

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350153

研究課題名(和文) 植物性食品のヘテロサイクリックアミンに対する体内で示す真の抗変異原性の評価

研究課題名(英文) The evaluation of true activity of antimutagenic plant food factors which are treated with heat processing and/or digestive enzymes

研究代表者

小原 章裕 (Ohara, Akihiro)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：20194615

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)：日本人の死亡原因の第一位を占めているガンは、食品中の機能性成分により予防可能であるという知見が多く報告されている。しかし機能性成分を含む食品類は、実際の食生活では加熱処理、更には消化酵素などの作用を受ける事になる。本研究では、それら作用によって活性が変化するかについて検討した。タンパク質を多く含む食品を加熱した際に、発ガン物質が生成されたが、活性がある食品と一緒に添加すると生成は抑えられた。また、活性を示す素材を消化酵素処理しても活性に変化はなかった。それら活性成分は発ガン物質に作用していることも予想できた。活性を持った食品は実際の食生活でも効果を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：There are many reports to be able to prevent cancer, which is the first place of Japanese cause of death, by food factors. But foods, contain the factors, are treated by many process such as heat treatment and digested by enzymes etc. in dietary habit. In this study, their bioactive changes by these processings were investigated. A carcinogens and/or mutagens were produced by heat treated high protein food. However, the formation of carcinogens and/or mutagens decreased, when the foods contained activities were heated together. In addition, the activity did not change even if the active materials were treated with digestive enzyme. It was expected that those active ingredients acted with carcinogens and/or mutagens directly. Therefore, it was suggested that the food containing the activity showed an effect in the eating habits.

研究分野：食生活

キーワード：抗変異原性成分 Nostoc属 消化酵素 加熱処理 活性発現メカニズム

### 1. 研究開始当初の背景

1981年から日本人の死亡原因の第一位はガンが占めており、現在に至るまで増加の途をたどりながら第一位を継続しており、この傾向は今世紀半ばまで変化する事はないと予想されている(人口動態統計(2015))。疫学調査の結果より、ガンの主要な発症要因は、喫煙と食べ物で、他の要因を合わせて、75%以上が発ガン物質による化学発癌であることはよく知られている(M. Keeら(1983))。また、米国におけるデザイナーフーズ計画などにおいて、食生活に気を付けることによりガンを予防する事ができることも知られている(大澤ら(1995))。

前世紀の後半から活発に進んだ食品の第3次機能成分を明らかにする研究の一環で、発ガン物質と関連性の高い変異原物質に対する抗変異原成分も精力的に明らかにされ(小原ら, 2013, 2014, 2015), これら物質がガンの予防に有効に作用するのではないかと期待されている。

これら活性成分を含む食品類は、実際の食生活では加熱処理を受け、更には実際に食用に供すると消化酵素などの作用を受ける事になる。しかし、これら複雑な処理によって活性がどのように変化するかについて検討した研究は寡聞ながら多く見受けられないが、本知見を明らかにすることは、活力ある高齢社会を構築するために必要な事である。

### 2. 研究の目的

上記の背景の下、この複雑な系を通じて人体に影響を与えるか否かを推定するために、以下のモデルケースを通じて明らかにすることにした。

- ① 動物性食品を加熱処理して生じる変異原物質(主にヘテロサイクリックアミン類(以下HCA類))の生成に対して活性成分を含む食品を添加した際の生成への影響
- ② 研究代表者が明らかにした抗変異原性を示す試料を用いて消化酵素処理する事により試料の示す活性の消長
- ③ 上記項目で活性を示した際の活性発現メカニズムの推定

### 3. 研究の方法

上記目的を達成するために以下実験を行った。

- 1) 高タンパク性食品を加熱処理して生じる変異原物質(主にHCA類)の生成に対して活性成分を含む食品を添加した際の生成への影響

HCAは、特に加熱調理された肉や魚等のタンパク性食品で形成されることが多い。そのため日常生活において摂取する機会が多く、HCA形成を減少させることで発がんのリスクを減らすことが期待できる。

