

図3 フライ温度変化によるAAm生成量

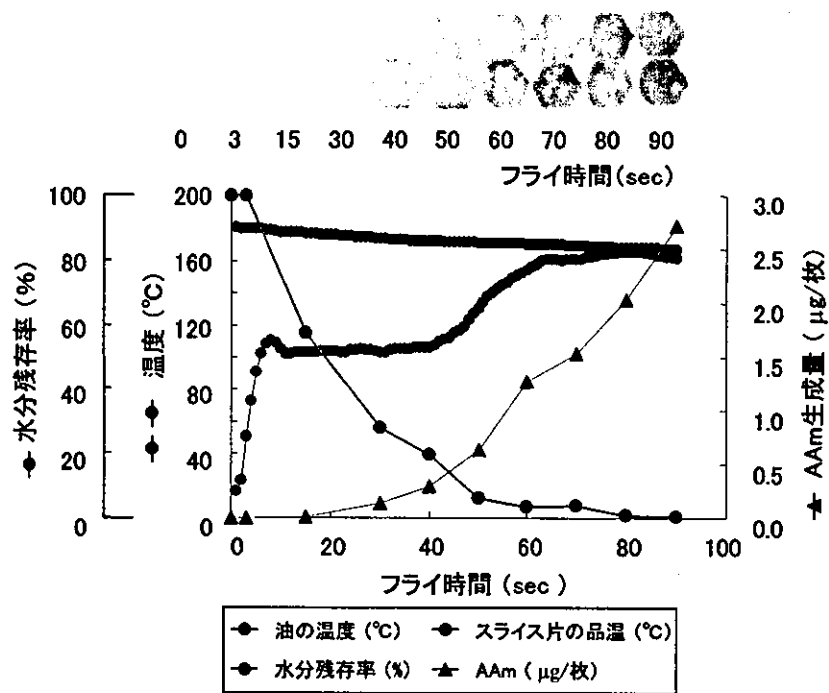


図4 フライ過程によるAAm生成量

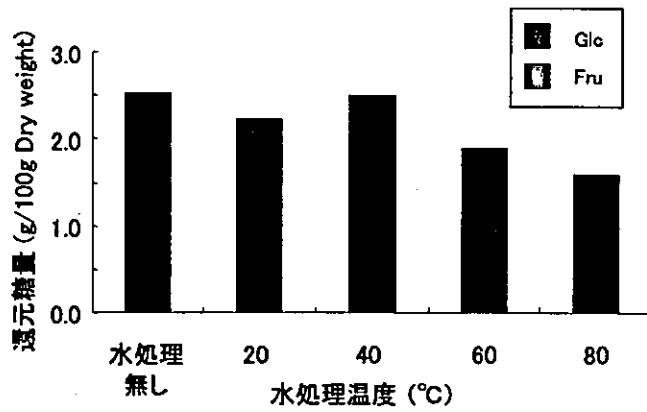


図5 水処理温度が還元糖に及ぼす影響

※水処理時間 2 (min)

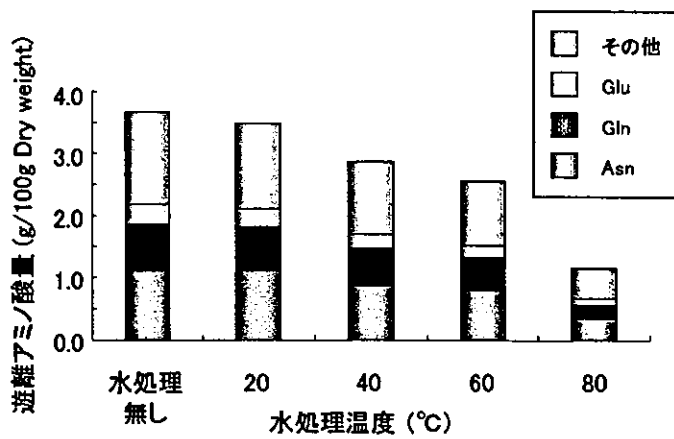


図6 水処理温度が遊離アミノ酸に及ぼす影響

※水処理時間 2 (min)

