

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19310025
 研究課題名（和文）アミノ酸同位体比質量分析を用いた過去30年にわたる食環境の変遷による生体影響評価
 研究課題名（英文）ISOTOPE RATIO MASS SPECTROMETRIC STUDY ON ISOTOPE RATIO ANALYSES OF AMINO ACIDS IN LIFE CYCLE ASSESSMENT FOR THIRTY YEARS FOOD EATINGS
 研究代表者
 伊永 隆史 (KORENAGA TAKASHI)
 首都大学東京・大学院理工学研究科・教授
 研究者番号：19310025

研究成果の概要（和文）：本研究では、京都大学が生体試料バンクとして収集した1970年代から現在までの生体試料のうち血液試料を取り上げ、その時代に摂取していた食事についてアミノ酸同位体比分析を行い、過去30年間における食環境の変遷と生体試料への影響評価を行った。生体試料（血清）における必須アミノ酸および非必須アミノ酸の挙動解析に成功し、アミノ酸分子の安定同位体比微小変化を精密解析し、世界で初めての研究成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：We discussed the dietary effect to the human body based on behavior of stable isotope ratio using amino acid in blood serum of the past 30 years. Stable isotope variation of each molecular amino acid clarified a influence of dietary change on human body and it impacted researches of the human life cycle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：環境影響評価・環境政策

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：食環境変動・安定同位体比・質量分析・アミノ酸・生体試料

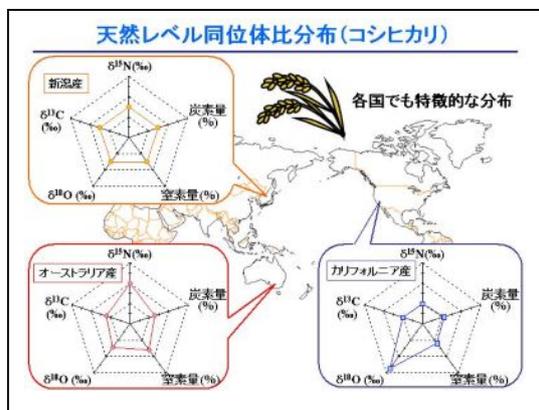
1. 研究開始当初の背景

(1) 生体の全有機物の窒素同位体比は、食物連鎖上の栄養段階が一段階上昇するごとに約3～5‰大きくなる。一方、炭素同位体比は、栄養段階に伴う変動が約0～1‰と小さく、基本的に摂取した食物の同位体比を強く反映する。よって、炭素・窒素同位体比の二次元分布によって、その動物の食歴や栄養段階の位置が予測できることから、生態学や考古学の分野で多数の報告例がある。

しかし、一般環境についての報告例は少ない。まして、食資源の同位体組成の特徴やそれらが生体試料の同位体組成へ及ぼす影響についてはこれまで詳細はほとんど把握できていない。地球化学や考古学といった古環境復元のツールとして用いるためには、現代における食環境の変遷が生体へ及ぼす影響を評価する必要があると考えられる。

(2) まず、本研究代表者は同位体比の特徴を食品試料へ応用した。国産米およびカリフ

オルニア産・オーストラリア産の精米（コシヒカリ）について、試料全体の炭素・窒素・酸素同位体比・炭素・窒素量の5要素をマルチダイアグラムで表すことにより、今まで成し得なかった各国及び各県の「化学的特徴の視覚化」に成功している（World Grains Summit 2006にて国際会議発表：下図。）



以上の結果からも全有機物の多元素同位体比によって、生育環境の大まかな違いを捉えることはできるが、自然環境試料中の有機物は一般に何百、何千もの有機分子の混合物であり、従来の有機物全体の測定では様々な過程と履歴を持つ有機分子の集合体の同位体組成としてしか情報が得られない。実際に上記の研究結果のみでは、生物の同位体比が環境要因の中で何を反映しているか追及することは困難である。

