

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15793

研究課題名（和文）食品消毒による健康リスク評価のためのハロゲン化チロシン類毒性評価と実態調査

研究課題名（英文）Evaluation of toxicity and formation of halogenated tyrosines that form from food disinfection

研究代表者

小牧 裕佳子（Komaki, Yukako）

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：40811617

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）：食品消毒は食中毒防止に重要な役割を持つ。レタス及びホウレンソウを次亜塩素酸で処理すると、野菜中タンパク質のチロシン残基が塩素化され、塩素化チロシンを生成することが知られる。消毒剤として次亜臭素酸が使用された際は、臭素化チロシンが生成することが予想される。これらのハロゲン化チロシン類の健康リスク評価のため細胞毒性を評価したところ、ジブロモチロシンの強い毒性が検出された。また、細胞に次亜塩素酸または次亜臭素酸を作用した際に抗体反応にて簡便にハロゲン化チロシン類の生成の検出することが可能かを評価した。抗ブロモチロシン抗体にて、塩素化チロシンおよび臭素化チロシンの生成を検出することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品消毒は食中毒防止に重要な役割を持つが、レタス及びホウレンソウを次亜塩素酸で処理すると、野菜中タンパク質のチロシン残基が塩素化され、クロロチロシンとジクロロチロシンを生成することが知られる。消毒剤として次亜臭素酸が使用された際は、臭素化チロシンが生成することが予想される。ハロゲン化された食品中タンパク質は、消毒後の洗浄過程で除去されることなく消費者に届き、体内に取り込まれる。胃酸での消化により単量体化され、体内の細胞はこれらハロゲン化チロシン類に曝露されると考えられる。本研究では、食品消毒処理により食品中に生成するハロゲン化チロシン類が健康リスクとなりうるのかを明らかにすることを目指した。

研究成果の概要（英文）：Food disinfection plays an important role to prevent foodborne illness. Chlorination of leafy vegetables such as lettuce and spinach results in chlorination of tyrosine residues in vegetables. When hypobromous acid is used as a disinfectant, it is likely that brominated tyrosine would form. To evaluate the health risk from these halogenated tyrosines, cytotoxicity was investigated using multiple cell lines. Dibromotyrosine was the most toxic species among tested compounds. Moreover, the use of antibodies to investigate the formation of halogenated tyrosines when cells are treated with hypochlorous acid or hypobromous acid was evaluated. Anti-bromotyrosine antibody successfully detected the formation of chlorinated and brominated tyrosines.

研究分野：環境科学

キーワード：ハロゲン化チロシン類 細胞毒性 食品消毒 消毒副生成物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品消毒は食中毒防止に重要な役割を持ち、次亜塩素酸系消毒剤を用いた消毒は世界的に広く行われている。水道水分野では、消毒剤と原水中有機炭素との反応により消毒副生成物という物質群が生成することが知られるが、食品消毒においても、消毒剤と食品中有機物の反応が非意図的な副産物を生成することが懸念される。レタス及びホウレンソウを次亜塩素酸で処理すると、野菜中チロシン残基が塩素化され、クロロチロシンとジクロロチロシンを生成することが知られる。水産加工においても塩素消毒は行われ、水産物中のタンパク質が塩素の修飾を受け、クロロチロシンを生成することが報告されている。消毒剤として次亜臭素酸が使用された際は、臭素化チロシンが生成することが予想される。ハロゲン化修飾を受けた食品中タンパク質は固体上に留まるため、消毒後の洗浄過程で除去されることなく消費者に届き消費される。体内に取り込まれたタンパク質内ハロゲン化アミノ酸は、胃酸による消化により単量体化され、体内の細胞はこれらハロゲン化チロシン類に曝露されると考えられる。チロシン以外のアミノ酸残基、脂質を前駆体とするハロゲン化物も懸念されるが、構造活性相関にて、芳香族環を持つ消毒副生成物は脂肪族のものより発生毒性が強いと報告されており、また、野菜消毒における塩素化チロシン生成は既知であるため、本研究ではハロゲン化チロシン類(クロロチロシン、ジクロロチロシン、ブロモチロシン、ジブロモチロシン)に注目し、食品消毒の健康リスク評価に資するべく、ハロゲン化チロシン類の毒性評価と食品中での生成量の評価を行うことを目指した。

