

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K14027

研究課題名（和文）ベビーフードに含まれる生理活性アミン類による乳幼児への健康影響評価

研究課題名（英文）Risk assessment of biogenic amines in baby foods

研究代表者

粟津 薫（Awazu, Kaoru）

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：30435888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：ベビーフードに含まれる生理活性アミン類（BA）による乳幼児への健康影響を評価するために、HPLC-FL測定によるBA分析法を確立した。ヒトへの健康影響が認められているBA6種（Him、Tym、Phm、Tpm、Put、Cad）、生鮮食品に含まれるBA2種（Spd、Spm）、内部標準物質（1,7-Diaminoheptane）を分析対象とした。

WCXカラムによる精製後、フルオレスカミンによる蛍光誘導体化およびHPLC-FL測定を行うことにより、ウェットタイプベビーフードに適用可能なBA7種（Him、Tym、Spd、Spm、Put、Cad、Phm）と内部標準物質の分析法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内における食品のBAの含有実態に関する研究は、魚介類加工品および発酵食品などの微生物の増殖で生成されるBAを対象に実施されてきた。確立した分析法を用いて国内に流通するベビーフードのBAの含有実態を調査し、乳幼児への健康影響や製品の特徴と含有量の関連を明らかにすることで、健康被害の防止やベビーフードの品質改善に役立つと考える。

研究成果の概要（英文）：To evaluate the health effects of biogenic amines (BAs) contained in baby foods on infants, we developed a BAs analysis method using HPLC-FL measurement. We analyzed six BAs (Him, Tym, Phm, Tpm, Put, Cad) that have been recognized to have health effects on humans, two BAs (Spd, Spm) contained in fresh foods, and an internal standard (1,7-Diaminoheptane). After purification using a WCX column, fluorescent derivatization with fluorescamine and HPLC-FL measurement were performed to establish an analytical method for seven BAs (Him, Tym, Spd, Spm, Put, Cad, Phm) and internal standard substances applicable to wet-type baby foods.

研究分野：食品分析

キーワード：生理活性アミン biogenic amines ベビーフード 健康影響評価 HPLC-FL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品に含まれる生理活性アミン類 (biogenic amines : BA) は、主にタンパク質の変性や細菌の増殖に伴うアミノ酸の分解で生成される。BA の経口摂取による健康影響およびその報告は、欧州食品安全機関 (EFSA) が発行する科学的意見書にまとめられている¹⁾。

魚介類に含まれるヒスタミン (Him) チーズやワインに含まれるチラミン (Tym) による健康影響が知られており、その他のプトレシン (Put) やカダベリン (Cad) は、Him や Tym よりも毒性が弱い。Him の代謝阻害、発がん物質のニトロソアミンの生成との関係が示唆されている。現状、食品の腐敗や発酵で生成される BA に関する報告が多く、動植物の代謝で生成される BA、特に加工食品に含まれる原料由来の BA に関してはあまり報告されていない。また、経口摂取された BA は腸管に存在する酵素で代謝され無毒化されるが、代謝系が未発達の乳幼児は健康被害の重篤化が懸念される。よって、研究が進んでいない加工食品のうち、乳幼児が摂取するベビーフードを対象にするのが適切であると考えた。

2. 研究の目的

ベビーフードに含まれる BA に着目し、BA 分析法の確立、流通品の BA 含有実態の調査、製品ごとの乳幼児への健康影響評価、製品の特徴と BA 含有量の関係の解明を通じて、ベビーフードに含まれる BA による乳幼児への健康影響を評価することを最終的な目標とした。本研究ではベビーフードの BA 分析法の確立を目的とした。

ベビーフードの BA 分析における課題として、BA に比べて高濃度に含まれる成分 (糖質、脂質、タンパク質など) が機器分析の妨害となるため除去する必要がある。魚介類や食肉加工品の BA 分析では、陽イオン交換系固相抽出カラムを用いることで良好な精製効果が得られたこと、フルオレスカミンによる蛍光誘導体化により高感度分析が可能であったことを参考に、ベビーフードの BA 分析法を検討した。

3. 研究の方法

分析対象は、ヒトへの健康影響が認められている BA6 種 (ヒスタミン Him、チラミン Tym、フェネチルアミン Phm、トリプタミン Tpm、プトレシン Put、カダベリン Cad)¹⁾ とし、生鮮食品に含まれる BA2 種 (スペルミジン Spd、スペルミン Spm) および BA 分析で内部標準物質として使用されることの多い 1,7-Diaminoheptane の分析もあわせて検討した。

試料は、月齢 5 ヶ月頃から 1 歳半までを対象としたベビーフードを用いた。

分析方法は、既報²⁾⁻⁴⁾を参考にベビーフードから BA を抽出後、陽イオン交換系固相抽出カラムによる精製、フルオレスカミンによる蛍光誘導体化、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-FL) による定量を行った。

