

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460833

研究課題名(和文)放射線損傷塩基である5,6-ジヒドロチミジンを指標とした新規照射食品検知法の開発

研究課題名(英文) Determination of irradiation histories of foods using liquid chromatography and tandem mass spectrometry of 5,6-dihydrothymidine

研究代表者

高取 聡 (Takatori, Satoshi)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：90311480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射特異的にDNA中に生じる損傷ヌクレオシドである5,6-dihydrothymidine (dDHT) を検知指標とした食品の新規放射線照射履歴検知法を開発した。照射した牛生レバー等の食品からDNAを抽出し、ヌクレオシドに分解後、固相で精製した。試験液中のdDHT及びチミジン(Thd)をLC-MS/MSで測定した。照射試料特異的にdDHTの生成が認められ、DNA中のdDHTとThdの存在比を示す(dDHT/Thd)は、1～11kGyの範囲で線量依存的に増大した。本法は、DNAを抽出することが可能な食品に広く適用することが期待でき、照射食品の新たな検知法として有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：A method for detecting irradiation histories of foods including raw beef livers and shrimps was developed by measuring 5,6-dihydrothymidine (dDHT) using LC-MS/MS. Liver DNA was extracted using phenol-chloroform extraction followed by precipitation in 50% ethanol. DNA was then enzymatically digested and nucleosides were purified using an OASIS MCX column. dDHT and thymidine (Thd) contents of resulting test solutions were analyzed using LC-MS/MS. dDHT was detected specifically after gamma-irradiation. Concentration ratios of dDHT to Thd in the test solutions increased dose-dependently after irradiation at 1.0-11.3 kGy, which included the practical dose for sterilization of 2-7 kGy. Thus, this method is a candidate for the detection of irradiation histories of foods from which DNA can be extracted.

研究分野：食品衛生学

キーワード：照射食品 検知法 5,6-dihydrothymidine LC-MS/MS 生レバー

1. 研究開始当初の背景

【食品の殺菌方法としての放射線照射】

国民の食の安全を確保するために最も確実な方法は、危険な食品（例えば、病原菌で汚染された食品）を排除することである。平成 23 年 4 月に発生したユッケによる病原性大腸菌による集団食中毒事件を契機に生レバー（以下、レバー）のように、従来の衛生管理技術では完全な殺菌処理が不可能な食品に対する確実な殺菌方法として、ガンマ線あるいは電子線等の放射線（以後、放射線と略す）照射が着目されるようになった。厚生労働省は、上記集団食中毒事件を契機にレバー中の病原性大腸菌の分布を調査した。その結果、レバーでは病原性大腸菌による汚染が胆管を通じて内部まで及んでいることから、他の食肉部位のようにトリミング等の表面加工では病原菌の排除が困難であると判断され、その提供が禁止された。その一方、レバーの提供に対する国民の要望が強いことから、厚生労働省は、レバーに対する適切な殺菌方法の確立を条件に提供を解禁しうることに言及している。これにより放射線照射は、レバーに対する新たな殺菌方法として有望視されている。

食品への放射線照射は、加熱処理とは異なり、食品の品質をほとんど変えることなく殺菌、殺虫あるいは発芽抑制が可能である。このために 40 ヶ国を越える諸外国で、加熱殺菌処理によって品質の低下が避けられない香辛料の殺菌・殺虫や冷凍エビあるいは食肉の殺菌または根菜類の発芽抑制等に利用が認められている。世界保健機関は、食品への 10 kGy 以下の放射線照射は安全上問題がないとしている。我が国では、馬鈴薯の発芽防止のための照射が唯一認められているが、その流通量は極めて少ない。同時に馬鈴薯以外の放射線照射処理を受けた食品（照射食品）の流通も認められていない。しかし、国内でも上記の集団食中毒事件を契機にレバー等への放射線照射が認められる可能性がある。

