 特級) 43.4 mg を 0.02 mol / L リン酸緩衝液 (pH 6.6) に溶解させ 1 mol / L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL に調製した

0.2 mol / L グルタミン (Gln) 溶液 L(+)-Glutamine 2.923 g を 0.02 mol / L リン酸緩衝液 (pH 6.6) に溶解させ 1 mol / L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL に調製した

0.05 mol / L グルタミン酸 (Glu) 溶液 L(+)-Glutamic acid 0.736 g を 0.02 mol / L リン酸緩衝液 (pH 6.6) に溶解させ 1 mol / L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL に調製した

0.2 mol / L ハリン (Val) 溶液 L-Valine 1.172 g を 0.02 mol / L リン酸緩衝液 (pH 6.6) に溶解させ 1 mol / L NaOH と HCl

で pH を 6.6 とし、100 mL に調製した

0.2 mol / L アルギニン (Arg) 溶液 L(+)-Arginine 1.742 g を 0.02 mol / L リン酸緩衝液 (pH 6.6) に溶解させ 1 mol / L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL に調製した

0.2 mol / L リシン (Lys) 溶液 L(+)-Lysine 1.462 g を 0.02 mol / L リン酸緩衝液 (pH 6.6) に溶解させ 1 mol / L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL に調製した

0.05 mol / L アスパラギン酸 (Asp) 溶液 L-Aspartic acid 0.666 g を 0.02 mol / L リン酸緩衝液 (pH 6.6) に溶解させ 1 mol / L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL に調製した

0.2 mol / L システイン (Cys) 溶液 L-Cysteine (関東化学(株)製 特級) 2.423 g を 0.02 mol / L リン酸緩衝液 (pH 6.6) に溶解させ 1 mol / L NaOH と HCl で pH を 6.6 とし 100 mL に調製した

(AAm測定用試薬)

標準品 AAm (純度 99%以上) は関東化学(株)製の電気泳動用を使用した。アクリルアミド 1^{13}C (99 atom% ^{13}C , 以下 AA 1^{13}C と略) は CDN ISOTOPES 社製を使用した

標準原液 各標準品 10 mg を正確に 10 mL の褐色メスフラスコに採り、超純水を加えて全量を 10 mL とし 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準原液とした。本溶液は褐色の共栓付ガラス容器に入れ、冷蔵庫 (5 $^{\circ}\text{C}$) に保存した

標準溶液 各標準原液を超純水で適宜希釈して標準溶液とした

臭化カリウム、トリエチルアミン、アセトン、n-ヘキサン 和光純薬工業(株)製の特級試薬を使用した

0.1 mol / L 臭素酸カリウム溶液 臭素酸カリウム (和光純薬工業(株)製 特級試薬)

1.67 g を超純水に溶解して 100 mL とした
1 mol / L チオ硫酸ナトリウム溶液 チオ硫酸ナトリウム五水和物（和光純薬工業（株）製 特級）24.82 g を超純水に溶解して 100 mL とした

フロリンルカートリッジノンカラム Waters 社製 Sep Pak Plus Florisil を使用した

酢酸エチル、無水硫酸ナトリウム 和光純薬工業（株）製の残留農薬試験用試薬を使用した

超純水 日本ミリポア（株）の超純水装置（MQ Synthesis）を使用した

（遊離アミノ酸測定用試薬）

標準品 遊離アミノ酸 17 種類は和光純薬工業（株）製のアミノ酸混合標準液 H 型を使用した L アスパラギン、L グルタミン、および L トリプトファンは和光純薬工業（株）製の特級試薬を使用した

標準原液 L アスパラギンおよび L グルタミンを 5 mol / L、L トリプトファンを 1 mol / L 含む標準原液を超純水で調製し、冷蔵庫（5℃）にて保存した

標準溶液 標準原液と遊離アミノ酸混合標準液を分析時に適宜混合 希釈して標準溶液とした

その他試薬等 HPLC 移動相に使用したメタノールおよびアセトニトリルは和光純薬工業（株）製の高速液体クロマトグラフ用を使用した その他の試薬は全て和光純薬工業（株）製の特級を使用した

