

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00783

研究課題名(和文) 食用植物に含まれるヒスタミン産生抑制成分の探索とアレルギー様食中毒防止への応用

研究課題名(英文) Constituents in some edible plants inhibiting the activity of histamine producing enzyme, histidine decarboxylase, and their application 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年増加傾向にあるヒスタミンに起因する食中毒はヒスタミンが熱に安定なために加熱調理で防ぐことができず、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。本研究では、ヒスタミン産生の要因となる食品付着菌由来ヒスチジン脱炭酸酵素を阻害し魚肉中のヒスタミン産生を抑制する食用植物成分を探索した。その結果、メドウスイート、ローズレッドペタル、クローブから強い酵素阻害活性する6種のエラジタンニンを見積もって、これらの植物の熱水抽出液で魚を短時間浸漬処理することにより、ヒスタミン蓄積を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To prevent food poisoning caused by histamine which has been on the increase, it is very important that histamine accumulation should be arrested at the stage of distribution and storage because histamine is not detoxified by cooking for its stability against heat. In this study, we searched for constituents in some edible plants that inhibit the activity of histamine producing enzyme, histidine decarboxylase, derived from adherent germ to food and production of histamine in fish. Six ellagitannins in meadowsweet, petal of rose red or cloves were identified as strong inhibitors of the enzyme. It is likely that a short-time immersion of fish in the hot-water extracts of these plants protects accumulation of histamine based on ellagitannin content of the extracts.

研究分野：生活科学 食生活学 食品成分化学 調理科学

キーワード：ヒスチジン脱炭酸酵素 モルガン菌 ヒスタミン メドウスイート ローズレッドペタル クローブ
エラジタンニン

1. 研究開始当初の背景

(1)わが国では、近年食育の推進が図られており、伝統的な食文化への理解が重要視されている。また生活習慣病予防の観点からも、日本型食生活の価値が見直され、各種給食施設においても積極的に日本食が取り入れられるようになり、魚類を食する機会が増えてきている。一方で、魚が原因のヒスタミンによるアレルギー様食中毒の発生件数が増加傾向にあり、とくに学校や保育所などの給食施設における大規模なアレルギー様食中毒の発生が目立っている。

(2)アレルギー様食中毒の原因物質であるヒスタミンは、食品の貯蔵・加工中に増殖した食品付着細菌のヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)の作用によって生成されることが知られている。とくにヒスチジン含有量の高い赤身魚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、食中毒の直接的な原因物質であるヒスタミンが通常の加熱調理では分解されないため、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、保蔵過程でヒスタミンを蓄積させないことが肝要であり、現在のところ、低温貯蔵によりヒスタミン生成菌の増殖を抑制することが唯一の対策であるが、なかには低温性ヒスタミン生成菌が存在するため、必ずしも温度管理のみでヒスタミン食中毒を予防することができないのが現状である。

2. 研究の目的

上記の研究背景を鑑み、新たな対策として、もし食品付着菌由来のHDCを阻害する成分を見出すことができれば、食品の流通・保蔵時におけるヒスタミン蓄積を抑制し、ヒスタミン食中毒の発生防止に応用することが可能であると考えた。

そこで本研究では、魚を試験対象として、安全性が期待できる食用植物のヒスタミン産生抑制作用を系統的に調べ、有望植物をスクリーニングすること、有望植物が食品付着菌由来のHDCに対して阻害活性を示すかどうかを確認し、強い阻害活性を示した食用植物を対象に寄与成分を明らかにすることを目的とした。さらに研究過程で化学構造の類似した活性化化合物群を得ることができた場合は、化学構造と酵素阻害活性との関連性を解明することも目指した。

3. 研究の方法

(1)サバ筋肉を用いたヒスタミン産生抑制効果のある食用植物の探索

スクリーニングに用いた試料

ナツメグ、シナモン、ローズレッドペタル、ローズピンクペタル、メドウスイート、オールスパイス、クローブ、コリアンダー(葉茎)、パセリ、スイートバジル、オレガノ、ローズマリー、セージ、タイム、紫唐辛子、レモングラス、カルダモン、黒ショウガの計

