

200401147A

別添1

厚生労働科学研究研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

アクリルアミドの生成抑制及び毒性抑制に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 今井 俊夫

平成17(2005)年 4月

目 次

| | | |
|---|-------|----|
| I. 総括研究報告 | | |
| アクリルアミド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ドの生成条件および生成抑制に関する研究 | -- | 10 |
| 古賀秀徳 | | |
| 2. アクリルアミドの代謝と毒性抑制に関する研究 | ----- | 26 |
| 大野泰雄 | | |
| 3. アクリルアミドの遺伝毒性抑制に関する研究 | ----- | 38 |
| 本間正充 | | |
| 4. アクリルアミドの神経毒性抑制に関する実験的研究 | ----- | 48 |
| 広瀬雅雄 | | |
| 5. アクリルアミドの発がん性抑制に関する実験的研究 | ----- | 69 |
| 今井俊夫 | | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 80 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 81 |
| 1. Formation of acrylamide in a processed food model system, and examination of inhibitory conditions | | |
| 2. Chemoprevention of acrylamide toxicity by antioxidative agents in rats - Effective suppression of testicular toxicity by phenylethyl isothiocyanate | | |
| 3. Enhancement by acrylamide of <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced rat mammary tumor development -possible application for a model to detect co-modifiers of carcino-genesis | | |

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
総括研究報告書

アクリルアミド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ド(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た。AAは実験的に神経毒性、精巢毒性のほか、遺伝毒性を伴う発がん性を示すことからヒトの健康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、及び生体に摂取されたAAの毒性抑制法を実験的に確立することを目的とする。[古賀]AAの生成について、ジャガイモスライス片を用いたモデル系により、スライス片に水分が十分に残存している場合にはフライ油温度に関わらず品温は100°C程度に留まってAAは殆ど生成されず、水分が少なくなると品温の急激な上昇に伴いAAの生成されることを明らかにした。フライ前の水処理及びフライ後に余熱を取除くことの有効性についても検討した。毒性に関しては、[大野]ラット肝細胞あるいは神経系細胞を用いた実験で、AAの代謝物であるグリシドアミド(GA)がAAよりも強い細胞毒性を示すこと、N-アセチルシステインあるいはメチオニンが毒性抑制効果を示すことを明らかにし、毒性発現に酸化ストレスが関与している可能性を示した。[本間]ヒトリンパ芽球を用いた実験で、GAはAAより低濃度で強い細胞毒性と高い遺伝毒性誘発率を示し、AAは染色体レベルでの大きな欠失を、GAは主として点突然変異を誘発することを明らかにした。またAAの吸着作用を期待して6種類の食物繊維の遺伝毒性に対する軽減作用を検討したが、何れにも効果はみられなかった。[広瀬] In vivoにおいて、抗酸化物質である α リポ酸などの神経毒性抑制効果が確認されたが、その機序としてグルタチオン系のレドックス制御が介在する可能性を示した。また、消化管におけるAAの吸収阻害作用を期待して5種類の食物繊維等の作用を検討したが、効果はみられなかった。[今井]発癌物質であるMNUを用いたAAのラット乳腺発がん早期検出モデルにより、抗酸化作用をはじめとした種々の作用をもつ4種類の物質の発がん抑制作用を検討した結果、CYP2E1阻害作用などを有するイソチオシアン酸フェネチルの効果を示す結果を得た。

分担研究者

- 1) 広瀬 雅雄 国立医薬品食品衛生研究所・病理部長
- 2) 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部長

- 3) 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
- 4) 古賀 秀徳 カルビー株式会社・CRM グループ・品質保証室・エキスパート（日本スナック・シリアルフーズ協会）

A. 研究目的

アクリルアミド(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。ヒトに対するAAの暴露はこれまで職業的な特殊条件下にのみ起こり得ることから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が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

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〕

加工食品モデルの一つとして、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ズドライし、乾体とした状態でオープンにて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AA含量を臭素誘導体化後GC/MSにて測定した。原料あるいは加工条件として、含まれる還元糖の種類あるいは加熱温度の影響について検討した。次に実際の食品を用いたモデルとして、ジャガイモ(5ヶ月間低温貯蔵した北海道産トヨシロ)を水道水で洗浄後、剥皮せずにスライサーにて1.42mmの厚さでスライスし、片抜きにて維管束内部をくり抜いたものを約15g量りとり、蒸留水にて水処理を行った後、軽く表面の水分を拭き取ったものをジャガイモモデル系とした。180°Cに過熱したフ

料とする飲料等から広く検出された。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、JECFAではその暴露マージンからヒトの健康に影響を及ぼし得ると判断されている。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できるような方法を明らかにすること、及び生体に摂取されたAAの代謝過程を明らかにして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することが期待される。

ライヤー(パームオレイン:ライス=1:1)で90秒間フライした後、生成されたAA含量を臭素誘導体化後GC/MSにて測定した。加工条件として、フライ前の水処理(処理水温度、処理時間)、フライ過程における品温、水分残存率、フライ後の余熱の影響について検討した。

(2)AAの代謝と毒性抑制〔大野〕

ラットの遊離肝細胞は雄性SD系ラットよりコラゲナーゼ環流法を用いて調製した。細胞培養溶液はAAあるいはGA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。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(GSH)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て細胞死の指標とした。さらに細胞培養溶液中へN-アセチルシステイン、メチオニン、アスコルビン酸あるいはGSHを添加してその影響を観察した。

ラット神経系細胞については、胎児海馬から神経細胞の、新生児からアストロサイトの

初代培養を行った。生細胞数の測定には MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium)アッセイを用いた。細胞の同定については、神経細胞に対し anti-NeuN, アストロサイトに対しては anti-GFAP 抗体を用いて免疫組織化学を行った。細胞培養液中に AA あるいは GA を添加して各々の毒性を比較したほか、N-アセチルシステイン, p38MAP キナーゼ阻害剤 SB203850, カスパーゼ阻害剤 Z-VAD 及び SP600125 処理による毒性抑制を検討した。

