

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：33904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560069

研究課題名(和文) 食の安全確認を支援するShort-strip濾紙電気泳動装置の開発

研究課題名(英文) Development of a simple device named "short-strip cellulose paper electrophoresis" for food safety

研究代表者

小栗 重行(Oguri, Shigeyuki)

愛知学泉大学・家政学部・教授

研究者番号：20247597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒスタミン(HA)中毒予防は、食材中に含まれるHA量の測定が最も有効的である。しかし、同中毒の発症量は個人差がある。これは、体内に存在するHA分解酵素(DAO)活性が食材中の特定物質による阻害が一因している。一方、既存の測定法でこれらを簡便に分析することは容易でない。今回、古典的なる紙電気泳動法にマルチタスク機能を付加させた「Short-stripろ紙電気泳動法」と命名した装置を開発した。その結果、食品中のHA測定とEthanolによるDAO阻害が確認できた。加えて、short-strip 呈色部からHA量を数値化するアプリ(Android 4.3)を開発、スマートフォンで実証試験も行った。

研究成果の概要(英文)：A method named short-strip cellulose paper electrophoresis was developed for the determination of histamine (HA), and for the screening of histaminases or diamine oxidase (DAO) inhibitor in food in order to prevent HA food poisoning. Using this method after optimizing it, we were able to analyze HA in food samples like 5 brands of soy sauce, 3 brands of first-fish and 5 kinds of raw-fish. We demonstrated the inhibition of DAO with ethanol. In addition, we also developed application software running on a smart-phone (Android 4.3) to read out the amount of HA in digital format.

研究分野：食品衛生学

キーワード：ヒスタミン ヒスタミン食中毒 ろ紙電気泳動 ペーパー分析デバイス スマートフォン

## 1. 研究開始当初の背景

毎年、春の季節を迎えると天気予報などで花粉飛散量が報告され、花粉症に悩む人達には話題で事欠かない時期となる。この花粉症は、花粉がアレルギー刺激となり体内でヒスタミン(HA)を含む各種生理活性物質が遊離し、くしゃみ等のアレルギー症状を発する。一方、魚などの生食材に微生物が付着すると、食材中のアミノ酸(ヒスチジン)からHAが合成される。HAが蓄積した食材を摂取すると、アレルギー様食中毒(HA中毒)が同様に発症する。HA中毒は、毎年10件前後、発症患者は数百人と、後を絶たない。その要因として、HAは無臭で熱に安定、水に溶解しやすい特徴から調理での解毒が容易でない。加えて、食材中のHA測定の法制化が欧米諸国と比較して遅れている点などが挙げられる。また、HA中毒はHA摂取量が同じでも発症しない人など、個人差が大きいことも知られている。これは、免疫反応で発生した内因性HAや食材から摂取した外因性HAは体内に存在するHA分解酵素(DAO: Diamine Oxidase、E.C. No. 1.4.3.6)により速やかに分解排泄される。しかし、本酵素活性が低下するとHA中毒が発生しやすくなることが予想できる。DAO活性低下は遺伝的要因と、食事で摂取する特定成分によるDAO阻害が一因していると考えられる。以上の背景から、HA中毒を未然に防止するには、食材中のHA量測定と同時に、DAO活性を阻害する成分特定が求められる。

## 2. 研究の目的

既存法で簡便にHA量やDAO活性阻害物質をスクリーニングすることは容易でない。本研究課題では、古典的な「ろ紙電気泳動法」に新たな機能を付加させることで、HA分析の飛躍的改善を目指し、「Short-stripろ紙電気泳動法」と命名した新分析手法の開発を行う。従来のろ紙電気泳動は、支持体である「ろ紙」を分離の「場」としてのみ利用しているのに対し、本法は試料中の夾雑物質の中からHAを