2. 研究の目的

食品消毒処理で広く用いられる次亜塩素酸は、食品中タンパク質のチロシン残基を塩素化し、塩素化修飾されたチロシン残基は固体上に残留するため、消毒後の洗浄過程で除去されることなく消費者に届く可能性があるが、消毒処理による食品中高分子化学修飾がヒトの健康リスクとなりうるかを詳細に調査した研究はない。本研究では、食品消毒処理により食品内に生成するハロゲン化チロシン類の毒性評価と、生成したハロゲン化産物を抗体反応で簡便に検出することが可能かを評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞の培養

ヒト前骨髄性白血病HL-60は理研細胞バンクより購入し、10%ウシ胎児血清(FBS)を含むRPMI培地にて培養した。ヒト皮膚角化細胞HaCaTは、German Cancer Research CenterのNorbert Fusening博士のご厚意により分与されたものであり、10%FBSを加えたDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)にて培養した。ヒト肝芽腫由来細胞株HepG2は、JCRB細胞バンクより購入し、10%FBSを含むDMEMにて培養した。ヒト大腸癌細胞Caco-2、日本人胃癌細胞株で高分化型管状腺癌由来のMKN7、日本人胃癌細胞株で低分化型充実型腺癌由来のMKN45は理研セルバンクより購入し、Caco-2は20%FBSと非必須アミノ酸を加えたMinimum Essential Medium(MEM)にて、MKN7とMKN45は10%FBSを加えたRPMI培地で培養した。

(2) ハロチロシン類の曝露方法

HL-60細胞を 4×10^5 cells/35-mm dishとなるよう調製し、10%FBSを含むRPMI培地で調製したクロロチロシン(ClTyr)、ジクロロチロシン(DiClTyr)、ブロモチロシン(BrTyr)、ジブロモチロシン(DiBrTyr)を添加した。24時間ごとに細胞液を採取し、トリパンプルー色素排除法にて細胞生存率を求めた。他の接着細胞は35-mm dishに播種し、50% confluentの時点でそれぞれの培養培地で調製したハロゲン化チロシン類を作用した。24時間ごとにトリプシン回収し、トリパンプルー色素排除法にて細胞生存率を求めた。

(3) 次亜塩素酸および次亜臭素酸の調製

5%次亜塩素酸ナトリウム溶液を適宜希釈し、292 nmの吸光度より濃度を求めた。40 mM次亜塩素酸ナトリウム溶液を調製し、45 mM臭化ナトリウム溶液と等量混合し、30分間室温で反応させた。329 nmでの吸光度から、生成した次亜臭素酸の濃度を求めた。

(4) 生成したハロチロシン類の検出法

HepG2細胞を35-mm dishに播種し、confluentになるまで培養した。次亜塩素酸液及び次亜臭素酸液をリン酸緩衝食塩水にて希釈し、HepG2細胞上に添加し室温で10分間反応させた。得られた細胞サンプルの塩素化チロシン類、臭素化チロシン類の検出はウェスタンブロット法にて行った。抗クロロチロシン抗体はHycultBiotech(HP5002)より、抗ブロモチロシン抗体は日本老化制御研究所(MBY-020P)より購入した。

4. 研究成果

(1) ハロゲン化チロシン類の細胞毒性

ハロゲン化チロシン類を最終濃度 2.5 mM となるよう調製し、HL-60 に作用した結果を図 1A に示す。ジブロモチロシンでのみ時間依存的な細胞生存率の低下が見られた。そこで、ジブロモチロシンについてさらに詳細な生存率を測定したところ、濃度依存的な細胞生存率の低下が観察された (図 1B)。MKN7 細胞にハロゲン化チロシン類を 5 mM 作用させた際に、明確な細胞生存率の低下が見られたのはジブロモチロシンのみであった。ジクロロチロシンでは明確な細胞生存率低下は観察されなかったが、細胞増殖の抑制は見られた (図 2)。同様の細胞毒性評価を HaCaT、HepG2、CaCo-2、MKN45 細胞でも試みたが、明確な生存率低下は認められず、ハロゲン化チロシン類の溶解度の限界もあり、これ以上の高濃度での測定はできなかった。

