

小坂俊仁, 芳野純治, 乾和郎, 若林貴夫, 奥嶋一武, 小林隆, 三好広尚, 渡邊真也, 服部昌志, 林繁和, 白石泰三, 山本隆行, <u>渡邊昌俊</u> , 中澤三郎.	潰瘍性大腸炎とDNAメチル化との関連 -one-carbon metabolism関連遺伝子多型を中心に-	消化器医学	7	74-80	2009
Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., <u>Masuda, S.</u> , Kinae, N. and Honma, M.	Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems.	Environ. Mol. Mutagen. (in press)			2010
Kawai K, Li YS, Song MF, <u>Kasai H.</u>	DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications.	Bioorg Med Chem Lett	20	260-265	2010
Hori A, Mizoue T, <u>Kasai H</u> , Kawai K, Matsushita Y, Nanri A, Sato M, Ohta M.	Body iron store as a predictor of oxidative DNA damage in healthy men and women.	Cancer Sci	101	517-522	2010
Yoneda M., Hirokawa Y.S., Ohashi A., Uchida K., Kami D., <u>Watanabe M.</u> , Yokoi T., Shiraishi T., Wakusawa S.	RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145.	Experimental and Molecular Pathology	88	90-95	2010

研究成果の刊行物・別刷

食品中の 化学物質と安全性

- 食品の安全性についての考え方
 - 汚染化学物質の毒性
 - 食品添加物
 - 新開発食品の安全性
- 企業の対応
- 食品安全行政の考え方

執筆者名簿

編者

米谷 民雄 静岡県立大学 食品栄養科学部客員教授
社団法人 日本食品衛生学会 会長
前・国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

執筆者

加地 祥文 厚生労働省医薬食品局食品安全部 監視安全課長
菅野 純 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毒性部長
木苗 直秀 静岡県立大学 学長
古賀 秀徳 カルビー株式会社 R&D グループ R&DDE センター
基礎研究チームリーダー
杉山 英男 国立保健医療科学院 生活環境部環境物理室長
手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部長
長岡(浜野)恵 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官
永山 敏廣 東京都健康安全研究センター 食品化学部残留物質研究科長
西川 秋佳 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病理部長
原田 雅己 サントリービジネスエキスパート株式会社 品質保証本部
安全性科学センター 部長
堀江 正一 大妻女子大学 家政学部食物学科教授
米谷 民雄 静岡県立大学 食品栄養科学部客員教授
社団法人 日本食品衛生学会 会長
前・国立医薬品食品衛生研究所 食品部長
増田 修一 静岡県立大学 食品栄養科学部食品衛生学研究室准教授
山田 隆 日本食品添加物協会 顧問
米元 純三 前・国立環境研究所 環境リスク研究センター副センター長

(五十音順)

<p>9 生産段階, 流通段階における規制</p> <p>3 有害金属</p> <p>1 有機水銀</p> <p>2 カドミウム</p> <p>3 鉛</p> <p>4 無機ヒ素</p> <p>5 アルミニウム</p> <p>6 銅</p> <p>4 内分泌かく乱物質</p> <p>1 ダイオキシン類</p> <p>2 ビスフェノール A</p> <p>3 フタル酸エステル</p> <p>4 トリブチルスズ</p> <p>5 ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDE)</p> <p>6 ポリフッ化化合物 (PFOS, PFOA)</p> <p>5 放射能</p> <p>1 放射能とは</p> <p>2 体内挙動と毒性発現メカニズム</p> <p>3 急性・慢性毒性および発がん性</p> <p>4 ADI と基準値</p> <p>5 摂取量と中毒事例</p> <p>6 リスク低減法と治療法</p> <p>6 加工食品に含まれる化学物質の安全性</p> <p>1 アクリルアミド</p> <p>2 トランス脂肪酸</p> <p>3 その他</p>	<p>堀江正一</p> <p>米谷民雄</p> <p>米谷民雄</p> <p>米谷民雄</p> <p>米谷民雄・長岡(浜野)恵</p> <p>米谷民雄・長岡(浜野)恵</p> <p>米谷民雄</p> <p>米元純三</p> <p>米元純三</p> <p>米元純三</p> <p>米元純三</p> <p>米元純三</p> <p>米元純三</p> <p>杉山英男</p> <p>杉山英男</p> <p>杉山英男</p> <p>杉山英男</p> <p>杉山英男</p> <p>杉山英男</p> <p>木苗直秀・増田修一</p> <p>木苗直秀・増田修一</p> <p>木苗直秀・増田修一</p>
<p>第3章 食品添加物</p> <p>1 ニコチン酸</p> <p>2 亜硫酸塩類</p> <p>3 グルタミン酸ナトリウム</p> <p>4 亜硝酸塩および硝酸塩</p> <p>5 臭素酸カリウム</p> <p>6 タール色素</p> <p>7 天然添加物 (コウジ酸, アカネ色素)</p>	<p>山田 隆</p> <p>山田 隆</p> <p>山田 隆</p> <p>山田 隆</p> <p>山田 隆</p> <p>山田 隆</p> <p>米谷民雄</p>
<p>第4章 新開発食品の安全性</p> <p>1 遺伝子組換え食品</p> <p>1 遺伝子組換え食品とは</p>	<p>手島玲子</p>

6 加工食品に含まれる化学物質の安全性



1 アクリルアミド

(1) アクリルアミド (AAM) とは

アクリルアミド (AAM) は1950年以降、紙力増強剤、凝固剤、土壌改良剤、樹脂加工剤、接着剤、化粧品 (シェービングジェルや整髪剤) などに使用されるポリアクリルアミド (PAAM) の原料として製造されている化学物質である。モノマーである AAM は、水に溶けやすいが、PAAM は水に溶けにくい。

2002年にスウェーデン政府がストックホルム大学との共同研究で加熱食品中に AAM が含まれていることを報告した^{1,2)}。食品を高温で調理または加工することにより、食品中のグルコースやフルクトースなどの還元糖がアミノ酸のアスパラギン (Asn) と反応するいわゆるメイラード反応が進行し、AAM が生成すると考えられている。また、他の経路としては、アスパラギン酸より生成したアクリル酸がアンモニアと反応する経路、脂質の分解物であるアクロレインの酸化を経て生成する経路などがある^{3~5)}。

最近、AAM の各種毒性が明らかになってきており、ヒトに対しても有害な AAM が、加熱調理された食品中に含有されていることが、大きな社会問題となっている。

(2) 体内動態と毒性発現メカニズム

AAM は食品を通して、経口的に摂取されると腸より吸収され、肝臓で代謝されて、また血流にのって各臓器に移行する。AAM は、肝臓でグルタチオン抱合を受けて *N*-アセチル-S-(2-カルバモイルエチル) システインとなり、尿中に排泄される⁶⁾。また、AAM は薬物代謝酵素である CYP 2E1 により酸化されてエポキシド体のグリシドアミドに変化する⁶⁾。

グリシドアミドは AAM と同様にグルタチオン抱合されて、*N*-アセチル-S-(2-カルバモイル-2-ヒドロキシエチル) システインまたは *N*-アセチル-S-(1-カルバモイル-2-ヒドロキシエチル) システインとなり、尿中に排泄される⁶⁾。

AAM およびグリシドアミドは血中でヘモグロビンと結合して付加体を形成する⁷⁾。また、グリシドアミドは DNA と付加体を形成し、肝臓などで検出されている⁸⁾。

(3) 急性・慢性毒性および発がん性

AAM の急性毒性についてはラット、マウスの LD₅₀ (mg/kg) 値が、経口投与でいずれも 170 mg/kg である⁹⁾。F 344 ラットに 93 日間飲水投与したところ、5 mg/kg/日以上で神経線維の変性が確認されている¹⁰⁾。Wistar ラットに 90 日間混餌投与した結果、30 mg/kg/日以上で神経症状や死亡が見られ、40 mg/kg/日では精細管の変性が認められている¹¹⁾。

生殖・発生毒性に関しては、ラットに 400 ppm の濃度で混入した食餌を交配後 20 日間摂取させたところ、親雌ラットでは末梢神経障害が見られている。しかし、仔ラットでは障害が確認されていない。他の報告では、AAM を飲水投与した雄のマウスおよびラットを非投与の雌と交配させると出生仔の大きさが減少し、着床欠損も確認されている。

AAM は遺伝子突然変異試験、染色体異常試験、小核試験で陽性を示した¹¹⁾。しかし、Ames 試験では陰性であった。AAM の代謝物であるグリシドアミドは、Ames 試験では陽性を示し、他の各遺伝毒性試験においても AAM よりも強い陽性を示した¹²⁾。したがって、AAM を摂取することにより発現する遺伝毒性は、代謝物であるグリシドアミドによって誘導されると考えられる。

