

4. 電子加速器のビームの特徴と利用研究および関西を中心とする施設の現状

大阪ニュークリアサイエンス協会 奥田修一

電子加速器では、ビームのエネルギー、時間構造（パルス）、輝度などが制御でき、高度利用が行われている。電子ビームの特性と物質との相互作用の特徴、2次ビームとその応用、これまでの研究で得られたビーム利用に関する知見について述べた。一方で、新しい産業応用につながる基礎研究のために必要な汎用の加速器は、維持管理が困難になっている。関西を中心にこの現状を報告された。

令和元年度 ONSA 賞講演概要

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た 新規照射食品検知法の開発

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所
福井直樹、高取聡、藤原拓也、北川陽子

1. はじめに

1.1. 再着目された食品照射

食中毒の発生を未然に防止することは重要な課題である。我が国は魚介類の刺身のほか、馬刺しや鳥刺し等の食肉を生食する食文化がある。牛レバー、豚レバー等の内臓肉やユッケ、最近ブームのジビエ（狩猟で得た鹿、猪等の野生鳥獣の食肉）等、これらの食肉を生食することによって、病原微生物、寄生虫、E型肝炎ウイルス等を原因とした食中毒の危険性が高くなる。例えば、牛レバーを生食すると、腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症に罹患し、腎臓機能を低下させ溶血性尿毒症症候群（HUS：Hemolytic Uremic Syndrome）や脳症を併発する可能性も否めない^[1]。2011年に発生したユッケ喫食による集団食中毒は、病原性大腸菌 O-111 を原因とし^[2, 3]、食肉や臓器を含む食肉を生食することの危険性を我々に再認識させた。この食中毒を契機として、牛レバーの汚染実態調査や国内外の文献調査が行われ、牛レバーは表面だけでなくその内部まで病原性大腸菌等に汚染されている可能性が高いことが判明した^[1]。当時これらを除く有効な手段がなかったために、国民の健康保護の観点から食品衛生法が改正され、2012年7月から牛レバーを対象に^[4]、さらに2015年6月から豚レバーを含む豚肉を対象に^[5]、生食用として販売・提供することが禁止された。しかし、法規制された現在でも、加熱用としてレバーを提供しなかった飲食店の摘発事例や、牛レバーを含め食肉の生食による食中毒発生の報道が絶えない。食中毒発生の懸念があるにもかかわらず、これらの生食に対する根強い願望をもつ消費者もいる。法規制の一方で、畜産物の生食の安全性を確保する技術についての研究が厚生労働省研究班により進められ、塩素系消毒剤、高圧処理、放射線照射（照射）による殺菌効果の検討が行われている。食品の照射（食品照射）は、非加熱処理で食品の品質をほとんど変えることなく殺菌が可能な技術として世界的に広く普及している。FAO（国連食糧農業機関）/IAEA（国際原子力機関）の2006年1月のリストでは、食品照射許可国が57ヶ国記載されており^[6]、食肉の殺菌のみならず、殺虫、発芽防止等を目的に、香辛料、野菜類、果実類等に食品照射が実施され、2005年の統計では照射処理量40万5千トン、経済規模1兆6100億円と試算されている^[7]。カナダでは、食肉の殺菌を目的として、腸管出血性大腸菌汚染を原因とした2012年のエクセル社の牛挽肉大規模リコール事件を契機に2016年に牛挽肉への照射が許可されている^[8]。透過性の高い放射線の利点を活かして、生のままレバーの内部まで殺菌処理ができる方法として国内では食品照射が改めて着目されている。

1.2. 照射食品の検知法

食品照射では、食品の種類や線量により色調の変化や照射臭が生じることもあるが、適正な線量の範囲内であれば、照射に伴う変化について視覚的・官能的に識別することが困難である。このため消費者が食品を入手する際、照射された食品（照射食品）と非照射食品を自らの意思で選択できるよう、照射食品には表示が求められる。しかし、流通や販売の過程で表示の消失、あるいは偽装等が懸念され、照射の履歴を科学的に識別・立証するための判別方法（検知法）が不可欠である。我が国では、芽止め目的による馬鈴薯の照射のみが例外措置として認められているが、原則、食品照射は禁止されており、多くの国で照射が認められている香辛料等の照射食品の輸入や流通は禁止されている。このため、輸入食品に対して照射履歴を確認するために検疫所等で定期的にモニタリング検査が行われている。照射食品に対する規制は各国において異なることから、国際的取引においても科学的に保証できる手段として検知法が必要となる。また、病院食や宇宙食等の保存食では、滅菌処理された厳密な照射管理が必須であり食品の安全確保のうえで必要である。このように、検知法開発の意義は消費者への食品選択権の付与、流通管理や品質保証の信頼性および国際的取引等、多岐にわたるため、これまで国際的に様々な検知法が開発・検証されてきた。

検知法開発の端緒は 1960 年代であり一時下火になったものの、欧州圏内での統一規制の観点から、圏内の照射の表示に関する裏付けとして、1990 年頃から検知法開発に関する研究プロジェクト（FAO/IAEA による ADMIT および欧州委員会の融資により行われた BCR プロジェクト）が国際的に進められた経緯がある^[6, 9, 10, 11]。当時、欧州委員会によって検知法を標準化するための権限が欧州標準化委員会（CEN）に与えられ、これらの研究プロジェクトの成果をもとに、CEN が標準分析法（CEN 標準分析法）を制定し、現在 10 種類が存在する^[6]。これら分析法は、試験室間の共同試験によって、結果の再現性から妥当性に至るまで、その性能が評価されている。それぞれに適用できる食品に制約があり、多岐におよぶ照射食品を網羅的に識別できる単一の分析法は存在しない。また、CEN 標準分析法のうち 9 種類がコーデックスの標準分析法に採用されている。

我が国では、厚生労働省研究班により CEN 標準分析法等の検証が行われ、偽陽性率の低い確定的な方法として、熱ルミネッセンス（TL）法、アルキルシクロブタノン（ACB）法および電子スピン共鳴（ESR）法が公定法として通知されている。TL 法は、照射食品に付着または混入したケイ酸系鉱物の熱発光を指標としているため、鉱物を分離可能な香辛料、野菜、茶、甲殻類等に適用できる。TL 法では、照射履歴の判定に鉱物が必要であり、さらに分離した鉱物の再照射も必要な分析法であるため、単一の試験室での実施が困難である。ACB 法は、脂質が照射された際に生成するドデシルシクロブタノン等の ACB 類を指標としているため、脂質の多い食肉、卵、チーズ等に適用できるが、脂質が少ない食品の照射履歴の判定は困難である。ESR 法は、骨、貝殻、あるいは糖結晶内に生じたラジカルを指標としているため、カエルの足等の骨付きの肉、殻付の貝類および糖結晶を伴う乾燥果実等に適用できる。ラジカルは、加熱により消失し、常温で流通する食品では貯蔵期間によっては検知が困難となる^[12]。これらの公定法は、その特性と適用可能な食品の組み合わせを考慮して、検疫所等での輸入食品のモニタリング検査に活用されており、食品衛生法に違反する照射された食品も見つかっている。

1.3. 新たな検知法開発の着想

今後、殺菌を目的にレバーへの照射が認められた場合、その照射履歴を正しく識別できるための検知法を確立しておく必要がある。レバーは鉱物や骨のない食肉のカテゴリーで、一義的に ACB 法の適用が想定される。しかし、レバーの脂質含量は概ね 4%以下とされ、一定量の脂質（15%を超える）を伴う脂身付きの一般的な食肉と比較して必ずしも多くの脂質を含んでいないため、ACB 法