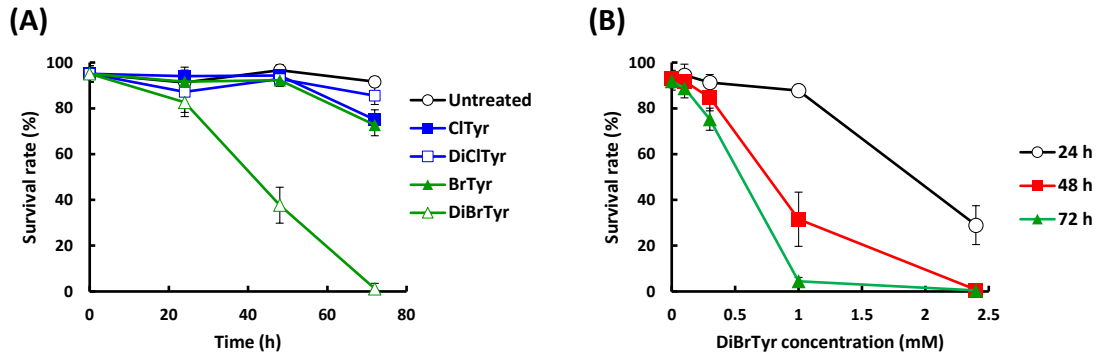


図 1 HL-60 細胞を用いた (A) ハロゲン化チロシン類の毒性比較、(B) ジブロモチロシンの細胞生存率

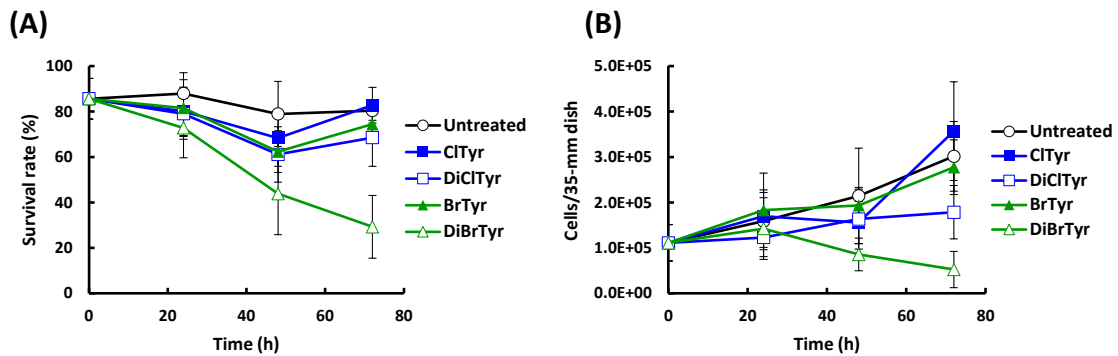


図 2 MKN7 細胞を用いたハロゲン化チロシン類の (A) 毒性比較と (B) 増殖曲線

(2) 細胞内でのハロゲン化チロシン類生成の検出

クロロチロシンは好中球の酸化反応の、プロモチロシンは喘息の好中球の活性のバイオマーカーとして広く用いられる。HepG2 細胞に次亜塩素酸および次亜臭素酸を作用し、生成した塩素化チロシン、臭素化チロシンをウェスタンブロッティングにより検出した (図 3)。CBB 染色では、1000 μ M の次亜塩素酸、次亜臭素酸を作用したサンプルではタンパク質の泳動パターンがそれ以下の濃度のものとは大きく異なっており、大きな質的変化が起こっていることが伺えた。抗クロロチロシン抗体でハロゲン化チロシンの生成を検出したところ、1000 μ M の次亜塩素酸、次亜臭素酸作用条件にて 25 kDa 付近のバンドの消失と、50 kDa 付近での新たなバンドの形成が検出されたが、この抗クロロチロシン抗体では塩素化チロシンと臭素化チロシンの生成を区別することはできないことが伺えた。一方、抗プロモチロシン抗体でハロゲン化チロシンの生成量を検出したところ、次亜臭素酸作用サンプルにて 300 μ M 以上の作用濃度で細胞内タンパク質の臭素化が強く起こっていることが示唆された。また、次亜塩素酸処理サンプルでは 1000 μ M にて 50 kDa 付近のバンドの生成のみが検出された。この抗プロモチロシン抗体は、3, 5-ジブロモチロシン、3, 5-ジクロロチロシンに反応するとされており、次亜塩素酸処理では主にジクロロチロシンを、次亜臭素酸処理ではジブロモチロシンを検出したのだと考えられるが、次亜塩素酸処理サンプルの CBB パターンから伺える、高分子量域の生成物をこの抗体では検出できないことが示唆された。よって、臭素化反応における臭素化産物の検出においてのみ、簡便な検出方法としての抗体反応の利用は、期待の持てる結果となった。