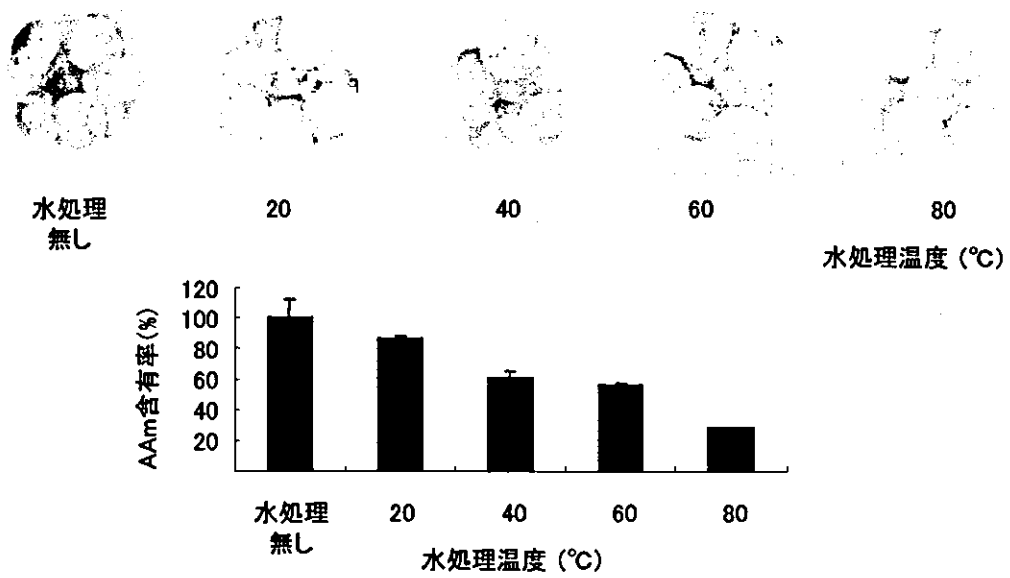


図7 水処理温度がAAm生成に及ぼす影響

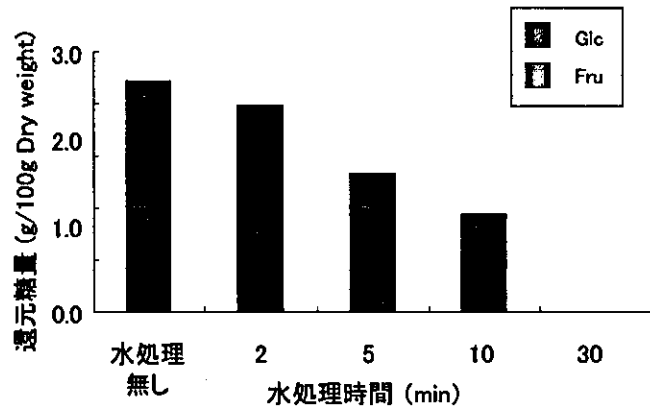


図8 水処理時間が還元糖に及ぼす影響

※水処理温度 60 (°C)

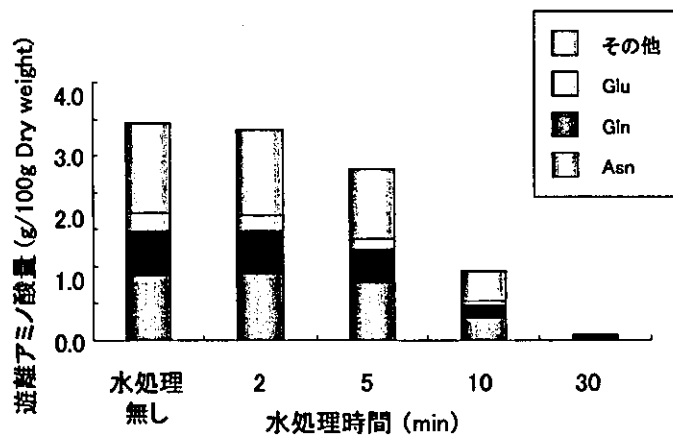


図9 水処理時間が遊離アミノ酸に及ぼす影響

※水処理温度 60 (°C)

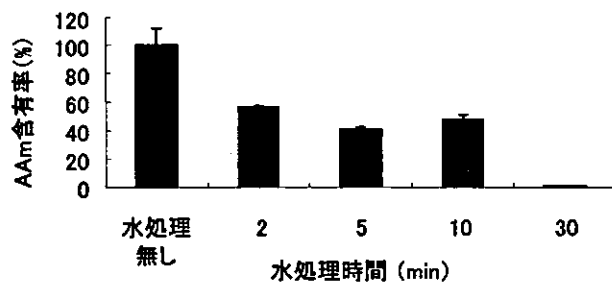
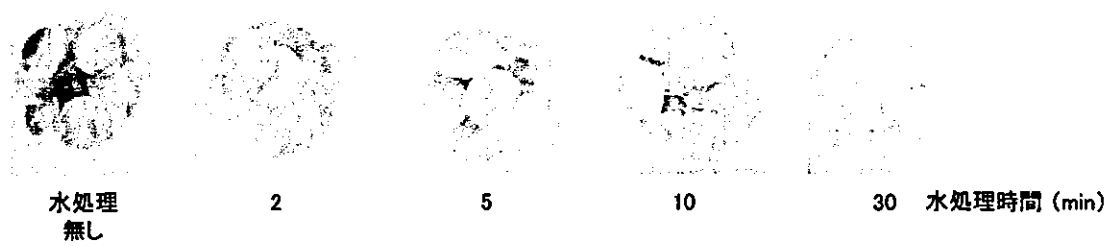
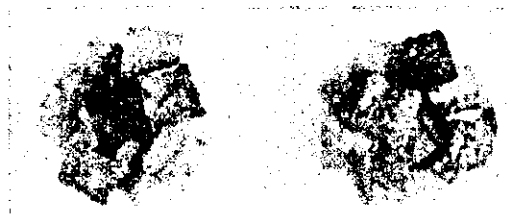


図10 水処理時間がAAm生成に及ぼす影響



フライ後室温にて放置

フライ後に液体窒素にて急冷

※水処理温度 20 (°C)、
水処理時間 2 (min)

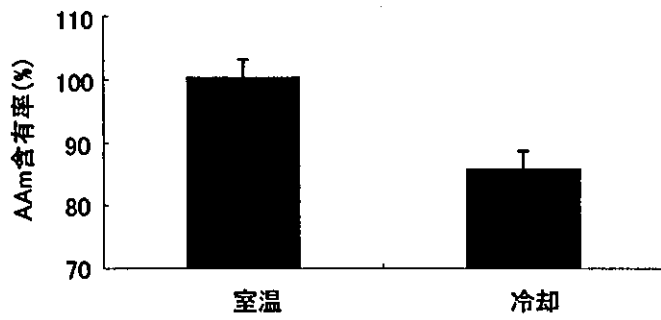


図11 フライ後の冷却効果

厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

アクリルアミドの生成抑制及び毒性抑制に関する研究 1

「アクリルアミドの代謝と毒性抑制に関する研究」

分担研究者：大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター 薬理部

（協力研究者：紅林秀雄（同上））

研究要旨

引き続きラット肝細胞における毒性と代謝に関する検討を行っており、アクリルアミドからのエポキシド体（グリシダミド）の生成は、CYP2E1により代謝されていると考えられた。また、アクリルアミド処置により細胞内の還元型グルタチオン（GSH）量がみられたが、グリシダミド処置の場合 GSH 量の減少の他、高濃度時で生細胞数の割合の減少が認められた。これらの減少はN-アセチルシステインおよびメチオニン添加により抑制されたが、アスコルビン酸や GSH 添加による影響は少なかった。一方、凍結ヒト肝細胞においてもグリシダミドの生成がみられたが、その活性はラット肝細胞の20分の1程度でこの分析法で困難な場合があった。

