

機関番号：30110

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590124

研究課題名 (和文) 銀杏中毒原因物質の食品加工過程における配糖体化メカニズムの解明と毒性評価

研究課題名 (英文) Study of glycosidation mechanism of 4'-O-methylpyridoxine in the processing process of *Ginkgo biloba* seeds and toxicity

研究代表者

和田 啓爾 (WADA KEIJI)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：40158689

研究成果の概要 (和文) : 当研究室では、すでに銀杏中毒の原因物質が 4'-O-メチルピリドキシン (MPN) であることを明らかにしている。本研究では、新たに銀杏を摂取する際には、MPN の配糖体の形で摂取していることを示した。さらに、MPN の配糖体は MPN 同様、痙攣誘発作用を有すること、摂取した MPN 配糖体は小腸において一部はそのままの形で吸収され、また一部は MPN に変換されることが示された。本研究は、銀杏中毒の毒性発現機構の第一段階として小腸における MPN 配糖体の吸収機構と加水分解機構の関与を示した最初の研究である。

研究成果の概要 (英文) : It was reported that 4'-O-methylpyridoxine (MPN) is responsible for *Gin-nan* food poisoning by our group. In this study, we newly suggested that MPN-5'-glucoside, rather than MPN, is consumed when we eat *Ginkgo biloba* seeds. Additionally, MPN-5'-glucoside had a lethal effect in mice, as well as MPN. A portion of orally administered MPN-5'-glucoside was directly absorbed and a portion of the other was hydrolyzed to MPN in intestine. This is the first study which suggested contribution of absorption and hydrolysis of MPN-5'-glucoside in intestine to the first step of occurrence of *Gin-nan* food poisoning.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	400,000	120,000	520,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：食品衛生学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：自然毒食中毒、毒性評価、配糖体、食品加工、銀杏中毒

1. 研究開始当初の背景

(1) 銀杏を大量に摂取すると痙攣を伴う中毒症状を引き起こし、死亡例の報告がある。その原因物質は当初青酸配糖体と言われていたが、申請者は、銀杏中に含まれるビタミン B₆ 誘導体 4'-O-methylpyridoxine (MPN) が銀杏中毒の原因物質であることを明らかにし

た (Wada *et al.*, 1985)。また MPN を投与すると脳内の抑制性の神経伝達物質 γ -アミノ酪酸 (GABA) 濃度が低下し、興奮性のアミノ酸グルタミン酸濃度が上昇することを証明した (Minami *et al.*, 1990)。MPN はグルタミン酸からビタミン B₆ 依存的に GABA を生成するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) を阻害す

る報告があり(Buss *et al.*, 2001)、GAD が MPN の毒性に関わっていると考えられている。

(2) MPN は、銀杏中に含まれているが、MPN の配糖体(MPN-5'-glucoside)もまた銀杏中に含まれていることがカナダのグループにより報告された(Scott *et al.*, 2000)。我々はさらに各種ビタミン B₆ 誘導体の同時定量法を確立して生の銀杏と加工された銀杏(缶詰めやパック製品)の MPN および MPN 配糖体の量を比較したところ生の銀杏ではほとんどが MPN であるのに対し、加工された銀杏ではほとんどが MPN 配糖体であることを発見した(Yoshimura *et al.*, 2006)。

2. 研究の目的

申請者は加工により MPN から MPN 配糖体に変換したと考えられる奇異な現象に興味を持った。そこで本研究課題では、(1)どのような機構で MPN が配糖体化されるか、(2)配糖体化された MPN は吸収されるか、(3)配糖体化された MPN は毒性を示すのかを明らかにすることを目的とした。2)と3)により MPN 配糖体が MPN 同様に吸収および毒性を示すか明らかとなり、MPN 配糖体の毒性が低いことが明らかになれば、1)で明らかになった配糖体化処理により銀杏の毒性を低下させることができ、銀杏中毒の画期的な予防法に応用できる研究である。本研究は、生銀杏と銀杏加工製品中の中毒原因物質の化学形の違いを解析し、また銀杏中に含まれる MPN とその配糖体の毒性および体内動態の違いをあきらかにし、銀杏中毒の予防法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 銀杏中の MPN および MPN 配糖体量は当研究室で確立した蛍光検出器を用いた HPLC 法(Yoshimura *et al.*, 2006)により行った。

