

# ドングリ中毒の診断のためのドングリ中総ポリフェノールの簡易抽出法

寺本直輝<sup>1)</sup> 島田圭悟<sup>2)</sup> 杉田由佳<sup>3)</sup> グルゲ・キールティ・シリ<sup>4)</sup>  
吉岡 都<sup>4)</sup> 山中典子<sup>4)†</sup>

- 1) 福島県中央家畜保健衛生所 (〒963-6311 石川郡玉川村大字岩法寺字新屋敷 114-12)
- 2) 千葉県東総食肉衛生検査所 (〒289-2504 旭市二の 5908-3)
- 3) 宮崎県宮崎家畜保健衛生所 (〒880-0212 宮崎市佐土原町下那珂 3151-1)
- 4) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2021年2月24日受付・2021年10月21日受理)

## 要 約

ドングリによる中毒の診断に資するために、ドングリに含まれる総ポリフェノール (TPPs) の簡便、迅速な抽出手法を開発した。含水アセトンで振盪する本手法は高速溶媒抽出法 (ASE) に匹敵する回収率であった上、再現性が高く、簡易であり、十分診断に応用できるものと考えられた。また、この手法でマテバシイのドングリの TPPs 濃度を定量したところ、未熟果は熟果よりも有意に濃度が高かった。——キーワード：ドングリ中毒、抽出法、総ポリフェノール。

-----日獣会誌 74, 788~791 (2021)

ブナ科植物の堅果、ドングリによる家畜の中毒は、海外では牛、羊、馬などで古くから知られ、タンニン酸等のポリフェノールが原因とされている [1-4]。国内では2015年に家畜保健衛生所業績発表会及び日本獣医師会獣医学術学会年次大会で口頭発表された北海道の牛の集団発症症例が初めての報告である。この症例は、強風による多量の落果など特殊な条件下での発生であったが、雑木林が多いわが国では散発している可能性は大いにある。ドングリ中毒では、今日まで死亡例での消化管の出血や腎臓の病変など、おもに病理組織学的診断が行われてきたが、多量のポリフェノールを摂取したことが判断できれば早期に診断を確定でき、また生残した個体の治療方針や予防のための対策につながる [1-3, 5]。

ドングリに含まれるポリフェノールのうち、タンニン酸、没食子酸、ピロガロール、ケルセチンなどで中毒例があることが分かっているが、たとえばタンニン酸のLD<sub>50</sub>はラットで2.26±0.083g/kg体重と非常に大きい数字である [6-8]。これは少量で毒性を現し、摂取自体が中毒の診断につながるキョウチクトウなどと異なり、ドングリでは摂取量の多寡が病態の大きな指標となることを示し、ドングリ中のポリフェノール類の含量と

摂取量を把握する意義は高い [9]。

タンニン酸をはじめとするポリフェノール類の含有量の推定は、一般に総ポリフェノール (TPPs) 濃度の定量によって行われ、日本食品成分表2015年版 (七訂) 分析マニュアル ([https://www.mext.go.jp/a\\_menu/syokuhinseibun/1368931.htm](https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/1368931.htm))、(accessed 2021-6-5) にも示される (タンニンとして記述) ように、その手法は対象となる食品等の種類によって異なる。ドングリの TPPs の定量法としては、Basdenら [4] が1987年に報告したFolin-Ciocalteu 試薬による発色で検出する方法があるが、ソックスレー抽出器を用いて6時間かけて抽出する必要があり、非常に煩雑である。今日ではソックスレー抽出に代わり、高速溶媒抽出 (Accelerated Solvent Extraction: ASE) 法を用いれば、高い圧力と温度の下で短時間に抽出することができるが、このような装置は高価であることもあって一般の診断室では保有していないことが多い [10]。

そこで、凍結乾燥したドングリを粉碎し、溶媒を加えて振盪する抽出操作により、定量性において ASE 法に匹敵するうえ、非常に簡便で迅速に TPPs を定量する方法を開発したので報告する。

† 連絡責任者：山中典子 (国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門)

〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5 ☎・FAX 029-838-7913 E-mail: yamamaya@affrc.go.jp

表1 振盪法及びASE法によるカシワドングリの総ポリフェノール量

手 法	乾重量(%)	平 均	SD	RSD(%)
振盪法	4.3	4.30	0.13	2.92
	4.4			
	4.1			
ASE法	4.8	4.79	0.16	3.36
	4.6			
	5.0			

同一試料で3回繰り返し

また、ドングリのポリフェノール含量は、樹種、熟度、生育条件などで異なることから、開発した方法を用いて熟度の異なるマテバシイのドングリのTPPs濃度を定量したので、あわせて報告する [4, 11].

