

200501042A

別添1

厚生労働科学研究研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

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17年度 総括・分担研究年度終了報告書

主任研究者 今井 俊夫

平成18（2006）年 4月

目 次

I. 総括研究年度終了報告		
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. 分担研究年度終了報告		
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	-----	20
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	-----	23
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	-----	30
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	-----	37
今井俊夫		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	
1. アクリルアミドの分析法, 実体, 低減法.		
2. Formation of acrylamide in a processed food model system, and examination of inhibitory conditions.		
3. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells.		
4. Chemoprevention of acrylamide toxicity by antioxidative agents in rats - effective suppression of testicular toxicity by phenylethyl isothiocyanate.		
5. 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 carcinogenesis.		

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
平成17年度（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 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、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の低減化法を明らかにすること、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。生成抑制に関しては、[古賀]AAの前駆物質であるアスパラギン、還元糖を比較的多く含むジャガイモの加工用3品種のスライス片を用い、実際のフライ調理工程で応用可能な方法を検討した。その結果、フライ前の温水洗浄(70℃, 2分間)と低温加工(150℃)の併用によりAAの生成率が80%程度低減することが示されたが、味覚、物性など品質とのバランスの検討を要する。毒性に関しては、[大野] AAと代謝物のグリシドアミド(GA)のラット海馬神経細胞に対する細胞毒性及び短期シナプス伝達に及ぼす作用を検討した。AA, GAはともに1mM以上の高濃度で細胞生存率を低下させ、シナプス伝達を阻害したが、AAよりもGAの作用が強く、N-アセチルシステイン、 $\alpha$ -リポ酸、ビタミンCなど抗酸化物質の前処置がそれらの抑制に有効であった。シナプス伝達阻害作用については、特に神経終末に対する作用の強いことが示唆された。[本間] ヒトリンパ芽球細胞株TK6を用いて、GAはAAに比し強い遺伝毒性を示すことを示してきたが、ラットS9, AAからGAへの代謝に関与するCYP2E1の高い活性をもつヒトS9存在下では、細胞毒性、遺伝毒性は増強されず、CYP2E1を高発現するヒト遺伝子導入細胞h2E1ver2, MCL-5における細胞毒性も親細胞のAHH-1と明らかな違いを示さず、AAがCYP2E1により代謝されるという従来の報告と一致しない結果が得られた。AAの毒性抑制法の確立には、代謝様式の詳細を明らかにする必要があることが示された。[広瀬] SD系雄ラットにおける神経・精巣毒性モデルにより、これまでに抑制効果を明らかにした $\alpha$ -リポ酸、フェネチルイソチオシアン酸、あるいは $\alpha$ -トコフェロールを組合せて投与した結果、精巣障害に対する抑制作用について、 $\alpha$ -リポ酸とフェネチルイソチオシアン酸の組合せによる相加作用が確認された。[今井] SD系雌ラットにMNUで処置後、AAと抗酸化作用のある $\alpha$ -リポ酸、抗酸化及びCYP2E1阻害作用を有する18 $\beta$ -グリシルレチン酸、あるいは抗酸化及び第II相酵素誘導作用を有するインドール-3-カルビノールを同時投与した。その結果、MNUとAAのみの対照群に比べ、被験物質投与群では乳癌の発生頻度/数が低下あるいは低下傾向を示した。以上、抗酸化/CYP2E1阻害/第II相酵素誘導物質がAAの毒性抑制に有用である可能性が示された。

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・副所長
- 3) 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・室長
- 4) 古賀 秀徳 カルビー株式会社・CRM グループ・フードサイエンス研究チーム・リーダー（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コントロール可能なもの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、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。

#### 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]

ジャガイモとしてトヨシロ、スノーデン及びアトランティックの3品種を使用した。ジャガイモを水道水で洗浄後、剥皮せずにスライサーを用いて1.42mmの厚さでスライスし、型抜きにてスライス片の維管束内部をくりぬいたものを、約15g量りとり、70℃に加温した1000mLの蒸留水の入ったビーカーに入れ、振盪恒温槽中で洗浄処理を120秒間行い、軽く表面の水分を拭き取った（ブランチングあり）。洗浄処理をしなかったものを対照とした（ブランチングなし）。各試料より10gを量りとり180℃に加熱したフライヤー（パームオレイン:ライス=1:1）で90秒間フライした。フライ終了温度は160℃になるように調整した。フライ後に、生成されたAA含量を臭素誘導体化後GC/MSにて測定した。低温調理として、170℃に加熱、フライ終了温度が150℃になるように調整したものと比較した。

(2)AAの代謝と毒性抑制 [大野]

ラット胎児の海馬から神経細胞を、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。シナプス伝達に対する作用については、海馬神経細胞で惹起されるCa<sup>2+</sup>振動を指標とした(Koizumi et al., PNAS, 2003)。細胞内Ca<sup>2+</sup>

濃度測定には fura2 法を用いた。

### (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 とラット肝臓由来 S9 及びヒト肝臓由来マイクロゾーム画分 (lot# HLS104) を用い、外来的代謝活性化の影響を検討した。TK6 はチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子がヘテロであるため、この遺伝子をターゲットした遺伝子突然変異試験が可能である。対数増殖期にある細胞を AA で 4 時間処理して細胞毒性を評価し、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。内因的代謝活性化試験系として、ヒトリンパ芽球細胞株 AHH-1 と、それを基礎としたトランシジェニック細胞である h2E1V2 と MCL-5 を用いた。h2E1V2 は CYP2E1 を、MCL-5 は 5 つの代謝酵素 CYP1A2, CYP2A3, CYP3A4, CYP2E1, mEpoxide hydrolase を高発現する。これら細胞は、BD bioscience の Dr. Crespi から供与された。

