

研究課題名 (研究項目名)	食事由来アクリルアミドばく露量推定方法の開発と妥当性の検討および大規模コホート研究に基づく発がんリスクとの関連に関する研究（課題番号：1503） （4 その他（1） 自ら評価や新たな危害要因に対応する調査・研究）
主任研究者	研究者名：祖父江 友孝 所属機関：国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成 27 年度～平成 29 年度（3 年間）

2 研究目的

本研究では、日本人のアクリルアミドばく露量を評価し、ばく露と発がんリスクとの関連を検討することを最終目標とする。具体的な目的は、次の 3 つである。

①食事由来アクリルアミドばく露量を食事記録法および食物摂取頻度法などの食事調査法を用いて推定する方法を開発し、陰膳法の食品サンプルからの分析量を用いて推定の妥当性を明らかにする。②大規模コホート研究のデータを用いて、アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連を検討する。③生体指標（赤血球）中のアクリルアミドヘモグロビン付加体量を測定し、食事調査から推定したアクリルアミドばく露量と比較する。

3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
（1）食事調査由来のアクリルアミド推定値の検討－分析値との比較	1）秤量法および食物摂取頻度調査法による摂取量推定方法の開発	石原淳子（麻布大学）
	2）秤量法、食物摂取頻度調査法による推定値と陰膳法サンプル中アクリルアミド分析値との比較	祖父江友孝（大阪大学）
（2）大規模コホート研究データを用いた食事由来ア	1）食事由来ばく露量推定方法の妥当性・再現性の検討	石原淳子（麻布大学）

クリルアミド ばく露量とがん罹患 リスクとの関連検討	2) 食事由来ばく露量とがん罹患 リスクとの関連検討	祖父江友孝（大阪大学）
(3) 生体指 標を用いたア クリルアミド の長期ばく露 評価と摂取量 との関連	1) 血液および尿検体の収集	祖父江友孝（大阪大学）
	2) FFQの収集	石原淳子（麻布大学）
	3) アクリルアミド-ヘモグロビン 付加体を用いた長期ばく露の評価	松井康人（京都大学）
	4) その他のばく露指標の利用に 関する探索的検討	松井康人（京都大学）
	5) 陰膳法による分析値および秤 量法食事記録と、生体指標との関 連検討	祖父江友孝（大阪大学）
	6) FFQを用いた長期間の摂取量 推定と、生体指標との関連検討	石原淳子（麻布大学）

4 倫理面への配慮について

本研究に係る各研究団の取り扱いについては、関連する倫理指針（疫学研究に関する倫理指針等）を遵守し、個人情報の保護・管理に万全を期した上で実施した。新たに個人情報の提供を受ける際は、研究内容を十分説明した後に、同意の得られた者のみを対象とした。研究実施に先立って、倫理審査委員会の承認（大阪大学、相模女子大学、麻布大学、京都大学）を得て研究を実施するとともに、個人情報の保護に関して細心の注意を払った上で実施した。また、河原班（食品健康影響評価技術研究 課題名：「食品由来のアクリルアミド摂取量の推定に関する研究」、主任研究者：国立環境研究所 河原純子）との共同研究により実施した(3)の課題については、国立研究開発法人国立環境研究所における医学系倫理審査会の承認を得て実施した。

既に同意を得て実施された既存資料を用いて行う二次的研究の実施にあたっては、匿名化したデータのみを用いて分析を行った。追加的な調査の実施にあたっては、対象者本人の同意を得ることを研究計画書に記述をして、各研究者が所属する機関の倫理審査委員会の承認を得て、研究を実施した。

II 研究内容及び成果等

(1) 食事調査由来のアクリルアミド推定値の検討—分析値との比較

1) 秤量法および食物摂取頻度調査法による摂取量推定方法の開発：石原淳子（麻布大学）

研究内容・方法

秤量法食事記録（Dietary Record: DR）および食物摂取頻度調査票（Food Frequency Questionnaire: FFQ）の既存データを用いてアクリルアミド摂取量の推定を行った。2014年9月、神奈川県在住の対象者11世帯の14名（男性3名、女性11名、20～74歳）から収集した連続2日間（日曜日と月曜日）の陰膳法（Duplicated Method: DM）サンプルのデータを伴う同日のDRおよび過去一年の食事を回答するFFQを、既存データおよびサンプルとして用いた。

摂取量推定のためのアクリルアミド含有量データベースは、2016年7月までに公開されていた複数の含有量データ¹⁻¹⁰を用いて作成した。DRに出現する食品は5訂日本食品標準成分表（以下、5訂成分表）の1878項目にコーディングされており、これらの食品を次のクライテリアに沿って分類し、100gあたりのアクリルアミド含有量を充当した（置換法）。クライテリアは、A) 同種または類似種、かつ同じまたは類似の調理法による分類による充当、B) 複数の食品を使った食品（例：菓子類）は組み合わせの成分値を充当、C) 油脂類、生食品、非加工食品、非加熱食品には”0”を充当、D) 上記に該当しない場合は欠損値とした。日本食品標準成分表1878食品のうち、282食品（15%）がアクリルアミドを含む食品として推定に用いられ（クライテリアAおよびB）、1276食品が0（クライテリアC）、320食品が欠損（クライテリアD）となった。また、野菜やいくつかの食品については家庭内における加熱調理により生成するアクリルアミドを考慮する必要があるため、秤量法データを料理単位毎に整理した。具体的には、ジャガイモ（揚げる、焼く、炒める、下炒め）、タマネギ（揚げる、焼く、炒める、下炒め）、モヤシ（揚げる、焼く、炒める）、アスパラガス（揚げる、焼く、炒める）、ピーマン（揚げる、焼く、炒める）、カボチャ（揚げる、焼く、炒める）、キャベツ（揚げる、焼く、炒める）、インゲン（揚げる、焼く、炒める）、ナス（揚げる、焼く、炒める）、ブロッコリー（揚げる、焼く、炒める）、サヤエンドウ（揚げる、焼く、炒める）、サツマイモ（揚げる）、トースト、揚げ衣、焼飯が該当し、これによって5訂成分表は1917食品となり、うち321食品（17%）がアクリルアミドを含む食品（クライテリアA）となった。

5訂成分表でコーディングされたDRの各食品重量に、アクリルアミド含有量データベースの値を乗じて100で除し、その値を各対象者調査日ごとに合計することによって、DRで推定した一日当たり摂取量、体重（自己申告）当たり摂取量、食品群毎の寄与割合を算出した。

FFQは国立がん研究センター研究開発費 課題名：「予防研究基盤としてのコホート研究の維持と規模の拡大—多目的コホートに基づくがん予防など健康の維持・増進に役立つエビデンスの構築に関する研究」（主任研究者 津金昌一郎 国立がん研究センター社会と健康研究センター長）で用いられたマークシート式の調査票で、138食品の摂取頻度とポーションサイズ、調理法などの食習慣、その他生活習慣に関する

質問により構成され、過去一年間の平均的な摂取量を回答するようになっている。
DRと同様、野菜（じゃがいも、たまねぎ、もやしなど）に関しては、調理法を加味する必要があることから、食品項目ごとの調理法の割合を、DRから求めた。これに各食品のアクリルアミド含有量を乗じることで、FFQ各食品項目についてアクリルアミド含有量の荷重平均成分値データベースを作成した。FFQに記載された各食品の頻度、標準目安量と相対目安量を乗じた各摂取量に、成分値データベースの値を乗じることで各食品の摂取量を算出し、全ての食品の摂取量を合計することで一人一日当たりアクリルアミド摂取量を算出した。また、体重（調査時点実測値）を用いて、体重当たりの1日摂取量も算出した。

研究成果

表1に対象者の特性を示した。対象者のBMI平均値は 20.8kg/m^2 であった。

DRおよびFFQから推定したアクリルアミド摂取量平均値はそれぞれ $0.233\pm 0.192\mu\text{g}/\text{体重}(\text{kg})/\text{日}$ 、 $0.128\pm 0.062\mu\text{g}/\text{体重}(\text{kg})/\text{日}$ で、FFQはDRに比べて若干低い推定値となった（表2）。寄与食品群としては、嗜好飲料類の寄与割合が48%と最も高く、続いて菓子類、野菜類が各18%、穀類、イモ類が各5%で、これらの合計で全体の9割以上を占めた（図1）。

考察及び今後の課題

本研究で開発した手法によるアクリルアミド摂取量推定値は、モンテカルロ法によって推計されたアクリルアミド摂取量中央値の $0.154\mu\text{g}/\text{体重}(\text{kg})/\text{日}$ と同程度であった¹。このことから、開発したアクリルアミド含有量データベースを用いることで、DRおよびFFQを使用した食事由来のアクリルアミド摂取量推定は可能であることが推察された。

しかしながら、DRでは $0.233\pm 0.192\mu\text{g}/\text{体重}(\text{kg})/\text{日}$ と高く、摂取量を過大評価している可能性があった。この要因としては寄与割合で最も高い嗜好飲料類による影響が考えられ、特に緑茶からの摂取は過大評価している可能性がある。

緑茶中に含有されるアクリルアミドは茶葉に由来する。そのため、同じ茶葉を使用して複数回お茶を淹れる場合、お茶中のアクリルアミド量はその回数に反比例することが推測される。しかしながら、標準的なDRの実施手順では茶葉の使用回数については考慮していないことが多く、今回の調査法でも同様であったため、嗜好飲料類からの過大評価が生じている可能性が考えられる。

表1. 対象者の特性

n	14
Age, years (mean, SD)	40.8 (5.7)
30-39, n	6
40-49, n	7
50-59, n	1
Sex	
Men (%)	23.0
Women (%)	77.0
BMI, kg/m ² (mean, SD)	20.8 (2.7)

SD, standard deviation; BMI, body mass index.

表 2. 陰膳法 (DM) 分析値および秤量法 (DR)、食物摂取頻度調査票 (FFQ) から推定したアクリルアミド摂取量 (n=14)

	Acrylamide intake (μg/body weight (kg)/day)					
	mean	SD	Median	Min.	Max.	
DM	0.106 ± 0.123	0.066	0.00	0.457		
DR	0.233 ± 0.192	0.183	0.064	0.710		
FFQ	0.128 ± 0.062	0.112	0.045	0.262		

SD, standard deviation; DM, duplicate method; DR, dietary record; FFQ, food frequency questionnaire.