電気泳動で支持体上に導き(抽出)同時に支持体上に固定化した呈色試薬でHAの捕捉と濃縮、呈色反応(検出)を行う「場」とすることで、HAが目視でも高感度検出を可能とする「マルチタスク」機能を有する点で大きく異なる。また、どこでも、いつでも、誰でも使えるユビキタス・デバイスの開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 3-1. Short-stripろ紙電気泳動法の原理

#### NDA塗布型 Short-strip法

HAと特異的な呈色反応(pH 4-6)を示す2,3-naphthalenedicarbaldehyde (NDA)と古典的なろ紙電気泳動法を組み合わせることで、試料からのHA抽出、分離、補足、検出の各工程がろ紙片上で自動的に展開される。その結果、従来と比べHAが簡便に検出可能となる。動作原理を図-1に示す。

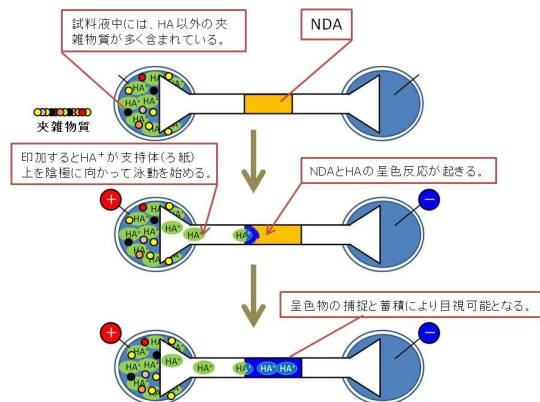


図-1 NDA塗布型 Short-stripろ紙電気泳動法の原理

#### ケイ酸ゲル塗布型 Short-strip法

NDAは化学構造類似体のヒスチジン(His)などのアミノ酸と交叉反応を示すことが判明している。上記法では、pH 4で泳動を行うとHisがHAと同時に検出されてしまう。対策として、Hisの等電点(PI=7.6)以上のpHで泳動することでHisの泳動を押さえる。しかし、NDAはpH 7以上では呈色反応を示さない。そこで、泳動中での呈色反応を諦め、ケイ酸ゲルを固定したろ紙片を用いてHAの捕捉のみを行うこととした。HAとNDAの呈色反応は