(3) そこで、各々の有機分子の起源および生物活動を介して地球環境のより詳細な情報を読み取ることが可能である分子レベル同位体比分析が注目を集めている。各有機分子は、起源生物・生成過程・生育環境などの情報を保存している。よって、分子ごとに同位体比を測定することで、周辺環境が刻み込んだ情報を詳細に読み取ることができる。本研究チームも地球化学の分野を中心に、脂質分子の分子レベル安定同位体比研究を行っており（Matsumoto et al., 2001, Chikaraishi et al., 2004, 2005, 2006, Suzuki et al., 2006）、主に脂質分子の起源生物の特定、さらにその生育環境の復元に用いてきた。中でも、近年注目を集めているのがアミノ酸の分子レベル同位体比測定である。アミノ酸には動物の体内では合成できずに食物から摂取する必要がある必須アミノ酸と、体内で合成可能な非必須アミノ酸がある。よって、アミノ酸について分子別に同位体比を測定することで、摂取した食物由来のアミノ酸が生体内でどのような挙動を示すのかを解読できると期待されている。実際に、Hare P. Edgar. らの研究チームは、豚に C3 植

物飼料または C4 植物飼料を摂取させ、アミノ酸の炭素・窒素同位体比の変動を用いて、餌の違いによる合成・代謝のメカニズムを解析している。よって、アミノ酸の同位体組成をトレーサーとして、現代における食環境の経年変化が生体試料へ及ぼす影響を評価する本研究に至った。

2. 研究の目的

Hare らは、必須アミノ酸の中の成長作用において最も重要なアミノ酸であるリジンの同位体比が、摂取した食物の同位体比を強く反映することを報告している。つまり、必須アミノ酸と非必須アミノ酸の同位体比をツールとすることで、摂取した食物と生体試料の間で起こるアミノ酸の動態解析が期待される。そこで、本研究では京都大学が生体試料バンクとして収集した 1970 年代から現在までの母乳などの生体試料と、その時代に摂取していた食事についてアミノ酸同位体比分析を行い、過去 30 年間における食環境の変遷と生体試料への影響評価を行う。様々な年代に採取された食品や母乳および尿試料の入手は困難であるが、京都大学医学部の小泉らはヒトの食事・母乳・尿・血液を集めた生体試料バンクを創設しており、本研究において試料提供の協力体制を得ている。母乳はアミノ酸スコアが 100 と理想的なたんぱく質であり、母乳に必須アミノ酸をはじめとするアミノ酸が豊富に含まれているため、生後まもない乳児は、母乳だけで十分に成長する。しかし、近年、加工品の消費の増加による食生活の変化が母乳へもたらす影響が懸念されている。Hare らの研究から、必須アミノ酸は食資源の同位体組成を強く反映すると考えられるため、アミノ酸の同位体組成を用いて、食環境の経年変化が母乳へ及ぼす影響を、尿についても分析することで、吸収されずに排出されたアミノ酸との相関関係についても総合的に評価する。

(1) 具体的には以下の解明を目指す。

- ①生体試料における必須アミノ酸および非必須アミノ酸の挙動解析
- ②1970 年代から現在までの食資源におけるアミノ酸の経年変化
- ③食環境が及ぼす母乳および尿中アミノ酸の影響評価

以上より、1970 年代後半から現在に至る長期間におけるヒトの食環境の変遷とそれらが生体試料（母乳・尿）へ与える影響についてアミノ酸の分子レベル同位体比分析法によって解析する。

(2) 現代の食環境の変動が及ぼす生体試料への影響をアミノ酸の同位体比により評価

することは、以下のような成果や応用性が期待される。

①生体試料における必須アミノ酸・非必須アミノ酸と食資源のアミノ酸の同位体組成の関係が解明されれば、食物連鎖や古環境復元におけるツールとして大きく貢献できる。

②母親の摂取する食事と母乳のアミノ酸の関係が解明されれば、乳幼児をもつ母親の栄養バランスを考える際の有用な情報を提供する。

③加工品の増加といった時代とともに変化するヒトの食環境の変化を追うとともに、環境変化が母乳を通じて乳児へ与える影響を評価可能となる。

④アミノ酸分子をターゲットとすることで、医療やドーピング検査などにも簡単に転用可能な技術であり、生物の代謝生成系・栄養状態などの総合評価への基礎データを提供する。

3. 研究の方法

具体的には以下のような研究計画で実験を行う。

(1) アミノ酸の分子レベル安定同位体比分析法の確立

①アミノ酸の標準物質を用いて、オンライン同位体比測定に最適な抽出・分離・精製法・キャピラリーカラム・ガスクロマトグラフ (GC) の条件・誘導体化法を最適化する。

②最適化した条件を用いて、まずは標準物質の同位体比 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) が、再現性よく高精度で測定できる手法を開発する。

③特に窒素同位体比の測定は、アミノ酸に含まれる窒素を N_2 にした後、イオン化して安定同位体比質量分析計 (IRMS) で検出するが、 N_2 は大気中に大量に含まれることから、バックグラウンドの影響をいかに減らすことができるかが重要となる。