による検知は容易でない。そこで食品に普遍的に含まれる DNA が、放射線照射された際に受ける化学的变化に着目した。DNA は照射の「直接的な」ターゲットで検知指標としての活用が考えられる。特にレバーは、プリン体を多く含むため、DNA の抽出が容易と考えられる。DNA に着目した検知法は過去にも開発されている。照射による DNA 鎖切断を検出するコメットアッセイ、酵素免疫学的測定法 (ELISA) による DNA 中に生じた 8-オキソ-2'-デオキシグアノシン (8-oxo-dGuo) や 5,6-ジヒドロチミジン (DHdThd) 等の損傷ヌクレオシド (以下、損傷ヌクレオシド) の免疫学的な検出法である。前者のコメットアッセイは、多様な食品に適用可能と考えられるが、線量依存曲線の描出等の定量的な評価には電気泳動像の複雑な解析が必要であり^[13]、保存条件によっては DNA の分解によって判定が曖昧になることも考えられる。したがって、コメットアッセイは他の検知法と併用して結果の再検証を必要とするスクリーニング法に位置付けられている。後者の ELISA 法は、微量の損傷ヌクレオシドを特異的に認識する高品質の抗体が必要であり、この抗体の調製に時間を要する^[14]ため、日常的に使用するには非効率である。

近年、食品中の微量成分の分析に使用する機器の性能の向上が著しい。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) を用いることで、抗原抗体反応に依存することなく、微量の損傷ヌクレオシドを高精度に分析できるようになった。LC-MS/MS は、食品中の残留農薬等の分析のために、国内外の分析機関で普遍的に使用されている。主な損傷ヌクレオシドには、8-oxo-dGuo のほかチミジングリコール (dThd-glycol) 等があるが、これらは、照射以外にも活性酸素によっても生じる^[15, 16]。一方、DHdThd は、照射によりチミジン (dThd) から活性酸素の関与なく生成することから、8-oxo-dGuo および dThd-glycol よりも照射に対する特異性が高いことが示唆される。機器分析には、標準品の安定的供給が不可欠であるが、DHdThd の標準品は入手可能である。そこで照射したレバーから抽出した DNA をヌクレオシドに分解し、含まれる DHdThd を検知指標とし、LC-MS/MS で測定することで新たな照射食品検知法が確立できると考え、新たな検知法 (DHdThd 法) の開発に着手した。

DHdThd 法は、食品から DNA を抽出し、抽出した DNA を酵素によりヌクレオシドに分解後、DHdThd とその由来となる dThd を LC-MS/MS で測定する手法である。すなわち、3つの工程 (①食品からの DNA 抽出、②DNA のヌクレオシドへの分解および固相カラムと限外濾過膜による精製、③LC-MS/MS 測定) から構成される

(図 1)。本稿では DHdThd 法の構築に至る経緯を中心に、さらに多様な食品への適用性の拡大について検証した結果の概要について紹介する。



図1 新規照射食品検知法 (DHdThd法) のフロー図

2. DHdThd 法の構築

食品から DNA を採取し、得られた DNA をヌクレオシドに分解して DHdThd を検出する前に、まずは DNA の構成単位であるチミジン (dThd) 水溶液について、次に市販の DNA から調製した DNA 水溶液に対して γ 線を照射し、DHdThd を検出するための基礎的な条件を確立のうへ DHdThd 法の構築を目指した。

2.1. 放射線照射によってチミジンから生成するジヒドロチミジン

γ 線等の放射線照射（照射）により水溶液中の dThd から DHdThd が生成すること（図 2）は Sharpatyi らにより報告された^[17]。これら dThd と DHdThd は LC-MS/MS の性能にもよるが数 ng/mL レベルでも検出できる。分析カラムは、UPLC 対応の ODS カラム（Waters 社製 ACQUITY UPLC HSS T3 ; 2.1 × 100 mm, 1.8 μ m）を用い、移動相には 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液および 0.5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液を使用した。当該カラムは残留農薬分析でも使用する一般的なカラムである。LC-MS/MS は、LC 部に Nexera UPLC（株式会社 島津製作所）、MS/MS 部に 4000QTRAP（株式会社エービー・サイエックス）を使用した。測定対象成分のイオン化法には、ESI（electrospray ionization）法のポジティブモードを採用した。試験液中の DHdThd および dThd の定量下限はそれぞれ 0.6 ng/mL および 2.0 ng/mL であった。DHdThd に対して大過剰に存在する dThd の測定時には、試験液を精製水で 1~5 万倍に希釈して測定した。

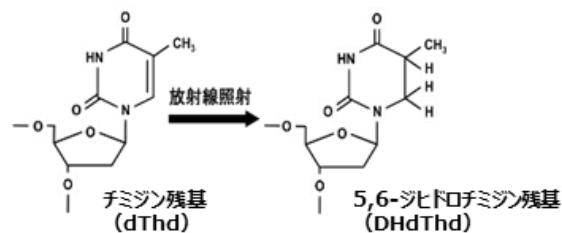


図2 放射線照射によりDNA中のチミジン（dThd）残基から5,6-ジヒドロチミジン（DHdThd）残基が生成する

DHdThd は、保持時間 4.8 および 5.6 分に 2 本のピークとして観測された（図 3）。これら 2 本のピークは 5 位の不斉炭素に起因するジアステレオマー（*S* および *R* 体）に相当する。DHdThd については、両異性体を合算定量し、その値を total-DHdThd とした。なお、標準品における異性体の比率は、85 : 15 であった（図 3A）。これは、標準品のテクニカルシートの混合比率に一致した。一方、dThd は保持時間 7.4 分に 1 本のピークとして観測された（図 3B）。検知指標には、dThd の定量値に対する DHdThd の定量値である total-DHdThd/dThd を用いた。これは、DNA 中の dThd に対する DHdThd の存在比を示す。

チミジン水溶液（1000 ppm ; 1 mg/mL）を凍結条件下（-20℃）で照射すると DHdThd が非照射試料で検出されず、照射試料で検出された（図 3C, E）。また、total-DHdThd/dThd は線量に依存して増加した（図 4）。例えば、約 9.3 kGy の γ 線を照射したとき、DHdThd が約 0.9 ppm 生成した。これを total-DHdThd/dThd で表すと概ね 9.0×10^{-4} となる。

dThd 水溶液同様に、 γ 線を照射した DNA をヌクレオシドに酵素分解し、精製を経て得られた試験液を LC-MS/MS 分析に供することにより、total-DHdThd/dThd を算出できる。例えば、サケ精巢由来 DNA（Salmon sperm DNA）を用いて調製した DNA 水溶液（5 mg/mL）を凍結下で照射した。照射後、DNA をヌクレオシドに酵素分解し、試験液中の DHdThd および dThd を測定のうえ、