### (4) AA の神経毒性抑制に関する実験的研究 [広瀬]

6 週齢の雄 SD:IGS ラットを 7 群、各 8 匹に分け、無処置対照群以外には、AA を被験物質の投与 1 週間前より 0.02% 濃度で 5 週間飲水投与した。AA 単独群の他、昨年度まで AA による神経・精巣毒性に対する抑制効果を明らかにしてきた 0.2%  $\alpha$ -リポ酸 (ALA), 0.05% フェネチルイソチオシアン酸 (PEITC), 1%  $\alpha$ -トコフェロール (TP) の混餌による 4 週間併用、及び組合せ投与群として ALA+PEITC 及び ALA+TP 群を設定した。実験期間中は神経症状 (Gait score) をカウントし、実験終了時には動物を剖検して精巣、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、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的検索を行った。坐骨神経については、採取前に 2.5% glutar-

aldehyde の点滴固定を行い、エポン切片についてトルイジンブルー染色を行い、軸索変性の数、神経線維密度、萎縮した有髄神経線維 (径  $<3 \mu\text{m}$ ) 数の形態計測を実施した。精巣においては、細胞残屑の出現した精細管の数を測定した。中枢神経系のシナプス傷害の指標として、synaptophysin (SYP) の免疫染色により、小脳分子層で 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。

### (5) AA の発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

7 週齢の雌 SD:IGS ラット 100 匹に、乳腺、甲状腺など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 週間後より各群に AA を 0.004% の濃度で飲水投与した。AA と同時に被験物質として 0.15% (5 週目より 0.1%)  $\alpha$ -リポ酸 (ALA), 0.1% 18 $\beta$ -グリシルレチン酸 (GRA), 0.1% インドール-3-カルビノール (I3C) あるいは 0.15% (2 週目より 0.1%, 5 週目より 0.075%) ジスルフィラム (DSF) を 21 週間混餌投与した。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 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  $\times$  よこ  $\times$  高さ) を測定した。投与期間終了後の剖検においては、動物を剥皮後、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)  $\times$  (よこ)  $\times$  (高さ)  $\times$   $\pi/6$  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、ヒト肝臓由来マイクロゾーム画分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]

ブランチングなし、通常温フライの対照試料と比較し、ブランチングあり・通常温フライ、ブランチングなし・低温フライ、及びブランチングあり・低温フライにおいて、AA 生成量は各々46, 42, 及び 22%に減少した。3種のジャガイモ品種については同様の傾向を示した。また、フライ後のサンプルの褐変度については、対照試料がもっとも強く、次いでブランチングあり・通常温フライ及びブランチングなし・低温フライで同程度の褐変がみられ、ブランチングあり・低温フライでは、褐変は殆ど認められなかった。

#### (2) AA の代謝と毒性抑制 [大野]

海馬神経細胞に対し、AA 及び GA は添加後 24 時間後から生存率を低下させ、48 時間後にはさらに顕著な低下を示した。AA に対し GA の毒性は 3 倍程度強く、LD50 (神経細胞の生存率を 50%低下させる濃度) は、GA の 0.87mM に対し AA は 2.5mM であった。抗酸化物質である N-アセチルシステイン、 $\alpha$ -リポ酸、ビタミン C の作用を検討した結果、N-アセチルシステインは 100-1000  $\mu$ M の比較的高濃度で AA の細胞毒性を抑制したが、GA の細胞毒性には拮抗しなかった。N-アセチルシステインは前

処理のみならず、同時添加でも強い細胞保護作用を示した。 $\alpha$ -リポ酸は 10 及び 100  $\mu$ M で AA の細胞毒性を抑制したが、GA に対しては有効ではなかった。また、 $\alpha$ -リポ酸は前処置 (24 時間) により、その効果が非常に強くなることが示された。ビタミン C は 10-300  $\mu$ M 濃度で AA 及び GA の細胞毒性を軽減させた。これら 3 種の抗酸化物質に AA による細胞毒性に対する抑制作用が観察されたが、その作用は軽度であり、30%程度に低下した生存率を 40-50%に回復させる程度であった。

海馬神経細胞で観察される自発的  $Ca^{2+}$  振動を指標としたシナプス伝達に対し、AA 及び GA は 10mM という高濃度で阻害作用を示した。AA あるいは GA 投与直後数分は  $Ca^{2+}$  振動の振幅及び頻度に変化はみられないが 60 分後には著明な振幅及び頻度の減少が観察され、これらは 120 分後にはほぼ消失した。このとき、シナプス後細胞の細胞応答性の低下は認められないことから AA 及び GA は特に神経終末に作用し、その機能を阻害するものと考えられた。

#### (3) AA の遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

TK6 細胞は、ヒトマイクロゾーム画分非存在下で、AA 濃度依存的に細胞毒性を示し 15mM で約 80%の細胞毒性を示した。また、TK 突然変異のわずかな誘発と小核の誘発が観察された。通常のラット誘導型 S9 の 7 倍程度の活性をもつ高活性 CYP2E1 をもつヒトのマイクロゾーム画分存在下において、両者に顕著な差は認められなかった。AHH-1 は元来、aromatic hydrocarbon によって CYP1A1 を誘導しやすい細胞株である。この細胞を基礎とした h2E1V2 及び MCL-5 細胞は、CYP2E1 により代謝活性化されたジメチルニトロサミンに対し強い感受性を示したが、AA に対しては親株の AHH-1 と同程度の結果を示した。