### 材料及び方法

手法の開発のために用いたドングリは、北海道の症例において2014年に現地集められたカシワのドングリを $-20^{\circ}\text{C}$ で保存したものである。

ドングリのはかまを取り、半切したのち、水分含量測定のため、50g以上(約20粒)をビーカーにとり、凍結乾燥機(FDU-830, 東京理化学器械株, 東京)を用いて重量が一定になるまで凍結乾燥した。簡易粉碎器(ラボミルサー, 大阪ケミカル株, 大阪)で粉末状になるまで粉碎したドングリを0.2g秤量, 80%含水アセトン10ml加え, 試験管ミキサーで1分間激しく混合した。混合物は振盪機(マルチシェーカー MMS-510, 東京理化学器械株, 東京)を用いて250rpmで20分間振盪したのち, 200×gで15分間遠心分離した。上清を別試験管にとり,  $40^{\circ}\text{C}$ , 窒素雰囲気下でアセトン除去し, 蒸留水で10mlにメスアップした。孔径 $0.45\mu\text{m}$ の親水性PTFEフィルター(DISMIC 13HP020AN, アドバンテック東洋株, 東京)で濾過したものを測定試料とした(以下「振盪法」とする)。振盪法と比較すべき手法として, ASE装置(Dionex ASE 200, Thermo Fischer Scientific, U.S.A.)を用いた抽出を行った。振盪法と同様に凍結乾燥したドングリを1g秤量し, 80%含水アセトンを溶媒として1,000psi,  $70^{\circ}\text{C}$ , 5分, 2サイクルの条件で抽出した。抽出液を抽出溶媒で50mlにメスアップし, このうち10mlをとって同様にアセトン除去, 蒸留水で10mlに調製したものを測定試料とした(以下「ASE法」とする)。

試料中のTPPsの濃度の定量はあらかじめアセトンで $1\text{mg/ml}$ に調製し, 蒸留水で $5\sim 100\mu\text{g/ml}$ に希釈したタンニン酸を標準としてBasdenら [4]の方法により行った。抽出した試料を蒸留水で20~50倍に希釈したものを $600\mu\text{l}$ とり, 蒸留水で2倍希釈したFolin-Ciocal-

表2 振盪法及びASE法による回収率(%)

手 法	mean	SD	RSD(%)
振盪法	93.1	7.95	8.54
ASE法	98.0	3.69	3.77

同一試料で3回繰り返し

teu試薬(フォーリン&チオカルト フェノール試薬, 富士フィルム和光純薬株, 大阪)  $400\mu\text{l}$ を加えて激しく混合, さらに1mlの20%  $\text{NaCO}_3$ を加えて同様に混合し, 正確に20分静置したのち730nmの吸光度を測定した。

両手法の定量性を比較するため, 添加回収試験を行った。振盪法ではドングリ0.2gあたり, ASEではドングリ1gあたりそれぞれ125mgのタンニン酸を抽出操作開始時にスパイクして, 各抽出法にて抽出ののちに定量し, 回収率と相対標準偏差を求めた。

2018年8月下旬に, つくば市内の雑木林からマテバシイのドングリを採取した。堅果の熟度により含量が異なるとの報告があることから, 熟度の異なるものが混在するドングリのうち未熟な緑色のもの(未熟果)と, 熟していると思われる果皮が茶色のもの(熟果)をそれぞれ分別して採取した [4]。振盪法による抽出法でそれぞれのドングリのTPPs濃度を定量した。

### 結 果

表1は振盪法とASE法を用いて定量したカシワのドングリの定量結果である。同じ凍結乾燥サンプルを3回個別に抽出操作を行って定量すると, いずれも相対標準偏差の小さい再現性の高い結果が得られたが, 振盪法による定量値はASE法によるものよりやや低かった。

ASE法と振盪法抽出によるTPPs添加回収試験の結果を表2に示す。いずれも回収率90%以上で相対標準偏差も小さいが, 比較すると振盪法では回収率はやや低い結果であった。