(2) MPN 配糖体の痙攣誘発作用の有無を明らかにするために、MPN 誘発性痙攣を起こし易い動物種であるマウスを用いた。痙攣誘発作用は、MPN 配糖体投与後のマウスにおける痙攣発生時間ならびに痙攣発生率を MPN 投与後のマウスと比較した。

(3) ラットまたはヒト血清ならびに尿中の MPN、MPN 配糖体、MPN 代謝物およびビタミン B₆ 誘導体の測定には、HPLC を用いた新規測定条件を検討した。なお、銀杏中毒患者の血清および尿を分析する際には、十分なインフォームドコンセントをとった上で行う。

(4) ラット小腸粘膜における MPN 配糖体の吸収ならびに加水分解機構の解析には、拡散チャンバー法により行った。

4. 研究成果

(1) 銀杏中の MPN および MPN 配糖体量
① MPN の配糖体化工程：銀杏製品の加工工程における MPN ならびに MPN 配糖体量の変化を解析するために、熱処理の影響を中心に検討した。その結果、生の銀杏を茹でた時と電子レンジで加熱した時、ならびに炒った時いずれの条件でも MPN が減少し、MPN 配糖体が増加した(図1)。この結果より熱処理が配糖体化に寄与していると考えられた。

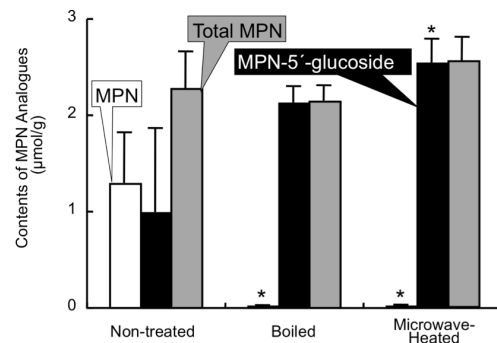


図1:銀杏中のMPNおよびMPN配糖体量に及ぼす熱処理の影響

② MPN の配糖体化工程の検討：銀杏は薄皮とさらにその周りを固い殻に包まれているが、殻または薄皮の有無に関わらず、すべての条件で熱処理により MPN 配糖体の増加が観察された(図2)。

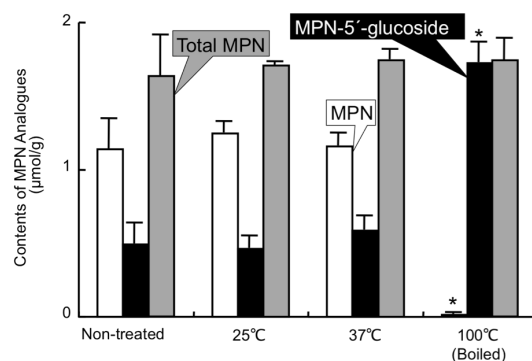


図2:銀杏中のMPNおよびMPN配糖体量の温度依存的な変化

また、温度条件について検討すると、茹でることによる配糖体の増加は、37度以下の水中では観察されなかった(図3)。これらの結果より、熱処理による MPN 配糖体の増加には殻または薄皮は影響しないことと、高温条件での処理が必要であることが明らかとなった。

