

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01960

研究課題名(和文)多成分分析によるプレミアム蜂蜜の品質保証と偽装防止

研究課題名(英文)Authenticity of premium honeys by multi-component analysis to prevent food disguise

研究代表者

加藤 陽二 (Kato, Yoji)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授

研究者番号：30305693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：蜂蜜(国内外あわせて70種類)に含まれる成分を液体クロマトグラフィー精密質量分析器により調べることにより、(本物)認証への応用の可能性を検討した。また、加熱処理に伴う成分変化について、化学的及び免疫化学的手法を用いて調べたところ、大きく減少する2成分が見つかり、それぞれ揮発あるいはアミノカルボニル反応による付加修飾を生じていた。培養細胞を用いた解析では、蜂蜜由来の成分のうち、疎水性成分が細胞内に取り込まれ、細胞内エステラーゼなどの働きにより水溶性代謝物となった後、細胞内に滞留していることがわかった。この遅延が、細胞内で機能性発現を誘導していることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、精密質量分析器を用い、蜂蜜にわずかに含まれる植物由来の成分を調べて比較した。更にサンプル数を増やすことで、将来的な花蜜の由来や割合を明らかにできる認証システムの構築につながる。蜂蜜の加熱にともなう成分変化を調べたところ、機能性や認証への利用に期待したい成分が大きく減少すること、及び、その減少の仕組みを明らかにした。今後の損失を抑える保存法・製法の開発につながる。また、体内での機能性発現を模したモデル実験により、食品分野ではこれまでにほとんど着目されてこなかったカルボキシルエステラーゼ作用による代謝物の生成及びその変換による機能性発現の可能性を示唆することが出来た。

研究成果の概要(英文)：We investigate the contents of 70 honey samples from domestic and foreign countries using liquid chromatography-precise mass spectrometry to apply the possible authentication of origin of the honey. When the changes in contents by heating were analyzed by chemical and immunochemical approaches, we have found two unstable chemicals; One chemical is vapoured and the other is decreased by amino-carbonyl reaction. In culture cells, hydrophobic chemicals are incorporated and then metabolized to water-soluble (hydrophilic) metabolites by intracellular esterase and so on. The hydrophilic metabolite is accumulated in a cell for a while. The accumulation may induce some functionality in the cell.

研究分野：食品化学・生化学

キーワード：蜂蜜 花蜜 成分分析 認証 生体利用性 機能性 加熱処理

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

蜂蜜は健康をイメージさせる食品である。花蜜の違いにより、味・香りが異なり、様々な蜂蜜が楽しられている。一方で、一般の人にとって、ラベルの(中身の)正しさを確認する方法が無く、実際に、安価な蜂蜜を高価なプレミアム蜂蜜として偽装し販売する例も度々報告されている。一方で、分析技術の向上にともない、成分を調べることによる認証が実用化されつつある。蜂蜜はそのまま食されるほかに、ソース・ドレッシングに加えたり、飴やグミなどの加工食品にも利用されている。その際、多くは加熱処理を受けるが、加熱に伴う成分変化についての検討は少ない。消費者が期待する蜂蜜に対する健康効果については、その成分に由来すると考えられるが、実際にその機能性発現機構を明らかにした例はほとんど無い。超高齢社会を迎えた我が国では、食による健康維持が重要であり、科学的な知見・エビデンスに基づいた食の機能性解明が望まれている。

### 2. 研究の目的

国内外の蜂蜜成分を解析し、パターンを調べ、本物認証に用いる。加熱処理に伴う蜂蜜成分の変化を追跡し、減少する成分については、その仕組みを探る。食してから体内に入り機能性を発揮する可能性を考え、組織ホモジネートや細胞、動物などを用いて、代謝機序を解明する。

### 3. 研究の方法

化学的な成分(代謝物含む)の解析については、超高速液体クロマトグラフィー多波長検出器(UHPLC-PDA, UltiMate3000)及び四重極型-飛行時間型タンデム精密質量分析器(UHPLC-Q-TOF, Sciex X500R)を用いた。内部標準には、Forchlorfenuron (FCF)を用いた。Q-TOFのデータ解析には、MetabolitePilot 及び MarkerView などを用いた。揮発性成分はヘッドスペース型ガスクロマトグラフィー質量分析器(GC-MS)により解析した。アルデヒド成分については、特異抗体を用いたウエスタンブロット法により、タンパク質への付加修飾を確認した。培養細胞は、肝細胞モデル HepG2、小腸上皮細胞モデル Caco-2 及びマクロファージ細胞モデル RAW264.7 を用い、成分を添加して、細胞内外の代謝物の変動を追跡した。ヒト由来の組織ホモジネートや酵素(組み換え体)を用いて in vitro での代謝機構の解明も行った。マウスに成分を投与して、血漿中の代謝物についても検出定量した。

