

200501042B

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15年度～17年度 総合研究報告書

主任研究者 今井 俊夫

平成18（2006）年 4月

## 目 次

I. 総合研究報告	
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	
(資料 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	23
(資料 2) アクリルアミドの代謝と毒性抑制に関する研究 -----	41
(資料 3) アクリルアミドの遺伝毒性抑制に関する研究 -----	59
(資料 4) アクリルアミドの神経毒性抑制に関する実験的研究 -----	69
(資料 5) アクリルアミドの発がん性抑制に関する実験的研究 -----	96
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	105
III. 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）  
（総合）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] ガラス繊維濾紙を用いてAAの前駆物質であるアスパラギンと還元糖を基本とするモデル系を構築し、AAの生成条件及びその生成機構について検討した。次いで前駆物質を比較的多く含むジャガイモのそのスライス片をモデルとし、そのフライ調理過程におけるAA生成率の挙動について、最終的には、実際のフライ調理工程で利用可能な方法について検討を試みた。その結果、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、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の調整が極めて効果的であることが示された。また、フライ調理後の余熱を取り去ることも有効であった。前駆物質を除去するための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の生成抑制効果の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デンプンの糊化がみられ、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の問題点がある。実際に応用可能な、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最適化を要する。毒性に関しては、[大野] ラット遊離肝細胞を用いて、AAの代謝物であるエポキシド体のグリシダミド(GA)生成について検討した結果、AAからGAへの代謝にはCYP2E1が関与し、AA処置により細胞内毒性防御物質の還元型グルタチオン(GSH)量の低下することを示した。また、AAとGA両者の毒性について比較検討した結果、GA処置では還元型GSH量の低下がより顕著であり、細胞死も観察された。また、ラット海馬神経細胞及びアストロサイトを用いた検討では、AAよりもGAがより強い細胞毒性を呈し、神経細胞の方がアストロサイトよりも強く障害された。海馬神経細胞のシナプス伝達に関しては、AA、GAとも阻害作用を呈したが、GAでより顕著であった。また、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。これら肝細胞あるいは神経系細胞に対するAAの毒性は、N-アセチルシステイン、 $\alpha$ -リポ酸、ピタミンCなどの抗酸化物質により抑制された。[本間] ヒトリンパ芽球細胞株TK6を用いてGAはAA

に比し強い細胞毒性、遺伝毒性を示すことを明らかにした。遺伝毒性については、AAは染色体レベルの大きな欠失を、GAは主に点突然変異を誘発した。ラットS9、あるいはAAからGAへの代謝に関与するとされるCYP2E1の高い活性を有するヒトS9存在下では、細胞毒性及び遺伝毒性は増強されなかった。また、CYP2E1を高発現するヒト遺伝子導入細胞h2E1ver2、MCL-5における細胞毒性についても親細胞のAHH-1と明らかな違いはみられず、AAがCYP2E1により代謝されるというこれまでの報告と異なる結果の得られたことから、AAの毒性抑制法を確立するためには、その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AAの神経・精巣毒性モデルを用いて、抗酸化物質の $\alpha$ -リポ酸(ALA)、 $\alpha$ -トコフェロール(TP)あるいはCYP2E1阻害/第II相酵素誘導作用のある硫化ジアリル、フェネチルイソチオシアン酸(PEITC)による毒性抑制作用を示した。中枢あるいは末梢神経におけるALA、TPあるいはPEITCによる毒性抑制に対し、GSH系のレドックス制御の介在している可能性が示唆された。ALA、TPあるいはPEITCの組合せ投与の効果については、精巣障害に対する抑制作用について、ALAとPEITCの組合せによる相加作用が確認された。[今井] SD系雌ラットに乳腺発癌物質であるMNUでイニシエーション処置後にAAを投与することにより、AAの乳腺早期発がんモデルを確立した。MNU-AAモデルを用いて、抗酸化物質のALA、TP、1-O-ヘキシル-2,3,5-トリメチルヒドロキノン、抗酸化/CYP2E1阻害/第II相酵素誘導作用を有するPEITC、18 $\beta$ -グリシルレチン酸(GRA)、インドール-3-カルビノール(I3C)をAAと同時に投与した。その結果、ALA、PEITC、GRAあるいはI3C投与により、乳癌の発生、増殖が抑制された。以上、抗酸化/CYP2E1阻害/第II相酵素誘導作用を有する物質がAAの毒性に対する抑制物質として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、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。

## 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]

1) *ガラス繊維濾紙モデル* ガラス繊維濾紙 (GA-200,  $\phi$  25 mm, 0.75 mm, 東洋濾紙) を針状物 (爪楊枝を用いた針山) 上に乗せて濾紙以外への溶液の浸透を防いだ状態で、AA の前駆物質である還元糖のグルコース及び遊離アミノ酸としてアスパラギンを基本とした溶液をリン酸緩衝液で調製して浸透させた。ガラス繊維濾紙をパーム油にてフライ加工したものを溶液フライ系サンプル、溶液を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。AA の生成条件として、加工温度、pH、前駆体としてのグルコースとフルクトース、遊離アミノ酸の影響を検討した。

2) *ジャガイモスライス片モデル* 前駆物質を比較的多く含むジャガイモスライス片を用いた検討では、水道水でジャガイモ (トヨシロ) を洗浄後、剥皮せずにスライサーを用いて 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 の蒸留水の入ったビーカーに入れて振盪恒温槽中で洗浄処理

を行い、軽く表面の水分を拭き取ったものをモデル系とした。さらに 10 g 量り取り 180 °C に加熱したフライヤー (パームオレイン: ライス=1:1) で 90 秒間フライする過程におけるフライ油温度、スライス片の品温、水分残存率の AA 生成量に及ぼす影響について検討した。また、洗浄処理時の蒸留水温、時間、フライ後の余熱除去の影響についても調べた。サンプルの水分含量の測定は常温加熱乾燥法に従った。揚げ種 (ジャガイモスライス片) 中温度測定は、側面から中央付近に長極細シース熱電対 (T34,  $\phi$  0.25 ストレートシース, 岡崎製作所) を挿入して測定した。

