

図 9 反応溶液中のAAm生成率

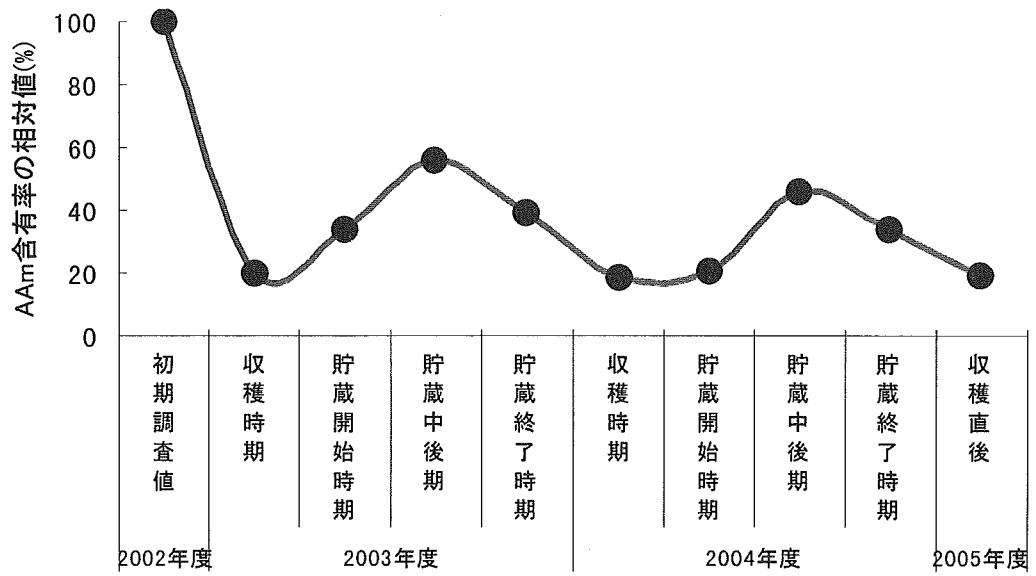


図 10 ポテトチップス中のAAm含有率の経年変化

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）  
分担（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  
「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

遊離肝細胞におけるアクリルアミド代謝物の分析法を確立し、ラット肝細胞でアクリルアミドの主代謝物と思われるエポキシド体(グリシダミド)の生成量を HPLC 法で測定した。そのグリシダミド生成速度は、アセトン水で誘導したラット肝細胞で数倍高いことから、CYP2E1 による代謝と考えられた。肝細胞はアクリルアミド処置により細胞内毒性防御物質である還元型グルタチオン(GSH)量が減少した。また、グリシダミド処理ではGSH量がより顕著に減少し細胞死も観察された。これらの細胞毒性は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。アクリルアミドからグリシダミドの生成速度、またそれぞれによる細胞内 GSH との反応速度の比は文献によるアクリルアミド尿中代謝物の割合と矛盾しない値が得られた。

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  $H_2C=CHCONH_2$ ）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) へ一部が代謝されるが、いずれもグルタチオン抱合体に代謝されてからメルカプツール酸抱合体となって尿中排泄される (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る。

今回、アクリルアミドの代謝活性体とも考えられる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)量との関係を検討し、更にN-アセチルシステイン、メチオニン、アスコルビン酸およびGSH等の毒性抑制効果を検討した。  
(参照文献)

IARC. (1994). Acrylamide. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Humans: Some Industrial Chemicals; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 60, 389-433.

IPCS. (1985) Environmental Health Criteria 49, Acrylamide. WHO, Geneva, Switzerland.

## B. 研究方法

ラットの遊離肝細胞は未処理、または0.1%アセトン水を5日間投与した雄性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。

遊離肝細胞培養溶液 ( $10^6$  cell/ml) ではアクリルアミド又はグリシダミド 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1 あるいは 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 1 mL 採取し、遠沈後、上清画分は代謝物を HPLC で測定し、細胞画分からはグルタチオン (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 25  $\mu$ L 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。また、細胞培養溶液中へ N-アセチルシステイン、メチオニン、アスコルビン酸および GSH を添加してその影響を観察した。

## C. 研究結果

アクリルアミドおよびグリシダミドの標品を用い HPLC (UV 検出器) での分析を検討した結果、溶出溶媒を 10% MeOH, 0.5 ml/min とし、プレカラムとして GF-310 4B ( $\phi$  4.6 mm x 50 mm) および本カラムとして Hypercarb ( $\phi$  4.6 mm x 100 mm) を用いて分析することとした (Fig. 2)。それらの保持時間

r. t. (retention time) はグリシダミドが 6.5 分、アクリルアミドが 8.8 分に溶出した。その測定感度はグリシダミドがアクリルアミドより 1/10 以下と低いことが判明した。

アクリルアミドをラット遊離肝細胞系で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た (Fig. 3)。一方、アセトン水を 5 日間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速度が 3-4 倍と高い活性が確認された。

このラット遊離肝細胞におけるアクリルアミドの代謝実験からミカエリス定数 Km および Vmax を求め、そこから計算した代謝クリアランス (CL) は、アセトンで誘導したラット肝細胞で未処理ラットの 7 倍であった (Table 1)。

また、アクリルアミドでは、LDH法による細胞死は認められなかったが、細胞内の GSH 含量は高濃度域 (1 mM 以上) で有意に減少した (Fig. 4A)。

この時培地中への N-アセチルシステイン およ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が、アスコルビン酸や GSH 添加による影響は少なかった (Fig. 5)。

一方、グリシダミド高濃度域 (0.3 mM 以上) でも GSH 含量の減少が顕著に観察された (Fig. 4B)。この場合も培地中へ N-アセチルシステイン およびメチオニンを添加することにより細胞内 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 (Fig. 6A)。

このアクリルアミドやグリシダミドによる

細胞内GSHの減少は、共にグルタチオントランスフェラーゼ (GST) による反応と考え、ミカエリス定数 $K_m$ および $V_{max}$ を求め、代謝クリアランス ( $V_m/K_m$ ) を計算した (Fig.4 & Table 2)。この細胞内GSHのアクリルアミドによる減少速度は未処理およびアセトン誘導したラット肝細胞間で差はなかったが、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く反応した。