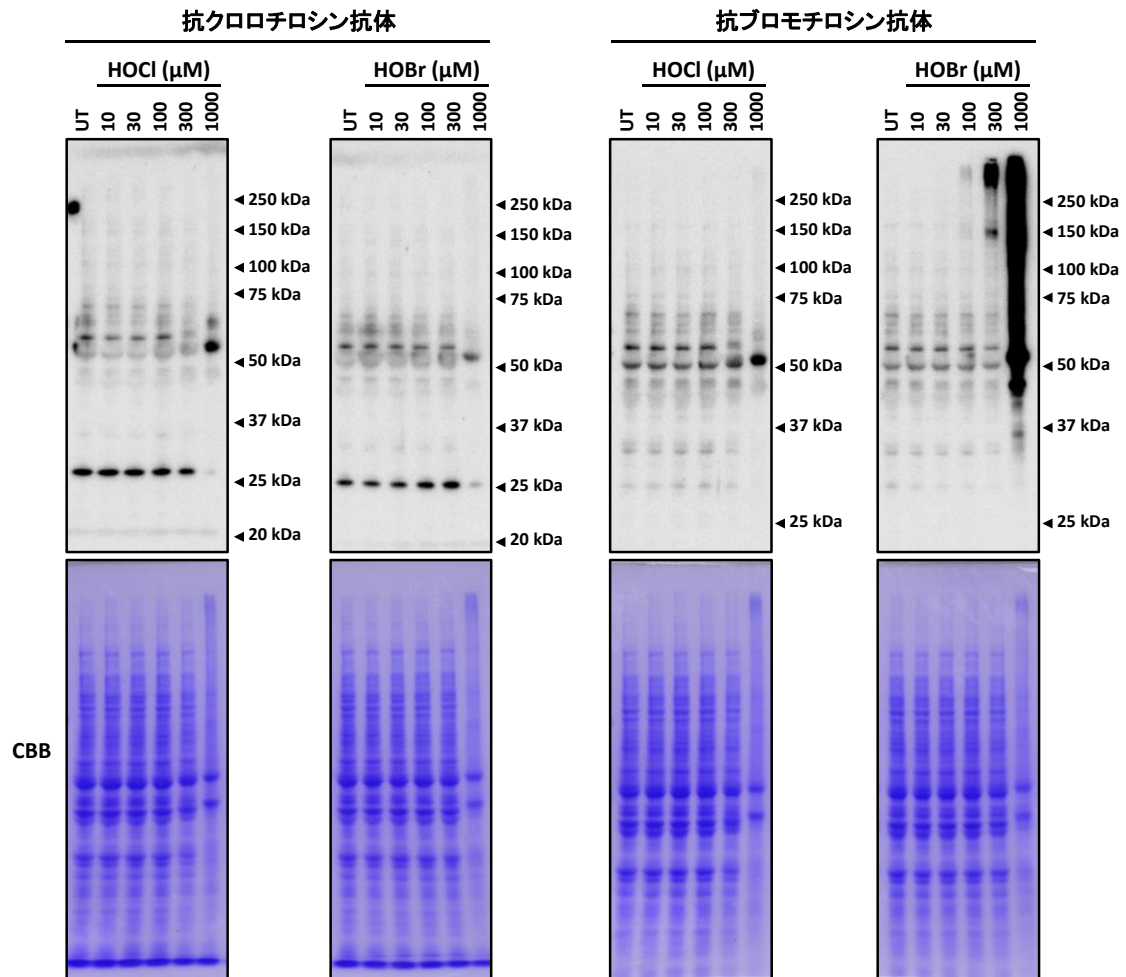


図3 HepG2細胞における次亜塩素酸 (HOCl) および次亜臭素酸 (HOBr) 処理後のハロゲン化チロシン類の検出

(3) 考察と今後の展望

食品消毒に使われる次亜塩素酸は食品中の生体高分子と反応し塩素化産物を生成する。野菜中チロシン残基は塩素化され、クロロチロシン類を生成する。最近、葉野菜の表皮組織に含まれる脂質中の不飽和脂肪酸に塩素が付加し、クロロヒドリンを生成することが報告された。消毒剤として次亜臭素酸が使用された際は、臭素化物が生成することが予想される。生体高分子がハロゲン化された場合、ハロゲン化修飾を受けた高分子はそのまま固体上に留まるため、消毒後洗浄過程で除去されることがなく消費者に届き消費されることが考えられる。そして消化の過程でハロゲン化修飾を受けた単量体が放出されることが予想される。こうした消毒処理による食品中高分子の化学修飾がヒトの健康リスクとなりうるかを調査するため、クロロチロシン、ジクロロチロシン、プロモチロシン、ジプロモチロシンの毒性評価を行った。まず皮膚細胞及び肝臓由来細胞を用いたが、強い細胞毒性を検出できず、物質間の毒性比較なども行えなかった。細胞は由来となる器官により代謝能が異なり、酵素活性などにも幅がある。より食事摂取に近いと考えられる消化器官系の培養を入手し、毒性評価を行ったが、ヒト大腸癌細胞 Caco-2、日本人胃癌細胞株で低分化型充実型腺癌由来である MKN45 のハロゲン化チロシン類への感受性は低く、日本人胃癌細胞株で高分化型管状腺癌由来である MKN7 でのみジプロモチロシンの細胞毒性が検出できた。また、様々な化学物質に対する抵抗性が低いことで知られるヒト前骨髄球性白血病細胞由来細胞株 HL-60 細胞ではジプロモチロシンの顕著な毒性が観察できた。今後はこの毒性の起こるメカニズムを詳細に調べるため、DNA 損傷生成の有無などを検討していく予定である。また、今回有用性が判明した抗プロモチロシン抗体を用い、ジプロモチロシン由来の臭素が細胞内タンパク質を臭素化するののかも検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Komaki Yukako, Suganuma Koki, Ibuki Yuko	4. 巻 117
2. 論文標題 Protective role of electrophile-reactive glutathione for DNA damage repair inhibitory effect of dibromoacetonitrile	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Sciences	6. 最初と最後の頁 305 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jes.2022.05.015	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 Komaki Yukako, Ibuki Yuko	4. 巻 423
