

厚生労働科学研究研究費補助金

食品安全確保研究事業

アクリルアミドの生成抑制及び毒性抑制に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 今井 俊夫

平成16(2004)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
アクリルアミドの生成抑制及び毒性抑制に関する研究	-----	1
今井俊夫		
II. 分担研究報告		
1. 馬鈴薯加工食品中のアクリルアミドの生成条件および生成抑制に関する研究	--	9
古賀秀徳		
2. アクリルアミドの代謝と毒性抑制に関する研究	-----	19
大野泰雄		
3. アクリルアミドの遺伝毒性抑制に関する研究	-----	22
本間正充		
4. アクリルアミドの神経毒性抑制に関する実験的研究	-----	27
広瀬雅雄		
5. アクリルアミドの発がん性抑制に関する実験的研究	-----	30
今井俊夫		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	34

厚生労働科学研究費補助金（生活安全確保研究事業）
分担研究報告書（平成15年度）

アクリルアミドの神経毒性抑制に関する実験的研究

分担研究者 広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所病理部 部長

研究要旨：アクリルアミド(ACR)によって誘発される精巣障害ないし神経障害に対して、抗酸化作用あるいは解毒酵素の誘導ないし阻害作用のある化学物質の併用投与が抑制効果を示すかどうかの検討を行った。動物はSD:IGS ラットを用いて、ACRを28日間200 ppm 飲水投与して神経障害を誘発するモデルを用いた。ACRによる障害抑制の候補物質として、2000 ppm α -lipoic-acid (ALA), 10000 ppm α -tocopherol (TP), 1000 ppm diallyl sulfide (DAS)の混餌投与を、ACR投与に先立つ1週間前より行った。その結果、ACRによる精巣障害に対しては、病理組織学的にALA, TP, DASが部分的に障害を抑制する事が明らかとなった。神経障害に関しては、ALAがgait scoreに対し、部分的に神経症状を改善とともに、病理組織学的検索でも抑制効果が明らかとなった。

A. 研究目的

アクリルアミド(ACR)は主に紙力増強剤、合成樹脂、合成繊維、排水中等の沈殿物凝集剤、土壌改良剤、接着剤、塗料、土壌安定剤らの原料として用いられており、職業上ACRに暴露された作業員等に対して神経障害を引き起こすことや、雄の動物を用いた実験で、繁殖障害を示すことが確認されている。また、この物質は遺伝毒性を示し、発がん性が懸念されており、International Agency for Research on Cancer (IARC)による発がん性分類において、ACRは2A（人に対しておそらく発がん性がある）に分類されている。

近年、スウェーデン政府により、ストックホルム大学と共同で行った研究の結果、炭水化物を多く含むイモ等を焼く、または揚げることにより、ACRが生成されるという発表があったため、昨年度の厚生労働科学研究において、わが国に流通する加工食品中のACR含量の検討と、未だ詳細が解明されていないACRの毒性評価等や生成機序の検討等に必要データ収集を行うため、緊急の

研究班が組織された経緯がある。

ACRは炭水化物食品を120°C以上に加熱した際、それに含まれるアスパラギン等のアミノ酸と糖の反応により生成され、ポテトチップス類の製造過程で多量に生成される(1312 μ g/kg)。ヒトでの一日当たりの平均摂取量を検討した結果、0.8~6.0 μ g/kg 体重（短期摂取の場合）、0.3~0.8 μ g/kg 体重（長期摂取の場合）であることが判明した。

ACRによる神経毒性は、Na⁺,K⁺-ATPase と neurofilament を標的とした fast axonal flow の阻害による軸索傷害を主体としている。病理組織学的には、sensorimotor neuron の遠位端からの障害を特徴としており、central and peripheral distal axonopathy を生じるが、末梢の病変の進行とは関係なく強い運動失調を招く。最近の研究結果では、軸索末端が障害の最初の標的部位と考えられている。実験的に求められた神経障害のNOAELは0.5 mg/kg/day となっている。

雄性生殖障害は、神経障害に起因した運動障害

による二次的な影響の他、減数分裂後の精子に対する DNA 付加体形成による影響が考えられている。この生殖障害の NOAEL は 2 mg/kg/day となっている。