AAM の発がん性に関して、IARC では「ヒトに対しておそらく発がん性を示す」グループ 2A に分類している。

(4) ADI と基準値

食品中における AAM について規制を設けている国はない。2002 年にドイツ連邦消費者健康保護・獣医学研究所は、食品 1 kg あたり AAM 1 mg を行動基準値として採用している。行動基準値は努力目標であり強制力がないため、最大基準値のような規制ではない。飲料水中の AAM については、WHO では 0.5 ppb というガイドラインを推奨している。EU では、水道水の AAM 基準値を 0.1 ppb としている。しかし、日本では水道水中の AAM の基準値は設定されていない。

AAM 摂取による神経毒性について、EPA では、影響が認められない NOEL を 0.2 mg/kg/日、有害な影響が認められる最低曝露量 (lowest observed adverse effect level : LOAEL) を 1 mg/kg/日としている。

また、遺伝子傷害性がある場合には、曝露量が少量であっても遺伝子の変異が生ずる可能性が考えられるため、閾値を設定することができない。したがって、JECFA では、食品を通して摂取される遺伝毒性物質の場合、曝露幅 (margin of exposure : MOE ; 曝露マージン) を採用している。曝露幅とは用量 - 反応結果から算出された無毒性量などの閾値や NOEL やベンチマーク用量下限信頼限界 (benchmark dose lower confidence limit : BMDL) と摂取量の大きさの違いを数的に示す指標で、AAM の場合、その平均摂取量 (0.001 mg/kg 体重/日) と発がんに対する BMDL (0.3 mg/kg 体重/日) の曝露幅は、 $MOE = NOEL (0.3) \div 摂取量 (0.001) = 300$ と算出されている。

JECFA では、曝露幅が 10,000 以上のものは“ヒトの健康への懸念は低い”としており、MOE がそれよりも小さいものは“懸念がある”としている。

(5) 摂取量と中毒例

AAM は、炭水化物を多く含む原材料を高温 (120 °C 以上) で加熱調理した食品 (ポテトチップス、フライドポテト、ビスケットなど) やコーヒー豆、ほうじ茶葉、煎り

麦のような、高温で焙煎した食品原材料に含まれている¹³⁾。さらに一般家庭で食品を調理した際にも、その材料や方法により AAM は生成し、タバコの煙にも AAM が含まれている¹⁴⁾。

世界各国における摂取量の結果より、一般的な人の平均的な摂取量は 1 日当たり 0.001 mg/kg 体重、また摂取量が多い人の摂取量は 1 日当たり 0.004mg/kg 体重とされている。

ヒトの AAM による健康被害では、職業曝露による神経毒性が報告されている。また、オランダと米国の AAM を扱う工場作業者を対象にしたコホート研究において、作業における膀胱がんの標準化死亡比がやや高い値を示したと報告されている¹⁵⁾。また、短期曝露影響として、眼、皮膚、気道の刺激や中枢神経系への影響が考えられている。

長期または反復曝露影響としては、神経系への影響や、末梢神経の損傷、遺伝毒性、発がん性が考えられる。なお、食品を通じた AAM の摂取と発がん率との疫学的な調査は行われているが、相関性は報告されていない。

(6) リスク低減法と治療法

現在、食品中に存在する AAM の含有量および摂取量を減少させる取組みが行われている。AAM の生成原料となるグルコースや Asn の量を減らしたり、少ないものを原料とすることが考えられている。また、AAM が生成しないように Asn 以外のアミノ酸を添加したり、植物成分を添加する方法も提案されている。

AAM が CYP2E1 により代謝活性化されてグリシドアミドとなり、毒性が増強することから、CYP2E1 誘導を抑制する食品を摂取する方策も考えられる。WHO では、食品の加熱しすぎを避け、バランスのよい食事を摂るように勧告している。

参 考 文 献

- 1) Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, *et al* : Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs, *J Agric Food Chem*, 50, 4998-5006 (2002)
- 2) Rosén J, Hellenäs KE : Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analyst*, 127, 880-882 (2002)
- 3) Becalski A, Lau BP, Lewis D, *et al* : Acrylamide in foods : occurrence, sources, and modeling, *J Agric Food Chem*, 51, 802-808 (2003)
- 4) Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT : Acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature*, 419, 448-449 (2002)
- 5) Yaylayan VA, Stadler RH : Acrylamide formation in food : a mechanistic perspective, *J AOAC Int*, 88, 262-267 (2005)
- 6) Kopp EK, Dekant W : Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses, *Toxicol Appl Pharmacol*, 235, 135-142 (2009)

- 7) Hartmann EC, Boettcher MI, Schettgen T, *et al* : Hemoglobin adducts and mercapturic acid excretion of acrylamide and glycidamide in one study population, *J Agric Food Chem*, 56, 6061-6068 (2008)
- 8) Zeiger E, Recio L, Fennell TR, *et al* : Investigation of the low-dose response in the in vivo induction of micronuclei and adducts by acrylamide, *Toxicol Sci*, 107, 247-257 (2009)
- 9) 後藤 稔, 池田正之, 原 一郎編 : 産業中毒便覧, 増補版, 医歯薬出版(1981)
- 10) Burek JD, Albee RR, Beyer JE, *et al* : Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery, *J Environ Pathol Toxicol*, 4, 157-182 (1980)
- 11) Cihák R, Vontorková M : Cytogenetic effects of acrylamide in the bone marrow of mice, *Mutat Res*, 209, 91-94 (1988)
- 12) Hashimoto K, Tanii H : Mutagenicity of acrylamide and its analogues in *Salmonella typhimurium*, *Mutat Res*, 158, 129-133 (1985)
- 13) Takatsuki S, Nemoto S, Sasaki K, *et al* : Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 44, 89-95 (2003)
- 14) Diekmann J, Wittig A, Stabbert R : Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acrylamide and acetamide in cigarette mainstream smoke after on-column injection, *J Chromatogr Sci*, 46, 659-663 (2008)
- 15) Marsh GM, Youk AO, Buchanich JM, *et al* : Mortality patterns among workers exposed to acrylamide : updated follow up, *J Occup Environ Med*, 49, 82-95 (2007)

2 トランス脂肪酸

(1) トランス脂肪酸 (TFA) とは

天然に存在する多くの不飽和脂肪酸 (unsaturated fatty acid : UFA) はシス型となっているが, 現在, 食品中のトランス型の二重結合を1つ以上有する UFA (トランス脂肪酸 ; trans-unsaturated fatty acid : TFA) の健康影響が大きな問題となっている。

TFA の主な生成要因としては, マーガリン, ショートニングなどの硬化油 (常温でも固体を保つ油) の製造過程が考えられる¹⁾。硬化油製造の際, UFA に水素添加すると飽和脂肪酸 (saturated fatty acid : SFA) を生成するが, SFA にならない一部の UFA のシス型の結合がトランス型へと変化することにより生成する。また, 油を高温で加熱する過程においてもシス型の UFA から生成したり, ウシなどの反芻動物の胃内バクテリアの作用によっても生成すると報告されている²⁾。

(2) 体内動態と毒性発現メカニズム

食品を通して TFA を摂取すると、シス型脂肪酸と同様に消化・吸収・代謝される。代謝されなかった TFA の多くは組織の脂肪部に取り込まれる。吸収された TFA は細胞膜の脂質組成を変化させ、細胞機能異常を起こすと推測されている。また、悪玉コレステロールである LDL コレステロールを増加させ、善玉コレステロールである HDL コレステロールを減少させるといわれている³⁾。最近、TFA が胎児に移行することも報告されている⁴⁾。

(3) 急性・慢性毒性および発がん性

EU における調査で、TFA の摂取量が乳がんや大腸がんの発症と関連することが確認されており、動脈硬化などの心血管系疾患のリスクにおいても SFA と同様に有意な関連が認められている⁵⁾。さらに 2 型糖尿病と TFA 摂取との関係も指摘されており、TFA の摂取量を減少させることにより、糖尿病の発症が抑制できるとされている⁶⁾。

急性毒性については、現在までに詳細な報告はない。アレルギーとの関連については、喘息等との間に相関性があること、さらに、認知機能の低下を引き起こすことなどが報告されている。

(4) ADI と基準値

食事、栄養および慢性疾患予防に関する WHO/FAO 合同専門家会議の報告書では、心臓血管系の予防のため、食事由来の TFA の摂取をきわめて低く抑えるべきであり、最大でも 1 日あたりの総エネルギー量の 1% 未満にするように勧告している。したがって、1 日の摂取エネルギーを 2,000 kcal とした場合、TFA 摂取量は 1 日あたり 2 g となる。

(5) 摂取量と中毒例

TFA 含有食品としては、マーガリン、ショートニングといった食用油脂または牛肉や乳製品などの畜産物由来食品があり、日本人はそれぞれの食品群から TFA 摂取量の約 58% および 26% を摂取している⁷⁾。TFA の食品中の含有量は硬化油の製造法により大きく異なっている。

日本人の 1 日あたりの摂取量は、平均で 0.7 g (摂取エネルギー換算では 0.3%) である。なお、米国では 5.8 g (2.6%)、EU 諸国では男性 1.2 ~ 6.7 g (0.5 ~ 2.1%)、女性 1.7 ~ 4.1 g (0.8 ~ 1.9%) となっている。