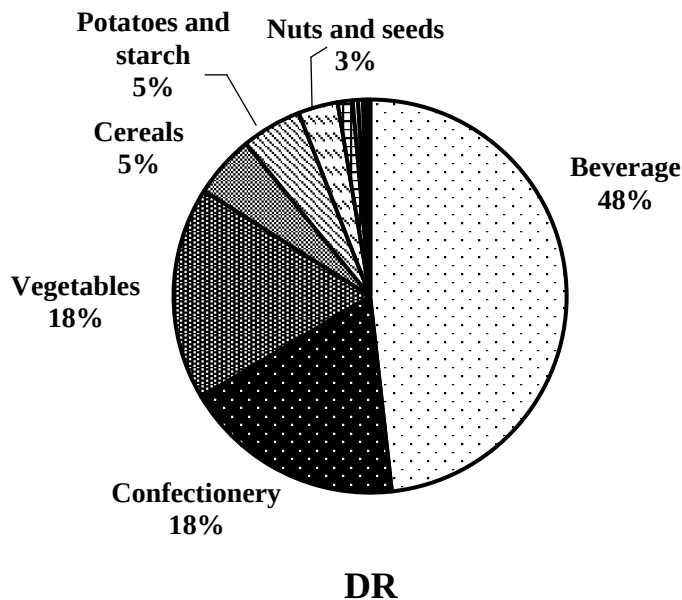


図1. 秤量法(DR)を用いたアクリルアミド摂取量の寄与食品と割合

2) 秤量法、食物摂取頻度調査法による推定値と陰膳法サンプル中アクリルアミド分析値との比較：祖父江友孝（大阪大学）

研究内容・方法

1-1)のDRと同日に収集した陰膳法(Duplicated Method: DM)の凍結食品サンプルは、全て料理毎に専用袋、容器に分けて、-30度で凍結保存されていた。これら料理毎のサンプルについて、外部機関(環境科学研究所、愛知)に委託して、定量限界0.005mg/kgで料理毎に分析し、一人1日分の各料理アクリルアミド量を合計して摂取量を算出した。DM分析値を比較基準とし、スピアマン相関係数を指標として1-1)において推定したDRおよびFFQの摂取量推定値の妥当性を検討した。

研究成果

14名の2日間食事記録中、料理サンプル数は270種類(夫婦での参加世帯及び同一対象者の料理サンプルの重複は削除、アクリルアミド含有量の分析が可能な30g以上の料理サンプルのみを抜粋)で、そのうち焼くが約18%、揚げるが約2%、炒めるが約6%であった。

DM分析値は $0.106 \pm 0.123 \mu\text{g}/\text{体重kg}/\text{日}$ であり、FFQおよびDRの推定値はDMの値より高く推定されていた(表2)。また、DRから推定したアクリルアミド摂取量を、DM分析値と比較すると、スピアマン相関係数は0.52であり、統計学的に有意ではないものの比較的高い相関係数を示した(図2)。

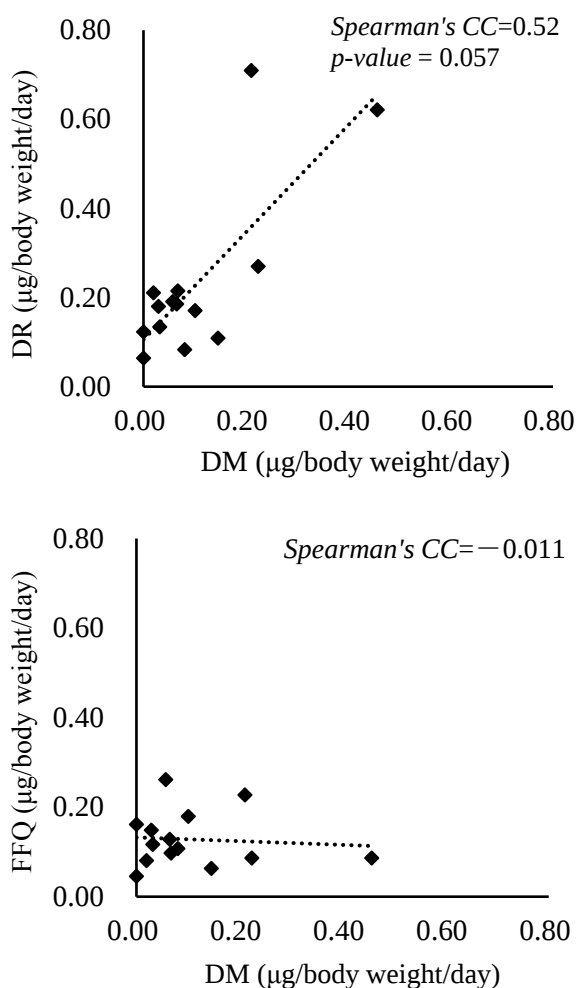


図 2. DM 分析値と DR,FFQ による推定値の関連

考察及び今後の課題

アクリルアミド含有量データベースを用いた推定によって、DMとDRで比較的高い正の相関が得られた。しかしながら、摂取量絶対値は過大評価している可能性があり、1-1)で述べたように、嗜好飲料類による過剰推定が影響したと考えられる。このようなアクリルアミド含有量データベースに由来する誤差が生じる可能性があることから、データベースは適宜更新していく必要がある。

一方で、DMとFFQでは相関がみられなかった。DRがDMと同日の摂取状況を調査しているのに対して、FFQは長期の摂取量を反映する調査法であるため、短期の摂取量評価法である2日間のDMと相関しなかった可能性が考えられ、本研究の比較基準であるDMが長期的ばく露を反映していない可能性が示唆された。今後は、複数日の秤量法などのデータを用いて、アクリルアミド摂取量の個人間変動などを検討し、長期的ばく露を反映する食事評価法の検討を行う必要がある。

また掲載食品による影響も考えられる。本研究では、発がんリスクの検討を目的として大規模コホート研究において用いられたFFQによるばく露評価の可能性を検討したが、このFFQにはアクリルアミドを高濃度で含む食品であるポテトチップスなどのスナック菓子類はFFQに含まれないため、これらの食品由来のアクリルアミドは摂取量に含まれず、過小評価されている可能性はある。ただし、DRにおけるスナック菓子類の寄与割合は10%以下とあまり高くなかったため、影響は小さいと考えられる。

(2) 大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連検討

1) 食事由来ばく露量推定方法の妥当性・再現性の検討 石原淳子（麻布大学）

研究内容・方法

大規模コホート研究において食事由来アクリルアミドのリスク評価を行うことを前提に、食物摂取頻度調査票（FFQ）から推定した摂取量の妥当性・再現性を検討するために、1995～1998年に2つのコホート研究の小集団（10地域からボランティアで参加した約500名を対象とした多目的コホートFFQ妥当性研究）から収集した既存データである、計2回のFFQ（おおよそ1年間隔）、および計28日間（7日間×4季節）の秤量法食事記録（DR）を用いた（コホートⅠ：n=215、コホートⅡ：n=350）。

FFQを用いた摂取量推定は、27年度に作成した日本食品標準成分表掲載食品に対してのアクリルアミド成分表による計算に加えて、DRデータを野菜の加熱調理法毎に整理し、家庭における調理を加味して摂取量を推定した。FFQから推定された摂取量をDRから推定された摂取量と比較することにより妥当性を検討した。また2回のFFQによる推定摂取量を比較することにより、再現性を検討した。

研究成果

日本食品標準成分表1878食品のうち、282食品がアクリルアミドを含む食品として推定に用いられた。DRを用いたアクリルアミド摂取量は、 $6.78 \pm 3.89 \mu\text{g}/\text{日}$ （コホートⅠ）、 $7.25 \pm 3.33 \mu\text{g}/\text{日}$ （コホートⅡ）であった。FFQを用いたアクリルアミド摂取量は、 $7.03 \pm 4.30 \mu\text{g}/\text{日}$ （コホートⅠ）、 $7.14 \pm 3.38 \mu\text{g}/\text{日}$ （コホートⅡ）で

あった。また、DRと比較したFFQ妥当性・再現性検討のスピアマン順位相関係数は、コホートⅠでは男性0.48、女性0.42、コホートⅡでは男性0.37、女性0.34であった（表3）

表3. FFQおよびDRから推定したアクリルアミド摂取量と、FFQの妥当性・再現性

	DR		FFQ		% *	妥当性 ^a	再現性 ^b
	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差		エネルギー 調整後	エネルギー 調整後
コホートⅠ							
体重あたり粗アクリルアミド摂取量(μg/体重kg/day)							
男性 (n=102)	0.10	± 0.06	0.11	± 0.07	5	0.48	0.62
女性 (n=113)	0.13	± 0.08	0.14	± 0.09	5	0.42	0.56
合計 (n=215)	0.12	± 0.07	0.12	± 0.08	2	－	－
コホートⅡ							
体重あたり粗アクリルアミド摂取量(μg/体重kg/day)							
男性 (n=174)	0.12	± 0.06	0.11	± 0.06	－7	0.37	0.61
女性 (n=176)	0.13	± 0.06	0.14	± 0.06	5	0.34	0.58
合計 (n=350)	0.12	± 0.06	0.12	± 0.06	3	－	－

DR, 食事記録; FFQ, 食物摂取頻度調査票.

*パーセント差(%): (FFQ-DR)/DR×100.

^aDRとFFQのスピアマンの順位相関係数.

^b2回のFFQのスピアマンの順位相関係数.

考察及び今後の課題

本研究によって、FFQを用いて推定されたアクリルアミド摂取量の妥当性・再現性が明らかになり、がんとの関連検討において摂取量の順位づけをすることに適していることが明らかになった。

ただし、FFQとDRは両方とも同じ成分表を用いて摂取量を推定することから、誤差の方向性が一致して見かけ上妥当性が高くなる可能性がある。そのため、今後は生体指標を用いたFFQの妥当性・再現性の検証についても検討を行う必要がある。多目的コホートFFQ妥当性研究では、同時に対象者から血液または尿検体を採取し、凍結保存していることから、本研究内ではアクリルアミドヘモグロビン付加体量や代謝産物の測定の可能性についても情報収集を行った。

2) 食事由来ばく露量とがん罹患リスクとの関連検討 祖父江友孝（大阪大学）

研究内容・方法

全国10 府県11 保健所管内の地域住民約14 万人（コホート研究開始時点年齢40～69歳）を対象とした「多目的コホートに基づくがん予防など健康の維持・増進に役立つエビデンスの構築に関する研究（多目的コホート研究）」（国立がん研究センター研究開発費、主任研究者：津金昌一郎）において、1995～1998 年に実施したアンケート調査（5 年後調査、138 食品項目を含む食物摂取頻度調査）を用いて、アクリルアミドの個人別摂取量を推定した。摂取量は2015～2016年度に作成した成分表を用いて算出され、推定値の妥当性が検証されている（Kotemori, J Epid

emiol, 2017) ものをうい、がんの主要部位（乳、肺、肝臓、子宮体、卵巣）罹患との関連を検討した。解析対象者男女各4~5万人（がん部位によって除外規定が異なるため、解析によって若干の差あり）を個人別摂取量によって三分位に分け、第一三分位を基準として、相対リスクを算出した。その際、アンケート調査により把握されている種々のリスク要因（がんの部位により異なる）によって調整したリスク比を指標として検討した。

研究成果

乳がん：コホート集団（女性）におけるFFQを用いたアクリルアミド摂取量平均値（標準偏差）は7.0（3.7） $\mu\text{g}/\text{日}$ 、体重あたりでは0.14（0.13） $\mu\text{g}/\text{kg体重}/\text{日}$ であった。寄与食品は(2)-1)FFQ妥当性研究の食事記録による寄与食品と概ね類似していた。寄与率が高いものからコーヒー、緑茶、ビスケットおよびクッキー、じゃがいも、野菜が挙げられた（図3）。また、三分位の群別に層別した際、摂取量の違いに最も大きく寄与している食品はコーヒーであった（図4）。

