

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33906

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17986

研究課題名（和文）食品に含まれる機能性フラボノイドおよびその代謝物による放射線内部被ばくリスク低減

研究課題名（英文）Inhibitory effect of dietary flavonoids and their metabolites on cesium absorption in the intestinal tract

研究代表者

保田 倫子（Yasuda, Michiko）

椋山女学園大学・生活科学部・講師

研究者番号：00707036

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、放射能汚染時の内部被ばくによる健康被害の低減対策として、日常的に予防策・対処策として摂取できる「食品」に、放射性セシウムの体内への吸収阻害効果および体外への排泄促進効果を見出すことを目的としている。ヒト結腸がん細胞Caco-2モデルを用い、代謝吸収と考慮した上でセシウム透過に対する効果を評価したところ、食品成分のうち、フラボノイドのケルセチンにその効果があることを見出した。その作用機構を検討し、代謝物である抱合体はそれらの効果を示さず、キレート形成能もセシウムに対して発揮されていないことが示唆された。また、セシウム輸送体に対して発現抑制効果がみられたが、さらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物試験に供する前段階の試験かつ試験管内試験より生体影響を加味できる方法として前課題で確立した試験系を用い本研究を行った。食品機能性を考慮する上で必ず考慮すべき代謝吸収形態についても本実験系では考慮できる。合成品であるフラボノイド代謝物質を供することで、Caco-2細胞を用いた試験でも短期間処理などの状況に応じて、代謝について考慮した実験系となっている。代謝物について考慮しつつ、食品成分のターゲットを絞った後、従来の動物試験および試験管内試験を組み合わせることで、より効率よく精度のよい研究を進めることができ、実用化に近づける、と考える。また検討すべきことは多々あるため今後も引き続き検討を行う。

研究成果の概要（英文）：The inhibition of Cs absorption in intestine might be effective on internal exposure to radiation by Cs-137. The aim of this study was the investigation of screening food factors inhibiting the absorption of Cs in intestine and the elucidation of the underlying mechanisms. Quercetin, a dietary flavonoid, showed the inhibitory effects on the Cs absorption. Its metabolites such as conjugates did not show these effects. And, quercetin did not form the chlete complex with Cs ions. Meanwhile, a Cs transporter gene level was partly downregulated by Quercetin.

研究分野：食品科学

キーワード：セシウム ケルセチン Caco-2 キレート 食品機能 フラボノイド 代謝吸収 腸管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災の際、原発事故により放射性物質による放射能汚染が社会問題となり、現在でも、放射能汚染対策は最重要課題の一つである。日本、世界においても起こりうる地震を想定し、放射能汚染を未然に防ぐ対策は勿論、ばく露時の健康被害の低減対策は極めて重要であり、放射性セシウムを体内に吸収させない、速やかに排泄させることは、その解決法の一つである。

申請者の知る限り、食経験がある食材および食品成分の中でセシウムの体内への吸収抑制および体外への排泄促進効果を有するものについての報告例は少ない。鉄のシアノ化錯体、プルシアンブルーはその効果を有し (Madshus et al., 1968) 実用化されているが、放射性物質の大量摂取等の事故等の際にのみ指定公共機関からの許可を経て使用することが定められており、日常的に予防策・対処策として用いるのは難しい。リンゴに含まれる多糖類のペクチンにセシウム吸着作用があり、同様の効果が期待されると報告があるが、PB に比べセシウムとの結合が格段に弱く、生体内での効果の証明は難しい (Gall et al., 2006)。よって、申請者は、日常的に予防策・対処策として摂取できる「食品」に、放射性セシウムの体内への吸収阻害効果および体外への排泄促進効果を見出すことを最終目的とし、これまでに研究を進めてきた。

まず、申請者は、動物および試験管内試験により下線部の効果に対する食品成分の評価を行った。動物実験は重要かつ必要であるが、動物の尊い犠牲の上に成り立つためその実施を最低限に抑えることが求められる。また、試験管内試験のみでは生体内影響を他の方法より十分には考慮できない場合が多い。一方、下線部の効果を持つ食品成分については、まだ研究例が少なく実用化に至らないものが多いため、上記の最終目的のためには新たな食品成分の探索が必要である。そこで、これら既存法 (動物・試験管内試験) に供する前段階の試験として、新規評価系を確立し、その新規評価系と既存の方法を合わせて進めることで、効率的・多面的解析を進めることが可能となり、信頼性の高い食品成分評価が期待できると考えた。よって、これまでに、マウスおよびヒト腸管粘膜を装着した Ussing chamber (ex vivo) ならびに培養細胞を用い、セシウムの腸管における移行についての 2 種の新規評価系を確立した (科学研究費助成事業若手 B 申請者代表課題、H27~29 年)。

