

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292010

研究課題名(和文)茶で検出されたニコチンの起源の解明

研究課題名(英文)Analysis of the origin of nicotine detected in tea

研究代表者

森田 明雄 (Morita, Akio)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：20324337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：チャ葉から検出されたニコチンの起源を明らかにすることは、食の安全・安心の観点からも非常に重要である。本研究では、チャから検出されたニコチンの起源を決定付け、その原因の詳細について明らかにすることを目的とした。我々は、チャにおける高感度ニコチン分析方法を確立し、世界中に流通している茶製品をはじめとする多くの茶サンプルについてニコチン含量を分析した。その結果、ほとんどのサンプルから残留基準値以上のニコチンを検出した。環境中からのニコチン汚染が限りなく低いサンプルからも普遍的にニコチンを検出したため、チャはニコチンを生合成している可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Nicotine levels in food crops are monitored using the default maximum residue level (MRL) of 0.01 ppm in Japan, but nicotine levels in tea were found to exceed the MRL. Therefore, it is necessary to clarify the origin of this nicotine. We measured nicotine in various tea samples using LC-MS/MS. We measured nicotine in tea leaves used for drinking, analyzing 118 tea samples. All samples contained nicotine above the MRL. Then, we measured the nicotine concentrations in the leaves of two Japanese tea cultivars after they were prepared as green, oolong, and black teas. The nicotine levels in the processed tea leaves were unchanged. Furthermore, we quantified the nicotine levels above MRL from hydroponic tea roots and cultured cells from aseptic conditions that virtually guaranteed the complete exclusion of nicotine contamination from exogenous sources. These results suggest that endogenous nicotine is present in tea, and that the plant synthesizes the nicotine.

研究分野：植物栄養学

キーワード：工芸作物 ニコチン チャ

### 1. 研究開始当初の背景

茶は、世界で最も愛飲されている嗜好飲料の1つであり、わが国でも古くから人々の食生活に深く根ざした飲み物として親しまれている。2013年1月には、朝日新聞グループに「伸びる(茶の)消費、コーヒーを上回る」という記事が掲載され、世界的に伸び続けるその消費に高い関心が寄せられている。これは、コーヒーは先進国を中心とした飲料であるという認識に対して、茶は貧富を問わず誰にとっても身近な飲料として親しまれてきたことが消費を伸ばす要因の1つとしてあるものの、最大の要因は、茶に含まれている魅力的な機能性成分によるものと考えられる。1980年代以降の緑茶のカテキン類の効能に関する研究をきっかけに、茶の科学的研究の進歩は目覚しく、抗菌・抗腫瘍性に加え、生活習慣病に対する効能や抗アレルギー性などが発見されている。その他にもストレス緩和効果のあるテアニンなどのアミノ酸が豊富に含まれており、今や「茶は健康に良い飲み物」との認識が世界的に浸透し、高い需要を背景に世界中で茶の生産面積は拡大している。さらに、茶は一般の植物とは異なり、上述したテアニンなどのアミドやカテキン類などのフラボノイド化合物の他に、カフェインなどのアルカロイド化合物といった特異な成分を多く含む特徴を持つ。

このような状況の中、我々の研究グループでは近年、アルカロイド化合物の一種であるニコチンが茶葉中にタバコ(乾物重1g当り約~2mg程度)と比較して極微量(乾物重1g当り約~0.8µg程度)存在することを発見した。ニコチンは、主にタバコ等のナス科の植物に多く含まれていることが知られており、トマトやジャガイモなどといった食品中にも含まれていることが報告されている。また、これらを主食とする北欧などの地域では、食事中からのニコチン摂取が他の地域に比べて多いとされている(スウェーデン; 1.1µg/day, デンマーク; 1.3µg/day, \*食事由来からのみの値)。ニコチンは即効性の非常に強い神経毒性を持つ化合物であり、主に中枢神経および末梢に存在するニコチン性アセチルコリン受容体に作用することで強い薬理作用を表す。誤飲や誤食などによる中毒症例は度々報道されることがあるが、食品からの摂取量は微量であるため直接的な問題とはなっていない。しかし、全ての生物に対して毒性を発揮するため、過去に農薬(殺虫剤)として使用されていた経歴を持つ(当然現在は使用が禁止されている)。厚生労働省は、食品中に残留する農薬などが人の健康に害を及ぼすことのないように、全ての農薬・飼料添加物または動物用医薬品について残留基準を設定している。その後、2003年の食品衛生法の改正に伴い、食品中に残留する農薬などの規格基準である「ポジティブリスト制度」が導入された。この結果、チャを含めた全ての農作物または食品中におけるニコチン