本研究では鶏肉と豚肉を用いて、加熱時間と肉の種類の違いによる調理ロスの変化を

調べ、HCA生成量の増減をHPLC法による分析(Y. Yaoら(2013), 山本ら(1988), 江越ら(1995))とAmes testによる変異原性試験(矢作ら(1980))により評価した。さらに豚肉においては抗変異原性を示すと以前に報告のあった調味料・スパイス添加による影響も調べた。

- 2) 抗変異原性を示す試料を用いて消化酵素処理する事により試料の示す活性の消長

胃の消化酵素であるペプシンと小腸で主要な役割を果たすパンクレアチンによる処理によって抗変異原性に変化が生じるか検討をした。

ペプシン溶液(pH2)あるいはパンクレアチン溶液(pH7.5)に、抗変異原性を示す試料溶液(今回は、食材として利用されている微細藻類の一種(*Nostoc*属)及び春日井サボテンを研究試料として使用した)及び変異原物質を加えて37℃で前者は30分、後者は2時間作用させた後に抗変異原性試験を行い、コントロール区と比較することにより活性を調べた。

- 3) 消化酵素処理によって活性を示した試料の活性発現メカニズムの検討

Ames試験で抗変異原活性が確認された葛仙米活性成分が1-NPに対してどのように作用しているのか調べるために、短時間かつ簡便に分析できる薄層クロマトグラフィーによる分離能を用いて調べた。葛仙米活性成分(メタノール画分、酢酸エチル画分)の1-NPに対する影響は、二次元薄層クロマトグラフ法により出現したスポットで確認した。

まず、メタノールを用いて濃度調製した1-NPに葛仙米酢酸エチル画分またはメタノール画分100μLに1-NPを100μLずつ加え、37℃の恒温槽で30分間振盪させた。得られた混合液をそれぞれ酢酸エチル画分+1-NP溶液、メタノール画分+1-NP溶液として試験に供した。

TLCプレート(Silica gel 60F<sub>254</sub>)に抗変異原性を示した葛仙米抽出画分、1-NP溶液、葛仙米抽出画分+1-NP溶液をそれぞれスポットした後に展開させた(展開溶媒(ヘキサン:酢酸エチル=4:6))。展開した後で目視および紫外線ランプ(256Å)でスポットを確認した。その後TLCプレートを風乾させた後に90度回転させて展開溶媒(酢酸エチル=2:8)を用いて展開を行った。展開した後に目視および紫外線ランプ(256Å)でスポットを確認し、上記の試料溶液ごとと比較し、スポットの消失や新たなスポットの出現などを確認した。

### 4. 研究成果

- 1) 実動物性食品を加熱処理して生じる変異原物質(主にHCA類)の生成に対して活性成分を含む食品を添加した際の生成への影響

表1に示したように、鶏肉では加熱時間7

分間、14分間ともにHCA類は検出できなかった。しかし、豚肉においては多くのHCA類において加熱時間が延びることによってHCA類の含有量が増えている。また、両試料の変異原性を測定したところ、豚肉は復帰コロニー数が7分で800に対して14分で1600、鶏肉では100に対して250と両方とも加熱時間が延びると並行して変異原性は上昇していた(図1)。

このことより例外も認められるが、鶏肉と豚肉において加熱時間が長くなればなるほどHCA形成量も増加したと結論した。

表1 鶏肉, 豚肉の加熱処理によって生じるHCA類

		IQ	MeIQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	PhIP
鶏肉	7分	ND	ND	ND	ND	ND
	14分	ND	ND	ND	ND	ND
豚肉	7分	ND	0.390	0.169	0.233	ND
	14分	ND	0.822	0.211	0.349	ND

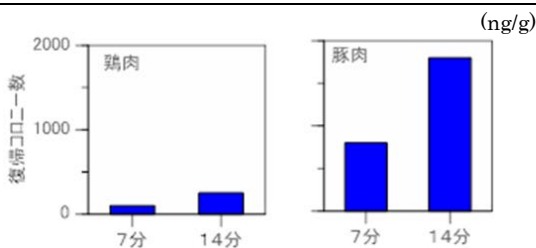


図1 鶏肉, 豚肉の加熱によって生じる変異原性

次に、我々はこれら食品を摂取する際には、多くの場合、調味料や他の食材と一緒に加熱処理する。そこで、今回はモデルケースとして「豚肉生姜焼き」をイメージした加熱処理を行い、変異原性の動向とHCAの生成量を調べた。