植物性食品中には、ポリフェノールに分類され、C6-C3-C6 構造を基本骨格とした化合物群、フラボノイドが多数含まれる。これらは植物中では、様々な刺激、たとえば紫外線、微生物、酸化ストレス等に対してそのストレス応答を阻害する化合物として作用しているケースが多く、ヒトにとっても機能性成分として働くという報告が多数ある。その作用メカニズムの一つとして、フラボノイド類の持つキレート剤としての作用が挙げられる。放射性金属のキレート剤として現在知られているものにジエチレントリアミン 5 酢酸 (DTPA)、2, 3-ジメルカプト-1-プロパノール (ジメルカプロール)、D-ペニシラミン、デフェロキサミン (DFOA) がある。キレート剤とは、金属イオンと錯体を形成したものについていい、金属中毒の治療薬剤、放射性金属のキレート剤として使用されてもいる。これは、キレート剤が放射性金属イオンとも安定な水溶性錯体を形成することで、放射性金属の体外排泄を促進するという作用機序である。このことから、フラボノイドがセシウムの腸管での移行に影響を及ぼす可能性があるのではないかと予想した。申請者は上記の新規評価系を用いて食品成分を評価し、腸管におけるセシウムの体内への移行抑制もしくは体外への排泄促進効果を持つフラボノイドが存在する、という予備的な結果を得た。しかし、これらについてまだ詳細な検討が必要である。また、フラボノイドをはじめ、食品成分の生体機能性を考えるときに、その成分を摂取した時の代謝・吸収、つまり生体利用率についても考慮しないと、機能性の発揮について有効な考察をすることができない。

2. 研究の目的

上記のように、フラボノイドに腸管でのセシウム透過に影響を及ぼす可能性が示唆されたが、それについてまだ詳細な検討が必要な段階である。食品成分は体内で様々な化合物に代謝されるが、代謝を考慮した検討についても未だ十分ではない。以上を踏まえ、本研究では、代謝についても考慮し、食品に含まれるフラボノイド類の中から、セシウムの吸収阻害効果・排泄促進効果を持つ食品因子を見出し、最終的には、現実的な内部被ばく対策として、非常食としての摂取法および常備法について考案することを目指す。中でも、本研究では、玉ねぎに含まれるフラボノイドであり、機能性、代謝吸収形態、濃度などについて広く研究されているケルセチンが効果を示したことから、これについて詳しく調べることとした。

3. 研究の方法

ケルセチン代謝物 (ケルセチングルクロン酸抱合体およびケルセチンメトキシ化体であるイソラムネチン) が Cs の腸管から血中への移行に及ぼす作用を検討するため、分化させた Caco-2 細胞にこれら进行处理し、培地サンプルの回収を以下の方法で行った。Basolateral (側底) 側に 1~50 μM の各種ケルセチングルクロン酸抱合体 (5 種類) を処理した 1 時間後、apical (頂端)

側に 1 mM の CsCl を処理し、30 分 ~ 24 時間後に basolateral 側の培地を回収した。Basolateral 側に、1 μ M の各種イソラムネチン(3 種類)を処理した 1 時間後、apical 側に 1 mM の CsCl を処理した。その後、と同様に basolateral 側から培地を回収した。回収したの培地は濃硝酸を用いて灰化し、全体量が 1.7~1.8 g になるように超純水で調製した。これらを超純水で希釈し、内部標準物質としてイットリウム(Y)を混合後、ICP-MS で Y、Cs 量を測定した。代謝物は、富山県立大学生城真一先生に合成して頂いた。代謝吸収を考慮するにあたり、静岡県立大学名誉教授下位香代子先生にご協力頂いた。

RT-PCR により、ケルセチンが Caco-2 細胞における、トランスポーターの遺伝子発現量に及ぼす効果について検討した。TRIzol のプロトコールに従い、total RNA を抽出した後、逆転写を行った。その際、total RNA 量がサンプル 10 μ l 中に 800 ng となるように調製した。引き続き、cDNA サンプル 1 μ l をリアルタイム PCR に供した。