(3)AA の遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた。対数増殖期にある細胞を AA もしくは GA 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。代謝活性化の系としてはラット肝臓由来 S9 及び 2 種類のヒト肝臓由来 S9 を加え、AA の代謝活性化による遺伝毒性の変化を評価した。更に、AA によって誘発された TK 遺伝子突然変異体 44 種及び自然誘発突然変異体 56 種をクローニングし、定法に従い DNA を抽出した。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 グ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。

次に、生理食塩水で調製した食物繊維 (アルギン酸ナトリウム, イヌリン, グルコマンナン, デキストリン, キチンあるいはメチルセルロース) と細胞浮遊液を等量混合し 3 時間培養した。その後、AA を添加して 4 時間培養し、細胞を洗浄して新鮮な培地で更に 48 時間培養後、小核を観察した。また、細胞毒性は全培養期間中の相対細胞増殖率から求めた。

(4)AA の神経毒性抑制に関する実験的研究

[広瀬]

6 週齢の SD:IGS 雄ラットを 10 群, 各 5 ないし 10 匹に分け, 無処置対照群の他, 被験物質として各種の抗酸化物質 (α -リポ酸; ALA: α -トコフェロール; TP: 硫化ジアリル; DAS: イソチオシアン酸フェネチル; PEITC) は混餌により, AA は飲水により投与した。被験物質を 7 日前投与の後, 28 日間被験物質と AA を併用投与した。投与期間中, 神経症状 (Gait score) をカウントした。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), 三叉神経, 坐骨神経を採取し, 肝臓, 精巣, 精巣上体については重量を測定した。各臓器につき病理組織学的検索を行い, 精巣については細胞残屑の出現した精細管の数を測定した。坐骨神経は 2.5% グルタルアルデヒドの点滴固定を行った後採取し, エポン包埋, トルイジンブルー染色標本を作製して, 軸索変性の数, 神経線維密度, 萎縮した有髄神経線維の数を計測した。大脳, 小脳, 橋・延髄, 三叉神経については, 免疫組織化学的にカタラーゼ (CAT), チオレドキシニン (TRX), γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GCS), ヘムオキシゲナーゼ (HO)-1 の局在, 発現強度の検討を行った。またシナプス傷害の指標として, シナプトフィジン (SYP) の他, シナプシン-1 について小脳分子層での染色性を検討し, SYP については AA により異常な染色性を示す点状構造の分布を計測した。ウェスタンブロッティング解析として, 精巣と肝臓における CYP2E1, GCS, HO-1, CAT, TRX の発現量を検索した。

抗酸化物質投与実験と同様のデザインで, アルギン酸ナトリウム, グルコマンナン, デキストリン, キチンあるいは銅クロロフィリンナトリウムの併用投与を行い, AA により誘発される神経症状, 末梢神経障害, 小脳分子層 SYP 陽性異常構造の分布, 精巣障害に対す

る影響を検討した。

(5)AA の発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

7週齢のSD:IGS雌ラット100匹に、乳腺及び甲状腺をはじめ種々の臓器に発がん標的性を示す *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)を50 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した後ラットを5群に分け、MNU投与1週間後よりAAを40ppm濃度で飲水投与した。AAの投与開始とともに被験物質として1-*O*-ヘキシル-2,3,5-トリメチルヒドロキノン (HTHQ) 0.5% (18週目より0.25%)、 α -トコフェロール (TP) 1%、イソチオシアン酸フェネチル (PEITC) 0.05%あるいは銅クロロフィリンナトリウム (Chlorophyllin) 1%を粉末基礎飼料 (CRF-1) に混じて40週目まで投与した。MNU-AA処置を行い基礎飼料のみを与えた群を対照とした。実験期間中、体重及び摂餌量を週1回測定した。また14週目まで週1回、以後隔週で触診により乳腺腫瘍の発生状況を観察してノギスにてその大きさ (たて×よこ×高さ) 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した。剖検においては剥皮後、皮下結節/腫瘍を詳細に観察して大きさを測定し、病理組織学的検索を行った。なお、触診及び剖検時に測定した腫瘍 (腫瘍) の大きさより、(たて)×(よこ)×(高さ)× $\pi/6$ により体積を計算した。

(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、投与は主に経口投与により実施し、屠殺はエーテル深麻酔下で大動脈ないし心臓からの脱血により行うことにより動物に与える苦痛は最小限にとどめるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、使用したヒト細胞は米国 American Type Culture Collection (ATCC) に登録済みの株化細胞であり、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]

ガラス繊維濾紙モデルを用いて原料中の還元糖の種類について検討したところ、溶液フライ系、非水分オープン系のいずれにおいても、フルクトース (Fru)/アスパラギン (Asn) はグルコース (Glu)/Asn よりも AA 生成率が高く、褐変度も大きいことが明らかとなった。また、加熱温度を抑えることで AA 生成抑制効果がみられた。次に、ジャガイモモデル系を用いてフライ調理過程におけるスライス品の品温、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 以上であってもスライス品の温度は 100°C 程度に留まり AA は殆ど生成されないが、水分が少なくなると急激に品温が上昇し、それに伴って AA が生成されることを明らかにした。また、フライ前の水処理に関しては、処理水温度が高いほど、また処理時間が長いほど AA の生成抑制効果が高まること、更に水処理によりスライス片に含まれる還元糖及びアミノ酸が減少することが示された。フライ後に余熱を取除くことでも抑制効果が認められた。

(2)AAの代謝と毒性抑制 [大野]

ラット遊離肝細胞系に AA をインキュベートした場合、細胞内 GSH 含量の減少がみられたが、GA をインキュベートした場合には GSH 含量の低下速度が AA に比して速かったほか、高濃度処理時には生細胞数の減少が認められた。GA による GSH 含量あるいは生細胞数の減少は、N-アセチルシステイン及びメチオニン