乳がんとの関連を検討したところ、種々の交絡要因で調整を行っても、アクリルアミド摂取量による有意なリスク上昇は認められなかった。交互作用の影響を除くために、喫煙習慣、コーヒー摂取量、アルコール摂取量、体格、月経状況、さらには腫瘍組織中のホルモン受容体別に関連を検討したが、いずれも有意なリスク上昇はみられなかった（図5）。

子宮体がん：子宮体がんとの関連を検討したところ、アクリルアミド摂取量が多い者ほど有意にリスクが低かった。生殖要因などの交絡要因を調整しても関連は失われなかったが、コーヒー摂取量で調整をすると有意な関連はみられなくなった。また、コーヒー摂取による層別解析の結果、有意なリスク低下は、コーヒーを摂取している者のみにおいて見られた。

卵巣がん：アクリルアミド摂取量による有意なリスク上昇は認められなかった。さらに、乳がんと同様に層別解析を行ったが、有意なリスク上昇はみられなかった。

肝臓がん：肝臓がんとの関連を検討したところ、アクリルアミド摂取量が多い者ほど有意にリスクが低かったが、コーヒー摂取量で調整をすると有意な関連はみられなくなった。コーヒー摂取による層別解析を行ったところ、有意なリスク低下は、コーヒーを摂取している者のみにおいて見られた。

肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん：各がんとの関連を検討したところ、種々の交絡要因で調整を行っても、アクリルアミド摂取量による有意なリスク上昇は認められなかった。交互作用の影響を除くために、喫煙習慣別に関連を検討したが、いずれも有意なリスク上昇はみられなかった。

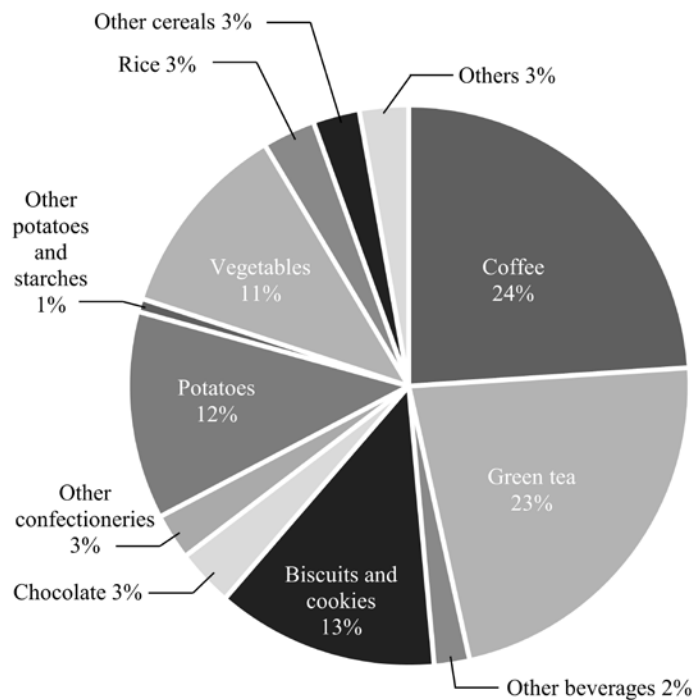


図3. FFQを用いて推定したアクリルアミド摂取量に寄与する食品とその寄与割合

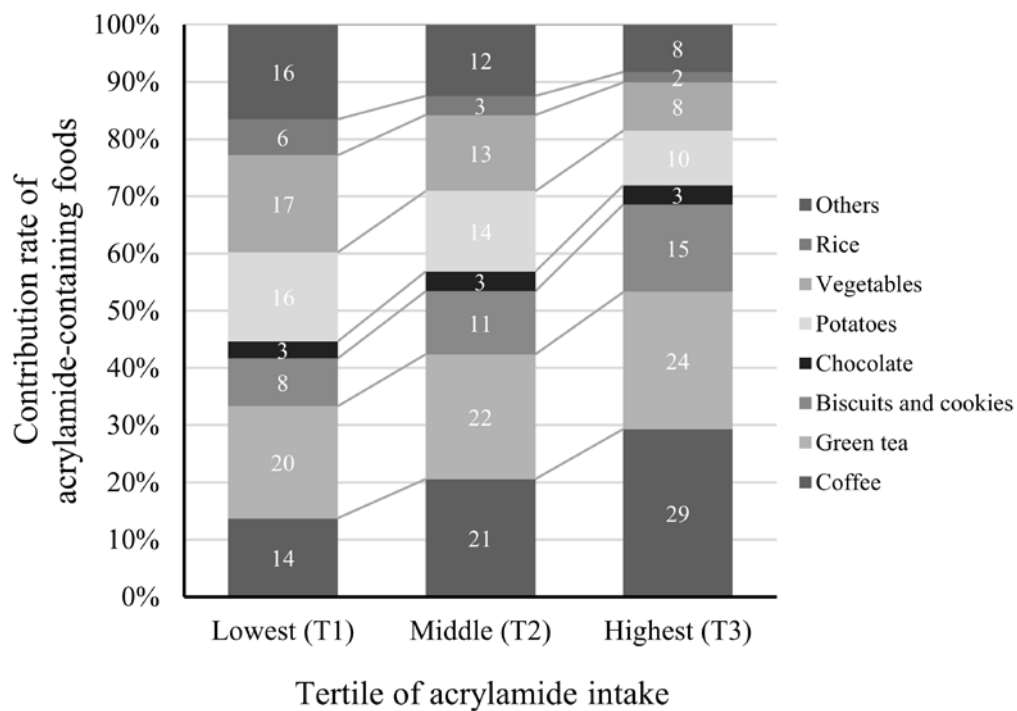


図4. FFQを用いて推定したアクリルアミド摂取量に寄与する食品とその寄与割合
(摂取量による三分位群別)

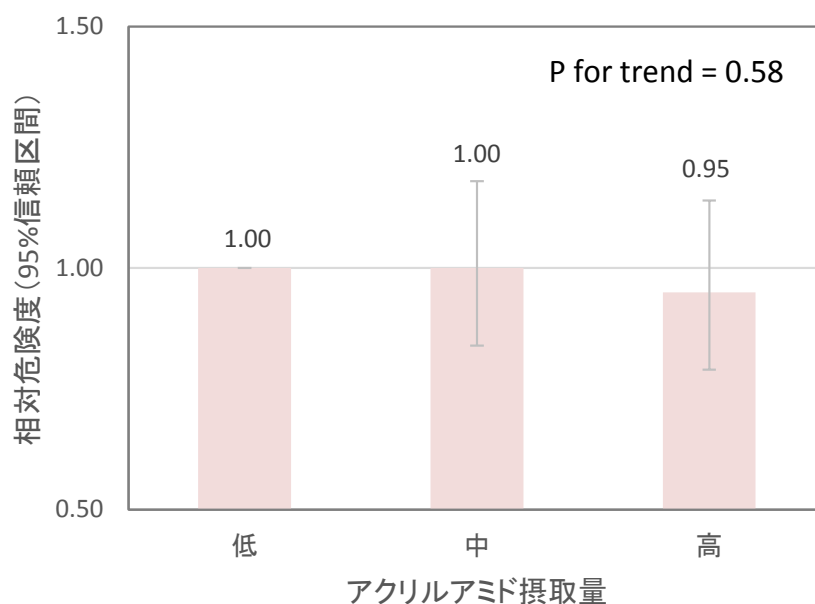


図5. アクリルアミド摂取量と乳がんリスクの関連

考察及び今後の課題

大規模コホート集団において推定したアクリルアミド摂取量平均値は、欧米諸国の平均値と比較して低く、欧米の最小群や第2五分位群に相当した¹¹⁻¹⁴。欧米では焼き菓子、フライドポテト、スナック菓子が主な供給源になっていたが、日本人ではコーヒーや緑茶など、飲料が寄与食品であり、供給源が異なることが明らかになった。

各種部位別がんと食事由来アクリルアミド摂取量との関連を調べた解析結果は、乳がん、卵巣がん、肺がん、食道がん、胃がん、大腸がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がんでは関連が見られなかった。また子宮体がん、肝がんでは摂取高群においてリスクが下がり、コーヒー摂取量で調整をすると有意な関連はみられなくなった。コーヒーはアクリルアミドの寄与食品であると同時に、子宮体がん、肝がんの予防因子であることが明らかになっている。本研究においては、アクリルアミドの発がん作用よりも予防効果が上回っていたと考えられる。

(3) 生体指標を用いたアクリルアミドの長期ばく露評価と摂取量との関連

1) 血液および尿検体の収集（祖父江友孝（大阪大学））

研究内容・方法

対象集団は茨城県つくば市、東京都町田市、神奈川県相模原市とこれらの周辺地域に在住の約100名(男女各約50名、年齢20～60歳代)を目標とし、2015～2016年にかけて、陰膳試料、秤量法食事記録を収集（河原班担当）した後、採血による血液検体の収集を行った。対象者の募集は、国立環境研究所や相模女子大学のホームページ、配布物、掲示板等を通じて行い、対象集団は性、年齢に偏りを避けるために、10歳ごとの年齢階級で男女計20名となるように調整した。

採血は相模女子大学内およびつくば市内の会議室等にて、食事調査実施から3日～

3ヶ月の期間（若干名最長5ヶ月）に行った。対象者は、あらかじめ調整した指定の日時に絶食の状態で採血会場に会場するように依頼した。採血はヘパリン採血管を用いて10mlを採取し、遠心分離（3500～4000rpmで10分間）後、赤血球（1.0ml×2本）、血漿（1.0ml×4本）、buffy coat（1.0ml×1本）を分注した。また、分離剤入り採血管を用いて8mlを採取し、遠心分離（3500～4000rpmで10分間）後、血清（1.0ml×3本）を分注した。これらは分注後、-80℃で凍結保存した。また、残存血清を用いて、一般検査項目（中性脂肪（TG）、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、GOT、GPT、γ-GTP、尿酸、ヘリコバクター・ピロリ抗体）の測定を行って、測定結果の返却を希望する対象者に対しては返却することとした。

さらに、2016年度は、新たに尿中代謝産物の測定を想定して、尿検体の収集を追加実施した。2016年度対象者には、あらかじめ採尿キット（採尿カップ（JESCO HEALTH CUP）、採尿ビン（10cc））を送付し、採血調査当日の早朝尿（朝、起床して最初の尿）を採取、調査会場に持参するよう依頼した。2015年度対象者には、血液一般検査項目の結果返却時に採尿追加調査の説明文書を同封、参加意向を得られた対象者に採尿キットを送付し、あらかじめ調整した指定の調査日に同意書とともに持参するよう依頼した。採尿は約10ml採取し、5.0mlクリオピュアチューブを用いて4mlを分注後、-80℃で凍結保存した。また、残存尿を用いて一般検査項目（尿中クレアチニン）の測定を行って、測定結果の返却を希望する対象者に対しては返却することとした。

研究成果

27年度からの陰膳の実施対象者延べ人数119名のうち、血液検体の提供を受けたのは102名（男性43名、女性59名、回収率85.7%）、尿検体の提供を受けたのは90名（男性39名、女性51名、回収率75.6%）であった（表4）。