(6) リスク低減法

TFA に限らず、脂肪や SFA、コレステロールの取りすぎは心疾患のリスクを上昇させるため、脂肪全般の摂取に注意する。また、硬化油の製造過程における TFA の生成量を減少させる方法を開発することも必要である。さらに、代替油脂の使用、家庭での油の繰り返し使用を禁止することで、リスクを低減することができる。

このように TFA に関する研究成果がいくつか報告されているが、まだ、研究途上

である。今後は①日本人の摂取量、②摂取レベルにおける安全性、③食品中含有濃度、④TFAの種類ごとの健康影響などを調べる必要がある。

参 考 文 献

- 1) Sommerfeld M : Trans unsaturated fatty acids in natural products and processed foods, *Prog Lipid Res*, 22, 221-233 (1983)
- 2) Faergeman O : Om trans fatty acids from cow's stomach, *Ugeskr Laeger*, 163, 3242-3243 (2001) (in Danish)
- 3) Motard-Bélangier A, Charest A, Grenier G, *et al* : Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease, *Am J Clin Nutr*, 87, 593-599 (2008)
- 4) Innis SM : Trans fatty intakes during pregnancy, infancy and early childhood, *Atheroscler Suppl*, 7, 17-20 (2006)
- 5) Bakker N, Van't Veer P, Zock PL : Adipose fatty acids and cancers of the breast, prostate and colon : an ecological study. EURAMIC Study Group, *Int J Cancer*, 72, 587-591 (1997)
- 6) Odegaard AO, Pereira MA : Trans fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes, *Nutr Rev*, 64, 364-372 (2006)
- 7) Okamoto H, Matsuzaki T, Maruyama I, *et al* : Trans-fatty acid contents in hydrogenated Oil and estimated intake, *J Jpn Oil Chem Soc*, 48, 1411-1414 (1999)

3 その他

(1) 多環芳香族炭化水素

多環芳香族炭化水素類 (polycyclic aromatic hydrocarbons : PAHs) は、芳香環を2つ以上もつ炭化水素化合物の総称であり、主として有機物質の熱分解や化石燃料である石炭、石油の燃焼により生成する。PAHsには芳香環の数および置換基の位置等により多くの異性体が存在している。PAHsはディーゼル車から排出される粒子状物質 (PM) に吸着し、大気、土壌を通して野菜、果物などを汚染している^{1,2)}。また、加熱調理肉類、市販菓子類、魚類缶詰などからもPAHsが検出されている³⁾。実際に、肉の加熱調理時にベンゾ[a]ピレン (B(a)P) が生成することが報告されている。ヒトの大気、タバコタール、加熱食品からのB(a)P曝露量は、0.10 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{日}$ であると推定されているが、飲料水からの摂取量は、0.0002 $\mu\text{g}/\text{日}$ ときわめて少ない。

PAHsの代謝は、主として中間体のエポキシドを経てフェノール類、ジオール類になり、それらが硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体またはグルタチオン抱合体となる⁴⁾。ジオールエポキシド体はDNAのグアニン残基と結合し、変異原性や発がん性を発現

する⁵⁾。B(a)Pのマウスの経口および静注でのLD₅₀値は100～500 mg/kg体重であり、ラットでの経口LD₅₀値は2,700 mg/kg体重である。

短期投与において、B(a)Pは骨髄毒性、貧血、脾腫を起こす⁶⁾。ナフタレンは周産期毒性を示す。さらにベンゾ[a]アントラセン、B(a)P、ジベンゾ[a,h]アントラセンおよびナフタレンはマウスやラットに胎芽毒性を示す。また、B(a)Pは催奇形性作用や生殖抑制作用を示し⁷⁾、また経胎盤発がん活性、受精能の低下と卵巣傷害を引き起こす。

このようにPAHsはさまざまな毒性を示すことから、ヒトへの健康障害とともに生態影響についても検討する必要がある。また、PAHsによるヒト曝露を最小にする方策をとることも必要である。そのためには、野菜や果物に付着したPAHsを取り除き、肉類の加熱時には過剰な脂肪を切除して、火炎との接触を防ぐ調理法をとること、さらに禁煙、排気ガス対策などが考えられる。

(2) ヘテロサイクリックアミン類

1977年に杉村らは、焼き魚や焼き肉中に強力な変異原・発がん性を示す物質の存在を確認しており、それらはヘテロサイクリックアミン類 (heterocyclic amines: HCAs) と呼ばれている。HCAsはアミノ酸やタンパク質の加熱分解により生成する。また、アミノ酸-グルコース-クレアチニン混合物を反応させることによっても生成し、これまでに約20種類のHCAsが分離同定されている。

HCAsは牛肉、ハンバーグ、鶏肉、羊肉、ソーセージ、ホットドッグ、丸干しイワシ、サーモンなどの加熱食肉や、ワインやコーヒー豆およびタバコから検出されている⁸⁾。加熱食品中に含まれるHCAsのなかで、PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine) の含有量が最も多い⁹⁾。日本人のHCAsの1日当たりの摂取量は、MeIQxで0.3～3.9 μg、PhIPで0.05～0.3 μgであり、米国人ではそれぞれ0.1、0.9 μgである。

HCAsは生体内に摂取されると、薬物代謝酵素CYP1A2により代謝されて、ヒドロキシアミノ体、アシルアミノ体となりDNAと付加体を形成して、遺伝子突然変異を誘発する⁸⁾。HCAsはサルモネラ菌を用いるAmes試験(TA 98, +S9 mix)で強い復帰突然変異を示す。また、PhIP、IQ、MeIQx、Trp-P-1、Glu-P-1等は、ラットやマウスの肝臓、乳腺、大腸、前立腺、肺などにがんを誘発する⁸⁾。

疫学調査により、焼き焦げを多く摂取すると発がんリスクが高くなることが指摘されているが、ヘテロサイクリックアミン(HCA)が直接ヒトの発がん要因になっているのかは明らかにされていない。それゆえ、1日あたりのHCA摂取量を明らかにすることは、発がんリスクを評価するために重要である。

(3) クロロプロパノール類

プロパノールに塩素が結合した化合物をクロロプロパノール類と称する。クロロプロパノール類は、架橋材、繊維染色助剤、プラスチック・樹脂の溶剤、有機合成物質

の原材料に使用されており、食品中にも存在していることが報告されている。

アミノ酸液を製造する際、脱脂加工大豆、小麦グルテン等の植物性タンパク質を塩酸でアミノ酸に加水分解する。その際残存している植物油脂と塩酸が反応し、副生成物としてクロロプロパノール類が生成する¹⁰⁾。また、食品の加熱処理時に、脂質と食塩中の塩素が反応する場合や、容器包装中の原料が分解した場合にも、クロロプロパノール類が生成されることも知られている。それゆえ、クロロプロパノール類を含む食品としては、アミノ酸液を原材料に添加したしょうゆおよびその製品、即席めんやそのスープなどととも、アミノ酸を原材料に添加しない、チーズ、パン、クラッカー、加工肉、サラミなどからも、クロロプロパノール類が検出されている。

クロロプロパノール類の毒性に関しては、3-クロロプロパン-1,2-ジオール (3-MCPD) について、JECFA はラットの 104 週間飲水投与試験の腎尿細管過形成をエンドポイントとした LOEL 1.1 mg/kg から、PMTDI を 2 μ g/kg 体重/日としている。1,3-ジクロロ-2-プロパノール (1,3-DCP) については、ラットで肝毒性が認められている。3-MCPD の変異原性については、サルモネラ菌や大腸菌を用いた *in vitro* 試験では、陽性および陰性を示しているが、*in vivo* のマウス骨髄を用いた小核試験では陰性であり、遺伝毒性はないとされている¹¹⁾。

1,3-DCP の変異原性について、JECFA ではほ乳類を用いた *in vivo* 試験の結果がないが、*in vitro* 試験で陽性を示し、遺伝毒性があると推定している¹²⁾。

発がん性については、3-MCPD がラットの腎臓等に良性腫瘍の形成し、1,3-DCP は高用量群で肝細胞がんの発生が認められている。1,3-DCP はラットに摂取させた場合、複数の臓器において発がん性が認められ、遺伝毒性試験でも陽性を示すことから、ヒトにおいても発がん性を示すと考えられる¹³⁾。したがって 1,3-DCP は発がん性があることから、3-MCPD のように PMTDI は設定されていない。また、ラットの精子異常や有性生殖能力の低下なども報告されている。

日本人がしょうゆから摂取する 3-MCPD の 1 日の平均的な摂取量は 0.002 ~ 0.005 μ g/kg 体重/日とされており、PMTDI: 2 μ g/kg 体重/日の 1% 未満であり、しょうゆによるリスクは低いと考えられる。なお、3-MCPD および 1,3-DCP はいずれもヒトの健康に悪影響を及ぼした事例は報告されていない。