オフ・ラインで行う。原理を図-2 に示す。

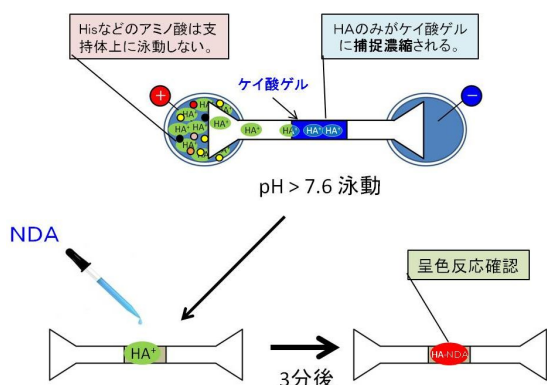


図-2 ケイ酸ゲル塗布型 Short-strip ろ紙電気泳動法の原理

### 3-2. 食品中HAの測定方法

分析法の操作手順の概要を図-3 に示す。

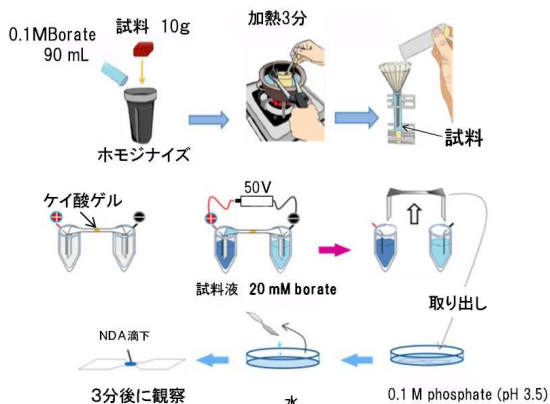


図-3 食品中HAの測定操作法

試料には市販食材として、発酵食品の醤油（4社5品目）ファストフィッシュ（銀鮭塩麹漬、粕本漬赤魚、西京漬さば）、生魚（サーモン、イワシ、サバ、サンマ、ブリ）を用いる。各試料 10 g を 20 mM ホウ酸 Na 溶液（約 pH 9.5）90 mL で 3 分間ホモジナイズし均一化、引き続き沸騰水浴中で 3 分間加熱し除タンパクと揮発性アミン類を除去する。最後に試料を冷し、遠心分離（10,000 r.p.m、10 min、4℃）にて不溶物を除去。また必要に応じて濾過し、HA 抽出試料液とする。Short-strip ろ紙電気泳動には、ケイ酸ゲル塗布型 Short-strip（有効長 10 mm × 幅 2 mm のろ紙中央部に 0.5g ケイ酸 Na/mL 溶液 0.3 μL を塗布後 5 M HCl 溶液

2 μL を滴下しゲルを形成。その後、strip を水で数回洗浄後、乾燥する)を使用する。試料液の一部 (4.2 mL) を陽極電解槽に入れ、陰極槽には 20 mM 四ホウ酸ナトリウム溶液を入れ 50V、60 ~ 120 分間泳動する。その後、支持体を装置から取り外し 0.1 M リン酸 Na (約 pH 4.7) で 3 分間、蒸留水で 1 分間洗浄。最後に、洗浄した支持体に 20 mM NDA-acetonitrile 溶液 2 μL を滴下し、3 分後に HA に伴う呈色部分を撮影。撮影には、スマートフォン (AQUOS PHONE SERIE mini SHL 24) を用いる。得られたデータは Photoshop (Ver. 8.0.1) で RGB 平均値を読み取る。または、呈色部の平均 RGB 値を半自動で読み取る専用アプリ (Android™ 4.3) を開発し、インストールしたタブレット端末 (Google Nexus 7) でも検証する。得られた呈色部分の平均 RGB 値 (Y) と HA 濃度 (X ppm) それぞれの対数値から相関式 ( $\text{Log } Y = a \cdot \text{log}(X) + b$ ) を求め、未知試料中の HA 含量を算出する。

### 3-3. DAO 阻害物質の測定方法

操作手順の概要を図-4 に示す。陽極用電気泳動槽を兼ねた 6-mL のチューブ内に基質 DAO (10 unit) を含む 10 μM HA-20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 5 mL に阻害物質を加え、38℃ で 120 分加熱。その後、酵素溶液に 0.1 M HCl (600 μL) を加え pH 4 に下げる。

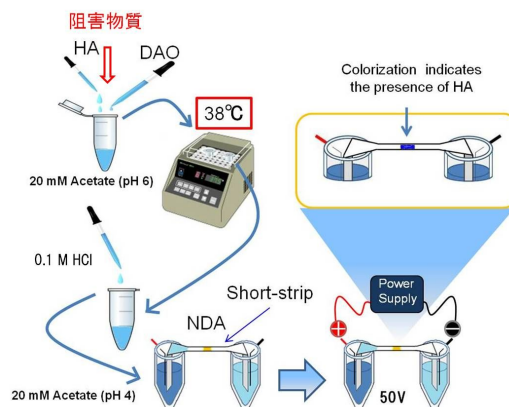


図-4 DAO 活性阻害物質測定法

その後、溶液内に残存する HA を 2,3-

naphthalenedicarboxaldehyde (NDA) を塗布した支持体（形状はケイ酸ゲル塗布型と同じ）を用い 50 V で 60 ~ 120 分間泳動する。支持体である Short-strip 上の呈色部分を目視で観察し、HA の消失有無の確認を行う。なお、用いた標準 DAO 酵素は SIGMA (from porcine kidney) を用いた。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. HA 定量（検出）限界

ケイ酸ゲル塗布型 Short-strip ろ紙電気泳動法：市販の新鮮マグロに既定量の HA を添加した試料を用いた (0-100 ppm)。操作法は 3-2. に準じた。結果を図-5、呈色部の平均 RGB 値との相関性を図-6 にそれぞれ示した。