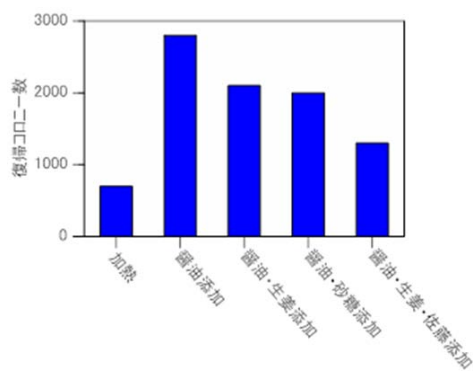


図2 豚肉加熱処理による変異原性に対する調味料の影響

図2からも明らかなように、調味料を添加して加熱処理を行った場合、そのまま加熱するよりも変異原性が上昇する場合もあるが、複数の調味料を添加することにより変異原性は低下することが観察された。

また、それと同様に各種HCAの生成量も変化している。これらHCAは、種類によって変異原性の強弱に差があるので、変異原性の増減と全てが並行して生成量が低下しているわけではないが、概観すると生成量は全ての調味料を添加した際に減少する傾向が観察された(表2)。今後、さらにその解釈に

ついては検討を加える必要がある。

表2 豚肉加熱処理によるHCA生成における調味料の影響

	醤油	醤油+生姜	醤油+砂糖	醤油+砂糖+生姜
IQ	2.26	1.41	5.02	3.26
MeIQ	1.22	2.00	1.04	0.82
MeIQx	0.40	0.78	0.36	0.38
2,8-DiMeIQx	1.01	0.53	0.37	trace
PhIP	ND	ND	1.75	trace

2) 抗変異原性を示す試料を用いて消化酵素処理する事により試料の示す活性の消長

① 微細藻類 (*Nostoc* 属) 及びその他の抗変異原活性

変異原物質は、取込まれた物質そのものが直接DNAに損傷を与える直接変異原物質と、代謝活性化された物質がDNAに損傷を与える間接変異原物質に分類される。

本試験では、発ガンイニシエーターであり各種変異原物質に対する消失作用を検討した。即ち、試料の各画分の濃度は1mg/mLに統一して行った。各変異原物質の濃度は、1日に摂取する食品によって誘起されると推定される総変異菌数が340,000(S-9)であることを参考に(大村ら(1986)), 40,000の約1/1000に相当する復帰コロニー数を生じる濃度(1-NP:1.5µg/mL, Trp-P1:0.7µg/mL及びIQ:20ng/mL)に調製して行った。

まず、直接変異原物質に対してどの程度抗変異原性を示すのかを検討した。

n-ヘキサン、酢酸エチル、メタノールで順次超音波抽出した*Nostoc*属(髪菜、イシクラゲ、葛仙米)各抽出物1mg/mLの1-NPに対する抗変異原活性を以下に示した。髪菜のヘキサン抽出画分は収量が少なく必要量採取することが出来なかった為、酢酸エチルとメタノール抽出画分のみで実験を行った。

髪菜は酢酸エチル抽出画分が17.0%、イシクラゲはヘキサン抽出画分が26.4%、葛仙米はヘキサン抽出画分が30.5%と最も高い活性を示した。各画分の濃度をさらに2mg/mLと5mg/mLに調整して抗変異原活性を測定したところ、葛仙米のヘキサン抽出画分を例外として、活性は濃度依存的に上昇し、またイシクラゲと葛仙米は濃度を5mg/mLに上げると酢酸エチル抽出画分の活性がそれぞれ62.3%、89.1%と3画分の中で最も高い活性を示した。

また、4-NQOに対しては、髪菜は酢酸エチル抽出画分が36.6%、イシクラゲが3画分とも50%前後の活性を示した(ヘキサン:49.4%、酢酸エチル:60.3%、メタノール:60.3%)が、葛仙米は3画分とも活性を示さなかった。

