

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14408

研究課題名（和文）食品添加物の細胞毒性試験による新しい毒性評価法の確立

研究課題名（英文）Development of new methods for the analysis of cytotoxicity by food additives

研究代表者

亀村 典生（Kamemura, Norio）

徳島文理大学・人間生活学部・講師

研究者番号：10632656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：食品添加物は様々な食品に添加されている。日本では動物試験により安全性評価を行っているが、低濃度または異なる添加物の組み合わせを消費することの長期的な影響に関しては明確になっていない。この研究では蛍光プローブを用いたフローサイトメトリー解析により食品添加物である抗酸化剤（BHA、BHT、BHT）と抗カビ剤（Azoxystrobin, biphenyl）の細胞毒性を調べた。これらの食品添加物は低濃度で細胞内カルシウムおよび亜鉛濃度を増加させ、酸化ストレスに対する細胞の脆弱性を誘発した。したがって食品添加物の毒性評価には動物試験だけでなく細胞への影響を見るために細胞試験も必要であることを提案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品添加物を使用することは一般化されているが、食品添加物の規定量以下であっても体内への影響が懸念されており、新しい毒性を判定する方法が急務となっている。本研究は食品添加物の細胞毒試験に注目し、フローサイトメーターを用いた細胞毒性試験により、食品添加物の毒性の有無、さらにどのような機構で毒性を引き起こすのかを判定できることを明確にした。本方法は細胞レベルで毒性を調べるため、動物試験に比べて時間が短く、さらに化合物の低濃度、長期投与での細胞に対する影響を見ることができる。本研究は食品添加物や食品中の化合物の毒性を決定できることから、食品の安全性を高める研究であり、社会的な意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Food additives are added to foods to keep them fresh or to enhance their colour, flavour or texture. All food additives used in Japan undergo a safety assessment by Toxicological tests on animals, before they are approved. However, the long-term effects of consuming low concentrations or a combination of different additives are currently unknown. This study examined the cytotoxic effect of food additives, antioxidants (BHA, BHT, BHT), preservatives (Azoxystrobin, biphenyl) by flow cytometry with fluorescent probes. These food additives increased levels of intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ in low concentration, resulting in an induced vulnerability of cells to oxidative stress. This study will contribute to the safety evaluation of food additives in the future. Hence, we propose that the toxicity evaluation of food additives should be carried out not only at the animal level, but also at the cellular level.

研究分野：食品衛生

キーワード：食品添加物 細胞毒性試験 細胞内カルシウム 細胞内亜鉛

1. 研究開始当初の背景

食品添加物を多くの食品に使われ、現在一般化している。実際に食品添加物は多くの有益性を持つが、体内への影響が懸念されている。実際に動物試験などにより一日摂取許容量 (ADI) を決定しているが、規定濃度以下であっても体内への影響が報告されており、新しい安全評価法を確立することが求められている。このような背景から食品添加物の細胞内因子への影響に注目し研究が開始された。

2. 研究の目的

毒物が体内に入ると細胞に影響を与え、さらに多くの細胞が障害を受けることで、症状として現われる。したがって、細胞単位で化合物の影響を見ることで、より詳細にその化合物の毒性を調べることができる。現在食品添加物などは動物試験により基準を決定しているが、低濃度で長期に細胞がさらえることによる影響に関しては、正確に反映されていない。本研究の目的は、細胞を用いた毒性試験の有効性の検証と現在毒性が高いと考えられる食品添加物、食品中に含まれる化合物の毒性機構を明確にすることである。

3. 研究の方法

(1) 細胞毒性を引き起こす食品添加物の探索

フローサイトメーターを用いて、食品添加物のラット胸腺細胞への影響を調べた。蛍光プローブを使用し、主に細胞死、細胞内カルシウム濃度、細胞内亜鉛濃度、膜電位の変化、還元型グルタチオンの変化、酸化ストレスに対する脆弱性の増加等を測定する (kamemura et al., 2017, Toxicol Res)。

(2) 食品添加物の好塩基球細胞への影響

ラット好塩基球白血球細胞 (RBL-2H3) を用いて、食品添加物の添加によりケミカルメディエーターの遊離を促進するのかを調べた。アレルギー刺激は anti-DNP-IgE と DNP-BSA により行った。ケミカルメディエーターの遊離の量に関しては、遊離ヒスタミンとヘキサキナーゼの活性により決定した。

4.