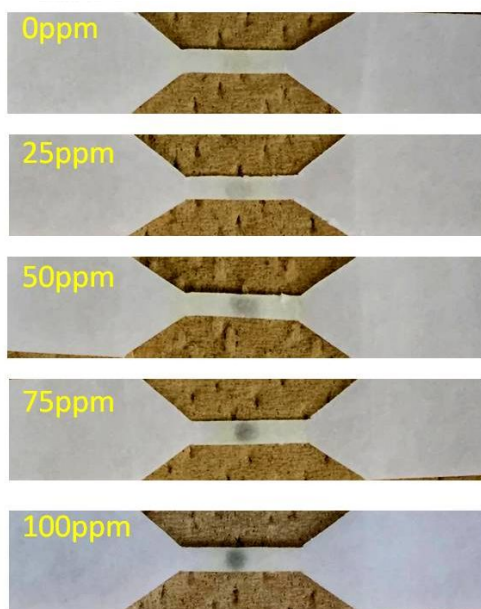


図-5 添加試料中の HA 検出

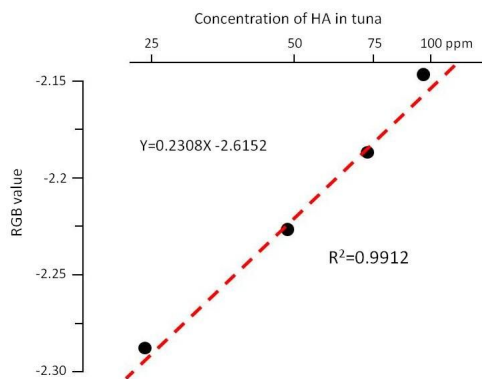


図-6 添加試料中の HA と平均 RGB 値

その結果、検出限界（定量限界）は 10 ppm 程度、呈色部の平均 RGB 値の対数値と HA 濃度の対数値に良い相関性 ( $r^2=0.99$ ) が得られた。

NDA 塗布型 Short-strip ろ紙電気泳動法：HA 標準液 (1、5、10  $\mu\text{M}$ ) を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4) で 50 V、1~2 時間印加した。得られた結果を表-1 に示した。その結果、本法での目視 HA 検出限界は 1  $\mu\text{M}$  (0.1 ppm 相当) に達した。

表-1 Short-stripろ紙電気泳動法によるHA検出

HA Conc.	Migration time (50 V)	
	60 min	120 min
1 $\mu\text{M}$		
5 $\mu\text{M}$		
10 $\mu\text{M}$		

##### 4-2. ケイ酸ゲル塗布型 short-strip ろ紙電気泳動法による食材中の HA 分析

表-2 に示す食材中 HA 含量の測定を試みた。なお、得られた結果は、高速液体クロマトグラフィーで得られて結果とほぼ同じ値をしめし、方法の妥当性が示唆された。

表-2 ケイ酸ゲル塗布型 Short-stripろ紙電気泳動法による食品中の HA 測定

試料	測定回			(ppm) 平均±偏差
	1	2	3	
醤油A	15	14	29	19±6.8
醤油B	31	32	31	0±0.8
醤油C	29	31	26	29±2.1
醤油D	75	63	65	68±5.2
醤油E	30	27	24	27±2.4
銀鮭塩麹漬	20	36	28	28±6.5
粕本漬赤魚	18	19	21	19±1.2
京西漬さば	25	28	17	23±14.6
サーモン	28	27	25	27±1.2
イワシ	29	51	25	35±11.4
サバ	22	24	24	23±0.9
サンマ	23	27	36	29±5.4
ブリ	24	18	27	23±3.7

##### 4-3. NDA 塗布型 short-strip ろ紙電気泳動法によるエタノールによる DAO 阻害の確認

アルコールを摂取すると鼻炎などのアレルギー類似症状を発症する健常者が見られる。これは、エタノールによる体内 DAO 阻害に起因すると言われている。そこで、NDA 塗布型 short-strip ろ紙電気泳動装置を使って確認