現在、食品製造業界では、酸加水分解植物性タンパク質の製造工程に、アルカリによる処理工程を導入して、クロロプロパノール類の含有量の低減化を行っている。

参 考 文 献

- 1) Niederer M : Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and substitutes (Nitro-, Oxy-PAHs) in urban soil and airborne particulate by GC-MS and NCI-MS/MS, *Environ Sci Pollut Res Int*, 5, 209-216 (1998)
- 2) Jánková M, Hajslová J, Tomaniová M, *et al* : Polycyclic aromatic hydrocarbons in

- fruits and vegetables grown in the Czech republic, *Bull Environ Contam Toxicol*, **77**, 492-499 (2006)
- 3) Lijinsky W : The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food, *Mutat Res*, **259**, 251-261 (1991)
 - 4) Borosky GL : Quantum chemical studies on ultimate carcinogenic metabolites from polycyclic aromatic hydrocarbons, *Curr Med Chem*, **15**, 2901-2920 (2008)
 - 5) Mattsson A, Jernström B, Cotgreave IA, *et al* : H2AX phosphorylation in A549 cells induced by the bulky and stable DNA adducts of benzo[a]pyrene and dibenzo[a, l] pyrene diol epoxides, *Chem Biol Interact*, **177**, 40-47 (2009)
 - 6) Legraverend C, Harrison DE, Ruscetti FW, *et al* : Bone marrow toxicity induced by oral benzo[a]pyrene : protection resides at the level of the intestine and liver, *Toxicol Appl Pharmacol*, **70**, 390-401 (1983)
 - 7) Barbieri O, Ognio E, Rossi O, *et al* : Embryotoxicity of benzo(a)pyrene and some of its synthetic derivatives in Swiss mice, *Cancer Res*, **46**, 94-98 (1986)
 - 8) Nagao M, Sugimura T, eds. : Current toxicology series ; Food borne carcinogens : heterocyclic amines, Wiley, Hoboken (2000)
 - 9) Busquets R, Mitjans D, Puignou L, *et al* : Quantification of heterocyclic amines from thermally processed meats selected from a small-scale population-based study, *Mol Nutr Food Res*, **52**, 1408-1420 (2008)
 - 10) Hamlet CG, Sadd PA, Crews C, *et al* : Occurrence of 3-chloro-propane-1, 2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods : a review, *Food Addit Contam*, **19**, 619-631 (2002)
 - 11) Robjohns S, Marshall R, Fellows M, *et al* : *In vivo* genotoxicity studies with 3-monochloropropan-1, 2-diol, *Mutagenesis*, **18**, 401-404 (2003)
 - 12) Hahn H, Eder E, Deininger C : Genotoxicity of 1, 3-dichloro-2-propanol in the SOS chromotest and in the Ames test. Elucidation of the genotoxic mechanism, *Chem Biol Interact*, **80**, 73-88 (1991)
 - 13) Piasecki A, Ruge A, Marquardt H : Malignant transformation of mouse M2-fibroblasts by glycerol chlorohydrines contained in protein hydrolysates and commercial food, *Arzneimittelforschung*, **40**, 1054-1055 (1990)

Isolation and Identification of a Novel Aromatic Amine Mutagen Produced by the Maillard Reaction

Rena Nishigaki,[†] Tetsushi Watanabe,^{*,‡} Tetsuya Kajimoto,[§] Atsuko Tada,[†]
Takeji Takamura-Enya,[†] Shigeki Enomoto,[†] Haruo Nukaya,^{||} Yoshiyasu Terao,^{||}
Atsushi Muroyama,[§] Minoru Ozeki,[§] Manabu Node,[§] Tomohiro Hasei,[‡] Yukari Totsuka,[†]
and Keiji Wakabayashi[†]

Cancer Prevention Basic Research Project, National Cancer Center Research Institute, 1-1 Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan, Department of Public Health and Department of Pharmaceutical Manufacturing Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, 1 Shichono-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan, and Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka, 52-1, Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

Received March 30, 2009

To clarify the formation of mutagens in the Maillard reaction of glucose and amino acids, 20 amino acids were separately incubated with glucose in the presence or absence of hydroxyl radicals produced by the Fenton reaction. After 1 week at 37 °C and pH 7.4, the reaction mixtures of glucose and tryptophan with and without the Fenton reagent showed mutagenicity toward *Salmonella typhimurium* YG1024 in the presence of a mammalian metabolic system (S9 mix). To identify mutagens in the reaction mixture, blue rayon-adsorbed material from a mixture of glucose, tryptophan, and the Fenton reagent was separated by column chromatography using various solid and mobile phases, and one mutagen, which accounted for 18% of the total mutagenicity of the reaction mixture, was isolated. The chemical structure of the mutagen was determined to be 5-amino-6-hydroxy-8*H*-benzo[6,7]azepino[5,4,3-*de*]quinolin-7-one (ABAQ) on the basis of ESI mass, high-resolution APCI mass, ¹H NMR, ¹³C NMR, and IR spectral analyses and chemical synthesis of the mutagen. The novel aromatic amine showed high mutagenicity toward *S. typhimurium* TA98 and YG1024 with S9 mix, inducing 857 revertants of TA98 and 6007 revertants of YG1024/μg, respectively. The mutagenicity of ABAQ was comparable to that of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, which is a mutagenic and carcinogenic heterocyclic amine in cooked meat and fish formed through the Maillard reaction at high temperature.

Introduction

The Maillard reaction is a nonenzymatic chemical reaction between reducing sugars and amino groups to form Schiff base adducts, which rearrange to form Amadori products. In the advanced Maillard reaction, the Amadori products are degraded into reactive carbonyl species, such as deoxyglucosone and methylglyoxal, and react again with free amino groups to form chromophores, fluorophores, and so forth. The Maillard reaction in vivo has been implicated in the aging process and various diseases, including diabetes, cataracts, retinopathy, and nephropathy (1–3). Elevated tissue concentrations of reactive carbonyl species are observed under pathological conditions (4–6). Pyrraline, that is, 2-amino-6-(2-formyl-5-hydroxymethylpyrrol-1-yl)hexanoic acid, is formed via the Maillard reaction between glucose and the ε-amino group of lysine (7) and is thought to induce biological responses, including mutations (8, 9). Increased levels of pyrraline were found in plasma and urine from diabetic individuals and were also detected in the sclerosed matrix of glomeruli affected by diabetic nephropathy (10–14). Many epidemiological studies have indicated positive

links between diabetes and cancer of the liver, pancreas, and others (15–17). These findings suggest that mutagenic/carcinogenic compounds, such as some reactive carbonyl species and pyrraline, are formed by the Maillard reaction in vivo and increase the risk of cancer in persons with a history of diabetes. However, little is known about the chemical structure of most mutagens formed through the Maillard reaction in vivo.

In the present study, model reactions in vitro were used to find mutagens potentially produced by the Maillard reaction in vivo. Mixtures of glucose and L-amino acids were incubated at 37 °C and pH 7.4 in the presence or absence of hydroxyl radicals produced by the Fenton reaction, because hydroxyl radicals are commonly generated in vivo, for example, during inflammation (18, 19). The mutagenicity of the reaction mixtures was examined with the *Salmonella* assay. The mixtures of glucose and tryptophan with and without the Fenton reagent showed obvious mutagenicity. Consequently, the mixture of glucose, tryptophan, and the Fenton reagent was separated using blue rayon and column chromatography, and one mutagenic compound was isolated. The mutagen was determined to be a novel compound, a benzoazepinoquinolinone derivative, on the basis of the consistency of spectral data and chromatographic behaviors of the mutagen and the synthesized compound.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +81-75-595-4650. Fax: +81-75-595-4769. E-mail: watanabe@mb.kyoto-phu.ac.jp.

[†] National Cancer Center Research Institute.

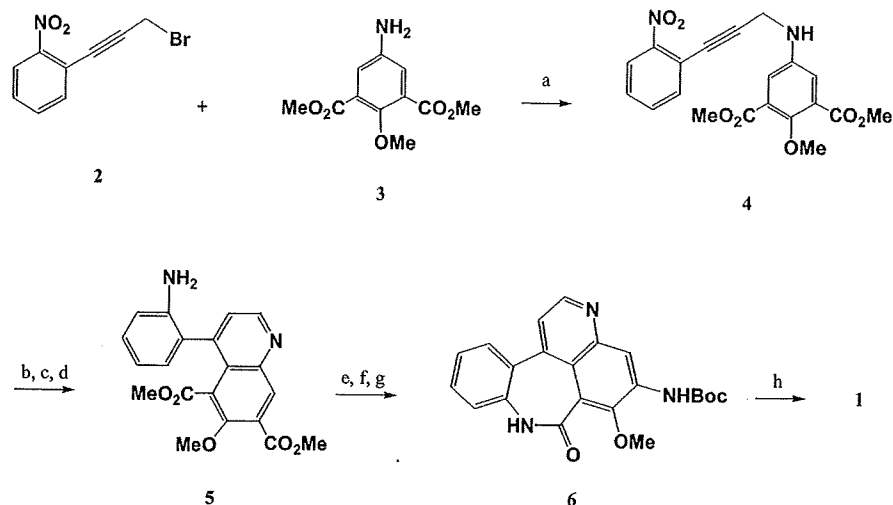
[‡] Department of Public Health, Kyoto Pharmaceutical University.