一方、LDH法による細胞死の変動を観測した。未処理ラット遊離肝細胞でインキュベーションによる生細胞の減少は、グリシダミド1mM濃度以下では細胞死は認められなかったが、グリシダミド最高濃度(3mM)時は4および6時間後にコントロールや他群と有意の細胞死が観察され、グリシダミドによる影響が見られた (Fig.6B)。この時培地中へのN-アセチルシステインおよび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、アスコルビン酸やGSH添加による影響は少なかった。

#### 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。

今回未処理ラットの遊離肝細胞を用いてアクリルアミドとインキュベートし、グリシダミドの生成が確認され、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3-4倍と高い活性が認められた。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。

ヒトの凍結保存した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。更に、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、興味深い結果が得られた。また、この培地にN-アセチルシステインおよ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、グリシダミドによる肝細胞内GSH含量の減少速度はアクリルアミドより速く (Fig. 4A & B)、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ている (Fig. 6A & B)。培地中N-アセチルシステインおよ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。

ラットにおけるアクリルアミドの代謝経路は主に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 によりグリシダミドへ代謝された後に、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グリセルアミド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アクリルアミド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 (Table 3)。

#### 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が認められ、細胞内GSHの原料として働いた可能性が示唆された。

凍結ヒト肝細胞ではアクリルアミドからグリシダミドへの代謝活性は非常に弱かったが、凍結や有機溶媒の影響で活性が減少し、CYP2E1 による代謝であることが支持された。一方、肝臓のCYP2E1はアルコール摂取でも上昇すると言われており、そのようなヒトではアクリルアミドからグリシダミドへの代謝活性が高いことが予測された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表 (2002年度)

未

#### 2. 学会発表

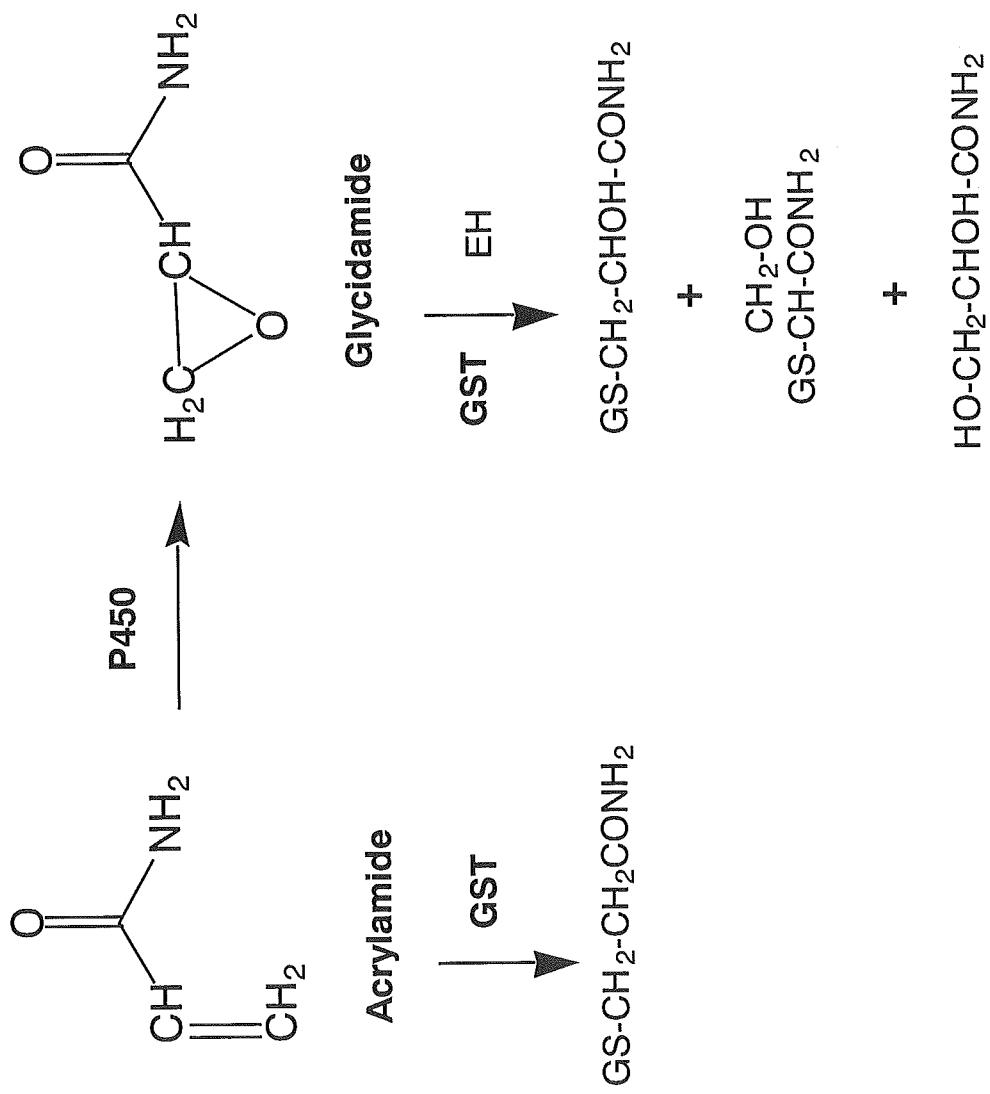
日本薬学会第125年会 (2005.3.30)  
アクリルアミドのラット肝細胞における代謝と毒性: 紅林秀雄, 大野泰雄