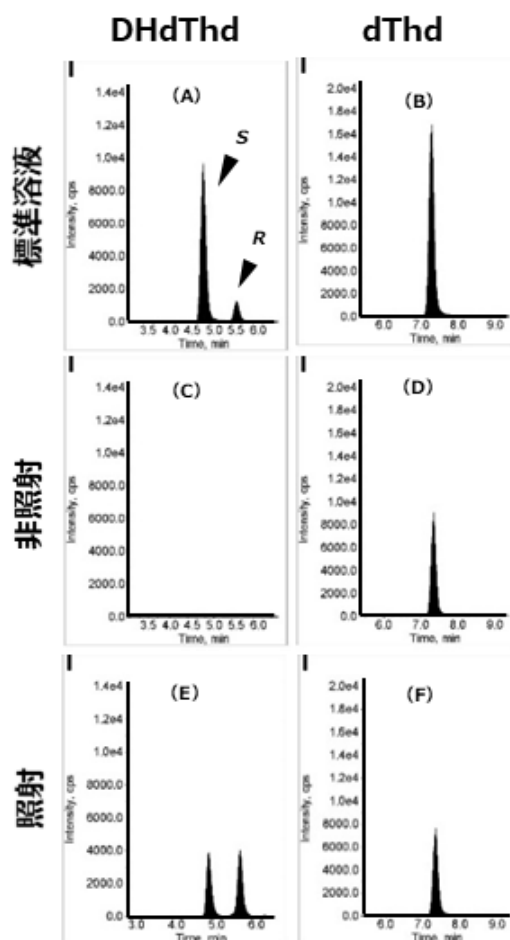


図3 代表的な照射dThd水溶液のクロマトグラム
標準溶液、(A)および(B) ;
非照射試料、(C)および(D) ;
照射試料(γ 線 9.3 kGy)、(E)および(F)

total-DHdThd/dThd を算出したところ線量に依存して増加した (図 4)。dThd 水溶液の照射に比較して、DNA 水溶液は total-DHdThd/dThd の値は概ね 1/3 と小さくなった。照射食品から得られた DNA においても同様の事象が観測できれば、total-DHdThd/dThd は有用な照射履歴の検知指標になると考えられた。

2.2. 生レバーの放射線照射履歴の検知

大阪市内で購入した個体の異なる 4 種類の牛生レバー (生レバー) を、約 3g ずつ食品用ラップフィルムで包装し、これら複数個を 50 mL 容ポリプロピレン (PP) 製容器に封入した。これらを -20°C 凍結下で 1 ~ 11 kGy の γ 線を大阪府立大学研究推進機構放射線研究センターもしくは (株) コーガアイソトープで照射した。照射後、試料は -20°C で保存した。なお、実際の線量は、試料の表面に貼付したラジオクロミックフィルムの感光度から算出した。図 1 のフローにより照射検知を試みた。

DNA 抽出には常法として活用されているフェノール・クロロホルムを用いた方法を一部改変して用いた。生レバー 7.5 g について、SDS および EDTA を含む Tris-HCl 緩衝溶液中で粉碎し、Proteinase K によりタンパク質を分解した。次にフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を経て得られた粗 DNA に対して RNase A 処理を行った。さらにフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出およびエタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA について、50% エタノールで洗浄した。エタノール濃度を通常 70% から下げることによって DNA 収量が減少したものの、純度の高い DNA をレバー 1 g あたり約 1 mg (1000 μ g) 得ることができた。DNA を 5 mg/mL になるように滅菌水に再溶解し DNA 水溶液 (80 μ L) を調製した。

得られた DNA は、2.1. で上述した Salmon sperm DNA と同様にヌクレオシドに分解した。すなわち、DNA (400 μ g) を、ヌクレアーゼ P1 およびアルカリホスファターゼにより、ヌクレオシドに分解した。分解した溶液中の不純物は、強陽イオン交換作用をもつ固相カラムにより除去し、さらに、限外濾過膜による精製を経て試験液とした。次いで試験液を 2.1. で上述したとおり LC-MS/MS で測定し、DHdThd および dThd を定量した。dThd の測定時には、試験液を精製水で 2 万倍に希釈した。これらの定量値より total-DHdThd/dThd を算出し検知指標に用いた。

LC-MS/MS の測定結果の一例を示した (図 5)。DHdThd の生成は照射特異的であり、非照射試料では、dThd のみが観測された (図 5A, B)。一方で照射試料では DHdThd の 2 本のピークが観測された (図 5C)。照射試料と非照射試料で dThd の生成はほぼ等量であり (図 5B, D)、DNA の分解効率も同等程度であった。検知指標の total-DHdThd/dThd も線量依存的に上昇し、右肩上がりの線量依存曲線が確認できた (図 6)。この線量依存曲線の縦軸は、total-DHdThd/dThd としていることで、試料間で DNA からヌクレオシドへの分解効率に差が生じていても、線量依存曲線

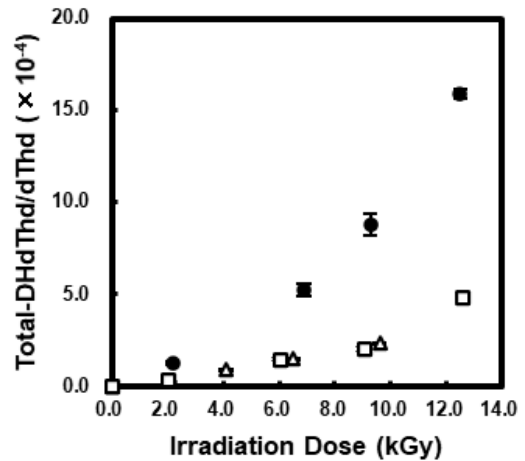


図4 線量とTotal-DHdThd/dThdの関係
● : dThd水溶液
△, □ : Salmon sperm DNA水溶液
※ n=3

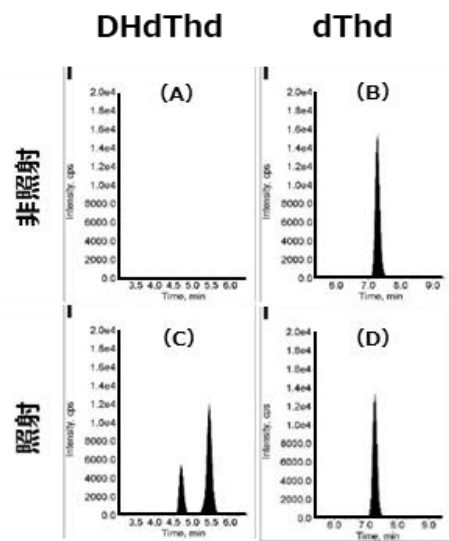


図5 代表的な生レバーのクロマトグラム
非照射試料,(A)および(B) ;
照射試料(γ 線 8.2 kGy),(C)および(D)

に影響が生じにくい。また、DNA は試料個体差あるいは部位の差が生じにくい。このため、total-DHdThd/dThd を縦軸とした線量依存曲線では、異なる4個体 (I~IV) に由来する生レバーでも近似した線量依存曲線が観測された。さらに、試料を220日間にわたり-20℃で冷凍保存した場合でも、この線量依存曲線の変化は僅少であった。これらのことから total-DHdThd/dThd は堅牢な検知指標であると考えられ、DHdThd 法の特長のひとつである。これにより、生レバーの照射履歴の検知を確立した^[18]。

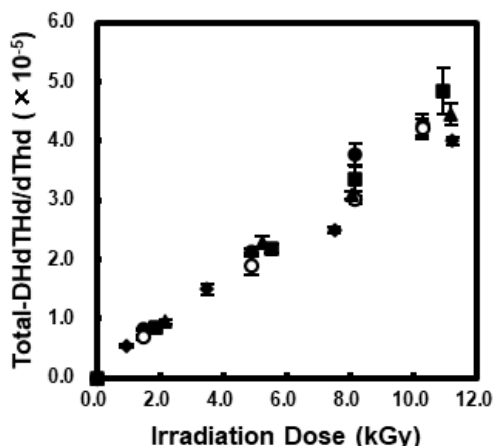


図6 生レバーのγ線照射結果

●: I (6), ▲: II (11), ■: III (22), ◆: IV (47), ○: I (220)
※ () はDNA抽出までの冷凍保存日数, n=3

2.3. 方法の改良

検知法の迅速化や高感度検出を図るための改良について工程ごとに検討した。

DNA 抽出工程では、後述するように、生レバーでは、カオトロピック試薬であるヨウ化ナトリウムを使用することで、簡便かつ迅速に生レバーから DNA を抽出することが可能となった。

