

称号及び氏名	博士（工学） 福井 直樹
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 31 日
論 文 名	「5,6-ジヒドロチミジンを検知指標とした LC-MS/MS による新規照射食品検知法の開発に関する研究」
論文審査委員	主査 古田 雅一 副査 谷口 良一 副査 河村 裕一

論文要旨

食品への放射線照射（食品照射）は、加熱処理や薬品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・殺虫あるいは品質保持（発芽防止等）が可能である。このため 50 カ国以上で食品照射が滅菌や殺虫方法として承認され、香辛料の殺菌および殺虫、または食肉・甲殻類の殺菌などに利用されている。しかし、食品照射は食品ごとに各国の承認の状況が異なり、国内においては、現在、馬鈴薯の芽止めを目的とした場合にしか認められておらず、放射線を照射した食品（照射食品）の輸入や流通が禁止されている。

照射食品を検知するため、欧州標準化委員会（CEN）がスクリーニング法を含めて 10 種類の検知法を CEN 標準分析法として採用している。これら検知法整備の目的は、照射食品の流通が認められている諸外国では、消費者への食品選択権の付与、流通管理、品質保証、国家間の貿易上の取引にとって欠かせない。一方、国内では諸外国からの輸入食品や流通食品の監視が最大の意義と考えられる。

CEN 標準分析法は、検知法の原理に応じて分析機器も異なり、それぞれ適用できる食品の種類に制約がある。例えば、アルキルシクロブタノン（ACB）法は脂肪が多い食品に、熱ルミネセンス（TL）法は珪酸塩鉱物を含む食品などに適用が限定されている。多種類の食品を網羅的に監視するためには、多種類の分析機器を備え、検知法ごとに個別に対応する必要がある。つまり、それぞれの検知法についての技術習得や機器整備の費用などを考慮すると非効率かつ非経済的である。

そこで、本研究では、食品の適用範囲に制約がなく波及性の高い新たな検知法の開発を目的とした。食品を網羅的に検査するためには、多岐にわたる食品に共通した堅牢な照射履歴の指標が必要である。ほとんどの食品には DNA が含まれているため、照射後の DNA に対する物理的・化学的な変化は有用な指標となり得ることから、放射線照射によって DNA 中のチミジン（dThd）から生成する損傷ヌクレオシドの 5,6-ジヒドロチミジン（DHdThd）に着目した。DHdThd の検知には残留農薬検査等で汎用されているタンデム型質量分析計付高速液体クロマトグラフ（LC-MS/MS）を利用し、照射食品検知法（DHdThd 法）を開発した。

DHdThd 法は 4 段階の工程から構成される分析法とした。第 1 段階は試料からの DNA 抽出工程、第 2 段階は抽出した DNA を酵素分解によりヌクレオシドまで分解する工程、第 3 段階は酵

素分解液を精製する工程、第4段階は LC-MS/MS により測定する工程で構成した。

第2章では、DNA のガンマ線照射によって dThd から生成した DHdThd を検出するまでの基礎的な分析手順を確立した。LC-MS/MS 測定において、DHdThd は異性体に伴う S および R 体の2本のピークが検出され、これら2本のピークエリア値の合算値を total-DHdThd として算出した。total-DHdThd の生成量は、酵素分解に供する DNA 量や DNA の消化効率に影響を受けるため、dThd に対する total-DHdThd の存在比 (total-DHdThd/dThd) が検知指標として頑健であると考え、dThd を測定のうえ、total-DHdThd/dThd の値を算出し、DHdThd 法の検知指標に位置づけた。Salmon sperm DNA 溶液を対象に、DNA を Nuclease P1 および Alkaline phosphatase の2種類の酵素によりヌクレオシドに分解する反応条件を最適化した。精製工程では、カチオン交換カラム (OASIS MCX) を用いた精製により、DHdThd の S 体と R 体の間の保持時間に検出されるデオキシグアノシン (dGuo) をはじめ、アミノ基を有するデオキシシチジン (dCyd)、デオキシアデノシン (dAdo) を測定対象成分 (dThd および DHdThd) と分離できた。-20°C で凍結した dThd 溶液および Salmon sperm DNA 溶液に凍結状態でガンマ線照射し、DHdThd が照射特異的かつ total-DHdThd/dThd の値が照射線量に依存して増加することを確認できた。