2) FFQの収集（石原淳子（麻布大学））

研究内容・方法

陰膳と同日の秤量法食事記録を収集の際、対象者に食物摂取頻度調査票（FFQ）への記入を依頼し、郵送にて回収した。FFQは、多目的コホート研究班（国立がん研究センターがん研究開発費 課題名：「予防研究基盤としてのコホート研究の維持と規模の拡大—多目的コホートに基づくがん予防など健康の維持・増進に役立つエビデンスの構築に関する研究」（主任研究者 津金昌一郎 国立がん研究センター社会と健康研究センター長））で用いられたマークシート式の調査票を用いた。FFQは138食品の摂取頻度とポーションサイズ、調理法などの食習慣、その他生活習慣に関する質問により構成されており、対象者は回答日より過去一年間の食習慣について振り返り回答する。郵送によって回収したFFQの回答内容を調査員が確認し、記入漏れなどの際には電話等により問い合わせを行った。

研究成果

陰膳の実施対象者のうち、FFQを受領したのは106名（男性45名、女性61名、回答率89.1%）であった（表4）。

表 4. 血液・尿検体および FFQ の性・年齢階級別回収者数

年齢区分	人数（人）					
	男性			女性		
	血液	尿	FFQ	血液	尿	FFQ
20-29歳	10	9	10	13	10	13
30-39歳	8	7	8	12	12	12
40-49歳	8	6	9	15	11	16
50-59歳	8	8	8	14	13	14
60歳以上	9	9	10	5	5	6
合計	43	39	45	59	51	61

3) アクリルアミド-ヘモグロビン付加体を用いた長期ばく露の評価 (京都大学)

松井康人

3-1) 前処理・定量方法の検討

研究内容・方法

アクリルアミド (Acrylamide, AA) 摂取量に対するヒト血中の累積的指標として多くの報告がある、ヘモグロビン (Hemoglobin, Hb) へのアクリルアミド付加体 (AA-Hb) について、その定量方法をはじめに検討した。過去の研究で多くの報告があるエドマン分解法 (Edman degradation) による前処理方法では、測定対象としている付加体が、プロピオンアミド化したバリン (図 6) であることから、①血中の遊離アミノ酸由来の濃度増加が考慮されていない。また、過去の研究で使用している内部標準物質も様々であり、同位体元素を用いた内部標準物質をエドマン分解前に赤血球試料に添加することで、②試料間の分解率を補正できる方法の開発を試みた。

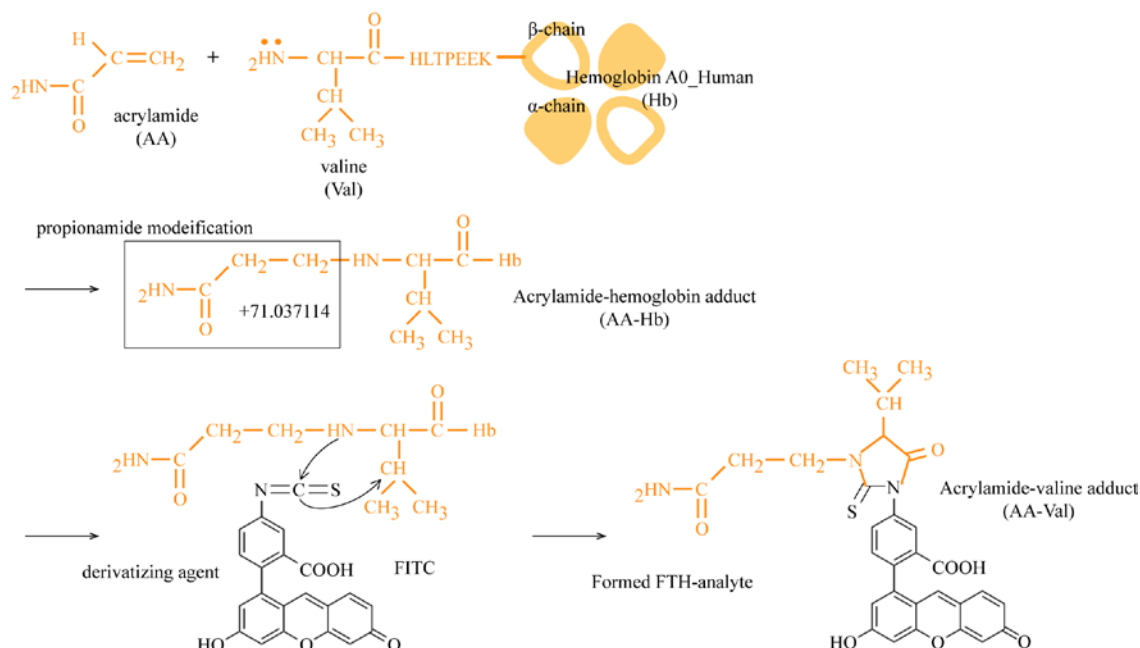


図 6. 測定対象としたヘモグロビン付加体の構造式

その上で、③赤血球試料中のアクリルアミド付加体由来のバリン付加体 (AA-Val) の、質量分析装置を用いた同定、定量と、④その測定値に関する既報の海外論文との比較、検証を試みた。①に関する実験方法として、赤血球試料とは別に、採血直後の全血を用いることとした。全血を遠心分離し赤血球層を分取したものを、0.9%塩化ナトリウム（生理食塩水）で3回洗浄した。もう一方には、同じく生理食塩水で洗浄した後に、エタノール沈殿により遊離アミノ酸を除去することで、値の違いを検証した。②については、旧来の方法では内部標準物質としてエドマン分解後の物質を使用していることから、FITC（フルオレセイン-5-イソチオシアネート、fluorescein isothio-cyanate）によるエドマン分解率が試料間で変動することが考慮できていない。そこで既存の内部標準物質に対し、エドマン分解法の分解対象となる、ヘモグロビン中のグロビンたんぱく質B鎖をトリプシン消化した、N末端側の8残基アミノ酸 (VHLTPEEK) に変更することで、分解率の差を考慮した定量方法を検証することとした。様々な濃度の VHLTPEEK に FITC を一定量加えてこれをエドマン分解し、生成物として Val-FTH を得た。これに対して、同位体ラベル化した N 末端側の 8 残基アミノ酸 (V(13C5;15N)HLTPEEK) を同様に分解し、Val(13C5;15N)-FTH を得ることで、これらの濃度比 (Val-FTH/Val(13C5;15N)-FTH) が、対応する VHLTPEEK 濃度と比例関係にあるかどうかを確認した。③については、サンプルを3回エタノール沈殿処理し、アセトンを加えて遠心分離することで Hb を含む精製たんぱく質を沈殿させた。これに FITC 試薬を加え 18 時間インキュベートさせ、SPE カラムにより固相抽出したものを LC/MS/MS により分析した。

研究成果

血中遊離アミノ酸に対する①の検討結果として、図7のマススペクトルを得た。左側のグラフが遊離アミノ酸の除去を行わなかったもののマススペクトル、右側のグラフが遊離アミノ酸の除去を行ったもののスペクトルを表している。上から順に、AA-Valの内部標準物質がFITCによってフルオレセイン化されたもの (AA-Val(13C5;15N)-FTH)、AA-Valのフルオレセイン化されたもの (AA-Val-FTH)、Valの内部標準物質がフルオレセイン化されたもの (Val(13C5;15N)-FTH)、Valのフルオレセイン化されたもの (Val-FTH) のマススペクトルを示す。遊離アミノ酸の影響を考察するため、Val-FTHのトータルイオン強度を比較すると、遊離アミノ酸除去を行っていないものではVal-FTHの値は 3.31×10^7 、遊離アミノ酸除去を行ったものでは 1.21×10^7 であった。内部標準物質として加えたVal(13C5;15N)-FTHの値は遊離アミノ酸を除去しなかったものは 5.43×10^5 であり、除去したものは 2.45×10^5 であった。この結果から、Val-FTHをVal(13C5;15N)-FTHで除した値は、それぞれ60.9、49.4と算定され、除去したものに比べて約1.25倍の高値となった。そのため、遊離アミノ酸を除去しなかった場合には、遊離アミノ酸中のバリン由来のVal-FTHが全体の17%程度存在することが試算できた。

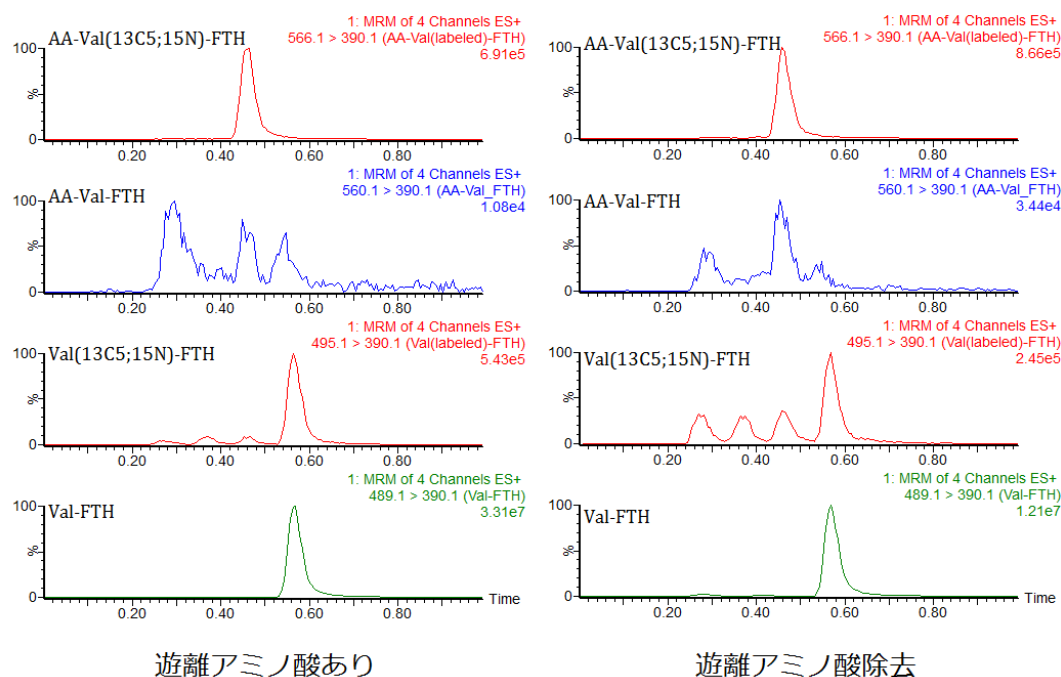


図7. 遊離アミノ酸の除去前後におけるVal-FTHのマスペクトルの比較

②の検討結果として、図8の検量線を得た。グラフの横軸はエドマン分解の対象となる、グロビンたんぱく質鎖をトリプシン消化した、N端末側の8残基アミノ酸 (VHLTPEEK) の濃度 (mM) を示しており、縦軸は分析によって得られたVHLTPEEKのエドマン分解の生成物であるVal-FTHのイオン強度を、その内部標準物質である生成物のVal(13C5;15N)-FTHの値で除したもの (図8中の縦軸、Val-FTH/labeled Val-FTH) である。相関係数が0.9862であり良好な直線関係を認めた。従って、エドマン分解で反応するVHLTPEEKを内部標準物質 (V(13C5;15N)HLTPEEK) として用いることで、測定対象としているAA-Valの量を、血液試料間の分解率の変動を考慮した前処理方法を確立することができた。

