

食品総合研究所研究報告

REPORT OF NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE

80

平成28年 3 月
March, 2016

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

食品総合研究所

NARO Food Research Institute (NFRI)

National Agriculture and Food Research Organization (NARO)

Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

この印刷物は、環境物品等の調達に関する法律（グリーン購入法）に基づく基本方針の判断基準を満足する古紙配合率100%、白色度70%以下の非塗工印刷用紙を使用しています。但し、表紙は除く（古紙は、新聞古紙等の市中回収古紙を100%原料として使用）。

食品総合研究所研究報告

第 80 号

平成 28 年 3 月

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

食品総合研究所

食品総合研究所研究報告

第 80 号

所長	大谷敏郎					
編集委員会						
委員長	長嶋等					
委員	矢野裕之	稲津康弘				
	八巻幸二	逸見林				
	中村敏英	小				
	伊藤康博					
事務局	濱野保文					

REPORT OF NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE

No. 80

President and Director General

OHTANI Toshio

Editorial Board

Chairman NAGASHIMA Hitoshi

Members YANO Hiroyuki

INATSU Yasuhiro

YAMAKI Kohji

HEMMI Hikaru

NAKAMURA Toshihide

KOBAYASHI Isao

ITO Yasuhiro

Secretary HAMANO Yasufumi

NARO Food Research Institute (NFRI)

National Agriculture and Food Research Organization (NARO)

Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

食品総合研究所報告（第80号）目次

報 文

ラットによる食品含有フラボノイドの肝臓、血清コレステロール、血清8-イソプロスタニンに及ぼす影響の検討 八巻 幸二, 高橋 陽子	1
3M™ Molecular Detection Systemを用いた <i>Listeria monocytogenes</i> の簡易迅速遺伝子検査法の評価 川崎 晋, 持田 麻里, 齋藤 美枝, 守山 隆敏	9
Two models of a farming environment: the fate of <i>Escherichia coli</i> contaminating either soil or water with soil Yukie Hosotani, Susumu Kawasaki, Thongsavath Chanthasombath, Borarin Buntong, Md Latiful Bari, and Yasuhiro Inatsu	17
Glutathione changes physical properties of rice batter without increasing its allergenicity Hiroyuki Yano and Akiko Fukui	23
麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> の形態関連遺伝子の解析 服部 領太, 楠本 憲一, 柏木 豊, 鈴木 聡	29

研究ノート

官能評価による加熱植物油の簡便な風味のプロファイリング 早川 文代, 風見 由香利, 神保 聡子, 浦田 貴之	37
味噌汁の作り方の違いがフラン量低減に及ぼす影響 箭田 浩士	43
茨城県つくば市の屋外でトラップに捕獲された貯穀害虫の記録（2014年11月～2015年10月） 古井 聡, 今村 太郎, 宮ノ下 明大	49
Improvement of the group testing method to evaluate GM maize content Junichi Mano, Kaori Takashima, Satoshi Futo, Yasutaka Minegishi, Kenji Ninomiya, Akio Noguchi, Kazunari Kondo, Reiko Teshima, Reona Takabatake, and Kazumi Kitta	57
Production of monodisperse oil-in-water emulsions using asymmetric micro through-holes compactly arranged on a metallic chip Isao Kobayashi, Yanru Zhang, Ran Li, Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima	69
<i>Lactobacillus brevis</i> の凝集を引き起こす物質の探索 齋藤 勝一, 富田 理, 中村 敏英	75
界面活性剤で可溶化された生体膜タンパク質の熱処理特性の評価 渡邊 康	81
大腸菌におけるゲノム重複を介した多剤耐性化 本山 志織, ワナシリ・ワナラット, 稲岡 隆史	87

技術報告

2009年度及び2010年度精米粉末中無機元素、並びに2009年度ひじき粉末中無機元素の技能試験結果 内藤 成弘	95
画像認識技術による食品害虫の自動判別 曲山 幸生, 七里 与子, 塚田 佳苗, 宮ノ下 明大, 今村 太郎, 古井 聡, 和田 有史, 石山 壘	105
食品総合研究所微生物バンクの現状と菌株の省エネルギー保存方法およびデータ管理方法の検討 岩橋 由美子, 鈴木 忠宏, 北村 義明	117

国連大学生研究成果

Hyper production of Acid protease by food grade fungi using food by-product Pushpa S Murthy	125
Genetic approach for bacteriophage resistance of <i>Bacillus subtilis</i> (natto) Supawadee Sriyam	126
Identification and Control of Microbiological Hazards in Fermented Vegetables and Fermented Fishes Produced in Cambodia Rithy Chrun	127
Functional Components of Colored Rice and Selected Vegetables Rosaly Vallejo MANAOIS	128
Screening and identification of enzyme inhibitors in local foods and analysis of lipase inhibition mode by anti-hyperlipidemic polyphenols Rahim Abu Torab	129

原著論文

《企画管理部》 Effect of active modified atmosphere packaging with different initial gas compositions on nutritional compounds of shiitake mushrooms (<i>Lentinus edodes</i>) Yanjie Li, Yutaka Ishikawa, Takaaki Satake, Hiroaki Kitazawa, Xiaoli Qiu, Saowaluk Rungchang	130
《放射性物質影響研究コーディネーター》 Characterization of brown rice as a certified reference material for Fukushima accident-related radioactivity measurements Yasuhiro Unno, Mayumi Hachinohe, Shioka Hamamatsu, Setsuko Todoriki, Akira Yunoki, Tsutomu Miura	130
Exchangeable Cs/K ratio in soil is an index to estimate accumulation of radioactive and stable Cs in rice plant Motohiko Kondo, Hideo Maeda, Akitoshi Goto, Hiroshi Nakano, Nobuharu Kiho, Tomoyuki Makino, Mutsuto Sato, Shigeto Fujimura, Tetsuya Eguchi, Mayumi Hachinohe, Shioka Hamamatsu, Hirotaka Ihara, Toshiyuki Takai, Yumiko Arai-Sanoh, Takeshi Kimura	130
乾麺の製麺・調理における放射性セシウムの動態解析 八戸 真弓, 内藤 成弘, 明石 肇, 等々力節子, 松倉 潮, 川本 伸一, 濱松 潮香	130
Distribution of radioactive cesium (¹³⁴ Cs plus ¹³⁷ Cs) in rice fractions during polishing and cooking Mayumi Hachinohe, Tomoya Okunishi, Shoji Hagiwara, Setsuko Todoriki, Shinichi Kawamoto, Shioka Hamamatsu	131
《食品機能研究領域》 Green tea catechin induced phagocytosis can be blocked by catalase and an inhibitor of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) Monobe Manami, Ema Kaori, Tokuda Yoshiko, Maeda-Yamamoto Mari	131
Purification and characterization of a novel O-methyltransferase from <i>Flammulina velutipes</i> Kirita Masanobu, Tanaka Yoshihisa, Tagashira Motoyuki, Kanda Tomomasa, Maeda-Yamamoto Mari	131
Metabolic stability and inhibitory effect of O-methylated theaflavins on H ₂ O ₂ -induced oxidative damage in human HepG2 cells Tanaka Yoshihisa, Kirita Masanobu, Abe Yuko, Miyata Satoshi, Tagashira Motoyuki, Kanda Tomomasa	131
‘Benifuuki’ green tea containing O-methylated catechin reduces symptoms of Japanese cedar pollinosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial Sawako Masuda, Maeda-Yamamoto Mari, Satoko Usui, Takao Fujisawa	131
Prevention of allergic disease development and symptoms by food factors Hiroshi Akiyama, Shigeru Katayama, Tomomasa Kanda, Mari Maeda-Yamamoto, Mamoru Totsuka, Shingo Takahashi, Toshihiko Shoji, Takahiro Inakuma, Soichiro Nakamura	132

給茶機 RICH+ (リッチプラス) を用いた茶葉中各種健康機能性成分の抽出条件の検討 山本 (前田) 万里, 奥田 祐, 大菅 武, 物部真奈美	132
Two transaldolase isogenes from <i>Moniliella megachiliensis</i> behave in a different way depending on the stress class Youshi Iwata, Daiki Mizushima, Yousuke Kobayashi, Tetsuya Ookura, Jun Ogihara, Jun Kato, Takafumi Kasumi	132
Simplified Methods for Purification of Peanut Allergic Proteins: Ara h 1, Ara h 2, and Ara h 3. Keigo Masuyama, Kazutaka Yamamoto, Kaoru Ito, Eiichi Kitagawa, Kohji Yamaki	132
Extraction efficiency of hydrophilic and lipophilic antioxidants from lyophilized foods using pressurized liquid extraction and manual extraction Jun Watanabe, Tomoyuki Oki, Jun Takebayashi, Yuko Takano-Ishikawa	132
Identification and distribution of cellobiose 2-epimerase genes by a PCR-based metagenomic approach Jun Wasaki, Hidenori Taguchi, Takeshi Senoura, Hiroshi Akasaka, Jun Watanabe, Kazuki Kawaguchi, Yosuke Komata, Kiyotoshi Hanashiro, Susumu Ito	133
Wheat alkylresorcinols suppress high-fat, high-sucrose diet-induced obesity and glucose intolerance by increasing insulin sensitivity and cholesterol excretion in male mice Oishi Katsutaka-, Yamamoto Sori, Itoh Nanako, Nakao Reiko, Yasumoto Yuki, Tanaka Keiko, Kikuchi Yosuke, Fukudome Shin-ichi, Okita Kimiko, Takano-Ishikawa Yuko	133
Milk prevents the degradation of daikon (<i>Raphanus sativus</i> L.) isothiocyanate and enhances its absorption in rats Katsunari Ippoushi, Hiroshi Ueda, Atsuko Takeuchi	133
Nutrients, Clock Genes, and Chrononutrition Hideaki Oike, Katsutaka Oishi, Masuko Kobori	133
Absolute quantification of protein NP24 in tomato fruit by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using stable isotope-labelled tryptic peptide standard Katsunari Ippoushi, Motoe Sasanuma, Hideaki Oike, Masuko Kobori, Mari Maeda-Yamamoto	134
Harmine lengthens circadian period of the mammalian molecular clock in the suprachiasmatic nucleus Kondoh Daisuke, Yamamoto Saori, Tomita Tatsunosuke, Miyazaki Koyomi, Itoh Nanako, Yasumoto Yuki, Oike Hideaki, Doi Ryosuke, Oishi Katsutaka	134
β -Cryptoxanthin alleviates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by suppressing inflammatory gene expression in mice. Masuko Kobori, Yinhua Ni, Yumiko Takahashi, Natsumi Watanabe, Minoru Sugiura, Kazunori Ogawa, Mayumi Nagashimada, Shuichi Kaneko, Shigehiro Naito, Tsuguhito Ota	134
Intestinal bacterium TM-30: an <i>S</i> -equol-producing bacterium isolated from human feces is involved in estrogen metabolism <i>in vitro</i> Motoi Tamura, Sachiko Hori, Hiroyuki Nakagawa	134
Effect of risk information exposure on consumers' responses to foods with insect contamination Atsushi Kimura, Yukio Magariyama, Akihiro Miyanoshita, Taro Imamura, Kumiko Shichiri, Tomohiro Masuda, Yuji Wada	134
イラストを用いた食品中の残留農薬量の理解度の検討 朴 ソラ, 増田 知尋, 村越 琢磨, 川崎 弥生, 内海 建, 木村 敦, 小山 慎一, 日比野治雄, 日野 明 寛, 和田 有史	135
Scents boost preference for novel fruits Yuki Yamada, Kyoshiro Sasaki, Satomi Kunieda, Yuji Wada	135
Model of vegetable freshness perception using luminance cues C. Arce-Loopera, Tomohiro Masuda, Atsushi Kimura, Yuji Wada, Katsunori Okajima	135

マウスリック試験を用いた甘味料の相乗効果評価 河合 崇行, 日下部裕子	135
Distinct human and mouse membrane trafficking systems for sweet taste receptors T1r2 and T1r3. Madoka Shimizu, Masao Goto, Takayuki Kawai, Atsuko Yamashita, Yuko Kusakabe	136
The glossopharyngeal nerve controls epithelial expression of Sprr2a and Krt13 around taste buds in the circumvallate papilla. Hirohito Miura, Yuko Kusakabe, Kento Hashido, Akihiro Hino, Makoto Ooki, Shuitsu Harada	136
Molecular mechanisms for sweet-suppressing effect of gymnemic acids. Keisuke Sanematsu, Yuko Kusakabe, Noriatsu Shigemura, Takatsugu Hirokawa, Seiji Nakamura, Toshiaki Imoto, Yuzo Ninomiya	136
Material perception of a kinetic illusory object with amplitude and frequency changes in oscillated inducer motion Tomohiro Masuda, Kazuya Matsubara, Ken Utsumi, Yuji Wada	136
Ultrasound pulsed wave Doppler imaging of the esophagus illustrates the effects of water volume on bolus kinematics Zhihong Gao, Kaoru Kohyama	136
Electromyographic texture characterization of hydrocolloid gels as model foods with varying mastication and swallowing difficulties Kaoru Kohyama, Fumiyo Hayakawa, Yukari Kazami, Sayaka Ishihara, Satomi Nakao, Takahiro Funami, Katuyoshi Nishinari	137
Instrumental uniaxial compression test of gellan gels of various mechanical properties using artificial tongue and its comparison with human oral strategy for the first size reduction Sayaka Ishihara, Mai Isono, Satomi Nakao, Makoto Nakauma, Takahiro Funami, Kazuhiro Hori, Takahiro Ono, Kaoru Kohyama, Katsuyoshi Nishinari	137
Mouthful size effects on mastication effort of various hydrocolloid gels used as food models Kaoru Kohyama, Fumiyo Hayakawa, Zhihong Gao, Sayaka Ishihara, Satomi Nakao, Takahiro Funami	137
Effects of milling ratio and water-to-rice ratio on mastication effort for cooked rice measured by electromyography Kaoru Kohyama, Navdeep Singh Sodhi, Tomoko Sasaki, Keitaro Suzuki	137
官能評価による未加熱こめ油の風味のプロファイリング 早川 文代, 風見由香利, 神保 聡子, 浦田 貴之	138
Optimising aroma quality in curry sauce products using in vivo aroma release measurements Jun Hatakeyama, James M. Davidson, Avinash Kant, Takeshi Koizumi, Fumiyo Hayakawa, Andrew J. Taylor	138
《食品安全研究領域》 Detection of commercially irradiated potatoes by thermoluminescence and photostimulated luminescence analyses Setsuko Todoriki, Hiromi Kameya, Kimie Saito, Shoji Hagiwara	138
数種のきのこ粉末の電子スピン共鳴による分析 菅野 友美, 山本久美子, 原田栄津子, 亀谷 宏美, 鶴飼 光子, 大澤 俊彦	138
Genotoxic potential and in vitro tumour-promoting potential of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone, two radiolytic products of fatty acids Kohji Yamakage, Hajime Sui, Ryo Ohta, Tomoyasu Toyozumi, Kumiko Kawakami, Hiroataka Matsumoto, Toshitaka Takahashi, Kiyoshi Sasaki, Mayu Ikezumi, Saki Negishi, Keisuke Izumi, Setsuko Todoriki, Kondo Takashi, Masakazu Furuta	139
放射線照射した甲殻類（エビおよびカニ）の検知への電子スピン共鳴分光法の適用 亀谷 宏美, 高附 巧, 松田りえ子, 堤 智昭, 等々力節子	139
加工食品を対象としたアルキルシクロブタノン法（EN1785）の性能評価 堤 智昭, 足立 利華, 高附 巧, 根井 大介, 亀谷 宏美, 等々力節子, 菊地 正博, 小林 泰彦, 松田りえ子, 手島 玲子	139

A single nucleotide polymorphism in the translation elongation factor 1 α gene correlates with the ability to produce fumonisin in Japanese <i>Fusarium fujikuroi</i> Haruhisa Suga, Miha Kitajima, Riku Nagumo, Takao Tsukiboshi, Ryuichi Uegaki, Takashi Nakajima, Masayo Kushiro, Hiroyuki Nakagawa, Masafumi Shimizu, Koji Kageyama, Mitsuro Hyakumachi	139
Loss of nivalenol during cooking of noodles made from <i>Fusarium</i> -infected Japanese soft wheat Sharif Md. Hossen, Hiroyuki Nakagawa, Hitoshi Nagashima, Hiroshi Okadome, Masayo Kushiro	140
Effect of milling on the content of deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in Japanese wheat Yazhi Zheng, Sharif Md. Hossen, Yuki Sago, Megumi Yoshida, Hiroyuki Nakagawa, Hitoshi Nagashima, Hiroshi Okadome, Takashi Nakajima, Masayo Kushiro	140
Extraction of a <i>Fusarium</i> mycotoxin zearalenone in edible oils Yazhi Zheng, Hiroyuki Nakagawa, Yuki Sago, Hitoshi Nagashima, Hiroshi Okadome, Masayo Kushiro	140
The α -oxoamine synthase gene <i>fum8</i> is involved in fumonisin B ₂ biosynthesis in <i>Aspergillus niger</i> Kiminori Shimizu, Hiroyuki Nakagawa, Ruiko Hashimoto, Daisuke Hagiwara, Yoshiki Onji, Katsuyoshi Asano, Susumu Kawamoto, Haruo Takahashi, Koji Yokoyama	140
Harmonized collaborative validation of a simultaneous and multiple determination method for nivalenol, deoxynivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, and zearalenone in wheat and barley by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) Hiroyuki Nakagawa, Shigehiro Naito, Yuusuke Kitani, Yoshinao Ito, Yoshikazu Aoyama, Matsuhisa Koyama, Yuusuke Hiejima, Keisuke Nakamura, Hiroshi Miyazaki, Tsuyoshi Morita, Masayohi Tamura, Naoki Mochizuki, Masaru Nakamura, Yuusuke Seki, Hisae Kadokura, Hidaka Ikeda, Tomoko Ishikuro, Yoriko Saito, Miyoko Tajima, Yohsuke Shigemasa, Kikuko Kasama, Yasuyo Oguma, Yuki Sago, Tetsuhisa Goto, Kazuyuki Hirayae	141
Retention of <i>Fusarium</i> mycotoxin zearalenone and deoxynivalenol during Japanese soft wheat milling Masayo Kushiro, Yazhi Zheng, Manasikan Thammawong, Toru Kozawa, Hiroyuki Nakagawa, Hitoshi Nagashima, Hiroshi Okadome	141
Altered gene expression profiles of wheat genotypes against <i>Fusarium</i> head blight Ayumi Kosaka, Alagu Manickavelu, Daniela Kajihara, Hiroyuki Nakagawa, Tomohiro Ban	141
国産豆腐より分離された腸球菌の特性 細谷 幸恵, 大畑由紀子, 川崎 晋, 稲津 康弘	141
ワークショップを通じた食品関連事業者等の自主衛生管理手法に関する知識の向上 (第2報) 川崎 晋, 持田 麻里, 大畑由紀子, 齋藤 美枝, 野澤 博美, 稲津 康弘	142
ナッツ類と乾燥果実類におけるノシメダラメイガ <i>Plodia interpunctella</i> の発育 木村 悟朗, 宮ノ下明大, 春成 常仁, 谷川 力	142
茨城県つくば市の屋外でトラップに捕獲された貯穀害虫の記録 古井 聡, 今村 太郎, 宮ノ下明大	142
ネコおよびインコ用の乾燥ペットフードにおけるノシメダラメイガ <i>Plodia interpunctella</i> 幼虫の発育 宮ノ下明大, 今村 太郎, 古井 聡	142
10, 11月に野外の性フェロモントラップに捕獲されたノシメダラメイガおよびタバコシバンムシの個体数 - 関東地方8カ所における2013年の調査 - 宮ノ下明大, 佐野 俊夫	142
茨城県つくば市において冬季に建物で発見されたマツヘリカメムシ <i>Leptoglossus occidentalis</i> 宮ノ下明大, 曲山 幸生	143
プラスチックコンテナ内での捕食性カメムシ類によるヒラタコクヌストモドキの個体数抑制効果 石島 力, 森本 彩佳, 今村 太郎, Porntip Visarathanonth, 宮ノ下明大	143

《食品分析研究領域》

Moisture distribution in rice grains used for sake brewing analyzed by magnetic resonance imaging Akemi K. Horigane, Keitaro Suzuki, Mitsuru Yoshida	143
Therapeutic effects of isoflavones on impaired salivary secretion Koufuchi Ryo1, Ayako Takahashi, Yoh Tamaki, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Hiroko Inoue, Ichiro Saito.....	143
豚肉に含まれるポリソルベート偽陽性成分の同定と除去 高木 晃一, 松永いづみ, 工藤 和幸, 亀山真由美.....	143
Isolation and structural determination of a new hydrophobic peptide venepeptide from <i>Streptomyces venezuelae</i> Shinya Kodanil, Kazuki Sato, Hikaru Hemmi, Mayumi Ohnishi-Kameyama	144
湯通し塩蔵ワカメの安定同位体比と微量元素組成の年次変化及び産地判別の可能性 鈴木彌生子, 國分 敦子, 絵面 智宏, 中山 和美.....	144
窒素安定同位体比測定のためのアミノ酸標準物質の開発 佐藤 里恵, 川西 英彦, Arndt SCHIMMELMANN, 鈴木彌生子, 力石 嘉人.....	144
DNA分析および安定同位体比分析によるさくらえび製品の産地判別 小泉 鏡子, 阿久津哲也, 中下留美子, 鈴木彌生子.....	144
長野県塩尻市における閉鎖牛舎での捕獲ツキノワグマの家畜飼料依存度 中下留美子, 林 秀剛, 岸元 良輔, 鈴木彌生子, 瀧井 暁子, 泉山 茂之.....	145
核酸塩基部位をもつ両親媒性脂質分子が作る多様なナノ構造 岩浦 里愛.....	145
Accumulation of supramolecular nanoparticles self-assembled from a bola-shaped cytidylic acid-appended fluorescein dye in cell nuclei Rika Iwaura, Kaname Yoshida, Mayumi Ohnishi-Kameyama	145
日本茶の商品情報表示に関する消費者意識の調査と考察 林 宣之, 氏原ともみ, 岩崎 邦彦.....	145
A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed L-rhamnitol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins Satoru Tomita, Tadashi Nemoto, Yosuke Matsuo, Toshihiko Shoji, Fukuyo Tanaka, Hiroyuki Nakagawa, Hiroshi Ono, Jun Kikuchi, , Mayumi Ohnishi-Kameyama, Yasuyo Sekiyama	146
微生物技能試験のzスコア計算方法による結果の差異 塚越 芳樹.....	146
Characterization of leaf blade- and leaf sheath-associated bacterial community and assessment of their responses to environmental changes of CO ₂ , temperature, and nitrogen levels under field conditions Seishi Ikeda, Takeshi Tokida, Hirofumi Nakamura, Hidemitsu Sakai, Yasuhiro Usui, Takashi Okubo, Kanakano Tago, Kentaro Hayashi, Yasuyo Sekiyama, Hiroshi Ono, Satoru Tomita, Masahito Hayatsu, Toshihiro Hasegawa and Kiwamu Minamisawa.....	146
Feasibility of rapid in vitro estimation of haematocrit in cattle by using short-wavelength near infrared spectroscopy Akifumi Ikehata, Xuan Luo, Kunio Sashida, Shanji Park, Tsutomu Okura, Yutaka Terada	146
Near-infrared (NIR) study of hydrogen bonding of methanol molecules in polar and nonpolar solvents: an approach from concentration-dependent molar absorptivity Yuho Mikami, Akifumi Ikehata, Chihiro Hashimoto, Yukihiro Ozaki	147
Surface plasmon sensors on ZnO:Ga layer surfaces: Electric field distributions and absorption-sensitivity enhancements Hiroaki Matsui, Akifumi Ikehata, Hitoshi Tabata	147

食品中の真菌数の迅速測定法の検討 関屋 秀一, 濱崎 芳活, 内藤 成弘, 高鳥 浩介	147
Determination of aflatoxin M1 in powdered formula: an inter-laboratory study and the surveillance in Japan Hisako SAKUMA, Yoshiko SUGITA-KONISHI, Toshitsugu TANAKA, Toshihiro NAGAYAMA, Shigehiro NAITO, Masakazu HORIE, Eiichi ISHIKURO, Masahiro NAKAJIMA, Tomoya YOSHINARI, Hiroshi KAWAKAMI	147
Interlaboratory study of immunochromatography for the rapid determination of cadmium concentrations in cereals and soybeans Kaoru Abe, Katsuo Nakamura, Shigehiro Naito	148
Effects of polishing, cooking, and storing on total arsenic and arsenic species concentrations in rice cultivated in Japan Shigehiro Naito, Eri Matsumoto, Kumiko Shindoh, Tsutomu Nishimura	148
ひじき粉末中の総ヒ素, カドミウム, 鉛及び必須無機元素の2008年度技能試験結果 内藤 成弘, 成川 知弘, 安井 明美	148
Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice Yasutaka Minegishi, Junichi Mano, Reona Takabatake, Kosuke Nakamura, Kazunari Kondo, Yasuo Kato, Kazumi Kitta, Hiroshi Akiyama	148
Multiplex comparison of the digestibility of allergenic and non-allergenic proteins in rice grains by <i>in vitro</i> digestion Gang-hua Lang, Yukari Kagiya, Kazumi Kitta	148
Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice Reona Takabatake, Mari Onishi, Satoshi Futo, Yasutaka Minegishi, Akio Noguchi, Kosuke Nakamura, Kazunari Kondo, Reiko Teshima, Junichi Mano, Kazumi Kitta	149
Development and validation of an event-specific quantitative PCR method for genetically modified maize MIR162 Reona Takabatake, Tomoko Masubuchi, Satoshi Futo, Yasutaka Minegishi, Akio Noguchi, Kazunari Kondo, Reiko Teshima, Takeyo Kurashima, Junichi Mano, Kazumi Kitta	149
Development of a reference material of a single DNA molecule for the quality control of PCR testing Junichi Mano, Shuko Hatano, Satoshi Futo, Junji Yoshii, Hiroki Nakae, Shigehiro Naito, Reona Takabatake, Kazumi Kitta	149
A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize Akio Noguchi, Hiroshi Akiyama, Kosuke Nakamura, Kozue Sakata, Yasutaka Minegishi, Junichi Mano, Reona Takabatake, Satoshi Futo, Kazumi Kitta, Reiko Teshima, Kazunari Kondo, Tomoko Nishimaki-Mogami	149
《食品素材科学研究領域》 Purification of Dehydrin Protein from Buckwheat Seed (<i>Fagopyrum esculentum</i> cv. Kitawase) Michiko Momma	150
Effect of oxygen absorber on accumulation of free fatty acids in brown rice and whole grain wheat during storage Wakako Tsuzuki, Yasuhiro Suzuki, Sumiyo Yamada, Shuuichi Kano, Hideo Ohnishi, Takeshi Fujimoto, Akira Horigane	150
低タンパク質含有率の硬質小麦を用いたごはんパンにおける低アミロース・糯水稻品種の製パン適性について 細井 淳, 相澤 淳平, 奥西 智哉	150
日本のイネ主要品種における mPing 挿入多型 岸根 雅宏, 奥西 智哉	150
<i>Candida utilis</i> assimilates oligomeric sugars in rice straw hydrolysate via the Calcium-Capturing-by-Carbonation (CaCCO) process for glutathione- and cell-biomass production Yoshiyuki Koyama, Rui Zhao, Masakazu Ike, Ken Tokuyasu	150

Effect of sorghum flour on glutathione-rice bread Hiroyuki Yano, Akiko Fukui	151
A 3-hydroxy β -end group in xanthophylls is preferentially oxidized to a 3-oxo ε -end group in mammals. Akihiko Nagao, Takashi Maoka, Hiroshi Ono, Eiichi Kotake-Nara, Miyuki Kobayashi, Mie Tomita	151
《食品工学研究領域》	
Effect of pH condition on the retention of oleuropein in aqueous solution by nanofiltration membrane Ilyes Dammak, Marcos A. Neves, Hiroshi Nabetani, Hiroko Isoda, Sami Sayadi, Mitsutoshi Nakajima	151
A Mixture of Histidine-Dipeptides, Vitamin C, and Ferulic Acid Reduces Comet Assay Scores in Normal Middle-Aged Men. Nobuya Yanai, Tomoyuki nitsuma, Shigenobu shiotani, Shoji Hagiwara, Hiroshi nabetani	151
Transport properties of oleuropein through nanofiltration membranes Ilyes Dammak, Marcos A. Neves, Hiroshi Nabetani, Sami Sayadi, Mitsutoshi Nakajima	151
Reactivity of palm fatty acids for the non-catalytic esterification in a bubble column reactor at atmospheric pressure Joelianingsih, Armansyah H Tambunan, Hiroshi Nabetani	152
食品害虫サイト用に開発したアクセス解析プログラムとそのツール化 曲山 幸生, 七里 与子, 宮ノ下明大, 今村 太郎, 古井 聡, 和田 有史, 増田 知尋.....	152
水蒸気-水二相バイндаによる流動層造粒における加水量削減技術の開発 五月女 格, 井上 孝司, 片桐 孝夫, 竹内 博一, 津田 升子, 岡留 博司, 五十部誠一郎.....	152
Variation in firmness of whole beans, embryos, and testas of cooked soybean (<i>Glycine max</i>) cultivars Takeshi Yasui, Tomoko Sasaki, Kaoru Kohyama, Makita Hajika	152
In vitro starch digestibility and in vivo glucose response of gelatinized potato starch in the presence of non-starch polysaccharides Tomoko Sasaki, Itaru Sotome, Hiroshi Okadome	152
高アミロース米の機械的攪拌ゲル化処理を利用した米麺加工法の開発 松山 信悟, 柴田真理朗, 杉山 純一, 藤田かおり, 蔦 瑞樹, 吉村 正俊, 粉川 美踏, 平野由香里, 荒木 徹也, 鍋谷 浩志.....	153
光学的手法に基づく「もち米」の胴割れ検知に関する基礎的研究 吉村正俊, 蔦 瑞樹, 杉山純一, 笠井 康, 粉川美踏, 藤田かおり, 柴田真理朗.....	153
フローサイトメトリーと多変量解析による緑茶飲料中の大腸菌数推定 蔦 瑞樹, 佐々木康彦, 竹内 郁雄, 中本 英樹, 石川 淳, 川崎 晋, 杉山 純一, 藤田かおり, 吉村 正俊, 柴田真理朗, 粉川 美踏.....	153
Spatially resolved diffuse reflectance in the visible and near-infrared wavelength range for non-destructive quality assessment of 'Braeburn' apples Nghia Nguyen Do Trong, Chyngyz Erkinbaev, Mizuki Tsuta, Josse De Baerdemaeker, Bart Nicolai, Wouter Saeys	153
Optical properties-microstructure-texture relationships of dried apple slices: Spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy as a novel technique for analysis and process control Nghia Nguyen Do Trong, Anna Rizzolo, Els Herrernans, Maristella Vanoli, Giovanna Cortellino, Chyngyz Erkinbaev, Mizuki Tsuta, Lorenzo Spinelli, Davide Contini, Alessandro Torricelli, Pieter Verboven, Josse De Baerdemaeker, Bart Nicolai, Wouter Saeys.....	153
Visualization of Gluten, Starch, and Butter in Pie Pastry by Fluorescence Fingerprint Imaging Mito Kokawa, Naoto Yokoya, Hiroko Ashida, Junichi Sugiyama, Mizuki Tsuta, Masatoshi Yoshimura, Kaori Fujita, Mario Shibata	154
Method of determining the optimal dilution ratio for fluorescence fingerprint of food constituents Vipavee Trivittayasil, Mizuki Tsuta, Mito Kokawa, Masatoshi Yoshimura, Junichi Sugiyama, Kaori Fujita, Mario Shibata	154

Nondestructive hygiene monitoring on pork meat surface using excitation-emission matrices with two-dimensional savitzky-golay second-order differentiation Hiroaki Shirai, Seiichi Oshita, Yoshio Makino, Junichi Sugiyama, Masatoshi Yoshimura	154
Large-scale gaseous acetic acid treatment to disinfect alfalfa seeds inoculated with <i>Escherichia coli</i> Daisuke Nei, Katsuyoshi Enomoto, Kazutaka Yamamoto	154
Modeling of the respiration rate and gene expression patterns of cabbage in response to mechanical impact stress using a modified Weibull distribution Manasikan Thammawong, Takahiro Orikasa, Hitomi Umehara, Ilmi Ganga Namali Hewajulige, Tomoko Kaneta, Nobutaka Nakamura, Yasuhiro Ito, Kohei Nakano, Takeo Shiina	154
Comparison of Desiccation Tolerance among <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i> , and <i>Cronobacter sakazakii</i> in Powdered Infant Formula Shigenobu Koseki, Nobutaka Nakamura, Takeo Shiina	155
魚醬油発酵時のヒスタミン蓄積に関わる原因菌の同定および乳酸菌発酵スターター接種によるヒスタミン蓄積抑制効果について 木村メイコ, 舊谷亜由美, 福井 洋平, 柴田 由起, 根井 大介, 矢野 豊, 里見 正隆.....	155
蓄積疲労を考慮した青果物のための新たな損傷予測理論の構築 (第2報) —多段積み包装されたイチゴ果実の損傷発生に及ぼす繰り返し衝撃の影響— 北澤 裕明, 斎藤 勝彦.....	155
Improving the layout of ventilation ports in packaging for fresh produce using computational fluid dynamics Hiroaki Kitazawa, Naoko Hasegawa	155
Changing oxygen concentration around the rootstock alters spear elongation and sprouting of white asparagus Hiroaki Kitazawa, Naoko Hasegawa, Machiko Fukuda, Shin-ichi Watanabe, Atsushi Yamasaki, Atsuko Uragami.....	155
PIV and CFD studies on analyzing intragastric flow phenomena induced by peristalsis using a human gastric flow simulator Hiroyuki Kozu, Isao Kobayashi, Marcos A. Neves-, Mitsutoshi Nakajima-, Kunihiko Uemura, Sosaku Ichikawa	156
Stability of monodisperse clove oil droplets prepared by microchannel emulsification Nanik Purwanti, Marcos A. Neves, Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima, Isao Kobayashi	156
Monodisperse W/O/W emulsions encapsulating L-ascorbic acid: Insights on their formulation using microchannel emulsification and stability studies Nauman Khalid, Isao Kobayashi, Marcos A. Neves, Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima, Hiroshi Nabetani	156
Formulation of monodisperse water-in-oil emulsions encapsulating calcium ascorbate and ascorbic acid 2-glucoside by microchannel emulsification Nauman Khalid, Isao Kobayashi, Marcos A. Neves, Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima, Hiroshi Nabetani	156
Interfacial characteristics and microchannel emulsification of oleuropein-containing triglyceride oil-water systems Safa Souilem, Isao Kobayashi, Marcos A. Neves, Logna Jlaiel, Hiroko Isoda, Sami Sayadi, Mitsutoshi Nakajima	157
Rapid inactivation of pectin methylesterase in tomato juice by high electric field alternating current Kunihiko Uemura, Chieko Takahashi, Isao Kobayashi	157
Direct observation and evaluation of cooked white and brown rice digestion by gastric digestion simulator provided with peristaltic function Zheng Wang, Sosaku Ichikawa, Hiroyuki Kozu, Marcos A. Neves-, Mitsutoshi Nakajima-, Kunihiko Uemura, Isao Kobayashi	157

《応用微生物研究領域》

Xylan-mediated aggregation of <i>Lactobacillus brevis</i> and its relationship with the surface properties and mucin-mediated aggregation of the bacteria Katsuichi Saito, Toshihide Nakamura, Isao Kobayashi, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Hitomi Ichinose, Keitarou Kimura, Kazumi Funane	157
Identification of a gene, <i>FMP21</i> , whose expression levels are involved in thermotolerance in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Toshihide Nakamura, Mami Yamamoto, Katsuichi Saito, Akira Ando, Jun Shima	158
Identification of Vietnamese <i>Coptotermes</i> pest species based on the sequencing of two regions of 16S rRNA gene Thi-Thao Nguyen, Thi-Huyen Do, Thu-Huong Duong, Quynh-Giang Le, Trong-Khoa Dao, Thi-Trung Nguyen, Thi-Quy Nguyen, Thi-Thu-Hien Nguyen, Keitarou Kimura, Nam-Hai Truong	158
Mining biomass-degrading genes through Illumina-based de novo sequencing and metagenomic analysis of free-living bacteria in the gut of the lower termite <i>Coptotermes gestroi</i> harvested in Vietnam Thi Huyen Do, Thi Thao Nguyen, Thanh Ngoc Nguyen, Quynh Giang Le, Cuong Nguyen, Keitarou Kimura, Nam Hai Truong	158
Removal of radioactive cesium (¹³⁴ Cs plus ¹³⁷ Cs) from low-level contaminated water by charcoal and broiler litter biochar Keitarou Kimura, Mayumi Hachinohe, K. Thomas Klasson, Shioka Hamamatsu, Shoji Hagiwara, Setsuko Todoriki, Shinichi Kawamoto	158
Molecular engineering of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from <i>Bacillus circulans</i> T-3040 : structural determinants for the reaction product size and reactivity Ryuichiro Suzuki, Nobuhiro Suzuki, Zui Fujimoto, Mitsuru Momma, Keitarou Kimura, Shinichi Kitamura, Atsuo Kimura, Kazumi Funane	159
The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of <i>Aspergillus fumigatus</i> Daisuke Hagiwara, Satoshi Suzuki, Katsuhiko Kamei, Tohru Gonoi, Susumu Kawamoto	159
Convenient preparation of fungal genomic DNA templates for polymerase chain reaction and temporal temperature gradient gel electrophoresis analyses of fungal diversity in the Japanese fermented soybean paste miso (味噌からの簡便迅速な真菌ゲノムDNAの抽出法により調整された鋳型DNAを用いたPCR産 鈴木 聡, 柏木 豊, 楠本 憲一.....	159
Characterization of acid phosphatase (AphC) from miso koji mold, <i>Aspergillus oryzae</i> KBN630, AphC is mainly responsible for both acid phosphatase activity and 5'-IMP dephosphorylation activity in soybean-koji culture Shoko Yoshino-yasuda, Emi Nakamura, Natsuko Ono, Osamu Hasegawa, Yoshimi Iga, Yohei Shiraishi, Yutaka Wagu, Kazuhiro Sugimoto, Tohru Suzuki, Tatsuya Sugimoto, Ken-Ichi Kusumoto, Masashi Kato and Noriyuki Kitamoto	159
Telomere-mediated chromosomal truncation in <i>Aspergillus oryzae</i> . Sawaki Tada, Hikaru Ohkuchi, Mayumi Matsushita-Morita, Ikuyo Furukawa, Ryota Hattori, Satoshi Suzuki, Yutaka Kashiwagi and Ken-Ichi Kusumoto	160
Culture-independent analysis of the bacterial community during fermentation of pa-som, a traditional fermented fish product in Laos Junichiro Marui, Sayvisene Boulom, Wanchai Panthavee, Mari Momma, Ken-Ichi Kusumoto, Kazuhiko Nakahara, Masayoshi Saito	160
Influence of Agmatine Supplemented Culture Medium on Metabolic Products and Gene Expression in <i>Fusarium asiaticum</i> . Tadahiro Suzuki, Hifumi Yoshioka, Yumiko Iwahashi	160
Low Toxicity of Deoxynivalenol-3-Glucoside in Microbial Cells Tadahiro Suzuki, Yumiko Iwahashi	160
《食品バイオテクノロジー研究領域》	
1, 2-β-Oligoglucan phosphorylase from <i>Listeria innocua</i> Masahiro Nakajima, Hiroyuki Toyozumi, Koichi Abe, Hiroyuki Nakai, Hayao Taguchi, Motomitsu Kitaoka	160

Characterization of two phosphorylases for α -1, 3-oligoglucans from <i>Clostridium phytofermentans</i> Takanori Nihira, Mamoru Nishimoto, Hiroyuki Nakai, Ken'ichi Ohtsubo, Motomitsu Kitaoka	161
Characterization of a thermophilic 4- <i>O</i> - β -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase from <i>Rhodothermus marinus</i> Nongluck Jaito, Wataru Saburi, Rei Odaka, Yusuke Kido, Ken Hamura, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka, Hirokazu Matsui, Haruhide Mori	161
Structural basis for reversible phosphorolysis and hydrolysis reactions of 2- <i>O</i> - α -glucosylglycerol phosphorylase Kouki K. Touhara, Takanori Nihira, Motomitsu Kitaoka, Hiroyuki Nakai, Shinya Fushinobu	161
One pot enzymatic production of nigerose from common sugar resources by employing nigerose phosphorylase Takanori Nihira, Futaba Miyajima, Kazuhiro Chiku, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka, Ken'ichi Ohtsubo, Hiroyuki Nakai	161
A β 1-6/ β 1-3 galactosidase from <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BI-04 gives insight into sub-specificities of β -galactoside catabolism within <i>Bifidobacterium</i> Alexander H. Viborg, Folmer Fredslund, Takane Katayama, Stinne K. Nielsen, Birte Svensson, Motomitsu Kitaoka, Leila Lo Leggio, Maher Abou Hachem	161
Facile enzymatic synthesis of sugar 1-phosphates as substrates for phosphorylases using anomeric kinases Yuan Liu, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka	162
Discovery of two β -1, 2-mannoside phosphorylases showing different chain length specificity from <i>Thermoanaerobacter</i> sp. X-514A Kazuhiro Chiku, Takanori Nihira, Erika Suzuki, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka, Ken'ichi Ohtsubo, Hiroyuki Nakai	162
Large-scale preparation of 1, 2- β -glucan using 1, 2- β -oligoglucan phosphorylase Koichi Abe, Masahiro Nakajima, Motomitsu Kitaoka, Hiroyuki Toyozumi, Yuta Takahashi, Naohisa Sugimoto, Hiroyuki Nakai, Hayao Taguchi	162
Open-close motion on ligand binding and two magnesium ions required for the catalysis of <i>N</i> -acetylhexosamine 1-kinase Mayo Sato, Takatoshi Arakawa, Young-Woo Nam, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka, Shinya Fushinobu	162
Synthesis of glycopyranosyl- (1 \rightarrow 2)- <i>N</i> -acetylneuraminic acid nonreducing disaccharides and their evaluation as neuraminidase substrates Shiro Komba, Sachiko Machida	162
宿主株が異なる <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 組換え体におけるキシロース発酵能の比較 榊原 祥清, 王 暁輝, 徳 安健	163
Lectin-like Oxidized LDL receptor I Mediates the uptake of the C-terminal domain of Hsp70 (A promising Immune adjuvant molecule) and antigen peptide complexes. M. K. Kuramochi, S. Kajiwara, T. Minowa, S. Machida	163
The <i>mthA</i> mutation conferring low-level resistance to streptomycin enhances antibiotic production in <i>Bacillus subtilis</i> by increasing the s-adenosylmethionine pool size Shigeo Tojo, Ji-Yun Kim, Yukinori Tanaka, Takashi Inaoka, Yoshikazu Hiraga, Kozo Ochi	163
Tetracycline tolerance mediated by gene amplification in <i>Bacillus subtilis</i> Wannasiri Wannarat, Shiori Motoyama, Kenta Masuda, Fujio Kawamura, Takashi Inaoka	163
Structure and biosynthetic implication of 5 <i>R</i> -(<i>N</i> -acetyl-L-cysteiny)- 14 <i>S</i> -hydroxy-dihydrokalafungin from a mutant of the <i>actVA</i> -ORF4 gene for actinorhodin biosynthesis in <i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2) Takaaki Taguchi, Tomoki Maruyama, Ryuichi Sawa, Masayuki Igarashi, Susumu Okamoto, Koji Ichinose	163
Extensive amplification of GI-VII-6, a multidrug resistance genomic island of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium, increases resistance to extended-spectrum cephalosporins Ken-ichi Lee, Masato Kusumoto, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Ikuo Uchida, Taketoshi Iwata, Susumu Okamoto, Kimiko Yabe, Takashi Inaoka, and Masato Akiba	164

Tomato FRUITFULL homologs regulate fruit ripening via ethylene biosynthesis
Yoko Shima, Masaki Fujisawa, Mamiko Kitagawa, Toshitsugu Nakano, Junji Kimbara, Nobutaka Nakamura,
Takeo Shiina, Junichi Sugiyama, Toshihide Nakamura, Takafumi Kasumi, Yasuhiro Ito 164

The AP2/ERF transcription factor SIERF52 functions in flower pedicel abscission in tomato
Toshitsugu Nakano, Masaki Fujisawa, Yoko Shima, Yasuhiro Ito 164

巨大糖タンパク質プロテオグリカンの小角X線散乱測定による特性解析
渡邊 康 164

付 録

食品総合研究所研究報告投稿要領 165

「日本食品科学工学会誌」投稿論文記載要項 167

報 文

3M™ Molecular Detection System を用いた *Listeria monocytogenes* の
簡易迅速遺伝子検査法の評価

川崎 晋*¹, 持田 麻里¹, 齋藤 美枝¹, 守山 隆敏²

¹ 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

² スリーエムヘルスケア株式会社

Evaluation of 3M Molecular Detection System for detecting *Listeria monocytogenes* from food samples

Susumu KAWASAKI*¹, Mari Mochida¹, Mie Saito¹, and Takatoshi Moriyama²

¹ National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

² 3M Health Care Limited, 33-1, Tamagawadai 2-chome Setagaya-ku, Tokyo 158-8583, Japan

Abstract

The culture methods (ISO 11202-1) were compared to 3M Molecular detection system (MDS) for *Listeria monocytogenes* from enrichment cultures of various types of artificially inoculated ready to eat (RTE) foods. The MDS assay was evaluated in 12 types of spiked samples, including meat, fish, sprouts, and dairy products for *L. monocytogenes*. The MDS assay also evaluated in inoculate ground beef samples. Beef samples contamination levels is 0.66 most probable number (MPN)/g were used for recovery study. Twenty test portions (5g) of the contaminated beef were pre-enriched, and MDS assay and the culture method (ISO 11290-1) was used thereafter. An excellent agreement was obtained for the results of MDS assay and culture method, which suggests that the MDS assay is a reliable and useful method for rapid screening of *L. monocytogenes* contamination.

Keywords: 3M Molecular detection system, *L. monocytogenes*, rapid detection, foodborne pathogens

* 連絡先 (Corresponding author), skawasa@affrc.go.jp

緒 言

Listeria monocytogenes は、人獣共通感染症として知られている食中毒菌であり、欧米諸国では1980年代に食品を介した集団感染事例が数多く報告されてきた。我が国においても、2001年のナチュラルチーズを原因食とした集団食中毒事例が報告されており、食中毒起因菌として注目されている¹⁾。本菌は低温での増殖が可能であり、特に市販食品において、非加熱でそのまま喫する「ready-to-eat」食品では、その汚染防除が重要視されている。実際、国内流通の食品の汚染率としても、市販の加熱用食肉からは20~40%の汚染が見られ、国内流通食品魚介類やその加工品においても10~30%の高い汚染率が一部の加工品目について得られており、食品の汚染率は欧米と大差ないことが報告されている²⁾。

L. monocytogenes の培養法による検出では、ISO 11290-1を用いた場合、4~6日の時間を必要とする³⁾。本法では、酵素基質培地と抗原抗体反応による検出を組み合わせるため、FDA/BAM⁴⁾と比較して判定者の経験は軽減されるものの、培養時間を24時間もしくは48時間とするため、検出時間の短縮には至らない。検出時間短縮のために、遺伝子学的手法を用いた*L. monocytogenes* の検出法がこれまで開発されてきた。例えば、Real-Time PCR法に代表されるように、蛍光色素で標識した一本鎖DNAプローブをPCR反応の特異的増幅領域内に設計することにより、電気泳動なしでの直接検出を可能にした検出系を応用した検出法が報告されている⁵⁾。また、SYBR Greenなどds-DNAに直接インターカレートする蛍光物質を用いて、遺伝子増幅の増加量をモニタリングする直接検

出法も開発されている⁶⁾。さらにはPCRのように遺伝子増幅時の温度変化を必要としない、等温遺伝子増幅が可能なLAMP法なども検出法として報告されている⁷⁾。このように遺伝子検出の自動化を可能とする技術の普及により、特に食中毒菌の検出においてはそのキット化が進み始めてきた。

近年、Molecular Detection System (3Mヘルスケア；以下、MDS) と呼ばれる、等温遺伝子増幅法であるLAMP法とATP検出法による発光検出系を組み合わせることにより遺伝子増幅産物を直接検出可能な遺伝子検査システムが開発された。MDSでは、遺伝子増幅された際に出現するピロリン酸塩および3'ホスホアデノシン-5'ホスホ硫酸をATPスルフィラーゼでの付加反応によりATPを産生させ、これをルシフェラーゼにより発光検出する(図1)ことにより、特定遺伝子の検出を行っている。本技術は、LAMP法を活用しているため増幅反応が比較的早く行われるという優位点に加え、発光検出のため励起光源を必要とせず、検出機器の省スペース化を可能とするという利点がある。また、一般に蛍光よりも発光検出の方が高感度であるということも、優位点のひとつである。しかし、現在、MDSの*L. monocytogenes* 検出キットの評価試験については具体的な報告例がなく、*Listeria* 属検出キットについては製造環境中のスポンジによるサンプリングについて、その優位性の結果が報告されているものの⁸⁾、実際の食品、特にReady-to-eat食品からの検出評価試験結果や、その検出感度についての報告はない。

本研究では、3M MDSの*L. monocytogenes* 検出キットを用いて、日本の小売店舗で販売されているReady-to-eat食品からの検出評価試験を試みた。また、挽肉を用いて低濃度汚染を想定した場合の検出率につい

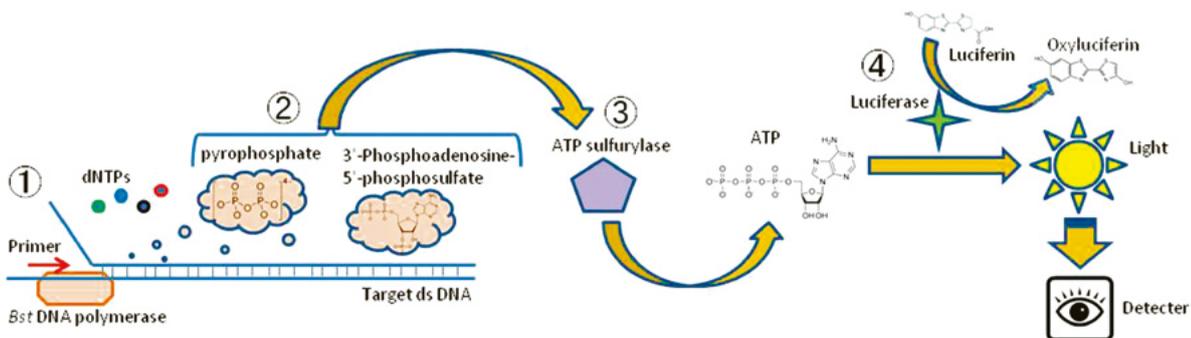


図1. MDS法を用いた遺伝子増幅産物の検出原理

て、3M MDS専用培地とその他の培地を活用した場合
 における検出率についても比較を行った。

実験材料および方法

1. 供試菌および供試食材と接種菌数の確認

供試菌は、*L. monocytogenes* ATCC49594株を用い、Trypticase Soy Broth (TSB, Difco) に0.6%のYeast extractを加えたもの(以下TSBYE)にて35℃、24時間培養後、実験に供した。供試食材は、小売店舗で市販されているReady-to-eat食品(表1)および牛挽肉を購入し、これを以下の実験に用いた。*L. monocytogenes*の前培養液は滅菌リン酸緩衝溶液を用いて10倍段階希釈し、この希釈液をTrypticase Soy Agar (TSA; Difco)に0.6% Yeast extractを加えた寒天平板(以下、TSAYE)に塗抹し培養した。35±1℃24時間培養後に発育集落数を計測し、*L. monocytogenes*の菌数を求めた。

2. 牛挽肉からの*L. monocytogenes* 検出感度試験

牛挽肉からの*L. monocytogenes*の検出感度を求めるため、Fraser培地(3M)もしくは牛挽肉加Fraser培養液からの検出感度を求めた。Fraser培養液は9mLずつ試験管に分注した。また、別途牛挽肉25gをFraser培地225mLに加え35℃で1昼夜培養した液を作成し、これを牛挽肉加Fraser培養液として9mLずつ試験管に分注した。この2つの系に、1.で作成した*L. monocytogenes*前培養液を、Fraser培養液もしくは牛挽肉加Fraser培養液を用いて10倍段階希釈し、それぞれ10⁰CFU/mL(1~9CFU/mL)となるまで希釈した。

各々の菌液各20μLをMDSによる核酸抽出法に供し、その抽出液をMDSによる遺伝子検出に供した。

3. Ready-to-eat食品からのMDSによる検出評価試験

前培養した*L. monocytogenes*菌液を滅菌リン酸緩衝溶液にて10倍段階希釈し、それぞれ10¹CFU/mLとなるよう調製した。調製した菌液0.1mLを表1に示した供試食材25gに接種し、直ちに評価試験に供した。

評価試験は、培養法ではISO11290-1に従って検出した。MDS法では、ISO11290-1でのDemi-Fraser培地による増菌過程で24時間培養後の菌液を20μL、さらにFraser培地による2次増菌過程で24時間培養後の菌液、それぞれ各20μLをMDSによる核酸抽出法に供した。これらの抽出液をMDSによる遺伝子検出に供し、培養法ISO11290-1の結果とMDSによる結果を比較した。

4. 低濃度接種区における検出感度試験と前培養培地間比較試験

培地間比較試験を行うため、低接種区(1検体25gあたり1細胞以下)の牛挽肉検体を作成し、検出率の比較を試みた(図2)。前培養した*L. monocytogenes*は滅菌リン酸緩衝溶液を用いて10倍段階希釈し、およそ10¹CFU/mLとなるよう調製した。調製した菌液1mLを牛挽肉400gに接種し、無菌の袋に入れ良く混合した。同じく、この菌液1mLを99mLのTSBYEに接種し、これを原液として*L. monocytogenes*の生菌数を求めた。生菌数は5本法による最確数法で求め、各試験管について混濁が見られたものには、*L. monocytogenes*の確認試験を、5.の手順に従って実施した。牛挽肉

表1. *L. monocytogenes*の接種試験によるMDS法の食材適合試験結果.

検体	1次増菌 (Demi-Fraser)		2次増菌 (Fraser)	
	ISO-11290-1	MDS	ISO-11290-1	MDS
ベーコン	+	-	+	+
スモークサーモン	+	+	+	+
マグロ剥き身	+	+	+	+
スジコ	+	-	+	+
エビ	+	+	+	+
明太子	+	+	+	+
コールスローサラダ	+	-	+	+
モヤシ	+	-	+	+
カイワレ	+	-	+	+
モッツァレラチーズ	+	-	+	+
カマンベールチーズ	+	+	+	+

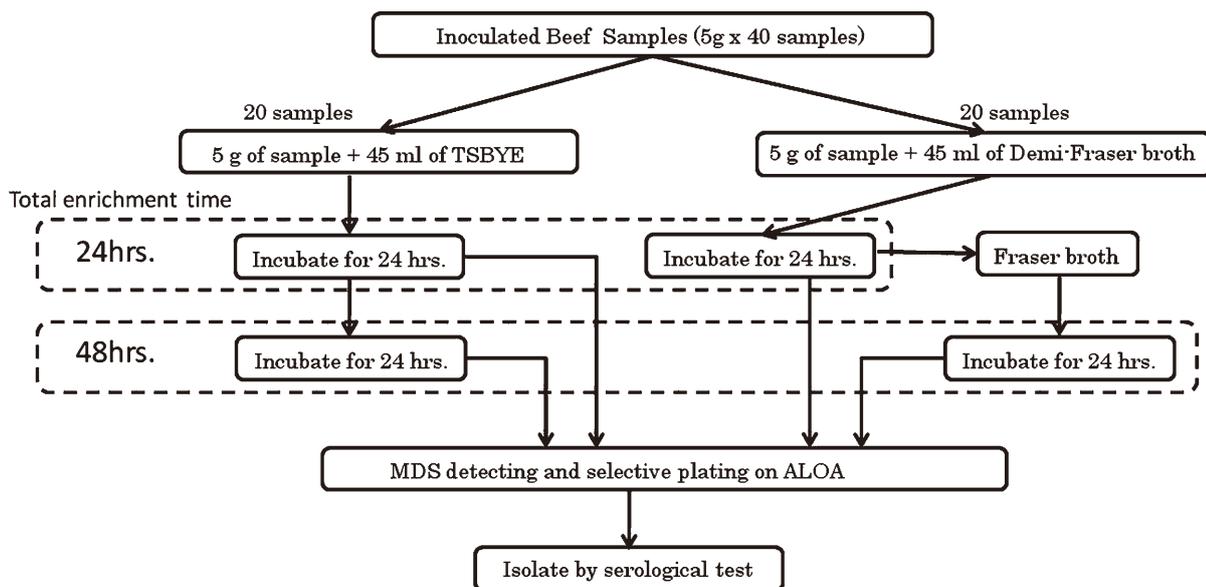


図2. MDSと培養法での*L. monocytogenes*検出比較実験のスキーム

は5gに小分けし、これを2試験区で各20個ずつ作成した。各試験区について、前培養培地（TSBYE、およびDemi-Fraser）を各45mLずつ加え、35℃で24時間培養した。培養後の各培養液は、各1mLずつ微量遠心管に移し、-20℃で直ちに保存した後にMDSによる核酸抽出および遺伝子検出に使用した。同時に、培養液から*L. monocytogenes*の確認試験を実施した。TSBYEの試験区では、さらに24時間培養を継続した。一方、Demi-Fraser培地の試験区では、0.1mLを10mLのFraser培地に移し、培養を24時間継続した。これらも培養が終了後、各々について、培養液から*L. monocytogenes*の確認試験を実施した。10mLのFraser培地については、さらに24時間培養を継続し、同様に確認試験を実施した。

5. 培養法と抗体キットによる*L. monocytogenes*の検出と確認

培養液中からの*L. monocytogenes*検出は、ALOA平板に一白金耳各線して35℃24~48時間培養することで行った。得られた典型コロニーは、釣菌して200μLのPBSに懸濁し内160μLを、抗体検出キットSiglePath L' mono (Merck)に供し、*L. monocytogenes*であることを確認した。

最確数法においても、各試験管にて混濁が見られ

たものにはその160μLをSiglePath L' monoに供し、*L. monocytogenes*であることを確認した。

6. MDSによる核酸抽出法および遺伝子増幅反応による検出

MDSによる核酸抽出ならびに遺伝子増幅反応検出は3M Molecular Detection Assay *Listeria monocytogenes* (3M)と専用遺伝子増幅機3M Molecular Detection Instrument (3M)を用いて行った。

4. で凍結保存した、24時間および48時間培養した培養液は、自然解凍した後、20μLを付属の抽出キットの3M Lysis tube（以下、Lysis tube）に加え、転倒混和した。これをヒートブロックで100℃15分間加熱後、直ちに事前に-20℃で冷却しておいたチルブロックに移し、10分間冷却した。Lysis tubeを数回転倒混和後、室温5分放置しLysis tube内の樹脂を自然沈降させ、検体由来の残渣を共沈により除去した。この上澄み20μLを固化化した遺伝子増幅試薬入りの反応管に移し、ピペティングにより混和させた後、専用遺伝子増幅機3M Molecular Detection Instrumentにより等温遺伝子増幅させた。また、測定毎に、付属の陽性/陰性コントロール試薬を用いて反応の確認を行った。75分間の反応後、*L. monocytogenes*の判定を付属ソフトウェアにより検出結果を自動判別した。

結 果

1. 牛挽肉における検出感度試験

Fraser培地および牛挽肉加Fraser培養液を用いて*L. monocytogenes*を段階希釈し ($10^1 \sim 10^7$ CFU/mL), その培養液20 μ LからMDS法による核酸抽出を行い, 遺伝子増幅反応に供した場合での検出感度を求めたところ, 双方ともに 10^5 CFU/mLと得られた (Data not shown).

2. Ready-to-eat食品でのMDS法の検出評価試験

10^0 CFU/25 gの濃度となるよう*L. monocytogenes*を接種した供試食材からのMDS法による検出試験結果を表1に示した. 1次増菌培地であるDemi-Fraser培地で24時間培養した検体からでは, スモークサーモン・マグロ剥身・エビ・明太子・カマンベールチーズからはMDS法で検出可能であったが, その他の検体からは検出できなかった. さらにこの1次増菌液0.1 mLを10 mLのFraser培地に移し, 24時間培養した検体からでは, 全ての食材においてMDS法による検出が可能であった.

3. 低濃度接種区における検出感度試験と前培養培地間比較試験

低濃度接種区における牛挽肉からの検出感度試験の結果を表2に示した. *L. monocytogenes*の接種菌数は最確数法で0.66 MPN/5 gと求められた. Demi-Fraser培地で一次増菌した場合, MDS法による陽性検出数は20検体中5検体で, これらは培養法での結果と一致した. 1検体のみ培養法で陽性, MDS法で陰性との結果を得た (検体No. 24). さらにFraser培地に移して培養を24時間行った検体では, 培養法で陽性と得られた検体は全てMDS法でも陽性と得られた. 1検体 (検体No. 33) のみ, 培養法で陰性であったが, MDS法で陽性と検出された. このFraser培養液については, 別途核酸を抽出し通常のPCR法に供したところ, *L. monocytogenes*陽性と得られることを確認した.

Demi-Fraser, Fraser培地以外の前培養培地の活用の可能性を検討するため, TSBYEにおいても, 同様の試験を実施した. TSBYEにて24時間培養の時点で, 培養法ならびにMDS法による検出に供したが, 培養法では3検体が陽性, MDS法では検出できなかった. さらに培養を48時間まで継続したところ, 培養法では8検体が陽性と得られたものの, MDS法にて陽性と得られたものは3検体であった.

表2. 牛挽肉を用いた*L. monocytogenes*の培地間評価および検出試験結果.

SampleNo.	TSBYE				SampleNo.	Demi-Fraser		Demi-Fraser → Fraser	
	24h		48h			24h		48h	
	ISO 11290-1	MDS	ISO 11290-1	MDS		ISO 11290-1	MDS	ISO 11290-1	MDS
1	+	-	+	-	21	-	-	-	-
2	-	-	+	+	22	-	-	-	-
3	-	-	-	-	23	+	+	+	+
4	-	-	-	-	24	+	-	+	+
5	-	-	+	+	25	-	-	-	-
6	-	-	-	-	26	+	+	+	+
7	-	-	-	-	27	-	-	-	-
8	-	-	+	-	28	-	-	-	-
9	-	-	-	-	29	+	+	+	+
10	+	-	+	-	30	-	-	-	-
11	-	-	-	-	31	-	-	-	-
12	-	-	-	-	32	-	-	-	-
13	-	-	+	-	33	-	-	-	+
14	-	-	-	-	34	+	+	+	+
15	-	-	-	-	35	+	+	+	+
16	-	-	-	-	36	-	-	-	-
17	-	-	-	-	37	-	-	-	-
18	-	-	-	-	38	-	-	-	-
19	-	-	+	+	39	-	-	-	-
20	+	-	+	-	40	-	-	-	-

考 察

L. monocytogenes の検出には遺伝子学的手法によるキットが多数販売されてきた。しかしながら、多くの場合、その検出は電気泳動後の検出をはじめ、蛍光色素標識した特異的プローブの活用など、励起光を必要とする検出法が主流である。本法は発光による検出法であるゆえ、蛍光検出よりも検出感度は高いと一般的に考えられ、かつ励起光源を必要とせずに検出可能という利点がある。しかしながら、図1に示したように、本法は遺伝子増幅と発光検出において、ATP スルフリラーゼによる付加反応やATPとのルシフェラーゼ反応の過程を必要とするため、実際の食品に適応した場合に遺伝子検出阻害は起こりうるのか、検討する必要がある。また、本検出に必要な前培養時間は十分であるのか、確認する必要がある。さらに*L. monocytogenes* の遺伝子検出には、効果的な核酸抽出が必要であることを述べた⁹⁾が、本法では担体樹脂に溶菌試薬を混合した試験管で100℃ 15分加熱するのみという極めて簡易な抽出操作であり、その抽出効率についても評価が必要と考えられた。

核酸抽出効果について検討したところ、MDS法による抽出の場合、20 µLの培養液を680 µLの溶菌試薬が入った試験管に加えて反応させた後、その上澄み20 µLを直接遺伝子増幅反応管に加えることから、理論上、培養中に35 CFU/20 µL (1.8×10^3 CFU/mL) 存在すれば1 copyの標的遺伝子が反応管に入り、増幅反応が起こることとなる。しかし、今回の試験結果では、検出感度は 10^5 CFU/mLと理論値よりも低く得られたことから、MDS法による抽出キットでは抽出効率が低いことを示唆した。本抽出法では遠心分離を必要とせず、担体樹脂による食品残渣の共沈作用とボイル法を同時に行える利点はあるものの、抽出効率はボイル法と同程度⁹⁾であった。

食材への適応評価試験では、国内外で*L. monocytogenes* の検出が報告されている主なもの¹⁾を検体として使用した。評価試験の結果、スモークサーモン・マグロ剥身・エビ・明太子・カマンベールチーズでは1次増菌培地Demi-Fraserで24時間培養後から検出されたが、多くの検体ではさらにFraserによる2次増菌までを必要とした。それゆえ、検体の種類にもよるであろうが、MDS法による*L. monocytogenes* 検出においては2次増菌までを行うことが望ましいという結果となった。この結果から、他の培地の活用による前

培養時間短縮の可能性を調べるため、非選択培地であるTSBYE培地にて前培養した場合での陽性検出率について比較検討した。

低接種区における培地間比較試験の結果、MDS法の基本プロトコールであるDemi-Fraserで24時間培養後にFraserでさらに24時間培養するスキームでは、1次増菌時点での培養法との比較結果においてMDS法では1検体において偽陰性を得たため、牛挽肉を検体とした場合2次増菌までが必要と考えられた。逆に、2次増菌後においては培養法では6検体に対しMDS法では7検体が陽性となり、陽性検体が一致もしくはそれ以上の結果を得たため、上記の培養条件でMDS法は十分に培養法の結果を包括できると考えられた。一方、TSBYEでは24時間培養後において陽性検体数は培養法においてもわずか3検体、MDS法では検出できなかった。48時間まで培養を継続しても、培養法では8検体が陽性と得られたのに対し、MDS法では3検体のみが陽性検体として一致した。それゆえ、TSBYEでの前培養はMDS法での検出に適さないと考えられた。

以上のことから、MDS法ではDemi-FraserおよびFraser培地で各々24時間の培養後に付属キットでの遺伝子抽出プロトコールと等温遺伝子増幅反応により、*L. monocytogenes* を特異的に検出可能であった。また、挽肉を用いた接種試験においてもその検出結果は培養法の結果と一致した。使用する食材に対して、個別の事前評価試験が必要となると考えられるものの、*L. monocytogenes* の迅速検査法として、十分使用に耐えうるものと考えられた。

要 約

L. monocytogenes を様々なReady to eat食品に接種した検体を用いて、培養法と3M Molecular detection systemによる検出結果を比較した。肉、魚、モヤシ、乳製品など12種類について検出評価試験を実施した。また、牛挽肉を用いたMDSの検出評価試験も実施した。牛挽肉の実験では接種菌数を0.66 MPN/gとし、添加回収試験を実施した。各20検体(5g)の牛挽肉を前培養し、それぞれMDS法およびISO11202-1による培養法により検出した。上記いずれも、MDS法による検出結果は通常の培養法の結果と一致し、MDS法は食品中の*L. monocytogenes* 汚染の迅速スクリーニング法として有用であると考えられた。

参考文献

- 1) 食中毒予防必携 第2版, 社団法人 日本食品衛生協会 155-162. (2007).
- 2) 厚生労働省, 食品由来のリストeria菌の健康被害に関する研究, 食品安全確保研究事業, 総括研究報告書 (2004).
- 3) ISO 11290-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. (1996).
- 4) FDA: Bacteriological Analytical Manual, Capture 10 (2003).
- 5) Kawasaki, S., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T. and Kawamoto, S., Multiplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection and quantification of *Salmonella* species, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in ground pork samples. *Foodborne Pathog. Dis.*, **7**, 549-554 (2010).
- 6) Li, F., Zhao, C., Zhang, W., Cui, S., Meng, J., Wu, J., and Zhang, D. Y., Use of ramification amplification assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* Shiga toxin-producing strains. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 6086-6090, (2005).
- 7) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T., Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl. Acids Res.*, **28**, E63, (2000).
- 8) Fortes, E. D., David, J., Koeritzer, B., Wiedmann, M., Validation of the 3M molecular detection system for the detection of listeria in meat, seafood, dairy, and retail environments. *J. Food Prot.*, **76**, 874-878. (2013).
- 9) Kawasaki, S., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S., Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. *J. Food Prot.* **68**, 551-556. (2005).

報 文

Two models of a farming environment: the fate of *Escherichia coli* contaminating either soil or water with soil

Yukie Hosotani¹, Susumu Kawasaki¹, Thongsavath Chanthasombath², Borarin Buntong³,
Md Latiful Bari⁴, and Yasuhiro Inatsu^{1*}

¹ Food Hygiene Laboratory, National Food Research Institute, NARO,
2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

² Ministry of Agriculture and Forestry, Department of Agriculture, Clean Agriculture Development Centre,
P.O. Box 811, Vientiane, Lao PDR

³ Department of Postharvest Technology, Royal University of Agriculture, Chamkar Daung, Dang Kor District,
P.O. Box 2696, Phnom Penh, Cambodia

⁴ Department of Microbiology, University of Dhaka, Dhaka 1000, Bangladesh

Abstract

Pathogenic bacteria contaminating raw vegetables are known to pose a risk of foodborne illnesses. Recent studies showed that the contamination with these bacteria may originate from irrigation water, agricultural materials, or entry of animals onto farms. Here, we conducted a pilot study on the fate of the mixture of 18 *Escherichia coli* strains artificially added to 4 kinds of soil or water with these soils (as a model of irrigation water). Water content and pH of the soils were 14–31% and 6.2–6.6, respectively. The log reduction in the number of *E. coli* cells in water ($6.5 \log \text{CFU mL}^{-1}$) 4 weeks after inoculation was 1.8–4.1 $\log \text{CFU mL}^{-1}$ under natural conditions. The log reduction in the number of *E. coli* cells in soil ($3\text{--}6 \log \text{CFU g}^{-1}$) was 0.5–2.9 $\log \text{CFU g}^{-1}$ in the same period. No relation between the log reduction and initial load of the strains was found. These results are suggestive of long-term survival of contaminating *E. coli* in a farm environment.

Key words: *Escherichia coli* O157, soil, water, PCR-DGGE, good agricultural practices

Introduction

Fresh vegetables have been implicated in microbial foodborne diseases worldwide¹. The incidence of foodborne illnesses attributed to fresh vegetables is increasing². Reported outbreaks associated with fresh vegetables are noteworthy because of the wide geographical distribution of the contaminated products and large numbers of consumers exposed, and thus the large number of cases^{3,4}.

Fresh vegetables are grown in environments that

are subject to many accidental or intentional inputs that are potential sources of microbial foodborne hazards and may lead to contamination of produce⁵. Fresh vegetables produced in open growth fields may be contaminated at some point as a result of various intentional or accidental inputs such as fecally contaminated irrigation water or immature manure. The intrinsic factors of the environment such as temperature, pH, and water activity may affect the growth, survival, and persistence of bacterial foodborne pathogens⁶.

The role of contaminated water (used for production

*Corresponding author (Tel./Fax: +81 29-838-8067, E-mail: inatu@affrc.go.jp)

of vegetable crops) as a vector for transmission of these pathogens to humans is less clear. Nonetheless, poor quality of irrigation water (according to elevated fecal coliform counts) has long been known to correlate with the incidence of human pathogens in leafy-vegetable crops⁷. Epidemiological evidence from specific outbreaks also points to the role of irrigation water in the introduction of pathogens into the production environment. For example, contamination of iceberg lettuce during a large outbreak of foodborne illnesses caused by *Escherichia coli* O157 in Sweden was linked to the use of contaminated irrigation water drawn from a small stream⁸. The risks of contamination of fresh vegetables with enteric pathogens from irrigation water have been quantified in several risk assessment studies^{9,10}. Many fresh vegetables represent a nutrient-rich and moist environment suitable for the survival and growth of contaminating bacteria coming from surface irrigation water or from the attached bits of soil¹¹.

Recent studies revealed a relation between the rate of decay (reduction in live-cell number) of contaminating pathogens/fecal indicators in soil/sand and the diversity of natural bacterial flora by means of polymerase chain reaction (PCR) with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)¹²⁻¹⁴. Unfortunately, only a small number of inoculated strains was used in these experiments. Considering the possible diversity of the survival ability of *E. coli* in soil or irrigation water, the use of several strains may yield much more realistic results. In the present study, we evaluated the fate of a mixture of 18 *E. coli* strains added to 4 kinds of soils or water samples contaminated with one of these soils under natural conditions during a summer in Japan.

Materials and Methods

Eighteen *E. coli* strains (derived from 2 beef meat samples, 5 chicken meat samples, 5 pork meat samples, and 6 samples of vegetables) were used to prepare the inoculums. All of the strains showed different patterns of RAPD-PCR¹⁵. Each of the strains was cultivated in 5 mL of brain heart infusion broth (Nissui Co., Ltd., Tokyo) at 35°C for 18 hours. All the cultures were mixed after centrifugation and washing with phosphate-buffered saline (PBS). Four soils (code-named "A" to "D") were collected from different vegetable fields in Japan. PCR-DGGE analysis of the collected soil samples was performed according to

the standard manual from the National Institute for Agro-Environmental Sciences, Japan¹⁶. In brief, total DNA in soil was extracted by means of the Fast DNA SPIN Kit for Soil (Q-BIOGene, USA) and a bead mill homogenizer. The V6-8 variable region of 16S ribosomal RNA (rRNA) genes was amplified by PCR and subjected to DGGE analysis by means of a Bio-Rad DCode system (Bio-Rad, Co., Ltd., Tokyo).