A. 研究目的

アクリルアミド（別名：アクリル酸アミド：構造式 $H_2C=CHCONH_2$ ）の一部はチトクローム P-450 によってエポキシドであるグリシダミド（glycidamide）へ代謝された後に排泄されることが報告されている（Fig. 1）。

アクリルアミドとエポキシド代謝物であるグリシダミドは組織中のタンパク質や核酸と共有結合することが示されている。いずれもヘモグロビンと結合するが、DNA 付加体はグリシダミドのみによって生じるとされている。

平成15年度においてはアクリルアミドの代謝と毒性をラット遊離肝細胞を用いて

検討し、代謝によりエポキシド体であるグリシダミドが生成すること、また、細胞毒性は検出できなかったが、細胞内毒性防御物質であるグルタチオンの減少が N-acetylcystein の添加で抑制されることを示した。

今年度はヒト肝細胞によりアクリルアミドの代謝およびアクリルアミドの代謝により生成したエポキシド代謝物であるグリシダミドの毒性と細胞内のグルタチオン（GSH）量の影響と毒性抑制についてラット遊離肝細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

ラットの遊離肝細胞は未処理雄性SD系

ラットよりコラゲナーゼ環流法を用いて調製した。凍結ヒト肝細胞はケーエーシーまたは日本農産より購入した。

ヒト肝細胞懸濁液 (6×10^5 cell/ml) はアクリルアミド 0, 0.1, 0.3, 1 或いは 3mM 含む Krebs-Henseleit-HEPES 緩衝液 (pH=7.4) 総量 0.25ml 中, 24-well plate, 37°C CO₂ インキュベーターで 0, 1, 2, 4 時間インキュベート後, その遠沈上清を HPLC (UV 検出器) を用いて分析した。なお, 移動相を 10%MeOH, 0.5ml/min, プレカラムは GF-310 4B (φ4.6mm x 50mm), 本カラムは Hypercarb (φ4.6mm x 100mm) を用いた。

ラットの遊離肝細胞懸濁液 (10^6 cell/ml) はグリシダミド 0, 0.1, 0.3, 1 或いは 3mM 含む Krebs-Ringer-HEPES 緩衝液 (pH: 7.4), 総量 10ml 中, 37°C で 0, 1, 2, 4, 6 時間インキュベート後, その細胞懸濁液を 1ml 採取し, 遠沈後, 細胞画分のグルタチオン (GSH) 含量を o-phthalaldehyde を用いた蛍光法で測定した。また, その細胞懸濁液 25μL を採取し, その細胞内外の乳酸デヒドロゲナーゼ活性を測定し (LDH法), 細胞死の指標とした。

C. 研究結果

昨年度の報告で示したように, アクリルアミドをラット遊離肝細胞系を用いてインキュベートした場合, グリシダミドの生成はほぼ 2 時間まで直線性が認められている (Fig. 2)。懸濁液にメタノールを添加した場合で活性が減少し, P-450 (cyp2E1) による代謝であることが示唆された。また, アクリルアミドによる細胞内グルタチオン含量の低下は N-アセチルシステインやメチオニンのような低分子 SH 化合物の添加により抑制さ

れた (Fig. 3)。

一方, 凍結ヒト肝細胞ではこの代謝活性はラットの場合より弱く 1/20 程度であった (Table 1)。但し, ラットの凍結保存した肝細胞でも活性は低いことから凍結の影響が考えられた。アクリルアミドからエポキシドであるグリシダミドへの代謝は比較的不安定な P-450 (cyp2E1) によるとの考えを支持する結果であった。

アクリルアミド代謝生成物であるグリシダミドによる肝細胞の GSH 含量と viability への影響を Fig. 4 に示した。グリシダミド低濃度域 (0-0.1mM) では GSH 含量の減少はコントロールと差が認められなかった (Fig. 4)。一方, グリシダミド高濃度域 (0.3mM 以上) ではその GSH 含量の減少はコントロールより顕著であった。また, viability は 3mM で抑制された。

一方, グリシダミド (3mM) の作用は N-アセチルシステインやメチオニンを添加することにより抑制され, 細胞内の GSH 含量の減少と viability の低下が顕著に抑制された (Fig. 5)。このグリシダミドによる細胞内 GSH の減少速度はアクリルアミドにおける減少速度より速かった (Fig. 6)。

D. 考察

アクリルアミドは吸収された後に全身に分布し, 一部はエポキシドであるグリシダミドへ代謝された後, いずれもグルタチオン抱合によって解毒され尿中排泄される。本物質はヘモグロビンをはじめ, 細胞骨格に関わるタンパク質や精子プロタミンなどと特異的に結合する。神経毒性は神経系タンパク質との結合や酵素阻害によって生じることが示されている。また, グリシダミドは共有結合

によって DNA 付加体を形成する。

前年度の研究で未処理ラットの遊離肝細胞を用いてアクリルアミドと6時間までインキュベートし、グリシダミドの生成が認められ、また、アセトン水を投与しチトクローム P-450 (cyp2E1) を誘導したラットの遊離肝細胞ではその生成が3-4倍と高い活性が確認され、これは、従来言われているアクリルアミドはチトクローム P-450 (cyp2E1) によってエポキシドであるグリシダミドへ代謝されるという報告と一致した。

今回の検討によりグリシダミドにより GSH 減少と viability の低下が認められたこと、また、GSH の低下速度がアクリルアミド処置後より早かったことは、グリシダミドが活性代謝物であることを示唆している。