生体に取り込まれた ACR は、チトクローム P450(CYP) 2E1 によりグリシダミドとなり各種の細胞に DNA 付加体を形成し遺伝子を傷害する。このグリシダミドは ACR と同様にグルタチオン抱合を受けて代謝される。

昨年度の班研究において、ラットを用いた ACR の 28 日間にわたる飲水投与による神経障害誘発モデルにおいて、グルタチオン抱合の基質である N-acetylcystein (NAC), 第 II 相解毒酵素の誘導と共に CYP 2E1 を阻害することが知られている phenylethyl isothiocyanate (PEITC), CYP 阻害作用が知られている 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) について、ACR と共にそれぞれ同時投与した結果、PEITC と HTHQ において有意差はないものの精巣障害に対する抑制作用と HTHQ においては神経障害に対する部分的な抑制作用を見出した。今年度の本研究では、昨年の研究班で行われた研究と同様に、経口的に摂取された ACR による神経毒性と精巣毒性に対する抑制作用を検討する目的で、神経細胞に対する抗酸化作用を示し、糖尿病性ニューロパチーなどに対して抑制作用を示すことが知られている α -lipoic acid (ALA), 強い抗酸化作用を示す α -tocopherol (TP), ニンニク由来の第 II 相解毒酵素の誘導剤であり CYP 2E1 の阻害剤である diallyl sulfide (DAS) の併用投与による影響を検討した。

B. 研究方法

6 週齢の雄 SD:IGS ラットを 8 群、各 10 匹に分け、無処置対照群の他、各種の候補物質は混餌により、ACR は飲水により投与を行った (Table 1)。ACR の投与濃度は、飲水投与により投与数週間以

内に神経障害が生じることが知られている文献値を参考に 200 ppm とした。ACR ないし被検物質の単独投与群の他、両者の併用投与群を設定した。投与濃度は、ALA は 2000 ppm, TP は 10000 ppm, DAS は 1000 ppm とした。投与期間は被検物質を 7 日間前投与の後、28 日間被検物質と ACR を併用投与した。投与期間中、摂餌量、摂水量 (ACR 投与群のみ) と神経症状 (Gait score) を週一回の割合でモニターした。Gait score は、各個体について 90 x 90 x 20 cm のプラスチック製の箱に静置し、姿勢などを観察し、Normal gait を 1 点、Slightly abnormal gait (slight ataxia, hopping gait, foot splay) を 2 点、Moderately abnormal gait (obvious ataxia, foot splay, limb abduction) を 3 点、Severely abnormal gait (inability to support body weight and foot splay) を 4 点としてカウントした。実験終了時に、定法に従い解剖を行い、肝臓、精巣、精巣上部、脳 (小脳と延髄を含む)、頸髄、胸髄、腰髄、三叉神経、座骨神経を採取し、肝臓、精巣、精巣上部については重量を測定した。精巣以外の臓器は 10% 磷酸緩衝ホルマリンで固定し、精巣はブアン固定し、それぞれパラフィン包埋切片につき、ヘマトキシリン・エオジン染色。また、座骨神経は摘出の前には 2.5% glutaraldehyde の点滴固定を行った後採取し、エボン包埋後、1 μ m 切片を作成し、トルイジブルー染色を行った。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮として、主な動物投与実験は経口投与により行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。また、動物はエーテル深麻酔下で大動脈ないし心臓からの脱血ないしにより屠殺したため、動物に与える苦痛は最小限にとどめた。

C. 研究結果と考察

投与期間中、体重については、ACR 投与開始後 1 週目より ACR 投与を行った全群で、無処置対照

群に比し体重の低値傾向が認められ、4週目では有意な低値を示した(Table 2)。また、Gait scoreに関しては、投与3週目までACR投与各群の間で明らかな差は認められなかったが、ACR+ALA群でスコアの低値傾向を認め、4週目ではこの群で対照群に比べ明らかな低値を示した(Fig. 1)。他のACRとの併用投与群ではACR単独投与群との間に明らかな差は認められなかった。また、ACR投与を行っていない群では、明らかな神経症状は認められなかった。