#### (4) AA の神経毒性抑制に関する実験的研究 [広瀬]

体重は、無処置対照群と比較し、AA+ALA 群で実験開始 1 週目から、AA+PEITC 群で 2 週目から、AA+ALA+TP 群で 3 週目から有意な低値が認められ、最終週(第 5 週)では AA を投与した全群で認められた。AA+ALA+PEITC 群と AA+ALA+TP 群では AA+ALA 群に比し有意に高値を示した。Gait score に関しては、AA 単独群では経時的にスコアが増加(症状が増悪)し、ALA を併用した全群で AA 投与 3 週目よりスコアが有意に低値を示した。病理組織学的解析では、AA 投与による坐骨神経の軸索変性、萎縮した有髄線維の割合の増加がみられた。ALA の併用により、軸索変性及び有髄線維の萎縮が抑制された。PEITC あるいは TP の併用により、ALA と同様に抑制がみられたが、その程度は ALA に比し弱かった。ALA+PEITC あるいは ALA+TP の併用により、軸索変性あるいは有髄線維の萎縮が抑制されたものの、ALA 併用群との有意差はみられなかった。三叉神経では AA 投与により神経節細胞の中心性色質融解がみられたが、いずれの被験物質あるいはその併用投与においても明らかな抑制効果を示さなかった。精巣については、AA 投与による精上皮細胞の脱落が認められ、ALA の併用により抑制された。また、ALA+PEITC の併用により抑制効果の増強がみられたが、ALA+TP の併用については ALA 併用との明らかな違いが認められなかった。変性した精細管の割合を形態計測した結果、AA 投与によりその割合は増加し、ALA あるいは PEITC の併用により抑制されたが、ALA+PEITC 併用による更なる抑制増強は明らかではなかった。AA 投与により出現した小脳皮質分子層における SYP 陽性の点状構造の分布については、ALA あるいは ALA+PEITC 併用による有意な抑制効果が認められたが、両群の差はみられなかった。

(5) AA の発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

各群における体重増加抑制の状況から、DSF 群については実験開始 2 週目から投与濃度を 0.15 から 0.1% に、5 週目から 0.1 から更に 0.075% に、ALA 群については実験開始 5 週目から投与濃度を 0.15 から 0.1% に変更した。最終体重においては対照群と比べ ALA 及び DSF 群で有意な低値を示した。特に、DSF 群の最終体重は対照群に比べ著しく低く、約 50% の増加抑制であった。触診による乳腺腫瘍の経時的観察において、発生頻度及び数が 12-15 週目以降、各被験物質投与群で対照群に比し低値傾向あるいは低値を示した。体積の推移については群間の有意な差はみられなかった。病理組織学的検索により、乳腺腫瘍は全て腺癌と診断され、その発生頻度は対照群の 20 例中 18 例(90%)に比べ、ALA、GRA 及び I3C 群ではそれぞれ 18 例(90%)、13 例(65%) 及び 15 例(75%) で明らかな差はみられなかったが、DSF 群では 8 例(40%) であり有意な低値を示した。腺癌の発生数は対照群の  $3.5 \pm 3.0$  個/ラットに対し、GRA 群では  $1.8 \pm 1.9$ 、I3C 群では  $1.7 \pm 1.5$  及び DSF 群では  $0.8 \pm 1.3$  個/ラットで有意な減少がみられた。体積については群間の明らかな差はみられなかった。

#### 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]

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て検討を行った結果、ブランチング処理と低温フライでは同程度の抑制効果が得られることが示されたが、ブランチング処理では AA の前駆体であるアスバラギンや還元糖に限らず他の遊離アミノ酸など水溶性成分も減少し、味覚への影響が大きいと考えられることから、低温フライ加工を優先的に採用することが望ましいと考えられた。また、ブランチングと低温フライの

併用では約 80%の生成抑制効果が認められたものの、味覚、物性など商品価値の劣化することが推測され、両者のバランスを十分に配慮した検討を要する。

今年度まで実施してきたガラス繊維濾紙やジャガイモモデル系を用いた検討により、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を明らかにしてきたことから、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、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、今年度にジャガイモのスライス片を用いて検討した方法が実用化に向けて有効であることが示された。

#### (2) AA の代謝と毒性抑制 [大野]

神経系細胞に対する毒性は、AA に比し肝薬物代謝酵素 CYP2E1 による代謝産物 GA の方が強いことを示してきた。しかし今回の実験では、GA に比して弱いものの AA 自体も神経細胞の生存率を低下させ、シナプス伝達を阻害した。CYP2E1 は脳内にも存在し、酸化ストレスにより活性の上昇することが報告されている (J Leukocyte Biology, 78, 1223-1232, 2005) ことから、今回みられた神経毒性が GA によるものであることも否定できないが、肝臓に比し脳では CYP2E1 の発現レベルが極端