ン含量は、一律基準値である0.01ppm(乾物重1g当り0.01µg)以下に定められた。しかしながら、これまでに報告されているチャ葉中のニコチン含量(乾物重1g当り~2µg)の多くはこの基準値を大きく上回っている。基準値を超えて農薬などが残留する食品は販売や輸入などが全面的に禁止されることから、生産者や市場関係者へのダメージは莫大である。さらに、食の安全・安心の観点からもチャから検出されたニコチンの由来を明らかにすることは早急な課題である。研究開始当初は、チャから検出されたニコチンの起源については内因性由来であるデータが得られつつあるものの、外因性由来である可能性を完全に否定できるものではなかった。

### 2. 研究の目的

我々は、様々なチャ品種または産地の茶葉についてガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)を用いた予備的な分析を行い、定量限界値を下回るものの供試した全ての茶葉中にニコチンが含まれていることを明らかにしている。そこで本研究では、GC-MSより分析精度の高いニコチン定量方法を確立するとともに、確立した方法を用いて世界各地の生産茶および茶品種について再分析し、生物学的に正確なデータを再度取得した。加えて、ニコチン生合成経路の探索により茶葉中から検出されたニコチンの起源を決定付けることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 分析精度の高いチャからのニコチン定量方法の確立

Cavaliereら(2010)のマッシュルームからのニコチン定量分析法を参考に、茶葉中のニコチン定量法として、QuEChERS [Quick (迅速), Easy (簡易), Cheap (安価), Effective (効率的), Rugged (高い耐久性), Safe (安全)]法による抽出と液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による分析について検討した。凍結乾燥後に微粉末化したチャサンプルにニコチン<sub>d</sub><sub>3</sub>を内部標準物質として添加し、添加回収試験により分析精度の評価を行なった。

#### (2) 世界各地の生産茶および茶品種におけるニコチン含量の差異

インド産76点(そのうち、アッサム産11点、ダージリン産65点)、インドネシア産1点、ガーナ産2点、中国産1点、台湾産6点、ベトナム産1点、日本産31点の茶葉で合計118点をニコチン分析に供試した。インド産の茶製品については、三井農林株式会社より、その他茶製品については関係機関を通して入手した。なお、以後のニコチン定量については(1)で確立した方法により行なった。

#### (3) 茶の加工過程による茶葉中でのニコチン含量の変化

茶製品は茶園から収穫した生葉に様々な加工を施して完成させる。例えば、煎茶や釜

炒り茶は加工過程の初期に蒸熱や殺青などの加熱処理を施すことで、Polyphenol oxidaseをはじめとする酵素を失活させる。一方、烏龍茶や紅茶は萎凋や発酵という加工を行なうことで酵素による酸化反応を進める。このため、チャに含まれる成分は製造工程中、様々な物理的および生化学的な影響を受けることが考えられるが、ニコチン含量の変動に関して詳細な知見はない。そこで、製造工程ごとのニコチン含量を測定し、工程の影響を検討した。

農研機構果樹茶業研究部門枕崎拠点内の茶園で栽培されている「やぶきた」と「べにふうき」の生葉を収穫後、同研究所内において煎茶、釜炒り茶、ウーロン茶および紅茶を製造した。製造後のサンプルについて、ニコチン含量を測定した。

#### (4) 水耕チャ樹およびチャ培養細胞におけるニコチン含量の差異

静岡大学農学部のガラス室において、チャ標準水耕液で栽培した1年生の「やぶきた」挿し木苗を供試資料とした。水耕移植約3ヶ月後のチャ樹を水道水で洗浄し、新葉、新茎、成葉、古茎、白色根、木化根の部位別に収穫した。