2 装置

ガスクロマトグラフ / 質量分析計 Agilent Technologies 社製ガスクロマトグラフ 6890 及び質量分析計 5973N

ホモンナイサー ウルトラタラノク (IKA JAPAN 社製)

遠心濃縮機 遠心エハポレーター CVE 3100 (EYELA 社製)

凍結乾燥器 FDU 540 型 (EYELA 社製)

高速液体クロマトグラフ Agilent

Technologies 社製高速液体クロマトグラフ 1100LC / ダイオードアレイ検出器

3 濾紙モテルの調製

3.1 ガラス繊維濾紙モテル

ガラス繊維濾紙 (GA 200, 25 mm φ, 0.75 mm, 東洋濾紙（株）製) を鋭利な針状物（発泡スチロールに爪楊枝を刺して作成した針山）上に乗せ、一枚数点の針状物で支えて濾紙以外への溶液の浸透を防げるようにし、各サンプル溶液を濾紙中心に添加吸収させたものを加工食品モテルとした

3.2 溶液フライ系

鉄製鍋にパーム油を 600 g 入れ、電磁調理器で加熱し、目的の温度になった時点で加熱を止め、各溶液を添加吸収させたガラス繊維濾紙 10 枚を投入し、フライしたフライ終了後のガラス繊維濾紙は直ちにステンレス製網さるに移して冷凍庫（-27℃）で凍結させて保存した

3.3 非水分オープン系

溶液を添加吸収させたガラス繊維濾紙を冷凍庫（-27℃）に 3 時間入れて凍結させ、凍結乾燥器にて一晩乾燥させた その乾燥調製サンプルを恒温器中において 5 分間一定温度で加熱後、直ちに冷凍庫（-27℃）で凍結させて保存した

4 AAm 測定

加熱調製濾紙サンプル 5 枚を 500 mL 容三角フラスコにとり、内部標準液として 100 μg / mL AA 1 ¹³C 溶液 100 μL を添加した 超純水 200 mL を加え、2 分間ホモンナイスし、そのうち 40 mL を 250 mL 容の遠沈管に移し 3500 rpm で 10 分間遠心分離した その上澄み液 20 mL を 50 mL の共栓付き遠沈管にとり、ヘキサノール 10 mL ずつ 2 回 5 分間振とう洗浄を行った

5 mol / L 硫酸を用いて pH 1 以下とし、臭化カリウム 10 g を加えて完全に溶解した後、0.1 mol / L 臭素酸カリウム溶液 6 mL を加えよく混合してから冷蔵庫中で 90

分間以上静置した 臭素化後の溶液に 1 mol / L チオ硫酸ナトリウム溶液を臭素の黄褐色が消失するまで加え、過剰の臭素を分解したのち、酢酸エチル 10 mL ずつで 2 回 5 分間振とう抽出した 抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレーターを用いて酢酸エチルを留去した

残留物を 10 % アセトン含有ヘキサノール (10 % A / H) 2 mL で溶解し、予めヘキサノール 10 mL で洗浄したフロリシルカートリッジカラムに負荷した 濃縮容器は 10 % A / H 1 mL ずつで 2 回洗い、洗液をカラムに負荷した カラムを 10 % A / H 6 mL で洗浄した後、20 % A / H 15 mL で被検物質を溶出し試験管で集めた 溶出液を遠心濃縮機で濃縮後、窒素を吹き付けて溶媒を留去し、残留物にアセトン 0.5 mL を加えた後、トリエチルアミン 20 μ L を添加して脱臭化水素し、GC / MS 分析溶液とした

5 GC / MS 測定条件

カラム DB-WAX (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μ m, J&W Scientific 社製) にカートカラムとして不活性化キャピラリーカラム (内径 0.25 mm, 長さ 2 m, J&W Scientific 社製) を接続した

オープン温度 50°C (1 min) \rightarrow 15°C / min \rightarrow 240°C (11.3 min)

注入口温度 250°C

トランスファーライン温度 240°C

イオン化電圧 70 eV (EI モード)

測定モード 選択イオン検出

SIM 条件 モニターイオン (下線が定量用, 他は定性用)