に低いこと、シナプス伝達阻害が AA 曝露後 60 分と比較的早い時間から観察されることから、AA 自体が神経細胞に作用して生存率の低下及びシナプス伝達阻害を引き起こしたとするのが妥当である。一方、抗酸化物質が AA 及び GA による神経細胞の生存率低下を抑制した。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、さらに AA 及びエポキシド体と結合能を有し、これらのスカベンジャーとしても働く。N-アセチルシステインの細胞保護作用は前処置なしでも認められたことから、スカベンジャーとして機能した可能性も考えられる。また、N-アセチルシステイン及び  $\alpha$ -リポ酸は、AA の毒性には比較的效果を示したが、GA による細胞生存率低下には顕著な効果を示さなかった。この原因として (1) AA 及び GA の毒性発現機序が異なる (2) AA の毒性が強いため保護効果が観察されにくい、の 2 つの可能性が考えられるが、詳細は不明である。ビタミン C が AA 及び GA 両者の毒性を抑制したことから、(2) だけでは説明ができない可能性もある。

食品からの AA 摂取により、生体内 AA 及び GA 濃度が mM オーダーに達することは考えにくい、今回の *in vitro* 系では mM オーダーでないと神経細胞毒性が観察されなかった。抗酸化物質による神経保護効果は、比較的軽度で、細胞生存率を 10-20%改善する程度であった。しかし、使用した AA が高濃度であったことを考慮すると、これら抗酸化物質の作用は意味のあるものであると考えることができる。中枢神経が食品由来の AA 及び GA により低濃度でより長期間にわたって曝露された際の神経細胞障害に対し、抗酸化物質が有効か否かは今後の検討課題である。

#### (3) AA の遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

これまでの我々の研究で、AA に比し GA の遺



伝毒性が強く、その性質も極めて異なることを報告した。AAはCYP2E1によりエポキシ環をもつGAに変換され、強い遺伝毒性物質に変わったことが予想される。NCTRのManjanathらは、BigBlueマウスを用いたHPRT, cII突然変異試験の結果を報告している

(Environmental Mutagen Society 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Pittsburgh, 2004. 10)。AAあるいはGAを10及び0.005%濃度で50日間飲水投与し、4週間後の肝臓での突然変異率が有意に上昇し、むしろAAでその誘発率は高かった。また、突然変異スペクトルを比較したところ、AAもGAもGC→TAのトランスマージョンを主体とする点突然変異であることが示された。このことは、AAはin vivoで代謝を受け、毒性が増強されるということをサポートしている。しかし、昨年度の実験ではAAはS9存在下でも毒性増強作用を示さなかった。今回、高いCYP2E1活性をもつヒトマイクロソーム画分を用いたが、やはりAAの毒性増強作用は認められなかった。CYP2E1は、S9調製後は急速に失活することも報告されている。そこで、CYP2E1を高発現するトランスジェニック細胞を用いてAAに対する感受性を比較した。これらの細胞は、同じCYP2E1で代謝を受けるジメチルニトロサミン(DMN)に対しては、顕著な毒性の増強を示したが、AAに対しては同程度の感受性しか示さなかった。これらの結果から、CYP2E1がAAの主たる代謝酵素であるとの結論は得られなかった。GhanayemらはCYP2E1-nullのマウスを用いて、AAに対する遺伝毒性をコメット試験、小核試験で観察している。また、GlattらはCYP2E1を高発現するV79細胞を用いて、SCEを指標にしてAAの遺伝毒性を評価している。これらの動物や細胞の結果は、正常のものに比べて差はあるが、その違いは顕著ではない。一方、DMNでは強い差が見られる。AAはCYP2E1によって

代謝されるが、その寄与率は低く、もっと他の代謝経路のある可能性がある。AAの毒性抑制法の確立には、詳細な代謝経路の解明が必要である。

(4)AAの神経毒性抑制に関する実験的研究 [広瀬]

昨年までの解析により、AAによる神経毒性は、ALA, TP, PEITCにより部分的に抑制され、ALAでより明らかであった。精巣障害に関しては、ALAとPEITCが著効を示した。今回のAA誘発神経障害及び精巣障害に対する抗酸化物質の組合せ投与による効果の検討では強い増強作用が期待されたが、神経障害については、中枢及び末梢神経に対し、ALAによる抑制作用以上の効果は見出せなかった。精巣障害に関しては、ALAとPEITCの組合せで、病理形態学的な相加作用が確認された。昨年度までの中枢神経での解析により、用いたそれぞれの抗酸化物質による抑制作用に関して、カタラーゼによるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消去系の活性化、更にALAによる抑制にはγ-グルタミルシステイン合成酵素の発現増加により内因性グルタチオン産生の亢進している可能性が示唆された。このことから、ALAによる抑制作用以上の効果の見出せなかった原因として、抑制作用にはカタラーゼによるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消去系の活性化よりも、内因性グルタチオン産生亢進の役割が大きいものと考えられた。精巣毒性に対して効果のあったPEITCとALAの組合せに関しては、PEITCはCYP2E1の阻害を介して毒性の強いGAの生成を抑制した結果による精上皮細胞障害の抑制、ALAについては内因性グルタチオン生成促進による保護作用の増加により、両者が相加的に作用したものと考えられた。