日本薬学会第126年会 (2006.3.29)  
アクリルアミドおよびグリシダミドのラット肝細胞毒性: 紅林秀雄, 大野泰雄

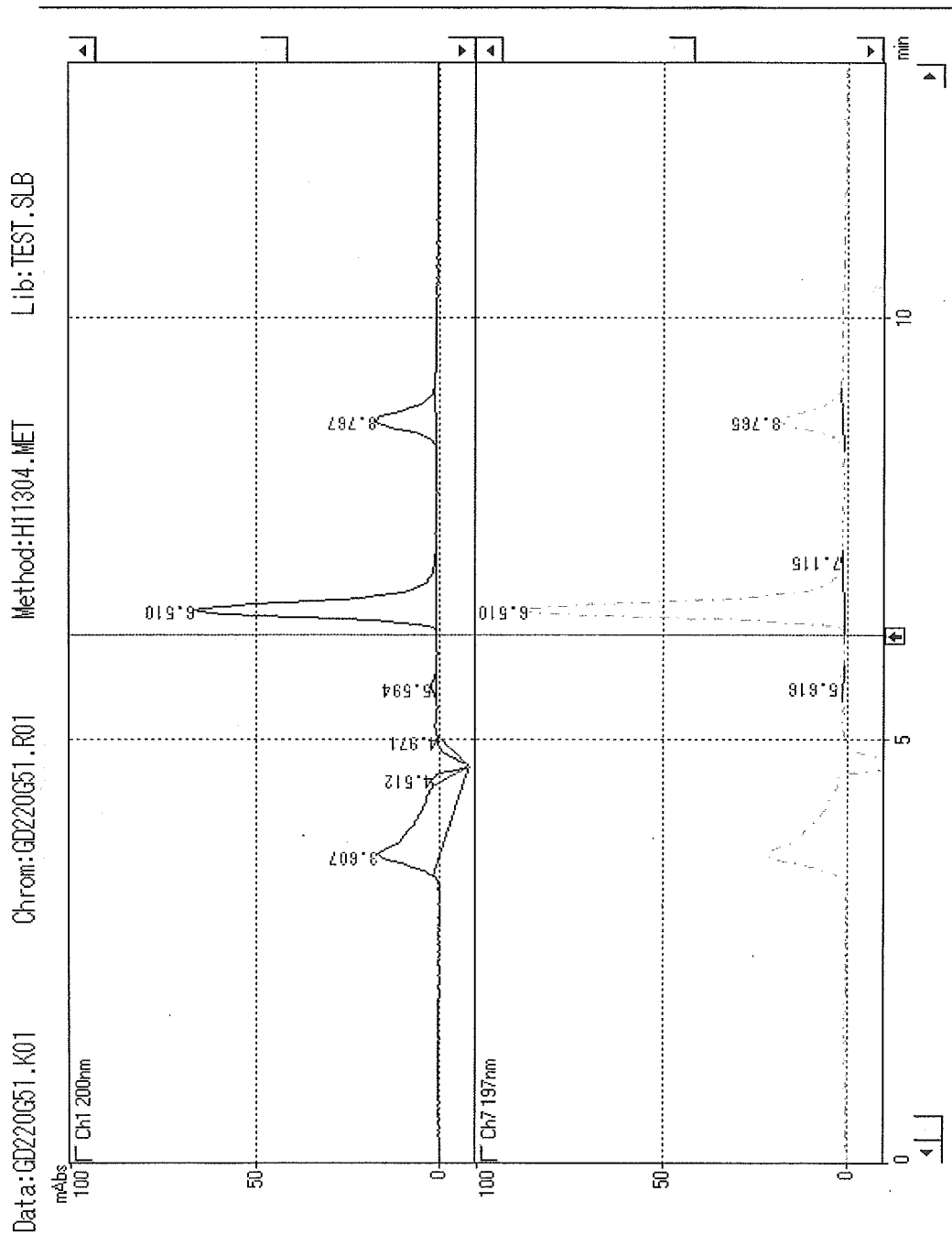
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig.1 Metabolism of acrylamide



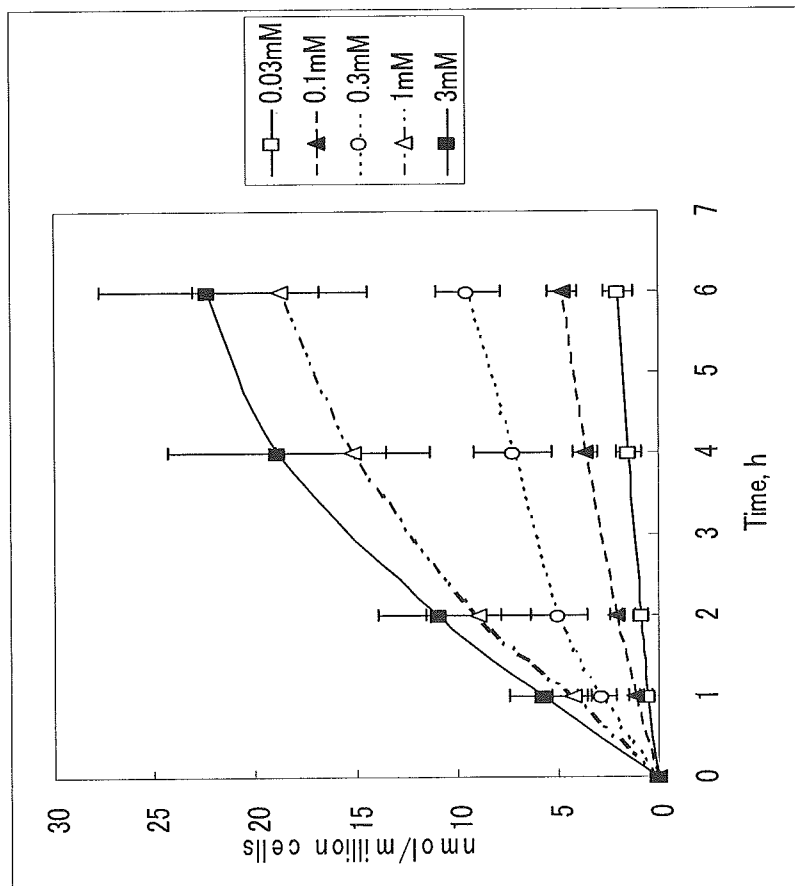
**Fig.2. Separation of glycidamide (r.t.=6.5 min) and acrylamide (r.t.=8.8 min) at HPLC (columns;GF-310 4B & Hypercarb).**