実験室近隣で採取されたマテバシイの定量結果を図に示す。熟果に比べて未熟果のTPPs含量は有意に高かった(studentの*t*検定)。

### 考 察

一般に食品等のTPPsの定量は茶葉の公定法(ISO 14502-1:2005)にあるとおり, Folin-Ciocalteu法によって行われるが, 定量対象のマトリックス組成により, 抽出法, 特に抽出溶媒は多様である [9, 12, 13]。ここでは実際にドングリを材料としたBasdenら [4]の手法に基づき, ASE法と, 今回開発したより簡易な振盪法による抽出法を比較検討した。

振盪法により抽出, 定量したカシワのドングリの定量結果は, ASE法と同様, 標準偏差, 相対標準偏差が非常に小さく, この抽出手法が堅牢な方法であることが示

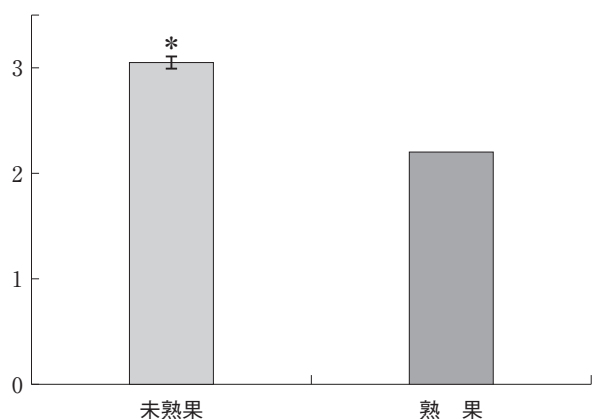


図 マテバシドングリの総ポリフェノール量(乾重量%)

\* :  $P < 0.001$

された。回収率は、ASE法による抽出では98%と非常に高い値であった。振盪法による抽出では、回収率は93%前後であったが、標準偏差、相対標準偏差の非常に小さい安定した定量結果が得られた。振盪法での回収率がASE法より低いことは、無添加での定量値がASE法より低いことと一致しており、振盪法の抽出効率はASE法にやや劣ることが示唆される。しかし、定量の妥当性としてCodex委員会のガイドラインの基準(Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, 2016, [https://www.aoc.org/wp-content/uploads/2019/08/app\\_f.pdf](https://www.aoc.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf)), (accessed 2021-2-3) で1~100mg/kgまでの範囲の物質の定量における回収率の目安とされる80~110%に収まっており、この手法は十分実用に耐えるものと考えられた。これらのことから、今回検討した振盪法による抽出によって、特別な機器を必要とせずに簡便、迅速に安定した定量が行えることが明らかになった。

次に振盪法を用いて、関東で普通に植栽されているブナ科植物のドングリであるマテバシイについて実際にTPPs量を定量した。マテバシイのTPPs含量自体はやや低い値であった。このことは、藤原滝雄が1982年に香川生物学会機関誌(ブナ科植物の果実(堅果)の成分と味について、香川生物, 10, 25-28)で述べている、マテバシイでは渋みが少なく、簡単なあく抜きで人の食用となるとの報告とも合致する。一方、熟果に比べて未熟果のTPPs含量は有意に高かった。これは未熟果で毒性が高いのではないとするFowlerら[1]の報告、未熟果と熟果でTPPs量が異なるとするBasdenら[4]の報告を裏付けるものである。

タンニン酸やケルセチンの急性毒性は多量に摂取した場合に現れる[6, 8]。また、ドングリを常食していると考えられるアカネズミを用いたドングリの給与試験では、少量から給与して漸増するとドングリの毒性は馴化

により低減されることが分かっている[14]。これらのことは、本法による定量結果を摂食量と合わせて家畜が摂取したドングリのTPPs量を推定することが、ドングリ中毒の診断及び早期の治療、続発の防止に資することを示している。また、牧野や運動場のブナ科植物ドングリのTPPs量を調査し、牧野整備、区画利用計画に反映することで、多量の摂食による中毒を未然に防ぐことにもつながると考えられる。