一方、ヒトの凍結保存した肝細胞でも活性が低いグリシダミド生成が認められた。ラットの凍結保存肝細胞でも活性は低いことから凍結の影響が考えられ、培養液にメタノールを添加しても活性が減少したことなどからして、比較的不安定な P-450 (cyp2E1) による代謝であることが支持された。

アクリルアミドにより肝細胞内の 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。この濃度域はアクリルアミド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 124-251 mg/kg に匹敵し興味深い。また、この時添加した N-アセチルシ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 法によりアクリルアミドによる遊離肝細胞の生細胞率の減少、即ち細胞死を観測したが、

対照群との差が認められなかった。これらの結果はアクリルアミド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があることを示唆している。GSH 低下抑制作用のある N-アセチルシステイン等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。

E. 結論

アクリルアミドのエポキシド代謝物のグリシダミドは高濃度時で細胞内 GSH 量の減少および肝細胞死につながる毒性を示し、アクリルアミドよりやや強い細胞毒性がある。

また、グリシダミド高濃度時での細胞内 GSH 量の減少および肝細胞死は N-アセチルシステインおよびメチオニン等の添加による抑制される。

凍結融解ヒト肝細胞標本ではアクリルアミドからグリシダミドへの代謝活性はラット遊離肝細胞標本と比べ非常に弱かったが、ラットの凍結保存肝細胞でも活性は低いことから凍結の影響も考えられ、懸濁液へのメタノール添加でも活性が減少したことなども考え合わせて、ヒトにおいても比較的不安定な P-450 (cyp2E1) による代謝であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 (2002 年度)

なし

2. 学会発表

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. 3. 30)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1: Kinetic parameters of metabolism of acrylamide to glycidamide in rat and human hepatocytes

parameters	rat hepatocytes		human
	control	acetone-treated*	hepatocytes
Vmax (nmol/hr/10 ⁶ cells)	6.5 ± 2.1	26.4 ± 3.0	0.45
Km (mM)	0.477 ± 0.100	0.263 ± 0.016	1.9
Vmax/Km (μL/hr/10 ⁶ cells)	13.9 ± 4.8	100 ± 12	0.23

*: Hepatocytes were prepared from rats pretreated with 1% acetone water for 5 days.

Fig.1. Structures of acrylamide and its epoxide metabolite, glycidamide

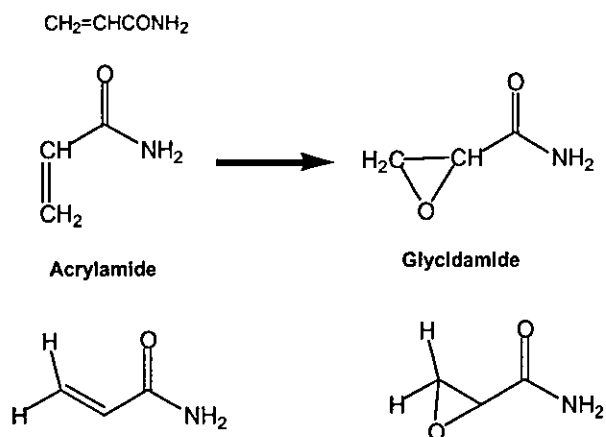


Fig. 2. Left; Formation of glycidamide in the freshly isolated rat hepatocytes by incubation with acrylamide (μM). Right; Effects of acrylamide on lactate dehydrogenase leakage in the isolated rat hepatocytes

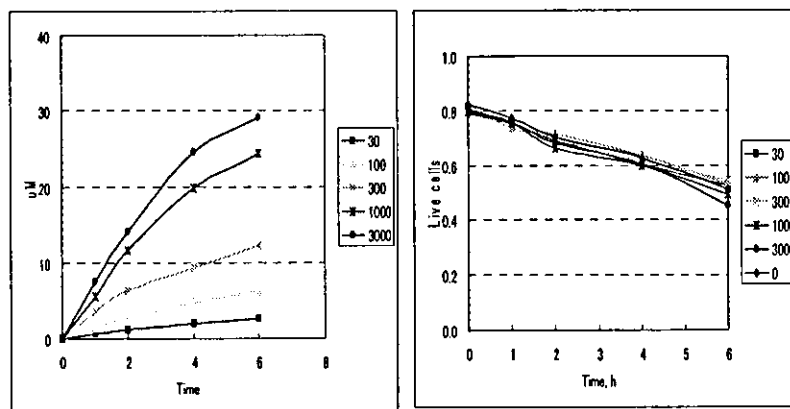


Fig.3. Left; Time course of GSH level in the isolated rat hepatocytes by incubation with acrylamide (μM). Right; Effects of N-actylcystein and methionine on GSH level in the isolated rat hepatocytes by incubation with acrylamide (3 mM)

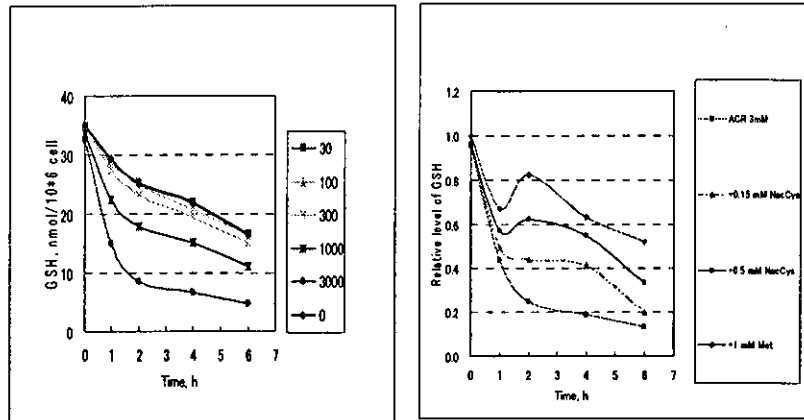


Fig. 4. Left; Decrease of GSH level in the isolated hepatocytes of untreated rats by incubation with glycidamide (μM). Right; Effect of glycidamide on live cell of the isolated rat hepatocytes

