

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00879

研究課題名(和文)加工食品のフードディフェンスを目指したビッグデータ化モレキュラー解析の構築

研究課題名(英文)Development of molecularly-based signals from food products using LC-MS in foodomics

研究代表者

井之上 浩一(Inoue, Koichi)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：30339519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、加工食品のフードディフェンスを目指したビッグデータ化モレキュラー解析(LC-MS)の開発および構築を目指した。様々な加工食品を対象として、ビッグデータ化などを行った。代表的な粉ミルクを採用し、理化学的分析技術には、LC-MSを用いた。本実験から、LC-MSでは、数ppmレベルにおいても検出することが可能であり、問題と考えていた極性に関する測定範囲も2つの分離モードを利用することで達成できた。そのため、メラミンや農薬類、重金属、劣化のように外部から意図的に混入される恐れを未然に検知できた。今後は、さらに微生物などの想定外の汚染評価へ応用することを検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：In this study including the field of metabolomics for food defense, the novel evaluation of low-molecular-weight compounds using untargeted LC coupled with electrospray time-of-flight MS and multivariate statistical analysis method is proposed for the quality assessment of the classification, contamination and degradation of food products (infant formula). The LC-MS is used to monitor more detected numbers in food samples. Based on these properties of infant formula, significant differences in the classification of types and origins, the contamination of unknown compound as melamine and the degradations for one week were evaluated based on the PCA patterns. With the metabolomics strategy, the difference from the low-molecular-weight compounds could be utilized for the evaluation of the classification, contamination and degradation of infant formulas for the food safety and quality.

研究分野：薬系分析

キーワード：食品汚染 LC-MS 多変量解析

## 1. 研究開始当初の背景

加工食品は常に安定かつ、持続的生産、管理、品質及び販売がなければならない。しかし、近年の事例では、加工食品の汚染や劣化によるニュースが後を絶たない。現在、素材・調理などが複雑な加工食品において、予期せぬ汚染や劣化の検査には、新たな概念が求められる。2012 年、北海道で起きた「白菜の浅漬け」による O-157 集団食中毒は未然に検知できず、多くの消費者に被害を及ぼした。つまり、未来志向型の食情報は、複雑な未知成分を踏まえた画期的な測定技術とデータ処理の構築が必須である。そこで、本研究開始当初の背景などでは、予想不可能な加工製品の劣化や汚染状況の情報に対して、新たな概念は無く、本研究によるビッグデータ化モлекуラー解析を考案する。

## 2. 研究の目的

本研究では、予想不可能な加工食品の劣化や汚染状況の把握に新たなアプローチとして、ビッグデータ化モлекуラー解析を提唱し、その実用性への基盤構築を目指すこととする。本研究のコンセプトは、「加工食品の安定的な生産 = 膨大なモлекуラー情報の安定的統計比率」という当たり前の観点にある。現在、多くの加工食品は、一定の品質を保ち、安定的な生産ラインで供給しなければならない。加工食品のモлекуラー(ビッグデータ)情報は、ある一定の多変量統計的範囲により製品形成となっているが、突出した外れパターンは、未知の汚染や劣化など、正規の製品として逸脱している可能性を示唆できる。そのため、未知汚染モデル(粉ミルク中メラミン汚染など)が、その統計的技術で検知できるのか、実際の応用性を踏まえて、実施することとする。それには、異物混入の加工食品(市販農薬やヒ素・水銀などの混入されたもの、微生物による汚染など)が、統計的解析により外れる製品であることを立証しなければならない。更に、安定生産される加工食品は、どの程度まで統計的範囲(正常域)を定めるか必要となる。

## 3. 研究の方法

本研究目的を達成するためには、非選択的理化学分析技術を用いて、加工食品の膨大かつ複雑なモлекуラーデータを取得し、詳細な解析のための統計手法を統合的にシステム化することが第一段階である。本研究者は、既に加工食品(粉ミルク)を用いて、LC-MS 網羅解析による多変量解析を構築している。このシステムは、粉ミルク種別判断、特徴別精査などへ応用可能と判断しており、十分に本研究の目標達成に利用できる。そこで、本システムを基盤として、本研究者は、ビッグデータ取得を目指して、多彩な分離技術及び検出法の追加検討を実施する。そのうえで、実際の疑似汚染・劣化加工食品モデルを評価し、その統計的判別評価を行う。その結果に

