

称号及び氏名 博士（工学） 藤原 拓也

学位授与の日付 2024年3月31日

論文名 「5,6-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」

論文審査委員 主査 古田 雅一
副査 宮丸 広幸
副査 川又 修一
副査 田中 良晴

論文要旨

食品に対する放射線照射（食品照射）は、既に 60 カ国以上で承認されている有用な食品衛生管理技術である。食品照射は、加熱や薬品による処理とは異なり、食品の品質をほとんど変えることなく、食肉・香辛料等の殺菌、もしくは農産物の成熟遅延や発芽防止等の効果を発揮することができる。一方で、食品照射の食品毎の承認品目は各国異なっているのが現状である。例えば、日本国内においては芽止めのために照射した馬鈴薯を例外として放射線を照射した食品（照射食品）の輸入や流通は禁止されている。

食品照射を適正に管理し、優れた食品衛生管理技術として活用していくためには、照射履歴の検知法の開発とその運用が必要である。しかし、既存の検知法はその検知法毎に適用できる食品の種類に制限があり、様々な食品に適用できる単一かつ簡便な方法は未だ開発されていない。

照射食品の検知法として、欧州標準化委員会（CEN）はスクリーニング法を含め計 10 種類の方法を CEN 標準分析法として採用している。これらの検知法を整備することは、照射食品の流通が認められている諸外国においては、消費者の自己選択権の確保、流通管理、品質保証および円滑な国際貿易等の観点から欠かせない。一方で、国内では、輸入食品や流通食品の監視がその意義の一つであると考えられる。

そこで我々は、食品中の DNA に含まれるヌクレオシドが照射を受けた際に生成する損傷ヌクレオシドを指標とした新規照射食品検知法を開発し、その実用化に向けて研究を進めている。DNA に含まれるチミジン (dThd) 残基の一部は、照射により 5,6-ジヒドロチミジン (DHdThd) 残基へと変化する。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) を用いて DHdThd を検出することにより、その照射履歴を検知することが可能である。本法は、食品から DNA を抽出してヌクレオシドに酵素分解して試験液とし、これを LC-MS/MS で分析する。検知指標は DHdThd の dThd に対する比 (DHdThd/dThd) とすることで、DNA の酵素分解効率の影響を排除しつつ、高い照射特異性と線量依存性を実現した。DNA は広範な食品に含まれる成分であるため、本検知法は幅広い食品への適用が期待できる。我々はこれまでに、殺菌のための照射を主に想定し、比較的高い線量 (0.5~11 kGy) を照射した牛ミンチ・エビ等に対して本法による照射履歴の検知が可能であることを報告した。

本研究では、DHdThd を検知指標とした食品に対する放射線照射履歴検知法の実用化に向けた基盤的研究を推進するため、主に対象食品を動物性食品と植物性食品とに分け、その検知に必要な改良を都度実施しながら、多様な食品に対する適用性を確立した。特に、農産物の検疫処理および芽止め等を目的とした比較的低い線量 (1kGy 以下) を照射した食品からの検知については、その線量の相対的な低さから生成する DHdThd が少量であるため、適用に対して課題を抱えていた。そこで本研究では、DHdThd を用いた検知法に固相カラムを利用した精製・濃縮手順を導入して高感度化し、4,000 μg の DNA から数十 Gy 程度の照射履歴の検知を可能とする方法を構築した。そして実際に、芽止めのための照射が行われる農産物から検知実証を行った。本研究を通して、DHdThd を用いた検知法の動物性食品および植物性食品への広範な適用性が確立した。また、線量依存性および頑健性など、本検知法の優れた特性が明らかになり、単一の方法で様々な食品へ適用できる検知法としてその将来が期待できる結果となった。

第 2 章では、脂質含量が低いために脂質の放射線分解生成物 2-アルキルシクロブタン類を指標とした既存の検知法の適用が困難な牛レバーに対して本法の適用性を検討した。その結果、牛レバー試料における DHdThd の生成は、放射線特異的かつ線量依存的事であることが確認された。牛レバーの個体差および 2 種類の照射線源 (ガンマ線もしくは電子線) の違いによる検知指標への影響は限られた。さらに、照射後試料の数カ月間の冷凍保管および試料の加熱処理を行った場合も検知指標には影響しなかった。本手法の頑健性を応用して、ある試料の線量依存曲線から、他の試料の照射線量を推定することが可能と見込まれた。

第 3 章では、牛レバーに対する本法の迅速化のために、市販の DNA 抽出カラムおよび抽出キットの利用を試みた。牛レバーの照射履歴検知に用いる DNA 抽出法として 3 種類の方法を用い、検知指標に影響を及ぼさないことが確認された。ヨウ化ナトリウムを使用する市販キットを用いることにより、所用時間 8 時間程度で 150 mg 程度の試料量から、0.5 kGy 以上の照射履歴を簡便に検知できる手順が確立された。将来的に牛レバーの生食が再度解禁された際には、本検知法が有益な衛生管理手法の一つとなりうることを期待される。