2. 論文標題 Inhibition of nucleotide excision repair and damage response signaling by dibromoacetonitrile: A novel genotoxicity mechanism of a water disinfection byproduct	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hazardous Materials	6. 最初と最後の頁 127194 ~ 127194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhazmat.2021.127194	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小牧裕佳子, 片山貴穂, 伊吹裕子
2. 発表標題 消毒副生成物ハロアセトニトリル類による細胞周期への影響
3. 学会等名 第57回水環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小牧裕佳子, 菅沼光希, 伊吹裕子
2. 発表標題 消毒副生成物ジブロモアセトニトリルの毒性におけるグルタチオンの役割
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅沼光希, 小牧裕佳子, 伊吹裕子
2. 発表標題 ジブromoアセトニトリルによるヌクレオチド除去修復阻害とグルタチオン枯渇の関係
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukako Komaki, Yuko Ibuki
2. 発表標題 Dibromoacetonitrile disrupts nucleotide excision repair
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Water Disinfection, Byproducts and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukako Komaki, Yuko Ibuki
2. 発表標題 Nucleotide excision repair disruption by dibromoacetonitrile
3. 学会等名 The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藪田慎也, 小牧裕佳子, 伊吹裕子
2. 発表標題 水道水中の消毒副生成物八口酢酸類の毒性評価
3. 学会等名 令和元年度日本水環境学会中部支部研究発表会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------