塩化ナトリウムを精製水または培地でボルテックスミキサーを用いて攪拌しながら溶解し、1 M の溶液を調製し精製水または培地で 1000 倍に希釈して 1 mM 塩化ナトリウム溶液とした。100 mM 塩化セシウム溶液を精製水または培地で 100 倍に希釈して、1 mM 塩化セシウム溶液とした。ケルセチン DMSO 溶液を精製水または培地で希釈し、ボルテックスミキサーで攪拌した。1 M 塩化ナトリウム溶液、10 mM ケルセチン溶液を、精製水または培地で希釈し、ボルテックスミキサーで攪拌した。100 mM 塩化セシウム、10 mM ケルセチンを精製水または培地で希釈し、ボルテックスミキサーで攪拌した。Caco-2 細胞のケルセチン処理法と同一にするために、水または培地、1 mM 塩化ナトリウム溶液、1 mM 塩化セシウム溶液、50 μ M ケルセチン溶液、ケルセチンと塩化ナトリウム混合溶液、ケルセチンと塩化セシウム混合溶液、ポジティブコントロールのケルセチン-亜鉛キレート(精製水溶解、メタノール溶解)をそれぞれ 200 μ l ずつマイクロプレートに入れた。そのマイクロプレートを 37 $^{\circ}$ C で 2 時間静置し、マイクロプレートリーダーで 200 nm ~ 500 nm の吸光スペクトルを測定した。錯体形成の確認については、鹿児島大学坂尾こず枝先生にご協力頂いた。

4. 研究成果

前課題までに確立した、ヒト結腸がん細胞 Caco-2 を用いた新規評価系を用い、フラボノイドのセシウム透過に対する効果を Apical 側から Basolateral 側、また、逆に apical 側から basolateral 側へのセシウムの透過に及ぼす影響を調べることにより検討した。

前課題までに、ケルセチンが apical から basolateral 側へのセシウムの透過に対して抑制効果を示すことがわかっていった。よって、さらに詳細を確認するために、ケルセチン等のフラボノイド、その配糖体、その代謝物、その類縁対について、濃度依存性、時間依存性についても確認した。その結果、ケルセチンを 30 分 apical 側に前処理した後 2 時間経ってからのセシウム透過について抑制効果がみられた。ケルセチンには効果があるが、その類縁対を apical 側に処理したとき、また、basolateral 側にケルセチン代謝物を処理したときには効果がみられなかった。

ケルセチンが金属イオンと錯体を形成すると吸光スペクトルが変化し、極大吸収波長のスペクトルがシフトする。今回のポジティブコントロールでは極大吸収波長のシフトが精製水中、培地中で見られたが、ケルセチンとセシウムの混合溶液では、精製水中、培地中、どちらの吸光スペクトルにおいても、ケルセチン溶液と比較して、吸収波長のシフトはみられなかった。よって、今回のこのケルセチンの効果については、培地内でのセシウムイオンとのキレート形成によるセシウムトラップ効果によるものではないと考えられる。よって、最初はキレート形成能を持つ食品成分としてフラボノイドに注目し、スクリーニングを開始したが、結果としてはキレート形成能と本効果は関係しなかった。