第 4 章では、本法の適用を植物性食品にも広げるため、唐辛子をはじめとした 9 種類の植物性食品試料について検討した。QIAGEN 製 Genomic-tip 100/G カラムを用いて DNA を抽出することで、検知に必要な DNA を様々な植物性食品から得ることができた。殺菌を想定した照射を行った 9 種類の植物性食品から DHdThd の検出が可能であり、本法は殺菌のために照射した様々な植物性食品に対する検知法として活用できることが見込まれた。

第 5 章では、本法を検疫処理および芽止めのために照射された食品に対して適用可能とするため、固相精製カラムを用いた手順を組み込み、4,000 μg の DNA から DHdThd を高感度に検出する手順を確立した。実際に 60~150 Gy のガンマ線を照射した salmon sperm DNA から線量依存的に DHdThd を検出することが可能であり、本検知法を利用した芽止め等のための数十 Gy 程度の照射履歴の検知に道が開かれた。

第 6 章では、第 5 章で開発した手順を用いて、芽止めに想定して照射したタマネギからの本法による検知実証を試みた。DNA 抽出手順に、超音波破碎処理を実施した上で大容量 DNA 抽出カラム

ムによる精製を組み合わせた手法を組み込むことで、検知に必要な 1 測定当たり 4,000 μg の DNA を得ることができた。ガンマ線 60~150Gy を照射したタマネギから、DHdThd を照射特異的かつ線量依存的に検出した。さらに、検知指標の他ロットのタマネギによる再現性と 90 日間の室温保管に対する安定性を確認した。DHdThd の生成と保管期間中の残存が生きた農産物を対象として観察され、本法は農産物を対象とした検知法として応用可能性を持つ方法であると考えられた。

第 7 章では、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。今後は、さらに多様な食品、特に検疫処理のために照射される果物および国内で唯一照射が認められている馬鈴薯などに対する適用性の検討が求められる。また、農産物の照射後の DHdThd の動態について、特に修復機構との関係性などに関してさらなる知見を得ることが必要である。また、他の衛生研究所等と多施設共同試験を実施して本検知法の性能評価を行い、本検知法の実用化に向け推進していくことが期待される。

審査結果の要旨

食品の放射線照射(食品照射)は、加熱による品質劣化や薬剤処理による残留性の恐れのない優れた食品保存、衛生管理技術として食肉・香辛料等の殺菌および農産物の発芽防止等に既に 60 カ国以上で利用されている。これらの照射食品の流通管理においては個々の目的に応じた照射条件を担保し、照射食品の健全性や消費者の選択権を保証することは必須であり、そのために汎用性の高い簡便な検知法の開発が求められている。しかし、既存の検知法は適用可能な食品に限られており、芽止めのために低線量で照射される馬鈴薯およびタマネギなども含めた、すべての照射食品に適用可能な高感度の検知法は未だ開発されていない。本論文では様々な食品に含まれている DNA の放射線照射による産物である 5,6-ジヒドロチミジン(DHdThd)に着目し、より高感度で汎用性の高い検知法開発を目指し、多様な食品に適用可能な以下の成果を得ている。

(1) 既存の検知法の適用が困難である牛レバーに対してヨウ化ナトリウムを用いた DHdThd の抽出定量法を考案し、検知の信頼性の向上と冷凍保管と加熱処理に影響を受けない頑健な検知条件を見出した。本検知法はガンマ線、電子線共に対応可能であることを立証した。さらにヨウ化ナトリウムを使用する市販キットを用いることにより、150 mg 程度の試料量から、一日以内で 0.5 kGy 以上の照射履歴を簡便に検知できる迅速法を確立した。

(2) 唐辛子を含む 9 種類の植物性食品(香辛料、茶葉)からの DNA 抽出に、植物繊維分解用のセルラーゼ処理および QIAGEN 製 Genomic-tip 100/G カラムの適用を実施することで、本法が植物性食品にも適用できることを明らかにした。

(3) 本法を検疫目的の殺虫や芽止めを目的とした低線量域の照射農産物へ適用可能とすることを旨とし、固相精製カラムによる精製過程の導入により DHdThd の検出感度の改善を図った。その結果、夾雑物の除去効率が飛躍的に向上し、実際に 60~150 Gy のガンマ線を照射した salmon sperm DNA から線量依存的に DHdThd を検出することに成功した。これを同じ低線量域で照射された芽止めタマネギに適用可能とするため、超音波処理と大容量 DNA 抽出カラムによる精製の組み合わせにより多量のタマネギ DNA を抽出する方法を確立し、実際に照射されたタマネギから照射特異的かつ線量依存的に DHdThd

を検出することに成功し、さらに 90 日間の室温保管に対する安定性を確認した。

以上の研究結果は、本法が動物性食品および植物性食品に対して適用可能である実用的な検知法へ飛躍的な改良を実現したと評価され、放射線照射食品の今後の流通管理の高度化と普及への貢献が期待できる。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。