

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11790

研究課題名（和文）ヒスタミンに起因するアレルギー様食中毒防止に資する食用植物成分の探索

研究課題名（英文）Search for the edible plant components contributing to prevention of food poisoning caused by histamine

研究代表者

菊崎 泰枝（KIKUZAKI, Hiroe）

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：60291598

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：給食施設等で毎年発生しているヒスタミンに起因するアレルギー様食中毒は、ヒスタミンが熱に安定であるため調理段階では防ぐことができず、食品の流通・保蔵段階でヒスタミンの蓄積を防ぐことが重要である。ヒスタミン蓄積は食品に付着したヒスタミン生成菌に起因しているため、本研究では、魚肉中のヒスタミン産生を抑制した食用植物のメドウスイートとクローブに着目し、ヒスタミン生成菌に対する抗菌成分の探索を行った。その結果、抗菌成分として12種のエラジタンニンと3種のガロイルグルコースを同定し、これらの成分がヒスタミン蓄積抑制に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毎年学校給食施設等で被害が発生し、加熱調理では防ぐことのできないヒスタミンに起因するアレルギー様食中毒を防止する対策を見出すことは、国民生活の質の向上に資する社会的意義のある課題の一つである。本研究では、長年食経験のある安全な食用植物から、ヒスタミン食中毒の原因となるヒスタミン生成菌の増殖抑制作用を有する成分を15種見出すことができた。本研究は、有効かつ安全なヒスタミン食中毒防止剤の開発に向けた基礎的研究と位置付けられる。

研究成果の概要（英文）：Food poisoning caused by histamine which occurs every year mainly in school lunch facilities is unable to be prevented at the stage of cooking because of the thermal stability of histamine. Therefore, it is important that histamine accumulation should be arrested at the stage of distribution and storage. In this study, we searched antimicrobial components against histamine-producing bacteria in meadowsweet and cloves and identified twelve ellagitannins and three galloyl glucoses as antimicrobial compounds. It is likely that these components contribute to suppression of accumulation of histamine.

研究分野：生活科学 食生活学 食品成分化学 調理科学 給食経営管理学

キーワード：ヒスタミン生成菌 モルガン菌 抗菌性 メドウスイート クローブ エラジタンニン ガロイルグルコース

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒスタミンに起因するアレルギー様食中毒は毎年のように発生しており、なかでも学校や保育園などの給食施設での発生が目立っている。平成 18 年から平成 27 年の 10 年間のヒスタミン食中毒患者の年齢別割合は、15 歳未満の患者が約 60% を占めていた。

(2) ヒスタミンは、食品の貯蔵・加工中に増殖したヒスタミン生成菌由来のヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の作用によってアミノ酸のヒスチジンから生成することが知られており、わが国では、ヒスチジン含有量の高いマグロやサバなどの赤身魚及びその加工品がヒスタミン食中毒の主要因となっている。

(3) ヒスタミン食中毒の最大の問題は、ヒスタミンが熱に安定なため通常の加熱調理では分解されず、調理の段階で防ぐことができないことにある。すなわち、食品の流通・貯蔵過程でヒスタミンを蓄積させないことが肝要であり、低温貯蔵によるヒスタミン生成菌の増殖を防ぐことが唯一の対策であるが、温度管理の不備やなかには低温性ヒスタミン生成菌が存在するため、完全に阻止できないのが現状である。

(4) 我々はこれまでに、長年食習慣のある安全な食用植物中にヒト由来 HDC を阻害する成分を見出してきた。ヒト由来 HDC とヒスタミン生成菌の一種であるモルガン菌の HDC が構造上類似していることから、これまでに見出してきた HDC 阻害成分がモルガン菌由来 HDC も阻害し、ヒスタミン生成を抑制する可能性が示唆された。

