

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19677

研究課題名(和文) DNA損傷を指標とした食品に照射された放射線の検出

研究課題名(英文) Nobel detection method for irradiated food based on DNA damages

研究代表者

清水 喜久雄(Shimizu, Kikuo)

大阪大学・放射線科学基盤機構附属ラジオアイソトープ総合センター・准教授

研究者番号：20162696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：食品に殺菌や鮮度保持を目的として放射線を照射する場合がある。この食品照射法は海外で主に用いられ、日本では発芽抑制のためのジャガイモへの照射を除き、食品への放射線照射は食品衛生法で禁止されている。輸入等で国内に持ち込まれた食品のうち、照射による滅菌等が禁止されているものについて、照射が行なわれたかを検査する技術について開発が進められている。

この研究では、食品に含まれるDNAの損傷の量をPCR法で測定することにより食品照射の有無を判定する方法の開発を行った。肉類についてPCR法で必須のプライマーの設計を行い、本法が十分に実用的であることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品照射は世界的には、肉類、香辛料など広範囲に行われている。現在日本ではジャガイモの出芽抑制にのみ実施されている。しかしながら、今後、日本に置いても食品照射が広く実施される可能性がある。本研究は食品照射が行われたか否かを速やかに簡単に実施する方法を開発するものである。本法は多くの食物に適応可能である。2年間の研究で食品照射で用いられる数Gyの線量は容易に検出できることが確認できた。また牛肉類の対しては適応可能な増幅プライマーの作成もでき、次のステップの足がかりがえられた。今後、この成果を元に、肉類全般に使用できる汎用プライマーの作成や、香辛料からのDNA抽出法の開発を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：From common meat foods, raw beef and beef jerky and raw pork were selected. Each g of food was irradiated with gamma rays up to 10 kGy using a cobalt 60 gamma ray source. DNA extraction / purification was performed from the irradiated sample. Real-time PCR was carried out using the purified DNA diluted with TE buffer to 0.01 µg / µl as a template DNA sample. It was revealed that the proportion of intact DNA in both beef and beef jerky decreased as the absorbed dose of gamma rays increased. The slopes of absorbed dose and proportion of undamaged template DNA were different between beef and beef jerky, indicating that DNA of beef tended to be relatively undamaged by gamma irradiation. On the other hand, the result of the PCR reaction was not obtained for raw pork (produced in Japan). The primers in study 1 may not be able to be amplified except in cattle. It is considered that the development of universal multi-primer must be done separately.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：食品照射 PCR法 DNA損傷

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品に殺菌や鮮度保持を目的として数キログレイレベルの放射線を照射する場合がある。これを放射線照射食品という。海外で主に用いられ、今後、日本への流通ルートに乗ることも考えられる。一方で、日本では発芽抑制のためのジャガイモへの照射を除き、食品への放射線照射は食品衛生法で禁止されている。平成 19 年 7 月 6 日に食安発第 0706002 号「放射線照射された食品の検知法(TL 試験法)」が通知され、輸入モニタリング検査が開始され、平成 24 年 9 月 10 日に食安発第 0910 第 1 号「放射線照射された食品検知法」が通知され、照射食品検知法に電子スピン共鳴(ESR)法が追加された。

これら従来法では、測定の対象となるラジカルおよび硫酸塩が食品内もしくは表面に保存されていることが条件であった。これらは長期の保管や洗浄によって失われた場合、正しく照射の有無を評価することはできない。また、ESR 法や TL 法では、高価な装置が必要であり(五百万円～一千万円/1 システム)、照射食品の検査を行なう機関が限定的であった。