4. 研究成果

(1) HPLC-FL による BA の定量

分析カラムは、フルオレスカミンで蛍光誘導体化した BA を保持可能な C18 カラムを用いた。弱酸性の移動相を用いることで BA の蛍光誘導体化物の C18 カラムへの保持が高まるため、0.05 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.3) とアセトニトリルを用いてグラジエント溶出を検討したが、Spm と Spd、Tpm と Phm でベースライン分離が得られなかった。次に、移動相に 0.05 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.3)、アセトニトリルおよびメタノールを用いて、アセトニトリルとメタノールを 1 : 1 の比率を維持するようにグラジエント溶出を検討したところ、Spm と Spd、Tpm と Phm についてもベースライン分離が得られ、良好なクロマトグラムが得られた (図 1)。検量線は、試験溶液中 BA 濃度 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で決定係数 0.999 以上と良好な相関が得られた。定量下限は S/N 比 10 以上を満たす検量線範囲内の濃度とし、試験溶液中 BA 濃度 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (試料中 BA 濃度 2 $\mu\text{g}/\text{g}$) とした。

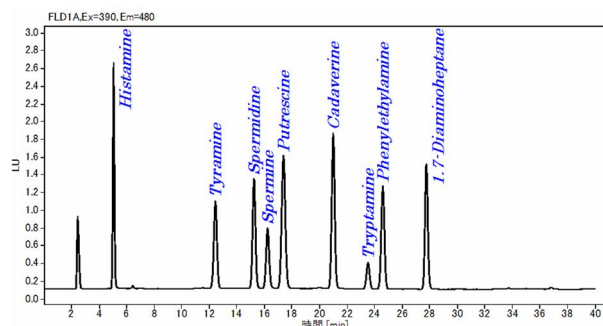


図 1 BA 標準溶液 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロマトグラム

HPLC-FL 条件

Agilent 1260 Infinity システム

カラム :

GL Science Inertsil ODS-4 5 μm 4.6 × 150 mm

FLD : Ex 390 nm, Em 480 nm

移動相: 0.05 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.3),

アセトニトリル, メタノール

流速 : 1.0 mL/min, 注入量 : 10 μL

カラム温度 : 50 , サンプル温度 : 12

(2) ベビーフードに含まれる BA の抽出条件

当初、分析妨害成分が多く含まれる試料としてフリーズドライタイプのベビーフードを用いて抽出および精製方法を検討したが、良好な結果が得られなかったため、ウェットタイプのベビーフードを対象にした BA 分析法の確立を目指した。

魚介類や食肉加工品の BA 分析は除タンパクを目的に 5 %トリクロロ酢酸溶液 (5 %TCA) を用いて BA を抽出したが、ベビーフード 4 種 (レバーと野菜ペースト、魚と野菜のクリーム煮、野菜ペースト、果実ペースト) の抽出に 5 %TCA を用いると遠心後の上清のろ過に時間がかかった。既報⁴⁾を参考に、除タンパク剤として用いられるメタノールと 5 %TCA の混液を用いた抽出を検討した。BA が含まれないことを確認したベビーフード (魚と野菜のクリーム煮) 5 g に BA10 µg/g を添加、5 %TCA または 5 %TCA : メタノール (1 : 1) 混液を用いて抽出、(3) で検討した方法に基づき固相抽出カラム精製後、フルオレスカミンによる蛍光誘導体化、HPLC-FL により定量した。

いずれの抽出液を用いても回収率は同程度であり、遠心後の上清のろ過が容易でろ過時間を短縮できた 5 %TCA : メタノール (1 : 1) 混液を用いることにした (表 1)。

(3) 固相抽出カラムによる精製

BA を保持可能とされる逆相-陽イオン交換ミックスモードカラム (WCX カラム) を検討に用いた。試料には、分析妨害成分が多く含まれるベビーフードを代表するものとして、魚と野菜のクリーム煮を用いた。

ベビーフード 5 g に BA10 µg/g を添加、5 %TCA : メタノール (1 : 1) 混液で 2 回抽出し、遠心後の上清をろ過、そのろ液を 50 mL に定容した。抽出液 1 mL を水酸化 Na 溶液による中和後、0.1 mol/L リン酸緩衝液 4 mL と混合したものを、コンディショニング済みの WCX カラムに負荷した。同濃度のリン酸緩衝液、水および 50 %メタノール各 5 mL で洗浄後、ギ酸 : 水 : メタノール混液で BA を溶出した。ギ酸 : 水 : メタノール混液は、2:48:50、2:28:70、2:8:90 の 3 種類を用いて検討し、それぞれ 5 mL ごとに 3 回 (計 15 mL) で溶出した。溶出液を減圧乾固後 50%メタノール 2mL に再溶解したものを、フルオレスカミンによる蛍光誘導体化、HPLC-FL により定量し、回収率を比較した。