[§] Department of Pharmaceutical Manufacturing Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University.

^{||} University of Shizuoka.

Experimental Procedures

Chemicals. Blue rayon was purchased from Funakoshi Co. Ltd. (Tokyo, Japan). L-Form of amino acids, HPLC-grade acetonitrile,

Scheme 1. Chemical Synthesis of ABAQ 1^a

^a Key: a, K₂CO₃; b, ICl, NaHCO₃; c, Pd(PPh₃)₄, HCO₂H; d, Pd-C/H₂; e, MsOH, *o*-dichlorobenzene; f, KOH aq; g, DPPA, *t*-BuOH; and h, BBBr₃.

and methanol were purchased from Wako Pure Chemical Industries Co. Ltd. (Osaka, Japan). All other chemicals used were of guaranteed grade.

Reaction of Glucose and Amino Acids with or without the Fenton Reagent for Mutagenicity Assays. Glucose (0.25 mmol) and the amino acid (0.5 mmol of alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, glutamine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, or valine) were dissolved in 0.5 M phosphate buffer (pH 7.4, 10 mL) with or without the Fenton reagent, that is, FeSO₄ (0.05 mmol) and 30% H₂O₂ (0.2 mL). Each solution was incubated at 37 °C for 1 or 3 weeks. All test samples were evaporated dry and dissolved in 50% dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.1 mL) for the mutagenicity assay.

Isolation of a Mutagen from the Reaction Mixture of Glucose and Tryptophan with the Fenton Reagent. Glucose (12.5 mmol), tryptophan (25 mmol), and FeSO₄ (2.5 mmol) were dissolved in 0.5 M phosphate buffer (pH 7.4, 500 mL), and 30% H₂O₂ (10 mL) was added to the solution. Then, the mixture was incubated at 37 °C for 1 week. The solution was diluted with 1.5 L of distilled water and treated with blue rayon (5 g) two times. The blue rayon was washed away with water, and adsorbed materials were extracted with 800 mL of methanol:ammonia–water (50:1, v/v) solution two times, as reported (20). The extract was evaporated dry. Part of the residue was used for the mutagenicity assay. The rest was further purified by column chromatography. An aliquot of each fraction obtained by column chromatography was tested for mutagenicity. The mutagenicity of the blue rayon extract and the eluate from columns were examined in *Salmonella typhimurium* YG1024 in the presence of S9 mix.

The blue rayon extract was applied to a Sephadex LH-20 column (35 mm × 860 mm, GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) and eluted with methanol. The first fraction was eluted with 280 mL. Thereafter, each fraction was eluted with a volume of 50 mL. Major mutagenic activity was observed in the fractions eluted at 1580–1680 mL. These mutagenic fractions were collected, evaporated, and then dissolved in methanol. The material was applied to an analytical grade YMC-Pack ODS-A 303 column (5 μm particle size, 4.6 mm × 250 mm, YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan) for HPLC with a mobile phase of 30% acetonitrile in 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) at a flow rate of 1 mL/min. Mutagenic fractions with retention times of 25–27 min were further purified on a CAPCELL PAK C18 ODS column (5 μm particle size, 4.6

mm × 250 mm, Shiseido Co. Ltd., Tokyo). By eluting the materials with 25% acetonitrile in 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at a flow rate of 1 mL/min, two mutagenic fractions with retention times of 25–25.5 and 30.5–33 min were observed. The purity of the mutagenic compound (compound I) in the fractions with retention times of 30.5–33 min was confirmed on a second YMC-Pack ODS-A 303 column with a mobile phase of 30% acetonitrile in 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) at a flow rate of 1 mL/min. The elutes were monitored for absorbance at 260 nm.

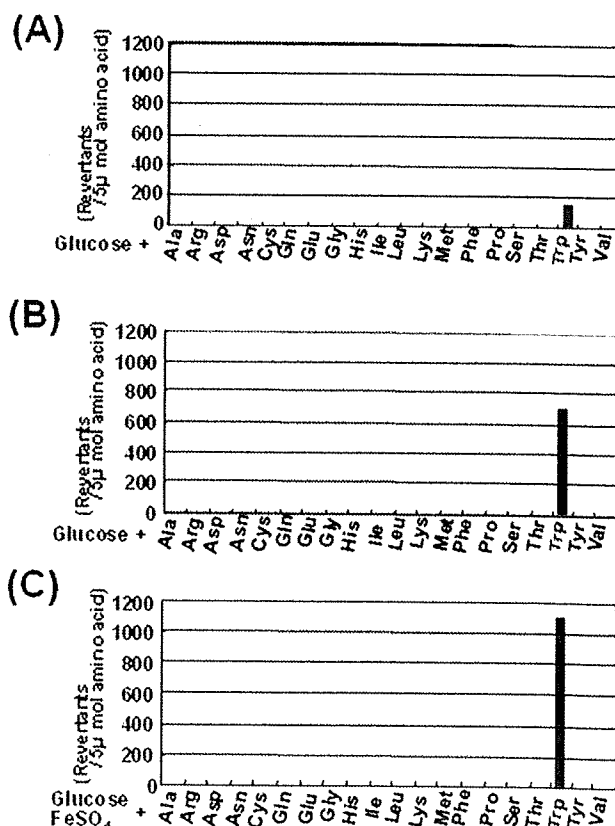


Figure 1. Mutagenicity of incubation mixtures of glucose and amino acids with or without the Fenton reagent toward *S. typhimurium* YG1024 in the presence of the S9 mix. (A) Incubation of a mixture of glucose and amino acid for 1 week, (B) incubation of a mixture of glucose and amino acid for 3 weeks, and (C) incubation of a mixture of glucose, amino acid, and the Fenton reagent for 1 week.

¹ Abbreviations: ABAQ, 5-amino-6-hydroxy-8H-benzo[6,7]azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; MeIQx, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline; PhIP, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine.

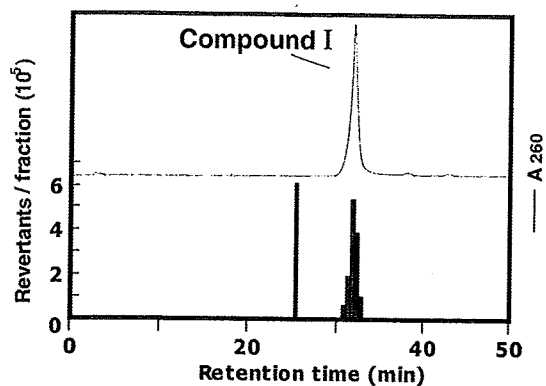


Figure 2. Purification of mutagenic compound I by HPLC. Mutagenic fractions from a YMC-Pack ODS-A 303 column with retention times of 25–27 min were purified on a CAPCELL PAK C18 ODS column. Compound I was obtained at a retention time of 32 min. The UV absorbance and mutagenicity are shown by the upper line and lower bars, respectively.

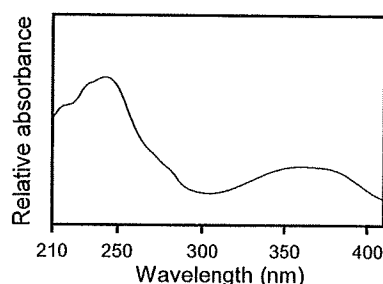


Figure 3. UV absorption spectrum of compound I, measured on the second YMC-Pack ODS-A 303 column with a photodiode array detector. The material was eluted with 30% acetonitrile in 25 mM phosphate buffer (pH 7.4).

Preparation of a Large Quantity of Compound I. In our preliminary experiment, incubation of the mixture of glucose, tryptophan, FeSO_4 , and 30% H_2O_2 at 60 °C for 2 days with shaking enhanced the formation of compound I by about 12-fold, as compared with incubation at 37 °C for 1 week (data not shown). Glucose (62.5 mmol), tryptophan (125 mmol), and FeSO_4 (12.5 mmol) were dissolved in 2.5 L of 0.5 M phosphate buffer (pH 7.4), and 30% H_2O_2 (50 mL) was added to the solution. The resulting mixture was incubated at 60 °C for 2 days with shaking. In total, 90 L of mixture was incubated. Compound I in the reaction mixture was extracted with an equal amount of chloroform. The extract was then evaporated dry, and the residue was dissolved in 20 mL of methanol, filtered through a glass filter, and applied to a Sephadex LH-20 column (50 mm \times 700 mm). The materials were first eluted with 460 mL of methanol, and then, methanol fractions of 40 mL were collected. The fractions at elution volumes of 2500–2820 mL, which were found to contain compound I, were combined and evaporated. The residue was dissolved in 5 mL of methanol and applied again to a Sephadex LH-20 column (30 mm \times 320 mm) with methanol as a mobile phase, and fractions of 5 mL were collected after the elution of 300 mL of methanol. The fractions containing compound I, which eluted at 650–665 mL, were combined and evaporated. The residue was further purified by HPLC on a semipreparative ODS-AM 324 column (5 μm particle size, 10 mm \times 300 mm, YMC Co. Ltd., Kyoto) with a mobile phase of 70% methanol at a flow rate of 2 mL/min, followed by a TSKgel CN-80Ts column (5 μm particle size, 4.6 mm \times 250 mm, Tosoh Corp., Tokyo) with a mobile phase of 65% of methanol at a flow rate of 0.5 mL/min. Compound I, found in the peak fractions with retention times of 19 and 16 min on the ODS-AM 324 column and the TSKgel CN-80Ts column, respectively, was finally purified on a SUMICHIRAL OA-7100 column (5 μm particle size, 4.6 mm \times 250 mm, SCAS Co. Ltd., Osaka) with a mobile phase of 50% of acetonitrile in 0.1% diethylamine–acetic acid (pH 7.4) at a flow rate of 0.5 mL/min. Compound I was isolated in the peak fraction