3) *実際の加工工程に応用可能な方法の検討* ジャガイモのトヨシロ, スノーデン, アトランティックの 3 品種のスライス片モデルを用い、フライ前の洗浄及び低温フライの影響を検討した。即ち、70°C で洗浄処理を 2 分間行い、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グあり、洗浄処理をしなかったものをブランチングなしとした。さらに 10 g 量り取り 180 °C 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°C になるように調整した。また 170°C 加熱した場合は、フライ終了温度が 150°C になるように調整した。加熱後サンプルの AA 含量は、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]

1) *肝細胞を用いた検討* 遊離肝細胞は無処置あるいは 0.1% アセトン水を 5 日間投与した SD 系雄ラットよりコラゲナーゼ環流法を用いて調製した。ま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。培養溶液 (Krebs-Ringer-HEPES 緩衝液, pH=7.4;  $10^6$  cell/ml) 中に AA あるいは代謝物のグリシダミド (GA) を加えて 37°C で 0-6 時間インキュベートした。その後、細胞懸濁液

を遠沈後、AA, GA 濃度を上清画分より HPLC にて測定し、細胞画分からはグルタチオン (GSH) 含量を o-phthalaldehyde による蛍光法で測定した。また、細胞懸濁液より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。さらに、培養溶液中に N-アセチルシステイン、メチオニン、ビタミン C 及び GSH を添加してその影響を観察した。

2) ラット中枢神経系細胞を用いた検出中枢神経に及ぼす影響として、ラットに AA を 10 mg/kg 体重の用量で 3 日間連続経口投与し、最終投与から 24 時間後に、深麻酔下でパラホルムアルデヒド灌流固定後、脳を摘出、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するとともに、神経細胞は抗 NeuN 抗体、アストロサイトは抗 GFAP 抗体を用いて免疫組織化学を行い、細胞の同定を行った。また、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こと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  $Ca^{2+}$  振動を指標とした (Koizumi et al., PNAS, 2003)。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定には fura2 法を用いた。毒性抑制物質として、N-アセチルシステイン、 $\alpha$ -リポ酸及びビタミン C の作用を検討した。

### (3) AA の遺伝毒性抑制に関する研究 [本間]

1) ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 における AA の遺伝毒性 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 あるいは 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。突然変異体の遺伝子解析として、AA によって誘発された TK 遺伝子突然変異体 44 種と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、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  $\beta$  グロビン部位とともに定量的 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。

2) 外来的及び内因的代謝活性化実験・食物繊維の影響 外来的代謝活性化実験では、活性値の異なる 2 種類のラット肝臓由来 S9, 2 種類のヒト肝臓由来 S9 及びヒト肝臓由来マイクロゾーム画分 (lot#HLS104) を用いた。内因的代謝活性化試験系では、ヒトリンパ芽球細胞株 AHH-1 と、それを基礎とした遺伝子導入細胞である h2E1V2, 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。毒性抑制物質として、培養液中での AA の吸着が期待された食物繊維 (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、メチルセルロース) の影響を検討した。具体的には、細胞浮遊液と各食物繊維を混合して 3 時間培養した後、AA を 1mg/ml 濃度で添加し、さらに 4 時間培養した。培養後、小核を観察し、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]

1) 抗酸化物質などによる AA の神経・精巢

**毒性の抑制** 6週齢の雄SD:IGSラットを10群、各5-10匹に分け、抗酸化物質( $\alpha$ -リポ酸, 0.2%, ALA;  $\alpha$ -トコフェロール, 1.0%, TP), CYP2E1阻害, 第II相酵素誘導作用のあるフェネチルイソチオシアン酸(0.05%, PEITC), 硫化ジアリル(0.1%, DAS)は混餌により, AAは飲水により投与した。AAの投与濃度は, 数週間以内に神経障害の生じることが報告されている文献値を参考に0.02%とした。AAあるいは各被験物質単独群のほか, 両者の併用群を設定した。投与期間は被験物質を7日間前投与の後, 28日間被験物質とAAを同時投与した。投与期間中, 神経症状(Gait score)をモニターした。投与終了時には剖検を行い, 肝臓, 精巣, 精巣上部, 脳(小脳と延髄を含む), 三叉神経, 坐骨神経を採取し, 精巣, 精巣上部については重量を測定した。精巣以外の臓器は10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し, 精巣はブアン固定し, 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。また, 坐骨神経は摘出の前に2.5%グルタルアルデヒドの点滴固定を行い, エポン包埋切片を作成し, トルイジンブルー染色を行った。坐骨神経においては, 軸索変性の数, 神経線維密度, 萎縮した有髄神経線維( $\phi < 3\mu\text{m}$ )の形態計測を実施し, 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。

**2) 抗酸化物質などによる毒性抑制機序の検討** 神経系における代謝あるいは酸化ストレス関連酵素の発現検索として, 大脳, 小脳, 橋・延髄, 三叉神経について, カタラーゼ(CAT), チオレドキシシン(TRX),  $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素(GCS), グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX), NSGP, ヘムオキシゲナーゼ(HO)-1, Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ(SOD), EC SOD, Mn SOD, 誘導型NO合成酵素(iNOS)に対する免疫組織化学を行った。

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投与により異常な染色性を示す点状構造の分布を計測した。更に, 精巣と肝臓におけるCYP2E1, GCS, HO-1, Cu/Zn SOD, CAT, TRXの発現量をウエスタンブローディングにより検索した。

**3) 抗酸化物質の併用効果・食物繊維の影響** AA単独群のほか, 上述の検索でAAの毒性抑制効果の確認されたALA(0.2%), PEITC(0.05%), TP(1%)の各群, 及びALA(0.2%) + PEITC(0.05%)あるいはALA(0.2%) + TP(1%)とAAとの併用群を設定した。また, 消化管内でAAを吸着することで生体へのAAの吸収阻害効果を期待した食物繊維(アルギン酸ナトリウム, 2.5%; グルコマンナン, 5%; デキストラン, 5%; キチン, 2.5%; クロロフィリン, 1%)の影響を末梢神経障害, 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指標として検討した。

#### (5) AAの発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

**1) AAの発がん性早期検出モデルの確立** AAの発がん性を抑制する物質を効率的に探索するため, AAの発がん性を比較的短期間で検出できるモデルの確立を試みた。6週齢の雌SD:IGSラット60匹に甲状腺発癌物質の*N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN)を単回皮下投与し, 1週間後に乳腺発癌物質の7,12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA)を単回強制経口投与した。その後ラットを3群に分け, AAを0.004, 0.002及び0(対照)%濃度で22週間飲水投与した。また, 同じく雌SD:IGSラット60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)を単回腹腔内投与した後AAを同濃度で30週間飲水投与す