基づく、最適な統計解析システム構築、データ蓄積体制の整備、様々な加工食品への展開などを想定した手法開発を行い、本研究の期間内に加工食品の未知汚染・劣化の未然検知法の確立を目指す。

## 4. 研究成果

粉ミルクは多くの成分(添加物、乳成分、脂質など)を含有しており、その成分分離分析を行うため、逆相系カラムおよび HILIC モードを検討した(図 1)。本実験は移動相に 0.1% 酢酸水溶液および 0.1% 酢酸アセトニトリル溶液を用い、検出にはエレクトロスプレーイオン化ポジティブ(ESI-ポジティブ)モードを利用した。ESI-ポジティブモード( $m/z$  100-1000)で測定を行い、保持時間として 0.5 分から 40 分で検出化合物数を得た。

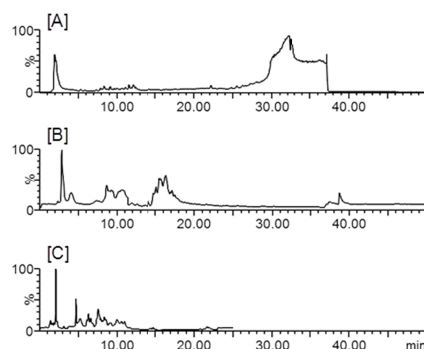


図 1 LC-MS クロマトグラムと検出ピークの検討

[A] Column: Acquity UPLC BEH C18 column (1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  100 mm); Gradient mode: Type A; Flow rate: 0.2 mL/min; Detected numbers: about 800

[B] Column: TSKgel Amide-80 column (3  $\mu$ m, 2.1  $\times$  150 mm); Gradient mode: Type B; Flow rate: 0.2 mL/min; Detected numbers: about 1,200

[C] Column: Trial TSKgel Amide-80 column (3  $\mu$ m, 2.1  $\times$  150 mm); Gradient mode: Type C; Flow rate: 0.4 mL/min; Detected numbers: about 1,200

また、今回、様々な加工食品へ LC-MS 及び多変量解析の技術を開発・応用してきた。そのなかでも、特に有益な結果は、賞味期限内と期限切れの判別と、保存状態による有機物変動を識別へ本手法が応用できるか行なった。LC-MS にて、粉ミルク試料(賞味期限内と期限切れ)を HILIC モードおよび逆相系カラムの両分離モードで分析した。また、保存状態での変化として、用事調整と各保存温度の違い(-80、10、38)で行なった(図 2)。

また、粉ミルクにメラミンが人為的に添加された場合、判断可能であるか検討を行なった。LC-MS にて、2 種の粉ミルク試料(標準試料、100 ppm メラミン混入試料)計 4 サンプルを HILIC モードおよび逆相系カラムの分離モー

ドで行った。それぞれのメラミン混入試料において未知物質として混入したメラミンのピーク ( $m/z$  127.03) を抽出し、HLIC モードおよび逆相系カラムの両分離モードで未知物質と設定した汚染の原因であるメラミンを検出することができた (図 3)。測定し得られたデータにおいて、統計的な解析である PCA を行った (図 3)。赤色及び緑のプロットがそれぞれの標準試料として、青及び黄色が未知汚染物質 (メラミン混入) である。PCA において粉ミルクの種類別だけでなく基準試料と汚染試料が明らかに判別可能であった。