研究成果

(1) 抗酸化剤ブチルヒドロキシアニソール (BHA) の毒性機構とジブチルヒドロキシトルエン (BHT) との毒性の違い

BHA と BHT は抗酸化剤であり、主にドックフード等に使用されている。BHT に関しては体内への影響が懸念され、現在はあまり使用されていない。そこで、BHA と BHT に関して毒性機構の違いを調べた。BHT に関してはネクロシス様の細胞死であることを以前に報告した (Kamemura, 2018, Computational Toxicology)。BHA は 30 μ M の低濃度で細胞内カルシウム、亜鉛の濃度を上昇させた。この濃度は、現在の規定量以下の使用であっても、体内に蓄積する可能性がある濃度である。またこれよりも低い濃度であっても長期投与による影響は懸念される。さらに毒性が強いとされる BHT との毒性の違いを比較した。BHA は Caspase-3 の活性が認められ、アポトーシス様の細胞死であることが明確になった。したがって、類似した構造であっても毒性が異なることが証明された。本研究から個々の化合物による細胞への影響を明確にしたうえで、使用の有無、規定量を定める必要があることを提唱する。

(2) ポストハーベスト農薬ピフェニルの毒性機構の解明

近年ポストハーベスト農薬の体内への影響が懸念されている。そこでポストハーベスト農薬として使用されているピフェニルの細胞への影響を調べた。ピフェニルは細胞内カルシウム、亜鉛の濃度を上昇させた。さらに細胞内カルシウム、亜鉛濃度の上昇をそれぞれ阻害すると、細胞死が抑制された。したがって毒性に関しては 2 つの要因が関与していることが明確になった。さらにピフェニルは低濃度で細胞内において酸化ストレスを発生させ、また酸化ストレスに対する脆弱性も誘導した。本研究からピフェニルの毒性機構が明確になった。使用においては、酸化ストレスに対する脆弱性も考慮に入れて使用量を規定する必要があることが示唆された。

(3) 防カビ剤アゾキシストロピンの細胞への影響

アゾキシストロピンは現在食品添加物として使用されている。アゾキシストロピンの細胞内への影響はあまり報告されていない。そこで、アゾキシストロピンの細胞内亜鉛への効果を調べた。アゾキシストロピンは、細胞内亜鉛の上昇を引き起こすことが明らかになった。アゾキシス

トロピンは、亜鉛の細胞外からの流入と細胞内での増加の2つに関与していることが明確になった。現在の規定では、実際にはこの亜鉛の上昇に影響する濃度に達することは難しいが、しかし長期間にわたって摂取することが体内にどのように影響するかは調べていく必要がある。

(4) アルギネチンの細胞内への影響

アルギネチンは、多くの植物に見られる天然のポリサッカライドであるペクチンを含む食品の調理プロセスによって生成される。しかしながら、アルギネチンの生物学的相互作用と毒性はまだ知られていない。本研究はアルギネチンの細胞作用を調べた。細胞に対するアルギネチンの効果は、アルギネチンは、非タンパク質チオールの細胞含有量を増加させ、さらに細胞内亜鉛濃度を上昇させた。細胞内亜鉛のキレート化は、非タンパク質チオールの細胞含有量に対するアルギネチンの効果を減少させ、細胞外亜鉛のキレート化は、アルギネチンによる細胞内亜鉛濃度の上昇をほぼ完全に減少させた。この結果からアルギネチン処理が細胞外からの亜鉛流出を増加させることを明確にした。さらにアルギネチンが、過酸化水素によって誘発される酸化ストレスおよびカルシウムイオノフォアによるカルシウムの過負荷から細胞を保護することを明確にしました。本研究は、アルギネチンはジャムの製造中に生成される可能性があり、これはジャムの追加の健康上の利点を提供する。