(5)AAの発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

今回、SD系雌ラットにMNUでイニシエーション処置した後、AAを飲水投与する乳腺早期

発がんモデルを用いて、AAの発がん作用に対する抑制物質の検索を試みた。抗酸化作用を有するALA群、抗酸化及びCYP2E1阻害作用を有するGRA群及び抗酸化及び第Ⅱ相酵素誘導作用を有するI3C群において、触診による乳腺腫瘍の経時的な観察で、その発生頻度及び発生数が低値傾向あるいは有意な低値を示した。病理組織学的検査ではGRA及びI3C群で腺癌の発生数の有意な減少がみられた。以上の結果から、ALA、GRA、I3Cは本モデルにおいてAAによる乳腺発がんに対し抑制作用を有することが示された。DSF群では、触診による乳腺腫瘍の発生頻度及び発生数が低値傾向あるいは有意な低値を示し、病理組織学的には発生頻度及び発生数が有意に減少した。しかし、同群では摂餌量の低下を伴う著明な体重増加抑制がみられた。乳腺発がんに対して、摂餌量あるいは体重増加量は大きな影響を与えることが報告されており(Thompson et al., 2004)、DSFによる摂餌量の低下及び体重増加抑制が腫瘍の発生頻度及び発生数の減少に関連している可能性が否定できないと考えられた。

## 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て、フライ調理工程で応用可能な方法を検討した結果、フライ前の温水洗浄(70℃, 2分間)と低温加工(150℃)の併用によりAAの生成率が80%程度低減することが示されたが、味覚、物性など品質とのバランスの検討を要する。

(2)AAの代謝と毒性抑制 [大野]

AA及びGAは、高濃度で中枢神経細胞に対する毒性を示した。その強さは、AAに比しGAが3倍程度強かった。AA及びGAの細胞毒性発現は先ず神経終末で引き起こされ、抗酸化

物質により保護でき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]

AAはin vitroの代謝活性化法で活性化を受けなかった。また、CYP2E1活性をもつ細胞でもAAの毒性は増強されなかったことから、AAの主たる代謝経路はCYP2E1以外の経路が考えられた。AAの毒性軽減法の確立のためにはこの代謝経路の解明と、それを利用したin vitro試験系の構築が重要である。

(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・精巣障害に対する抗酸化物質の複合抑制効果の検討により、神経障害についてはALAによる抑制作用以上の効果は見出せなかった。精巣障害に対する抑制作用に関しては、ALAとPEITCの組み合わせで、病理形態学的な相加作用が確認された。

(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0.004%の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、抗酸化、CYP2E1阻害あるいは第Ⅱ相酵素誘導作用を有するものが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可能性が示された。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 古賀秀徳:アクリルアミドの分析法, 実体, 低減法. In; “食品検査とリスク回避のための防衛技術”, 伊藤, 川本, 杉山, 西島, 米谷編, シーエムシー出版, 東京, 2006, pp241-249.
- 2) Ishihara, K., Matsunaga, A., Miyoshi, T., Nakamura, K., Sakuma, K., Koga, H.: Examination of conditions inhibiting the

formation of acrylamide in the model system of fried potato. Biosci. Biotechnol. Biochem. (in press).

3) 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, 33-39, 2005.

4) Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M: Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. Mutat. Res., 603, 151-158, 2006.

5) 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., 79, 531-541, 2005.

6) 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., 230, 25-32, 2005.

## 2. 学会発表

1) 石原克之, 蔵本龍衛, 古賀秀徳, 佐久間和

人: アクリルアミドの生成及び抑制条件の検討. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 2006 年 3 月, 京都.

2) 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.

3) Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumu, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., Honma, M.: Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens (2005.9)

4) 蓮村麻衣, 今井俊夫, 曹 永晩, 太田世志雄, 高見成昭, 広瀬雅雄: アクリルアミドのラット乳腺発がん作用に対する抑制物質の検索. 第 64 回日本癌学会, 2005 年 9 月, 札幌.

5) 高見成昭, 今井俊夫, 蓮村麻衣, 曹 永晩, 広瀬雅雄: アクリルアミドのラット乳腺発がん作用に対する抗酸化及び第 II 相酵素誘導物質の抑制効果. 第 22 回日本毒性病理学会, 2006 年 1 月, 鹿児島.

6) Imai T, Takami S, Cho YM, Hasumura M and Hirose M: Inhibitory effects of antioxidants and phase II-enzyme inducers on acrylamide-induced rat mammary carcinogenesis. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology (2006.3)

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（食品の安心・安全確保推進研究事業）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<sup>1)</sup>。その後、食品中のAAm分析法が報告され<sup>2),3)</sup>、種々の加工食品中のAAm含有量が調査されてきた<sup>4)~12)</sup>。そして食品中のアスパラギン(Asn)と還元糖(グルコース、フルクトース)の加熱により反応によりAAmが生成することが分かってきた<sup>13),14)</sup>。そこで、ガラス繊維濾紙を使ったモデル系を構築しアクリルアミドの生成条件およびその生成機構について検討し<sup>5)</sup>、さらに昨年はジャガイモスライス片を使用し、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が生成されることを明らかとした。さらには、フライ調理加工前に揚げ種中の前駆物質を除去するための水洗浄では、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。

そこで本年度は、昨年同様にジャガイモスライス片を用い、そのフライ調理加工における実際の加工工程でより利用可能な方法について検討を行った。すなわち、主要な加工用品種を用い、そのスライス片のよりフライ調理加工前に揚げ種中の前駆物質を除去するための水洗浄かつ低温でのフライ調理加工を実施しその併用効果について検討した。また、これまでAAmは120℃以上の加熱条件により生成されるとされていたが、より低温域で長期間の反応での生成の有無についても検討した。すなわちAsnとグルコース(Glc)のpHの異なる混合溶液を調製し、37℃の恒温条件下に7ヶ月間保管後Glc、Asnの残存量およびAAmの生成の有無について測定した。

