

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：84407

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07502

研究課題名(和文)ジヒドロチミジンを指標とした新規照射食品検知法の実用化に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Study for the realization of a new detection method for irradiated foods by measuring 5,6-Dihydrothymidine

研究代表者

藤原 拓也 (Takuya, Fujiwara)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・研究員

研究者番号：70783819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射により特異的に DNA 中に生じる損傷ヌクレオシドである5,6-dihydrothymidine (DHdThd) のチミジン (dThd) に対する比率 (DHdThd/dThd) を測定することにより、電子線照射食品の検知が可能であった。DHdThd の生成効率は線源によらず概ね一致していた。また、検知指標とする DHdThd/dThd は、試料(牛レバー)の長期保存(冷凍下4か月)前後あるいは加熱調理前後での変動は僅少であり、堅牢な検知指標であることが認められた。DHdThd には5R-および5S-異性体が存在するが、その異性体の生成比は照射温度に影響される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The method for determination of irradiation histories of foods by measuring the ratio of sum of 5R- and 5S-5,6-dihydrothymidine to thymidine (total-DHdThd/dThd) in DNA as a marker was applicable to electron beam (EB) irradiated foods as  $\gamma$ -irradiated foods. The production efficiency of DHdThd to irradiation dose was similar between the EB and the  $\gamma$ -irradiated samples. The total-DHdThd/dThd in irradiated samples was stable during the storage for 4 months at -20 °C and process of heating as cook. Thus, the total-DHdThd/dThd would be a rugged marker for determination for irradiation history of foods. The isomer ratio of 5R- and 5S-DHdThd may be sensitive to the temperature of sample irradiation, although further studies would be required.

研究分野：食品化学

キーワード：食品 食品照射 放射線 電子線 質量分析 LC-MS/MS

## 1. 研究開始当初の背景

### 【照射食品検知の現状】

食品に対する放射線照射は、殺菌等を目的として、主に国外において香辛料や食肉等、幅広い食品に対して行われている。一方、国内においては、現在のところジャガイモの芽止めを目的とした $\gamma$ 線照射のみが認められている。しかし、生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困難な食品に対する処理方法として放射線照射は有望視されており、今後国内においても適用が拡大する可能性もある。また、輸入食品等を通して照射食品が国内に既に一部流通している可能性も指摘されている。そのような状況下において、食品への照射を適切に評価・運用し、消費者の知る権利を確保するためには、その照射履歴の検知が不可欠である。現在、厚生労働省は食品の照射履歴の検知法として、熱ルミネッセンス法(TL法)、アルキルシクロブタン法(ACB法)、電子スピン共鳴法(ESR法)の3法を通知法として定めており、検疫所等での検査が行われている。しかし、現在の通知法は検査法の特長から、特定の成分を含む試料にしか適用できないという課題を抱えている。例えば、TL法はケイ酸塩を含む試料、ACB法は脂質を含む試料、ESR法は貝殻・結晶性の糖を含む試料を対象としている。そのため、様々な食品に幅広く適用できる新規検知法の開発が求められている。

### 【損傷ヌクレオシドを指標とした新規照射食品検知法の開発】

前述の課題を解決するため、我々は放射線照射によりDNA中のチミジン(dThd)から生成する損傷ヌクレオシドである5,6-ジヒドロチミジン(DHdThd)に着目し、DHdThdを指標とした新たな照射食品検知法(以下、DHdThd法)を開発した。DNAは幅広い食品中に含まれるため、DHdThd法は多様な食品に適用できる照射食品検知法に成り得る。また、農薬分析などで多用されるLC-MS/MSを利用して検知を行うため、普及性が期待できる手法である。 $\gamma$ 線を照射したレバー、牛肉、エビ等へのDHdThd法の適用性について、我々は既に立証している。将来的な実用化を見据え、その基盤となる各種の検討を更に進めているところである。

## 2. 研究の目的

DHdThd法の実用化に向け、その幅広い適用性と頑健性を検証するため、下記検討を行う。

### 1) 電子線照射食品に対するDHdThd法の適用性

食品照射線源としては、 $\gamma$ 線の他に電子線(electron beam; EB)も用いられている。EB照射には、遮蔽の容易さ、照射時間の短さ等の利点があり、工場設備に組み込みやすく近年注目されている。実際に米国で食肉の殺菌等に実用化され始めるなどしている。この実情をふまえ、EB照射試料に対して本法による検知を試み、 $\gamma$ 線照射試料との比較を行い、

その適用性を検討した。

### 2) DHdThd法の安定性・頑健性に関する検討

実際に流通食品に対して水際で検知を行う際には、加熱調理された試料や照射後に長期に渡り冷凍保管された試料からも検知を行える必要がある。照射後に長期冷凍保管した試料および加熱した試料に対して本法による検知を試み、加熱調理後、および長期冷凍保管後の本法による検知の適用性について検討した。