2 フロモプロペンアミト (2-BPA) m / z 149, 151

2 BPA 13C m / z 150, 152

EM 電圧 SIM 測定ではオートチューニング +800 V での設定値を用いた

キャリアーガス ヘリウム (1 mL / min で定流量モード)

注入量 1 μ L (スプリントレス)

6 遊離アミノ酸測定

フートカウンターにて試料を粉碎し、直ちに約 5 g を 50 mL 三角フラスコに秤量し、75 % エタノール 20 mL を加えた 80°C 20 分間で還留抽出を行ない、上清を 5A 濾紙で濾過して 200 mL ナス型フラスコへ移したのち、50 mL 三角フラスコの残渣に 75 % エタノール 20 mL を加え再度還留抽出を行なった 還留抽出は計 3 回繰り返す、三角フラスコおよび残渣を 75 % エタノールで洗った 洗液を含む濾液を 200 mL ナス型フラスコへ回収し、密栓をして 5°C 16 時間静置した

その後、フラスコをロータリーエバポレーターへセットし、40°C で減圧 (30 mmHg) してエタノール分を除去し、濾液を 10 分の 1 に濃縮した この濃縮液の全量を 50 mL のメスフラスコへ移した ナス型フラスコ内は 40 mM NaH₂PO₄ (pH 7.8) で洗い、同様に 50 mL メスフラスコへ回収した そして全体を 40 mM NaH₂PO₄ (pH 7.8) で 50 mL に定容した 上記の希釈液の一部 (2 mL) をろ過 (DISMIC 25cs, Advantec 社製) にてクリーンアップし HPLC 分析溶液とした

7 HPLC 測定条件

カラム ZORBAX Eclipse AAA (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3.5 μ m) にカートカラム Eclipse AAA (内径 4.6 mm, 長さ 12.5 mm, 粒子径 3.5 μ m) を接続した

カラムオープン温度 40°C

移動相 A 液 40 mol / L NaH₂PO₄ (pH 7.8), B 液 45 % CH₃OH, 45 % CH₃CN, 10 % H₂O

流速 2.0 mL

反応試薬 o-フタルアルテヒト (OPA, 1 級アミノ酸用), 9-フルオレニルメチルクロロフォルメート (FMOC, 2 級アミノ酸用)

検出器 ダイオードアレイ検出器 (DAD)
検出波長 DAD A 338 nm (OPA アミノ酸), DAD B 262 nm (FMOC アミノ酸)

8 水分測定

試料の水分含量の測定は常温加熱乾燥法に従った すなわちフートカウンターにて粉碎した試料から、たたちに約 10 g をアルミプレートに平たく延ばして秤量し、恒温器で 100 °C・5 時間乾燥したのち再度秤量し、水分含量を計算した

9 揚げ種中温度測定

ガラス繊維濾紙の側面から中央付近に長極細シース熱電対 (T34, φ0.25 ストレートニース, ㈱岡崎製作所製) を挿入し、モハイル型温度レコーダー (NR 1000, KEYENCE 社製) で測定した

C 結果および考察

1 加工温度, 時間および pH の影響

1 加工温度による影響

Glc と Asn との等モル混合溶液をガラス繊維濾紙 1 枚あたり 400 μL 添加 (Glc 7.21 mg, Asn 5.28 mg) し、溶液フライ系と非水分オープン系で種々の温度で加熱した後のガラス繊維濾紙の写真および AAm の生成率について図 1 に示した。その結果、溶液フライ系と非水分オープン系では大きく生成率が異なり、溶液フライ系では非水分オープン系の 10 倍程の生成率が認められ、加熱時における水分の影響が示唆された。同様に褐変度も溶液フライ系では大きく、非水分オープン系では褐変反応も溶液フライ系程進んでいないと思われた。また、非水分オープン系では、これまでの報告^{10) 11)}と同様に 120 °C より AAm の生成が認められた。溶液フライ系では 100~140 °C では温度が低く常圧下でのフライ加工とならなかったため分析は実施しなかった。溶液フライ系および、非水分オープン系ではそれぞれ 180 °C, 200 °C