高温によるスライス片の洗浄およびその後の低温フライ調理加工によって、処理フリーのコントロールと比較しAAmで約80%の低減がすべての品種において認められた。しかしその商品としての味覚、物性など品質価値については十分な検討が必要である。また混合溶液の37℃における長期間の恒温反応条件では、pHによってAAmのAsnに対する生成率が異なり、酸性条件下では生成は認められなかったが、強アルカリ条件下においては生成率は低い生成され、そして弱アルカリ域においては高い生成率でAAmが認められた。Asnと還元糖などの前駆物質が共存する条件下においては、低温条件下であってもAAmが生成されることが示唆された。

研究協力者

石原克之 カルビー株式会社 基礎研究  
1 チーム

蔵本龍衛 カルビー株式会社 基礎研究  
1 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<sup>1)</sup>. その後, 食品中の AAm 分析法が報告<sup>2), 3)</sup>され, 種々の加工食品中の AAm 含有量が調査されてきた<sup>4), 7~12)</sup>. 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<sup>6), 13), 14)</sup>が, その生成条件の詳細およびその生成抑制については未解明の部分多い.

そこで本研究では, 食品の中でも AAm の前駆物質である Asn および還元糖が比較的多く共存しているジャガイモを用い, そのスライス辺をフライ調理加工する際の AAm 生成抑制条件の検討を行った. また, Asn と Glc との混合溶液を 37℃ の恒温器で長期に保管し低温における反応による AAm の生成の可能性についても検討した.

## 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. なお HCl および NaOH 溶液で pH 3.0, 7.4, そして 12.0 に調製した.

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, 100 mL に調製した. なお HCl および NaOH 溶液で pH 3.0, 7.4, そして 12.0 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. なお HCl および NaOH 溶液で pH 3.0, 7.4, そして 12.0 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-<sup>13</sup>C (99 atom %<sup>13</sup>C, 以下 AA-1-<sup>13</sup>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 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。

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. ジャガイモスライス片のフライ調理

ジャガイモとしてトヨシロ、スノーデンそしてアトランティックの3品種を使用した。水道水でジャガイモを洗浄後、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 70℃ に加温した蒸留水の入ったビーカーに入れて振とう恒温槽（EYELA 社製）中で洗浄処理を 120 秒間行った。洗浄処理後に、軽く表面の水分を拭き取ったものをブランチンブ有りとし、この洗浄処理をしなかったも

のをブランチング無しとした。それを、10 g 量り取り 180℃ 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 秒間フライした。フライ終了温度は 160℃ になるように調整した。また 170℃ 加熱した場合は、フライ終了温度が 150℃ になるように調整した。

## 4. Asn・Glc 混合反応溶液調製

調製した 3.0、7.4 および 12.0 の pH に調製した Asn および Glc 溶液のそれぞれの 10 mL を混合し 20 mL とした。その混合溶液を滅菌済みの DISMIC（φ 0.2 μ m、ADVANTEC 社製）にてろ過し、濾液を滅菌した試験管に入れ、遮光した状態で 37℃ の恒温器に入れ、7 ヶ月間保存した。

## 5. AAm測定

ジャガイモモデル系では、フード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-<sup>13</sup>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。なお、反応溶液サンプルでは 1 g を分析試料とした。

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

ツ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  $\mu$ L を添加して脱臭化水素し、GC / MS 分析溶液とした。

#### 6. GC / MS 測定条件

カラム : DB-WAX (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25  $\mu$ 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-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  $\mu$ L (スプリットレス)

#### 7. 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。

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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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。反応溶液試料では、濾過し、その濾液を HPLC 分析溶液とした。

#### 8. 糖分析

フードカッターにて試料を粉碎し、直ちに約 20 g をピーカーに秤量し、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。反応溶液試料では、濾過し、その濾液を HPLC 分析溶液とした。

#### 9. HPLC 測定条件

##### 9-1 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.8), B 液 : 45 % CH<sub>3</sub>OH, 45 % CH<sub>3</sub>CN, 10 % H<sub>2</sub>O

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)

## 9-2 糖分析

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

カラムオープン温度: 30  $^{\circ}$ C

移動相: 75 / 25 Acetonitrile / H<sub>2</sub>O

流速: 1.4 mL / min

検出器: HP 1100 RID

## C. 結果および考察

### 1. ジャガイモスライスの洗浄および低温フライの影響

これまでの結果から<sup>5),16)</sup>からジャガイモスライス辺のフライ前の温水洗浄 (2分間・70 $^{\circ}$ C) によって, AAm の前駆物質である Asn および還元糖が減少すること, およびより低温でのフライ加工によっても AAm の生成が抑制できることを明らかにしてきた. そこで, それらを併用することでの抑制効果について検討し, その結果について図1に示した. フライ工程における AAm 生成におよぼす影響はフライ工程の終了付近における加工温度が大きいことはこれまでの研究<sup>16)</sup>からわかっており, そこで通常フライ温度を 160 $^{\circ}$ C, 低温フライ加工を 150 $^{\circ}$ Cとした. コントロールのブランチング無し・通常フライと比較し, ブランチング有り・通常フライでは 46%, ブランチング無し・低温フライでは 42%, そしてブランチング有り・低温フライでは 22%を示した. また3種全てのジャガイモ品種についておなじような傾向を示した. またフライ後のサンプルの褐変度は, コントロールがもっとも強く, ついでブランチング有

り・通常フライとブランチング無し・低温フライで堂程度の褐変が認められ, ブランチング有り・低温フライでは, ほとんど褐変は認められなかった. このことから低温フライとブランチング処理では同程度の抑制効果が得られる可能性が示唆され, ブランチング処理では Asn や還元糖に限らず他の遊離アミノ酸など水溶性成分の減少も十分に考えられなど味覚への影響も大きいと思われる, 商品価値の側面からも低温フライ加工が最初の取組みとしてはより望ましいと思われる. またブランチング有り・低温フライの併用では抑制効果は大きくなるが味覚・物性・風味など商品価値の側面から劣ることが容易に推測され, この方法での低減については商品価値との関係に十分に配慮しながら進める必要が不可欠となると思われる.