Table 1. Assignments of Signals in the ^1H and ^{13}C NMR Spectra of Compound I in $\text{DMSO}-d_6^a$

position	^{13}C NMR	^1H NMR
1	117.8	7.29 (1H, d, $J = 4.6$ Hz)
2	147.3	8.50 (1H, d, $J = 4.6$ Hz)
3		
3a	144.9	
4	111.9	7.20 (1H, s)
5	141.4	
6	157.4	
6a	104.5	
6b	120.3	
7	176.0	
8		10.38 (1H, s, $-\text{NH}$)
8a	137.0	
9	120.7	7.28 (1H, dd, $J = 1.4, 7.8$ Hz)
10	130.1	7.40 (1H, dt, $J = 1.4, 7.8$ Hz)
11	125.5	7.23 (1H, dt, $J = 1.4, 7.8$ Hz)
12	131.6	7.42 (1H, dd, $J = 1.4, 7.8$ Hz)
12a	127.7	
12b	140.6	
5-NH ₂		5.78 (2H, s)

^aChemical shifts are expressed as ppm. s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; and dt, triplet of doublets.

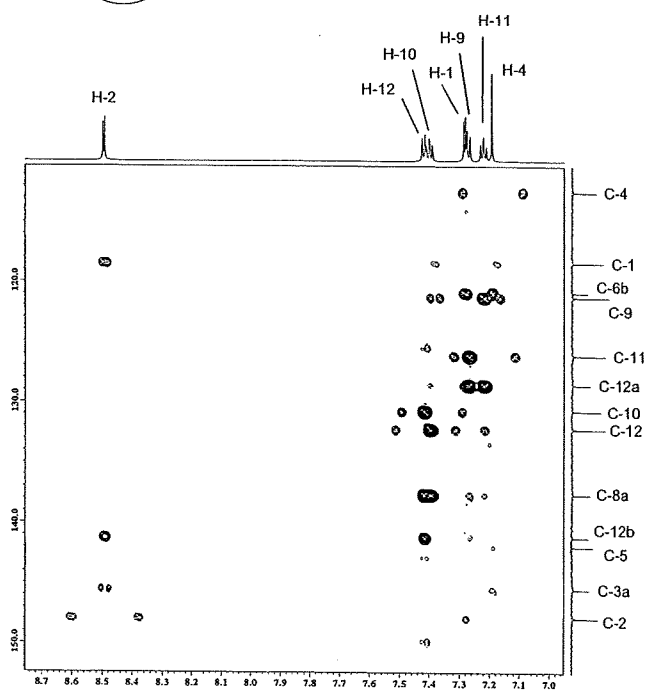
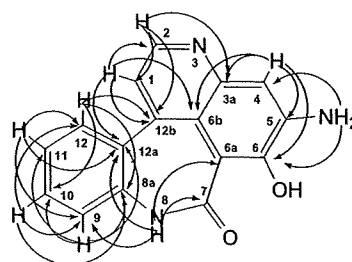


Figure 4. HMBC spectrum of compound I in $\text{DMSO}-d_6$.

with a retention time of 18 min. The above processes were repeated several times, and 330 μg of compound I was obtained.

The presence of a peak corresponding to authentic compound I was confirmed by HPLC on an analytical YMC-Pack ODS-A 303 column with a mobile phase of 30% acetonitrile in 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) as described above.

Spectral Measurement of Compound I. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded with a JEOLGX- α 600 or α 800 instrument using microprobe FT-NMR spectrometers. The IR spectrum of

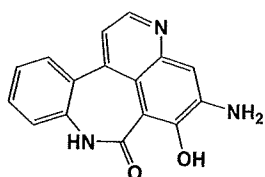


Figure 5. Chemical structure of ABAQ.

microattenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy was recorded with NEXUS670 and Nic-Plan with nitrogen. High-resolution mass spectrometry was performed using an API QSTAR Pulsar i equipped with a Micro-Tech HPLC system. UV absorption spectra were measured with a Tosoh PD-8020 photodiode array detector.

Chemical Synthesis of 5-Amino-6-hydroxy-8H-benzo[6,7]-azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one (ABAQ) 1. 1-(3-Bromoprop-1-ynyl)-2-nitrobenzene 2 was coupled with 5-amino-2-methoxyisophthalic acid dimethyl ester 3 in the presence of potassium carbonate to afford 2-methoxy-5-[3-(2-nitrophenyl)prop-2-ynylamino]isophthalic acid dimethyl ester 4. The coupled compound 4 was transformed to a quinoline derivative, 4-(2-aminophenyl)-6-methoxyquinoline-5,7-dicarboxylic acid dimethyl ester 5, by using Larock's method (21), followed by reduction with formic acid in the presence of Pd(PPh₃)₄ and subsequent catalytic hydrogenation. Treatment of the quinoline derivative 5 with methanesulfuric acid provided the lactam, the methyl ester of which was saponified to carboxylic acid and further converted to *t*-butyl carbamate by Curtius rearrangement (22). Synchronous cleavage of the methyl ether and the *t*-Boc group in 5-*tert*-butoxycarbonylamino-6-methoxy-8H-benzo[6,7]azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one 6 with boron tribromide furnished ABAQ 1 (Scheme 1). Details of the preparation as well as physical properties of ABAQ and synthetic intermediates are reported elsewhere (23). The purity of ABAQ was above 99% on HPLC.

Mutagenicity Assay. Mutagenicity was examined by the pre-incubation method (24) using *S. typhimurium* TA98 (25), TA100 (25), YG1024 (26), and YG1029 (26) in the presence and absence of S9 mix. Samples were dissolved in DMSO, unless stated otherwise. The S9 mix contained 0.05 mL of S9 in a total volume of 0.5 mL. S9 was prepared from the liver of male Sprague–Dawley rats treated with phenobarital and β -naphthoflavone in combination.

Results

Mutagenicity of the Mixtures of Glucose and Amino Acid with or without the Fenton Reagent. Figure 1 shows the mutagenicity of mixtures of glucose and amino acids with or without the Fenton reagent toward *S. typhimurium* YG1024 in the presence of S9 mix. When the mixtures were incubated for 1 week without the Fenton reagent, only the combination of glucose and tryptophan showed mutagenicity, producing 140 revertants per 5 μ mol of amino acid (Figure 1A). When the mixtures were incubated for 3 weeks, again, mutagenicity was observed only with glucose and tryptophan: 700 revertants per 5 μ mol of amino acid (Figure 1B), about 5 times the level after 1 week. When the Fenton reagent was incubated with the mixtures for 1 week, glucose and tryptophan showed strong mutagenicity (Figure 1C), generating 1100 revertants per 5 μ mol of amino acid, which was about eight times that after 1 week of incubation without the reagent. No mutagenicity was detected in any incubation sample without S9 mix. Solutions of each component above, that is, glucose, amino acid, or the Fenton reagent and a mixture of glucose and the Fenton reagent, which were not incubated, were not mutagenic (data not shown).