分子レベルの安定同位体比を測定するには、ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析計 (GC/IRMS) が用いられている。分子レベルの同位体比測定は、アミノ酸分子を GC で分離され、高温炉で燃焼または熱分解により気体にした後、オンライン接続された IRMS で連続的に検出される。よって、アミノ酸は GC で分析できるように精製・誘導体化が必要あり、GC/IRMS における測定条件の確立を行う。分子レベル安定同位体比を測定技術として、研究協力機関である海洋研究開発機構に機器を提供してもらい、既に脂質分子の測定技術は確立している。そこで、本研究では初年度に前処理装置を導入し、これまでの技術を改良して、アミノ酸の炭素・窒素同位体比測定技術を確立する。

(2) 生体試料 (母乳・尿) および食品試料の全有機物多元素同位体比分析

①収集した試料について、炭素・窒素・酸素・水素同位体比測定を行う。また、準備研究で用いた炭素量・窒素量は、同位体比測定の際に同時に測定が可能であり、これらの情報を加えた 6 要素を用いて検証を行う。

②測定された 6 要素について、マルチダイアグラムや多変量解析により傾向を解析し、食品と母乳との関係を解析していく。

各同位体比は、元素によって各々反映するものに特徴があり、水素・酸素同位体比は生育環境水の同位体比と温度・湿度・乾燥状態を反映し、窒素同位体比は食物連鎖上の栄養段階、炭素同位体比は基本的に食べた物の同位体比を強く反映すると報告されている。

そこで、まずは生体試料 (母乳・尿) および食品試料については、先行研究で用いられてきた全有機物レベルでの多元素 (炭素・窒素・酸素・水素) 安定同位体比測定を行う。ここでは、元素分析/同位体比質量分析計 (EA/IRMS) を用いて分析を行う。操作としては、粉末化した試料を錫箔 (炭素・窒素) または銀箔 (水素・酸素) に包み、元素分析系を用いて、高温での燃焼または熱分解によって有機物を気体にし、カラムで分離した気体を各々同位体比質量分析計へ導入し、各元素の同位体比を測定する。測定値は有機物全体の値を示すため、集合体としてしか情報が得られない。しかし、比較的簡単に測定が可能なることから、1970 年代から現在まで保存された数多くの試料を迅速に分析し、おおまかな傾向を確かめることができる。

また、生体試料 (母乳・尿) および食品試料について、全有機物レベルで多元素同位体比の変動を追跡する。多元素の同位体比変動が解明され、(3) で行うアミノ酸の分子レベル同位体比の結果と比較することで、試料全体とアミノ酸分子の同位体組成の相関関係が読み取れる。

(3) 生体試料 (母乳・尿) および食品試料のアミノ酸の炭素・窒素同位体比分析

(1) で確立された分析法を用いて、生体試料 (母乳・尿) および食品のアミノ酸同位体比測定を行う。

①アミノ酸の抽出・精製および GC 用の誘導体化については既に技術を有していることから、まずは、GC/MS でアミノ酸の分子分布を解析する。

②IRMS の前処理に GC を持つことで、複数のアミノ酸分子を一度の測定に導入しても、アミノ酸の同位体比が分子別に測定可能である。

アミノ酸を指標とした環境影響評価を行う

にあたって、最も重要となるのはアミノ酸の同位体比の変動メカニズムを解析することである。有機分子の同位体比変動は、原料自体が持つ同位体比と合成・代謝経路が主要因となる。

さらに必須アミノ酸は食物が持つ同位体比が大きな影響を与えていると考えられ、必須アミノ酸と非必須アミノ酸の間で同位体比は大きく異なると予測されることから、食物由来のアミノ酸が生体内でどのような挙動を示すのかを解読できると考えられる。そこで、本研究では、以下の解析を行う。

④食資源のアミノ酸について、個々の分子について同位体比を測定し、過去 30 年間における食環境の変遷とアミノ酸の同位体比変動を解析する。

⑤生体試料（母乳・尿）についても食資源同様に分子レベルにおけるアミノ酸の同位体比分析をする。これらの結果は上記の食環境の経年変化の結果と比較をし、生体試料（母乳・尿）中での必須アミノ酸および非必須アミノ酸動態解析を行う。

これにより、1970 年代後半から現在に至る長期間におけるヒトの食環境の変動とそれらが生体試料（母乳・尿）へ与える影響についてアミノ酸の分子レベル同位体比分析法によって解析する。

