

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23615006

研究課題名(和文) 安定同位体動態解析(Isotopomics)の基盤構築に向けた分析化学的研究

研究課題名(英文) Analytical chemistry studies on dynamic analyses of stable isotope analysis towards the isotopomics research foundation

研究代表者

伊永 隆史(Korenaga, Takashi)

千葉科学大学・危機管理学部・教授

研究者番号：30124788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：農畜水産物や食品の産地推定に科学的根拠を与えるため、炭素、水素、酸素、窒素の4元素でその95%が構成され、それらの安定同位体比データから起源や生育環境などの情報を得ることを示した。しかし、簡便なため普及が加速するバルク(全試料)分析では、議論に十分な精度の水素同位体比測定が実現できないなど問題点も残っていた。

そこで、本研究ではバルク測定(特に水素)の高精度化をはかることにより、起源トレーサビリティに利用できることを証明した。特に、わが国において全国的に栽培されているコメに注目し、脂肪酸を抽出したものについて水素同位体比測定をおこない、バルク分析よりも非常に精度の高いデータの取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to verify the origin of agricultural products and foods which were comprised of more than 95%, stable isotope analyses of 4 elements of carbon, hydrogen, oxygen, and nitrogen were found to be useful informations with scientific foundation. We can get the information such as the origin or the growth history from those stable isotope ratio data which are analyzed by the mass spectrometer. However, because in the bulk (whole samples) analysis that has hydrogen isotope ratio analysis problems of the precision. Therefore we proved an available method in traceability of the origin with higher precision than in the bulk isotope ratio analysis. In particular, we paid attention to rice plant cultivated in the whole Japan. We can analyze hydrogen isotope ratio values about a fatty acid which extracted from the raw rice samples, and succeeded to obtain the higher precision data than those the simple bulk sample analysis.

研究分野：分析化学

キーワード：質量分析 トレーサビリティ 農産物 食品 起源 安定同位体 同位体比 生育環境

研究成果報告書

(1) 研究開始当初の背景

有機物集合体である農畜水産物(食品)は、炭素、水素、酸素、窒素の4元素でその95%が構成され、これらの安定同位体比データから起源や生育履歴などの情報を得ることができる。しかし、簡便なため普及が加速するバルク(全個体)分析では、議論に十分な精度の水素同位体比測定が実現できないなど問題点も残っている。本研究ではバルク測定(特に水素)の高精度化をはかることを目的とする。さらに有機分子の高精度化技術の確立を合わせて達成することで、トレーサビリティに利用できる情報量が増すと期待できる。

安定同位体動態解析(アイソトポミクス; Isotopomics)は、安定同位体をトレーサーとして用い、環境および生体内の動態解析することを意味する。近年では食品の産地判別の分野で安定同位体の利用に注目が集まっており、様々な食品の同位体的特徴が明らかにされつつある。今後この成果を手掛かりとして、食歴や生活地域の情報をもとに食物から体内での物質循環、安定同位体の動態解析を行う研究領域を Isotopomics と称し、本研究はその発展に重要不可欠な水素同位体の分析精度の向上を目的としている。

食品を対象にした安定同位体比の研究では、食品全体を評価するバルク分析がその簡便性から利用されている。一方で、**バルク分析では交換性が非常に高いアミノ基などについて水素(交換性水素)の挙動により、特に水素の同位体比が精度良く測定できない**といった問題点が指摘されてきた。食品の生育地の情報として、現在使用されている炭素、窒素、酸素の安定同位体比に精度良く分析された水素

の値が加われば、これまで3元素では区別が困難だった地域での異なった特徴が得られる可能性が高い。

本研究では、全国的に作付けされているコメに着目し、コメから脂肪酸(交換性水素の含有率が少ない)を抽出したものについて水素同位体比測定をおこない、バルク分析よりも非常に精度の高いデータの獲得をめざした。これにより、**交換性水素を含む基を交換性水素を含まない基に変換することで、バルク試料中の水素同位体比を高精度に分析可能**と考えた。この手法では交換性水素の値は切り捨てになるが、試料中の交換性水素以外の水素に保存された生育環境の情報を正確に取り出すことに成功している。