Him、Tym、Put、Cad、Phm、1,7-Diaminoheptane の 6 種は、いずれの混液を用いたときも 0-5 mL の分画に 80 %以上溶出し、5-10 mL および 10-15 mL の分画には溶出しないまたは痕跡量程度の溶出であった。3 種類の混液のうち、ギ酸 : 水 : メタノール (2:48:50) 混液を用いた時の回収率が最も良好であった。

Spd は、0-5 mL の分画にギ酸 : 水 : メタノール (2:48:50) 混液を用いたときは 88 %溶出したが、(2:28:70) 混液は 71%、(2:8:90) 混液は痕跡量程度の溶出であった。

Spm は、ギ酸 : 水 : メタノール (2:48:50) 混液を用いた時のみ 5-10 mL の分画に 50 %、10-15 mL に痕跡量程度が溶出され、他の混液には溶出されなかった。

Tpm は、0-5 mL の分画にギ酸 : 水 : メタノール (2:8:90) 混液を用いたときは 80 %溶出したが、(2:28:70) 混液は 64%、(2:48:50) 混液は 36 %の溶出であった。他の BA と異なり、溶出液のメタノール濃度の増加に伴い回収率が増加した。

溶出液は、BA6 種 (Him、Tym、Spd、Put、Cad、Phm) と 1,7-Diaminoheptane で回収率が良好であったギ酸 : 水 : メタノール (2:48:50) を用いることとした。溶出液量は、Spm が 5-10 mL の分画に溶出したことを考慮して 10 mL とした。

1,7-Diaminoheptane の回収率は、いずれの混液を用いたときも 0-5 mL の分画に 90 %以上溶出したことから、抽出操作やカラム精製による損失が少なく、内部標準物質として適用可能であると考えられた。

(4) 添加回収試験

BA が含まれないことを確認したベビーフード (野菜ペースト) に BA10 µg/g を添加、(3) で検討した結果に基づき固相抽出カラム精製後、フルオレスカミンによる蛍光誘導体化、HPLC-FL により定量した結果、Tpm を除く BA7 種と 1,7-Diaminoheptane で良好な回収率が得られた (表 2)。

(5) まとめ

ウェットタイプベビーフードに適用可能な BA7 種 (Him、Tym、Spd、Spm、Put、Cad、Phm) と内部標準物質 (1,7-Diaminoheptane) の分析法を確立した。確立した BA 分析法を用いて、国内に流通するベビーフードの BA 含有実態を調査することにより、ベビーフードに含まれる BA による乳幼児への健康影響の評価が可能となる。

表1 BAの抽出条件による回収率の比較

	平均回収率 (%) / RSD (%) (n=3)	
	5% TCA	5% TCA : MeOH (1:1)
Him	85 / 1	87 / 3
Tym	95 / 1	98 / 2
Spd	101 / 1	99 / 4
Spm	79 / 4	77 / 2
Put	89 / 1	90 / 2
Cad	90 / 1	91 / 2
Tpm	30 / 23	31 / 11
Phm	88 / 1	92 / 2
1,7-Diaminoheptane	93 / 1	95 / 2

表2 添加回収試験

	平均回収率 (%) / RSD (%) (n=3)
Him	96 / 4
Tym	98 / 3
Spd	92 / 6
Spm	84 / 5
Put	81 / 7
Cad	90 / 3
Tpm	40 / 7
Phm	89 / 3
1,7-Diaminoheptane	93 / 3

< 参考資料 >

- 1) European Food Safety Authority, Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods, EFSA Journal 2011;9(10):2393
- 2) 粟津薫ら, タンデム固相抽出を用いた魚肉中ヒスタミン分析法の検討, 食品衛生学雑誌, 52, 199-204, 2011
- 3) 久保田晶子ら, フルオレスカミン誘導体化 HPLC 法による食品中の不揮発性アミン類分析法, 食品衛生学雑誌, 60, 61-67, 2019
- 4) 上田友紀子ら, 農産食品に含まれる不揮発性アミン類の実態調査, 第60回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 84-85, 2023

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 粟津薫, 福井直樹, 山口瑞香, 永吉晴奈, 松井啓史, 山口進康
2. 発表標題 フルオレスカミン誘導体化HPLC法による魚介類加工品中のヒスタミン・チラミン分析法の検討
3. 学会等名 第60回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 粟津薫, 新矢将尚
2. 発表標題 ベビーフード中の生理活性アミン類分析法の検討
3. 学会等名 第118回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 粟津薫, 新矢将尚
2. 発表標題 固相抽出法によるベビーフード中の生理活性アミン類分析法の検討
3. 学会等名 第117回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 粟津薫, 新矢将尚
2. 発表標題 HPLC-FLによる食品中生理活性アミン類一斉分析法の検討
3. 学会等名 第57回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------