

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350101

研究課題名(和文)ハーブ・香辛料処理による食品中有害アミンの増加抑制についての研究

研究課題名(英文) Inhibition of histamine accumulation in foods by herb extracts treatment

研究代表者

新田 陽子 (Nitta, Yoko)

岡山県立大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：70403318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：メドウスイートと呼ばれるハーブの熱水抽出液に含まれるTellimagrandin II、Rugosin A、Rugosin Dを、ヒスタミン産生菌の代表的な菌であるモルガン菌が有するヒスタミン合成酵素(HDC)に作用させたところ、強い阻害を示した。ハーブティーとして飲用される濃度の熱水抽出液によってもHDC活性が十分に阻害された。そこで、この抽出液に浸漬させたサバの切り身のヒスタミン蓄積を調べたところ、コントロールに比べてヒスタミン量が大幅に減少した。メドウスイート熱水抽出液は赤身魚でのヒスタミン蓄積を抑制し、食中毒予防に有効である可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Flipendula ulmaria, also known as meadowsweet, is an herb; its extract was examined for the prevention of histamine production, primarily that caused by contaminated fish. The efficacy of meadowsweet was assessed using two parameters: inhibition of *Morganella morganii* histidine decarboxylase (HDC) and inhibition of histamine accumulation in mackerel. Ellagitannins from *F. ulmaria* (rugosin D, rugosin A methyl ester, tellimagrandin II, and rugosin A) were previously shown to be potent inhibitors of human HDC, and in the present work, these compounds inhibited *M. morganii* HDC with IC50 values of 1.5, 4.4, 6.1, and 6.8 micro mol/L, respectively. Application of the extracts (at 2 wt%) to mackerel meat yielded significantly decreased histamine accumulation compared to treatment with PBS buffer as a control. Hence, *F. ulmaria* exhibits inhibitory activity against bacterial HDC and thus might be effective for preventing food poisoning caused by histamine.

研究分野：調理科学

キーワード：ヒスタミン ハーブ 赤身魚 ヒスチジンデカルボキシラーゼ

1. 研究開始当初の背景

ヒスタミンは、アミノ酸であるヒスチジンの脱炭酸によって生成される生理活性アミンである。ヒトの生体内で生成されており、アレルギー反応の介在物質としての役割や炎症時の発痛、かゆみを引き起こす物質としての役割など、さまざまな作用を有している。食品中で生成される場合があり、ヒスタミンを食品から摂取すると、顔面紅潮などのアレルギー症状が現れることがあるため、アレルギー様食中毒の原因物質とされている。アレルギー様食中毒は、食品衛生上重大な問題とされており、厚生労働省の食中毒統計資料でアレルギー様食中毒の事例が毎年報告されている。ヒスチジン含量が多い赤身魚内で、微生物による脱炭酸反応でヒスタミンが生成し、蓄積することが多い。海外では、チーズや赤ワインでのヒスタミン蓄積が問題視されているが、日本では赤身魚によるアレルギー様食中毒事例が大半を占めており、赤身魚からのヒスタミン摂取を防ぐことが重要であると考えられる。ヒスタミンは無味、無臭の化学物質であり、通常の加熱では分解されないため、ヒスタミンが一旦蓄積すると加熱による無毒化はできない。鮮度が不明であったり、流通経路の管理が不十分な赤身魚について、加熱することで食中毒予防ができたとして食卓に供してしまうと、多量のヒスタミンを気づかずに摂取してしまう可能性がある。一旦できてしまうと加熱無毒化できないことが、ヒスタミンによる食中毒がなくならず、毎年発生する理由として考えられる。ヒスタミン摂取を防ぐ具体的方法として、鮮度が不明な赤身魚は食べない、ということが第一に考えられるが、廃棄を増やすことは望ましいことではない。他の方法として、赤身魚中のヒスタミン産生菌の働きを抑えることが考えられる。これは、菌の増殖を抑えることで達成できるように考えられるが、菌が死滅しても酵素が機能する可能性があることから、ヒスタミン産生菌が有するヒスタミン生成酵素の働きを抑えることが重要になる。赤身魚中の主要なヒスタミン産生菌としてモルガン菌が知られており、モルガン菌由来のヒスタミン生成酵素の活性を抑制することが方法として考えられる。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、ヒト由来のヒスタミン合成酵素(ヒスチジンデカルボキシラーゼ(HDC))について、その活性阻害物質を天然物より探索してきた。100種類以上のサンプルをスクリーニングした結果、HDC活性を強く阻害する成分を含むハーブ・香辛料を見出してきた。ヒト由来のHDCと、モルガン菌由来のHDCともにビタミンB6を補酵素とする。このため、モルガン菌由来のHDCは、ヒト由来のHDCと少なくとも活性中心部位は類似していることが強く示唆される。このことから、ヒト由来HDC活性を阻害した成分は、モル