Each 95 g sample of the soils or each 90 mL sample of water mixed with 5 g of one of the soils was placed in a sterile plastic cup (200 mL). Five milliliters of PBS diluted inoculums was mixed in the cup with the soil or contaminated water. Acidity and water content of the soil samples were measured by means of the Satotech DM-15 instrument (Sato Co., Ltd., Kawasaki). These cups were left outside (27–33°C) in Tsukuba city, Japan, from July to September 2011. A 10 g portion of the soil samples was stomached for 1 minute with 90 mL of PBS to prepare an emulsion (10-fold dilution). One milliliter of this emulsion or original water samples was serially diluted and used for counting of viable cells. Typical purple colonies that grew on Merck Coliform agar (Merck, USA) plates were counted. Several colonies were picked and confirmed as *E. coli* by means of API 20E (bioMérieux, France). The above experiments were performed in duplicate and repeated 3 times during the same season. Each of the 6 resulting viable-cell counts was subjected to statistical analysis: analysis of variance (ANOVA) with the Tukey-Kramer multiple comparison test after logarithmic conversion.

Results and Discussion

The pH of the collected samples was in the range 6.5 to 7.4, and no significant difference among the 4 kinds of tested samples was observed ($P > 0.05$). Water content of soil samples A through D was 24%, 30%, 17%, and 38%, respectively. The PCR-DGGE profile of soils A through D is shown in Fig. 1. Soils C and D yielded similar patterns, and soil A contained relatively fewer strains of bacteria than did the other tested soils.

The fate of contaminating *E. coli* in water containing 5% of soil ($6.5 \log \text{CFU mL}^{-1}$) is shown in Fig. 2. The average log reduction after 4 weeks of storage under natural conditions was 3.5 (samples A and C), 1.8 (sample B), and $4.1 \log \text{CFU mL}^{-1}$ (sample D). The rate of log reduction in the number of viable cells in sample B was significantly

slower in comparison with the other tested water samples ($P < 0.05$).

The fate of contaminating *E. coli* in the soil samples ($6.3 \log \text{CFU g}^{-1}$) is shown in Fig. 3. The average log reduction after 4 weeks of storage under natural conditions was 2.1 (sample A), 1.7 (sample B), 1.3 (sample C), and 1.8 $\log \text{CFU g}^{-1}$ (sample D). The rate of log reduction in the number of viable cells in sample C was significantly slower in comparison with the other water samples tested ($P < 0.05$). Contaminating *E. coli* in the soil samples tended to survive better than that in water with the same soil type. When we compared the time points 0 weeks and 4 weeks for each soil, the fate of *E. coli* contaminating soils A, B, and D indicated decay by more than 1.0 $\log \text{CFU g}^{-1}$ independently of the range of 3 to 5 $\log \text{CFU g}^{-1}$ of the initial load of *E. coli* in the soil. At the same time, the fate of *E. coli* in soil C was consistent with decay, but the difference from other soil samples was not significant (Fig. 4).

Pathogenic enteric bacteria like *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* can persist for extended periods in a manure-amended soil, with survival times ranging from several weeks to several months and even up to 2 years in some cases⁽¹⁷⁾⁻²⁰⁾. Survival in a manure-amended soil is generally reduced by higher temperatures, higher levels of native microflora⁽⁹⁾, lower levels of easily available nutrients⁽²¹⁾, increased

levels of microbial diversity⁽²²⁾, and lower clay content⁽²³⁾. Generally, growth activity of bacteria contaminating soils is maximal in soils with 60% water content⁽²⁴⁾. Recent research revealed that bacterial cells enter the phase of vegetative cells that repeat cell divisions actively under rich-nutrient

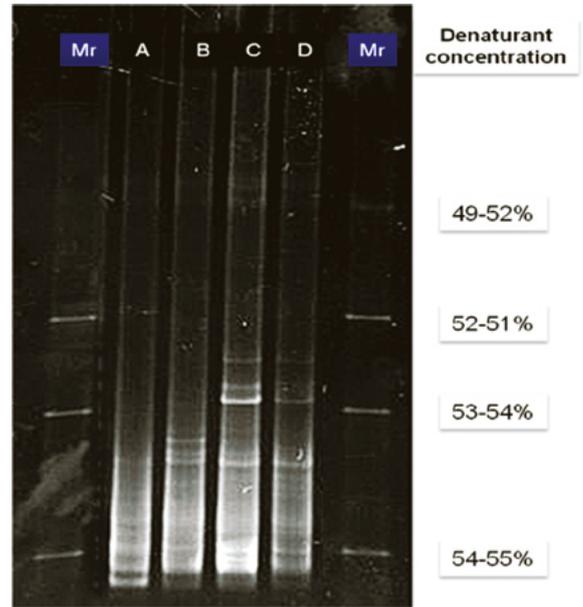


Fig. 1 Profiles of PCR with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the soils tested.

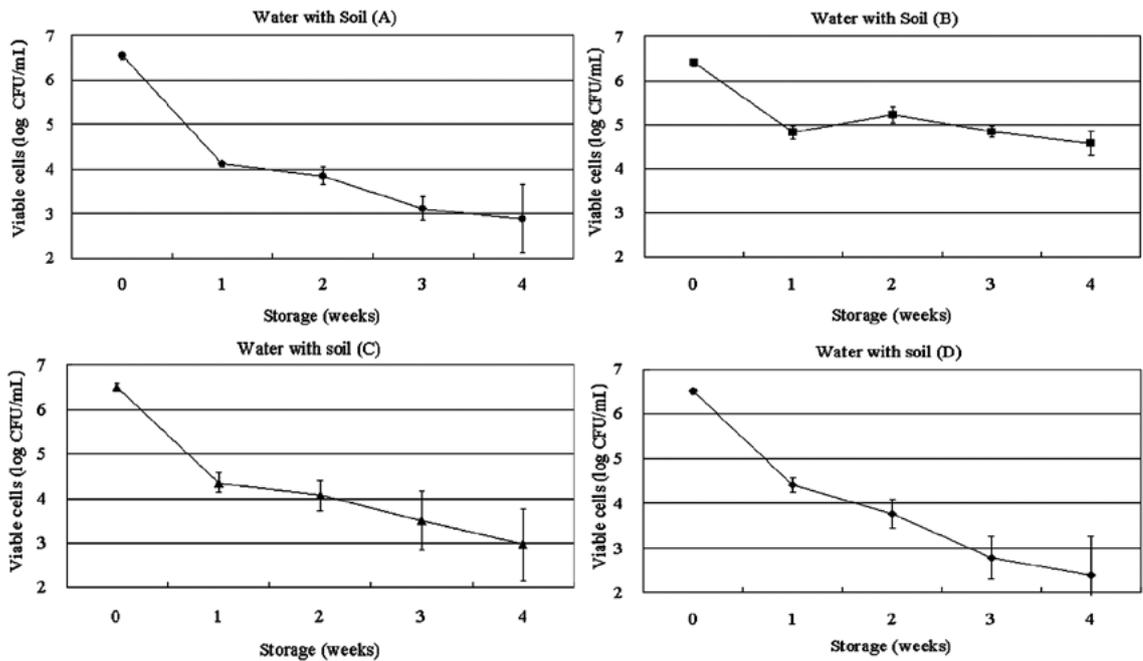


Fig. 2 The fate of *Escherichia coli* in water with 5% of soil.

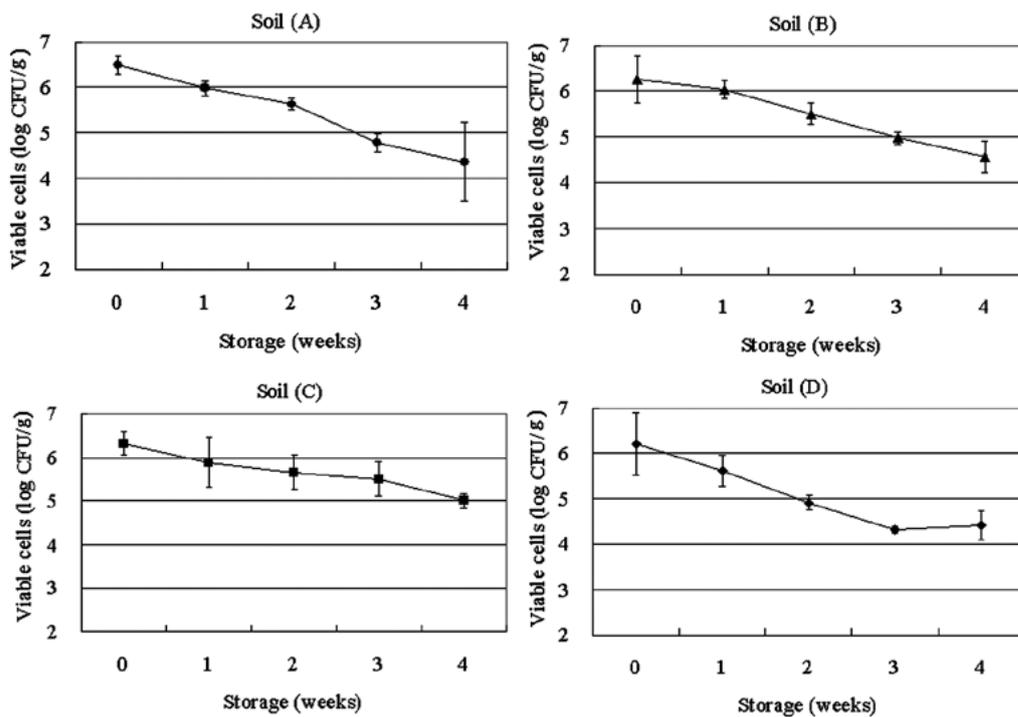


Fig. 3 The fate of *Escherichia coli* in the soil samples.

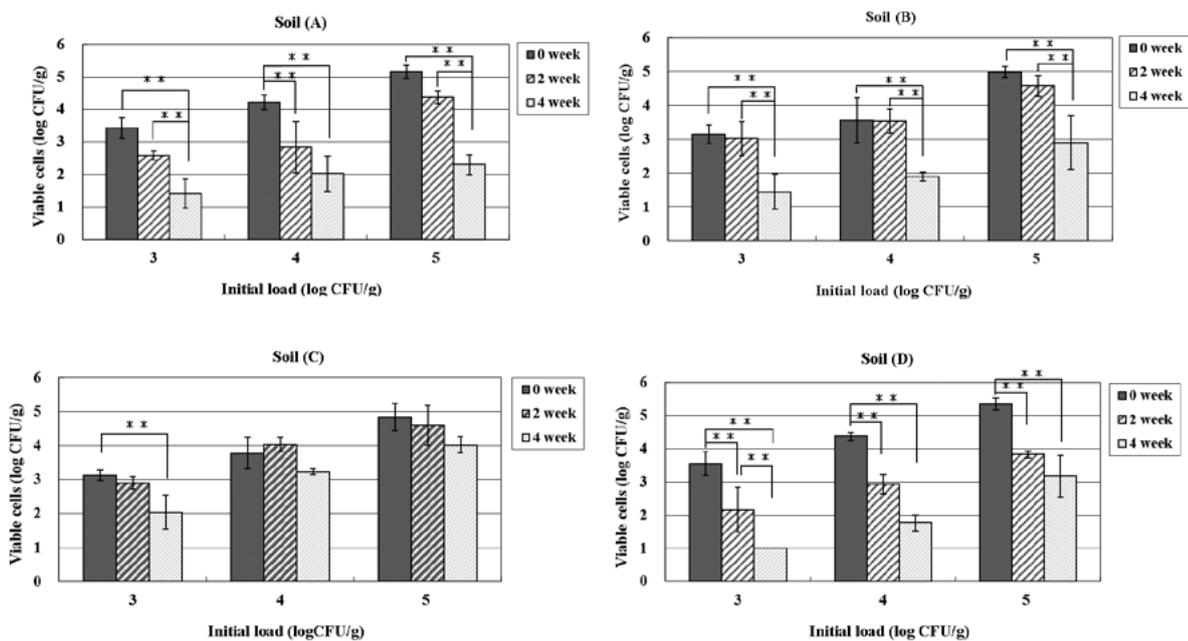


Fig. 4 Dependence of the decay of inoculated *Escherichia coli* cells on the initial load. Asterisks indicate a significant difference ($p < 0.01$) according to analysis of variance (ANOVA) with the Tukey-Kramer test for multiple comparisons.

conditions, but once environmental nutrients run low, bacteria turn into dormant cells and resting cells. Bacterial cells under these conditions were reported to show high

stress tolerance and resistance²⁵). In the present study, *E. coli* contaminating soil C tended to survive longer than in the other 3 soils tested. One of the reasons may be lower water

(and nutrient) content, which may reduce activity of bacteria in this soil; thus, *E. coli* contaminating soil C may have turned into dormant and resting cells and were less likely to enter the growth phase and accordingly remained alive longer in comparison with the other soils. For the reasons stated above, the differences in the fate of *E. coli* between the contaminated water samples and soil samples may be related to water content of each sample. Additionally, it is possible that soil C contained relatively lower levels of some compounds that suppress the growth of *E. coli* because *E. coli* contaminating water sample C also tended not to decay rapidly. It is not clear whether the relation with decay is due to the viable cells of *E. coli* or due to the microbial flora of the soils used in this study.

Conclusion

The numbers of viable cells of the 18 strains of *E. coli* that we tested here were reduced to 1–3 log CFU mL⁻¹ in water with soil and to 2–3 log CFU g⁻¹ in soil samples after 4 weeks under natural summer conditions in Japan. The contaminating *E. coli* tended to decay more rapidly in water than in soil. Soil type-dependent rates of reduction in the number of viable cells were observed both in soil and in water with soil. These results point to the importance of prevention of bacterial contamination in a field soil and irrigation water. In addition, the collected field samples for an assay of bacterial contamination should not be kept for long under natural hot conditions. Otherwise, some portion of the contaminating bacteria may die during storage.

Acknowledgement

This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number 23580353.

要 旨

病原微生物の付着した生野菜は、食中毒のリスクとして認識されている。近年の研究では、これらの微生物汚染は灌漑用水や、農業資材、圃場に侵入した野生動物に起因することが指摘されている。農業生産現場における病原微生物汚染の消長を明らかにするための試験的研究として、我々は18種の大腸菌を4種の土壤検体、および灌漑用水モデルとしてこれらの土壤と水を混和した検体に混入させ、その中における大腸菌の

生存期間の消長について検討を行った。灌漑用水モデルは、pH6.2から6.6、土壌含有量は14-31%とした。初発菌数6.5 log CFU mL⁻¹で大腸菌を接種した灌漑用水モデルを自然天候の下で保管した場合、4週間後には4.1~1.8 log CFU mL⁻¹対数的に減少した。また、初発菌数3から6 log CFU g⁻¹で大腸菌を接種した土壤検体においては、同様の条件の下で保管した場合、4週間後には0.5~2.9 log CFU g⁻¹減少した。大腸菌生菌数の対数的減少と、検体への接種菌量に相関は見られなかったが、本結果は農業環境中に混入した大腸菌が、長期間に渡り生存する可能性が示された。

References

- 1) Beuchat, L.R., Vectors and condition for pre-harvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *British Food Journal*, **108**, 38-53 (2006).
- 2) Herman, K.M., Ayers, T.L., and Lynch, M., *International Conference on Emerging Infectious Diseases, March 16-19, 2008 Atlanta, Georgia, USA*, 27-28 (2008).
- 3) Klontz K.C., Klontz J.C., Mody R.K., Hoekstra R.M., Analysis of tomato and jalapeño and Serrano pepper imports into the United States from Mexico before and during a National Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections in 2008. *J Food Prot.*, **73**, 1967-1974 (2010).
- 4) Soon, J.M., Seaman, P., and Baines, R.N., *Escherichia coli* O104:H4 outbreak from sprouted seeds. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, **216**, 346-354 (2013).
- 5) Brackett, R.E., Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biology and Technology*, **15**, 305-311 (1999).
- 6) De Roever, C., Microbiological safety evaluation and recommendations on fresh produce. *Food Control*, **9**, 321-347 (1998).
- 7) Norman, N.N., Kabler, P.W., Bacteriological study of irrigated vegetables. *Sewage Ind. Wastes*, **25**, 605-609 (1953).
- 8) Soderstrom, A., Lindberg, A., and Andersson, Y. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August–September 2005. *Eurosurveillance*. **10**(38), 22 September 2005 (2005).
- 9) Hamilton, A.J., Stagnitti, F., Premier, R., Boland, A.-M.,

- and Hale, G., Quantitative microbial risk assessment models for consumption of vegetable crops irrigated with reclaimed water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3284-3290 (2006).
- 10) Stine, S., Song, I., Choi, C., and Gerba, C., Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce. *J. Food Prot.*, **68**, 913-918 (2005).
 - 11) Ingram, D.T., Patel, J., and Sharma, M., Effect of repeated irrigation with water containing varying levels of total organic carbon on the persistence of *Escherichia coli* O167:H7 on baby spinach. *Journal of Food Protection*, **74**, 709-717 (2011).
 - 12) Feng, F., Goto, D., and Yan, T., Effects of autochthonous microbial community on the die-off of fecal indicators in tropical beach sand. *FEMS Microbiol Ecol*, **74**, 214-225 (2010).
 - 13) Ibekwe, A.M., and Ma, J., Effects of fumigants on microbial diversity and persistence of *E. coli* O15:H7 in contrasting soil microcosms. *Sci Total Environ*, **409**, 3740-3748 (2011).
 - 14) Van Elsas, J.D., Chiurazzi, M., Mallon, C.A., Elhottova, D., Kristufek, V., Salles, J.F., Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **109**, 1159-1164 (2012).
 - 15) Elano, R.R., Kitagawa, T., Bari, M.L., Kawasaki, S., Kawamoto, S., and Inatsu, Y., Comparison of the effectiveness of acidified sodium chlorite and sodium hypochlorite in reducing *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis.*, **7**, 1481-1489 (2010).
 - 16) Tsushima, S., and Matsushita, Y., Technical report on the PCR-DGGE analysis of bacterial and fungal soil communities. **ver. 3.3**, National institute for agro-environmental sciences., Tsukuba, Japan (2010).
 - 17) Franz, E., van Diepeningen, A.D., De Vos, O.J., and van Bruggen, A.H.C. Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar typhimurium in manure, manure-amended soil, and lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6165-6174 (2005).
 - 18) Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S.C., Millner, P., and Jiang, X., Persistence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection*, **67**, 1365-1370 (2004).
 - 19) Jiang, X., Morgan, J., and Doyle, M.P., Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2605-2609 (2002).
 - 20) Nicholson, F.A., Groves, S.J., and Chambers, B.J., Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Techn*, **96**, 135-143 (2005).
 - 21) Franz, E., Klerks, M.M., De Vos, O.J., Termorshuizen, A.J., and van Bruggen, A.H.C., Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* *stx1*, *stx2*, *eaeA*, and *rfbE* genes and survival of *E. coli* O157:H7 in manure from organic and low-input conventional dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 2180-2190 (2007a).
 - 22) Van Elsas, J. D., Hill, P., Chronakova, P., Grekova, M., Topalova, Y., Elhottova, D., and Kristufek, V., Survival of genetically marked *Escherichia coli* O157:H7 in soil as affected by soil microbial community shifts. *The ISME journal*, **1**, 204-214 (2007).
 - 23) Franz, E., Semenov, A.V., Termorshuizen, A.J., De Vos, O.J., Bokhorst, J.G., van Bruggen, A.H.C., Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157:H7 in 36 Dutch soils. *Environmental Microbiology*, **10**, 313-327 (2007b).
 - 24) Katzenelson, H., Stevenson, I.L., Observations on the metabolic activity of the soil microflora., *Canadian Journal of Microbiology.*, **2**, 611 (1956).
 - 25) E. Abel-Santos ed., Bacterial Spores: Current Research and Applications, Caister Academic Press (2012).

報 文

Glutathione changes physical properties of rice batter without increasing its allergenicity

Hiroyuki Yano* and Akiko Fukui

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

In our previous studies, glutathione, a biologically ubiquitous tripeptide, has been shown to improve swelling of gluten-free rice bread. To further characterize the effects of glutathione, we studied structural changes in batter protein in relation to gas retention properties of the batter. Glutathione (just as dithiothreitol and cysteine) cleaved the glutelin polymers into monomers, and concurrently improved gas retention capacity of the rice batter. Moreover, glutathione apparently did not promote formation of disulfide bonds among proteins. This was in contrast to wheat dough where extensive intermolecular disulfide bonds among proteins formed during kneading. Besides, an allergenicity test involving serum samples from dogs with wheat allergy suggested that the use of glutathione did not increase allergenicity of gluten-free rice bread. Our results suggest that glutathione modestly changes the structure of food protein while improving the physical properties of food without increasing its allergenicity. Our findings show usefulness of glutathione for research into the development of new foods.

Abbreviations: DTT, dithiothreitol; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline

Key words: Bread; Glutathione; Gluten-free; Rice; Sorghum; Wheat allergy

Introduction

The demand for gluten-free foods has increased (Lamacchia et al. 2014) due to the high prevalence of celiac disease (Green and Cellier 2007) and wheat allergy (Mansueto et al. 2014). In our previous studies, addition of glutathione improved swelling of gluten-free rice bread (Yano 2010; Yano et al. 2013). Moreover, the use of oxidized glutathione (GSSG) rather than reduced glutathione improved the smell of the bread (Yano 2012). Although the glutathione-rice batter had less volume during fermentation in the presence

of salt, a key flavor of bread, addition of sorghum flour to the batter prevented the volume reduction even in the presence of salt (Yano and Fukui 2015). The specific volume of this bread is ~4 mL/g, which is comparable to wheat bread. Furthermore, purified glutathione, which is not allowed as food material in several European and Asian countries, has been successfully replaced with edible yeast extract that contains 18% (w/w) of GSSG (Yano and Fukui 2015). Thus, a feasible formulation of gluten-free rice bread has been accomplished because all ingredients—rice/sorghum flour, yeast extract, dry yeast (for fermentation), sugar, salt, butter,

*Corresponding author: (Tel: +81 298388051, Fax: +81 298387996, E-mail: hyano@affrc.go.jp)

and water—are foodstuffs.

On the other hand, the effects of glutathione as well as the swelling mechanism have not been studied adequately. For example, although the intermolecular disulfide bond of glutelin polymers has been shown to be cleaved to produce monomers in the presence of glutathione, comparative studies with other relevant compounds such as cysteine and other amino acids have not been conducted. Besides, fermentation gas capacity of the batter before baking is not clear. Structural changes in proteins during the manufacturing process as well as their allergenicity are poorly understood. Research in this field should help to understand the mechanism of action of glutathione. The resulting knowledge will facilitate the use of glutathione in a wide variety of foods. Therefore, in this study, we sought to further characterize the effects of glutathione on rice batter/bread.

Materials and Methods

Materials

Rice flour (10.7% moisture, 0.3% ash, 6.2% protein, 0.9% lipids, and 81.9% starch) was obtained from Namisato, Co., Ltd. (Tochigi, Japan). Sorghum flour (12.4% moisture, 0.6% ash, 9.6% protein, 1.5% lipids, and 73.6% starch) was purchased from Nakano Sangyo, Co., Ltd. (Kagawa, Japan). Dried yeast (Nisshin Super Camellia) was obtained from Nisshin-foods Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Purified glutathione was purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). The GSSG-containing (18%, w/w) yeast extract, YH-D18, was a gift from Kohjin Life Sciences Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Gas retention properties of rice batter

Rice batter was prepared in a commercial bread maker SD-BH105 (Panasonic Corporation, Osaka, Japan) as described elsewhere (Yano 2010) with some modifications. In brief, 160 g of rice flour, 140 g of distilled water, and one of additives (dithiothreitol, glutathione, cysteine, or alanine) were mixed by kneading paddles for 20 min in a bread bin of the bread maker. The batter was then left overnight in a refrigerator (4°C). Next, 15 g of sugar and 2.5 g of baker's yeast (Nisshin Flour Milling Inc., Tokyo, Japan) were added to the batter, which was then mixed for 20 min. After that, 200 g of the batter was transferred to a 1-L beaker. Finally, each beaker was incubated at room temperature (25°C ± 1°C), and the volume of the swelling batter during the

fermentation process was recorded periodically.

Analysis of disulfide-linked polymerization of protein

To investigate disulfide-linked polymerization among proteins in the rice batter, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out without dithiothreitol (DTT) (Yano et al. 2001) as follows. After overnight incubation of the batter as described above, a portion of the batter (1.0 g) was mixed with 10 mL of a DTT-free Laemmli sample buffer (Laemmli 1970). After homogenization, the sample was centrifuged at 10,000 × g for 10 min. Then, 10 µL of the supernatant was subjected to SDS-PAGE. The electrophoresis was run on a precast polyacrylamide gel with a linear 4% to 20% acrylamide gradient (Bio-Rad, Hercules, USA) by means of the Criterion precast gel system (Bio-Rad) with a constant current of 30 mA per gel. After the electrophoresis, the gel was incubated (with moderate shaking overnight at room temperature) in 20% methanol containing 5% acetic acid and 0.025% Coomassie brilliant blue R-250 (CBB). The gel was then destained with a solution of 20% methanol and 5% acetic acid until the protein bands became visible.

Bread making

After adding bakers' yeast and mixing the batter for 20 min as described above, we transferred 200 g of the batter to an 800-mL square oven case. After fermenting the batter at 40°C (for ~60 min) until the batter swelled to the top of the oven case, we baked the batter at 180°C for 25 min in an EMO-C16C electric oven (Sanyo Electric, Osaka, Japan).

Allergenicity testing of the batter/bread

Pooled serum from dogs with wheat allergy. The serum of three dogs with high IgE titers against wheat were used in this experiment. The wheat-specific IgE concentration in these serum samples was 699 ng/mL, 609 ng/mL, and 755 ng/mL. These three samples were mixed in equal amounts to obtain pooled serum with the concentration of wheat-specific IgE of 730 ng/mL. The pooled serum was used in the following experiments.

Protein extract from cereal flour or breads. The protein extract was prepared from the following five food samples by means of FASPEK ELISA II Kit (Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Kanagawa, Japan): wheat flour, mixed flour of rice/sorghum, wheat bread baked in our lab,

rice/sorghum bread baked in our lab, and wheat bread from a local store. The protein concentration in each extract was determined with the Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad).

Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). This assay was performed as follows (Okayama et al. 2011). In summary, microwells were coated with the above-mentioned protein extract (0.1, 1.0, or 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) overnight at 4°C. Next, the wells were washed three times with PBST (phosphate-buffered saline containing 0.2% Tween 20) followed by blocking with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% gelatin for 4 hours at 4°C. After removal of the blocking buffer, the pooled serum diluted 1:400 with dilution buffer (1% gelatin in PBST) was added at 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ and incubated overnight at 4°C. After three washes with PBST, 100 μL of a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution of a biotinylated anti-dog IgE antibody (Bethyl, USA) diluted with dilution buffer (1% gelatin in PBST) was added to each well. After 2-hour incubation at room temperature, the wells were washed three times with PBST. After that, 100 μL of 0.05 U/mL Streptavidin-beta-Gal Conjugate (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg Germany) in dilution buffer was added to each well, and the mixture was incubated for 2 hours at room temperature. After the wells were washed three times with PBST, 100 μL of 0.1 mM 4-methylumbelliferyl-d-galactopyranoside (4MU, Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA) in reaction buffer (0.1% gelatin, 0.1 M NaCl, and 1 mM MgCl_2 in phosphate buffer, pH 7.4) was added to each well. After 1-hour incubation at room temperature, 100 μL of the stop solution (0.25 M Na_2CO_3) was added, and the fluorescence was detected on the microplate reader Gemini XPS (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The data were analyzed in the Softmax Pro software (Molecular Devices).

Results and Discussion

Effects of glutathione-related additives on the gas retention properties of rice batter

First, to further characterize the effects of glutathione on gluten-free rice batter, we analyzed the structural changes in the batter protein in relation to the gas retention properties of the batter. Protein bands of glutelin polymers became thinner in the presence of DTT, cysteine, or glutathione (Fig. 1A; lanes 2, 3, and 4). On the other hand, the profile of glutelin molecules did not change significantly in the

presence of alanine (lane 5). In line with the cleavage of glutelin polymers, addition of glutathione, DTT, or cysteine enhanced the retention of gas by rice batter (Fig. 1B). The highest specific volumes, 4.5, 3.7, and 4.1 mL/g, were obtained respectively for glutathione, cysteine, and DTT. After maintaining the greatest volume for ~ 3 hours, the batter collapsed to a smaller volume. Because the greatest specific volume of glutathione bread is ~ 4 mL/g, our data point to moderate shrinkage of the batter during the baking process. This is a key difference between the rice bread studied here and typical wheat bread, which is characterized by “oven spring,” i.e., increased dough volume at the early stage of baking. By contrast, the control batter and the alanine-supplemented batter collapsed earlier (after 1 hour) with the greatest specific volume as low as ~ 2.5 mL/g. Furthermore, bubbles in the batter were larger in the case of alanine in comparison with glutathione (Fig. 1C) or other SH-containing additives (data not shown). These results suggest that rice batter without the gluten skeleton cannot maintain large bubbles during the fermentation process in contrast to the typical presence of large bubbles in wheat breads (such as French loaf). In addition, glutathione and other SH-containing additives may facilitate confinement of fermentation gas in small bubbles, thereby stabilizing the crumb structure even without a gluten skeleton. A comparison between our cysteine and alanine procedures confirmed that the sulfhydryl group (SH), not the basic structure of an amino acid, conferred the gas retention capacity to the batter.

Comparison of protein profiles between rice batter and wheat dough

Next, we studied the effects of glutathione on protein in the batter composed of the rice/sorghum flour mixture. In the case of wheat flour, the protein profile changed completely if we compare the profiles before and after the mixing of the dough (Fig. 2; lanes 1 and 2). This is because two major wheat seed proteins, i.e., gliadin and glutenin, interacted extensively during kneading into insoluble gluten. Therefore, the level of SDS-soluble protein decreased after kneading of the dough. The protein network of gluten helps the dough hold the fermentation gas during the baking process. On the other hand, in the case of sorghum/rice batter, no major change was observed after addition of GSSG and mixing of the batter (lanes 3 and 4), except for a decreased amount

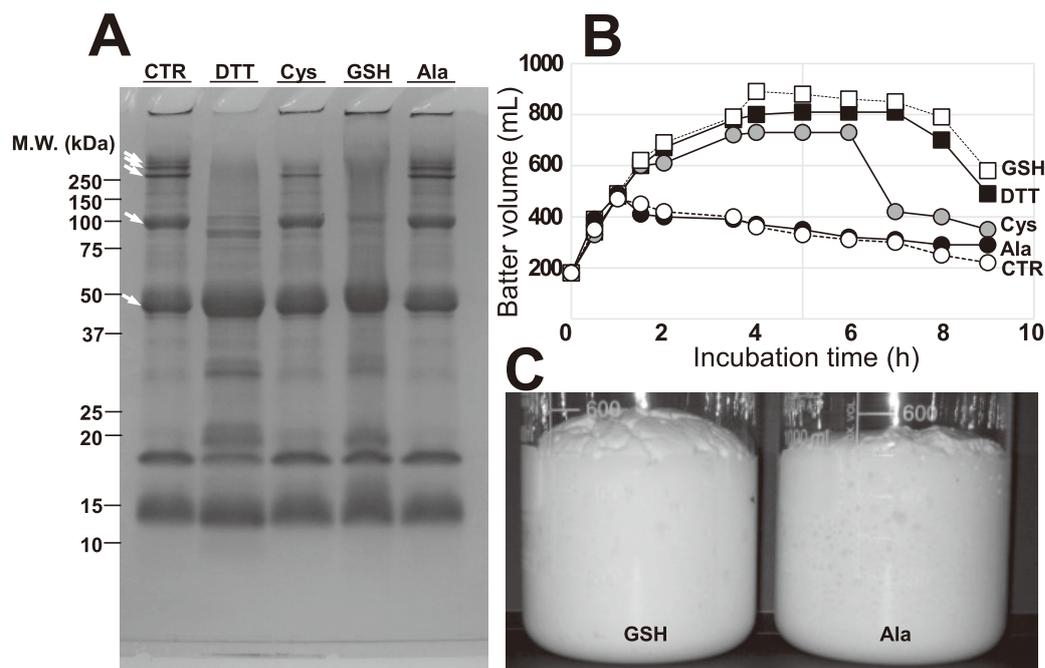


Fig. 1 Gas retention properties of gluten-free rice batter.

A, Profiles of the sodium dodecyl sulfate (SDS)-soluble protein in rice batter. B, Time course of the batter volume during fermentation. C, A close-up view of the glutathione-supplemented (left) and alanine-supplemented batter (right) after the first 1 hour of fermentation. Arrows: glutelin polymers. CTR: control rice batter (no additives); DTT, Cys, GSH, and Ala represent the types of batter to which dithiothreitol, cysteine, glutathione, or alanine was added, respectively. The batter was composed of rice flour (160 g), water (140 g), bakers' yeast (2.5 g), sugar (15 g), and one of the additives. The amount of cysteine, glutathione, and alanine that we added to batter was 1.3 mmol. In the case of dithiothreitol, the amount was 0.65 mmol because it has 2 SH groups in one molecule. After mixing the batter for 20 min, we transferred 200 g of the batter to a 1-L beaker for the fermentation test.

of glutelin polymers and concurrent upregulation of the monomer. Thus, the disulfide bond-mediated links among rice and sorghum proteins seemingly did not form even in the presence of glutathione. GSSG simply cleaved the intermolecular disulfide bonds of some glutelin polymers into monomers as shown in Fig. 1. These results support the theory (Yano and Fukui 2015) that swelling of batter is partially due to a physical effect, i.e., the "effect of mixing" of different types of flour as reported previously (Sanchez et al. 2002; Sciarini et al. 2010). GSSG made the crumbs of the rice/sorghum bread finer by facilitating confinement of the fermentation gas in small bubbles as mentioned in the previous section. These results confirm the complete difference in the swelling mechanism between wheat dough and rice batter.

Allergenicity of the batter/bread

Previously, we developed a formula for gluten-free

rice bread that involves yeast extract containing a high concentration of GSSG (18% w/w) (Yano and Fukui 2015). This is a feasible formulation because all the ingredients—rice/sorghum flour, yeast extract, dry yeast, butter, sugar, salt, and water—are foodstuffs. Accordingly, research in collaboration with bread makers for possible industrial production of the bread for patients with wheat allergy is currently in progress. In some cases, however, allergenicity of food proteins increases during the manufacturing process (Mills et al. 2009). Thus, to evaluate allergenicity of the bread of the new formula, a quantitative ELISA (Okayama et al. 2011) was performed on the serum from dogs with wheat allergy.

Allergenicity of wheat flour, rice/sorghum flour, wheat bread, and rice/sorghum bread was analyzed using pooled serum from three dogs allergic to wheat. The differences between this pooled serum and that from nonallergic dogs are shown in Fig. 3. Wheat flour and wheat breads showed

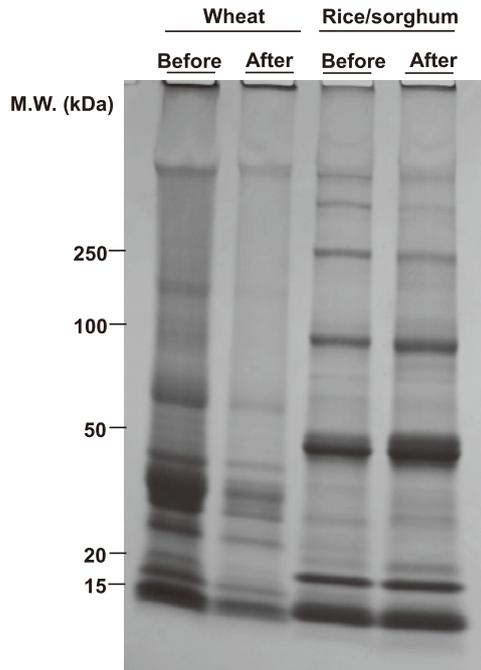


Fig. 2 The profile of sodium dodecyl sulfate (SDS)-soluble proteins before and after kneading/mixing of wheat dough/rice batter.

The rice/sorghum batter was made in the following proportions: rice flour (130 g), sorghum flour (30 g), water (140 g), and purified oxidized glutathione (1.0 g). Purified glutathione was absent in the sample in lane 3. Wheat dough was made in the following proportions: wheat flour (140 g), water (90 g), and salt (2.0 g). Before and after mixing/kneading of the batter/dough, 1.0 g of each sample was mixed with 10 mL of reductant-free Laemmli sample buffer. After centrifugation for 10 min at $10,000 \times g$, 10 μL of the supernatant was loaded into each well.

greater fluorescence as compared to rice/sorghum flour and bread when the protein concentration was 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or higher. Moreover, there was no significant difference between rice/sorghum flour and bread. Thus, our results suggest that rice/sorghum bread with glutathione-rich yeast extract is less allergenic to dogs with wheat allergy. Besides, the allergenicity did not increase during the bread making process: there was no significant difference in allergenicity between the flour and bread. This preliminary study suggested that the glutathione-rice bread is safe for patients with wheat allergy.

A high degree of similarity has been reported between the amino acid sequence of the allergenic peptide of wheat and that of a yeast protein (Rasmussen 1994; Watanabe et al. 1995). Another report mentions that patients with wheat-associated allergy are so sensitive to bakers' yeast (Watanabe et al. 1994). Nevertheless, there is accumulating evidence that gluten-free breads that are fermented with commercially available bakers' yeast are generally safe for patients with wheat allergy. Additionally, in the present study, the pooled serum from dogs allergic to wheat did not react with glutathione rice/sorghum bread fermented with bakers' yeast. Although further confirmatory studies are needed, the use of commercially available bakers' yeast for production of breads for patients with wheat allergy seems to be safe.

In conclusion, empirical data from the previous studies and from the present one suggest that glutathione can change physical properties of food without increasing allergenicity.

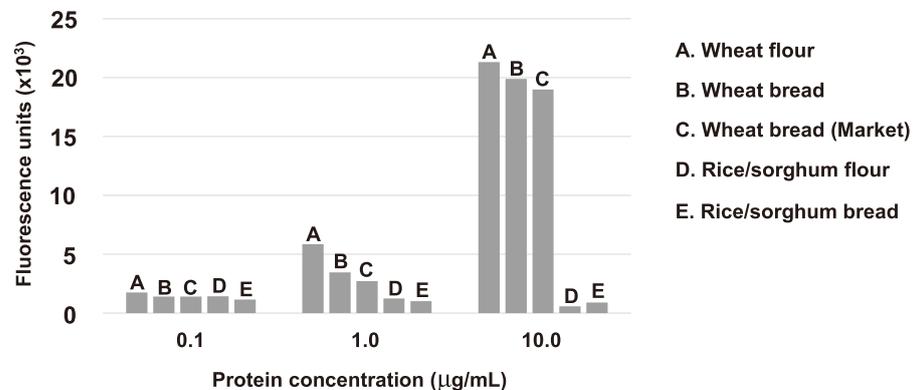


Fig. 3 Comparison of fluorescence intensity obtained by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) among wheat bread, rice bread, and the various types of ingredient flour.

Accordingly, this compound is considered useful for the food industry (Yano 2014).

Acknowledgments

We thank Professor Bob B. Buchanan, University of California, for his helpful discussions and encouragement. The allergenicity tests were carried out with the help of Animal Allergy Clinical Laboratories Inc. (Kanagawa, Japan). This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (# 25450193 to H. Y.).

References

- 1) Green PH, Cellier C. 2007. Celiac Disease. *New Engl. J. Med.* 357:1731-43.
- 2) Lamacchia C, Camarca A, Picascia S, Di Luccia A, Gianfrani C. 2014. Cereal-based gluten-free food: how to reconcile nutritional and technological properties of wheat proteins with safety for celiac disease patients. *Nutrients* 6:575-90.
- 3) Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- 4) Mansueto P, Seidita A, D'Alcamo A, Carroccio A. 2014. Non-celiac gluten sensitivity: literature review. *J American College Nutr* 33:39-54.
- 5) Mills ENC, Sancho AI, Rigby NM, Jenkins JA, Mackie AR. 2009. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 53:963-9.
- 6) Okayama T, Matsuno Y, Yasuda N, Tsukui T, Suzuta Y, Koyanagi M, Sakaguchi M, Ishii Y, Olivry T, Masuda K. 2011. Establishment of a quantitative ELISA for the measurement of allergen-specific IgE in dogs using anti-IgE antibody cross-reactive to mouse and dog IgE. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 139:99-106.
- 7) Rasmussen SW. 1994. XI. Yeast sequencing reports. Sequence of a 28.6 kb region of yeast chromosome XI includes the *FBA1* and *TOA2* genes, an open reading frame (ORF) similar to a translationally controlled tumour protein, one ORF containing motifs also found in plant storage proteins and 13 ORFs with weak or no homology to known proteins. *Yeast* 10:S63-S68.
- 8) Sanchez HD, Osella CA, de la Torre MA. 2002. Optimization of gluten-free bread prepared from corn starch, rice flour and cassava starch. *J Food Sci* 67:416-9.
- 9) Sciarini LS, Ribotta PD, León AE, Pérez GT. 2010. Influence of gluten-free flours and their mixtures on batter properties and bread quality. *Food Bioprocess Technol* 3:577-85.
- 10) Watanabe M, Ikezawa Z, Arai S. 1994. Fabrication and quality evaluation of hypoallergenic wheat products. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:2061-5.
- 11) Watanabe M, Tanabe S, Suzuki T, Ikezawa Z, Arai S. 1995. Primary structure of an allergenic peptide occurring in the chymotryptic hydrolysate of gluten. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:1596-7.
- 12) Yano H, Wong JH, Lee YM, Cho MJ, Buchanan BB. 2001. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 98:4794-9.
- 13) Yano H. 2010. Improvements in the bread-making quality of gluten-free rice batter by glutathione. *J Agri Food Chem* 58:7949-54.
- 14) Yano H. 2012. Comparison of oxidized and reduced glutathione in the breadmaking qualities of rice batter. *J Food Sci* 77:C182-8.
- 15) Yano H, Kaji N, Tokuriki M. 2013. Further studies on the protein chemistry and property of glutathione-added rice bread: Evidence of glutathionylation of batter protein as well as crumb structure/sensory evaluation. *Japan Agricultural Research Quarterly* 47:417-21.
- 16) Yano H. 2014. Ongoing applicative studies of plant thioredoxins. *Mol Plant* 7:4-13.
- 17) Yano H and Fukui A. 2015. Effect of sorghum flour on glutathione-rice bread. *Rep. Natl Food Res. Inst. No.* 79:9-17.

報 文

麹菌 *Aspergillus oryzae* の形態関連遺伝子の解析

服部 領太¹, 楠本 憲一¹, 柏木 豊², 鈴木 聡^{1*}

¹ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

² 東京農業大学

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

The analysis of morphogenetic gene of *Aspergillus oryzae*

Ryota Hattori¹, Ken-Ichi Kusumoto¹, Yutaka Kashiwagi², Satoshi Suzuki^{1*}

¹ Applied Microbiology Division, National Food Research Institute, NARO

2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642 Japan

² Tokyo University of Agriculture

1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-Ku, Tokyo 156-8502 Japan

Abstract

Filamentous fungus *Aspergillus oryzae* is used widely for the Japanese fermentation industry. Its ability of conidial production is important. However, mechanism of conidiation in *A. oryzae* remain to be elucidated. We constructed gene trap vector and carried out restriction enzyme mediated integration. We isolated 6 transformants that exhibit conidiation defect phenotype and recovered flanking genome region of plasmid integration site by plasmid rescue. One of them, strain 391, has the flanking genome region, which has high homology of glutaminase in *Neurospora crassa*. We supposed that the gene is involved in conidiation and tried to analysis the function.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, 分生子

* 連絡先 (Corresponding author), satosuzu@affrc.go.jp

緒 言

Aspergillus oryzae は日本醸造学会により我が国の国菌と認定された有用糸状菌である。糖質やタンパク質等を加水分解する酵素群の生産能が高いという特性を持つため、古来より味噌、醤油などの伝統的発酵食品の製造に麹菌として利用されている。麹菌培養のスターターとしては無性胞子である分生子が利用されており、初発接種分生子量を十分に確保することは麹づくりにおいて重要である。接種する分生子量が不足した場合、十分な菌体量を得ることが出来ない、いわゆる「はぜ落ち」の状態となり、その後の醸造工程に必要な酵素力価を得ることが出来ない。分生子を多量に得るための様々な技術的な知見が蓄積されているが¹⁾、その裏づけとなる麹菌分生子形成のメカニズムの解明はなされていない。

近縁のモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の研究で、分生子形成の制御に関わる分子機構が詳細に明らかにされている²⁾³⁾。分生子形成の主な制御因子 BrlA は、下流の転写因子 AbaA の転写を調節し、AbaA はさらに下流の転写因子 WetA の転写を調節する。これらの一連の転写因子の部位・時期特異的制御により順次分生子関連遺伝子の発現を制御していく分生子形成主制御経路が提唱されている⁴⁾。これら、BrlA を中心とする主制御経路とその上流の FluG 及び複数の Flbs 制御タンパク質による BrlA の制御系^{2)~4)}、また、それとは別に三量体 G タンパク質 FadA (G α)、SfaD (G β)、GpgA (G γ) による栄養成長と生殖との切り替え機構^{2)~4)} のように *A. nidulans* において解明された領域は、*A. oryzae* においても大枠で同様の制御機構が保存されており、個々の制御タンパク質の機能については、*A. nidulans* と *A. oryzae* の間に若干の差異がある場合があることが小川らによって明らかにされた⁵⁾。一方で、光、乾燥（水分あるいは浸透圧ストレス）、酸素分圧等の環境因子により *A. nidulans* の分生子形成が誘導されることが知られているが、それらの環境因子から BrlA に至る信号伝達経路は完全に解明されていない²⁾。長い遺伝学の歴史の中で多くの分生子形成異常変異株とその原因遺伝子座の知見の蓄積がある *A. nidulans* に対し、有性生殖環が未発見の *A. oryzae* では変異形質と原因遺伝子を結びつける研究はほぼ不可能であった。ゲノム情報や網羅的遺伝子発現情報を利用できるようになった現在でも、*A. oryzae* 独自の知見を得ることは依然として困難である。

高等植物のモデル生物であるシロイヌナズナでは、

T-DNA によるタグラインが分譲機関に寄託され、研究目的の利用を前提に共有されることで、多くの変異株の原因遺伝子やその機能が明らかにされてきた。タグリングによる変異株の作出は既に古典的手法となったが、*A. oryzae* のように遺伝学的解析の困難な生物の研究においては、現代でも有用な方法となりうる。筆者らはプラスミドタグリングによる変異株の作出と変異遺伝子の同定、当該遺伝子プロモーターの発現解析を同時に行うことができる実験手法として緑色蛍光タンパク質 GFP を用いたジーントラップベクター pPTREGFP1 を開発し、*Aspergillus* 属では新規の尿素トランスポータータンパク質を発見した⁶⁾。本研究では pPTREGFP1 を改良したジーントラップベクター pPTREGFP2 を用いたプラスミドタグリングにより、分生子形成に異常のある変異株を作出し、原因遺伝子候補の解析を行ったので報告する。

実験材料および方法

菌株、培地及び培養条件

供試菌株として *Aspergillus oryzae* RIB40 (NFR1599) 株を使用した。培地は、ツァベック・ドックス (CD) 寒天培地 (1% (w/v) D-glucose, 0.6% (w/v) NaNO₃, 0.1% (w/v) KH₂PO₄, 0.1% (v/v) trace element solution, 0.05% (w/v) KCl, 2% (w/v) Agar, 2 mM MgSO₄)、及びポテトデキストロースアガー (PDA) (Difco) を用いた。trace element solution の組成は 0.1% (w/v) FeSO₄ · 7H₂O, 0.88% (w/v) ZnSO₄ · 7H₂O, 0.04% (w/v) CuSO₄ · 5H₂O, 0.01% (w/v) Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 0.005% (w/v) (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O である。また、固体培養として米麹での培養を次のような設定で行った。アルファ化米 (徳島製麹) を 10 g, 9 cm 硝子シャーレに一層に敷き詰め 10 ml 蒸留水を添加してオートクレーブしたものに、分生子液を滴下し、4-7 日間十分に分生子を着生させた。培養はすべて 30℃ 培養室で行った。プラスミド増幅には *Escherichia coli* DH5 α (TOYOBO), XL-10Gold (Stratagene) を用いた。非メチル化プラスミドの増幅には *E. coli* SUS110 を用いた。タンパク質発現には *E. coli* Rosetta-gami (Merck) および *Pichia pastoris* (Invitrogen) を用いた。

一般的核酸取り扱い

ゲノム DNA の抽出は DNeasy Plant キット (QIAGEN)、プラスミド DNA の抽出は QIAprep Spin Miniprep キット (QIAGEN) を用いて添付マニュアル

に従って行った。

サザンブロット, ノーザンブロット, DNA シーケンス, DNA 制限酵素処理, DNA ライゲーション反応, 大腸菌形質転換は一般的な定法に従って行った。サザンブロット及びノーザンブロット用プローブDNAの作成はPCR DIG ラベリングキット (Roche) にて添付マニュアルに従って行った。ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) はKODポリメラーゼ (TOYOBO) を用いて添付マニュアルに従って行った。

ベクター構築

ジーントラップベクター pPTREGFP1 を *Pst*I で切断しアルカリフォスファターゼ処理をした。合成オリゴDNA, MCS5 (AACTGCAGGATCCGCGCAGATCTGCAGAA), MCS3 (TTCTGCAGATCTGCGCGGATCTGCAGTT) をアニーリングさせたDNA断片を *Pst*I で切断し, ゲル切り出し精製したものを上記ベクターにライゲーションし, pPTREGFP2とした。

Pichia 発現系に用いるベクターは pPIC3.5 (Invitrogen) の *Sna*BI-*Avr*II サイトにグルタミナーゼ相同遺伝子 cDNA を *Pst*I (切断後平滑化) -*Spe*I 断片をクローニングして作成した。

大腸菌発現系に用いるベクターは pET-32b (+) (Novagen) の *Bam*HI-*Xho*I (切断後平滑化) サイトにグルタミナーゼ相同遺伝子 cDNA の *Bcl*II-*Spe*I (切断後平滑化) 断片をクローニングして作成した。

RNA抽出

液体培養からの RNA 抽出は RNeasy (QIAGEN) を用いて添付マニュアルに従って行った。米麹からの RNA 抽出は, 鈴木らの方法⁷⁾にて行った。

cDNA合成

total RNA からの mRNA 精製は PolyA pure (Ambion) を用いて添付マニュアルに従って行った。全長 cDNA 合成は FirstChoice® RLM-RACE キット (Ambion) を用いて添付マニュアルに従って行った。全長 cDNA は PCR の後 TOPOTA クローニングベクター (Invitrogen) にクローニングした。cDNA 配列は DDBJ に登録した。(dbj|AB164052.1)

過剰発現及びアンチセンスベクター

アルカリフォスファターゼ処理済 pGEMTEFP の *Nco*I-*Eco*RV サイト (切断後平滑化) にグルタミナーゼ相同遺伝子 cDNA の PCR 断片をポリヌクレオチドカイ

ネースにてリン酸化したものをライゲーションした。シーケンスを確認後, これを正方向, 逆方向に cDNA が挿入されたものを 1 クローンずつ選び, *Pst*I と *Not*I の二重消化により切り出した後, pPTRScTm の *Pst*I-*Not*I サイトにクローニングした。

制限酵素仲介型挿入変異株作成法 (restriction enzyme mediated integration, REMI 法)

REMI 法の際には *Bgl*II で直鎖化した pPTREGFP2 プラスミドと *Mbo*I 5U をプロトプラスト PEG 法により *A. oryzae* 細胞内に導入した。プロトプラスト PEG 法は五味らの方法⁹⁾に従って実施した。また, 選抜はピリチアミン耐性にてピリチアミン (TAKARA BIO) の製品添付マニュアルに従って行った。

プラスミドレスキュー

各株から定法に従ってゲノム DNA を抽出し, strain1 は制限酵素 *Avr*II 及び *Bst*BI, strain28 は *Bst*BI 及び *Hpa*I, strain56 は *Bst*BI 及び *Xho*I, strain391 は *Bst*BI 及び *Mlu*I, strain473 は *Bst*BI 及び *Xho*I, strain513 は *Aat*II 及び *Bst*BI にてゲノム DNA を切断し, 制限酵素を熱失活後エタノール沈殿にて精製した。各株 4 µg の切断済み DNA を 200 µl の反応系でセルフライゲーションの後, 大腸菌の形質転換を行った。得られた大腸菌クローンからプラスミドを回収し, ゲノム DNA 切断に用いた制限酵素で切断し, アガロースゲル電気泳動にて確認した。

その他の測定および解析

SDS ポリアクリルアミド電気泳動は Laemmli の方法により行った⁹⁾。グルタミナーゼ活性測定は, L-グルタミン酸測定キット (ヤマサ) を用いて添付マニュアルに従って行った。マイクロアレイ解析は株式会社ファームラボ (東京都江東区) に委託した。

実験結果及び考察

プラスミドタギング実験に用いるジーントラップベクター pPTREGFP2 を先に構築した pPTREGFP1 の改良により作出した。(図 1 A) pPTREGFP1 を用いた REMI 法においては制限酵素 *Pst*I を用いる必要があったが, 6 塩基認識の *Pst*I では理論上⁶⁾塩基対 (およそ 4 kb) につき 1 回の切断機会しかない。そのような頻度では平均 2 kb 程度の *A. oryzae* の ORF にあたる確率が低いため, 制限酵素によるゲノム DNA の切断プラスミ

ド挿入箇所をより、なんらかの意味ある配列上に得る確率を上昇させるため4塩基認識のMboIを利用できるようにプラスミドを改良した。そこでpPTREGFP1のPstI切断部位近傍にMboI切断部位を内包するBgIII切断部位を追加しpPTREGFP2とした。(図1B)本ベクターを用いたREMI法による*A. oryzae*の形質転換では、あらかじめBgIIIにて直鎖状とした本ベクターと制限酵素MboIを同時に*A. oryzae*細胞内に導入する。MboIはdamメチレースによるメチル化DNAを切断できないため、DH5 α 等、damメチレース+の一般的な大腸菌宿主を用いて増幅されたプラスミド内の認識配列を切断することは出来ない。一方で、*A. oryzae*核内に導入されたMboIはdamメチレースを持たない真核生物ゲノムDNAを認識配列で切断し、5'突出末端GATCを生じる。そこへBgIIIによる直鎖化により5'突出末端GATCをもつ本ベクターが接近し、*A. oryzae*のDNA修復系により二重鎖の修復が行われることにより、本ベクターのゲノム内の無作為な位置への挿入が行われる。

pPTREGFP2を用いたREMI法による形質転換により、540株のピリチアミン耐性株を取得した。CD寒天培地培養による形態観察により、そのうち6株の分生子形成異常株 (strain1, strain28, strain56, strain391, strain473, strain513) を選抜した。(図2)540株のピリチアミン耐性株のうち、ジーントラップベクターの当初の目的である、プロモーターあるいはオープンリーディングフレームのトラップに成功し、緑色蛍光タンパク質を発現する株は皆無であった。また、CD寒天培地上にて、顕著な形態的な表現形を示す株は、上記6株の分生子形成異常株を除き見つからなかった。い

ずれも、野生株RIB40が分生子形成を行う培養4日目以降になってもコロニー色が白いままであった。実体顕微鏡観察によっても、分生子が見られないか、非常に少ないことが解った。そのため、これらの株が、タギングに成功した株であると判断し、各々のゲノムDNAをサザン解析に供した。サザン解析の結果、全株ともゲノム内一箇所に1コピーのプラスミドが挿入されていることが解った。(図3)そこで、これらの株のゲノムDNAに対してプラスミドを切断しない制限酵素での処理を行い、自己環状化によるプラスミドレスキューを試みた。

プラスミドレスキューにより、プラスミド挿入部位近傍のゲノムDNA断片を回収した。回収断片のシーケンスを調べたところ、strain28はコンティグSC111内の酵母のGCN2に相同性のある未知のプロテインキナーゼ様配列XM_001823030のORFに、strain56はコンティグSC011内の未知のモノオキシゲナーゼ様配列をコードするXM_001826222のORFに、strain391は前半がコンティグSC003内の未知のグルタミナーゼ様配列のORF、後半はSC009の非アノテーション領域に、strain473はSC003の非アノテーション領域に、strain513はSC113内の未知のモノカルボン酸トランスporter様配列をコードするXP_001824382.2のORFに、それぞれ合致した。strain1のプラスミドレスキューには失敗した。そこで、GCN2、モノオキシゲナーゼ、グルタミナーゼ、モノカルボン酸トランスporterの相同遺伝子の中から、醸造上重要な酵素であるグルタミナーゼに似た配列を持つ遺伝子を選び、以降の実験に供した。

グルタミナーゼ相同遺伝子を解析するため、まず発

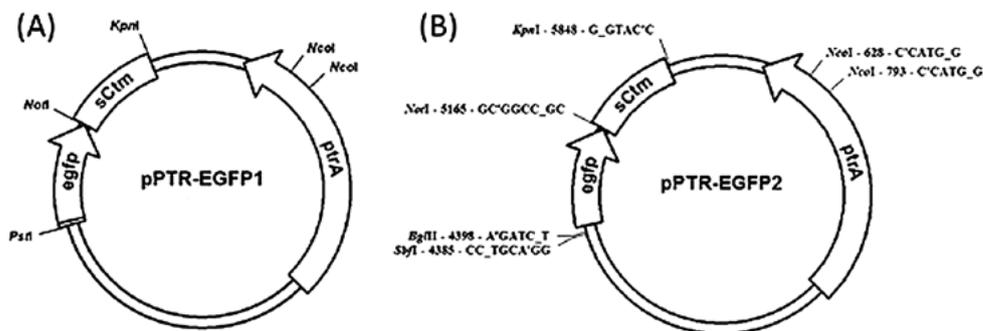


図1. ジーントラップベクター

(A): pPTREGFP1 (B): pPTREGFP2
 pptrA: ピリチアミン耐性マーカー
 egfp: 高感度緑色蛍光タンパク質コード領域
 sCtm: sC遺伝子ターミネーター

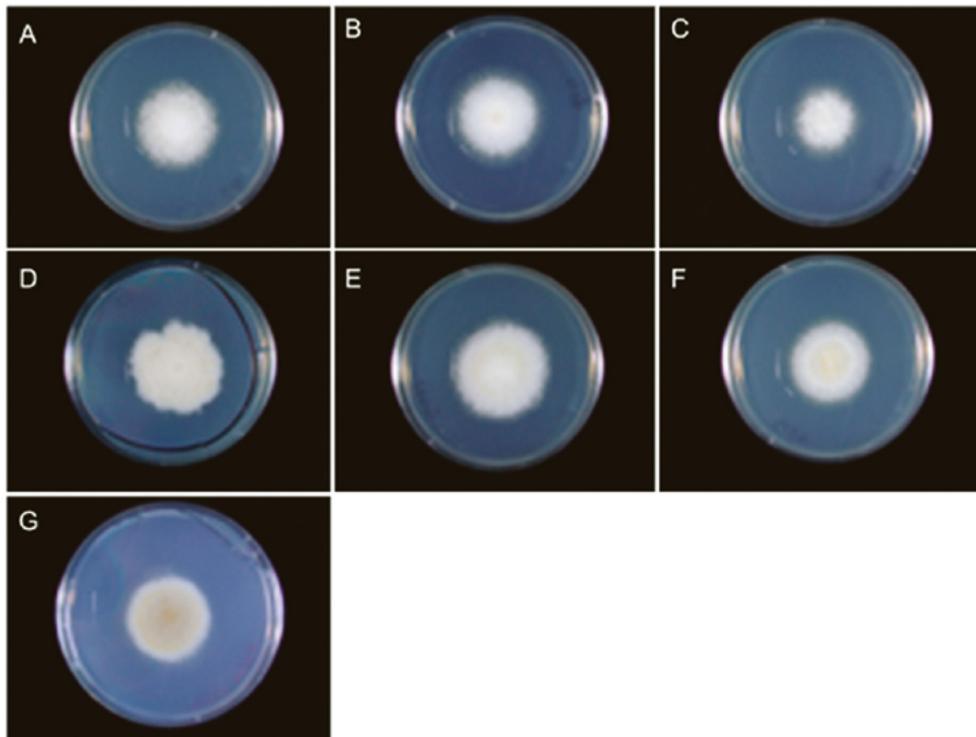


図 2. 形態変異株

A: strain 1, B: strain 28, C: strain 56, D: strain 391, E: strain 473, F: strain 513, G: RIB40 (Wild type)

現を調べた。液体培養，固体培養からそれぞれ抽出したtotal RNAに対して，strain391より回収したプラスミド近傍配列をプローブとしたノーザンブロット解析の結果，グルタミナーゼ相同遺伝子は液体培養ではほとんど発現せず，固体培養で発現が見られたが，発現量は対象とした*glaB*の発現と比べると非常にわずかであった。(図4)

mRNAを精製し，グルタミナーゼ相同遺伝子の全長cDNAを取得したところ，全長は2.7 kbであり，5つのイントロン配列に分断されたエキソンは6つ，予想アミノ酸配列835アミノ酸，予測分泌シグナル配列1から33番目アミノ酸であった。また，アミノ酸のアライメント解析では，*Neurospora crassa*のgi32404674と54%の相同性があった。既知の*A. nidulans*グルタミナーゼ，*A. oryzae*のglutaminaseA¹⁰⁾，タイで分離された麹菌のグルタミナーゼ¹¹⁾の保存領域に高い相同性が見られたが，それらには存在しないリンカー配列を持つ点で*N. crassa*のグルタミナーゼと最もよく似ていた。(図5)グルタミンは風味に影響しないピログルタミン酸へと酵素を介さない反応により変換されるために，グルタミナーゼの増加が醤油の風味改善に有効であるという報告がある¹²⁾。そのために麹菌のグルタミナーゼ

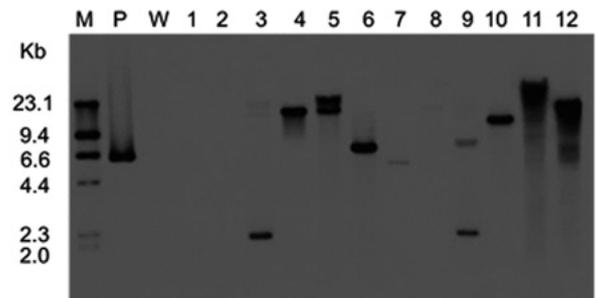


図 3. 変異株のサザンブロット解析

M: DNA サイズマーカー (λ /Hind III),
 P: pPTR-EGFP2 (1ng),
 W: RIB40 genome/ KpnI, 1: strain1 genome/ KpnI,
 2: strain1 genome/ XhoI, 3: strain28 genome/ KpnI,
 4: strain28 genome/ XhoI, 5: strain56 genome/ KpnI,
 6: strain56 genome/ XhoI, 7: strain391 genome/ KpnI,
 8: strain391 genome/ XhoI, 9: strain473 genome/ KpnI,
 10: strain473 genome/ XhoI, 11: strain513 genome/ KpnI,
 12: strain513 genome/ XhoI,

の研究はなされているが¹⁰⁾¹¹⁾，分生子形成に関する報告は特にない。グルタミン酸は分生子中に貯蔵される主要なアミノ酸としての報告があり，胞子発芽率が減

少した遺伝子改変株は含量が大きく低下したという報告はあるが¹³⁾、グルタミナーゼと分生子形成との関連は不明である。

市販メタノール資化性 *Pichia pastoris* タンパク質発

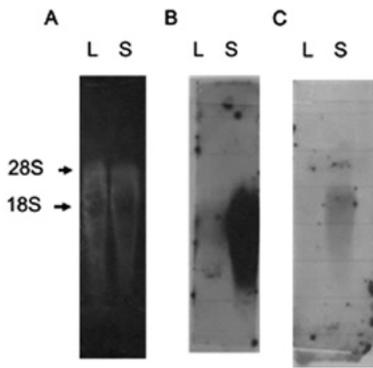


図4. グルタミナーゼ相同遺伝子発現

L 液体培養から抽出したRNA, S 米麹培養から抽出したRNA
 A: EtBr染色, B: *glaB* プローブ, C: strain391 rescue plasmid flanking region プローブ
 プローブはレスキュープラスミドの近傍配列部分をDIGラベルして用いた。

現系及び、大腸菌タンパク質発現系にてグルタミナーゼ相同遺伝子がコードするタンパク質を発現させたが、いずれもグルタミナーゼ活性は検出されなかった。そのため、当該タンパク質はグルタミナーゼではなく、別の活性を持つ酵素である可能性が考えられた。また、既知グルタミナーゼとのアミノ酸アライメントの解析により、既知グルタミナーゼには存在しないリンカー領域により、高度に保存された領域が分断されている事がわかったが、生育環境条件により、これらのリンカーが切り出されることによって酵素活性が生じるのかもしれない。また、C末側にEGFPを融合発現するGFP融合グルタミナーゼ様タンパク質発現株を作成したが、GFP蛍光は菌体内に観察された。*Pichia*による発現では当該タンパク質内在の分泌シグナルにより培養上清中への分泌発現が見られたため、*A.oryzae*でも、タンパク質本体は分泌発現されていると考えられるが、GFPを含むC末がプロセッシングを受けたことにより細胞内に残った可能性が考えられる。当該遺伝子過剰発現、アンチセンス発現、遺伝子破壊株の解析は、分生子形成異常に関わる形態変異の表現形を得ることができなかった。また、strain391と宿主株RIB40の遺伝子発現比較をマイクロアレイ解析により行ったが、分生子形成異常に関わる形態変異の

glutaminasehomolog	351	LSEHYVDLANAGTASDYSEQLAQAVQSGAYDWDIVALSARQMGATTFASITPENPIL	410
<i>N.crassa</i>	326	VRYHYNDFKTASLARNYSDSLARAFESGSESQDIAASARQMLGATQFSITPDDPII	385
<i>A.nidulans</i>	311	LDFHHDYKKSNSLSDLDRIADISVRAAGHDYLTITSLSIQAFATQLCFANDFYL	370
<i>A.o.ajinomoto</i>	313	LEFFHHDYAAAA SKLDLDRISKSDIDRAGQDYLTITSITVQVFAFVQLTSTPEDPYI	372
<i>A.o.thailand</i>	313	LEFFHHDYAAAA SKLDLDRISKSDIDRAGQDYLTITSITVQVFAFVQLTSTPEDPYI	372
glutaminasehomolog	411	FKEISSNGNFQITDVIFFPFPFLYTNPAHLAVLLEPLIEHMLSSQMPNKVYAHIOGTH	470
<i>N.crassa</i>	386	FKEISSNGNFQITDVIFFPFPFLYTNPKLGVLEPLIEHQLSSQMPNDVSYAHIOGTH	445
<i>A.nidulans</i>	371	FKEISSNGNINTDVIFFPFPFLYTNPAHLKYLLEPLIEQSSQVWNSVYAHIOGTH	430
<i>A.o.ajinomoto</i>	373	FKEISSNGNINTDVIFFPFPFLYTNPELLKLIKPIVEIQENQKVPNTVYAHIOGTH	432
<i>A.o.thailand</i>	373	FKEISSNGNINTDVIFFPFPFLYTNPELLKLIKPIVEIQENQKVPNTVYAHIOGTH	432
glutaminasehomolog	471	FPNATGHFDGNDVYIPVEECGNILIMGLAVVNSLRYSDSTARSVMSTRGTI-AQTSDKN	529
<i>N.crassa</i>	446	FPNATGHSDGNDVYIPVEECGNILIMGLALANAFRYDTEPAFVQAAAPHAVYNAISSAKD	505
<i>A.nidulans</i>	431	VPNATGHFDGNDVYIPVEECGNIVIMIALA-----Y-----AQ-KA-GD	466
<i>A.o.ajinomoto</i>	433	VPNATGHFKGDDEKIPVEECGNIVIMIALA-----Y-----AQ-KA-KD	468
<i>A.o.thailand</i>	433	VPNATGHFKGDDEKIPVEECGNIVIMIALA-----Y-----AQ-KA-KD	468
glutaminasehomolog	530	SGYFPLDNLQALGGIDKQDGRNGGGAQGEHLAEKIVQRSYKLITQITSVLVEFSLEFANQ	589
<i>N.crassa</i>	506	HS-RSVDRY-GFDLRGHRDRKTNLQTTGSKRAEKWLTASVSLIKQITGVLVRESLIPHNQ	563
<i>A.nidulans</i>	467	TAY--L-ESH-----VTTLRRITDVLIEDSLYFANQ	494
<i>A.o.ajinomoto</i>	469	NDY--L-SQH-----YFLLNKAITVLEDSIYFANQ	496
<i>A.o.thailand</i>	469	VQY--L-SQH-----YFLLNKAITVLEDSIYFANQ	496
glutaminasehomolog	590	XNVVSTDOFAGLAAQTNLALKGIIGIEMSKLAEVASHKANASYVKXDPLOTQIQNIFDT	649
<i>N.crassa</i>	564	---LCTDOFAGLAAQTNLALKGIIGIEMSEIADIVSHEDERAKHYR-----KIFAT	612
<i>A.nidulans</i>	495	---I-STDOFAGLAAQTNLALKGIIGIEMSVIASLIG-----DSDD-KMILTNVYHD	543
<i>A.o.ajinomoto</i>	497	---I-STDOFAGLAAQTNLALKGIIGIEMAVISNTIG-----HPDD-ASHSSIFAKD	545
<i>A.o.thailand</i>	497	---I-STDOFAGLAAQTNLALKGIIGIEMAVISNTIG-----HPDD-ASHSSIFAKD	545

図5. グルタミナーゼ相同遺伝子産物のアミノ酸アライメント解析 (上より、グルタミナーゼ相同遺伝子産物、*Neurospora crassa* グルタミナーゼ、*A. nidulans* グルタミナーゼ、*A. oryzae* グルタミナーゼA、タイで分離された *A. oryzae* グルタミナーゼ)

原因となる遺伝子の特定にはいたらなかった。

以上より, strain391の形態変異の原因及び, その候補遺伝子と仮定されたグルタミナーゼ相同遺伝子の機能は不明であった。

要約

*Aspergillus oryzae*はわが国の醸造産業に広く使用されている糸状菌であり, その分生子生産能は重要である。しかし, *A. oryzae*において, 分生子形成のメカニズムの解明はなされていない。

私たちは構築したジーントラップベクターを用いて制限酵素が介在するプラスミドの組込みを行った。6株の分生子形成異常株を取得し, プラスミドレスキューを行ったところ, strain391において, 対応する領域にある新規遺伝子は*Neurospora crassa*の持つグルタミナーゼに高い相同性を示していた。このタンパク質が分生子形成にかかわる可能性が示唆されたので, 機能解明を試みた。

文献

- 1) 楠本憲一, 古川育代, 鈴木聡, 柏木豊 麹菌の簡便かつ効率的な孢子形成能の強化法 食品総合研究所研究報告 **71**, 39-43 (2007)
- 2) Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Veluw, G.J., Wang, F., Müller, W.H., Dijksterhuis, J. and Wösten. H.A.B., Development in *Aspergillus*, *Studies in Mycology* **74**, 1-29 (2013)
- 3) Park, H.S. and Yu, J.H., Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol.* **15**, 669-77 (2012).
- 4) Adams T.H., Wieser J.K. and Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**, 35-54 (1998).
- 5) Ogawa, M., Tokuoka, M., Feng J. J., Takahashi, T., Koyama, Y., Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in koji-mold *Aspergillus oryzae* *Fungal Genetics and Biology*, **47**, 10-18 (2010).
- 6) Suzuki, S., Kusunoto, K-I. and Kashiwagi, Y., Construction of a gene trap vector, pPTR-EGFP1, for the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae* 食品総合研究所研究報告 **67**, 33-38 (2003)
- 7) 鈴木聡, 竹谷博子, 石田博樹, 楠本憲一, 柏木豊 アウリントリカルボン酸アンモニウムを用いた米麹からの麹菌全RNA抽出法の検討 食品総合研究所研究報告 **68**, 33-38 (2004)
- 8) Laemmli, UK., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685. (1970)
- 9) Iimura, Y., Gomi. K., Uzu, H., Hara, S., Transformation of *Aspergillus oryzae* through Plasmid-mediated Complementation of the Methionine-auxotrophic Mutation. *Agricultural and Biological Chemistry.* **51** 323-328. (1987)
- 10) Koibuchi K., Nagasaki H., Yuasa A., Kataoka J., Kitamoto K., Molecular cloning and characterization of a gene encoding glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **54**. 59-68. (2000)
- 11) Thammarongtham C., Turner G., Moir A.J., Tanticharoen M., Cheevadhanarak S. A new class of glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3**. 611-617. (2001)
- 12) Yano T., Ito M., Tomota K., Kumagai H. and Tochikura T. Purification and properties of glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.* **66**. 137-143. (1988)
- 13) 坂本和俊, 麹菌孢子 of 耐久性にかかわる遺伝子の発現制御機構について, 醸協, **105**, 762-769 (2010) .

研究ノート

官能評価による加熱植物油の簡便な風味のプロファイリング

早川 文代^{1*}, 風見 由香利¹, 神保 聡子², 浦田 貴之²

¹ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

² ボーソー油脂株式会社

Rapid flavor profiling of heated vegetable oils by sensory evaluation

Fumiyo HAYAKAWA^{1*}, Yukari KAZAMI¹, Satoko Jimbo² and Takashi URATA²

¹ National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

² Boso oil and fat Co.,Ltd., 2-17-1 Hinode, Funabashi, Chiba 273-0015, Japan

Abstract

Flavor profiles of heated vegetable oils (canola, palm olein, soybean, rice bran and corn oils) were rapidly determined. Eleven selected assessors were asked to describe flavor of each sample oil by selecting perceived flavor terms out of the 35 candidate terms. The data was submitted to correspondence analysis and the flavor map of sample oils was obtained, showing the characteristics of each oil flavor, e.g. rice bran oil had sweet aroma. This profiling method can be applicable to other products and will help researchers/technologists to conduct sensory evaluation easily and rapidly by reducing panel training for scoring.