DNA からヌクレオシドへの分解工程では、蛇毒ホスホジエステラーゼ (snake venom phosphodiesterase I : SVPD) による処理を併用した方法^[19, 20]を参考に改良することで、DNA の分解効率を高め、半量の DNA (200 μg) でも照射試料から DHdThd の生成の確認が可能となった。図7にγ線 6.5 kGy 照射した Salmon sperm DNA の一例を示したように、SVPD 存在下による分解では、Salmon sperm DNA および生レバーから得られた DNA とともに、S および R 体の異性体の生成比率が逆転した。SVPD 存在下では、S 体が優位に確認され、特に生レバーでは、線量によらず S 体の生成量が total-DHdThd の 85%相当と顕著に観測された。エキソヌクレアーゼの SVPD 存在下では、DHdThd を有する DNA 損傷部位の分解効率が高められ、DHdThd の生成量が増加することで、total-DHdThd/dThd は増加した。これは S 体の DHdThd 塩基部位が R 体の DHdThd 塩基部位よりもヌクレアーゼ P1 消化に対してより抵抗性であるという報告^[21, 22]によっても裏付けられる結果であった。

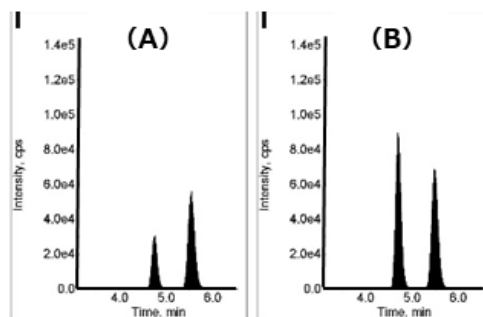


図7 DNAの酵素処理にSVPDを添加したことによるジヒドロチミンのクロマトグラムの比較

Salmon sperm DNA溶液にγ線6.5 kGy照射
SVPD未添加 (A), SVPD添加 (B)
※ SVPD ; Snake venom phosphodiesterase I

LC-MS/MS による測定では、DHdThd の定量時には、試験液中に過剰に存在する他のヌクレオシド等の妨害成分の影響によってイオン化が強く抑制されるために検出器へのイオン導入量が減少し、DHdThd の生成量が過小評価されることが判明した。このため、DHdThd の定量に用いる標準溶液に、照射試料と同様に処理を行った非照射試料から得られた試験液に DHdThd を添加したマトリックス添加標準溶液を調製した。このマトリックス添加標準溶液で作成したマトリックス検量線を使用することにより、イオン化抑制の影響を補正し、正確な DHdThd の定量値が得られることが可能となった。

これらの工程ごとの改良によって、後述するγ線と電子線照射による生レバーの比較結果において、線量依存曲線の傾きが大きくなることが確認されるとともに、照射履歴の検知に必要な時間の短縮が可能となった。

3. 動物性食品への適用範囲の拡大

生レバー以外の他の動物性食品への適用を試みた。2015年のEUにおける品目別の食品照射量の統計において、冷凍カエル脚、食鳥肉、冷凍むきエビが動物性食品の上位を占めている^[8]。肉類は脂質の多い食品であることからACB法が、エビは脂質が少ないために珪酸塩鉱物を対象にTL法が照射履歴の判定法として実用化されている。これら食品中の脂質の多寡によって検知法を選択するのではなく、一貫してDHdThd法が適用可能か検証した。

3.1. エビへの適用

エビ（ブラックタイガー）を2尾ずつ50 mL容PP製容器に頭部を除いて殻ごと封入し、-20°C凍結下で1~11 kGyのγ線を照射した。エビからのDNA抽出は、殻を取り除き上述した2.2.をもとに、フェノール・クロロホルム抽出法で行った。RNase A処理前に50%エタノール処理を行うことで抽出時間が短縮可能となり、純度の高いDNAが試料6 gから3.8 mg程度得られた。得られたDNA 200 μg相当を上述した2.3.の改良方法で酵素分解し、試験液をマトリックス検量線で定量した。γ線を0.49 kGy照射した試料について、照射履歴が検知可能であった。また、DHdThdは照射特異的に2本のピークとして検出され、線量によらずS体の生成量がtotal-DHdThdの90%相当で観測された。total-DHdThdは、生レバー同様に線量に伴って増加した。3種類のエビにおいてtotal-DHdThd/dThdは線量に対して近似する一方、生レバーと比較すると約3倍高い値であり、線量依存曲線の傾きが約3倍大きくなった。エビではtotal-DHdThdが単位線量当たり約3倍高い効率で生成することが示唆された。原因の一つに、エビは水分含有量が高く、total-DHdThd生成に係る放射線による間接作用が効率的に進行したことが推察された。また、照射後4日目と102日目にDNA抽出した結果が近似していることから、少なくとも98日間の冷凍保存条件で安定であることが確認できた。すなわち、200 μgのDNAからDHdThdが検知可能であったこと、およびエビDNAが試料1 gあたり0.6 mg採取できることを考慮すると、照射履歴の判定に必要な試料重量は約0.3 gと算定された。脂質の少ないエビにACB法を適用した報告^[23]において分析に供した試料重量は15 gであり、DHdThd法の試料重量はこの約2%程度に相当した。エビの照射履歴の判定に実用化されているTL法は、背腸に含まれる珪酸系鉱物を対象にしており、これらが採取できること、かつ、γ線を再照射する必要がある手間と時間を要する。本法では再照射する必要がなく、珪酸系鉱物の含まれる背腸の有無にも影響されない利点が挙げられる。

3.2. 牛肉への適用

異なる3個体由来する牛ミンチ（牛肉）を棒状（内径12 mm、長さ100 mm、約10 g）に成型し食品用ラップフィルムで包み、複数本をポリエチレン袋に封入後、-20°C凍結下で1~11 kGyのγ線を照射した。牛肉からのDNA抽出は上述した2.2.に準じ、フェノール・クロロホルム抽出法で行った。これにより、牛肉6 gから2.4 mg程度の純度の高いDNAが回収でき、このDNA 200 μgをエビと同様に測定に供した。DHdThdの照射特異性が確認され、線量によらずS体の生成量がtotal-DHdThdの80%相当で観測された。0.3 kGy照射した牛肉の照射履歴が検知可能

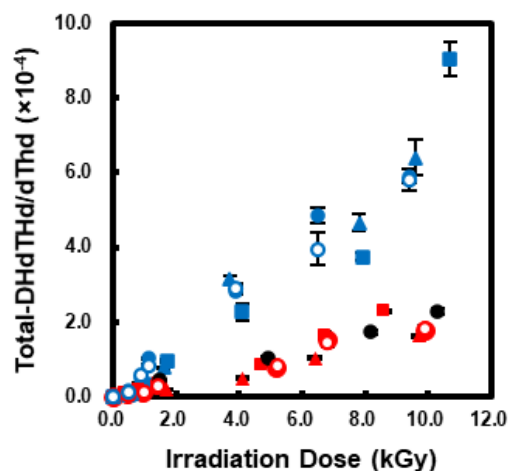


図8 エビおよび牛肉のガンマ線照射結果

- : エビ I (4)
 - : エビ I (102)
 - ▲ : エビ II (5)
 - : エビ III (4)
 - : 生レバー (220)
 - : 牛肉 I (3)
 - : 牛肉 I (56)
 - ▲ : 牛肉 II (151)
 - : 牛肉 III (153)
- * () はDNA抽出までの冷凍保存日数, n=3