【照射食品の検知法】

食品への放射線照射は、海外では広く適用が認められているのは上述のとおりである。検疫所における輸入時の細菌検査でほぼ無菌状態の冷凍エビ等が検知される事案があることから、既に照射食品が輸入されて流通している可能性も想定されている。これを受けて厚生労働省は、平成 19 年から 24 年にわたり、順次、照射食品の検知法を通知した。最新の通知には、(1) 熱ルミネッセンス (TL) 法、(2) アルキルシクロブタノン (ACB) 法及び(3) 電子スピン共鳴 (ESR) 法の 3 種類の方法が記載されている。これら検知法については、適用可能な食品に制約が多く、多様な食品への適用が困難な状況にあり、照射食品の検知システムが網羅されているとは言えない。上記のとおり集団食中毒を契機に食品の新たな殺菌方法として放射線照射が

表. 照射食品検知法（公定法）と開発した新規検知法（本法）の比較

検知法	試験法名	検知指標	適用可能な食品要件
公定法-1	TL 法	ケイ酸塩の熱発光	ケイ酸塩を含む
公定法-2	ACB 法	ACB	脂質を含む
公定法-3	ESR 法	ラジカルの生成	貝殻・結晶性の糖を含む
本法	dDHT 法	dDHT	DNA が抽出可能

注目されているが、生レバーは、3 種類の試験法の適用に求められる成分を十分に含んでおらず困難な食品のひとつである。多様な食品に適用可能な照射食品の新規検知法の開発は、社会的要求の高い重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、放射線照射時に細胞中の DNA 中に生成する特異的な損傷ヌクレオシドである 5,6-dihydrothymidine (dDHT) を新たな検知指標として着目し、多様な食品に適用可能な照射食品の新規検知法の開発を目的とした。DNA は、およそ普遍的に食品に含まれており、DNA 中のチミジン (Thd) 残基から生成する dDHT 残基 (図 1) を検知指標とした検知法を開発することで、現時点で適用が難しい食品についても照射履歴が検知可能になると期待した。食肉の照射履歴の検知には、放射線照射によって脂質から生成する ACB 法が適用される。しかし、レバーは、食肉の中でも脂質含有量が低い (レバーの脂質含有量は、3~4% 程度；生ハンバーグパテの脂質含有量は、15~20% 程度) ため、ACB 法の適用が困難である。dDHT を検知指標とする新規検知法は、脂質の含有量に影響されないため、レバーに対する最適な検知法になると考えた。

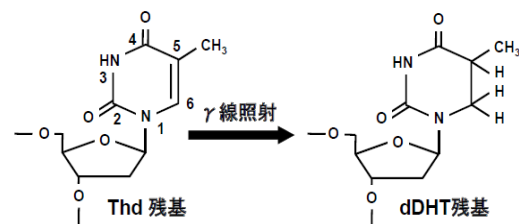


図 1. DNA を線照射することで Thd 残基の一部が dDHT 残基に変化する

3. 研究の方法

本研究では、食品中の残留農薬分析で広く使用されている LC-MS/MS 及び固相ミニカラムを使用した分析法とし、国内外の検査機関等でも実施可能な波及性のある検知法を開発することを目指した。従って、LC-MS/MS で検出可能な質と量を兼ね備えた dDHT を試料から得ることが鍵となる。検知法は、i) 試料からの DNA 抽出・精製、ii) DNA からヌクレオシドへの分解及びその精製、iii) 機器分析による定性及び定量から構成される。上記を満たすよう、工程ごとに

検討した。従来の検知法で分析が困難であり、また国内事情を鑑みてレバー及びエビへの適用を優先して検討した。なお、各試料には、コバルト 60 を線源とした線（計画線量：0~11 kGy）を -20 で照射し、DNA 抽出まで -20 で保存した。当該計画線量には食肉の殺菌を目的とした実用線量（2~7 kGy）が含まれる。実際に照射された線量は各試料表面に貼りつけたラジオクロミックフィルムの感光度で測定した。

4. 研究成果

1) LC-MS/MS での分析条件の構築

LC-MS/MS は 4000QTRAP (Sciex) を使用し、分析カラムには Acquity HSS T3 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm; Waters) を使用した。移動相には 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液と 0.5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液を使用した。インターフェイスには、ESI (electrospray ionization) のポジティブモードを使用した。dDHT 及び Thd の定量下限は、それぞれ、0.6 及び 1 ng/mL であった。dDHT は 5 位に不斉炭素を有するため、R 体及び S 体の異性体が存在し、クロマトグラフ上では、2 本のピークとして検出された（図 2; X）。

