

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

かび毒の発達神経毒性評価

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学農学研究院動物生命科学部門 教授

研究要旨

本研究は、発達神経毒性が懸念されているかび毒について、実験病理学的に発達神経毒性影響を検討する。平成 25 年度はフザリウム属真菌により産生されるかび毒であり、実験的に低用量で神経毒性を誘発することが知られている T-2 トキシン (T-2 toxin) について、マウスを用いて発達期神経毒性影響を検討した。9 ppm を高用量として選択し、公比 3 で投与群 (0、1、3、9 ppm) を設定し、妊娠 ICR マウスを用いて発達期暴露試験 (各群 12 匹) を行った。妊娠 6 日目から離乳時 (生後 21 日目) まで母動物に対して混餌投与することにより、経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時と生後 77 日目にそれぞれ解剖を行った。母動物は 9 ppm で分娩後 7~14 日にかけて体重低値を示し、分娩後 21 日目までの間に摂餌量、摂水量の低値を認めた。また、9 ppm で前胃粘膜の過形成を示唆する肥厚性変化が認められた。更に、1 ppm から胸腺重量の低値がみられ、9 ppm では肝臓重量の高値がみられた。このことから母動物では、一般毒性的変化は 9 ppm に集中的に見られたものの、免疫系への影響は最も鋭敏であった。児動物では、9 ppm で投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後も出生後 77 日まで体重低値が継続した。また、離乳時脳絶対重量の低値が 3 ppm から認められ、9 ppm での体重や諸臓器の重量低値と併せて T-2 トキシンによる発達障害が示唆された。出生後 77 日の児動物では雌 9 ppm で肝臓及び胸腺重量の低値がみられたが、出生時に比較して変化の程度は小さく、回復性のある変化であると考えられた。離乳時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、顆粒細胞層下帯での Tbr2 陽性細胞が 3 ppm から減少し、T-2 トキシンによる type 2 前駆細胞を標的としたニューロン新生障害が起きているものと考えられた。歯状回門部では reelin 陽性細胞の増加が 9 ppm で認められ、前駆細胞の移動異常を反映して介在ニューロンからの産生が増加した可能性が考えられた。

A. 研究目的

近年、農作物へのかび毒等自然毒の汚染が国際的に深刻な問題となっており、かび毒の国際的成分規格を設定する動きが活発にな

って来ている。かび毒の健康被害を防ぐには、基準策定が最も効果的であり、それに向けた国際的取り組みがなされている。すでに近年、木の実を対象とした総アフラトキシン、穀物

のオクラトキシン A (OTA) の新たな規格基準が設定され、更にはフモニシン、デオキシニバレノールの毒性再評価が行われている。今後さらに対象のかび毒が増えることが予想される。このような状況にあって、輸入大国の我が国としては、国際動向に準じた基準値策定は急務であることから、我が国の食品中のかび毒汚染実態および国民の暴露実態を正確に把握する必要がある。また、輸入食品を汚染するかび毒産生菌の種およびかび毒産生を考慮に入れた予防対策を構築する必要がある。

本研究では、神経毒性影響の懸念ないし報告のあるかび毒を対象として、高感受性集団である胎児・乳幼児を想定した神経発達に対するリスク評価を目的とする。我々は、記憶や学習の中枢であり、生後もニューロンを産生し続ける海馬歯状回に着目し、顆粒細胞層下帯(SGZ)における顆粒細胞系譜の各種分化指標と歯状回門に分布して顆粒細胞の分化や移動を制御する介在ニューロンの分布を検討することで、数々の神経毒性物質がニューロン新生を障害することを見出している。