Isolation of a Mutagen from the Mixture of Glucose, Tryptophan, and the Fenton Reagent. To extract mutagens from the reaction mixture of glucose, tryptophan, and the Fenton reagent, blue rayon was used. The blue rayon extract showed

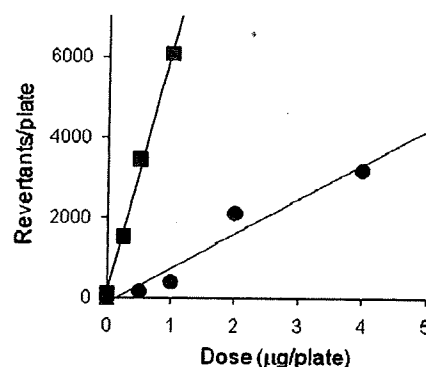


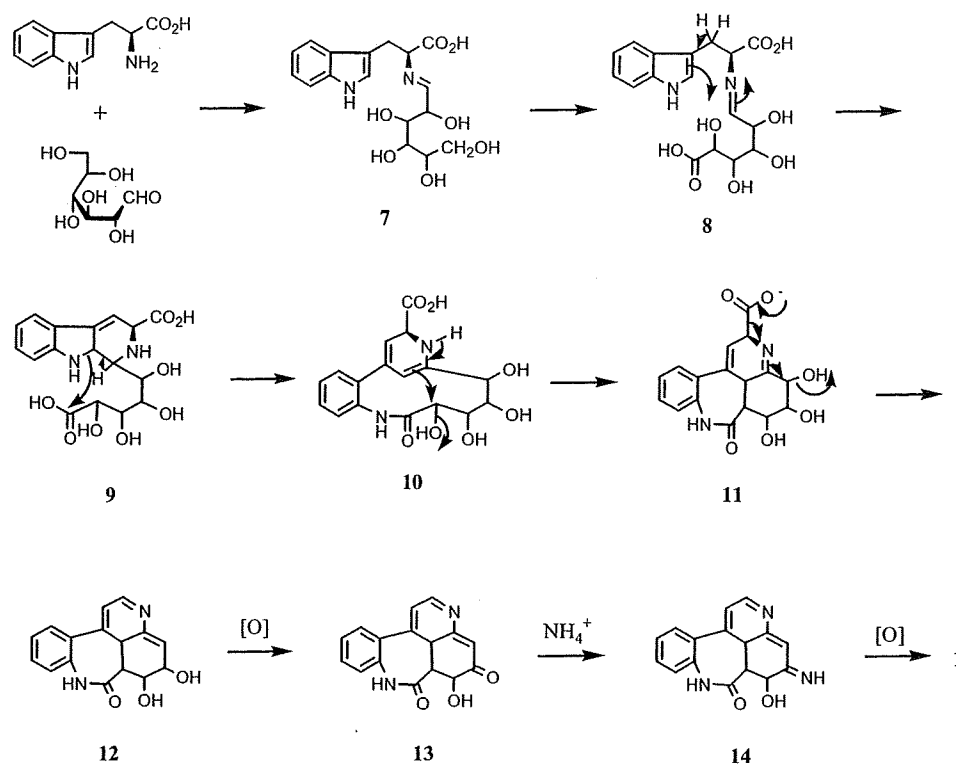
Figure 6. Mutagenicity of ABAQ toward *S. typhimurium* TA98 (●) and YG1024 (■) in the presence of S9 mix.

mutagenicity toward *S. typhimurium* YG1024 with S9 mix, its activity accounting for 72% of the mutagenicity of the mixture. By column chromatography using Sephadex LH-20, the mutagens extracted from the blue rayon were separated into four major mutagenic fractions, fractions 13–17, fractions 19–20, fractions 22–23, and fractions 26–28, which accounted for 18, 7, 14, and 26% of the total mutagenicity of the mixture, respectively. Materials in fractions 26–28 were separated by HPLC on an analytical YMC-Pack ODS-A 303 column, and the major mutagenic fraction was observed at a retention time of 25–27 min. The mutagens in this fraction were further purified by HPLC on a CAPCELL PAK C18 ODS column. Mutagenicity was mainly recovered in the two fractions with retention times of 25–25.5 and 30.5–33 min as shown in Figure 2. These fractions accounted for 7 and 18% of the mutagenicity of the mixture, respectively. In the latter fraction (retention time of 30.5–33 min), a single UV absorption peak was observed at the same retention time. On the second YMC-Pack ODS-A 303 column, the mutagenicity of the latter fraction was confirmed to be due to a single peak, and the material was designated compound I. Three micrograms of compound I was obtained from 0.5 mmol of tryptophan and 0.25 mmol of glucose in the presence of the Fenton reagent.

The UV absorption spectrum of compound I, obtained on the second YMC-Pack ODS-A 303 column with a photodiode array detector, is shown in Figure 3. Absorption maxima were found at 242 and 360 nm. With compound I isolated from the mixture described above as a marker, a large quantity of the compound was isolated from a total of 90 L of incubation mixture by column chromatography using Sephadex LH-20 and HPLC. This process was repeated several times, and 330 μ g of the compound was obtained and used for various spectral analyses. The mutagenicity of compound I toward YG1024 with S9 mix was 6000 revertants/ μ g.

Structural Analysis of Compound I. The IR spectrum of compound I showed absorption peaks at 1641 and 1594 cm^{-1} , which suggested that an amide bond exists in the molecule, as well as a peak at 3500–3000 cm^{-1} , which suggested the presence of hydroxyl or amino groups. The mass spectrum of compound I exhibited two ion peaks, $[M + H]^+$ at m/z 278 in the positive mode of ESI and $[M - H]^-$ at m/z 276 in the negative mode. Subsequent high-resolution mass spectrometry with APCI in the negative mode indicated the molecular formula of $[M - H]^-$ to be $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2$ (276.0781; calculated, 276.0773). Table 1 lists chemical shifts of the proton and carbon signals in the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compound I. The ^{13}C NMR spectrum showed 16 signals only in the sp^2 carbons region. On the basis of the high-resolution mass spectrum and ^{13}C NMR spectrum, the molecular formula of compound I was confirmed to be $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$. Among the 16 signals in the ^{13}C

Scheme 2. Plausible Mechanism for the Formation of ABAQ 1 from Glucose and Tryptophan



NMR spectrum, the signal at 176.0 ppm was assigned as a carbonyl carbon of an amide bond, which was observed in the IR spectrum. The ^1H NMR spectrum exhibited seven splitting signals at 7.20–7.42 and 8.50 ppm due to aromatic ring protons and two singlet signals at 10.38 and 5.78 ppm due to heteroatom-binding protons, which disappeared by the addition of D_2O . The doublet signal at 8.50 ppm observed in the lowest field among the carbon-binding protons was coupled with that at 7.29 ppm by a J value of 4.6 Hz. Meanwhile, a set of four signals observed at 7.23 (1H, dt, $J = 1.4, 7.8$ Hz), 7.28 (1H, dd, $J = 1.4, 7.8$ Hz), 7.40 (1H, dt, $J = 1.4, 7.8$ Hz), and 7.42 (1H, dd, $J = 1.4, 7.8$ Hz), which were correlated with one another in the ^1H – ^1H COSY spectrum, indicated the presence of an *o*-substitute benzene ring. The singlet signal at 7.20 ppm did not correlate with any signals in the ^1H – ^1H COSY spectrum. It is worth noting that the proton signal at 8.50 ppm correlated with the carbon signal at 147.3 ppm in the HMQC spectrum, suggesting the presence of a pyridine or a quinoline ring in compound I. Further detailed analysis of the HMQC and the HMBC spectra revealed correlations of the proton and carbon signals (Figure 4). From the above data, the chemical structure of compound I was deduced to be ABAQ (Figure 5). The ^1H NMR, UV, and mass spectral data of the synthesized ABAQ were coincident with those of compound I isolated from reaction mixture from glucose, tryptophan, and the Fenton reagent. The retention times of the compound I and synthesized ABAQ by HPLC were identical. Thus, we concluded that compound I was ABAQ.

Mutagenicity of ABAQ. Synthesized ABAQ was tested for mutagenicity in *S. typhimurium* TA98, TA100, YG1024, and YG1029 with and without S9 mix. ABAQ showed potent mutagenicity toward TA98 and YG1024 in dose-dependent manner with S9 mix, and the potencies were as follows: 857 revertants of TA98 and 6007 revertants of YG1024/ μg (Figure 6). ABAQ was slightly mutagenic toward TA100 (10 revertants/ μg) and YG1029 (141 revertants/ μg) with S9 mix. In the absence of S9 mix, ABAQ was not mutagenic in either strain.

Discussion

Some mutagenic and carcinogenic compounds in cooked foods have been reported to be formed by the Maillard reaction of reducing sugars and amino acids. A series of heterocyclic amines have been isolated as mutagens and carcinogens from cooked meat and fish, and some of them are thought to be produced through the Maillard reaction. For instance, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) were suggested to be formed by the reaction of creatine with Maillard reaction products from glucose and amino acids by heating at high temperatures, such as 128°C (27–30). The Maillard reaction also occurs at physiological temperatures. However, reports on the formation of mutagenic compounds through the Maillard reaction under physiological conditions are quite limited. In the present study, we examined the mutagenicity of reaction mixtures of glucose and amino acids held at physiological temperature and pH and found that the mixture of glucose and tryptophan kept for 1 week showed mutagenicity toward *S. typhimurium* YG1024 with S9 mix. Furthermore, under oxygen radicals- or active oxidative species-producing conditions with the Fenton reaction, the mutagenicity of the mixture of glucose and tryptophan was remarkably increased, being about eight times that after 1 week of incubation without the Fenton reagent. To identify mutagens, the reaction mixture of glucose, tryptophan, and the Fenton reagent was separated by bioassay-directed fractionation. Compound I, accounting for 18% of the mutagenicity of the mixture, was isolated and concluded to be a novel chemical, ABAQ, on the basis of the consistency of spectral data and retention times on HPLC of compound I and the synthesized compound.