Keywords: vegetable oil (植物油), sensory evaluation (官能評価), flavor (風味)

緒言

さまざまな食品や料理において、油脂の独特の風味は、消費者の受容性に影響する重要な要素の一つである。油脂が含まれる食品や、油脂を用いた調理において、油脂の風味がどの程度強いのか、また、その風味が

どのような質のものであるかは、品質を設計あるいは制御する上で考慮すべき重要な点である。そのため、さまざまな製品において、油脂の風味の質と強度およびその好ましさを官能評価によって客観的に示した報告は多くある。最終製品や料理の受容性を調べるだけでなく、油脂そのものの風味の特徴を数値化する試みもなされている。例えば、LeveauxとResurreccion¹⁾は

* 連絡先 (Corresponding author), fumiyooha@affrc.go.jp

ピーナッツ油や綿実油などの官能特性のプロファイリングを試みているし、Wangら²⁾は精製度の低い大豆油の品質を官能評価でも調べている。また、日本調理科学会近畿支部揚げる・炒める分科会³⁾は、揚げ油の劣化の判定は揚げ種ではなく揚げ油の官能評価の方がよいと結論づけている。米国油化学協会 (American Oil Chemists Society, 以下 AOCS) が推奨している植物油の風味の官能評価法⁴⁾もある。

油脂の官能評価においては、パネルの訓練および評価項目の設定に留意すべき点がある。通常の食生活では油脂を単独で味わうことはないので、他の食品試料に比べて、油脂に特化したパネリストの訓練の必要性が高くなる。しかも、油脂単独では不快な風味を呈することが多いため、パネリストの負担が大きい。また、試料油脂の個々の風味特性がそれぞれの試料に固有である場合も多く、“青臭い”や“魚の風味”等、複数の項目の強度を評価しても、多くの項目で、特定の試料以外は0か0に近い値になり、個々の項目の強度に意味がなくなる可能性が考えられる。実際、AOCSが提案している標準法⁴⁾においても、個々の特性の強度評価ではなく風味全体の強度評価と12項目の風味の有無をチェックするのみにとどまっている。しかし、AOCSが推奨している12項目のみでは種々の植物油の風味の特徴を示すことは難しいと考えられる。

前報⁵⁾において、著者らは、原料の異なる植物油5種 (なたね油、パームオレイン、大豆油、こめ油、とうもろこし油) を試料とし、新鮮な未加熱の状態で、風味の簡易プロファイリングに成功した。具体的には、まず、油脂の風味を構成する個々の特性について候補用語リストを作成し、そのリストから試料に感じられる特性を選択するという多肢選択法によって定性的な官能評価を行い、データにコレスポネンス分析を適用して試料油と特性との関係を示すマップを作製した。なお、コレスポネンス分析は、主成分分析のようにデータを解釈しやすい次元を減らして新しい因子を抽出し、対象物や変数の関係を探る統計手法である。得られたマップから、試料油の風味の特徴を俯瞰することができた。

本研究では、前報⁵⁾で開発した未加熱の植物油の簡易プロファイリング法が、加熱した植物油に適用できるかどうかを確認し、さらに、簡易プロファイリングの成果物として、原料の異なる5種の加熱植物油の風味の特徴を示すマップを得ることを目的とした。

なお、「風味」は、JIS Z8144⁶⁾で「食品を口内に入れたときの味覚、嗅覚などの総合的感覚」と定義され

ている。油脂の風味はその大部分が嗅覚によって知覚されていると考えられるが、口腔内で知覚される油脂の味に関する近年の知見⁷⁾もあることから、本研究では味覚と嗅覚を分離せず、油脂の風味とした。

実験方法

1. 材料

実験で用いる油には、国内消費量の上位5種類である、なたね油、パーム油、大豆油、こめ油、とうもろこし油を用い、パーム油についてはパームオレインを用いた。油脂の名称の表記は日本農林規格¹⁾に準じた。いずれも市販もされている業務用の製品と同等のもので、なたね油、大豆油、こめ油、とうもろこし油については日本農林規格¹⁾のサラダ油の基準を満たし、パームオレインは同規格の食用パームオレインの基準を満たしていた。

2. 試料油の調製

5種の材料油は、いずれも、製造後1か月以内に加熱して試料油とした。加熱処理はヒーティングブロックにて、180℃で120分間加熱した。加熱終了後、室温にて放冷し、24 mlの褐色瓶に約15 ml入れ、ヘッドスペースを窒素置換して密封した。試料油は暗所、常温で保存し、試料調製後2週間以内、容器を開けた後4時間以内に分析および官能評価に供した。

なお、パームオレインは上昇融点が10~20℃であり、保存中に一部が固体となる場合が考えられた。そこで、官能評価に用いる試料油は、いずれも、60℃のインキュベーターで45分間加温し、その後、24℃の室温で30分間放冷して室温に戻してから供した。

3. 試料油の性状

材料として用いた5種の油の脂肪酸組成、材料とした油および加熱した試料油の過酸化価、酸価およびカルボニル価の測定を基準油脂分析試験法⁸⁾に準じて行った。また、極性化合物量はデジタル極性化合物量測定器 (株) テストー社製 testo270) で測定した。なお、極性化合物量は3回測定した平均値とした。

4. 風味用語リストの作成

5種の試料油に関する文献¹⁾⁴⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾から評価用語を抽出し、さらに試料油に対する自由記述による予備評価によって、油の風味の質を表現する評価用語 (以下、風味用語) のリストを作成した。得られた風味用

語は50音順に評価用紙に列挙した。

5. パネル

農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所（以下、農研機構食品総合研究所）の近隣住民から募集し、ISO8586¹²⁾を参考にして選抜、訓練し、数か月から数年の官能評価経験をもつ11名をパネルとした。パネリストにはインフォームドコンセントを行い、評価参加の承諾を得た。一連の実験は、農研機構食品総合研究所の疫学研究倫理審査委員会の承認を経て実施した。

6. 官能評価の手順

試料油0.3 gを3桁のランダムコードを付したプラスチック製のスプーンに入れ、5種1組とし、1枚のトレイに横に並べて提示した。並べ方は、パネリストごとにランダム化した。試料を左から順に味わい、各試料油について、感じられた風味にチェックをいれるよう指示した。1つの試料油に、風味用語が列挙してある評価用紙を1枚提示した。5種の油を全て味わった後は、必要であれば、試料を追加して提示することとした。口直しに食パンと水を用意し、試料油が変わるときには必ず、続けて同じ試料油を味わうときは必要に応じて口直しをするように指示した。

7. 統計解析

油の種類と風味用語についてクロス集計を行い、コレスポンデンス分析を適用した。コレスポンデンス分

析にはSPSS Statistics 22（日本IBM）を用いた。

実験結果および考察

1. 試料油の性状

材料として用いた5種の油の脂肪酸組成を表1に示す。いずれの油もパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸が主要な脂肪酸であった。なたね油および大豆油はリノレン酸が特徴的で、パームオレインは飽和脂肪酸（パルミチン酸およびステアリン酸）が多かった。

試料油の性状を表2に示す。油脂の劣化度を評価する方法として、一般的に用いられる指標が過酸化価値である。しかし、過酸化価値で示される過酸化脂質は、熱で分解されやすく、蓄積されないことが知られている。本研究においても、最も高いパーム油でも2.0程度であった。酸価も、油脂の劣化を評価する一般的な指標であるが、いずれの油においても、加熱による上昇はみられたものの、上昇の程度は大きくなく、加熱による遊離脂肪酸量の生成量は少ないことが示された。

カルボニル価は、酸化二次生成物であるアルデヒドやケトンといったカルボニル化合物量を示す。これらのカルボニル化合物は油脂のにおいに影響することが知られている。いずれの試料油も、加熱前に比べてカルボニル価は上昇しており、酸化二次生成物の増加が示された。すなわち、加熱によって油の風味が変化していることが確認された。

極性化合物量は、ステロールやトコフェノール含量

表1. 5種の植物油の脂肪酸組成

脂肪酸	なたね油	パーム オレイン	大豆油	こめ油	とうもろ こし油
ラウリン酸 (12:0)	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
ミリスチン酸 (14:0)	0.0	0.9	0.0	0.3	0.0
パルミチン酸 (16:0)	4.1	40.5	10.2	16.9	10.8
パルミトレイン酸 (16:1)	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1
ステアリン酸 (18:0)	1.8	4.1	4.0	1.8	1.8
オレイン酸 (18:1)	64.4	42.9	26.1	43.6	31.7
リノール酸 (18:2)	18.8	10.6	52.1	34.3	53.4
リノレン酸 (18:3)	8.6	0.1	6.5	1.1	1.3
アラキジン酸 (20:0)	0.6	0.3	0.4	0.7	0.4
エイコセン酸 (20:1)	1.2	0.2	0.3	0.5	0.3
ベヘニン酸 (22:0)	0.3	0.0	0.3	0.2	0.2
リゲノセリン酸 (24:0)	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0

総脂肪酸量に対する脂肪酸の割合 (%、w/w) を示した。

が多いとうもろこし油, こめ油や大豆油などで高かった. 極性化合物量は, 一般的にフライ油の劣化度評価として用いられ, モノグリセライド, ジグリセライド, 遊離脂肪酸の他に重合体などの量を示している. いずれの試料も加熱によって微増したことが確認された.

2. 風味用語リスト

AOCS⁴⁾の評価項目, 種々の原料の未加熱油の記述的な官能評価¹⁾の項目, および成書¹¹⁾の植物油の風味用語を収集したところ19語を得た. さらに, 5種の試料油についての自由記述による予備評価で16語を追加して, 35語の候補を得た(表3).

3. 試料油と風味用語のマップ

風味用語と5種の試料油に関して, 11人のパネリストの反応をクロス集計した. “メロンのにおい”および“もみがらのにおい”は出現頻度の合計が0であったため, 解析から除外した. また, “紙・段ボールのにおい”等の12語についても, 出現頻度の合計が1~3と極めて低かったため, 以下の解析から除外した. なお, 予備的な解析によって, これらの12語を含めて解析しても, 解析結果のおおよその構造は変わらず, 残りの用語の分離が悪くなるのみであることを確認した. 最終的に, 試料油5種, 用語21語の5行21列のデータ行列を用いてコレスポンデンス分析を行った.

結果を図1に示す. 用語および試料油に対するスコアを第1次元および第2次元の直交座標上に布置した. 第1次元および第2次元に対する固有値はそれぞれ0.572および0.274であり, この2次元でデータの約85%の情報を集約できた. 図1から, 試料間の親近性, 試料と用語の親近性が読み取れ, すなわち, 各試料油の風味の質の特徴を俯瞰することができる. 本研究で対象とした種類の異なる加熱油のように, 試料に共通して評価できる項目を設定しにくいような場合でも, 候補項目を列挙し, その風味を感じるか否かのデータを集計し, 解析することで, 試料の風味の質を特徴づ

けることができた.

図1より, 各試料油からは, 脂肪酸およびその分解物由来, 含まれる不ケン化物や極性化合物由来の風味が感じられたりしていることが示された. 例えば, なたね油は, 高度不飽和脂肪酸由来と考えられる“魚”の風味が感じられていた. 大豆油は, 構成脂肪酸がリノール酸およびリノレン酸であるトリグリセリドを多く含み, これらが加熱によって, 2,4-デカジエナールや2,4-ヘプタジエナールを生成し, いわゆる“天ぶら臭”を醸し出すことはよく知られている¹³⁾. 本研究においても, 大豆油は, “天ぶら・天かす”の近くに布置されていた. 大豆油およびなたね油は, 高度不飽和脂肪酸を多く含み, 加熱すると, 揚げ物らしい風味とともに, 加熱した油に特有の劣化臭も生成する¹⁴⁾. そのため, これらの油は“加熱劣化臭”の近くに布置された. さらに, リノレン酸は加熱によって胸焼け臭のもととなるアクロレインを生成するとの報告¹⁵⁾もある. 本研究においても, 大豆油およびなたね油は“胸焼け臭”の近くに布置された.

とうもろこし油は“コクがある”や“香ばしい”と

表3. 試料油の風味用語リスト

青い芝	香ばしい	ナッツ
青臭い(大豆臭)	鉱物*	苦味
揚げ餅	焦げた	ぬか・ふすま*
油揚げ	こくがある	粘土
甘い香り	ゴム*	バター*
甘味	魚	花*
えぐみ	酸化臭	古い油
加熱劣化臭	酸味	フルーティ
紙・段ボール*	塩味	ペンキ
枯草*	刺激がある	マーガリン
きのこ*	渋味	まろやか
きゅうり*	スポンジケーキ*	胸焼け臭
金属*	鉄	メロン*
クレヨン	天ぶら・天かす	もみがら*
ケミカル	とうもろこし*	

*出現頻度が極めて低かったため, 解析からは除外した.

表2. 試料油の性状

	なたね油		パームオレイン		大豆油		こめ油		とうもろこし油	
	加熱前	加熱後	加熱前	加熱後	加熱前	加熱後	加熱前	加熱後	加熱前	加熱後
過酸化物質	0.0	0.5	0.0	2.0	0.1	1.0	0.0	0.8	0.0	1.9
酸価	0.04	0.06	0.04	0.06	0.04	0.05	0.03	0.06	0.09	0.13
カルボニル価	2.4	4.8	2.5	5.7	3.3	6.7	5.5	7.0	5.1	7.8
極性化合物量(% w/w)	5.5	6.7	7.2	8.2	9.0	10.0	9.8	10.2	9.3	10.5

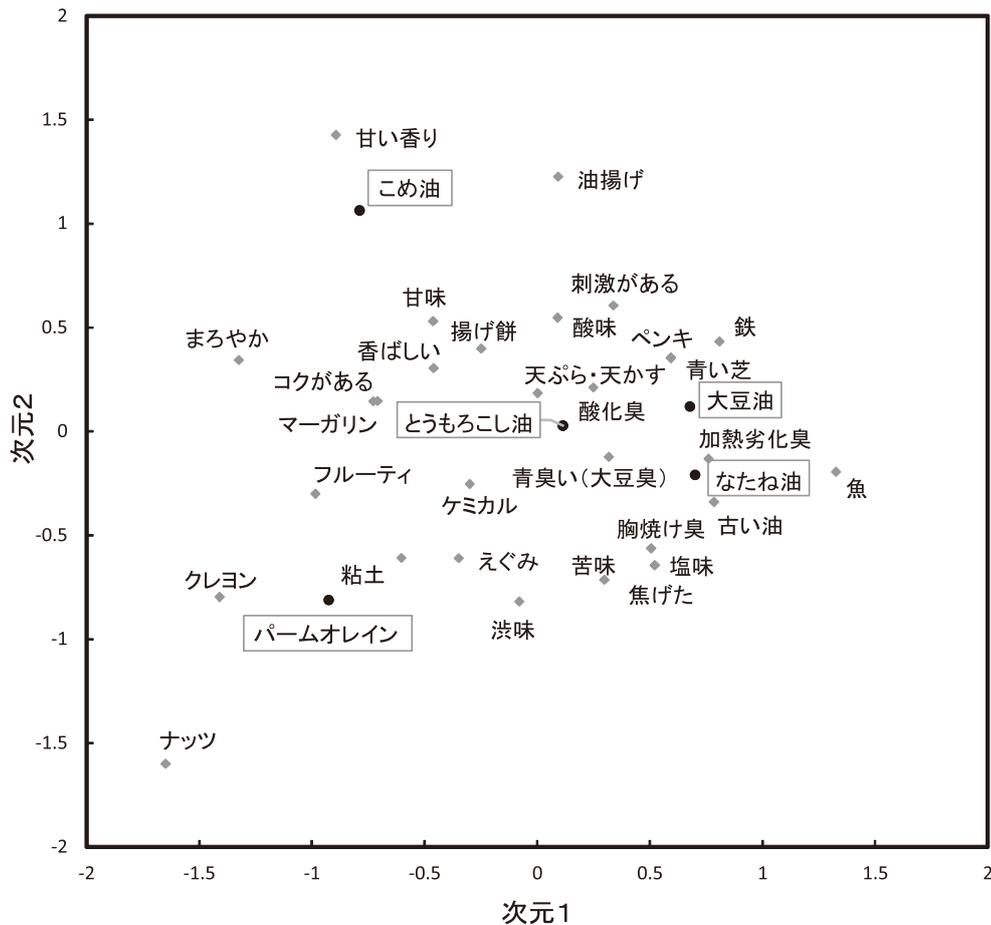


図1. 試料油の風味マップ

いった風味用語の近くに布置されていた。とうもろこし油は、こくが風味の特徴に挙げられる¹⁴⁾こともあり、本研究で作成したマップもそれを裏付けるものであった。“マーガリン”の近くに布置されたのは、とうもろこし油を原料としたマーガリンが製品として広く認知されていることが影響していると推察された。

こめ油は“甘い香り”や“まろやか”が風味を特徴づけていることが示された。こめ油の風味について、Ghosh¹⁶⁾は“delicate flavor (繊細なフレーバー)”，Liangら¹⁷⁾は“appealing flavor (魅力的なフレーバー)”と評している。これらは、研究者によって経験的に感じられた特性が表現されたものであるが、その具体的な要素は甘い香りやまろやかさである可能性が示唆された。また、こめ油中のオリザノールは加熱によってバニリンに変化するとの研究結果¹⁸⁾もあり、こめ油の甘い香りはバニリンが関与している可能性が考えられた。

パームオレインは、淡白な風味、あっさりした風味が特徴に挙げられている¹⁴⁾。本研究では、加熱によって生じる不快臭（“加熱劣化臭”，“胸やけ臭”等）とも、加熱特有の好ましい香気（“香ばしい”，“甘い香り”等）とも遠い位置にプロットされ、“ナッツ”や“クレヨン”等が特徴であることが示された。

本研究では、候補用語リストから感じられる風味用語を選択するという、パネリストにとっては負担が小さい方法で、簡便に、風味マップを作成した。これは、強度の評定を行わないため、パネリスト間で尺度を合わせる練習セッションがいらす、実験者にとっても負担が小さい方法である。また、得られたマップは、加熱した油の風味の特徴を一元的に把握することができるもので、用途や好みに応じた油の選択の際の有用な参照資料となると考えられる。油以外の試料でも、同様の方法での風味マッピングは可能であり、前報⁵⁾お

よび本研究で示した方法により、試料の官能特性を俯瞰するマップを簡便に作成できると考えられる。

要 約

前報で提案した、用語リスト作成および多肢選択法による官能評価という簡易法を、加熱した油の風味評価に適用した。試料油は、5種の植物油（なたね油、パーム油、大豆油、こめ油およびとうもろこし油）を180℃で120分間加熱したものとした。用語リストは、文献調査と予備評価によって作成し、35語で構成した。11人の分析型パネリストに、各試料油に感じられる特性を用語リストから選択させ、得られたデータにコレスポンデンス分析を適用した。その結果、例えばこめ油は甘い香り、大豆油は天ぷら臭、とうもろこし油は香ばしさが特徴的であるといった風味の特性を俯瞰することのできるマップが得られた。この方法は他アイテムでも適用可能な、実験者にとっても、パネリストにとっても、負担が小さい簡便なプロファイリング法であると考えている。

引用文献

- 1) Leveaux, V. D. and Resurreccion, A. V. A., Descriptive sensory profiling of freshly processed commercial peanut, cottonseed, canola and soybean oils. *J. Food Qual.*, **19**, 265-277 (1996).
- 2) Wang, X., Wang, T. and Johnson, L. A., Composition and sensory qualities of minimum-refined soybean oils. *JAOCs*, **79**, 1207-1214 (2002).
- 3) 日本調理科学会近畿支部揚げる・炒める分科会, フライ油の使用限界に関する研究(Ⅲ), 日本調理科学会誌, **31**, 214-219 (1998).
- 4) American Oil Chemists Society (AOCS), Flavor panel evaluation of vegetable oils, *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society*, sixth ed, AOCS, Cg2-83 (2009).
- 5) 早川文代, 風見由香利, 神保聡子, 浦田貴之, 官能評価による未加熱こめ油の風味のプロファイリング, 日本調理科学会誌, **47**, 333-340 (2014).
- 6) 日本規格協会, 官能評価分析－用語. JIS Z8144 (2004).
- 7) Tucker R. M., Mattes R. D. and Running C. A., Mechanisms and effects of “fat taste” in humans. *BioFactors*. **40**, 313-326 (2014).
- 8) 日本油化学会, 基準油脂分析試験法2013年版 (2013).
- 9) Prakash, M. Ravi, R. and Bhat, K. K., Effect of blending on sensory odor profile and physico-chemical properties of select vegetable oils. *J. Food Lipids.*, **8**, 163-177 (2001).
- 10) Warner, K. and Gupta, M., Frying quality and stability of low- and ultra-low-linolenic acid soybean oils. *JAOCs*, **80**, 275-280 (2003).
- 11) 戸谷洋一郎監修, 「油脂の特性と応用」, (幸書房, 東京), (2012).
- 12) International Organization for Standardization, Sensory analysis General guidance for the selection, training and monitoring of selected and expert assessors. ISO/DIS 8586 (2011).
- 13) 山下道大, 小山文裕, 大豆油, 「油脂の特性と応用」, 戸谷洋一郎監修, (幸書房, 東京), pp. 2-42 (2012).
- 14) 伊吹昌久, パーム油, 「油脂の特性と応用」, 戸谷洋一郎監修, (幸書房, 東京), pp. 176-205 (2012).
- 15) Endo, Y., Hayashi, C, Yamanaka, T., Takayose, K., Yamaoka, M., Tsuno, T., and Nakajima, S., Linolenic Acid as the main source of acrolein formed during heating of vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **90**, 959-964 (2013).
- 16) Ghosh, M., Review on recent trends in rice bran oil processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **84**, 315-324 (2007).
- 17) Liang, Y., Gao, Y., Lin, Q., Luo, F., Wu, W., Lu, Q. and Liu, Y., A review of the research progress on the bioactive ingredients and physiological activities of rice bran oil. *Eur. Food Res. Technol.*, **238**, 169-176 (2014).
- 18) 椿原靖規, 細川雅史, 宮下和夫, 生稲淳一, 根岸弘典, 米油の加熱におけるバニリン生成のメカニズムについて, 第44回日本油化学会講演要旨集, p. 90 (2005).

引用 URL

- i) 食用植物油の日本農林規格, 最終改正平成27年3月27日農林水産省告示第714号, http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_kikaku/pdf/kikaku_syokyu_150327.pdf (2015.10.15)

研究ノート

味噌汁の作り方の違いがフラン量低減に及ぼす影響

箭田 浩士*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Heating conditions effect the furan amounts in cooked miso soup.

Hiroshi Yada*

National Food Research Institute (NFRI), National Agriculture and Food Research Organization (NARO)
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

Furan is classified by the International Agency for Research on Cancer as a Group 2B carcinogen “possibly carcinogen to humans”. It is contained in many processed foods and cooked foods at low levels which are determined by the balance of degrees of vaporization and generation of furan during heating processes.

Three heating conditions were applied to miso soup cooking. The conditions without heating after miso addition were indicated the lower furan amounts than the condition of with heating upto 95°C after miso addition. All cooking were carried out using the pot for home without lid. Based on this result, the furan amounts in cooked miso soup are able to reduce without heating after miso addition.

Keywords: furan, heating condition, miso, miso soup

和 訳

多くの加工食品や加熱調理された料理に低濃度存在することが知られているフランは、国際がん研究機関においてヒトに対して発がん性がある化学物質に分類されている。フランは揮発性が高い反面、加熱により容易に生成することがあるため、加熱処理食品からの摂取量をより精確に見積もるためには、加熱調理過程での挙動を把握する必要がある。

本研究では、味噌を加えた後の加熱操作が異なる3つの条件で調理した味噌汁のフラン量を調べたところ、味噌を加えてから加熱しない条件では、味噌を加えてから加熱する条件に比べてフラン量が少ないことが明らかになった。家庭で使われる鍋で蓋を用いずに実施した試験の結果から、味噌の加え方によって味噌汁のフラン量を低減できることが明らかになった。

キーワード：フラン，加熱調理，味噌，味噌汁

* 連絡先 (Corresponding author), yada33@affrc.go.jp

緒 言

食品に含まれるフランの問題は、2004年にFDA（米国食品医薬品局）が缶詰や瓶詰等の加熱処理された食品にそれまで考えられていたよりも多くのフランが存在すると発表した¹⁾ことにより、広く知られるようになった。フランは分子式 C_4H_4O 、分子量68で、沸点が31.2℃の揮発性の高い芳香族化合物である。フランはHHS（米国保健社会福祉省）の発がん性物質のリストに記載されていて、IARC（国際がん研究機関）のリストでは「ヒトに対して発がん性を持つ可能性がある（2B）」に分類されている。日本においては、農林水産省が開示している「食品安全に関するリスクプロファイルシート」ⁱⁱ⁾や食品安全委員会が公表している「フランのファクトシート」ⁱⁱⁱ⁾により、フランの有害性や国内市販食品の汚染実態に関する情報が公開されている。

2004年のFDAの発表後、世界各国で食品中のフランについて調べられ、レトルト殺菌された食品以外にも比較的高濃度のフランを含む食品が存在すること、低濃度のフランはかなり広い範囲の食品に存在していること、家庭における加熱調理によってもフランが生成することなどが報告された¹⁾²⁾³⁾。日本においても、個別の食品や摂取量の実態について調べられており⁴⁾ⁱⁱ⁾筆者らはトータルダイエツトスタディを実施して、分析した17食品群から摂取するフラン量の7割を調味料及び香辛料類と嗜好飲料類の2群が占めていると推定した⁵⁾。フラン摂取に寄与の大きい調味料及び香辛料類の中で、日本を代表する調味料であり加熱調理に用いられることの多い味噌に注目して、家庭調理に準じた条件で味噌汁中のフランの挙動を調べ、100℃以下の加熱や保温によってフランが生成し、気密性の高い鍋を用いて加熱と保温を繰り返すとフラン量が2倍以上に増加することを報告した⁶⁾。

そこで、本報告では、味噌を加えた後加熱せず、温度を低く制御することにより、味噌を加えてから一煮立ち（沸騰の直前）するまで加熱するよりもフランの生成量を抑えることができるかどうか明らかにすることを目的とした。味噌を加えた後の加熱が異なる条件、及び異なる温度で味噌を加えた後に加熱しない条件を用いて味噌汁調理を行い、調理後の味噌汁のフラン量を調べて、フランの摂取量を低減する調理法を検討した。

実験方法

(1) 調理材料及び調理器具

本試験では家庭調理に準じた調理材料と調理器具を用いて実施した。味噌、豆腐はいずれもセブンプレミアムプライベートブランドの「田舎こうじみそ」、「丸大豆・水・にがりで作った絹豆腐」（充填絹ごし豆腐）を用い、だしには味の素社製の「ほんだし」（粉末ダシ）を用いた。調理にはミリQ水（ミリポア社製装置で精製）を使用した。加熱にはIH調理器（KZ-PH5、パナソニック製）を用い、調理容器はアルマイト製片手鍋ロレッタIH（直径18 cm、容量1.9 L、ナンセンジャパン株式会社製）を用いた。味噌汁の温度は棒状水銀温度計を用い、球部が鍋の中心から3 cm外側の底面から1 cmの高さに位置するように設置して測定した。

(2) 調理方法

味噌を加えた後の温度について、以下の3条件を設定した。

調理条件A 味噌を添加後に95℃まで加熱

豆腐を加えた後に再び95℃になった時点で加熱を継続したままで味噌を加え、下降した温度が再び95℃になった時点で加熱を停止し、完成とした。この調理条件は味噌を加えて一煮立ちさせる（沸騰直前まで加熱する）前報⁶⁾の調理条件に準じて、再現性を高める目的で調理終了の温度を95℃に設定した。

調理条件B 95℃で加熱を止めて味噌を添加

豆腐を加えた後に再び95℃になった時点で加熱を停止して味噌を加え、完成とした。

調理条件C 加熱を止め90℃まで待って味噌を添加

豆腐を加えた後に再び95℃になった時点で加熱を停止し、90℃まで下がるのを待って味噌を加え、完成とした。

調理の1反復は、当日に均質化した味噌（添加時には室温）を用いて同日に実施し、4反復はそれぞれ実施順番を変えて行った。調理の手順は以下の通り。

鍋に入れたミリQ水（600 mL）をIH調理器により6分間加熱して蓋を外し、湯温が95℃になった時点で粉末ダシ4 g、豆腐300 g（約1.5 cm角に切った64片）を投入した。再び95℃になるまで加熱し、前述した3条件で味噌を加えた。いずれの条件においても味噌48 gをステンレス製の味噌溶き棒と味噌溶き網を用いて溶き入れた。なお、加熱は全てIH調理器の最高出

力で行い、加熱開始から6分後に蓋を外した後は蓋を使用せず、解放条件で実施した。

(3) サンプリング方法

調理師養成教育全書⁷⁾の食べ物のおいしい温度帯(味噌汁は60~68℃)を参考にして、本実験では味噌汁を喫食する温度を70℃及び60℃に設定した。すなわち、調理終了後は鍋をIH調理器上に蓋をしないで静置した状態とし、完成直後と、味噌汁が70℃及び60℃になった時点でサンプリングを実施した。味噌汁からのフラン摂取量を評価するために、汁サンプルは鍋から液体部分をピストンマイクロピペッターで5 mLずつ3点、豆腐は1片を箸でポリプロピレン容器に取り、箸で細断して約5 gずつ3点を採取した。それぞれヘッドスペースバイアルに手早く採取して、クリンパによりテフロンライナー付シリコンゴムセプタムを備えたアルミ蓋を締め付け密閉した。ヘッドスペースバイアルはアルミ蓋とセットにして予め風袋を量っておいたものを用い、密閉後に室温まで冷めてから秤量して試料量を求めた。

(4) 分析試薬、分析方法及び分析条件

試料中のフラン濃度の分析は前報⁶⁾と同様の方法で、以下の通り実施した。

分析に用いたフラン標品は和光純薬製のフランー級(純度98%以上、安定剤として約0.03%の4-methyl-2-tert-butylphenolを含む)を、内標準のフラン-d₄はIsotec Inc. USA製の重水素標識フラン(重水素化率98 atom%)を用いた。

全ての分析試料にヘッドスペースバイアルのセプタムを通して内標準の重水素標識フラン(60 ng相当)を添加して、ヘッドスペース注入装置(HS)を備えたガスクロマトグラフ-質量分析装置(GC-MS, QP2010, 島津製作所製)で分析した。

分析条件は以下の通り。ヘッドスペースサンプラー TurboMatrixHS-40 (Perkin Elmer社製): 平衡化温度, 40℃ (30 min); ニードル温度, 100℃; トランスファーライン温度, 130℃。GC-MS: カラム, HP-Plot Q カラム (Agilent Technologies, Inc., 0.32 mm x 30 m, 膜厚20 µm); キャリアガス, He (カラム流量1.7 mL/min); 気化室温度, 200℃; スプリット比, 1:35; 昇温プログラム, 40℃ (0 min) -20℃/min-225℃ (15 min); 検出 (質量分析部), SIMモード, *m/z* 39 (ターゲット確認ピーク), *m/z* 40 (内標準確認ピーク), *m/z* 68 (ターゲットピーク), *m/z* 72 (内標準

ピーク)。分析結果は、ミリQ水5 mLにフラン0, 1.5, 6, 50, 70 ngを含む標準試料を用いてフラン量とピーク面積比(ターゲット(*m/z* 68)/内標準(*m/z* 72))から作成した検量線($R^2 > 0.999$)を用いて定量し、3点の平均値を試料のフラン濃度とした。

(5) フラン量の計算と有意差検定

60℃のサンプリング終了後に鍋に残った汁及び豆腐の重さを測り、サンプリング量と合わせて味噌汁の汁と豆腐の量を算出して、その1/4を味噌汁一杯分の重さとした。GC-MSにより求めたフラン濃度と一杯分の汁及び豆腐の重さから、試料のフラン量を求めた。

調理条件A, B, Cのうち、任意の2条件間における同一サンプリング時のフラン量についてエクセル2013(マイクロソフト社製)による4反復した結果の*t*検定(危険率1%及び5%)を行い、有意差が認められたものについて図1に示した。

実験結果及び考察

図1に3つの調理条件の味噌汁(一杯分)のフラン量を示した。味噌を添加後に再度95℃まで加熱する調理条件Aにおいては、品温が95℃になった完成時よりも、70℃まで温度が下がった味噌汁でフラン量が増加した。一方、95℃で加熱を止めて味噌を溶き入れる調理条件Bと、加熱を止め90℃になるまで待つてから味噌を添加する調理条件Cでは、完成時から70℃までにフラン量は増加しなかった。この結果から、それぞれの条件で調理した味噌汁から摂取するフラン量を過少評価することなく比較するためには喫食に適した温度、すなわち70℃及び60℃におけるフラン量を比較するのが適切と考えられた。未加熱食材(味噌、豆腐、粉末ダシ)のフラン合計量(374.7 ng)を100%としてそれぞれの味噌汁を比較すると、調理条件Aでは108%(70℃)と104%(60℃)であり、調理条件Bでは83%(70℃)と81%(60℃)、調理条件Cでは87%(70℃)と87%(60℃)であった。図1に示すように、調理条件AとB、及び調理条件AとCの70℃及び60℃におけるフラン量は有意に差があり、味噌を添加後に加熱しない調理条件によって、添加後に加熱する条件よりもフラン摂取量を低減できることが示された。味噌を添加後に加熱する条件において完成時のフラン量が未加熱食材のフラン合計量よりも低くなることは前報⁶⁾と同様の結果であったが、本試験

において完成後喫食に適した70℃まで温度が下がる間にフラン量が増加することが明らかになり、摂取量を正確に見積もるためには喫食する温度の味噌汁のフラン量を測定する必要があることが示された。

図2に3つの調理条件における味噌を加えるときと

加えた後の味噌汁の温度変化を示した。調理条件Aでは加熱しながら味噌を添加、Bでは加熱を停止して味噌を添加、Cでは加熱を停止して品温が90℃に下がってから味噌を添加したため、それぞれの味噌添加後の味噌汁の温度は、89℃、86℃、83℃であった。調

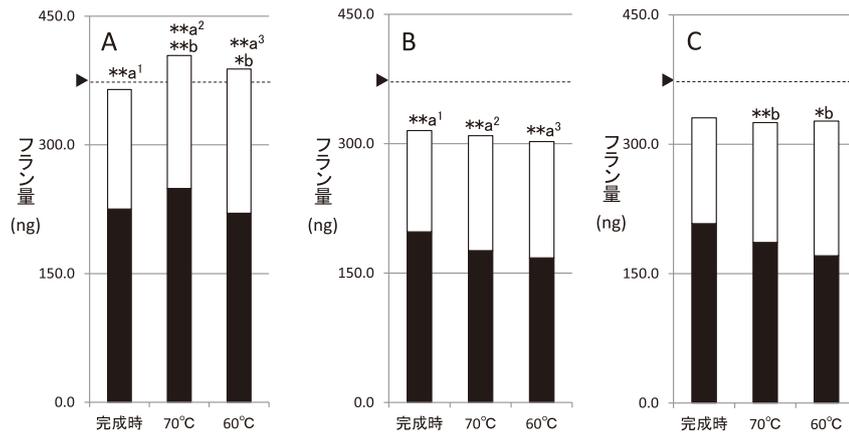


図1. 3つの調理条件の味噌汁に含まれるフラン量 (味噌汁一杯分)

A: 味噌を添加後に95℃まで加熱; B: 95℃で加熱を止めて味噌を添加;
 C: 加熱を止め90℃まで待って味噌を添加; □: 豆腐; ■: 汁;
 **a, **b: 危険率1%で有意差有り; *b: 危険率5%で有意差有り; ▶: 未加熱食材のフラン合計量

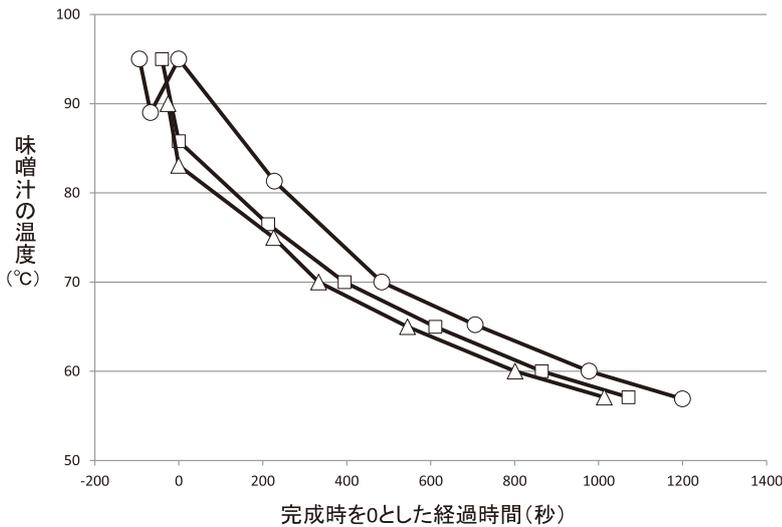


図2. 味噌を加えた後の味噌汁の温度変化

○: 調理条件A 味噌を添加後に95℃まで加熱; □: 調理条件B 95℃で加熱を止めて味噌を添加;
 △: 調理条件C 加熱を止め90℃まで待って味噌を添加

理条件BとCでは完成時と比べ、70℃の試料でフラン量が増加していない（図1）ことから、フランが増加する温度域の下限は、調理条件Bの完成時温度86℃よりも高いと推測された。しかし、調理条件Aでは味噌を添加した後に95-89℃の温度域に94秒置かれていたが、完成時のフラン量は未加熱食材のフラン合計量よりも少なかった。このことと、完成時から86℃まで温度が下がる間にフラン量が増加したと考えられることから、味噌汁にはフランが生成する速度と揮発により失われる速度が共に高く見かけ上のフラン量の変化が小さい温度域が95-89℃の間に存在し、完成時の95℃から86℃まで下がる間にフランの生成速度が揮発速度を上廻る温度域が存在することでフラン量が増加している可能性が考えられた。気密容器を用いた試験（データ未掲載）から、味噌を70℃以下で加熱した場合にはフランが生成しない事を確認しており、フランの沸点（31.2℃）を上回る70℃から60℃の温度域において全ての調理条件でフラン量の変化が小さいことから、味噌汁ではこの温度域においてフランの揮発速度が低いことが示された。図1から、70℃から60℃へ温度が下がる間に汁から豆腐へフランが移行していることが示唆されるが、これはこの温度域においてフランの揮発速度が低いことに関係している可能性が考えられる。

本試験では、味噌を添加してから加熱しない調理法によって、味噌を加えてから95℃まで加熱する調理法に比べてフラン量を低減できることが示された。

要約

フランの摂取量を低減する調理法を検討する目的で、味噌を加える時の温度やその後の加熱操作を違えた3条件で味噌汁調理を行い、調理後の味噌汁のフラン量を調べた。調理には家庭で使われる鍋を用い、味噌を加えてからは蓋を使用しなかった。味噌を加えてから95℃まで加熱する条件で調理した場合には、完成後70℃になるまでにフラン量が増加することが明らかになった。摂取するフラン量の過少評価を避ける為に喫食に適した70℃の味噌汁と比較すると、味噌を添加してから加熱しない調理法によって、味噌を加えてから95℃まで加熱する調理法と比べてフラン量が有意に低減できることが示された。

参考文献

- 1) Robin, L. P. and Clanci, S., Acrylamide, furan and the FDA, *Food Safety Magazine*, **13** (3), 17-21 (2007)
- 2) Morehouse, K. M., Nyman, P. J., McNeal, T. P., DiNovi, J. and Perfetti, G. A., Survey of furan in heat processed foods by headspace gas chromatography/mass spectrometry and estimated adult exposure, *Food Additives and Contaminants*, **25** (3), 259-264 (2008).
- 3) Roberts, D., Crews, C., Grundy, H., Mills, C. and Matthews, W., Effect of consumer cooking on furan in convenience foods., *Food Additives and Contaminants*, **25** (1), 25-31 (2008)
- 4) 箭田浩士, 中川博之, 塚越芳樹, 内藤成弘, 五十部誠一郎, 安井明美, 飯塚誠一郎, 木村彩子, 渡井正俊, 永田忠博, 漆山哲生, 辻山弥生, 山田友紀子, 亀山真由美, 食品に含まれるフランの分析, 平成19年9月日本食品科学工学会第54回大会講演集, P.156, 福岡 (2007年9月)
- 5) 箭田浩士, トータルダイエットスタディによるフラン摂取量推定, 食品と技術, 2008-03, 1-8 (2008)
- 6) 箭田浩士, 亀山真由美, 調理条件が味噌汁のフラン量に及ぼす影響, 日本食品科学工学会誌, 60, 521-524 (2013)
- 7) 丸山務他, 調理師養成教育全書必修編, 「7調理理論」, 第2版, 社団法人全国調理師養成施設協会 (東京) 編集・発行, pp.10 (2007).

引用 URL

- i) FDA (2004). Furan in Food, Thermal treatment; request for data and information
<http://www.gpo.gov/fdsys/search/pagedetails.action?st=04-10588&granuleId=04-10588&packageId=FR-2004-05-10> (2015.10.30接続確認)
- ii) 食品安全に関するリスクプロファイルシート (農林水産省)
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/150914_furan.pdf (2015.10.30接続確認)
- iii) フランのファクトシート (食品安全委員会)
<https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/factsheets-furan.pdf> (2015.10.30接続確認)

研究ノート

茨城県つくば市の屋外でトラップに捕獲された貯穀害虫の記録
(2014年11月～2015年10月)

古井 聡*, 今村 太郎, 宮ノ下 明大

国立研究開発法人 農業・食品産業総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

**Note of stored-product insect pests captured by outdoor traps in Tsukuba
(November 2014 ~ October 2015)**

Satoshi Furui*, Taro Imamura, Akihiro Miyanoshita

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan, 305-8642

Abstract

The number of stored-product insects captured by traps at the outdoors was examined from November 2014 to October 2015 in Tsukuba. The total numbers of *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera; Pyralidae), *Lasioderma serricornis* (Fabricius) (Coleoptera; Anobiidae) and *Anthrenus verbasci* (Linnaeus) (Coleoptera; Dermestidae) captured by four traps were 46, 22 and 127, respectively. Although, two traps were placed, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera; Tenebrionidae) was not captured.

Keywords: stored-product insect pest, trap, capture, outdoor, Tsukuba

和 訳

つくば市の屋外で捕獲される貯穀害虫の発生状況と消長を明らかにするため、昨年に引き続き、2014年の11月から翌2015年の10月にかけてトラップ調査を行った。その結果、ノシメマダラメイガ、タバコシバンムシ、ヒメマルカツオブシムシは4カ所のトラップで、それぞれ総計46個体、22個体、127個体が捕獲された。コクヌストモドキは2カ所にトラップを設置したが、全く捕獲できなかった。

キーワード：貯穀害虫，トラップ，捕獲，屋外，つくば市

* 連絡先 (Corresponding author), satfurui@affrc.go.jp

緒言

企業や飲食店では、ゴキブリやハエなどに代表される異物について、食品への混入を防ぐためにあらゆる手段を講じているが、混入可能性をゼロに近づけることはできても根絶は出来ない。混入事例が発生した場合、生産者は被害者である消費者に対応しつつ、異物の特定から原因の特定、混入防止体制の確立等に努めてきた。しかし、近年のインターネットの普及により、異物混入ルートが製造・流通過程か、あるいは消費者の購入後なのか不明な状況で、消費者側から一方的に混入被害事故として写真等を伴い公表されるようになった。この公表内容に対して、噂、根拠に欠ける推察や感情的なコメント等の無責任な情報が加わることで、生産者が過大な糾弾を受ける事態も発生し、社会的な問題となっている¹⁾。一方で、消費者が自ら口にし、健康の良否に直結する食品に対して然るべき注意を払い、より高いレベルの安全・安心を望むことは当然であり、混入の原因究明は依然強く求められている。

農産物を含む“食品”に混入する異物としては虫、毛、金属片、小石などが挙げられる。これらのうち虫は、ヒトに対する健康被害はほとんど無いにもかかわらず、消費者からのクレームが最も多い。我が国において食品への虫混入の際に過剰な拒否反応を示す理由は、都市部において生きた虫に接する機会も少なくなくなり、食虫経験も限られるためと考えられる。

食品へ混入する代表的な貯穀害虫としては、チョウ目のノシメマダラメイガ *Plodia interpunctella* (Hübner) (メイガ科) が最も発生事例が多いことが知られている。当該昆虫は、成虫で体長7-8mm。翅を広げると12-16mm程度の大きさで、頭部は赤紫色、腹部は灰白色、前翅の基半分は赤銅色、淡黄灰色で仕切られたあと半分は赤銅色であることを特徴とする^{2),3)}。米ぬかや玄米で最も生育が早く、小麦や小麦のふすまでは少し発育が遅れ、豆類では更に生育が遅れるとされている⁴⁾。幼虫は蛹になる際に隙間や角の部分を探して徘徊するので、時に食害対象の糧以外の箇所にも混入する。また、菓子やインスタント食品の袋を食い破って中に入り込み食べることもある⁵⁾。その他、コウチュウ目のタバコシバンムシ *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (シバンムシ科)、ヒメマルカツオブシムシ *Anthrenus verbasci* (Linnaeus) (カツオブシムシ科) も食品へ良く混入する害虫として知られている。これらの

昆虫は、一般に収穫後に糧を食害するが、例えば米の場合、玄米は外殻に守られている粃よりも被害が極めて大きいことが知られている⁶⁾。

我が国における米の流通は、利便性から主に玄米貯蔵であるが、15℃程度の低温状態をシームレスに整える等、虫が繁殖しづらい環境管理を適切に行えば、粃の状態でも無くとも防除は可能である。反面、管理体制が十分でない場合には、流通・貯蔵の全工程で虫害が発生する可能性がある。従って、食品貯蔵庫や家庭等の屋内において虫害が発生した際には、屋外で既に加害されていた穀物の持ち込みによる場合と、発生現場で屋内へ侵入し、繁殖した場合の両面から原因を考える必要がある。後者の場合、屋内へ侵入した時期や原因を推定するためには、それぞれの昆虫種について屋外環境における生態を把握しておく必要がある。しかし、貯穀害虫は比較的好く見かける昆虫種であるにも関わらず、これまでに報告されている例は少ない⁷⁾⁻⁹⁾。

本研究では、前年度に報告した調査に引き続き¹⁰⁾、調査場所を固定してノシメマダラメイガ、タバコシバンムシ等貯穀害虫を経年的に調べ、つくば市の屋外における複数の貯穀害虫の発生状況とその消長の周年変化から、周囲の環境要因と生活史との関係を明らかにする目的で基礎データを収集した。

実験方法

貯穀害虫捕獲用トラップは、ノシメマダラメイガ用にガチョンを、タバコシバンムシ用にはニューセリコ、コクヌストモドキ用にはトリオス、ヒメマルカツオブシムシ用にはハイレシス(いずれも富士フレーバー株式会社製)を用いた。

本論文における調査対象および期間は、前年度の調査に引き続き、ヒメマルカツオブシムシ、ノシメマダラメイガ、タバコシバンムシおよびコクヌストモドキについて、2014年11月1日から、2015年10月31日までの捕獲個体数を集計した。

調査地域は前年度の調査と同様に、茨城県つくば市観音台2-1-12 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所の変換利用実験棟(以下、変換利用実験棟とする。)とした(図1)。

トラップの設置箇所は、ノシメマダラメイガおよびタバコシバンムシ用は、A, B, C, D^aに、ヒメマルカツオブシムシ用はA, B, C, D^bとした。コクヌストモドキ用のトラップについては、AおよびBの2カ

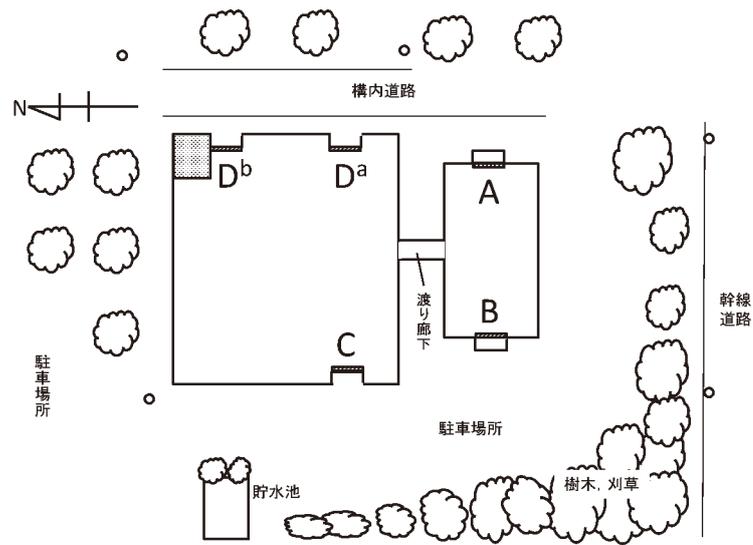


図1. 農研機構 食品総合研究所 変換利用実験棟におけるトラップの設置場所の模式図

設置場所A, Bのある建物は2階建て, 設置場所C, D^a, D^bのある建物は平屋建てである.

▨: トラップの設置位置 (観音開きドア付近) ▨: 貯穀害虫の継代飼育室 ○: 街灯

所のみで実施した。

トラップの設置場所は建屋の1階部分とし、ノシメマダラメイガ用、タバコシバンムシ用およびヒメマルカツオブシムシ用トラップは建屋壁の床面から1.5 m程度の高さに、コクヌストモドキ用トラップは建物壁と床面の角に沿うように静置した。捕獲数の確認は、土曜日、日曜日、祝祭日を除く毎日午前中に行った。また、設置したトラップはトラップに添付されている説明書の有効期限に従って約1ヶ月を目処に交換した。

実験結果と考察

1. ノシメマダラメイガの発生状況とその消長

4月25日から10月31日までの間に変換利用実験棟周辺4カ所に設置したノシメマダラメイガ用トラップについて、1週間あたりの捕獲数を表1にまとめた。ノシメマダラメイガの各トラップにおける位置的な捕獲数の違いはA>B>C>D^aの順であり、総計46個体が捕獲された。2014年度は、A>B>D^a>Cの順で多く、総計68個体が捕獲された¹⁰⁾。また、本調査で捕獲されなかった期間(2014年11月1日から2015年4月25日まで)は、幼虫休眠により活動停止していると考えられた¹¹⁾。捕獲場所の違いによる捕獲数については、両年共にA、次いでBが最も多かったが、CおよびD^a

は調査年度により異なった。他方、総捕獲数は、2014年度の調査が本年度よりもトラップ調査の実施期間が短かった(2014年6月25日から同年10月31日)にも関わらず捕獲個体数が多かったことから、本年度は2014年度よりも発生数が少なかったと推察された。

図2は、4カ所のトラップに捕獲されたノシメマダラメイガの個体数を一週間ごとに集計し、調査期間ごとにプロットし、本年度と2014年度の結果を比較したものである¹⁰⁾。本年度において、ノシメマダラメイガは5月23日から19日、7月11日から24日、10月4日から10日にかけて3回の捕獲ピークが認められ、全体としては7月11日から24日にかけてピークを迎えた。また、2014年の調査期間は本年度の期間の一部をカバーしておらず、比較できない箇所もあるが、消長のパターンは良く一致していた。

2. タバコシバンムシの発生状況とその消長

表2は各タバコシバンムシ用トラップの1週間あたりの捕獲数をまとめたものである。表2から、各トラップにおける位置的な捕獲数はA>B>C>D^aの順で多かった。また、本年度の総捕獲数は22個体であった。2014年11月1日から2015年6月5日までの期間は、幼虫休眠により活動停止したため捕獲されなかったと推察された¹¹⁾。2014年度は6月25日から10月31日までに37個体が捕獲されており¹⁰⁾、今年度の発生は

表 1. 2015年にトラップに捕獲されたノシメダラメイガの個体数

調査期間 (月/日)	ノシメダラメイガの捕獲数				合計
	トラップの位置				
	A	B	C	D ^a	
4/25-5/1	0	0	1	0	1
5/2-5/8	0	0	0	0	0
5/9-5/15	0	0	0	0	0
5/16-5/22	0	0	0	0	0
5/23-5/29	3	0	1	0	5
5/30-6/5	3	0	0	1	4
6/6-6/12	1	0	0	1	2
6/13-6/19	1	0	0	0	1
6/20-6/26	0	0	0	0	0
6/27-7/3	0	1	0	0	1
7/4-7/10	0	0	0	1	1
7/11-7/17	3	2	1	0	6
7/18-7/24	1	5	0	0	6
7/25-7/31	1	1	2	0	4
8/1-8/7	2	0	1	0	3
8/8-8/14	1	0	1	0	2
8/15-8/21	0	1	0	0	1
8/22-8/27	0	1	0	0	1
8/28-9/4	0	1	0	0	1
9/5-9/11	0	0	0	0	0
9/12-9/18	0	0	1	0	1
9/19-9/25	0	0	0	0	0
9/26-10/2	2	0	0	0	2
10/3-10/9	0	0	1	0	1
10/10-10/16	0	0	2	1	3
10/17-10/23	0	0	0	0	0
10/24-10/30	0	0	0	0	0
合計	18	12	11	4	46

調査期間：2014/11/1～2015/10/31, 捕獲なし：2014/11/1～2015/4/24.

表 2. 2015年にトラップに捕獲されたタバコシバンムシの個体数

調査期間 (月/日)	タバコシバンムシの捕獲数				合計
	トラップの位置				
	A	B	C	D ^a	
4/25-5/1	0	0	0	0	0
5/2-5/8	0	0	0	0	0
5/9-5/15	0	0	0	0	0
5/16-5/22	0	0	0	0	0
5/23-5/29	0	0	0	0	0
5/30-6/5	0	0	0	0	0
6/6-6/12	0	1	0	1	2
6/13-6/19	0	0	0	0	0
6/20-6/26	0	0	0	0	0
6/27-7/3	0	1	0	0	1
7/4-7/10	0	0	0	0	0
7/11-7/17	1	0	2	0	3
7/18-7/24	1	0	1	0	2
7/25-7/31	1	0	0	0	1
8/1-8/7	0	0	0	0	0
8/8-8/14	0	0	0	0	0
8/15-8/21	2	3	1	2	8
8/22-8/27	1	0	1	0	2
8/28-9/4	1	0	0	0	1
9/5-9/11	0	0	0	0	0
9/12-9/18	0	1	0	0	1
9/19-9/25	1	0	0	0	1
9/26-10/2	0	0	0	0	0
10/3-10/9	0	0	0	0	0
10/10-10/16	0	0	0	0	0
10/17-10/23	0	0	0	0	0
10/24-10/30	0	0	0	0	0
合計	8	6	5	3	22

調査期間：2014/11/1～2015/10/31, 捕獲なし：2014/11/1～2015/6/5.

2014年度より少ないと考えられた。トラップの位置的な捕獲数の違いは、2014年度はD^a>B>C>Aの順であり、一致しなかった。

図3は図2と同様に、各トラップに捕獲されたタバコシバンムシの個体数を一週間ごとにプロットし、本年度と2014年度の結果を比較したものである。本年度は、2015年度の6月6日の週から捕獲され、8月15日の週にピークを迎えた後、減少し、9月25日までみられた。2014年度のピークは8月2日の週であり¹⁰⁾、本年度は約2週間の遅れが認められたものの、消長のパターンは同様であった。

3. ヒメマルカツオブシムシの発生状況とその消長

表3はヒメマルカツオブシムシ用トラップについて、1週間あたりの捕獲数をそれぞれ集計したものである。本年度は各トラップにおける位置的な捕獲数の違いはC>D^b>B>Aの順で多く、全トラップで総計127の個体が捕獲された。2014年11月1日から2015年4月24日までは幼虫休眠により捕獲されなかったと考えられた¹¹⁾。2014年度におけるトラップの位置的な捕獲数の違いは、前年度がA>D^b>B=Cの順で多かったことから、一致しなかった。また、2014年度の総捕獲数は94個体であり¹⁰⁾、本年度の発生頭数は昨年よりも多いと推察された。

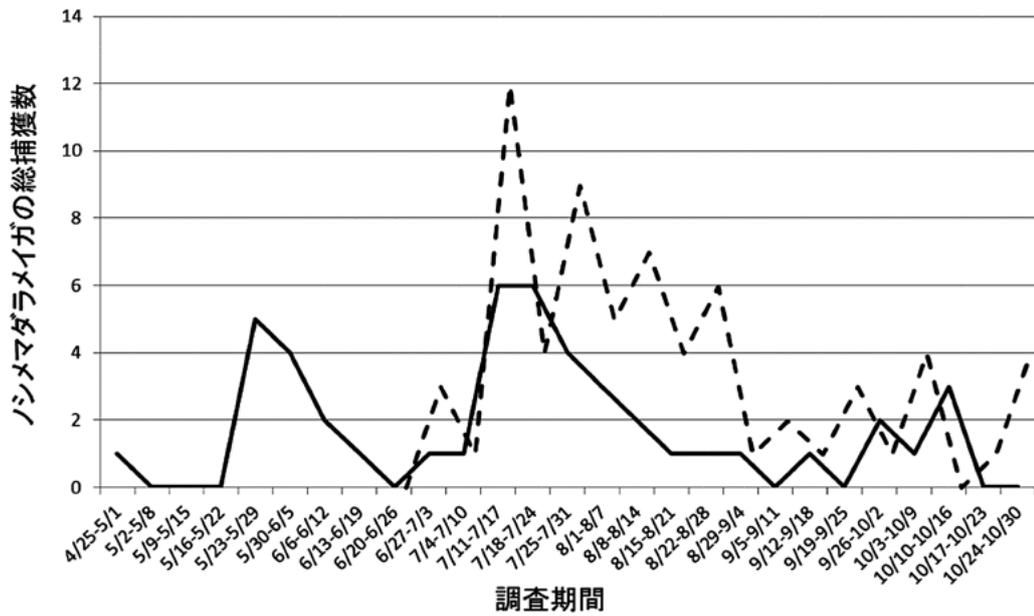


図2. 2015年および2014年度における屋外のノシメマダラメイガの捕獲消長比較

計4箇所に設置したトラップの総捕獲数を1週間毎にプロットして比較した。2015年：線，2014年：破線。
 2015年度の調査期間：2014/11/1～2015/10/31，捕獲なし：2014/11/1～2015/4/24。
 2014年度の調査期間：2014/6/25～2014/10/31。

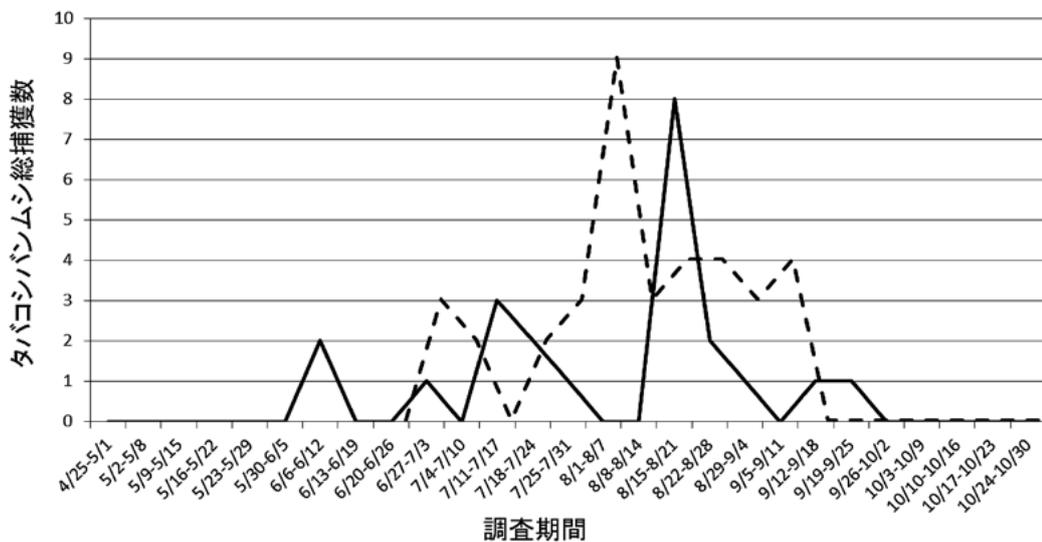


図3. 2015年および2014年度における屋外のタバコシバンムシの捕獲消長比較

計4箇所に設置したトラップの総捕獲数を1週間毎にプロットして比較した。2015年：線，2014年：破線。
 2015年度の調査期間：2014/11/1～2015/10/31，捕獲なし：2014/11/1～2015/4/24。
 2014年度の調査期間：2014/6/25～2014/10/31。

図4は、ヒメマルカツオブシムシの捕獲数を集計したものである。本年度は5月23日から捕獲のピークを迎え、6月5日まで見られた。2014年のピークは5

月17日の週で、6月23日まで捕獲が確認されたことから、消長のパターンも一致がみられた。

4. コクヌストモドキの発生状況とその消長

コクヌストモドキ用トラップでの調査では、2014年度および2015年度において1個体も捕獲されなかったため、存在は確認されなかった。

貯穀害虫の屋外における発生状況と消長を明らかにするための基盤情報を得ることを目的とし、つくば市の屋外におけるノシメマダラメイガ、タバコシバンムシ、ヒメマルカツオブシムシ、コクヌストモドキについて調査した記録を報告した。本報告は古井ら(2015)の報告と合わせると一年を通じた調査が行えたこととなり¹⁰⁾、有用な基礎データを得ることが出来た。今後も本調査を続けることにより、貯穀害虫の周年変化に関するデータを蓄積し、個々の害虫に特有な発生周期や、周囲の環境などの影響から生活史を明らかにし、防除に役立てたいと考えている。

参考文献

- 1) 日本経済新聞2015年10月29日
- 2) 吉田敏治, 渡辺直, 尊田望之 (1989) 図説 貯蔵食品の害虫, 全国農村教育協会, 東京, 268p.
- 3) 広渡俊哉 (2004) 屋内で見られる小蛾類. 文教出版. 大阪. 105p.
- 4) Hill, D.S. (1990) Pests of stored products and their control. Belhaven Press. London. 274p.
- 5) 村田未果, 今村太郎, 宮ノ下明大, カップ綿製品へのノシメマダラメイガ幼虫の侵入と発育, 応動昆, **50**(2), 131-136, (2006)
- 6) 中北宏, 池長裕史, 貯穀害虫に関する諸問題と防除の現状と今後の展望 : I. 貯穀害虫のもつ諸問題, 家屋害虫, **17**(1), 79-91, (1995)
- 7) 高山渉, 杉本可能, 高橋明也, フェロモントラップによる屋外におけるタバコシバンムシ捕獲調査, ペストロジー学会, **7**, 42-44, (1992)
- 8) 平尾素一, 一般住宅内外におけるフェロモントラップによるノシメマダラメイガ (*Plodia interpunctella* H.) の汚染調査, ペストロジー学会誌 **11**(1), 18-23, (1996)
- 9) 坂下琢治, 高橋邦也, タバコシバンムシおよびジンサンシバンムシ成虫の屋内および屋外における

表3. 2015年にトラップに捕獲されたヒメマルカツオブシムシの個体数

調査期間 (月/日)	ヒメマルカツオブシムシの捕獲数				合計
	トラップの位置				
	A	B	C	D ^a	
4/25-5/1	2	5	5	3	15
5/2-5/8	4	3	11	6	24
5/9-5/15	1	2	2	4	9
5/16-5/22	3	6	2	4	15
5/23-5/29	9	12	15	14	50
5/30-6/5	5	2	2	5	14
6/6-6/12	0	0	0	0	0
6/13-6/19	0	0	0	0	0
6/20-6/26	0	0	0	0	0
6/27-7/3	0	0	0	0	0
7/4-7/10	0	0	0	0	0
7/11-7/17	0	0	0	0	0
7/18-7/24	0	0	0	0	0
7/25-7/31	0	0	0	0	0
8/1-8/7	0	0	0	0	0
8/8-8/14	0	0	0	0	0
8/15-8/21	0	0	0	0	0
8/22-8/27	0	0	0	0	0
8/28-9/4	0	0	0	0	0
9/5-9/11	0	0	0	0	0
9/12-9/18	0	0	0	0	0
9/19-9/25	0	0	0	0	0
9/26-10/2	0	0	0	0	0
10/3-10/9	0	0	0	0	0
10/10-10/16	0	0	0	0	0
10/17-10/23	0	0	0	0	0
10/24-10/30	0	0	0	0	0
合計	24	30	37	36	127

調査期間：2014/11/1～2015/10/31, 捕獲なし：2014/11/1～2015/4/24.

捕獲消長, ペストロジー学会誌, **16**(1), 23-29, (2001)

- 10) 古井聡, 今村太郎, 宮ノ下明大, 茨城県つくば市の屋外でトラップに捕獲された貯穀害虫の記録, 食総研報, **79**, 19-24, (2015)
- 11) 安富和男, 梅谷献二 (1983) 現職図鑑 衛生害虫と衣食住の害虫, 全国農村教育協会, 東京, 310p.

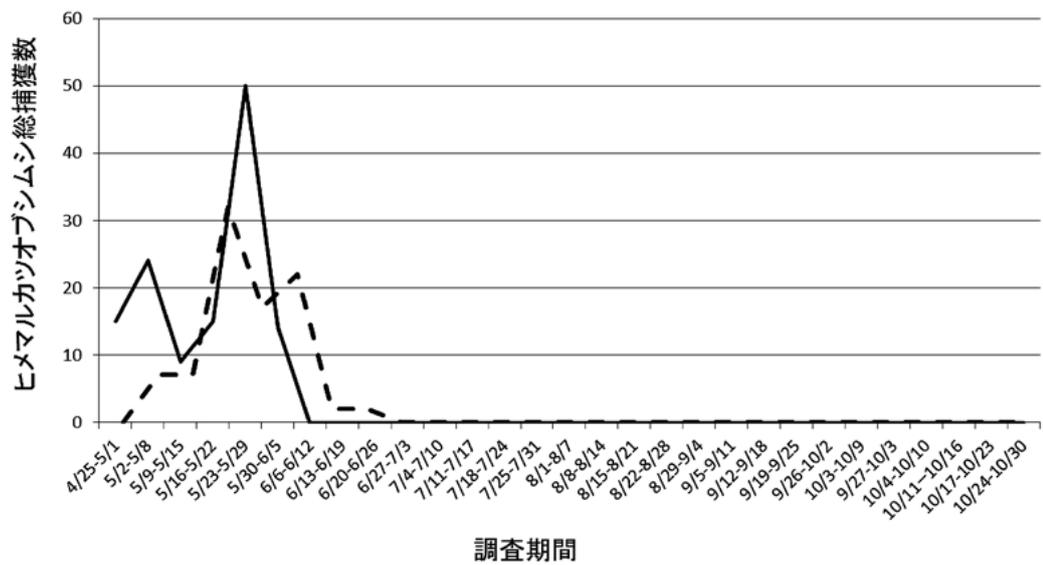


図4. 2015年および2014年度における屋外のヒメマルカツオブシムシの捕獲消長比較

計4箇所に設置したトラップの総捕獲数を1週間毎にプロットして比較した。2015年：線，2014年：破線。
 2015年度の調査期間：2014/11/1～2015/10/31，捕獲なし：2014/11/1～2015/4/24
 2014年度の調査期間：2014/4/15～2014/10/30。

研究ノート

Improvement of the group testing method to evaluate GM maize content

Junichi Mano¹, Kaori Takashima¹, Satoshi Futo², Yasutaka Minegishi³, Kenji Ninomiya⁴, Akio Noguchi⁵,
Kazunari Kondo⁵, Reiko Teshima⁵, Reona Takabatake¹, and Kazumi Kitta^{1*}

¹ National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba 305-8642, Japan

² Fasmac Co., Ltd., 5-1-3, Midorigaoka, Atsugi, Kanagawa 243-0041, Japan

³ Nippon Gene Co., Ltd., 1-5, Kandanshiki-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0054, Japan

⁴ Shimadzu Corporation, 1, Nishinokyo-Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan

⁵ National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Abstract

The use of genetically modified (GM) stacked-event products combining two or more GM parental events, especially in maize, has been increasing. This situation has made real-time PCR-based quantitative methods prone to overestimation of the content of GM organisms (GMOs) relative to the actual weight proportion. To solve this problem, we previously proposed a group testing method enabling accurate weight-based evaluation of GMO content in maize grains. In the present study, this method was slightly modified and validated in-house in order to enhance its reliability and user friendliness. Additionally, we developed a testing method for identification of GM events in the lysate samples used for the group testing. First, we confirmed specificity of the modified method by means of authentic GM and non-GM materials. Evaluation of the limit of detection suggested that the modified method reliably detected a single GM kernel in a group sample composed of 20 maize kernels. Then, we conducted a blind test using simulated group samples. All of the testing results matched the presence/absence of GM kernels in the simulated samples. Furthermore, identification of GM events in the group testing samples was successfully achieved by DNA purification from the residual lysates and subsequent real-time PCR array analyses.

Key words: GMO, group testing, validation

Introduction

In order to give consumers the freedom of choice between genetically modified (GM) and conventional food products¹⁾, food-labeling regulations regarding GM organisms (GMOs) were implemented in 2001 in Japan. According to these regulations, “non-GMO” labeling is permitted only when final products are made from non-GMO materials grown and distributed within an identity-

preserving handling system. In this system, unintentional commingling of GMOs is allowed up to 5% of content for maize and soybeans. Therefore, quantitative GMO analyses for maize and soybeans are needed to monitor the validity of food labeling.

In recent years, crop varieties with stacked GM events (resulting from crossing of two or more single GM events) have been widely used, especially in maize products²⁾. Although the most commonly used method for quantitative GMO analysis is real-time PCR, assessment of GMO

*Corresponding author (Tel.: +81 29-838-7369, Fax: +81 29-838-7369, e-mail: kaz@affrc.go.jp)

content of stacked-event products by real-time PCR leads to overestimation relative to the actual weight-based GMO content³). This is because a kernel of a stacked-event product contains the PCR target sequences corresponding to two or more single-event kernels. Because of the increasing use of stacked-event products, it has become virtually impossible to accurately measure GMO content by means of the currently available methodology.

To solve this problem, Akiyama *et al.* developed an individual-kernel detection method that involves multiplex real-time PCR analysis of the DNA extracted from individual ground maize kernels³). This detection system has already been adopted as an official GM maize detection method in Japan. Afterwards, we developed a group testing method⁴), as an alternative, to make evaluation of the kernel-based GMO content easier. Recently, Noguchi *et al.* reported a trait-specific real-time PCR method that allows for quantification of GM maize content irrespective of stacked GM maize commingling in ground samples⁵). In the trait-specific method, the real-time PCR-quantified herbicide tolerance genes *cp4-epsps* and *pat* and their copy numbers were converted into GMO content on the basis of surveillance of the actual GM event distribution. Certainly, this method may be useful for analysis of GMO content in ground maize samples including stacked-event GM grains. Nevertheless, to make the trait-specific method less biased, extensive surveillance of GM events in commercially distributed grain samples as previously reported^{6, 7}), should be conducted on a continuous basis. This approach is expected to decrease feasibility of the method. Thus, the

group testing is a promising method for quantification of GM maize irrespective of the stacked GMO commingling.

In the group testing, a predetermined number of groups is taken from a larger bulk sample, while each group contains a defined number of kernels; then GMO content is evaluated statistically on the basis of qualitative results on multiple small pools of grains (Fig. 1). The developed method enabled efficient evaluation of GMO content on a weight/weight basis irrespective regardless of the presence of stacked-event products. The previously developed testing method consisted of a sample pretreatment step (in which a group of 20 maize kernels was ground in a lysis buffer by means of a household food processor) and a subsequent PCR assay step, in which the lysed sample was directly analyzed as a DNA template by qualitative PCR. For the qualitative PCR analysis, we set up two duplex real-time PCR assays, a GM maize screening assay, and an experimental control assay. The GM maize screening assay was designed to detect the 35S promoter region (P35S) and NOS terminator region (TNOS) widely introduced into commercially available GM maize events. The experimental control assay is intended to confirm that the reaction mixture contained sufficient amounts of extracted DNA, and there is no PCR inhibition. The target sequences of the experimental control assay were designed to detect both the starch synthase IIb gene from *Zea mays* (SSIIB, as the endogenous reference DNA) and an artificial sequence in small amounts of plasmid DNA (as an internal positive control; IPC).

In the previously conducted collaborative trial of the group testing method⁴), we encountered PCR inhibition

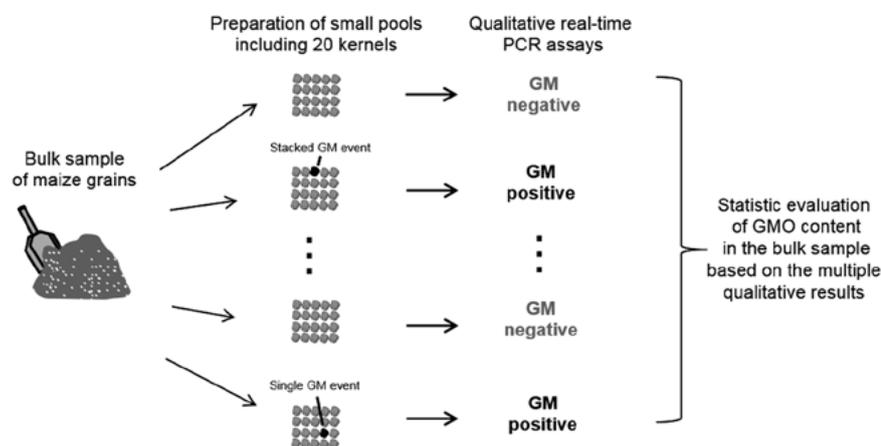


Fig. 1 An outline of the group testing strategy.

in one sample out of 216 samples, and just this one PCR result had to be eliminated from the analysis. To make the group testing method more practical, the frequency of elimination of samples due to PCR inhibition should be reduced, and this approach will also decrease the number of extra analyses. In order to make the group testing robust, we recently developed a novel real-time PCR master mix whose efficiency is not affected by PCR inhibitors from maize grains. We found that this master mix reagent enabled direct real-time PCR analysis of crude cell lysates of a wide range of foods and agricultural products⁸⁾. In the present study, we attempted to enhance the method's reliability and user friendliness by means of some modifications including adoption of the master mix reagent. We also validated the modified method. Additionally, we developed a method for GM event identification after the group testing.

Materials and Methods

1. Materials

We used the following representative GM maize events: Bt11, DAS-59122-7, Event176, GA21, MIR162, MIR604, MON810, MON863, MON88017, MON89034, NK603, TC1507, T25, and 3272. F1-generation seeds or ground materials of Bt11, Event176, GA21, MIR162, MIR604, and 3272 were kindly provided by Syngenta Seeds (Basel, Switzerland); F1-generation seeds of MON810, MON863, MON88017, MON89034, and NK603 were kindly provided by Monsanto (St. Louis, MO, USA); and F1-generation seeds of DAS-59122-7 and TC1507 were kindly provided by Pioneer Hi-Bred International (Johnston, IA, USA). F1-generation seeds of T25 were imported from the USA. Dry seeds of conventional maize were imported from the USA and used as non-GM maize. For preparation of purified DNA extracts, we used the DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as described in the "JAS analytical test handbook."⁹⁾ DNA concentration in the solutions was determined by measuring ultraviolet (UV) light absorbance at 260 nm. All DNA extracts were diluted to the concentration of 20 ng/ μ L and then used for the subsequent PCR analyses. The purity of each genuine GM and conventional seed was confirmed by the real-time PCR array as reported^{10, 11)}.