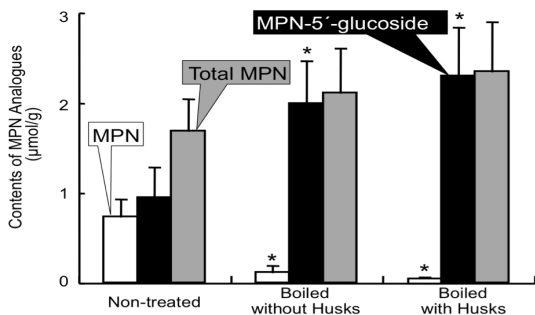


図3:銀杏中のMPNおよびMPN配糖体量の熱処理による変化に及ぼす殻の影響

③ 銀杏中のMPNおよびMPN配糖体量におよぼす乾燥処理の影響:上記の結果は、熱処理によりMPNがMPN配糖体に変化したと考えていた。しかし、測定前処理時に行った乾燥処理により、生の銀杏ではMPN配糖体が減少しMPNが増加するが、熱処理を行った銀杏では、MPN配糖体量の変化が観察されなかった。つまり、生の銀杏では、MPN配糖体が乾燥処理中にMPNに加水分解されMPNが多く検出されたが、熱処理をした銀杏では、乾燥処理によるMPNの加水分解が起こりにくく、MPN配糖体が主に検出されたと考えられた。

以上の結果から、当初想定していた、銀杏加工中にMPNがMPN配糖体に変化する可能性は否定されたが、生の銀杏と加工後の銀杏中には、ともにMPNよりもMPN配糖体が多く含まれていることが明らかとなった。したがって銀杏を摂取する際には、MPN配糖体として摂取していると考えられ、銀杏中毒の毒性発現機構の第一段階として、MPN配糖体の加水分解やMPN配糖体の吸収機構の解明が重要であると考えられた。

(2) MPN配糖体の毒性評価

MPNによる痙攣を引き起こし易いマウスを用いて、MPN配糖体とMPNの痙攣誘発

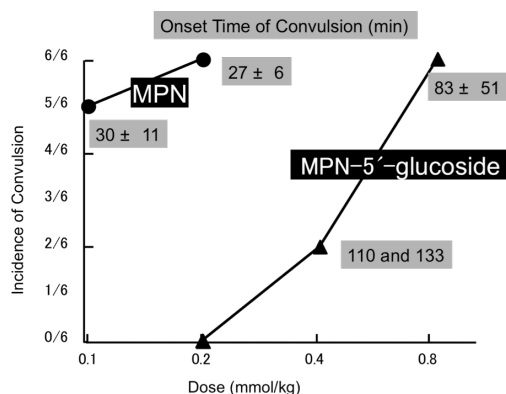


図4:マウスにおけるMPNおよびMPN配糖体による痙攣発症率と痙攣発生時間

作用を比較した。MPN配糖体は、MPNよりも毒性が低く、毒性が現れるまでに時間がかかる(図4)ことから、MPN配糖体は生体内でMPNに変換されて毒性を示すと考えられた。

(3) 血中および尿中MPNならびにMPN配糖体の測定法の開発

当研究で確立したMPNおよびMPN配糖体量の測定に用いたHPLC法(Yoshimura et al., 2006)に加えて、MPN、MPN配糖体、MPN代謝物ならびに内因性のビタミンB₆の同時定量法を確立した。

(4) MPN配糖体の体内動態

① ラットにおけるMPN配糖体の体内動態:MPN配糖体を経口投与(1 mg/kg)後のラット尿中にMPN配糖体とMPNならびにMPNの代謝物が検出された。投与されたMPN配糖体の約30%がMPN配糖体として尿中に検出されたことから、投与したMPN配糖体の一部は吸収されそのまま排泄されることが明らかとなった。またMPN代謝物の排泄率は、MPN投与後のMPN代謝物の排泄率の50%程度であり、MPN配糖体投与後にMPNに変換された割合は、MPN投与後に吸収された割合の約半分であると推測された。つまり、MPN配糖体は生体内でMPNに変換しさらに代謝を受けることが明らかとなった。