ABAQ showed mutagenicity toward TA98, TA100, YG1024, and YG1029 with S9 mix, and the activities were higher in TA98 and YG1024, detectors of frameshift mutations, than TA100 and YG1029, detectors of base pair change mutations. The mutagenic potencies of ABAQ toward YG1024 and YG1029, *O*-acetyltransferase overproducing derivatives of TA98 and TA100, respectively, were higher than those toward their parent strains. These results

suggest that ABAQ needs metabolism by cytochrome P450 and O-acetyltransferase to show mutagenicity. These characteristics were very similar to those of food-derived heterocyclic amines, reported to be formed through the Maillard reaction. The mutagenic potency of ABAQ, 857 revertants of TA98/ μg and 6007 revertants of YG1024/ μg , are comparable to those of PhIP, which is a mutagenic and carcinogenic heterocyclic amine (31).

It is possible that there might be several routes for the formation of ABAQ from glucose and tryptophan by the Maillard reaction. Scheme 2 shows one of the plausible mechanisms for the formation of ABAQ **1** from glucose and tryptophan by the Maillard reaction. First, the primary amino group of tryptophan and the aldehyde at the C-1 position of glucose were condensed to form the Schiff base **7**, the primary alcohol of which would be oxidized in the Maillard medium to carboxylic acid to afford the intermediate **8**. Next, the *ene*-reaction involving the terminal olefin of the indole, allylic proton at the β -carbon of tryptophan, and imine gave a tricyclic intermediate **9**, which was immediately converted to ϵ -lactam **10** accompanying deprotonation and the cleavage of a carbon–nitrogen bond. A subsequent SN2 reaction of the α -hydroxyl group of the lactam with enamine nucleophile yielded a tetracyclic compound **11** that has the basic skeleton of **1**. Decarboxylation of **11** could induce dehydration to provide the allylic alcohol **12**, which would be easily oxidized to give the α,β -unsaturated ketone **13**. The reaction of **13** with ammonium ion in the Maillard medium would form an imine intermediate **14**. Spontaneous dehydration of **14** driven by aromatic stability should furnish **1**.

In the present study, we found that a novel mutagen, ABAQ, was formed by the Maillard reaction of glucose and tryptophan in the presence and absence of hydroxyl radicals produced by the Fenton reaction. A consistent increase in blood sugar levels is a feature of diabetes, and the reaction of glucose and amino acids is thought to be enhanced in diabetic individuals. These facts suggest that ABAQ might be formed as an endogenous mutagen/carcinogen in diabetics and a population with high blood sugar levels. Further studies on the biological activities of ABAQ, such as genotoxicity in vivo, and the quantification of ABAQ in biological samples from diabetic individuals are important to estimate the risk posed by ABAQ.

Acknowledgment. This study was supported by Grants-in-aid for Cancer Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan and Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

References

- (1) Aronson, D. (2004) Pharmacological prevention of cardiovascular aging—Targeting the Maillard reaction. *Br. J. Pharmacol.* **142**, 1055–1058.
- (2) Nagaraj, R. H., Shipanova, I. N., and Faust, F. M. (1996) Protein cross-linking by the Maillard reaction. Isolation, characterization, and in vivo detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal. *J. Biol. Chem.* **271**, 19338–19345.
- (3) McCance, D. R., Dyer, D. G., Dunn, J. A., Bailie, K. E., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., and Lyons, T. J. (1993) Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **91**, 2470–2478.
- (4) Thomalley, P. J. (1994) Methylglyoxal, glyoxalases and the development of diabetic complications. *Amino Acids* **6**, 15–23.
- (5) Niwa, T., Takeda, N., Miyazaki, T., Yoshizumi, H., Tatematsu, A., Maeda, K., Ohara, M., Tomiyama, S., and Niimura, K. (1995) Elevated serum levels of 3-deoxyglucosone, a potent protein-cross-linking intermediate of the Maillard reaction, in uremic patients. *Nephron* **69**, 438–443.
- (6) Beisswenger, P. J., Howell, S. K., Nelson, R. G., Mauer, M., and Szewigold, B. S. (2003) α -Oxoaldehyde metabolism and diabetic complications. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1358–1363.
- (7) Nakayama, T., Hayase, F., and Kato, H. (1980) Formation of ϵ -(2-formyl-5-hydroxymethyl-1-yl)-L-norleucine in the Maillard reaction between D-glucose and L-lysine. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1201–1202.
- (8) Basta, G., Schmidt, A. M., and Caterina, R. D. (2004) Advanced glycation end products and vascular inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* **63**, 582–592.
- (9) Omura, H., Jahan, N., Shinohara, K., and Murakami, H. (1983) Formation of mutagens by the Maillard reaction. *ACS Symp. Ser.* **215**, 537–563.
- (10) Yoshihara, K., Kiyonami, R., Shimizu, Y., and Beppu, M. (2001) Determination of urinary pyrrole by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 863–866.
- (11) Odani, H., Shinzato, T., Matsumoto, Y., Takai, I., Naki, S., Miwa, M., Iwayama, N., Amano, I., and Maeda, K. (1996) First evidence for accumulation of protein-bound and protein-free pyrrole in human uremic plasma by mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 237–241.
- (12) Portero-Otin, M., Pamplona, R., Bellmunt, M. J., Bergua, M., Nagaraj, R. H., and Prat, J. (1997) Urinary pyrrole as a biochemical marker of non-oxidative Maillard reactions in vivo. *Life Sci.* **60**, 279–287.
- (13) Portero-Otin, M., Pamplona, R., Bellmunt, M. J., Bergua, M., and Prat, J. (1997) Glycaemic control and in vivo non-oxidative Maillard reaction: Urinary excretion of pyrrole in diabetes patients. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**, 767–773.
- (14) La Vecchia, C., Negri, E., Decarli, A., and Franceschi, S. (1997) Diabetes mellitus and the risk of primary liver cancer. *Int. J. Cancer* **73**, 204–207.
- (15) La Vecchia, C., Negri, E., Franceschi, S., D'Avanzo, B., and Boyle, P. (1994) A case-control study of diabetes mellitus and cancer risk. *Br. J. Cancer* **70**, 950–953.
- (16) Rousseau, M. C., Parent, M. E., Pollak, M. N., and Siemietycki, J. (2006) Diabetes mellitus and cancer risk in a population-based case-control study among from Montreal, Canada. *Int. J. Cancer* **1182**, 2105–2109.
- (17) Inoue, M., Iwasaki, M., Otani, T., Sasazuki, S., Noda, M., and Tsugane, S. (2006) Diabetes mellitus and the risk of cancer. *Arch. Intern. Med.* **166**, 1871–1877.
- (18) Ward, P. A., Till, G. O., Kunkel, R., and Beauchamp, C. (1983) Evidence for role of hydroxyl radical in complement and neutrophil-dependent tissue injury. *J. Clin. Invest.* **72**, 789–801.
- (19) Ramos, C. L., Pou, S., Britigan, B. E., Cohen, M. S., and Rosen, G. M. (1992) Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 8307–8312.
- (20) Ushiyama, H., Wakabayashi, K., Hirose, M., Itoh, H., Sugimura, T., and Nagao, M. (1991) Presence of carcinogenic heterocyclic amines in urine of healthy volunteers eating normal diet, but not of inpatients receiving parenteral alimentation. *Carcinogenesis* **12**, 1417–1422.
- (21) Zhang, X., Campo, M. A., Yao, T., and Larock, R. C. (2005) Synthesis of substituted quinolines by electrophilic cyclization of *N*-(2-alkynyl)anilines. *Org. Lett.* **7**, 763–766.
- (22) Shioiri, T., Ninomiya, K., and Yamada, S. (1972) Diphenylphosphoryl azide. New convenient reagent for a modified Curtius reaction and for peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 6203–6205.
- (23) Ozeki, M., Muroyama, A., Kajimoto, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., and Node, M. (2009) Synthesis of a new mutagenic benzoazepinoquinolinone derivative. *Synlett*, **11**, 1781–1784.
- (24) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., and Sugimura, T. (1977) Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat. Res.* **48**, 121–129.
- (25) Maron, D. M., and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173–215.
- (26) Watanabe, M., Jr., Ishidate, M., and Nohmi, T. (1990) Sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: New derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat. Res.* **234**, 337–348.
- (27) Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., and Sugimura, T. (1992) Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res.* **52** (7 Suppl), 2092s–2098s.
- (28) Sugimura, T., Wakabayashi, K., Hitoshi, N., and Nagao, M. (2004) Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.* **95**, 290–299.
- (29) Jagerstad, M., Olsson, K., Grivas, S., Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., and Sugimura, T. (1984) Formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in a model system by heating creatinine, glycine and glucose. *Mutat. Res.* **126**, 239–244.
- (30) Shioya, M., Wakabayashi, K., Sato, S., Nagao, M., and Sugimura, T. (1987) Formation of a mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in cooked beef, by heating a mixture containing creatinine, phenylalanine and glucose. *Mutat. Res.* **191**, 133–138.
- (31) Turesky, R. J., Goodenough, A. K., Ni, W., McNaughton, L., LeMaster, D. M., Holland, R. D., Wu, R. W., and Felton, J. S. (2007) Identification of 2-amino-1,7-dimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline: An abundant mutagenic heterocyclic aromatic amine formed in cooked beef. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 520–530.