の添加により抑制されたが、アスコルビン酸あるいはGSH添加による影響は明らかではなかった。

ラット培養海馬神経細胞にAAあるいはGAをインキュベートした結果、いずれも濃度依存的に細胞死を誘発し、MITアッセイにより定量的に比較するとAAに比しGAの毒性が強かった。また、アストロサイトにおいても同様の結果が得られたが、神経細胞に対する毒性がより顕著であった。GAによる神経細胞の毒性は、N-アセチルシステイン及びp38MAPキナーゼ阻害剤SB203850により抑制されたことから、GAの毒性発現には酸化的ストレス及びp38MAPキナーゼの活性化が関与している可能性が示された。

(3)AAの遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

TK6細胞においてAAは濃度依存的に細胞毒性を示し、TK突然変異及び小核の誘発が高濃度でみられた。一方GAについては、AAより低濃度で細胞毒性が観察され、またTK突然変異、小核ともさらに低濃度から誘発された。コメット試験では、AAは全ての用量でDNA損傷性を示さなかったのに対し、GAは低濃度から損傷性を示して用量依存的に増強した。昨年度に解析した自然誘発及びAA誘発のTK変異体に加え、GA誘発TK変異体について遺伝子解析を行ったところ、AAはヘミ型LOHを顕著に誘発することが明らかとなっていたが、GAはLOH突然変異より主として非LOH型変異を誘発した。このことよりGAは染色体レベルの大きな異常よりも点突然変異等の遺伝子変異を誘発することを示唆する。また、AAをS9処理して細胞毒性と小核誘発性をS9非存在下での結果と比較したところ、S9による影響はみられなかった。

TK6細胞におけるAAの細胞毒性及び小核誘発性に対する食物繊維の抑制効果については、検討したいずれの食物繊維も単独では殆ど細

胞毒性を示さず小核の誘発もみられなかったが、AAの細胞毒性及び小核誘発に対しても抑制効果を示さなかった。

(4)AAの神経毒性抑制に関する実験的研究 [広瀬]

Gait scoreに関しては、AA単独群に比しALAあるいはTP併用群で低値を示した。精巣重量は、AA単独群、ALA併用、DAS併用、PEITC併用群で増加、また精巣上体重量はALA併用、DAS併用、PEITC併用群で増加した。病理組織学的には、AA投与による精巣精細管腔内の精上皮細胞の脱落がALA併用あるいはPEITC併用群で弱かった。またAA投与による坐骨神経の軸索変性は、ALA併用、TP併用、PEITC併用群で軽減した。AA投与による神経線維密度の減少はALA併用あるいはTP併用群で改善し、有髄線維の萎縮は化学物質併用の各群で有意に改善した。AA投与により小脳皮質分子層におけるSYP陽性の異常な点状染色像が増加を示し、類似の染色性を示すシナプシン-1陽性像も増加したことから、このSYP陽性構造の分布変化はAAにより誘発されたpresynaptic terminalの変化であると考えられた。この分布変化に対しALA併用による改善傾向を認めた。次に、中枢及び末梢神経における抗酸化作用関連蛋白質の免疫染色では、CATはALA、TP、DASあるいはPEITCのいずれの併用群でも発現増強した。TRXはALA併用群で増強がみられたが、ウエスタンブロッティングによる確認では使用した抗体の特異性に問題が残った。GCSはALA併用群で陽性像が増強した。肝臓における蛋白質発現を検討した結果、CYP2E1はその阻害剤であるDASとPEITCの単独投与により発現減少を示した。AA単独群に比しTP併用例では若干の増加を認めた。GCSはTPないしDAS単独群の肝臓で減少したが、AAとの併用群では明らかな変化を示さず、精

巢では化学物質投与による明らかな変化はみられなかった。H0-1は肝臓でALAの単独投与により増加したが、精巣において明らかな発現変動を示さなかった。CATは、DAS、PEITC単独群の肝臓で減少した。AA投与によってもその発現は減少し、化学物質の併用によりその発現は回復した。ただし、投与物質に特異的な発現は認めなかった。精巣においてもCATは構成的発現を示したが、PEITC単独投与により発現は減少を示し、AAを投与した各群でも発現減少を示した。TRXは肝臓においてALA、TP、DAS単独投与で明らかな発現増加を示した。TRXはAA投与によって発現減少を示したが、TP、PEITCの併用で若干発現の増強を認めた。

食物繊維などの併用において、Gait scoreについてはAA投与各群で群間の明らかな差を認めなかった。病理組織学的検索における坐骨神経の軸索変性、三叉神経 ganglion cellsの中心性物質融解、精上皮細胞の変性・脱落、精巣上体管内への細胞残屑の出現については、AA投与各群で群間の明らかな差を認めなかった。形態計測においても坐骨神経の神経線維密度、変性軸索数、萎縮を示す有髄線維数、精巣での変性・脱落を示す精細管の数、小脳皮質分子層における異常なSYP陽性構造はAA投与の各群でその数に明らかな差を認めなかった。

(5)AAの発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

触診による乳腺腫瘍の経時的観察において、PEITC群における発生頻度及び数が12-15週目以降実験期間を通して低く、16週目には有意な($p < 0.05$)低値を示した。HTHQ群についても12-16週目以降実験期間を通して発生頻度および数が低下傾向を示したが、統計学的有意差はみられなかった。その他の群については発生頻度、数及び体積の推移に明らかな変

化は認められなかった。病理組織学的には、対照群を含む各群で20例中13-17例(65-85%)に乳腺腫瘍の発生がみられ、その頻度に明らかな群間の差を認めなかった。乳腺腫瘍の発生数は対照群の 1.5 ± 1.3 個/ラットに対し、TP群では 2.4 ± 1.6 個/ラットで有意な増加がみられたが、摂餌量の増加に伴う体重増加によるものと考えられた。また体積については対照群の $11.1 \pm 21.4 \text{cm}^3/\text{個}$ に対し、PEITC群では $2.6 \pm 4.7 \text{cm}^3/\text{個}$ と有意に($p < 0.05$)減少した。その他の群については発生数及び体積に明らかな変化は認められなかった。