る検討も併せて行った。AAの投与量は、報告されている2年間の発がん性試験において乳腺及び甲状腺に発がん性がみられた用量を参考にして設定した (Johnson et al., 1986; Friedman et al., 1995)。

2) AAの発がん性抑制物質の探索 上述の実験で確立した、MNUによる処置後AAを投与するラット乳腺早期発がんモデルを用いて、AAの発がん性抑制物質の探索を行った。まず、雌SD:IGSラット100匹にMNUを投与した後5群に分け、1週間後より各群にAAを0.004%濃度で飲水投与するとともに、被験物質として抗酸化剤の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%),  $\alpha$ -トコフェロール (TP, 1%), CYP2E1阻害、第II相酵素誘導作用のあるフェネチルイソチオシアン酸 (PEITC, 0.05%) あるいはAAの吸着作用を期待したクロロフィリン (1%) を39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対照群を設けた。この実験で、PEITCに発がん抑制作用がみられたこと、神経・精巣毒性抑制に関する研究で抗酸化剤の効果が示されたことから、更にAAの発がん性抑制物質の探索を継続した。即ち同じ方法で、抗酸化作用の $\alpha$ -リボ酸 (ALA, 0.15%, 5週目より0.1%), 抗酸化及びCYP2E1阻害作用のある18 $\beta$ -グリシルレチン酸 (GRA, 0.1%), 抗酸化及び第II相酵素誘導作用のあるインドール-3-カルビノール (I3C, 0.1%) あるいはCYP2E1阻害、第II相酵素誘導作用のあるジスルフィラム (DSF, 0.15%, 2週目より0.1%, 5週目より0.075%) を21週間混餌投与した。以上のいずれの実験においても、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、剖検した。剥皮後、皮下結節/腫瘍を詳細に観

察して摘出、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、投与は主に混餌あるいは混水による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あるいは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を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、使用したヒト肝細胞は米国NPO団体TTTが倫理法に基づいて調製し実験材料として市販され、あるいはヒトリンパ芽球細胞は米国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]

1) ガラス繊維濾紙モデルによる検討 AA生成率が、溶液フライ系では非水分オープン系の10倍程度であり、加熱時における水分の影響が示唆された。非水分オープン系では、これまでの報告と同様に120℃よりAAの生成が認められた。溶液フライ系及び非水分オープン系では各180, 200℃を頂点としてAAの生成が増減した。また、フライ調理に使用されている160~180℃の温度帯では僅かな温度の違いでも大きく生成率の異なることが明らかとなった。pHの影響については、溶液フライ系ではpHが高いほど生成率が高かった。前駆体としての還元糖については、アスパラギン量を固定し、対して還元糖のモル量を2倍、3倍と増やしたところ、溶液フライ系に



においてグルコースは添加量が 1:1 程度までは AA の生成は増加するが、その後は減少した。一方、フルクトース量を増やすと、それに伴って AA の生成が増加した。遊離アミノ酸については、グルコースとアスパラギンの系に種々の遊離アミノ酸を添加して検討した結果、システインは溶液フライ系、非水分オープン系ともに顕著に AA 生成を抑制し、グルタミン、グルタミン酸ともに非水分オープン系では約 50%抑制した。一方、溶液フライ系ではグルタミン酸、リジン、アスパラギン酸では抑制し、グルタミン、バリンでは促進した。

2) ジャガイモスライス片モデルを用いた検討 フライ過程におけるフライ油温度、スライス片の品温、水分残存率の AA 生成量に及ぼす影響について検討した。水分が 10%以上残存している場合にはフライ油温度は 170℃以上であってもスライス片の品温は 100℃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片の品温が上昇し、フライ油温度に達した。AA の生成量は、水分が十分に残存しスライス片の品温が 100℃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片の品温が上昇するのに伴って増加した。また、褐変反応も、水分が減少して温度が上昇するのに伴い進行した。フライ終了後の冷却による抑制効果については、180℃で 2 分間フライしたサンプルを直ち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 AA 生成抑制がみられた。更にフライ前の洗浄および低温フライの影響を検討した結果、フライ前の前駆物質を除去するため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 の生成抑制効果の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、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の問題点がある。

3) 実際の加工工程に応用可能な方法の検討 フライ前の温水洗浄 (70℃, 2 分間; ブランチングあり) と低温加工 (150℃) の併用により、ブランチングなしと通常フライ温度として 160℃の場合と比較した。ブランチングなし、通常温フライに対し、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、ブランチングなし、通常温フライがもっとも強く、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。

以上の研究成果は、実際のポテトチップス製造工程への応用されている。日本国内では、ジャガイモの収穫時期から貯蔵をして通年のジャガイモ加工食品としての原料としていることから、貯蔵に伴い AA の前駆物質の 1 つである還元糖が増加し、原料ジャガイモの貯蔵の条件およびその期間によって製品中の AA 含量が異なることが示されている。そのような状況の中で、初期調査値である平成 14 年度の AA 含有率を基準とし、経年的に AA 含有率の相対値を比較した結果、原料ジャガイモの貯蔵後期においても 50%程度、収穫直後では 20%程度まで含有量が減少した。

## (2) AA の代謝と毒性抑制 [大野]

1) 肝細胞を用いた検討 ラット遊離肝細胞系に AA を添加した場合、GA の生成においてほぼ 2 時間まで直線性が認められたが、アセトン投与により CYP2E1 を誘導したラットの遊離肝細胞では、その生成速度が 3-4 倍となった。この実験からミカエリス定数  $K_m$  及び