To prepare the DNA template for the IPC reaction, a pUC19 plasmid harboring the artificial sequence Art was constructed and named pART as we reported previously⁴⁾.

After linearization by a restriction enzyme and purification by ethanol precipitation, the theoretical copy number of the pART solution was calculated from the theoretical molecular weight of the plasmid and the mass-based DNA concentration estimated by the UV spectroscopy. The solution was diluted to a given concentration with a 5 ng/ μ L ColE1 plasmid solution in Tris/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer (Nippon Gene, Tokyo, Japan) on the basis of the theoretical copy number. Then, we evaluated the copy number of the Art sequence by digital PCR analysis using the QuantStudio 3D Digital PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). We prepared the reaction mixture in the total volume of 30 μ L, which included 27 pmol of primers IPC 1-5' (5'-CCGAGCTTACAAGGCAGGTT-3') and IPC 1-3' (5'-TGGCTCGTACACCAGCATACTAG-3'), 7.5 pmol of IPC 1-Taq probe (5'-TAGCTTCAAGCATCTGGCTGTCGGC-3'), 5 μ L of a DNA template, and 15 μ L of QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix (Life Technologies). IPC 1-Taq was labeled with the dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) and black hole quencher 1 (BHQ1) at the 5' and 3' termini, respectively. We loaded 14.5 μ L of the reaction mixture into each Digital PCR 20K chip, and two chips were prepared as duplicates. Then, the chips were subjected to thermal cycling on a GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies). The thermal cycling conditions were as follows: 10 min at 96°C, 39 cycles of 2 min at 60°C and 30 s at 98°C, then 2 min at 60°C and an indefinite hold at 10°C. Fluorescence scanning of the chip was performed by means of the QuantStudio 3D Digital PCR instrument (Life Technologies), and the raw data were analyzed in the QuantStudio 3D AnalysisSuite software (Life Technologies). The pART solution whose copy numbers were estimated at 17–23 copies/ μ L was used as the DNA template in the IPC reaction.

2. The modified method of group testing

We modified the conditions of the real-time PCR analysis in the previously reported group testing method⁴⁾. We chose a newly developed real-time PCR master mix reagent, DirectAce qPCR Mix (Nippon Gene), as the PCR enzyme and buffer. The primer pair SSIIB 3-5' and SSIIB 3-3' was used as a substitute for the primer pair SSIIB 1-5' and 1-3'. In the previous testing method, theoretically estimated 40 copies of the pART plasmid were used as the DNA template for IPC reaction. Meanwhile, in this study, the concentration of the pART plasmid solution was maintained

at 17–23 copies/ μL , and 1 μL of the solution was added to the reaction mixture. The modified testing protocol was as follows:

Step 1⁴⁾. A grain counter plate (For 100 Soybeans; Fuji Kinzoku, Tokyo, Japan) is ready, and only 20 holes are made available by covering the plate with a sheet of a cellophane film or aluminum foil. Twenty maize kernels are scooped as one group with the plate and are put into glass vessels (sample capacity, 75 mL) of a Milser 800-DG household food processor (Iwatani, Tokyo, Japan). An analyst can determine the number of groups in one experiment depending on the analytical purpose.

Step 2⁴⁾. One liter of lysis buffer is prepared from 20 mL of a 1 mol/L Tris-HCl buffer solution (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), 10 mL of a 0.5 mol/L EDTA solution (Nacalai Tesque), 80 mL of a 5 mol/L NaCl solution (Nacalai Tesque), 30 mL of a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution (Nacalai Tesque), and ultrapure water. Twenty milliliters of the lysis buffer is added to each glass vessel. Each group is ground for 20 s by means of the household food processor. The lysates in glass vessels are incubated for 10 min at room temperature, and then the glass vessels are vigorously shaken by hand. After 10 min of static standing for separation of the solid and liquid phases, 50 μL of the supernatant is transferred to a plastic tube. The sample of each supernatant is diluted twofold with sterile distilled water. The diluted solution is centrifuged at more than 1,000 $\times g$ on a personal benchtop centrifuge for 1 min, and then the supernatant is used as a DNA template for the following PCR assay.

Step 3. The DNA templates are analyzed by the two duplex real-time PCR assays, i.e., the GM maize screening assay and experimental control assay. In the GM maize screening assay, the reaction mixture (25 μL) consists of 12.5 pmol of primers P35S 1-5' (5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'), P35S 1-3' (5'-CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'), TNOS 2-5' (5'-GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG-3'), and TNOS 2-3' (5'-CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT-3'); 2.5 pmol of probes P35S-Taq (5'-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-3') and TNOS-Taq (5'-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-3'); 2.5 μL of a DNA template; 12.5 μL of 2 \times DirectAce qPCR Mix (Nippon gene); and 0.5 μL of the ROX Passive Reference solution enclosed with the DirectAce qPCR Mix. In the experimental

control assay, the reaction mixture (25 μL) consists of 12.5 pmol of primers IPC 1-5', IPC 1-3', SSIIB 3-5' (5'-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3'), and SSIIB 3-3' (5'-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3'); 2.5 pmol of probes IPC 1-Taq and SSIIB-Taq (5'-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-3'); 1 μL of the IPC plasmid solution; 2.5 μL of a DNA template; 12.5 μL of 2 \times DirectAce qPCR Mix; and 0.5 μL of ROX Passive Reference solution. The oligonucleotides as PCR primers and TaqMan probes were both synthesized by Fasmac (Atsugi, Japan). P35S-Taq, TNOS-Taq, and IPC 1-Taq were labeled with the dyes FAM and BHQ1 at the 5' and 3' termini, respectively. For SSIIB-Taq, hexachlorofluorescein (HEX) was used in place of FAM. The thermal cycling conditions were as follows: 10 min at 95°C and 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 65°C in 9600 emulsion mode. All real-time PCR analyses are performed on a 7900HT real-time PCR instrument (Life Technologies).

Step 4⁴⁾. Data analysis is conducted in the Sequence Detection Software, version 2.3. The manual threshold cycle (C_t) mode (thresholds: 0.256 for FAM and 0.064 for HEX) and manual baseline mode (start of baseline, 3; end of baseline, ¹⁵⁾ are set in the "Delta Rn vs. Cycle" view of the "Amplification Plot" option. When the C_t values are below 40, the reaction result is labeled positive. If the result of SSIIB or IPC detection by the experimental control assay is found to be negative, the group in question is rejected. If both SSIIB and IPC yield positive results, the group is labeled either GM positive or GM negative depending on the result of the GM maize screening assay.

3. Evaluation of the inhibition tolerance of real-time PCR analysis

In accordance with the modified method, 20 kernels of a non-GM maize material were ground, and crude extract was obtained. Then, the crude extract was analyzed as a DNA template by real-time PCR in the experimental control assay as described above except for the amount of crude extract in the PCR mixtures. We added the crude extract in the amounts of 2.5, 3.3, 4.2, and 5 μL corresponding to 1-, 1.33-, 1.67-, and 2-fold amounts relative to those defined in the protocol, respectively. For comparison with the previously reported method⁴⁾, we also performed a real-time PCR analysis where BIOTAQ HS DNA polymerase (Shimadzu, Kyoto, Japan) and 12.5 μL of 2 \times Ampdirect Plus buffer (Shimadzu) were

used instead of 2 × DirectAce qPCR Mix.

4. Evaluation of specificity of real-time PCR under the modified conditions

The samples of genomic DNA extracted from genuine GM and non-GM maize materials were analyzed by real-time PCR under the modified conditions. C_t values were determined in triplicate for each DNA sample in one PCR run.

5. Evaluation of the limit of detection (LOD) of the modified group testing method

We prepared simulated group samples consisting of one GM and 19 non-GM kernels. As the GM material, F1-generation seeds of MON810 were used. As the non-GM material, 15 kinds of maize samples were used. Two group samples were prepared for each kind of non-GM material; thus, 30 samples were prepared. The samples were analyzed according to the modified group testing method.

6. The method for identification of GM events after the group testing

We used a DNA extraction kit, GM quicker (Nippon Gene), for DNA purification from the residual cell lysate generated during the group testing. First, 600 μ L of each supernatant of a lysate sample was transferred into a 1.5-mL microcentrifuge tube, and then 4 μ L of an RNase A solution (100 mg/mL) was added, and the mixture was vortexed vigorously. After that, the mixture was incubated for 5 min at room temperature. Then, 75 μ L of GE2 buffer was added, and the mixture was vortexed vigorously. After standing still on ice for 5 min, the mixture was centrifuged for 5 min at 13,000 $\times g$, and 400 μ L of the supernatant was transferred to a 1.5-mL microcentrifuge tube. Next, 50 μ L of GB3 buffer and 200 μ L of ethanol were added, and the mixture was vortexed. The mixture was transferred to a silica membrane spin column and centrifuged for 30 s at 13,000 $\times g$. After removal of the filtrate, 600 μ L of GW buffer was added to the spin column, and the spin column was centrifuged for 1 min at 13,000 $\times g$. After removal of the filtrate, the spin column was recentrifuged for 1 min at 13,000 $\times g$ and placed in a collection tube. The DNA retained in the column was eluted by addition of 50 μ L of sterile water, incubation for 3 min at room temperature, and centrifugation for 1 min at 13,000 $\times g$. The resulting DNA

extracts were diluted to 20 ng/ μ L with sterile water on the basis of UV absorbance measurement, and then the diluted samples were subjected to the real-time PCR array analysis targeting for GM maize events (Bt11, GA21, Event176, MON810, MON863, NK603, T25, TC1507, DAS-59122-7, MIR604, and MON88017) and the endogenous reference gene of maize, SSIIb, as reported previously^{10,11}.

7. The blind test of group testing and GM event identification

For preparation of blinded samples, authentic materials of MON810, MON863, MON88017, NK603, and non-GM maize were used. We prepared groups consisting of either one GM and 19 non-GM kernels or 20 non-GM kernels. Groups including a MON810 MON863, MON88017, or NK603 kernel were named A, B, C, and D, respectively. Twenty group samples were defined as a set of blinded samples. Ten groups were intended for the first screening, and three non-GM groups and seven GM groups (groups A, B, C, or D) were randomly mixed and numbered from one to 10.

Another 10 groups were intended for additional analysis, and four non-GM groups and six GM groups (groups A, B, C, or D) were randomly mixed and numbered from 11 to 20. In total, 13 groups in the set of blinded samples contained GM kernels. We prepared three sets of blinded samples.

An analyst (who was given no information on the samples) performed group testing according to the testing protocol described above. Ten groups were analyzed in one experiment using the modified method. After the group testing, the analyst performed the GM event identification as described above.

Results and Discussion

1. Modifications of the group testing method

We recently developed a real-time PCR master mix, the DirectAce qPCR Mix, which allows for stable DNA amplification even from crude cell lysates⁸. In the present study, we introduced the master mix reagent into the group testing method. Because the reagent was optimized for TaqMan real-time PCR analysis and is tolerant of PCR inhibitors, we expected a decrease in the number of false negative results caused by PCR inhibition. We indeed confirmed the improvement of tolerance to PCR inhibitors

in a crude maize extract (Fig. 2). Under the modified PCR conditions, DNA amplification was observed, even though the crude maize extract was present in the 1.67-fold amount relative to the previously reported method. Additionally, the use of the master mix reagent made preparation of the reaction mixture simpler because DNA polymerase, magnesium ions, deoxyribonucleotide triphosphates, and the buffer are already mixed in the reagent.

In our previous study⁴⁾, calculated 40 copies of the pART plasmid were used as a DNA template in the IPC reaction. In contrast, in this study, the concentration of the pART plasmid solution was maintained between 17 and 23 copies/ μL by the digital PCR analysis, and then 1 μL of the solution was added to the reaction mixture. A reduction in the copy number of the target sequence was expected to make the IPC reaction more sensitive to PCR inhibition.

In the official testing method notified from the Consumer Affair Agency¹²⁾, the primer set SSIIB 3-5' and 3-3' is used for detecting a maize endogenous reference gene. Additionally, the primer set was recently incorporated into the "JAS Analytical Test Handbook." In order to improve the user friendliness by means of the same reagent for the

existing testing methods, we chose the primer set SSIIB 3-5' and 3-3' for the group testing.

2. Specificity of real-time PCR under the modified conditions

In the previous study⁴⁾, we evaluated specificity of real-time PCR assays by means of 11 GM maize events. Since then, however, several more GM events have been approved. We used 14 GM maize events for the specificity evaluation in the present study. DNA extracts from genuine materials were analyzed by the real-time PCR assays under the modified conditions (Fig. 3). P35S and/or TNOS regions were detected for all GM maize events, and the C_t values of detection roughly corresponded to the total copy numbers of P35S and TNOS regions in each event. Non-specific detection was not observed among non-GM maize samples, as expected. On the basis of these results, we concluded that the real-time PCR under the modified conditions can detect commercially available GM maize events and stacked-event products derived from these single events.

3. Evaluation of LOD of the modified group testing

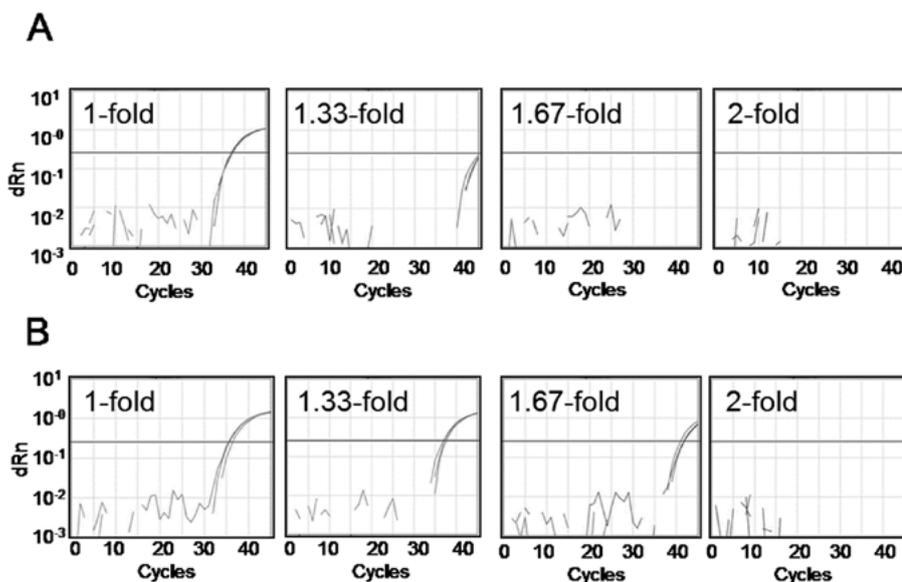


Fig. 2 Evaluation of PCR inhibition by crude maize extract.

We performed an experimental control assay with various amounts of crude maize extract, and the DNA amplification curves in the IPC reaction are shown. The amount of crude maize extract that was analyzed in the testing protocol was defined as "one-fold" and the multipliers indicating the actual added amounts are shown in each panel. A, the previously reported PCR conditions; B, the modified PCR conditions (this study).

method

The LOD of the modified method was assessed by means of simulated group samples containing a single GM kernel among 20 kernels (Fig. 4). This condition yields the smallest amount of GM DNA in the crude cell lysate of grains and makes it possible to test whether the smallest amount of GM DNA results in accurate PCR detection. To prepare the simulated samples, we selected F1-generation seeds of MON810 as a GM material because it has only a single copy of P35S in its diploid genome. As non-GM material, we used various varieties of maize to evaluate the LOD by taking into consideration differences due to the varieties if any. All of the reactions showed the expected DNA amplification, and all of the simulated samples were determined as GM positive. The false negative rate was estimated to be 0%, which fulfilled the criterion for the LOD for qualitative GMO detection methods according to the ISO standards regarding GMO analysis¹³). Additionally, we found that the DNA amplification was not affected by the differences among maize varieties. Thus, the modified method was confirmed to show sufficiently enough performance for reliable detection of a single GM kernel in

a group sample.

4. Design of the method for GM event identification following group testing

The P35S and TNOS regions introduced into the GM crops were originally derived from a common plant virus and a soil bacterium, respectively. This situation implies that the positive results of the P35S and TNOS detection may be attributed to the presence of the virus and bacterium in the analytical samples. When the group testing targeting P35S and TNOS was performed, if a bulk sample was contaminated by the virus and/or bacterium, then the sample may be rejected erroneously. In order to implement the group testing for a regulatory inspection, it is necessary to provide a method that precludes false positive detection caused by the contamination with viruses or bacteria. We therefore needed the testing method to identify GM events in group samples. The method is expected to be applied to the samples whose GMO content was estimated to be above 5% by the group testing. We investigated the conditions for DNA extraction from the residual lysate samples, and a suitable procedure was established as described in the

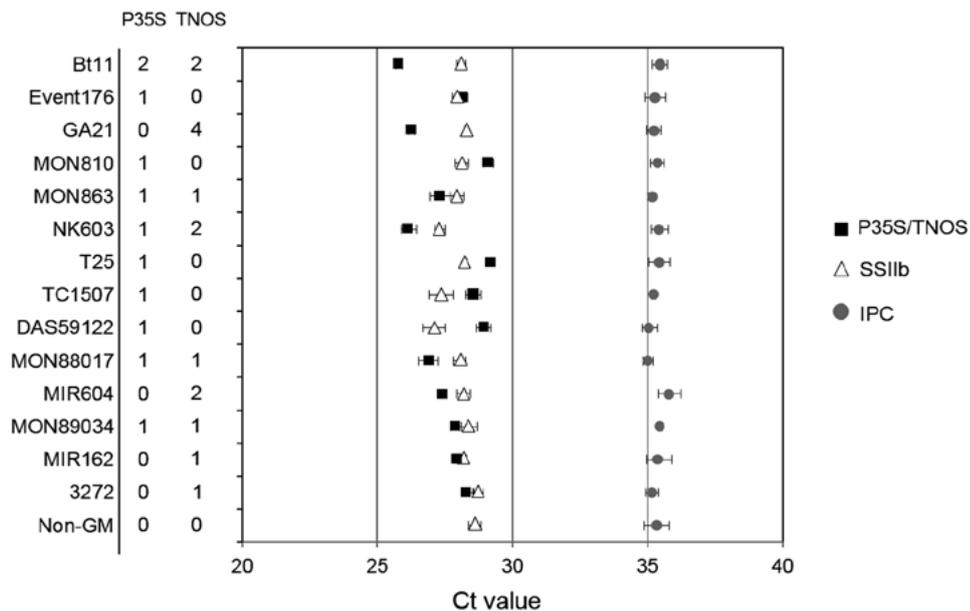


Fig. 3 Evaluation of specificity of real-time PCR in the modified method.

We analyzed various DNA templates by the GM maize screening assay (P35S/TNOS) and by the experimental control assay (IPC/SSIIb). The mean Ct values of three measurements and their standard deviations are shown.

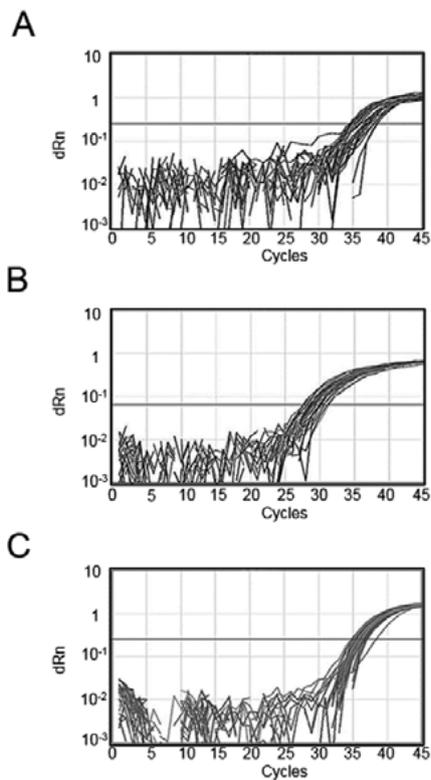


Fig. 4 LOD evaluation of the modified method.

DNA amplification curves for 30 group samples are shown. A, P35S/TNOS detection; B, SSIIB detection; C, IPC detection.

Materials and Methods section. For PCR analysis of the resulting DNA samples, we adopted the real-time PCR array method that we reported previously^{10, 11}. The real-time PCR array is a multi-target detection system using 96-well PCR plates to which the primer and TaqMan probe mixtures are added (into the predefined wells). In this study, we implemented the SSIIB-specific detection and event-specific detection for Bt11, GA21, Event176, MON810, MON863, NK603, T25, TC1507, DAS-59122-7, MIR604, and MON88017. Nevertheless, we could change the detection targets depending on a situation because the real-time PCR array is highly flexible in terms of detection targets.

This is the first report on a method for GM event identification after group testing.

5. The blind test of group testing and GM event identification

To evaluate reliability of the entire testing process, we carried out a blind test of the group testing and of the

subsequent GM event identification.

As an official testing method in Japan¹², the individual kernel detection method has already been adopted to determine whether GMO content in a bulk sample exceeds 5%. The testing procedure requires analysis of 90 kernels for the first screening. If there are three or more GM kernels among the first 90 kernels tested, another set of 90 kernels must be tested. If the total number of GM kernels in the two tests (180 kernels) is nine or less, then the GMO content of the bulk sample is below 5% and is acceptable⁴. According to the published statistics^{14, 15}, we previously determined the testing conditions and acceptance criteria of the group testing at the same accuracy of analysis as in the individual kernel detection method. The defined testing conditions and criteria were as follows: A group is comprised of 20 maize kernels, and 10 groups are analyzed for the first screening. If seven or more groups are found to be GM positive in the first screening, an additional set of 10 groups will be analyzed. If the total number of GM-positive groups in the two tests (20 groups) combined is 12 or less, then GMO content of the bulk sample is determined to be below 5%⁹. For the blind test, we prepared three sets of 20 group samples (10 groups for the first screening and 10 groups for the additional analysis) as blind samples to perform the group testing in accordance with the fixed testing conditions as shown above. In order to evaluate the method performance of the GM event identification, we used four representative GM events (MON810, MON863, NK603, and MON88017) as GM materials. Additionally, all sets of blind samples were designed to be rejected based on the acceptance criteria and the samples were destined for the GM event identification.

An analyst in our laboratory who did not know the sample composition performed the group testing according to the modified method described above. All of the results showed the expected positive/negative determinations corresponding to the presence/absence of a GM kernel in each group (Table 1). The results indicated that the method certainly detected the presence of GM kernels and that there was no cross-contamination among the group samples. During the group testing, it is necessary to unmistakably detect a GM kernel in a group sample for accurate evaluation of GMO content. We concluded that the modified method shows adequate performance, and that the analyst who precisely conducts the experiment can obtain accurate results without cross-contamination.

Afterwards, the same analyst performed GM event identification only on the test-positive samples as determined by the group testing. The average concentration of the resulting DNA extracts was 96.1 ng/ μ L, and the standard deviation was 10.0 ng/ μ L. The DNA extraction method was found to yield a sufficient amount of DNA for the

subsequent PCR analysis. We then performed the real-time PCR array analysis of each DNA extract. The representative results of the real-time PCR array are shown in Fig. 5. In this method, when the amplification curve crossed the threshold line, this situation was labeled as a positive result. Each sample showed DNA amplification curves both in the SSIIb

Table 1. Results of the blind test.

Set 1	Sample number																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
GM kernel admixed	-	B	-	D	A	-	D	B	A	C	-	C	A	D	-	A	C	-	-	B
Result of group testing	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
Result of GM event identification	NA	B	NA	D	A	NA	D	B	A	C	NA	C	A	D	NA	A	C	NA	NA	B

Set 2	Sample number																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
GM kernel admixed	B	A	C	-	-	-	C	A	D	C	-	A	-	D	B	B	-	B	D	-
Result of group testing	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Result of GM event identification	B	A	C	NA	NA	NA	C	A	D	C	NA	A	NA	D	B	B	NA	B	D	NA

Set 3	Sample number																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
GM kernel admixed	-	-	D	-	A	C	B	D	A	A	-	-	-	D	-	C	B	C	C	B
Result of group testing	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Result of GM event identification	NA	NA	D	NA	A	C	B	D	A	A	NA	NA	NA	D	NA	C	B	C	C	B

+, positive detection - , negative detection A, MON810. B, MON863. C, NK603. D, MON88017. NA, not analyzed.

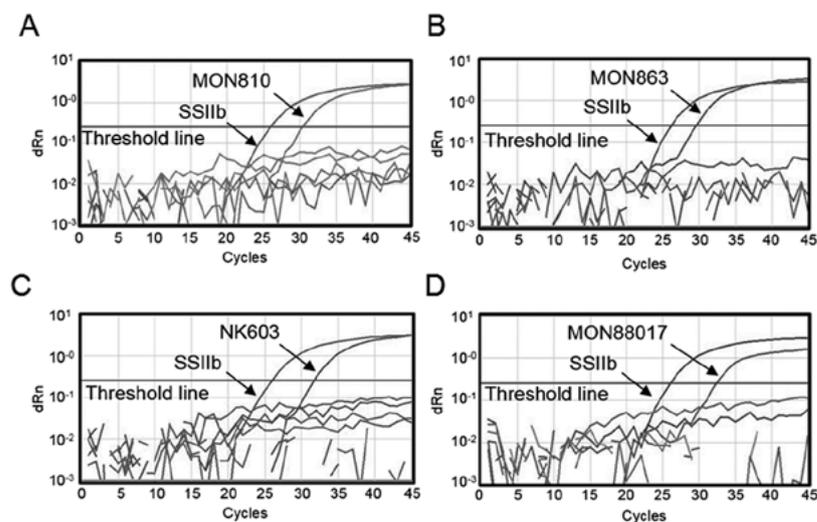


Fig. 5 Representative results of the real-time PCR array analysis for GM event identification.

A, a group sample containing a MON810 kernel; B, a group sample containing a MON863 kernel; C, a group sample containing a NK603 kernel; D, a group sample containing a MON88017 kernel.

detection assay as a positive control and in the respective event-specific assay corresponding to the GM event admixed in the samples. All the results of the GM event identification in the blind test completely matched the admixed GM events in the respective simulated samples, suggesting that our method of GM event identification was also reliable.

Conclusion

In this study, the group testing method was improved to enhance reliability and user friendliness. A method of GM event identification after the group testing was also developed. These methods were validated on the basis of the results of in-house evaluation and a blind test. They are expected to be applicable to evaluation of GMO content in batches of maize grains for verification of food labeling.

Acknowledgments

We thank Monsanto, Pioneer Hi-Bred International, and Syngenta Seeds for providing plant materials. We are grateful to Dr. Shigehiro Naito for the information about validation of the method. This research was funded by grants from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, "Research Project for Genomics for Agricultural Innovation GAM-211" and "Research Project for Genomics-based Technology for Agricultural Improvement GRA-201-1-1," and by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- 1) Hino, A. Safety assessment and public concerns for genetically modified food products: The Japanese experience. *Toxicol. Pathol.*, **30**, 126-128 (2002).
- 2) James, C. Executive summary of global status of commercialized biotech/GM crops: 2012. ISAAA Brief, **44** (2012).
- 3) Akiyama, H., Watanabe, T., Wakabayashi, K., Nakade, S., Yasui, S., Sakata, K., Chiba, R., Spiegelhalter, F., Hino, A., Maitani, T. Quantitative detection system for maize sample containing combined-trait genetically modified maize. *Anal. Chem.*, **77**, 7421-7428 (2005).
- 4) Mano, J., Yanaka, Y., Ikezu, Y., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Yotsuyanagi, Y., Spiegelhalter, F., Akiyama, H., Teshima, R., Hino, A., Naito, S., Koiwa, T., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K. Practicable group testing method to evaluate weight/weight GMO content in maize grains. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 6856-6863 (2011).
- 5) Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of the genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *Eur. Food Res. Technol.*, **240**, 413-422 (2015).
- 6) Akiyama, H., Sakata, K., Kondo, K., Tanaka, A., Liu, M., Oguchi, T., Furui, S., Kitta, K., Hino, A., Teshima, R. Individual detection of genetically modified maize varieties in non-identity-preserved maize samples. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1977-1983 (2008).
- 7) Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R. Quantification and identification of genetically modified maize events in non-identity-preserved maize samples in 2009 using an individual kernel detection system. *Food Hyg. Saf. Sci.*, **53**, 157-165 (2012).
- 8) Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K. Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of foods and agricultural products. *Food Hyg. Saf. Sci.*, **55**, 25-33 (2014).
- 9) Japanese Agricultural Standard (JAS) analytical test handbook: genetically modified food quality, labeling analysis manual for individual products (Sept. 24, 2012). The Food and Agricultural Materials Inspection Center, Japan. http://www.famic.go.jp/technical_information/jashandbook/gmo/manual_3.pdf (Jan. 14, 2016)
- 10) Mano, J., Shigemitsu, N., Futo, S., Akiyama, H., Teshima, R., Hino, A., Furui, S., Kitta, K. Real-time PCR array as a universal platform for the detection of genetically modified crops and its application in identifying unapproved genetically modified crops in Japan. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 26-37 (2009).
- 11) Mano, J., Harada, M., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Noritake, H., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Iizuka, T. Comprehensive GMO detection using real-time PCR array: single-laboratory validation. *J. AOAC Int.*, **95**,

- 508-516 (2012).
- 12) Notification No. 201 (Nov. 16, 2012), Food Labeling Division, Consumer Affair Agency, Government of Japan.
 - 13) International Standardization Organization. ISO 24276 Foodstuffs--Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products--General requirements and definitions; Geneva, 2006.
 - 14) Remund, K. M., Dixon, D. A., Wright, D. L., Holden, L. R. Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Sci. Res.*, **11**, 101-119 (2001).
 - 15) Laffont, J. L., Remund, K. M., Wright, D., Simpson, R. D., Grégoire, S. Testing for adventitious presence of transgenic material in conventional seed or grain lots using quantitative laboratory methods: statistical procedures and their implementation. *Seed Sci. Res.*, **15**, 197-204 (2005).

遺伝子組換えトウモロコシの混入率評価を目的とする グループテスト法の改良

真野潤一¹, 高島かおり¹, 布藤聡², 峯岸恭孝³, 二宮健二⁴, 野口秋雄⁵,
近藤一成⁵, 手島玲子⁵, 高畠令王奈¹, 橘田和美^{1*}

¹ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

² 株式会社ファスマック

³ 株式会社ニッポンジーン

⁴ 株式会社島津製作所

⁵ 国立医薬品食品衛生研究所

要 旨

複数の遺伝子組換え (GM) 系統の掛け合わせによるスタック品種の使用拡大に伴い, リアルタイム PCR による定量検知法は, GM トウモロコシの混入率を実際よりも過大に評価する傾向にある. この問題を解決するため, トウモロコシ穀粒中の組換え体混入率を正確に評価することができるグループテスト法をこれまでに提案している. 本研究では, 既報の分析法の利便性および信頼性を向上させるため, 分析法を改変し, 室内妥当性確認を行った. また, グループテスト後に GM 系統を特定する試験法を確立した. 最初に, トウモロコシの各種 GM 系統及び非組換え体の純粋な試料を用いて, 改変法の反応特異性を確認した. また, 検出限界の評価を行い, 改変法が 20 粒中に 1 粒含まれる GM 穀粒を確実に検出できることを確認した. 次に, 擬似混入試料を用いたブラインド試験を実施した. 全ての擬似混入試料で, 試料中の GM の有無に対応した分析結果が得られた. また, グループテストで使用した細胞溶解液から DNA を精製し, それをリアルタイム PCR アレイ法で分析することで, グループテストの試料に含まれていた GM 系統の正確な特定が可能であった.

キーワード: 遺伝子組換え, グループテスト法, 妥当性確認

研究ノート

Production of monodisperse oil-in-water emulsions using asymmetric micro through-holes compactly arranged on a metallic chipIsao Kobayashi^{1*}, Yanru Zhang^{1,2}, Ran Li^{1,3}, Kunihiko Uemura¹, Mitsutoshi Nakajima^{1,2}¹ National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan.² Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan.³ Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan.**Abstract**

The aim of this study was to produce monodisperse oil-in-water (O/W) emulsions using a metallic microchannel emulsification (MCE) chip containing 171 compactly arranged asymmetric micro through-holes. Each asymmetric micro-through-hole that was fabricated on an aluminum chip consisted of a circular microhole with a 100- μm diameter (1650- μm depth on the inlet side) and a microslot on the outlet side with a 100 \times 700- μm cross-section and 350- μm depth. Uniformly sized silicone oil droplets with an average diameter (d_{av}) of 291.5 μm and the coefficient of variation (CV) of 3.9% were smoothly formed by means of the asymmetric micro through-holes at the flow rate of the dispersed phase (Q_d) of 1.0 mL/h without a cross-flowing continuous phase. Metallic MCE chips have advantages over silicon MCE chips in terms of durability vis-à-vis alkaline cleaning and shocks as well as modifications of through-hole dimensions.

Key words: Microchannel emulsification; oil-in-water emulsion; metallic chip

Introduction

Emulsions are thermodynamically metastable systems, meaning that emulsion stability can be analyzed within a finite period. Droplet coalescence, which eventually causes phase separation, is strongly influenced by droplet size and by its distribution of emulsion products. Emulsions with narrow distributions of droplet sizes are usually called monodisperse emulsions. Such emulsions are advantageous owing to improved stability versus droplet coalescence

and easier control and interpretation of major emulsion properties (McClements, 2004). These characteristics have attracted researchers from various fields including the food industry. Monodisperse emulsions are also available as templates useful for producing monodisperse microparticles and microcapsules.

Microchannel emulsification (MCE) is a promising method for producing monodisperse emulsions (Kobayashi and Ichikawa, 2015) because this approach involves a robust and very mild process of droplet formation. Microchannel (MC) arrays with unique geometric features

*Corresponding author (Phone: +81-29-838-8025, Fax: +81-29-838-8122, e-mail: isaok@affrc.go.jp)

enable stable droplet formation that is insensitive to the flow rate of each phase below a critical value (Kobayashi et al., 2010). Previous MCE studies showed production of monodisperse emulsions (containing bioactive compounds) with droplet sizes of $>1 \mu\text{m}$ and the minimal coefficient of variation (CV) of $<5\%$ (Kobayashi and Ichikawa, 2015). Monodisperse emulsions obtained by MCE have been used for fabricating food-grade monodisperse micromaterials, e.g., lipid microparticles, gel microbeads, and coacervate microcapsules (Kobayashi and Ichikawa, 2015).

To date, silicon-based MC array chips have been mainly developed for MCE, which can be ascribed to precise microfabrication of MC arrays, extremely flat chip surfaces, and controlled modification of chip surfaces (Vladislavjević et al., 2012). Studies on MCE have also been performed on nonsilicon MC array chips made of a polymer (poly[methyl methacrylate]) (Liu et al., 2005; Kobayashi et al., 2008) or metal (stainless steel) (Kobayashi et al., 2012). MC arrays can be categorized into parallel microgrooves and micro through-holes (Kobayashi and Ichikawa, 2015). Asymmetric micro through-holes that are compactly arranged on a chip have higher droplet productivity in comparison with the other types of MC arrays. In MCE, asymmetric micro through-holes that are currently available are formed on a silicon-based chip; their drawbacks include intolerance toward alkaline cleaning, shock fragility, and difficulties with modification of through-hole dimensions.

We therefore explored the fundamental production characteristics of oil-in-water (O/W) emulsions by MCE using asymmetric micro through-holes compactly arranged on an aluminum chip.

Materials and methods

Reagents and preparation of the solution

Silicone oil with dynamic viscosity of $48.5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ at 25°C (KF96-50) was purchased from Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20; hydrophilic-lipophilic balance [HLB] 16.7) was purchased from Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd. (Osaka, Japan). A continuous-phase solution was prepared by dissolving Tween 20 in Mill-Q water at the emulsifier concentration of $1.0 \text{ wt}\%$. All the reagents were used as received.

Experimental setup and the procedure

The emulsification experiments were performed on a custom-made MCE system (Kobayashi et al., 2014). Figure 1(a) schematically depicts an aluminum MCE chip containing asymmetric micro through-holes. Each asymmetric micro through-hole consists of a circular microhole with a $100\text{-}\mu\text{m}$ diameter and $1650\text{-}\mu\text{m}$ depth on the inlet side and a microslot

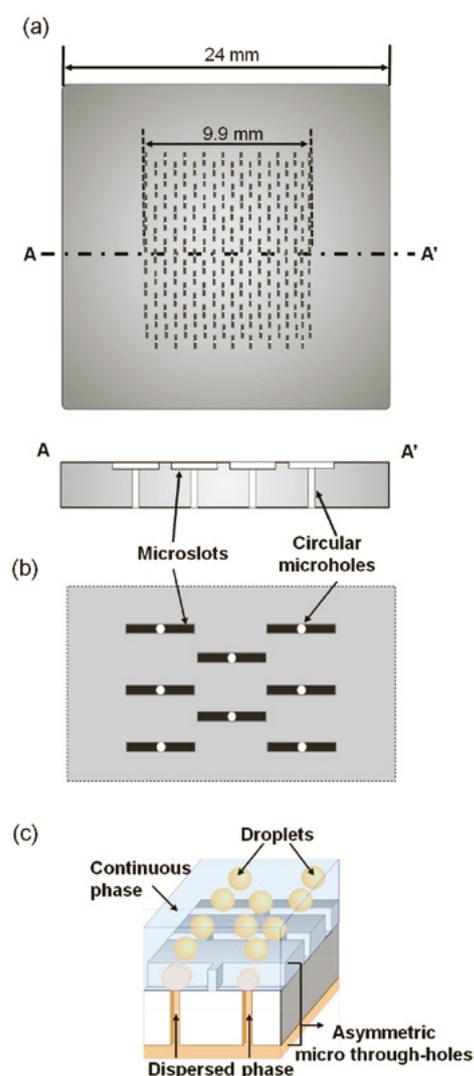


Fig. 1 (a) Schematic top and cross-sectional views of aluminum MCE chip containing asymmetric micro through-holes. (b) Magnified schematic top view of asymmetric micro through-holes. (c) Three-dimensional schematic drawing of droplet generation via asymmetric micro through-holes.

on the outlet side with a $100 \times 700\text{-}\mu\text{m}$ cross-section and $350\text{-}\mu\text{m}$ depth. As shown in Fig. 1(b), the asymmetric micro through-holes are compactly arranged at the center of the chip. One hundred seventy-one asymmetric micro through-holes were fabricated by microdrilling to obtain circular microholes and by means of subsequent electric discharge machining for forming microslots.

Prior to each experiment, the aluminum MCE chip was surface-oxidized using a plasma reactor (PR-500, Yamato Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan) to make its surface hydrophilic. This MCE chip was fixed in a module prefilled with a continuous phase. A dispersed phase from a 10-mL glass syringe was fed into the module by means of a syringe pump (Model 11 Plus; Harvard Apparatus, Inc., Holliston, USA). The continuous phase from a 1-L plastic tank was fed into the module by means of hydrostatic pressure. To form oil droplets, we injected the dispersed phase introduced into the module via the asymmetric micro through-holes in the presence or absence of the cross-flowing continuous phase at ambient temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$; Fig. 1(c)). A microscopic video system (Kobayashi et al., 2014) was used for *in situ* and real-time monitoring of the droplet formation from the slot outlets.

Measurement of droplet size

The diameters of the oil droplets formed were manually measured using image analysis software (WinRoof, Mitani Co., Fukui, Japan). The number- average droplet diameter (d_{av}) was determined by dividing the number of the measured droplets ($n = 200$) by the sum of the droplet diameters. CV was used as an indicator of the droplet size distribution and was calculated as follows:

$$CV = (\sigma/d_{av}) \times 100 \quad (1)$$

where σ is the standard deviation of the droplet diameter.

Results and discussion

Figure 2(a) shows typical formation behavior of oil droplets on an aluminum MCE chip containing asymmetric micro through-holes at the flow rate of the dispersed phase (Q_d) of 1.0 mL/h and the flow rate of the continuous phase (Q_c) of 200 mL/h . This Q_d corresponds to the dispersed-phase flux (J_d) of $10\text{ L}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$. Oil droplets smoothly and periodically formed and detached from the slot outlets. Such successful droplet formation was observed in $\sim 85\%$ of slot

outlets, and the droplet formation rate for each active micro-through-hole was between 0.11 and 0.13 s^{-1} . As shown in Fig. 2(b), the formed oil droplets were of uniform size and were closely packed on top of the compartment above the chip surface in the absence of the cross-flowing continuous phase. No droplet coalescence occurred during microscopic observation for 1 h.

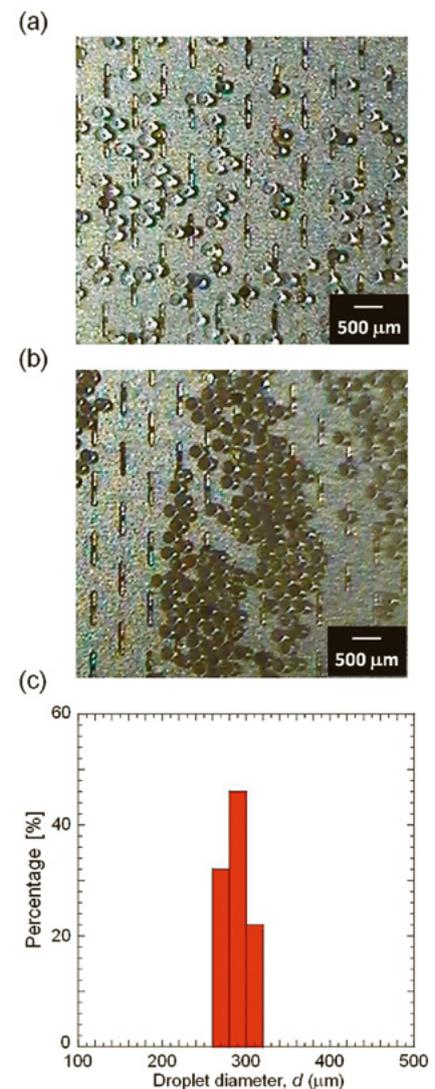


Fig. 2 (a), (b) Typical generation and detachment of oil droplets from the outlets of asymmetric micro through-holes fabricated on an aluminum chip. (c) Size distribution of the oil droplets obtained using the aluminum MCE chip.

The size distribution of the oil droplets that were formed by means of the aluminum MCE chip is presented in Fig. 2(c). The resultant oil droplets had d_{av} of 291.5 μm and CV of 3.9%; these data are suggestive of their monodispersity. Their size distribution also contained a sharp monomodal peak; this pattern is similar to that of the oil droplets formed by means of a silicon MCE chip (Kobayashi et al., 2010). This d_{av} was 2.9-fold greater than the microhole diameter. In MCE, d_{av} is mainly dependent on the microhole diameter and slot depth and ranges from 20 to 180 μm (Kobayashi et al., 2010; Khalid et al., 2015), indicating that d_{av} of the oil droplets obtained here is acceptable. The droplet formation rate for the whole MCE chip was found to be $7.7 \times 10^4 \text{ h}^{-1}$. The aluminum MCE chip that we used here contained compactly arranged micro through-holes, just as silicon MCE chips do (Kobayashi et al., 2010), suggesting that it is possible to produce monodisperse emulsions at high productivity in terms of droplets. The cross-flowing continuous phase that we used here did not affect the resultant oil droplet size (data not shown). The Reynolds number of this cross-flowing continuous phase (Re_c) can be calculated by means of the formula

$$Re_c = \rho_c U_c d_{eq, ch} / \eta_c = \rho_c U_c (4A_{ch} / L_{ch}) / \eta_c \quad (2)$$

where ρ_c is the continuous-phase density, U_c is the average continuous-phase velocity in the compartment above the chip surface, $d_{eq, ch}$ is the equivalent diameter of the compartment, L_{ch} is the wetted perimeter of the compartment, and η_c is the continuous-phase viscosity. The Re_c value of 0.7 that we obtained here means laminar flow of the cross-flowing continuous phase. We believe that shear stress resulting from the cross-flowing continuous phase is too low to enhance droplet detachment from the slot outlets.

The results of this study are discussed below. Although it was possible to microscopically examine formation of droplets from the slot outlets, the contours of the expanding and detached droplets were less clear-cut than those for a silicon chip. This difference is attributable to the difference in surface roughness of silicon and aluminum MCE chips. The surface roughness of silicon MCE chips is less than 0.01 μm , whereas that of aluminum MCE chips is thought to be greater than 0.1 μm . Diffuse light reflection, in principle, increases with the increasing surface roughness. The greater surface roughness of the aluminum MCE chips causes greater diffused reflection of light from the chip

surface; this situation may make the contours of expanding and detached droplets blurry. The asymmetric micro through-holes that we fabricated were highly uniform: the size distribution of < 4%. This result fulfills the necessary condition of producing monodisperse emulsions. In contrast, the size of the oil droplets that were formed in this study is quite large for emulsion droplets; this situation is due to the large size of the asymmetric micro through-holes fabricated on the aluminum MCE chip. Further downsizing of such asymmetric micro through-holes is required to attain production of monodisperse emulsions with droplet sizes smaller than 100 μm for food-related and biotechnological applications.

In conclusion, a monodisperse O/W emulsion with uniformly sized oil droplets $\sim 300 \mu\text{m}$ in diameter was reliably produced here by means of a metallic MCE chip containing compactly arranged asymmetric micro through-holes. The surface roughness of MCE chips is the main factor affecting sharpness of the contours of expanding and detached droplets during microscopic examination.

References

- Khalid, N., Kobayashi, I., Marcos M. A., Uemura, K., Nakajima, M., Nabetani, H. (2015). Monodisperse aqueous microspheres encapsulating high concentration of L-ascorbic acid: Insights of preparation and stability evaluation from straight-through microchannel emulsification. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1852-1859.
- Kobayashi, I., Hirose, S., Katoh, T., Zhang, Y., Uemura, K., and Nakajima M. (2008). High-aspect-ratio through-hole array microfabricated in a PMMA plate for monodisperse emulsion production. *Microsyst. Technol.*, **14**, 1349-1357.
- Kobayashi, I., Hori, Y., Uemura, K., and Nakajima, M. (2010). Production characteristics of large soybean oil droplets by microchannel emulsification using asymmetric through holes. *Japan J. Food Eng.*, **11**, 37-48.
- Kobayashi, I., Wada, Y., Hori, Y., Neves, M. A., Uemura, K., and Nakajima M. (2012). Microchannel emulsification using stainless-steel chips: Oil droplet generation characteristics. *Chem. Eng. Technol.*, **35**, 1865-1871.
- Kobayashi, I., Zhang, Y., Neves, M. A., Hori, Y.,

- Uemura, K., and Nakajima M. (2014). Influence of electrolyte concentration on microchannel oil-in-water emulsification using differently charged surfactants. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **440**, 79-86.
- Kobayashi, I. and Ichikawa, S. (2015). Microchannel emulsification and improvement of the stability of food-grade monodisperse emulsion droplets through layer-by-layer deposition. *Japan J. Food Eng.*, **16**, 89-96.
- Liu, H., Nakajima, M., and Kimura, T. (2004). Production of monodispersed water-in-oil emulsions using polymer microchannels. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **81**, 705-711.
- McClements, D. J. (2004). Food emulsions: Principles, practice, and techniques. 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton.
- Vladisavljević G. T., Kobayashi, I., and Nakajima M. (2012). Production of uniform droplets using membrane, microchannel and microfluidic emulsification devices. *Microfluid. Nanofluid.*, **13**, 151-178.

金属チップ上に密に配置された非対称マイクロ貫通孔を用いた 単分散水中油滴型エマルションの作製

小林 功^{1*}, 張 晏如^{1,2}, 李 然^{1,3}, 植村 邦彦¹, 中嶋 光敏^{1,2}

¹ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

² 筑波大学生命環境系

³ 筑波大学大学院生命環境科学研究科

要 旨

本研究では、金属製のマイクロチャネル乳化チップを利用した単分散水中油滴（O/W）型エマルションの作製特性について検討した。前記チップの中央部には、171個の非対称マイクロ貫通孔が密に配置されている。個々の非対称マイクロ貫通孔は、入口側のマイクロホール（直径100 μm 、深さ1650 μm ）および出口側のマイクロスロット（断面サイズ100 \times 700 μm 、深さ350 μm ）が連結した状態で構成されている。分散相流量速度が1.0 mL/hの場合において、サイズが均一な微小油滴（平均液滴径291.5 μm 、変動係数3.9%）が、連続相のせん断流れを必要とせずにマイクロスロットの出口から安定的に作製された。金属製マイクロチャネル乳化チップは、耐アルカリ性、耐衝撃性、および貫通孔サイズの変更容易性の面においてシリコン製マイクロチャネル乳化チップよりも有利であるといえる。

研究ノート

Lactobacillus brevis の凝集を引き起こす物質の探索

齋藤 勝一*, 富田 理, 中村 敏英

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Screening of materials that cause the aggregation of *Lactobacillus brevis*

Katsuichi Saito*, Satoru Tomita, and Toshihide Nakamura

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO),
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

Screening of materials that cause the aggregation of *Lactobacillus brevis* was conducted in order to elucidate the adhesion and the aggregation mechanism of lactic acid bacteria, which involved in such as expression of probiotic effects of the bacteria. In addition to xylan and mucin, it was found that the macromolecules, especially to polysaccharides as dextran, polygalacturonic acid, pectin, and also DNA, could cause the aggregation of the strains. Furthermore, it was revealed that the autoaggregation was occurred by addition of fermentable sugars such as glucose and sucrose.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus brevis*, aggregation, adhesion, polysaccharide

緒言

乳酸菌は、チーズやヨーグルトなどの乳製品から、漬物や味噌、醤油、日本酒といった植物を原料とする様々な発酵食品の製造に関わる主要な発酵微生物である。また、プロバイオティクスとして、乳製品由来の乳酸菌を中心に整腸作用や免疫調整作用、アレルギー抑制作用などの保健機能の解明が進められている¹⁾。特に近年では、乳製品由来の乳酸菌とは異

なる特性を有するプロバイオティクスとして植物に由来する乳酸菌が注目され、その食品への積極的利用が進められている^{2,3)}。また、ヨーグルトのスターターである *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus* の2種の乳酸菌がサンシュユという植物から分離され、乳製品の製造に用いられる乳酸菌も元来植物に由来すると考えられた⁴⁾。このように乳酸菌は植物との関わりが深い菌種である。しかし、乳酸菌の機能解析は、その保健機能の観点から動物宿主や腸内細菌との相互作用解析に焦点が当てら

* 連絡先 (Corresponding author), k.saito@affrc.go.jp

れ、植物や植物成分との作用解析は研究が立ち遅れている現状にある。

以上を踏まえ、植物との関わりという観点からの乳酸菌の新機能の解明を目指し著者らが検討を行った結果、*Lactobacillus brevis*がキシランに付着し凝集するという作用を見出した⁵⁾。この付着機構を解析したところ、菌体表層とキシランの電荷による静電的な作用により付着作用が生じることを明らかにした。また、細胞表面に存在する細胞表層タンパク質 (surface layer protein: SLP)⁶⁾が電荷の安定性に関与し、SLPの状態や分子種が電荷の強弱や対象基質との親和性などに関与しているものと考えられた。更に胃腸管粘膜成分であるムチンにもキシラン同様に付着・凝集することを確認した⁵⁾。このことから、*L. brevis*が、植物、動物といった成分・環境を問わず静電的な非特異的な作用により幅広い対象に付着するものと考えられた。乳酸菌の付着作用は、人や動物の腸管への付着といった保健機能発現や、食品における乳酸菌の発生や発酵などに大きく関わっている。しかし、その詳細については未だ不明な部分が多く、乳酸菌がどのような物質に付着可能でどのような基質によって凝集が促進されるのか十分に明らかになっていない。

そこで本研究では、乳酸菌の付着・凝集作用の機構解明に向け、*L. brevis*の凝集を引き起こすキシラン、ムチン以外の物質の探索を行った。

実験方法

1. 使用菌株及び培養方法

乳酸菌として (独) 製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門 (NBRC) より分譲の *L. brevis* NBRC 3345, 3690, 12005, 12520, 13109, 13110, 107147^T の 7 株を用いた。各菌株を MRS 培地 (DifcoTM Lactobacilli MRS Broth (Becton Dickinson and Company)) で 30℃, 24時間静置培養し、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体を生理食塩水により洗浄後、菌体量の指標として OD₆₀₀ の濁度が約 2.0 となるように生理食塩水 (9.0 g/l NaCl, pH 無調整) に懸濁し以降の実験に供した。

2. 凝集作用の判定・評価

探索対象の物質として、表 1 に示す単糖、二糖、多糖などの糖類、DNA などの核酸、アルブミンなどのタンパク質やアミノ酸の合計 79 種を用いた。各物質を生理食塩水 (同上)、リン酸緩衝生理食塩水 (ダ

ルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Sigma-Aldrich), 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH₂PO₄, 8.0 g/l NaCl, 1.15 g/l Na₂HPO₄ (anhydrous), pH7.4), あるいはリン酸緩衝液 (23.4 g/l NaH₂PO₄ · 2H₂O と 53.7 g/l Na₂HPO₄ · 12H₂O を混合し pH7.2 に調整, pH7.2) に 2% となるように懸濁し、室温で 1 時間振盪後、遠心分離により得られた上清を試料溶液とした。菌体懸濁液と試料溶液を等量混合し、30℃ で 2 時間保温後、菌体の凝集・沈降の発生を目視にて観察した。加えて、一定量の懸濁液を試験管の中間点から抜き取りその OD₆₀₀ を測定することにより凝集作用の判定・評価を行った。凝集作用の評価は、(試料未添加 (対照) の OD₆₀₀) - (試料添加の OD₆₀₀) / (試料未添加 (対照) の OD₆₀₀) により定量的な相対凝集度⁷⁾を算出し、0 (凝集作用なし) ~ 1 (凝集作用大) の値を 0.25 毎に区切り 4 段階で評価を行った。各試料溶液の pH を測定し、pH を中性に調整する際には、緩衝能がリン酸緩衝液に劣るものの塩化ナトリウム濃度が生理食塩水に近いリン酸緩衝生理食塩水を用い検討を行い、リン酸緩衝生理食塩水では十分な緩衝能が得られなかった物質についてリン酸緩衝液を用いた評価を行った。以上の凝集作用の判定・評価方法の概要を図 1 に示した。

実験結果及び考察

各物質の添加による *L. brevis* の凝集作用の評価結果を表 1 に示した。また、凝集作用が確認できた物質については、pH 無調整の生理食塩水を用いた場合とリン酸緩衝生理食塩水あるいはリン酸緩衝液を用い pH を中性に調整した場合の作用を比較した。そのパターンにより、(A) 生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水あるいはリン酸緩衝液の両方の場合に凝集が確認できるもの、(B) 生理食塩水の場合にのみ作用が確認でき物質添加時の pH が 4 以上のもの、(C) 生理食塩水の場合にのみ作用が確認でき物質添加時の pH が 4 未満のもの 3 つのタイプに分類した。pH がおよそ 4 を下回る場合には物質を添加しなくとも菌体が自己凝集することを確認しており、このため pH を指標に B と C の区分を行った。

まず、A のタイプでは、pH が中性、酸性を問わず、デキストラン、ポリガラクトロン酸、ペクチン、CMセルロースナトリウム塩、そして DNA など、多糖を中心とする高分子でキシラン、ムチンと同様の凝集作用が見られた。*L. brevis* の菌体は負の電荷を有しており、同じく負の電荷を有するキシランとムチンに溶液

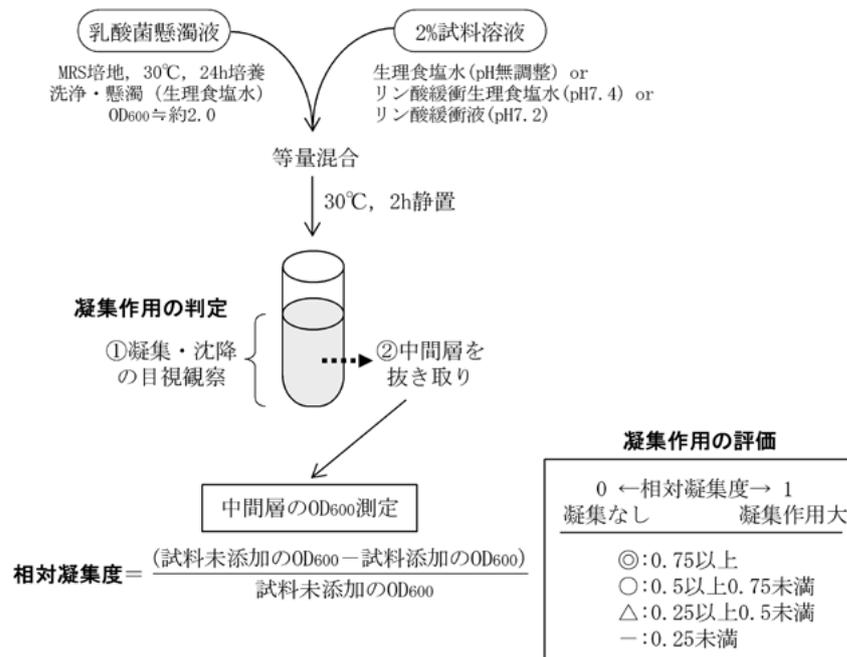


図1. 各種物質の添加による凝集作用の判定・評価方法

中のイオンを介し付着しているものと考えられている⁵⁾。DNAをはじめ今回凝集が確認できたAタイプの高分子も少なからず負の電荷を有するものと考えられ、キシラン、ムチンと同様に静電的な作用により菌体が付着し凝集するものと考えられた。一方で、同じく電荷を有する牛血清アルブミンやカゼインなどのタンパク質や各種アミノ酸では凝集作用が確認できなかった。デキストリンをはじめ作用が確認できなかった多糖に比べ作用が確認できた多糖は分岐や修飾などの側鎖構造が多い傾向にあり、ムチンやDNAも糖鎖や糖残基を含む。このため、本菌の付着・凝集には静電作用に加え糖の種類や構造も重要な要因であると考えられた。菌株間の比較では、キシラン、ムチンで作用が確認できた6菌株でいずれの高分子でも概ね作用が確認できた。先行研究⁵⁾においてキシラン、ムチンで作用が確認できなかった*L. brevis* NBRC 107147^Tは今回用いた物質でも作用が見られなかった。*L. brevis* NBRC 107147^Tでは、生理食塩水に懸濁してDNAを添加した場合に菌体の凝集が確認できたが、これはpHが2.1と強酸性となったため自己凝集したものと考えられた。一方、低分子であるイノシン、ウリジンでも

一部菌株で凝集が確認できた。しかし、作用が一部菌株に限られpHを中性に調整した場合に若干作用が低下する傾向が見られたことから、これら物質の構成成分であるD-リボースと同様のBのタイプに分類されることが考えられた。

B, Cタイプでは、共に生理食塩水の場合のみ凝集が見られた。Cタイプの場合、pHがおよそ3前後であり物質自体の直接的な作用ではなくpHによる自己凝集であると考えられた。一方、Bタイプでは、自己凝集が生じるほどのpH条件ではなく、低分子物質が中心でありAタイプのような付着による凝集でもないと考えられた。Bタイプの物質は、グルコースをはじめ*L. brevis*が利用可能な発酵性糖質である。このことから、添加した物質が*L. brevis*により発酵され、生成した乳酸等によりpHが低下し自己凝集するものと考えられた。乳酸等が生成しても緩衝液を用いた場合や中性付近で添加した場合には自己凝集が生じるpHには至らないため、凝集が生じないと考えられた。このような発酵に伴うpH低下による凝集作用はこれまでに報告例がなく、現在詳細な検討を行っている。

B, Cタイプでは、Aタイプで凝集作用が見られた

表1. 各種物質の添加による *Lactobacillus brevis* の凝集作用の評価

添加物質	pH	懸濁 溶液*	<i>Lactobacillus brevis</i> NBRC No.						凝集 タイプ***	
			3345	3960	12005	12520	13109	13110		107147 ^T
キシラン (Oat)	6.3	(S)	◎**	◎	◎	◎	◎	◎	-	A
	7.2	(PBS)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	
	7.1	(PB)	◎	◎	○	◎	◎	◎	-	
キシラン (Birch)	6.0	(S)	△	◎	-	-	◎	◎	-	(A)
	4.2	(S)	◎	◎	-	-	◎	◎	-	(A)
ポリガラクトuron酸ナトリウム	4.3	(S)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	A
	7.1	(PBS)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	
ベクチン (シトラス) †	3.2	(S)	◎	◎	○	◎	◎	◎	-	A
	7.0	(PB)	○	○	△	△	△	△	-	
ベクチン (リンゴ) †	2.6	(S)	-	-	○	◎	-	-	-	A
	6.9	(PB)	△	○	△	△	△	△	-	
デキストラン	4.4	(S)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	A
	7.2	(PBS)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	
ゲルコマンナン	4.5	(S)	○	◎	○	○	○	○	-	A
	7.2	(PBS)	○	○	○	○	○	○	-	
CMセルロースナトリウム塩	6.0	(S)	○	◎	○	○	◎	◎	-	A
	7.1	(PBS)	○	○	○	○	○	○	-	
	6.2	(S)	-	○	△	△	○	○	-	
ムチン	6.5	(PBS)	○	○	○	○	○	○	-	A
	7.1	(PB)	△	◎	-	△	◎	◎	-	
DNA (サケ精液) †	2.1	(S)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	A
	6.8	(PB)	◎	◎	○	○	◎	◎	-	
イノシン	6.0	(S)	○	-	-	-	◎	○	-	A
	6.8	(PBS)	△	-	-	-	-	△	-	
ウリジン	4.3	(S)	○	-	-	-	◎	△	-	A
	7.1	(PBS)	△	-	-	-	△	△	-	
グルコース	4.8	(S)	△	○	-	-	◎	△	-	B
	7.3	(PBS)	-	-	-	-	-	-	-	
	7.0	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	
スクロース	4.6	(S)	△	○	-	-	◎	△	-	B
	7.3	(PBS)	-	-	-	-	-	-	-	
D-リボース	4.8	(S)	○	-	-	-	◎	○	-	B
	7.0	(PBS)	-	-	-	-	-	-	-	
フルクトース	4.0	(S)	△	-	-	-	-	○	-	(B)
イソマルトオリゴ糖	4.1	(S)	△	△	-	-	◎	△	-	(B)
マルトオリゴ糖	4.7	(S)	△	△	-	-	◎	△	-	(B)
フルクトオリゴ糖	4.2	(S)	△	○	-	-	○	△	-	(B)
キシロオリゴ糖	3.1	(S)	◎	△	-	-	◎	◎	-	C
	7.3	(PBS)	-	-	-	-	-	-	-	
ガラクトuron酸 †	2.2	(S)	○	◎	○	○	◎	◎	-	C
	6.5	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	
デキストリン	3.1	(S)	○	-	-	-	◎	◎	-	C
	7.0	(PBS)	-	-	-	-	-	-	-	
ゲンチオオリゴ糖	3.7	(S)	△	-	-	-	◎	△	-	(C)
L-アスパラギン酸 †	3.0	(S)	△	△	-	-	◎	△	-	C
	6.1	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	
L-グルタミン酸 †	3.2	(S)	○	-	-	-	◎	◎	-	C
	6.2	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	
L-システイン塩酸塩 †	1.4	(S)	△	◎	-	-	-	-	-	C
	6.3	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	
アデニン †	2.7	(S)	○	△	-	-	◎	○	-	C
	6.4	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	

* (S) 生理食塩水, (PBS) リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4), (PB) リン酸緩衝液 (pH7.2), PBS で十分な緩衝能が得られなかった物質 (†) について PB を実施, ** 相対凝集度: (◎) 0.75 以上, (○) 0.5 以上 0.75 未満, (△) 0.25 以上 0.5 未満, (-) 0.25 未満, *** A: (S) (PBS or PB) で共に凝集, B: (S) のみで凝集 (pH4 以上), C: (S) のみで凝集 (pH4 未満), 括弧書きは PBS, PB 未実施のため推定

以下の物質は (S) において全菌株で凝集なし (-): キシロース, アラビノース, セロビオース, デンプン (米, バレイショ, 可溶性), マンノース, ガラクトース, ラムノース, トレハロース, ラクトース, ラフィノース, N-アセチルグルコサミン, キシリトール, グリセロール, ソルビトール, イヌリン, キチン, 牛血清アルブミン, カゼイン, カゼインナトリウム, スキムミルク, 大豆ペプトン, 大豆ペプチド, L(+)フェニルアラニン, L(+)アルギニン, L(+)イソロイシン, L(+)グルタミン, L-アスパラギン, L-アラニン, L-アルギニン塩酸塩, L-グルタミン酸ナトリウム, L-システイン, L-スレオニン, L-セリン, L-チロシン, L-トリプトファン, L-バリン, L-ヒスチジン, L-プロリン, L-メチオニン, L-リシン, L-リシン塩酸塩, L-ロイシン, グリシン, メタリン酸ナトリウム, ポリリン酸ナトリウム, 乳酸ナトリウム, グアノシン, ウラシル, チミン

L. brevis NBRC 12005, 12520株では作用がほとんど見られなかった。*L. brevis*の自己凝集は、SLPが部分的に解離し生じることを確認しており、今回用いた菌株間でSLPの分子種がそれぞれ異なる事も明らかにしている⁵⁾。このため、これら菌株による作用の差異は、菌株間のSLPの分子種の差異によるものと考えられ、SLPの分子種により自己凝集が生じるpHが異なるものと推察された。また、Aタイプの菌株間の作用の強弱の差異についても、このSLPの分子種の差異が影響しているものと考えられた。乳酸菌の中にはSLPを保持しない菌種も多く、保持する菌種でもSLPの分子種は多様に富むことが知られている⁶⁾。このような表面構造の多様性が、電荷の強弱や各種物質との作用などに影響し、ひいては、乳酸菌の各種性質の多様性をもたらす一因となっていると推察される。一方、*Lactobacillus* 属乳酸菌のSLPの等電点 (pI) は、およそ10前後と高いことが知られており⁶⁾、今回検討を行った酸性、中性のpH条件は*L. brevis*の電荷の正負には影響しないと考えられた。

以上、今回の検討によりキシラン、ムチンに加え多糖を中心とする数種の高分子の存在により*L. brevis*が凝集することが明らかになった。また、発酵性糖質を添加した場合にも、発酵に伴うpH低下に起因すると思われる自己凝集が生じることを確認した。今回見出した糖質を中心とする各種物質への乳酸菌の付着・凝集作用はこれまでに知られていない新知見である。乳酸菌の付着作用は、乳酸菌の保健機能の発現や、食品における乳酸菌の発酵や発酵過程に関わっている。これまでに、乳酸菌の細胞表層に存在するレクチン様のタンパク質や糖鎖が、宿主腸管粘膜のムチンや糖鎖、あるいは、人血液のA型抗原を認識し付着すること⁸⁻¹²⁾、同様の作用により腸内細菌や酵母にも付着すること¹³⁻¹⁶⁾が確認されている。更に乳酸菌の付着や凝集は、自然環境中や口腔内におけるバイオフィーム形成や歯垢形成などに関与すると考えられている^{17,18)}。本研究で得られた知見は、これらの先行研究の発展、進展に有用な新知見であり、乳酸菌の付着・凝集機構の解明、ひいては、乳酸菌の保健機能発現や発酵過程の解明など様々な分野での本知見の活用が期待できる。

要 約

植物との関わりの観点からの乳酸菌機能の解明を目指しこれまでに検討した結果、*Lactobacillus brevis*が

キシラン、ムチンに付着・凝集することを見出した。そこで乳酸菌の保健機能発現などに関与する付着・凝集作用の機構解明に向け、*L. brevis*の凝集を引き起こす各種物質の探索を行った。その結果、キシラン、ムチンに加え、デキストラン、ポリガラクトロン酸、ペクチンなどの多糖や、糖鎖や糖質を含むムチン、DNAなどの高分子の添加により*L. brevis*が凝集することを明らかにした。また、菌株によってはグルコースやスクロースなどの発酵性糖質を添加した場合に、発酵に伴うpH低下に起因すると思われる自己凝集が生じることを確認した。

文 献

- 1) 日本乳酸菌学会編、乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス、京都大学学術出版会 (2010)。
- 2) 岡田早苗、植物性乳酸菌世界とその秘める可能性、日本乳酸菌学会誌、**13**, 23-36 (2002)。
- 3) 五十嵐俊教、植物性乳酸菌を利用した飲料・食品の開発、*BIO INDUSTRY*, **24**, 32-39 (2007)。
- 4) Michaylova, M., Minkova, S., Kimura, K., Sasaki, T. and Isawa, K., Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **269**, 160-169 (2007)。
- 5) Saito, K., Nakamura, T., Kobayashi, I., Ohnishi-Kameyama, M., Ichinose, H., Kimura, K. and Funane, K., Xylan-mediated aggregation of *Lactobacillus brevis* and its relationship with the surface properties and mucin-mediated aggregation of the bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **78**, 2120-2127 (2014)。
- 6) Hynönen, U. and Palva, A., *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 5225-5243 (2013)。
- 7) Kos, B., Susković, J., Vuković, S., Simpraga, M., Frece, J. and Matosić, S., Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 981-987 (2003)。
- 8) Vélez, M.P., De Keersmaecker, S.C. and Vanderleyden, J., Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.*, **276**, 140-148 (2007)。
- 9) Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J. and Roy, N.C., The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe

- interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.*, **2013**, 237921 (2013).
- 10) Uchida, H., Kawai, Y., Kinoshita, H., Kitazawa, H., Miura, K., Shiiba, K., Horii, A., Kimura, K., Taketomo, N., Oda, M., Yajima, T. and Saito, T., Lactic acid bacteria (LAB) bind to human B- or H-antigens expressed on intestinal mucosa. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 3073-3076 (2006).
 - 11) Uchida, H., Kinoshita, H., Kawai, Y., Kitazawa, H., Miura, K., Shiiba, K., Horii, A., Kimura, K., Taketomo, N., Oda, M., Yajima, T. and Saito, T., Lactobacilli binding human A-antigen expressed in intestinal mucosa. *Res. Microbiol.*, **157**, 659-665 (2006).
 - 12) Gross, G., van der Meulen, J., Snel, J., van der Meer, R., Kleerebezem, M., Niewold, T.A., Hulst, M.M. and Smits, M.A., Mannose-specific interaction of *Lactobacillus plantarum* with porcine jejunal epithelium. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **54**, 215-223 (2008).
 - 13) Ledder, R.G., Timperley, A.S., Friswell, M.K., Macfarlane, S. and McBain, A.J., Coaggregation between and among human intestinal and oral bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **66**, 630-666 (2008).
 - 14) Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P.A., Lambert, J., de Vos, W.M., van der Meer, R., Smits, M.A. and Kleerebezem, M., Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, **187**, 6128-6136 (2005).
 - 15) Furukawa, S., Nojima, N., Yoshida, K., Hirayama, S., Ogihara, H. and Morinaga, Y., The importance of inter-species cell-cell co-aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in mixed-species biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1430-1434 (2011).
 - 16) Katakura, Y., Sano, R., Hashimoto, T., Ninomiya, K. and Shioya, S., Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 319-326 (2010).
 - 17) 吉田明弘, 口腔細菌のクオラムセンシングとバイオフィルム形成, 環境バイオテクノロジー学会誌, **10**, 9-14 (2010).
 - 18) 花田信弘, 今井奨, 口腔乳酸菌のバイオフィルム形成と様々な生き残り戦略, 日本乳酸菌学会誌, **17**, 47-50 (2006).

研究ノート

界面活性剤で可溶化された生体膜タンパク質の熱処理特性の評価

渡邊 康*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Characterization of heat-treatment properties of a membrane protein solubilized in the presence of a surfactant

Yasushi Watanabe*

NARO, National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

In order to understand the structural properties of a food-related hydrophobic protein, the heat-induced denaturation of an integral membrane protein OmpF porin in the presence of an anionic surfactant, sodium dodecyl sulfate, was characterized by circular dichroism spectroscopy and gel electrophoresis. The cooperative irreversible transition of the mean residue ellipticity of OmpF porin was observed between 60 °C and 80 °C at pH 7. The native β -structure of OmpF porin trimer is converted to an α -helix-like structure of the denatured monomer upon heating. The denatured protein in the presence of sodium dodecyl sulfate has no transition upon heating as followed by circular dichroism spectroscopy. This property will be the same as that of protein polypeptides derived from water-soluble proteins in complex with the surfactant micelles.