次に間接変異原物質Trp-P-1及びIQに対する抗変異原性を検討した。

Trp-P-1に対しては、試料3種類とも活性を示さなかった。しかし同じ間接変異原物質でありHCA類の1つであるIQに対しては、イシクラゲは酢酸エチル抽出画分が43.6%、

葛仙米はメタノール抽出画分が43.0%と他の画分と比較して高い活性を示した。髪菜は3画分とも活性を示さなかった。杉村は、変異原物質のHCA類は大別すると、IQのようにイミダゾール部分が構造に組み込まれたもの(IQ-type)と、Trp-P-1のようにイミダゾール部分の無いもの(non-IQ-type)とに分類でき、魚肉・牛肉を加熱した時はIQ-typeが多いと報告している(1995)。このように食品に含まれる変異原物質は化学構造上多様な種類が存在する。よって種々の変異原物質に対する抗変異原活性を評価することは、髪菜、イシクラゲ、葛仙米の示す抗変異原活性が実際の食生活において多岐に働くことに繋がる。

*Nostoc* 属 3 種類の各画分の各種変異原物質に対する抗変異原活性の強さを表1にまとめた。イシクラゲの酢酸エチル抽出画分は直接変異原物質に対して最も高い抗変異原活性を示し、間接変異原物質のIQに対しても同様の抗変異原活性を示した。よって種々の変異原物質を抑制する可能性が示唆された。

表3 *Nostoc* 属 3 種類の抗変異原性

	直接変異原物質		間接変異原物質	
	1-NP	4NQO	Trp-P1	IQ
<b>髪菜</b>				
ヘキサン	NT	NT	NT	NT
酢酸エチル	±	+	-	-
メタノール	+	-	-	-
<b>イシクラゲ</b>				
ヘキサン	±	+	-	-
酢酸エチル	-	++	-	+
メタノール	±	++	-	-
<b>葛仙米</b>				
ヘキサン	±	-	-	-
酢酸エチル	±	-	-	±
メタノール	+	-	-	+

++, 60%以上 : +, 31~60% : ±, 15~30% : -, 15%未満

NT : 試験できず

また、詳細なデータは示していないが、研究代表者がアドバイザーとして参画し地元製品としてブランド化を進めている春日井サボテンについても同じ手法で検索を進め、酢酸エチル画分に1-NPに対する抗変異原性が存在することを明らかにしている。また、本画分の活性成分の一つがフェルラ酸であることも見出している。

### ② 1-NP に対する抗変異原活性の消化酵素処理による活性の消長

実際の食生活を想定して、活性を示した試料に対して消化酵素処理を行い、活性の変化を調べた。

粉末乾燥物の試料と1-NPを消化酵素溶液中で反応させたものを試料溶液として抗変異原活性試験を行った。ペプシン処理区、パンクレアチン処理区共に無処理区と有意な差を示さなかった。このことから、今回使用した試料の髪菜、イシクラゲ、葛仙米は、消

化酵素処理によって活性は消滅せずに維持されると推察された。

次に1mg/mLの濃度で1-NPに対して高い抗変異原活性を示した髪菜の酢酸エチル抽出画分、イシクラゲのヘキサン抽出画分、葛仙米のヘキサン抽出画分について、同様に消化酵素処理をして抗変異原活性試験を行った。イシクラゲと葛仙米はペプシン処理区、パンクレアチン処理区共に無処理区との間に有意な差を示さなかった。髪菜はペプシン処理では、pH2.0において活性が消滅したのに対し、pH4.0とpH5.0では活性が復活し、さらに無処理区より優位に高い活性を示す結果となった( $p < 0.05$ )。胃内は本来pH2と言う事になっているが、実際は食品などの固形物が入ることによって、pH4程度に上昇している場合もあるので、実際の食生活において活性は残っている可能性が高いことが示唆された。*Nostoc* 属や他の微細藻類についての消化酵素処理における抗変異原活性の変化についての報告は、寡聞ながら研究代表者の調べた範囲では見受けられなかったが、Fernándezらは、一般的に消化酵素処理によって機能性成分の構造が変化し、この理由として処理時間や消化液のpHの違いによるものと述べている(2013)。本実験における髪菜の酢酸エチル抽出画分も、pHの変化によって抗変異原活性が減少或いは増加したのかもしれない。今後詳細に検討をする必要がある。