ガン菌由来のHDC活性を阻害する可能性が高いと考えた。そこで、本研究では、ハーブ・香辛料由来成分を用いて赤身魚中でのHDC活性を阻害することで、ヒスタミン生成を抑制し、食品からのヒスタミン摂取を減らす方法を検討することを目的とした。

また、セロトニンは生理活性アミンであり、ヒスタミンと同様に炎症時の発痛物質として知られている。また食品からの過剰摂取が頭痛を引き起こすとされている。AroDCは芳香族アミノ酸を基質とする酵素であり、微生物はAroDCを活用している可能性が高く、AroDCによりセロトニンが生成していることも考えられる。スペインのマグロについてヒスタミンよりも高いセロトニン含量が報告されているが、ヒスタミンと比べて、赤身魚におけるセロトニン含量はあまり調べられていない。そこで、本研究では赤身魚中のセロトニン含量についても調べることも目的とした。

3. 研究の方法

モルガン菌の培養法を確立し、モルガン菌由来のHDC活性を測定し、その活性を阻害するハーブ・香辛料成分を同定する。すでに候補となる試料は確保しているため、それらを使用する。阻害するハーブ・香辛料を決定できれば、赤身魚に適用し、そのハーブ・香辛料由来の抽出液に浸漬または乾燥粉末をふりかけた赤身魚中のヒスタミン含量を調べ、増加が抑制されるかどうかを調べる。また、赤身魚中のセロトニンを定量し、赤身魚中のヒスタミン含量との比較、保存時間による含量の変化、保存温度による含量の変化を調べる。

4. 研究成果

モルガン菌由来HDCを精製するために、ヒト由来HDCの精製法に基づいてプロトコルを作成した。精製を容易にするために、大腸菌での組換え体タンパク質としてモルガン菌由来HDCを発現させた。モルガン菌JCM1672は理研バイオリソースセンターより提供を受けた。PrimeSTAR® Max DNA polymerase(タカラバイオ社)を用いてHDCのcDNAをコードする配列を増幅した。5'側のプライマーは以下の通りである: 5' - ACG CGG ATC CAT GAC TCT GTC TAT CAA TG -3' ここでBamHI制限酵素認識部位を太字で示した。3'側のプライマーは以下の通りである: 5' - ACG CGA ATT CTT ATG CCG CGT GTA AG -3' ここでEcoRI制限酵素認識部位を太字で示した。増幅したPCR産物は、BamHI-EcoRIサイトでpGEX-6p-1プラスミドに組み込んだ。核酸配列はシーケンス解析により確認した。作成したプラスミドを含む大腸菌をLB培地で培養し、対数増殖期にIPTGを0.1mMになるように添加し、その後集菌した。菌体破碎、遠心分離後の上清をGSTタグ用のアフィニティー精製を行い、プロテアーゼでGSTを切断後、

イオン交換精製を行った。イオン交換精製後のタンパク質は、SDSPAGEにて単一バンドとなるレベルまで精製が行えた。その酵素の活性を調べたところ、表1のようになり、報告されているモルガン菌から精製されたHDCの活性とほぼ一致した。このことより、組換え体タンパク質のHDCはモルガン菌HDCの特性を有することが示唆され、このタンパク質を用いて実験を行った。