平成 25 年度は、穀物汚染が危惧されているフザリウム属真菌によって産生される T-2 トキシン (T-2 toxin) を評価対象とした。T-2 トキシンについては日本ならびにコーデックス委員会においても食品中の基準値は策定されておらず、リスク管理措置の検討のためより多くの毒性データが必要とされている。そこで T-2 トキシンの発達期神経毒性影響を明らかにすることを目的として母動物に混餌投与することにより、妊娠 6 日から出生後 21 日 (離乳時) まで経胎盤、経乳的に児動物に対して暴露させ、暴露終了時ならびに出生後 77 日に解剖してニューロン新生に対する影響を検討し、離乳時における影響ならびにその回復性を評価することとした。

B. 研究方法

妊娠 ICR マウス (妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー) を、一群を 12 匹ずつとして計 4 群に分け、T-2 トキシンを 0、1、3、9 ppm の用量で妊娠 6 日から分娩後 21 日まで混餌投与した。最高用量は予備的に 0、6、12 ppm を設定して母動物に対して混餌投与した際に、12 ppm で児動物の低体重、産仔数の減少が認められ、6 ppm では影響がみられなかったため、体重の低値とともに妊娠の維持が期待される 9 ppm に設定した。出生後 4 日目に間引きを行い、各母動物に雄 8 例、雌 2 例を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、週に 2 回の割合で体重及び摂餌量、週に 1 回、摂水量の測定を行った。混餌飼料の調製は 2 週間を超えない頻度で行った。出生後 21 日 (離乳時) に児動物の半数を解剖に供した。各群 10 例の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4% PFA / 0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行った。各群雄 31~35 例、雌 13~20 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、胸腺、脾臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。PFA 灌流固定脳標本については大脳の Bregma の後方約 -3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面 (2 切面) が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μm 厚の連続切片を作製した。切片は、抗マウス Sox2 抗体 (x4000 倍、Abcam 株式会社) 抗マウス Tbr2 抗体 (x500 倍、Abcam 株式会社) 抗マウス doublecortin 抗体 (x1000 倍、Abcam 株式会社) 抗マウス reelin 抗体 (x1000 倍、Novus Biologicals, Inc., Co.) 抗マウス NeuN 抗体 (x100 倍、IgG、Clone A60、Millipore Corporation) 抗マウス parvalbumin 抗体 (x1000 倍、IgG、Millipore Corporation) を

用いて、DAB 発色にて ABC 法

(VECTASTAIN ABC Elite kit、Vector Laboratories) による免疫染色を行った。新生ニューロンの分化指標である Sox2、Tbr2 及び doublecortin 陽性細胞数について海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において検索を行った。一方、GABA 性介在ニューロンの指標である reelin 及び parvalbumin、成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。

母動物は分娩後 22 日に CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、胸腺、脾臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。また T-2 トキシンの慢性毒性試験で病理変化が報告されている胃についても同時に採取した。

残り半数の児動物は出生後 77 日まで T-2 トキシンを含まない通常飼料により飼育し、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を週に 1 回の割合で測定した。出生後 77 日に各群 10 例の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4% PFA / 0.1M リン酸バッファーによる灌流固定を行った。各群雌雄各 10 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、胸腺、脾臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

母動物の体重ならびに期間重量、摂餌量、摂水量は母動物ごとに集計し、群平均及び標準偏差を算出した。児動物の体重及び臓器重量、免疫組織化学染色における陽性細胞のカウント数については児動物の群平均ならびに標準偏差を算出した。統計学的解析は、体重、摂餌量、摂水量、臓器重量、免疫染色における陽性細胞カウント値について、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は Dunnett、不等分散の場合は Steel の方法

により検定を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物は全て CO₂/O₂ 深麻酔下での灌流固定ならびに後大静脈からの放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

C. 研究結果

体重、飲水量、摂餌量：

母動物は、体重低値が 9 ppm 群で分娩後 7 ~ 14 日にかけて、摂餌量の低値が 9 ppm 群で分娩後 5, 18, 21 日目に、摂水量の低値が 9 ppm 群で 14, 18, 21 日目に、3 ppm 群で 18 日目に認められた (Fig. 1)。児動物は雌雄とも 9 ppm で投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後もこの群で出生後 77 日目まで体重低値が継続した (Fig. 2, 3、Table 1)。雌では、1 及び 3 ppm で出生後 35 日目以降体重の低値傾向を示し、3 ppm では 56 及び 63 日目で、1 ppm では 63 日目で低値が統計学的に有意であった (Fig. 3)。