を頂点として増減した。それ以上の高温域では共に減少傾向を示し、生成率よりも分解率の方が高いのではないかと考えられた。またフライ調理にもっぱら使用されている 160 °C~180 °C の温度帯では僅かな温度の違いでも大きく生成率が異なってくるのが分かった。

2 pH による影響

pH による AAm 生成率への影響について図 2 に示した。1 の結果と同様に非水分オープン系では溶液フライ系に比べて全ての pH においてほとんど生成されなかった。また溶液フライ系では pH が高いほど、生成率が高いことが分かった。褐変度も溶液フライ系では非水分オープン系よりも濃く、そして pH の高いほど褐変度が高いことも分かった。一方非水分オープン系では pH の違いによる差は認められなかった。これは、Glc はアルカリ水溶液中では環状構造が開いて直鎖構造となり反応性が高くなるため、溶液フライ系では pH が高くなるほど反応しやすくなっている¹⁴⁾と考えられた。

3 フライ過程での AAm 生成率変化

フライ調理過程におけるフライ温度、揚げ種中温度、水分残存率を図 3-(a) に示した。水分が 5 % 以上十分残存している場合にはフライ油温度は 170 °C 以上であっても揚げ種中温度は 100 °C 程度に留まり、その後水分が少なくなると急激に揚げ種中温度が上昇し、フライ油温度に達した。また褐変反応も水分が減少し、温度上昇に伴い進行していることが分かった。そこで図 3-(b) に AAm 生成率変化を示したか、ほぼフライの経時変化に伴って生成され、全く水分が揚げ種中に無い状態では変化しないことが分かった。しかし、15 秒時点では揚げ種の周辺だけが褐変しており、その部分の温度はモニターしている 100 °C ではなく、フライ油温度程度に達していること

示唆された。そこで、この周辺部を切り抜き、中心部だけ、つまり温度をモニターしている部分だけとし AAm を測定した結果を図 3-(c) に示した。その結果、やはり中心部分での生成は低いことか分かった。つまり水分が減少し揚げ種中温度が上昇するに伴い AAm も顕著に上昇することか分かった。このことから、フライ調理過程で水分が減少し褐変反応が進行始める段階でのフライ油温度およびその加熱時間が極めて重要であることか示唆された。

II カルボニル化合物の影響

食品加工中に生成されると考えられるメイラート反応および還元糖分解物由来カルボニル化合物^{15) 16)}と Asn との反応による AAm の生成について検討した(図 4) Asn と各カルボニル化合物の等モル混合溶液を濾紙に浸透後に加熱し AAm 生成率を測定した。その結果、非水分オープン系では全てのカルボニル化合物で生成は認められたか、還元糖と比較するとその生成率は極めて低いことか分かった。一方で溶液フライ系では、3 DG か Glc とほぼ同等の生成率を示し、次に Glyo か Glc の 30%、HMF か 3%程の生成率を示し、MeGlyo、ピルヒンアルテヒトでは生成は認められなかった。このことは低分子の化合物は沸点が低く、180℃でのフライ時には直ぐに揮発してしまつたものと考えられた。しかし、Fru では Glc の約 2 倍の生成率を示し Glc 以上に AAm 生成に大きく関与していることか示唆された。

III AAm 生成率に及ぼす Glc と Fru との比較

Glc または Fru と Asn の反応による AAm の生成率の比較を図 5 に示した。Asn 量を固定し、その量に対して還元糖の量(モル)を 2 倍、3 倍と徐々に増やし生成率を測定したところ、溶液フライ系において Glc は添加量が 1:1 程度までは AAm は増

加するか、その後は逆に減少することか分かった。また褐変度も Glc では Asn の 4 倍量以上では減少することか認められた。一方 Fru では添加量を増加させればそれに伴って AAm が増加することか分かった。さらに褐変度も Fru の増加に伴い増加することが認められた。非水分オープン系では Glc と Fru で顕著な差は認められなかったか、Asn と同量までは生成率は増加し、それ以上増加した場合は生成率は減少した。褐変度は溶液フライ系と同様に Glc では 4 倍量以上で減少か認められたか、Fru では認められなかった。このことより AAm の前駆体として重要なのは Asn と Fru であることか示唆された。

