

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07462

研究課題名(和文) 遺伝毒性を有する食品汚染カビ毒に対するシステムティックな新規安全性確保手法の開発

研究課題名(英文) Development of systematic methods for safety assurance of genotoxicity mycotoxins

研究代表者

小西 良子 (KONISHI, YOSHIKO)

麻布大学・生命・環境科学部・教授

研究者番号：10195761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アフラトキシン(AFs)は、遺伝毒性カビ毒で極力食品からの暴露を低減する必要がある。食品中のAFs汚染の検知のため、AFs特異抗体の遺伝子情報から新しいELISA法を開発した。食品に汚染しているAFsをトラップして排泄させるデトックス成分として、市販のきゅうりのLactococcus lactis subsp. lactis NCDO 604Tに強いデトキシケーション効果があった。暴露AFsをモニターには、尿中のAFM1が摂取後24時間以内の有効なバイオマーカーになることを明らかにした。これらの方法をシステムティックに使うことで、食品に汚染しているAFsの暴露を最小限に抑えることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Aflatoxins (AFs) are genotoxic mycotoxin and FAO/WHO recommends that AFs not take as much as possible. In this study, the systematic methods how to minimize the intake of AFs were developed. we developed noncompetitive homogeneous ELISA with the information of DNA sequence of monoclonal antibody to measure AFs in food. We found that Lactococcus lactis subsp. lactis NCDO 604T isolated from cucumber had high affinity to AFs as a detoxication of AFs. We found the biomarker to monitor of exposure to AFB1. The mouse in vivo experiment revealed that AFM1 in urine was good biomarker within 24hrs post intake of AFB1. Exposure to AFs could be suppressed by using these methods systematically.

研究分野：農学

キーワード：食品安全性 遺伝毒性物質

1. 研究開始当初の背景

アフラトキシンは、天然物中最も発がん性が高い、遺伝毒性カビ毒として知られており、コーデックス委員会や多くの諸外国でも基準値等が設定されているが、極力食品からの曝露を低減する必要があると FAO/WHO から勧告されている。アフラトキシンは、穀類、豆類、種実類など多くの食物を汚染するが、特にアフラトキシン B₁ (AFB₁) の代謝産物であるアフラトキシン M₁ (AFM₁) は、牛乳を汚染するため、特に乳児や幼児に摂取量が多く生涯曝露期間も長い。その毒性である発がん性や免疫毒性などの健康被害を引き起こす恐れが高く、世界的にも深刻な問題となっている。そのため曝露量の低減化を主眼においた安全性確保が最も効果的な対策と考えられる。本邦でも食品安全委員会が行った牛乳中の AFM₁ に対するリスク評価を踏まえて、コーデックス規格と同じ最大残留濃度である 0.5µg/kg を基準値とした。しかし一部の先進国 (EU 諸国や米国) では乳児、幼児向けの基準値が成人対象よりも厳しく設定される施策が行われている。このような背景から、ヒト、特に乳児、幼児への曝露量を積極的に低減することを目的とする手法を開発することは、食品の安全性の分野で重要な課題である。

我々は、今までにいろいろなカビ毒に関してその毒性評価、分析法の確立および曝露評価などリスク評価に関する研究を行うとともに、食品加工での低減化への試みも行っている。最近では食品添加物として認められているゲル化多糖類を用いて、小麦等に汚染するデオキシニバレノールを封じ込め、腸管吸収阻害効果を持つ可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、我々のこれまでの研究成果を基に、遺伝毒性を有するカビ毒である AFM₁ をモデルとして、たとえ基準値以下の汚染であっても、ヒトへの汚染を最小限に留めるためのシステムティックな安全性確保手法を開発する。すなわち、食品中の対象カビ毒を超高感度で即時に検出出来る検出技術を開発し、汚染が検出された場合には対象カビ毒をデトキシケーションできる加工技術を開発する。さらには、ヒトへの曝露を対象カビ毒のバイオマーカーを検出する手法によって測定し、常にヒトへの曝露量を評価し、フィードバックできるシステムを構築する。具体的には食品中の汚染濃度を超高感度かつ即時の検出法の開発 AFM₁ が検出された食品に対するデトキシケーション バイオマーカーによるアフラトキシンの曝露評価について検討する。