着床数、産仔数：

着床数、産仔数に T-2 トキシンによる影響は認められなかった (Table 1)。

臓器重量：

母動物では 1 ppm から胸腺絶対重量の低値が認められ、相対重量の低値も 1 及び 9 ppm で認められた。9 ppm では肝臓の絶対重量及び相対重量の高値が認められた (Table 2)。

児動物では離乳時に雌雄共に 3 ppm から脳絶対重量の低値がみられ、9 ppm では肝臓、胸腺、脾臓の絶対重量の低値がみられた

(Table 3)。雄では胸腺の絶対重量の低値が 3 ppm から認められた。出生後 77 日では雌 9 ppm で肝臓、胸腺の絶対重量低値がみられた (Table 4)。

病理学的変化および免疫組織学的変化：

母動物の剖検時における肉眼的な所見として、前胃粘膜の肥厚が 3 ppm より認められ、発現数は用量に相関して増加した (Table 5)。

離乳時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、SGZ において Tbr2 (Type2 前駆細胞に発現) 陽性細胞が 3 ppm から減少したが、Sox2 (主に type 1 幹細胞と type 2a 前駆細胞に発現) ないし doublecortin 陽性細胞は統計学的有意な変動を示さなかった (Table 6)。また、歯状回門部では、介在ニューロンから産生され、ニューロンの移動制御に機能することが知られている reelin 陽性細胞が 9 ppm で増加したが、parvalbumin 陽性介在ニューロンや NeuN 陽性成熟ニューロン数には変動を認めなかった。

D. 考察

妊娠 ICR マウスに T-2 トキシンを 9 ppm を最高用量として妊娠 6 日から分娩後 21 日まで混餌投与することで、児動物に経胎盤、経乳的に暴露させ、暴露終了時ならびに出生後 77 日における影響について解析した。その結果、母動物は 9 ppm で分娩後 7~14 日にかけて体重低値を示し、主に 9 ppm で分娩後 21 日目までの間に摂餌量、摂水量の低値を認めた。また、9 ppm で前胃粘膜の過形成を示唆する肥厚性変化が認められ、摂餌量ならびに摂水量の低下に影響した可能性が考えられた。一方、1 ppm から胸腺重量の低値がみられ、9 ppm では肝臓重量の高値がみられた。このことから母動物では、一般毒性的変

化は 9 ppm に集中的に見られたものの、免疫系への影響は最も鋭敏に認められた。児動物では、9 ppm で投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後も出生後 77 日まで体重低値が継続した。一方、離乳時の児動物では脳絶対重量の低値が 3 ppm から認められ、9 ppm での体重や諸臓器の重量低値と併せて T-2 トキシンによる発達障害が示唆された。出生後 77 日の児動物では雌 9 ppm で臓器重量低値がみられたが、出生時と比較して変化の程度は小さく、雄では出生時の変化が消失していることから、回復性のある変化であると考えられた。

離乳時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、Tbr2 (Type2 前駆細胞に発現) 陽性細胞が 3 ppm から減少し、T-2 トキシンによるニューロン新生障害が起きているものと考えられた。9 ppm でみられた reelin 陽性細胞の増加は前駆細胞の移動異常を反映して介在ニューロンからの産生が増加した可能性が考えられた。

E. 結論

T-2 トキシンの発達期暴露により、母動物と児動物への影響は主に 9 ppm で認められたが、母動物では 1 ppm より胸腺重量の低下がみられ、児動物では 3 ppm より脳の絶対重量の低値と海馬歯状回における type2 前駆細胞を標的とするニューロン新生障害を示唆する変化が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