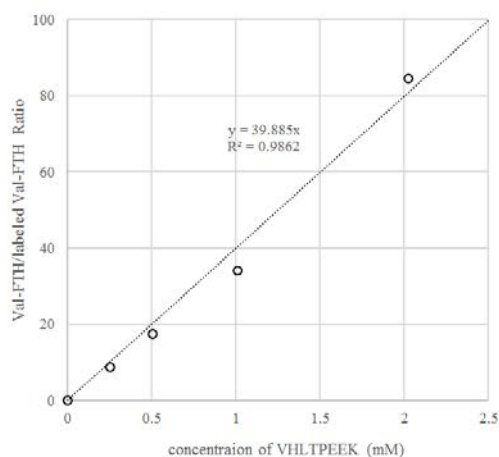


図8. ペプチド濃度に対する分解生成物 (Val-FTH) 比を用いた検量線

考察及び今後の課題

過去の大半の研究報告が付加体と称しているAA-Valに対し、グロビンβ鎖をトリプシン消化したN末端側の8残基のアミノ酸（AA-VHLTPPEEK）を標準物質として用いることで、定量が可能であることを認めた。また、既存の研究報告に対し、ヒト血中に存在している遊離バリン由来のAA-Valを考慮し、同位元素を用いた内部標準物質により、エドマン分解率を考慮することなく定量できる新たな手法を開発することができた。さらにこれまでの報告と比較すると、約10分の1という微量試料を用いた、より高感度で精密な前処理方法と定量方法を確立することができた。

3-2) ヘモグロビン付加体の定量と陰膳からの摂取量との比較

研究内容・方法・成果

AA-Val定量によって得られた、③に関する結果を表5に示す。全体の平均値は45.55 pmol/gHb、標準偏差は34.16 pmol/gHbであり、測定値の範囲は11.91~249.5 pmol/gHbであった。男女毎に母集団を分けたところ、男性の平均値は44.86 pmol/gHb、標準偏差は31.54 pmol/gHbであり、測定値の範囲は11.91~146.0 pmol/gHb、女性の平均値は46.06 pmol/gHb、標準偏差は36.20 pmol/gHbであり、測定値の範囲は15.35~249.5 pmol/gHbであった。男女間の平均値の間には大きな差は検出できなかった。また喫煙習慣の違いに着目し、母集団を喫煙者と非喫煙者に分けて比較したところ、喫煙者の平均値73.57 pmol/gHbが、非喫煙者の平均値である38.29 pmol/gHbよりも、やや高い値を示した。なお喫煙、非喫煙のアンケート項目には未回答者が2名おり、この2名のデータは喫煙、非喫煙の比較では除外し、それぞれの値を求めている。

表5. ヒト血中AA-Val付加体濃度の測定結果

	AA-Val level (pmol/g Hb)						
	mean	SD	Min.	25percentile	Median	75percentile	Max.
Total (n=102)	45.55 ±	34.16	11.91	25.53	35.69	53.05	249.5
Men (n=43)	44.86 ±	31.54	11.91	22.65	33.96	57.27	146.0
Women (n=59)	46.06 ±	36.20	15.35	27.00	39.21	50.89	249.5
Non-Smoker(n=79)	38.29 ±	29.14	11.91	24.15	32.57	44.23	249.5
Smoker (n=21)	73.57 ±	38.16	13.76	51.80	68.29	94.42	150.2

また、陰膳法によるアクリルアミド摂取量調査を行った日から、採血を行った日までの日数が調査協力者によって一定では無かったことから、陰膳の調査日から採血までの日数が一週間以内の集団（・1week、図9中の○印）、一週間から一ヶ月半までの集団（1week-1.5month、図9中の□印）、一ヶ月半から三ヶ月までの集団（1.5month-3month、図9中の△印）という3つの集団に層別化した上で、陰膳法により得られたアクリルアミドの一日当たり摂取量（AA Intake (ng/day)）を縦軸に、AA-Val (pmol/g Hb)を横軸に取り、得られたデータをプロットし図9を得た。図中の直線は母集団毎の回帰直線であり、原点を通らない直線を仮定した回帰式と相関係数を示している。陰膳調査日から採血までの日数が一週間以内の集団では、

AA Intake とAA-Val levelの間にわずかな相関（R²値が0.1842）が見られるものの、一週間から一ヶ月半までの集団、一ヶ月半から三ヶ月までの集団との間では相関が認められなかった。

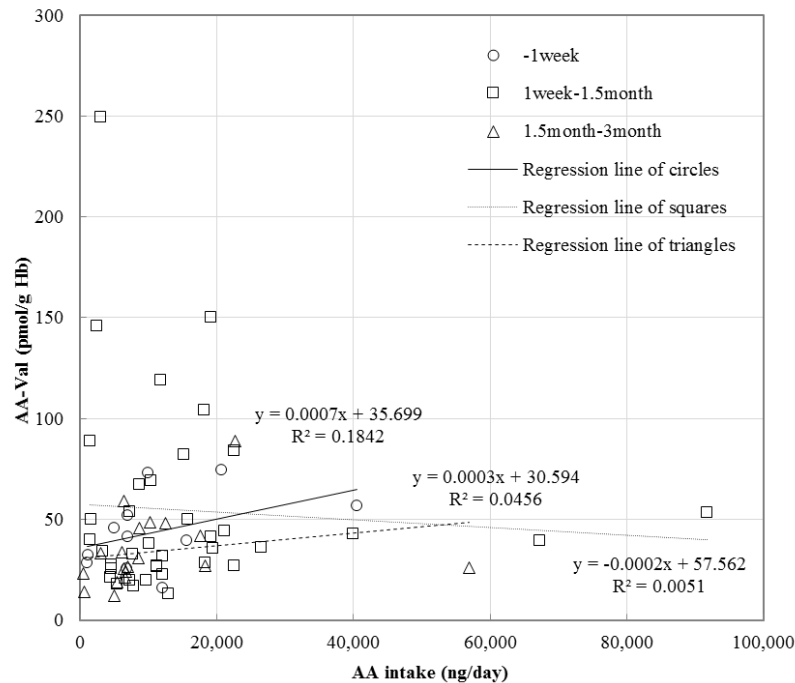


図9. 陰膳法による一日当たりアクリルアミド摂取量と付加体量との関係

考察及び今後の課題

喫煙者の付加体（AA-Val）濃度が、非喫煙者のそれと比べると平均値で1.9倍程度高くなるという結果が得られた。Hubert W.Vesperらによる先行研究（表6の2段目）では、喫煙者のAA-Val平均値が114 pmol/gHb、非喫煙者の平均値が48.2 pmol/gHbという結果が示されている¹⁵。これらのことを踏まえると喫煙習慣が付加体濃度の増加を促すという傾向が本研究においても再認できた。これを支持する結果は、過去の研究においても確認されている¹⁵⁻²⁰が、その程度は一定ではなく、喫煙習慣の強度にも依存するものと推測される（表6）。

陰膳調査日から採血日までの期間の層別化については、期間が一週間以内の集団は、一週間から一ヶ月半までの集団と一ヶ月半から三ヶ月までの集団と比較すると、アクリルアミド摂取量と付加体量との間に比較的高い相関を得た。ヒトのヘモグロビン寿命を考慮すると、ばく露マーカーとしての付加体は累積的なばく露量を表現している可能性がある。ヘモグロビンA1c（HbA1c）のマーカーを例に考えると、付加体の対するアクリルアミド摂取量の過去の影響程度は、直前の一カ月が約50%とされていることから、層別化により得られた値には妥当性があると示唆できる。また、国外の調査値とも大きな乖離が無かったことから、有用なばく露マーカーであると結論付けられた。

今後、喫煙のほか、年齢、体重、など他の要因も考慮した場合の摂取量との関連について解析を進めていく。

表6. ヘモグロビン付加体濃度の過去の研究報告との比較

Reference	Exposure	N	AA-Val level (pmol/g Hb)	
This study	smokers	21	73.57 ± 38.16	Mean ± SD
	non-smokers	79	38.29 ± 29.14	Mean ± SD
Hubert W. Vesper et al.2013	smokers	1,067	114 (104-125)	Mean (95% CI)
	non-smokers	2987	48.2 (46.4-50.1)	Mean (95% CI)
Pietro Ferrari et al.2012	smokers	255	116.5 (28.1-75.4)	GM (90% CI)
	non-smokers	255	44.4 (53.8-243.8)	GM (90% CI)
Hubert W. Vesper et al.2010	smokers	1316	113 (103-123)	GM (95% CI)
	non-smokers	5,686	50.0 (48.5-51.7)	GM (95% CI)
Nur Duale et al.2008	smokers	6	154.00 ± 19.00	Mean ± SE
	non-smokers	43	40.00 ± 2.25	Mean ± SE
Thomas Schettgen et al.2004	smokers	16	80 ± 47	Mean ± SD
	non-smokers	13	19 ± 7	Mean ± SD

4) その他のばく露指標の利用に関する探索的検討

松井康人（京都大学）

研究内容・方法

アクリルアミドの一部が血中のヘモグロビンに付加することが知られている。ヘモグロビンは、2つのα鎖とβ鎖のグロビンたんぱく質からなる4量体であり、アクリルアミドはβ鎖 N末端にシッフ塩基として付加し、この反応は不可逆的である。シッフ塩基はカルボニル化合物と芳香族アミン（本研究ではこれがHb β鎖 N末に相当する）が、アミン中窒素の求核電子対による求核電子反応により脱水縮合し、反応が進む。前述した「3-1）前処理・定量方法の検討」においては、その安定体としてのプロピオンアミド化グロビンβ鎖（AA-Hb、図6中の2段目）の定量を、エドマン分解によるバリン付加体（AA-Val、図6中の3段目）として定量することを検討した。

本章では、アクリルアミドヘモグロビン付加体の定量を実施している過去の研究報告から、その対象物（構造）と前処理方法を調査し、測定の可能性について検討した。また、アルカリ性下で精製ヒトヘモグロビン（MP biomedical社）溶液をSPEカラムで精製したものを、LC/MS/MSにて分析することで、付加領域とその構造の網羅的な解析を実施し、還元とアルキル化の処理に対する定量性についても検討した。

研究成果

過去の研究報告においては、アクリルアミドヘモグロビン付加体がどのような前処理方法を経て、どのような測定方法で、どのような指標として利用されているかの観点から、文献調査を実施した。

その結果、表7の通りにほぼすべての報告が、β鎖 N末端のバリン（valine, Val）への付加体（AA-Val）を測定対象としており、その前処理方法としてN末端側の1残基のアミノ酸のみを分解、分離することが可能なエドマン分解を用いていた。分解に利用されている誘導体化試薬については数種の報告があり、定量用の標準物質についてはほとんどの報告で、AA-Valのようなエドマン分解後の生成物を化学合成したものを使用していた。一方で、グロビンβ鎖をトリプシン消化したN末端側の8残基のアミノ酸（AA-VHLTPEEK）を生成し、その後AA-Valを測定している報告は存在するものの、これ自体を定量している報告は見つけることができなかった。また、この8残基アミノ酸（VHLTPEEK）を血液試料と共にエドマン分解し、内部標準試料として使用している報告も無かった。HbA1cを例に挙げると、AA-Val

