

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 6月 2日現在

研究種目：科学研究費補助金（ 基盤研究（C） ）

研究期間：平成19年～平成21年

課題番号：19500675

研究課題名（和文） 調理・加工による食品中有害物質のデトックス法と新しい安全性評価法の構築

研究課題名（英文） New approach for detoxication of toxic substances in foods and the evaluation

研究代表者

小西 良子（ KONISHI YOSHIKO ）

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長

研究者番号：10195761

研究成果の概要（和文）：食品中の有害物質、特にカビ毒に着目し、調理や加工により減毒化（デトックス化）を行いヒトへの摂取量をできるだけ少なくする方法を開発することによって、より積極的なデトックス法の開発を目的とした。果物などに多く存在するペクチン成分に着目し、そのデトックス効果を検討した。その結果、ペクチンのうち低メトキシペクチンにカルシウムを加えることでカビ毒の封込効果があることが見いだされた。動物への投与試験により、ペクチンによりできるゲルがカビ毒を封込め、消化吸収を阻害する可能性が示唆された。ペクチンは長い食生活の経験から、安全な食品であること、最近コレステロール吸収阻害などの付加価値が注目されていることから、食品添加物としても有用であることが示されている。これに加えて、食品中の有害物質を封じ込め、その吸収を阻害する作用を持つことは今後の応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Mycotoxin is natural contaminant and cause adverse effects on human and animal health. Since it is too hard for mycotoxin to reach zero tolerance, many approaches to reduce intake mycotoxin from final food products have been tried. However the developed tools until now has advantages and disadvantages. Therefore the development of new method for reduction of exposure to mycotoxins is needed on food processing.

In this study, we developed pectin gelation containing mycotoxin (DON) and examined suppressive effect on absorption of deoxynivalenol (DON). As pectin, low methoxy non-amidate (LMNA) pectin and amidate (LMA) pectin were used. The gelation using LMA pectin was effective for sealing DON into gel at 4 °C and 37 °C. In vivo experiment revealed that the gelation suppressed the absorption of DON in gastro-intestine.

The LMA pectin would be valuable processing tool to reduce the exposure to mycotoxin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1800000	0	1800000
20年度	1000000	0	1000000
21年度	700000		700000
年度			
年度			
総計	3500000		3500000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学、食生活学

キーワード：デトックス、調理・加工、安全性、カビ毒、

1. 研究開始当初の背景

食品にはヒトや動物に健康被害を起こす有害物質が多種含まれていて、食の安全性の確保の観点から大きな社会問題となっている。その中でもカビ毒、自然毒は気象変動に影響されること、植物内で生合成される物質が多いことなどから、その防除は非常に困難であるといわれている。カビ毒は、かびの2次代謝産物であるが、天然物化合物中で最強の発がん性物質であるアフラトキシンをはじめ、慢性毒性として発がん性、免疫毒性を有する物質が多く存在する。

このような有害物質は原則摂取してはならないのであるが、除去が非常に難しい物質においては、調理や加工により減毒化（デトックス化）を行いヒトへの摂取量をできるだけ少なくする努力が最も必要である。

2. 研究の目的

このような背景から、それぞれのカビ毒・自然毒の特性（脂溶性および水溶性、タンパク、糖および脂質との結合性など）をふまえた加工、調理法を開発することによって、より積極的なデトックスが可能になると考え、特に発がん性、免疫毒性が危惧されている有害物質の加工・調理によるデトックス法の開発を行うことを目的とした。また、調理に用いる食品素材との組み合わせにより、腸管の吸収を抑え最終的には有害物質の体内への摂取を抑える方法も同時に検討した。

すでに木炭かすなどを食品に混ぜて食べることで有害物質の腸管吸収がおさえられることがヒトを用いた実験で実証されている。しかし本研究では現実的に応用可能な食材である食物繊維や難消化性多糖類などの影響を検討する。

本研究で開発された方法により得られた調理済み食品の安全性は、最終調理食品の消化物の腸管での吸収率を考慮に入れた評価法を、動物実験系で行う。食品は、多種多様な成分が含まれていることから、消化液による消化を受けたあとの食品を評価することが最も現実に則した評価法である。

