

<平成 29 年度助成>

多様な放射線損傷ヌクレオシドを指標とする 新たな照射食品検知法の開発

高取 聡¹⁾・福井 直樹¹⁾・北川 陽子¹⁾・古田 雅一²⁾

(¹⁾ 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部、²⁾ 大阪府立大学 研究推進機構放射線研究センター)

1. 研究背景および目的

食品の放射線照射（以下、照射）は、加熱や薬品によらず殺菌・殺虫等が可能であり、食品の品質を殆ど損なうことがない。このため世界的には食肉等の動物性食品あるいは香辛料等の植物性食品の殺菌・殺虫・芽止め等に広く適用されている。しかし、国内では馬鈴薯の芽止めを目的とした照射が例外的に認められているにすぎない。照射を適正に管理するためには、その照射履歴の検知が不可欠である。厚生労働省は、照射履歴の検知法として、熱ルミネッセンス法、アルキルシクロブタノン法および電子スピン共鳴法の三種類の方法を通知している。各検知法の適用の可否は食品の組成に左右されるため、食品によって使い分けの必要がある。DNA は多様な食品に含まれるため、その構成要素であるデオキシリボヌクレオシドが照射を受けることによって生じる損傷ヌクレオシドを検知指標とすることで多様な食品に適用できる検知法が開発できると期待される。我々は、チミジン (dThd) 残基から生成する損傷ヌクレオシドのひとつである 5,6-dihydro-2'-deoxythymidine (DHdThd) を指標とする新たな検知法を開発した^{1,2)}。本法は、フェノール・クロロホルム抽出法で食品から DNA を抽出し、この DNA をヌクレオシドに分解して得られた試験液中の dThd に対する DHdThd の存在比 (DHdThd/dThd) をタンデム型質量分析計付液体クロマトグラフ (LC-MS/MS) で測定する。本法は、牛レバーを含む食肉およびエビの照射履歴の検知が可能であるが、香辛料等の植物性食品へ適用し、十分な感度を達成するためには DNA の抽出法等において、さらなる検討が必要

であると考えられた。本研究では、植物性食品にも適用できる DNA 抽出工程を確立し、さらに DHdThd 以外の損傷ヌクレオシドについて検知指標に加えて、多様な食品に適用可能な新たな検知法の開発を目指した。

2. 実験方法

試料は、凍結条件 (-17 ~ -20°C) 下で γ 線または電子線 (10 MeV) 照射した。試料からの DNA 抽出には、Genomic-tip (G-tip; QIAGEN) およびこれに対応する緩衝液 (G2, QBT, QC および QF 緩衝液) を用いる方法を確立した。粉末状でない香辛料等は、予めマルチビーズショッカー (安井器械) で粉碎した。試料 (2 ~ 6 g) に G2 緩衝液を 20 mL 添加し、ホモジナイズした。Proteinase K、RNase A およびセルラーゼを加えて 50°C で 1 時間インキュベートした。遠心分離後、上清を QBT 緩衝液で平衡化した G-tip 100/G カラムに全量負荷した。流出液は捨て、カラムを QC 緩衝液 7.5 mL で 3 回洗浄し、洗浄液を捨てた。カラムに QF 緩衝液 6 mL 負荷し、DNA を溶出させた。DNA はイソプロパノール沈殿により回収し、洗浄および減圧乾燥後、滅菌水に溶解して吸光度を測定した。本研究では、図 1 に示す損傷ヌクレオシドを対象とし、LC-MS/MS での測定条件を確立した。DNA 中の損傷ヌクレオシドの測定では、既報²⁾ に準じて DNA をヌクレオシドに酵素分解し、LC-MS/MS で分析した。