もアクリルアミド摂取に対する累積的なばく露指標と考えられるものの、指標としての意義を示している論文は、ヒトによる調査ではほとんど存在しないのが現状と言えた。

表7. 文献調査によるヘモグロビン付加体定量方法の検討

Title	Quantitative Target	Preprocessing and Quantitative Equipment
Alcohol influence on acrylamide to glycidamide metabolism assessed with hemoglobin-adducts and questionnaire data	Hb adducts to N-terminal valine	GC-MS
A new modified Edman procedure for analysis of N-terminal valine adducts in hemoglobin by LC-MS/MS	AA-Val-FTH, d3-AA-Val-FTH, AA-d7-Val-FTH, GA-Val-FTH, d3-GA-Val-FTH, GA-d7-Val-FTH, EO-Val-FTH, EO-d7-Val-FTH	Edman degradation, N-alkyl Edman method LC-MS
Monoclonal antibody development for acrylamide-adducted human hemoglobin; A biomarker of dietary acrylamide exposure	Hb adducts to N-terminal valine	Edman degradation, N-alkyl Edman method LC-MS
Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice administered single doses of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide	C5-AA-Val-PFPTH, C5-GA-Val-PFPTH	Edman degradation, N-alkyl Edman method LC-MS
Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis	GA-d7Val-PFPTH	Edman degradation, N-alkyl Edman method GC-MS
Laboratory Procedure Manual (CDC)	AA-VHLTPEEK, GA-VHLTPEEK, Isotope labeled AA-Val(13C5 15N)-HLTPEEK, GA-Val(13C5 15N)-HLTPEEK	LC-MS/MS
Analysis of hemoglobin adducts	AA-Val-PTH, GA-Val-PTH	Edman degradation, N-alkyl Edman method LC-MS
Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment	N-(2-carbamoyl-ethyl)[2H7]valine-PFPTH for AA-Val adducts, N-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)[2H7]valine-PFPTH for GA-Val adducts	Edman degradation, N-alkyl Edman method GC-MS
Differences in hemoglobin adduct levels	AA-Val-PFPTH	GC-MS
Simultaneous quantification of hemoglobin adducts	Hb adducts to N-terminal valine	GC-MS

次にプロピオンアミド化アミノ酸の量に対する、DTT (Dithiothreitol)、IAA (Iodoacetamide) 処理の影響について検討した。アクリルアミド添加濃度を3種 (AAが0.01、0.1、1 $\mu\text{g/mL}$) 用意し、精製ヒトヘモグロビンに添加しインキュベートしたところ、DTT、IAAによる処理を施さない試料群において、プロピオンアミド化アミノ酸量がより多く検出できた。この結果から、DTT、IAAの両処理を施さず、付加部位の網羅的検索を実施することとした。図10に、精製ヒトヘモグロビンにアクリルアミドを添加した際に、プロピオンアミド化されたリシンの数を付加した部位別に示す (α 鎖のN末端から7番目のリシンについては $\alpha 7$ と表記)。Hb-1AAは精製ヒトヘモグロビンへのアクリルアミドの添加濃度が1 $\mu\text{g/mL}$ 、Hb-10AAは10 $\mu\text{g/mL}$ 、Hb-100AAは100 $\mu\text{g/mL}$ のアクリルアミドを添加しており、ブランクはアクリルアミドの代わりに同量の超純水を添加している。 $\alpha 61$ と $\beta 66$ のリシンが、比較的多くプロピオンアミド化されていることを認めた。またアルギニン、アスパラギン、グルタミンのプロピオンアミド化は確認できなかった。

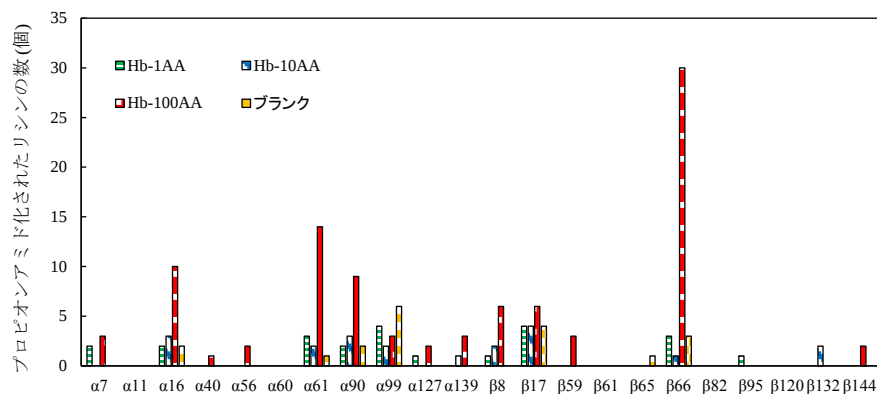


図10. プロピオンアミド化されたリシン数

図11に、精製ヒトヘモグロビンにアクリルアミドを添加した際のextracted ion chromatogram (XIC) で得られた3+のMSクロマトグラムを示す。図中の矢印の位置に測定対象物のピークを認め、グロビンβ鎖をトリプシン消化したN端末側の8残基のアミノ酸 (AA-VHLTPEEK) であることが確認できた。さらにこれらは、すべてのAA添加濃度 (ヒト精製ヘモグロビンHb 1,000 $\mu\text{g/mL}$ に対し、アクリルアミドを1 (Hb-1AA)、10 (Hb-1AA)、100 (Hb-1AA) $\mu\text{g/mL}$ 添加) において確認することができた。

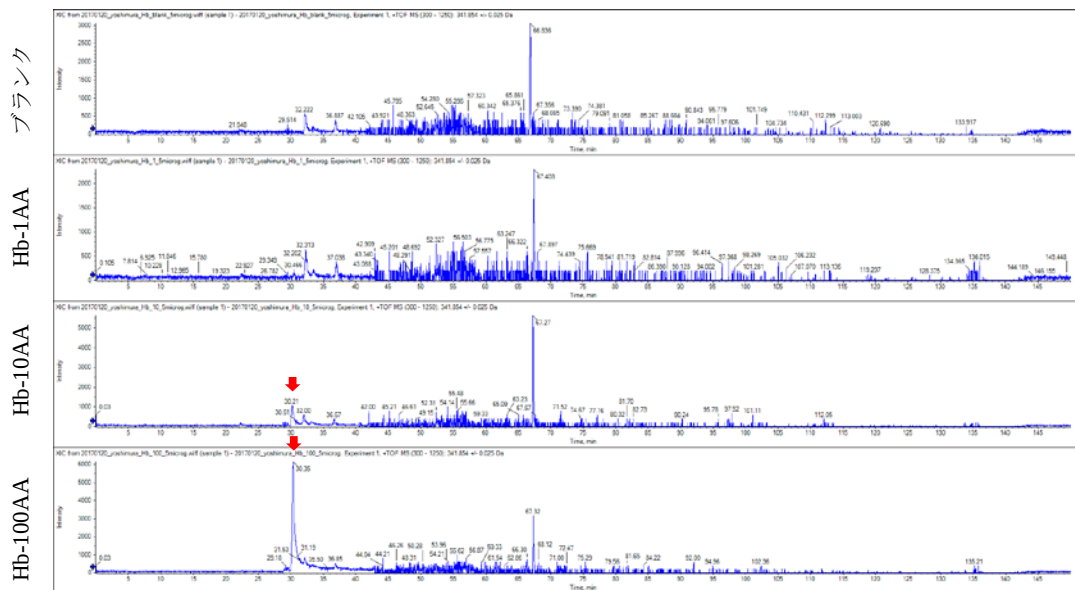


図11. AA-VHLTPEEKのクロマトグラム

考察及び今後の課題

たんぱく質の最適な前処理方法を検討し、ヒト精製ヘモグロビンへのアクリルアミド添加実験を行った結果、一般的な前処理方法である、還元・アルキル化処理による付加体生成量の減少が示唆された。従って、これらの処理を施さず、アミノ酸への付加部位を網羅的に計測したところ、 $\alpha 61$ と 866 のリシンがプロピオンアミド化されやすいことを認めた。従来、バイオマーカーとして利用されてきたヘモグロビンβ鎖のN末端バリンへの付加は、LC/MS/MSによる同定のみにとどまっており、付加部位に関する検討はなされていない。これはN末端バリン以外のアミノ酸やその部位についても、付加体としての有用なマーカーとなる可能性を示唆しており、アクリルアミド添加量に対する付加体生成の量-反応関係を明らかにしていくことが期待される。

5) 陰膳法による分析値および秤量法食事記録と、生体指標との関連検討 石原淳子 (麻布大学)

研究内容・方法

アクリルアミド摂取量を反映する生体指標として、赤血球検体のアクリルアミド-

ヘモグロビン付加体を測定した分析値と、1日陰膳法摂取量との関連性を検討するため、国立環境研究所（国環研）において測定された後に、提供を受けた陰膳サンプル分析データと、当研究班の検体データの照合を行ったところ、検討可能な対象者数は89名であった。陰膳法を用いたばく露評価（摂取量推定）値と、生体指標であるアクリルアミドヘモグロビン付加体の関連を調べるため、摂取量推定値によって三分位に分け、各群の分析値を比較した。

秤量法に関しては当初計画では全データを収集・データ化することを検討したが、河原班の研究課題に必須の陰膳法分析に必要な情報の入手と両立することが、両班の協議において判明したため、全食品についてのデータ化は行わず、必要部分のデータを、調査原票を用いて事後的に抽出し、FFQを用いたアクリルアミド摂取量推定のための情報を得ることとした。

研究成果

解析対象者を摂取量推定値によって三分位にわけ、重回帰分析を用いて性別および喫煙状況を調整した上で、各群のアクリルアミドヘモグロビン付加体濃度の幾何平均値を算出したところ、摂取量が高い群で、アクリルアミドヘモグロビン付加体濃度が高いことが明らかになった（表8）。

表8.摂取量推定値の三分位群別アクリルアミドヘモグロビン付加体濃度(pmol/gHb)

DM				FFQ			
	n	GM (95% CI) ^{a, b}			n	GM (95% CI) ^{a, b}	
Tertile of each acrylamide intake							
T1	29	46.0	(36.9 - 57.3)		29	44.4	(35.4 - 55.8)
T2	30	48.3	(38.0 - 61.4)		30	52.5	(41.2 - 66.9)
T3	30	64.5	(50.5 - 82.5)		30	59.9	(47.0 - 76.3)
p for trend		0.02				0.04	

GM, geometric mean; CI, confidence interval; DM, Duplicated method; FFQ, food frequency questionnaire; T1-T3, Tertiles of acrylamide intake estimated from DM or FFQ.

^a Adjusted for sex and smoking status.