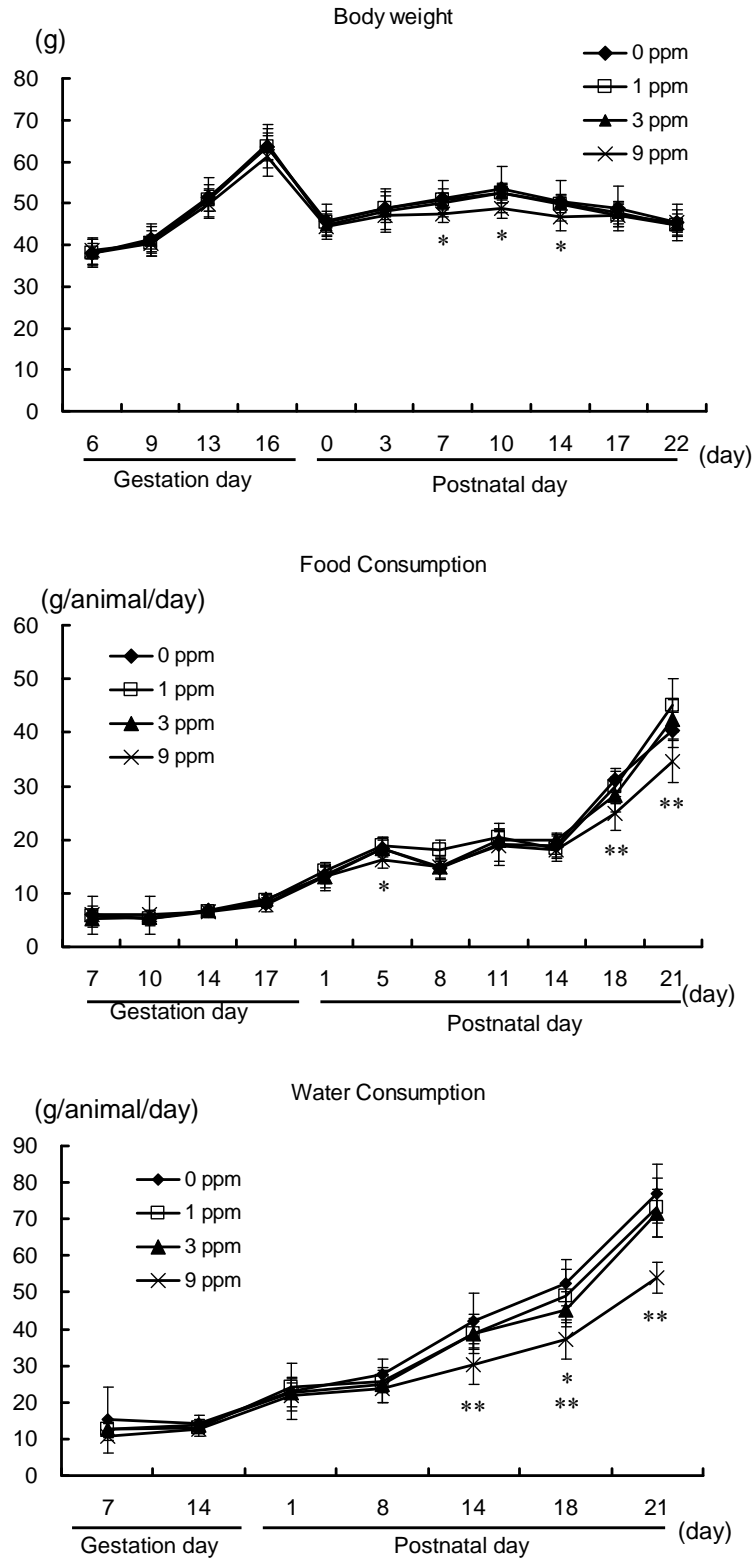


Figure 1. Body weight, food consumption and water consumption of dams given T-2 Toxin from GD 6 to PND 22 in the diet.