18種類の食用植物を研究対象試料とした。

熱水抽出物の調製

各乾燥粉末試料に10倍容の蒸留水を加え、100℃で5分間加熱抽出した。

シナモン、オールスパイス、クローブの熱水抽出物については、さらに塩化メチレン可溶部と水溶部に分画した試料も調製した。

サバ筋肉の浸漬

サバの筋肉部分を細かく刻み、1gずつふたつき容器に採り、PBS(pH7.0)または試料熱水抽出液3mLに氷上で浸漬した。5分後浸漬液を取り除き、25℃下で保存した。

ヒスタミン量の定量

試料に0.1M EDTA溶液(pH8.0)24mLを加えてすりつぶし、沸騰水中で20分間加熱後冷却した。「チェックカラーヒスタミン」(キッコーマンバイオケミファ株式会社)を用いて遠心分離後の上清中のヒスタミン量を測定した。

(2)モルガン菌由来HDC阻害活性の測定

酵素反応

モルガン菌は魚に付着しヒスタミン食中毒を引き起こす主要菌である。モルガン菌由来HDCにジチオトレイトール、ピリドキサルリン酸を含むリン酸カリウム緩衝液(pH6.5)および試験試料のエタノール溶液を加えた後、基質のL-ヒスチジンを加えて25℃で10分間反応させた。反応は過塩素酸を加えて停止させた。

ヒスタミンの定量

反応液をHPLCに供し、イオン交換カラム(TSKgel Histamine pak)で分離し、o-フルタルアルデヒドで蛍光標識化後、蛍光検出器にてヒスタミンを定量した。

HDC阻害率(%)

$100 - \frac{[(\text{サンプルのヒスタミンピーク面積}) - (\text{ブランクのヒスタミンピーク面積})]}{[(\text{コントロールのヒスタミンピーク面積}) - (\text{ブランクのヒスタミンピーク面積})]} \times 100$ で阻害率を算出した。2回試験の平均値をそのサンプルの阻害率とした。

(3)ローズレッドペタルおよびクローブ成分の抽出、精製、単離および構造解析

抽出・分画

各乾燥試料をヘキサン抽出し、その残渣を塩化メチレンで抽出した。その抽出残渣をさらに70%含水アセトンで抽出し、アセトンを減圧濃縮後、水懸濁液を順次、塩化メチレン、酢酸エチルで分配し、塩化メチレン可溶部、酢酸エチル可溶部、水溶部に分画した。各有機溶媒抽出液は減圧濃縮し、水溶部は凍結乾燥した。

酢酸エチル可溶部の分画

各酢酸エチル可溶部をSephadex LH-20カラムクロマトグラフィー(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。溶出物をHPLC分析し、クロマ

トグラムのパターンをもとに分画し、HDC 阻害活性を測定した。

HDC 阻害活性画分の精製

HDC 阻害活性の認められた画分を ODS ゲルおよび Sephadex LH-20 c.c. で繰り返し精製し、化合物を単離した。

単離化合物の構造決定

単離化合物を各種 NMR、LC/MS/MS にて分析し、構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) サバ筋肉を用いたヒスタミン産生抑制効果のある食用植物の探索

食用植物熱水抽出物のヒスタミン産生抑制効果

スクリーニングに供した試料のなかで、シナモン、ローズレッドペタル、ローズピンクペタル、メドウスイート、オールスパイス、クローブ、紫唐辛子がサバ筋肉中のヒスタミン生成を抑制した。