^b Geometric means were calculated by back transforming the arithmetic means of the log-transformed values

考察及び今後の課題

本研究によって、DMを用いたアクリルアミド摂取量推定値とアクリルアミドヘモグロビン付加体濃度の間に関連が見られ、アクリルアミドヘモグロビン付加体濃度はアクリルアミド摂取量を反映する生体指標となる可能性が示唆された。

欧米における先行研究では、本研究と同じ方法を用いて測定したアクリルアミドヘモグロビン付加体濃度が、個人レベルのばく露を反映する生体指標として用いられ、コホート内症例対照研究などの疫学研究が実施されている²¹⁻²²。本研究は、国内において日本人の生体試料からアクリルアミドヘモグロビン付加体濃度を測定し、それを食事摂取量推定値と比較した初の研究で、今後、日本人におけるアクリルアミドのリスク評価をさらに進める上で重要な知見である。

今後の課題としては、ばく露量（推定値および付加体濃度）の個人内変動に関する

検討を行う必要がある。本研究では短期間（1日）のDMを収集した後、1週間から3カ月程度の間に採血された検体を用いて測定を行っている。アクリルアミドは過去1ヶ月程度の長期間の摂取量を反映することがわかっているが、今回の結果からは1日の摂取量推定値であるDMとの相関が高かったことから、個人内におけるアクリルアミド摂取量の日々の変動が大きくない可能性が示唆された。一方で、本研究課題(1)においてDMのパイロット研究として14名を対象に行った研究においては、短期指標(DM)と長期指標(FFQ)の相関が低かったという結果(図2)は、本課題の結果とは一致しなかった。今後、個人内変動について十分な検討を行っていくことが不可欠で、アクリルアミドヘモグロビン付加体濃度が推定値(摂取量)を反映する期間を明らかにするために、陰膳法から採血までの期間の違いによる測定値と推定値との関連性を、本研究のデータを用いて検討すると同時に、一人当たりの摂取量データと検体が複数日ある研究データを用いて、ばく露量の個人内変動を検討し、長期のアクリルアミドばく露評価のための適切な指標を検討する必要がある。

6) FFQを用いた長期間の摂取量推定と、生体指標との関連検討 石原淳子(麻布大学)

研究内容・方法

国環研との共同研究において収集された陰膳を伴う秤量法を用いて、家庭での加熱調理についての情報を調理コードとして調理法ごとに整理する作業を行った。その結果を、FFQを用いた摂取量推定に反映させた((1)-1)の方法)後、アクリルアミドヘモグロビン付加体測定値と、FFQから推定される長期間の個人別摂取量推定値を比較した。

研究成果

FFQを用いた摂取推定値とアクリルアミドヘモグロビン付加体を喫煙有無別にプロットし、相関係数を算出した(図12、13)。スピアマン相関係数は喫煙者、非喫煙者ともに0.21程度であった。

FFQを用いた摂取量推定値を三分位にわけ、重回帰分析を用いて性別および喫煙状況を調整したうえで、各群の幾何平均を算出したところ、摂取量が高い群で、アクリルアミドヘモグロビン付加体濃度が統計学的有意に高いことが明らかになった(表8)。

考察及び今後の課題

FFQを用いた摂取推定値とアクリルアミドヘモグロビン付加体の相関は低く、生体指標を用いたばく露評価は、FFQによって推定された長期的なばく露量の絶対値との関連が小さかった。一方で、FFQによる推定値の順位づけを高低で三群に分けた場合、摂取高群において付加体濃度が高かった。FFQによるアクリルアミド摂取量の相対的な順位付けは、アクリルアミドヘモグロビン付加体をGold Standardとした場合、一定程度妥当と考えられた。アクリルアミドヘモグロビン付加体は、摂取量計算に伴う誤差を回避できるが、食事以外(喫煙など)のばく露源の影響を受けること、赤血球の寿命から3か月適度の摂取量を反映する指標と考えられることから、必ずしもFFQよりも長期摂取量を正確に反映する指標とは限らない。今後の発がんに関する疫学調査には、個人摂取量の指標としてFFQとアクリルアミドヘモ

グロビン付加体の両者を併用していくことが適切と考えられた。

アクリルアミド-ヘモグロビン付加体濃度は、アクリルアミドによる発がんのリスクを検討する上で重要な長期的ばく露指標として、欧米の大規模コホート研究において用いられている。その基礎的な検討として、アクリルアミド-ヘモグロビン付加体濃度とFFQなどの質問票を用いた摂取量推定値との関連について報告されている²³⁻²⁷。また、アクリルアミド-ヘモグロビン付加体濃度を用いて、アクリルアミドとの関連の強い食品を予測するなどの検討も行われている。今後はこのような多様な観点から検討を行う。

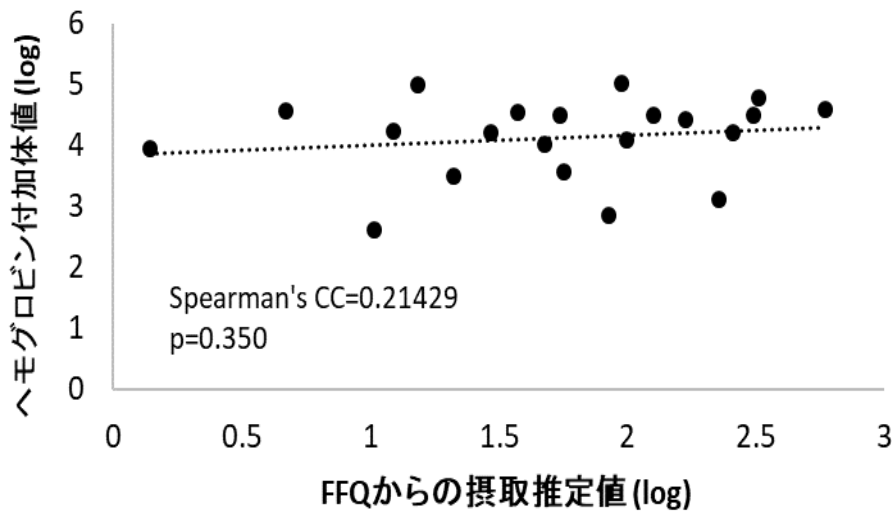


図12. FFQによる一日当たりアクリルアミド摂取量と付加体量との関係（現在喫煙者および過去喫煙者）

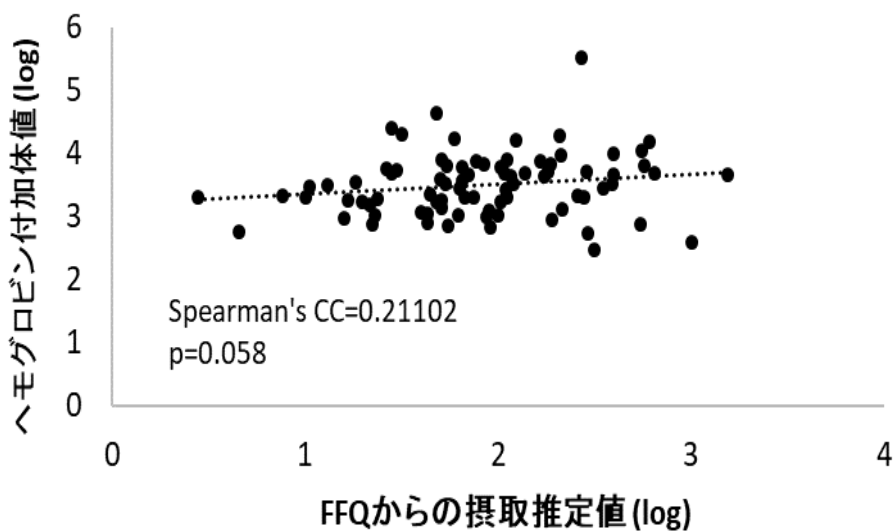


図13. FFQによる一日当たりアクリルアミド摂取量と付加体量との関係（非喫煙者）

研究全体の成果、考察及び結論

本研究は、日本人のアクリルアミドばく露量を評価し、ばく露と発がんリスクとの関連を、既存の大規模コホート研究データを用いて検討することを最終目標として、コホート研究で用いられた食物摂取頻度調査票（FFQ）の他にも、陰膳法(DM)、秤量法食事記録（DR）、さらに生体指標としてのアクリルアミドヘモグロビン付加体測定値など、アクリルアミドのばく露評価の有用性と妥当性について多角的に検討した。

まず、既存の FFQ や DR などから摂取量を算出する場合、記録されている全ての食品の成分表データベース（本研究内ではアクリルアミドの含有量データベース）を必要とするため、公開されている食品中アクリルアミド濃度の情報を元に、データベースを作成し、同時に加熱調理された野菜中のアクリルアミド量を加味するため、既存の情報（食品コードや質問項目）から算出方法を検討し、推定方法の開発を行った。推定された摂取量を、成分表データベースを用いない方法である DM 測定値と比較したところ、DR の推定値とは比較的強い関連があり、成分表を用いる方法の有用性が示唆された。

次に、コホート研究の一部の対象者から得られた既存のDR、FFQを用いて、開発した推定方法によって摂取量推定値を算出し、DRを基準として、FFQの妥当性を検討したところ、FFQによる順位づけの妥当性が比較的高いことが明らかになった。そこで、コホート集団において過去に収集されたFFQから摂取量を推定し、追跡後の各部位のがん罹患との関連を解析した。その結果、多くの部位別がんではアクリルアミド摂取量によってリスクの上昇が認められず、コーヒーが予防的に働くことがわかっている子宮体がんや肝がんでは、リスクが下がるという結果となり、日本人のアクリルアミドの寄与食品一位であるコーヒーによって、リスクが修飾されていることがわかった。これらの結果は、アクリルアミドによって日本人の発がんリスクが上がる可能性が低いことを示しており、公衆衛生対策の必要性の有無を判断するための食品安全に関する知見として意義深いことである。

ただし、結果がFFQの推定誤差によって希薄化されている可能性については留意が必要である。FFQは疫学研究において、長期間の食事によるばく露レベルを順位付けすることに用いられる食事調査法であり、食事のばく露要因による発がんリスクを検証するために大規模集団に対して食事摂取量調査を行う場合の国際標準的な方法であるが、短所として、摂取量の絶対値の把握が難しく、質問項目（食品リスト、目安量）や成分値データベースの精度など、食事調査特有の測定誤差の影響を受けている可能性がある。

そこで 3 つ目の課題として、国内では測定されていないアクリルアミドの生体指標を、疫学研究において国際標準的に用いられている方法で測定し、その有用性や、他の食事調査法との比較を行った。このことにより、今まで国内では行われなかった、生体指標を用いたアクリルアミド摂取量のばく露評価が可能となり、コホート内症例対照研究など、食事調査の測定誤差の影響を受けないばく露評価法によるより頑強なエビデンスを得るための素地がつくられた。

FFQ による食事摂取量推定値は、異なる構成の FFQ によって推定された摂取量との直接的な比較が難しく（例えば国外の FFQ）、また生体内におけるアクリルアミドの代謝の個人差については考慮されないという欠点がある。本研究で収集された血液・尿サンプルは、アクリルアミドに関連する血中グリシドアミドや尿中代謝物を測定する目的で凍結保存をしていることから、今後、これらの生体試料を有効活用して、アクリルアミドのばく露評価をさらに多角的に行うことが課題である。