「やぶきた」薬由来の懸濁培養細胞を供試材料とした。B5培地を用い、培養室内(暗所、25℃)で振とう培養(100 rpm)し、9日間ごとに継代し培養細胞を、ろ紙を用いて吸引し、回収した。これらのサンプルについてニコチンを定量した。

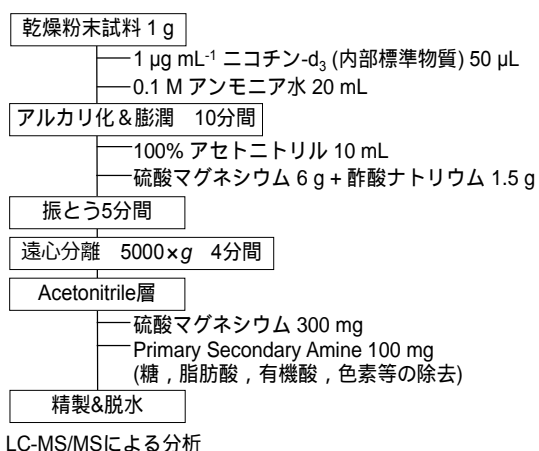
#### (5) ニコチン生合成経路探索のための遺伝子組換え体作出法の確立

効率的なチャの形質転換のために、すでにチャへの感染報告があるLBA4404およびEHA105のほか、GV3101株を入手し、それぞれのアグロの形質転換および植物への感染条件を検討するための増殖曲線を求めた。さらに、ニコチン生合成関連遺伝子のチャ組織への導入のために、主としてパーティクルガンによる遺伝子導入法の検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 分析精度の高いチャからのニコチン定量方法の確立

溶媒振とう時間などの抽出時間に対する条件検討を行ったところ、いずれの条件においてもニコチンの回収率は70-120%の範囲内であり、各条件の間に有意差は見られなかった。厚生労働省が発行する「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」によると、その実験系の妥当性を評価する際の回収率は70~120%であることが指標となっている。実験操作手順の最適性からも、QuEChERS法によるチャからのニコチンの抽出時間は5分が最適であると判断した。また、LC-MS/MSによる定量下限値は $0.005 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ となり、本法がチャの高効率および高感度ニコチン定量法として適用できることが分かった(図1)。



LC-MS/MSによる分析

図1 QuEChERS法によるチャからのニコチン抽出法

#### (2) 世界各地の生産茶および茶品種におけるニコチン含量の差異

測定した全ての茶葉から残留基準値である $0.01 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ 以上のニコチンが検出された(図2)。最大値はダージリン産の紅茶で $0.70 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ 、最小値は台湾産の緑茶で $0.011 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ であった。ダージリン産の茶葉では最小値で $0.11 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ と他の国と比べて比較的高濃度のニコチンが検出され、残留基準値の10倍を超えるものであった。他にも、アッサム、中国、インドネシア産からも残留基準値を上回るニコチンが検出された。一方、日本の茶製品のニコチン含量は $0.013 \sim 0.040 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ で、平均値を算出すると $0.019 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ であり、残留基準値を超えるものの、アッサム産やダージリン産、中国産の茶葉と比べると比較的低かった。以上のことから、チャに含まれるニコチン含量は、産地や茶品種により異なると同時に、紅茶で高い傾向が確認された。