であった。3種類の牛肉において、生レバー同様に線量依存的に total-DHdThd/dThd は増加し、線量依存曲線は生レバーとほぼ重なった (図 8)。照射後 3 日目と 56 日目に DNA 抽出した結果も近似し、少なくとも 53 日間の冷凍保存条件下で安定であることが確認できた。脂質の少ないエビ、脂質の多い牛肉ともに照射履歴の検知に成功し、脂質の多寡によらず DHdThd 法が適用できることが確認できた。

4. DHdThd 法と公定法の比較

生レバーで構築した DHdThd 法の性能・信頼性を評価するために、共通試料を用いて公定法と比較した。ACB 法は脂質の多い試料を対象とした公定法であり、その原理は、脂質が放射線照射を受けた際に、脂肪酸から生成する 2-ドデシルシクロブタノン (DCB) および 2-テトラデシルシクロブタノン (TCB) 等のアルキルシクロブタノン類を検知指標として検出するものである。生レバーは脂質含量が少なく、試料からの脂肪抽出が困難であったため、脂質含量が多い食肉を共通試料とした。上述した 3. 2. の γ 線を照射した牛肉を分割し、DHdThd 法および ACB 法の双方で比較した (図 9)。

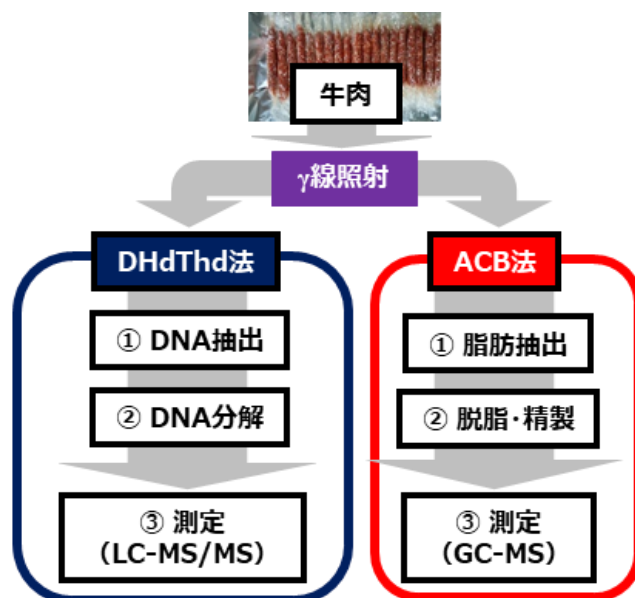


図9 牛肉を共通試料として γ 線照射し、ジヒドロチミジン (DHdThd) 法およびアルキルシクロブタノン (ACB) 法で比較する

4. 1. ACB 法

ACB 法は食品試料からの脂肪抽出、脱脂・精製および質量分析計付ガスクロマトグラフ (GC-MS) 測定の三段階のプロセスで構成される (図 9)。 γ 線照射した牛肉を含め、レトルト牛丼にも適用できる迅速で簡便な ACB 法を開発^[24, 25, 26]し次のとおり分析した。脂肪抽出工程では、牛肉 5 g と珪藻土 5 g を乳鉢内で混合しよくすり潰した後、ヘキサンを加えて振とう抽出し、遠心分離後に No. 5A 濾紙で濾過後、濾過液を回収した。濾過液をエバポレータにより減圧濃縮し、70°C で 30 分間にわたり乾燥器内で乾燥し脂肪を得た。試料 5.0 g から抽出された脂肪重量から牛肉の脂肪含有量は個体 I で 9.6%、個体 II で 8.6%、個体 III で 6.7% と算出した。脱脂・精製工程では、脂肪抽出工程で得られた脂肪 0.2 g を、アセトンおよびアセトニトリルを加えて攪拌後、-20°C で 30 分間冷凍脱脂した。遠心分離後、上清を回収し、窒素吹き付けにより溶媒を揮発させた後、ヘキサンに転溶した (粗抽出液)。粗抽出液をシリカゲルカラム (石英ウールを下部に詰めたパスツールピペットにシリカゲルを詰めて作製) により精製した。次いでこれを窒素吹き付けにより溶媒を揮発させた後、内部標準溶液 (2-シクロヘキシルシクロヘキサノン) を加えたヘキサン溶液に溶解して試験液とした。GC-MS 測定では、代表的な DCB と TCB を測定対象とし、これらの合算値 (ACBs) を内標準法により算出した。DCB および TCB は照射特異的に生成し、その量は線量の上昇に伴って増加した。例えば、5.2 kGy で照射した個体 I では、抽出脂肪 1.0 g 中に DCB が 509 ± 100 ng、TCB が 588 ± 74 ng 検出された。照射線量の範囲 (0.3 ~ 9.8 kGy) において、DCB と TCB の濃度比は約 1 : 1 であった。

4. 2. DHdThd 法と ACB 法の相関

DHdThd 法の検知指標である total-DHdThd/dThd と ACB 法の検知指標である ACBs の結果を比較した。異なる 3 個体に由来する牛肉において差異はあるものの、total-DHdThd/dThd と ACBs の間には

高い正の相関関係（相関係数 0.96~0.99）があることが確認された(図 10)。ACBs は公定法に利用されている検知指標であることから、total-DHdThd/dThd と ACBs に明確な相関関係が認められ、新たな検知指標として total-DHdThd/dThd の高い信頼性が確認できた。ACBs の生成量は試料の個体差のばらつきが大きくなる一方、total-DHdThd/dThd は、total-DHdThd と dThd の存在比であり、ばらつきが小さくなった。検討した 3 種類の牛肉で最も脂肪含有量の低い個体Ⅲのように ACBs の生成量は、脂肪含有量の低い牛肉において高線量照射で低下する可能性が認められた。一方、total-DHdThd/dThd は、個々の牛肉の試料間の個体差にかかわらず近似した値であり、ACBs の生成量よりも安定している指標であると考えられた。本法と公定法である ACB 法の間において、高い相関性が認められたことから、本法の信頼性について一定の裏付けがされた^[27]。

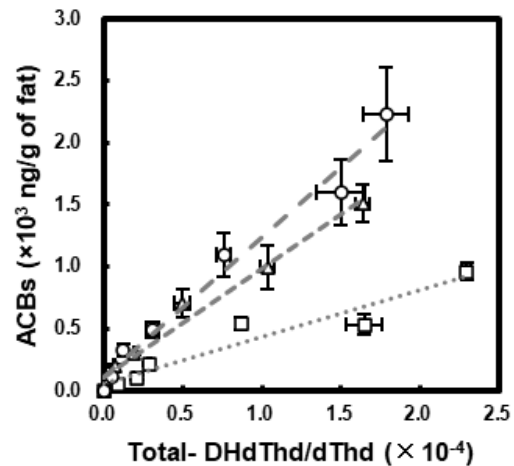


図10 牛肉のTotal-DHdThd/dThdとACBsの比較

○: I (Total-DHdThd/dThd;3, ACBs;7)
 △: II (Total-DHdThd/dThd;151, ACBs;2)
 □: III (Total-DHdThd/dThd;153, ACBs;4)
 ※ () はDNA抽出または油抽出までの冷凍保存日数, n=3

5. γ 線以外の他の線源を用いた検証

食品照射には、コバルト 60 およびセシウム 137 からの γ 線以外にも 10 MeV 未満の電子線照射も認められている^[6, 28]。 γ 線照射で DHdThd の生成が確認できたため、電子線照射によっても DHdThd が生成することは容易に推測できる。線源の違いによる DHdThd の生成に関する知見を得る目的で生レバーを用いて検証した。