軽元素(H,C,N,O,S)の安定同位体比質量分析による微小な地球化学的变化を解析することにより食品の産地判別研究に活路を開き、コメ、牛肉、ウナギ等の国内外産地判別に成功した。同位体比質量分析装置(IRMS)を用いた安定同位体トレーサビリティを指向する食品安全応用研究に到達した。先端的安定同位体トレーサビリティ機能を持つ同位体比質量分析装置(EA/IRMS)のみならず、ガスクロマトグラフィー/同位体比質量分析装置(GC/C/IRMS)を用いれば、脂肪酸・アミノ酸等分子別での同位体比微小変化の解析も可能になり、農畜水産物の表示偽装問題のみならず、化学品、繊維、木材、麻薬などの原料産地判別や農産物や国産食料の輸出認証システム構築などへの幅広い利活用が化学工業・農林水産等分野で期待される。

(2) 研究の目的

同位体比質量分析法による産地トレーサビリティの解析応用について、以下に述べる。

ヨーロッパでは食品の産地表示を知的財産と位置付け、ブランド化して世界中へ盛んに流通させてきた。対象は農産物およびその加工品が主で、チーズ、バター、ハム、ワインなどが知られている。ブランドの価値を信頼できるものにするため、表示が確かであることを確認できる産地判別法の開発やその運用に EU が一体となって取り組み、世界から高いブランド評価と信頼を得ている。わが国でも 2006 年以降顕在化してきた食品の産地偽装問題に関し科学的検証が不十分であったため、伊永らは先端的高機能を持つ同位体比質量分析装置をコメ試料の軽元素（炭素、窒素、酸素、水素、硫黄）の安定同位体比微小変化の精密測定に適用し、産地トレーサビリティの応用研究で画期的成果を上げ、農林水産省の補助を得て研究推進した。その結果、農産物・食品等の産地判別が可能なることを基礎的に見出し 2008 年公表した。日本でも遅ればせながら国民生活上重要な食の安全性や産地表示の信頼性に関し、農産物の産地トレーサビリティ研究が脚光を浴びるようになった。

食の安全に対する国民・消費者の強い希望を反映して 2009 年に JAS 法が改正され、産地表示で悪質な偽装があった場合の直罰規定が盛り込まれた。その後「産地偽装を科学的に見破る」産地判別技術の新聞報道があって、安定同位体比の存在がクローズアップされた。世界的に普及している液体シンチレーションを用いた放射性同位体測定による ^{14}C 単独情報を用いた判別技術と比べても、軽元素 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, D/H, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) による多様な安定同位体情報が得られるため、産地証明能力で優位性があると考えられる。食品産地判別法では微量無機元素の含有測定が先行したが、食品成分

の骨格を構成する安定同位体の方が付随している微量元素よりも学術的優位性があると考えられた。

(3) 研究の方法

安定同位体は国際原子力機関(IAEA)によって世界の降水の δD ・ $\delta^{18}\text{O}$ 値が公表されている。 δX 値の算出式は次式に示すとおりである。

$$\delta X (\%) = (R_{\text{試料}} / R_{\text{標準物質}} - 1) \times 1000$$

安定同位体比 δX の分析方法は、液状の食品はそのまま測定でき、固形食品では洗浄や前処理操作としての脱脂等を行ってから凍結乾燥して粉末化すれば容易に測定可能である。標準物質は、炭素では Pee Dee 層の矢石の化石(略称 VPDB)、窒素は大気窒素(Air)、酸素は標準平均海水(略称 SMOW) 水素は標準平均海水(略称 VSMOW)などが用いられる。

安定同位体比の基礎研究は、1980 年頃から地球化学分野で積極的な取り組みが日本でも始まり、地球古環境試料の有機物同位体組成は、起源生物や生合成過程、生育環境などの情報を保存していることが知られたため、元素分析/同位体比質量分析装置 (EA/IRMS) の性能向上を踏まえ生物地球化学や生態学などの学術研究で世界的成果をあげた。