表1 作成した酵素の K_m と V_{max} 値

pH	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$)	V_{max}/K_m ($\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{mM}$)
6.0	2.6	73	28
6.5	1.4	43	31

先行研究のヒトHDCを用いた薬用植物からの阻害物質の探索において、メドウスイートと呼ばれるハーブ熱水抽出液に強い阻害が見られ、阻害物質として Tellimagrandin II、Rugosin A、Rugosin D が単離された (Nitta et al., 2013)。そこで、これらの物質をモルガン菌由来HDCに作用させたところ、強い阻害を示した (表2)。ハーブティーとして飲用される濃度の2 wt% 熱水抽出液中の Tellimagrandin II、Rugosin A、Rugosin D の量は 200~400 μM であり、この抽出液によってHDC活性が十分に阻害された (図1)。そこで、この抽出液に浸漬させたサバの切り身と、コントロールとしてPBSに浸漬させた切り身とで、ヒスタミン蓄積を比較した。PBSでは25で保存1日後に11検体中7検体のヒスタミン量が100ppmを超えたのに対し、メドウスイートでは11検体中0検体であった (表3と4)。このことより、メドウスイート熱水抽出液はヒスタミンによる赤身魚での食中毒予防に有効である可能性が高いと考えられた。

セロトニンについてサバ切り身中の量をELISAで定量したところ、7ppm程度で、253日保存によってその量の変化は見られなかった。これは、微生物によってセロトニン生成はなされていないか、もしくは生成されてもただちに分解されていることが示唆された。セロトニンについてはヒスタミンのように明らかな蓄積を確認できなかったため、食中毒になる可能性は低いと考えられた。

表2 Tellimagrandin II、Rugosin A、Rugosin D のモルガン菌HDCに対する IC_{50} と、2 wt% メドウスイート熱水抽出液中の濃度

成分	IC_{50} (μM)	濃度 (μM)
Tellimagrandin II	6.1	344
Rugosin A	6.8	421
Rugosin D	1.5	207

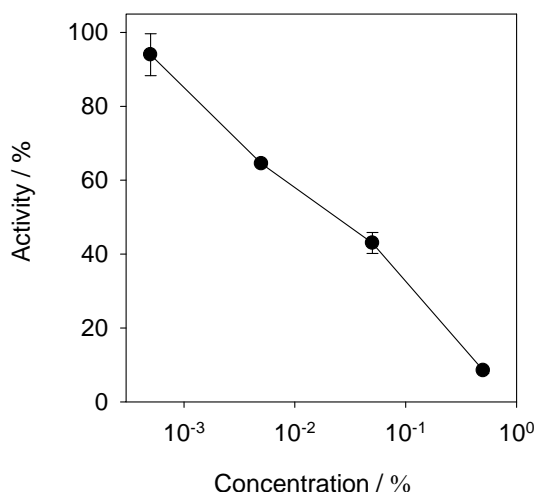


図1 様々な濃度のメドウスイート熱水抽出液のモルガン菌HDCに対する阻害

表3 PBSに浸漬させたサバ切り身の250時間、24時間、48時間保存した時のヒスタミン量 (-:100ppm以下、+:100ppm以上)

	PBS		
	Histamine content		
	0h	24h	48h
No.1	-	+	+
No.2	-	-	-
No.3	-	-	+
No.4	-	-	+
No.5	-	-	+
No.6	-	+	+
No.7	-	+	+
No.8	-	+	+
No.9	-	+	+
No.10	-	+	+
No.11	-	+	+

表4 メドウスイート熱水抽出液に浸漬させたサバ切り身の250時間、24時間、48時間保存した時のヒスタミン量 (-:100ppm以下、+:100ppm以上)