そこで我々は、生物が共通して持つ DNA が照射を受けた際に生成する DNA 切断を指標として、食品に照射された放射線の照射履歴を分子生物学的に検出する手法を開発する。具体的には、照射が疑われる食品(食肉、香辛料)から DNA を抽出して、定量 PCR 法により無傷の DNA 量を定量し、食品照射の検知に応用するものである。DNA は食品を構成する細胞に含まれるものであり、洗浄等によって失われることがない。また、食肉類や香辛料のように、加工前の食品はその製品としての性質上、状況は新鮮に保たれており、細胞は保存されていると考えられる。

2. 研究の目的

食品に殺菌や鮮度保持を目的として数キログレイレベルの放射線を照射する場合がある。これを放射線照射食品という。食品照射法は海外で主に用いられ、日本では発芽抑制のためのジャガイモへの照射を除き、食品への放射線照射は食品衛生法で禁止されている(久米民和、放射線と産業, 114 号, pp. 51-54, 2007.)。輸入等で国内に持ち込まれた食品のうち、照射による滅菌等が禁止されているもの(以下、照射食品)について、照射が行なわれたかを検査する技術について開発が進められている。照射食品を検出するための従来法として、ESR(電子スピン共鳴)法などがある。ESR 法は、迅速かつ定量的に、測定対象の食品内もしくは表面に保存されているラジカルのスペクトルから、照射済食品の吸収線量を評価するものであり優れた方法である。一方、ESR 法には、食品の長期の保管や洗浄によってラジカルが失われる場合や、ESR 装置が高価であるなどの課題がある。そこで、これら既存の方法と併用可能であり、別の原理に基づく照射食品の検出方法を開発することを目的として、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)による照射食品の検出について検討した。

3. 研究の方法

PCR とは、DNA 分子の特定の領域または全体を、さまざまな DNA ポリメラーゼを利用して量的に増幅する手法のことである。PCR 法の原理から、鋳型となる DNA に放射線照射による損傷があれば、ポリメラーゼ連鎖反応を阻害すると考えられる。すなわち、ポリメラーゼ連鎖反応での DNA 合成効率から、鋳型として機能する未損傷の DNA 量を評価できると考えられる(図 1)。

食品のモデルとして、感想したオーストラリア産牛肉(ビーフジャーキー、以後サンプル B)および熟加工済みの国産豚肉(ロースハム、以後サンプル P)を用いた。大阪大学産業科学研究所のコバルト 60 を用い、食品サンプルに γ 線を 5kGy、10kGy 室温照射した。照射後、QIAGEN 社の DNA 精製キットを用いて、食品サンプルから DNA を精製し、TE 緩衝液で 4ng/ μ l となるように希釈した。サンプル B およびサンプル P について、1well あたり 4 ng の DNA に対し、リアルタイム PCR を行い、鋳型として機

能する未損傷の DNA 量を評価した。リアルタイム PCR の際の蛍光色素として iQ™ SYBR® Green スーパーミックス (Bio-Rad)を用いた。DNA 量の評価には、Bio-Rd 社、DNA 定量ソフトウェア CFX Manager™を用いた。