### 4. 研究成果

(1) 蜂蜜の成分解析については、最初に UHPLC-PDA で 1 検体 10 分間の分析条件で検討した。特徴的な成分がいくつか大きくピークで認められる蜂蜜がある一方、複雑なピークプロファイルを示す蜂蜜、ほとんど特徴的なピークが認められずその含量(ピーク面積)も少ない蜂蜜、など多様であった。そのため、次に、より高感度かつ構造情報の得られる UHPLC-Q-TOF を用いた。

およそ 70 検体について、IDA (information dependent acquisition) のポジティブ及びネガティブモードで二度分析し、解析を進めた。成分を細かく調べるため、内部のライブラリ (NIST 等) 及び外部データベース (ChemSpider) を介して解析を進めたが、小数点以下 3 桁程度まで信頼できる精密質量をもってしても、構造類縁体が多数提示され、標品があるもの以外の同定は困難であった。今後は標品をそろえ、未同定の成分と比較できるようにする必要がある。

得られたデータを用いて MarkerView による多成分分析(図 1)を行ったところ、マヌカ蜂蜜などのモノフローラル蜂蜜ではグループ化が可能であった。一方で、サンプル数が少ない蜂蜜はばらつきも多く、グループ化が困難であった。このため、蜜源について信頼のおけるモノフローラル蜂蜜を養蜂家などから継続的に収集し、成分の解析を進め、本物認証を実現する必要がある。

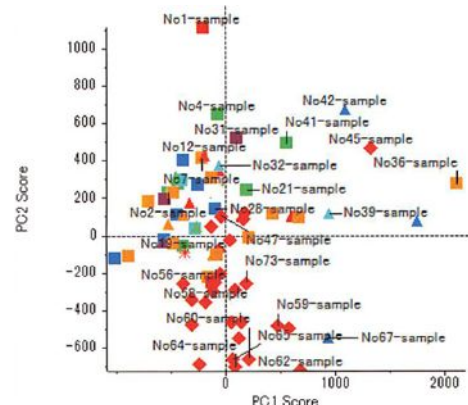


図 1

(2) マヌカ蜂蜜を用い、加熱処理に伴う成分変化を追跡した。調べた成分は図 2 A にまとめた。その結果、温度(図 2 B)、時間(図 2 C)に依存して、大きく減少する特徴的な 2 成分(2'-メトキシアセトフェノン MAP 及びメチルグリオキサール MGO)が見つかった。また、ヒドロキシメチルフルフラール HMF は加熱に伴い増加した。なお、HMF は加熱や長期保存の指標として知られていることからその増加は妥当であると考えた。Leptosperin などほとんど変化のない成分、メチルシリリングート MSYR などのわずかに減少する成分も認められた。特に大きな減少が認められた成分 MAP はニュージーランド政府の主導のマヌカ蜂蜜の認証指標として用いられている 4 成分の一つであり、かつ、その中でも植物マヌカにのみ認められる最も重要な成分と言える。また、MGO は消費者が期待する抗菌作用を示す主体である。続いて、その減少機構を明らかにすることを目指した。