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]

今年度より実際の食品を用いたモデルの一つとしてジャガイモのスライス片を用いた実験を開始した。これにより、本研究の最終目的である流通する加工食品中のAA含有量の低減化を実現するための有効な基礎データを得ることができたと考えられる。具体的には、フライ調理過程においてスライス片に水分が十分に残存していることがAAの生成抑制に重要であることが明らかとなった。従って、実際のフライ過程においては水分が減少し褐変反応が進行し始める段階でのフライ油温度及びフライ時間が極めて重要であることが示された。またフライ前の水処理に関しては、処理水温度が高いほど、また処理時間が長いほどAAの生成抑制効果が高まることが示されたが、一方、処理水温度が高過ぎる場合にはジャガイモデンプンの糊化がみられること、処理時間が長過ぎる場合にはスライス片中に還元糖、アミノ酸が殆ど含まれなくなるなど、実用面では食感とのバランスを検討する必要がある。

(2)AAの代謝と毒性抑制 [大野]

ラット遊離肝細胞系を用いた実験において、AAに比してGAでインキュベートした場合、細胞内GSH含量の低下速度がAAに比して速かったほか、高濃度処理時には生細胞数の減少が認められたことより、GAがAAの活性代謝物であることを示していると考えられた。GAによるGSH含量あるいは生細胞数の減少はN-アセチルシステイン及びメチオニンの添加により抑制されたが、N-アセチルシステインについては細胞内に取込まれてGSHの原料として作用し、細胞内GSH含量の減少を抑制したことが示唆された。

神経系細胞を用いた実験では、AA及びGAは、ともに細胞毒性を示した。従ってAAの毒性発現の本態はGAとの指摘もあるが、今回の実験結果よりAAそのものにも毒性作用のあることが示された。またGAによる神経細胞の毒性は、N-アセチルシステイン及びp38MAPキナーゼ阻害剤SB203850により抑制されたことから、毒性発現には酸化的ストレス及びp38MAPキナーゼの活性化が関与している可能性が示され、一方、カスパーゼ阻害剤Z-VAD及びSP600125による抑制作用がみられなかったことから、GAによる細胞死に対するアポトーシスの関与は乏しいことが示唆された。

(3)AAの遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

AAの代謝物であるGAは、用量依存的に細胞毒性、TK遺伝子突然変異、小核を誘発し、その毒性はAAよりかなり高いことが推測された。また、TK突然変異スペクトルの特徴も、AAは主としてヘミ型のLOHを示したのに対し、GAでは大部分が非LOH型変異であり、そのスペクトルはアルキル化剤であるEMSに類似していることから、主に点突然変異を誘発することを示している。コメント試験では、GAは低濃度から用量依存的に陽性反応を示したことから、DNAに直接付加体などを形成して突

然変異を誘発すると考えられた。AAはCYP2E1によりGAに代謝されて強い遺伝毒性を示すことが予想されたが、今回の実験ではS9存在下においてもAAの毒性増強作用は認められなかった。CYP2E1はS9調製後に急速に失活するとの報告もあるが、CYP2E1で代謝されるジメチルニトロサミンについては顕著な毒性の増強がみられることから、S9中のCYP2E1の活性は十分であると考えられた。S9を用いた試験では長時間の処理が困難であることから、今後はCYP2E1を発現するトランスジェニック細胞等を用いて、AAの代謝とその毒性発現様式を解明する必要がある。

(4)AAの神経毒性抑制に関する実験的研究 [広瀬]

AAによる神経毒性は、ALAにより最も強く抑制され、TPとPEITCによっても部分的に抑制されることを見出した。中枢神経あるいは末梢神経での抗酸化作用関連蛋白質の発現検索により、ALAによる抑制にはTRX系とグルタチオン系、TPとPEITCではグルタチオン系のレドックス制御が介在していることが示唆されたが、TRXに関しては用いた抗体の特異性に疑問が生じたため、再現性の確認を要する。精巣毒性に関しては、ALAとPEITCで明らかな抑制効果を示したが、肝臓、精巣での代謝あるいは酸化ストレス関連酵素の発現に関する今回までの検索では、これらの化合物に特異的な抑制系は見出されなかった。また、DASとPEITCはCYP2E1に対して強い活性阻害作用のあることが知られているが、5週間の投与により、肝臓におけるCYP2E1の発現自体も抑制されることが見出された。更に、AA投与によっても肝臓のCYP2E1の発現が強く抑制されたことは、AA暴露に反応して生体内でGAの生成を抑える防御作用の介在している可能性が示唆された。

消化管内でのAAの吸着作用を期待して食物繊維やChlorophyllinなど併用投与を行った

が、何れの物質でもAA誘発神経障害および精巣障害を抑制できなかったことから、今回の実験条件下では、消化管内での食物繊維などによるAA吸収阻害作用は生じていないと判断された。

(5)AA の発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

MNUによるイニシエーション処置後のAA飲水投与によるラット乳腺早期発がんモデルにおいて、AAとPEITCを併用することにより、触診による経時的観察で乳腺腫瘍の発生頻度及び数が12-15週目以降実験期間を通して低値を示し、16週目には有意な抑制が認められ、さらに病理組織学的に確認された乳腺腫瘍の体積が有意に減少した。従って、CYP2E1阻害、第II相酵素誘導作用をもつPEITCは、本モデルにおいてAAによる乳腺腫瘍の発生、増殖に対し抑制作用を有する可能性が示された。その他の群については触診及び病理組織学検査により確認された乳腺腫瘍の発生頻度、発生数及び体積について明らかな抑制効果はみられなかった。以上より、今後CYP2E1阻害あるいは第II相酵素誘導作用をもつ天然物質を中心に検索を進めるのが有効であると考えられた。