第3章では、検知対象を DNA 溶液から食品試料へ応用した。牛生レバーを対象としてフェノールクロロホルムを用いた DNA 抽出を行い、牛生レバー 3.75 g から DHdThd が検出できるだけの DNA 量を十分に採取できた。DNA 抽出工程では 50% エタノール沈殿処理 (追加精製操作) により高純度の DNA を得ることができた。4種類の起源の異なる牛生レバーに、-20°C の冷凍条件下でガンマ線を照射したところ、DHdThd が照射特異的に生成し、殺菌のための実用線量域を含む 1.0~11.3 kGy の範囲で total-DHdThd/dThd の値は照射線量に依存して増加し、個体差によらず近似した値が得られた。また、照射後7か月間-20°C で凍結保存後に DNA 抽出した試料からも、total-DHdThd/dThd の値は照射直後と近似した値が得られたことから、total-DHdThd/dThd の値が検知指標として堅牢であることが示唆された。課題として、試料からの DNA 抽出や精製に時間を要することや、低線量照射試料でも検出できるように分析法を高感度化することが挙げられた。

第4章では、DHdThd 法の高感度化および迅速化を検討し分析法を改良した。第一の改良点として、DNA 分解に Nuclease P1 および Alkaline phosphatase の他に Snake venom phosphodiesterase I (SVPD) を併用した。これにより、未消化で残存していたジヌクレオシドモノホスフェート等のジヌクレオチド類の分解が促進され、DHdThd が効率的に遊離され検出量が増加し感度が向上した。また、SVPD の併用の有無によって、検出される DHdThd の S および R 体の生成比率が異なることが判明した。SVPD を併用しない DNA 分解で R 体の生成比率が高かったのに対し、併用によって S 体が優位に生成された。第二の改良点として、精製工程において OASIS MCX カラムを使用せず、リン酸およびクロロホルムによる液液分配による精製を行った。これにより測定対象の DHdThd や dThd 以外のヌクレオシドは除外できなかったものの、精製時間は約八分の一に短縮できた。第三の改良点として、試験溶液中の夾雑成分に由来するイオン化抑制を補正するため、マトリックス添加検量線の適用が有効であることを明らかにした。以上の改良によって、total-DHdThd/dThd の値は、照射 Salmon sperm DNA 溶液で約3倍、照射牛生レバーで約6倍に向上し DHdThd 法がより低線量域の照射においても照射履歴の判定が可能となることを見出した。

第5章では、DHdThd 法の適用性の拡大を目的に、海外で照射実績の多い牛ミンチ肉とエビを対象にした。DNA 抽出工程において、DNA の追加精製操作 (50% エタノール沈殿処理) を RNase A 処理前に実行することによって処理後に行うよりも、高純度の DNA を得ることができた。また、DNA 抽出時間を大幅に短縮できた。3種類の起源の異なる牛ミンチ肉とエビに、-20°C の冷凍条件下でガンマ線を照射した結果、DHdThd が照射特異的に生成し、牛ミンチ肉では 0.3~9.8 kGy の範囲で、エビでは 0.49~10.7 kGy の範囲で total-DHdThd/dThd の値が照射線量に依存して増加した。また、少なくとも牛ミンチ肉で照射後53日間、エビで照射後98日間は、

DHdThd/dThd の値が照射直後の値と変わらず安定して検出された。脂肪分の多い試料は公定法の **ACB** 法が適用できるため、共通試料として牛ミンチ肉を対象に **DHdThd** 法と **ACB** 法の双方を適用して比較した。この結果、脂肪重量当たりの **ACB** 生成量と **total-DHdThd/dThd** の値に明確な正の相関性が認められ、**DHdThd** 法が信頼性のある分析法であることが立証できた。さらに、**DHdThd** 法の適用に際しては、**ACB** 法の適用条件である試料中の脂肪含有量や、**TL** 法適用条件である珪酸塩鉱物の存在に影響されない既存検知法に対しての優位性が示唆された。