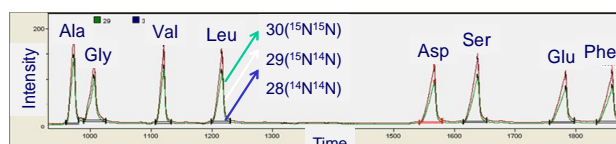


図 1 ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析装置 (GC/IRMS) によるアミノ酸の安定同位体比測定例

その後、EA/IRMS にガスクロマトグラフを接続したガスクロマトグラフィー分離/同位体比質量分析装置 (GC/IRMS) の開発により、図 1 に例示するようなアミノ酸分子個々の安定同位体比解析が可

能になり、この分野の進歩に一層の貢献が期待される。

しかし、軽元素の安定同位体比を適用し食品産地トレーサビリティーの可能性を見出す基礎研究は、国内では2003年頃まで皆無であった。国内でも食品産地判別を目指した微量金属元素、玄米のストロンチウム同位体、イガイの水素・炭素安定同位体比などに着目した先行研究が始まり、ヨーロッパの実用研究と同時期に、軽元素同位体比を農水産物の生育履歴に伴う化学指紋に見立て産地トレーサビリティー解析を行う基礎研究へつながった。

(4) 研究成果

コメの産地判別では、国産、豪州産、米国産のコシヒカリ(精米)の軽元素の安定同位体比を多元素について解析を行った結果を図1に示す。米国産コシヒカリは、国産や豪州産よりも高い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示す特徴が得られた。植物の $\delta^{13}\text{C}$ 値は、乾燥しているほど高くなることが報告されており、気候や生育土壌の水分条件の違いがコシヒカリの $\delta^{13}\text{C}$ の違いに反映されたものと考えられた。一方、豪州産コシヒカリは、国産や米国産よりも高い $\delta^{18}\text{O}$ 値を示す特徴が得られた。この結果は、IAEA(国際原子力機関)が公表している世界の降水の $\delta^{18}\text{O}$ 値の傾向とも一致しており、地域によって水の $\delta^{18}\text{O}$ 値が異なれば、産地識別が可能であることを示している。

コメの持つ化学情報を評価するため、炭素・窒素・酸素のうち、2元素の安定同位体比のデータを二次元で表示した。(図2) また、国内の地域性を反映する軽元素4種の安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ ・ $\delta^{18}\text{O}$ ・D) 微小変化を四角形のレーダープロット(図3)で表示することによってコメの産地特定に関し有効性が見出された。有