参考文献

1. 内閣府食品安全委員会、食品健康影響評価技術研究「食品由来のアクリルアミド摂取量の推定に関する研究（研究課題番号 1507）」中間報告書。
<https://www.fsc.go.jp/fsciis/technicalResearch/show/cho99920151507>（アクセス日 07/01/2016）。
2. 農林水産省、食品安全に関するリスクプロファイルシート（化学物質）
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/150807_rp_aa.pdf（アクセス日 07/01/2016）
3. 国立医薬品食品衛生研究所、食品中のアクリルアミド分析結果
<http://www.mhlw.go.jp/topics/2002/11/tp1101-1a.html>（アクセス日 07/01/2016）。
4. Mizukami Y, Kohata K, Yamaguchi Y, Hayashi N, Sawai Y, Chuda Y, et al. Analysis of acrylamide in green tea by gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 7370-7.
5. Takatsuki S, Nemoto S, Sasaki K, and Maitani T. Production of Acrylamide in Agricultural Products by Cooking. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 2004;45 : 44-8.
6. Yoshida M, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, Chuda Y, Yada H, Kobayashi H, et al. Determination of Acrylamide in Processed Foodstuffs in Japan. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* 2002; 49: 822-5.
7. Yoshida M, Miyoshi K, Horibata K, Mizukami Y, Takenaka M, and Yasui A. Estimation of Acrylamide Intake from Cooked Rice in Japan. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* 2011; 58 525-30.
8. 内閣府食品安全委員会、食品健康影響評価技術研究、アクリルアミドに関する情報整理シート <https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrieveId=kai20111222sfc&fileId=520>（アクセス日：07/01/2016）。
9. FAO/WHO. Health implications of Acrylamide in Food. <http://www.who.int/food-safety/publications/acrylamide-food/en/>（アクセス日 07/01/2016）。
10. 内閣府食品安全委員会、食品健康影響評価技術研究「食品からのアクリルアミド摂取量の統計的推定に関する研究（研究課題番号 1408）」研究成果報告書、
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/technicalResearch/show/cho99920141408>（アクセス日：07/01/2016）。
11. Mucci LA, Sandin S, B€alter K, et al. Acrylamide intake and breast cancer risk in Swedish women. *JAMA.* 2005;293:1322-1327.
12. Burley VJ, Greenwood DC, Hepworth SJ, et al. Dietary acrylamide intake and risk of breast cancer in the UK women's cohort. *Br J Cancer.* 2010;103:1749-1754.

13. Pedersen GS, Hogervorst JG, Schouten LJ, et al. Dietary acrylamide intake and estrogen and progesterone receptor-defined postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122:199-210.
14. Wilson KM, Mucci LA, Rosner BA, et al. A prospective study on dietary acrylamide intake and the risk for breast, endometrial, and ovarian cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:2503-2515.
15. Hubert W. Vesper, Maya R. Sternberg, Tunde Frame, and Christine M. Pfeiffer Among 10 Sociodemographic and Lifestyle Variables, Smoking Is Strongly Associated with Biomarkers of Acrylamide Exposure in a Representative Sample of the U.S. Population. *The Journal of Nutrition* 2013; 143(6):995S-1000S
16. Pietro Ferrari, et al. Challenges in estimating the validity of dietary acrylamide measurements. *European Journal of Nutrition* 2013; 52:1503-1512
17. Hubert W. Vesper, Samuel P. Caudill, John D. Osterloh, Tunde Meyers, Deanna Scott, and Gary L. Myers Exposure of the U.S. Population to Acrylamide in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 278-283
18. Nur Duale, et al. Biomarkers of Human Exposure to Acrylamide and Relation to
19. Polymorphisms in Metabolizing Genes. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 2009; 108(1), 90-99
20. Thomas Schettgen, Horst Christoph Broding, Jürgen Angerer, Hans Drexler Hemoglobin adducts of ethylene oxide, propylene oxide, acrylonitrile and acrylamide—biomarkers in occupational and environmental medicine. *Toxicology Letters* 2002; 134 65-70
21. Obón-Santacana M, et al., Acrylamide and Glycidamide Hemoglobin Adducts and Epithelial Ovarian Cancer: A Nested Case-Control Study in Nonsmoking Postmenopausal Women from the EPIC Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016; 25(1):127-34.
22. Xie J, et al., Acrylamide hemoglobin adduct levels and ovarian cancer risk: a nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22:653-60
23. Duarte-Salles T, von Stedingk H, Granum B, Gützkow KB, Rydberg P, Törnqvist M et al. Dietary acrylamide intake during pregnancy and fetal growth—results from the Norwegian mother and child cohort study (MoBa). *Environ Health Perspect* 2013; 121: 374-379
24. Wilson KM, Bälter K, Adami HO, Grönberg H, Vikström AC, Paulsson B et al. Acrylamide exposure measured by food frequency questionnaire and hemoglobin adduct levels and prostate cancer risk in the cancer of the prostate in Sweden study. *Int J Cancer* 2009a; 124: 2384-2390
25. Wilson KM, Vesper HW, Tocco P, Sampson L, Rosén J, Hellenäs KE et al. Validation of a food frequency questionnaire measurement of dietary acrylamide intake using hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. *Cancer Causes Control*

2009c; 20: 269-278

26. Wirfält E1, Paulsson B, Törnqvist M, Axmon A, Hagmar L. Associations between estimated acrylamide intakes, and hemoglobin AA adducts in a sample from the Malmö Diet and Cancer cohort. *Eur J Clin Nutr.* 2008; 62:314-23
27. Bjellaas T1, Olesen PT, Frandsen H, Haugen M, Stølen LH, Paulsen JE, Alexander J, Lundanes E, Becher G. Comparison of estimated dietary intake of acrylamide with hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. *Toxicol Sci.* 2007;98:110-7
28. Ferrari P1, Freisling H, Duell EJ, Kaaks R, Lujan-Barroso L, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Nailler L, Polidoro S, Mattiello A, Palli D, Tumino R, Grioni S, Knüppel S, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Orfanos P, Katsoulis M, Trichopoulou A, Quirós JR, Ardanaz E, Huerta JM, Etxezarreta PA, Sánchez MJ, Crowe F, Khaw KT, Wareham NJ, Ocke M, Bueno-de-Mesquita B, Peeters PH, Ericson U, Wirfält E, Hallmans G, Johansson I, Engeset D, Nicolas G, Gallo V, Norat T, Riboli E, Slimani N. Challenges in estimating the validity of dietary acrylamide measurements. *Eur J Nutr.* 2013;52:1503-12

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。）

◎Kotemori A, Ishihara J, Zha L, Liu R, Sawada N, Iwasaki M, Sobue T, Tsugane S, JPHC Study Group. Dietary acrylamide intake and risk of breast cancer: The Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Cancer Science* 2017; 109(3): 843-853

◎Kotemori A, Ishihara J, Nakadate M, Sawada N, Iwasaki M, Sobue T, Tsugane S for the JPHC FFQ Validation Study Group. Validity of a self-administered food frequency questionnaire for the estimation of acrylamide intake in the Japanese population: the JPHC FFQ Validation Study., *Journal of Epidemiology* (in press)

◎Kotemori A, Ishihara J, Zha L, Liu R, Sawada N, Iwasaki M, Sobue T, Tsugane S, JPHC Study Group. Dietary acrylamide intake and the risk of endometrial or ovarian cancers among Japanese women. *Cancer Science* (in press)

◎Yamamoto J, Ishihara J, Kotemori A, Nakadate M, Sobue T. Validity of estimated acrylamide intake by the dietary record method and food frequency questionnaire in comparison with a duplicate method: A pilot study. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* (in press)

2 本研究を基にした学会発表の実績

砂見綾香、石原淳子、横山悠大、中舘美佐子、澤田典絵、岩崎基、津金昌一郎、祖父江友孝 Validity of a food-frequency questionnaire for acrylamide intake: the JPHC FFQ Validation Study、第 27 回日本疫学会学術総会、甲府、2017

横山悠大、石原淳子、砂見綾香、中舘美佐子、大方円、清水綺花、祖父江友孝 食事記録を用いたアクリルアミド摂取量の推定、および陰膳法との比較による推定の妥当性検討、第 27 回日本疫学会学術総会、甲府、2017

3 特許及び特許出願の数と概要

なし

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

2018.3.3 多目的コホート研究リサーチニュース、アクリルアミド摂取量と乳がん罹患との関連について－多目的コホート研究（JPHC 研究）からの成果－
<http://epi.ncc.go.jp/jphc/1/index.html>

2018.3.7-29 アクリルアミド摂取量と乳がん罹患についての各誌、ウェブ掲載（産経、

秋田魁新報、西日本新聞、神戸新聞、愛媛新聞、下野新聞、宮崎日日新聞、健康情報ニュース、m3.com、臨床ニュース、QLifePro

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1)食事由来アクリルアミドばく露量を、陰膳法の食品サンプルからの分析量を用いて明らかにし、秤量法食事記録(DR)、食物摂取頻度調査票(FFQ)データからの摂取量を推定する方法を明らかにする。	5	食品中アクリルアミド含有量のデータを集約し、疫学研究における食事ばく露評価の方法を開発し、その妥当性を検討した。学会発表のうえ、論文は現在投稿中である。
(2)FFQを用いた食事由来アクリルアミドばく露量推定法の妥当性・再現性について、食事記録を用いて明らかにする。	5	既存のコホート研究小集団の食事調査データを用いて、コホート集団における食事評価法の妥当性を評価した。学会発表済み、論文印刷中である。
(3)食事由来アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連を、大規模コホート研究のデータを用いて明らかにする。	5	既存コホート研究のデータを用いて、FFQから推定したアクリルアミド摂取量と各部位別のがんの関連を検討した。乳がんに関しては論文掲載済み、学会発表予定であり、その他のがんに関しても、投稿予定である。
(4)血液および標準タンパク質に既知濃度のアクリルアミドを添加した試料を用い、ヘモグロビンの分離と質量分析による付加体の同定を試みると共に、血液の前処理方法による回収率の違いについても検証する。さらに、ヘモグロビン以外のタンパク質や核酸などとの付加体についても、ばく露指標としての有用性を検討する	5	アクリルアミド-ヘモグロビン付加体の測定法の検討を行った。 また、新規に収集した血液検体を測定し、食事摂取量の生体指標としての有用性について検討を行った。 論文は投稿準備中である。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項 目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	アクリルアミドの個人別摂取量推定の方法を開発、評価し、前向きコホート研究のデータを用いて各部位がんの発がんリスクとの関連を検討したことにより目標を達成した。 生体試料収集を完了し、アクリルアミドヘモグロビン付加体を測定し、食事摂取量との関連性を検討したことにより、目標を達成した。
(2) 研究成果の有用性	5	食事調査法を用いたばく露評価による日本人におけるアクリルアミドの発がんリスクについての知見を得た。 生体指標を用いたアクリルアミドばく露評価の有用性について、知見を得た。
総合コメント 食事由来アクリルアミドの推定が一定の科学的妥当性の上に可能となり、各部位がんの発がんリスクとの関連について、質の高いエビデンスを得た。また、生体指標を用いたばく露評価の有用性について一定の結果を示されたことで、今後、生体指標を用いたさらなる研究の可能性が開けた。本研究によってわが国における食事由来のアクリルアミドばく露量のリスク評価に資する情報が蓄積された。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。