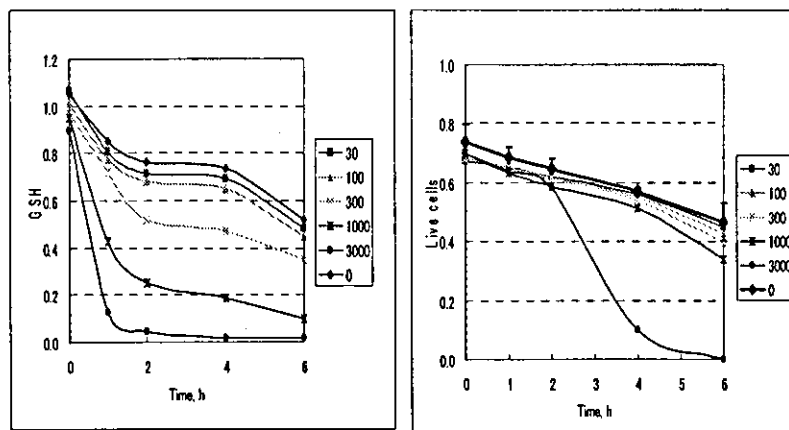


Fig. 5. Left; Effects of small molecular thiols on decrease of GSH level in the isolated rat hepatocytes by incubation with glycidamide (3mM). Right; Effect of small molecular thiols on decrease of viability in the isolated rat hepatocytes by incubation with glycidamide (3mM).

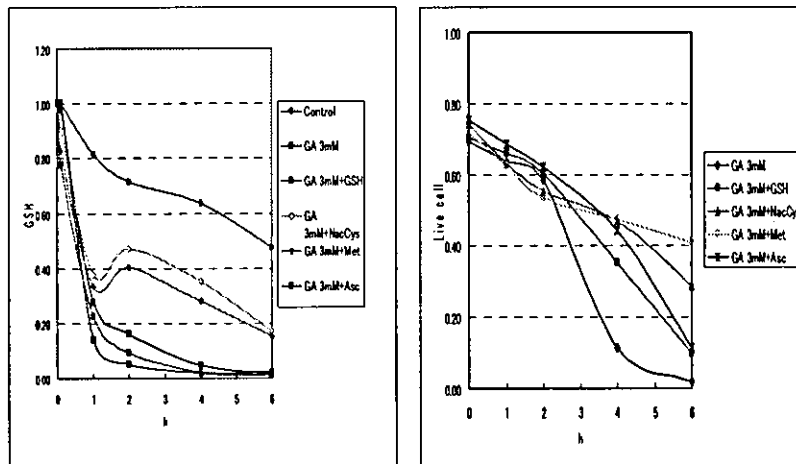
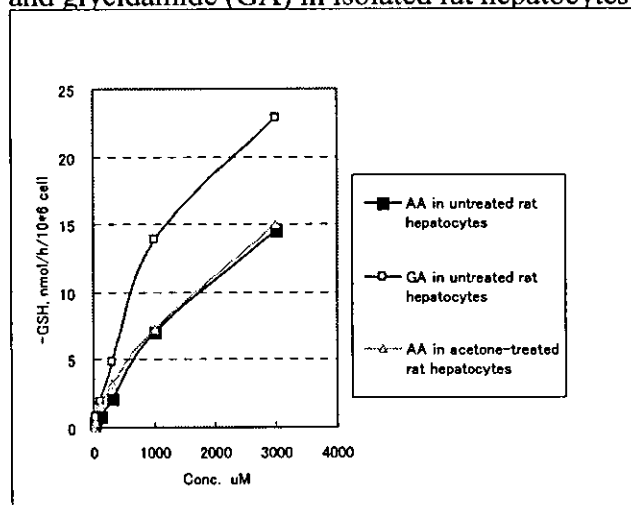


Fig. 6. Decreasing rate of GSH conc. By acrylamide (AA) and glycidamide (GA) in isolated rat hepatocytes



アクリルアミドの生成抑制及び毒性抑制に関する研究 2

「アクリルアミドの代謝と神経毒性抑制に対する研究」

分担研究者 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター薬理部

(研究協力者:小泉 修一(同上))

研究要旨

アクリルアミド及びその代謝産物のエポキシド体(グリシダミド)の中樞神経系に対する有害作用を検討した。初代培養海馬神経細胞、培養アストロサイトをを用いて、アクリルアミド及びグリシダミドの細胞毒性を評価したところ、アクリルアミド及びグリシダミド共に高用量(1 mM 以上)で、両細胞の cell viability を低下させた。Cell viability の低下は、アストロサイトよりも神経細胞の方がより顕著であり、またアクリルアミドよりもグリシダミドの方がより強い細胞毒性を呈した。In vitro のアクリルアミドの有害作用には、N-アセチルシステインの前処置が有効であった。以上、アクリルアミドは中樞神経系の細胞毒性作用を有することが明らかとなった。しかし、その作用は、代謝産物のグリシダミドの方が強く、また毒性発現に mM 以上の高濃度を要した。N-アセチルシステインが cell viability 低下に有効であったことから、酸化ストレスによる細胞障害が関連しているものと考えられた。

A 研究目的

アクリルアミド及びその代謝産物グリシダミドの中樞神経細胞への有害作用を評価し、そのメカニズム及び回避方法を追求する。

B 研究方法

細胞:既報に従い、ラット海馬胎児から神経細胞を、また新生ラットからアストロサイトの初代培養を行った。

生細胞数測定(Cell viability 測定):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。これは、MTT が細胞内ミトコンドリアの脱水素酵素の基質となり、生存能の高い細胞程多くの MTT が還元され、その結果生じるホルマザン量が生存細胞数とよく対応する事に基づいた方法である。アッセイには、測定キット