(1) 食品中の汚染濃度を超高感度かつ即時の検出法の開発

食品中からの AFM₁ の測定方法として、高速液体クロマトグラフィーは正確性と高い感度を担保できるが、簡便迅速な ELISA 法、イムノクロマト法などは、主に基準値以上の食品の排除を目的に開発されているため、実態調査やバイオマーカー等に使用される超高感度測定法には適していない。そこで、我々は研究期間内に、迅速に測定結果が得られ、かつ高感度と正確性を併せ持つ Noncompetitive homogeneous ELISA 法を開発する。この測定法は抗原抗体反応を利用して、抗体を遺伝子改変することにより ELISA 法のステップを短縮したものである。

(2) AFM₁ が検出された食品に対するデトキシケーション

AFM₁ の食品加工中のデトキシケーション

として、乳酸菌を用いる手法を開発する。乳や乳製品に含まれる乳酸菌の中に、アフラトキシン類を吸着させる種があることは、以前から報告されていたが、我々は、胃酸などに耐性を持つといわれる野菜由来の乳酸菌に着目し、その AFM₁ に対するデトキシケーションを明らかにする。AFM₁ は主に小腸上部から吸収されることから、吸収部位において AFM₁ と結合する乳酸菌が、AFM₁ の吸収阻害に効果があることが期待できる。日常食している野菜から乳酸菌を単離し、吸着率の高い種を単離同定する。

(3) バイオマーカーによるアフラトキシンの曝露評価

AFM₁ をバイオマーカーとして用いることは AFB₁ のヒトでの曝露評価手法として行なわれていることであるが、今回マウスを用いた AFB₁ 曝露実験において、AFM₁ がバイオマーカーとしてどの程度検出されるのかを明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 食品中の汚染濃度を超高感度かつ即時の検出法の開発

Noncompetitive homogeneous ELISA 法 (図 1) を確立するために、AFM₁ を特異的に認識するモノクローナル抗体を、マウスを用いて作成した。抗原としてはアフラトキシン G₂ (AFG₂) キーホールリンペット (KLH) または牛血清アルブミン (BSA) を作成した。方法は AFG₂-oxime を作成し、KLH または BSA を反応させた。マウスに免疫し、抗体価がある程度高くなった個体を用いて、いくつかのハイブリドーマを作成しモノクローナル抗体を収集した最も AFM₁ に結合性が高いハイブリッド細胞を選抜し、RT-PCR 法により cDNA をクローニングして V_H および V_L のア

ミノ酸配列を解析した。Noncompetitive homogeneous ELISA 法の原理は、グルクロニダーゼ結合 V_H と基質結合 V_L が、抗原を介して結合することで、酵素と基質が反応し発色する。大腸菌で V_H および V_L のリコンビナントを作成し、グルクロニダーゼに V_H を、その基質に V_L を結合させた。

感度の測定には、標準品である AFM₁ を 10⁻⁴ ~ 10² nM の範囲に希釈して用いた。

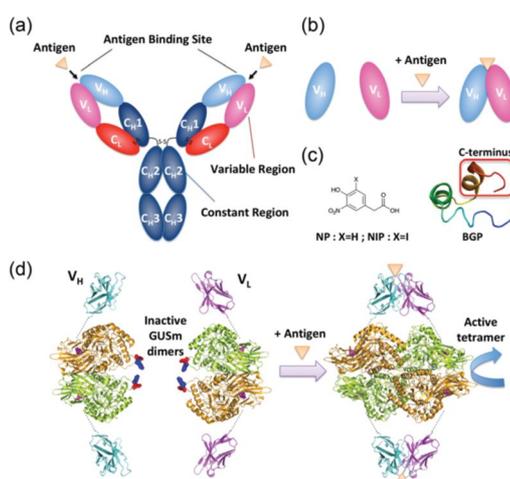


図 1 . Noncompetitive homogeneous ELISA 法

(2) AFM₁ が検出された食品に対するデトキシケーション

野菜由来の乳酸菌を用いて、デトキシケーション試験を行った。

相模原市周辺で収穫された市販のきゅうり、白菜、大根、なすを購入し、表面を水道水で 5 回洗浄後、表面をピューラーで採取し、ストマッキング後 M.R.S 培地で増殖した菌を収集した。グラム染色およびカタラーゼ試験により、グラム陽性且つカタラーゼ陰性を示した菌を乳酸菌と分類し、GAM 半流動培地 (日水製薬株式会社) に保存し実験に用いた。また、対照菌として動物由来乳酸菌である