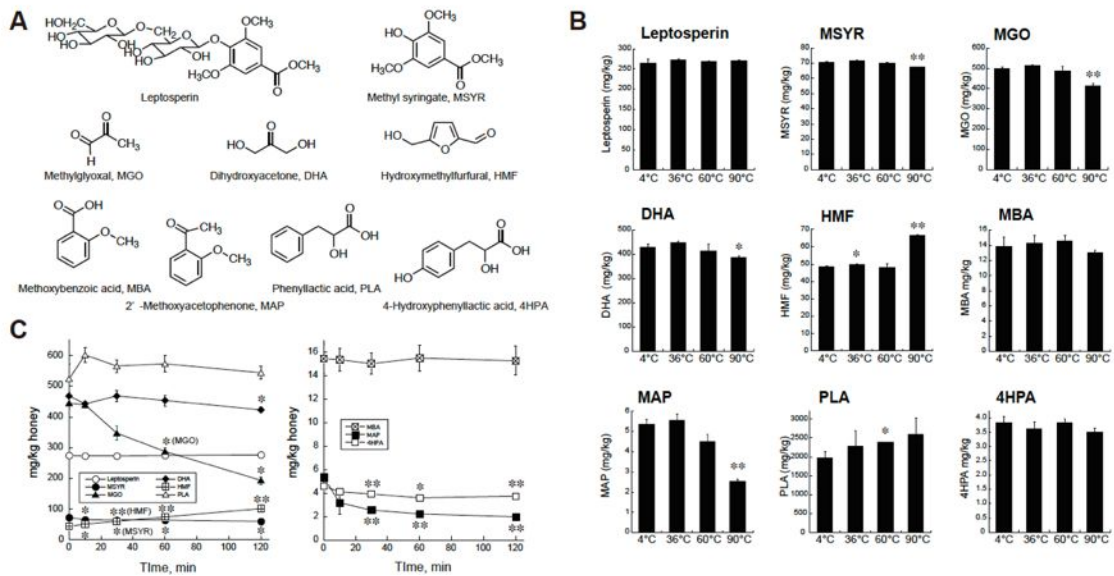


図 2

MAPについては加熱により減少するものの、新たな生成物が見つからず、揮発していることが予想された。実際に、ヘッドスペース型 GC-MS により加熱したマヌカ蜂蜜のガス中から MAP が検出・定量された (図 3)。なお、この分析は静岡県立大学食品栄養科学部の三好規之准教授との共同研究として実施した。

加熱に伴い MGO は揮発せず、蜂蜜中のアミノ酸 (L-プロリン) が減少した。あわせて MGO とプロリンの付加生成物として 2-acetyl-1-pyrrolidine が質量分析器により確認された。蜂蜜中のタンパク質を調べたところ、加熱に伴い、MGO 修飾物として知られる Argpyrimidine 残基が生じていることが特異抗体を用いた免疫化学的方法により明らかとなった。実際にアルギニンの誘導体を使ったモデル実験でも、MGO との反応により Argpyrimidine の生成が質量分析器により確認された。以上の様に、MAP は揮発により、また MGO はタンパク質やアミノ酸に付加修飾することで減少することがわかった。以上の加熱試験の結果については、現在、学術論文として、投稿中である。

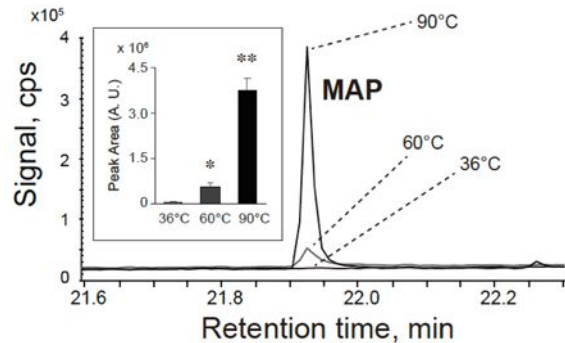


図 3

(3) 蜂蜜に豊富に含まれる成分がどのように吸収され、代謝され、体内で動いているか、動態について検討を進めた。蜂蜜に含まれる植物フラボノイド配糖体 Leptosperin は、腸管内でグルコシダーゼなどにより切断を受けて糖が外れたアグリコン (メチルリシゲート MSYR) となる。MSYR は脂溶性を有し、細胞膜を介した単純拡散により細胞内に取り込まれることを推測している。Leptosperin は腸の細胞では糖鎖が切断されない。MSYR は、細胞内に入ると薬物代謝酵素によりグルクロン酸抱合体 (MSYR-GA)、硫酸抱合体 (MSYR-S) になる。加えて、エステラーゼ活性を有する酵素によりシリング酸 (SYR) を生じる。血液中などでは、更に SYR のグルクロン酸や硫酸抱合体も見つかっている。

本検討では、まず培養細胞を用いて、Leptosperin、MSYR、MSYR-GA、MSYR-S、SYR について、分子レベルでの代謝機構の解明を進めた。その結果、細胞内薬物代謝酵素により、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体などに変換され、水溶性を増した構造体として、細胞外に出されることがわかった。なお、これら抱合体は、ほとんど細胞内には戻らない。ただし、免疫細胞モデルである RAW264.7 細胞の場合は、リポ多糖で刺激することにより、細胞外に グルクロナダーゼが分泌され、グルクロン酸抱合が外れることがわかった。また、分化誘導した腸の細胞モデル (Caco-2) では、MSYR-S を培養液に加えると徐々に濃度が減少し、代わりに SYR が増加した。このことは、MSYR-S が細胞膜のアニオントランスポーターから取り込まれ、細胞内でスルファターゼ処理を受けることを示している。

MSYR を細胞外から作用させると SYR が主生成物として生じるが、Conditioned medium と MSYR を保温しても SYR は生じない。このため、細胞内で MSYR のカルボメトキシ基を切断して SYR に変換するエステラーゼ活性を持つ酵素の存在が推測された。いくつかの阻害剤を用いて検討したところ、阻害パターンからカルボキシエステラーゼ 1 (CES1) の関与が示唆された。そこで、ヒト組織ホモジネートや CES1 の組み換え体を用いて反応させたところ、特異的に CES1 により MSYR から SYR が生じることがわかった。なお、マウスに Leptosperin あるいは MSYR を投与する