### 2. 低温長期反応における AAm生成

Asn と Glc または Fru とを溶液状態で混合し 37 $^{\circ}$ C に長期保存 (7ヶ月) した場合の AAm 生成について検討した. 図2には反応後の溶液中の Glc および Fru の含量変化について示した. pH 3 の条件では Glc および Fru ともに僅かな減少が認められた. pH 7.4 条件下では Fru では 97% 残存しているが Glc では 78% を示した. 弱アルカリ条件下では Glc の方が Fru よりも分解または反応性が高いと考えられた. pH 12 のアルカリ条件下では混合していない Glc 区では Fru が, また Fru 区では Glc が認められ, アルカリ条件下では異性化反応が起きたものと示唆された. また残存率も極めて低く Glc 区で 9.4%, Fru 区で 7.2% であった.

次に Asn の残存率について図3に示した. Glc 区と Fru 区とで大きな違いは全ての pH 条件下で認められなかった. すなわち, pH 7.4 条件下での残存率は最も高く Glc 区で 55.3%, Fru 区で 60.6% を示した. また異性化したと思われる Asp の生成率



も Asn に対してともに 3.0%であった。次に残存率の高いのは pH3.0 の条件下であり、Glc 区で 49.2%、Fru 区では 54.5%を示した。また Asp の生成率においてもともに Asn に対して 7.6%であった。そして最も残存率の少なかったのは pH12.0mの条件下であり Glc 区で 12.1%、Fru 区では 11.4%を示し、Asp の生成率はそれぞれ 27.3%、29.5%であった。アルカリ条件下においては Asn が Asp への異性化反応が起きて居ると示唆された。

そして図4に各条件における AAmの生成率について示した。最も生成率の高かったのは Glc 区・pH7.4 であり 10520ppm で Asn に対する生成率は 0.08%、次いで Fru 区・pH7.4 の 7400ppm で Asn に対する生成率は 0.06%、それから Glc 区・pH12.0 の 3950ppm で Asn に対する生成率は 0.03%、そして Fru 区・pH12.0 の 2670ppm で Asn に対する生成率は 0.02%であった。pH3.0 条件下では両区ともに trace であった。このようにこれまでは 100℃いじょうの高温における条件によって AAmが生成されるとされてきたが、37℃という比較的低温条件下においても長期間還元糖と Asn が中性域からアルカリ域で共存していれば AAmの生成反応が起こることが認められた。また、その Asn に対する生成率は、180℃の高温域で 0.038%<sup>13)</sup>よりも高い生成率であった。

つまり、低温で加工される食品であってもその加工条件または保存条件によっては AAmが生成されうる可能性があると考えられる。

#### D. まとめ

ジャガイモスライス片のフライ前の温水洗浄と低温でのフライ加工の併用による AAmの生成抑制効果および Asn と Glc または Fru とを溶液状態で混合し、37℃に長

期保存した場合の AAm生成について検討した。

1) ジャガイモスライス片をフライ調理加工前に温水で洗浄、かつ低温でフライ加工することで約 80%の AAm生成抑制効果の可能性が認められた。

2) 37℃・中性～アルカリ域において、還元糖と Asn が長期間共存するような条件下において AAmは高い生成率で生成される可能性が示唆された。

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

・Ishihara, K., Matsunaga, A., Miyoshi, T., Nakamura, K., Sakuma, K., Koga, H., Examination of Conditions Inhibiting the Formation of Acrylamide in the Model System of Fried Potato, Biosci. Biotechnol. Biochem.(in press).

・古賀秀徳, “食品検査とリスク回避のための防衛技術”, 伊藤, 川本, 杉山, 西島, 米谷編, シーエムシー出版, 東京, 2006, pp241-249.

##### 2. 学会発表

・社団法人 日本農芸化学会 2006 年度大会「アクリルアミドの生成および抑制条件の検討」(2006 年 03 月 26 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  $^{13}\text{C}$ -labeled acrylamide as an internal standard. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 43, 371-376 (2002).
- 4) 吉田充, 小野裕嗣, 亀山真由美, 忠田吉弘, 箭田浩士, 小林秀誉, 石坂真澄, 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) Ishihara, K., Matunaga, A., Miyoshi, T., Makamura, 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, 33-39 (2005).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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>
- 9) 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/acrydata.html>
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., Dodson, A. T., Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448-449 (2002).
- 14) 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).
- 15) Kugimiya, M., Fujimura, T., Gelatinization of starches in parenchyma cells separated from potatoes. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 43, 951-955 (1996).
- 16) Katsuyuki, I., Atsushi, M., Takayuki, Kazuya, N., Kazuto, S., Hidenori, K., Examination of Conditions Inhibiting the Formation of Acrylamide in the Model System of Fried Potato, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*(in press).