$V_{max}$  を求め、算出した代謝クリアランス ( $V_m/K_m$ ) は、アセトンで誘導したラット肝細胞では無処置ラットの 7 倍であった。凍結ヒト肝細胞では、この代謝活性はラットの 1/20 程度であり、凍結の影響と考えられた。また、ラット肝細胞において、AA による細胞死はみられなかったが、細胞内の GSH 含量は高濃度域 (1 mM 以上) で有意に減少した。この時、培地中に N-アセチルシステインあるいはメチオニンのような低分子 SH 化合物を添加することにより、GSH 含量の減少が顕著に抑制されたが、ビタミン C や GSH 添加による影響は少なかった。一方、GA 高濃度域 (0.3 mM 以上) でも細胞内 GSH 含量の顕著な減少が観察された。この場合も、N-アセチルシステインあるいはメチオニン添加により GSH 含量の減少が顕著に抑制され、その抑制作用は添加後 1 時間より 2-4 時間がより効果的であった。AA や GA による細胞内 GSH の減少は、グルタチオントランスフェラーゼ (GST) による反応と考えられ、ミカエリス定数  $K_m$  及び  $V_{max}$  を求め、代謝クリアランスを計算した。AA による細胞内 GSH の減少速度は、無処置及びアセトンを投与したラットの肝細胞に差はなかったが、GA による GSH の減少は AA よりも速かった。無処置ラットの肝細胞に対し、GA の 1 mM 濃度以下では細胞死はみられなかったが、GA の高濃度 (3 mM) では 4 及び 6 時間後に細胞死が観察された。この時、培地中に N-アセチルシステインあるいはメチオニンを添加することにより細胞死が抑制されたが、ビタミン C や GSH 添加による影響は少なかった。

2) ラット中枢神経系細胞を用いた検討  
AA を経口投与したラットでは、海馬において肥厚化した反応型アストロサイト像が観察された。しかし、脳虚血等の障害に脆弱な CA1 領域の錐体細胞の組織像に変化は認められなかった。アストロサイトに顕著な病変が観察

されたこと、アストロサイトの脳機能に果たす重要性が多く報告されるようになってきたことから、培養アストロサイトに対する AA 及び GA の作用を検討し、神経細胞に対する作用と比較検討した。その結果、AA, GA ともに濃度依存的にアストロサイトの生存率を低下させた。また AA に比し GA の作用が強かった。しかし、アストロサイト及び神経細胞の生存率を比較すると、神経細胞がより障害を受けやすいことが明らかとなった。従って、以下の研究は神経細胞に焦点を絞り展開した。初代培養海馬培養神経細胞に対し、AA 及び GA は、添加後 24 時間後から神経細胞の生存率低下を誘発し、48 時間後にはさらに顕著な低下を示した。AA に比し GA の毒性は 3 倍程度強く、LD50 値 (海馬神経細胞の生存率を 50% 低下させる濃度) は、GA の 0.87 mM に対し AA は 2.5 mM であった。GA (1 mM, 48 時間) により惹起される海馬神経細胞の生存率低下のメカニズムを明らかにするため、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。各阻害剤は GA と同時に添加した。GA による細胞生存率の低下は、SB203850 により有意に抑制されたことから、p38MAP キナーゼの活性化が関与していることが示唆された。また、カスパーゼ阻害剤が全く効果を示さなかったことから、この細胞死にはアポトーシスの関与が少ないと考えられる。AA, GA の神経毒性に対する抗酸化物質の 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 の比較的高濃度で抑制したが、GA の細胞毒性には拮抗しなかった。また、N-アセチルシステインは、前処置のみならず、AA との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) すると効果が明らかに強くなった。ビタミン C は 10-300  $\mu$ M の濃度で 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 の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%程度に低下した細胞生存率を 40-50% に回復させる程度であった。海馬初代培養神経細胞で観察される自発的  $Ca^{2+}$  振動を指標とし、シナプス伝達に対する AA 及び GA の作用を検討した結果、ともに 10mM という非常に高い濃度でシナプス伝達阻害作用を示した。AA, GA の投与直後数分は  $Ca^{2+}$  振動の振幅及び頻度に変化はみられないが、60 分後には明らか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。この時、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]

1) ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 における AA の遺伝毒性 AA と GA による細胞毒性、TK-遺伝子突然変異誘発性、小核誘発性を比較した。その結果、AA は濃度依存的に細胞毒性を示し、14mM (1mg/mL) で約 80% の細胞毒性を示した。TK 突然変異の誘発は最高濃度のみで有意であり、小核も 11.2mM 以上の高濃度で誘発がみられた。一方、GA は AA より低濃度で細胞毒性が観察され、TK 突然変異、小核とも、更に低濃度から誘発された。コメット試験における DNA 損傷性については、AA は全ての用量で損傷性が認められなかったのに対し、GA は 0.5mM の低濃度から損傷性がみられ、用量依存的に増加した。TK 変異体に関しては、増殖の早い NG(normal growth) 変異体と増殖の遅い SG(slow growth) 変異体に分類でき、SG 変異体のすべては LOH 型変異を示すことが知られている。AA は全てのタイプの突然変異を誘発するが、特にヘミ型 LOH を顕著に誘発する

ことが明らかとなった。対照的に GA は LOH 突然変異よりはむしろ非 LOH 型変異を主として誘発した。このことは、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ものである。

2) 外来的及び内因的代謝活性化実験・食物繊維の影響 AA は、CYP2E1 に代謝され、GA に変換されることが知られている。In vitro 遺伝毒性試験系について、2 つのラット肝臓由来 S9 (induced rat S9 と normal rat S9) 及びヒト肝臓由来 S9 (HLS-059 と pooled S9) を加え試験を行った。このうちラット induced S9 とヒト HLS-059 は薬物代謝活性の高い薬剤誘導型 S9 である。遺伝子突然変異、小核誘発、コメットとも S9 の添加により遺伝毒性の増強が観察されたが、S9 間の効果に関して明確な結論は得られなかった。更に、通常のラット誘導型 S9 の 7 倍程度の CYP2E1 活性をもつ、ヒト HLS-059 から調製されたマイクロゾーム画分を用いて試験を行ったが、明らかな変化は認められなかった。一方、ヒトリンパ球細胞株 AHH-1 は 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て、h2E1V2 は CYP2E1 を、MCL-5 は 5 つの代謝酵素 CYP1A2, CYP2A3, CYP3A4, CYP2E1, mEpoxide hydrolase を高発現するように改変された遺伝子導入細胞である。h2E1V2, MCL-5 細胞は CYP2E1 の最適な基質であるジメチルニトロサミンに対して強い感受性を示したが、AA に対しては親株の AHH-1 と同程度であった。毒性抑制物質として、培養液中での AA の吸着が期待された食物繊維の影響を検討したが、全ての食物繊維は単独では殆ど細胞毒性を示さず、AA の細胞毒性に対しても殆ど影響を与えなかった。小核についても、食物繊維単独では顕著な誘発は認められなかった。AA による小核の誘発に関しては、グルコマンナン、デキストリンで逆