*,** Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

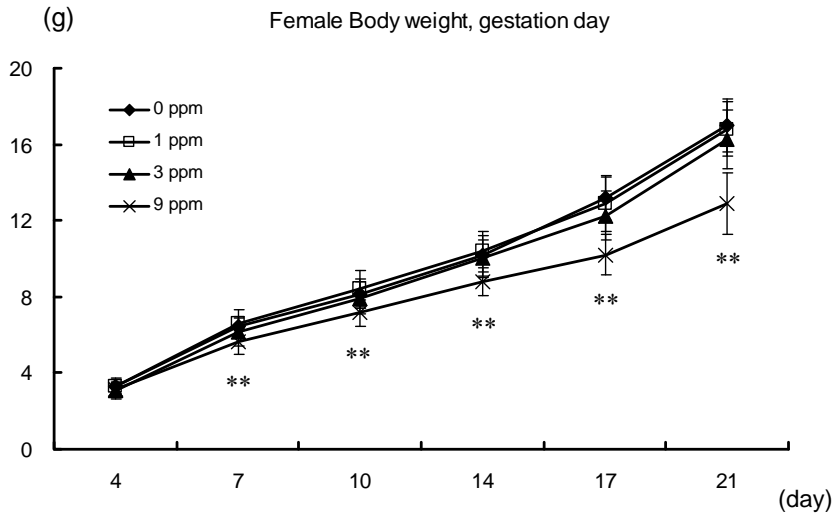
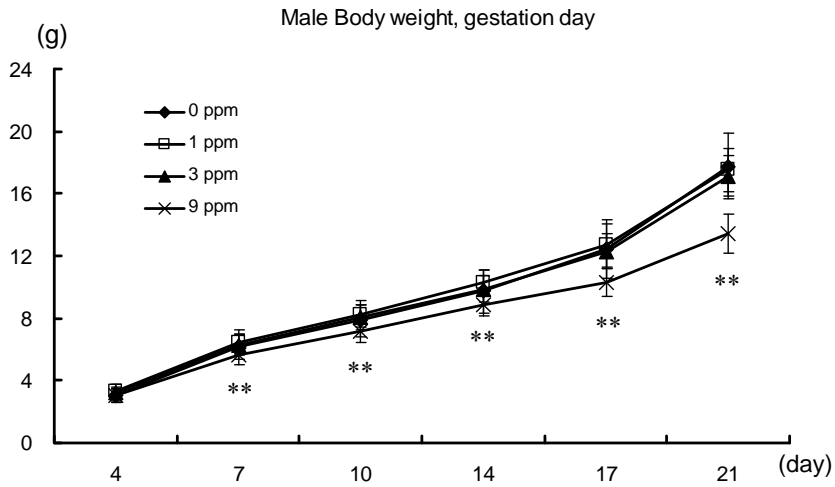


Figure 2. Body weight of male and female offspring at gestation day.