(5) 好塩基球細胞への食品添加物への影響

アレルギーは肥満細胞または好塩基球細胞がケミカルメディエーターを細胞外に放出することが直接的な原因で症状につながる。このケミカルメディエーターの放出機構には細胞内カルシウムの上昇が大きく関与している。食品添加物の中には細胞内カルシウムを上昇させるものもあり、これらの食品添加物が好塩基球にどのように影響を与え、アレルギー反応とどのように関係するのかを調べた。BHAによって細胞内カルシウムを上昇させた後、アレルギー刺激を与え、ケミカルメディエーターの遊離を調べた。BHA有無の群で比べたところ、BHA有の群でケミカルメディエーターの遊離がより上昇することが確認できた。本研究から、食品添加物を長期間にわたって摂取し、細胞内カルシウムが上昇した好塩基球が存在すると、アレルギー反応がより強く起こる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mizobuchi Mizuki, Ishidoh Kazumi, Kamemura Norio	4. 巻 1
2. 論文標題 A comparison of cell death mechanisms of antioxidants, butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01480545.2021.1894701	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 Doi Sayaka, Kawamura Mina, Oyama Keisuke, Akamatsu Tetsuya, Mizobuchi Mizuki, Oyama Yasuo, Masuda Toshiya, Kamemura Norio	4. 巻 15
2. 論文標題 Bioactivity of alginetin, a caramelization product of pectin: Cytometric analysis of rat thymic lymphocytes using fluorescent probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0241290 ~ 0241290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0241290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shoji Mai, Asada Masaki, Matsumoto Akihiko, Nishino Haruki, Xiang Ao Yi, Mizobuchi Mizuki, Kanematsu Naoki, Miura Hajime, Kamemura Norio	4. 巻 7
2. 論文標題 Azoxystrobin at sub-cytotoxic concentrations disrupts intracellular zinc homeostasis: A flow cytometric analysis with rat thymic lymphocytes and fluorescent probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.7.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kamemura Norio, Oyama Keisuke, Ueno Shinya, Mizobuchi Mizuki, Ishidoh Kazumi, Kanematsu Naoki	4. 巻 5
2. 論文標題 Thiopental Elevates Steady-State Levels of Intracellular Ca ²⁺ and Zn ²⁺ in Rat Thymic Lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry	6. 最初と最後の頁 130 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25026/jtpc.v5i2.259	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 Shoji Mai, Asada Masaki, Matsumoto Akihiko, Nishino Haruki, Xiang Ao Yi, Mizobuchi Mizuki, Kanematsu Naoki, Miura Hajime, Kamemura Norio	4. 巻 7
2. 論文標題 Azoxytobin at sub-cytotoxic concentrations disrupts intracellular zinc homeostasis: A flow cytometric analysis with rat thymic lymphocytes and fluorescent probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.7.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Miho, Nishimura Madoka, Kawamura Mina, Kamemura Norio, Nagamune Hideaki, Tabata Atsushi	4. 巻 64
2. 論文標題 Change in membrane potential induced by streptolysin O, a pore forming toxin: flow cytometric analysis using a voltage sensitive fluorescent probe and rat thymic lymphocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 10~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12748	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 Kamemura Norio	4. 巻 6
2. 論文標題 Butylated hydroxytoluene, a food additive, modulates membrane potential and increases the susceptibility of rat thymocytes to oxidative stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Computational Toxicology	6. 最初と最後の頁 32~38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.comtox.2018.04.001	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 Ae Masamichi, Imura Naohiro, Inubushi Tomoko, Abe Shin, Yusuke Bekki, Sugimoto Mayumi, Kamemura Norio	4. 巻 1
2. 論文標題 Biphenyl-induced cytotoxicity is mediated by an increase in intracellular Zn ²⁺	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01480545.2018.1499771	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 Inubushi Tomoko, Sugimoto Mayumi, Kunimi Haruka, Hino Haruka, Tabata Atsushi, Imura Naohiro, Abe Shin, Kamemura Norio	4. 巻 5
2. 論文標題 Biphenyl increases the intracellular Ca ²⁺ concentration in HL-60 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 99 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.5.99	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------