に小核誘発を増強させる傾向が見られたが、抑制的効果は全く認められなかった。

#### (4) AA の神経毒性抑制に関する実験的研究 [広瀬]

1) 抗酸化物質などによる AA の神経・精巣毒性の抑制 ALA, TP, PEITC あるいは DAS による AA の神経・精巣毒性に対する影響を検索した。体重については、AA 投与による増加抑制がみられたが、AA と併用した各被験物質の投与による明らかな違いはみられなかった。Gait score に関しては、AA 投与により経時的にスコアが増加（症状が増悪）したが、AA 単独群に比べて、AA+ALA 群で AA 投与 2 週目よりスコアの低値を認め、AA+TP 群では 4 週目に低値を示した。精巣重量は AA 投与により増加したが、AA+ALA, AA+PEITC, AA+DAS 群でも同様の増加がみられた。精巣上体重量は、AA+ALA, AA+PEITC, AA+DAS 群で増加した。病理組織学的には、AA 投与により坐骨神経の軸索変性が認められ、その程度は AA 単独群に比べ AA+ALA, AA+TP, AA+PEITC 群で明らかに弱かった。AA による神経線維密度の減少は AA+ALA 群で有意に改善され、変性軸索数は AA+ALA 及び AA+TP 群で改善を示した。また、有髄神経線維の萎縮は各抗酸化剤投与により有意に改善した。AA 投与による三叉神経の神経節細胞にみられた中心性色質融解については、抗酸化剤投与による効果を示さなかった。AA 投与により、小脳皮質分子層に SYP 陽性の異常な点状染色像および類似の染色性を示すシナプシン-1 陽性像が増加したことから、AA によりシナプス前終末の変化が誘発されたものと考えられた。この SYP の分布変化については、AA+ALA 群で若干の改善傾向を認めた。以上より、AA 誘発神経障害に関しては、中枢神経においては明らかではないものの、末梢神経においては ALA により明らかな改善が認められ、TP 及び PEITC でも部分的な緩解を示

した。精巣精細管の病理組織所見として、AA 投与による精上皮細胞の脱落が認められ、その程度は、AA 群に比べ AA+ALA, AA+PEITC 群で明らかに弱く、脱落細胞の出現した精細管数の定量解析においても ALA 及び PEITC による効果が確認された。AA 投与により、精巣上体管内の細胞残屑も認められたが、その程度は、AA 単独群に比べ、AA+ALA, AA+TP, AA+DAS, AA+PEITC 群で明らかに弱かった。以上の結果から、AA による精巣障害に対しては、PEITC とともに ALA が部分的ではあるが最も強く抑制することが明らかとなった。

2) 抗酸化物質などによる毒性抑制機序の検討 中枢及び末梢神経に対し、抗酸化作用関連蛋白質の免疫染色を行った。CAT は、無処置動物あるいは AA 群で小脳のプルキンエ細胞と歯状核ニューロン、橋・延髄に存在するニューロンの細胞質に若干の陽性を示したが、ALA 投与により小脳、大脳皮質や三叉神経での発現増強が認められた。TP 投与でも小脳での陽性像の増強を認め、橋・延髄でも増強傾向を示した。DAS 投与では、三叉神経で増強を示し、橋・延髄でもその傾向を認めた。PEITC 投与では、大脳皮質、小脳、三叉神経での増強あるいは発現がみられ、橋・延髄でも同様の傾向を示した。GCS については、ニューロンの細胞質、アストロサイトの核と細胞質、オリゴデンドロサイトの細胞核に陽性を示し、無処置動物と比較して AA 群での明らかな違いは認められなかったが、ALA 投与により小脳プルキンエ細胞、歯状核での陽性像が増強した。他の併用群では染色性に明らかな変動を認めなかった。GPX は、AA 群で小脳歯状核、橋・延髄に分布するニューロンで強く陽性を示したが、抗酸化物質の投与により、AA+ALA 群における小脳歯状核を除き、陽性像が減弱した。NSGP はアストロサイトに陽性を示し、AA 群で、大脳皮質、海馬、小脳皮質類

粒細胞層に発現増強を示したが、抗酸化物質の併用による発現変動は殆どみられず、TP 投与により顆粒細胞層で増強を示したのみであった。その他の酸化ストレス関連蛋白質 (TRX, HO-1, Cu/Zn SOD, EC SOD, Mn SOD, iNOS) については、AA 投与による有意な変化はみられなかった。AA の精巣毒性に対する ALA あるいは PEITC による保護作用の機序を明らかにする目的で、肝臓と精巣での酸化ストレス関連蛋白質の発現量を解析した結果、HO-1 は肝臓、精巣で構成的に発現し、肝臓では AA+ALA 群で発現上昇、AA+DAS 群で発現低下を示したが、精巣において明らかな発現変動を示さなかった。Cu/Zn SOD, GCS は、肝臓、精巣とも、いずれの投与によっても強い発現変動を示さなかった。CAT は、肝臓、精巣において構成的な発現がみられたが、肝臓では群間の明らかな差はなく、精巣では、AA 投与により発現が低下したが、AA と被験物質を投与した各群に変動は認められなかった。TRX は肝臓において構成的な発現を示し、AA 投与により発現が低下したが、AA+TP, AA+DAS, AA+PEITC 群では発現が上昇した。CYP2E1 は肝臓で構成的な発現を示したが、精巣では検出限界以下であった。肝臓において、CYP2E1 の活性阻害剤である DAS と PEITC の単独投与により発現低下を示し、AA 投与でも発現減少を示した。AA 群に比し、AA+ALA, AA+TP 群で若干の増加を認め、AA+PEITC 群では強い減少を示した。

3) 抗酸化物質の併用効果・食物繊維の影響  
体重は、AA+ALA 群で 1 週目から、AA+PEITC 群で 2 週目から、AA+ALA+TP 群で 3 週目から、無処置群に比し有意な低値が認められ、最終週 (5 週目) では AA を投与した全群で低下した。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 3