シナモン、オールスパイス、クローブの高極性成分のヒスタミン産生抑制効果

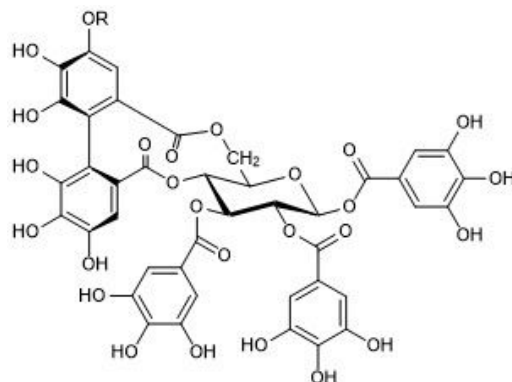
シナモンの精油成分であるシンナムアルデヒド、オールスパイスおよびクローブの精油成分であるオイゲノールはすでにモルガン菌由来 HDC 活性を阻害することが報告¹⁾されていたため、熱水抽出物を、精油成分を含む塩化メチレンに可溶部と水溶部に分画し、それぞれサバ筋肉中のヒスタミン産生抑制効果を調べた。3 種とも塩化メチレン可溶部はヒスタミン生成を抑制した。一方、精油成分を除去した水溶部は、クローブのみが強いヒスタミン産生抑制効果を示し、クローブにはオイゲノール以外にヒスタミンの生成を抑制する高極性成分の存在が示唆された。

(2) メドウスイートの HDC 阻害成分

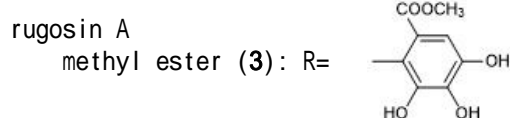
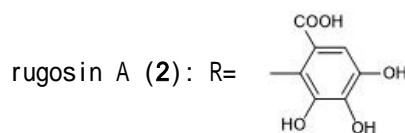
我々はこれまでにメドウスイートに含まれるヒト由来 HDC 阻害活性を示すエラジタンニンを報告している²⁾。本研究でメドウスイート熱水抽出物にサバ筋肉中におけるヒスタミン産生抑制効果が認められたことから、モルガン菌由来 HDC に対しても阻害活性を示す可能性が高まった。そこで、熱水抽出物の HDC 阻害を調べたところ、濃度依存的に阻害を示した。さらに、メドウスイートから単離した 4 種のエラジタンニン [tellimagrandin II(1), rugosin A(2), rugosin A methyl ester(3), rugosin D(4)] (図 1) の HDC 阻害を調べたところ、濃度依存的に阻害を示し、阻害の強さは 4 > 3 > 2 > 1 であった (図 2)。この傾向はヒト由来 HDC に対する阻害活性とよく一致した²⁾。

モルガン菌由来 HDC は、ヒト由来 HDC と同様ビタミン B₆ を補酵素とし、活性中心部位が類似していることが示唆されており、同様の機構により阻害を示した可能性が考えられる。阻害機構の詳細は不明であるが、我々はエラジタンニン 1~4 がヒト由来 HDC に対して可逆的に作用し、非競合阻害を示すことを

明らかにしている²⁾。今後、モルガン菌由来 HDC に対しても、これらのエラジタンニンの阻害様式を調べて行きたい。



tellimagrandin II(1): R=H



rugosin D(4)は 1 の二量体に相当する構造をもっている。

図 1 メドウスイートに含まれるエラジタンニンの構造

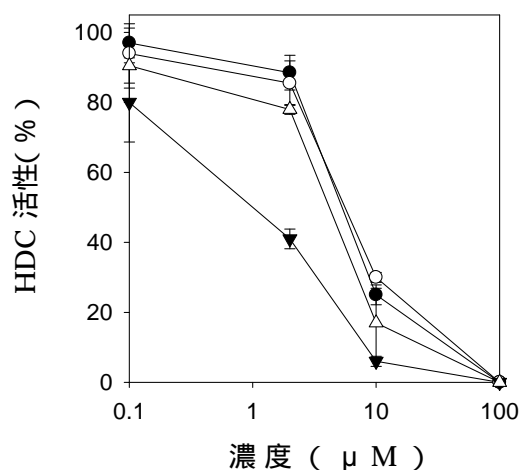


図 2 エラジタンニン (1~4) のモルガン菌由来 HDC 阻害率 (%)
1 (△), 2 (□), 3 (○), 4 (▽)

(3)ローズレッドペタルのHDC阻害成分

ローズレッドペタル熱水抽出物もサバ筋肉におけるヒスタミン産生抑制効果が認められたことから、成分分析を行ったところ、1~4を含む6種のエラジタンニンが得られた。さらに、5種のガロイルグルコースおよび8種のガロイル基をアシル基にもつフラボノイド配糖体を単離した。現時点では、単離成分のヒト由来HDC阻害活性の測定を実施したところであり、今後、モルガン菌由来HDCに対する阻害活性や阻害様式の検討を進めていく。