** Significantly different from the untreated controls ($P < 0.01$, Dunnett's or Steel's test).

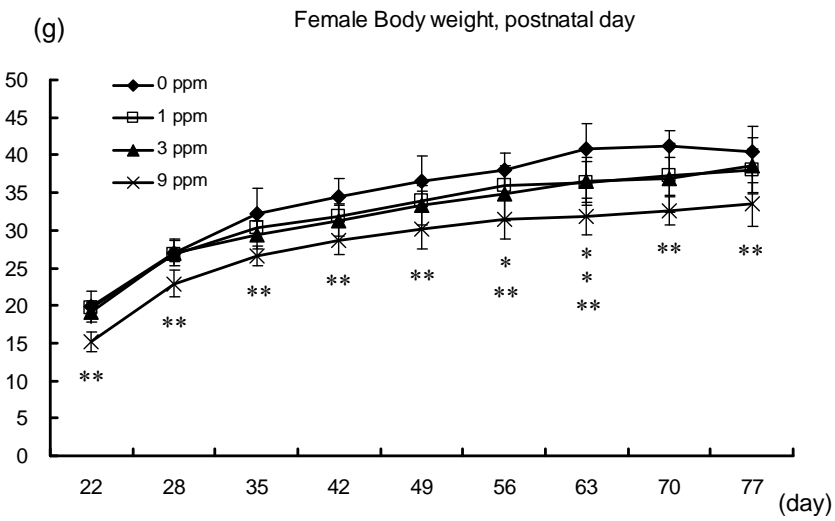
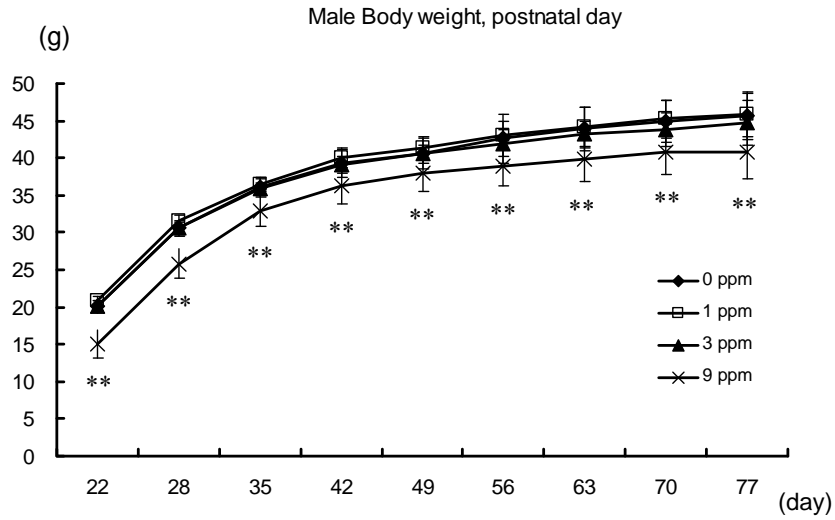


Figure 3. Body weight of male and female offspring at postnatal day.

*,** Significantly different from the untreated controls ($P < 0.05$, $P < 0.01$, Dunnett's or Steel's test).

Table 1. Reproductive and general parameters of dams given T-2 Toxin from GD 6 to PND 22

	T-2 Toxin (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
No. of dams	9	10	10	10
No. of implantation sites	15.30±1.77	16.33±1.87	16.15±1.41	15.50±2.65
No. of live offspring	14.36±2.50	14.50±2.07	14.92±1.19	13.75±2.34
Mean body weight (GD, g)	48.37±3.53	48.06±2.33	48.78±2.51	47.85±3.43
Mean body weight (PND, g)	49.12±4.52	48.44±1.74	48.58±1.75	46.67±1.76
Food intake (GD, g/animal/day) ^a	6.48±0.69	6.61±0.84	6.57±0.58	6.77±1.92
Food intake (PND, g/animal/day) ^a	22.61±1.63	23.51±1.77	22.55±1.54	20.09±1.51**
Water consumption (GD, g/animal/day) ^a	13.85±2.59	12.94±1.47	13.44±1.58	11.78±1.27*
Water consumption (PND, g/animal/day) ^a	44.25±5.00	42.12±4.11	40.89±4.10	33.58±3.45**
T-2 Toxin intake (GD, mg/kg body weight/day) ^a	0	0.14±0.02	0.40±0.03	1.18±0.25
T-2 Toxin intake (PND, mg/kg body weight/day) ^a	0	0.49±0.03	1.39±0.07	3.79±0.24

Mean±SD.

^a Mean value of each week.

*, ** Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: GD; gestation day, PND; postnatal day.