と、血液中に MSYR 及び SYR が検出させることから、生体内でも同様の仕組みで SYR が生じ、体内を循環していることがわかった。以上の培養細胞や組織、動物を用いた代謝研究については、*J. Agric Food Chem* 誌 (2019) に本研究の成果として公表済みである。

続いて、細胞 (残渣) における各代謝物の存在 (滞留) を調べた。MSYR-GA や MSYR-S などの抱合体に比べ、SYR の含量が多いことがわかった (未発表データ)。つまり、抱合体よりも長く細胞内に存在し続けていることから、他の成分よりも何らかの機能性を発現するチャンスがあることが予想される。また、MSYR も培養液では消失していても、細胞からは依然として検出されることから、一部は細胞膜などにとどまる可能性も示唆される。今後は、この滞留について詳細かつ定量的に解析するとともに、滞留することで細胞の機能性に関係した遺伝子の発現 (あるいは抑制) を誘導するののかについても検討し、「食べたあとの体内での機能性発現機序」の解明につなげたい。

#### <引用文献>

Akari Ishisaka, Shinichi Ikushiro, Mie Takeuchi, Yukako Araki, Maki Juri, Yui Yoshiki, Yoshichika Kawai, Toshio Niwa, Noritoshi Kitamoto, Toshiyuki Sakaki, Hirohito Ishikawa, Yoji Kato. In vivo absorption and metabolism of leptosperin and methyl syringate, abundantly present in manuka honey. *Mol. Nutr Food Res.*, **61** (9), 1700122 (2017), DOI: 10.1002/mnfr.201700122

Yoji Kato, Masaki Kawai, Shota Kawai, Yayako Okano, Natsumi Rokkaku, Akari Ishisaka, Kaeko Murota, Toshiyuki Nakamura, Yoshimasa Nakamura, Shinichi Ikushiro. Dynamics of the cellular metabolism of leptosperin found in manuka honey. *J. Agric. Food Chem.*, **6739**, 10853-10862 (2019), DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03894

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Yoji, Kawai Masaki, Kawai Shota, Okano Yayako, Rokkaku Natsumi, Ishisaka Akari, Murota Kaeko, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa, Ikushiro Shinichi	4. 巻 67
2. 論文標題 Dynamics of the Cellular Metabolism of Leptosperin Found in Manuka Honey	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 10853 ~ 10862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.9b03894	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 加藤 陽二	4. 巻 52
2. 論文標題 マヌカ蜂蜜の現状について 特徴, 成分, 認証	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本調理科学会誌	6. 最初と最後の頁 417 ~ 419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11402/cookeryscience.52.417	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 加藤 陽二	4. 巻 70
2. 論文標題 マヌカハニーの特徴とその機能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本家政学会誌	6. 最初と最後の頁 97 ~ 101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11428/jhej.70.97	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤陽二、岡野やや子、河合翔太、菅尚子
2. 発表標題 マヌカ蜂蜜に特徴的なケミカルマーカーの加熱に伴う変化
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅尚子、岡野やや子、河合翔太、坂本薫、加藤陽二
2. 発表標題 マヌカ蜂蜜特有成分の熱安定性
3. 学会等名 日本調理科学会 近畿支部 第44回 研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤陽二、河合翔太、室田佳恵子、中村俊之、中村宜督、生城真一
2. 発表標題 レプトスペリン、メチルシリリングート及びその代謝物の細胞を用いた代謝機構の解明
3. 学会等名 日本フードファクター学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡野やや子、河合翔太、清水与代、菅尚子、加藤陽二
2. 発表標題 マヌカハチミツに含まれるケミカルマーカールの熱安定性について
3. 学会等名 日本フードファクター学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoji Kato
2. 発表標題 Leptosperin, a unique chemical in manuka honey
3. 学会等名 The 5th International Symposium on "Convergence of Bio-Health and Food Science (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木理央、吉木結以、生城真一、有満秀幸、加藤陽二
2. 発表標題 マヌカ蜂蜜に含まれるメチルグリオキサールの細胞毒性とその制御
3. 学会等名 日本フードファクター学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤陽二、室田佳恵子、石坂朱里、伊藤美紀子、生城真一
2. 発表標題 マヌカ蜂蜜に含まれるレプトスペリン及びメチルシリリングートの培養細胞を用いた代謝研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2017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	石坂 朱里  (Ishisaka Akari)  (30724463)	兵庫県立大学・環境人間学部・助教   (24506)	
研究分担者	生城 真一  (Ikushiro Shinichi)  (50244679)	富山県立大学・工学部・教授   (23201)	
研究分担者	中村 宜督  (Nakamura Yoshimasa)  (60324381)	岡山大学・環境生命科学研究所・教授   (15301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	中村 俊之 (Nakamura Toshiyuki)  (90706988)	岡山大学・環境生命科学研究科・助教       (15301)	