週目より有意に低値を示した。病理組織学的には、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、PEITC あるいは TP の併用でも抑制したが、その程度は ALA に比し弱かった。ALA+PEITC, 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計測した結果、AA 投与により増加し、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 投与による精巣上体管の細胞残屑は、ALA や PEITC 併用、あるいは ALA+PEITC 併用による弱い抑制傾向がみられたのみであった。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。

AA 投与による gait score, 精巣重量, 坐骨神経の軸索変性, 三叉神経の神経節細胞の中心性色質融解, 精巣精細管の精上皮細胞の変性・脱落, 精巣上体管の細胞残屑, 坐骨神経の神経線維密度, 変性軸索数, 萎縮有髄線維数, 変性・脱落を示す精細管数, 小脳皮質分子層における SYP 異常構造の出現に対し、各食物繊維、クロロフィリンは明らかな影響を示さなかった。

## (5) AA の発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

### 1) AA の発がん性早期検出モデルの確立

DMBA-DHPN による検討では、生存率及び体重に AA 投与による有意な変化は認められなかった。触診による乳腺腫瘍の経時的観察において、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認められなかった。乳腺腫瘍の組織学的検索では、対照群の 19 例中 16 例 (84%) に  $5.1 \pm 4.4$  個/ラットの腺癌の発生がみられたが、その頻度及び数に対する AA 投与の影響は認められなかった。甲状腺ではいずれの群にも腫瘍を含む増殖性病変は認められなかった。MNU による検討では、途中死亡/切迫屠殺が AA の 0.004%群の 20 例中 4 例及び対照群の 20 例中 1 例にみられた。体重は、0.004%群において対照群と比し軽微な増加抑制傾向を示した。触診による乳腺腫瘍の観察では、AA の 0.004, 0.002%群及び対照群において各々 AA 投与開始 6, 8 及び 12 週後に腫瘍の発生がみられた。その発生頻度及び数は 0.004 及び 0.002%群において増加傾向を示し、体積については AA 投与による変化は認められなかった。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  $1.0 \pm 1.3$  個/ラットの腺癌の発生がみられ、0.004%群では 20 例中 16 例 (80%) と有意に発生頻度が増加し、発生数についても  $2.1 \pm 2.5$  個/ラットと増加傾向を示した。0.002%群では発生頻度及び数において各々 20 例中 13 例 (65%) 及び  $1.8 \pm 2.0$  個/ラットと増加傾向を示したが統計学的に有意な差ではなかった。甲状腺ではいずれの群にも腫瘍を含む増殖性病変は認められなかった。

### 2) AA の発がん性抑制物質の探索

実験 1：死亡率に関しては対照群で 20 例中 5 例、HTHQ 群で 2 例、TP 群で 3 例、PEITC 群で 4 例、クロロフィリン群で 1 例の途中死亡/

切迫屠殺がみられ、主な死因は乳腺腫瘍からの出血とそれに伴う貧血、一般状態の悪化であった。体重については、HTHQ 群で実験開始 5 週目以降有意な増加抑制が認められたことから 18 週目から投与濃度を 0.5 から 0.25%に変更した。その結果、回復傾向を示して 22 週目より統計学的有意差は消失した。最終体重は対照群と比べ TP 群で有意な増加を示した。摂餌量については TP 群で増加したが、他の群では明らかな変化はみられなかった。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 週目には有意な低値を示した。HTHQ 群についても 12-16 週目以降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。病理組織学的検索では、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認められ、その頻度に明らかな群間の差はみられなかった。発生数については対照群の  $1.5 \pm 1.3$  個/ラットに対し、TP 群では  $2.4 \pm 1.6$  個/ラットで有意な増加を示した。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。

実験 2：死亡率に関しては、16 週目に I3C 群の 1 例が乳腺腫瘍からの出血とそれに伴う高度貧血、一般状態の悪化により切迫屠殺された。対照群を含む他の群では切迫/死亡例はみられなかった。体重は、LA 及び DSF 群で実験開始 1 週目以降実験期間を通して、I3C 群で 4-15 週において対照群に比べ有意に低値を示した。体重増加抑制の状況から、DSF 群については 2 週目から投与濃度を 0.15 から 0.1%に、5 週目から更に 0.075%に、LA 群につ

いては5週目から0.15を0.1%に変更した。その結果、回復するまでには至らなかったものの体重差が更に広がることはなかった。最終体重においては対照群と比べLA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。GRA及びI3C群では有意な差はみられなかった。摂餌量については対照群に比べDSF群で低値傾向を示したが、他の群で明らかな差はみられなかった。触診による乳腺腫瘍の観察において、発生頻度及び数が対照群に比べLA、GRA及びI3C群で14あるいは15週目から低値傾向を示し始め、LA群では18週目以降の発生数、GRA群では15、20及び21週目の発生頻度及び19週目以降の発生数、I3C群では20週目以降の発生数が有意な低値を示した。DSF群では発生頻度は12週目以降、発生数は14週目以降から低値傾向を示し始め、発生頻度は14週目以降、発生数は15週目以降から有意な低値を示した。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、LA、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。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]

ガラス繊維濾紙モデルを用いた検討では、溶液フライ系でのAA生成率が、非水分オープ

ン系の10倍程度であったことから、加熱時における水分の影響が示唆された。また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が、溶液フライ系ではpHが高いほど生成率が高く、グルコースがアルカリ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ことが関与していると考えられた。前駆体としての還元糖について、グルコースとフルクトースを比較した結果に関しては、溶液フライ系において、グルコース添加量が一定量までAA生成率は増加するがその後は逆に減少し、フルクトースについては、添加量を増加させればそれに伴ってAAが増加することが分かった。このことよりAAの前駆体としての還元糖で重要なのはフルクトースであることが示唆された。遊離アミノ酸については、システインが溶液フライ系、非水分オープン系ともに顕著にAA生成を抑制するなどの結果が得られた。以上の結果及びこれまでの報告より、加工食品中のAA生成機序を推定したところ、主に2つ以上の生成経路があると考えた。即ち、1つはアスパラギンと還元糖が反応しグリコシドを経由しAAを生成する経路(経路1)、もう1つはグルタミン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ジカルボニル化合物(3-DG, 1-DG)を生成、またはフルクトースが単独でジカルボニル化合物に変化し、これらのジカルボニル化合物とアスパラギン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よりアスパラギンに対するAA生成率は高いと推測された。