(4)クローブのHDC阻害成分

クローブの熱水抽出物のサバ筋肉中におけるヒスタミン産生抑制効果がオイゲノールのみに起因するのではなく、高極性成分も寄与している可能性が示唆されたため、阻害成分の探索を進めた。

クローブの各抽出物のモルガン菌由来HDC阻害活性を調べたところ、酢酸エチル可溶部が最も強い阻害を示した。酢酸エチル可溶部のSephadex LH-20c.c.による分画物のHDC阻害活性測定の結果、エタノール溶出画分には阻害が認められず、エタノール-メタノール溶出画分以降に阻害活性が認められた。

阻害活性を示した画分の精製を進め、3種の化合物を単離した。機器分析による構造解析により、エラジタンニン1、casuarictin(5)、rugosin C(6)と同定した。1はグルコースの2位と3位にガロイル基がエステル結合しているのに対して、5はヘキサヒドロキシフェノール基(HHDP基)の2個のカルボキシル基がグルコースの2位と3位にエステル結合し10員環構造をもった化合物である。同様に6は2のグルコースの2位と3位のガロイル基がHHDP基に置換した構造を有している。これら単離化合物のモルガン菌由来HDC阻害活性を調べたところ、阻害の強さは6>1>5という結果となった。

(5)HDC阻害活性と化学構造の関連性

本研究により、モルガン菌由来HDC阻害活性をもつ6種のエラジタンニンがメドウスウィート、ローズレッドペタル、クローブから得られた。それらのHDC阻害活性の強さと化学構造を比較検討したところ、以下のことが示唆された。

エラジタンニン単量体(1~3,5,6)よりも二量体の4の阻害活性が強い。

1と2を比較すると大きな差は認められないが2の方が若干1よりも強い阻害を示したことから、グルコースの4位と6位に架橋するHHDP基がvaloneoyl基に置換すると活性がやや上昇する。このことは、5よりも6の阻害活性が強かったことから支持される。

1と5を比較すると阻害活性が1>5であったことから、グルコースの2位と3位にHHDP基が形成されると阻害率が低下する。

2と3を比較すると阻害活性が3>2であっ

たことから、valoneoyl基のフリーのカルボキシル基がメチルエステル化することにより、阻害活性が増強する。

本研究では、ローズレッドペタルから数種のガロイルグルコースとフラボノイド配糖体を得ている。現時点ではヒト由来HDC阻害試験のみの実施であるが、ガロイルグルコースでは、ガロイル基の個数が多いほど活性が上昇し、同じ個数のガロイル基を持つもの同士を比較すると、6位のガロイル基置換が阻害活性を上昇させる傾向にあるという知見を得ている。また、フラボノイド配糖体の阻害活性は、エラジタンニンに比べると1/100程度であり、非競合型の阻害を示すことを明らかにした。阻害活性はガロイル基の数が多いほど高く、糖部分がグルコースよりもガラクトースあるいはラムノースである方が強い活性を示したことから、糖の構造もHDC阻害活性に影響することが示唆された。今後は、モルガン菌由来HDCに対しても同様の阻害が見られるかどうかを検討していく。

(6)エラジタンニンのヒスタミン産生抑制への寄与

本研究で得られたHDC阻害成分のなかで、最も阻害活性の強い化合物群はエラジタンニンであることがわかった。

メドウスウィートは、スクリーニングに用いた1/5の濃度である2%の熱水抽出液でもサバ筋肉中のヒスタミン生成を抑制するという結果を得た。2%の濃度は通常ハーブティーとして利用するときと同程度の濃度である。2%の熱水抽出液中のエラジタンニン1、2、4の濃度をHPLCで測定したところ344、421、207μMであった。これらの濃度はモルガン菌由来HDCを完全に阻害する濃度を上回っており、エラジタンニンはサバ中のヒスタミン生成の抑制に大きく寄与しているものと推察できる。