国産小麦に汚染が多いトリコテセン系カビ毒の1種であるデオキシニバレノール（DON）は、免疫毒性を有しており、感染症等への抵抗力を弱める易感染性を示す。そこで本研究ではDONに注目し、腸管での吸収を抑える食品成分との組み合わせと調理法を開発した。最終調理食品の安全性に関しては、腸管での消化吸收を加味した新しい評価法を構築した。

この研究の成果により、食品中の発がん性物質などの有害物質をできるだけ摂取しない調理法・加工法が開発され、高齢者社会とともに問題化するであろうカビ毒・自然毒の慢性毒性による健康被害の顕在化を未然に防ぐことが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 植物性ペクチンゲルの作成

アルカリ精製低メトキシル化ペクチン（LMNA ペクチン、DE 35%；ビストップ D-2262, 三栄源エフエフアイ（株））、酸精製低メトキシル化ペクチン（LMA ペクチン、DE 35%；ビストップ D-2264, 三栄源エフエフアイ（株））を供試し、ペクチン濃度（0.5, 1.0, 1.5%）および Ca 濃度（1.24, 1.72, 2.30 mg/ml）のペクチンゲルをそれぞれ作製した。DON 含有ゲルは DON 500ng/ml を添加して作成した。対象としてペクチンのみのゲルを作成した。

(2) ペクチンゲル強度の測定：テクスチャーアナライザー（TA-TX2i, 英弘精機（株））を用い、プランジャー直径 20mm、プランジャー速度 0.5mm/sec、距離 5.0mm にてゲル強度を測定した。

(3) ペクチンゲルの封入効果：DON 500ng/ml を添加して形成したペクチンゲルに対して、10 および 50 倍量の水に浮遊させ、4 または 37℃で一晩静置し、浮遊水を回収した。この浮遊水に拡散する DON 含有量を ELISA にて測定した。ペクチンゲルの封入量は、ペクチンゲルへの DON 添加量から浮遊水中の DON 量を引いて算出した。

(4) ELISA による DON の測定

DON 抗体を 2000 倍に PBS で希釈し、100 μ l ずつ 96well へ分注し、4℃下で一晩静置した。プレートを洗浄後 1%ポリビニルアルコール溶液を 250 μ l ずつ分注し、30 分静置し、ブ

ロッキングを行った。

DON Standard の調整は、DON 標準品 1ppm 溶液を PBS で 4 段階希釈し、250ppb、62.5ppb、15.6ppb、3.9ppb を用意した。これらを Standard とし、検量線を作製した。

DON ホースラヂッシュペーパーオキシダーゼ複合体 (DON-HRP) の調整は DON HRP を 100 倍希釈し、Stock soln とし、さらに 1% 牛血清アルブミン (BSA) 含有 PBS 溶液で 100 倍希釈して使用した。standard または sample を各 75 μ L を、抗体をコーティングしていない 96 穴プレートに分注し DON-HRP 75 μ L を分注し、standard 及び sample と混合した。

混合溶液を 100 μ L ずつコーティング済みのプレートに分注し、30 分間静置し、洗浄後 TMB 発色指示液を 100 μ L ずつ分注し、暗所にて 15 分静置した。反応は 2N H_2SO_4 を 100 μ L ずつ分注し 450nm で吸光度を測定した。

(5) マウス投与実験

C6B3F1 5 週齢オスマウスをそれぞれ

- A 群: DON 添加ゲル化ペクチン投与区、
- B 群: DON 添加非ゲル化ペクチン投与区、
- C 群: DON 溶液投与区、
- D 群: 対照区と群分けした。

投与はゲル化したペクチンはピンセットを用い、液体のペクチンおよび溶液はゾルデを用いて経口的に行った。採血は 15、30、90 分、3、6、8、24 時間後に行い、血漿を分離後 $-80^{\circ}C$ で測定まで保存した。