解剖時の臓器重量(相対)は、DAS単独投与群で肝臓重量の減少、ACR単独投与群、ACR+ALA、ACR+DAS投与群で精巣重量の増加、またACR+ALA、ACR+DAS投与群で精巣上体重量の増加を認めた(Table 3)。

病理組織学的検索の結果、ACR投与により精巣精細管での精上皮細胞の脱落が管腔内に認められ、その程度は、ACR単独に比べ、ACR+ALA、ACR+TP、ACR+DAS投与群で明らかに弱かった(Table 4)。また、ACR投与各群で精巣上体管内での細胞残屑が認められ、その程度は、ACR単独に比べ、ACR+DAS投与群で明らかに弱かった(Table 4)。神経毒性を検索した結果、ACR投与各群で末梢神経の軸索の変性と萎縮を認めたものの、その程度はACR単独投与群に比べACR+ALA投与群で明らかに弱いことが確認された(Table 4)。他のACRとの併用投与群ではACR単独投与群との間に明らかな差は認められなかった。

以上の結果から、ACRによる精巣障害に対しては、ALA、TP、DASが部分的に障害を抑制する事が明らかとなった。このことは、これらの物質の投与によって、ACRによるフリーラジカルの生成が抗酸化作用により抑制されるとともに、遺伝毒性代謝産物であるグリシダミドの生成抑制あるいは解毒亢進が生じている可能性が考えられる。神経障害に関しては、Gait scoreではALAが部分的

に神経症状を改善し、坐骨神経の病理組織学的検索でもALAによる抑制効果が認められた。ALAは神経好性の抗酸化物質として注目されており、以上の結果は、ACRによるニューロン内でのフリーラジカルの生成が抑制された可能性を示唆している。今後、これらの実験材料について、病変の定量計測とともに酸化的障害の検索を行い、ACRの毒性作用に対するこれらの物質による修飾作用を精査する予定である。

D. 結論

ACRによる精巣障害に対しては、ALA、TP、DASが部分的に障害を抑制することが明らかとなった。神経障害に関しては、ALAが部分的に抑制効果を示すことが明らかになった。

E. 研究発表

1. 論文発表
特になし。

2. 学会発表

Masao Hirose: Japan's Reaction to the Acrylamide in Foods Issue and Key Research Effort on Prevention of Acrylamide-induced Neuronal and Reproductive Toxicities in Rats. 食品中アクリルアミドの健康問題に関する国際シンポジウム, 2003年8月, 韓国, ソウル

Masao Hirose: Prevention of Acrylamide Induced Toxicity in Rats. 第20回日本毒性病理学会・第5回国際毒性病理学会合同国際学会, 2004年2月, 神戸

F. 知的所有権の取得状況

特になし。

Table 1. Experimental design

Group	No. of animals	28 days	
		-7	0
1	10	Basal diet	
2	10	0.2% ALA in diet	
3	10	1%TP in diet	
4	10	0.1% DAS in diet	
5	10	Basal diet	200 ppm ACR in water
6	10	0.2% ALA	0.2% ALA in diet + 200 ppm ACR in water
7	10	1% TP	1% TP in diet + 200 ppm ACR in water
8	10	0.1% DAS	0.1% DAS in diet + 200 ppm ACR in water

Table 2. Body weight changes in rats exposed to ACR and/or ALA, TP or DAS

	0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Control	249.8 ±11.7	307.0 ±17.3	344.6 ±21.2	387.0 ±28.0	412.5 ±30.0
ALA	243.7 ±12.4	295.7 ±21.8	331.5 ±27.8	358.7 ±31.3	379.2 ±35.5
TP	260.0 ±8.1	320.5 ±6.2	357.0 ±8.7	395.9 ±11.7	427.0 ±17.7
DAS	259.5 ±13.0	318.7 ±14.4	360.9 ±29.1	397.1 ±29.6	416.3 ±43.7
ACR	252.2 ±9.7	285.0 ±12.3**	318.2 ±14.8*	335.7 ±17.0**	339.3 ±19.1**
ACR+ALA	250.9 ±11.6	279.0 ±19.7**	313.7 ±30.5	328.5 ±32.7**	334.6 ±36.5**
ACR+TA	260.8 ±14.2	293.0 ±23.0	325.1 ±27.7	351.1 ±40.1*	356.1 ±42.8**
ACR+DAS	257.7 ±13.7	298.4 ±21.0	335.5 ±28.2	358.2 ±33.5	369.6 ±37.1*