Lactobacillus rhamnosus (ATCC 33316)および植物由来乳酸菌である *Pediococcus pentosaceus* (ATCC 53103)の2菌株を用いた。

乳酸菌と分類した全ての菌株 (計 137 株) を Brain heart infusion プロス培地(Becton, Dickinson 社) 5 ml に植菌し、30 °C で5日間増菌させた。培養液は遠心分離 (15 °C, 3500 rpm, 20 分)してプロスを除去し、滅菌 PBS で3回洗浄後、AFM₁ 含有 PBS 溶液 (AFM₁, 5 ng/ml)を 1 ml 添加し、30 °C で1時間インキュベートさせた。その後、遠心分離 (15 °C, 3500 rpm, 10 分)、上清を回収し、競合的 ELISA により、上清中の AFM₁ の定量を行い、菌体の結合率を以下の式により算出した。

結合率 (%) = 上清の AFM₁ 濃度 (ng/ml) / 添加した AFM₁ 濃度 (ng/ml) × 100

各野菜で最も結合率の高い1株を計4株選定し、それを対象に 16S rDNA 領域から菌種同定を行った。

酸性下 (pH 2.0)における AFM₁ の結合能は、最も結合率の高かった *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 604^T を AFM₁ 含有 HCl (pH 2.0) 溶液 (AFM₁, 5 ng/ml) を 1 ml 添加し、30 °C で1、2、4 時間インキュベートさせた。その後、遠心分離 (15 °C, 3500 rpm, 10 分)して、上清を回収し、競合的 ELISA により、上清中の AFM₁ の定量を行い、菌体の結合率を算出した。

(3) バイオマーカーによるアフラトキシンの曝露評価

AFB₁ を摂取した場合、どの程度の AFM₁ が、いつごろまで尿中に検出されるのかをマウスに投与して検討した。各群5匹ずつ行った。群には PBS を、群は AFB₁ 1.8 mg/kg のみを経口で投与した。血液は 5 分, 10 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間, 8 時間, 24 時間採取

し、血漿をみつめ、測定まで -20 °C で保存した。尿は、24 時間、48 時間のものを採取した。血中および尿中の AFB₁ 代謝物 (AFM₁) は、ELISA 法により測定した。

4. 研究の成果

(1) AFM₁ の Noncompetitive homogeneous ELISA の開発

AFG₂-BSA を抗原として確立したハイブリドーマのうち、#1F6 が最も AFM₁ に対して結合能が高かった。そこで、#1F6 から、V_H および V_L のアミノ酸配列を解析し、 γ -グルクロニダーゼおよびその基質に結合させた。図 2 に、標準曲線を示したが、10⁻¹ nM (0.032.5ng/mL) 以上から検出できた。

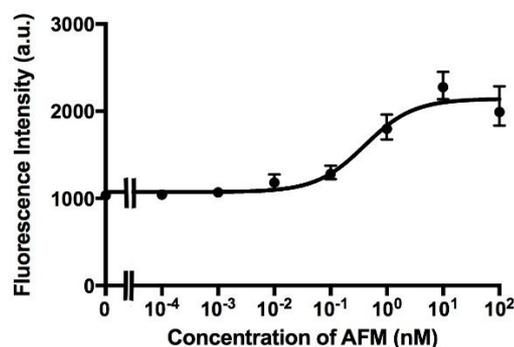


図 2 . Noncompetitive homogeneous ELISA の標準曲線

(2) AFM₁ が検出された食品に対するデトキシケーション

各種野菜から単離して乳酸菌と判定された計 137 株を、M.R.S プロス培地 5 ml で培養し増菌させたスクリーニング における実験から、93 株の中から菌数が 10⁸ cfu 以上で、結合率が 35%以上の菌株を、計 24 株選定をした。内訳としてきゅうり由来が 19 株、白菜由来が 1 株、大根由来が 2 株、なす由来が 2 株であり、きゅうり由来の乳酸菌が約 8 割を占めた。また、対照菌の動物および植物由来乳酸菌は *Lactobacillus rhamnosus* が 21%、

Pediococcus pentosaceus が 21%の結合率を示した。

表 1. 野菜由来乳酸菌の AFM₁ 結合能

由来	No.	AFM ₁ 結合率(%)
きゅうり	132	55.68
	89	55.66
	96	48.64
	38	41.81
	16	40.12
	140	39.6
	15	38.08
	26	31.32
	24	27.49
	40	27.49
	36	26.83
	17	22.97
	22	21.42
	28	18.78
	29	17.98
14	15.91	
30	13.75	
25	11.84	
23	11.45	
大根	121	34.14
	46	20.77
なす	193	33.39
	216	32.62
白菜	225	46.24
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		25.41
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		21.17