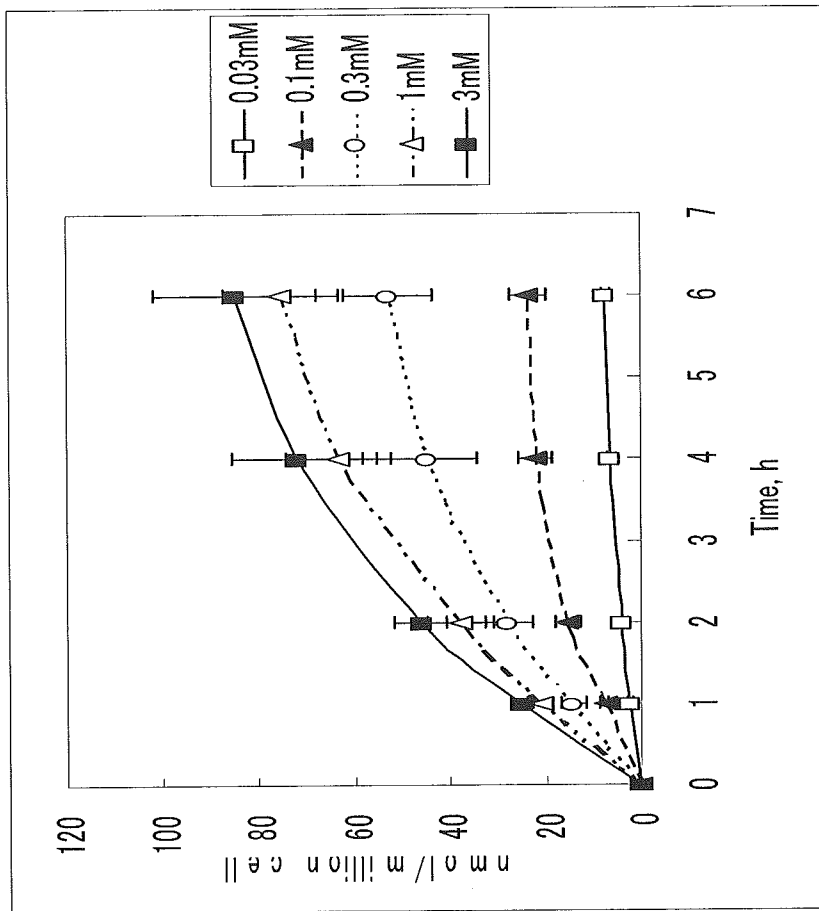


**Fig. 3. Formation of glycidamide from acrylamide in the hepatocytes isolated from untreated rats (A) and acetone-treated rats (B). The hepatocytes were incubated with different concentrations of AA through 6h. The values represent the mean  $\pm$  S.D. of four rats. Open squares, 0.03 mM AA; closed triangles, 0.1 mM AA; open circles, 0.3 mM AA; open triangles, 1 mM AA; closed squares, 3 mM AA.**

(A)

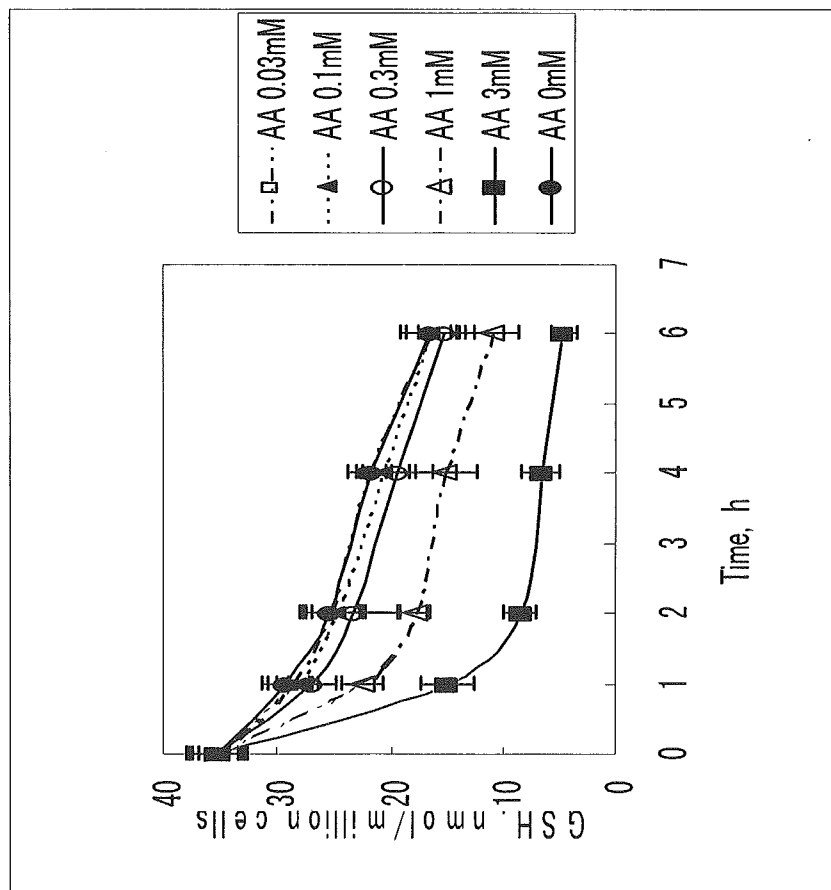


(B)