免疫組織学的検討:神経細胞は、anti-NeuN を、アストロサイトは anti-GFAP 抗体を用いて細胞の同定を行った。

C 研究結果

初代培養海馬培養神経細胞に対するアクリルアミド及びグリシダミドの影響を検討した。図1は、海馬培養神経細胞にアクリルアミド(上段)及びグリシダミド(下段)をそれぞれ 100 μ M、1 mM 及び 10 mM 加えて、48 時間インキュベートした後の透過光像であ

る。両薬物とも、濃度依存的に、神経細胞死を誘発した。アクリルアミド及びグリシダミドの低濃度(<100 μ M)では、顕著な形態変化は観察されなかった。

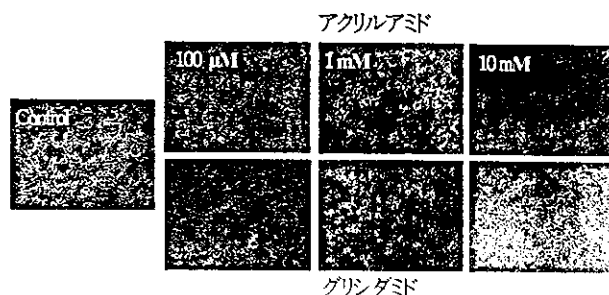


図1 アクリルアミド及びグリシダミドの神経細胞に対する作用

アクリルアミド(上段)及びグリシダミド(下段)は、100 μ M、1 mM、10 mM の濃度で48時間インキュベートした。左端の写真は、コントロールの透過光像

これら、神経細胞に対する作用を定量的に解析する目的から、アクリルアミド及びグリシダミドの作用を MTT アッセイ法を用いて評価した。図2はアクリルアミド(左カラム;赤)及びグリシダミド(右カラム;青)の神経細胞の cell viability に与える影響を定量化したものである。ア両薬物とも、1 及び 10 mM の濃度で、有意な cell viability の低下が認められた。また、アクリルアミドよりグリシダミドの作用のほうが強かった。

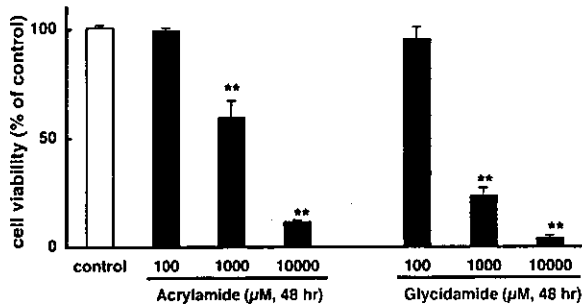


図2 アクリルアミド及びグリシダミドの海馬初代培養神経細胞に対する作用
アクリルアミド(左)及びグリシダミド(右)(各 100 μM - 10 mM)を神経細胞に添加し、48 時間後に MIT アッセイを行った。

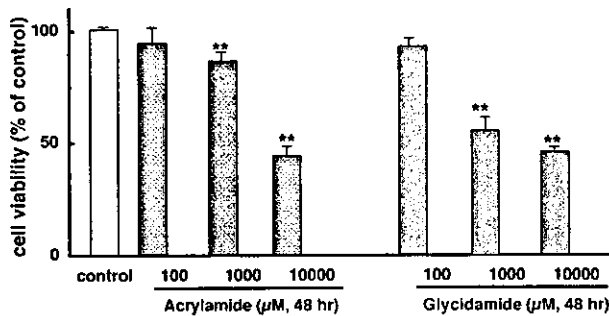


図3 アクリルアミド及びグリシダミドの初代培養アストロサイトに対する作用
アクリルアミド(左)及びグリシダミド(右)(各 100 μM - 10 mM)を神経細胞に添加し、48 時間後に MIT アッセイを行った。

アクリルアミド及びグリシダミドのグリア細胞に対する作用を検討した。培養アストロサイトにアクリルアミド及びグリシダミドを 100 μM - 10 mM の濃度で添加して、MIT アッセイ cell viability を測定した。図3で示すように、両薬物とも、濃度依存的にアストロサイトの cell viability を低下させた(図3)。またアクリルアミドよりグリシダミドの作用が強かった。さらに、図2と比較すると、アクリルアミド及びグリシダミド共に、アストロサイトに対する cell viability 低下作用より、神経細胞に対する作用の方が顕著であった。

グリシダミドによる神経細胞の cell viability 低下のメカニズムを解析する目的から、各種薬物の作用を検討した。図4は、グリシダミド(1 mM, 48 hr)により惹起される海馬神経細胞の cell viability 低下に対する、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 の作用を検討したものである。薬物は、グリシダミドと同

時に添加した。グリシダミドの cell viability 低下は、N-アセチルシステイン及び SB203850 により有意に抑制されたことから、酸化ストレスによる細胞障害及び p38MAP キナーゼの活性化が関与している可能性が示唆された。

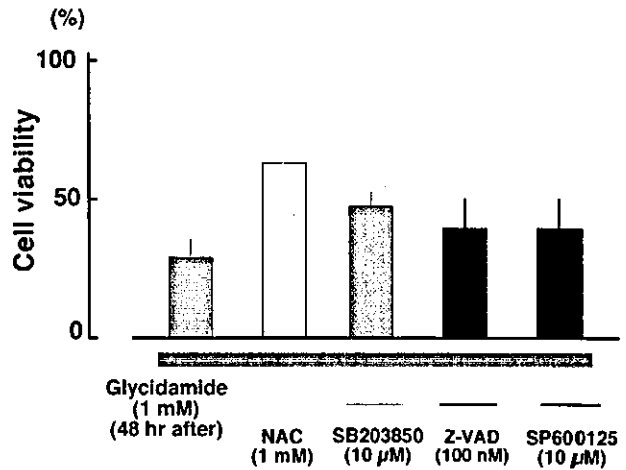


図4 グリシダミドにより惹起された海馬神経細胞の cell viability 低下に対する、各種薬物の作用

グリシダミド(1 mM, 48 時間)により惹起される神経細胞の cell viability 低下に対する、N-アセチルシステイン(NAC)、p38MAP キナーゼ阻害剤 SB203850、カスパーゼ阻害剤 Z-VAD 及び SP600125 の作用を検討した。各薬物はグリシダミドと同時に神経細胞に添加した。