(5) バラ科ハーブのメドウスイートに含まれるタンニン類にヒト由来 HDC 阻害活性があることを見出している。モルガン菌由来 HDC 阻害の可能性を期待してサバ筋肉を 5 分間メドウスイート熱水抽出エキスに浸漬し、取り出したサバ筋肉の保存試験を行った。その結果、ヒスタミン生成が抑制されることが明らかとなった。同様の効果が数種のハーブや香辛料で明らかとなり、このうち、クローブから数種のモルガン菌由来 HDC 阻害活性成分を見出した。

2. 研究の目的

食用植物中にはヒスタミン生成抑制作用を示すものが存在し、モルガン菌由来 HDC 阻害成分が含有されていることを見出したが、モルガン菌の増殖抑制もヒスタミン生成抑制の要因である可能性が考えられる。そこで本研究では、ヒスタミン生成菌に対する抗菌活性がどのようにヒスタミン生成抑制に寄与しているかを明らかにすることを目的に、ヒスタミン生成抑制作用のあるメドウスイート、クローブにヒスタミン生成菌増殖抑制作用があるかどうかを明らかにし、抗菌活性成分を探索した。

3. 研究の方法

(1) 抗菌活性およびヒスタミンの測定

ペーパーディスク法

モルガン菌 (*Morganella morganii* subsp. *morganii*) NBRC3848 株とフォトバクテリウム (*Photobacterium phosphoreum*) NBRC13896 株の 2 種類のヒスタミン産生菌を使用した。モルガン菌の培養には 802 培地、フォトバクテリウムには 325 培地を使用した。各培養菌液を全面塗布した寒天培地に、被験試料 1mg を染み込ませたペーパーディスクを置き、モルガン菌は 30、フォトバクテリウムは 24 で一晩培養した。形成された阻止円の直径を計測し、抗菌活性の有無を調べた。

最小発育阻止濃度の測定

100 cells/mL に調製したモルガン菌液と 20% メタノールに溶解した被験試料を、ヒスチジンを含む液体培地に加え一晩培養した。目視で濁りが確認できたものを発育ありとして、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。また、595 nm の吸光度を測定して濁度を求め、被験試料を含まない 20% メタノールを添加したコントロールの濁度を 100 としたときの細胞増殖率も算出した。

生菌数の測定

モルガン菌を約 8.3 log₁₀ CFU/mL に調製した培養液を希釈し、ヒスチジンを含む培地中で 105 CFU/mL に調製し、被験試料を添加して振盪培養した。これを寒天培地に塗布し、出現したコロニー数から生菌数を算出した。

ヒスタミンの定量

上記の液体培地中に生成したヒスタミンを HPLC で定量した。

(2) メドウスイートおよびクローブ成分の抽出・分画、精製、単離および構造解析

抽出・分画

各乾燥試料を塩化メチレンで抽出し、塩化メチレン抽出物を得た。その残渣を 70% アセトン

水溶液で抽出し、酢酸エチル可溶部と水溶部に分画した。水溶部をさらに MCI ゲルカラムクロマトグラフィー (c.c.) に供し、水溶出部とメタノール溶出部に分けた。得られた 4 つの画分の抗菌活性をペーパーディスク法で評価した。

酢酸エチル可溶部の分画

各酢酸エチル可溶部を Sephadex LH-20 c.c. に供し、エタノール、エタノール - メタノール、メタノール、メタノール - アセトン、アセトンで順次溶出した。溶出液を HPLC 分析し、クロマトグラムのパターンに基づいて分画し、ペーパーディスク法で抗菌活性を測定した。

抗菌活性画分の精製

各抗菌活性画分について、ODS ゲルおよび Sephadex LH-20 c.c. を繰り返し行い、化合物を単離した。

単離化合物の構造決定

標準化合物がある場合は、HPLC 分析により単離化合物を同定した。標準化合物がない場合は、単離化合物の NMR、LC/MS 分析を行い、構造解析した。

4. 研究成果

(1) メドウスウィートおよびクローブ抽出・分画物の抗菌活性

メドウスウィート

得られた 4 つの画分の抗菌活性の有無を、ペーパーディスク法を用いて評価したところ、酢酸エチル可溶部とメタノール溶出部の 2 画分に、モルガン菌およびフォトバクテリウム双方に対して阻止円が確認できた。2 つの活性画分の HPLC 分析を行ったところ、類似したクロマトパターンが得られたため、以後は酢酸エチル可溶部に着目した。