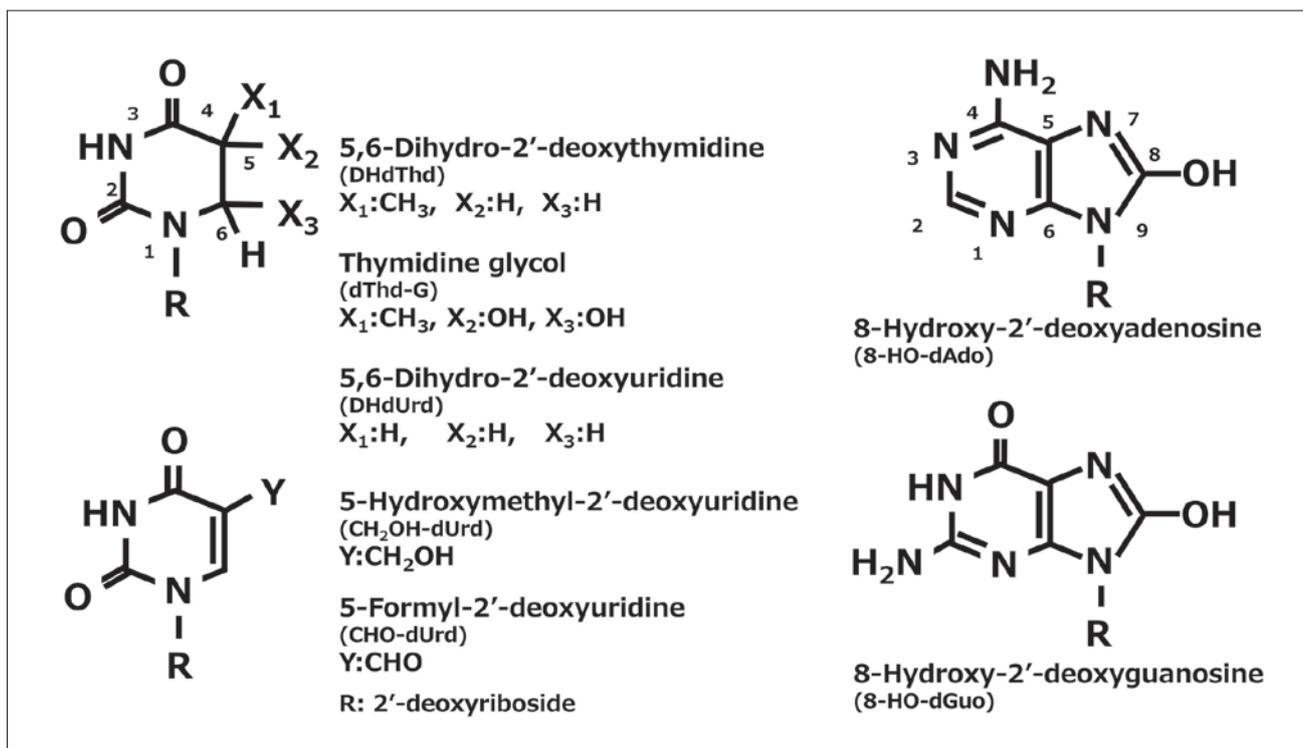


図1 損傷ヌクレオシドの構造

3. 結果および考察

3.1. 多様な食品への適用

DNA抽出工程にG-tipを用いることで食肉および魚介類等の動物性食品に加えて、香辛料等の植物性試料にも本法を適用することが可能となった³⁾。レバー等の動物性食品には、より迅速なヨウ化ナトリウム法を用いる工程も併せて確立した。図2にG-tipで必要量のDNA(約80 μ g)が抽出できる食品に対して、 γ 線または電子線照射した際の1 kGyあたりのDHdThd/dThdを比較した結果を示した。食肉類では、照射線量1 kGyあたりのDHdThd/dThdは、概ね $20 \times 10^{-6} \sim 30 \times 10^{-6}$ であった。魚介類では、マグロが食肉類と類似した値であったが、ホタテ貝柱およびタラコ等では、食肉類よりも高値であった。DHdThdは、間接作用によって生成するため、食肉類よりも水分含量が高い魚介類でDHdThdの生成効率が高いことが示唆された。一方、乾燥シイタケおよび粉末大麦若葉における照射線量1 kGyあたりのDHdThd/dThdは、低い傾向であった。