ジャガイモスライス片モデルによる検討では、揚げ種中に水分が十分に残存し、スライス片の品温が100℃程度の段階では殆ど生成されないが、水分が少なくなりスライス片の品温が上昇するのに伴ってAAが生成され、褐変反応も進行した。従って、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、フライ終了時間が極めて重要であることが示された。また、フライしたサンプルを直ちに急冷することで、室温で放置した場合と比較して AA の生成抑制がみられたことから、フライ後の余熱を取り除くことは AA 低減に有効であることが示唆された。フライ前の前駆物質を除去するため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 の生成抑制効果の高まることが示されたが、処理水温度については  $60 \pm 5^\circ\text{C}$  で始まるとされるジャガイモデンプンの糊化の問題、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、味覚、食感などとのバランスを十分に考慮する必要がある。そこで、実際の加工工程に応用可能な方法の検討として、ジャガイモスライス片のフライ前の温水洗浄（ブランチング処理）と低温でのフライ加工とそれらの併用による抑制効果について比較検討した結果、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、それらの併用がより効果的であることが示されたが、ブランチング処理では AA の前駆体に限らず他の遊離アミノ酸など水溶性成分の減少も充分に考えられるなど味覚、物性、風味への影響も大きいと思われ、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より望ましいと思われる。以上の検討により、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。実際、これらの研究成果を踏まえてポテトチップス製造工程に応用され、初期調査値である平成 14 年度の AA 含有率を基準とし、原料ジャガイモの貯蔵後期において 50%、収穫直後では 20% 程度まで含有量が減少した。

## (2) AA の代謝と毒性抑制 [大野]

AA 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 GA 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、GA は共有結合によって DNA 付加体を形成する。今回、無処理ラットの遊離肝細胞に AA をインキュベートし、GA の生成することが確認された。また、アセトン水により CYP2E1 を誘導したラットの遊離肝細胞では、その生成速度が 3-4 倍と高い活性が認められた。この結果は、AA は CYP2E1 によりエポキシドである GA へ代謝されるという従来報告と一致した。ヒトの凍結肝細胞でも低い活性が認められたが、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が考えられた。AA によりラット肝細胞内の GSH 含量は、1-3mM という高濃度域では顕著に減少した。この濃度域は、AA がラット全身に一様に分布したと仮定した際、ラット急性毒性の経口 LD50 値の 124-251 mg/kg 体重に匹敵し、興味深い結果が得られた。また、この培地に N-アセチルシステイン及びメチオニンを添加することにより細胞内の GSH 含量の減少が顕著に抑制された。この抑制効果は添加後 1 時間より 2-4 時間が効果的であることから、これらが細胞内に取り込まれ GSH の合成原料として働き 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。これらの結果より、AA 単独投与では急性の肝細胞毒性の誘発される可能性は低いと考えられる。しかし、肝臓が局所的に高濃度の AA 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の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。一方、GA による肝細胞内 GSH 含量の減少速度は AA より速く、また細胞死も観察され、細胞毒性がより強く観察された。この細胞毒性も培地中への N-アセチルシステイン等を添加することにより顕著に抑制された。培地中 N-アセチルシステイン及びメチオニンは細胞内に取り込まれ cystathionine 回路等によりシステインから GSH 生成の原料として働いたものと考えられた。ラットにおける AA の代謝経路は主に GSH との抱合により生じるメルカプツール酸体であるが、一部はチトクローム P-450 により GA へ代謝された後、加水分解または GSH 抱合によるメルカプツール酸抱合体あるいは GA として尿中排泄される。今回のラット遊離肝細胞における AA の代謝クリアランスは、ラット尿中代謝物の割合と矛盾しない値であった。

ラットに AA を経口投与した際に、海馬アストロサイトの肥厚化が観察されたが、神経細胞の変性は認められなかった。先ずアストロサイトの機能障害が惹起され、次いで神経細胞が傷害される機序が考えられたが、*in vitro* でそれぞれの細胞に対する障害の度合いを観察することにより、神経細胞がより障害されやすいことが明らかとなった。*In vivo* で神経細胞の病変が観察されなかった理由として、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ること、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, *Toxicol. Lett.*, 112-113, 23-33, 2000; LoPachin et al., *Neuro Toxicology*, 25, 349-363, 2004)。従って、NeuN 抗体により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あり、神経終末や神経線維等のマーカーを使った組織学的な解析が必要と考えられる。

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ですが、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]

AA は TK6 細胞において用量依存的に遺伝子突然変異と小核を誘発したことから、*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  $800 \mu\text{g/ml}$  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。また、遺伝毒性試験は通常  $5000 \mu\text{g/ml}$  もしくは  $10\text{mM}$  の低い方を最高濃度にする事となっているが、この場合 AA については  $710 \mu\text{g/ml}$  ( $10\text{mM}$ ) となるが、この濃度までの突然変異、小核誘発率は低い。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。一方、AA の代謝物と考えられる GA も用量依存的に細胞毒性、遺伝子突然変異、小核の誘発を示した。また、その作用濃度、誘発率を考慮すると、その毒性は AA よりかなり高いことが推測される。TK6 細胞における突然変異頻度を 2 倍増加させる濃度は約  $55 \mu\text{g/ml}$  と計算され、 $800 \mu\text{g/ml}$  の AA の約 15 倍である。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が予想された。このことは、従来 AA がエームス陰性であるにもかかわらず、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。AA の示した変異スペクトルは、放射線によって引き起こされる突然変異のそれとよく似ていたことから、AA は放射線のように DNA の 2 本鎖切断を誘発するのかもしれない。DNA 2 本鎖切断による細胞死や修復には p53 遺伝子が関与しており、p53 の低レベルの発現は、その後を大きな DNA 損傷に有利に働くことが知られている (適応応答)。このことが証明されれば、低レベルの AA や他の弱い変異原物質の暴露が、その後の AA による遺伝毒性の誘発に対して抑制的に働くかもしれない。一方、GA によって引き起こされる突然変異の特徴は AA と全く異なるものであった。GA は LOH 型の割合は低く、大部分は非 LOH 型変異であった。変異スペクトルはアルキル化剤である EMS に類似しており、GA は主に点突然変異を誘発することを示している。エームス試験でも AA は陰性なのに対し、GA は陽性を示すことが報告されており、このことを支持するものである。コメット試験では、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、GA は DNA に直接付加体などを形成し突然変異を誘発することが考えられる。ヘミ型 LOH を引き起こす AA は染色体切断等を引き起し、コメット陽性になることが期待されたが、全く DNA 損傷性は示さなかった。小核や突然変異の誘発も大きくないことから、AA 自体の遺伝毒性としては DNA に直接影響を与えず突然変異を誘発することが考えられる。AA は CYP2E1 によりエポキシ環をもつ GA に変換され、強い遺伝毒性を示すことが予想される。しかし、AA は S9 存在下、マイクロゾーム存在下で試験してもそ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が、同じ CYP2E1 で代謝をうけるジメチルニトロサミン (DMN) の結果では顕著な毒性の増強がみられたことから S9 中の CYP2E1