Keywords: membrane protein, sodium dodecyl sulfate, circular dichroism, protein solution property

緒言

食品の製造や開発において、タンパク質の構造物性の特性評価は重要な課題の一つである。タンパク質は生命現象の一端を担う重要な生体高分子であるばかりでなく食品関係分野においても重要な素材であり機能性成分である。タンパク質の研究やその有効利用はそ

の扱いやすさから水溶性タンパク質を中心に展開されてきた。しかし、生体膜タンパク質は、受容体やその存在状態など水溶性タンパク質にない特性を持つものとして注目されているがその研究は立ち遅れている¹⁾。生体膜タンパク質の研究は、生命科学分野だけでなく農業や食品などのタンパク質の係わる多くの分野において基盤的側面から発展させて開発応用に資する意義がある。生体膜タンパク質は単独では水

* 連絡先 (Corresponding author), yasuw@affrc.go.jp

に不溶であるため、水に可溶化する主要な方法としては界面活性剤の利用が考えられる。可溶化することにより、タンパク質の溶液物性特性を評価する事ができる^{2)~6)}。

本研究では、食品分野に関係する水に不溶性の生体膜タンパク質の構造物性特性の知見を得るため、陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で可溶化された大腸菌外膜タンパク質OmpF ポーリン (外膜に内在して分子量600以下の親水性小分子に対する孔を形成する。ファージの受容体としても注目されている。)^{7), 8)}の熱処理による構造変化を円偏光二色性スペクトル測定による2次構造を指標として評価した。SDSはタンパク質に対して変性作用をもつ界面活性剤であり、ゲル電気泳動法として、食品関係分野をはじめタンパク質に関係する分野において常法として広範囲に利用されている。また、大腸菌外膜生体膜タンパク質OmpF ポーリンのこの界面活性剤による可溶化状態は室温付近では天然構造を維持した3量体として存在することが知られている^{2)~4), 6)~8)}。本研究では、これまで十分に知見のない本タンパク質の熱処理による構造変化およびSDS存在下で変性したタンパク質の構造特性について報告する。

実験方法

OmpF ポーリンは、大腸菌 (*E. coli* B) から精製した^{2), 3)}。SDSはBDH Chemicals から購入した。ウシ炭酸脱水酵素とウシ血清アルブミンは、それぞれシグマおよび千葉畜産工業 (株) から購入した。

精製標品を1.0 mg/mLのSDS, 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) で平衡化したゲル濾過クロマトグラフィーカラム (ガードカラム TSK-GCSWXL (ϕ 6 × 40 mm) および主カラム TSK-G3000SWXL (ϕ 7.8 × 300 mm), 東ソー (株)) に供することにより、3量体のシングルピークの分画溶液を分取し基準試料溶液とした。タンパク質濃度は、測定用のセルに注入する直前に上記カラム平衡化緩衝液で希釈することにより0.1 mg/mLに調整した。タンパク質濃度は280 nmにおける吸光係数値1.41 mL/(mg · cm) を利用して決定した⁷⁾。

ウシ炭酸脱水酵素とウシ血清アルブミンの熱処理変性タンパク質溶液は、2.0 mg/mLのSDS, 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) にタンパク質濃度が0.5 mg/mLになるように調製した。ウシ血清アルブミン溶液には1.0 mg/mLのジチオトレイトールをさらに

添加しジスルフィド結合を還元切断した。その各試料溶液をキャップ付きガラス試験管に入れ、95 °Cの湯中に5分間投入し変性試料溶液を調製した。その試料溶液を室温に冷却してから、0.45 μ mのメンブレンフィルター (日本ミリポア (株), HV) にて濾過後に1.0 mg/mLのSDS, 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) で平衡化した上記ゲル濾過カラムに添加して、主タンパク質のピーク溶出液を分取した。その後、タンパク質濃度が0.1 mg/mLになるようにカラム平衡化緩衝液で調製直後にスペクトルを測定した。ウシ炭酸脱水酵素とウシ血清アルブミンのタンパク質濃度は280 nmにおける吸光係数値、それぞれ1.90および0.678 mL/(mg · cm), を利用して決定した⁹⁾。

円偏光二色性スペクトル測定には、円二色性分散計 (日本分光 (株), J-720) を使用した。厚さ (光路長) 1 mmの石英セルを用いて、恒温槽の水を循環させたセルブロックの温度をデジタル温度計 (安立計器 (株), HL-200) によってモニターした。各測定温度で10分間静置した後にその温度でスペクトル測定した。測定条件は、波長250 nmから200 nmまで、スキャンスピード50 nm/min, 感度50 mdeg, 積算回数20回, 他の条件は装置の取扱説明書に記載された設定で行った。溶質からのスペクトルはタンパク質以外の成分を含む溶媒の測定データを差し引いた。平均残基モル楕円率 $[\theta]$ (deg · cm²/dmol) は各タンパク質の平均残基分子質量, OmpF ポーリン; 109 g/mol^{10), 11)}, ウシ炭酸脱水酵素とウシ血清アルブミン; 110 g/mol⁹⁾, を使用して計算した。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、試料溶液を各温度で10分間処理した後室温に冷却後にLaemmliの方法¹²⁾に従い、厚さ1 mm, 長さ70 mmの12.5%ゲルを用いて20 mA定電流で約80分間泳動した。泳動後のゲル中のタンパク質バンドはクマシーブリリアントブルー R250で染色した。

実験結果および考察

生体膜タンパク質は単独では水に不溶性であるため水に可溶化するために界面活性剤を利用する必要があるため、本研究ではタンパク質に対して変性作用を示す陰イオン界面活性剤SDSを使用した。また、試料溶媒中のSDSの濃度は1.0 mg/mL (3.5 mM) で、本研究と同様溶媒条件の臨界ミセル濃度は1.4 mMである¹³⁾のでSDSはミセルを形成してタンパク質可溶化に十分な濃度である。大腸菌外膜タンパク質OmpFポー

リンは、室温付近においてはこの界面活性剤ミセル中で β バレル構造からなる単量体で形成される3量体として可溶化されていることは知られている^{2),3),7),8)}。

図1に本タンパク質のSDSで可溶化された条件下の遠紫外部(200 nm-250 nm)の円偏光二色性スペクトルを示す。遠紫外部の円偏光二色性スペクトルはタンパク質の二次構造を反映する¹⁴⁾。25℃においては、 β 構造に特徴のある217 nm付近の平均残基モル楕円率 $[\theta]$ の極小値と、206 nm付近の $[\theta]$ のゼロ値との交点がみられる。65℃においては、217 nm付近の $[\theta]$ の極小値の値が25℃の値より約1割小さくなっているものの、206 nm付近の $[\theta]$ のゼロ値との交点は存在し、 β 構造に特徴的なスペクトルがみられる。75℃においては、217 nm付近の $[\theta]$ の極小値はあるが、206 nm付近の $[\theta]$ のゼロ値との交点は存在しない。さらに、95℃においては205 nm付近ではデータに乱れがあるが、217 nm付近の $[\theta]$ の極小値と206 nm付近の $[\theta]$ のゼロ値との交点は存在しない。図1には、95℃まで処理して測定した後25℃に冷却してから25℃で測定した円偏光二色性スペクトルも示している。このスペクトルは207 nm付近の極小値と220 nm付近の負のシグナルを示し、これはランダムコイルと α ヘリックス様の構造が混在す

る事を示す¹⁴⁾。

図2に、本タンパク質の25℃の円偏光二色性スペクトルで特徴のあった217.5 nmと207 nmの $[\theta]$ の温度依存性を示す。217.5 nmの $[\theta]$ の絶対値は約70℃までは徐々に直線的に減少し、70℃から80℃の間に構造が一気に崩壊する協同的な変化が認められる。さらに、80℃以上ではわずかな変化はあるものの顕著な変化はない。一方、207 nmの $[\theta]$ の変化は約60℃まではほとんど変化はなく、60℃から80℃の間に協同的な変化が認められる。80℃以上では217.5 nmと同様に顕著な変化はない。転移温度が波長により差があるのは、それぞれの波長に反映する構造特性が異なるためかもしれない。一方、昇温後に冷却した場合の変化は、それぞれの波長の $[\theta]$ の絶対値は徐々に直線的に増大し、昇温時の協同的な変化は観察されなかった。この結果は、SDS存在下の本タンパク質の熱変性は不可逆的な現象であることを示す。図3は、本タンパク質溶液を熱処理後にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動した結果であり、熱処理により3量体が単量体に解離していることがわかる。円偏光二色性データとの関係では、3量体は β 構造を維持していて単量体は天然構造と異なる変性状態であると考えられる。この変性と解離が同期する結果は、

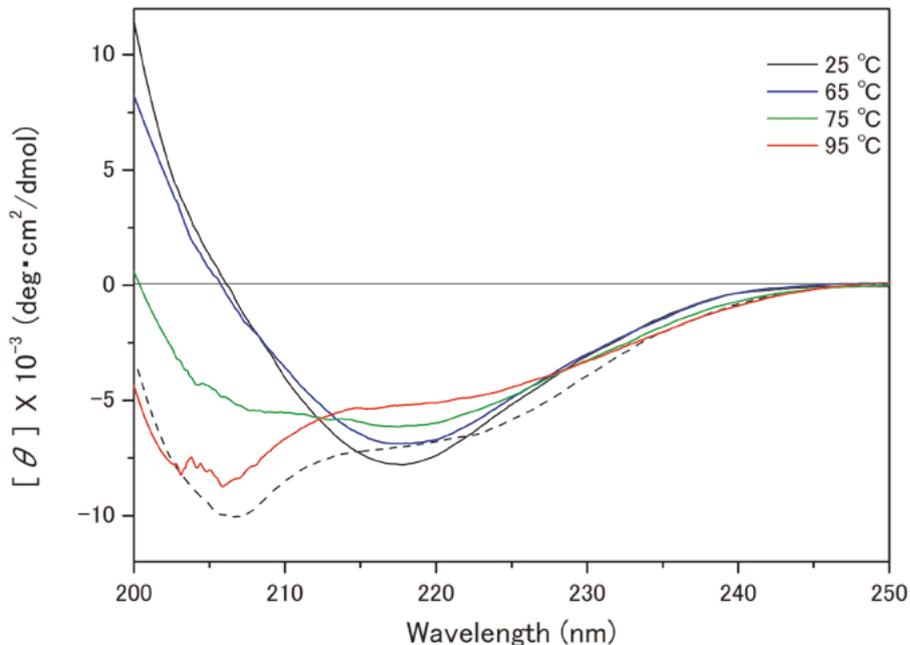


図1. OmpF ポーリンの円偏光二色性スペクトル

各温度は図中に示した。破線は95℃処理後25℃に冷却してから25℃で測定したスペクトルである。

これまでの本タンパク質の熱変性実験の結果⁶⁾と一致するものの、変性温度は50℃と70℃の間との報告⁶⁾であり、本研究の結果(図2と図3)の方が高温域(60℃から80℃)であった。この結果の違いは実験条件(pH 8.3, 昇温速度90℃/時間など)が異なるためと考えられるが、この変性が不可逆反応のため熱力学的解析ができないので本研究ではこれ以上の実験条件の精査はしなかった。

つぎに、SDS存在下で変性したタンパク質の構造特性をさらに調べるため、SDS-PAGEの分子量マーカーとして利用されている2種の水溶性タンパク質(ウシ炭酸脱水酵素とウシ血清アルブミン)について円偏光二色性スペクトルを測定した。図4は、それらSDS存在下で変性したタンパク質の25℃と95℃の円偏光二色性スペクトルを示している。明らかに、OmpFポーリンの変性状態のスペクトル(図2)と同様にそれらすべてのスペクトルの形状が $[\theta]$ の極小値の違いはあるものの相互に似ている。つまり、ランダムコイルと α ヘリックス様の構造が混在する構造であり、SDS存在下の変性タンパク質に共通する構造特性であることが示唆される。しかし、この α ヘリックス様の二次構造が天然構造の一部と一致するものか不明である。

また、図4の挿入図には α ヘリックス様の構造を示すスペクトルに特徴のある220 nmと207 nm付近の $[\theta]$ の温度依存性を示して、測定した25℃と95℃の範囲内では協同的变化はみられない。この

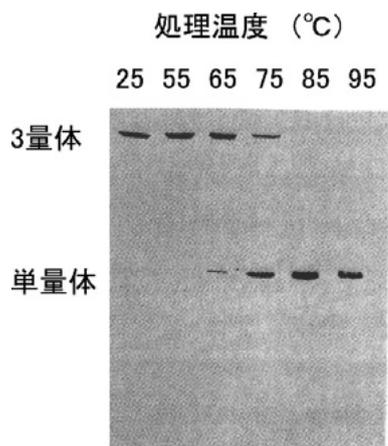


図3. 熱処理後のOmpFポーリンのSDSゲル電気泳動のパターン

処理温度は図中に示した。

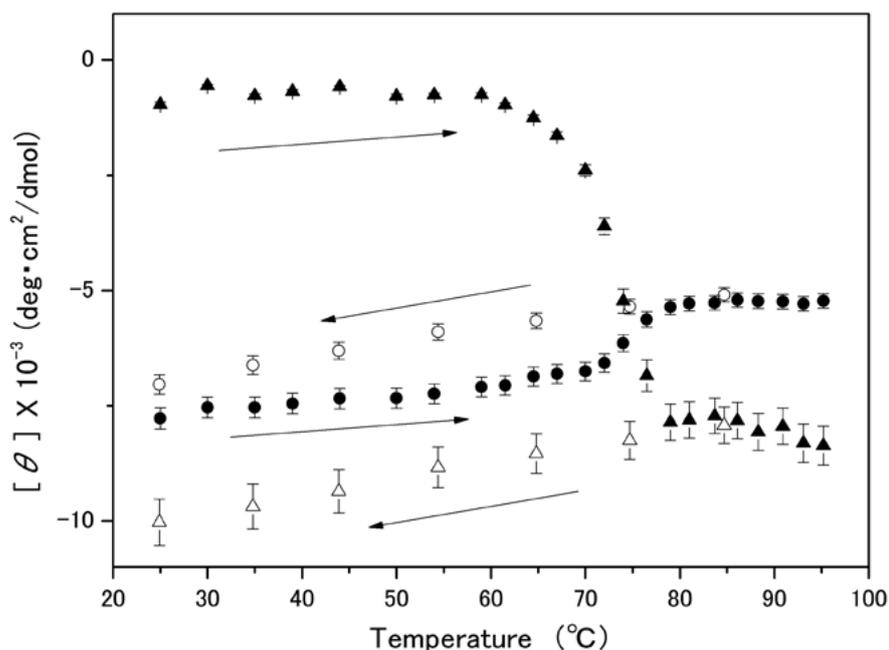


図2. 平均残基モル楕円率 $[\theta]$ の温度依存性

●は217.5 nm昇温, ○は217 nm降温条件で, ▲は207 nm昇温, ▲は207 nm降温条件のデータを示す。矢印は温度変化の方向を示した。

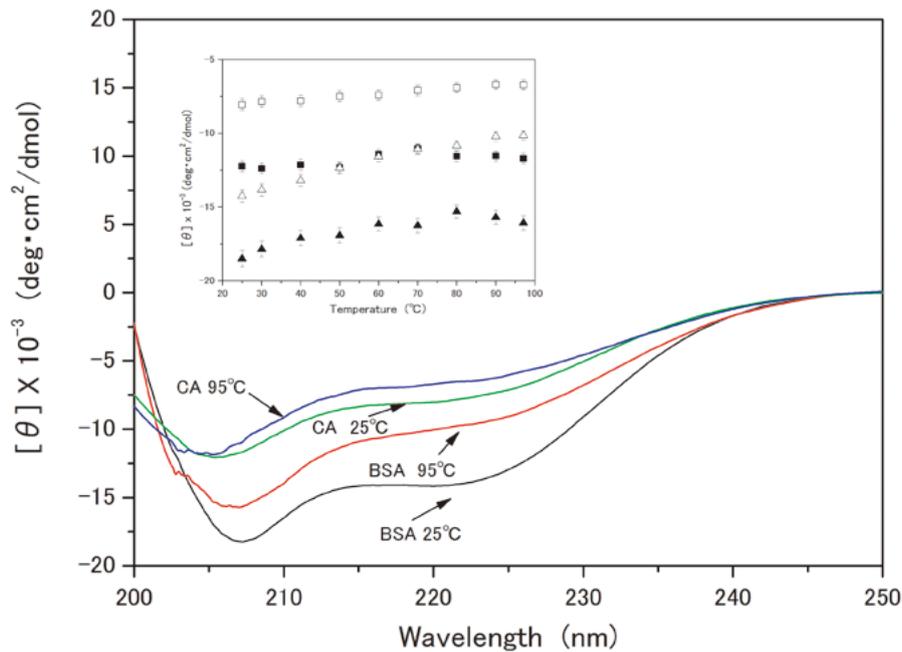


図4. SDS存在下で熱処理したタンパク質の円偏光二色性スペクトル

BSAはウシ血清アルブミン、CAは炭酸脱水酵素を示している。挿入図は、BSA (▲ 207 nm, △ 220 nm) と CA (■ 206 nm, □ 220 nm) について、平均残基モル楕円率 $[\theta]$ の昇温依存性を示した。

結果はSDS存在下の変性タンパク質は天然構造を維持している水素結合をはじめとする種々の相互作用ネットワークが壊れていることを示し、SDS存在下の変性タンパク質に共通する構造特性であることが示唆される。我々はOmpFポリーンの変性単量体へのSDS結合量はタンパク質グラムあたり1.6gであり、同溶媒条件下で変性した水溶性タンパク質へのSDS結合量と同程度であることを報告している¹⁵⁾。この結果はこれら変性タンパク質の単位長さ当たりの荷電量がほぼ一定であることを示している。これら共通の構造物性特性が、SDS-PAGEが分子量の違いで変性タンパク質を分離する方法として利用されている物理化学的な根拠の一つと考えられる。このような溶液中のタンパク質分子の構造物性の知見の蓄積は、今後のタンパク質が関与する食品バイオテクノロジーの発展に寄与することが期待できるので多様な対象について試験研究することが今後も必要と考えられる。

要約

食品分野に関係する水に不溶性の生体膜タンパク質の構造特性の知見を得るため、陰イオン界面活性剤で

あるSDSによる可溶化状態の大腸菌外膜タンパク質OmpFポリーンの円偏光二色性スペクトル測定およびゲル電気泳動法により、pH7における構造特性の温度依存性を評価した。本タンパク質は60℃付近まではβ構造をもつ3量体として可溶化しており、60℃から80℃の間に協同的な構造転移がみられ、αヘリックス様の構造をもった変性単量体へ不可逆的に解離する。このSDS存在下の変性タンパク質の平均残基モル楕円率の温度依存性は、25℃と95℃の範囲内では協同的な変化は観察されなかった。この結果はSDS存在下の変性タンパク質に共通する構造特性であることが示唆された。

文献

- 1) 岩田 想, 「膜タンパク質構造研究」, 第1版 (化学同人, 京都) (2013).
- 2) Watanabe, Y., Characterization of the refolding and reassembly of an integral membrane protein OmpF porin by low-angle laser light scattering photometry coupled with high-performance gel chromatography, *J. Chromatogr. A*, **961**, 137-146 (2002).

- 3) Watanabe, Y. and Inoko, Y., Physicochemical characterization of the reassembled dimer of an integral membrane protein OmpF porin, *Protein J.*, **24**, 167-174 (2005).
- 4) 渡邊 康, 猪子洋二, 生体膜蛋白質の溶液中の集合状態の特性評価, 食品総合研究所研究報告, **73**, 53-57 (2009).
- 5) 渡邊 康, 猪子洋二, 両親媒性環境下の疎水性蛋白質の分子集合状態の特性評価, 食品総合研究所研究報告, **71**, 33-37 (2007).
- 6) Markovic-Housley, Z. and Garavito, M., Effect of temperature and low pH on structure and stability of matrix porin in micellar detergent solutions, *Biochim. Biophys. Acta*, **869**, 158-170 (1986).
- 7) Rosenbusch, J. P., Characterization of the Major Envelope Protein from *Escherichia coli*. , *J. Biol. Chem.*, **249**, 8019-8029 (1974).
- 8) Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. and Rosenbusch, J. P., Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins, *Nature* **358**, 727-733 (1992).
- 9) Fasman, G.D., "Handbook of biochemistry and molecular biology", Vol.2, CRC Press, Cleveland, OH, (1976).
- 10) Chen, R., Krämer, C., Schmidmayr, W., Chen-Schmeisser, U. and Henning, U., Primary structure of major outer-membrane protein I (*ompF* protein, porin) of *Escherichia coli* B/r, *Biochem. J.* **203**, 33-43 (1982).
- 11) Inokuchi, K., Mutoh, N., Matsuyama, S. and Mizushima, S., Primary structure of the *ompF* gene that codes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12, *Nucleic Acids Res.* **10**, 6957-6968 (1982).
- 12) Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 13) Kratochvil, J.P., Comments on some novel approaches for the determination of micellar aggregation numbers, *J. Coll. Int. Sci.*, **75**, 271-275 (1980).
- 14) Greenfield, N.J. and Fasman, G.D., Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry*, **8**, 4108-4116 (1969).
- 15) Watanabe, Y., Okuno, T., Ishigaki, K. and Takagi, T., Assessment study on the high-performance liquid chromatography-type hydroxyapatite chromatography in the presence of sodium dodecyl sulfate, *Anal. Biochem.*, **202**, 268-274 (1992).

研究ノート

大腸菌におけるゲノム重複を介した多剤耐性化

本山 志織, ワナシリ・ワナラット, 稲岡 隆史*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12**Multidrug tolerance mediated by genomic segmental amplification
in *Escherichia coli***

Shiori Motoyama, Wannasiri Wannarat, Takashi Inaoka*

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Abstract

A multidrug efflux pump, AcrAB-TolC, contributes to multiple antibiotic resistance (Mar) phenotype in *Escherichia coli*. In this study, we investigated multidrug tolerance mediated by genomic segmental duplication of *acrAB* locus in *E. coli*. In a strain K-12 W3110, 3.8% (8 of 208) of ampicillin-resistant colonies carried the multiplied copy of *acrA* gene, thereby exhibiting multidrug-resistance phenotype. In contrast, in a strain O157:H7 MY-29, we could not isolate such mutant. All isolated Mar strains were found to carry the same 416 kb-genomic amplicon. Sequencing analysis showed that the amplified regions were bordered by insertion sequence (IS), IS5. These results suggest that *E. coli* gene amplification occurs largely between directly oriented homologous IS elements. Thus, our results suggest that the genomic amplification-mediated Mar phenotype depends on the genetic background.

Keywords: genomic amplification, multidrug tolerance, *Escherichia coli***緒言**

多剤排出ポンプは化学構造の異なる多種多様な薬剤を細胞外へと排出するトランスポーターであり, 多剤耐性を引き起こす要因の一つである¹⁾²⁾. AcrAB-TolC システムは大腸菌において最も良く研究された多剤

排出ポンプであり, 多剤耐性大腸菌の多くは AcrAB-TolC を過剰生産していることが知られている³⁾.

AcrAB-TolC システムは3つのタンパク質によって構成されている. AcrB は内膜に局在する基質認識部位であり⁴⁾, TolC は外膜チャネルとして機能している⁵⁾. ペリプラズムに存在する AcrA は AcrB タンパク質と複合体を形成し, AcrB と TolC チャネルを連結す

* 連絡先 (Corresponding author), tina2672@affrc.go.jp

る役割を担っている。TolCは他の排出ポンプの外膜チャネルとしても機能しており、必要に応じてAcrAB複合体と結合すると考えられている⁶⁾。これら3つのタンパク質は*acrAB*と*tolC-ygiAB*という2つの異なるオペロンにコードされており、これら遺伝子の発現はMarAやSoxS、Rob等の転写因子により制御されている⁷⁾⁸⁾。これまでに同定された大腸菌の多剤耐性変異の多くは、*acrAB*や*tolC-ygiAB*の発現を増大させるものである。

細菌が薬剤耐性を獲得する遺伝的要因には、突然変異のほか、耐性遺伝子を含むゲノム領域の多コピー化(ゲノム重複)がある。このゲノム重複は、最初の2コピー化ステップとその後の多コピー化ステップの2段階のステップによって進行すると考えられている⁹⁾。最初の2コピー化ステップはRecAに依存した相同組換え又はRecAに依存しない非同相組換えのいずれかによって進行するが、多コピー化ステップでは2コピー化ステップにより生じた相同配列間でRecAに依存した相同組換えにより進行すると考えられている。このようなゲノム重複を介した薬剤耐性化においては、環境中の選択圧により生存に適したコピー数の耐性遺伝子を有する細胞が選抜されるため、ゲノム中の遺伝子コピー数は環境変化に応じて増減することになる。

細菌の薬剤耐性変異に関する膨大な研究例と比較して、ゲノム重複を介した薬剤耐性に関する研究は少なく、その知見は極めて乏しい。そこで我々は、ゲノム重複を介した細菌の薬剤耐性機構について調査してきた。その結果、グラム陽性菌の枯草菌では、2コピー化ステップのほとんどが非同相組換えによりランダムに起こるのに対し、グラム陰性菌のサルモネラ菌においては2コピー化ステップのほとんどが挿入配列(IS)間での相同組換えにより起こることが判明した¹⁰⁾¹¹⁾。大腸菌においては、これまでに報告されているゲノム重複の多くが相同なISで挟まれた領域で起こっていることから、サルモネラ菌と同様に最初の2コピー化ステップのほとんどが非同相組換えにより起こると考えられる。大腸菌K-12 W3110株ゲノムでは、*acrAB*領域に多数のISが存在しており、*acrAB*領域がゲノム重複により多コピー化し易い可能性がある。一方、O157:H7 Sakai株ゲノムでは、*acrAB*領域にISはわずかしか存在せず、W3110株と比較して*acrAB*領域のゲノム重複頻度は低いと予想できる。本研究では、W3110株および毒素非生産性O157:H7 MY-29株を用いて、大腸菌における*acrAB*領域のゲノム重複を介した多剤耐性獲得について検討を行なった。

実験材料および方法

1. 使用菌株

大腸菌K-12 W3110株および毒素非生産性O157:H7 MY-29株を用いた。

アンピシリン耐性株は、薬剤を含まないLB液体培地で3-4時間培養後、適当な濃度のアンピシリンを含むLB寒天培地上に適量塗布することによって取得した。出現した耐性菌は同じ濃度のアンピシリンを含むLB寒天培地上に継代培養した。

2. 抗生物質耐性度の測定

大腸菌*acrAB*重複株を様々な濃度の抗生物質を含むLB寒天培地上に塗布し、抗生物質を含まない培地での生育と比較して増殖阻害が起こる最低濃度を最小発育阻止濃度(MIC)とした。抗生物質にはアンピシリンのほかクロラムフェニコール、テトラサイクリン、エリスロマイシン、カナマイシン、ノボビオシン、セフトキサシム、およびリファンピシンを用いた。

3. ゲノムDNA調製

ゲノムDNAの調製には、実験に応じて2通りの調製法を用いた。コロニーから直接ゲノムDNAを調製する場合には、ゲノムDNA調製試薬インスタジーン(バイオラッド社)を用いて調製した。培養液からゲノムDNAを調製する場合には、スクリーニングに使用した濃度のアンピシリンを含むLB培地で一晚培養した培養液を遠心し、上清を除去後、一般的なゲノムDNA調製法であるフェノール/クロロホルム抽出法により調製した。

4. 定量PCRによるコピー数定量

遺伝子コピー数の定量にはアプライド・バイオシステムズ社のリアルタイムPCR装置7300を使用した。PCR反応は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(東洋紡)を使用し、20 μL反応液に各プライマーを終濃度300 nMになるよう添加して行なった。コントロール遺伝子としてリボソームタンパク質S10をコードする*rpsJ*遺伝子を用いた。使用したプライマーは表1に示した。

結果

1. *acrAB* 遺伝子領域のコピー数変動

大腸菌K-12 W3110株のアンピシリンに対するMIC

表 1. 本研究で使用したプライマー

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>acrA</i>	AGCGGTCGCATTGGTAAG	TTTCAGGCGCAGGAAGTC
<i>ampC</i>	CGCCTCTTGCTCCACATT	GTGTGACGGGCTGCTTTT
<i>ampG</i>	GGTGAAGTAGGCGTGGTT	TCGACAGCAGCCAGTAAC
<i>argF</i>	AGTTCCTGCACTGTCTGC	CGACTCAAACACCTCGTC
<i>cysS</i>	GGGATGGTGATGGTTGAC	GCCTGCTTCAGGTTCTCT
<i>glfI</i>	GTGGGTTACTCGCAGGAT	CGACGTTGTTGGTGGTAG
<i>lnt</i>	CGATAATGGGCGTGAAG	TCTCCGGTTGTGGGGTAA
<i>mmuP</i>	GCTGGGTTTCAGCTTTAC	ACCAGCGAGAACCAGAAC
<i>ompT</i>	GAGGCCGAAAAGTCAGTC	CATCCAGTCTGATCGAC
<i>ribD</i>	CCACATGCCGAAGTACAC	CTGCGGGTTAGGATCTTG
<i>rpsJ</i>	TCCGTATCCGCTGAAAAG	CGCGTCTTTGTTGACGTG
<i>sbcC</i>	CGACACGTCAGCAAGAAG	GCTGCTGGCTGTGTAATG
<i>tauA</i>	AGACGGCAAGGTGTTGAC	CTGTTTCAGCCACACGTC
<i>yahD</i>	CAACCATGTAGGCTGGAC	CCTGCGGCAATCAGTAAC
<i>ybbJ</i>	GAGTGGCAAGGGTAATG	GTTGACCAGCGGAGATTCT
<i>ybdM</i>	GACCTGTCTGGAAGGTACG	CTGTCCATCCCAGCTCT
<i>ykfC</i>	AAGGCACAAAGCACAGG	CACTCGCATCTCGCCATA

は 2 µg/mL であり, 4 µg/mL のアンピシリンを含む LB 培地上では耐性株が約 10^{-6} – 10^{-5} の頻度で出現する. 大腸菌は β-ラクタマーゼおよび多剤排出システム AcrAB-TolC を有しており, これら遺伝子のいずれかの重複はアンピシリン耐性を付与すると考えられる. そこで大腸菌 W3110 株を用いてアンピシリン 4 µg/mL を含む LB 培地上で耐性株を選抜し, β-ラクタマーゼをコードする *ampC* 遺伝子および *acrA* 遺伝子コピー数を定量した. アンピシリン感受性の野生株 36 株を用いた対照実験では *acrA* 遺伝子のコピー数は 0.95 ± 0.1 , *ampC* 遺伝子のコピー数は 1.0 ± 0.10 であった. また, それらの分布は, *acrA* 遺伝子が 0.77–1.2, *ampC* 遺伝子が 0.89–1.2 の範囲内であった (図 1, 白棒グラフ). これに対して, 調査したアンピシリン耐性株 94 株中 *acrA* 遺伝子では 27 株 (31%), *ampC* 遺伝子では 4 株 (4.3%) においてコピー数が 1.5 以上となっていた (図 1, 黒棒グラフ). これらの結果は, アンピシリン耐性株において, *acrA* 遺伝子領域のコピー数が *ampC* 遺伝子領域よりも変動し易いことを示唆している. 多剤排出システム AcrAB-TolC の増加は, 他の抗生物質や界面活性剤, 有機溶剤等の抵抗性を増大させる為, アンピシリンによる選択圧は大腸菌の多剤耐性化の要因と成り得る.

2. *acrAB* 遺伝子重複株の分離

大腸菌 K-12 W3110 株を新たにアンピシリン 4 µg/mL

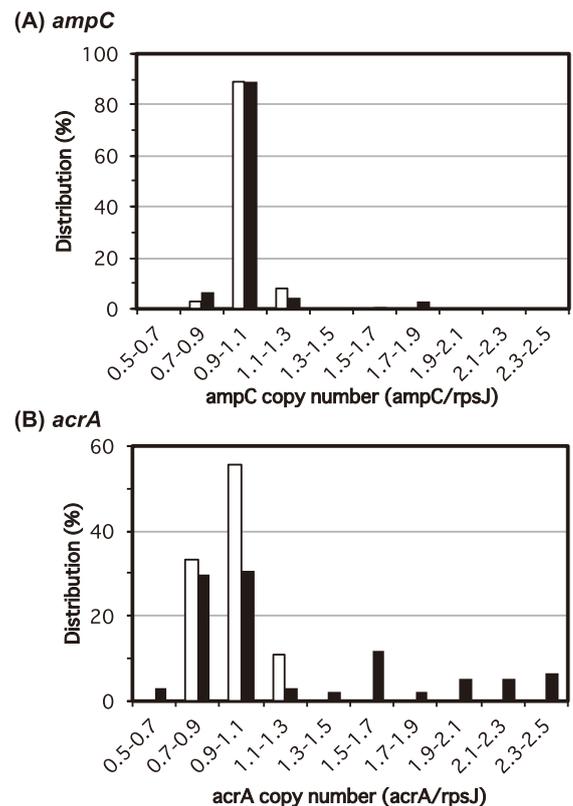


図 1. アンピシリン耐性株における *ampC* および *acrA* 遺伝子コピー数の変動

アンピシリン耐性株の *ampC* (A) および *acrA* (B) 遺伝子のコピー数の分布 (黒色棒グラフ). 白色棒グラフは野生株におけるそれぞれのコピー数の分布を示す.

を含むLB培地上に塗布し、合計208株のアンピシリン耐性株を取得した。一方、毒素非生産性大腸菌O157:H7 MY-29はアンピシリンに対する感受性がW3110株よりわずかに高く、3 µg/mLのアンピシリンを含む培地上でアンピシリン耐性株を選抜可能である。そこで、大腸菌O157:H7 MY-29株からも合計205株のアンピシリン耐性株を取得した。得られた耐性株の *acrA* 遺伝子のコピー数を定量したところ、W3110株由来のアンピシリン耐性株208株のうち8株 (3.8%) において *acrA* 遺伝子コピー数が2.0–2.5コピーとなっていた。しかしながら、O157:H7 MY-29株由来のアンピシリン耐性株205株の中には、*acrA* 遺伝子重複株は含まれていなかった。そこで、W3110株由来の *acrAB* 重複株8株 (No. 5, 21, 39, 47, 48, 51, 54, 58) について、さらなる解析を行なった。

3. *acrAB* 重複領域の同定

得られた8株の遺伝子重複領域を同定するため、*acrAB* 遺伝子領域の周辺遺伝子のコピー数を定量した (図2)。その結果、8株全てにおいて重複領域の両末端にIS5が存在しており、396遺伝子を含む約416kbの領域が重複していることが判明した。また、この重

複領域の左側末端部分では、中心部分よりもコピー数が高くなる傾向があった (図2)。これについては、原因は明らかではないが、この領域には4つのIS1が同方向に並んでおり、末端部分でさらなる遺伝子重複を起こしている可能性も考えられる。これらの結果から、大腸菌における遺伝子重複の2コピー化ステップの多くは、サルモネラ菌と同様にIS等の相同配列を介して生じると考えられる。枯草菌においては、非相同組換えが主要な2コピー化ステップであり、ゲノム重複がランダムに生じるのに対し、大腸菌やサルモネラ菌においては、ゲノム重複の多くが相同配列で挟まれた特定の領域で生じやすくなっているものと推察できる。すなわち、大腸菌やサルモネラ菌においては、ゲノム重複を介した薬剤耐性株の出現頻度がゲノム構造に大きく依存していると考えられる。

4. *acrAB* 重複株の抗生物質耐性

8株の *acrAB* 重複株の抗生物質耐性を調べた結果、アンピシリンの他、クロラムフェニコールやテトラサイクリン、エリスロマイシン、セフトキシム、リファンピシンに対する抵抗性が増大し、多剤耐性を獲得していた (表2)。興味深いことに、得られた

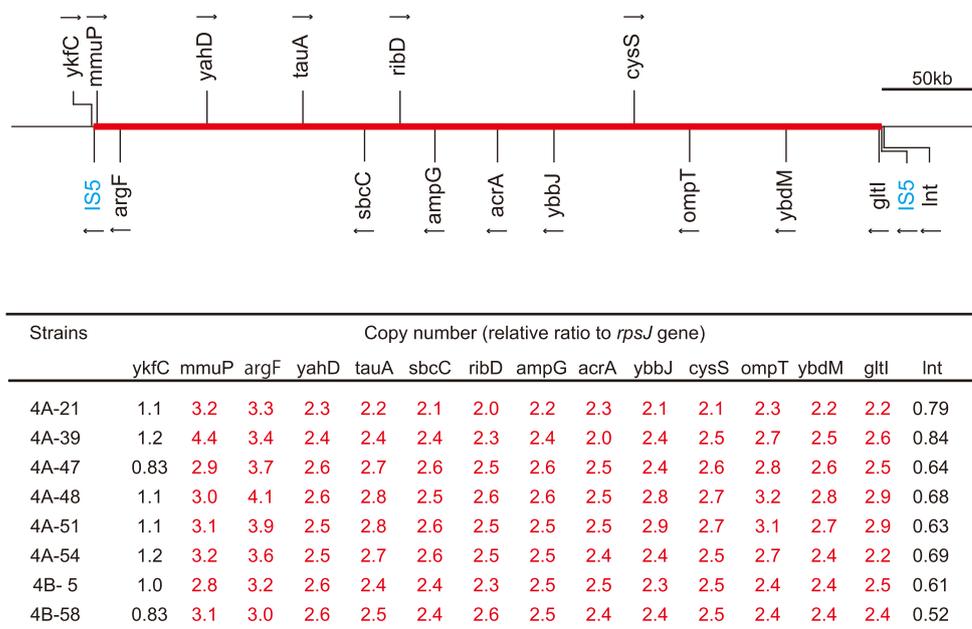


図2. *acrA* 遺伝子重複株の重複領域の同定

上段は *acrA* 遺伝子周辺の大腸菌W3110株ゲノムを表す。ゲノム重複を起こした領域を赤線、重複領域末端の挿入配列 (IS5) は青字で示した。矢印は遺伝子の方向を表す。下段の表は、*acrA* 遺伝子重複株における *acrA* 遺伝子周辺の各遺伝子コピー数。赤字は、コピー数が2以上のものを示す。

acrAB 遺伝子重複株の重複領域は同一であるにもかかわらず、薬剤感受性はそれぞれわずかに異なることがわかった。例えば、カナマイシンに対してはNo.39だけが耐性を示し、ノボピオシンに対しては8株中6株で感受性が高くなっていった。これらの原因については不明であるが、ゲノム中に突然変異等が生じている可能性もある。

考 察

本研究では、アンピシリンによる選択圧により大腸菌が *acrAB* 領域のゲノム重複を介して多剤耐性化し得ることを明らかにした。大腸菌 K-12 W3110株および O157:H7 MY-29株を用いて、*acrAB* 遺伝子重複による多剤耐性化頻度を比較した結果、W3110株では208株中8株 (3.8%) において *acrAB* 遺伝子重複が生じていたが、O157:H7 MY-29株では分離した205株中に *acrAB* 遺伝子重複を見出すことはできなかった。この結果は、大腸菌の遺伝子重複がIS等の相同配列に大きく依存しており、ゲノム構造によって遺伝子重複の出現頻度が異なることを示唆するものである。

図3に示すように、大腸菌 K-12 W3110株のゲノムでは *acrAB* 領域に20個のISが存在している。これらISのうち、IS間での相同組換えを介したゲノム重複により *acrAB* のコピー数を増加させ得る組み合わせは3通り存在し、予想されるアンプリコンの大きさは252 kb (アンプリコン1) および302 kb (アンプリコン2)、416 kb (アンプリコン3) である (図3A)。本研究で取得した *acrAB* 遺伝子重複株は全てアンプリコン3

が2~3コピーに重複したものであったが、Nicoloffらは大腸菌 K-12株由来の多剤耐性株においてアンプリコン1を2コピー有する株を分離し、報告している¹²⁾。また、彼らは *acrAB* 近傍にある *lon* 遺伝子にトランスポゾンの標的配列が存在しており、*lon* 遺伝子内に新たにISが挿入された後、*lon::IS*とIS186間 (約149 kb) でゲノム重複を引き起こした株についても報告している¹³⁾。我々の実験では、*lon* 遺伝子内に新たにISが挿入された株を見出すことはできなかったが、IS挿入を介した遺伝子重複頻度は、既存のIS間で起こる遺伝子重複の頻度と比較して低いものと考えられる。

一方、O157:H7 Sakaiのゲノムでは、*acrAB* 領域には5個しかISが存在しておらず、ゲノム重複により *acrAB* のコピー数を増加させ得る組み合わせは543 kbのアンプリコン1のみである (図3B)。今回使用したMY-29株のゲノム配列は不明であるが、Sakai株と類似していると考えられることから、ゲノム構造の違いが *acrAB* 遺伝子重複株の出現頻度に影響しているものと推察できる。

大腸菌 O157:H7 Sakai株はゲノム中の異なる位置に2つの毒素遺伝子 (*stx1* および *stx2*) を有している。これら毒素遺伝子の周辺では *acrAB* 領域とは異なり、多くのISが存在していることから、O157:H7 Sakai株においては、*acrAB* 領域よりも毒素遺伝子周辺領域が遺伝子重複を起こしやすい可能性がある。毒素遺伝子の多コピー化と食中毒との関連は不明ではあるが、今後検討する必要があるだろう。

表2. 大腸菌 W3110由来 *acrA* 重複株の抗生物質感受性

Strain	<i>acrA</i> copy number	MIC (μg/mL)							
		AMP	CP	TC	EM	KM	NV	CTX	RIF
W3110	1	2	4	1.5	60	1	200	<0.03	10
5	2.5	4	10	2	80	1	125	0.03	17
21	2.3	4	10	2	70	1	200	0.05	18
39	2	4	10	2	70	3	150	0.05	20
47	2.5	4	10	2	70	1	125	0.03	19
48	2.5	4	10	2	70	1	125	0.03	20
51	2.5	4	10	2	70	1	150	0.03	18
54	2.4	4	10	2	70	1	200	0.03	20
58	2.4	4	10	2	80	1	125	0.05	18

AMP: アンピシリン, CP: クロラムフェニコール, TC: テトラサイクリン, EM: エリスロマイシン, KM: カナマイシン, NV: ノボピオシン, CTX: セフトキシム, RIF: リファンピシン

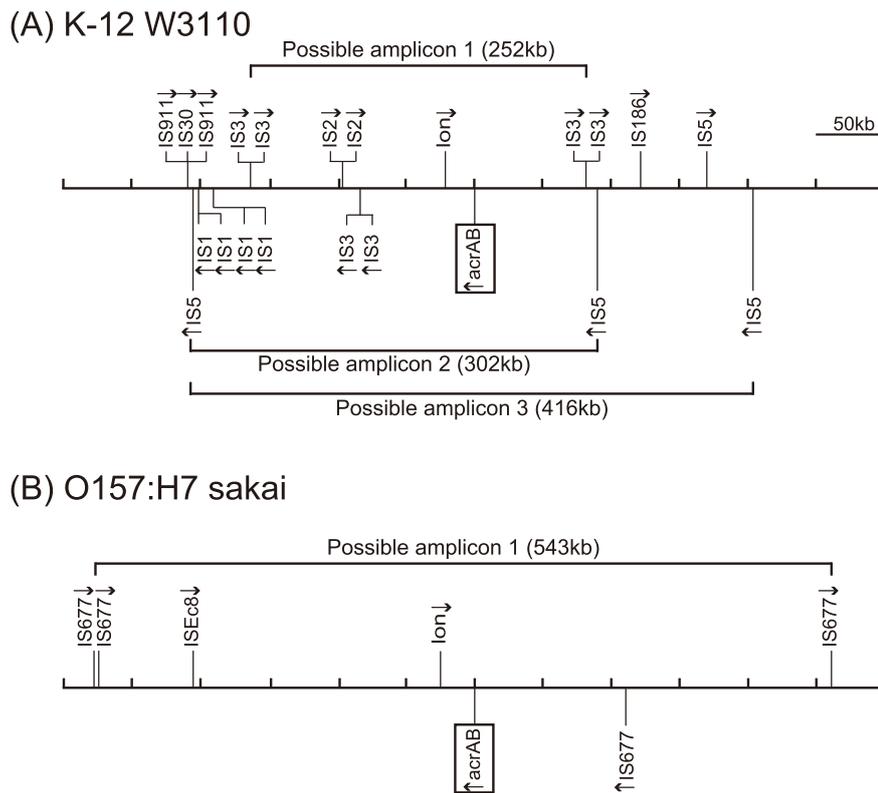


図3. *acrAB*領域の比較と予想される重複領域

大腸菌K-12 W3110 (A) 及びO157:H7 Sakai (B) における*acrAB*領域のISと予想される重複領域. 矢印は遺伝子の方向を表す.

参考文献

- 1) Nikaido, H. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Inf Dis* **27**, S32-41 (1998)
- 2) Li, X. Z., Plésiat, P., and Nikaido, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* **28**, 337-418 (2015)
- 3) Okusu, H., Ma, D., and Nikaido, H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* **178**, 306-308 (1996)
- 4) Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. and Yamaguchi, A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587-593 (2002)
- 5) Koronakis, V., Eswaran, J., and Hughes, C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* **73**, 467-489 (2004)
- 6) Touzé, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V. Interaction underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Mol Microbiol* **53**, 697-706 (2004)
- 7) Martin, R. G., Gillette, W. K. Rhee, S. and Rosner, J. L. Structural requirements for mar box function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol Microbiol* **34**, 431-441 (1999)
- 8) White, D. G., Goldman, J. D. Demple, B. and Levy, S. B. Role of the *acrB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 6122-6126 (1997)
- 9) Sandegren, L., and Andersson, D. I., Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* **7**(8), 578-588 (2009)

- 10) Wannarat, W., Motoyama, S., Masuda, K., Kawamura, F. and Inaoka, T. Tetracycline tolerance mediated by gene amplification in *Bacillus subtilis*. *Microbiol* **160**, 2474-2480 (2014)
- 11) Lee, K., Kusumoto, M., Sekizuka, T., Kuroda, M., Uchida, I., Iwata, T., Okamoto, S., Yabe, K., Inaoka, T. and Akiba, M. Extensive amplification of GI-VII-6, a multidrug resistance genomic island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, increases resistance to extended-spectrum cephalosporins. *Front Microbiol* **6**, 78 (2015)
- 12) Nicoloff, H., Perreten, V. and Levy, S. B. Increased genome instability in *Escherichia coli lon* mutants: Relation to emergence of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants caused by insertion sequence elements and large tandem genomic amplifications. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1293-1303 (2007)
- 13) Nicoloff, H., Perreten, V., McMurry, L. M. and Levy, S. B. Role for tandem duplication and Lon protease in AcrAB-TolC-dependent multiple antibiotic resistance (Mar) in an *Escherichia coli* mutant without mutations in *marRAB* or *acrRAB*. *J Bacteriol* **188**, 4413-4423 (2006)

技術報告

2009年度及び2010年度精米粉末中無機元素, 並びに2009年度
ひじき粉末中無機元素の技能試験結果

内藤 成弘*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Keywords : 技能試験, 精米, ひじき, カドミウム, 総ヒ素, 鉛, 必須無機元素

**Results of the proficiency testing programs for determination of inorganic
elements in milled rice flour in 2009 and in 2010
and for determination of those in hijiki seaweed powder in 2009**

Shigehiro Naito*

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

National Food Research Institute, NARO provided proficiency testing programs for determination of cadmium and nine essential inorganic elements in milled rice flour in 2009 with 76 participants and in 2010 with 96 ones and for determination of total arsenic, cadmium, lead and those in hijiki seaweed powder in 2009 with 39 ones. Reported values on a fresh weight basis and dry weight values calculated using water content measured by each participant were analyzed according to the International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. In 53 of total 64 elements of the three programs, assigned values could be determined according to the Harmonized Protocol. The 53 elements had at least one questionable reported value with $2 \leq |z \text{ score}| < 3$ and 49 of them had at least one unsatisfactory reported values with $|z \text{ score}| > 3$. These results indicate that regular testing of accuracy of analytical values is one essential requirement for laboratories.

Keywords: proficiency testing, milled rice, hijiki, seaweed, total arsenic, cadmium, lead, essential inorganic elements

* 連絡先 (Corresponding author), naito@affrc.go.jp

緒 言

技能試験¹⁾²⁾への参加は、試験所認定³⁾⁴⁾や食品衛生法上の検査機関登録の必須条件⁵⁾であり、農林水産省の実態調査等で定量分析を受託する分析機関も技能試験への参加を要求されている¹⁾。これは、コーデックス委員会 (Codex Alimentarius Commission) が、食品の輸出入に係わる試験所への要求事項の一つとして、適切なプロフィシエンシテスティング (技能試験) への参加を挙げており⁶⁾、第三者が実施する技能試験に参加することが分析値の信頼性確保の一つの方法として国際的に認識されているためである。

欧州技能試験データベース EPTIS (European Proficiency Testing Information System)ⁱⁱ⁾によると、食品・飲料の分析化学の技能試験は、27カ国の海外プロバイダー86機関から418プログラム (FAPASⁱⁱⁱ⁾) 提供のプログラムはEPTISでは1プログラムに集約)、食品・飲料の微生物検査の技能試験は、17カ国の海外プロバイダー37機関から125プログラム (FEPASⁱⁱⁱ⁾) 提供のプログラムはEPTISでは1プログラムに集約) が提供されている。しかし、海外プロバイダーが提供する技能試験では、防疫上の理由から試料の日本への輸入が許可されず国内の試験室が参加できない場合や、国内で関心の高い試料・成分のプログラムが定期的に提供されていない場合がある。一方、国内で提供されている食品分析の技能試験^{iv)~ix)}は、対象食品・成分に限りがある。そこで、農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所では、食品からの摂取量低減のための行政的施策が実施されているカドミウムについて、国内で関心の高い米をマトリックスに選択し、さらに食事摂取基準等に関連して分析機会の多い必須無機元素も対象成分に加えた技能試験を2006年度から2010年度まで年1回提供した^{7)~9)}。さらに2008年度には、産業技術総合研究所計量標準総合センター (NMIJ) が微量元素分析用ひじき粉末標準物質に関する研究開発の中で生産した候補標準物質を用いたひじき粉末中の総ヒ素、カドミウム、鉛及び必須無機元素の技能試験を提供した¹⁰⁾。2011年度から2013年度では、NMIJが生産した玄米粉末中の無機元素の候補標準物質を用いた技能試験をNMIJと共催で年1回提供し¹¹⁾、2014年度はイカ粉末中の無機元素の候補標準物質を用いた技能試験^{x)}をNMIJと共催で1回提供した。

技能試験では、実施者が均質な試料を参加試験室に配付し、各試験室は任意の方法で分析後、実施者に分

析値を提出する。実施者は分析値の評価結果 (かたより) を示した報告書を各参加試験室に送付するので、参加試験室はかたよりの大小によって各自の技能を確認し、他の試験室の分析方法などを参考にして、技能試験の結果を分析技能の向上に役立てることができる。技能試験の結果は参加者だけに報告されるのが原則のため、参加者以外が技能試験結果の情報を入手することは一般的に制限されている。しかし、測定値の分布や使用された測定法に関する情報など、技能試験結果には参加者以外にとっても有益な情報が多く含まれる。また、技能試験への参加の必要性を啓発するためにも、技能試験結果を多くの人に知ってもらう必要がある。そこで、本報告では、2009年度及び2010年度に実施した精米粉末中のカドミウム及び必須無機元素の技能試験の結果、並びに2009年度に実施したひじき粉末中の総ヒ素、カドミウム、鉛及び必須無機元素の技能試験の結果について報告する。

実験方法

1. 試料

2009年度の精米粉末試料 (以下、2009精米又は2009精米試料と略記) 及びひじき粉末試料 (以下、2009ひじき又は2009ひじき試料と略記) は2009年4月に、2010年度精米粉末試料 (以下、2010精米又は2010精米試料と略記) は2010年5月に食品総合研究所で各々調製した。2009精米試料では玄米を家庭用精米機 (象印マホービン、BR-EA35) で歩留まり約90%に搗精した精米を用いた。2010精米試料では玄米をワンパス式精米機 (サタケ)、家庭用精米機 (象印マホービン、BT-AE05) の順に用いてカドミウム濃度の高い米及び低い米を歩留まり約90%に各々搗精し、両方の濃度の精米を混合した精米を用いた。2009ひじき試料では市販の芽ひじきを用いた。精米及びひじきは、チタン製0.5 mmメッシュ及びチタン製ロータをセットした超遠心粉碎機 (14000 rpm, Retsch ZM200) で各々粉碎し、縮分器 (Retsch PT100) で粉末試料約20 gをポリプロピレン製分解試料管 (65 mL デジチューブ、ジーエルサイエンス) に詰め、試料管にラベルを貼り、その後に減圧シーリング (東静電気、TOSPACK V-380G) を行い、配付まで常温保管した。

2. 測定対象成分

精米の測定対象成分はカドミウム、ナトリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、

カリウム及びリンとし、成分の選択は任意とした。また、元素測定時に併行して、日本食品標準成分表が穀類の粉類で採用している試料量 3 g, 135℃, 1時間の常圧通風加熱乾燥法¹²⁾の試料量を 1 gに変更して水分測定を行うことを要求した。

ひじきの測定対象成分は総ヒ素、カドミウム、鉛、鉄、亜鉛、銅、マンガン、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム及びリンについて任意とした。また、元素測定に併行して、日本食品標準成分表が藻類の乾燥品で採用している試料量 5 g, 105℃, 5時間の常圧通風加熱乾燥法の試料量を 2 gに変更して水分測定を行うことを要求した。

3. 配付

2009精米試料は2009年8月5日に80人に、2010精米試料は2010年8月24日に100人に、2009ひじき試料は2009年8月25日に43人に各々発送した。精米、ひじきともに試料番号がラベルされた試料管とともに実施要領、試験結果報告用紙、分析方法報告用紙を参加者に送付した。報告の締め切りは、2009精米：2009年11月4日、2010精米：2010年11月5日、2009ひじき：2009年11月30日とした。

4. 統計解析

統計解析の手順は、IUPACの技能試験に関するハーモナイズドプロトコル¹⁾(以下、ハーモナイズドプロトコルと略記)に従った。外れ値検出には、ハーモナイズドプロトコルに例として記載されている中央値±50%超の値を外れ値とする方法及び箱ひげ図¹³⁾を用いた。ただし、箱ひげ図は中央値±50%超の値を除去してもロバスト標準偏差がハーモナイズドプロトコルの許容範囲に入らない場合にだけ用いた。ハーモナイズドプロトコルに従って付与値を決定できなかった場合は、中央値±50%超の外れ値を除去後の中央値を

付与値の参考値とし、中央値の標準不確かさ u は中央値の95%信頼区間¹⁴⁾から求めた。

z スコアを計算するときの標準偏差は、水分及び各元素の付与値又は参考値をHorwitzの式¹⁵⁾¹⁶⁾に代入して計算した。加熱乾燥法を用いる水分測定法は経験的分析法のため、得られた水分値はAOAC Internationalのガイドライン^{xi)}ではHorwitzの式の適用外である。しかし、Horwitzら¹⁷⁾は、水分の室間再現標準偏差のデータにもHorwitzの式が当てはまることを報告している。そこで、水分データの解析でもHorwitzの式を用い、その結果は参考とした。付与値を求めるための計算から除外した参加者についても、参考値として z スコアを計算した。解析にはExcel2013及びフリーウェアR^{xii)}のバージョン3.1.3を用いた。

技能試験の結果

試料重に水分含量を含む新鮮重(生重量)当たりの元素濃度はmg/kg fw又はg/kg fw、試料の水分含量を補正した乾物重(乾重量)当たりの元素濃度はmg/kg dw又はg/kg dwと示す。

1. 報告数と参加機関

2009精米は締め切り日までに65人、締め切り後に11人の合計76人、2010精米は締め切り日までに84人、締め切り後に12人の合計96人、2009ひじきは締め切り日までに34人、締め切り後に5人の合計39人から分析値が報告された。参加者の所属先による分類を表1に示す。

2. 報告値の解析結果

回収率の測定は行っていないことから、元素の報告値は回収率による補正はしていない。

ハーモナイズドプロトコルに従って報告値から求

表1. 技能試験参加者の所属先による分類

所属先	2009精米		2010精米		2009ひじき	
	参加者数	割合(%)	参加者数	割合(%)	参加者数	割合(%)
独法研究・検査機関	15	19.7	19	19.8	4	10.3
都道府県の研究機関	22	28.9	28	29.2	6	15.4
依頼分析受託機関	29	38.2	22	22.9	16	41.0
民間会社	6	7.9	22	22.9	8	20.5
大学	4	5.3	5	5.2	5	12.8
計	76	100	96	100	39	100

注) 複数人参加した機関があるため参加者数を集計

めた付与値及び標準不確かさ、 z スコアの分布を2009精米は表2、2010精米は表3、2009ひじきは表4に示す。表2から表4には、報告された水分で補正した乾物重当たりの測定値の解析結果も示す。

外れ値検出方法にハーモナイズドプロトコルに記載のない箱ひげ図も用いた成分がある2009精米及び2009ひじきについては、外れ値検出方法が1)ハーモナイズドプロトコルに記載のある中央値 $\pm 50\%$ 超のみの場合、2)1)の除去後に箱ひげ図も用いた場合の両方の結果を表2及び表4に示した。ただし、両方の結果を併記した成分の1)の結果はハーモナイズドプロトコルの付与値採用条件(以下で説明する表2及び表4のHorRat(R)¹⁸) ≤ 1.2 を満たしていないため参考値とした。付与値の標準不確かさは1)の値が原理的に2)の値以上の大きさになるが、1)の付与値の標準不確かさもハーモナイズドプロトコルの許容条件(z スコア計算における付与値の標準不確かさを無視できるように、付与値の標準不確かさ $\leq 0.3 \times \text{Horwitz}$ の式¹⁵⁾¹⁶⁾を用いた室間再現標準偏差の予測値)は満たしている。次に、1)と2)の z スコアの分布を比較すると、2009精米の乾物重当たりのマグネシウムのみ $|z\text{スコア}| \leq 2$ の参加者数が異なるが、他の成分では $|z\text{スコア}| \leq 2$ の参加者数及び $|z\text{スコア}| \leq 3$ の参加者数は同じ結果であった(表2、表4)。

外れ値検出に中央値 $\pm 50\%$ 超及び箱ひげ図を用いても報告値のばらつきが大きくてハーモナイズドプロトコルに従った付与値(HuberのH15アルゴリズムを用いたロバスト平均値、又はデータ分布を正規分布カーネルで推定したカーネル密度の最頻値)を決定できなかった成分は、2009精米では新鮮重当たり及び乾物重当たりのナトリウム、鉄及びカリウムの6成分、2010精米では新鮮重当たり及び乾物重当たりのナトリウム及びカルシウム、並びに乾物重当たりの鉄の5成分、2009ひじきでは水分の1成分であった。これらの成分については、中央値 $\pm 50\%$ 超の外れ値を除去後の中央値を付与値の参考値とした。これまでに報告した技能試験の結果^{7)~10)}では、中央値の標準不確かさ u は計算不可としていたが、この報告では中央値の95%信頼区間を拡張不確かさ(U , 包含係数 $k=2$)として計算した。中央値の95%信頼区間は中央値の上側と下側で幅が異なる場合があるが、上下対称の幅として上側と下側の幅の平均値を求め、その1/2を中央値の標準不確かさとして表2から表4に記載した。そして、中央値の標準不確かさに有効データ数の平方根を掛けて1回測定の標準不確かさを求めた。

表2から表4に示した1回測定の相対標準不確かさは、複数の試験室が任意の分析法を用いたときの不確かさを示しており、複数の試験室が同じプロトコルの分析法を用いる室間再現標準偏差よりも大きくなる変動要因を含んでいる¹⁹⁾。室間再現相対標準偏差の大きさの評価指標であるHorRat(R)を1回測定の相対標準不確かさについてHorwitzの式を用いて計算し、外れ値除去後の報告値のばらつきの評価指標とした。ハーモナイズドプロトコルでは、付与値へのロバスト平均値の採用条件がHorRat(R) ≤ 1.2 のため、付与値計算にHuberのH15アルゴリズムを用いた表2~表4の成分のHorRat(R)はすべて1.2以下である。付与値へのロバスト平均値の採用条件を満たさない場合に、付与値にカーネル密度推定法の最頻値を採用する条件は、最頻値の標準誤差のHorRat(R) ≤ 0.3 (z スコア計算における付与値の不確かさを無視するための条件)のため、1回測定のHorRat(R) $\leq 0.3 \times (\text{有効データ数の平方根})$ になる。つまり、最頻値を付与値に採用した成分の有効データ数が16個より多くなると、その成分の1回測定のHorRat(R)は1.2より大きくなる。最頻値を付与値に採用した表2のカルシウムの有効データ数は22個のため1回測定のHorRat(R)は1.4である。付与値の参考値に中央値を採用した12成分の1回測定のHorRat(R)は1.7から4.9と大きい。特に、2009精米及び2010精米のナトリウムは1回測定のHorRat(R)がすべて4を超えており、報告値のばらつきが大きい。

考 察

1. $|z\text{スコア}| > 3$ の報告値に関する検討

2009精米、2010精米及び2009ひじきの新鮮重当たり及び乾物重当たりの全64元素のうちハーモナイズドプロトコルに従って付与値を決定できなかった11元素を除いた53元素すべてに技能評価で「疑わしい」と判定される $2 < |z\text{スコア}| \leq 3$ の報告値が存在し、「不満足」と判定される $|z\text{スコア}| > 3$ の報告値が2009精米の新鮮重当たり及び乾物重当たりの亜鉛及び銅以外の49元素に存在した(表2~表4)。53元素中の49元素で、 $|z\text{スコア}| > 3$ となるかたよりの大きい報告値が存在することは、定量分析を行うすべての試験室は分析値のかたよりを定期的に点検する必要性を示している。

$|z\text{スコア}| > 3$ の報告値を与えた元素分析における前処理法及び測定法について調べた結果、同一条件の前処理法及び測定法が1件だけは、蛍光X線法、並び

表 2. 2009年度精米粉中無機元素の技能試験結果

測定対象成分 ^{a)}	報告数	有効データ数 ^{d)}	外れ値検出法 ^{e)}	付与値計算法 ^{f)}	付与値	付与値の標準不確かさ ^{g)}	1回測定の標準不確かさ ^{h)}	1回測定の相対標準不確かさ(%)	HorRat(R) ⁱ⁾	zスコア	zスコア	zスコア	zスコア
										≤2の参加者数	≤2の率(%)	≤3の参加者数	≤3の率(%)
水分 ^{b)} (% (質量分率))	76	(70)	2	H15	(11.7)	(0.05)	(0.40)	(3.4)	(1.2)	(59)	(78)	(68)	(89)
		(76)	1	中央値	(11.7)	(0.05)	(0.40)	(3.4)	(1.2)	(59)	(78)	(68)	(89)
Cd (mg/kg fw)	76	74	1	H15	0.611	0.005	0.044	7.2	0.4	74	97	74	97
Na ^{c)} (mg/kg fw)	21	(16)	1	中央値	(10.8)	(1.4)	(5.4)	(50.0)	(4.5)	(8)	(38)	(11)	(52)
Mg (mg/kg fw)	29	24	2	H15	274	4	18	6.6	1.0	22	76	24	83
		(27)	1	中央値	(277)	(7)	(34)	(12.3)	(1.8)	(22)	(76)	(24)	(83)
Ca (mg/kg fw)	27	22	2	最頻値	41.1	1.1	5.3	12.9	1.4	18	67	21	78
		(23)	1	中央値	(40.9)	(1.2)	(5.6)	(13.7)	(1.5)	(18)	(67)	(21)	(78)
Fe ^{c)} (mg/kg fw)	26	(23)	1	中央値	(2.31)	(0.13)	(0.60)	(26.0)	(1.8)	(17)	(65)	(21)	(81)
Zn (mg/kg fw)	33	33	1	H15	18.7	0.2	1.2	6.4	0.6	32	97	33	100
Cu (mg/kg fw)	35	35	1	H15	3.35	0.05	0.31	9.3	0.7	34	97	35	100
Mn (mg/kg fw)	30	30	1	H15	11.7	0.3	1.4	12.0	1.1	26	87	29	97
K ^{c)} (g/kg fw)	28	(26)	1	中央値	(1.33)	(0.04)	(0.18)	(13.5)	(2.5)	(21)	(75)	(24)	(86)
P (g/kg fw)	22	22	1	H15	1.20	0.02	0.07	5.8	1.1	19	86	21	95
Cd (mg/kg dw)	76	74	1	H15	0.690	0.006	0.049	7.1	0.4	74	97	74	97
Na ^{c)} (mg/kg dw)	21	(16)	1	中央値	(12.3)	(1.5)	(6.1)	(49.6)	(4.5)	(8)	(38)	(11)	(52)
Mg (mg/kg dw)	29	24	2	H15	311	4	21	6.8	1.0	21	72	24	83
		(27)	1	中央値	(315)	(8)	(39)	(12.4)	(1.8)	(23)	(79)	(24)	(83)
Ca (mg/kg dw)	27	22	2	最頻値	46.7	1.3	6.0	12.8	1.4	18	67	21	78
		(23)	1	中央値	(46.5)	(1.3)	(6.1)	(13.1)	(1.5)	(18)	(67)	(21)	(78)
Fe ^{c)} (mg/kg dw)	26	(23)	1	中央値	(2.62)	(0.15)	(0.70)	(26.7)	(1.9)	(18)	(69)	(21)	(81)
Zn (mg/kg dw)	33	33	1	H15	21.2	0.2	1.4	6.6	0.7	32	97	33	100
Cu (mg/kg dw)	35	35	1	H15	3.79	0.06	0.37	9.8	0.7	32	91	35	100
Mn (mg/kg dw)	30	30	1	H15	13.3	0.3	1.6	12.0	1.1	25	83	29	97
K ^{c)} (g/kg dw)	28	(26)	1	中央値	(1.51)	(0.04)	(0.19)	(12.6)	(2.4)	(21)	(75)	(24)	(86)
P (g/kg dw)	22	22	1	H15	1.36	0.02	0.09	6.6	1.2	19	86	20	91

a) mg/kg fw 又は g/kg fw：試料重に水分含量を含む新鮮重（生重量）当たりの元素濃度

mg/kg dw 又は g/kg dw：試料の水分含量を補正した乾物重（乾重量）当たりの元素濃度

b) 水分は適用外の Horwitz の式を解析に利用したため、解析結果はすべて参考値として（）で示した。

c) ハーモナイズドプロトコルに従って付与値を決定できなかったため、解析結果はすべて参考値として（）で示した。

d) 付与値を決定したデータ数（外れ値除去後のデータ数）

e) 1：中央値±50%超を外れ値として除外（ハーモナイズドプロトコルに外れ値検出法の例として記載のある方法）

2：1)の除去後に箱ひげ図（ハーモナイズドプロトコルに記載なし）で検出した外れ値を除外

f) H15：HuberのH15アルゴリズムを用いたロバスト平均値（ハーモナイズドプロトコルに従った付与値計算方法）

最頻値：データ分布を正規分布カーネルで推定したカーネル密度の最頻値（H15で付与値を決定できなかった場合のハーモナイズドプロトコルに従った付与値計算方法）

中央値：中央値±50%超を除去後の中央値（ハーモナイズドプロトコルに従った付与値を決定できなかった場合に採用した参考値）。中央値を採用した解析結果はすべて参考値として（）で示した。

g) 付与値計算法がH15の場合：Huberのロバスト標準偏差/√有効データ数

付与値計算法が最頻値の場合：ブートストラップ法で計算した最頻値の標準誤差

付与値計算法が中央値の場合：中央値の95%信頼区間の1/4の値

h) 付与値計算法がH15の場合：Huberのロバスト標準偏差

付与値計算法が最頻値の場合：ブートストラップ法で計算した最頻値の標準誤差×√有効データ数

付与値計算法が中央値の場合：中央値の95%信頼区間の1/4の値×√有効データ数

i) 1回測定の相対標準不確かさ/Horwitzの式を用いた室間再現相対標準偏差の予測値

表 3. 2010年度精米粉末中無機元素の技能試験結果

測定対象成分 ^{a)}	報告数	有効データ数 ^{d)}	外れ値検出法 ^{e)}	付与値計算法 ^{f)}	付与値	付与値の標準不確かさ ^{g)}	1回測定の標準不確かさ ^{h)}	1回測定の相対標準不確かさ(%)	HorRat(R) ⁱ⁾	zスコア ≤ 2の参加者数	zスコア ≤ 2の率(%)	zスコア ≤ 3の参加者数	zスコア ≤ 3の率(%)
水分 ^{b)} (% (質量分率))	96	(95)	1	H15	(12.5)	(0.04)	(0.38)	(3.0)	(1.1)	(80)	(83)	(85)	(89)
Cd (mg/kg fw)	90	84	1	H15	0.185	0.002	0.017	9.2	0.4	83	92	84	93
Na ^{c)} (mg/kg fw)	28	(19)	1	中央値	(7.43)	(0.85)	(3.7)	(49.8)	(4.2)	(10)	(36)	(15)	(54)
Mg (mg/kg fw)	38	37	1	H15	241	3	20	8.3	1.2	34	89	36	95
Ca ^{c)} (mg/kg fw)	39	(34)	1	中央値	(38.1)	(1.1)	(6.1)	(16.0)	(1.7)	(27)	(69)	(31)	(79)
Fe (mg/kg fw)	39	28	1	H15	1.95	0.07	0.35	17.9	1.2	27	69	27	69
Zn (mg/kg fw)	46	44	1	H15	16.5	0.2	1.3	7.9	0.8	43	93	43	93
Cu (mg/kg fw)	46	41	1	H15	2.10	0.04	0.23	11.0	0.8	39	85	41	89
Mn (mg/kg fw)	42	40	1	H15	7.15	0.10	0.64	9.0	0.8	36	86	40	95
K (g/kg fw)	39	37	1	H15	1.03	0.01	0.06	5.8	0.4	33	85	34	87
P (g/kg fw)	36	35	1	H15	1.05	0.01	0.07	6.67	0.4	28	78	30	83
Cd (mg/kg dw)	89	83	1	H15	0.211	0.002	0.019	9.0	0.4	82	92	83	93
Na ^{c)} (mg/kg dw)	27	(19)	1	中央値	(9.00)	(1.16)	(5.07)	(56.3)	(4.9)	(11)	(41)	(14)	(52)
Mg (mg/kg dw)	37	36	1	H15	275	4	23	8.4	1.2	33	89	35	95
Ca ^{c)} (mg/kg dw)	38	(33)	1	中央値	(43.1)	(1.2)	(6.6)	(15.3)	(1.7)	(26)	(68)	(30)	(79)
Fe ^{c)} (mg/kg dw)	38	(28)	1	中央値	(2.18)	(0.13)	(0.70)	(32.1)	(2.3)	(26)	(68)	(27)	(71)
Zn (mg/kg dw)	45	42	1	H15	18.8	0.2	1.3	6.9	0.7	42	93	42	93
Cu (mg/kg dw)	45	40	1	H15	2.39	0.05	0.29	12.1	0.9	38	84	39	87
Mn (mg/kg dw)	41	39	1	H15	8.16	0.12	0.74	9.1	0.8	35	85	39	95
K (g/kg dw)	38	36	1	H15	1.17	0.01	0.07	6.0	0.4	31	82	33	87
P (g/kg dw)	35	34	1	H15	1.20	0.01	0.07	5.8	0.4	28	80	29	83

a) ~ i) : 表 2 参照

に2010精米：鉄の電気加熱式原子吸光法 (248.3 nm) 及びICP発光分析法 (371.9 nm), 銅のICP質量分析法 (63, Co), 2009ひじき：カリウムのICP発光分析法 (404.7 nm) だけであり, 他の方法には同一又は類似の条件で|zスコア| ≤ 2の報告値があり問題点は見つけられなかった。

ハーモナイズドプロトコルに従って付与値を決定できた新鮮重当たりの元素について, 元素ごとに|zスコア| > 3の報告数を調べた結果, 2009精米ではカルシウムの6個 (負のzスコア: 3個, 正のzスコア: 3個), 2010精米では鉄の12個 (負のzスコア: 3個, 正のzスコア: 9個), 2009ひじきでは総ヒ素の7個

表 4. 2009年度ひじき粉末中無機元素の技能試験結果

測定対象成分 ^{a)}	報告数	有効データ数 ^{d)}	外れ値 ^{e)} 検出法	付与値計算法 ^{f)}	付与値	付与値の標準不確かさ ^{g)}	1回測定の標準不確かさ ^{h)}	1回測定の相対標準不確かさ(%)	HorRat(R) ⁱ⁾	zスコア	zスコア	zスコア	zスコア
										≤2の参加者数	≤2の率(%)	≤3の参加者数	≤3の率(%)
水分 ^{b)} (% (質量分率))	39	(39)	1	中央値	(3.9)	(0.08)	(0.47)	(12.1)	(3.7)	(19)	(49)	(25)	(64)
As ^{c)} (mg/kg fw)	32	23 (29)	2 1	H15 中央値	132 (131)	1 (3)	7 (13)	5.3 (9.9)	0.7 (1.3)	22 (22)	69 (69)	25 (25)	78 (78)
Cd (mg/kg fw)	31	28	1	H15	0.651	0.014	0.077	11.8	0.7	27	87	28	90
Pb (mg/kg fw)	24	21	1	H15	1.06	0.04	0.19	17.9	1.1	19	79	21	88
Fe (mg/kg fw)	24	22	1	H15	146	3	13	8.9	1.2	19	79	20	83
Zn (mg/kg fw)	27	24	1	H15	12.6	0.2	1.2	9.5	0.9	22	81	23	85
Cu (mg/kg fw)	28	26	1	H15	2.68	0.04	0.22	8.2	0.6	26	93	26	93
Mn (mg/kg fw)	25	24	1	H15	9.46	0.16	0.78	8.2	0.7	24	96	24	96
Na (g/kg fw)	22	20	1	H15	11.5	0.1	0.5	4.3	1.1	18	82	19	86
K (g/kg fw)	26	21 (24)	2 1	H15 中央値	48.1 (47.7)	0.4 (0.5)	1.7 (2.3)	3.5 (4.8)	1.1 (1.5)	18 (18)	69 (69)	19 (19)	73 (73)
Mg (g/kg fw)	28	25 (26)	2 1	H15 中央値	5.56 (5.57)	0.06 (0.06)	0.28 (0.31)	5.0 (5.6)	1.2 (1.3)	24 (24)	86 (86)	25 (25)	89 (89)
Ca (g/kg fw)	26	24	1	H15	14.0	0.1	0.5	3.6	0.9	20	77	21	81
P (g/kg fw)	22	20	1	H15	0.977	0.012	0.052	5.3	0.9	16	73	19	86
As ^{c)} (mg/kg dw)	32	25 (29)	2 1	H15 中央値	136 (136)	2 (3)	9 (15)	6.6 (11.0)	0.9 (1.4)	22 (22)	69 (69)	25 (25)	78 (78)
Cd (mg/kg dw)	31	28	1	H15	0.676	0.015	0.081	12.0	0.7	27	67	28	90
Pb (mg/kg dw)	24	21	1	H15	1.11	0.04	0.20	18.0	1.1	19	79	21	88
Fe (mg/kg dw)	24	22	1	H15	151	3	14	9.3	1.2	19	79	20	83
Zn (mg/kg dw)	27	24	1	H15	13.1	0.3	1.3	9.9	0.9	22	81	23	85
Cu (mg/kg dw)	28	26	1	H15	2.79	0.04	0.22	7.9	0.6	26	93	26	93
Mn (mg/kg dw)	25	24	1	H15	9.83	0.17	0.82	8.3	0.7	24	96	24	96
Na (g/kg dw)	22	20	1	H15	12.0	0.1	0.6	4.7	1.2	17	77	20	91
K (g/kg dw)	26	19 (24)	2 1	H15 中央値	49.9 (49.7)	0.3 (0.5)	1.3 (2.2)	2.6 (4.4)	0.8 (1.4)	18 (18)	69 (69)	19 (19)	73 (73)
Mg (g/kg dw)	28	25 (26)	2 1	H15 中央値	5.79 (5.80)	0.06 (0.07)	0.30 (0.36)	5.2 (6.2)	1.2 (1.4)	25 (25)	89 (89)	25 (25)	89 (89)
Ca (g/kg dw)	26	24	1	H15	14.6	0.1	0.6	4.1	1.1	20	77	21	81
P (g/kg dw)	22	20	1	H15	1.01	0.01	0.05	5.0	0.9	16	73	19	86

c) 総ヒ素以外のa)～i)：表2参照

(負のzスコア：6個(2個は計算ミスの報告値)、正のzスコア：1個)及びカリウムの7個(負のzスコア：6個(2個は計算ミスの報告値)、正のzスコア：1個)が各技能試験で一番多く、これら4元素だけ $|z\text{スコア}| \leq 3$ の率が80%未満であった。ひじきの総ヒ素については、2008年度の技能試験結果¹⁰⁾においても $|z\text{スコア}| > 3$ の報告数が8個(負のzスコア：8個、正のzスコア：0個)で同様の傾向が認められたが、報告値に負のかたよりの多い原因は不明である。

ハーモナイズドプロトコルに従って付与値を決定できた新鮮重当たりの元素について、参加者ごとに $|z\text{スコア}| > 3$ の報告数を調べた結果、2009精米：1個が9名、2個が1名、4個が1名の計11名、2010精米：1個が16名、2個が3名、3個が1名、4個が2名、8個が1名の計23名、2009ひじき：1個が8名、2個が5名、3個が3名、4個が1名、5個が1名、9個が1名の計19名が報告していた。2009精米の4個は蛍光X線分析法の報告値であり、2010精米の8個、並びに2009ひじきの5個及び9個は付与値の約1/10の値を報告していた。また、2010精米では付与値の約10倍の値を2名(1名は1元素、もう1名は2元素)が報告していた。付与値の約1/10の値を報告した3名は、今回の技能試験では1kg当たりの濃度の報告を参加者に要求したのに、100g当たりの濃度を報告したと考えられる。付与値の約10倍の値を報告した原因は転記ミス又は計算ミスが疑われる。

分析値がかたよる原因としては、コンタミネーション、計算ミス、希釈倍率の間違い、検量線作成の問題、前処理条件の問題、測定条件の問題等が考えられる。 $|z\text{スコア}| > 3$ の報告値を提出した参加者の内部質管理(IQC: Internal Quality Control)の実施状況は未確認であるが、2011年度に実施した玄米粉中無機元素の技能試験¹¹⁾では、認証標準物質(CRM)を利用している試験室の報告値の方がCRMを利用していない試験室の報告値よりも付与値に近い傾向が認められている。内部質管理を適切に実施すれば分析値のかたよりは点検できることから、技能試験への参加とともに内部質管理を行うことの重要性が改めて確認された。

2. 付与値を決定できなかった元素に関する検討

精米の無機元素分析の技能試験^{7)~9)}は2006年度から2010年度までに今回の2回を含め計5回提供した。5回の技能試験においてハーモナイズドプロトコルに従って付与値を決定できなかった回数を新鮮重当たりの濃度について元素別に集計すると、ナトリウム：

5回、カルシウム：3回、鉄：3回、カリウム：2回、リン：1回であった。これらの元素について(年度、報告数、有効データ数)の形式で示すと、ナトリウム：(2006, 20, 14) (2007, 20, 12) (2008, 17, 13) (2009, 21, 16) (2010, 28, 19)、カルシウム：(2007, 21, 16) (2008, 20, 20) (2010, 39, 34)、鉄：(2006, 25, 23) (2008, 19, 15) (2009, 26, 23)、カリウム：(2006, 24, 21) (2009, 28, 26)、リン：(2007, 15, 14)である。報告数と有効データ数の差は、中央値±50%超の報告数であり、付与値を決定できなかった元素にはかたよりの大きい外れ値が多いことが認められる。ナトリウムはコンタミネーションの発生しやすい元素である²⁰⁾ことが影響していると考えられた。

ひじきの無機元素分析の技能試験は2008年度¹⁰⁾及び2009年度の2回提供した。ハーモナイズドプロトコルに従って付与値を決定できず、外れ値除去後の中央値を参考値に採用した元素は、2008年度のナトリウムだけであった。ただし、2008年度のひじきの技能試験への参加者が26名と少なかったため、鉛、銅、ナトリウム、カルシウム及びリンは有効データ数(12~14個)がハーモナイズドプロトコルの条件(15個以上)を満たさず参考値とした。

参加者数が限定された技能試験に関するIUPAC/CITACガイド²¹⁾には、統計的な不確かさの観点から検討した結果、報告数が30個未満の技能試験の報告値から付与値を決定するのは好ましくなく、参加者には非明示でCRMを配付試料として利用することが好ましいと記載されている。

2010精米のカルシウムでは報告数が39個でもハーモナイズドプロトコルに従って付与値を決定できなかった。したがって、参加者数が多くて有効データ数が30個以上の技能試験においても、ハーモナイズドプロトコルに従って報告値から付与値を決定できない場合があるため、配付試料にCRM又はCRMとトレーサブルな試料²²⁾を可能な限り利用すべきである。

要 約

農研機構食品総合研究所は、精米粉末中のカドミウム及び必須無機元素の技能試験を2009年度(報告数76)及び2010年度(報告数96)に、ひじき粉末中の総ヒ素、カドミウム、鉛及び必須無機元素の技能試験を2009年度(報告数39)に提供した。参加者からの新鮮重当たりの報告値及び参加者が測定した水分を用いて計算した乾物重当たりの値は、IUPACの国際ハーモナ

イズドプロトコルに従って解析した。三つの技能試験でデータ解析した全64元素のうち53元素は、ハーモナイズドプロトコルに従って付与値を決定できた。これら53元素のすべてに技能評価で「疑わしい」と判定される $2 < |z\text{スコア}| \leq 3$ の報告値が存在し、そのうち49元素には「不満足」と判定される $|z\text{スコア}| > 3$ の報告値が存在した。これらの結果は、分析機関は定期的に分析値の精確さを点検する必要があることを示している。

謝 辞

技能試験提供時の農研機構食品総合研究所食品分析・標準化センター長の矢部希見子博士、前センター長の安井明美博士に感謝いたします。試料調製を補助していただいた農研機構食品総合研究所品質情報解析ユニットの進藤久美子主任研究員、尾藤知香氏、状態分析ユニットの白井美幸氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R., The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report). *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145-196 (2006).
- 2) JIS Q 17043, 適合性評価 --- 技能試験に対する一般要求事項 (2011).
- 3) ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (2005).
- 4) JIS Q 17025, 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項 (2005).
- 5) 厚生労働省, 食品衛生検査施設における検査等の業務の管理の実施について (平成9年4月1日衛食第117号)
- 6) Codex CAC/GL 27, Guidelines for the assessment of the competence of testing laboratories involved in the import and export control of food (1997).
- 7) 進藤久美子, 塚越芳樹, 内藤成弘, 稲垣和三, 鎗田孝, 成川知弘, 千葉光一, 安井明美, 精米粉末中カドミウム及び主要無機質の技能試験, *分析化学*, **57**(6), 427-437 (2008).
- 8) 内藤成弘, 進藤久美子, 安井明美, 精米粉末中カドミウム及び必須無機元素の2007年度技能試験結果, *食総研報*, **77**, 69-77 (2013).
- 9) 内藤成弘, 門倉雅史, 安井明美, 精米粉末中のカドミウム及び必須無機元素の2008年度技能試験結果, *食総研報*, **78**, 47-55 (2014).
- 10) 内藤成弘, 成川知弘, 安井明美, ひじき粉末中の総ヒ素, カドミウム, 鉛及び必須無機元素の2008年度技能試験結果, *食総研報*, **79**, 47-56 (2015).
- 11) Miyashita, S., Inagaki, K., Naito, S., Shindoh, K., Narukawa, T., Zhu, Y., Kuroiwa, T., Hioki, A., Fujimoto, T. and Chiba, K., Identification of possible technical problems in determination of the major inorganic constituents of brown-rice flour by evaluating proficiency test results, *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**(25), 8347-8362 (2013).
- 12) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編, [付表] 水分定量法: 食品別試料前処理法と測定方法一覧表, 「五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル」, (国立印刷局, 東京), pp. 9-11 (2005).
- 13) 渡部洋, 鈴木規夫, 山田文康, 大塚雄作, 箱型図, 「探索的データ解析入門」, (朝倉書店, 東京), pp. 33-37 (1985).
- 14) Hill, I.D., 95% confidence limits for the median, *J. Stat. Comput. Simul.*, **28**(1), 80-81 (1987).
- 15) Horwitz, W., Kamps, L.R. and Boyer, K.W., Quality assurance in the analysis foods for trace constituents, *J. AOAC*, **63**(6), 1344-1354 (1980).
- 16) 内藤成弘, Horwitzの式, 「最新版食品分析法の妥当性確認ハンドブック」, 第1版, 安井明美, 五十君静信, 後藤哲久, 丹野憲二, 湯川剛一郎編, (サイエンスフォーラム, 東京), pp. 76-78 (2010).
- 17) Horwitz W., Albert R. and Deutsch, M., Precision parameters of methods of analysis required for nutrition labeling. Part I. major nutrients, *J. AOAC*, **73**(5), 661-680 (1990).
- 18) Codex, CAC/GL 72-2009, Guidelines on analytical terminology (2009).
- 19) Thompson, M., Lowthian, P.J., A Horwitz-like function describes precision in a proficiency test, *Analyst*, **120**(2), 271-272 (1995).
- 20) 安井明美, ナトリウム, 「新・食品分析法」, 日本食品科学工学会新・食品分析法編集委員会編, (光琳, 東京), pp.156-162 (1996).
- 21) Kuselman, I. and Fajgelj, A., IUPAC/CITAC Guide:

Selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants—chemical analytical laboratories (IUPAC Technical Report), *Pure & Appl. Chem.*, **82**(5), 1099-1135 (2010).