図3にトウガラシを照射した際のDHdThd/dThd

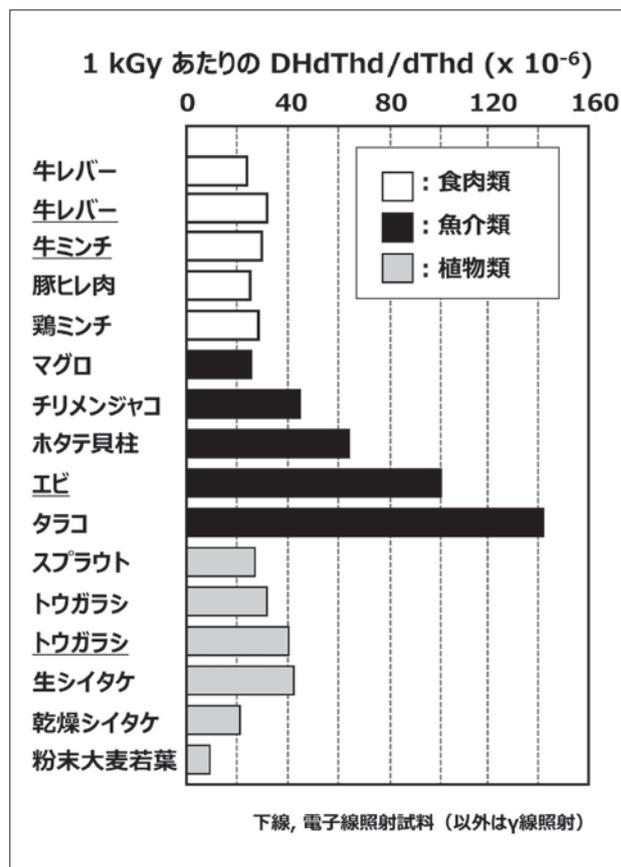


図2 多様な食品における照射線量1 kGyあたりのDHdThd/dThdの比較 ³⁾より許可を得て転載

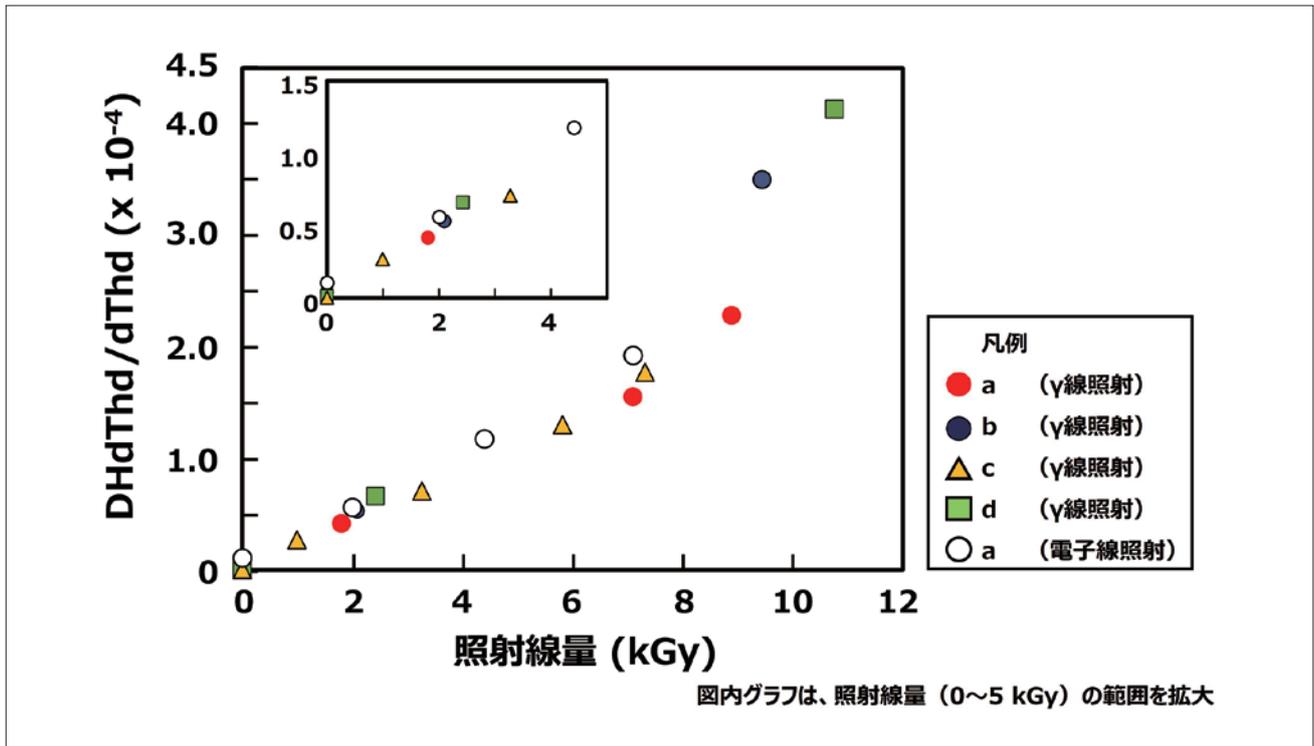


図3 トウガラシ試料 (a～d) における DHdThd/dThd の線量依存曲線

の線量依存曲線を示した。トウガラシの種類によらず線量依存曲線は概ね重なることが認められた。また、照射履歴の検知において線源 (γ線または電子線) の影響は認められなかった。なお、検知下限は 0.5 kGy 以上であった。

3.2. DHdThd/dThd による照射線量推定

照射線量 1 kGy あたりの DHdThd/dThd は、魚介類を除く食肉あるいは植物性食品間では近似しており、さらに同一食品間では、より近似した値を示した。これに基づき、既知の線量を照射した試料において DHdThd/dThd の線量依存曲線を作成し、この線量依存曲線と未知試料の DHdThd/dThd と比較することで、照射線量を推定可能であると考えられた。これについては、照射した牛レバーを試料として実証することに成功した⁴⁾。また、DHdThd/dThd は、凍結下での長期保存および加熱処理においても安定であった。

3.3. 照射による損傷ヌクレオシドの生成

デオキシリボヌクレオシド水溶液 (1 mg/mL) を凍

結条件下で γ 線照射した結果を示した (図 4)。dThd 水溶液からは DHdThd, thymidine glycol (dThd-G) および 5-formyl-2'-deoxyuridine (CHO-dUrd) 等が検出され、デオキシシチジン (dCyd) 水溶液からは 5,6-dihydro-2'-deoxyuridine (DHdUrd) が検出された。これらは概ね線量依存的に生成していたが、生成効率および照射特異性の観点で DHdThd が最も優れていた。デオキシアデノシン水溶液からは 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine (8-HO-dAdo) が検出され、11 kGy で生成量が急増した。デオキシグアノシン水溶液では、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の生成が示唆されたが、照射前の水溶液にも含まれており、照射による生成と分別することは困難であった。サケ精巢由来 DNA に γ 線を照射し、損傷ヌクレオシドの生成を検証した結果、DHdThd および DHdUrd は照射特異的かつ線量依存的に生成していた。DHdUrd の生成量は、DHdThd の約 1/3 ~ 1/2 であり、DHdThd の補完的指標として有用であると考えられた。一方で、他の損傷ヌクレオシドの顕著な生成は認められなかった。