の活性は十分であると考えられた。AA と GA の *in vivo* の遺伝毒性に関しては最近、NCTR の Manjanatha らが 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)。10, 50ppm の飲水で 50 日間投与し、4 週間後の肝臓での突然変異は、両化合物とも有意に上昇し、むしろ AA でその誘発率は高かった。このことは、AA は *in vivo* で代謝を受け、毒性が増強されることを示している。このように *in vivo* と *in vitro* 試験での矛盾点の理由は明らかではないが、代謝様式やその速度に関係しているのかもしれない。S9 を用いた試験では長時間の処理が困難であるため、CYP2E1 を高発現する遺伝子導入細胞を用いて AA に対する感受性を比較した。これら細胞は、同じ CYP2E1 で代謝をうける DMN に対しては顕著な毒性の増強がみられたが、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、AA の遺伝毒性を、SCE を指標にして評価している。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があるのかもしれない。その経路の解明が、新しい解毒方法の確立に重要であるのかもしれない。AA がげっ歯類で発がん性を示すことが指摘されていることから、できるだけ食物中からの AA 摂取、吸収を減少させる方策が検討されている。食物繊維は消化管運動を活発化させたり、食物成分の消化吸収

を低下させたりすることから、毒物の排泄を促進させ効果が期待できる。また、胆汁酸などを始め、無機質やビタミンを吸着させ排出させる能力を有する。このような吸着、不活化作用の *in vitro* での報告はない。もしその作用が確認できれば、*in vivo* での効能試験のスクリーニングとして有用と考えられる。本研究で、ヒト *in vitro* 試験系において、AA による細胞毒性、遺伝毒性を効率的に検出できることがわかった。本試験系を用いて 6 種類の水溶性、非水溶性食物繊維について検討を行ったが、全てにおいて抑制効果はみられなかった。ほとんどが難溶性であるため、試験可能な最大濃度での試験であること、処理条件が比較的短時間の 1 条件であることなどから、この試験だけで効果を全く否定することはできないが、その可能性は極めて低いものと考えられる。

#### (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、抗酸化物質の検索により、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。精巣毒性に関しては、ALAとPEITCで明確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、計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新たに見出された。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、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クロロフィリン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

及び精巣障害を抑制できなかったことから、消化管内での食物繊維などによるAA吸収阻害作用は、今回の実験条件下では生じていないと判断された。AA誘発神経障害および精巣障害に対する各種抗酸化物質の複合抑制効果の検討では強い増強作用が期待されたが、中枢及び末梢神経においては、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。一方、中枢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、用いた各抗酸化物質による抑制作用に関してカタラーゼによる $H_2O_2$ 消去系の活性化、更にALAによる抑制にはGCS発現増加による内因性GSH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が見出せなかったことについては、抑制作用には、カタラーゼによる $H_2O_2$ 消去系の活性化よりも、内因性GSH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、ALAに関しては、PEITCはCYP2E1の阻害による毒性の強いGA生成抑制による精上皮細胞障害の抑制、ALAについては内因性GSH生成促進による保護作用の増加が考えられ、この違いが相加的に作用したと考えられた。

#### (5) AA の発がん性抑制に関する実験的研究 [今井]

AA の発がん性に対する具体的な抑制物質の探索に先立ち、AA のラットにおける発がん標的臓器である乳腺及び甲状腺に対し、その発がん性を比較的短期間で検出できるモデルの確立を試みた。まず、SD 系雌ラットに DMBA 及び DHPN による処置を行った後、AA を 0.004 及び 0.002%濃度で 22 週間飲水投与したが、乳腺に対する発がん促進作用は認められなかった。また、甲状腺においては、対照群を含むいずれの群でも増殖性病変は認められな

かった。次に、MNU による処置を行った後、AA を 0.004 及び 0.002%濃度で 30 週間飲水投与した。その結果、0.004%投与により乳癌の発生頻度の有意な増加が認められ、発生数については、統計学的有意差はなかったものの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。従って、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場合、SD 系雌ラットに MNU 投与後、AA を 0.004%濃度で飲水投与する乳腺早期発がんモデルが適していると考えられた。今回実施した AA の発がん性早期検出モデルの作製においては、乳腺あるいは甲状腺に対して標的性を示す化学発癌物質によりラットを処置した後、食品中に含まれる AA を投与した際の発がん促進作用を検討した。文献的には、今回の検討と同様に化学発癌物質による処置後、加熱した魚肉食品中に最も多く含まれる変異原/発がん物質であるヘテロサイクリックアミン (HCA) をラットに投与した際の発がん促進作用について種々の報告がみられる。肝発癌物質である DEN による処置後、HCA の一つである 2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) を混餌投与した際に肝前癌病変である glutathione S-transferase placental form 陽性細胞巢の数及び面積が著明に増加 (Fujita et al., 2002)、大腸発癌物質である DMH による処置後、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) を混餌投与した際に大腸腫瘍の発生数が著明に増加する (Hirose et al., 1999) などの報告がみられる。一方、前投与する発癌物質の種類、あるいは標的臓器により HCA による発がん促進作用が異なることも報告されている (Imaida, et al., 2001; Shirai, et al., 2002)。今回検討した実験デザインにおいて、DMBA と MNU による前処置に