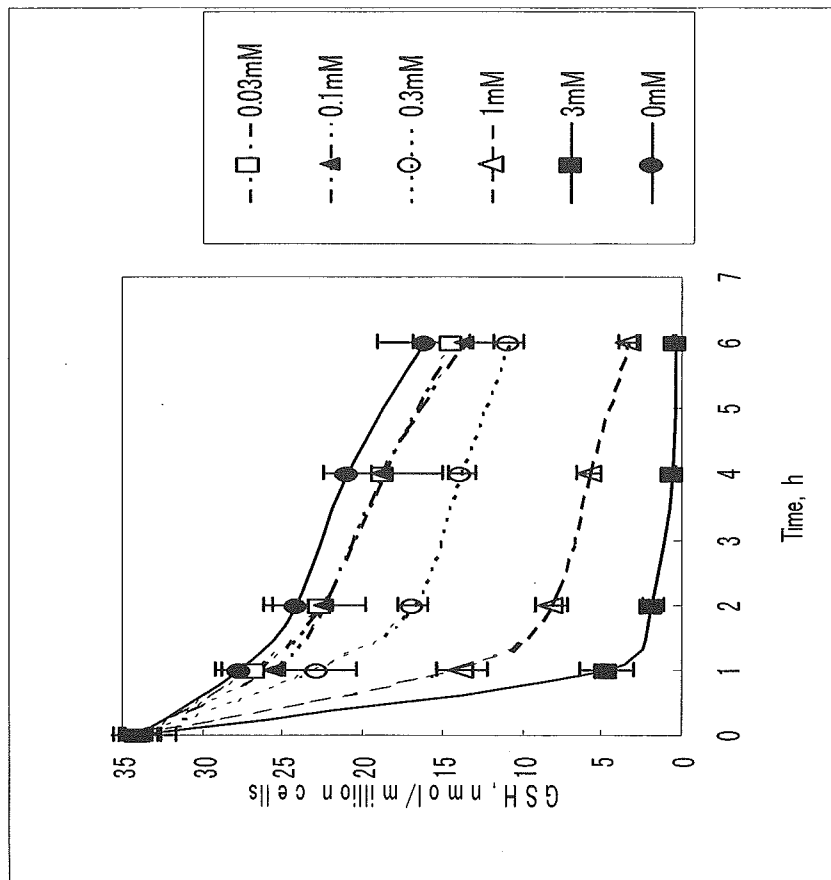


**Fig. 4. Decrease of GSH in the isolated hepatocytes incubated with acrylamide (A) and glycidamide (B) for 6h. The values represent the mean  $\pm$  S.D. of four rats. Open squares, 0.03 mM; closed triangles, 0.1 mM; open circles, 0.3 mM; open triangles, 1 mM; closed squares, 3 mM; closed circles, 0 mM.**

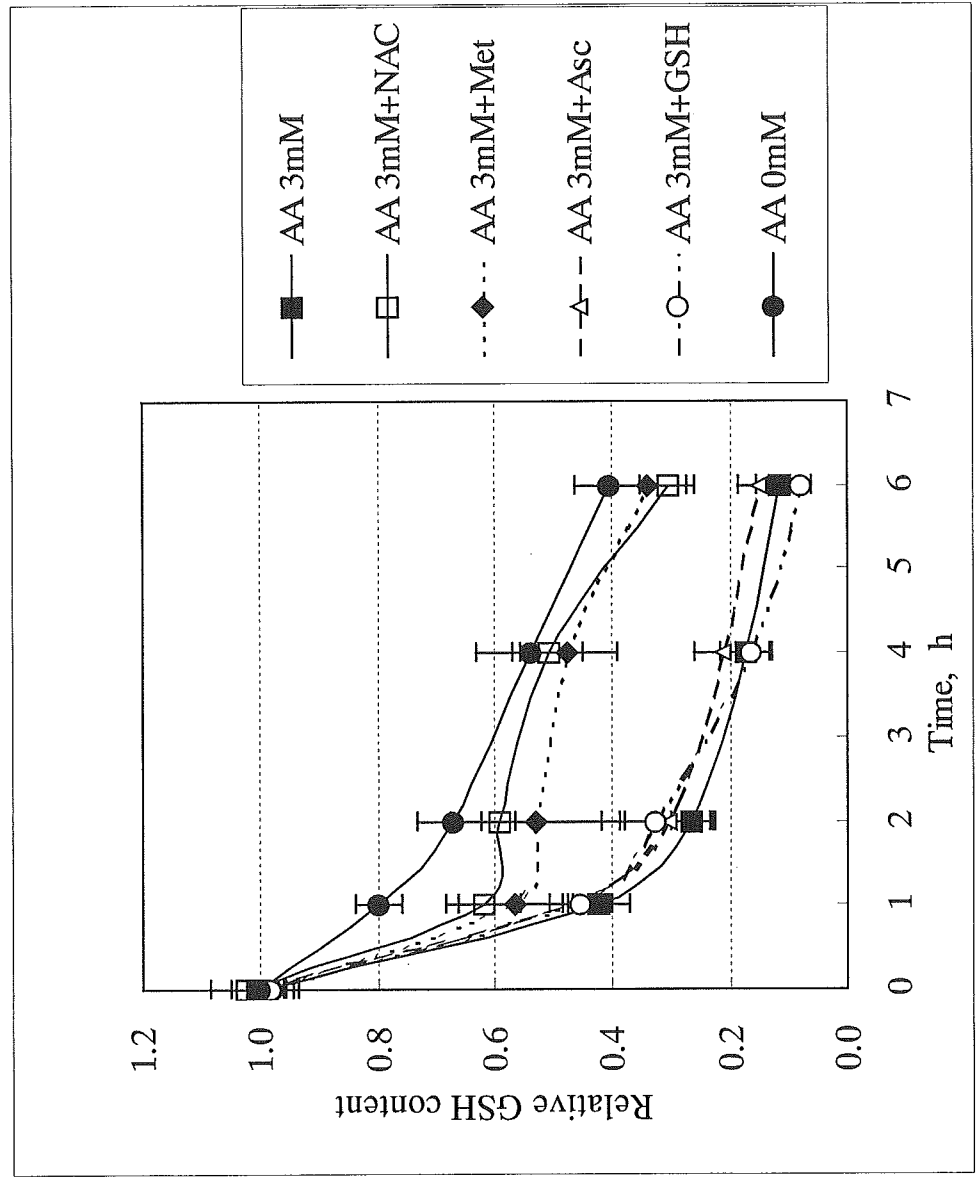
(A)



(B)