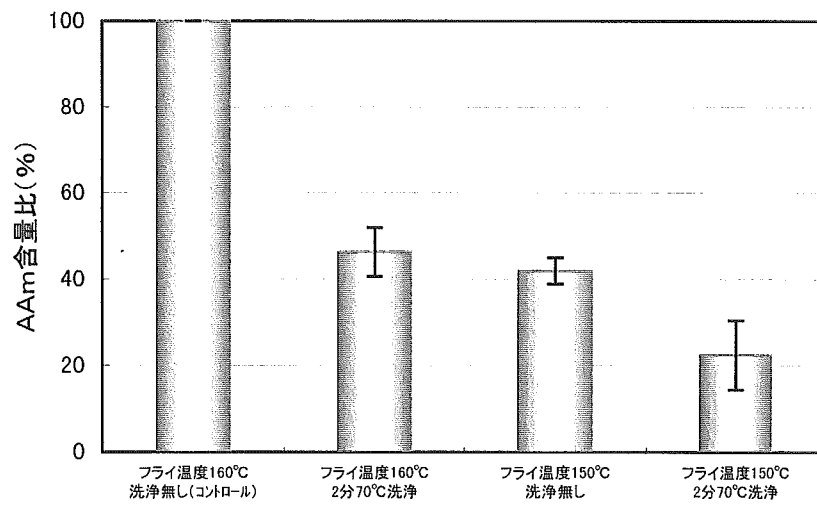
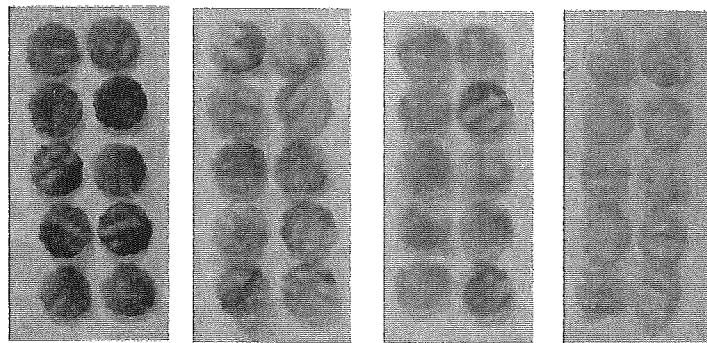


図 1 ブランチングおよび低温フライによる低減効果

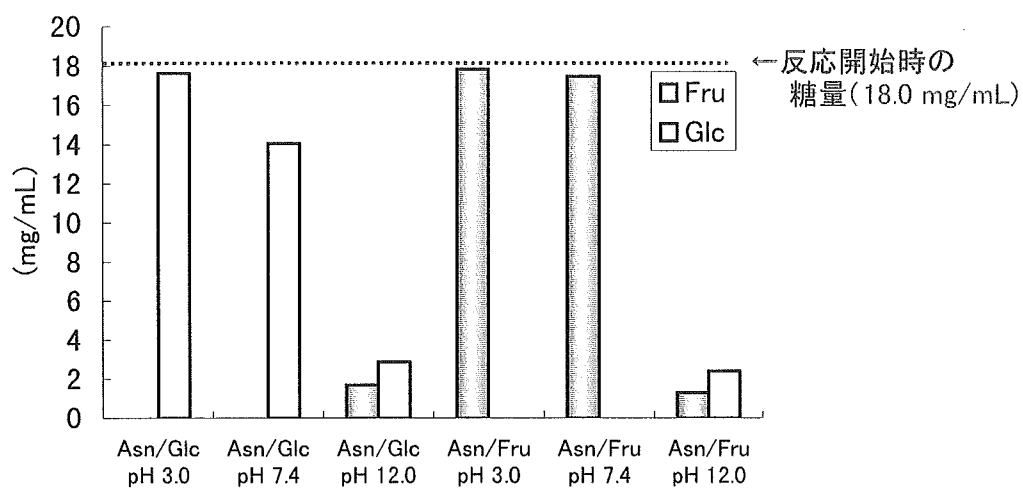


図 2 反応溶液中のGlcおよびFru量

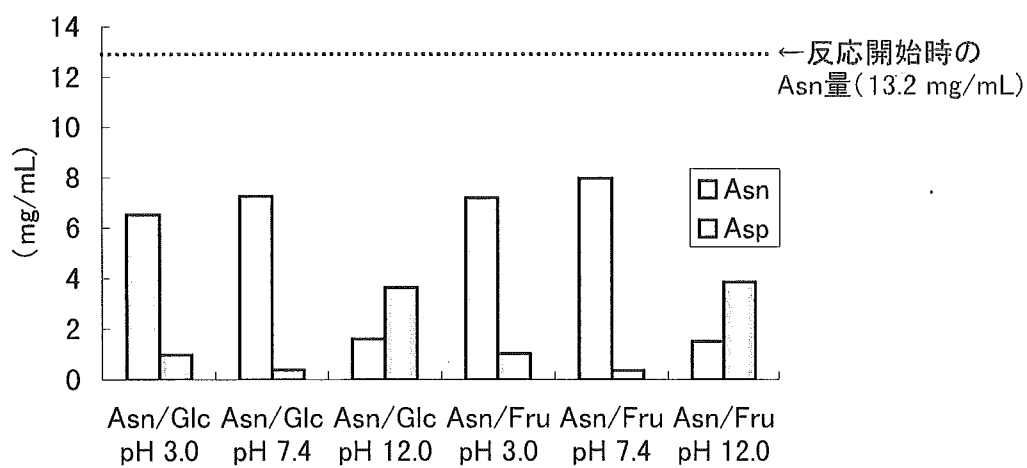


図 3 反応溶液中のAsnおよびAsp量