5.1. γ 線照射と電子線照射の比較

異なる 4 個体由来する生レバーを試料として二組用意し、それぞれ γ 線と電子線を照射した。 γ 線照射 (2.7 kGy/h) は大阪府立大学研究推進機構放射線研究センターで、電子線照射 (線量に応じて 4~40 MGy/h) は原子燃料工業 (株) で実施した。約 10 g の生レバー断片 (長さ×幅×高さ: 40×20×5 mm) をそれぞれ食品用ラップフィルムで包み、複数個をプラスチック製ディッシュ (内径 100 mm、高さ 20 mm) に封入後、-20℃で凍結した。これらを凍結条件下で計画線量 1~8 kGy で照射し、実線量はディッシュの表裏に貼りつけたラジオクロミックフィルムで計測した。試料 1 g を対象に、上述した 2.3. の改良方法により DNA 抽出および DNA を酵素分解し、得られた試験液を LC-MS/MS で測定した。また、 γ 線あるいは電子線照射した生レバー (個体Ⅳ) は、電子レンジ (170W) で中心温度が 90℃以上になるよう 180 秒間加熱して DHdThd が検知できるか確認した。

DNA 抽出にヨウ化ナトリウム法を採用することで、生レバー 1 g あたり 2.4~3.4 mg の高純度の DNA が得られた。抽出時間も 5 時間で、抽出に 2 日間を要した常法のフェノール・クロロホルム法に比べて抽出時間の短縮が可能となった。 γ 線あるいは電子線照射したいずれの試料においても、DNA 収量や純度の差は確認されなかった。また、電子レンジで加熱した生レバーは抽出工程で、DNA 沈殿が黒褐色を呈したが、クロロホルムを用いた精製工程を追加することで、白色沈殿となり純度の高い DNA が得られた。

DHdThd は照射特異的に生成し、 γ 線あるいは電子線の線源や線量によらず S 体の生成量が

total-DHdThd の約 85%相当観測された。さらに、total-DHdThd/dThd の線量依存曲線は、異なる 4 個体で類似しており、相互に重なりが認められた (図 11)。

γ 線照射した生レバー (個体IV) について、(1)照射後 6 日目に抽出、(2) -20°C で 127 日間保存後に抽出、および(3) -20°C で 175 日間保存後に電子レンジ加熱後に抽出した。非照射の生レバーを電子レンジ加熱しても、DHdThd は観測されず、また、照射試料を電子レンジ加熱しても照射履歴の判定は可能であった。上記(1)~(3)の条件について、1 kGy あたりの total-DHdThd/dThd を線量ごとに示した (図 12)。0.48 kGy を除いて、線量によらず、これらの値について顕著な差は認められず、概ね $3.0 \times 10^{-5} \text{ kGy}^{-1}$ の一定値を示した。1 kGy あたりの total-DHdThd/dThd が一定であることは、線量依存曲線が一次回帰的であり、抽出した DNA の質の優劣に伴ってヌクレオシドへの分解効率に差が生じても補正されることに由来すると考えられた。

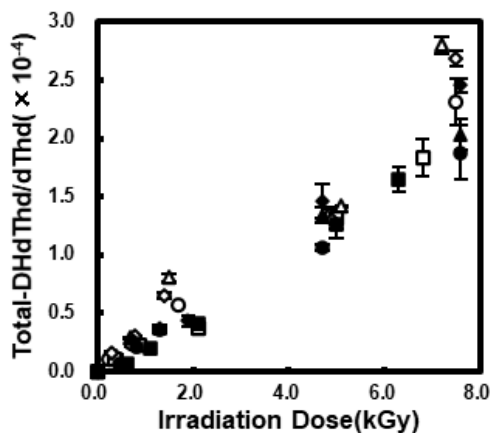


図 11 生レバーの γ 線および電子線の照射比較

- : I; γ 線(22) ○: I;電子線(22)
- ▲: II; γ 線(13) △: II;電子線(13)
- : III; γ 線(10) □: III;電子線(9)
- ◆: IV; γ 線(6) ◇: IV;電子線(6)
- ※ () はDNA抽出までの冷凍保存日数, n=3

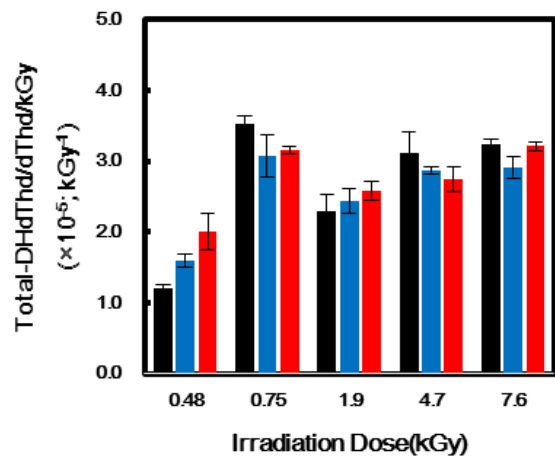


図 12 電子レンジ加熱した γ 線照射レバーの 1kGyあたりのTotal-DHdThd/dThd
 ■: IV(6) ■: IV(127)
 ■: IV(175; 電子レンジ170W, 180秒加熱)
 ※ () はDNA抽出までの冷凍保存日数, n=3

5.2. レバーに照射した線量の推定

Total-DHdThd/dThd は、試料の個体差、線源、保存期間あるいは加熱によっても変動が少ない堅牢な検知指標であることが示された。この特長を活かし、既知の線量を照射した 1 個体から得た線量依存曲線をもとに、他の個体の total-DHdThd/dThd から試料に照射された線量 ($D_{\text{計測}}$) を算出した。電子線照射した生レバー (個体 I) の線量依存曲線は、 y を total-DHdThd/dThd (10^{-4})、 x を線量 (kGy) として、 $y = 0.297x + 0.025$ (決定係数: 0.993) で一次式に回帰できた。この一次回帰式を用いて γ 線あるいは電子線照射した生レバー (個体 I ~ IV、電子レンジ加熱した照射生レバーを含む) の 12 種類について、ラジオクロミックフィルムで計測した実際の線量 ($D_{\text{実測}}$) に対する算出した線量 ($D_{\text{計測}}$) の比 ($D_{\text{計測}}/D_{\text{実測}}$) は、4.67~7.62 kGy の範囲において 0.74~1.30 であった。本法は、照射の検知のみならず、照射線量の推定も可能と考えられた^[29]。

6. 多様な食品への適用拡大

DHdThd 法の多様な食品への適用を目的に検証した。植物性食品については、常法のフェノール・クロロホルムやヨウ化ナトリウムを使用した DNA 抽出法により、DHdThd 法が適用できるだけの十分な量の DNA が得られなかった。そこで遺伝子組み換え食品検査で適用する DNA 抽出法を参考にして、

食品から DNA を抽出する際にセルラーゼを加えて酵素反応を行った後、これを陰イオン交換カラムで精製することにより、植物性食品 (2~5 g) から 100 μg 程度の高純度の DNA を数時間で抽出可能であった。また、セルラーゼを添加せずに酵素反応すると、動物性食品からも DNA の抽出は可能であった。現在までに、鶏肉、豚肉、タラコ、ホタテ貝柱、チリメンジャコ、マグロ、生シイタケ、乾燥トウガラシ、ブロッコリースプラウト、乾燥シイタケ、大麦若葉粉末からの DNA 抽出が可能であることを確認できた。試料 1 g あたりの DNA 収量は、多い食品として生レバー、乾燥トウガラシおよび大麦若葉粉末で概ね 200 $\mu\text{g/g}$ 以上であり、最も少ない食品として生シイタケで 30 $\mu\text{g/g}$ であった。これら食品に 8~9 kGy の γ 線を照射し、80 μg の DNA をヌクレオシドに分解して測定に供した。チリメンジャコのクロマトグラムの特例を示した