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]

ジャガイモのスライス片を用いたモデル系により、スライス片に水分が十分に残存している場合にはフライ油温度に関わらず品温は100℃程度に留まりAAは殆ど生成されず、水分が少なくなると品温の急激な上昇に伴いAAの生成されることを明らかにした。フライ前の水処理及びフライ後に余熱を取除くことも有効であることが示された。

(2)AAの代謝と毒性抑制 [大野]

ラット肝細胞を用いた実験では、GAによるGSH低下速度がAAに比して速く、また生細胞数の減少がみられたことから、GAが活性代謝物であると考えられた。GAによる細胞内GSH含量低下及び生細胞数の減少は、N-アセチルシステイン及びメチオニン添加により抑制された。

ラット神経系細胞を用いた実験では、AA及びGAはともに細胞毒性を示すが、その強さはGAでより顕著であった。またAA及びGAの細胞毒性の発現には酸化的ストレスが関与していることが示唆された。

(3)AAの遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

GAはAAに比し強い遺伝毒性を示すことが明らかとなり、GAはDNAに直接損傷を与えて点突然変異を誘発するものと考えられた。しかし、今回の実験では、AAの毒性はS9存在下でも増強されなかったことから、AAの代謝による影響は確認できなかった。S9を用いた短時間試験の本試験系には限界があり、薬物代謝活性を有する細胞を用いたAAの代謝及び毒性発現機構の解析が必要と考えられた。

食物繊維はin vitroにおいてAAによって誘発されるヒト培養細胞における細胞毒性及び遺伝毒性に対して抑制効果を示さなかった。

(4)AAの神経毒性抑制に関する実験的研究 [広瀬]

AAによる神経障害に関しては、ALA、TP、PEITCが部分的に抑制効果を示すことが明らかとなり、その中でALAが最も強い抑制作用を示した。精巣障害に対しては、ALAがPEITCと同様に障害を抑制することが明らかとなった。

(5)AAの発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

MNUをイニシエーターとしてAAを40ppm濃度で飲水投与するラット乳腺発がんモデルを用いた検索において、CYP2E1阻害あるいは第

II相酵素誘導作用をもつPEITCがAAの乳腺発がん作用に対する抑制物質として有用であることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishihara, K., Matsunaga, A., Miyoshi, T., Nakamura, K., Nakayama, T., Ito, S., Koga, H.: Formation of acrylamide in a processed food model system, and examination of inhibitory conditions. J. Food Hyg. Soc. Japan, 46, 2005, in press.

2) Lee, K-Y, Shibutani, M., Kuroiwa, K., Takagi, H., Inoue, K., Nishikawa, H., Miki, T., Hirose, M.: Chemoprevention of acrylamide toxicity by antioxidative agents in rats - Effective suppression of testicular toxicity by phenylethyl isothiocyanate. Arch Toxicol., 2005, in press.

3) Imai, T., Cho, Y.M., Hasumura, M., Hirose M.: Enhancement by acrylamide of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat mammary tumor development - possible application for a model to detect co-modifiers of carcinogenesis. Cancer Lett., 2005, in press.

2. 学会発表

1) 石原克之, 松永篤史, 三好隆行, 中山孝志, 古賀秀徳, 伊藤秀二: 加工食品モデル系におけるアクリルアミドの生成および抑制条件の検討. 日本食品衛生学会第 87 回学術講演会, 2004 年 5 月, 東京.

2) 松永篤史, 石原克之, 中山孝志, 伊藤秀二, 古賀秀徳: モデル系でのフライ調理によるアクリルアミドの生成抑制条件の検討. 日本調理科学会平成 16 年度大会, 2004 年 9 月, 札幌.

3) 石原克之, 松永篤史, 三好隆行, 古賀秀徳, 佐久間和人: フライ食品調理時におけるアクリルアミド生成抑制条件の検討. 日本農芸化学会 2005 年度大会, 2005 年 3 月, 札幌.

4) 紅林秀雄, 大野泰雄: アクリルアミドのラット肝細胞における代謝と毒性. 日本薬学会第 125 年会, 2005 年 3 月, 東京.

5) 小山直己, 坂本浩子, 桜庭真弓, 小泉朋子, 桜庭真弓, 高島良生, 林真, 松藤寛, 山形一雄, 本間正充: ヒトリンパ球芽細胞株 TK6 を用いたアクリルアミドの *in vitro* 遺伝毒性誘発機構の解析. 日本環境変異原学会第 33 回大会, 2004 年 11 月, 長崎.

6) 黒岩敬子, 渋谷淳, 李京烈, 井上薫, 広瀬雅雄: Acrylamide による神経及び精巣毒性に対する抗酸化物質の予防効果の評価. 第 21 回日本毒性病理学会, 2005 年 1 月, 浜松.

7) Hirose, M.: Current situation on research of chemicals in food including acrylamide in Japan. Workshop on risk analysis/risk communication related to the occurrence of emerging chemicals in food. March 2005, Ottawa, Canada.

8) 曹永晩, 蓮村麻衣, 今井俊夫, 広瀬雅雄: ラット乳腺及び甲状腺化学発がんモデルにおける acrylamide の発がん促進作用. 第 63 回日本癌学会学術総会, 2004 年 9 月, 福岡.