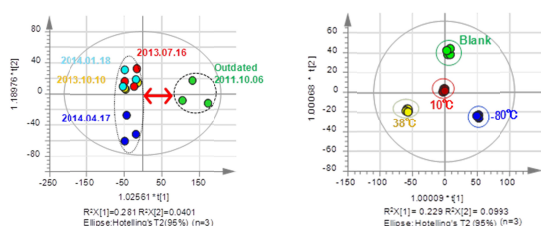


図 2 LC-MS による粉ミルク中の劣化指標の評価

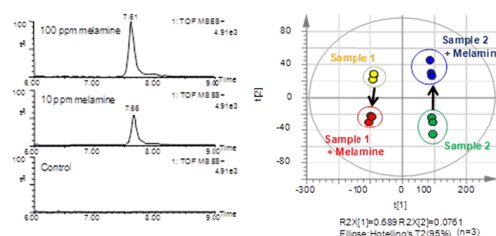


図 3 LC-MS による粉ミルク中のメラミン汚染の評価

本研究では、加工食品のフードディフェンスを目指したビッグデータ化モレキュラー解析の構築を実施した。加工食品 (粉ミルクなど) の製品の解析には、LC-MS を用い、数 ppm レベルにおいても検出することが可能であった。そのため、メラミンや農薬類、重金属、劣化のように外部から意図的に混入される恐れを未然に検知できた。今後は、さらに微生物などの想定外の汚染評価へ応用することを検討する必要がある。

## 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 3 件)

Nishitsuji, K., Xiao, J., Nagatomo, R., Umemoto, H., Morimoto, Y., Akatsu, H., Inoue, K., Tsuneyama, K. Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. *Sci. Rep.* 7/1, 15876 (2017) 査読有 DOI: 10.1038/s41598-017-16189-5

Inoue, K., Tanada, C., Hosoya, T., Yoshida, S., Akiba, T., Min, J.Z., Todoroki, K., Yamano, Y., Kumazawa, S., Toyo'oka, T. Principal component analysis of molecularly-based signals from infant formula contaminations using LC-MS and NMR in foodomics. *J. Sci. Food Agric.* 96, 3876-3881 (2016) 査読有 DOI: 10.1002/jsfa.7584

Inoue, K., Tanada, C., Sakamoto, T., Tsutsui, H., Akiba, T., Min, J.Z., Todoroki, K., Yamano, Y., Toyo'oka, T. Metabolomics approach of infant formula for the evaluation of contamination and degradation using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Food Chem.* 181, 318-324 (2015) 査読有 DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.117

〔学会発表〕(計 5 件)

Inoue, K., Nagatomo, R., Tanakda, C., Harada, S. "Principal component analysis of molecularly-based signals from infant formula contaminations using LC-MS in foodomics" PITTCON 2018 Conference & Expo. (2018)

長友涼介, 岡田泰毅, 筒井陽仁, 赤津裕康, 常山幸一, 井之上浩一: ピコリルアミン誘導体化法による短鎖脂肪酸の LC-ESI-MS/MS 分析法の開発: 腸内細菌叢への応用 第 30 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2017 年

井之上浩一, 棚田千尋, 秋場高司, 山野 裕, 豊岡利正: LC-MS オミクス解析による粉ミルク汚染の未然検知法の開発 第 111 回 日本食品衛生学会学術講演会, 2016 年

井之上浩一: LC/MS と多変量解析を利用した食品汚染の未然検知法の開発 2015 年度 関西衛生科学研究会 冬季研修・研究会, 2016 年

井之上浩一: フードミクスとは? 「食の安全から機能性探索までの応用」 ifia JAPAN2015 (第 20 回国際食品素材/添加物展・会議) / HFE JAPAN2015 (第 13 回ヘルスフードエキスポ), 2015 年

〔図書〕(計 3 件)

井之上浩一「HPLC, GC の測定条件設定テクニックと解析 事例集」技術情報協会, p. 190-192 (2016)

井之上浩一「月刊フードケミカル: フードミクスによる食品のリスクアセスメント」食品化学新聞社, p. 58-63 (2016)

Y Picó ( Editor): Inoue, K., Toyooka,  
T. “ Chapter 13: Foodomics ” Advanced Mass  
Spectrometry for Food Safety and Quality  
1st Edition. ELSEVIER p. 654-684 (2015)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者：

井之上 浩一 ( INOUE KOICHI )

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：30339519