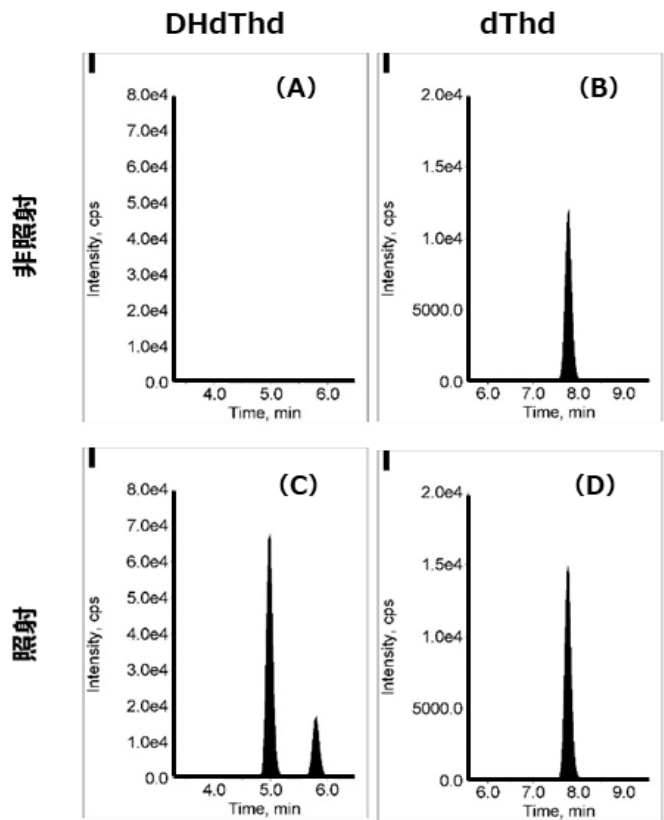


図13 代表的なDHdThdおよびdThdのクロマトグラム (チリメンジャコ) 非照射試料,(A)および(B); 照射試料(γ 線 8.6kGy),(C)および(D)

(図 13)。DHdThd が照射特異的に生成し、S 体の生成量が大半をしめた。植物性食品の一部の試料 (乾燥トウガラシ、乾燥シイタケおよび大麦若葉粉末) では、非照射試料からも DHdThd が検出される保持時間に極微量のピークが認められた。しかしその量は、殺菌を目的とする線量 (5~10 kGy) を照射した試料の概ね 5% 程度未満であり、照射履歴の判別に大きな支障とならないと考えている。また、DNA の抽出できた多様な食品について、1 kGy あたりの total-DHdThd/dThd を示した (図 14)。鶏、豚等の食肉での 1 kGy あたりの total-DHdThd/dThd は、概ね $0.2\sim 0.3 \times 10^{-4}$ であり、レバーと類似していた。一方、魚介類では、マグロは食肉と類似した値であったが、タラコ、ホタテ貝柱およびチリメンジャコの total-DHdThd/dThd は、 $0.4\sim 1.4 \times 10^{-4}$ となり、食肉よりも高値であり、上述した 3.1. のエビの結果とも類似していた。DHdThd は、主に間接作用によって生成するため、食肉よりも水分含量が高い魚介類等で 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大麦若葉粉末における 1 kGy 照射あたりの total-DHdThd/dThd は、概ね $0.1\sim 0.4 \times 10^{-4}$ と低い傾向であった。本法は、DNA の

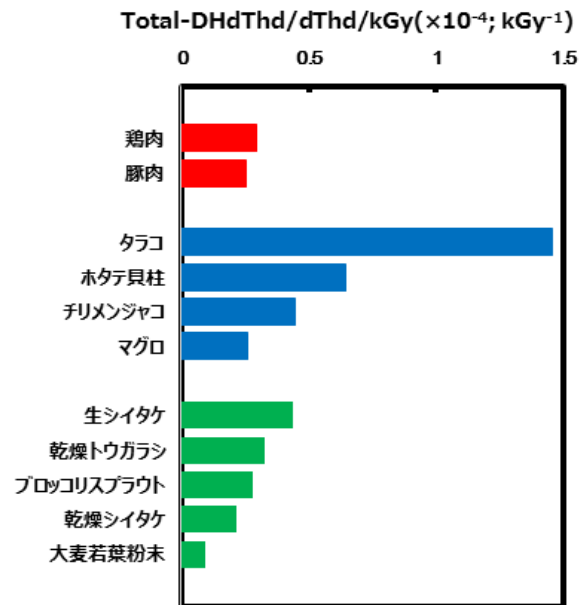


図14 多種類の試料を凍結条件下でガンマ線照射 (8~9kGy) した場合の、1 kGyあたりの Total-DHdThd/dThd

抽出が可能であれば多様な食品に適用できる可能性が示唆された^[30]。

7. まとめ

新規に開発した DHdThd 法は、次の 4 点が特長に挙げられる。

- ① 食品に普遍的に含まれる DNA が放射線照射された際に生成する損傷ヌクレオシドのひとつである DHdThd を指標とするため、適用可能な食品は多様である。食品から DNA を採取さえできれば、照射履歴が検知できると考えられる。
- ② DHdThd は、他の放射線損傷ヌクレオシドと比較して、放射線照射に対する特異性が高い。
- ③ 食品の理化学検査等で汎用的に使用される LC-MS/MS により検出可能であることから、検疫所や衛生研究所等に広く波及が期待され、輸入食品検査にも適用可能である。
- ④ 検知指標の total-DHdThd/dThd は明確な線量依存曲線を示すことから線量の推測が可能で、照射履歴の判定のみならず適正な線量管理にも活用できることが期待できる。

8. 今後の展望

食品照射で利用される線量は、殺菌、殺虫、芽止め等の目的により異なるが、これまで、殺菌、殺虫を目的とした概ね 1 kGy 程度以上の線量で照射される食品を念頭に検知を試みた結果、DHdThd を指標とした検知法が有用であることを見いだした。国内で照射実態のある馬鈴薯および中国での照射量の多いニンニク等の芽止めを目的とした線量は、細胞分裂の抑制を引き起こすとされる概ね 0.02~0.15 kGy である^[28, 31]。また、近年では、低線量照射が熱帯産果実等を対象とした植物防疫（害虫の繁殖防止）の方法として、オゾン層破壊物質の臭化メチル等の薬剤燻蒸処理の代わりに世界的に急速に拡大している。さらに、 γ 線照射よりも取扱いが簡易な低エネルギー電子線または X 線照射装置の導入も進められている^[32]。これらの低線量域を中心に DHdThd 法の適用範囲を拡大する展望を描いている。また、DHdThd 以外の放射線照射に対する特異性が高い他の損傷ヌクレオシドを探索し、補助指標としての活用を検討する。DHdThd を指標とした本法が食品の種類や線量域を問わず、食品から DNA を抽出できれば照射履歴を判定できることを明らかにすることを目指していきたい。

9. 謝辞

本研究は多くの皆様方のご支援とご協力を賜り遂行されたもので、本稿はその成果について紹介したものです。大阪府立大学工学研究科量子放射線系専攻量子線化学生物学研究室（古田研究室）の古田雅一先生には、食品照射領域および研究計画に関して多大なるご指導とご助言を、ならびに古田研究室の関係各位には実験のご協力を賜りました。また、本研究の着想および先行研究の検討を含めて有益なご助言を前大阪府立公衆衛生研究所副所長の尾花裕孝様に賜りました。さらに、大阪府立大学研究推進機構放射線研究センターおよび(株)コーガアイソトープの皆様には γ 線照射に、原子燃料工業(株)の皆様には電子線照射にご協力を賜りました。皆様方に厚く御礼申し上げます。また、本研究は、JSPS 科研費（基盤研究(C); 25460833）、JSPS 科研費（研究活動スタート支援; 16H07502）および（公財）浦上食品・食文化記念財団による研究助成を受けて実施いたしました。