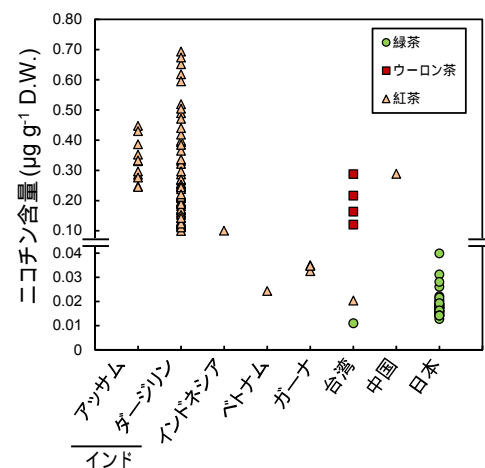


図2 世界各地から収集した荒茶のニコチン含量

#### (3) 茶の加工過程による茶葉中でのニコチン含量の変化

「やぶきた、べにふうき」とともに生葉、製造途中の茶葉から残留基準値以上のニコチンが検出された(図3)。生葉と各製造工程の

ニコチン含量は、煎茶における蒸熱や釜炒り茶や烏龍茶における殺青といった加熱処理を行っても  $0.02 \mu\text{g g}^{-1}$  DW 前後であり、有意差は見られなかった。また、その後の乾燥過程である揉捻などの操作後も変動しなかった。紅茶特有の製造工程である発酵に関しても、生葉と比較したところ両品種で有意差は確認できなかった。以上より、茶葉中でニコチンは酵素反応の影響または気化がほとんどなく安定して存在し、製造過程による影響はほぼないことが示唆された。

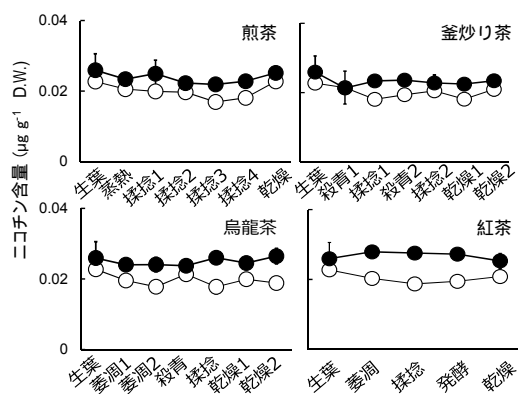


図3 各種茶の製造工程がニコチン含量に及ぼす影響

#### (4) 水耕チャ樹およびチャ培養細胞におけるニコチン含量の差異

すべての部位からニコチンが検出された。特に、白色根および褐色根で高く、圃場で栽培された茶樹と同様の傾向を示した。このことから、ニコチンの茶樹全体における分布には部位特異性があることが示唆された(図4)。

培養細胞からも、残留基準値以上のニコチンが検出された。細胞の継代はクリンベンチ内で行っており、収穫から抽出まで常時手袋を着用していたため、外部からのニコチン汚染の可能性はほとんどないと考えられる。このことから、検出されたニコチンは、チャ懸濁培養細胞自身が生合成したものである可能性が高いことが示唆された。

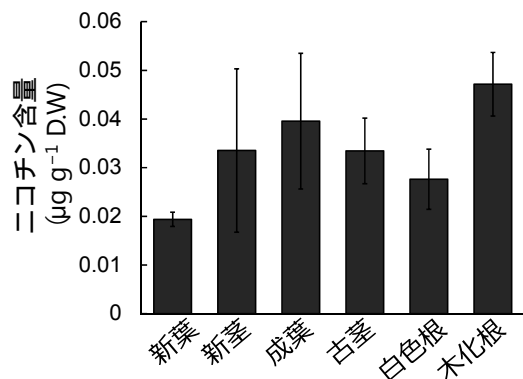


図4 チャ「やぶきた」におけるニコチン含量。

#### (5) ニコチン生合成経路探索のための遺伝子組換え体作出法の確立

宿主ゲノム中への挿入が可能なアグロバ

クテリウム法、特に毛状根形成アグロの形成能ついて、それぞれチャにおける形質転換のための条件検討を行った。その結果、さまざまな毛状根形成がみられたため、チャに親和性のあるアグロを検討する必要がある。また、茶抽出物を添加した LB 培地ではアグロバクテリウムの生育が抑制傾向であることが示唆された。一方、モデル植物のタバコを用いたパーティクルガン処理の培養方法をチャの不定胚に適用すると、高頻度の移植そのものが不定胚を枯死に至らせることが明らかとなった。また、抗生物質添加液体培地では、固形培地よりも3週間早く不定胚が枯死することが分かった。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計13件)

山下寛人, 栗田郁也, 田中靖乃, 武田和哉, 堀江紳弘, 北条寛, 南條文雄, 森田明雄, 一家崇志, チャにおけるニコチン生合成のジャスモン酸誘導性の発現解析, 2017年3月2日, 平成28年度中部土壤肥料研究会, ウィンクあいち(愛知県, 名古屋市)