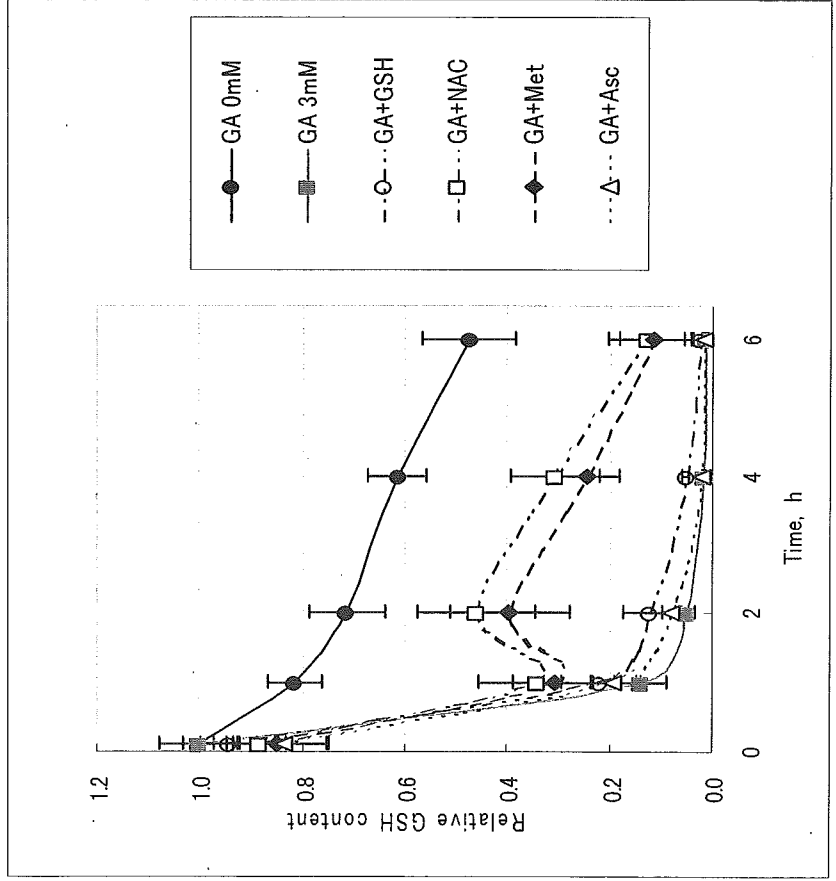


**Fig. 5. Effects of N-acetylcysteine, methionine, ascorbic acid and GSH on decrease of glutathione content of the hepatocytes incubated with 3mM acrylamide (AA). The values represent mean  $\pm$  SD of three rats. Closed squares, 3 mM AA; open squares, 3 mM AA plus 0.5 mM N-acetylcysteine; closed diamonds, 3 mM AA plus 0.5 mM methionine; triangles, 3 mM AA plus 0.5 mM ascorbic acid; open circles, 3 mM AA plus 0.5 mM GSH; closed circles, 0 mM AA.**

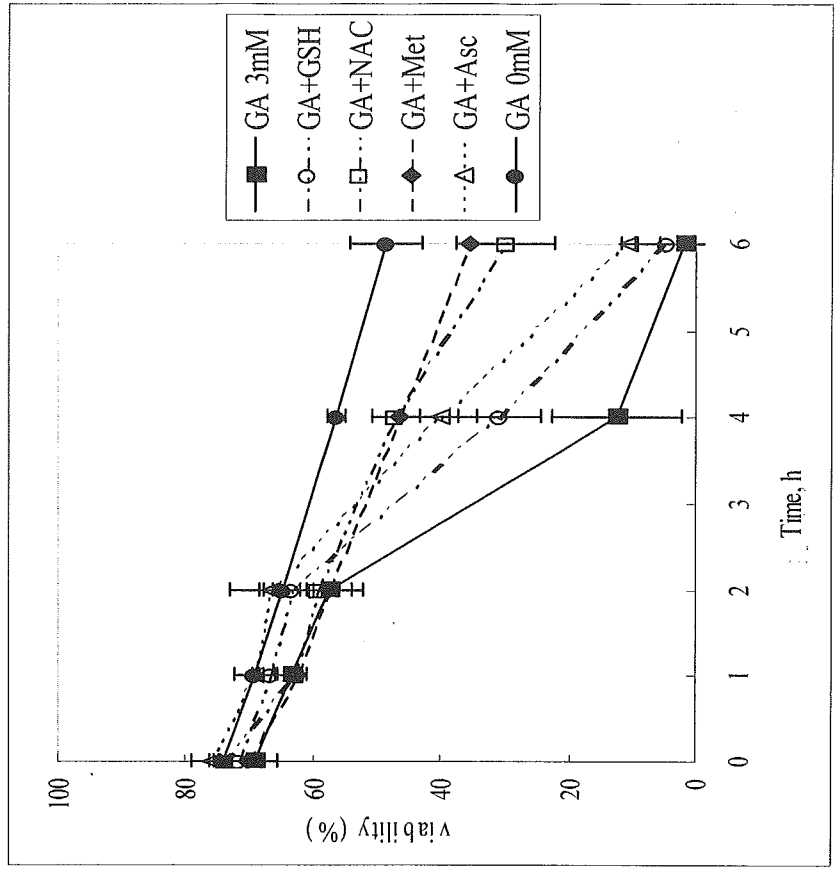


**Fig.6. Effects of 0.5 mM N-acetylcysteine, methionine, ascorbic acid and GSH on decrease of cellular glutathione content (A) and cell viability (B) of the freshly isolated rat hepatocytes incubated with glycidamide (3mM).**

(A)



(B)



**Table 1. Kinetic parameters of metabolism of acrylamide to glycidamide in the freshly isolated rat hepatocytes**

parameters	hepatocytes		ratio
	control	acetone-induced	
$V_{\max}$ (nmol/h/ $10^6$ cells)	$6.5 \pm 2.1$	$26.4 \pm 3.0$	4.1
$K_m$ (mM)	$0.477 \pm 0.100$	$0.263 \pm 0.016$	0.55
$CL_{int}$ (ml/h/ $10^6$ cells)	$13.9 \pm 4.8$	$100 \pm 12$	7.2