γ 線を照射したトウガラシから抽出した DNA を

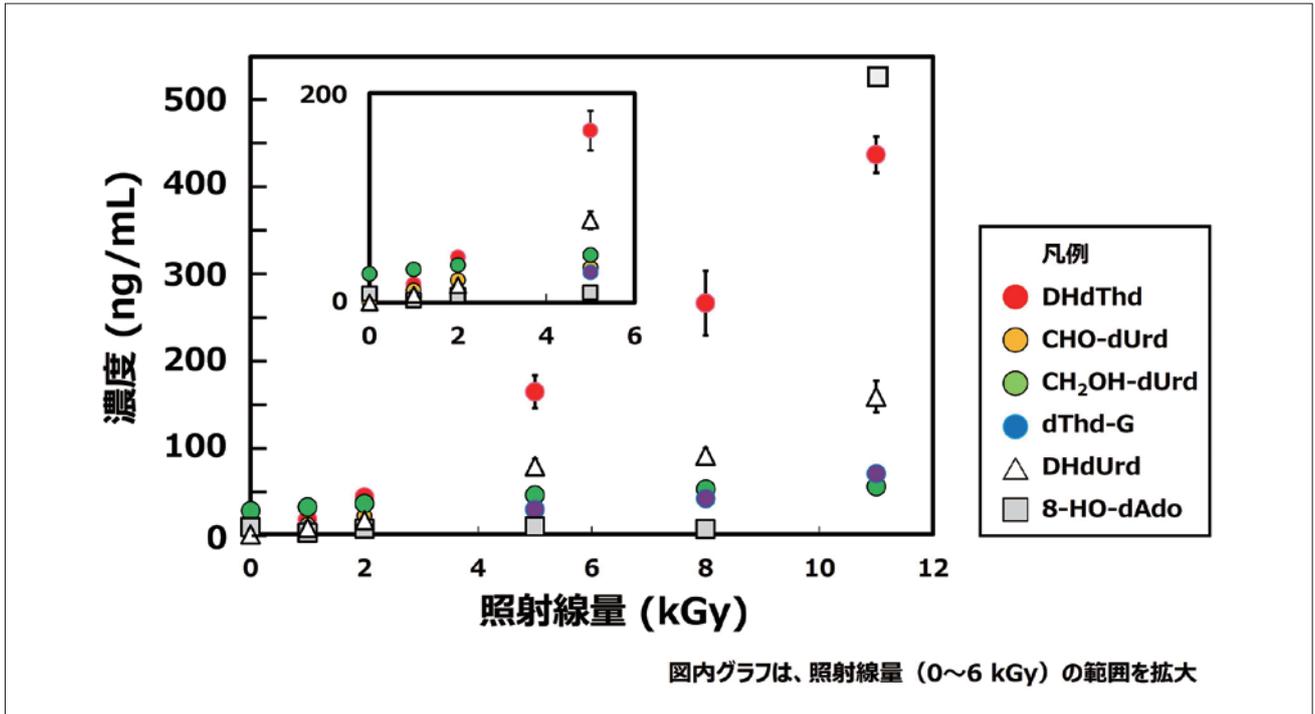


図4 γ線照射時におけるデオキシリボヌクレオシド水溶液からの損傷ヌクレオシドの生成

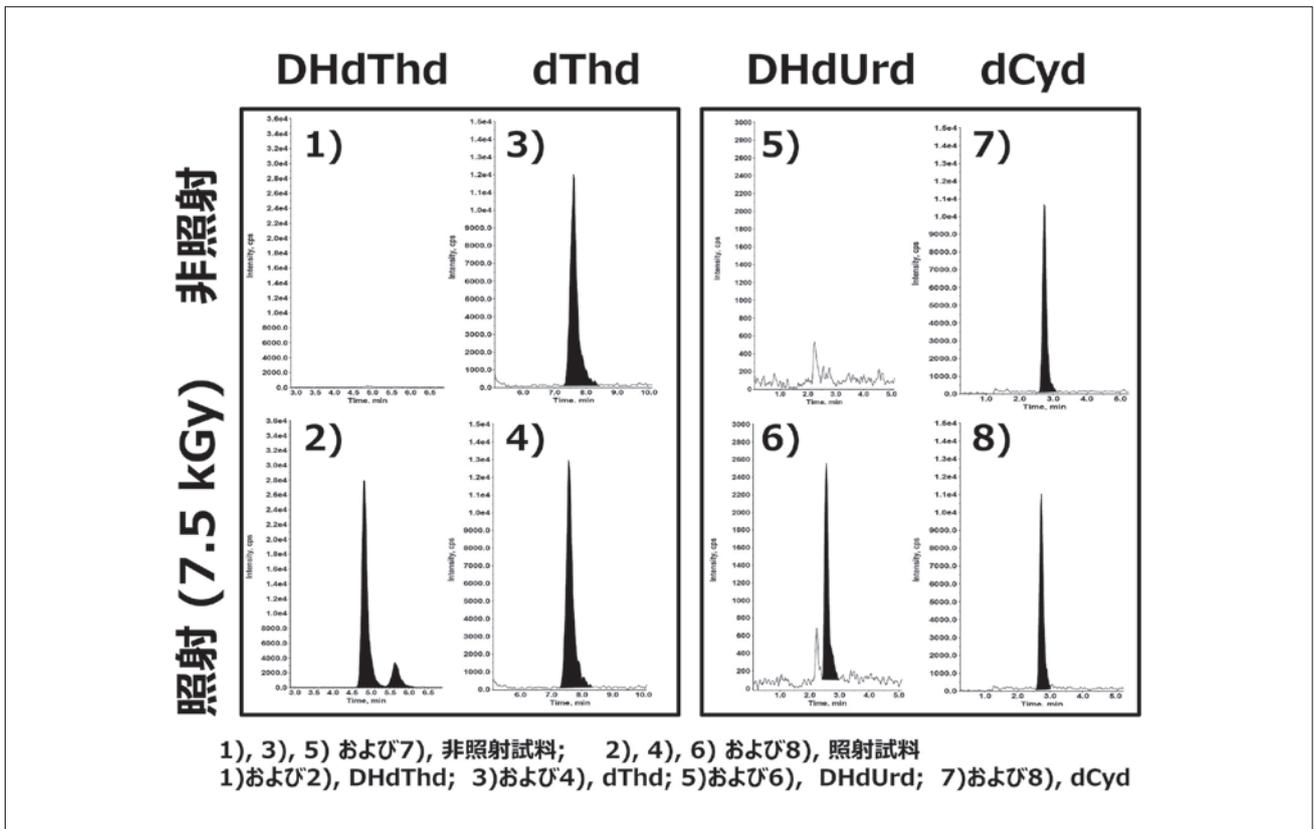


図5 γ線 (7.5 kGy) を照射したトウガラシの分析結果 (SRM クロマトグラム)

酵素分解し、LC-MS/MS で分析した結果、DHdThd および DHdUrd の生成が認められた (図5)。サケ

精巢由来 DNA と同様に DHdThd および DHdUrd 以外に検知指標として有用な損傷ヌクレオシドは認め

られなかった。これらの結果から食品の照射履歴の検知には、DHdThd が最も優れており（第一検知指標：DHdThd/dThd）、DHdUrd がその補完的な指標（第二検知指標：DHdUrd/dCyd）として活用できると考えられた。

3.4. 香辛料等への適用

香辛料等の植物性食品から G-tip を用いて DNA を抽出した結果を示した（表 1）。大麦若葉、トウガラシ、パセリおよびクミン等では必要量の DNA を抽出することが可能であった（ⅠおよびⅡ）。一方、胡椒、ウコンおよびナツメグ等については、本法の適用が可能となる質および量を満たした DNA の抽出が困難であり、抽出対象とする試料部位、出発試料量あるいは精製カラムの選択において、さらなる改良が求められた（ⅢおよびⅣ）。