### 3) *Nostoc* 属の抗変異原成分の活性発現メカニズムの推定

1-NP に対し活性を示した葛仙米抽出物(酢酸エチル画分、メタノール画分)が1-NPに対してどのように影響しているのか調べるために薄層クロマトグラフィー(TLC)による分離・分析を行った。

酢酸エチル画分を1-NPに作用させた際の結果を図3に示した。左から酢酸エチル抽出画分を分離したもの、1-NPのみを展開したもの、酢酸エチル画分と1-NPを作用させた混合液を分離したものとなっている。

図3より明らかのように、酢酸エチル画分及び1-NP由来のスポット以外に、新しいスポットN1及びN2が新たに出現しており、活性成分が1-NPに作用して新たなスポットに由来する生成物を生成する事によって変異原物質、1-NP、の変異原性を減少させた事が予想された。



図3. 葛仙米酢酸エチル画分の1-NPに対する影響

(ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 6 and ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 8)

次に、メタノール画分と1-NPを作用させ

た際の結果を図4に示した。左からメタノール抽出画分を分離したもの、1-NPのみを展開したもの、メタノール画分と1-NPを作用させた混合液を分離したものとなっている。

図4より明らかなように混合液を分離した図において、点線のスポットで示した1-NPのスポットが観察できなくなり、1-NPが消失した可能性が示唆された。しかし、酢酸エチル抽出画分との混合液を分離した際に観察できた新たに出現したスポットはみあたらなかった。



図4 葛仙米中メタノール画分の1-NPに対する影響

(ヘキサン：酢酸エチル=5：5 and 酢酸エチル 100%)

以上の結果から、葛仙米の酢酸エチル画分は、1-NPと反応し、新しい物質を生成すること、メタノール画分は1-NPに作用し1-NPのスポットを消失させることで高い抗変異原性を示したことから、抗変異原性を示す物質は変異原物質に作用して新たな物質を形成することが示唆された。

#### 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)

Etsuko Harada, Toshihiro Morizono, Ken-ichiro Minato, Akihiro Ohara and Takeo Hasegawa, Safety evaluation of *Grifola Gargal*, an edible basidiomycete from Chile, *Mushroom Science and Biotechnology*, 査読有, 22, 79-85 (2014)

能勢充彦, 氏田 稔, 高谷芳明, 湊 健一郎, 日坂真輔, 堀池愛一, 小原章裕, 春日井サボテンに含まれる生理活性の検索, 名城大学総合研究所論文集, 査読有, 14, 1-8 (2015)

〔学会発表〕(計 4件)

川村 磨史, 小原 章裕(5番目) 他, *Nostoc*属の示す抗変異原性に対する消化液処理による影響, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014年3月29日, 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

Akihiro Ohara et al., The anticarcinogenicity of microalgae, *Nostoc* genus, 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, 2015年5月17日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小原 章裕 他, 春日井サボテンに含まれる生理活性の検索, 日本食品科学工学会第62回大会, 2015年8月29日, 京都大学吉田キャンパス(京都市左京区)

小原 章裕 他, 微細藻類, *Nostoc*属の抗発ガン性について, 日本農芸化学会 2016

年度大会, 2016年3月29日, 札幌コンベンションセンター(札幌市白石区)

〔図書〕(計 1件)

小原 章裕, *アイ・ケイコーポレーション*, 基礎食品学(遠藤 泰志 他編), 2015, 121

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: サボテン抽出エキス、このエキスを含む健康食品等及び医薬

発明者: 小原章裕、能勢充彦

権利者: 春日井商工会議所

種類: 特許

番号: 特願 2014-85283

出願年月日: 平成 26 年 4 月 17 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-agr.mei.jo-u.ac.jp/cgi-bin/la-bo10/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小原 章裕 (OHARA Akihiro)

名城大学・農学部・教授

研究者番号: 20194615