*: Significantly different from control, $p < 0.05$

Table 3. Intakes of food and ACR, and final body and relative organ weights

	BW (g)	Food intake (g/day)	Relative organ weights (g/100g BW)		
			Liver	Testes	Epididymis
Control	418.1 ± 30.6	21.7 ± 0.7	3.75 ± 0.36	0.77 ± 0.06	0.24 ± 0.02
ALA	381.9 ± 36.4	21.9 ± 1.5	3.75 ± 0.36	0.77 ± 0.06	0.24 ± 0.02
TP	426.1 ± 17.0	24.0 ± 2.0	3.80 ± 0.20	0.74 ± 0.09	0.25 ± 0.02
DAS	414.6 ± 46.6	23.0 ± 0.5	3.30 ± 0.26*	0.78 ± 0.15	0.26 ± 0.03
ACR	342.8 ± 19.0**	19.7 ± 1.2	3.75 ± 0.23	0.96 ± 0.09**	0.27 ± 0.02
ACR+ALA	330.7 ± 35.3**	20.2 ± 1.5	3.95 ± 0.28	0.97 ± 0.11**	0.28 ± 0.04**
ACR+TP	355.8 ± 41.9**	21.2 ± 3.0	3.73 ± 0.19	0.86 ± 0.12	0.26 ± 0.03
ACR+DAS	367.3 ± 34.7**	21.5 ± 0.6	3.58 ± 0.22	0.89 ± 0.08*	0.28 ± 0.03*

*, **: Significantly different from the controls, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 4. Effect of co-exposed ALA, TP or DAS on the ACR-induced histopathological changes in male genital organs and sciatic nerves

	Control	ACR	ACR+ALA	ACR+TP	ACR+DAS
Testis					
Exfoliation of spermatocytes or spermatids (±/+/+/+/+)	(10/0/0)	(0/3/6/1)	(4/6/0/0)**	(4/4/2/0)*	(3/6/1/0)**
Epididymis					
Desquamated cell debris in duct (±/+/+/+)	(10/0/0)	(2/7/1)	(7/2/1)	(6/3/1)	(7/3/0)*
Sciatic nerve					
Axonal atrophy (+/+/+/+)	0	(2/6/2)	(8/2/0)*	(5/5/0)	(2/7/1)
Axonal degeneration (+/+/+/+)	0	(3/5/2)	(7/1/0)*	(2/8/0)	(4/3/3)

*: Significantly different from the controls, $p < 0.05$

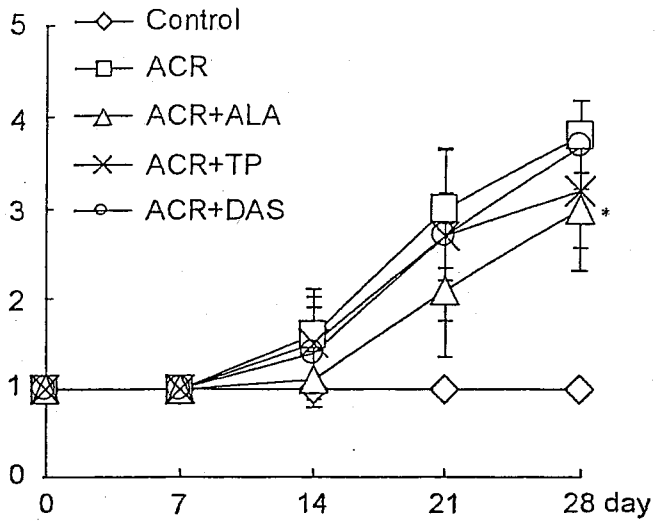


Fig. 1. Effect of co-exposed ALA, TP or DAS on the gait scores in rats exposed to ACR.
 *, Significantly different from the ACR alone.