- 22) Kuselman, I., Weisman, A., Wegscheider, W., Traceable property values of in-house reference materials, *Accred. Qual. Assur.*, **7**(3), 122-124 (2002).

引用 URL

- i) http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/guide_zenbun_1.pdf (2015. 10. 16)
- ii) <https://www.eptis.bam.de/en/index.htm> (2015.10. 16)
- iii) <http://sid.gsi.co.jp/fera/> (2015. 10. 16)
- iv) <http://www.jsac.or.jp/ginousiken/> (2015. 10. 16)
- v) http://www.fdsc.or.jp/service/gaibuseido/gaibuseido_main.html (2015. 10. 16)
- vi) <http://www.jfrl.or.jp/seminar/program.html> (2015. 10. 16)
- vii) <http://www.jffic.or.jp/proficiencytest> (2015. 10. 16)
- viii) <https://cosmokai.com/survey/> (2015. 10. 16)
- ix) <http://www.kanso.co.jp/environment/analysisExam/index.html> (2015. 10. 16)
- x) <https://www.nmij.jp/public/event/2014/proficiencytest/main.html> (2015. 10. 16)
- xi) http://www.eoma.aoac.org/app_d.pdf (2015. 10. 16)
- xii) <http://www.r-project.org/> (2015. 10. 16)

技術報告

画像認識技術による食品害虫の自動判別

曲山幸生^{1*}, 七里与子¹, 塚田佳苗¹, 宮ノ下明大¹, 今村太郎¹, 古井聡¹,
和田有史¹, 石山墨²

¹ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

² 日本電気株式会社 情報・メディアプロセッシング研究所
〒211-8666 神奈川県川崎市中原区下沼部1753

Keywords : 食品害虫, 画像認識, 類似度, 判別

Automatic Discrimination of Insect Pests of Foods by Image Recognition

Yukio Magariyama^{1*}, Kumiko Shichiri¹, Kanae Tsukada¹, Akihiro Miyanoshita¹,
Taro Imamura¹, Satoshi Furui¹, Yuji Wada¹, and Rui Ishiyama²

¹ National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-862, Japan

² Information and Media Processing Research Laboratories, NEC Corporation
1753, Shimonumabe, Nakahara-Ku, Kawasaki, Kanagawa 211-8666, Japan

Abstract

We developed a discrimination system for insect pests of foods. It consists of an originally developed computer program that calculates a similarity between two images, and a reference image library of 8 species of insect pests: *Sitophilus zeamais*, *Callosobruchus chinensis*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma serricornis*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Rhyzopertha dominica*, *Plodia interpunctella*, and *Sitotroga cerealella*. To characterize the discrimination system, we took 300 test pictures of 10 insect species: *Cryptolestes pusilloides*, *Cadra cautella*, and the 8 species mentioned above. The discrimination system made correct answers to them at 89 % in the simplest discrimination method in which the solution is the insect showing the highest similarity in the reference library. The percentage of correct answers for *P. interpunctella* was very low, 33 %, however. In addition to technical problem, some other problems such as securing remained to be fixed. Therefore, we conclude that the official service cannot be carried out by the present discrimination system.

Keywords: Insect pest of foods, Image recognition, Similarity, Discrimination

* 連絡先 (Corresponding author), maga@affrc.go.jp

緒言

食品工場、倉庫、小売店、レストラン等では、食品に昆虫が混入すると組織存続の危機に関わる大問題に発展しかねない。多くの事業者は問題が起こる前に普段から綿密な対策を立てているが、それでも対策の穴を完全になくすことは難しく、時に昆虫混入事例が発生することがある。その際、それをいち早く発見して、混入した昆虫と混入経路を同定し、対策を改良することが必要である。この努力を常に継続しているという姿勢を消費者が知れば、その事業者を信頼するようになるだろう。

一方、昆虫混入は家庭でも発生する。常温で保管している、米、小麦粉、乾燥麺類、菓子類、茶等に混入する危険性が高い。食品に昆虫が発生した時、家庭でも、その昆虫がどこからいかにして侵入してきたかを知ることができれば、混入しにくい保管方法に変えることができる。そのような本格的な対策を講じないまでも、混入した昆虫が健康被害を引き起こす危険性を知りたいのは当然である。また、家屋内で見かけた昆虫が、保管している食品から発生しているかもしれないと不安になることもある。

以上のような状況を考えると、食品に混入した昆虫の同定（厳密な場合もあれば、大まかでよい場合もある）が必要とされる場面は多い。このような需要に応えるため、昆虫を同定する専門業者が存在している。しかし、専門業者が提供するサービスは事業者向けのため、高額で時間がかかる。家庭で利用する時はもちろん、業務で利用する時でも、厳密性は低いが、低額で気軽に使えるサービスへの需要もあると思われる。

そこで、我々はそのようなサービスの技術的な基盤を確立するために、画像による食品害虫判別への取り組みを開始し、2年前に第1報¹⁾を報告した。そこでは、2画像間の類似度を算出する独自の食品害虫用判別プログラムと、4種類の昆虫（コクゾウムシ、コクヌストモドキ、タバコシバンムシ、ノシメマダラメイガ）に対する参照画像集から構成される判別システムを開発した。

本報では、その後、参照画像を増やした判別システムで、前報よりも詳細な検討を行った結果を報告する。また、判別技術以外の課題についても述べる。

実験方法

1. 類似度算出プログラム

判別の基本となる昆虫画像間の類似度を算出するプログラムは、著者のひとり（石山）が作成した。これは前報¹⁾で報告したものと同一で、主に輪郭の情報を利用する。このプログラムと参照画像集を実装した試験判別システムを農研機構食品総合研究所に設置し、本研究に使用した。プログラムは、参照画像名、参照画像、参照昆虫、類似度の情報を、類似度の高い順に出力する（図1）。

2. 参照画像集

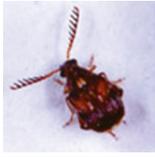
参照画像を撮影するために、農研機構食品総合研究所で飼育している8種類の昆虫（表1：コクゾウムシ、アズキゾウムシ、コクヌストモドキ、タバコシバンムシ、ノコギリヒラタムシ、コナナガシクイムシ、ノシメマダラメイガ、バクガ）を用いた。その



図1. 判別プログラムの出力例

試験画像（IMGPI357、コクゾウムシ、デジカメ自由方向）を判別プログラムに入力して得られた結果の先頭部分を示した。参照画像名、参照画像、参照昆虫、類似度の情報を類似度の高い順に表示する。

表 1. 本研究に使用した昆虫

分類目 昆虫名 学名 試験画像数 参照画像数	食品害虫サイト の画像	分類目 昆虫名 学名 試験画像数 参照画像数	食品害虫サイト の画像
コウチュウ コクゾウムシ <i>Sitophilus zeamais</i> 10×3 400		コウチュウ アズキゾウムシ <i>Callosobruchus chinensis</i> 10×3 400	
コウチュウ コクヌストモドキ <i>Tribolium castaneum</i> 10×3 400		コウチュウ タバコシバンムシ <i>Lasioderma serricorne</i> 10×3 400	
コウチュウ ノコギリヒラタムシ <i>Oryzaephilus surinamensis</i> 10×3 400		コウチュウ コナナガシクイムシ <i>Rhyzopertha dominica</i> 10×3 400	
チョウ ノシメダラメイガ <i>Plodia interpunctella</i> 10×3 400		チョウ バクガ <i>Sitotroga cerealella</i> 10×3 400	
コウチュウ ハウカクムネヒラタムシ <i>Cryptolestes pusilloides</i> 10×3 -		チョウ スジマダラメイガ <i>Cadra cautella</i> 10×3 -	

ハウカクムネヒラタムシとスジマダラメイガは、参照画像集には含まれていない。ハウカクムネヒラタムシは図鑑に登録されていないので、本研究で撮影した画像を掲載した。

後、前報¹⁾で報告した方法を用いて、参照画像を撮影した。参照画像数は、それぞれ400ずつである。

3. 試験画像の撮影

試験画像を撮影するために、参照画像に用いた8種類の昆虫に2種類（ハウカクムネヒラタムシ、スジマダラメイガ）を加え、合計10種類の昆虫（表1）を用意し、参照画像用昆虫と同様に、冷凍庫（-20℃）で24時間以上放置後、結露がなくなるまで常温に置いて、撮影用サンプルとした。参照画像集に含まれない昆虫を試験昆虫に加えた理由は、実際の適用場面では想定外の昆虫を処理する可能性があり、その場合にどのような判別結果が得られるのかを確認するためである。

用意した昆虫サンプルを、次の3つの条件で撮影した。

① 顕微鏡

参照画像と同じ方法を用いて撮影した。

② デジカメ背面

昆虫サンプルを濾紙（ADVANTEC, No2, 90 mm）の上に背を上にして置き、コンパクトデジタルカメラ（Pentax Optio WG-2）の顕微鏡モードを用いて撮影した。

③ デジカメ自由方向

昆虫サンプルを濾紙（ADVANTEC, No2, 90 mm）の上に向きを気にせずに置き、コンパクトデジタルカメラ（PENTAX Optio WG-2）の顕微鏡モードを用いて撮影した。

4. クラスタ分析

大村の教科書²⁾に従って解析した。すなわち、試験画像に対する参照画像の類似度TOP100の件数を基に、

試験昆虫間の相関係数を求め、正の相関が強い順に組を作った。組と組の間の相関は、それに含まれる要素間の相関係数の平均とした。

5. 試験的サービス

2013年10月16日から、食品害虫サイト内に「食品害虫を写真で検索」というページを設け、利用者から写真を電子メール送ってもらい、判別結果を電子メールで回答するというサービスを実施した。回答メールには、判別プログラムで最も類似度の高かった昆虫名とコメントを記載した。

実験結果および考察

1. 判別技術

試験画像300枚（試験昆虫10種類×撮影条件3×10枚）と、参照画像3,200枚（参照昆虫8種類×400枚）との間の類似度（合計96,000件）を判別プログラムにより求めた。図1は判別プログラムの出力例である。これを基に、判別システムの特性を解析した。

(1) 判別システムの正答率

本研究で開発した判別システムを用いて最も簡単に判別を下す方法は、類似度が最も高かった参照昆虫を判別結果とすることである。表2に、この方法で判別した結果をまとめた。全8種類の試験昆虫の正答率は89%だが、ノシメマダラメイガは33%で、極めて正答率が低かった。ノシメマダラメイガの誤答はすべてバクガであった。一方、バクガの正答率は100%であった。この結果を解釈すると、この判別システムでは、

ノシメマダラメイガはバクガに似ているが、バクガはノシメマダラメイガに似ていないと判断したことになる。なぜこのような判別が生じるのか、今後検討が必要である。

前述の判別方法を用いた場合の対応する類似度を図2に示した。これから、試験昆虫ノシメマダラメイガに対して、誤答（図2の▲）した時の類似度が正答した時と同程度であることがわかった。試験昆虫アズキゾウムシに対する正答率は93%だが、ノシメマダラメイガと同様に、誤答した時の類似度は高かった。

その他の6種類の試験昆虫では、誤答した時の類似度は、正答した時よりも低かった。したがって、この6種類に関しては類似度の値によって判別できると考えられる。

(2) 類似度分布

図3は、本研究で算出したすべての試験画像と参照画像との間の類似度を、昆虫の種類別にまとめた度数分布図である。例えば、図3(a)は、試験昆虫コクゾウムシの画像(30枚)と、8種類の参照昆虫の画像(各400枚、合計3,200枚)との間の類似度の分布を示している。

試験昆虫コクゾウムシ画像と参照昆虫コクゾウムシ画像との類似度の分布は、二つの分布が重なっているように見える（図3(a)）。つまり、平均値0.55のメインの分布と平均値0.70の小集団の分布である。それ以外の参照昆虫に対する類似度分布はほぼ対称で、平均値0.50から0.55の単一の分布であると考えられた。このような分布は、コクヌストモドキ（図3(c)）、ノコギリヒラタムシ（図3(e)）、コナナガシンクイム

表2. 最大類似度の参照昆虫を判別結果としたときの正答率

試験昆虫	自由方向		背面		顕微鏡		全条件		%
	正	誤	正	誤	正	誤	正	誤	
コクゾウムシ	9	1	10	0	10	0	29	1	97
アズキゾウムシ	10	0	8	2	10	0	28	2	93
コクヌストモドキ	9	1	9	1	10	0	28	2	93
タバコシバンムシ	10	0	10	0	10	0	30	0	100
ノコギリヒラタムシ	8	2	10	0	10	0	28	2	93
コナナガシンクイムシ	10	0	10	0	10	0	30	0	100
ノシメマダラメイガ	5	5	0	10	5	5	10	20	33
バクガ	10	0	10	0	10	0	30	0	100
合計	71	9	67	13	75	5	213	27	89

シ (図3 (f)) でも見られた。

試験昆虫タバコシバンムシ画像と参照昆虫タバコシバンムシ画像との類似度の平均値は0.75で、他の参照昆虫に対する類似度の平均値 (0.45から0.6) よりも顕著に大きかった (図3 (d))。ただし、その分布は対称であった。このような分布は、バクガ (図3 (h)) でも見られた。

以上の6種類の昆虫の場合は、適当な閾値を定め、それ以上の類似度を示す参照画像があれば、それが判別結果であると判断してよい。ちなみに、この6種類の昆虫は、前項で述べた最大類似度の値が正答と誤答とで差があった6種類と同一であった。

一方、試験昆虫アズキゾウムシ画像と参照昆虫アズキゾウムシ画像との類似度の分布は、その他の参照昆虫に対する類似度分布と大きな違いはなく、判別は困難だろうと思われた (図3 (b))。このような分布は、ノシメマダラメイガ (図3 (g)) でも見られた。

この結果から、各試験画像に対する類似度3,200のうち、上位の類似度の部分を抽出して解析すると、違いが強調されて、各試験昆虫に対する判別システムの特徴を顕著に表すことができると考えられた。そこで、以下では、各試験画像に対する類似度の上位100

を取り出して解析する。

(3) 類似度を基礎とした昆虫の分類

表3に各試験画像に対する類似度TOP100の件数をまとめた。このデータを基に、試験昆虫に対してクラスター分析を行い、得られた分類を樹形図の形式で表したものが図4である。

参照画像集に含まれる8種類の昆虫に対して、以下の順に相関が高かった (図4 (a))。

- ① ノシメマダラメイガとバクガ (相関係数: 0.93)
- ② アズキゾウムシとタバコシバンムシ (相関係数: 0.19)
- ③ コクヌストモドキとコナナガシクイムシ (相関係数: 0.05)
- ④ ①とノコギリヒラタムシ (相関係数: 0.02)
- ⑤ ②とコクゾウムシ (相関係数: -0.14)
- ⑥ ④と③ (相関係数: -0.14)

この結果は、本研究で開発した判別システムが、上記の順に似た判別結果 (類似度) を出力することを示している。つまり、図4は本判別システムの間違えやすさを表していると言うことができる。

なお、類似度TOP100の件数ではなく、類似度

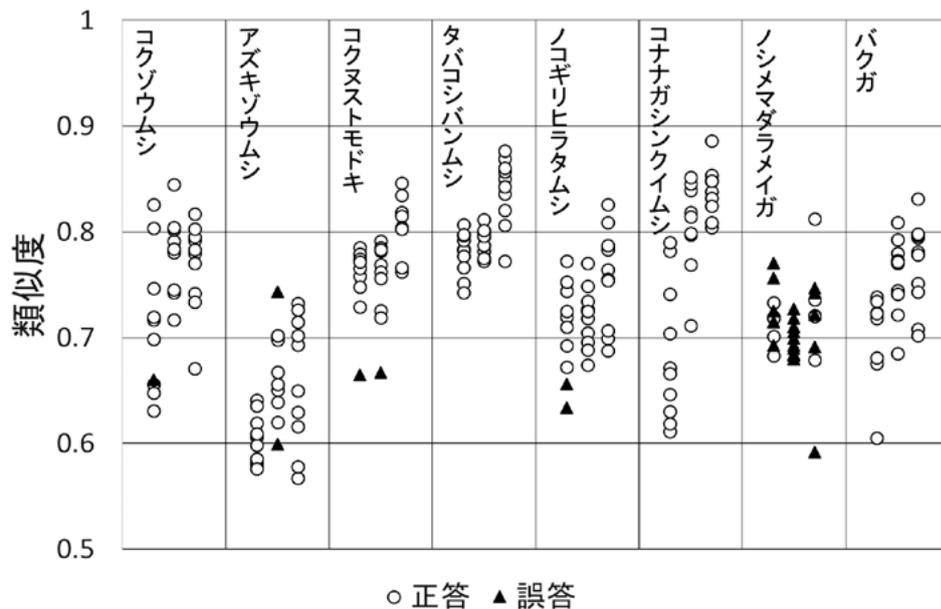


図2. 各試験画像に対する最大類似度

各試験画像 (試験昆虫8種類×撮影条件3種類×試験画像10枚=240点) に対する最大類似度を、試験昆虫別、撮影条件別に示した。撮影条件は、各試験昆虫の左から、デジカメ自由方向、デジカメ背面、顕微鏡である。

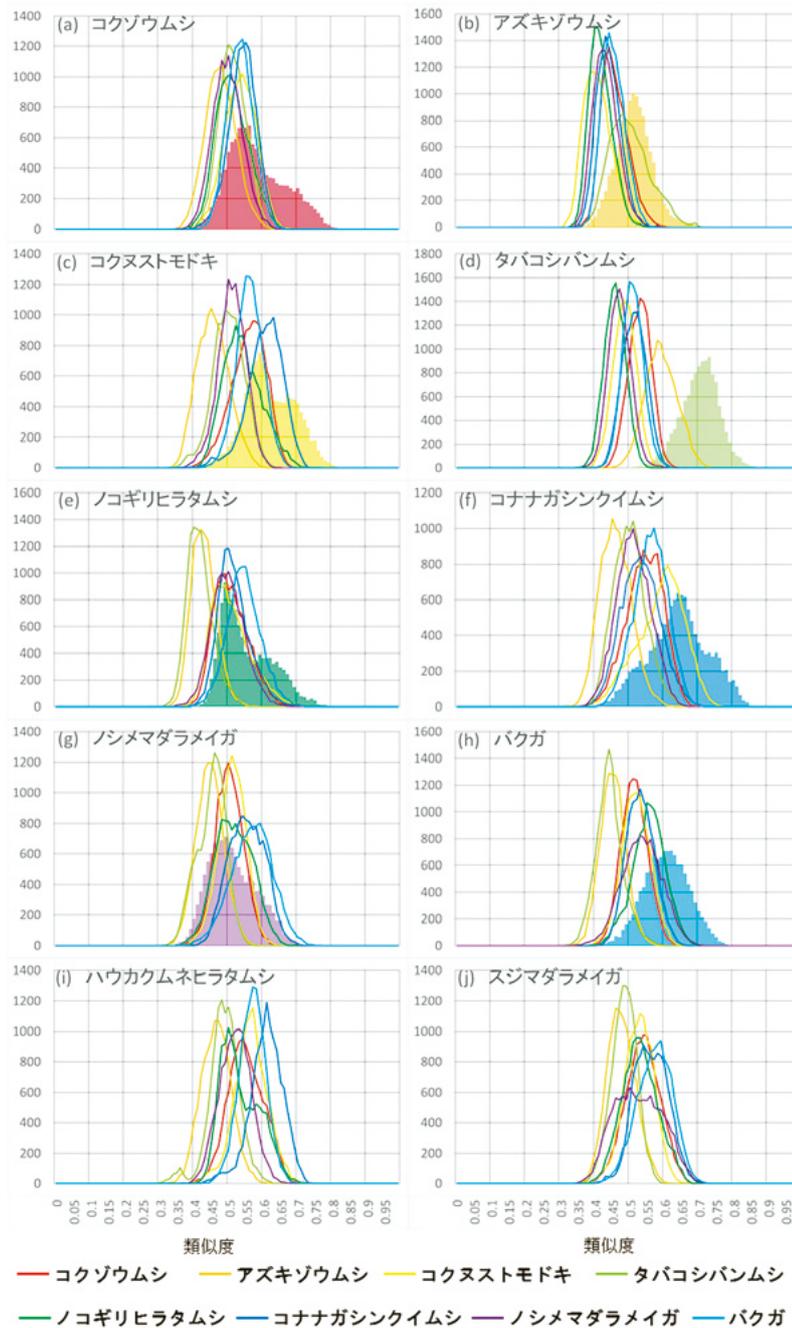


図3. 試験画像に対する類似度の分布

試験昆虫10種類の画像各30枚と、参照昆虫8種類の画像各400枚との間の類似度の分布を、参照昆虫別（色で区別）に示した。塗りつぶしで示した分布は、試験昆虫と参照昆虫が同じ場合である。

TOP100の類似度の合計を基に同じ解析を行っても、ほとんど同じ結果が得られた（データは示していない）。

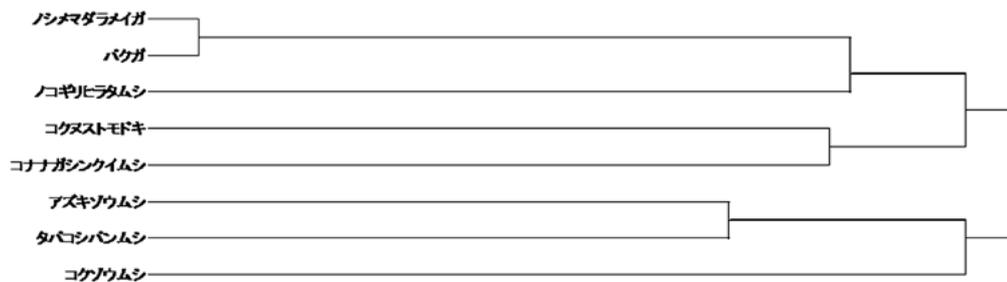
(4) 撮影条件の影響

各試験画像に対する最大類似度を、試験昆虫別、撮影条件別に示したのが、図2である。図2の各試験画像に対する最大類似度を類似度TOP100まで拡張して

表 3. 類似度 TOP100 の件数

試験昆虫	参照昆虫							
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
①コクヌストモドキ	2747	36	3	89	4	55	1	65
②アズキノウムシ	71	2122	0	716	7	0	45	39
③コクヌストモドキ	2	0	2447	2	121	379	11	38
④タバコシバンムシ	0	5	0	2995	0	0	0	0
⑤ノコギリヒラタムシ	23	0	156	0	2342	25	42	412
⑥コナナガシンクイムシ	136	4	160	8	37	2580	4	71
⑦ノシメダラメイガ	40	25	9	16	201	403	655	1651
⑧バクガ	0	0	0	0	53	7	171	2769
⑨ハウカクムネヒラタムシ	187	0	175	0	278	2050	20	290
⑩スジマダラメイガ	211	4	14	0	221	563	732	1255

(a)



(b)

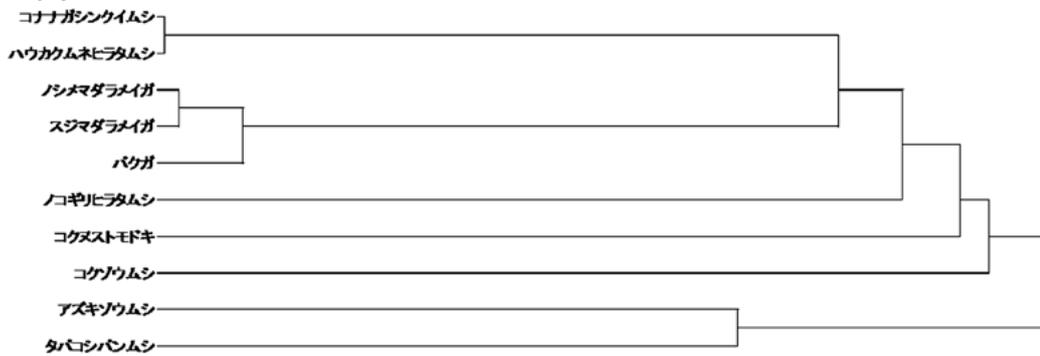


図 4. 類似度 TOP100 のデータを基にした分類

類似度 TOP100 に現れる参照昆虫の件数のデータ (表 3) を基に, クラスタ分析 (階層的な手法) を用いて分類した結果を示した. (a) 参照画像集に含まれている昆虫 8 種類だけを対象にした分類. (b) 本研究で使用した全種類 (10 種類) を対象にした分類.

示したのが, 図 5 である. 図 5 では参照昆虫の種類を色分けして示している. つまり, グラフの色が単調ならば, TOP100 の中に含まれる昆虫の種類が少ないことを表す. 試験昆虫コクゾウムシ (図 5 (a)), タバ

コシバンムシ (図 5 (d)), バクガ (図 5 (h)) は, 類似度 TOP100 までのデータからも, 判別の容易な昆虫であると言える. また, コクヌストモドキ (図 5 (c)), ノコギリヒラタムシ (図 5 (e)), コナナガシンクイ

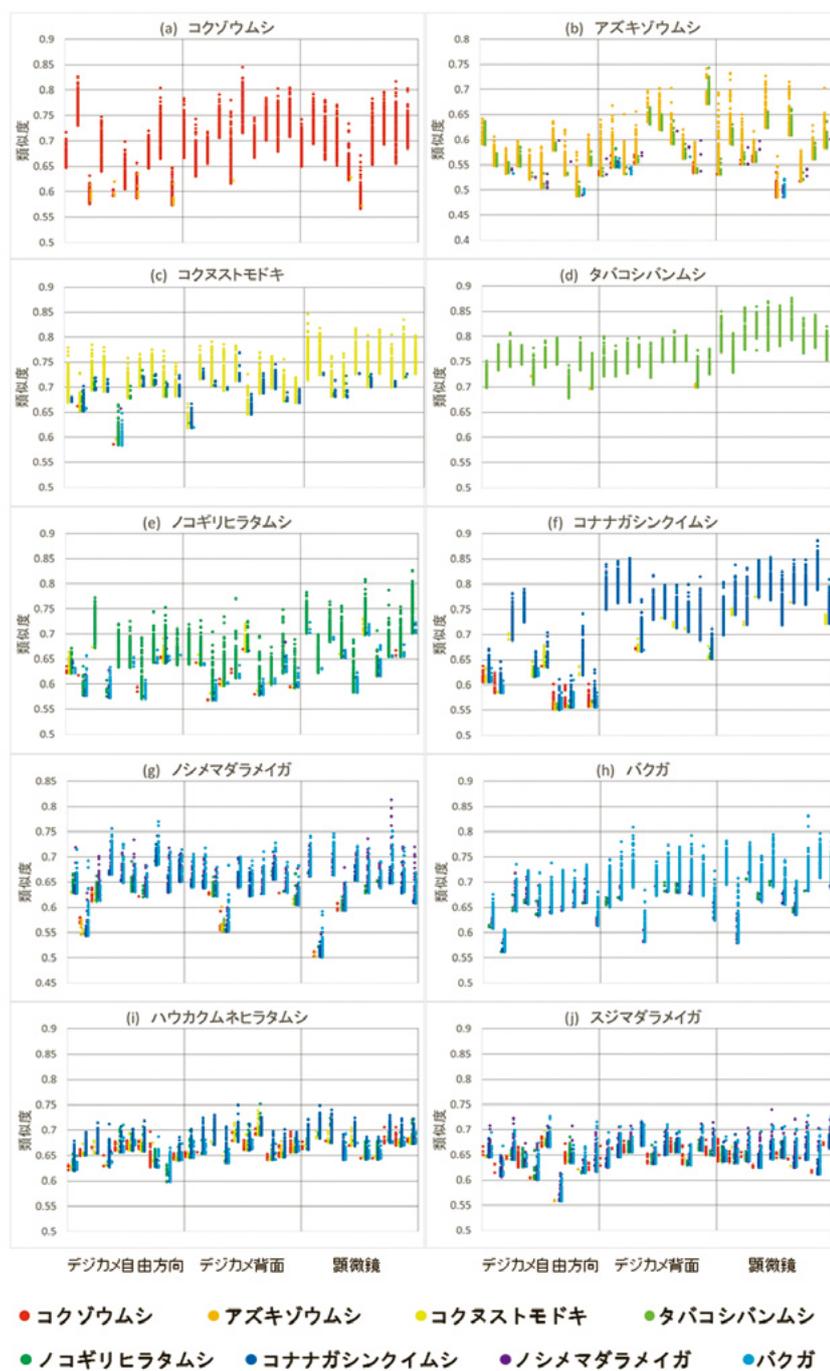


図5. 試験画像に対する類似度TOP100の分布

試験画像1枚ずつに対する類似度（高いものから100）の分布を、参照昆虫別（色で区別）、撮影条件別に示した。

ムシ（図5(f)）では、類似度が低い範囲で多様な色が混ざっていたが、類似度が高い範囲では単調な色合いだったことから、これらも判別が比較的簡単にできると思われる。

これらの図を用いて、撮影条件による類似度の違いについて考察する。

i) 撮影方向

各図のデジカメ背面（背側から撮影）とデジカメ自

由方向（方向を気にせず撮影）とを比較することによって、撮影方向（つまり、昆虫の背側からの撮影か、自由な方向からの撮影か）の影響を調べた。その結果、試験昆虫の種類によって次のようにグループ分けすることができた。

① 撮影方向の影響が大きい：コクゾウムシ、アズキゾウムシ、コナナガシンクイムシ、バクガ

撮影方向を限定すると、コクゾウムシは類似度のばらつきが小さくなった。アズキゾウムシ、コナナガシンクイムシ、バクガは類似度が大きくなった。

② 撮影方向の影響が見られない：コクヌストモドキ、タバコシバンムシ、ノコギリヒラタムシ、ノシメマダラメイガ

ii) 撮影機材

各図の顕微鏡（実体顕微鏡使用）とデジカメ背面（デジカメ顕微鏡モード使用）とを比較することによって、撮影機材（つまり、参照画像を撮影した機材と同じか違うか）の影響を調べた。その結果、試験昆虫の種類によって次のようにグループ分けすることができた。

① 撮影機材の影響が大きい：コクヌストモドキ、タバコシバンムシ、ノコギリヒラタムシ、コナナガシンクイムシ

参照画像と同じ機材で撮影すると、このグループの昆虫の類似度は大きくなった。

② 撮影機材の影響が見られない：コクゾウムシ、アズキゾウムシ、ノシメマダラメイガ、バクガ

上記のように、撮影方向や撮影機材の影響は一部の昆虫に現れた。したがって、参照画像集には様々な撮影方向や撮影機材を用いて得られた多様な画像を登録しておくことが望ましいことがわかった。

(5) 参照画像集に含まれていない試験昆虫に対する結果

参照画像集に含まれていない昆虫が試験昆虫の場合には、判別システムが「判別範囲外」と出力するのが理想的である。しかし、本判別システムではそのような場合でも類似度は算出される。参照画像集に含まれていない昆虫に対する類似度の特徴を詳細に見ていく。

図3(i)と(j)は、試験昆虫ハウカクムネヒラタムシとスジマダラメイガに対する全類似度分布である。ハウカクムネヒラタムシの場合、参照昆虫コナナガシンクイムシに対する類似度が、他の昆虫に対する類似度よりも高めであった。つまり、ハウカクムネヒラタムシをコナナガシンクイムシと判定してしまう可能性

が高い。一方、試験昆虫スジマダラメイガの場合は、どの参照昆虫に対する類似度も似たような分布を示し、特に高めになったものはなかった。

図4(b)は、ハウカクムネヒラタムシとスジマダラメイガを含めて、各試験画像に対する類似度TOP100の件数を基礎にした分類をおこなった結果である。ハウカクムネヒラタムシはコナナガシンクイムシ（相関係数：0.99）と、スジマダラメイガはノシメマダラメイガ（相関係数：0.95）と、極めて相関が高かった。

ハウカクムネヒラタムシとスジマダラメイガの試験画像に対する類似度TOP100の分布を図5(i)と(j)に示した。一見してわかることは、類似度が0.75よりも下に分布し、他の昆虫に比べてその範囲が狭く、グラフの色が多様なことである。これは参照画像集に含まれていない試験昆虫の特徴かもしれない。しかし、逆にこの類似度の分布の情報から参照画像に含まれている昆虫であるかどうかを判断する方法は今ところない。理想的な判別システムは、参照画像集に含まれていない試験昆虫に対して、「参照画像集に含まれていないため判別不能」と判定すべきである。しかし、現状では、参照画像集に含まれる昆虫の中で似たものを答えてしまうことになる。

(6) 判別技術改良の方向性

今回得られた正答率89%は十分に高い数値である（表2）。しかし、参照画像集に含まれている昆虫の種類が8種類だけでは、それに含まれていない似た形の昆虫を判別するとき混乱が起こる（1. (5) 参照）。そこで、判別対象を米の害虫に限定して、米に混入する昆虫（例えば、チャタテムシ類、ケシキスイ類、カツオブシムシ類等）を参照画像集に登録することで信頼性を高くすることができるだろう。

また、ノシメマダラメイガとバクガとを間違えやすいという問題は、チョウ目の成虫の場合、翅の開き具合が一定でない等、形状を安定して撮影することが困難であることが原因の一つだと考えられる。そこで、形状に加えて、翅の斑紋や色彩といった情報も類似度算出に利用すればよいのかもしれない。あるいは、可能なら、チョウ目とコウチュウ目を最初に自動判別し、その後それぞれに適した類似度算出方法を適用することも考えられる。

画像認識技術を利用した食品害虫判別分野は取組みが始まったばかりの段階である。参照画像集と類似度算出方法の両面の進歩を期待するのはもちろんだが、利用範囲を米の害虫に限定する等、その時点の技術レ

ベルに合った応用先を見つけながら、段階的に発展させていくというやり方が必要である。

2. 判別技術以外の課題

食品害虫サイト等で公開サービスを検討する場合、判別技術以外の課題も重要である。

(1) ニーズ

ニーズ（用途）と判別技術のレベルは密接に関係している。例えば、害虫防除の専門家なら、現場で発見した昆虫をかなりの正確さでその時に判別したいと考えたり、昆虫の同定時間を短縮したいと考えたりするかもしれない。また、家庭の主婦なら、台所で見つけた昆虫の種名（学名）よりも、その発生源、危険性、対処法を指摘してもらほうが重要だと思うかもしれない。

現時点で可能なサービスを「食品害虫を写真で検索」というページで試験的に提供し、ニーズを探った。利用者にメールで昆虫画像を送ってもらい、判別結果をメールで回答するという形式である（表4）。このページを2013年10月16日に公開後、2013年度2件、2014年度2件、2015年度（10月まで）15件の問い合わせがあった（表5）。その中には、家屋内で見つけられた昆虫が広く含まれており、利用者は食品害虫という制限をあまり強く意識していないようである。中には、屋外で見つけた昆虫も含まれていた。しか

し、面倒な手続きの上、食品害虫しか判別できないにもかかわらず、これだけの問い合わせがあったことを考えると、写真を送るだけで自動的に回答が返ってくるようなサービスを提供できれば、かなり大きなニーズがあると思われる。

本研究の成果を生かして、この試験的サービスを多少改良することは可能である。図4から、ノシメダラメイガとバクガは間違いやすいことがわかっている。そこで、判別システムが出した答えに加えて、誤りやすい候補を画像とともに併記することで、利用者の満足する情報に近づけることができると考えられる（表6）。

(2) セキュリティ確保

食品害虫判別サーバを設け、利用者から画像ファイルを受け取り、判別プログラムを実行し、結果を利用者に返信するという自動判別システムができれば理想的だと考えられる。しかし、試験的サービスにおいては、利用者から画像ファイルを添付したメールを送ってもらい、それを手動で判別プログラムに入力、実行し、その結果を利用者にメールで回答するというシステムを採用した。その理由は、自動判別システムを開発するのが手間であるということ以上に、新開発システムのセキュリティを確保する（例えば、画像ファイルに悪意のあるコードが含まれていないことを確認する）ために必要な専門知識がなかったことのほうが大

表4. 害虫判別の回答例

依頼写真	
回答	<p>●● ●● 様 お問い合わせありがとうございました。 検索の結果を報告申し上げます。</p> <p>-----</p> <p>【依頼日】2015/●/●● 【解析日】2015/●/●● 【結果報告】 ご依頼の写真につきまして判別プログラムを使用して解析した結果、コクゾウムシである可能性が最も高いと判定されました。 しかし、写真は明らかにコクゾウムシ以外の昆虫と思われます。画像が不鮮明なため、種名の判定はできませんでした。 図鑑：コクゾウムシ http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/gaichu/zukan/16.html</p> <p>-----</p> <p>ご利用ありがとうございました。</p>

表5. 昆虫判別サービスへの問合せ

	年月	場所	判定結果
1	2013/11	家屋内	食品害虫 (参照昆虫)
2	2013/12	家屋内	食品害虫以外
3	2014/ 2	家屋内	食品害虫 (その他)
4	2014/ 5	屋外	食品害虫以外
5	2015/ 5	家屋内	判別不能
6	2015/ 5	家屋内	食品害虫 (その他)
7	2015/ 6	家屋内	食品害虫 (参照昆虫)
8	2015/ 6	不明	判別不能
9	2015/ 6	不明	判別不能
10	2015/ 6	家屋内	判別不能
11	2015/ 6	不明	判別不能
12	2015/ 6	不明	判別不能
13	2015/ 6	不明	判別不能
14	2015/ 7	家屋内	判別不能
15	2015/ 7	家屋内	判別不能
16	2015/ 7	不明	判定不能
17	2015/ 8	自動車内	食品害虫以外
18	2015/ 8	家屋内	食品害虫以外
19	2015/10	家屋内	食品害虫 (参照昆虫)

判定結果は最終的に人が判断したものを示した。

きい。そのため、外部から画像ファイルを受け取る操作を手動にして、チェックできるようにすることで、とりあえず試験的サービスを実施した。

将来は、このようなサービスを研究者が実施したいと考えた場合には、情報広報部門の専門家が協力体制を整備し、情報システム共通の課題については研究者が悩まなくてもすむようにすべきだと考える。

(3) 結果の保証

リスクコミュニケーション分野等でも常に問題になっていることは、専門家が様々な制約（例えば、現在の科学的知識、得られる情報、解答までに許された時間等）の中で導いた結論を、受け取る人が変わることのない真実だと考えてしまうことである。そのため、専門家が発表した情報を疑うことなく信じてしまったり、専門家が過去に発表した情報を訂正することを許せなかったりする人が出てくる。これを恐れるため、多くの公的研究機関は影響の大きな問題ほど新

表6. 新しい害虫判別の回答例 (案)

依頼写真	
回答	<p>●●●●様 お問い合わせありがとうございます。 検索の結果を報告申し上げます。</p> <p>-----</p> <p>【依頼日】2015/.../... 【解析日】2015/.../... 【結果報告】 ご依頼の写真につきまして判別プログラムを使用して解析した結果、ノシメマダラメイガである可能性が最も高いと判定されました。しかし、判別プログラムは、対象外の昆虫の場合、候補内から最も似ているものを選択してしまいます。また、ノシメマダラメイガとバクガを誤判別する可能性が高いことがわかっています。食品害虫サイトの該当する図鑑ページでお確かめください。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>ノシメマダラメイガ</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>バクガ</p> </div> </div> <p>【食品害虫サイト】 [図鑑：ノシメマダラメイガ] http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/gaichu/zukan/28.html [図鑑：バクガ] http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/gaichu/zukan/32.html</p> <p>-----</p> <p>ご利用ありがとうございました。</p>

しい研究成果の公開に慎重な姿勢をとる。

本研究の「食品害虫を写真で検索」ページのサービスは、研究途中の技術を検証するための試験提供という形態である。この場合は、結果が正しくなくても利用者の許容範囲内であり、さらに担当者のコメントも付加されるため、問題が発生することはないと考えた。しかし、将来本格的にサービスを提供する場合には、正答率が100%ではないことをどのように利用者に伝えて納得してもらうかが重要な課題になる。

3. 現時点における対応

以上、食総研における画像による食品害虫の自動判別の現状を紹介し、本技術を使ったサービスの将来の実現可能性を示した。判別技術やそれ以外の課題（セキュリティ問題等）について客観的に考慮すると、現時点では本格的な公開サービスを実施できる状況ではないと判断している。

しかし、判別技術については、顔認識分野を筆頭に画像認識技術の発展が著しい。本格的な研究開発を実施できれば、昆虫の判別技術も現在の顔認識のレベルに到達するまでそれほど時間がかからないのではないだろうか。現実的なプロセスは、その時点の判別技術レベルに合った用途を見つけ、それを実用化し、次の段階に技術レベルを向上させるというサイクルを繰り返すことになるだろう。この場合、判別技術の課題よりも、その時点での技術レベルや社会環境を考慮した上で、サービスを提供する意志を組織として持つことができるかが重要である。画像による昆虫の自動判別について、今後も関連分野の状況を監視していきたい。

要 約

食品害虫用に独自に開発した2画像間の類似度を算出するプログラムと、8種類の食品害虫（コクゾウム

シ、アズキゾウムシ、コクヌストモドキ、タバコシバシバシ、ノコギリヒラタムシ、コナナガシクイムシ、ノシメマダラメイガ、バクガ）に対する参照画像集とからなる、食品害虫判別システムを構築した。この判別システムの特性を調べるために、10種類の昆虫（参照用に使用した8種類と、参照画像のないハウカクムネヒラタムシ、スジマダラメイガ）の画像を30枚ずつ撮影し、試験画像とした。食品害虫判別システムは、最大類似度を示した参照画像の昆虫を解答とすることにした場合、参照画像集に含まれる8種類の試験昆虫に対して89%の確率で正しく答えた。しかし、ノシメマダラメイガに対する正答率は極端に低く、33%だった。参照画像集に含まれていない昆虫の判別は困難であった。また、判別技術以外にも、セキュリティ確保などの課題も残っている。したがって、このままの判別システムでは正式な公開サービスを実施することはできないと結論した。

文 献

- 1) 曲山幸生, 七里与子, 宮ノ下明大, 今村太郎, 古井聡, 和田有史, 増田知尋, 石山墨, 貯穀害虫の画像による自動判別, 食品総合研究所研究報告, **78**, 57-64 (2014).
- 2) 大村平, クラスタ分析のはなし, 「多変量解析のはなし」, 改訂版 (日科技連, 東京), pp. 162-185 (2006).

引用 URL

- i) <http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/gaichu/index.html> (2015. 9. 25)
- ii) <http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/gaichu/insect.html> (2015. 9. 25)

技術報告

食品総合研究所微生物バンクの現状と菌株の省エネルギー保存方法
およびデータ管理方法の検討

岩橋 由美子*, 鈴木 忠宏, 北村 義明

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

**Current situation in National Food Research Institute microorganism bank
and consideration of energy conservation method
and data management method for microorganism preservation.**

Yumiko Iwahashi*, Tadahiro Suzuki and Yoshiaki Kitamura

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, JAPAN

Abstract

We have described that the current situation and the past distribution situation of collected strains that are stored in the National Food Research Institute microorganism bank. We are exploring a more energy-saving management methods of strains that are currently stored.

Keywords: microorganism bank, energy-saving management

緒言

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所微生物バンク（食研微生物バンク）は1983年以降当所研究員が用いて来た菌株を、当該研究員が当所を離れた後も研究財産として有用に使えるよう、長期間保存することを目的として設立

された。当初から食研微生物バンクは微生物バンク委員会により運営され、各委員は所長が任命することになっていた。設立当初の構成は委員長、細菌委員、乳酸菌委員、酵母委員、糸状菌委員、放線菌委員、耐塩菌委員となっていた。保存菌株は好気性細菌類、乳酸菌類、酵母類、糸状菌類、放線菌類、耐塩菌類であり、受け入れる菌株は第二次スクリーニングを通ったもので、純粋培養したもの、その他微

* 連絡先 (Corresponding author), yumiko@affrc.go.jp

生物バンク委員会で認めたものである。受け入れの際、寄託者によって菌株名や菌株番号、培養法など、その菌株に関しての詳細な情報を記入した菌株カードが作成され、現在まで微生物バンク委員会が保管している。微生物バンク委員会は受け入れた菌株について、極力その保存、維持に努めなければならないとしているが、不測の事故や雑菌の混入、死滅等についてはその限りではないとしている。また微生物バンク委員会規則は2006年に変更されており、委員会の構成として7名以内に変更されている。また寄託された菌株は随時希望者に分譲しているが、その分譲範囲は国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所の職員及び共同研究で所内使用のみに限定している。本報告では食研微生物バンクの寄託・分譲の現状について報告する。また2011年の東日本大震災を機にエネルギー節減および人件費の削減が急務となったことから、菌株の省エネルギー保存方法の検討および菌株情報の電子化による利用しやすいデータベースの構築を行った。

実験方法

1. 植え継ぎ方法

培地については、細菌類は栄養寒天培地、乳酸菌類はブリックス寒天培地、酵母類はYM寒天培地、糸状菌類はポテトデキストロース培地、放線菌類はISP-II培地、耐塩性菌類は8%食塩含有ブリックス寒天培地とした(すべてDIFCO)。菌株の植え継ぎは斜面培地又は穿刺とし、培養は原則として30℃数日間、雑菌の混入の有無は肉眼で判定のうえ、当初は原則として4℃で保存していた。植え継ぎ期間は菌株の性質にあわせて3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月としたが、乳酸菌類は2ヶ月とした。これらと同時に寄託された全ての菌株について流動パラフィン(Wako)を重層した斜面培地を作成し、13℃の部屋で保存した。変異又は生育が弱い菌は再度植えることとした。新規受け入れ菌株は継代培養と流動パラフィン重層で1年間様子を見て流動パラフィン重層した菌株が1年後生存していれば流動パラフィン重層保存のみに移行してもよいこととした。糸状菌類以外は上記液体培地で培養後、等量(v/v)のグリセロールを添加し-80℃で保存した。糸状菌類については別途平板培地で増殖させた菌体の一部を寒天ごと50%グリセロール液水溶液(v/v)中に投じて-80℃にて保存した。-80℃保存植え継ぎは10年とした。

2. 菌株情報の管理方法

菌株受け入れに際し、寄託者は菌株カードを作成することとした。菌株カードには、菌株名、菌株番号、寄託年月日、寄託者氏名、その他培養方法や保管方法などの詳細なデータを記載することとした。菌株カードは微生物バンク委員会が保管した。

3. 菌株情報の電子化

菌株カードに記載されている情報の電子化は、FileMaker Pro Advanced(ファイルメーカー株式会社)を用いてデータベースを構築した。FileMakerのランタイムアプリケーションを作成することで当該ソフトを有していなくても菌株情報の閲覧を可能とした。さらに利用しやすいように、収集した文献への直接リンクや糸状菌類の寒天平板培地上での画像を収録した。

4. 菌株の省エネルギー保存方法の検討

13℃専用保存室を停止することを目的として、保存している流動パラフィン入りのスラントや穿刺培養されていたものの廃棄を検討した。流動パラフィン入りの保存菌株の大半は同時に-80℃にも保存されているため、-80℃保存菌株を一度復元し、生存の確認を行った。また-80℃に保存されている糸状菌類のうち、NFRI 1281株について平板寒天培地での培養を行い、孢子・菌糸の形状の比較や色素産生について目視で観察した。

結果と考察

1. 現在の寄託菌株の分布

現在食研微生物バンク委員会が管理している菌株は、2015年11月時点で酵母類が758株、糸状菌類が492株、乳酸菌類が169株、細菌類が1,061株、放線菌類が47株、総数2,527株である。

酵母類の内訳は22属であり、その約63%が*Saccharomyces*属である。糸状菌類の内訳は41属であり、*Aspergillus*属と*Penicillium*属だけで糸状菌類全体の約70%を占める。乳酸菌類は6属でありそのうち*Lactobacillus*属が約64%である。図1にその属の構成割合を円グラフで示した。また図には示していないが、放線菌類は4属であるが、そのほとんどは*Streptomyces*属(44株)、他の3属はそれぞれ1株ずつであり、同様に細菌類に関しても、そのほとんどが*Bacillus*属(941株、88.6%)であった。

2. 現在までに分譲した菌株数

今までに、分譲した菌株数は表1の通りである。これまでに、酵母類はのべ1,793株、糸状菌類はのべ997株、乳酸菌類がのべ679株、細菌類がのべ1,071株、放線菌類がのべ74株、総数のべ4,614株を分譲した。

3. 省エネルギーに寄与する保存方法の検討

凍結保存が困難な一部の糸状菌類について、 -80°C 保存がどのように影響するかを確認した。図2に *Fusarium graminearum* NFRI 1281株について2002年に斜面培地に植え継ぎをした後そのまま 4°C 保存していたもの(図2, 1-A), 寒天を一部はぎ取り50% (v/v) グリセロール液中で -80°C にて保存していたものから2015年8月に斜面平板培地へ植菌(図2, 1-B), 生育後に両者をポテトデキストロース寒天平板培地に植菌, 培養したコロニーを示した(図2, 2-A, B)。保存方法の異なる2種の株では, 色素産生に目視で若干の変化が見られた。この結果は, 糸状菌類については -80°C での長期生存は可能であるが物質産生能等の維持に関しては -80°C 保存のみとするにはまだ検討が不十分であることを示している。13年前に植え継ぎをして 4°C に保存してあった斜面培地保存菌株での生存

は確認出来ており, この結果より現在保管している斜面培養菌株を全て廃棄することは不適切と考え, 最古のものを含め今後も最小本数を維持していく予定である。1985年からスタートした農林水産省ジーンバンク事業のセンターバンクとなっている農業生物資源ジーンバンクでは保有菌株は凍結乾燥法(細菌類・放線菌類・酵母類など), 凍結保存法(糸状菌類など)などで保存されているが, 凍結保存が難しいものについては, 継代培養により維持している。当食研微生物バンクでも今後, 酵母類, 乳酸菌類, 放線菌類及び糸状菌類の胞子については凍結乾燥保存への移行を検討してさらなる冷凍庫の削減を行い, より省力保存を進めていく予定である。

また, 雑菌の混入が疑われる場合, 例えば過去に特許を取得しているような有用な菌株については, 分譲に当たってrRNAの部分構造の比較などの方法を用いて正しい菌株であるか, 精査する必要がある。

4. 菌株カードの電子化及びデータベースの構築と配布

寄託された菌株の一つ一つはその詳細がカードに記載されていたが, 膨大な量であるために必要な時に容易に取り出して閲覧することが難しく, 研究員の利用

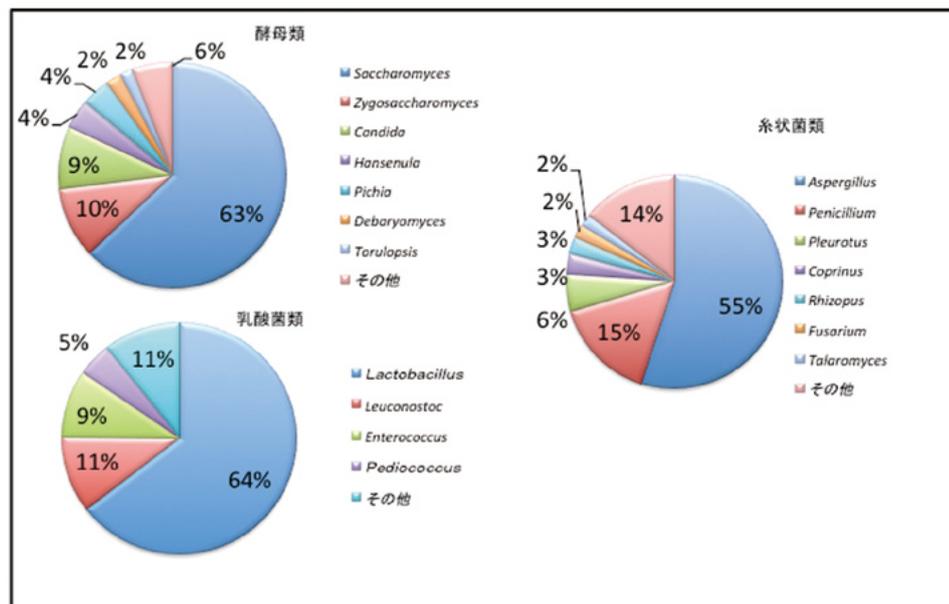


図1. 食品総合研究所微生物バンク寄託菌株の分布

食品総合研究所微生物バンクに寄託されている菌株のうち, 酵母類, 糸状菌類, 乳酸菌類について, それぞれの属の構成割合を円グラフで示した。

表 1. 保存菌株の分譲実績

年度	分譲総数	糸状菌類	酵母類	細菌類	放線菌類	乳酸菌類	申請件数
1983 (昭和58) 年度	47	10	37	0	0	0	5
1984 (昭和59) 年度	43	11	29	3	0	0	7
1985 (昭和60) 年度	76	22	40	14	0	0	13
1986 (昭和61) 年度	386	17	367	2	0	0	18
1987 (昭和62) 年度	76	13	3	51	10	0	10
1988 (昭和63) 年度	190	63	99	23	2	3	14
1989 (昭和64/平成元) 年度	110	28	23	58	1	3	15
1990 (平成2) 年度	350	84	230	32	1	0	22
1991 (平成3) 年度	198	78	30	35	52	3	20
1992 (平成4) 年度	55	21	27	7	0	0	15
1993 (平成5) 年度	49	21	21	6	0	1	14
1994 (平成6) 年度	59	24	27	5	0	3	11
1995 (平成7) 年度	107	54	23	18	2	10	17
1996 (平成8) 年度	59	35	6	4	1	13	12
1997 (平成9) 年度	61	23	22	10	0	6	15
1998 (平成10) 年度	154	103	10	36	0	5	12
1999 (平成11) 年度	99	33	16	50	0	0	15
2000 (平成12) 年度	58	3	19	11	0	25	11
2001 (平成13) 年度	241	13	8	119	1	100	22
2002 (平成14) 年度	193	7	15	14	0	157	18
2003 (平成15) 年度	249	3	7	129	0	110	14
2004 (平成16) 年度	108	24	11	57	0	16	20
2005 (平成17) 年度	289	57	31	179	0	22	23
2006 (平成18) 年度	116	38	12	17	2	47	16
2007 (平成19) 年度	671	1	654	3	0	13	11
2008 (平成20) 年度	111	29	1	11	2	68	14
2009 (平成21) 年度	182	3	11	148	0	20	12
2010 (平成22) 年度	61	47	8	0	0	6	5
2011 (平成23) 年度	74	24	2	7	0	41	7
2012 (平成24) 年度	22	0	0	22	0	0	2
2013 (平成25) 年度	12	12	0	0	0	0	3
2014 (平成26) 年度	96	89	0	0	0	7	6
2015 (平成27) 年度	11	7	4	0	0	0	2

に不便であった。さらに経年による紙の劣化に伴い、文字が不鮮明・欠落する事象が頻発していた。そのため、カードに記載されていた内容はすべてデータベースプログラムである FileMaker Pro Advanced に登録してデータベース化（管理用データベース）した。さらに搭載されているランタイムアプリケーションを用いて、当該ソフトを保有しておらずとも検索・閲覧出来るランタイム版としてDVDに収録することで所内への配布も可能となった。上述の糸状菌類の平板培養画像も収録・参照出来るようにし、分譲を受けた菌株と比較する事が出来るようにした。また、寄託された菌株を用いて行った研究に関する文献は、可能な限りそ

の全文をネットから直接参照出来るようにリンクを作成し、データベースの利便性を高めた。食研微生物バンクから分譲された菌株を使用した発表文献等は本稿の最後に収集文献として示した。新たに寄託された菌株については直接データベースに収録しているためカードを作成していない。過去にノート等に手書きで記載されたままになっている菌株の保存場所一覧、植え継ぎ情報などを今後順次追加して管理用データベースを充実させていきたい。ただ過去にどのような植え継ぎをなされているかの記録が欠落しているものがあり、現在する実際の菌株に直接記載されている情報をたどるしか方法のない菌株もある。今後も継続して

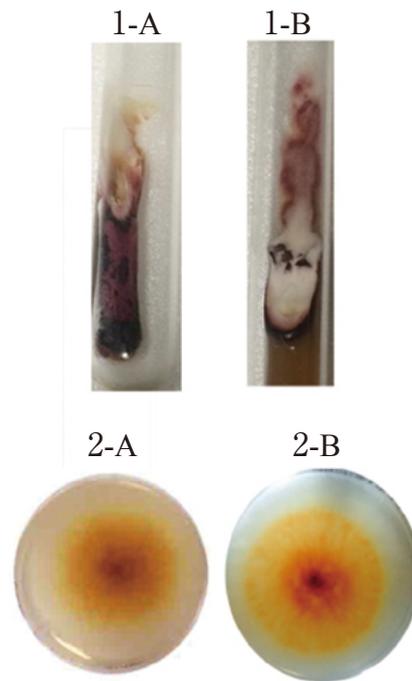


図2. 保存方法の違いによる色素生産の変化.

- 1-A : 2002年に植え継ぎをし、その後4℃保存していた斜面寒天培地
 1-B : 50% (v/v) グリセロール溶液中で-80℃保存していた株から2015年に斜面寒天培地に移植した株
 2-A : 1-Aから平板寒天培地への移植し、25℃で3日培養したコロニー
 2-B : 1-Bから平板寒天培地への移植し、25℃で3日培養したコロニー

データベースを充実させてより使いやすい形にすることにより、食研微生物バンクの利用の促進を図り、微生物研究の一層の発展を目指す。

食研微生物バンクに寄託されている菌株は各種物質産生菌や耐冷凍性、耐糖性酵母類、様々な分離源から分離された乳酸菌類などである。古いものは50年以上前に分離された菌株もあり、当初の分析方法では測れない能力を秘めている可能性がある。食研微生物バンクに寄託されている菌株は、現在食品総合研究所内の研究員にのみ分譲が許可されているが、共同研究であれば所外からの使用が可能である菌株が存在する。食研微生物バンクに寄託されている菌株を使用した共同研究は当所研究員や共同研究の窓口である産学連携チーム、あるいは微生物バンク委員長等に是非お声をかけていただきたい。微生物の分離・同定に関わる研究者がすくなくなりつつある中、省エネルギーに寄与しつつも先人の不朽の研究成果・財産の有効利用を図るとともに、今後も有用菌株の収集に努めてまいりた

い。

要約

食研微生物バンクに寄託された菌株の内訳及び分譲数を記載した。また省エネルギーに寄与するため糸状菌類の凍結保存の可能性を検討した。さらに、紙ベースで保存されていた寄託菌株の詳細(来歴、培養条件、参考文献等)をデータベース化し、ランタイムアプリケーションを用いて、当該ソフトを保有しておらずとも検索・閲覧出来るDVDを作成することで所員への配布を可能とした。

参考文献

- 1) 伊藤寛, 海老根英雄, 小坂正吉, 市販醸造用乳酸菌類の性状, 食糧研究所研究報告, 18, 28-35 (1964).

- 2) 木内幹, 太田輝夫, 藤家宏子, 海老根秀雄, 大豆炭水化物の酵素的分解に関する研究:(第1報) *Bacillus subtilis* No.17のヘミセルラーゼの精製と性質, 日本食品工業学会誌, **19**, 585-590 (1972).
- 3) 木内幹, 太田輝夫, 加藤なを, 海老根秀雄, 大豆炭水化物の酵素的分解に関する研究:(第2報) *Bacillus pumilus* No.24のヘミセルラーゼの精製と性質, 日本食品工業学会誌, **20**, 239-243 (1973).
- 4) 木内幹, 鈴木紀, 太田輝夫, 伊藤恵美子, 海老根秀, 遊離脂肪酸を資化する耐塩性味噌酵母類の分離, 日本食品工業学会誌, **25**, 508-514 (1978).
- 5) 矢口長彦, 杉本貞三, 佐藤静夫, 鶴田理, 輸入飼料用稲わらの汚染菌, マイコトキシン, **14**, 21-23 (1982).
- 6) Yanagimoto, M. and Enatsu, T., Regulation of a blue pigment production by γ -nonalactone in *Streptomyces* sp., *J. Ferment. Technol.*, **61**, 545-550 (1983).
- 7) Karki, T., Ito H., Nikkuni, S., Ohono, M., and Ebine, H., Microorganisms associated with various pickles, 食品総合研究所研究報告, **43**, 40-53 (1983).
- 8) 春見隆文, 久保直哉, 若生勝雄, 小田恒朗, 特許「醗酵によるポリオール類の製造」昭59-153208, 59.7.25 (公開No. 昭61-31018).
- 9) Tokuoka, K., Ishitani, T., Goto, S., and Kamagata, K., Identificatin of yeasts isolated from high-sugar foods, *J. General Appl. Microbiol.*, **31**, 411-427 (1985).
- 10) Itoh, H., Hadioetomo, R.S., Nikkuni, S. and Okada, N., Studies on lactic acid bacteria in fish sauces (Part 2): Identification of salt-tolerance and acid-producing bacteria from fish sauces, 食品総合研究所研究報告, **47**, 31-40 (1985).
- 11) Hino, A. Takano.,H., and Tanaka, Y., New freeze-tolerant yeast for frozen dough preparations, *Cereal Chem.*, **64**, 269-275 (1987).
- 12) 木内幹, 市販納豆菌の分離と同定, 食品総合研究所報告, **50**, 18-21 (1987).
- 13) Yanagimoto, M., Matsumoto, K. and Mori, K., IM2, a new inducer of blue pigment production in *Streptomyces* sp. MAFF 10-06015, *J. Ferment. Technol.*, **66**, 1-6 (1988).
- 14) Suzuki, C., Yamada, K., Okada, N. and Nikkuni, S., Isolation and characterization of halotolerant killer yeasts from fermented foods, *Agricul. Biol. Chem.*, **53**, 2593-2597 (1989).
- 15) Yanagimoto, M., Tanaka, Y., Mori, K., Regulation of Blue Pigment Production in Two Cycloserine Producers of Actinomycetes, Trends in Actinomycetes in Japan (edited by Y.Koyama) Society for Actinomycetes, 57-59 (1989).
- 16) 進藤昌, 中村以正, 中原忠篤, 木内幹, かが付きバイオリクターの製作と乳酸の連続生産, 発酵工学雑誌, **67**, 525-529 (1989).
- 17) 昭和63年度微生物遺伝資源探索収集調査報告書(農業生物資源研究所), P.59-71 (1990).
- 18) 木内幹, 鷹見勲, 進藤昌, 山本和也, 森江京子, スイートソルガムサイレージ用スターターの開発, 食品総合研究所研究報告, **54**, 44-52 (1990).
- 19) 進藤昌, 中村以正, 中原忠篤, 木内幹, スイートソルガム搾汁液を用いたL(+)乳酸の生産, 日本食品工業学会誌, **37**, 98-103 (1990).
- 20) 木内幹, 森江京子, スイートソルガムサイレージの乳酸菌類スターターの製造, 食品総合研究所研究報告, **55**, 19-23 (1991).
- 21) 木内幹, 森江京子, スイートソルガムサイレージの酵母類スターターの製造, 食品総合研究所研究報告, **55**, 24-30 (1991).
- 22) Sugiyama, J., Tokuoka, K., Suh, S.-O., Hirata, A. and Komagata, K., *Sympodiomyces*: a new yeast-like anamorph genus with basidiomycetous nature from orchid nectar, *Antonie van Leeuwenhoek*, **59**, 95-108 (1991).
- 23) 舟根和美, 大家せつ子, 柳本正勝, *Streptomyces virginiae* MAFF10-06014 株の二次代謝産物生産誘導因子「IMファクター」非生産変異株の分離とその性質, 食品総合研究所研究報告, **55**, 37-44 (1991).
- 24) Kitamoto, H.K., Ohmomo, S, Nakahara, T., Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making, *J. Dairy Sci.*, **76**, 803-811 (1993).
- 25) 新国佐幸, 石山朋治, 鈴木チセ, 鈴木忠直, 小坂直治, 森勝美, ヘテロ乳酸菌類 *Lactobacillus fructivorans* に起因する加工味噌の膨れ, 日本食品工業学会誌, **43**, 910-916 (1996).
- 26) 森勝美, 山田知枝, 中島博文, 島純, 北海道における発酵食品微生物の収集, 微生物遺伝資源探索収集調査報告書, **10**, 1-5 (1998).

- 27) 永井利郎, 伊藤義文, 納豆菌の一般形質導入ファージ *Bacillus subtilis* (natto) phage ϕ BN100, 微生物遺伝資源利用マニュアル, **11**, 1-4 (2002).
- 28) Inatsu, Y., Kimura, K. and Itoh, Y., Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in southeast asia: comparison with *B. subtilis* (natto) starter strains, *Japan Agricultural Research Quarterly : JARQ*, **36**, 169-175 (2002).
- 29) Suzuki S., Kusumoto, K., and Kashiwagi, Y., Construction of a gene trap vector, pPTR-EGFP1, for the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*, Rep Natl. Food Res. Inst., **67**, 33-38 (2003).
- 30) Saito, M., Rai, D.R. and Masuda, R., Isolation of *Penicillium hirsutum* from spoiled, packaged asparagus spears in Japan, *Journal of General Plant Pathology*, **69**, 304-306 (2003).
- 31) 斉藤道彦, 貯蔵穀類加害菌類の分離・同定, 微生物遺伝資源利用マニュアル, **22**, 1-11 (2007).
- 32) 鈴木聡, 福岡真里, 楠本 憲一, 柏木豊, 生馬鈴薯デンプン滓上にて生育可能な麹菌株, 食品総合研究所報告, **73**, 47-52 (2009).
- 33) Elano, R.R., Kitagawa, Bari, Md.L., Kawasaki, S., Kawamoto, S., and Inatsu, Y., Comparison of the Effectiveness of Acidified Sodium Chlorite and Sodium Hypochlorite in Reducing *Escherichia coli*, *Foodborne Pathogens and Disease*, **7**, 1481-1489 (2010).
- 34) Suzuki S., Fukuoka, M., Tada, S., Matsushita-morita, M., Hattori, R., Kitamoto, N., Kusumoto, K., Production of polygalacturonase by recombinant *Aspergillus oryzae* insolid-state fermentation using potato pulp. *Food Sci. Technol. Res.* **16**, 517-521 (2010).
- 35) Wang, X., Ike, M., Shiroma, R., Tokuyasu, K., Sakakibara, Y., Expression of neutral b-glucosidase from *Scytalidium thermophilum* in *Candida glabrata* for ethanol production from alkaline-pretreated rice straw, *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 362-365 (2013).
- 36) Saito K., Nakamura, T., Lpbayashi, I., Pnishi-Kameyama, M., Ichinose, H., and Funane, K., Xylan-mediated aggregation of *Lactobacillus brevis* and its relationship with the surface properties and mucin-mediated aggregation of the bacteria, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 2120-2127 (2014).
- 37) Nakamura T., Yamamoto, M., Saito, K., Ando, A., and Shima, J., Identification of a gene, FMP21, whose expression levels are involved in thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, **4**, 67 (2014).