抗菌活性が認められた酢酸エチル可溶部を Sephadex LH-20 c.c. によって 23 フラクション (Fr.) に分画し、ペーパーディスク法で抗菌活性の有無を調べたところ、Fr. 1~3 を除くすべての画分に 2 種の菌に対する阻止円が観測された。

クローブ

得られた 4 つの画分の抗菌活性の有無を、ペーパーディスク法を用いて評価したところ、酢酸エチル可溶部とメタノール溶出部の 2 画分に、モルガン菌およびフォトバクテリウム双方に対して阻止円が確認できた。2 つの活性画分の HPLC 分析を行ったところ、類似したクロマトパターンが得られたため、以後は酢酸エチル可溶部に着目した。

抗菌活性が認められた酢酸エチル可溶部を Sephadex LH-20 c.c. によって 16 フラクション (Fr.) に分画し、モルガン菌を使用してペーパーディスク法で抗菌活性の有無を調べたところ、Fr. 1 を除くすべての画分に阻止円が観測された。Fr. 1 の主成分は HPLC 分析により没食子酸であることがわかり、クローブの主成分の一つである没食子酸にはモルガン菌に対する抗菌性がないことが明らかとなった。

(2) メドウスウィートの抗菌活性画分に含まれる成分

抗菌活性を示した Fr. 12~23 をそれぞれ繰り返し c.c. で精製することにより、6 種類の化合物を単離し、HPLC による同定および NMR 解析を行った。単離化合物のうち 5 種は、環状 D-グルコースに 1 個のヘキサヒドロキシジフェニル (HHDP) 基がエステル結合したエラジタンニンであり、加えて分子内にガロイル基が 2~4 個エステル結合した構造であった (Tellimagrandin I、Tellimagrandin II、Heterophyllin A、Rugosin A、Rugosin A methyl ester)。また、残りの 1 種はエラジタンニン二量体の Rugosin D であった。

(3) クローブの抗菌活性画分に含まれる成分

抗菌活性を示した Fr. 5~16 をそれぞれ繰り返し c.c. で精製することにより、11 種の化合物を単離し、HPLC による同定および NMR 解析を行った。単離化合物のうち 3 種は、それぞれ -D-グルコースの 1,2,3 位、1,2,3,6 位、1,2,3,4,6 位がガロイル基とエステル結合したガロイルグルコースであった。8 種はエラジタンニンであり、うち 6 種は HHDP 基が 1 個およびガロイル基が 1~4 個エステル結合した構造の 1-O-galloyl-2,3-O-(S)HHDP-D-glucose、1,3-di-O-galloyl-4,6-O-(S)HHDP-D-glucose、1,2,3-tri-O-galloyl-4,6-O-(S)HHDP-D-glucose、Syzyginin A およびメドウスウィートからも単離された Tellimagrandin I、Tellimagrandin II であった。残りの 2 種は分子内に HHDP 基が 2 個およびガロイル基が 1 ないし 2 個結合した Casuarinon と Rugosin C であることが判明した。

(4) メドウスウィートおよびクローブから単離したエラジタンニン、ガロイルグルコースの抗菌活性

メドウスウィートおよびクローブから単離した計 12 種のエラジタンニンおよび 3 種のガロイルグルコースのモルガン菌に対する抗菌活性を測定したところ、すべての化合物の MIC が 10 μ M ~ 20 μ M の範囲であり、分子内に有する HHDP 基やガロイル基の個数の違いによる抗菌活性の差は認められなかった。