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ド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 日本スナック・シリアルフーズ協会

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ド(AAm)が生成されることが発表された¹⁾。その後、食品中のAAm分析法が報告され^{2),3)}、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が生成することが分かってきた^{12),13)}が、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。そこで昨年度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い、溶液フライ系では180℃で、非水分オープン系では200℃を頂点としてAAm生成率が増減すること、pHが低いほどAAm生成率は低減すること、試料水分残存率が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、フルクトース(Fru)はAAm生成に効果的に影響すること、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、特にシステインの存在は抑制効果を持つことといった知見を得た。そして加工食品中でのAAm生成機序の推定を行った。本年度は、それらの結果をもとに、ガラス繊維濾紙を用いて還元糖の違いによるAAm生成率、生成開始温度の比較を行った。また、ジャガイモを用いてのAAm低減について検討を行った。

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ズドライし、乾体とした状態でオープンで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。

溶液フライ系、非水分オープン系のどちらにおいても、Fru/Asnはグルコース(Glc)/AsnよりもAAm生成率が高く、褐変度も大きいことが分かった。また、加熱温度を抑えることでAAm生成抑制効果が見られた。また、非水分オープン系ではFru/Asn、Glc/Asnはそれぞれ100℃、110℃からAAmの生成が認められた。

ジャガイモを洗浄後剥皮せずに、スライス片を型抜きにて維管束内部をくりぬいたものを、条件を変えて水処理を行い、フライ加工に供した。

フライ過程におけるスライス片の品温、水分残存率、AAm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温度が170℃以上であってもスライス片の品温は100℃程度に留まっておりAAmはほとんど生成されないが、水分が少なくなると急激にスライス片の品温が上昇し、それに伴ってAAmが生成されることが分かった。フライ前の水処理では、処理水温度が高いほど、また処理時間が長いほどAAm抑制効果があることが分かった。また、フライ後の余熱を取り除くことでも抑制効果が認められた。

研究協力者

石原克之 カルビー株式会社 フードサイエンス研究チーム

松永篤史 カルビー株式会社 品質検査チーム

中村和哉 カルビー株式会社 フードサイエンス研究チーム

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)が生成されることが発表された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が生成することが分かってきた^{12), 13)}が、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、ガラス繊維濾紙を用いたモデル系とジャガイモを用いたモデル系で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) 3.12 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) 2.84 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 6.6 になるように混合した。

0.2 mol/L グルコース (Glc) 溶液：

D(+)-Glucose (和光純薬工業(株)製 特級)

3.60 g を 0.02 mol/L リン酸緩衝液に溶解させ 100 mL とした。

1 mol/L NaOH 溶液：NaOH (和光純薬工業(株)製 特級) 4.00 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) 2.64 g を 0.02 mol/L リン酸緩衝液に溶解させ、1 mol/L NaOH を用いて pH を 6.6 とし 100 mL に調製した。

0.2 mol/L フルクトース (Fru) 溶液：D(-)-Fructose (和光純薬工業(株)製 特級) 3.60 g を 0.02 mol/L リン酸緩衝液に溶解させ 100 mL とした。

(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-1-¹³C (99 atom %¹³C, 以下 AA-1-¹³C 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 μg/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 °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。

フロリジルカートリッジカラム：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 °C) 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

ホモジナイザー：ウルトラタラック (IKA JAPAN 社製)

遠心濃縮機：遠心エバポレーター 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. 濾紙モデルおよびジャガイモモデルの調製

3-1 ガラス繊維濾紙モデル

ガラス繊維濾紙 (GA-200, 25 mm φ,

0.75 mm, 東洋濾紙(株)社製) 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デルとした。

3-1-1 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ざるに移して冷凍庫 (-27 °C) で凍結させて保存した。

3-1-2 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 °C) 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 °C) で凍結させて保存した。

3-2 ジャガイモモデル系

ジャガイモ (5 ヶ月間低温貯蔵した北海道産のトヨシロ) を水道水で洗浄後、剥皮せずにスライサー (Urschel 社製) を用いて 1.42 mm の厚さでスライスし、スライス片を型抜きにて維管束内部をくりぬいたものを、約 15 g 量り取り、1000 mL の蒸留水の入ったピーカーに入れて振とう恒温槽 (EYELA 社製) 中で水処理を行った。水処理後に、軽く表面の水分を拭き取ったものをジャガイモモデル系とした。それを、10 g 量り取り 180 °C に加熱したフライヤー (EISHIN 社製、パームオレイン：ライス=1:1) で 90 sec 間フライした。

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

ホモジナイズし、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。(ジャガイモモデル系では、フードカッターにて粉碎し、粉碎試料 2 g を遠沈管に移し内部標準液 100 μ g/mL AA-1- 13 C 溶液 20 μ L と超純水 40 mL を加え 2 分間ホモジナイズし 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、ヘキサン 10 mL ずつで 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ン (10 % A/H) 2 mL で溶解し、予めヘキサン 10 mL で洗浄したフロリジ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) にガード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 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 15 $^{\circ}$ C / min \rightarrow 240 $^{\circ}$ C (11.3 min)

注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C

トランスファーライン温度 : 240 $^{\circ}$ 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-プロモプロペンアミド (2-BPA) : m/z 149, 151

2-BPA- 13 C : 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 (スプリットレス)

6. 遊離アミノ酸測定

フードカッ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 $^{\circ}$ C \cdot 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 $^{\circ}$ C \cdot 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 $^{\circ}$ 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 NaH_2PO_4 (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 NaH_2PO_4 (pH 7.8) で 50 mL に定容した。上記の希釈液の一部 (2 mL) を濾過 (DISMIC-25cs, Advantec 社製) にてク

リーンアップし HPLC 分析溶液とした。

7. 糖分析

フードカッターにて試料を粉碎し、直ちに約 20 g をビーカーに秤量し、40 % エタノール 100 mL を加えて 1 分間ホモジナイズした。その後、5A 濾紙で濾過した。さらにその濾液を濾過 (DISMIC-25cs, Advantec 社製) にてクリーンアップし HPLC 分析溶液とした。

8. HPLC 測定条件

8-1 遊離アミノ酸分析

カラム: Zorbax Eclipse AAA (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3.5 μ m) にガードカラム 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 $^{\circ}$ 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/min