尚, ここに記載されている文献は利用者からの報告に基づくもので, 食研微生物バンクに寄託されている全ての菌株に関して網羅的に収集したものではない.

報 文

ラットによる食品含有フラボノイドの肝臓, 血清コレステロール,
血清8-イソプロスタニンに及ぼす影響の検討

八巻 幸二*, 高橋 陽子

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
食品機能研究領域・栄養機能ユニット

**Effect of some flavonoids in food on liver, serum cholesterol
and 8-isoprostane in rats.**

Kohji Yamaki* and Yoko Takahashi

Nutritional function Laboratory, Food function division, National Food Research Institute, NARO
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Abstract

Four typical edible flavonoids, which were catechin, quercetin, chrysin, and genistein, were evaluated on body and liver weight, aspartate aminotransferase, and alanine transaminase, serum cholesterol and 8-isoprostane in normal strain Sprague Dawley rats. These flavonoids were given by containing in standard diet for 4 weeks, after feeding these parameters were measured. By the flavonoids intake, there were no change of body weight and liver weight. Furthermore, healthy effects on liver, anti-oxidant effect, and reducing effect of genistein for total cholesterol in serum. These flavonoids have good effects for the intake for 4 weeks.

Keywords: food safety, flavonoids, high intake

緒 言

食物特に野菜等に含まれるフラボノイドは, これまで多くの健康機能性が報告され, この性質を活用した

機能性食品の開発も盛んに行われている. 特定保健用食品や, 平成27年度から施行された機能性表示食品制度でも, 食経験があるものであっても, 成分の濃度を高めた食品あるいは錠剤やカプセル等の食物については特に, 十分な配慮が必要となる. そこで, 日常に大量摂

* 連絡先 (Corresponding author), kyamaki@affrc.go.jp

取の可能性のあるフラボノイドを選択し、汎用される系である Sprage Dawley (SD) ラットに4週間の混餌食を摂取させ、肝臓への影響、血清中のコレステロール値、細胞膜の酸化マーカーを測定してその影響を調べた。

実験材料および方法

1. 試料・試薬

フラボノイドとして、(+)カテキン (Sigma-Aldrich Co. LTD), ケルセチン (LKT Laboratories Inc.), クリシン (LKT Laboratories Inc.), ゲニステイン (LCL Laboratories) を用いた。動物の飼料として、NMF 粉末飼料 (オリエンタル酵母) を用い、規定の含量となるように混合し、エチレンオキサイド滅菌した後、給餌した。血液中のパラメータとして、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST, GOT) とアラニントランスアミナーゼ (ALT, GPT) の測定はトランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬) を、総コレステロール値はコレステロール E-テストワコー (和光純薬) を用い、8-イソプロスタンは酵素免疫測定法 (EIA) キット (Cayman chemical) を用いて測定した。

2. 動物

SD 系雄性ラット (日本チャールズリバー社) を4週齢で購入し、通常食で予備飼育後、フラボノイド添加食を給餌した。飼育は室温24-26度、湿度40-60%, 8:00-20:00 昼の環境下で飼育した。動物実験は農研機構規則で定められた飼育環境と食品総合研究所細則に従って、食品総合研究所動物実験委員会の承認の下に行われた。

3. 飼育・採血・血液中のパラメータ測定

フラボノイド4種、カテキン、ケルセチン、クリシン、ゲニステインをNMF粉末飼料に添加し、それぞれ、0 (コントロール), 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0% (w/w) になるように均一に混合し、フードカバー付給餌器 (オリエンタル) で給餌した。また2-3日おきに体重の測定と餌の残量を測定した。4週間飼育した後、麻酔下において頸動脈切断により、採血し放血致死させ、肝臓の重量を測定した。採取した血液は、凝固させた後、3000 rpm, 10 min, 4℃で遠心分離後、血清を採取した。採取した血清は、AST, ALT, 総コレステロール, 8-イソプロスタンの測定に用いた。

4. 統計処理

統計処理は、各群の平均値と標準誤差で表し、Dunnettの多重比較で各群とコントロール群との有意性の検定を行った。

結果および考察

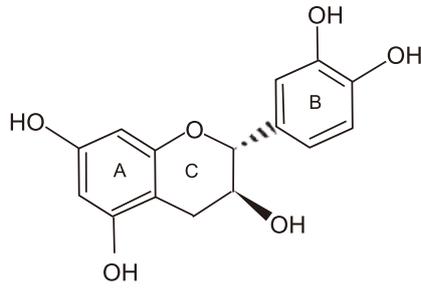
1. 体重および肝臓重量に対する影響

フラボノイドの体重と肝臓重量に対する影響を調べるため、ラットを用いた4週間の摂餌試験を行った。図1には、用いた4種の典型的なフラボノイドの構造式を示した。緑茶等に含まれる代表的フラボノイドであるカテキン (A) は、分類的には flavan-3-ol に含まれ、フラボノイドの基本骨格のC環の3番目に水酸基を有している。Flavanolの代表であるケルセチン (B) はタマネギに含まれている。Flavoneの代表であるクリシン (C) は、熱帯地方の野菜やハーブ等に多く含まれ、細胞試験で抗がん作用が確認されている¹⁾²⁾。また大豆に多く含まれるイソフラボンのゲニステイン (D) は、鶏飼育ではあるがサプリメントで免疫増強効果の報告があり³⁾、大豆製品に多く含まれている。クリシン以外は、日本で普通に摂取できるフラボノイドである。4週間摂取後、ラットは、外見上の変化はなく、行動観察でも異常な様子は確認されず、健康状態は異常無かった。図2には、4週間の飼育後に測定した体重を示した。高用量での体重減少傾向はあったが、用いた4種のフラボノイドとも、明らかに有意な体重減少は確認されなかった。ケルセチンの0.03%摂取群では有意な減少が確認された。体内での異物代謝臓器としての肝臓では、比重量の変動を調べた (図3)。その結果、有意な変動は確認されなかった。4種のフラボノイド全体では、上昇傾向が散見されるが、どれも有意なものではなかった。しかし、コントロールと比較し、上昇傾向が認められることは、代謝活性増加による血流上昇や炎症傾向など、肝臓への負担が影響しているものと想定される。

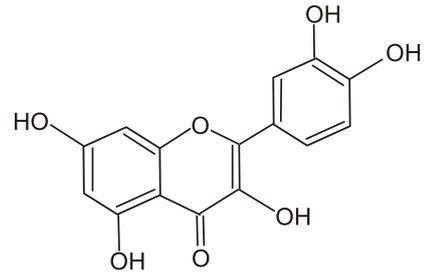
2. AST, ALT, 血清コレステロール, 血清8-イソプロスタンの影響

図4と図5は血中のASTとALTの結果である。ASTは肝臓を含めた全身の臓器に、ALTは肝臓に障害があった場合に、数値が上昇するマーカーである。4種のフラボノイドすべてに、これらマーカーの低下傾向が確認され、特にケルセチンでは0.1%, 0.3%食で有意な低下を示した。このことよりフラボノイドは肝臓

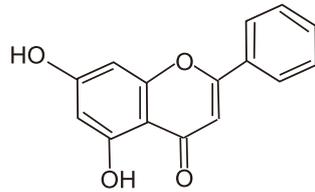
A カテキン



B ケルセチン



C クリシン



D ゲニステイン

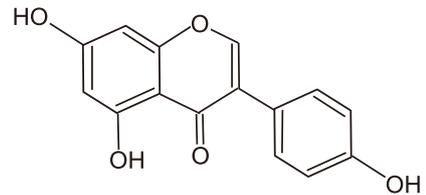


図1. 使用したフラボノイドの構造式

A カテキン, B ケルセチン, C クリシン, D ゲニステイン

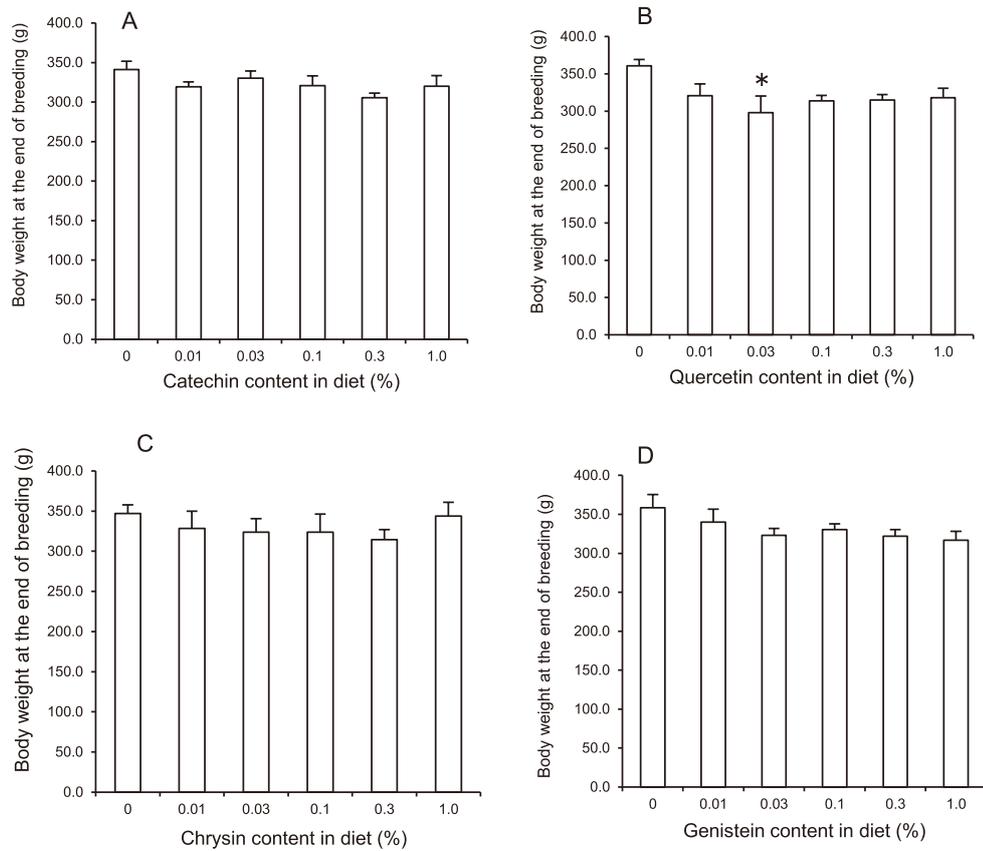


図2. 飼育期間終了時の体重

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置の飼育終了時の体重の結果を示した。値は平均値±標準誤差で表した (n=4)。*: p<0.05でコントロール群 (0%) と有意な差を示す。

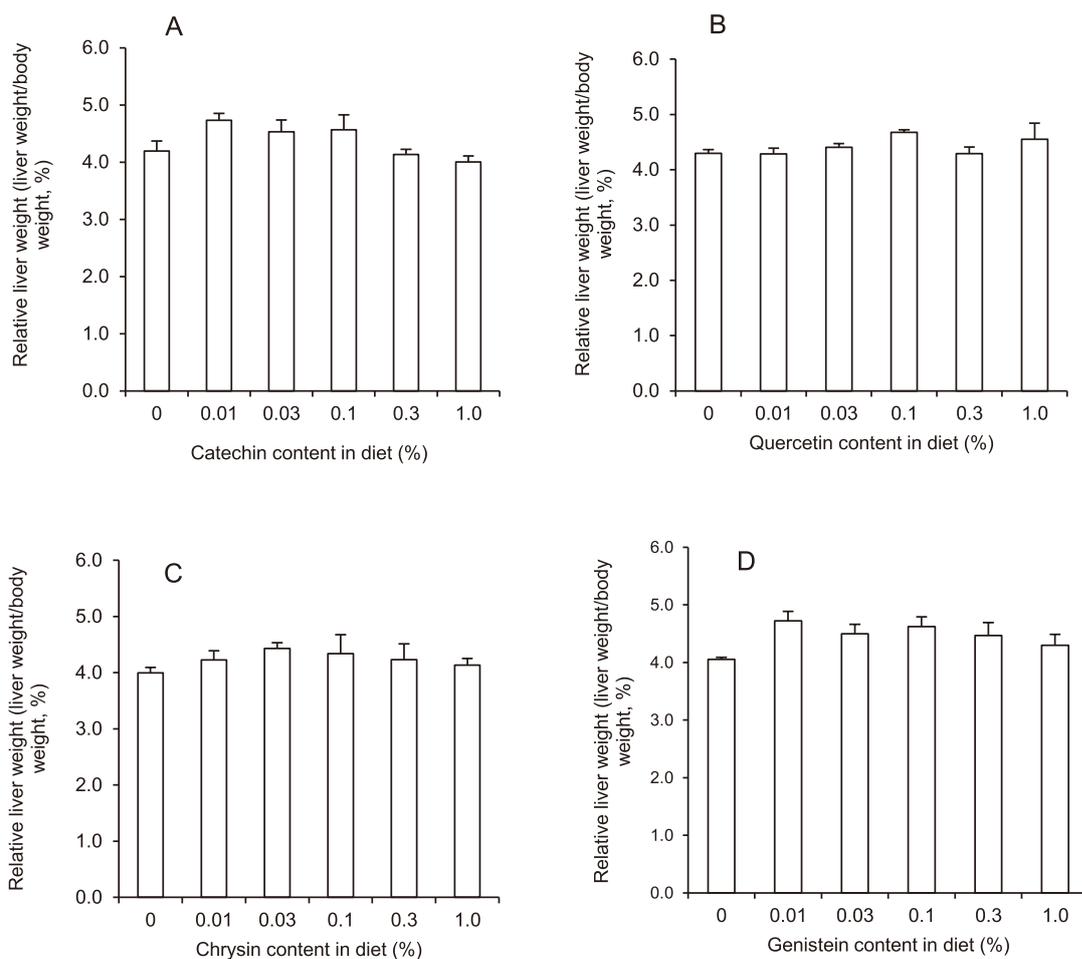


図3. 肝臓の比重量

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置ラットの体重に対する肝臓比重量 (%) の結果を示した. 値は平均値±標準誤差で表した (n=4).

保護作用を有する可能性があると考えられた. カテキン, ケルセチン, ゲニステインには肝臓保護作用があることは既に報告があり⁴⁻⁶⁾, この事実を確認する結果になった. コレステロール値に対する効果は, ゲニステイン以外の3種のフラボノイドでは効果は確認されず, ゲニステインのみ有意な減少を示した(図6). 化学構造では, 用いたフラボノイドのうち, ゲニステインのみB環とC環の結合位置の違いがあり, 血中コレステロール濃度低下の影響に, この構造の重要性が示唆された. ゲニステインの血中コレステロール濃度に対する抑制効果は, 既に多くの報告があり⁷⁾⁸⁾, この結果を支持するものである. 注意喚起のためであるが, 食品安全委員会からは, 大豆イソフラボンの安全

な一日摂取目安量の上限值70~75 mg/日(大豆イソフラボンアグリコン換算値)と設定されており, この量を超えるのは好ましくない. またケルセチンの場合, ヒト試験のコレステロール低下効果の報告があり⁹⁾, ラットとヒトでの感受性の差があると推定された. コレステロールのげっ歯類での試験では, ヒトとの違いが大きいため, 同様な結果を得ることは困難であると考えられる. 抗酸化性の効果として, 血液中の8-イソプロスタンの測定を行った. 8-イソプロスタンは, 細胞膜に含まれるリン脂質の脂肪酸が酸素ラジカルによって酸化障害を受け, 非酵素的反応で生成され, 血液中に放出されると考えられ, 酸化ストレスのマーカーとして用いられている. 図7は, 8-イソプロスタ

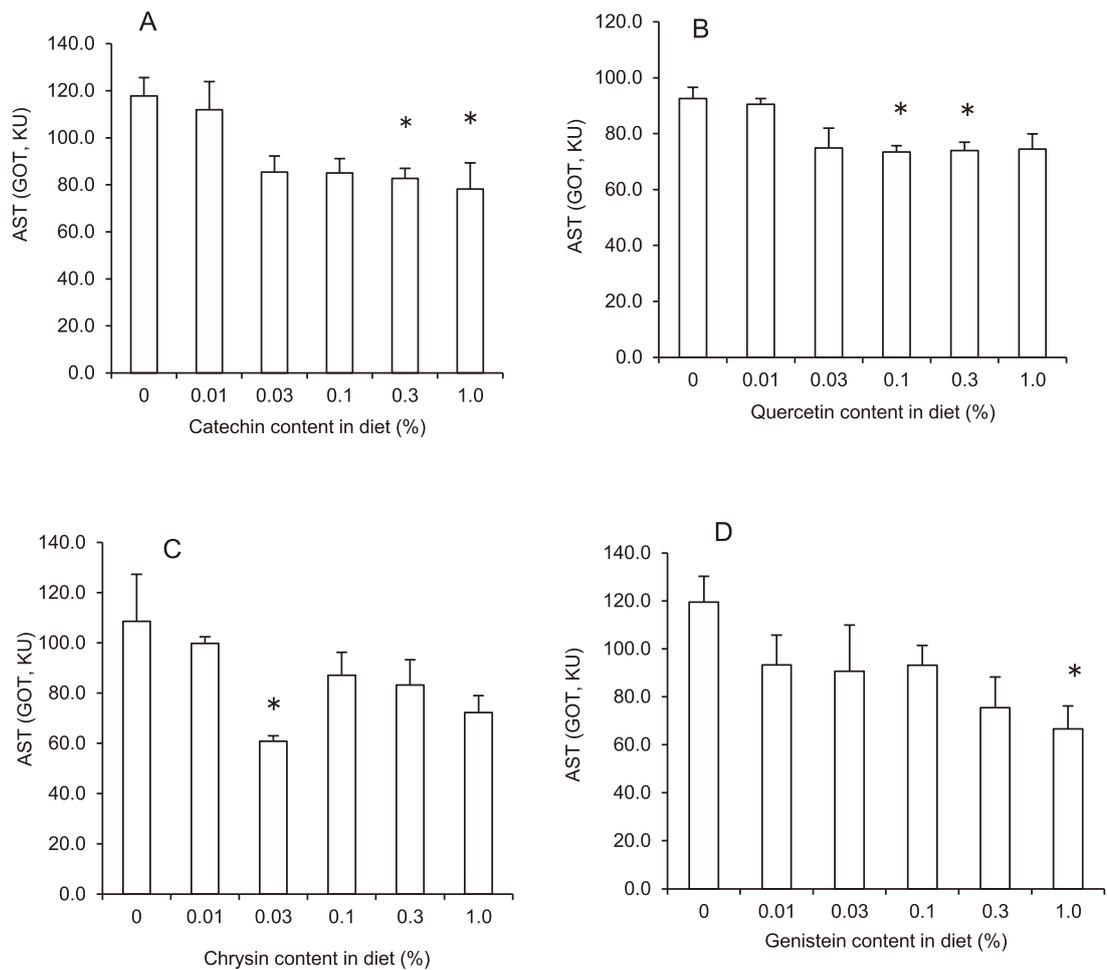


図4. 血液中AST (GOT) の測定結果

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置ラットから採血した後, 遠心分離後血清を採取した. この血清を用いて, 測定キットを用いてASTの活性を測定した. 値は平均値±標準誤差で表した (n=4). *: p<0.05でコントロール群 (0%)と有意差を示す.

ンの血中濃度を測定した結果である. ケルセチンは用量依存的な抑制効果を示したが, 他のフラボノイドは有意な変動は確認されなかった. カテキンでは, 全体の多重比較では有意な変動は認められなかったが, 0.01-0.1%群での層別解析を行うと5%で有意な抑制を示す結果であった. この結果は, 0.3%-1%群で何らかの他の抗酸化抑制因子の存在が推測された.

用いた4種のフラボノイドは最大用量の1%含有食でも, 外見や, 行動等の変化はなく, 健康状態を保ち, また有意な体重の減少もなく, 肝臓の比重量の変動は全く確認されなかった. この最大用量の1%含有食とは, ラットの1日当たり摂取する食餌量が約100 g/kgであることから換算すると, 1日の食事で

50 kg成人が50 gのフラボノイドを取る量となる. ASTでは, 0.1%以上の添加食で肝臓指標の減少が, 幾つかのフラボノイドで確認され, ALTではケルセチンが低下作用を示した. またコレステロール値の減少効果に関して, イソフラボンのゲニステインで抑制効果が確認された. 酸化ストレスマーカーの8-イソプロスタンでは, カテキンとケルセチンで, その抑制効果が確認され, 生体内での抗酸化効果が期待される.

謝辞

本研究の一部は, 農研機構: 機能性を持つ農林水産物・食品開発プロジェクトの助成を受けた.

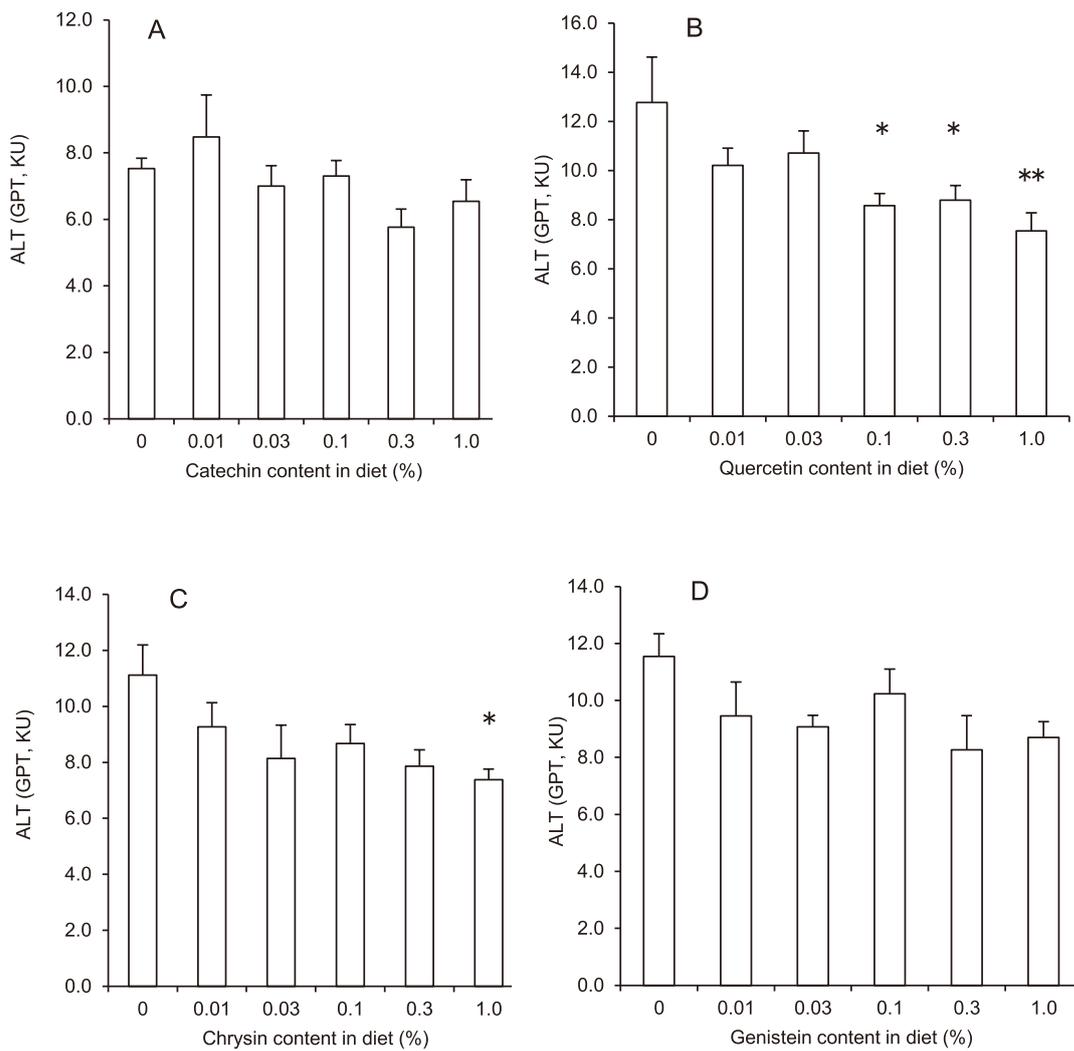


図5. 血液中ALT(GPT)の測定結果

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置ラットから採血した後, 遠心分離後血清を採取した. この血清を用いて, 測定キットを用いてALTの活性を測定した. 値は平均値±標準誤差で表した (n=4). *: p<0.05, **: p<0.01でコントロール群 (0%)と有意差を示す.

要約

4種のフラボノイド, カテキン, ケルセチン, クリシン, およびゲニステインをラットに摂餌投与し, 4週間飼育後の肝臓, 血清コレステロール, 8-イソプロスタンを測定した. フラボノイドの餌添加最大1%でも, 明らかな外見上, 行動等の変化は確認されず, また肝臓への変化も認められなかった. また肝臓保護作用と抗酸化効果およびゲニステインの抗コレステロール効果が確認された.

参考文献

- 1) Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn. Rev.* **8**, 122-146 (2014).
- 2) Xia Y, Lian S, Khoi PN, Yoon HJ, Joo YE, Chay KO, Kim KK, Do Jung Y. Chrysin inhibits tumor promoter-induced MMP-9 expression by blocking AP-1 via suppression of ERK and JNK pathways in gastric cancer cells. *PLoS One.* **10**, e0124007. (2015)

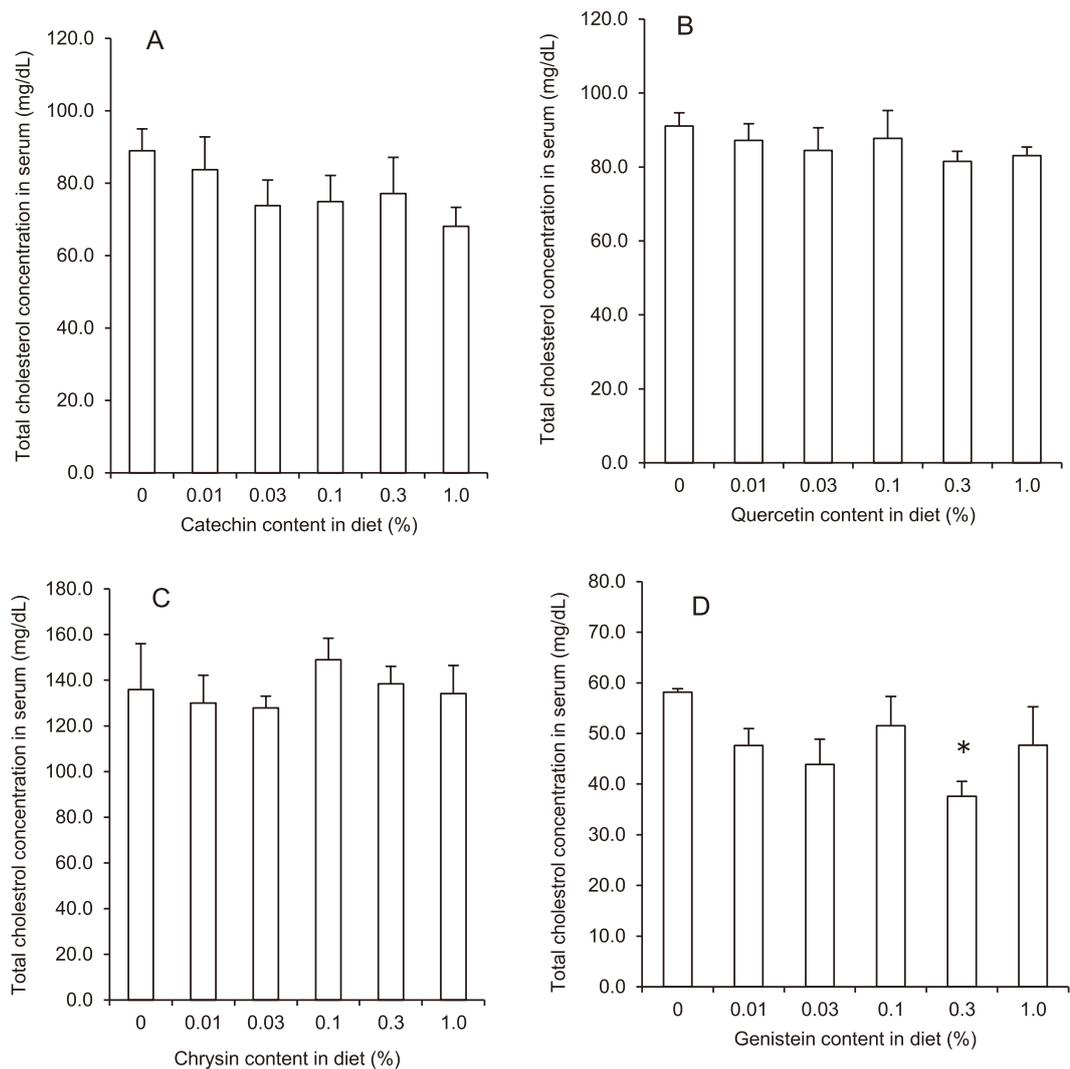


図6. 血液中総コレステロールの測定結果

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置ラットから採血した後, 遠心分離後血清を採取した. この血清を用いて, コレステロール測定キットを用いて血清中の総コレステロールを測定した. 値は平均値±標準誤差で表した (n=4). *: p<0.05でコントロール群 (0%) と有意差を示す.

- 3) Rasouli E and Jahanian R. Improved performance and immunological responses as the result of dietary genistein supplementation of broiler chicks. *Animal*. **9**, 1473-1480 (2015).
- 4) Tang Y, Gao C, Xing M, Li Y, Zhu L, Wang D, Yang X, Liu L, Yao P. Quercetin prevents ethanol-induced dyslipidemia and mitochondrial oxidative damage. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 1194-1200 (2012).
- 5) Delgado ME, Haza AI, García A, Morales P, Myricetin, quercetin, (+)-catechin and (-)-epicatechin protect against N-nitrosamines-induced DNA damage in human hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro*. **23**, 1292-1297 (2009).
- 6) Fan YJ, Rong Y, Li PF, Dong WL, Zhang DY, Zhang L, Cui MJ., Genistein protection against acetaminophen-induced liver injury via its potential impact on the activation of UDP-glucuronosyltransferase and antioxidant enzymes. *Food Chem. Toxicol.* **55**, 172-181 (2013).
- 7) Tang C, Zhang K, Zhao Q, Zhang J., Effects of Dietary Genistein on Plasma and Liver Lipids, Hepatic

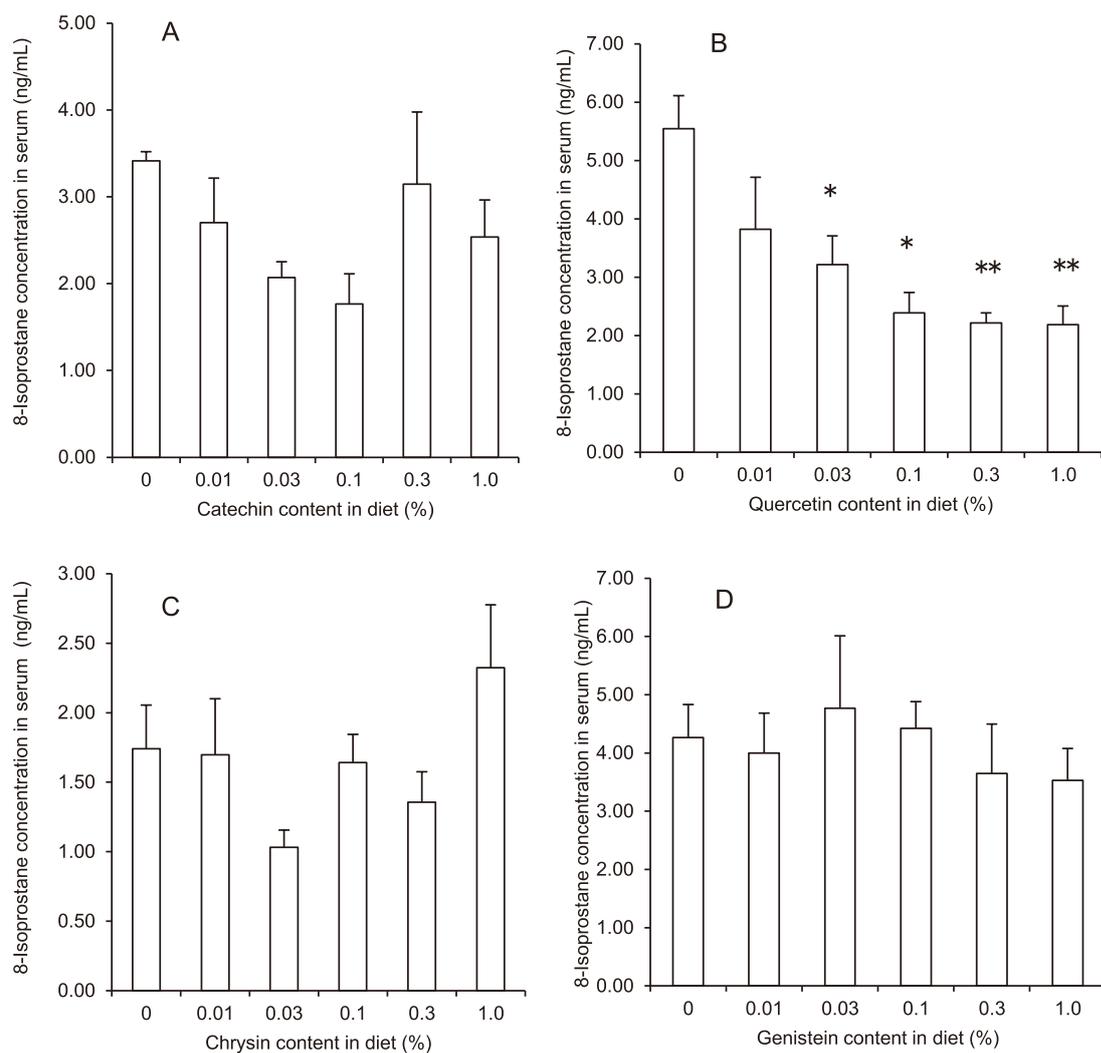


図7. 血液中 8-Isoprostane の測定結果

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置ラットから採血した後, 遠心分離後血清を採取した. この血清を用いて, 8-Isoprostane EIA測定キットを用いて測定した. 値は平均値±標準誤差で表した (n=4). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ でコントロール群 (0%) と有意差を示す.

- Gene Expression, and Plasma Metabolic Profiles of Hamsters with Diet-Induced Hyperlipidemia. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 7929-7936 (2015).
- 8) Legette LL, Lee WH, Martin BR, Story JA, Arabshahi A, Barnes S, Weaver CM., Genistein, a phytoestrogen, improves total cholesterol, and Synergy, a prebiotic, improves calcium utilization, but there were no

- synergistic effects. *Menopause.* **18**, 923-931 (2011).
- 9) Lu TM, Chiu HF, Shen YC, Chung CC, Venkatakrishnan K, Wang CK., Hypocholesterolemic Efficacy of Quercetin Rich Onion Juice in Healthy Mild Hypercholesterolemic Adults: A Pilot Study. *Plant Foods Hum. Nutr.* Sep 18 (Online) (2015).

Hyper production of Acid protease by food grade fungi using food by-product

Pushpa S Murthy

UNU-Kirin Fellow from India

Applied Micology Laboratory, Applied Micorobiology Division

National Food Research Institute, NARO

Screening of food grade and industrial *Aspergillus oryzae* strains was performed and the potential strain *A. oryzae* RIB 40 (ATCC 42149) yielding 20.5 U/ml of acid protease on enrichment media was identified. However, productivity of the parent strain was improved by UV mutagenesis with a lethality of 1.8×10^{-4} . The mutant strain (F6) produced 115 U/ml, which is 5.6 times higher than the parent. Solid state fermentation of potato pulp powder and optimization of biovariables, namely moisture (50 %), temperature (30 °C) and fermentation time (120 h) for efficient protease production, accomplished using a central composite rotatable experimental design, led to an 11-fold increase in protease activity (31 U/g dry substrate). The protease from *A. oryzae* also released glycine (0.57 ± 0.25 U/g) and 40.65 nkat/g carboxy peptidases activity which can enhance food palatability. Further basic studies considering that *A. oryzae* is able to respond to light and as conserved light related genes in genome sequence, light regulation with respect to morphology, growth, sporulation and protease production of *A. oryzae* strains were explored. The colonies resulted with circular stripe pattern containing white and green rings illustrating poor and rich spores besides mycelia formation when exposed to white light than in the dark in few and vice versa. Thus, the results indicate that *A. oryzae* perceives and responds to light as a trigger of conidiation and influence protease production. Hence light as one of the variables for enzyme optimization needs to be considered. Also, molecular mechanisms of photoreaction of this fungus would provide physiological significance for basic and also for biotechnological processes

Key words: *A. oryzae*, Acid protease, process optimization, bio- variables, Light

Genetic approach for bacteriophage resistance of *Bacillus subtilis* (natto)

Supawadee Sriyam

UNU-Kirin fellow from Thailand

Applied Bacteriology Laboratory, Applied Microbiology Division

National Food Research Institute, NARO

Bacillus subtilis strains are the essential bacteria responsible for soybean fermentation. Bacteriophage contamination is a problem, which may occur during the fermentation and spoils the product. At present the *yueB* is the only gene reported as a bacteriophage receptor gene in *B. subtilis* and responsible for irreversible binding of bacteriophage SPP1 to cell surface. It is very interesting to study relationship between bacteriophage sensitivity and variation of *yueB* in *B. subtilis* species. With this preliminary study we obtained *yueB* gene from total 42 strains of *B. subtilis* including Japanese natto fermenting strain and strains isolated from Thua-nao of Thailand by PCR. The nucleotide and translated amino acid sequence of *yueB* gene were analyzed to examine phylogenetic relationship with each other. Deduced amino acid sequences of YueB revealed large diversity in the middle part of it which was supposed to be topologically exposed to cell surface. Moreover, we constructed the knock out mutant of *yueB* by insertion of erythromycin resistance cassettes and determine phage sensitivity in the absence of *yueB*. The phage sensitivity assay confirmed that the *yueB* gene knockout mutant of the laboratory strain *B. subtilis* 168 is resistant to SPP1 phage, but the mutant of natto strain *B. subtilis* NAFM5 was still sensitive to several phages including phages isolated from spoiled natto. These results suggest co-evolution of *yueB* and bacteriophages and *B. subtilis* might have bacteriophage receptor gene(s) other than *yueB*. The study on bacteriophage resistance in *B. subtilis* could be extremely useful and applicable in fermented food industry.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *yueB* gene, natto, bacteriophage

Identification and Control of Microbiological Hazards in Fermented Vegetables and Fermented Fishes Produced in Cambodia

Rithy Chrun

UNU-Kirin Fellow from Cambodia
Food Hygiene Laboratory, Food Safety Division
National Food Research Institute, NARO

Foodborne outbreaks are common in Cambodia, but only a few investigating documents have been conducted due to the poor public awareness and the lack of scientific report. The objectives of this study were (i) to identify and evaluate the contamination rate of microbial hazards in fermented vegetable and fish products in Cambodia, (ii) to determine histamine level in fermented fishes as well as histamine producing bacteria, and (iii) to define targets for control histamine producing bacteria through starter culture (LAB). Total 128 samples including fermented vegetables (60 samples) and fermented fishes (68 samples) were purchased randomly from 5 wet markets in Cambodia from March 2014 to July 2014. In this study, *E. coli*, *Cronobacter sakazakii*, *shigella* spp., *Enterobacter* spp., other Opportunistic *Enterobacteriaceae*, Opportunistic *Non-Enterobacteriaceae*, *Vibrio* spp., *Enterococcus* spp., *Aerococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Bacillus cereus* were found in both fermented foods. The contamination rates in both categories of fermented foods were different, especially for *Enterococcus* spp. Coliform bacteria, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Bacillus cereus* in fermented fishes were significantly higher than in those fermented vegetables. Twelve samples (20%) of fermented fishes exceeded the Food Standards Code (FSC) maximum permitted level (200 ppm) for histamine. *Enterobacter aerogenes* was identified as potential histamine producing bacteria in fermented fishes. Initial pH of fermentation and fast-growing lactic acid bacteria as starter culture play an important role for control histamine producing *Enterobacter aerogenes* as well as other *Enterobacteriaceae*. In this case, the combination of initial pH (6.0) with *Lactobacillus pentosus* or pH (5.0) with *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* are able to suppress the growth of *Enterobacter aerogenes* and minimize the content of histamine at below FSC.

The results in this works could be information of bacterial contaminants in Cambodian fermented foods that should be prevented and reduced in the future. The quality of the raw material and good hygiene practices in food facility should be required to improve food safety in Cambodia. The strategy of target suitable starter cultures under optimal initial pH of fermentation indicated positive result to reduce poisoning histamine in final fermented foods.

Keywords: Fermented vegetables, fermented fishes, hazardous bacteria, histamine, histamine producing bacteria, Lactic acid bacteria, initial pH of fermentation, biological control, Cambodia.

Functional Components of Colored Rice and Selected Vegetables

Rosaly Vallejo MANAOIS

UNU-Kirin Fellow from Philippines

Functional Food Factor Laboratory, Food Function Division

National Food Research Institute, NARO

Plants are known rich sources of biologically active compounds that provide physiological benefits, including antioxidative and anti-inflammatory effects, and reduction of risks of degenerative conditions. In this work, the different bioactive constituents in some plant foods, particularly pigmented rice (*Oryza sativa* L.) and some commonly consumed vegetables in Japan, were investigated.

Unpolished forms of three varieties of Philippine *indica* rice differing in pericarp color and a nonpigmented *japonica* cultivar (Koshihikari) were evaluated for their antioxidant potential using *in vitro* and *in vivo* techniques. Black rice (var. Ittum) contained the highest level of monomeric anthocyanins, 27.0 mg/100 g fresh weight (FW), but red rice (var. Saluyaw) had the highest antioxidant capacity among the samples, as measured by hydrophilic-oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC) assay, 7,284 μmol Trolox equivalent/100 g FW. This indicated the presence of other antioxidants in red rice. Feeding of Balb/c mice with diets containing 65.95% rice for 30 d did not induce changes in the antioxidant status in serum and liver, nor in the anti-inflammatory markers in adipose tissues.

In order to explore naturally occurring antioxidants in various foodstuffs, antioxidant capacities of spinach (*Spinacia oleracea*), komatsuna (*Brassica rapa*), and Japanese parsley or seri (*Oenanthe javanica*) were assessed. Seri exerted the strongest antioxidant capacity, 4,085 μmol TE/100 g FW. Further study on the effect of location and seasonal variations in seri indicated that the mean total ORAC value of 22 seri samples cultivated in three regions (Kyushu, Kanto, Tohoku) was 3,287 μmol TE/100 g FW, with 82% attributed to hydrophilic antioxidants. The major hydrophilic antioxidants in seri were chlorogenic acid (CGA) and quercetin derivatives, namely, isoquercitrin (quercetin-3-*O*-glucoside), rutin (quercetin-3-*O*-rutinoside), hyperoside (quercetin-3-*O*-galactoside), and quercetin-3-*O*-rhamnosyl-galactoside. CGA was the primary contributor to antioxidant capacity of seri. Seri samples cultivated in Kanto area contained higher levels of CGA, corresponding to higher H-ORAC values. Lipophilic ORAC values tended to increase in December to January, but this did not affect the total antioxidant capacity of seri. These results provided information on seri bioactive compounds and the conditions favorable for cultivation of seri possessing higher antioxidant capacity.

The potential effect of unpolished rice cultivars in modulating the intestinal bacterial population in mice was examined. Bacterial community in cecal contents analyzed by Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of DNA followed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) showed distinct DGGE profiles between the control (AIN-93G diet) and rice-fed groups. Banding patterns of samples from rice groups were similar, although intensities of the bands varied. Cluster analysis showed two separate major clusters for AIN and rice-fed groups. Results of quantitative PCR and DGGE showing various microbial populations further confirmed differences in microbial diversity between AIN and rice-fed groups. This work showed that diets containing rice resulted in shifts in the composition of intestinal microbiota of Balb/c mice.

Screening and identification of enzyme inhibitors in local foods and analysis of lipase inhibition mode by anti-hyperlipidemic polyphenols

Rahim Abu Torab Ph.D.

UNU-Kirin Fellow from Bangladesh
Nutritional Function Laboratory, Food Function Division
National Food Research Institute, NARO

Background

Elevated blood levels of TG and Cholesterol are two very important factors for hyperlipidemia symptoms. Blocking cholesterol biosynthesis and TG hydrolysis are two most effective mechanisms to cope hyperlipidemia.

Rationale

A number of plant polyphenols showed potential lipase and HMG CoA reductase inhibitory activity. Therefore, it is important to evaluate local dietary for their anti-hyperlipidemic activity.

Objectives

Searching inhibitors from local dietary sources was the central focus of the present study by conducting: (1) Screening of selected local agricultural produces for lipase and HMG CoA reductase inhibitors; (2) Extraction and quantification of selected inhibitors by HPLC; (3) Screening standard flavonoid and non-flavonoid phenolics for lipase inhibition potency; and (4) Diagnosis of lipase inhibition modality of the resultant high potency inhibitors to evaluation the enzyme structure-activity relationship.

Methodology

Selected foods were first extracted with different solvent systems followed by measuring their IC₅₀ value as an index of their inhibitor potency. Standard phenolics were screened for lipase inhibition and high potency inhibitors were further analyzed for their enzyme inhibition kinetics.

Results

Nine bean extracts showed insignificant HMG CoA reductase inhibitions while, out of 16 bean, cereals, and fruits, only few showed significant lipase inhibition potency. HPLC assay identified presence of free gallic (GA) and ferulic acids (FA) in cereals as well as anthocyanins in black rice. A number of standard flavonoid and non-flavonoid polyphenols when screened for their lipase inhibition potential, only GA and gallol moiety containing catechins, namely, Epigallocatechin and Epigallocatechin gallate were found significantly inhibiting pancreatic lipase (IC₅₀ are 387.2, 237.3, and 391.2 μ M respectively). Analysis of lipase inhibition modality by these polyphenols identified a mode of inhibition that were best fit to competitive inhibitions as revealed by visual inspection of Lineweaver-Burk and Dixon plots.

Conclusions

Structural similarity and a common pattern of competitive inhibitions exerted by the studied polyphenols pointed to a role of their galloyl moiety in enzyme binding and inhibiting the substrates competitively.

原著論文

Postharvest Biology and Technology, 92, 107-113 (2014)

Effect of active modified atmosphere packaging with different initial gas compositions on nutritional compounds of shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*)

Yanjie Li^{*1, *2}, Yutaka Ishikawa^{*2}, Takaaki Satake^{*1}, Hiroaki Kitazawa^{*2}, Xiaoli Qiu^{*1}, Saowaluk Rungchang^{*1}

^{*1} University of Tsukuba

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} Shandong University of Technology

Keywords: Modified atmosphere packaging, Shiitake mushroom, Polysaccharide, Phenolic, Free amino acid

Applied Radiation and Isotopes, 87, 485-488 (2014)

Characterization of brown rice as a certified reference material for Fukushima accident-related radioactivity measurements

Yasuhiro Unno^{*1}, Mayumi Hachinohe^{*2}, Shioka Hamamatsu^{*2}, Setsuko Todoriki^{*2}, Akira Yunoki^{*1}, Tsutomu Miura^{*1}

^{*1} National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

^{*2} National Food Research Institute, NARO

Keywords: Brown rice, Certified reference material, Cs-134, Cs-137, Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident
キーワード：玄米，認証標準物質，セシウム134，セシウム137，福島第一原子力発電所事故

Soil Science and Plant Nutrition, 61, 133-143 (2014)

Exchangeable Cs/K ratio in soil is an index to estimate accumulation of radioactive and stable Cs in rice plant

Motohiko Kondo^{*1}, Hideo Maeda^{*1}, Akitoshi Goto^{*1}, Hiroshi Nakano^{*1}, Nobuharu Kiho^{*2}, Tomoyuki Makino^{*2}, Mutsuto Sato^{*3}, Shigeto Fujimura^{*4}, Tetsuya Eguchi^{*4}, Mayumi Hachinohe^{*5}, Shioka Hamamatsu^{*5}, Hirotaka Ihara^{*6}, Toshiyuki Takai^{*1}, Yumiko Arai-Sanoh^{*1}, Takeshi Kimura^{*7}

^{*1} NARO Institute of Crop Science

^{*2} National Institute for Agro Environmental Sciences

^{*3} Fukushima Agricultural Technology Centre, NARO

^{*4} NARO Tohoku Agricultural Research Center

^{*5} National Food Research Institute, NARO

^{*6} National Agriculture Research Center, NARO

^{*7} National Agriculture and Food Research Organization

Keywords: exchangeable cesium, exchangeable potassium, rice, soil properties, transfer factor
キーワード：交換態セシウム，交換態カリウム，コメ，土質，移行係数

日本食品科学工学会誌, 62(1), 56-62(2015)

乾麺の製麺・調理における放射性セシウムの動態解析

八戸真弓^{*1}, 内藤成弘^{*1}, 明石 肇^{*2}, 等々力節子^{*1}, 松倉 潮^{*1}, 川本伸一^{*1}, 濱松潮香^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 錦築 (煙台) 食品研究開発有限公司

^{*3} 一般財団法人日本穀物検定協会東京分析センター

Keywords: Radioactive cesium, udon, dried noodle, noodle preparation, cooking
キーワード：放射性セシウム，うどん，乾麺，製麺，茹で調理

Journal of Food Protection, 78 (3), 561-566 (2015)

Distribution of radioactive cesium (^{134}Cs plus ^{137}Cs) in rice fractions during polishing and cooking

Mayumi Hachinohe, Tomoya Okunishi, Shoji Hagiwara, Setsuko Todoriki, Shinichi Kawamoto, Shioka Hamamatsu

National Food Research Institute, NARO

Keywords: radioactive cesium, brown rice, polished rice, cooked rice
 キーワード：放射性セシウム，玄米，精米，炊飯米

Cytotechnology, 66 (4), 561-566 (2014)

Green tea catechin induced phagocytosis can be blocked by catalase and an inhibitor of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2)

Monobe Manami*¹, Ema Kaori*¹, Tokuda Yoshiko*¹, Maeda-Yamamoto Mari*²

*¹ NARO Institute of Vegetable and Tea Science

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: epigallocatechin, catalase, transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2)
 キーワード：エピガロカテキン，カタラーゼ，TRPM2

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 78 (5), 806-811 (2014)

Purification and characterization of a novel O-methyltransferase from *Flammulina velutipes*

Kirita Masanobu*¹, Tanaka Yoshihisa*¹, Tagashira Motoyuki*¹, Kanda Tomomasa*¹, Maeda-Yamamoto Mari*²

*¹ Asahi Beer

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: novel O-methyltransferase, enokidake mushroom, characterization
 キーワード：新規メチルトランスフェラーゼ，えのきだけ，特性解明

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 78 (7), 1140-1146 (2014)

Metabolic stability and inhibitory effect of O-methylated theaflavins on H_2O_2 -induced oxidative damage in human HepG2 cells

Tanaka Yoshihisa*¹, Kirita Masanobu*¹, Abe Yuko*¹, Miyata Satoshi*¹, Tagashira Motoyuki*¹, Kanda Tomomasa*¹,
 Maeda-Yamamoto Mari*²

*¹ Asahi Beer

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: O-methylated theaflavins, inhibitory effect on H_2O_2 -induced oxidative damage, HepG2 cells
 キーワード：メチル化テアフラビン，過酸化水素誘導酸化的損傷抑制作用，HepG2細胞

Allergology International, 64 (2), 211-217 (2014)

'Benifuuki' green tea containing O-methylated catechin reduces symptoms of Japanese cedar pollinosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial

Sawako Masuda*¹, Maeda-Yamamoto Mari*², Satoko Usui*¹, Takao Fujisawa*¹

*¹ 三重病院

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: 'Benifuuki' green tea, O-methylated catechin, reduction of symptoms of pollinosis, randomized placebo-controlled trial
 キーワード：べにふうき緑茶，メチル化カテキン，花粉症状軽減作用，無作為割付並行群間ヒト介入試験

Current Pharmaceutical Design, 20, 892-902 (2014)

Prevention of allergic disease development and symptoms by food factors

Hiroshi Akiyama*¹, Shigeru Katayama*¹, Tomomasa Kanda*², Mari Maeda-Yamamoto*³, Mamoru Totsuka*⁴, Shingo Takahashi*⁵, Toshihiko Shoji*⁶, Takahiro Inakuma*⁵, Soichiro Nakamura*¹

*¹ Shinsyu University

*² Asahi Beer

*³ National Food Research Institute, NARO

*⁴ The University of Tokyo

*⁵ Kagome

*⁶ NARO Institute of Fruit Tree Science

Keywords: Prevention of allergic disease, apple polyphenol, green tea catechin

キーワード：アレルギー疾患予防, リンゴポリフェノール, 緑茶カテキン

日本食品科学工学会誌, 61(12), 586-591 (2014)

給茶機 RICH+ (リッチプラス) を用いた茶葉中各種健康機能性成分の抽出条件の検討

山本 (前田) 万里*¹, 奥田 祐*², 大菅 武*², 物部真奈美*³

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² ホンザキ電機株式会社

*³ (独) 農研機構野菜茶葉研究所

Keywords: green tea infuser 'RICH plus', O-methylated catechins, epigallocatechin (EGC), theanine

キーワード：給茶機「リッチプラス」, メチル化カテキン, エピガロカテキン, テアニン

Journal of Bioscience and Bioengineering, 119 (2), 148-152 (2015)

Two transaldolase isogenes from *Moniliella megachiliensis* behave in a different way depending on the stress class

Youshi Iwata*¹, Daiki Mizushima*¹, Yousuke Kobayashi*¹, Tetsuya Ookura*², Jun Ogihara*¹, Jun Kato*¹, Takafumi Kasumi*¹

*¹ Department of Chemistry and Life Science, Nihon University

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: *Moniliella megachiliensis*, Osmotic stress, Oxidative stress, Polyol, Transaldolase isogene

Food Science and Technology Research, 20 (4), 875-881 (2014)

Simplified Methods for Purification of Peanut Allergic Proteins: Ara h 1, Ara h 2, and Ara h 3.

Keigo Masuyama*¹, Kazutaka Yamamoto*², Kaoru Ito*¹, Eiichi Kitagawa*¹, Kohji Yamaki*²

*¹ Sonton Food Industry

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: peanut allergy, purification, Ara h 1-3, ammonium sulfate fractionation (ASF)

Journal of Food Science, 79 (9), C1665-C1671 (2014)

Extraction efficiency of hydrophilic and lipophilic antioxidants from lyophilized foods using pressurized liquid extraction and manual extraction

Jun Watanabe*¹, Tomoyuki Oki*², Jun Takebayashi*³, Yuko Takano-Ishikawa*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO

*³ National Institute of Health and Nutrition

Keywords: antioxidant, extraction, food samples, pressurized liquid extraction, spike-and-recovery

Applied Microbiology and Biotechnology, 99 (10), 4287-4295 (2015)

Identification and distribution of cellobiose 2-epimerase genes by a PCR-based metagenomic approach

Jun Wasaki*¹, Hidenori Taguchi*², Takeshi Senoura*², Hiroshi Akasaka*², Jun Watanabe*³, Kazuki Kawaguchi*⁴, Yosuke Komata*⁴, Kiyotoshi Hanashiro*⁴, Susumu Ito*⁴

*¹ Hiroshima University

*² Hokkaido University

*³ National Food Research Institute, NARO

*⁴ University of the Ryukyus

Keywords: metagenome, environmentalDNA, cellobiose 2-epimerase, mannobiose 2-epimerase, mannan catabolism

The Journal of Nutrition, 145 (2), 199-206 (2015)

Wheat alkylresorcinols suppress high-fat, high-sucrose diet-induced obesity and glucose intolerance by increasing insulin sensitivity and cholesterol excretion in male mice

Oishi Katsutaka*¹⁻³, Yamamoto Sorj*¹, Itoh Nanako*¹, Nakao Reiko*¹, Yasumoto Yuki*^{1,3}, Tanaka Keiko*⁴, Kikuchi Yosuke*⁴, Fukudome Shin-ichi*⁴, Okita Kimiko*⁵, Takano-Ishikawa Yuko*⁶

*¹ Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

*² Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo

*³ Graduate School of Science and Technology, Tokyo University of Science

*⁴ Research Center for Basic Science, Research and Development, Quality Assurance Division, Nisshin Seifun Group, Inc.

*⁵ Yeast Function Development Unit, Oriental Yeast Co., Ltd.

*⁶ National Food Research Institute, NARO

Keywords: alkylresorcinol, obesity, glucose intolerance, cholesterol absorption, circadian rhythm

キーワード：アルキルレゾルシノール，糖尿病，耐糖能，コレステロール吸収，サーカディアンリズム

Food Chemistry, 161, 176-180 (2014)

Milk prevents the degradation of daikon (*Raphanus sativus* L.) isothiocyanate and enhances its absorption in rats

Katsunari Ippoushi, Hiroshi Ueda, Atsuko Takeuchi

NARO Institute of Vegetable and Tea Science

Keywords: Isothiocyanate, Daikon, Milk, Absorption, Rat

Current Nutrition Reports, 3 (3), 204-212 (2014)

Nutrients, Clock Genes, and Chrononutrition

Hideaki Oike*¹, Katsutaka Oishi*², Masuko Kobori*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Keywords: Circadian rhythm, Clock genes, Chrono-nutrition, Metabolic disorders, Breakfast

キーワード：概日リズム，時計遺伝子，時間栄養学，代謝異常，朝食

Food Chemistry, 173, 238-242 (2015)

Absolute quantification of protein NP24 in tomato fruit by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using stable isotope-labelled tryptic peptide standard

Katsunari Ippoushi, Motoe Sasanuma, Hideaki Oike, Masuko Kobori, Mari Maeda-Yamamoto

National Food Research Institute, NARO

Keywords: Protein NP24, Tomato, Absolute quantification, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Stable isotope-labelled peptide

Biological & Pharmaceutical Bulletin, 37, 1422-1427 (2014)

Harmine lengthens circadian period of the mammalian molecular clock in the suprachiasmatic nucleus

Kondoh Daisuke*¹, Yamamoto Saori*¹, Tomita Tatsunosuke*¹, Miyazaki Koyomi*¹, Itoh Nanako*¹, Yasumoto Yuki*¹, Oike Hideaki*², Doi Ryosuke*¹, Oishi Katsutaka*¹

*¹ Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: carboline alkaloid, circadian clock, PER2::LUC protein, real-time reporter assay, suprachiasmatic nucleus

PLoS One, 9 (5), e98294 (2014)

β -Cryptoxanthin alleviates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by suppressing inflammatory gene expression in mice.

Masuko Kobori*¹, Yinhua Ni*^{2, 3}, Yumiko Takahashi*¹, Natsumi Watanabe*¹, Minoru Sugiura*⁴, Kazunori Ogawa*⁵, Mayumi Nagashimada*², Shuichi Kaneko*³, Shigehiro Naito*¹, Tsuguhito Ota*^{2, 3}

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Brain/Liver Interface Medicine Research Center, Kanazawa University

*³ Kanazawa University Graduate School of Medical Science

*⁴ Citrus Research Division, NARO Institute of Fruit Tree Science, NARO

*⁵ Grape and Persimmon Research Division, NARO Institute of Fruit Tree Science, NARO

Keywords: β -cryptoxanthin, nonalcoholic steatohepatitis, inflammation, macrophages, oxidative stress

キーワード: β -クリプトキサニン, 非アルコール性脂肪肝炎, 炎症, マクロファージ, 酸化ストレス

Food Science and Technology Research, 20 (2), 309-316 (2014)

Intestinal bacterium TM-30: an S-equol-producing bacterium isolated from human feces is involved in estrogen metabolism *in vitro*

Motoi Tamura, Sachiko Hori, Hiroyuki Nakagawa

National Food Research Institute, NARO

Keywords: estrone, β -estradiol, S-equol, daidzein, intestinal bacterium

キーワード: エストロン, β -エストラジオール, S-エコール, ダイゼイン, 腸内細菌

Journal of Food Science, 79 (Nr.2), S246-S250 (2014)

Effect of risk information exposure on consumers' responses to foods with insect contamination

Atsushi Kimura*¹, Yukio Magariyama*², Akihiro Miyanoshta*², Taro Imamura*², Kumiko Shichiri*², Tomohiro Masuda*², Yuji Wada*²

*¹ Faculty of Environment and Information Sciences, Yokohama National University

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: consumer perception, food defect, food information, insect contamination, risk communication

日本健康教育学会誌, 22(2), 1-11 (2014)

イラストを用いた食品中の残留農薬量の理解度の検討

朴ソラ*1,*2,*3, 増田知尋*3, 村越琢磨*4, 川崎弥生*5, 内海 建*3, 木村敦*3,*6, 小山慎一*2, 日比野治雄*2, 日野明寛*3,*7, 和田有史*3

- *1 韓国国際大学校産業デザイン学科
- *2 千葉大学大学院工学研究科
- *3 (独) 農研機構食品総合研究所
- *4 (独) 理化学研究所 理研BSI-トヨタ連携センター
- *5 日本大学文理学部
- *6 東京電機大学情報環境学部
- *7 日本製粉株式会社中央研究所

Keywords: risk communication, information design, pesticide residue
 キーワード: リスクコミュニケーション, 情報デザイン, 残留農薬

Appetite, 81, 102-107 (2014)

Scents boost preference for novel fruits

Yuki Yamada*1, Kyoshiro Sasaki*2, Satomi Kunieda*3, Yuji Wada*4

- *1 Faculty of Arts and Science, Kyushu University
- *2 Graduate School of Human-Environment Studies, Kyushu University
- *3 R & D Division, Takasago International Co.
- *4 National Food Research Institute, NARO

Keywords: Visual-olfactory interaction, Awareness, Edibility, Morphing

Food Quality and Preference 40 (B), 279-286, (2015)

Model of vegetable freshness perception using luminance cues

C. Arce-Lopera*1,*2, Tomohiro Masuda*3, Atsushi Kimura*3,*4, Yuji Wada*3, Katsunori Okajima*2

- *1 Faculty of Engineering, CESI University
- *2 Faculty of Environment and Information Sciences, Yokohama National University
- *3 National Food Research Institute, NARO
- *4 Tokyo Denki University

Keywords: Visual freshness perception, Luminance distribution, Image analysis, Statistics; Vegetables

日本味と匂学会誌, 21(3), 157-160 (2014)

マウスリック試験を用いた甘味料の相乗効果評価

河合崇行, 日下部裕子

(独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: Mouse, Lick, Sweetener, synergetic effects

PLoS One, 9 (7), e100425 (2014)

Distinct human and mouse membrane trafficking systems for sweet taste receptors T1r2 and T1r3.

Madoka Shimizu*¹, Masao Goto*¹, Takayuki Kawai*¹, Atsuko Yamashita*², Yuko Kusakabe*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Keywords: taste receptor, sweet taste, membrane traffick, species difference

Neurosci Letter, 580, 147-152 (2014)

The glossopharyngeal nerve controls epithelial expression of Sprr2a and Krt13 around taste buds in the circumvallate papilla.

Hirohito Miura*¹, Yuko Kusakabe*², Kento Hashido*², Akihiro Hino*², Makoto Ooki*¹, Shuitsu Harada*¹

*¹ Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: Taste bud, Taste nerve, Cell differentiation, Taste pore, Precursor cell

The Journal of Biological Chemistry, 289 (37), 25711-25720 (2014)

Molecular mechanisms for sweet-suppressing effect of gymnemic acids.

Keisuke Sanematsu*¹, Yuko Kusakabe*², Noriatsu Shigemura*¹, Takatsugu Hirokawa*³, Seiji Nakamura*¹, Toshiaki Imoto*⁴, Yuzo Ninomiya*⁵

*¹ Graduate School of Dental Sciences, Kyushu University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

*⁴ Department of Functional, Morphological and Regulatory Science, Tottori University

*⁵ Research and Development Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu University

Keywords: Molecular Evolution, Molecular Modeling, Signal Transduction, Gymnemic Acids, Sweet Taste

Vision Research, 109 (B), 201-208 (2015)

Material perception of a kinetic illusory object with amplitude and frequency changes in oscillated inducer motion

Tomohiro Masuda, Kazuya Matsubara, Ken Utsumi, Yuji Wada

National Food Research Institute, NARO

Keywords: Material perception, Motion perception, Illusory contour

Journal of Texture Studies, 45 (5), 335-343 (2014)

Ultrasound pulsed wave Doppler imaging of the esophagus illustrates the effects of water volume on bolus kinematics

Zhihong Gao, Kaoru Kohyama

National Food Research Institute, NARO

Keywords: Bolus, esophagus, kinematics, ultrasonic pulsed wave Doppler, volume
キーワード：食塊，食道，運動学，超音波パルスドブラ，容量

Food Hydrocolloids, 43, 146-152 (2015)

Electromyographic texture characterization of hydrocolloid gels as model foods with varying mastication and swallowing difficulties

Kaoru Kohyama*¹, Fumiyo Hayakawa*¹, Yukari Kazami*¹, Sayaka Ishihara*², Satomi Nakao*², Takahiro Funami*²,
Katuyoshi Nishinari*^{3, 4}

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² San-Ei Gen F. F. I., Inc.

*³ Graduate School of Human Life Science, Osaka City University

*⁴ Present Address: School of Food and Pharmaceutical Engineering, Hubei University of Technology

Keywords : texture, sensory evaluation, gels, eating difficulty, electromyography
キーワード : テクスチャー, 官能評価, ゲル, 食べにくさ, 筋電位測定法

Journal of Texture Studies, 45 (5), 354-366 (2014)

Instrumental uniaxial compression test of gellan gels of various mechanical properties using artificial tongue and its comparison with human oral strategy for the first size reduction

Sayaka Ishihara*¹, Mai Isono*¹, Satomi Nakao*¹, Makoto Nakauma*¹, Takahiro Funami*¹, Kazuhiro Hori*², Takahiro Ono*³,
Kaoru Kohyama*⁴, Katsuyoshi Nishinari*^{5, 6}

*¹ San-Ei Gen F. F. I., Inc.

*² Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

*³ Graduate School of Dentistry, Osaka University

*⁴ National Food Research Institute, NARO

*⁵ Graduate School of Human Life Science, Osaka City University

*⁶ Present Address: School of Food and Pharmaceutical Engineering, Hubei University of Technology

Keywords: artificial tongue, gel fracture, instrumental uniaxial compression, the first size reduction, tongue-palate compression
キーワード : 人工舌, ゲルの破壊, 機器による一軸圧縮, 第一破壊, 舌と口蓋による圧縮

Food Science and Technology Research, 20 (6), 1121-1130 (2014)

Mouthful size effects on mastication effort of various hydrocolloid gels used as food models

Kaoru Kohyama*¹, Fumiyo Hayakawa*¹, Zhihong Gao*¹, Sayaka Ishihara*², Satomi Nakao*², Takahiro Funami*²

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² San-Ei Gen F. F. I., Inc.

Keywords: texture, food size, hydrocolloid gels, mastication effort, electromyography
キーワード : テクスチャー, 食品の大きさ, ハイドロコロイドゲル, 咀嚼量, 筋電位測定法

Journal of Texture Studies, 45 (6), 477-486 (2014)

Effects of milling ratio and water-to-rice ratio on mastication effort for cooked rice measured by electromyography

Kaoru Kohyama*¹, Navdeep Singh Sodhi*^{1, 2}, Tomoko Sasaki*¹, Keitaro Suzuki*^{1, 3}

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Present Address: Department of Food Science and Technology, Guru Nanak Dev University

*³ Present Address: NARO Institute of Crop Science

Keywords: Electromyography, Japonica rice, mastication, milling, texture
キーワード : 筋電位測定法, ジャポニカ米, 咀嚼, 精米, テクスチャー

日本調理科学会誌, 47(6), 330-340(2014)

官能評価による未加熱こめ油の風味のプロファイリング

早川文代*1, 風見由香利*1, 神保聡子*2, 浦田貴之*2

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 ボーソー油脂株式会社

Keywords: rice bran oil, sensory evaluation, time-intensity analysis, flavor, correspondence analysis
キーワード: こめ油, 官能評価, タイム-インテンシティ法, 風味, コレスポネンス分析

Food Chemistry, 157 (6), 229-239 (2014)

Optimising aroma quality in curry sauce products using in vivo aroma release measurements

Jun Hatakeyama*1, James M. Davidson*2, Avinash Kant*2, Takeshi Koizumi*1, Fumiyo Hayakawa*3, Andrew J. Taylor*2

*1 Research and Development Department, Nichirei Foods

*2 Flavometrix Limited, University of Nottingham

*3 National Food Research Institute, NARO

Keywords: APCI-MS, MSNose, Fat content, Spices, Flavour matching

Food Science and Technology Research, 20 (3), 555-561 (2014)

Detection of commercially irradiated potatoes by thermoluminescence and photostimulated luminescence analyses

Setsuko Todoriki, Hiromi Kameya, Kimie Saito, Shoji Hagiwara

National Food Research Institute, NARO

Keywords: potatoes, gamma irradiation, analytical detection, TL, PSL

日本きのこ学会誌, 1(22), 19-23(2014)

数種のきのこ粉末の電子スピン共鳴による分析

菅野友美*1, 山本久美子*2, 原田栄津子*3, 亀谷宏美*4, 鶴飼光子*2, 大澤俊彦*5

*1 北海道教育大学旭川校

*2 北海道教育大学函館校

*3 株式会社岩出菌学研究所

*4 (独) 農研機構食品総合研究所

*5 愛知学院大学

Keywords: Agaricus blazei, Coprinus comatus, Electron spin resonance (ESR), Grifola gargar, Radicals

Mutation Research, 770, 95-104 (2014)

Genotoxic potential and in vitro tumour-promoting potential of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone, two radiolytic products of fatty acids

Kohji Yamakage*¹, Hajime Sui*¹, Ryo Ohta*¹, Tomoyasu Toyozumi*¹, Kumiko Kawakami*¹, Hirota Matsumoto*¹, Toshitaka Takahashi*¹, Kiyoshi Sasaki*¹, Mayu Ikezumi*¹, Saki Negishi*¹, Keisuke Izumi*², Setsuko Todoriki*³, Kondo Takashi*⁴, Masakazu Furuta*⁵

*¹ Hatano Research Institute

*² The University of Tokushima Graduate School

*³ National Food Research Institute, NARO

*⁴ University of Toyama,

*⁵ Osaka Prefecture University

Keywords: Radiolytic products, 2-Dodecylcyclobutanone, 2-Tetradecylcyclobutanone, Genotoxicity, Bhas 42 cell-transformation assay, Tumour-promoting effect

食品衛生学雑誌, 55(5), 193-204(2014)

放射線照射した甲殻類（エビおよびカニ）の検知への電子スピン共鳴分光法の適用

亀谷宏美*¹, 高附巧*², 松田りえ子*², 堤智昭*², 等々力節子*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 国立医薬品食品衛生研究所

Keywords: electron spin resonance spectroscopy, irradiated food, prawn shrimp, crab
キーワード：電子スピン共鳴分光法, 照射食品, エビ, カニ

食品照射, 49(1), 9-15(2014)

加工食品を対象としたアルキルシクロブタン法 (EN1785) の性能評価

堤 智昭*¹, 足立利華*¹, 高附 巧*¹, 根井大介*², 亀谷宏美*², 等々力節子*², 菊地正博*³, 小林泰彦*³, 松田りえ子*¹, 手島玲子*¹

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 日本原子力研究開発機構

Keywords: Irradiated food, 2-dodecylcyclobutanone, 2-tetradecylcyclobutanone, European standard EN1785, Processed food
キーワード：放射線照射食品, 2-ドデシルシクロブタン, 2-テトラデシルシクロブタン, ヨーロッパ標準分析法EN1785, 加工食品

Fungal Biology, 118 (4), 402-412 (2014)

A single nucleotide polymorphism in the translation elongation factor 1 α gene correlates with the ability to produce fumonisin in Japanese *Fusarium fujikuroi*

Haruhisa Suga*¹, Miha Kitajima*², Riku Nagumo*², Takao Tsukiboshi*³, Ryuichi Uegaki*³, Takashi Nakajima*⁴, Masayo Kushiro*⁵, Hiroyuki Nakagawa*⁵, Masafumi Shimizu*², Koji Kageyama*⁶, Mitsuro Hyakumachi*²

*¹ Life Science Research Center, Gifu University

*² Faculty of Applied Biological Science, Gifu University

*³ National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO

*⁴ National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, NARO

*⁵ National Food Research Institute, NARO

*⁶ River Basin Research Center, Gifu University

Keywords: Fungi, Gibberella fujikuroi, Mycotoxin, Rice pathogen, Bakanae disease

Journal of Food Processing and Preservation, 38 (3), 1113-1118 (2014)

Loss of nivalenol during cooking of noodles made from *Fusarium*-infected Japanese soft wheat

Sharif Md. Hossen*¹, Hiroyuki Nakagawa*¹, Hitoshi Nagashima*¹, Hiroshi Okadome*¹, Masayo Kushiro*^{1, *2}

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Headquarters, NARO

Keywords: raw noodle, cooked noodle, broth, transfer ratio, nivalenol

Food Control, 40, 193-197 (2014)

Effect of milling on the content of deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in Japanese wheat

Yazhi Zheng*¹, Sharif Md. Hossen*¹, Yuki Sago*¹, Megumi Yoshida*², Hiroyuki Nakagawa*¹, Hitoshi Nagashima*¹, Hiroshi Okadome*¹, Takashi Nakajima*², Masayo Kushiro*^{1, *3}

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² National Agriculture Research Center for Kyushu/Okinawa Region, NARO

*³ Headquarters, NARO

Keywords: wheat, zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol, milling

JSM Mycotoxins, 60 (1), 23-27 (2014)

Extraction of a *Fusarium* mycotoxin zearalenone in edible oils

Yazhi Zheng*¹, Hiroyuki Nakagawa*¹, Yuki Sago*¹, Hitoshi Nagashima*¹, Hiroshi Okadome*¹, Masayo Kushiro*^{1, *2}

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Headquarters, NARO

Keywords: acetonitrile, HPLC-FLD, oil, recovery, zearalenone

Mycoscience, 56, 301-308 (2015)

The α -oxoamine synthase gene *fum8* is involved in fumonisin B₂ biosynthesis in *Aspergillus niger*

Kiminori Shimizu*¹, Hiroyuki Nakagawa*², Ruiko Hashimoto*³, Daisuke Hagiwara*¹, Yoshiki Onji*⁴, Katsuyoshi Asano*⁴, Susumu Kawamoto*¹, Haruo Takahashi*^{1, *5}, Koji Yokoyama*¹

*¹ Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Chiba Prefectural Institute of Public Health

*⁴ Nara Prefectural Institute of Public Health

*⁵ National Institute of Health Science

Keywords: gene cluster, gene expression, mycotoxin, secondary metabolism

Analytical and Bioanalytical Techniques, 2014 S6, (2014)

Harmonized collaborative validation of a simultaneous and multiple determination method for nivalenol, deoxynivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, and zearalenone in wheat and barley by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Hiroyuki Nakagawa*¹, Shigehiro Naito*¹, Yuusuke Kitani*², Yoshinao Ito*², Yoshikazu Aoyama*³, Matsuhisa Koyama*³, Yuusuke Hiejima*⁴, Keisuke Nakamura*⁴, Hiroshi Miyazaki*⁵, Tsuyoshi Morita*⁵, Masayohi Tamura*⁶, Naoki Mochizuki*⁶, Masaru Nakamura*⁷, Yuusuke Seki*⁸, Hisae Kadokura*⁹, Hidaka Ikeda*¹⁰, Tomoko Ishikuro*¹⁰, Yoriko Saito*¹², Miyoko Tajima*¹², Yohsuke Shigemasa*¹³, Kikuko Kasama*¹⁴, Yasuyo Oguma*¹⁴, Yuki Sago*¹, Tetsuhisa Goto*¹⁵, Kazuyuki Hirayae*¹⁶

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Headquarters, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

*3 Nagoya Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

*4 Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

*5 Tokyo Analysis Center, Japan Grain Inspection Association

*6 Research Laboratories for Food Safety Chemistry, Asahi Group Holdings, Ltd.