Mean  $\pm$  SD of 4 rats

Table 2. Parameters of conjugation reaction of GSH with acrylamide or glycidamide by GST in the isolated rat hepatocytes

parameters	Acrylamide		Glycidamide	
	control	hepatocytes	hepatocytes	control
Vmax (nmol/h/10 <sup>6</sup> cells)	21.2 ± 2.1	20.2 ± 3.0	33.0 ± 3.2	
Km (mM)	1.44 ± 0.20	1.15 ± 0.26	1.48 ± 0.21	
Vmax/Km (ml/h/10 <sup>6</sup> cells)	14.7 ± 0.6	17.7 ± 1.6	22.6 ± 4.1	

Mean ± SD of 3 rats

**Table 3. Estimated toxicokinetic parameters of metabolim of acrylamide and glycidamide by P450 and GST in rats**

parameters	P450				GST			
	Acrylamide to Glycidamide		Acrylamide + GSH		Acrylamide + GSH		Glycidamide + GSH	
	control	acetone-induced	control	acetone-induced	control	acetone-induced	control	acetone-induced
	rats	rats	rats	rats	rats	rats	rats	rats
$V_{\max}$ (mg/h/kg)	2.5	10	8.3	7.9				13
$K_m$ (mg/L)	34	19	103	82				105
$CL_H$ (ml/h/kg)	75	554	81	97				123

$CL_H$ : hepatic clearance

Parameters were estimated from Table 1 and 2.

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)  
分担(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

「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及びグリア細胞(アストロサイト)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、各種薬物の保護作用を検討した。アクリルアミド及びグリシダミド共に高濃度(1 mM 以上)で、神経細胞及びアストロサイトの cell viability を低下させたが、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、また神経細胞のほうがアストロサイトよりも強く障害された。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、 $\alpha$ リポ酸及びビタミンC等の抗酸化作用を呈する薬物の前処置が有効であった。また、短期のシナプス伝達に及ぼすアクリルアミド及びグリシダミドの作用を検討したところ、やはり両薬物とも高濃度でシナプス伝達阻害作用を呈したが、阻害作用はグリシダミドでより顕著であった。シナプス伝達阻害作用は、特に神経終末に対する作用が強いことが示唆された。

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及びグリア細胞(アストロサイト)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、測定キットを用いた。シナプス伝達に対する作用:既報(Koizumi et al., PNAS, 2003)により海馬神経細胞で惹起される  $Ca^{2+}$ 振動を指標として、シナプス伝達に対する作用を評価した。細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度測定は、fura2 法を用いた。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

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。アストロサイトに顕著な病変が観察されたこと、またアストロサイトが脳機能に果たす重要性が多く報告されるようになったことから、先ず培養アストロサイトに対するアクリルアミド及びグリシダミドの作用を検討し、神経細胞に対するそれと比較検討を行った。

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。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。しかし、アストロサイト及び神経細胞の cell viability 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。

MTTアッセイ法を用い、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。両薬物とも、添加後24時間後から神経細胞の cell viability 低下を引き起こし、これは48時間後にはさらに顕著であった。グリシダミドの毒性が約 3 倍程度強く、その LD50 値(海馬神経細胞の cell



viabilityを50%低下させる濃度)は、グリシダミド0.87 mMに対しアクリルアミド2.5 mMであった。

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 低下の細胞内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。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 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可能性が示唆された。また、カスパーゼ阻害剤が全く効果を呈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小さいと考えられる。

抗酸化物質である、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。N-アセチルシステインは100-1000  $\mu$ Mの比較的高濃度で、アクリルアミドの細胞毒性を統計学的に抑制したが、グリシダミド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、細胞にあらかじめ前処置するのではなく、アクリルアミドと同時に添加しても、強い細胞保護作用を示した。 $\alpha$ リポ酸は10及び100  $\mu$ Mでアクリルアミドの細胞毒性を抑制した。しかし、グリシダミドに対しては有効ではなかった。また、 $\alpha$ リポ酸はあらかじめ細胞に前処置(24時間)すると、その作用が非常に効果が強くなることが明らかとなった。ビタミンCは10-300  $\mu$ Mの濃度でアクリルアミド及びグリシダミドの細胞毒性を軽減させた。これら3種の抗酸化物質にアクリルアミド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 cell viability 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  $Ca^{2+}$  振動を指標として、シナプス伝達に対するアクリルアミド及びグリシダミドの作用を検討した。アクリルアミド及びグリシダミドは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。両薬物を投与すると、直後数分は、 $Ca^{2+}$  振動の振幅及び頻度に全く変化は認められないが、60分後には著名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、アクリルアミド及びグリシダミド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る。

## D 考察

*In vivo*でアクリルアミド(10 mg/kg)を経口投与した際に、先ず海馬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。先ずアストロサイトの機能障害が惹起されて、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。

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, 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られる。

アクリルアミドの毒性は、主に肝臓の薬物代謝酵素 CYP2E1 による代謝産物グリシダミドによって引き起こされると考えられている。しかし、本研究結果では、アクリルアミド自身も神経細胞の cell viability を低下させ、またシナプス伝達を阻害した。しかしその作用はグリシダミドよりも弱かった(約1/3)。CYP2E1 は脳内にも存在し、最近の報告では酸化ストレス等に曝された際にその活性は上昇する(J Leukocyte Biology, 78, 1223-1232, 2005)。従って、本研究で観察されたアクリルアミドの神経毒性が、脳内 CYP2E1 により代謝されたグリシダミドによって引き起こされた可能性も完全には否定出来ない。しかし、肝臓に比較するとその発現レベルが極端に低いこと、アクリルアミドのシナプス伝達阻害作用は曝露後60分といった比較的早い時間から観察されること等を考えると、アクリルアミド自身が神経細胞に作用してシナプス伝達阻害及び cell viability の低下を引き起こしたものと推測される。