機肥料を用いた農法による有機米の判別も窒素安定同位体比によって実施可能なことが分かった。

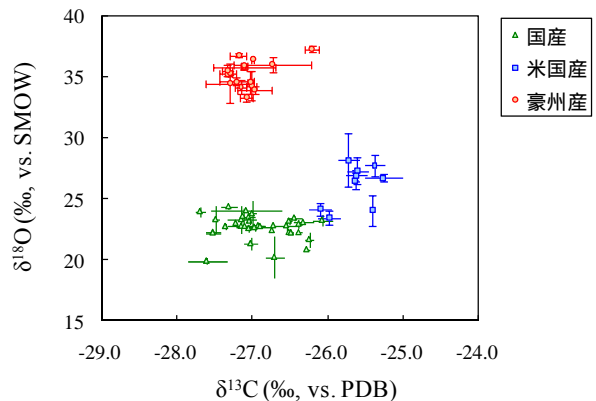


図2 国産、米国産、豪州産コメの炭素・酸素安定同位体比の二次元分布

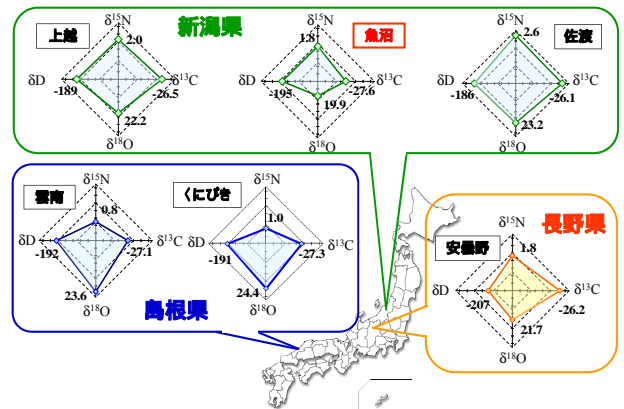


図3 国産コシヒカリの軽元素安定同位体比(^{13}C ・ ^{15}N ・ ^{18}O ・D)の四角形レーダープロット表示

国内各地のコメ産地情報について産地判別の実用性や信頼性を立証するため、コメの安定同位体比は地域間差のほうが品種間差よりも大きい(図4)ことも明らかにした。

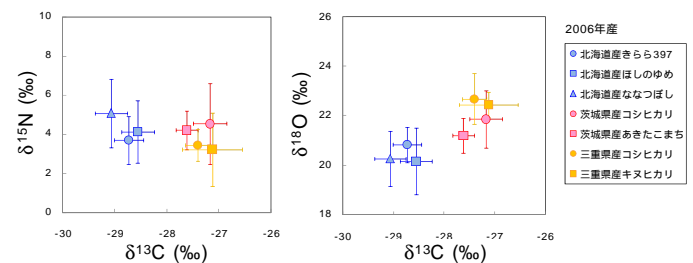


図4 各種コメ試料の安定同位体比測定における地域間差と品種間差

牛肉の産地判別では、現地調達した米
 国産や豪州産牛肉を用いて炭素・窒素・
 酸素安定同位体比に基づく二次元プロッ
 トを作成し、各国産牛肉の安定同位体比
 情報について特性を視覚化することに成
 功した。なお、日本国内で流通している
 国産牛肉と米国産、豪州産の輸入牛肉と
 の軽元素安定同位体比を比較評価した結
 果、図5に示すとおり、原産地を判別可
 能といえるが、現地調達の牛肉試料より
 判別関数式の設定が難しく、外国産輸入
 牛肉を国産牛肉に近づけるような給餌等
 の研究がなされていることも考察された。