2) Thd の照射による dDHT の生成

基礎検討は、凍結した 1 mg/mL の Thd 水溶液を照射した試料を用いた。非照射の Thd 溶液中には dDHT は検出されなかった。一方、線照射した Thd 溶液中には、線量依存的に dDHT の生成が認められた。R 体及び S 体の生成比率は概ね 1:1 であった。6.9 kGy 照射時の dDHT 濃度は、510 ng/mL であり、Thd に関しては、0.97 mg/mL であった。照射時の Thd 溶液中の dDHT 及び Thd の濃度比（dDHT/Thd）は、照射線量と共に増加し、線量依存曲線として示すことが可能であった。また、各線量における dDHT 生成にかかる G 値の平均値は、 2.8×10^{-3} であり、既報に類似する値であった。また、生成した dDHT のプロダクトイオンスキャンのスペクトラムは標準品と一致しており、Thd 溶液の線照射により dDHT が生成することが確認された。

3) DNA の照射による dDHT 残基の生成

サケ精巢由来 DNA 溶液（5 mg/mL）を線照射した。照射した DNA は常法によりヌクレオシドに酵素分解した。分解液中に含まれる dDHT 及び Thd 以外のヌクレオシドは、LC-MS/MS 分析における妨害成分となるため OASIS MCX カラムにより除去した。なお、OASIS MCX カラムによる dDHT の回収率は約 70% であった。また、Thd の代替として添加した 5-ethyl-2'-deoxyuridine の回収率は 100% であった。非照射の DNA 中に dDHT の生成は認められなかった。一方、照射した DNA 中には dDHT が線量依

存的に生成していた。DNA を照射した際の dDHT の生成効率は、Thd 溶液のおよそ 1/4 であった。また、R 体及び S 体の生成比率は概ね 3:7 であった。また、生成した dDHT スペクトラムは標準品と一致しており、DNA 溶液を線照射することにより、DNA 中に LC-MS/MS で検出可能な量の dDHT 残基が生成することを確認した。

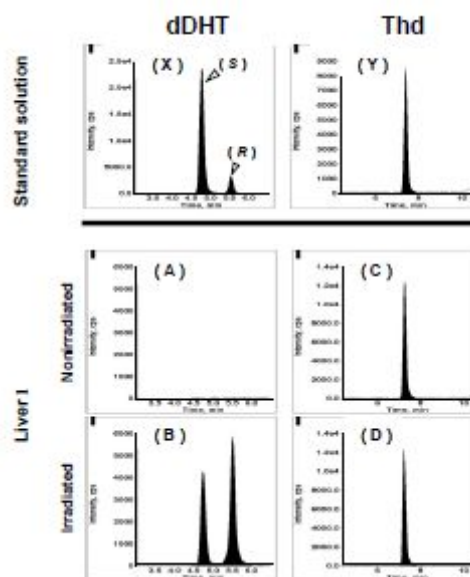


図 2. LC-MS/MS 分析結果 (MRM) の例 (X, A 及び B): dDHT (m/z , +245 > +117) (Y, C 及び D): Thd (m/z , +243 > +127) (X) dDHT 標準品溶液 (20 ng/mL); (Y) Thd 標準品溶液 (20 ng/mL); (A 及び C) 非照射レバー (検体 1); (B 及び D) 11 kGy 照射レバー (検体 1)

4) レバーの照射による dDHT の生成

レバーから DNA を抽出するために動物組織用 DNA 抽出キットを使用した。dDHT の検出に必要な DNA の収量に満たなかった。また、夾雑成分の残存も認められた。収量上の問題を解決するためスケールアップが容易なフェノール・クロロホルム抽出法を適用した。レバーからフェノール・クロロホルム抽出法により DNA を抽出した結果、必要な収量は確保したものの、夾雑物が残存しており、DNA からヌクレオシドへの分解効率の低下が認められた。そこで 50% 濃度でエタノール沈殿操作を行い、夾雑成分を除去した。精製した DNA をヌクレオシドに分解して OASIS MCX カラムによる精製工程を経て試験液とし、LC-MS/MS で分析した。非照射のレバー中に dDHT の生成は認められなかった。一方、照射したレバー中には dDHT が照射特異的に生成していた（図 2; A 及び B）。試験液中の Thd 濃度に対する dDHT 濃度の比（dDHT/Thd）は、DNA 中の dDHT 残基の Thd 残基の存在比を示し