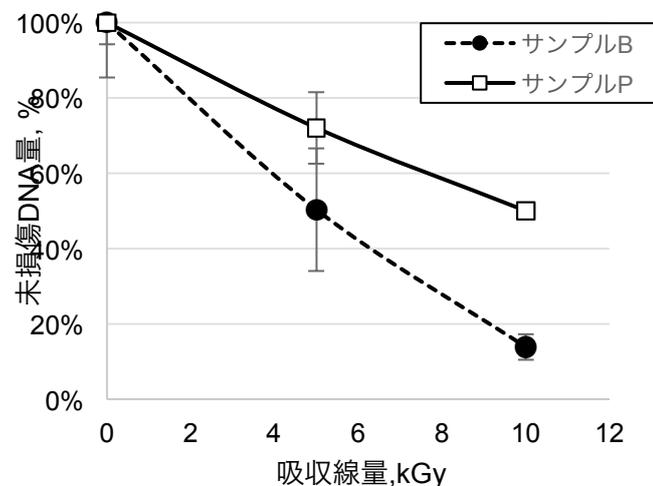
4. 研究成果

図 2 にリアルタイム PCR による照射食品内の鋳型として機能する未損傷の DNA 量を示す。5kGy、10kGy のガンマ線照射によりサンプル B およびサンプル P ともに未損傷 DNA は低下し、10~20%程度に減少することが明らかとなった。10kGy では有意に 0Gy(未照射)と差があり、照射済食品を識別できることが示された。一方で、通常の DNA 鎖へのガンマ線の二本鎖切断の収量から考えると、図 2 の結果は DNA 鎖切断頻度が低いと考えられる。これは、本研究で対象とした食品サンプルがすでに加工済みであり、未照射の時点でも DNA が切断していたことが理由として挙げられる。

本手法の課題としては、実際に使用する現場を想定した場合、未照射のサンプルをどのように定義するかを考える必要がある。ひとつの解決法として、アルカリ反応や DNase(DNA を切断する酵素)により DNA を化学的に切断し、その追加の DNA 切断による未損傷の DNA 量の差分を評価することで、照射線量を評価する方法は有効であるかもしれない(すなわち、照射食品の DNA であれば、このような化学処理による未損傷 DNA の減少の幅が少なく、未照射食品との差が明確になると考えられる。また、PCR の領域を工夫する事で照射食品特有の DNA 切断を評価することが可能であるかもしれない。本実験では 200bp 程度の領域を増幅領域としたが、このほかに 150bp、100bp の利用域もそれぞれ PCR を行い、DNA 合成量を評価する。放射線による DNA 損傷はポアソン分布に従うランダムな反応であるため、DNA 合成する領域が大きくなればそれだけ PCR 反応は阻害されることが予想される。一方、未照射の食品の DNA であれば、PCR の領域によらず一定の DNA 合成が可能となる。すなわち、PCR の領域(DNA の長さ)に依存する結果が得られることが照射食品の証拠となると考えられる。

本手法は、従来法と比較して、サンプルの取り扱い、運用コスト、操作の熟練が必要でない等、多くの利点がある。

さらにはほ乳動物に対する汎用プライマーの設計などについて検討した。



検討 1 プライマー・PCR 反応条件の設計

PCR 解析に必要なプライマーについて設計した。ほ乳動物については、一般的にはほ乳動物が共通して持つ CYCS 遺伝子の一部の配列を増幅するプライマーを 3 種類設計し、候補とした。また、市販のほ乳動物 DNA 検出用合成 DNA (プライマーセット: anicon5, anicon3、プロメガ社製)も比較として用いた。

国産牛肉 1g から、DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA 抽出・精製を行った。精製した DNA を TE 緩衝液で 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように希釈したものを鋳型 DNA サンプル

として、Mini Opticon (Bio-rad 社製)を用いてリアルタイム PCR を実施し、DNA 増幅能力を検証した。その結果、3 種類設計したプライマーのうち 1 種のみが DNA 合成ができることを確認した。このプライマー配列を以下に示す。DNA 合成効率は、市販の anicon5, anicon3 と同等である事も確認できた。また、最適化した PCR 反応条件を表 1 に示す。