Table 2. Organ weights of dams at PND 22

		T-2 Toxin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
No. of animals		9	10	10	10
Final body weight (g)		45.30 ± 4.38	44.78 ± 1.61	44.71 ± 2.53	45.39 ± 2.92
Brain	Absolute (g)	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.02
	Relative (g/100g BW)	1.11 ± 0.06	1.11 ± 0.03	1.10 ± 0.05	1.07 ± 0.06
Liver	Absolute (g)	2.91 ± 0.33	2.89 ± 0.36	2.96 ± 0.23	3.45 ± 0.30**
	Relative (g/100g BW)	6.43 ± 0.35	6.45 ± 0.69	6.63 ± 0.46	7.60 ± 0.50**
Thymus	Absolute (g)	0.094 ± 0.013	0.070 ± 0.020**	0.073 ± 0.016*	0.031 ± 0.011**
	Relative (g/100g BW)	0.209 ± 0.029	0.158 ± 0.046*	0.164 ± 0.040	0.069 ± 0.011**
Spleen	Absolute (g)	0.164 ± 0.029	0.157 ± 0.025	0.211 ± 0.064	0.207 ± 0.093
	Relative (g/100g BW)	0.360 ± 0.043	0.350 ± 0.050	0.470 ± 0.126	0.451 ± 0.183

Mean±SD.

*, ** Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: BW; body weight, PND; postnatal day.

Table 3. Organ weights of offspring at PND 21

		T-2 Toxin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
No. of male animals		31	35	32	32
Final body weight (g)		17.98 ± 1.78	17.63 ± 1.44	17.13 ± 1.33	13.61 ± 1.22**
Brain	Absolute (g)	0.441 ± 0.025	0.433 ± 0.016	0.425 ± 0.019**	0.411 ± 0.022**
	Relative (g/100g BW)	2.467 ± 0.232	2.477 ± 0.198	2.491 ± 0.176	3.033 ± 0.227**
Liver	Absolute (g)	1.03 ± 0.14	1.02 ± 0.12	0.98 ± 0.13	0.71 ± 0.10**
	Relative (g/100g BW)	5.69 ± 0.36	5.79 ± 0.42	5.73 ± 0.43	5.25 ± 0.40**
Thymus	Absolute (g)	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.02**	0.08 ± 0.02**
	Relative (g/100g BW)	0.67 ± 0.16	0.64 ± 0.11	0.60 ± 0.10	0.58 ± 0.13**
Spleen	Absolute (g)	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.02**
	Relative (g/100g BW)	0.79 ± 0.18	0.78 ± 0.10	0.79 ± 0.15	0.66 ± 0.13**
No. of female animals		13	17	20	19
Final body weight (g)		16.99 ± 1.37	16.81 ± 1.40	16.27 ± 1.54	12.89 ± 1.62**
Brain	Absolute (g)	0.433 ± 0.027	0.422 ± 0.014	0.414 ± 0.018*	0.410 ± 0.020**
	Relative (g/100g BW)	2.556 ± 0.167	2.524 ± 0.189	2.561 ± 0.224	3.218 ± 0.350**
Liver	Absolute (g)	0.88 ± 0.12	0.92 ± 0.10	0.87 ± 0.11	0.64 ± 0.11**
	Relative (g/100g BW)	5.16 ± 0.37	5.45 ± 0.33	5.35 ± 0.42	4.98 ± 0.38
Thymus	Absolute (g)	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.02**
	Relative (g/100g BW)	0.69 ± 0.13	0.67 ± 0.12	0.69 ± 0.15	0.62 ± 0.13
Spleen	Absolute (g)	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.03**
	Relative (g/100g BW)	0.83 ± 0.12	0.80 ± 0.15	0.78 ± 0.15	0.72 ± 0.19

Mean±SD.

*, ** Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: PND; postnatal day, BW; body weight.