セシウムの細胞レベルでの輸送は、主に化学的性質が類似しているカリウムの輸送系に依存していることが予想でき、セシウムの輸送にかかわるトランスポーター候補として、Potassium voltage-gated channel sub family H (KCNH)ファミリー、Transient receptor potential classic (TRPC)ファミリー、Transient receptor potential melastatin (TRPM)ファミリーがあげられる。よって、この中のいくつかの mRNA 発現について検討したところ、KCNH3 と TRPC1 はセシウム共存下で、ケルセチンに発現抑制作用などは見られなかったが、TRPM7 については、抑制傾向がみられた。よって、このトランスポーターに対するケルセチンの効果が本作用機序に関わっている可能性もあるが、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Michiko T. Yasuda, Yuto Watanabe, Takashi Hosono, Taiichiro Seki, Taka-aki Suzuki, Hiroyuki Sakakibara, Kayoko Shimoi	4. 巻 188
2. 論文標題 Nocturnal light exposure stimulates the cardiac fibrinolysis system and stress responses in C3H/He mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 79-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2020.02.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshikazu Goukon, Michiko T. Yasuda, Hiro Yasukawa, Masanori Terasaki	4. 巻 249
2. 論文標題 Occurrence and AhR activity of brominated parabens in the Kitakami River, North Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemosphere .	6. 最初と最後の頁 126152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2020.126152.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saeko Tada-Oikawa, Mana Eguchi, Michiko Yasuda, Kiyora Izuoka, Akihiko Ikegami, Sandra Vranic, Sonja Boland, Lang Tran, Gaku Ichihara, Sahoko Ichihara	4. 巻 33, 5
2. 論文標題 Functionalized Surface-Charged SiO ₂ Nanoparticles Induce Pro-Inflammatory Responses, but Are Not Lethal to Caco-2 Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Res. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 1226-1236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.9b00478.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mannen R, Yasuda MT, Sano A, Goda T, Shimoi K, Ichikawa Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Changes in plasma concentration of flavonoids after ingestion of a flavonoid-rich meal prepared with basic foodstuffs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Functional Foods In Health And Disease	6. 最初と最後の頁 558-575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31989/ffhd.v9i9.643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh, K., Masumori, S., Mukai, D., Sakakibara, H., Yasuda, M. and Shimoi, K	4. 巻 44
2. 論文標題 Dosage time affects alkylating agents induced micronuclei in mouse peripheral blood reticulocytes through the function of erythropoietin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 273-282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.44.273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minoru Numata, Akane Hirano, Yukika Yamamoto, Michiko Yasuda, Nobuhiko Miura, Kazutoshi Sayama, Masa-Aki Shibata, Tomohiro Asai, Naoto Oku, Noriyuki Miyoshi, Kayoko Shimoi	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 Metastasis of Breast Cancer Promoted by Circadian Rhythm Disruption due to Light/Dark Shift and its Prevention by Dietary Quercetin in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Circadian Rhythms	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5334/jcr.203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ryo Mannen, Michiko T. Yasuda, Ayami Sano, Toshinao Goda, Kayoko Shimoi, Yoko Ichikawa	4. 巻 11(2)
2. 論文標題 Effect of flavonoid-rich meals and low-flavonoid meals based on the dietary reference intakes for Japanese, using basic foodstuffs on the gene expression of inflammatory cytokines in the whole blood cells from adult men of normal or light overweight.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Functional Foods in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 56-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31989/ffhd.v11i2.781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 保田倫子
2. 発表標題 食品による内部被ばくのリスク低減を目指して 腸管におけるセシウム移行に対する食品成分の効果
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会中部支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保田 倫子、西脇志保、江間陽菜、永田晃久、矢田友和
2. 発表標題 愛知県額田郡幸田町産・筆柿果実のポリフェノールについての検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michiko T Yasuda, Miku Inuzuka, Kaho Furuhashi, Akihisa Nagata
2. 発表標題 Antioxidant activities and constituents of leaves and fruits of a Japanese persimmon (Fudegaki)
3. 学会等名 The 258th ACS National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiko T Yasuda, Saki Kondo, Yuki Hayashi, Chika Tokuyama, Shinichi Ikushiro, Shin-Ichiro Karaki, Kayoko Shimoi
2. 発表標題 The inhibitory effects of quercetin on the intestinal cesium absorption in a Caco-2 cell system
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors/the 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiko T Yasuda, Chika Tokuyama, Yukiko Kobayashi, Sachiyo Shitasue, Shin-Ichiro Karaki, Kayoko Shimoi
2. 発表標題 Establishment of a system for screening food factors inhibiting the absorption of Cs in intestine
3. 学会等名 the 256th ACS National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮川文、青島美穂、清水萌以、菅井碧乃、中村俊之、中村宜督、矢田友和、保田倫子
2. 発表標題 筆柿葉茶ポリフェノール類の定量とそれらに対する消化液の影響 (in vitro)
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山琴音、武田あいか、鶴野紗矢香、山川紗生、山本向菜美、矢田友和、保田倫子
2. 発表標題 不完全甘柿・筆柿の甘・渋果実中のカロテノイドの違いに関する検討
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属ホームページ内 https://success.sugiyama-u.ac.jp/teacher/index.php?tid=m2017017&ga=2.26761465.515662116.1620988738-592499476.1498811998 ORCID https://orcid.org/0000-0002-8984-6138
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	下位 香代子 (Shimoi Kayoko) (10162728)	静岡県立大学・食品栄養科学部・客員教授 (23803)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	生城 真一 (Ikushiro Shinichi) (50244679)	富山県立大学・工学部・教授 (23201)	
研究協力者	坂尾 こず枝 (Sakao Kozue) (40713285)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・助教 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関