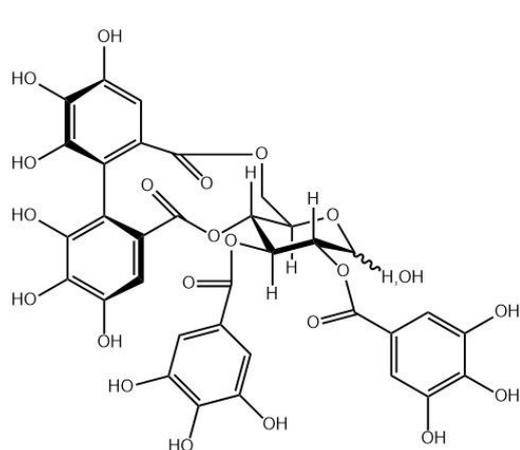
この抗菌試験ではヒスチジンを添加した培地を使用したが、一部の単離化合物についてヒスチジンを添加しない培地を用いて試験を行ったところ、MIC が 100 μ M 以上という結果が得られ、その差の要因について現在検討している。エラジタンニンやガロイルグルコースがモルガン菌

に対して抗菌性を示すことは明らかとなったが、活性の強度については、今後引き続き検討していく。

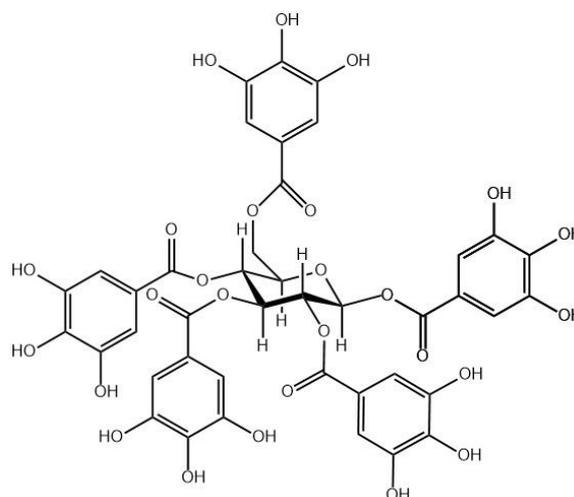
(5) Tellimagrandin I と Pentagalloyl glucose の抗菌活性およびヒスタミン生成抑制作用

メドウスイートやクローブの含有成分である Tellimagrandin I と Pentagalloyl glucose を被験試料として、抗菌活性とヒスタミン生成抑制作用の関連性を検討した。最終濃度 $10\ \mu\text{M}$ ~ $500\ \mu\text{M}$ の範囲で液体培地に添加して一定時間培養し、培養後の生菌数と同時にヒスタミン蓄積量を測定した。その結果、Pentagalloyl glucose の濃度が $25\ \mu\text{M}$ のとき、モルガン菌の生菌数が培養時間 10 時間、20 時間の両方でコントロールと比較して有意に減少し、ヒスタミンの生成も抑制していた。一方、Tellimagrandin の場合は $50\ \mu\text{M}$ でも菌数は対照と変わらず抗菌活性を示さなかったが、ヒスタミン生成量のみ抑制されていた。

我々のこれまでの研究で、Tellimagrandin は $50\ \mu\text{M}$ で HDC を阻害することを明らかにしている。このことから、Tellimagrandin はモルガン菌の増殖を抑制できない濃度においても HDC 阻害作用によりヒスタミン生成を抑制できる可能性が示唆された。



Tellimagrandin I



Pentagalloyl glucose

本研究により、ヒスタミン生成抑制作用のある食用植物抽出物は、HDC 阻害作用のみならず、ヒスタミン生成菌増殖抑制作用を示すこと、加水分解型タンニンは HDC 阻害作用とともに、ヒスタミン生成菌に対する増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。一方、HDC 阻害活性を示さなかった画分にも抗菌活性を有する画分があり、フラボノイド関連化合物が関与していると考えられる。現時点ではケルセチンやケンフェロール関連化合物が存在していることがわかっている段階であり、今後はこれらの成分を単離・構造決定して、ヒスタミン生成菌に対するフラボノイド系化合物の抗菌活性についても調べる。ヒスタミン生成抑制の機序として HDC 阻害作用と抗菌作用が考えられる。Pentagalloyl glucose の実験結果は、見かけ上抗菌活性がヒスタミン生成抑制の要因となっていることを示唆している。一方で Tellimagrandin の場合は HDC 阻害作用がヒスタミン生成抑制の要因の可能性が示唆された。今後、単離化合物について、ヒスタミン生成抑制の機序を解析し、ヒスタミンに起因する食中毒発生防止策構築のための基礎的知見を積み上げたいと考えている。