Table 4. Organ weights of offspring at PND 77

		T-2 Toxin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
No. of male animals		10	10	10	10
Final body weight (g)		45.96 ± 5.47	46.60 ± 5.19	43.71 ± 4.95	40.75 ± 3.78**
Brain	Absolute (g)	0.515 ± 0.090	0.502 ± 0.016	0.487 ± 0.017	0.494 ± 0.021
	Relative (g/100g BW)	1.128 ± 0.182	1.087 ± 0.113	1.126 ± 0.123	1.222 ± 0.121
Liver	Absolute (g)	2.198 ± 0.347	2.244 ± 0.337	2.154 ± 0.158	2.191 ± 0.263
	Relative (g/100g BW)	4.960 ± 0.423	4.984 ± 0.536	5.079 ± 0.505	5.314 ± 0.387
Thymus	Absolute (g)	0.056 ± 0.019	0.050 ± 0.010	0.045 ± 0.014	0.047 ± 0.020
	Relative (g/100g BW)	0.126 ± 0.039	0.112 ± 0.027	0.105 ± 0.031	0.113 ± 0.045
Spleen	Absolute (g)	0.134 ± 0.025	0.134 ± 0.025	0.139 ± 0.022	0.134 ± 0.036
	Relative (g/100g BW)	0.307 ± 0.069	0.299 ± 0.048	0.332 ± 0.080	0.325 ± 0.077
No. of female animals		10	10	10	10
Final body weight (g)		40.70 ± 3.55	38.00 ± 3.63	38.55 ± 3.74	33.43 ± 2.94**
Brain	Absolute (g)	0.525 ± 0.022	0.515 ± 0.018	0.505 ± 0.015	0.504 ± 0.020
	Relative (g/100g BW)	1.296 ± 0.102	1.362 ± 0.105	1.321 ± 0.138	1.517 ± 0.120**
Liver	Absolute (g)	2.082 ± 0.387	1.858 ± 0.269	1.672 ± 0.575	1.690 ± 0.211*
	Relative (g/100g BW)	5.095 ± 0.725	4.885 ± 0.486	4.349 ± 1.403	5.069 ± 0.577
Thymus	Absolute (g)	0.080 ± 0.020	0.071 ± 0.010	0.074 ± 0.011	0.063 ± 0.017*
	Relative (g/100g BW)	0.197 ± 0.043	0.188 ± 0.031	0.193 ± 0.034	0.187 ± 0.038
Spleen	Absolute (g)	0.175 ± 0.051	0.177 ± 0.059	0.178 ± 0.041	0.166 ± 0.047
	Relative (g/100g BW)	0.425 ± 0.104	0.465 ± 0.159	0.462 ± 0.092	0.494 ± 0.123

^a Mean ± SD.

*, ** Significantly different from the untreated controls (P < 0.05, P < 0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: PND; postnatal day, BW; body weight.

Table 5. Macroscopical finding with dams at PND 22

		T-2 Toxin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
No. of animals		12	11	13	13
Forestomach					
	Thickening of mucosa	0	0	2	7

Abbreviation: PND; postnatal day.

Table 6. Immunohistochemical data in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21

	T-2 Toxin (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
No. of animals	9	10	10	10
Number of positive cells at subgranular zone (/mm)				
Sox2	37.3 ± 3.3	38.6 ± 3.4	40.5 ± 2.5	36.2 ± 2.9
Tbr2	10.68 ± 2.84	8.71 ± 2.04	6.91 ± 1.82**	7.33 ± 2.25**
doublecortin	89.7 ± 14.0	86.1 ± 8.0	90.8 ± 12.3	76.1 ± 13.7
Number of positive cells at hilus (/mm ²)				
reelin	147.7 ± 44.1	177.5 ± 42.7	178.8 ± 39.0	224.0 ± 53.6**
NeuN	291.7 ± 43.0	277.2 ± 61.5	263.1 ± 56.0	283.6 ± 58.4
parvalbumin	37.9 ± 19.5	49.0 ± 18.2	36.8 ± 15.9	41.7 ± 13.1

Mean±SD.

** Significantly different from the untreated controls (P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: PND; postnatal day, Sox2; SRY (sex determining region Y)-box 2, Tbr 2; T box brain 2, NeuN; neuron-specific nuclear protein.