(4) 食環境が生体試料（母乳・尿）へ及ぼす影響の総合評価

生体試料（母乳・尿）およびその時代に摂取していた食資源について、全有機物の多元素同位体比と、アミノ酸の分子分布および分子レベル安定同位体比について、データをまとめ、以下の点について解析を行う。

①生体試料内における必須アミノ酸および非必須アミノ酸の摂取および代謝メカニズムの解析

②加工品の増加などによる食資源の経年変化

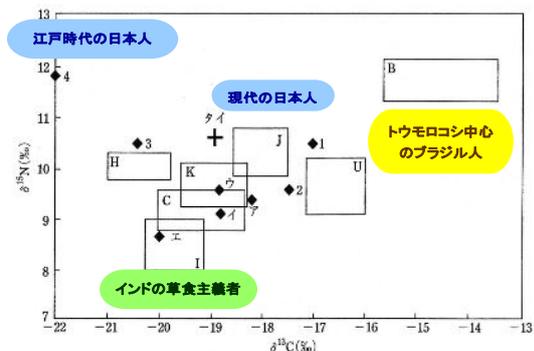
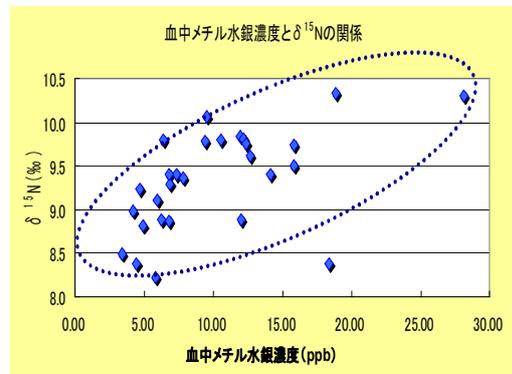
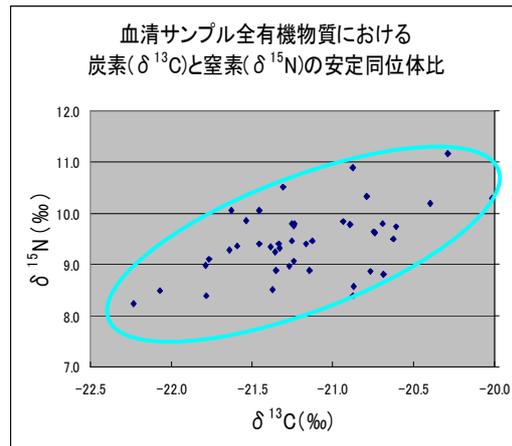
③食環境が生体試料（母乳・尿）成分へ及ぼす影響の評価

食品のアミノ酸と生体試料（母乳・尿）の必須アミノ酸との同位体比の比較から、食資源の吸収・代謝におけるアミノ酸の挙動メカニズムを解析し、過去 30 年間というスパンでの食環境の変遷が生体試料（母乳・尿）へ及ぼす影響を評価する。これらの結果から、食環境の変化に伴う生体試料のアミノ酸バランスの変化やアミノ酸の起源の推定が期待され、加工食品などの登場により大きく変わり行く食生活の姿を追うことが可能となる。また、現代における食環境が生体試料の同位体組成へ及ぼす影響が把握できれば、地球化学や考古学の世界における古環境復元に関

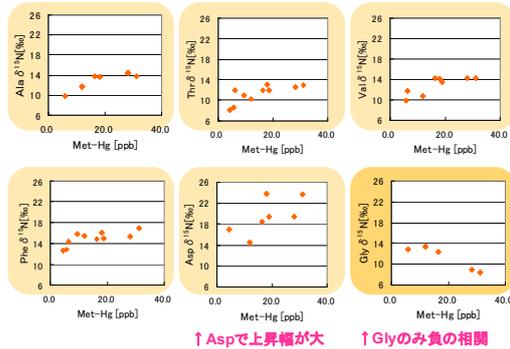
しても有用なツールとなる。

4. 研究成果

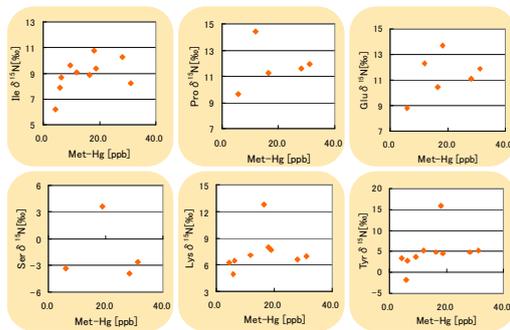
1970 年代後半から現在に至る長期間におけるヒトの食環境の変遷と、それらがヒト血液生体試料へ与える影響について、アミノ酸の分子レベル同位体比分析法による解析に成功し、世界で始めて以下に示すような代表的研究成果が得られた。