### 3) その他の検討

その他、DHdThd法の実用化に向けて、DNA抽出・精製手法の改良、香辛料等他の食材への本法の適用可能性の検討等を行った。

## 3. 研究の方法

牛レバーを大阪市内の小売店3店舗から購入し(検体1, 2, 3)、EBもしくは $\gamma$ 線照射用試料として分割し、それぞれ照射した(計画線量:0~11kGy)。試料はEBの透過性を考慮し、2cm程度に成型した。EB照射は企業に委託し、出力10MeVの電子加速器で片面照射した。 $\gamma$ 線照射は大阪府立大学のコバルト60照射施設にて行った。照射中、試料は-20℃を目安として冷却しながら照射し、DNA抽出まで冷凍保管した。吸収線量についてはラジオクロミックフィルムの感光度から算出した。

照射後、試料からヨウ化ナトリウムを用いてDNAを抽出した。その後、DNA 200 $\mu$ gに対してPI Nuclease、Alkaline phosphatase および Snake venom phosphodiesterase I を用いてヌクレオシド単位に分解し、LC-MS/MS(AB Sciex 4000 QTRAP)を用い、DNA中のdThdに対するDHdThdの存在比率(DHdThd/dThd)を算出した。

## 4. 研究成果

### 1) 電子線照射食品に対するDHdThd法の適用性

#### 【電子線・ $\gamma$ 線照射時の比較】

EB照射した牛レバー試料3種類全てにおいて、 $\gamma$ 線照射時と同様に、DHdThdの照射特異的な生成とDHdThd/dThdの線量依存的な上昇が認められた(図1)。DHdThd/dThdの値は吸収線量が近ければ線源の種類によらず類似した値となった。以上のことから、本法はEB照射試料に対しても適用可能であると考えられた。

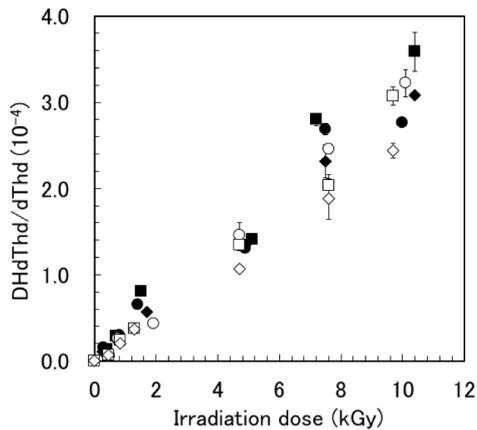


図 1. 照射レバーにおける線量依存曲線  
横軸;照射線量・縦軸;DHdThd/dThd  
●, 検体 1 (EB); ○, 検体 1 (γ線); ■, 検体 2 (EB); □, 検体 2 (γ線); ◆, 検体 3 (EB); ◇, 検体 3 (γ線)  
各点は、DNA の酵素分解以降を 3 併行で行った測定値の平均

2) DHdThd 法の安定性・頑健性に関する検討  
【冷凍保管試料に対する適用性】

照射後 4 ヶ月以上試料を冷凍保管し、その後 DNA を抽出して本法による検知を行った。照射後数日以内に DNA を抽出した場合と比較したところ、DHdThd/dThd はほとんど変化せず、線量依存性が保たれていた。以上より、本法は長期間の冷凍保管に対して安定的な手法であることが考えられた(図 2)。

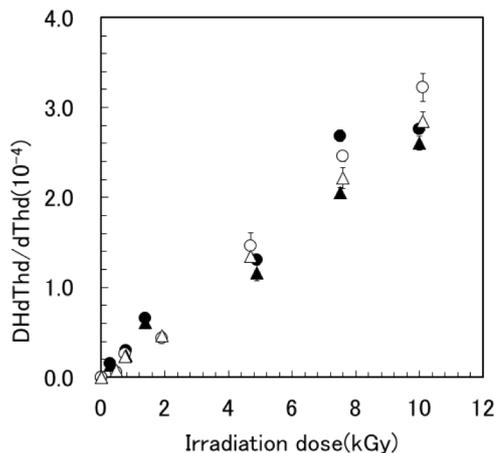


図 2. 長期冷凍保管後の安定性  
横軸;照射線量・縦軸;DHdThd/dThd  
●, 検体 1 (EB, 照射 6 日後); ○, 検体 1 (γ線, 照射 6 日後); ▲, 検体 1 (EB, 照射 128 日後); △, 検体 1 (γ線, 照射 127 日後); ●○は図 1 の再掲  
各点は、DNA の酵素分解以降を 3 併行で行った測定値の平均