反応試薬: *o*-フタルアルデヒド (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)

8-2 糖分析

カラム: Zorbax Carbohydrate Analysis Column (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 5 μ m)

カラムオープン温度: 30 $^{\circ}$ C

移動相: 75 / 25 Acetonitrile / H₂O

流速: 1.4 mL/min

検出器: HP 1100 RID

9. 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。すなわちフードカッターにて粉碎した試料から、ただちに約 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 $^{\circ}$ C・5 時間乾燥したのち再度秤量し、水分含量を計算した。

10. スライス品の品温測定

ジャガイモのスライス片の側面から中央付近に長極細シース熱電対 (T34, ϕ 0.25 ストレートシース, ㈱岡崎製作所製) を挿入し, モバ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

I. ガラス繊維濾紙モデル系

1. 溶液フライ系

Glc 及び Fru 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 μ L 添加 (Glc, Fru 7.21 mg, Asn 5.28 mg) し, それぞれ 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180 $^{\circ}$ C で 1 分間フライした後のガラス繊維濾紙の写真および AAm の生成量について図 1 に示した。その結果, Glc / Asn と比較して Fru / Asn において AAm 生成量は 2 倍以上であることが分かった。そして, 150 ~ 165 $^{\circ}$ C の範囲内においては褐変度も高くなった。またどちらにおいても, フライ温度が高くなればなるほど生成量が増加した。この溶液フライ系モデルにおいて, 150 $^{\circ}$ C 以下の温度帯では, 生揚げになってしまうために, 常圧下でのフライと言う面からは, 温度が低すぎるために適していないことが分かった。(data not shown)

2. 非水分オープン系

Glc 及び Fru 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 μ L 添加 (Glc, Fru 7.21 mg, Asn 5.28 mg) し, フリーズドライ後に, それぞれ 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125 $^{\circ}$ C で 5 分間オープン加熱した後のガラス繊維濾紙の写真および AAm の生成量について図 2 に示した。Glc / Asn では 110 $^{\circ}$ C 以上

で AAm の生成が認められたのに対して、Fru / Asn では 100 °C 以上から AAm の生成が認められ、糖による AAm 生成開始温度の違いが示唆された。さらに、Fru / Asn は Glc / Asn よりも低温で褐変が認められた。非水分オープン系においても溶液フライ系と同様に、Glc / Asn と比較して Fru / Asn で AAm 生成量は 2 倍以上であることが分かった。

3. フライ温度変化による AAm 生成量の影響

溶液フライ系において、Glc / Asn, Fru / Asn のそれぞれにおいて、180 °C と 160 °C でフライを行った際の AAm 生成量の経時変化をモニターしたところ (図 3)、糖による生成時間の大きな違いは認められなかった。

II. ジャガイモモデル系

1. フライ過程での AAm 生成量変化

ジャガイモモデル系でのフライ過程におけるフライ油温度、スライス品の品温、水分残存率、AAm 生成量について図 4 に示した。水分が 10 % 以上十分に残存している場合にはフライ油温度は 170 °C 以上であってもスライス品の品温は 100 °C 程度に留まり、その後水分が少なくなると急激にスライス品の品温が上昇し、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。AAm の生成量は、水分が十分に残存しスライス品の品温が 100 °C 程度の段階ではほとんど生成されないが、水分が少なくなりスライス品の品温が上昇するのに伴って AAm が生成され始めることが分かった。そしてフライ終了時 (90 sec) まで AAm 生成量は増加し続けた。このことから、フライ過程では水分が減少し褐変反応が進行し始める段階でのフライ油温度およびフライ終了時間が極めて重要であることが示唆された。

2. 水処理温度が及ぼす影響

スライス片を、20, 40, 60, 80 °C でそれぞれ 2 分間水処理したときの還元糖量について図 5 に示した。40 °C で水処理した場合を除いて、水処理することで水処理しないコントロールと比較して、還元糖が減少することが分かった。これは水処理することによって表面に付着している還元糖が処理水に流出した結果と考えられた。40 °C で変化が見られなかった原因として、スクロースをグルコースとフルクトースに分解するインベルターゼといった酵素が働き還元糖が増加したために、コントロールとあまり差が見られなかったことが示唆された。また、ジャガイモデンプンの糊化温度は 60 ± 5 °C 程度である¹⁴⁾ことから、60, 80 °C の水処理によってデンプンの糊化が始まっており、デンプンが糊化することによって壊れた細胞なども処理水に流出していることが考えられた。また、そのときの遊離アミノ酸量および Asn 量は、処理水温度が高くなれば減少する傾向であることが分かった (図 6)。この水処理したスライス片をフライしたときのアクリルアミドを測定した (図 7)。コントロールである水処理無しを 100 % としたときの AAm 含量は、水処理温度が高いほど低くなり、遊離アミノ酸量および Asn 量に相関していることが分かった。そして 80 °C の水処理においては約 70 % の AAm 抑制効果が認められた。しかし、デンプンの糊化温度を超える高温で水処理を行った場合には、フライをする前に既にデンプンが糊化してしまうために、糊化温度よりも低い温度で水処理したサンプルと比較して、フライ後の食感が大きく異なることが分かった。このことから、食品を高温で水処理してフライする際には、フライ後の食感を検討する必要があることが示唆された。

3. 水処理時間が及ぼす影響

スライス片を、60℃でそれぞれ2, 5, 10, 30分間水処理したときの還元糖量および遊離アミノ酸量を図8, 図9に示した。水処理しないコントロールと比較して水処理時間が長くなれば還元糖量, 遊離アミノ酸量が減少することが分かった。30分間水処理することで, 還元糖量, 遊離アミノ酸量はほとんど見られなくなった。この水処理したスライス片をフライしたときのアクリルアミドを測定したところ(図10), 2~10分間の範囲内では約50%の抑制効果が見られた。30分間の水処理においては100%近いAAm抑制効果が見られ褐変反応もほぼ完全に抑制されていることが分かった。しかし, 水処理することによりフライ後の味や食感に大きな影響を及ぼすことから, 官能的な面からも評価することが今後の課題であると考えられた。