CYCS 遺伝子プライマー

Primer-forward : GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCA

Primer-reverse : CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG

表.1 ウシ肉に対する PCR 反応条件

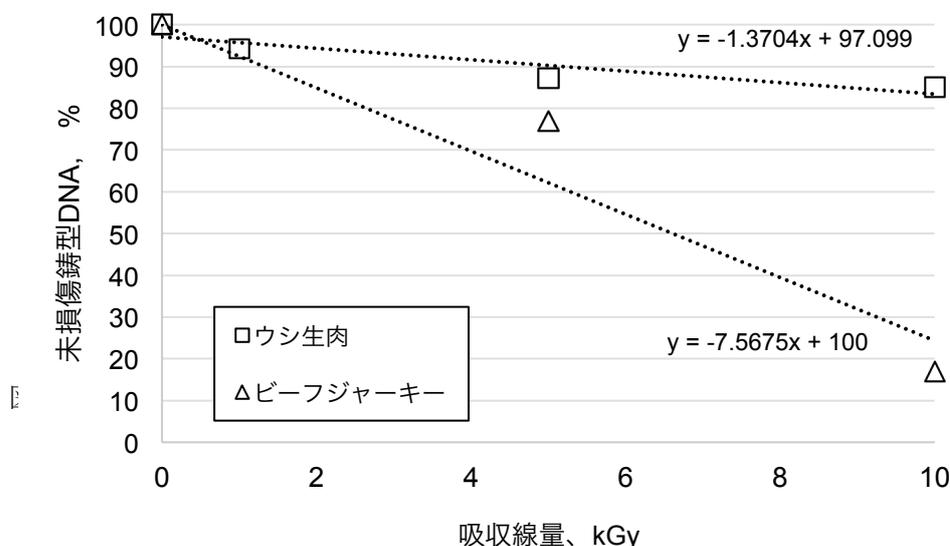
PCR cycle setting		
95°C	5 min.	50 cycles
95°C	30 sec.	
55°C	30 sec.	

検討 2 ウシ肉類への検討

一般の肉類食品から、牛生肉(日本国産)およびビーフジャーキー(オーストラリア製)および豚生肉(日本国産)を選択した。それぞれ食品 1g に対し、大阪大学産業科学総合研究所 コバルト 60 ガンマ線源を用いてガンマ線を 10kGy まで照射した。照射済みのサンプルから、DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA 抽出・精製を行った。精製した DNA を TE 緩衝液で 0.01 μg/μl となるように希釈したものを鋳型 DNA サンプルとして、Mini Opticon (Bio-rad 社製)を用いてリアルタイム PCR を実施した。プライマーおよび PCR 反応条件は検討 1 のものを用いた。

国産牛肉およびビーフジャーキーに対する、未損傷鋳型 DNA 割合を図 1 に示す。国産牛肉およびビーフジャーキーともにガンマ線の吸収線量の上昇に伴って、未損傷鋳型 DNA 割合が低下することが明らかになった。吸収線量と未損傷鋳型 DNA 割合の傾きは、国産牛肉およびビーフジャーキーで異なり、国産牛肉については DNA がガンマ線照射によって比較的損傷しない傾向が示された。この理由は不明であるが、サンプルの状態が異なることが関係する可能性がある。

一方で、豚生肉(日本国産)に対しては、PCR 反応の結果が得られなかった。検討 1 でのプライマーについては、ウシ以外では増幅できない可能性がある。普遍的なマルチプライマーの開発は別途行わなければならないと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松尾 陽一郎、平山 誠、川井 良太、砂川 武義、清水 喜久雄、泉 佳伸、53, 223-240 (2018).	4. 巻 53
2. 論文標題 放射線照射によるDNA損傷の新評価手法の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 223-240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 清水喜久雄, 松尾陽一郎, 佐藤典仁, 山本幸佳
2. 発表標題 DNA損傷を指標とした食品に照射された放射線の検出
3. 学会等名 第54回 日本食品照射研究協議会 研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Shimizu, T. Matuo, Y. Izumi, N. Sato, T. Yamamoto
2. 発表標題 Quantification of DNA damages by Real-time PCR Reaction and Its Application to Radiation Monitoring System
3. 学会等名 3rd International Conference on Dosimetry and its Applications Lisbon, Portugal (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水喜久雄、松尾陽一郎、泉佳伸
2. 発表標題 リアルタイムPCRを用いた放射線によるDNA損傷の評価に関する検討
3. 学会等名 第62回 放射線化学討論会 福井
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	松尾 陽一郎 (Youichirou Matuo) (90568883)	福井大学・学術研究院工学系部門・准教授 (13401)	