【加熱試料に対する適用性】

照射試料を、一般的に食中毒を防ぐために

用いられる食品加熱条件である 75°C 1 分間以上を満たすよう加熱し、その後本法による検知を行った。その結果、加熱によって dThd 収量および DHdThd 収量がともに同程度低下し、結果として DHdThd/dThd はほとんど変化せず、線量依存性が保たれていた(図 3)。よって、DHdThd/dThd を指標にした本法は食品の加熱により影響されにくい手法であることが示唆された。

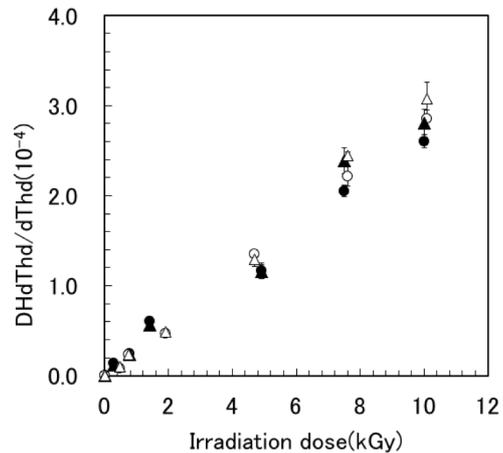


図 3. 加熱調理後の安定性  
横軸;照射線量・縦軸;DHdThd/dThd  
●, 検体 1 (EB, 非加熱); ○, 検体 1 (γ線, 非加熱); ▲, 検体 1 (EB, 加熱); △, 検体 1 (γ線, 加熱); ●○は図 1 の再掲  
各点は、DNA の酵素分解以降を 3 併行で行った測定値の平均

【照射温度の影響について】

EB・γ線照射牛レバー試料において、DHdThd/dThd は類似した線量依存性を示したが、照射した放射線の種類により DHdThd の 2 種類の異性体 (5R-または 5S-DHdThd) の生成比率に相違が見られた(図 4)。

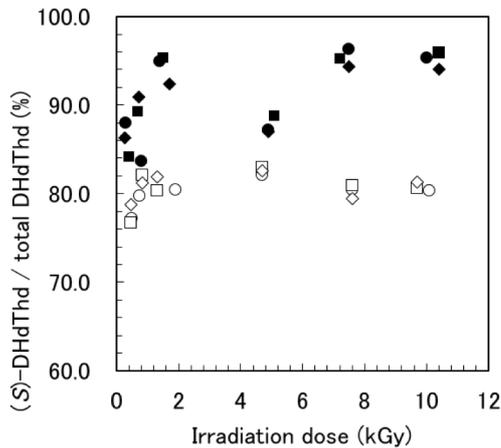


図4. EB・γ線照射時の異性体比  
横軸;照射線量・縦軸;DHdThd中のS体比率  
●, 検体1(EB); ○, 検体1(γ線); ■, 検体2(EB); □, 検体2(γ線); ◆, 検体3(EB); ◇, 検体3(γ線)

この原因として、照射時の試料温度の影響が考えられた。その影響について検討するため、試料を異なる4段階の温度条件下で照射(上層)し、同時に照射した-20℃冷却群(下層)とDHdThd/dThd及び異性体の比率を比較した(図5)。その結果、DHdThd/dThdに関しては温度の影響は見られなかったが(図6)、異性体比については、-20℃よりも試料温度が高い場合、S体の比率が低下した(図7)。詳細についてはより厳密な検討が必要であるが、この結果から、DHdThdの中間体の生成については温度の影響を受けにくいものの、中間体からS体もしくはR体が生成するプロセスについては、温度に対して高い感受性を持つ可能性が考えられた。