IV 遊離アミノ酸の影響

食品中には遊離アミノ酸がさまざまな組成で存在しているか、シャカイモを例にとりその遊離アミノ酸含量を測定した(表 1)そこでこれら遊離アミノ酸の反応性について検討するために、含量の多い遊離アミノ酸 10 種について同様の組成比で調製し、Glc に対し総量で 2 倍となる様、濾紙に浸透させフライし経時的に残存遊離アミノ酸を測定し、遊離アミノ酸の反応性について検討した(図 6)ここでは遊離アミノ酸組成比の上位 5 種のみ表示した。これより、Asn と Gln とか急激に減少しており反応性の高い遊離アミノ酸であり、また非常に減少の少ない Asp、Glu 等は反応性の低い遊離アミノ酸であることか分かった。

そしてこれらの遊離アミノ酸が AAm 生成にどのように影響しているかを確認するために、Glc / Asn 等モルの系に種々の遊離アミノ酸を等モル添加し、その影響を検討した(図 7)その結果、Cys は溶液フライ系、非水分オープン系共に顕著に AAm 生成を抑制し、溶液フライ系では褐変反応も抑制した。また、Gln、Glu 共に非水分オープン系では約 50%抑制し、遊離アミノ

酸による違いがなかった。一方溶液フライ系では Glu, Lys, Asp では抑制し, Gln, Val では生成を促進していることが分かった。

さらに, Glc を一定量とし, 種々の遊離アミノ酸と Asn との存在比率を段階的に変更し共存させた場合の AAm 生成に及ぼす影響について検討した (図 8)。なお, 遊離アミノ酸と Glc 比は 2:1 に固定した。Cys では生成抑制効果が大きかったので除外した。Gln, Val, Arg, Glu, Lys, Asp のそれぞれと Glc との反応では AAm は生成されないことが分かった。また, Glc と Asn の比の 1:2 を基準として Asn 含量に比例した計算による AAm 理論値と比較すると, Gln, Val, Arg は添加することで AAm 生成が理論値より増加し, 生成を促進させていることが認められた。一方で Glu, Lys, Asp は理論値よりも少なく生成を抑制していることが分かった。

次に同様の実験を非水分オープン系でおこなったところ (図 9) 溶液フライ系では反応性の高かった Gln と低かった Arg との間で AAm 生成に及ぼす影響の差は見られなかった。

V 加工食品中での AAm 生成機序の推定

以上の結果およびこれまでの研究報告^{2),11),12),13),14)}より加工食品中の AAm 生成機序を推定した (図 10)。主に 2 つ以上の生成経路があると考えた。すなわち 1 つは Asn と還元糖が反応しグリコントを經由し AAm を生成する経路 (経路 1), もう 1 つは Gln などの反応性の高い遊離アミノ酸がまず還元糖と反応しシカルホニル化合物 (3 DG, 1 DG) を生成, または Fru が単独でシカルホニル化合物に変化し, これらのシカルホニル化合物と Asn とが反応することで生成する経路 (経路 2) であり, 経路 2 の方が経路 1 より Asn に対する AAm 生成率は高いと推測した。

Asn に対して Glc が相当の量存在した系で生成率が減少したのは, Glc と Asn が最初に結合し, そこでほとんどの Asn が消費され, シカルホニル化合物と反応する Asn が残存していないためではないかと考えられた。一方 Fru で生成率の減少が認められなかったのは, 単独で反応性の高い 1 DG へと変化し, その変化した 1 DG と存在する Asn との反応が進むために AAm 生成率は増加するものと考えられた。また, 遊離アミノ酸組成についても反応性の高い十分な Gln などと Asn が共存した場合には, まず還元糖と Gln などが反応し (結果 Asn が温存されて), シカルホニル化合物を生成し, そのシカルホニル化合物と残存していた Asn とが十分に反応できることで AAm が増加すると推測した。またそれに反し, 反応性が Asn と同じかまたは低い Glu のような遊離アミノ酸が多く共存した場合には, 経路 1 の反応で Asn が消費されその後のシカルホニル化合物と反応するための十分な Asn が無く, またその際には残存している他の Glu のような反応性の低い遊離アミノ酸が競合的に作用し, 経路 2 の AAm の生成を抑制するためと考えられた。