第 6 章では、**DHdThd** 法の広範な普及を目的に、迅速で簡便な分析法に改良するための検証を行った。牛生レバー、牛ミンチ肉およびエビを対象に、**DNA** 抽出に 2 種類の **DNA** 抽出キットを活用しその有用性を確認できた。さらに、分析に必要な試料重量を縮減でき分析スケールの小型化や経費の節減にもつながった。これらにより、牛生レバー、牛ミンチ肉およびエビの照射履歴の判定には、少なくとも試料 **1 g** あれば、**DNA** 抽出に約 **3** 時間、**DNA** の酵素分解および精製に約 **3** 時間、**LC-MS/MS** の測定に約 **2** 時間の合計約 **8** 時間程度で判定できることが示唆された。すなわち **ESR** や **TL** 装置といった特殊な機器を使用せず、汎用機器の **LC-MS/MS** および **DNA** 抽出キットを用いて、容易に照射食品を検知できると考えられた。これは、輸入食品や流通食品の監視を強化できる体制整備の構築に、本研究の成果が十分に貢献できると考えられる。

第 7 章では、本論文の結論を述べ、本研究で得られた結果を総括するとともに今後の展望について述べた。本研究では動物性試料を対象に開発してきたが、今後、植物性試料への適用性の拡大を視野に入れている。**DHdThd** 法が、動物性または植物性試料に至る適用範囲の広い、かつ汎用機器を用いた利点を生かし、これまで適用範囲が限定的であった公定法を卓越した検知法として、国際的にも最も利用されることが期待できる。

審査結果の要旨

食品の放射線殺菌（食品照射）は、食品の品質維持において加熱処理や薬品処理よりも優れており、広範囲の食品に対し、50 カ国以上で香辛料の殺菌および殺虫、または食肉・甲殻類の殺菌などに利用されている。しかし、食品照射は食品ごとに各国の承認の状況が異なり、我が国では馬鈴薯の発芽防止以外の放射線照射が禁止されている。そのため違法な照射食品の流通を防ぎ、照射食品に義務づけられている表示の妥当性や消費者の選択権を保証するため、放射線照射の有無を検知する方法（検知法）が求められている。現在、国際的に提唱されている種々の検知法は、原理に応じて分析機器も異なり、それぞれ適用できる食品の種類に制約がある。本研究では、食品の適用範囲に制約がなく波及性の高い新たな検知法の開発をめざし、広範囲の食品に含まれる **DNA** 塩基の放射線損傷産物、5,6-ジヒドロチミジン (**DHdThd**) に着目し、食品からの **DNA** 塩基の抽出方法を検討し、残留農薬検査等で汎用されているタンデム型質量分析計付高速液体クロマトグラフ (**LC-MS/MS**) を用いた定量法について検討し、以下の成果を得ている。

- 1) **DNA** 標品として **Salmon sperm DNA** を使い、**Nuclease P1** および **Alkaline phosphatase** による酵素分解、カチオン交換カラム (**OASIS MCX**) を用いた精製を最適化し、ガンマ線照射によって **dThd** から生成した **DHdThd** を検出するまでの基礎的な分析手順を確立した。
- 2) 上記の分析手順を我が国で今後放射線殺菌が利用される可能性のある牛生レバーに応用し、放射線量に依存した **DHdThd** 量の増加と 7 ヶ月の冷凍保存期間における検出の有効性を確認した。さらに牛ミンチ肉、エビについて十分な検知が可能であることを実証した。
- 3) 分析の高感度化および迅速化を検討し、**Snake venom phosphodiesterase (SVPD)** を併用することにより酵素分析法を改良した。さらに市販の **DNA** 抽出キットを用いることにより、さらなる試料重量の縮減、分析スケールの小型化に成功した。

以上の研究結果は従来法よりも汎用的な照射食品検知法 (**DHdThd** 法) の開発に成功したこと

を示し、放射線照射食品の検知法の発展に新たな端緒となり得る有用な知見を与えている。すなわち、本法は汎用機器を用いて動物性または植物性試料に至る広範囲の試料に適用可能であり、これまで適用範囲が限定的であった公定法を卓越した汎用的な検知法として発展することが期待できる。また、申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有することを証したものである。