ており、これを線量 (0 ~ 11 kGy) に対してプロットした結果、明確な線量依存性を示していた (図 3)。また、異なる個体由来するレバーにおいても線量依存曲線は、ほぼ重なっており dDHT/Thd は堅牢な検知指標であることが示唆された。これは、dDHT の生成について Thd に対する存在比で表現することで DNA からヌクレオシドへの分解効率に影響されないことに起因すると考えられ、このことは当該検知指標の利点である。また、同一のレバーについて照射直後と -20 で 7 ヶ月保存後にそれぞれ DNA を抽出して dDHT/Thd を比較した結果、概ね一致しており、dDHT/Thd は凍結保存下で少なくとも半年は安定であると考えられた。LC-MS/MS における dDHT の定量下限からレバーにおける最小検知可能線量は 0.5 ~ 1 kGy と考えられた。また、食肉についてはレバーのみならず、線照射したミンチの検知も可能であった。本法は、広く食肉の照射履歴の検知に有用であると考えられた。

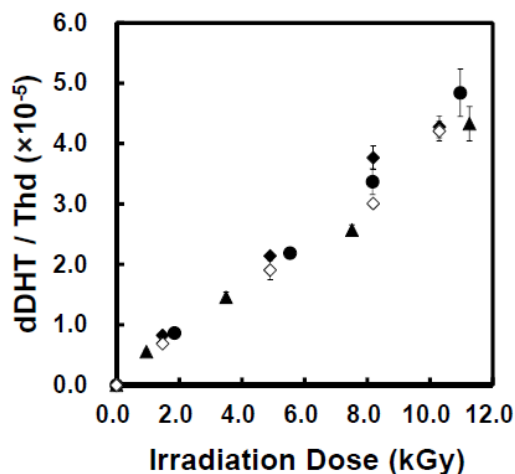


図 3. 照射レバーにおける線量依存曲線
横軸;照射線量・縦軸;DNA 中の dDHT/Thd
, 検体 1; , 検体 2; , 検体 3; , 検体 4
(7 ヶ月間冷凍保管保存後に測定)

各点は、3 回の実験 (DNA の酵素分解以降) の測定値の平均

5) 食肉以外の食品への応用

冷凍エビは、海外で放射線照射による殺菌が高頻度に行われている食品のひとつである。その照射履歴の検知には、TL 法が適用される。本法の適用には、試料に付着するケイ酸塩の回収が必要であり、これが回収できなければ適用は困難である。また、ケイ酸塩は食品本体ではないので、意図してこれを除去すれば照射履歴の偽装も可能と考えられるため、レバーと同様に新たな検知法の開発が望まれる。そこで本法の適用検討を行った。冷凍ブラックタイガーエビを対象に評価した結果、非照射のエビ中には dDHT の生成が認められず、一方で照射したエビ中には dDHT が線量依存的に生成していた。線量

(0 ~ 11 kGy) に対して dDHT/Thd をプロットした結果、明確な線量依存性を示していた。このことから、本法は冷凍エビの照射履歴の検知にも適用可能であることが分かった。

6) ACB を指標とした簡便な検知法との比較

dDHT を指標とした新規検知法と既存の検知法との比較は、その性能評価を行う上必要である。脂質を多く含む食肉に対しては放射線照射により脂質から特異的に生成する ACB を検知指標とした検知法が公定法として確立されている。これを比較対象の検知法とした。しかし、公定法ではソックスレーを用いた脂質抽出工程を含むため、分析時間を要しかつ併行処理可能な試料数も限られる。このため独自に改良法を考案した。改良法では、試料の水分を珪藻土に吸収させた後、ヘキサンで抽出した後、ヘキサンを除去して脂質を回収した。ACB は、脂溶性が高いため当該脂質中に抽出されている。この脂質の一部をアセトンに溶解した後、アセトニトリル存在下で冷凍して脂質の大部分を除去した。最後にパスツールピペットにシリカゲルを充填した簡易カラムで精製した後、GC-MS で測定した。本法は、多数の検体を併行処理可能であり、その検知下限は 1 kGy 以下であり、dDHT を指標とした新規検知法の比較対象として相応しいと考えられた。