Hiroto Yamashita, Ikuya Kurita, Yasuno Tanaka, Akio Morita, Takashi Ikka, Jasmonate induction of nicotine biosynthesis in cultured tea cells (*Camellia sinensis* L.), International Symposium on Functional Plant Biology, Jan. 23, 2017, Assam University, Silchar, India

Hiroto Yamashita, Ikuya Kurita, Yasuno Tanaka, Takashi Ikka, Akio Morita, Isolation and characterization of genes involved in nicotine biosynthesis in tea plants (*Camellia sinensis* L.), International Symposium on Plant Biotechnology for Crop Improvement, Jan. 20-21, 2017, Indian Institute of Technology Guwahati, India

山木海人, 折原玲美, 古川一実, チャ形質転換のための4種の毛状根形成アグロバクテリウムの評価, 2016年11月19日, 第24回日本育種学会中部地区談話会, 農研機構 野菜花き研究部門(三重県, 津市)

山下寛人, 栗田郁也, 一家崇志, 谷口郁也, 荻野暁子, 武田和哉, 堀江紳弘, 北条寛, 南條文雄, 森田明雄, 各種茶サンプルにおけるニコチンの実態調査, 2016年10月27日, 第32回茶学術研究会講演会・第13回日本カテキン学会年次学術大会合同大会, グランシップ静岡(静岡県, 静岡市)

山下寛人, 栗田郁也, 一家崇志, 谷口郁也, 荻野暁子, 武田和哉, 堀江紳弘, 北条寛, 南條文雄, 森田明雄, QuEChERS法およびLC-MS/MSを用いた茶に含まれるニコチン分析法の確立, 2016年10月26日, 平成28年度日本茶業学会, グランシップ静岡(静岡県, 静岡市)

山下寛人, 栗田郁也, 一家崇志, 荻野暁子, 古川一実, 森田明雄, チャコアコレクションにおけるニコチン含量の系統間差異, 2016年9月24日, 日本育種学会第130回講演会, 鳥取大学(鳥取県, 鳥取市)

山下寛人, 栗田郁也, 一家崇志, 荻野暁子, 古川一実, 森田明雄, チャ (*Camellia sinensis*) のニコチン生合成はジャスモン酸応答を示すか, 2016年9月20-22日, 2016年度日本土壌肥料学会, 佐賀大学(佐賀県, 佐賀市)

古川一実, 加藤美知代, 青島洋一, 中村順行, チャ(茶樹: *Camellia sinensis*) の培養・形質転換技術の歩み, 2016年9月1日, 第34回日本植物細胞分子生物学会, 信州大学(長野県, 上田市)

Hiroto Yamashita, Ikuya Kurita, Takashi Ikka, Akiko Ogino, Kazumi Furukawa, Akio Morita, Nicotine Biosynthesis in Tea (*Camellia sinensis* L.) is Response to Jasmonate?, Aug. 29-31, 2016, The 5th UGSAS-GU Roundtable & Symposium, Gifu University, Gifu, Gifu, Japan

古川一実, 小泉舞衣, 堀内郁美, 大嶋雅夫, 田部井豊, 一家崇志, 森田明雄, チャ(茶樹 *Camellia sinensis*) の形質転換のための培養プロセス, 2016年3月22日, 日本育種学会第129回講演会, 横浜市立大学(神奈川県, 横浜市)

栗田郁也, 一家崇志, 谷口郁也, 荻野暁子, 根角厚司, 森田明雄, チャに含まれるニコチン定量法の確立とその成分特性の解析, 2015年9月9-11日, 2015年度日本土壌肥料学会, 京都大学(京都府, 京都市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森田 明雄 (MORITA, Akio)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号: 20324337

### (2)研究分担者

一家 崇志 (IKKA, Takashi)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号: 90580647

谷口 郁也 (TANIGUCHI, Fumiya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員

研究者番号: 20370570

荻野 暁子 (OGINO, Akiko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員

研究者番号: 70370567

古川 一実 (FURUKAWA, Kazumi)

沼津工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号: 90353151