最も結合率が高かった *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 604^T と対照菌の動物および植物由来乳酸菌 2 株を HCl (pH 2.0) で 1、この中で各野菜ごとに最も高い結合能を持つ乳酸菌を選んで、種の同定を 16sDNA の情報から行った。

表 2 . 各野菜の代表的菌株の同定

No.	由来	菌種名	相同率(%)
121	大根	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRIC 1539 ¹	99.4
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> NCDO 523 ⁷	
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>suiaricum</i> LMG 8159 ⁷	
132	きゅうり	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 604 ^T	100
193	なす	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRIC 1539 ¹	99.9
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> NCDO 523 ⁷	
225	白菜	<i>Wetssella cibaria</i> NBRC 106073 ⁷	99.9

2、4 時間インキュベートした結果、全ての菌株はインキュベートする時間が増えるにつれて菌数は減少していったが、*L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 604^T と *L. rhamnosus* は完全に死滅することはなかった。2 時間の時点では *L. rhamnosus* の生存数が多かったが、4 時間では *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 604^T の生存数が多かった。次に酸性下での AFM₁ の結合率を求めた。*L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 604^T は 1 時間で 54.71%、2 時間で 52.33%、4 時間で 59.66%と、酸処理をしなかったもの (34.29%) と比べて高い結果を示した (図 3)。また、対照菌においても同じであった。

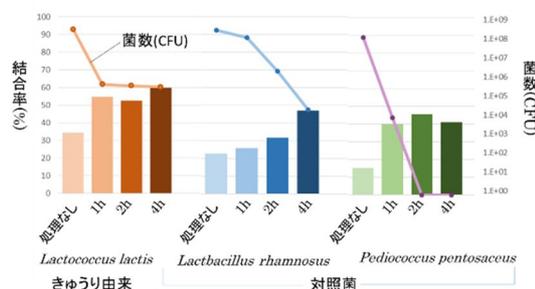


図 3 . 酸性下における結合能および生菌数 (3) バイオマーカーによるアフラトキシンの曝露評価

AFM₁ は、血漿中からはほとんど検出されず、尿中から多く検出された。24 時間以内の尿からは 0.58ng/mL 以上、48 時間以内の尿からは 0.041ng/mL 以上の AFM₁ が検出された。今までの報告から、血漿中には AFB₁-リジン複合体がバイオマーカーとして検出されたとの知見があることから、AFM₁ は尿のバイオマーカーとして曝露評価に使用できることが明らかになった。マウスの場合、投与

量の約2%が AFM₁として尿から排泄される
ことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

(1) Mongkon W1, Sugita-Konishi Y, Chaisri W, Suriyasathaporn Wasana Chaisri, Wantanwa Mongkon, Yoshiko Sugita-Konishi, Aflatoxin B1 Contamination of Dairy Feeds after Storage in Farm Practice in Tropical Environmen. Biocontrol Sci.、査読有、Vol. 22, No.1, 2017, pp.41-45,2017
Doi 10.4265/bio.22.41

(2)Wasana Chaisri, Wantanwa Mongkon, Yoshiko Sugita-Konishi, Dirk Van Dam, Ingrid Huntle, Witaya Suriyasathaporn 2.Feed and feed storage factors in relation to aflatoxin M1 contamination in bulk milk of smallholder dairy farms. JSM Mycotoxins、査読有、Vol. 67, No. 2, 2017, pp.85 – 88,

<http://doi.org/10.2520/myco.67-2-3>

[学会発表] (計 2件)

尾畑瑠衣、窪田祐恵、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子、アフラトキシン結合能を有する野菜由来乳酸菌の探索と消化液での安定性に関する研究 第 113 回 日本食品衛生学会学術総会、2017

窪田祐恵、尾畑瑠衣、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子、野菜由来乳酸菌のアフラトキシン類への結合能と胃内環境での挙動、日本マイコトキシン学会、2018

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 良子 (KONISHI YOSHIKO)
麻布大学・生命環境科学部・教授
研究者番号 10195761

(2) 連携研究者

上田 宏 (UEDA HIROSHI)
東京工業大学・資源化学研究所・教授
研究者番号 60232758