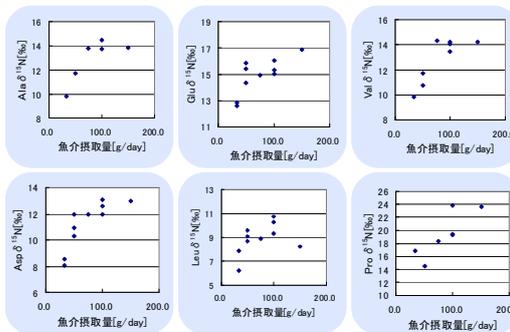
◆ヒト血清のアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値と全血中メチル水銀濃度



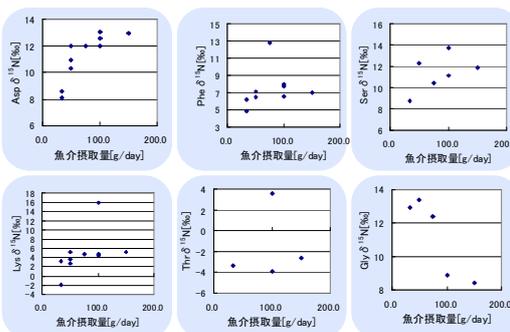
◆ヒト血清の他アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値と魚介類の摂取量



◆ヒト血清のアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値と魚介類の摂取量



◆ヒト血清のアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値と魚介類の摂取量



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15件)

①Mayu Yamamoto, Rumiko Nakashita, Yaeko Suzuki, Takahiro Ichimiya, and Takashi Korenaga, Application of Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry for Studying Nutrition and Biosynthesis in Plants, Chemistry Letters, 査読有, Vol.38, No.7 2009, 696-697

②中下留美子、鈴木彌生子、一宮孝博、伊永隆史、生元素安定同位体比解析による養殖ウナギの産地判別の可能性、日本食品科学工学会誌、査読有、Vol.56、No.9、2009、495-497

③ Rumiko Nakashita、Yaeko Suzuki、Fumikazu Akamatsu、Yoshiko Iizumi、Takashi Korenaga、Yoshito Chikaraishi、Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef、Analytica Chimica Acta、査読有、618、2008、148-152

④ Yaeko Suzuki、Yoshito Chikaraishi、Nanako Ogawa、Naohiko Ohkouchi、and Takashi Korenaga、Geographical origin of polished rice based on multiple element and stable isotope analyses、Food Chemistry、査読有、109、2008、470-475

⑤中下留美子、鈴木彌生子、赤松史一、小原和仁、伊永隆史、安定同位体比解析による国産・豪州産・米国産牛肉の産地判別の可能性、日本食品科学工学会誌、査読有、Vol.55、No.4、2008、191-193

[学会発表] (計40件)

①伊永隆史、安定同位体の動態解析研究と食の安全にかかる産地判別への応用、第57回質量分析総合討論会、2009.5.13~5.15 大阪

②伊永隆史、安定同位体比による産地特定と動態解析研究、第7回同位体科学研究会、2009.3.6、神奈川

③Rumiko Nakashita、Yaeko Suzuki、Yoshiko Iizumi、Takashi Korenaga、C, N, and O stable isotope ratios as a tool to discriminate the beef origin、3rd International symposium on Recent Advances in Food Analysis、2007.11.7~11.9、チェコ

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：農産物の産地判別方法、および養殖、
輸入、天然ウナギ判別方法

発明者：伊永隆史、榮口彌生子、中下留美子

権利者：伊永隆史

種類：特許

番号：特願 2009-62020

出願年月日：平成 21 年 3 月 13 日

国内外の別：国内

名称：バイオマス試料の由来判別方法および
コメの産地判別方法

発明者：伊永隆史、鈴木彌生子、中下留美子

権利者：伊永隆史

種類：特許

番号：特願 2009-129075

出願年月日：平成 21 年 5 月 28 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊永 隆史 (KORENAGA TAKASHI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：30124788