(6) 血漿中の DON 検出方法

血漿を PBS で 5 倍希釈とし、これを ELISA により測定した。

4. 研究成果

ペクチンゲル強度は、 Ca^{2+} 2.30mg/ml 添加ペクチン 1.0%濃度では、LMNA ペクチン; 164.1 ± 11.2 、LMA ペクチン; 3162.4 ± 81.0 (N/m^2) と LMA ペクチンの強度が 20 倍程度高かった。この差は、ペクチン濃度 0.5 および 1.5%でも同様の傾向にあり、1.5%のゲル強度は LMNA ペクチン; 199.6 ± 7.30 、LMA ペクチン; 9240.5 ± 186.90 (N/m^2) と約 50 倍の強度差が認められた。このことから LMNA ペクチンのほうが LMNA ペクチンより、ゲル強度が高いことが明らかになった。

Ca^{2+} 2.30mg/ml 添加 0.5-1.5% LMNA ペクチンおよび LMA ペクチンで作製したゲルの浮遊水の DON 含量を ELISA にて測定したところ、 $4^{\circ}C$ 条件下における DON の封入効果は LMNA ペクチンではほとんどみられなかったが、LMA ペクチンでは 50%以上の封入効果を示していた(図 1)。これらの結果から、LMNA ペクチンには DON 封入効果は薄いが LMA ペクチンでは生体内温度においてもその封入効果が保

てることが明らかになった。

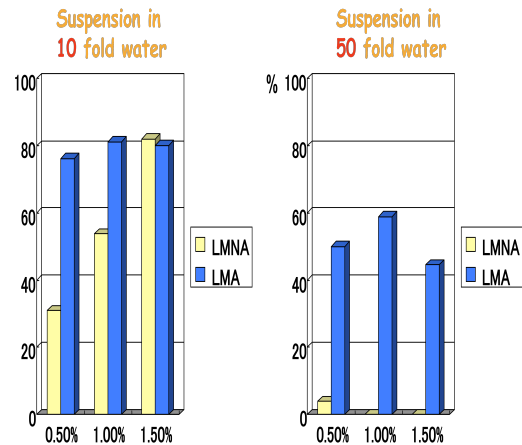


図 1. $4^{\circ}C$ におけるゲル内 DON の封入率

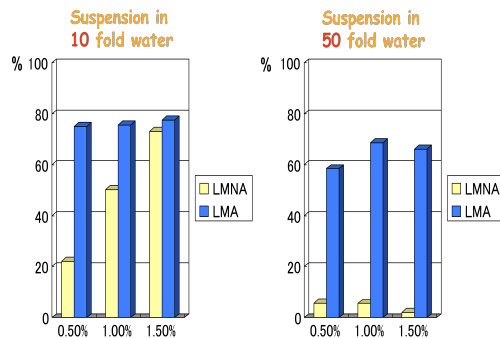


図 2. $37^{\circ}C$ におけるゲル内 DON の封入率

$37^{\circ}C$ でも LMA ペクチンには 58-78% の DON がペクチンゲルに残存していた。

これらのことから、LMA ペクチンには DON を封入する効果があること、体内の温度においてもその効果は維持できることが示された。

そこで、生体内の吸収率を明らかにし、その効果を評価するため、マウスの投与実験を行った。マウス投与実験では、1) 血漿: A 群 ($n=15$) では、血漿中 DON 濃度は投与後上昇し、投与後 15 分で平均 426.7 ng/mL、投与後 30 分で平均 460.1 ng/mL で最大となった。その後徐々に減少し、投与後 24 時間ではほとんど検出されなかった。B 群 ($n=8$) では血漿中 DON 濃度は投与後急速に上昇し、投与後 15 分で最大となり平均 2070.3 ng/mL であった。その後徐々に減少し、投与後 24 時間ではほとんど検出されなかった。C 群 ($n=16$) では血漿中 DON 濃度は投与後急速に上昇し、投与後 15 分で最大となり平均 2532.0 ng/mL であった。その後徐々に減少し、投与後 24 時間ではほとんど検出されなかった。D 群では血漿中から DON は検出されなかった。B 群 C 群共に時間経過に伴い血漿中 DON 濃度は減少して