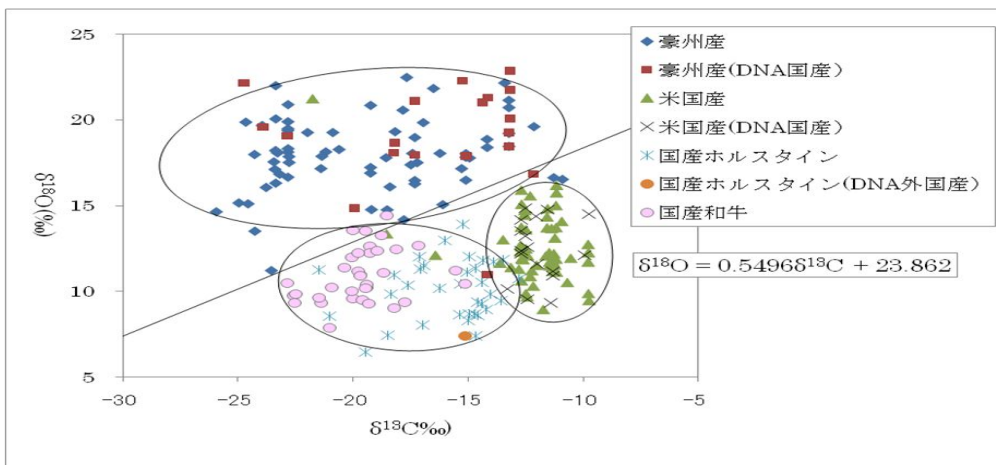


図5 国産牛肉および米国産、豪州産の輸入牛肉の炭素・酸素安定同位体比二次元分布と判別関数式

2008年7月収集

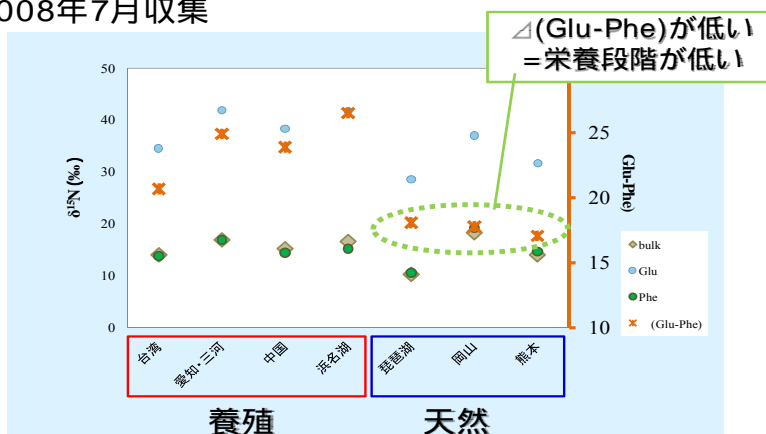


図6 GC/C/IRMSの適用によるアミノ酸分子別の栄養段階解析(グルタミン酸Glu フェニルアラニンPhe)に基づく、天然ウナギと養殖ウナギの判別事例

日本国内産と偽装される産地偽装問題が頻繁に起こる国外産ウナギの産地判別に関しても、輸入品と国産品のウナギに

ついて軽元素安定同位体比解析による判別に成功した。また、天然ウナギと養殖ウナギの識別についてはバルク試料の同位体比解析では不確実であったため、GC/C/IRMS を適用してアミノ酸分子 (Glu, Phe) レベルで栄養段階の $\delta^{15}\text{N}$ 解析を試みることにより海から河川へ遡上した天然ウナギの判別に初めて成功した。(図6)

以上、同位体比質量分析法による安定同位体トレーサビリティ応用に及ぶ水素同位体に関する研究成果は、従来にない先見性と応用性に富み、D/H 変換が起こる分析化学上の問題点を克服すればさらなる分析精度向上も期待される。安定同位体に着目した食品の摂取や代謝などの動態を解析する新学術研究領域 (Isotopomics: 同位体動態解析学) への将来展望が見込まれる研究成果を挙げられたので、分析化学分野の発展に役立つと考えられる。

(5) 主な発表論文等

学術論文 7 件

1. 伊永隆史, 同位体比質量分析法によるコメの起源トレーサビリティに関する研究 (総合論文), 分析化学, 査読有, 63, 233 ~ 244 (2014).
2. Atsuko Yamanaka, Akiko S. Goto, Takashi Korenaga, D/H exchange in C-H bonds of Fatty Acids : Implication for geographical Discrimination of food materials, Food Chem., 査読有, 138, 1720 ~ 1722 (2013).
3. Kanji Aoyagi, Akiko S. Goto, Tatsuya Fujino, Takashi Korenaga, Yoshito Chikaraishi, Deuterium depletion in the fatty acids from beef, Res. Org. Geochem., 査読有, 29, 27 ~ 30 (2013).

4. 青柳寛司, 後藤晶子, 藤野竜也, 伊永隆史, 松坂牛・飛騨牛の安定同位体比分析, 日本食品科学工学会誌, 査読有, 60, 138 ~ 141 (2013).
5. 伊永隆史, 安定同位体比質量分析法を用いた食品産地判別研究の現状と課題, RADIOISOTOPES, 査読有, 62, 219 ~ 233 (2013).
6. Kanji Aoyagi, Atsuko Yamanaka, Akiko S. Goto, Tatsuya Fujino, Takashi Korenaga, Yoshito Chikaraishi, Methyl and ethyl chloroformate derivatizations for compound-specific stable isotope analysis of fatty acids, Res. Org. Geochem., 査読有, 27, 91 ~ 95 (2011).
7. Akiko S. Goto, Takashi Korenaga, Yoshito Chikaraishi, Methyl and ethyl chloroformate derivatizations for compound-specific stable isotope analysis (CSIA) of fatty acids, Res. Org. Geochem., 査読有, 27, 91 ~ 95 (2011).

図書 2 件

1. 伊永隆史, 食品産地偽装防止と産地同定分析法(分担執筆), 原口紘丞編, 「環境分析ガイドブック」, 査読有, 丸善, 758 (2011).
2. 伊永隆史, 「生命科学のための分析化学」, 伊永隆史編著, 化学同人, 査読有, 1 ~ 172 (2011).

(6) 研究組織

研究代表者 千葉科学大学危機管理学部・教授 伊永隆史 (Takashi Korenaga) 30124788

研究分担者 千葉科学大学危機管理学部・講師 手束聡子 (Satoko Tezuka) 70435759