② 銀杏中毒患者におけるMPN配糖体の体内動態:銀杏中に含まれるMPN配糖体を摂取したと考えられる銀杏中毒患者でも、血清中にMPNならびにMPNの代謝物が検出され、ヒトにおいても、MPN配糖体がMPNに変換され、さらに代謝を受けることが明らかとなった。

③ ラット小腸におけるMPN配糖体の加水分解と吸収:小腸粘膜においてMPN配糖体からMPNが生成するか、MPN配糖体が小腸粘膜を透過するかを同時に検討するために、チャンバーシステムを用いた検討を行った。MPN配糖体の一部が小腸粘膜においてMPNに変換されること、また残りの一部はそのままの形で小腸粘膜を透過することが明らかとなった。

(5) 総括

本研究の主な成果を以下にまとめる。

① 銀杏を摂取する際にはMPNよりもむしろMPN配糖体として摂取していることが明らかになった。

② MPNの配糖体はMPNよりは毒性が低いものの、痙攣誘発作用を有することが明らかになった。

③ 摂取した MPN 配糖体の一部はそのままの形で吸収され、また一部は MPN に変換されることが *in vivo* 実験において証明された。

④ 小腸において MPN 配糖体の吸収機構ならびに加水分解機構が存在することが明らかになった。

以上の成果により、銀杏中毒の毒性発現機構の第一段階として小腸における MPN 配糖体の吸収機構と加水分解機構の関与が示された。これらの成果は、今まで MPN の毒性発現機構を中心に展開されて来た銀杏中毒に関する研究に加えて、小腸における MPN 配糖体の吸収機構と加水分解機構が重要であると示した世界で初めての報告であり、今後の銀杏中毒機構の解明ならびに予防法の確率に有用な情報である。

銀杏中毒は小児で多く発生し、毒性の発現には年齢差が存在することが報告されており (Wada & Haga, 1997)、小腸における MPN 配糖体の吸収機構ならびに加水分解機構が年齢差の一因になるか、今後の検討が必要である。また、MPN 配糖体の吸収機構ならびに加水分解機構が明らかになればそれらの活性を制御することにより、銀杏中毒の予防が期待できるため、今後さらに詳細な検討を続けて行く予定である。

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 1 件)

Daisuke Kobayashi, Teruki Yoshimura, Atsushi Johno, Keiko Sasaki, Keiji Wada, Toxicity of 4'-O-methylpyridoxine-5'-glucoside in *Ginkgo biloba* seeds, Food Chemistry, 査読あり, Vol.126, No.3, 2011, pp.1198-1202.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 石川美香、和田啓爾、他 2 名、銀杏中毒原因物質 4'-O-Methylpyridoxine の各種動物肝におけるグルクロン酸抱合反応、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡
- ② 小林大祐、和田啓爾、他 2 名、各種動物肝ミクロソームにおける銀杏中毒原因物質 4'-O-Methylpyridoxine の代謝反応、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山県桃太郎アリーナ
- ③ 小林大祐、和田啓爾、他 12 名、2007 年度に銀杏中毒が疑われた症例における中毒原因物質 4'-O-Methylpyridoxine ならびにビタミン B6 の血清中濃度測定、第 31 回

日本中毒学会総会学術集会、2009 年 7 月 24 日、北里大学

④ 小林大祐、和田啓爾、他 5 名、銀杏中毒原因物質 4'-O-Methylpyridoxine とその配糖体の痙攣誘発作用、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 26 日、国立京都国際会議場

⑤ 小林大祐、和田啓爾、他 2 名、銀杏中に存在する 4'-O-Methylpyridoxine-5'-glucoside の定量と毒性、フォーラム 2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2008 年 10 月 17 日、熊本市民会館

[その他]

ホームページ等

<http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~wada/kg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 啓爾 (WADA KEIJI)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号: 40158689

(2) 研究分担者

吉村 昭毅 (YOSHIMURA TERUKI)

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号: 60220737

小林 大祐 (KOBAYASHI DAISUKE)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号: 30405667

(3) 連携研究者

なし