両方法の比較は、1 ~ 11 kGy 照射したミンチ肉で行った。双方の検知法において非照射試料から各検知指標は検出されなかった。また、これら両検知指標は、パラレルに線量依存的に増加した。このことから、dDHT は、確立された検知指標である ACB と明確な相関関係が認められ、新たな検知指標として有用であると考えられた。

7) 今後の課題

本法について、香辛料等の植物性食品への適用が今後の重要な課題である。植物細胞には細胞壁が存在するため、抽出に先立ちこれを破壊する必要がある。液体窒素凍結下で粉碎装置を適用した。dDHT の検出を目的とした DNA の収量を得るための出発試料を粉碎するために長時間を要した。また、香辛料では色素及び食物繊維が夾雑成分として多く残存し、回収した DNA の質も低い状態に留まった。これを解決するために細胞壁分解工程に塩化ベンジル法を適用し、多検体の併行処理が可能となった。また、精製工程には、DNA 選択的に保持が可能な固相の活用で解決を図りつつある。

また、加工食品への適用も課題として挙げられる。照射食品を加工した場合、試料から DNA が逸脱または分解することで検知が困難になることが考えられる。このため、より少量の DNA で測定できるよう、本法の高感度化は重要である。放射線照射に対する特異性は dDHT よりも劣ると考えられるものの、生成量が多いと期待される thymidineglycol

及び 5-formyl-2'-deoxyuridine 等の他の損傷ヌクレオシドを第二の検知指標として導入することも有効と考えている。これら dDHT を補う検知指標を導入することが可能になれば検知法の感度のみならず精度の向上も期待できる。

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2件)

Kitagawa Y., Okihashi M., Takatori S., Kajimura K., Obana H., Furuta M., Nishiyama T.; A Rapid and Simple Method for the Determination of 2-Alkylcyclobutanones in Irradiated Meat and Processed Foods: Food Analytical Methods, 7, 1066-72 (2014)

北川陽子、起橋雅浩、高取聡、福井直樹、梶村計志、尾花裕孝、古田雅一、常温保存下における照射レトルト牛丼中 2 - アルキルシクロブタノンの安定性について、食品照射，査読有，49，3-8 (2014)

[学会発表](計5件)

北川陽子、起橋雅浩、福井直樹、高取聡、梶村計志、尾花裕孝、西山利正、古田雅一、2 - アルキルシクロブタノンを指標とした食品の照射履歴の簡易分析法の検討、第 49 回日本食品照射研究協議会教育講演会、2013、東京

起橋雅浩、北川陽子、高取聡、梶村計志、尾花裕孝、古田雅一、照射試料を用いた 2 - アルキルシクロブタノン測定における技能試験、第 105 回 日本食品衛生学会 学術講演会、2013、東京

北川陽子、起橋雅浩、高取聡、梶村計志、尾花裕孝、西山利正、古田雅一、簡易分析法による照射生レバー中 2 - アルキルシクロブタノンの測定、第 105 回日本食品衛生学会学術講演会、2013、東京

福井直樹、高取聡、北川陽子、起橋雅浩、石川悦子、藤山貴友、古田雅一、梶村計志、尾花裕孝、放射線損傷塩基である 5,6-

ジヒドロチミジンを指標とした新規照射食品検知法の開発、第 110 回日本食品衛生学会学術講演会、2015、京都

高取聡、福井直樹、北川陽子、起橋雅浩、梶村計志、古田雅一、尾花裕孝、5,6-ジヒドロチミジンを指標とした新規照射食品検知法の開発、第 52 回全国衛生化学技術協議会年会、2015、静岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高取 聡 (TAKATORI Satoshi)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：90311480

(2) 研究分担者

起橋 雅浩 (OKIHASHI Masahiro)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：60250312

北川 陽子 (KITAGAWA Yoko)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：20280836

福井 直樹 (FUKUI Naoki)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：90516717

(3) 連携研究者

古田 雅一 (FURUTA Masakazu)

大阪府立大学・地域連携研究機構・放射線研究センター

教授

研究者番号：40181458