これまでに報告されているヒスタミン生成抑制作用を示す物質はシンナムアルデヒド、オイゲノールなどの精油であり、実際に食品に応用する場合には、そのにおいが問題となる。今回、無臭の高極性成分をヒスタミン産生抑制成分として見出したことで、食品への応用につながるができるものと考えられる。その効果はハーブティーで摂取する程度の濃度で発揮されることから、苦味や渋味、たんぱく質の変性を伴わず利用できるものと期待される。すなわち、メドウスウィート、ローズレッドペタル、クローブの熱水抽出液に魚を短時間浸漬処理することで、ヒスタミンに起因する食中毒の発生を防止できる可能性が示唆される。本研究は、食品への応用に向けて、その基礎的知見が得られたことに意義があると考えている。

引用文献

1) 上井恵理、寺田 岳、秋山純基、一色賢

司、食品衛生学雑誌、52、271-275 (2011)

2) Y. Nitta, H. Kikuzaki, T. Azuma, Y. Ye, M. Sakaue, Y. Higuchi, H. Komori, H. Ueno, Food Chemistry, 138, 1551-1556 (2013)

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 4 件)

Yoko Nitta, Hiroe Kikuzaki, Hiroshi Ueno, Novel inhibitors for histidine decarboxylase from plant components, International Biology Review, 査読有, Vol.1, No.2, 2017
DOI:10.18103/ibr.v1i2

菊崎泰枝, フトモモ科スパイス(クローブ, オールスパイス)の食文化と機能性, Functional Food, 査読無, Vol.11, No.2, 2017, 111-116

Yuichi Uno, Yoko Nitta, Misaki Ishibashi, Yuji Noguchi, Hiroe Kikuzaki, Inhibition of recombinant human histidine decarboxylase activity in different strawberry cultivars, Acta Physiol Plant, 査読有, Vol. 39, No. 134, 2017
DOI: 10.1007/s11738-017-2430-9

Yoko Nitta, Fumiko Yasukata, Noritoshi Kitamoto, Mikiko Ito, Motoyoshi Sakaue, Hiroe Kikuzaki, Hiroshi Ueno, Inhibition of *Morganella morganii* histidine decarboxylase activity and histamine accumulation in mackerel muscle derived from *Filipendula ulumaria* extracts, Journal of Food Protection, 査読有, Vol. 79, No.3, 2016, 463-467
DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-313

[学会発表](計 9 件)

山下慶子、新田陽子、菊崎泰枝、ローズレッドペタルに含まれるフラボノイド配糖体のヒスチジン脱炭酸酵素阻害活性と阻害様式、第71回日本栄養・食糧学会大会、2017年5月19-21日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

山下慶子、新田陽子、菊崎泰枝、ローズレッドペタルに含まれるフラボノイド配糖体のヒスチジン脱炭酸酵素阻害活性、第21回日本フードファクター学会学術集会、2016年11月19-20日、富山国際会議場(富山)

森美幸、菊崎泰枝、植野洋志、小森博文、

新田陽子、ガロタンニン、エラジタンニンによるヒスチジン脱炭酸酵素の活性阻害の解析、日本ビタミン学会第68回大会、2016年6月17-18日、富山国際会議場(富山)

Fumiko Yasukata, Noritoshi Kitamoto, Yoji Kato, Akira Murakami, Akari Ishisaka, Hiroe Kikuzaki, Yoko Nitta, Preventive effects of herbs on allergy-like food poisoning, The 6th International Conference on Food factors, November 22-25, 2015, Seoul.

安方芙実子、北元憲利、新田陽子、江戸良也子、植野洋志、菊崎泰枝、メドウスイート抽出液によるサバのヒスタミン汚染抑制、日本生物高分子学会2015年度大会、2015年9月19-20日、香川大学(香川)

森美幸、渡邊裕香、新田陽子、植野洋志、秋本梢、小林慧子、菊崎泰枝、ローズレッドペタル成分によるヒト由来ヒスチジン脱炭酸酵素の阻害、日本生物高分子学会2015年度大会、2015年9月19-20日、香川大学(香川)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

新田陽子 (NITTA Yoko)
岡山県立大学・保健福祉学部・准教授
研究者番号: 70403318