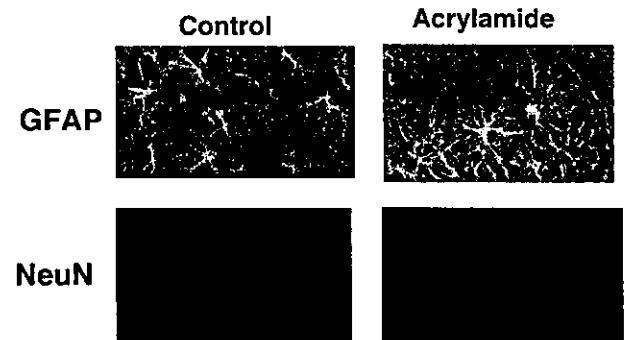


図5 アクリルアミドの経口投与による、海馬アストロサイト及び神経細胞の免疫組織像の変化

アストロサイトは GFAP で、海馬神経細胞は NeuN を用いて免疫染色像を取得した。Acrylamide は 10mg/kg を3日間連続投与した。アクリルアミドの投与により、海馬 CA1 領域のアストロサイトの肥厚化が観察されたが(右上図)、CA1 領域の神経細胞の組織像には変化が認められなかった。

ラットにアクリルアミドを経口投与して、海馬の神経細胞及びアストロサイトの組織像の変化を観察した。アクリルアミドは 10 mg/kg の濃度で、3日間連続で経口投与し、最終投与から24時間後に、深麻酔下で PFA 灌流固定後、脳を取り出し、免疫組織学的研究に供した。海馬では、アクリルアミドの投与により肥厚化した活性化アストロサイト像が観察された(図5、右上 GFAP 像)。

しかし、脳虚血等の障害に脆弱である海馬 CA1 領域の錐体細胞の組織像には特に変化は認められなかった(図5, NeuN 像)。

D 考察

アクリルアミド及びグリシダミドは共に神経細胞及びアストロサイトに対して毒性(cell viability の低下)を呈した。毒性発現には、1 mM 以上と高濃度を要した。また、代謝産物グリシダミドは、アストロサイトよりも顕著な毒性作用を呈した。代謝産物のグリシダミドが、アクリルアミドの毒性発現の本体と指摘されているが、本実験結果では、アクリルアミドそのものにも毒性作用があることが示唆された。

グリシダミドによる神経細胞毒性は、N-アセチルシステインによって抑制された。N-アセチルシステインは、酸化ストレス等を抑制する細胞内毒性防御物質であるグルタチオンを増加させる。また、N-アセチルシステインは、エポキシド体と結合能を有し、グリシダミドのスカベンジャーとしても働く。しかし、p38MAP キナーゼは種々のストレス性の刺激により、活性化する細胞内シグナルであるが、p38MAP キナーゼ阻害剤 SB203850 も、グリシダミドによる cell viability 減少を抑制した。これらの知見は、グリシダミドによる神経細胞毒性は、酸化ストレスが関与しているものと考えられる。グリシダミドにより誘発される神経細胞死には、カスパーゼ阻害剤が全く保護作用を示さなかった(図4)。従って、この細胞死にはアポトーシスは関係していないものと考えられる。

In vivo でアクリルアミド(10 mg/kg)を経口投与した場合、アストロサイトの肥厚化は観察されたが、神経細胞の変性は認められなかった。神経細胞の変性が細胞体から遠い部位、つまり神経終末から誘発され、また神経伝達物質の放出能が障害されるとの報告がある(LoPachin, Toxicology Lett., 112-113, 23-33, 2000; LoPachin et al., Neurotoxicology, 25, 349-363, 2004)。従って、NeuN 抗体を用いて細胞体を染色した今回の実験では、神経細胞の障害を捉えきれなかった可能性が高い。今後は、神経終末や神経繊維等のマーカーを使った組織学的な解析が必要と考える。

E 結論

アクリルアミド及びその代謝産物グリシダミドは、共に高濃度で、*in vitro* で中枢神経毒性及びグリア細胞毒性を示した。その毒性発現の強さは、グリシダミドがより強力であった。アクリルアミド及びグリシダミドの細胞毒性発現には、酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。

F 健康危険情報

特筆事項無し

G 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuda, M., Mizokoshi, A., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, Kohsaka, S. and Inoue, K. (2004). Activation of p38MAPK in spinal hyperactive microglia contributes to neuropathic pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia*, 89, 89-95.
2. Inoue, K., Tsuda, M. and Koizumi, S. (2004) ATP- and Adenosine-Mediated Signaling in the Central Nervous System: Chronic Pain and Microglia: Involvement of the ATP Receptor P2X(4). *J. Pharmacol. Sci.*, 94, 112-114.
3. Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M. and Inoue, K. (2004) Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons; involvement of extracellular ATP and activation of P2Y2 receptors. *Biochem. J.*, 380, 329-338.
4. Shinozaki, Y., Koizumi, S., Ishida, S., Sawada, J., Ohno, Y., and Inoue, K. Cytoprotection against oxidative-stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. (2005) *Glia*, 49, 288-300.
5. Nasuhata, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) The involvement of β 1 integrin in P2Y12/13 receptor-mediated chemotaxis of microglia and its regulation of microglial proliferation that is inhibited by ADP. *Glia*, in press