いく傾向にあったが、A群では投与後30分がピークとなった(図3)。またB群およびC群の血漿中DON濃度はA群に比べ4~5倍となった。AUC (Area under the curve) はA群 : B群 : C群 = 1 : 3.445 : 3.426 となった。

DONペクチンゲル投与群とDON単独投与群の血中DON濃度を比較した結果から、DONペクチンゲル投与群では顕著に血中への吸収が抑制されていることが明らかになった。

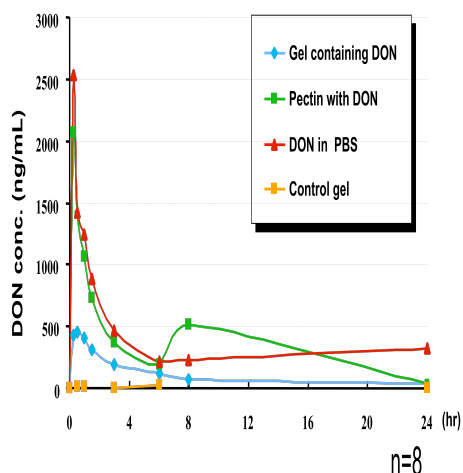


図3. DON含有ペクチン投与後の血中DON濃度の変化

これらの結果より、ペクチンによるゲル化はDONの封入に効果的であり、DONの吸収量を抑制する効果が示唆された。その効果は、Ca²⁺イオンによるLMAペクチンのegg-box形成によるものと考えられた(図4)。

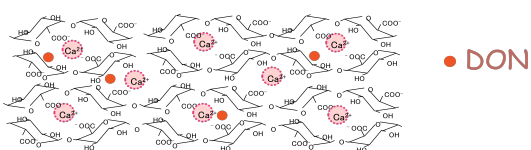


図4. LMAペクチンのDONへの封入効果の予想図

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Tanaka H, Takino M, Sugita-Konishi Y, Tanaka T, Toriba A, Hayakawa K. Determination of nivalenol and deoxynivalenol by liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry.

Rapid Commun Mass Spectrom, 査読あり、23 (19)、2009、3119-3124

- ② Tanaka, H., Sugita-Konishi, Y., Takino, M., Tanaka, T., Toriba, A., Hayakawa, K., A survey of the occurrence of Fusarium Mycotoxins in Biscuits in Japan by using LC/MS. J. Health Science, 56 (2), 査読あり 2010, 1-7

[学会発表] (計4件)

- ① 田村千佳子, 杉山圭一, 鎌田洋一, 小西良子, 中馬誠, 門田智之, 西島基弘; 低メトキシルペクチンのゲル化を利用したカビ毒の封入効果, 第98回日本食品衛生学会, 2009.10.8, 函館
- ② Tamura, C., Nakamura, M., Kadota, T., Itoh, S., Kamata, Y., Sugiyama, K., Nishijima, N., Sugita-Konishi, Y., Sealing effects of pectin gelation on mycotoxin reduction in food, ISM Conference 2009, 2009.9.8, ツーリン, オーストリア
- ③ Koyama, D., Arai, S., Kamata, Y., Nakajima, T., Sugita-Konishi, Y., Itoh, S.; Suppressive Effect of Pectin Gelation on Absorption of Deoxynivalenol in Mice. アジア養豚獣医学会 (APVS2009), 2009.10.27 茨城県つくば市
- ④ Sugita-Konishi, Y., Koyama, D., Kadota, T., Itoh, S., Sugiyama, K., Tamura, C., Nishijima, M., Kamata, Y., Suppressive Effect of Pectin Gelation on Absorption of Deoxynivalenol in Mice. 49th Annual Meeting of Society of Toxicology, 2010.3.10, 米国、ソルトレイク

○出願状況 (計1件)

名称: マイコトキシンの体内への吸収を抑制する効果のある食品または飼料用添加剤

発明者: 小西良子

田村千佳子

中馬 誠

権利者: 国立医薬品食品衛生研究所

三栄源 F F I (株)

種類：特願

番号：2009-207488

出願年月日：平成21年9月8日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西良子 (KONISHI YOSHIKO)

研究者番号：10195761

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：