できるか試した。得られた結果を表-3 に示した。酵素反応液にエタノール 6  $\mu\text{L}$  添加(ヒトの酪酐状態)すると、反応溶液中に HA が残存することが確認できた。この結果より、エタノールによる DAO 阻害が示唆された。(表-3 の印参照)

表-3 NDA塗布型Short-stripろ紙延期泳動によるエタノールのDAO阻害試験

Conditions	Time (50 V)	
	60 min	120 min
HA (10 $\mu\text{M}$ )		
DAO + HA		
DAO + HA + EtOH (5 $\mu\text{L}$ )		
DAO + HA + EtOH (6 $\mu\text{L}$ )		

After digestion of HA with NDA (20 unit/tube) in the pH 6 of 20 mM acetate buffer (5 mL), the pH of the solution was changed at pH 4 by adding 0.1M HCl (600  $\mu\text{L}$ ).

#### 4-4. 今後の課題

今回、Short-strip ろ紙電気泳動の試験を繰り返す中、NDA が高濃度ポリアミン (500-1000 ppm プトレシン、カダベリン) とともに交叉反応することが判明し、選択性に関する課題が未解決となった。また、2 種類のストリプいずれでも、分析時間に最低 1 時間以上掛かり、敏速分析の達成にも更なる改善が求められる。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 8 件)

小栗重行、加藤希美、杉山悠子

「Short-strip ろ紙電気泳動法によるヒスタミン高感度検出の検討」日本分析化学会第 63 年会 (2014 年 9 月、広島大学)

小栗重行、杉山裕子、中貴俊、宮崎慎也

「Short-strip ろ紙電気泳動法による食品中ヒスタミンの選択的検出および定量」第 75 回分析化討論会 (2015 年 5 月、山梨大学)

小栗重行、下澤莉奈、白畑萌奈、南静渚

「Short-strip ろ紙電気泳動法による食品から生体試料分析への応用」第 28 回バイオメディカル分析化学シンポジウム(2015 年 8 月、長崎大学)

小栗重行、下澤莉奈、白畑萌奈、南静渚

「Short-strip ろ紙電気泳動法によるヒスタミン分析の最適化と選択性の検証」日本分析化学会第 64 年会 (2015 年 9 月、九州大学)

小栗重行、片岡史歩、三宅麻井

「Short-strip ろ紙電気泳動法による食品から生体試料分析への応用」第 29 回バイオメディカル分析化学シンポジウム(2016 年 9 月、京都大学)

小栗重行、片岡史歩、三宅麻井

「ヒスタミン分解酵素阻害物質スクリーニング法に Short-strip ろ紙電気泳動法の応用と展開」日本分析化学会第 65 年会 (2016 年 9 月、北海道大学)

小栗重行、片岡史歩、三宅麻井

「Short-strip ろ紙電気泳動法による食品中ヒスタミン分析の試み」第 112 回日本食品衛生学会学術講演会 (2016 年 10 月、函館国際ホテル)

小栗重行、片岡史歩

「マルチタスク機能を付加した Short-strip ろ紙電気泳動による食品中ヒスタミン分解酵素(DAO)阻害物質検出の試み」日本薬学会第 137 年会(2017 年 3 月、仙台国際センター) [その他](1 件)

小栗重行

「魚を食べたら蕁麻疹、食物アレルギーと思う前に！」生活と文化講座 (2016 年 3 月、愛知県 岡崎商工会議所)

<http://www.okazakicci.or.jp/konwakai/kouza/28life.pdf#search=%27E5%B0%8F%E6%A0%97%E9%87%8D%E8%A1%8C++%E9%AD%9A%E3%82%92%E9%A3%9F%E3%81%B9%E3%81%9F%E3%82%89%27>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小栗重行 (OGURI SHIGEYUKI)

愛知学泉大学家政学部家政学科・教授

研究者番号：20247597