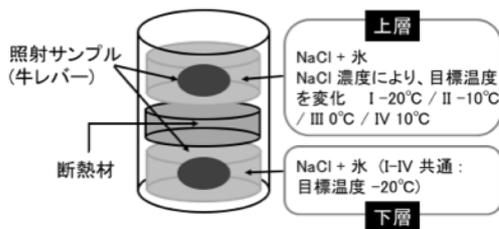


図5. 温度変化比較試験の概要

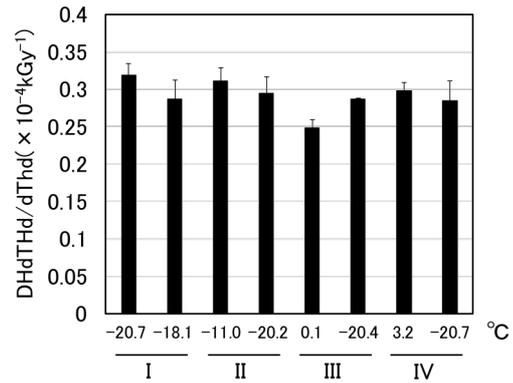


図6. 照射温度とDHdThd / dThd

温度は、照射開始時と終了時に中心温度計で測定し、その平均値を照射温度とした。各棒は、DNAの酵素分解以降を3併行で行った測定値の平均。

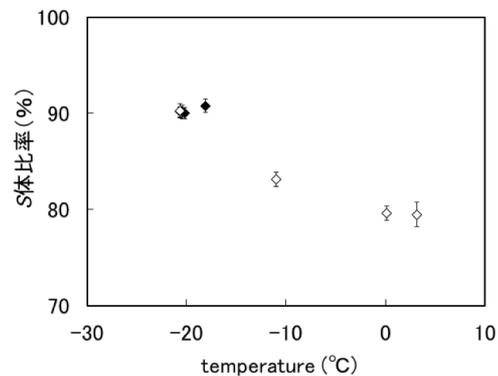


図7. 照射温度と異性体比

横軸;照射温度・縦軸;DHdThd中のS体比率

◆, 下層(対照群); ◇, 上層(温度変化群);

温度は、照射開始時と終了時に中心温度計で測定し、その平均値を照射温度とした。各点は、DNAの酵素分解以降を3併行で行った測定値の平均。

### 3) その他の検討

レバー試料からのDNA抽出については、カオトロピック剤としてヨウ化ナトリウムを用いることで収量の増加、抽出時間の短縮を図ることができた。さらに市販抽出キットによりDNAを抽出しDHdThdを検出できるとともに、一部の香辛料への適用も可能であった。

### 【今後の課題】

今回の検討により、日本での将来的な食品照射候補食材の一つである牛生レバーについて、本法による照射検知が有用であることが考えられた。また、多くの国で照射が実施されている香辛料について、一部の香辛料からDNAを抽出しDHdThdを検出できた。収量の向上等課題は残されているものの本法の香辛

料への応用が今後期待できる成果が得られた。一方、本法の実用化に向けてはさらなる検討が必要と考えられる。具体的には、牛以外のレバーに対する検知性能の確認や、加熱以外の調理後試料からの DHdThd 検出、DNA 抽出・精製方法の改良による迅速化、複数機関による共同試験の実施などである。

また、今までの検討の結果、本法は高い照射特異性と明確な線量依存性を持つことが確認できた。本法の応用として、DHdThd/dThd の値から照射線量を推定できる可能性がある。より詳細な検討を行うことで、照射線量推定の実現性について検討する。

また、EB および  $\gamma$  線以外の食品照射線源として、X 線および低エネルギー電子線の利用も増加している。試料にこれらの照射を実施し、本法による検知を試みる。

## 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 1 件)

- ① Naoki Fukui, Satoshi Takatori, Yoko Kitagawa, Takuya Fujiwara, Etsuko Ishikawa, Takatomo Fujiyama, Keiji Kajimura, Masakazu Furuta, Hirotaka Obana: Rapid and Reliable Method for Determining Irradiation Histories of Ground Beef and Prawns by Measuring 5,6-Dihydrothymidine: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65, 9342-9352(2017)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 福井直樹、高取聡、北川陽子、藤原拓也、起橋雅浩、石川悦子、藤山貴友、梶村計志、古田雅一、尾花裕孝、放射線損傷ヌクレオシドである 5,6-ジヒドロチミジンを指標とした照射食品検知法の開発、日本食品照射研究協議会第 52 回大会、2016、東京
- ② 福井直樹、藤原拓也、北川陽子、高取聡、石川悦子、藤山貴友、梶村計志、古田雅一、尾花裕孝、放射線損傷ヌクレオシドである 5,6-ジヒドロチミジンを指標とした照射食品検知法の開発、第 54 回アイソトープ・放射線研究発表会、2017、東京
- ③ 藤原拓也、福井直樹、高取聡、石川悦子、藤山貴友、梶村計志、古田雅一、放射線損傷ヌクレオシドである 5,6-ジヒドロチミジンを指標とした照射食品検知法の電子線照射食品への適用性、第 113 回日本食品衛生学会学術講演会、2017、東京
- ④ 藤原拓也、福井直樹、高取聡、石川悦子、藤山貴友、梶村計志、古田雅一、放射線損傷ヌクレオシドである 5,6-ジヒドロチミジンを指標とした照射食品検知法

の開発(電子線照射食品への適用)、第 53 回日本食品照射研究協議会研究発表会、2018、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 拓也 (FUJIWARA Takuya)

地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・研究員

研究者番号：70783819