抗酸化作用を有する物質がアクリルアミド及びグリシダミドによる神経細胞の cell viability 低下を抑制した。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、アクリルアミド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無しでも認められたことは、一部には本薬物が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、アクリルアミドの毒性には比較的效果を示したが、グリシダミドにより惹起される cell viability 低下には顕著な効果を示さなかった。これには、(1)アクリルアミド及びグリシダミドの毒性発現機序が異なる、(2)グリシダミド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、現在のところ詳細は不明である。ビタミンCがアクリルアミド及びグリシダミド両者の毒性を抑制したことを考慮すると、単に(2)だけでは説明ができない可能もある。

食品から摂取するアクリルアミド及びグリシダミドが、本実験のように中枢神経系で mM オーダーに達することは考えにくい。本 *in vitro* 実験系では 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、cell viability を10-20%改善する程度であった。しかし使用したアクリルアミドがこのように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。中枢神経系が食品由来のアクリルアミド及びグリシダミドにより低濃度でより長期間に渡って曝露された際の神経細胞障害に対しても、抗酸化物質の摂取が有効であるか否かは今後の検討課題である。

## 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* で中枢神経毒性を示した。神経細胞及びグリア細胞(アストロサイト)は、共に障害を受けるが、神経細胞のそれがより顕著であった。また神経細胞に対する毒性発現の強さは、グリシダミドがアクリルアミドの約3倍程度強力であった。アクリルアミド及びグリシダミドの細胞毒性発現には、p38MAPK キナーゼを介した経路が、関与していた。また、神経細胞は先ず神経終末で引き起こされること、これらの障害は抗酸化物質により軽減でき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<sub>4</sub>. *J. Pharmacol. Sci.*, 94, 112-114.
3. Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M. and Inoue, K. (2004) Ca<sup>2+</sup> waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons; involvement of extracellular ATP and activation of P2Y<sub>2</sub> 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 P2Y<sub>1</sub> receptors. (2005) *Glia*, 49, 288-300.
5. Inoue, K., Denda, M., Tozaki, H., Fujishita, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 124, 756-763.
6. Narita, M., Miyatake, M., Shibasaki, M., Tsuda, M., Koizumi, S., Narita,

M., Yajima, Y., Inoue, K. and Suzuki, T. (2005) Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. *J. Neurochem.*, 93, 1383-1392.

7. Nasu-tada, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) The involvement of  $\alpha$ 1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA. *Glia*, 52, 98-107.
8. Fujishita, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2006) Upregulation by retinoic acid of P2Y<sub>2</sub> receptors in normal human epidermal keratinocytes. *Purinergic Signaling*, in press.
9. Nasu-Tada, K. \*, Koizumi, S. \*, Tsuda, M. \*, Kunifusa, E. and Inoue, K. (2006) Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X<sub>4</sub>, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia*, in press. (\*equal contribution)
10. 小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀 (2006) ATP を介した皮膚ケラチノサイト間情報連絡と痛み、Pain Research、印刷中

### 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 P2Y<sub>2</sub> 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/P2Y<sub>1</sub> 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、 $\beta$ 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P2Y<sub>12</sub>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 P2Y<sub>2</sub> 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: P2Y<sub>6</sub> 受容体活性化によるミクログリア細胞のフェノサイトーシス脳の増大: 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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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 P2Y<sub>1</sub> 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 β1 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
24. Koizumi, S. and Inoue, K. Dynamic astrocyte-to-neuron communication mediated by astrocytic ATP in hippocampal cultures. Euroglia Meeting, 17-21 May 2005, Amsterdam, Holland.
25. 小泉修一、大野泰雄、井上和秀、アストロサイトによるシナプス伝達制御(シンポジウム)、日本薬理学会関東支部会、2005年6月18日、東京
26. Koizumi, S. Astrocytes function as an interface of neurovascular system (Symposium), 26-28, July, Neuro2005, Tokyo
27. Koizumi, S. Fujishita, K. Inoue, K. Tsuda, M. and Inoue, K. ATPを介した表皮ケラチノサイト間情報連絡と痛み(シンポジウム)、第27回日本疼痛学会、7月26-27日、宇都宮
28. Koizumi, S., Fujishita, K. and Inoue, K. Glia-to-vascular communication mediated by extracellular ATP (Symposium). 第48回日本神経化学会、28-30 Oct, Fukuoka
29. Koizumi, S., Tsuda, M. and Inoue, K. Mechanical allodynia induced by P2Y2 receptor activation. Society for Neuroscience, Washington DC, 12-16 Nov, 2005
30. Tsuda, M. Kunifusa, E., Nasu-Tada, K., Hasegawa, S., Koizumi, S. and Inoue, K. Fibronectin increases expression of P2X<sub>4</sub> receptors in microglia. Society for Neuroscience, Washington DC, 12-16 Nov, 2005.
31. 小泉修一、藤下加代子、末石浩二、高田英友子、片岡泰文、ATP受容体を介するアストロサイト-ペリサイト系による毛細血管制御(シンポジウム)、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
32. 津田誠、國房恵巳子、多田薫、小泉修一、井上和秀、フィブロネクチンはミクログリアにおけるP2X4受容体の発現を増強する、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
33. 藤下加代子、末石浩二、片岡泰文、井上和秀、小泉修一、血管周細胞ペリサイトに発現するP2受容体の生理的役割、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
34. 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀、アストロサイトにおけるP2Y1受容体活性化を介した酸化ストレス誘導細胞死シグナリングに対する拮抗作用、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
35. 多田薫、斎藤秀俊、井上和秀、小泉修一、アストロサイトの

pinocytosisにおけるP2Y6受容体の関わり、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜

36. 大久保聡子、多田薫、斉藤秀俊、小泉修一、ラットアストロサイトにおけるリポポリサッカライドによるP2受容体の変化、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜
37. 戸崎秀俊、津田誠、小泉修一、井上和秀、レチノイン酸による初代培養ミクログリアのP2X4受容体発現増強、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜

#### H. 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