以上のことから、われわれの開発した簡易抽出法は、ドングリ中毒の診断、予防、治療に利用することができると考えられる。

中毒事故の際のドングリ試料の利用を許諾いただいた北海道網走家畜保健衛生所に感謝する。

## 引用文献

- [1] Fowler ME, Richards WPC : Acorn poisoning in a cow and a sheep, J Am Vet Med Soc, 147, 1215-1220 (1965)
- [2] Beck JL, Beck CC : Acorn toxicity in a heifer (a case report), Vet Med Sm Anim Clin, 67, 1003-1006 (1972)
- [3] Anderson GA, Mount ME, Vrins AA, Ziemer EL : Fatal acorn poisoning in a horse: Pathologic findings and diagnostic consideration, J Am Vet Med Assoc, 182, 1105-1110 (1983)
- [4] Basden KW, Dalvi RR : Determination of total phenolics in acorns from different species of oak trees in conjunction with acorn poisoning in cattle, Vet Hum Toxicol, 29, 305-306 (1987)
- [5] AHVLA Disease surveillance report : Acorn poisoning in cattle and sheep, Vet Rec, 174, 215-218 (2014)
- [6] Dollahite JW, Pigeon RF, Camp BJ : The toxicity of gallic acid, pyrogallol, tannic acid and *Quercus havardi* in the rabbit, Am J Vet Res, 23, 1264-1267 (1962)
- [7] Dunnick JK, Hailey JR : Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods, Toxicol Sci, 19, 423-431 (1992)
- [8] Boyd EM, Berezky K, GODI I : The acute toxicity of tannic acid administered intragastrically, Can Med Assoc J, 92, 1292-1297 (1965)
- [9] Galey FD, Holstege DM, Plumlee KH, Tor E, Johnson B, Anderson ML, Blanchard PC, Brown F : Diagnosis of oleander poisoning in livestock, J Vet Diagn Invest, 8, 358-364 (1996)
- [10] Watanabe J, Oki T, Takebayashi J, Takano-Ishikawa Y : Extraction efficiency of hydrophilic and lipophilic antioxidants from lyophilized foods using pressurized liquid extraction and manual extraction, J Food Sci, 79, C1665-C1671 (2014)
- [11] Vander Wall SB : The evolutionary of nut dispersal, The Botanical Review, 67, 74-117 (2001)
- [12] Samee W, Engkalohakul M, Nebbua N, Direkrojanavuti P, Sornchaithawatwong C, Kamkaen N : Correlation analysis between total acid, total phenolic and ascorbic acid contents in fruit extracts and their antioxi-

- dant activities, Thai Pharmaceutical and Health Science Journal, 1, 196-203 (2006)
- [13] 齋藤 佑, 日塔優太, 波多野豊平, 村上 聡, 尾形健明, 木島龍朗: 伝統野菜の総ポリフェノール含有量スクリーニングとスーパーオキシド消去活性, 材料技術, 34, 159-165 (2016)
- [14] Shimada T, Saitoh T, Sasaki E, Nishitani Y, Osaaw R: Role of tannin-binding salivary proteins and tannase-producing bacteria in the acclimation of the Japanese wood mouse to acorn tannins, J Chem Ecol, 32, 1165-1180 (2006)

---

### Simple Method for Extracting Total Polyphenol in Acorns for Diagnosis of Acorn Poisoning

Naoki TERAMOTO<sup>1)</sup>, Keigo SHIMADA<sup>2)</sup>, Yuka SUGITA<sup>3)</sup>,  
GURUGE Keerthi Siri<sup>4)</sup>, Miyako YOSHIOKA<sup>4)</sup>  
and Noriko YAMANAKA<sup>4)†</sup>

- 1) *Central Livestock Hygiene Service Center, Fukushima prefecture, 114-12 Shinyashiki, Ganhouji, Tamakawa-mura, Ishikawa-gun, 963-6311, Japan*
- 2) *Toso Meat Inspection Office, Chiba prefecture, 5908-3 Ni, Asahi, 289-2504, Japan*
- 3) *Livestock Hygiene service Center, Miyazaki prefecture, 3151-1 Shimonaka, Sadoharamachi, Miyazaki, 880-0212, Japan*
- 4) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannnon-dai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

#### SUMMARY

In this study, a novel, simple and rapid extraction method was developed for the determination of the total polyphenol content of acorns to diagnose acorn poisoning in domestic animals. The extraction efficiency between the shaking method and the accelerated solvent extraction method with aqueous acetone was comparable. Additionally, the shaking method was highly reproducible, easy and sufficiently applicable for the identification of total polyphenol content. It is found that the total polyphenol levels of immature acorns (*Lithocarpus edulis*) were significantly higher than ripe acorns. — Key words : Acorn poisoning, Extraction, Total polyphenol.

† Correspondence to : Noriko YAMANAKA (National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization)

3-1-5 Kannnon-dai, Tsukuba, 305-0856, Japan

TEL · FAX 029-838-7913 E-mail : yamamaya@affrc.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 788 ~ 791 (2021)