< 引用文献 >

- 1) 厚生労働省ホームページ [ヒスタミンによる食中毒について \(mhlw.go.jp\)](http://www.mhlw.go.jp)
- 2) Yoko Nitta, Hiroe Kikuzaki, Hiroshi Ueno et al., J of Food Protection, 79, 2016, 463-467
- 3) Yoko Nitta, Hiroe Kikuzaki, Hiroshi Ueno et al., Food Chemistry, 138, 2013, 1551-1556

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoko Nitta, Miyuki Mori, Yuji Noguchi, Yuichi Uno, Misaki Ishibashi, Hiroshi Ueno, Hiroe Kikuzaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Isolation of phenolic components from strawberry cultivar 'Tokun' and their inhibitory activities on recombinant human histidine decarboxylase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Macromol.	6. 最初と最後の頁 33-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 新田陽子、菊崎泰枝	4. 巻 40
2. 論文標題 薬用植物を使用したアレルギー様食中毒予防の研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 50-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Nitta Yoko, Ito Hideyuki, Komori Hirohumi, Ueno Hiroshi, Takeshima Daiki, Ito Mikiko, Sakaue Motoyoshi, Kikuzaki Hiroe	4. 巻 83
2. 論文標題 The ellagitannin trimer rugosin G inhibits recombinant human histidine decarboxylase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1315 ~ 1318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1606695	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 葛西円、菊崎泰枝、新田陽子
2. 発表標題 ヒスタミン生成菌の生育に対する植物由来ヒスチジン脱炭酸酵素阻害成分の影響
3. 学会等名 第469回ビタミンB研究協議会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹島大貴、菊崎泰枝、伊東秀之、小森博文、植野洋志、新田陽子
2. 発表標題 エラジタンニンによるヒスチジンでカルボキシラーゼ活性阻害機構の検討
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田あゆみ、山下慶子、熊崎ほなみ、新田陽子、小倉裕範、菊崎泰枝
2. 発表標題 クローブに含まれるヒスタミン生成抑制成分の探索
3. 学会等名 第26回日本フードファクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹元優花、小原理加、高砂美有、新田陽子、小倉裕範、菊崎泰枝
2. 発表標題 メドウスイートに含まれるヒスタミン産生抑制成分の探索
3. 学会等名 第35回日本香辛料研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新田陽子
2. 発表標題 ヒスチジン脱炭酸酵素および芳香族アミノ酸脱炭酸酵素の活性に及ぼす香辛料成分
3. 学会等名 第35回日本香辛料研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葛西円、菊崎泰枝、新田陽子
2. 発表標題 エラジタンニン、ガロタンニンによるモルガン菌由来ヒスチジン脱炭酸酵素の阻害
3. 学会等名 日本生物高分子学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葛西円、菊崎泰枝、新田陽子
2. 発表標題 エラジタンニン、ガロタンニンによる食品中ヒスタミン蓄積抑制機構の解明
3. 学会等名 第466回ビタミンB研究協議会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nitta Yoko, Ito Hideyuki, Komori Hirohumi, Ueno Hiroshi, and Kikuzaki Hiroe
2. 発表標題 The inhibitory activity of ellagitannins on recombinant human histidine decarboxylase
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	小倉 裕範 (OGURA Yasunori) (60304557)	奈良女子大学・生活環境科学系・教授 (14602)	

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
研究分担者	新田 陽子 (NITTA Yoko) (70403318)	お茶の水女子大学・基幹研究院・准教授 (12611)	

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