表 1 香辛料等の植物性食品からの DNA 抽出量（試料 1 g あたり）

分類*	試料
Ⅰ	大麦若葉、トウガラシ、パプリカ、ハバネロ、パセリ、バジル、クミン、山椒、花椒
Ⅱ	ローズマリー、オールスパイス、ジンジャー、シイタケ、スプラウト、ニンニク
Ⅲ	シナモン、ウコン、コリアンダー、クローブ
Ⅳ	胡椒、ナツメグ、カルダモン、タイム、オレガノ

* Ⅰ, 100 $\mu\text{g/g}$ 以上； Ⅱ, 40 ~ 100 $\mu\text{g/g}$ ；
Ⅲ, 10 ~ 40 $\mu\text{g/g}$ ； Ⅳ, 10 $\mu\text{g/g}$ 未満

図 6 に γ 線照射したトウガラシ、クミン、パプリカおよびバジルについて、DHdThd/dThd および DHdUrd/dCyd を分析した結果を示した。これら試料中では、概ね照射特異的かつ線量依存的な DHdThd/dThd および DHdUrd/dCyd の上昇が認められた。一方で非照射試料においても、微量の DHdThd および DHdUrd が検出された。香辛料等には、殺菌を目的として概ね 5 ~ 10 kGy の線量が照射される。非照射試料からの検出される DHdThd の量は、7.8 kGy を照射した試料の 10% 未満であり、殺菌を目的とした照射履歴を検知するうえで大きな支障にはならないと考えられた。

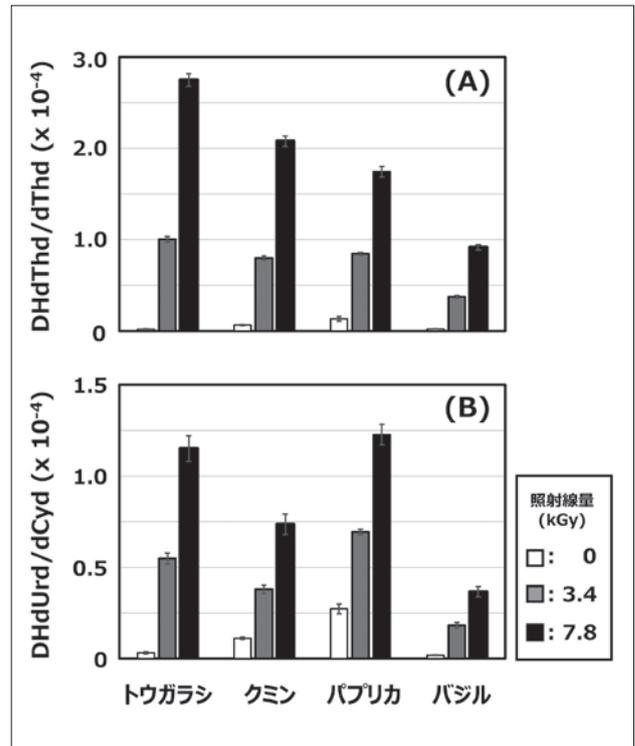


図 6 非照射および γ 線 (3.4 または 7.8 kGy) を照射した植物性試料中の (A) DHdThd/dThd および (B) DHdUrd/dCyd

4. まとめ・今後の展望

本研究では、動物性食品から香辛料等の植物性食品まで多様な食品の照射履歴を検知可能な方法を開発した。一方で DNA 抽出効率が本法の適用に及ばない試料については、DNA 抽出効率の向上および精製カラムの検討等が今後の課題とされた。また、新たな検知指標として DHdUrd/dCyd（第二検知指標）を見出した。第一検知指標とする DHdThd/dThd は、試料の保存および加熱処理にも安定な指標であり、同一食品では未知試料の照射線量の推定にも活用できることを明らかにした。