	Meadowsweet extract		
	Histamine content		
	0h	24h	48h
No.1	-	-	-
No.2	-	-	-
No.3	-	-	-
No.4	-	-	-
No.5	-	-	-
No.6	-	-	-
No.7	-	-	+
No.8	-	-	+
No.9	-	-	+
No.10	-	-	+
No.11	-	-	+

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2件)

Y. Nitta, F. Yasukata, N. Kitamoto, M. Ito, M. Sakaue, H. Kikuzaki, H. Ueno
Inhibition of *Morganella morganii* histidine decarboxylase activity and histamine accumulation in mackerel muscle derived from *Filipendula ulumaria* extracts. *J. Food Prot.* 79, 463-467 (2016) 査読有
doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-313

新田陽子、小森博文、植野洋志 ヒスタミンとドーパミン生成酵素の変遷、生化学 vol.87, 321-325 (2015) 査読無
doi:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870321

[学会発表](計10件)

山下慶子、新田陽子、菊崎泰枝 ローズレッドペタルに含まれるフラボノイド配糖体のヒスチジン脱炭酸酵素阻害活性
日本フードファクター学会 2016年11月19-20日 富山県立大学(富山)

森美幸、菊崎泰枝、宇野雄一、野口裕司、小森博文、植野洋志、新田陽子 イチゴ品種‘桃薫’のヒスチジン脱炭酸酵素の活性阻害
日本生物高分子学会 2016年9月9-10日 東邦大学(千葉)

森美幸、菊崎泰枝、植野洋志、小森博文、新田陽子 ガロタンニン、エラジタンニンによるヒスチジン脱炭酸酵素の活性阻害の解析
日本ビタミン学会第68回大会 2016年6月17-18日 富山国際会議場(富山)

新田陽子 ヒスチジンデカルボキシラーゼ活性を阻害する食品成分 支部創立15周年記念 日本農芸化学会中四国支部第45回講演会(例会) 2016年6月11日 香川大学(香川)

宇野雄一、新田陽子、石橋美咲、野口裕司、菊崎泰枝 イチゴ品種におけるヒスチジンデカルボキシラーゼの活性阻害率の評価
園芸学会春季大会 2016年3月26-27日 東京農業大学(東京)

新田陽子、江戸良也子、安方芙実子、北元憲利、菊崎泰枝 アレルギー様食中毒予防に有効なハーブ・香辛料抽出液の探索
農芸化学会中四国支部例会 2016年1月23日 岡山県立大学(岡山)

Fumiko Yasukata, Noritoshi Kitamoto, Yoji Kato, Akira Murakami, Akari Ishisaka, Hiroe Kikuzaki, Yoko Nitta
Preventive effects of herbs on allergy-like food poisoning The 6th International Conference on Food Factors-ICoFF 2015, Seoul, November 22-25, 2015

安方芙実子、北元憲利、加藤陽二、新田陽子 ハーブを用いたアレルギー様食中毒発生予防法の検討
日本栄養改善学会 2015年9月25-26日 福岡国際会議場・福岡サンパレスホテル(福岡)

安方芙実子、北元憲利、新田陽子、江戸良也子、植野洋志、菊崎泰枝 メドウスイート抽出液によるサバのヒスタミン汚染抑制
生物高分子学会 2015年9月19-20日 香川大学(香川)

安方芙実子、北元憲利、加藤陽二、石坂朱里、新田陽子 ハーブを用いたアレルギー様食中毒発生予防法の検討
農芸化学会 2015年3月26-29日 岡山大学(岡山)

[図書](計2件)

新田陽子 他 食品学総論 講談社 110-116 2016年

新田陽子 他 食品学Ⅰ 羊土社 163-175 2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新田陽子 (NITTA, Yoko)
岡山県立大学・保健福祉学部・准教授
研究者番号: 70403318

(4) 研究協力者

菊崎泰枝 (KIKUZAKI, Hiroe)
奈良女子大学・生活環境学部・教授

北元憲利 (KITAMOTO, Noritoshi)
元兵庫県立大学・環境人間学・教授