D まとめ

ガラス繊維濾紙に遊離アミノ酸溶液および還元糖などシカルホニル化合物水溶液を浸透させたモデル系にて, 加熱加工食品中の AAm の生成および抑制条件について検討した。

- 1) 溶液フライ系では 180 °C で, 非水分オープン系でも 200 °C を頂点として AAm 生成率が増減することが分かった。
- 2) 揚げ種中の pH が低いほど AAm の生成率は低減することが分かった。
- 3) 試料水分の残存率が 5 % 以下レベルに達した場合の加熱温度とその加熱時間が AAm 生成に大きく関与していることが示

唆された

4) Fru は AAm 生成に効果的に影響することか示唆された

5) Asn と共存する遊離アミノ酸の組成は AAm 生成率に影響すること、特に Cys の存在は抑制効果を持つことか示唆された

研究発表

1 論文発表

無し

2 学会発表

無し

3 知的財産権の出願登録状況

無し

参考文献

1) <http://www.slv.se/eng/default.asp>

2)加工食品中のアクリルアミトの測定 分析及びリスク評価等に関する研究 平成14年度 総括 分担研究報告書 (2003)

3) Nemoto S, Takatsuki S, Sasaki K, and Maitani T, Determination of acrylamide in foods by GC/MS using ¹³C labeled acrylamide as an internal standard, *J Food Hyg Soc Japan*(食衛誌) 43(12), 371-376 (2002)

4)吉田充,小野裕嗣,亀山真由美,忠田吉弘,箭田浩士,小林秀登,石坂眞澄,日本で市販されている加工食品中のアクリルアミトの分析,日本食品科学工学会誌,49(12), 822-825 (2002)

5)Takatsuki S, Nemoto S, Sasaki K, Maitani T, Determination of acrylamide in processed food by LC/MS using column switching, *J Food Hyg Soc Japan*(食衛誌), 44(2), 89-95 (2003)

6)Ono H, Chuda Y, Ohnishi Kameyama

M, Ishizaka M, Kobayashi H, Yoshida M, Analysis of acrylamide by LC MS/MS and GC-MS in processed Japanese food, *Food Additives and contaminants*, 20(3), 215-220 (2003)

7) U S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, Exploratory Data on Acrylamide in Foods, December 4, 2002 <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydata.html>

8) U S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, Exploratory Data on Acrylamide in Foods February 2003, Update March 12, 2003 <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydata2.html>

9)Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Tornoqvist M, Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs, *J Agric Food Chem*, 50, 4998-5006 (2002)

10)Becalski A, Lau B P Y, Lewis D, Seaman S W, Acrylamide in food occurrence, sources, and modeling, *J Agric Food Chem*, 5, 802-808 (2003)

11)Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep fried products, *Eur J Lipid Sci Technol* 104, 762-771 (2002)

12)Mottram, D S, Wedzicha, B L, Dodson, A T Acrylamide is formed in the Maillard reaction *Nature*, 419, 448-449 (2002)

13)Stadler, R H, Blaank, I, Varga, N, Robert, F, Hau, J, Guy, P A, Robert, M C, Riediker, S, Acrylamide from Maillard reaction products *Nature*, 419, 448-449 (2002)

14)柴沼忠三, 綾野雄幸編, 要説 食品化学, 第一出版株式会社 1979, pp15-17

15) Glenn R Ponder and Geoffrey N Richards Pyrolysis of inulin, glucose, and fructose, *Carbohydrate Research*, 244 341-359 (1993)

16) Sara I F S Martins, Antonius T M Marcelis, Martinus A J S van Boekel Kinetic modelling of Amadori N (1-deoxy-D-fructosyl) glycine degradation pathways Part I – Reaction mechanism, *Carbohydrate Research*, 338 1651-1663 (2003)