本法は、多様な食品に適用可能であり、照射履歴の検知のみならず、照射線量の推定もできる。さらに、本法の DNA 抽出工程は簡便であり、LC-MS/MS があれば実施可能であることから広く普及することも期待できる。これは既存の照射食品検知法にない本法の特長であり、今後、本法の実用性を一層高めていく予定である。

謝 辞

本研究の遂行に多大なご支援を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団および関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Fukui, N., Takatori, S., Kitagawa, Y., Okihashi, M., Ishikawa, E., Fujiyama, T., Kajimura, K., Furuta, M., Obana, H.; Determination of irradiation histories of raw beef livers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry of 5,6-dihydrothymidine. *Food Chem.*, 216, 186 (2017).
- 2) Fukui, N., Takatori, S., Kitagawa, Y., Fujiwara, T., Ishikawa, E., Fujiyama, T., Kajimura, K., Furuta, M., Obana, H.; Rapid and reliable method for determining irradiation histories of ground beef and prawns by measuring 5,6-dihydrothymidine. *J. Agricul. Food Chem.*, 65, 9342 (2017).
- 3) 高取聡, 福井直樹, 藤原拓也, 北川陽子, 梶村計志, 石川悦子, 古田雅一; 放射線損傷ヌクレオシドであるジヒドロチミジンを指標として照射食品を検知する, *放射線と産業*, 146, 30 (2019).
- 4) Fujiwara, T., Fukui, N., Kitagawa, Y., Kajimura, K., Obana, H., Ishikawa, E., Furuta, M., Takatori, S.; Estimation of irradiation doses of raw beef liver samples using 5,6-dihydrothymidine as an irradiation marker. *ACS Omega*, 4, 12325 (2019).

Detection of the irradiation history of foods by measurement of modified nucleosides

Satoshi TAKATORI¹⁾, Naoki FUKUI¹⁾, Yoko KITAGAWA¹⁾, and Masakazu FURUTA²⁾

¹⁾ *Division of Hygienic Chemistry, Osaka Institute of Public Health*

²⁾ *Radiation Research Center, Osaka Prefecture University*

A method has been developed for detecting the irradiation histories of plant and animal-based foods, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to measure 5,6-dihydrothymidine (DHdThd) and 5,6-dihydro-2'-deoxyuridine (DHdUrd). DHdThd and DHdUrd are modified nucleosides formed by gamma irradiation from the 2'-deoxythymidine (dThd) and 2'-deoxycytidine (dCyd) moieties of DNA, respectively, in foods. DNA was extracted from foods using a buffer containing chaotropic ions, proteinase K, RNase A, and cellulase, before being purified using a negative-ion exchange column (Genomic-tip; QIAGEN). The resulting DNA was enzymatically digested to form nucleosides and purified with an ultrafiltration membrane to prepare solutions for analysis by LC-MS/MS. DHdThd and DHdUrd were radio-specifically formed, and the ratios of DHdThd/dThd and DHdUrd/dCyd in the test solutions increased in a dose-dependent manner in the irradiated samples. These ratios were suitable to allow the detection of the irradiation history of the samples. The amount of DHdUrd/dCyd was approximately one-tenth that of DHdThd/dThd in the irradiated samples. Thus, DHdUrd/dCyd was an auxiliary indicator of DHdThd/dThd. DHdThd/dThd was found to be robust to long-term storage by freezing and to heating in irradiated beef liver samples. Irradiation doses of beef liver samples were estimated using dose-response curves of total DHdThd/dThd developed from the other irradiated samples. The irradiation history of foods of animal (meat, fish, shrimp, and fish roe) and plant (cayenne pepper, paprika powder, cumin, basil, young leaves of barley, parsley, and mushrooms) origins can, therefore, successfully be detected using this method, indicating that this protocol possesses a potential for this type of analysis in a variety of foods.