2. 学会発表

1. Koizumi, S., Miyatake, M., Tsuda, M. and Inoue, K. Tonic regulation of signaling cascades by spontaneously released ATP in astrocytes, Purines2004, 6-9 June, 2004, Chapel Hill, U.S.A.
2. Fujishita, K., Koizumi, S., Inoue, K. Skin-to-sensory neuron communication mediated by ATP and activation of P2Y2 receptors in NHEKs, Purines2004, 6-9 June, 2004, Chapel Hill, U.S.A.
3. Shinozaki, Y., Koizumi, S. and Inoue, K. Cytoprotective action against oxidative stress by ATP/P2Y1 receptors-mediated pathways in astrocytes. Purines2004, 6-9 June, 2004, Chapel Hill, U.S.A.
4. 小泉修一、藤下加代子、井上和秀:ATP による血管周皮細胞ペリサイトー第10回アストロサイト連関、ATP・アデニン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
5. 多田 薫、小泉修一、井上和秀、 β 1 インテグリンを介するミクログリアの増殖・ケモタキシスとP2Y12受容体、第10回 ATP・アデニン研究会、8月26-27日、岡崎
6. 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀:ATP によるアストロサイトの酸化ストレスからの細胞保護作用:第10回 ATP・アデニン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
7. 藤下加代子、小泉修一、井上和秀:レチノイン酸による皮膚 P2Y2 受容体の発現制御:第10回 ATP・アデニン研究

- 会、2004年8月26-27日、岡崎
8. 重本一最上由香里、小泉修一、多田薫、津田誠、井上和秀:P2Y6 受容体活性化によるミクログリア細胞のフェノサイト-シス脳の増大:第10回 ATP・アデニン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
 9. 國房恵巳子、多田薫、小泉修一、津田誠、井上和秀:細胞外マトリックスとミクログリアのP2受容体、第10回 ATP・アデニン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
 10. 津田誠、國房恵巳子、小泉修一、井上和秀:神経因性疼痛モデルにおけるグリア細胞の活性化様式、第10回 ATP・アデニン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
 11. Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M. and Inoue, K. Ca^{2+} waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons; involvement of extracellular ATP and activation of P2Y2 receptors, Neuro2004, 2004年、9月21-23日、大阪
 12. Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M. and Inoue, K.: Ca^{2+} waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons; involvement of extracellular ATP and activation of P2Y2 receptors, Society for Neurosciences, 23-28, Oct, 2004, San Diego, U.S.A.
 13. 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀:ATP によるアストロサイトの酸化ストレス抵抗性の獲得、グリア研究会、2004年11月20日、福岡
 14. 戸崎秀俊、小泉修一、井上和秀:核内受容体の介した初代培養ミクログリアのP2X4受容体発現増強:第29回クロマフィン研究会、2004年11月27-28日、軽井沢
 15. 藤下加代子、小泉修一、井上和秀:レチノイン酸による皮膚 P2 受容体の発現制御、第29回クロマフィン研究会、2004年11月27-28日、軽井沢
 16. 小泉修一、篠崎陽一、井上和秀:アストロサイトは P2Y1 受容体を介して酸化ストレス耐性を獲得する:第29回クロマフィン研究会、2004年11月27-28日、軽井沢
 17. Koizumi, S., Fujishita, K. and Inoue, K. P2Y1 receptor-mediated Ca^{2+} wave propagation in the hippocampus. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
 18. Fujishita, F., Koizumi, S. and Inoue, K. Pericyte-to-astrocyte communication via extracellular ATP. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
 19. Shinozaki, S., Koizumi, S. and Inoue, K. Mechanisms underlying protection of oxidative-stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y₁ receptors. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
 20. Tozaki, H., Koizumi, S., Sato, Y., Tsuda, M. and Inoue, K. Retinoic acid upregulates P2X4 receptor expression in microglia. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
 21. Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Tada, K., Tsuda, M. and Inoue, K. The physiological function of P2Y6 receptor in rat microglial cells. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
 22. Tada-Nasu, K., Koizumi, S. and Inoue, K. The involvement of $\beta 1$ integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: P2Y12/13 receptor has opposite roles. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
 23. Kunifusa, E., Tsuda, M., Hasegawa, S., Tada-Nasu, K., Koizumi, S. and Inoue, K. Up-regulation by fibronectin of P2X4 receptors in microglia. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- G 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 - 無し
 3. その他
 - 無し

厚生労働科学研究費補助金
(食品安全性確保研究事業 アクリルアミドの生成抑制及び毒性抑制に関する研究)
分担研究報告書

アクリルアミドの遺伝毒性抑制に関する研究

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

研究要旨

食品に含まれるアクリルアミド(AA)の毒性が食物繊維の存在下において軽減されるかどうかを、*in vitro* ヒト細胞試験系によって評価したところ、試験した6種類の食物繊維(アルギン酸ナトリウム、イヌリン、グルコマンナン、デキストラン、キチン、メチルセルロース)にその効果は無かった。

AAの主たる代謝物であるグリシダミド(GA)について、その遺伝毒性の程度と、特徴を明らかにした。GAはAAより低濃度で強い細胞毒性、および高い遺伝毒性誘発率を示した。誘発された突然変異を解析すると、AAが染色体レベルの大きな欠失などを引き起こすのに対して、GAは主として点突然変異を誘発することがわかった。一方、AAの毒性のS9添加による増強作用は顕著ではなかった。今後、S9以外の代謝反応を利用して、AAの代謝様式と毒性発現機構の解明を行う必要がある。

A. 研究目的

2002年の3月にスウェーデンの研究者より、アクリルアミド(AA)が食品の高温調理により自然発生することが報告されて以来、日常生活において食事中から摂取されるAAが、人の健康にどれだけの影響を与えるかが問題となっている。

AAは慢性暴露により、末梢神経の変性を起こすことが知られている他、発がん性が指摘されている。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。

一方、AAの遺伝毒性に関しては細菌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、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と考えられている。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。