4. フライ後の冷却による抑制効果

スライス片を20℃で2分間水処理後に180℃で2分間フライしたサンプルのフライ後の冷却による抑制効果を検討した(図11)。その結果, フライ直後に液体窒素で凍結させて急冷することで, 室温で放置した場合と比較して, 約15%のAAm抑制効果が見られた。このことから, フライ後の余熱を取り除くことはAAm低減に有効であることが示唆された。

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溶液を浸透させたモデル系とジャガイモのスライス片を用いたモデル系にて, フライ加工食品中のAAmの生成および抑制条件について検討した。その結果は次のとおりであった。

- 1) AAm生成にはGlcよりもFruが大きく関与している。
- 2) Fru, Glcはそれぞれ100, 110℃以上でAAm生成が認められた。

3) フライ温度を180℃から160℃に抑えることでAAm抑制効果が認められた。

4) フライ過程において水分が十分に減少した段階(水分残存率10%程度)でAAmが生成され始める。

5) ジャガイモのスライス片の水処理温度が高いほど, また時間が長いほどAAm抑制効果が認められた。

6) フライ後に冷却することによってAAm抑制効果が認められた。

研究発表

1. 論文発表

・Katsuyuki, I., Atsushi, M., Takayuki, M., Kazuya, N., Takashi, N., Shuji, I., Hidenori, K., Formation of acrylamide in a processed food model system, and examination of inhibitory conditions. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 33-39 (2005).

2. 学会発表

- ・社団法人 日本食品衛生学会第87回学術講演会「加工食品モデル系におけるアクリルアミドの生成および抑制条件の検討」(2004年05月13日)
- ・日本調理科学会「モデル系でのフライ調理によるアクリルアミドの生成抑制条件の検討」(2004年09月10日)
- ・2005年度 日本農芸化学大会「フライ食品調理時におけるアクリルアミド生成抑制条件の検討」(2005年03月30日)

3. 知的財産権の出願登録状況

・無し

参考文献

- 1) <http://www.slv.se/engdefault.asp>
- 2) 加工食品中のアクリルアミドの測定・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., Maitani, T., Determination of acrylamide in foods by GC/MS using ^{13}C -labeled acrylamide as an internal standard. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **43**, 371-376 (2002).
- 4) 吉田充,小野裕嗣,亀山眞由美,忠田吉弘,箭田浩士,小林秀誉,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ドの分析,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*, **44**, 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 foods. *Food Addit. Contam.*, **20**, 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., Lewis, D., Seaman, S. W., Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 802-808 (2003).
- 11) Christian, G., Sabine, K., 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., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M. C., Riediker, S., Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, **419**, 449-450 (2002).
- 14) Kugimiya, M., Fujimura, T., Gelatinization of starches in parenchyma cells separated from potatoes. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **43**, 951-955 (1996).

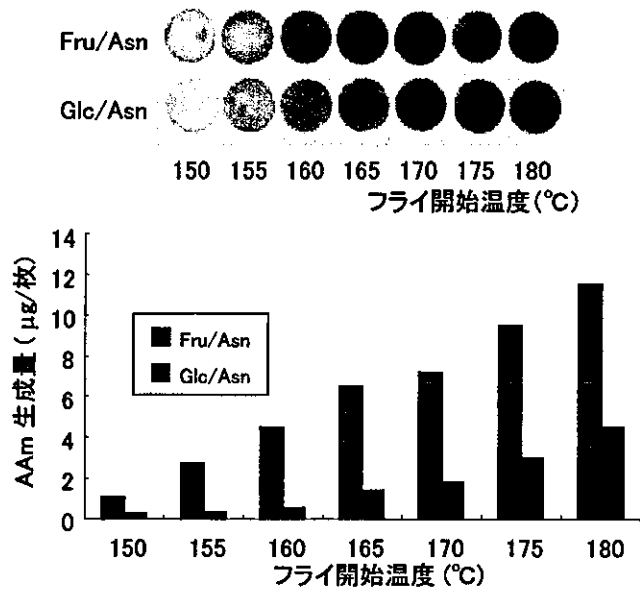


図1 還元糖によるAAm生成量の比較
(溶液フライ系) ※フライ時間 60 (sec)

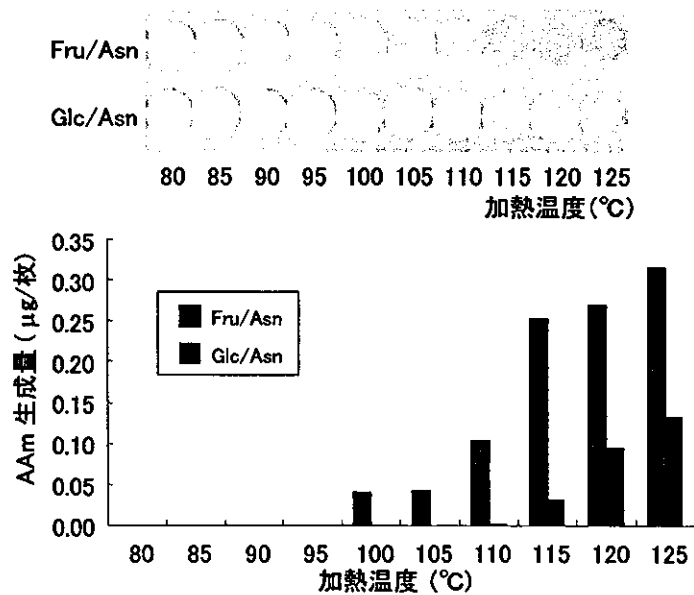


図2 還元糖によるAAm生成量の比較
(非水分オープン系) ※加熱時間 5 (min)