参考文献

- [1] 品川邦帆, ファルマシア, 49(2013)22.
- [2] M. Watahiki, J. Isobe, K. Kimata, T. Shima, J. Kanatani, M. Shimizu, A. Nagata, K Kawakami, M. Yamada, H. Izumiya, S. Iyoda, T. Morita-Ishihara, J. Mitobe, J. Terajima, M. Ohnishi,

- T. Sata, *J. Clin. Microbiol.*, 52(2014)2757.
- [3] Y. Yahata, T. Misaki, Y. Ishida, M. Nagira, M. Watahiki, J. Isobe, J. Terajima, S. Iyoda, J. Mitobe, M. Ohnishi, T. Sata, K. Taniguchi, Y. Tada, N. Okabe, E. coli O111 Outbreak Investigation Team(2015), *Epidemiol. Infect.*, 143(2015)2721.
- [4] 平成 24 年厚生労働省告示第 404 号.
- [5] 平成 27 年厚生労働省告示第 289 号.
- [6] 林徹, 食品・農業分野の放射線利用(2008).
- [7] 久米民和, 食品照射, 43(2008)46.
- [8] 日本食品照射研究協議会, 食品照射 INFORMATION 第 1 号(2017).
- [9] 宮原誠, 食品照射, 37(2002)29.
- [10] 等々力節子, *RADIOISOTOPES*, 49(2000)467
- [11] 林徹, 食品照射, 45(2010)47.
- [12] S. Chabance, I. Pouliquen-Sonaglia, J. Raffi, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 79(2001)103.
- [13] N. Cetinkaya, D. Ercin, S. Özvatan, Y. Erel, *Food Chem.*, 192(2016)370.
- [14] K. Hubbard, H. Ide, B. F. Erlanger, S. S. Wallace, *Biochemistry*, 28(1989)4382.
- [15] J. Cadet, K. J. A. Davies, M. H. Medeiros, P. Di Mascio, J. R. Wagner, *Free Radic. Biol. Med.*, 107(2017)13.
- [16] Y. Hua, S. B. Wainhaus, Y. Yang, L. Shen, Y. Xiong, X. Xu, F. Zhang, J. L. Bolton, R. B. van Breemen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12(2001)80.
- [17] V. A. Sharpatyi, J. Cadet, R. Teoule, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 33(1978)419.
- [18] N. Fukui, S. Takatori, Y. Kitagawa, M. Okihashi, E. Ishikawa, T. Fujiyama, K. Kajimura, M. Furuta, H. Obana, *Food Chem.*, 216(2017)186.
- [19] G. S. Madugundu, J. Cadet, J. R. Wagner, *Nucleic Acids Res.*, 42(2014)7450.
- [20] F. Samson-Thibault, G. S. Madugundu, S. Gao, J. Cadet, J. R. Wagner, *Chem. Res. Toxicol.*, 25(2012)1902.
- [21] M. Weinfeld, K. J. Soderlind, G. W. Buchko, *Nucleic Acids Res.*, 21(1993)621.
- [22] J. M. Falcone, H. C. Box, *Biochim. Biophys. Acta*, 1337(1997)267.
- [23] S. Chen, Y. Morita, K. Saito, H. Kameya, M. Nakajima, S. Todoriki, *J. Agric. Food Chem.*, 59(2011)78.
- [24] Y. Kitagawa, M. Okihashi, S. Takatori, K. Kajimura, H. Obana, M. Furuta, T. Nishiyama, *Food Anal. Methods*, 7 (2014) 1066.
- [25] 北川陽子, 起橋雅浩, 高取聡, 福井直樹, 梶村計志, 尾花裕孝, 古田雅一, 食品照射, 4(2014)3.
- [26] 北川陽子, 起橋雅浩, 高取聡, 福井直樹, 梶村計志, 尾花裕孝, 古田雅一, 食品照射, 51(2016)17.
- [27] N. Fukui, S. Takatori, Y. Kitagawa, T. Fujiwara, E. Ishikawa, T. Fujiyama, K. Kajimura, M. Furuta, H. Obana, *J. Agric. Food Chem.*, 65(2017)9342.
- [28] 林徹, 化学と生物, 50(2012)345.
- [29] T. Fujiwara, N. Fukui, Y. Kitagawa, K. Kajimura, H. Obana, E. Ishikawa, M. Furuta, S. Takatori, *ACS Omega*, 4(2019)12325.
- [30] 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, 放射線と産業,

146(2019)30.

[31] 小林泰彦, 菊地正博, 放射線化学, 88(2009)18.

[32] 久米民和, 等々力節子, RADIOISOTOPES, 68(2019)469.

会員紹介

ナノグレイ株式会社の製品紹介

ナノグレイ(株) 社長 宮下 拓

1. はじめに

ナノグレイ(株)は2006年に創業した小企業で、微弱線源をもちいた放射線応用計測器を製造・販売している。

創業当時、我が国での放射線応用計測器の使用状況は、工場で使用できる厚さ計、レベル計、密度計では、原子力規制委員会(当時の文部科学省)の許可を必要とするものがほとんどで、許可・届出を必要としない免除レベルの線源を用いた放射線応用計測器は、土木用など一部の密度計あるいは水分計、液化ガスボンベのレベル計、有毒ガス検知器などに限られていた。

2005年にR I規制法(当時の放射線障害防止法)の大改正があり、B S S取り入れに伴う免除レベルの引き下げとともに、設計認証制度が創設され一種の規制緩和がなされた。即ち、設計認証を取得すれば、主任者資格や管理区域なしに使用できる数量の範囲が広がった。我々はこれをチャンスと捉え、厚さ計、レベル計、密度計について、積極的に設計認証を取得し、工場でも使用可能なものを目指した。

2011年の福島原発事故によって、社会が放射線を見る目がより厳しくなったが、既に許可線源を使用している顧客から見れば、取扱は簡単になりより安全になるということで前向きに評価してくれた顧客も多かった。さらに、全く放射線を使用していなかった顧客が今までにない評価法として採用してくれた。

放射線検出器としては、製品の大半がシンチレータと光電子増倍管を組み合わせたものを使用している。

2. ベータ線厚さ計 SB-1100

ロール to ロールの製造ラインにおけるオンラインベータ線厚さ計としては、許可が必要な線源と電離箱検出器の組み合わせが使われてきた。用途は樹脂フィルムの成型ラインやリチウムイオン電池電極の活物質の塗工乾燥ラインなどである。1979年に主に空港のエックス線検査装置を広めるために法令が緩和され、それに伴い軟エックス線厚さ計も管理区域をないものとして取り扱って良いようになった。それにより、ベータ線厚さ計からエックス線厚さ計に需要が流れ、ベータ線厚さ計の需要が激減した。

弊社では、2009年と2012年にそれぞれPm-147線源とKr-85線源について設計認証を取得した[1]。管理区域や主任者の問題が解決されれば、ベータ線はエックス線管のように突然切れることはなく、測定対象物の元素依存性も少ないなどのメリットが再評価されてきている。従来、許可線源でしか対応できなかったリチウムイオン電池電極の活物質の塗工乾燥ラインや塩ビ壁紙の製造ライン、さらにこれまでベータ線があまり使われていなかった用途にも導入してもらうことに成功した。