*7 Research & Development Center, Showa Sangyo Co., Ltd.

*8 QE (quality exam.) Center, Nisshin Seifun Group Inc.

*9 Research Institute, Analysis Center, Kagome Co., Ltd.

*10 Itabashi Spice Center, S&B Foods, Inc.

*11 R&D Center, Nippon Meat Packers, Inc.

*12 Co-op net

*13 Central Research Institute for Feed and Livestock, National Federation of Agricultural Co-operative Associations

*14 Hatano Research Institute (HRI), Food and Drug Safety Center (FDSC)

*15 Faculty of Agriculture, Shinshu University

*16 National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, NARO

Keywords: LC-MS/MS, harmonized collaborative validation, mycotoxin, wheat, barley

Japanese Journal of Food Chemistry and Safety (日本食品化学学会誌), 21 (3), 173-178 (2014)

Retention of *Fusarium* mycotoxin zearalenone and deoxynivalenol during Japanese soft wheat milling

Masayo Kushiro*¹, Yazhi Zheng*¹, Manasikan Thammawong*¹, Toru Kozawa*², Hiroyuki Nakagawa*¹, Hitoshi Nagashima*¹, Hiroshi Okadome*¹

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Tokachi Agriculture Experimental Station, Hokkaido Research Organization (HRO)

Keywords: raw noodle, cooked noodle, broth, transfer ratio, nivalenol

Toxins, 7, 604-620 (2015)

Altered gene expression profiles of wheat genotypes against *Fusarium* head blight

Ayumi Kosaka*¹, Alagu Manickavelu*¹, Daniela Kajihara*^{1, 2}, Hiroyuki Nakagawa*³, Tomohiro Ban*¹

*1 Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University

*2 Vascular Biology Laboratory, Heart Institute InCor, University of Sao Paulo, School of Medicine

*3 National Food Research Institute, NARO

Keywords: wheat, *Fusarium graminearum*, molecular response, detoxification, local and systemic response

食品総合研究所研究報告, 79, 31-34 (2015)

国産豆腐より分離された腸球菌の特性

細谷幸恵, 大畑由紀子, 川崎 晋, 稲津康弘

(独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: enterococci, indicator bacteria of fecal contamination

食品総合研究所研究報告, 79, 25-29(2015)

ワークショップを通じた食品関連事業者等の自主衛生管理手法に関する知識の向上 (第2報)

川崎晋, 持田麻里, 大畑由紀子, 齋藤美枝, 野澤博美, 稲津康弘

(独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: food hygiene, workshop, self-inspection A

ベストロジ, 29(2), 49-52(2014)

ナッツ類と乾燥果実類におけるノシメマダラメイガ *Plodia interpunctella* の発育

木村悟朗*1, 宮ノ下明大*2, 春成常仁*1, 谷川 力*1

*1 イカリ消毒株式会社

*2 (独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: raw whole almond, shelled macadamia nut, shelled walnut, dried plum, raisins

キーワード: アーモンド, マカデミアナッツ, クルミ, プルーン, レーズン

食品総合研究所報告, 79, 19-24(2015)

茨城県つくば市の屋外でトラップに捕獲された貯穀害虫の記録

古井 聡, 今村太郎, 宮ノ下明大

(独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: stored-product insect pest, trap, capture, outdoor, Tsukuba

キーワード: 貯穀害虫, トラップ, 捕獲, 屋外, つくば市

都市有害生物管理, 4(2), 79-82(2014)

ネコおよびインコ用の乾燥ペットフードにおけるノシメマダラメイガ *Plodia interpunctella* 幼虫の発育

宮ノ下明大, 今村太郎, 古井 聡

(独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: *Plodia interpunctella*, pet food, larval development, cat, parakeet

キーワード: ノシメマダラメイガ, ペットフード, 幼虫発育, ネコ, インコ

都市有害生物管理, 4(2), 91-96(2014)

10, 11月に野外の性フェロモントラップに捕獲されたノシメマダラメイガおよびタバコシバンムシの個体数
- 関東地方8カ所における2013年の調査 -

宮ノ下明大*1, 佐野俊夫*2

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 法政大学生命科学部

Keywords: *Plodia interpunctella*, *Lasioderma serricornis*, sex pheromone trap, outdoor

キーワード: ノシメマダラメイガ, タバコシバンムシ, 性フェロモントラップ, 屋外

ペストロジー, 29(1), 23-24, (2014)

茨城県つくば市において冬季に建物で発見されたマツヘリカメムシ *Leptoglossus occidentalis*

宮ノ下明大*1, 曲山幸生*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: western conifer seed bug, overwintering, adult, alien insect pest, bulding
キーワード: マツヘリカメムシ, 越冬, 成虫, 外来害虫, 建物

都市有害生物管理, 4(2), 59-63(2014)

プラスチックコンテナ内での捕食性カメムシ類によるヒラタコクヌストモドキの個体数抑制効果

石島 力*1,*2, 森本彩佳*1, 今村太郎*1, Pornpip Visarathanonth*3, 宮ノ下明大*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 現在: (独) 農研機構中央農業研究センター

*3 タイ農業局

Keyword: *Joppeicus paradoxus*, stored-product insect, *Tribolium confusum*, *Xylocoris flavipes*

キーワード: ホウネンカメムシ, 貯蔵食品害虫, ヒラタコクヌストモドキ, ミナミアシブトハナカメムシ

Journal of Cereal Science, 60 (1), 193-201 (2014)

Moisture distribution in rice grains used for sake brewing analyzed by magnetic resonance imaging

Akemi K. Horigane*1, Keitaro Suzuki*1,*2, Mitsuru Yoshida*1,*3

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 NARO Institute of Crop Science

*3 Nippon Veterinary and Life Science University

Keywords: rice grain, moisture distribution, magnetic resonance imaging, sake brewing

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 55 (3), 168-173 (2014)

Therapeutic effects of isoflavones on impaired salivary secretion

Koufuchi Ryo*1, Ayako Takahashi*1, Yoh Tamaki*2, Mayumi Ohnishi-Kameyama*3, Hiroko Inoue*1,*4, Ichiro Saito*1

*1 Department of Pathology, Tsurumi University School of Dental Medicine

*2 Department of Health and Welfare Services National Institute of Public Health

*3 National Food Research Institute, NARO

*4 Department of Pharmacotherapy, Nihon Pharmaceutical University

Keywords: isoflavones, dry mouth, estrogen, salivary secretion, reactive oxygen species

日本食品科学工学会誌, 62(2), 62-79(2015)

豚肉に含まれるポリソルベート偽陽性成分の同定と除去

高木晃一*1, 松永いづみ*2, 工藤和幸*1, 亀山真由美*2

*1 日本ハム株式会社商品開発研究所検査分析課

*2 (独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: polysorbate, false-positive compound, pork, phospholipid, solid-phase extraction

The Journal of Antibiotics, 67 (12), 839-842 (2014)

Isolation and structural determination of a new hydrophobic peptide venepeptide from *Streptomyces venezuelae*

Shinya Kodani*¹, Kazuki Sato*¹, Hikaru Hemmi*², Mayumi Ohnishi-Kameyama*²

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Graduate school of Agriculture, Shizuoka University

Keywords: *Streptomyces venezuelae*, hydrophobic peptide, NMR spectrum

分析化学, 63(7), 619-623(2014)

湯通し塩蔵ワカメの安定同位体比と微量元素組成の年次変化及び産地判別の可能性

鈴木彌生子*¹, 國分敦子*², 絵面智宏*², 中山和美*²

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 理研ビタミン (株)

Keywords: $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, trace elements, wakame, geographical origin, interannual variation

キーワード: $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, ワカメ, 産地判別, 年次変化

分析化学, 63(5), 399-403(2014)

窒素安定同位体比測定のためのアミノ酸標準物質の開発

佐藤里恵*¹, 川西英彦*¹, Arndt SCHIMMELMANN*², 鈴木彌生子*³, 力石嘉人*⁴

*¹ SIサイエンス (株)

*² インディアナ大学

*³ (独) 農研機構食品総合研究所

*⁴ (独) 海洋研究開発機構

Keywords: amino acids, nitrogen, stable isotope, standards, reference materials

キーワード: アミノ酸, 窒素, 安定同位体比, 標準物質

日本食品科学工学会誌, 61(4), 160-167(2014)

DNA分析および安定同位体比分析によるさくらえび製品の産地判別

小泉鏡子*¹, 阿久津哲也*^{1, 2}, 中下留美子*^{3, 4}, 鈴木彌生子*^{3, 5}

*¹ 静岡県水産技術研究所

*² 静岡県水産技術研究所浜名湖分場

*³ 日本認証サービス (株)

*⁴ (独) 森林総合研究所

*⁵ (独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: Sakuraebi (*Sergia lucens*), geographical origin, DNA analysis, stable carbon isotope ratios, stable nitrogen isotope ratios

キーワード: さくらえび製品, 産地判別, DNA分析, 炭素安定同位体比, 窒素安定同位体比

信州大学農学部AFC報告, 12, 85-90(2014)

長野県塩尻市における閉鎖牛舎での捕獲ツキノワグマの家畜飼料依存度

中下留美子*1,*2, 林 秀剛*2, 岸元良輔*2,*3, 鈴木彌生子*2,*4, 瀧井暁子*2,*5, 泉山茂之*2,*5

- *1 (独) 森林総合研究所
- *2 信州ツキノワグマ研究会
- *3 長野県環境保全研究所
- *4 (独) 農研機構食品総合研究所
- *5 信州大学農学部

Keywords: Asiatic black bear, cattle feed, conflict, feeding habit, stable isotope
 キーワード: 安定同位体比, 家畜飼料, 食性履歴, ツキノワグマ, 被害

オレオサイエンス, 14(7), 275-282(2014)

核酸塩基部位をもつ両親媒性脂質分子が作る多様なナノ構造

岩浦里愛

(独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: Amphiphiles, Nanostructures, Nucleic Acids, Self-assembly

Chemical Communications, 50 (66), 9295-9297 (2014)

Accumulation of supramolecular nanoparticles self-assembled from a bola-shaped cytidylic acid-appended fluorescein dye in cell nuclei

Rika Iwaura*1, Kaname Yoshida*2, Mayumi Ohnishi-Kameyama*1

- *1 National Food Research Institute, NARO
- *2 Japan Fine Ceramics Center

Keywords: Intracellular delivery, Nanoparticles, Nucleotide, Self-assembly

日本食品工学会誌, 62(1), 41-49(2015)

日本茶の商品情報表示に関する消費者意識の調査と考察

林 宣之*1, 氏原ともみ*2, 岩崎邦彦*3

- *1 (独) 農研機構食品総合研究所
- *2 (独) 農研機構野菜茶業研究所
- *3 静岡県立大学経営情報学部

Keywords: Japanese tea, merchandise information display, Consumer, questionnaire survey, Sensory information
 キーワード: 日本茶, 商品情報表示, 消費者, アンケート調査, 感覚関連情報

Food Chemistry, 174, 163-172 (2015)

A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed L-rhamnitol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins

Satoru Tomita*¹, Tadashi Nemoto*², Yosuke Matsuo*¹, Toshihiko Shoji*³, Fukuyo Tanaka*⁴, Hiroyuki Nakagawa*¹, Hiroshi Ono*¹, Jun Kikuchi*^{5, *6, *7}, Mayumi Ohnishi-Kameyama*¹, Yasuyo Sekiyama*^{1, *7}

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

*³ NARO Institute of Fruit Tree Science

*⁴ NARO Agricultural Research Center

*⁵ RIKEN Center for Sustainable Resource Science

*⁶ Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

*⁷ Graduate School of Bioagricultural Sciences and School of Agricultural Sciences, Nagoya University

Keywords: NMR-based metabolic profiling, Apple, Geographic origin, L-Rhamnitol

日本食品科学工学会誌, 61(11), 548-551 (2014)

微生物技能試験のzスコア計算方法による結果の差異

塚越芳樹

(独) 農研機構食品総合研究所

キーワード: microbiology, proficiency testing, 微生物, 技能試験

Microbes and Environments, 30 (1), 51-62 (2015)

Characterization of leaf blade- and leaf sheath-associated bacterial community and assessment of their responses to environmental changes of CO₂, temperature, and nitrogen levels under field conditions

Seishi Ikeda*¹, Takeshi Tokida*², Hirofumi Nakamura*³, Hidemitsu Sakai*², Yasuhiro Usui*², Takashi Okubo*⁴, Kanako Tago*², Kentaro Hayashi*², Yasuyo Sekiyama*⁵, Hiroshi Ono*⁵, Satoru Tomita*⁵, Masahito Hayatsu*², Toshihiro Hasegawa*² and Kiwamu Minamisawa*⁴

*¹ Memuro Research Station, Hokkaido Agricultural Research Center, NARO

*² National Institute for Agro-Environmental Sciences

*³ Taiyo-Keiki Co., Ltd

*⁴ Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

*⁵ National Food Research Institute, NARO

Keywords: FACE, nitrogen, *Planctomycetes*, rice phyllosphere, temperature

Journal of Near Infrared Spectroscopy, 22 (1), 11-17 (2014)

Feasibility of rapid in vitro estimation of haematocrit in cattle by using short-wavelength near infrared spectroscopy

Akifumi Ikehata*¹, Xuan Luo*¹, Kunio Sashida*², Shanji Park*², Tsutomu Okura*², Yutaka Terada*³

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Soma Optics, LTD

*³ National Institute of Animal Health, NARO

Keywords: haematocrit, cattle blood, short-wavelength near infrared spectroscopy

キーワード: ヘマトクリット, 牛血液, 短波長近赤外分光法

Applied Spectroscopy, 68 (10), 1181-1189 (2014)

Near-infrared (NIR) study of hydrogen bonding of methanol molecules in polar and nonpolar solvents: an approach from concentration-dependent molar absorptivity

Yuho Mikami*¹, Akifumi Ikehata*², Chihiro Hashimoto*³, Yukihiko Ozaki*¹

*¹ School of Science, Kwansai Gakuin University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Niihama National College of Technology

Keywords: Near-infrared, hydrogen bonding, methanol, polar and nonpolar solvents, MCR

キーワード: 近赤外, 水素結合, メタノール, 極性溶媒, 無極性溶媒, MCR

Applied Physics Letters, 106, 011905 (2015)

Surface plasmon sensors on ZnO:Ga layer surfaces: Electric field distributions and absorption-sensitivity enhancements

Hiroaki Matsui*¹, Akifumi Ikehata*², Hitoshi Tabata*¹

*¹ Electrical Engineering and Information Systems, The University of Tokyo

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: Surface plasmon sensor, ZnO:Ga, absorption-sensitivity enhancements

キーワード: 表面プラズモン共鳴センサー, ZnO:Ga, 吸収感度増強

日本防菌防黴学会誌, 42, 55-61 (2014)

食品中の真菌数の迅速測定法の検討

関屋秀一*¹, 濱崎芳活*¹, 内藤成弘*², 高鳥浩介*³

*¹ 味の素

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ NPO 法人カビ相談センター

Keywords: Fungi, Yeast & Mold, Rapid Method, Safety factor, Incubation time

キーワード: 真菌, 酵母・カビ, 短縮法, 安全率, 培養時間

JSM Mycotoxins, 64 (1), 15-21 (2014)

Determination of aflatoxin M1 in powdered formula: an inter-laboratory study and the surveillance in Japan

Hisako SAKUMA*¹, Yoshiko SUGITA-KONISHI*², Toshitsugu TANAKA*³, Toshihiro NAGAYAMA*⁴, Shigehiro NAITO*⁵, Masakazu HORIE*⁶, Eiichi ISHIKURO*⁷, Masahiro NAKAJIMA*⁸, Tomoya YOSHINARI*¹, Hiroshi KAWAKAMI*⁹

*¹ National Institute of Health Sciences

*² Azabu University

*³ Kobe Institute of Health

*⁴ Meiji Pharmaceutical University

*⁵ National Food Research Institute, NARO

*⁶ Otsuma Women's University

*⁷ Japan Scientific Feeds Association

*⁸ Nagoya City Public Health Research Institute

*⁹ Kyoritsu Women's University

Keywords: Aflatoxin M1, Inter-laboratory study, Liquid milk, Powdered formula, Surveillance

キーワード: アフラトキシシン M1, 室間共同試験, 液体ミルク, 粉ミルク, サーベイランス

Journal of AOAC International, 97 (3), 913-920 (2014)

Interlaboratory study of immunochromatography for the rapid determination of cadmium concentrations in cereals and soybeans

Kaoru Abe*¹, Katsuo Nakamura*², Shigehiro Naito*³

*¹ National Institute for Agro-Environmental Sciences

*² Sumika Chemical Analysis Service, Ltd

*³ National Food Research Institute, NARO

Keywords: Cadmium, Cereals, Soybean, Immunochromatography, Interlaboratory study

キーワード：カドミウム、穀類、大豆、イムノクロマトグラフィー、室間共同試験

Food Chemistry, 168, 294-301 (2015)

Effects of polishing, cooking, and storing on total arsenic and arsenic species concentrations in rice cultivated in Japan

Shigehiro Naito*¹, Eri Matsumoto*², Kumiko Shindoh*¹, Tsutomu Nishimura*²

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Japan Food Research Laboratories

Keywords: Rice, Total arsenic, Inorganic arsenic, Polishing, Washing, Cooking, Storage

キーワード：コメ、総ヒ素、無機ヒ素、とう精、洗米、調理、貯蔵

食品総合研究所研究報告, 79, 47-56 (2015)

ひじき粉末中の総ヒ素、カドミウム、鉛及び必須無機元素の2008年度技能試験結果

内藤成弘*¹, 成川知弘*², 安井明美*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² (独) 産総研計量標準総合センター

Keywords: Proficiency testing, Hijiki seaweed, Total arsenic, Cadmium, Lead, Essential inorganic elements

キーワード：技能試験、ひじき、総ヒ素、カドミウム、鉛、必須無機元素

Japanese Journal of Food Chemistry and Safety, 21 (1), 48-56 (2014)

Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice

Yasukata Minegishi*^{1,2}, Junichi Mano*³, Reona Takabatake*³, Kosuke Nakamura*⁴, Kazunari Kondo*⁴, Yasuo Kato*², Kazumi Kitta*³, Hiroshi Akiyama*⁴

*¹ NIPPON GENE, Co., Ltd.

*² Department of Biotechnology, Toyama Prefectural University

*³ National Food Research Institute, NARO

*⁴ National Institute of Health Sciences

Keywords: positive control plasmid, restriction enzyme, contamination, genetically modified, qualitative PCR

Food Chemistry, 168, 606-614 (2014)

Multiplex comparison of the digestibility of allergenic and non-allergenic proteins in rice grains by in vitro digestion

Gang-hua Lang, Yukari Kagiya, Kazumi Kitta

National Food Research Institute, NARO

Keywords: Rice protein, Digestibility, Allergenic protein, Multiplex immunodetection

Food Control, 50, 949-955 (2015)

Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice

Reona Takabatake*¹, Mari Onishi*², Satoshi Futo*², Yasutaka Minegishi*³, Akio Noguchi*⁴, Kosuke Nakamura*⁴, Kazunari Kondo*⁴, Reiko Teshima*⁴, Junichi Mano*¹, Kazumi Kitta*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² FASMAC Co., Ltd.

*³ NIPPON GENE Co., Ltd.

*⁴ National Institute of Health Sciences

Keywords: Rice, Endogenous, Genetically Modified, Detection, PCR

Food Hygiene and Safety Science, 55 (5), 205-209 (2014)

Development and validation of an event-specific quantitative PCR method for genetically modified maize MIR162

Reona Takabatake*¹, Tomoko Masubuchi*¹, Satoshi Futo*², Yasutaka Minegishi*³, Akio Noguchi*⁴, Kazunari Kondo*⁴, Reiko Teshima*⁴, Takeyo Kurashima*¹, Junichi Mano*¹, Kazumi Kitta*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² FASMAC Co., Ltd.

*³ NIPPON GENE Co., Ltd.

*⁴ National Institute of Health Sciences

Keywords: MIR162, event-specific, genetically modified (GM), real-time PCR, maize

Analytical Chemistry, 86 (17), 8621-8627 (2014)

Development of a reference material of a single DNA molecule for the quality control of PCR testing

Junichi Mano*¹, Shuko Hatano*², Satoshi Futo*², Junji Yoshii*³, Hiroki Nakae*³, Shigehiro Naito*¹, Reona Takabatake*¹, Kazumi Kitta*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² FASMAC Co., Ltd.

*³ Japan Micro Array Consortium

Keywords: DNA, Single molecule, Reference material, PCR

European Food Research and Technology, 240 (2), 413-422 (2015)

A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize

Akio Noguchi*¹, Hiroshi Akiyama*¹, Kosuke Nakamura*¹, Kozue Sakata*¹, Yasutaka Minegishi*², Junichi Mano*³, Reona Takabatake*³, Satoshi Futo*⁴, Kazumi Kitta*³, Reiko Teshima*¹, Kazunari Kondo*¹, Tomoko Nishimaki-Mogami*¹

*¹ National Institute of Health Science

*² NIPPON GENE Co., Ltd.

*³ National Food Research Institute, NARO

*⁴ FASMAC Co., Ltd.

Keywords: Genetically modified maize, qPCR, Trait-specific method, Stacked GM maize

食品総合研究所研究報告, 79, 35-39 (2015)

Purification of Dehydrin Protein from Buckwheat Seed (*Fagopyrum esculentum* cv. Kitawase)

Michiko Momma

National Food Research Institute, NARO

Keywords: dehydrin, group2 LEA protein, buckwheat, 16kDa pepsin resistant protein

LWT-Food Science and Technology, 58, 222-229 (2014)

Effect of oxygen absorber on accumulation of free fatty acids in brown rice and whole grain wheat during storage

Wakako Tsuzuki*¹, Yasuhiro Suzuki*², Sumiyo Yamada*¹, Shuuichi Kano*³, Hideo Ohnishi*⁴, Takeshi Fujimoto*⁴, Akira Horigane*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² National Institute of Crop Science, NARO

*³ TAKACHIHO SEIKI CO. LTD.

*⁴ Nihon BUCHI K.K.

Keywords: Brown rice, Whole grain wheat, Lipid degradation, Oxygen absorber, Storage

キーワード: 玄米, 小麦全粒粉, 脂質劣化, 脱酸素剤, 貯蔵

北陸作物学会報, (49), 62-64 (2014)

低タンパク質含有率の硬質小麦を用いたごはんパンにおける低アミロース・糯水稻品種の製パン適性について

細井 淳*¹, 相澤淳平*², 奥西智哉*³

*¹ 長野県農業試験場

*² 長野県工業技術総合センター

*³ (独) 農研機構食品総合研究所

キーワード: 硬質小麦, ごはんパン, 低アミロース, 製パン

育種学研究, 16(4), 139-146 (2014)

日本のイネ主要品種におけるmPing挿入多型

岸根雅宏, 奥西智哉

(独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: mPing, transposon, cultivar identification, rice

Bioresource Technology, 172, 413-417 (2014)

Candida utilis assimilates oligomeric sugars in rice straw hydrolysate via the Calcium-Capturing-by-Carbonation (CaCCO) process for glutathione- and cell-biomass production

Yoshiyuki Koyama, Rui Zhao, Masakazu Ike, Ken Tokuyasu

National Food Research Institute, NARO

Keywords: *Candida utilis*, Rice straw, Cell biomass, Glutathione, Oligosaccharides

食品総合研究所研究報告, 79, 9-17(2014)

Effect of sorghum flour on glutathione-rice bread

Hiroyuki Yano, Akiko Fukui

National Food Research Institute, NARO

Keywords: Bread, Glutathione, Gluten-free, Rice bread, Sorghum

Journal of Lipid Research, 56 (2), 449-462 (2015)

A 3-hydroxy β -end group in xanthophylls is preferentially oxidized to a 3-oxo ϵ -end group in mammals.

Akihiko Nagao^{*1}, Takashi Maoka^{*2}, Hiroshi Ono^{*1}, Eiichi Kotake-Nara^{*1}, Miyuki Kobayashi^{*1}, Mie Tomita^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Research Institute for Production and Development

Keywords: keto-carotenoid, liver, mouse, oxidation, metabolism

Separation Science and Technology, 49 (15), 2289-2302 (2014)

Effect of pH condition on the retention of oleuropein in aqueous solution by nanofiltration membrane

Ilyes Dammak^{*1}, Marcos A. Neves^{*1}, Hiroshi Nabetani^{*2}, Hiroko Isoda^{*2}, Sami Sayadi^{*3}, Mitsutoshi Nakajima^{*1, *2}

^{*1} Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} Environmental Bioprocess Laboratory, Center of Biotechnology of Sfax

Keywords: mass transport, nanofiltration, oleuropein, pH effect, rejection
 キーワード：物質移動, ナノろ過, オレウロペイン, pH効果, 阻止

Food Science and Technology Research, 20 (2), 485-491 (2014)

A Mixture of Histidine-Dipeptides, Vitamin C, and Ferulic Acid Reduces Comet Assay Scores in Normal Middle-Aged Men.

Nobuya Yanai^{*1, *3}, Tomoyuki niitsuma^{*2}, Shigenobu shiotani^{*3}, Shoji Hagiwara^{*1}, Hiroshi nabetani^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Third Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tokyo Medical University

^{*3} Research Division, Tokai Bussan Co., Ltd.

Keywords: histidine-dipeptides, vitamin C, ferulic acid, antioxidant combination, comet assay, reactive oxygen species (ROS)
 キーワード：ヒスチジン-ジペプチド, ビタミンC, フェルラ酸, 抗酸化物質の組合せ, コメット・アッセイ, 活性酸素

Food and Bioproducts Processing, 94, 342-353 (2015)

Transport properties of oleuropein through nanofiltration membranes

Ilyes Dammak^{*1}, Marcos A. Neves^{*1}, Hiroshi Nabetani^{*2}, Sami Sayadi^{*3}, Mitsutoshi Nakajima^{*1, *2}

^{*1} Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} Environmental Bioprocess Laboratory, Center of Biotechnology of Sfax

Keywords: Nanofiltration, Concentration polarization, Osmotic pressure, Oleuropein, Flux decline
 キーワード：ナノろ過, 濃度分極, 浸透圧, オレウロペイン, 流束低下

Procedia Chemistry, 9, 182-193 (2014)

Reactivity of palm fatty acids for the non-catalytic esterification in a bubble column reactor at atmospheric pressure

Joelianingsih*¹, Armansyah H Tambunan*², Hiroshi Nabetani*³

*¹ Chemical Engineering Study Program, Institut Teknologi Indonesia

*² Graduate School, Agricultural Engineering Science, Bogor Agricultural University

*³ National Food Research Institute, NARO

Keywords: Fatty acids, methyl esterification, biodiesel, non-catalytic, superheated methanol

キーワード：脂肪酸, メチルエステル化, バイオディーゼル, 無触媒, 過熱メタノール

食品総合研究所研究報告, 79, 57-66 (2015)

食品害虫サイト用に開発したアクセス解析プログラムとそのツール化

曲山幸生, 七里与子, 宮ノ下明大, 今村太郎, 古井 聡, 和田有史, 増田知尋

(独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: Access Analysis, Food-Insect Site, Radiation-Influence Site, Access Behavior, Website Operation

キーワード：アクセス解析, 食品害虫サイト, 放射線影響サイト, アクセス行動, ウェブサイト運営

日本食品工学会誌, 15(1), 25-35 (2014)

水蒸気-水二相バイングによる流動層造粒における加水量削減技術の開発

五月女 格*¹, 井上孝司*², 片桐孝夫*², 竹内博一*³, 津田升子*¹, 岡留博司*¹, 五十部誠一郎*⁴

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² ポッカサッポロフード&ビバレッジ株式会社中央研究所

*³ ポッカサッポロフード&ビバレッジ株式会社

*⁴ 日本大学生産工学部

Keywords: agglomeration, droplets evaporation, gas-liquid two-phase flow, water soluble powder

Cereal Chemistry, 91 (5), 419-424 (2014)

Variation in firmness of whole beans, embryos, and testas of cooked soybean (Glycine max) cultivars

Takeshi Yasui*¹, Tomoko Sasaki*², Kaoru Kohyama*², Makita Hajika*¹

*¹ Institute of Crop Science, NARO

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: Soybean, Firmness, Embryo, Testa

Starch, 67 (5-6), 415-423 (2015)

In vitro starch digestibility and in vivo glucose response of gelatinized potato starch in the presence of non-starch polysaccharides

Tomoko Sasaki, Itaru Sotome, Hiroshi Okadome

National Food Research Institute, NARO

Keywords: Potato starch, Starch digestibility, Non-starch polysaccharides, Viscosity, Glucose response

日本食品科学工学会誌, 61(3), 127-133(2014)

高アミロース米の機械的攪拌ゲル化処理を利用した米麺加工法の開発

松山信悟*2, 柴田真理朗*1, 杉山純一*1, 藤田かおり*1, 葛 瑞樹*1, 吉村正俊*1, 粉川美踏*2, 平野由香里*2, 荒木徹也*2, 鍋谷浩志*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 東京大学

Keywords: 高アミロース米, ゲル化, 米麺, 動的粘弾性, 破断試験

農業情報研究, 23(2), 49-58(2014)

光学的手法に基づく「もち米」の胴割れ検知に関する基礎的研究

吉村正俊*1, 葛 瑞樹*1, 杉山純一*1, 笠井 康*2, 粉川美踏*3, 藤田かおり*1, 柴田真理朗*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 ケット科学研究所

*3 東京大学

Keywords: もち米, 玄米, 胴割, 拡散反射, 分光イメージング, 品質評価

日本食品工学会誌, 15(3), 157-164(2014)

フローサイトメトリーと多変量解析による緑茶飲料中の大腸菌数推定

葛 瑞樹*1, 佐々木康彦*2, 竹内郁雄*2, 中本英樹*2, 石川 淳*2, 川崎 晋*1, 杉山純一*1, 藤田かおり*1, 吉村正俊*1, 柴田真理朗*1, 粉川美踏*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 (株) 日立パワーソリューションズ

Keywords: Chemometrics, Patial Least Squares Regression, Escherichia coli, Culture method

Postharvest Biology and Technology, 91, 39-48 (2014)

Spatially resolved diffuse reflectance in the visible and near-infrared wavelength range for non-destructive quality assessment of 'Braeburn' apples

Nghia Nguyen Do Trong*2, Chyngyz Erkinbaev*2, Mizuki Tsuta*1, Josse De Baerdemaeker*2, Bart Nicolai*2, Wouter Saeys*2

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Katholieke Universiteit Leuven

Keywords: SRS, NIR, Fruit, Structure

Innovative Food Science & Emerging Technologies, 21, 160-168 (2014)

Optical properties-microstructure-texture relationships of dried apple slices: Spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy as a novel technique for analysis and process control

Nghia Nguyen Do Trong*2, Anna Rizzolo*3, Els Herrernans*2, Maristella Vanoli*3, Giovanna Cortellino*3, Chyngyz Erkinbaev*2, Mizuki Tsuta*1, Lorenzo Spinelli*4, Davide Contini*5, Alessandro Torricelli*5, Pieter Verboven*2, Josse De Baerdemaeker*2, Bart Nicolai*2, Wouter Saeys*2

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Katholieke Universiteit Leuven

*3 CRA-IAA

*4 Istituto di Fotonica e Nanotecnologie

*5 Politecnico di Milano

Keywords: SRS, Fruit, Structure, Texture

Food and Bioprocess Technology, DOI 10.1007/s11947-014-1410-y (2014)

Visualization of Gluten, Starch, and Butter in Pie Pastry by Fluorescence Fingerprint Imaging

Mito Kokawa*^{1, *2}, Naoto Yokoya*³, Hiroko Ashida*⁴, Junichi Sugiyama*¹, Mizuki Tsuta*¹, Masatoshi Yoshimura*^{1, *2}, Kaori Fujita*¹, Mario Shibata*^{1, *2}

*¹ National Food Research Institute, NARO
 *² Japan Society for the Promotion of Science
 *³ The University of Tokyo
 *⁴ Fuji Oil Co., Ltd

Keywords: Gluten, Starch, Butter, Imaging, Fluorescence, Fingerprint

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 79 (4), 652-657 (2015)

Method of determining the optimal dilution ratio for fluorescence fingerprint of food constituents

Vipavee Trivittayasil, Mizuki Tsuta, Mito Kokawa, Masatoshi Yoshimura, Junichi Sugiyama, Kaori Fujita, Mario Shibata

National Food Research Institute, NARO

Keywords: Excitation-emission matrix, Principal component analysis, Concentration multivariate analysis

Food and Bioprocess Technology, 7 (12), 3455-3465 (2014)

Nondestructive hygiene monitoring on pork meat surface using excitation-emission matrices with two-dimensional savitzky-golay second-order differentiation

Hiroaki Shirai*², Seiichi Oshita*², Yoshio Makino*², Junichi Sugiyama*¹, Masatoshi Yoshimura*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO
 *² University of Tokyo

Keywords: Nondestructive detection, Fluorescence spectroscopy, NAD(P)H, PLSR, Second derivative

Foodborne Pathogens and Disease, 11 (4), 332-334 (2014)

Large-scale gaseous acetic acid treatment to disinfect alfalfa seeds inoculated with *Escherichia coli*

Daisuke Nei*¹, Katsuyoshi Enomoto*², Kazutaka Yamamoto*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO
 *² Daisey Machinery Co. Ltd.

Keywords: *Escherichia coli*, acetic acid, sprout, alfalfa seeds

Postharvest Biology and Technology, 96, 118-127 (2014)

Modeling of the respiration rate and gene expression patterns of cabbage in response to mechanical impact stress using a modified Weibull distribution

Manasikan Thammawong*¹, Takahiro Orihara*², Hitomi Umehara*¹, Ilmi Ganga Namali Hewajulige*³, Tomoko Kaneta*⁴, Nobutaka Nakamura*¹, Yasuhiro Ito*¹, Kohei Nakano*⁵, Takeo Shiina*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO
 *² Faculty of Agriculture, Iwate University
 *³ Industrial Technology Institute
 *⁴ Tokushima Prefectural Agriculture, Forestry, and Fisheries Technology Support Center
 *⁵ Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University

Keywords: Cabbage, Gene expression, Postharvest mechanical stress, Weibull distribution model

Journal of Food Protection, 78 (1), 104-110 (2015)

Comparison of Desiccation Tolerance among *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Cronobacter sakazakii* in Powdered Infant Formula

Shigenobu Koseki*¹, Nobutaka Nakamura*², Takeo Shiina*²

*¹ Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Cronobacter sakazakii*, Powdered Infant

日本水産学会誌, 81(1), 97-106(2015)

魚醤油発酵時のヒスタミン蓄積に関わる原因菌の同定および乳酸菌発酵スターター接種によるヒスタミン蓄積抑制効果について

木村メイコ*¹, 舊谷亜由美*¹, 福井洋平*¹, 柴田由起*², 根井大介*³, 矢野 豊*⁴, 里見正隆*¹

*¹ (独) 水産総合研究センター中央水産研究所

*² プレッシングフェバー株式会社

*³ (独) 農研機構食品総合研究所

*⁴ (独) 水産総合研究センター北海道区水産研究所

キーワード: ヒスタミン, 魚醤油, 乳酸菌

日本包装学会誌, 23(4), 277-285(2014)

蓄積疲労を考慮した青果物のための新たな損傷予測理論の構築 (第2報)
—多段積み包装されたイチゴ果実の損傷発生に及ぼす繰り返し衝撃の影響—

北澤裕明*^{1, 2}, 斎藤勝彦*²

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 神戸大学大学院海事科学研究科

Keywords: peak acceleration, repetitive shock, stacked packaging, velocity change

キーワード: ピーク加速度, 繰り返し衝撃, 多段積み包装, 速度変化

Journal of Food, Agriculture & Environment, 12 (3-4), 46-50 (2014)

Improving the layout of ventilation ports in packaging for fresh produce using computational fluid dynamics

Hiroaki Kitazawa, Naoko Hasegawa

National Food Research Institute, NARO

Keywords: Computational fluid dynamics (CFD), fresh produce, packaging, ventilation port

キーワード: 数値流体力学 (CFD), 青果物, 包装, 通気孔

Scientia Horticulturae, 178 (*), 211-216 (2014)

Changing oxygen concentration around the rootstock alters spear elongation and sprouting of white asparagus

Hiroaki Kitazawa*¹, Naoko Hasegawa*¹, Machiko Fukuda*², Shin-ichi Watanabe*³, Atsushi Yamasaki*⁴, Atsuko Urugami*²

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² NARO Institute of Vegetable and Tea Science

*³ NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center

*⁴ NARO Tohoku Agricultural Research Center

Keywords: *Asparagus officinalis* L., controlled atmosphere, growth regulation, O₂ concentration, spear elongation

キーワード: アスパラガス, ガス環境制御, 成長調節, 酸素濃度, 若茎伸長

Food & Functions, 5 (8), 1839-1847 (2014)

PIV and CFD studies on analyzing intragastric flow phenomena induced by peristalsis using a human gastric flow simulator

Hiroyuki Koza^{*1, *3}, Isao Kobayashi^{*1}, Marcos A. Neves^{*1-^{*3}}, Mitsutoshi Nakajima^{*1-^{*3}}, Kunihiko Uemura^{*1}, Sosaku Ichikawa^{*1, *3}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Alliance for Research on North Africa, University of Tsukuba

^{*3} Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Keywords: PIV, CFD, Gastric peristalsis, Intragastric flow

キーワード：粒子画像流速測定法, 数値流体力学, 胃ぜん動運動, 胃内流動

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 466, 66-74 (2014)

Stability of monodisperse clove oil droplets prepared by microchannel emulsification

Nanik Purwanti^{*1, *2}, Marcos A. Neves^{*1, *3}, Kunihiko Uemura^{*1}, Mitsutoshi Nakajima^{*1, *3}, Isao Kobayashi^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Department of Mechanical and Biosystem Engineering, Bogor Agricultural University

^{*3} Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Keywords: Clove oil, Stability, Oil-in-water emulsion, Microchannel emulsification

キーワード：丁香油, 安定性, 水中油滴エマルション, マイクロチャネル乳化

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 458, 69-77 (2014)

Monodisperse W/O/W emulsions encapsulating L-ascorbic acid: Insights on their formulation using microchannel emulsification and stability studies

Nauman Khalid^{*1, *2}, Isao Kobayashi^{*1}, Marcos A. Neves^{*1, *3}, Kunihiko Uemura^{*1}, Mitsutoshi Nakajima^{*1, *3}, Hiroshi Nabetani^{*1, *2}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

^{*3} Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Keywords: Microchannel emulsification, Water-in-oil-in-water emulsions, Monodisperse droplets, L-ascorbic acid, Emulsifier concentration

キーワード：マイクロチャネル乳化, W/O/W エマルション, 単分散微小液滴, L-アスコルビン酸, 乳化剤濃度

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 459 (5), 247-253 (2014)

Formulation of monodisperse water-in-oil emulsions encapsulating calcium ascorbate and ascorbic acid 2-glucoside by microchannel emulsification

Nauman Khalid^{*1, *2}, Isao Kobayashi^{*1}, Marcos A. Neves^{*1, *3}, Kunihiko Uemura^{*1}, Mitsutoshi Nakajima^{*1, *3}, Hiroshi Nabetani^{*1, *2}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

^{*3} Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Keywords: Microchannel emulsification, Calcium ascorbate, Ascorbic acid 2-glycoside, Monodisperse W/O emulsions, Droplet productivity

キーワード：マイクロチャネル乳化, アスコルビン酸カルシウム, アスコルビン酸2-グリコシド, 単分散W/Oエマルション, 液滴生産性

Food Research International, 62, 467-475 (2014)

Interfacial characteristics and microchannel emulsification of oleuropein-containing triglyceride oil-water systems

Safa Souilem^{*1,*4}, Isao Kobayashi^{*2,*3}, Marcos A. Neves^{*1,*3}, Logna Jlaiel^{*4}, Hiroko Isoda^{*1,*3}, Sami Sayadi^{*4}, Mitsutoshi Nakajima^{*1,*3}

*1 Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

*2 Alliance for Research on North Africa, University of Tsukuba

*3 National Food Research Institute, NARO

*4 Center of Biotechnology of Sfax, Tunisia

Keywords: Olive leaf extract, Interfacial activity, Gibbs adsorption equation, Triglyceride oil-in-water emulsion, Microchannel emulsification

キーワード：オリーブ葉抽出物，界面活性，ギブス吸着式，水中トリグリセリド油エマルション，マイクロチャンネル乳化

Food Science and Technology Research, 21, 7-11 (2015)

Rapid inactivation of pectin methylesterase in tomato juice by high electric field alternating current

Kunihiko Uemura, Chieko Takahashi, Isao Kobayashi

National Food Research Institute, NARO

Keywords: inactivation, pectin methylesterase, tomato, high electric field alternating current

キーワード：失活，ペクチンメチルエステラーゼ，トマト，交流高電界

Food Research International, 71, 16-22 (2015)

Direct observation and evaluation of cooked white and brown rice digestion by gastric digestion simulator provided with peristaltic function

Zheng Wang^{*1,*2}, Sosaku Ichikawa^{*1,*3}, Hiroyuki Koza^{*1,*3}, Marcos A. Neves^{*1,*3}, Mitsutoshi Nakajima^{*1,*3}, Kunihiko Uemura^{*1}, Isao Kobayashi^{*1}

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Alliance for Research on North Africa, University of Tsukuba

*3 Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Keywords: Cooked white rice, Cooked brown rice, Gastric digestion simulator, Rice disintegration, Direct observation

キーワード：炊飯白米，炊飯玄米，胃消化シミュレーター，米飯粒子微細化，直接観察

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 78 (12), 2120-2127 (2014)

Xylan-mediated aggregation of *Lactobacillus brevis* and its relationship with the surface properties and mucin-mediated aggregation of the bacteria

Katsuichi Saito^{*1}, Toshihide Nakamura^{*1}, Isao Kobayashi^{*1}, Mayumi Ohnishi-Kameyama^{*1}, Hitomi Ichinose^{*1,*2}, Keitarou Kimura^{*1}, Kazumi Funane^{*1}

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University

Keywords: *Lactobacillus brevis*, aggregation, surface layer protein, xylan, mucin

キーワード：乳酸菌，凝集，細胞表層タンパク質，キシラン，ムチン

AMB Express, 4, 67 (2014)

Identification of a gene, *FMP21*, whose expression levels are involved in thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*

Toshihide Nakamura*¹, Mami Yamamoto*¹, Katsuichi Saito*¹, Akira Ando*², Jun Shima*³

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² NARO Institute of Vegetable and Tea Science

*³ Ryukoku University

Keywords: Thermotolerance, Yeast, Gene expression, Growth rate, *FMP21*

キーワード：高温耐性, 酵母, 遺伝子発現, 生育速度, *FMP21*

Bulletin of Insectology, 67 (1), 131-136 (2014)

Identification of Vietnamese *Coptotermes* pest species based on the sequencing of two regions of 16S rRNA gene

Thi-Thao Nguyen*¹, Thi-Huyen Do*², Thu-Huong Duong*², Quynh-Giang Le*², Trong-Khoa Dao*², Thi-Trung Nguyen*², Thi-Quy Nguyen*², Thi-Thu-Hien Nguyen*³, Keitarou Kimura*⁴, Nam-Hai Truong*²

*¹ Vinh University

*² IBT, Vietnam Academy of Science and Technology

*³ Institute of Ecology and Work Protection, Vietnam

*⁴ National Food Research Institute, NARO

Keywords: *Coptotermes gestroi*, *Coptotermes formosanus*, taxonomy, mtDNA 16S rRNA

Journal of Bioscience and Bioengineering, 118 (6), 665-671 (2014)

Mining biomass-degrading genes through Illumina-based de novo sequencing and metagenomic analysis of free-living bacteria in the gut of the lower termite *Coptotermes gestroi* harvested in Vietnam

Thi Huyen Do*¹, Thi Thao Nguyen*², Thanh Ngoc Nguyen*¹, Quynh Giang Le*¹, Cuong Nguyen*¹, Keitarou Kimura*³, Nam Hai Truong*¹

*¹ IBT, Vietnam Academy of Science and Technology,

*² Vinh University

*³ National Food Research Institute, NARO

Keywords: Free-living gut bacterial community, *Coptotermes gestroi*, Cellulase, Hemicellulase, Illumina de novo sequencing, Pectinesterase, Metagenome

Food Science and Technology Research, 20 (6), 1183-1189 (2014)

Removal of radioactive cesium (¹³⁴Cs plus ¹³⁷Cs) from low-level contaminated water by charcoal and broiler litter biochar

Keitarou Kimura*¹, Mayumi Hachinohe*¹, K. Thomas Klasson*², Shioka Hamamatsu*¹, Shoji Hagiwara*¹, Setsuko Todoriki*¹, Shinichi Kawamoto*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service

Keywords: radioactive cesium, adsorption, charcoal, biochar, pH dependency

キーワード：放射性セシウム, 吸着, 活性炭, バイオチャー, pH依存性

Biochemical Journal, 467 (2), 259-270 (2015)

Molecular engineering of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Bacillus circulans* T-3040: structural determinants for the reaction product size and reactivity

Ryuichiro Suzuki*^{1, *2}, Nobuhiro Suzuki*^{3, *4}, Zui Fujimoto*³, Mitsuru Momma*³, Keitarou Kimura*¹, Shinichi Kitamura*⁵, Atsuo Kimura*⁶, Kazumi Funane*¹

*¹ Applied Microbiology Division, National Food Research Institute, NARO

*² Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

*³ Biomolecular Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences

*⁴ Structural Biology Research Center, Photon Factory, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization (KEK)

*⁵ College of Life, Environment, and Advanced Sciences, Osaka Prefecture University

*⁶ Division of Applied Bioscience, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University

Keywords: family 35 carbohydrate-binding module, cycloisomaltooligosaccharide, cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase, subsite engineering

キーワード: 糖結合モジュールファミリー35, 環状イソマルトメガロ糖, 環状イソマルトオリゴ糖, 環状イソマルトオリゴ糖 グルカノトランスフェラーゼ, サブサイト工学

Fungal Genetics and Biology, 73, 138-149 (2014)

The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*

Daisuke Hagiwara*¹, Satoshi Suzuki*², Katsuhiko Kamei*¹, Tohru Gonoï*¹, Susumu Kawamoto*¹

*¹ Medical Mycology Research Center, Chiba Univ.

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, AtfA, Conidia, MAPK, Trehalose

キーワード: アスペルギルスフミガタス, AtfA, 分生子, MAPカインース, トレハロース

食品総合研究所研究報告, 79, 1-7 (2015)

Convenient preparation of fungal genomic DNA templates for polymerase chain reaction and temporal temperature gradient gel electrophoresis analyses of fungal diversity in the Japanese fermented soybean paste miso (味噌からの簡便迅速な真菌ゲノムDNAの抽出法により調整された鋳型DNAを用いたPCR産物の時間温度勾配電気泳動法による味噌中の真菌叢の解析)

鈴木 聡*¹, 柏木 豊*², 楠本憲一*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 東京農大

Keywords: FTA® card, traditional Japanese fermented food miso, PCR-TTGE, fungal diversity

キーワード: FTAカード, 味噌, PCR-TTGE, 真菌多様性

Food Science and Technology Research, 20 (2), 367-374 (2014)

Characterization of acid phosphatase (AphC) from miso koji mold, *Aspergillus oryzae* KBN630, AphC is mainly responsible for both acid phosphatase activity and 5'-IMP dephosphorylation activity in soybean-koji culture

Shoko Yoshino-yasuda*¹, Emi Nakamura*¹, Natsuko Ono*¹, Osamu Hasegawa*¹, Yoshimi Iga*², Yohei Shiraishi*², Yutaka Wagu*², Kazuhiro Sugimoto*³, Tohru Suzuki*⁴, Tatsuya Sugimoto*⁵, Ken-Ichi Kusumoto*⁶, Masashi Kato*⁷ and Noriyuki Kitamoto*¹

*¹ Food Research Center, Aichi Center for Industry and Science Technology

*² Bio'c,

*³ Technical Center of Nagoya University

*⁴ The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University

*⁵ Nakamo

*⁶ National Food Research Institute, NARO

*⁷ Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Meijo University

Keywords: acid phosphatase gene, *Aspergillus oryzae*, 5'-IMP dephosphorylation, miso, soybean-koji culture

Journal of Bioscience and Bioengineering, 119 (1), 43-46 (2015)

Telomere-mediated chromosomal truncation in *Aspergillus oryzae*.

Sawaki Tada*¹, Hikaru Ohkuchi*¹, Mayumi Matsushita-Morita*¹, Ikuyo Furukawa*¹, Ryota Hattori*¹, Satoshi Suzuki*¹, Yutaka Kashiwagi*² and Ken-Ichi Kusumoto*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Department of Fermentation Science, Tokyo University of Agriculture

Keywords: *Aspergillus oryzae*, Filamentous fungi, Chromosomal truncation, Aflatoxin, Telomere position effect

Fishery Science, 80 (5), 1109-1115 (2014)

Culture-independent analysis of the bacterial community during fermentation of pa-som, a traditional fermented fish product in Laos

Junichiro Marui*¹, Sayvisene Boulom*², Wanchai Panthavee*³, Mari Momma*¹, Ken-Ichi Kusumoto*⁴, Kazuhiko Nakahara*¹, Masayoshi Saito*¹

*¹ Japan International Research Center for Agricultural Sciences

*² Faculty of Agriculture, National University of Laos,

*³ Institute of Food Research and Product Development

*⁴ National Food Research Institute, NARO

Keywords: Pa-som, Fermented fish product, PCR denaturing gel gradient electrophoresis, Lactic acid bacteria

JSM Microbiology, 2 (2), 1012 (2014)

Influence of Agmatine Supplemented Culture Medium on Metabolic Products and Gene Expression in *Fusarium asiaticum*.

Tadahiro Suzuki, Hifumi Yoshioka, Yumiko Iwahashi

National Food Research Institute, NARO

Keywords: *Fusarium*, Mycotoxine, Deoxynivalenol

Toxins (Basel), 7, 187-200 (2015)

Low Toxicity of Deoxynivalenol-3-Glucoside in Microbial Cells

Tadahiro Suzuki, Yumiko Iwahashi

National Food Research Institute, NARO

Keywords: deoxynivalenol-3-glucoside, DNA microarray, yeast, *Chlamydomonas reinhardtii*

PLoS One, 9 (3), e92353 (2014)

1, 2- β -Oligoglucan phosphorylase from *Listeria innocua*

Masahiro Nakajima*^{1, 2}, Hiroyuki Toyozumi*¹, Koichi Abe*¹, Hiroyuki Nakai*³, Hayao Taguchi*¹, Motomitsu Kitaoka*²

*¹ Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Graduate School of Science & Technology, Niigata University

Keywords: 1, 2- β -oligoglucan phosphorylase, 1, 2- β -glucan, *Listeria innocua*, glycoside hydrolase family 94

Journal of Applied Glycoscience, 61 (2), 59-66 (2014)

Characterization of two phosphorylases for α -1, 3-oligoglucans from *Clostridium phytofermentans*

Takanori Nihira*^{1, *2}, Mamoru Nishimoto*¹, Hiroyuki Nakai*², Ken'ichi Ohtsubo*², Motomitsu Kitaoka*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Graduate School of Science & Technology, Niigata University

Keywords: α -1, 3-oligoglucan phosphorylase, α -1, 3-oligoglucan, nigerose phosphorylase, glycoside hydrolase family 65, *Clostridium phytofermentans*

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 78 (2), 263-270 (2014)

Characterization of a thermophilic 4-*O*- β -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase from *Rhodothermus marinus*

Nongluck Jaito*¹, Wataru Saburi*¹, Rei Odaka*¹, Yusuke Kido*¹, Ken Hamura*¹, Mamoru Nishimoto*², Motomitsu Kitaoka*², Hirokazu Matsui*¹, Haruhide Mori*¹

*¹ Faculty of Agriculture, Hokkaido University

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: *Rhodothermus marinus*, 4-*O*- β -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase, mannan, substrate specificity, phosphorolysis

The Journal of Biological Chemistry, 289 (26), 18067-18075 (2014)

Structural basis for reversible phosphorolysis and hydrolysis reactions of 2-*O*- α -glucosylglycerol phosphorylase

Kouki K. Touhara*¹, Takanori Nihira*², Motomitsu Kitaoka*³, Hiroyuki Nakai*², Shinya Fushinobu*¹

*¹ Department of Biotechnology, University of Tokyo

*² Faculty of Agriculture, Niigata University

*³ National Food Research Institute, NARO

Keywords: glycoside hydrolase, phosphorylase, X-ray crystallography, *Bacillus selenitireducens*, glucosylglycerol

Journal of Applied Glycoscience, 61 (3), 75-80 (2014)

One pot enzymatic production of nigerose from common sugar resources by employing nigerose phosphorylase

Takanori Nihira*¹, Futaba Miyajima*², Kazuhiro Chiku*², Mamoru Nishimoto*³, Motomitsu Kitaoka*³, Ken'ichi Ohtsubo*^{1, *2}, Hiroyuki Nakai*^{1, *2}

*¹ Graduate School of Science & Technology, Niigata University

*² Faculty of Agriculture, Niigata University

*³ National Food Research Institute, NARO

Keywords: nigerose, maltose, sucrose, soluble starch, nigerose phosphorylase

Molecular Microbiology, 94 (5), 1024-1040 (2014)

A β 1-6/ β 1-3 galactosidase from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 gives insight into sub-specificities of β -galactoside catabolism within *Bifidobacterium*

Alexander H. Viborg*¹, Folmer Fredslund*¹, Takane Katayama*², Stinne K. Nielsen*³, Birte Svensson*¹, Motomitsu Kitaoka*⁴, Leila Lo Leggio*³, Maher Abou Hachem*¹

*¹ Department of Systems Biology, Technical University of Denmark

*² Ishikawa Prefectural University

*³ Department of Chemistry, University of Copenhagen

*⁴ National Food Research Institute, NARO

Keywords: β -galactosidase, glycoside hydrolase, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, substrate specificity, galactooligosaccharides

Carbohydrate Research, 401, 1-4 (2015)

Facile enzymatic synthesis of sugar 1-phosphates as substrates for phosphorylases using anomeric kinases

Yuan Liu, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka

National Food Research Institute, NARO

Keywords: sugar 1-phosphate, anomeric kinase, pyruvate kinase, electro dialysis, substrate for phosphorylase

PLoS One, 9 (12), e114882 (2014)

Discovery of two β -1, 2-mannoside phosphorylases showing different chain length specificity from *Thermoanaerobacter* sp. X-514A

Kazuhiro Chiku^{*1}, Takanori Nihira^{*1}, Erika Suzuki^{*1}, Mamoru Nishimoto^{*2}, Motomitsu Kitaoka^{*2}, Ken'ichi Ohtsubo^{*1}, Hiroyuki Nakai^{*1}

^{*1} Faculty of Agriculture, Niigata University

^{*2} National Food Research Institute, NARO

Keywords: β -1, 2-mannoside phosphorylase, *Thermoanaerobacter*, β -1, 2-mannan, glycoside hydrolase family 130

Journal of Applied Glycoscience, 62 (2), 47-52 (2015)

Large-scale preparation of 1, 2- β -glucan using 1, 2- β -oligoglucan phosphorylase

Koichi Abe^{*1}, Masahiro Nakajima^{*1}, Motomitsu Kitaoka^{*2}, Hiroyuki Toyozumi^{*1}, Yuta Takahashi^{*1}, Naohisa Sugimoto^{*3}, Hiroyuki Nakai^{*3}, Hayao Taguchi^{*1}

^{*1} Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} Graduate School of Science & Technology, Niigata University

Keywords: 1, 2- β -glucan, 1, 2- β -oligoglucan phosphorylase, sucrose phosphorylase, glycoside hydrolase family 94

Biochimica et Biophysica Acta, 1854 (5), 333-340 (2015)

Open-close motion on ligand binding and two magnesium ions required for the catalysis of *N*-acetylhexosamine 1-kinase

Mayo Sato^{*1}, Takatoshi Arakawa^{*1}, Young-Woo Nam^{*1}, Mamoru Nishimoto^{*2}, Motomitsu Kitaoka^{*2}, Shinya Fushinobu^{*1}

^{*1} Department of Biotechnology, University of Tokyo

^{*2} National Food Research Institute, NARO

Keywords: crystal structure, anomeric sugar kinase, conformational change, magnesium ion, *Bifidobacterium longum*

Journal of Carbohydrate Chemistry, 33, 117-136 (2014)

Synthesis of glycopyranosyl- (1 \rightarrow 2)-*N*-acetylneuraminic acid nonreducing disaccharides and their evaluation as neuraminidase substrates

Shiro Komba, Sachiko Machida

National Food Research Institute, NARO

Keywords: Nonreducing sugar, Sialic acid, Galactose, Glucose, Neuraminidase

食品総合研究所研究報告, 79, 67-76 (2015)

宿主株が異なる *Saccharomyces cerevisiae* 組換え体におけるキシロース発酵能の比較

榊原祥清, 王曉輝, 徳安健

(独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Xylose fermentation, Xylulose fermentation
 キーワード: バイオエタノール, サッカロミセス・セレビジエ, キシロース発酵, キシルロース発酵

International Journal of Biochemistry Research & Review, 4 (4), 284-294 (2014)

Lectin-like Oxidized LDL receptor 1 Mediates the uptake of the C-terminal domain of Hsp70 (A promising Immune adjuvant molecule) and antigen peptide complexes.

M. K. Kuramochi*¹, S. Kajiwara*², T. Minowa*², S. Machida*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Nanotechnology Innovation Station, National Institute for Materials Science

Keywords: C-terminal domain of Hsp70 (C70), lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1), antigen peptides, immune adjuvant

Journal of Bacteriology 196 (8), 1514-1524, (2014)

The *mthA* mutation conferring low-level resistance to streptomycin enhances antibiotic production in *Bacillus subtilis* by increasing the s-adenosylmethionine pool size

Shigeo Tojo*¹, Ji-Yun Kim*², Yukinori Tanaka*¹, Takashi Inaoka*², Yoshikazu Hiraga*¹, Kozo Ochi*¹

*¹ Hiroshima Institute of Technology

*² National Food Research Institute, NARO

Keywords: streptomycin resistance mutation, antibiotic production, s-adenosylmethionine, *Bacillus subtilis*

Microbiology 160, 2474-2480, (2014)

Tetracycline tolerance mediated by gene amplification in *Bacillus subtilis*

Wannasiri Wannarat*^{1, 2}, Shiori Motoyama*¹, Kenta Masuda*³, Fujio Kawamura*³, Takashi Inaoka*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Production Improvement Institute (KAPI), Kasetsart University

*³ Rikkyo University

Keywords: gene amplification, tetracycline, *Bacillus subtilis*

The Journal of Antibiotics, 68 (7), 481-483 (2015)

Structure and biosynthetic implication of 5R-(N-acetyl-L-cysteiny)-14S-hydroxy-dihydrokalafungin from a mutant of the *actVA*-ORF4 gene for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)

Takaaki Taguchi*¹, Tomoki Maruyama*¹, Ryuichi Sawa*², Masayuki Igarashi*², Susumu Okamoto*³, Koji Ichinose*¹

*¹ Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University

*² Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN)

*³ National Food Research Institute, NARO

Keywords: Actinorhodin, Biosynthesis, Shunt product, Structural analysis

Frontiers in Microbiology, online journal (2014)

Extensive amplification of GI-VII-6, a multidrug resistance genomic island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, increases resistance to extended-spectrum cephalosporins

Ken-ichi Lee^{*1}, Masato Kusumoto^{*1}, Tsuyoshi Sekizuka^{*2}, Makoto Kuroda^{*2}, Ikuro Uchida^{*3}, Taketoshi Iwata^{*1}, Susumu Okamoto^{*4}, Kimiko Yabe^{*4}, Takashi Inaoka^{*4}, and Masato Akiba^{*1, *5}

^{*1} National Institute of Animal Health, NARO

^{*2} National Institute of Infectious Diseases

^{*3} Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health, NARO

^{*4} National Food Research Institute, NARO

^{*5} Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

Keywords: gene amplification, multidrug resistance, extended-spectrum cephalosporins, *Salmonella*

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 78 (2), 231-237 (2014)

Tomato FRUITFULL homologs regulate fruit ripening via ethylene biosynthesis

Yoko Shima^{*1}, Masaki Fujisawa^{*1}, Mamiko Kitagawa^{*2}, Toshitsugu Nakano^{*1}, Junji Kimbara^{*2}, Nobutaka Nakamura^{*1}, Takeo Shiina^{*1}, Junichi Sugiyama^{*1}, Toshihide Nakamura^{*1}, Takafumi Kasumi^{*3}, Yasuhiro Ito^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Research Institute, Kagome

^{*3} Department of Chemistry and Lifescience, Nihon University

Keywords: Ripening inhibitor (RIN), MADS-domain protein, FRUITFULL (FUL), ethylene

キーワード：果実成熟，転写因子，MADSボックス転写因子，エチレン

Journal of Experimental Botany, 65 (12), 3111-3119 (2014)

The AP2/ERF transcription factor SIERF52 functions in flower pedicel abscission in tomato

Toshitsugu Nakano, Masaki Fujisawa, Yoko Shima, Yasuhiro Ito

National Food Research Institute, NARO

Keywords: Abscission, abscission zone, cell-wall hydrolytic enzyme, tomato, transcription factor

キーワード：脱離，離層，細胞壁加水分解酵素，トマト，転写因子

食品総合研究所研究報告, 79, 41-45 (2015)

巨大糖タンパク質プロテオグリカンの小角X線散乱測定による特性解析

渡邊 康

(独) 農研機構食品総合研究所

Keywords: food biopolymer, solution property, physicochemical characterization

食品総合研究所研究報告投稿要領

- 1 食品総合研究所研究報告への投稿に関し、必要な事項を定めることを目的とする。
- 2 投稿者は、次のとおりである。
 - (1) 投稿者は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所職員（契約職員を除く。以下「職員」という。）及び元職員とする。

ただし、機構特別研究員、食研特別研究員、流動研究員、依頼研究員、日本学術振興会特別研究員、日本学術振興会外国人特別研究員、連携大学院生、国連大学生、インターン等は、当該研究員の受け入れ職員（元職員を含む。）を責任著者（コレスポンディングオーサー等）とすることにより、投稿できるものとする。
 - (2) 投稿者は、責任著者とする。ただし、筆頭著者が責任著者と異なる際には、職員（元職員を含む。）である責任著者の了承の下、筆頭著者が投稿できるものとする。
 - (3) 投稿する内容は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所において得られた研究成果とし、そのうち学術的または技術的に価値のある原著論文とする。
 - (4) (1) から (3) の内容に関して、特段の問題が生じた際には、編集委員会において、調整できるものとする。
- 3 投稿できる論文の内容は、次のとおりである。
 - (1) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所研究報告（以下「研究報告」という。）には、原著（「報文」、「研究ノート」、及び「技術報告」）、「国連大学生研究成果」、及び学会誌発表研究論文の「抄録」を登載する。
 - (2) 原著は食品分野の研究及び産業等に寄与するもので、他誌に未発表のものに限る。「報文」は独創的な研究に基づいて得られた新しい事実と価値ある結論を有するもの、「研究ノート」は報文にまとめ得ないが学術的に公表する価値のある事実または結論を含むもの、「技術報告」は報文にまとめ得ないが有用なデータを含むものとする。
 - (3) 「国連大学生研究成果」として、当所の国連大学生が実施した研究成果の抄録を登載する。
 - (4) 前年度に当所の職員が学会誌に発表したすべての研究論文について、「抄録」を登載する。
- 4 食品総合研究所研究報告の著作権は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構刊行物著作権取扱規程（14規程第56号）によるものとする。
- 5 原稿の執筆に当たっては、別に定める食品総合研究所刊行物執筆要領に基づくものとする。使用する言語は日本語または英語とする。編集委員会で扱うその他の刊行物については、この執筆要領を準用する。
- 6 原稿の提出
 - (1) 原著論文の投稿に際しては、事前に所属領域長の承認及び内容の確認を得て行う。

- (2) 原著原稿は、正 1 部を提出し、電子ファイルを併せて提出する。なお、図及び写真で電子化できないものは、正原稿とは別に原図 1 部を提出する。
- (3) 「国連大学生研究成果」抄録原稿は、原稿 1 部を提出する。
- (4) 抄録原稿は、原稿 1 部を提出する。
- (5) 印刷用の最終原稿として電子化ファイルを提出する。ただし、図表等が電子化されていない場合は、この限りではない。
- (6) 原著については、原稿、原稿の電子ファイルともに、著者、事務局双方でバックアップを保管する。

7 原著論文については、編集委員会が選定した査読者が査読を行う。

8 食品総合研究所研究報告の発行回数は原則として年 1 回とするが、所長の判断により追加できるものとする。

9 食品総合研究所研究報告の別刷は原則として作成しない。ただし、執筆者等の希望がある場合は、研究ユニット等の経費負担により作成できるものとする。

10 その他、ここに定められていない事項は、編集委員会で決定する。

附則 この要領は、平成 26 年 6 月 17 日から実施する。

「食品総合研究所研究報告」の編集については、廃止する。

1 はじめに

この記載要領は投稿規程により、論文投稿に当たって原稿を執筆するさいの指針として作成したものである。執筆に当たっては投稿規程とともによく読んで、体裁の整った理解しやすい論文を作成するように努めていただきたい。

2 投稿論文

2.1 用紙は A4 判とし、縦長に置き、上下左右に各 3 cm 程度の余白を設け、11 ポイント程度の字の大きさを 26 字×27 行 (=702 字) を横書きする。

2.2 投稿論文の構成と提出部数

投稿論文の構成は、(1)表紙、(2)英文要旨およびその和訳、(3)本文、(4)表、(5)図(写真を含む)、(6)図(写真を含む)の説明原稿とする。

著者は投稿原稿の完全な控えを手元に保存する。なお審査の過程で変更があった場合は、それらの控えもすべて保存する。

3 投稿方法

論文の投稿はオンライン投稿システムの指示に従い行う。(URL : <http://www.editorialmanager.com/nskkk/>)

4 表紙

4.1 表紙には **4.5** の例のように、和文で欄外見出し、題名、著者名、所属、キーワード(日本語)、脚注の順に書く。

4.2 欄外見出しは著者名(姓のみ、2 名の場合は併記し、3 名以上の場合は「筆頭著者の姓・他」とする)に続いて、題名を **15 字** 以内にまとめて書く。なお、欄外見出しは会誌の表紙題名としても使用される。

4.3 共著者の所属が筆頭著者のそれと異なる場合は、共著者の氏名の右肩に「¹」「²」「³」を付け、所属(著者の正式な所属機関名)と対応させる。内容に関する質疑、別刷り請求等のための連絡先代表者を指定する場合は、当該氏名に「*」を付け、脚注と対応させる。

4.4 脚注には著者の所属機関の郵便番号と住所を書く。なお、連絡先代表者を指定した場合、「連絡先 (Corresponding author)」としメールアドレスを記載する。

4.5 表紙記載例

〔欄外見出し〕

食品・他：麹菌および鶏卵の量と魚醤油の品質

醤油麹量と鶏卵添加量がイカおよびイワシ魚醤油の品質に及ぼす影響[†]

食品花子¹、深海潜太²、水産勝尾^{2*}、
畜産育雄³、農業営子³

¹独立行政法人機能食材研究所

²太平洋大学農林水産学系

³全国県農業畜産試験場

キーワード：5 語以内

.....〔脚注〕.....

¹〒929-0808 能登県いしる市薄口台 4-5-67

²〒288-9999 西南県南総市黒潮岬 3-2-1

³〒123-4567 全国県風見鶏市大豆が丘 5432-10

*連絡先 (Corresponding author), abcd@efg.hijk

5 英文要旨およびその和訳

5.1 英文要旨は報文および技術論文では、200 語程度とし、研究ノートおよび速報では **100 語** 程度とする。

5.2 下記 **5.4** の例のように、題名、次いで 3 行あけて著者名(名、姓の順とし、先頭文字のみ大文字とする)、所属機関名および住所、所在地、次に 1 行あけて要旨本文を書く。

5.3 英文要旨には研究の目的、方法、結果および結論を述べる。キーワードを 5 語以内で付ける。

5.4 英文要旨記載例

Effects of Concentrations of “Shoyu Koji” and Egg on Quality of Fish Sauces of Squid and Sardine

Hanako Shokuhin¹, Senta Fukami², Katsuo Suisan^{2*}, Ikuo Chikusan³ and Eiko Nogyo³

¹National Functional Food Stuff Institute, 4-5-67 Usukuchidai, Ishiru, Noto 929-0808

²Institution of Agriculture, Forestry and Fisheries, Taiheiyou University, 3-2-1 Kuroshiomisaki, Nansou, Seinan 288-9999

³Zenkoku Prefectural Agricultural and Livestock Experiment Station, 5432-10 daizugaoka, kazamidori, Zenkoku 123-4567

Fish sauces were prepared, using Japanese squid and sardine caught in the sea near Oni-ga-shima island. The quality of fish sauces was studied by changing Shoyu Koji and Ukokkei-egg concentrations during fermentation.……

Keywords :

6 本文

6.1 本文の構成

6.1.1 報文および技術論文

構成区分は原則として緒言（記述に当たっては「緒言」という見出し字句は用いない）、実験方法、実験結果、考察（「実験結果および考察」としてもよい）、要約、謝辞（必要な場合、記述に当たっては「謝辞」という字句は用いない）、文献とする。記述に当たっては、構成区分の見出し字句の前後は1行ずつあけ、見出し字句は行の中央に書く。

構成区分中の大見出し、中見出しおよび小見出しは、それぞれ1, 2, 3, ……、(1), (2), (3), ……、i, ii, iii), ……のように順次区別する。

中見出しまでは見出し字句をつけ、改行して文章を書き出す。小見出しは見出し字句をつけ、改行して文章を書くことを原則とするが、見出し字句のあとに「:」をつけて改行しないで文章を続けてもよい。見出し字句の最後にピリオドはつけない。

6.1.2 研究ノートおよび速報

構成区分見出しを必要とせず、緒言（記述に当たっては「緒言」という見出し字句は用いない）、大見出し以下の区別で記述する。大見出しの見出し字句は原則として、直接必要な事項の字句を見出しとする。要約は大見出しにより、文献のみは構成区分見出しとする。

6.2 原稿の書き方

6.2.1 文章および文字

文章は平易かつ簡潔な「である」調とする。英字、数字は原則として半角とする。

6.2.2 専門用語は原則として文部科学省学術用語審議会編「学術用語集」による。略語又は記号を用いるときは、最初に用いる箇所で正式名称を書き、かっこ内に略語や記号を示す。

6.2.3 化合物名は原則としてIUPAC（国際純正応用化学連合）命名法に従い日本語で書く。

本文中では化学式を用いず、名称を用いて書く。長い化合物名の場合は、6.2.2に準じて略語を用いてもよい。また、化合物の名称として、一般に使用されるものを用いてもよい。

6.2.4 外国の人名、会社名などはアルファベット表記とする。ただし、例のように、周知の術語となっている人名はカタカナ書きでもよい。人名には敬称をつけない。

〔例〕 ケルダール分解法、ソモギー法、モール法、フェーリング液など

6.2.5 本文中に図、表を引用する場合、図、表が英文で書かれている場合はFig. 1, Table 1とし、和文で書かれている場合は図1, 表1とする。挿入位置を原稿用紙の右余白に Fig. 1, Table 1, 図1, 表1 のように指示する。

6.2.6 物理量の記号および使用上の規約は、なるべくIUPACの勧告に従う。付記1および「物理化学で用いられる量・単位・記号」((社)日本化学会標準化専門委員会監修、朽津耕三訳、(講談社サイエンティフィック、東京)(1991)、要約版は、化学と工業、42(3)、498-506(1989)。以下「IUPAC手引き」と略称)を参照する。

6.2.7 単位は付記2に準拠する。

6.2.8 動植物名は「文部科学省学術用語審議会編：学術用語集-動物編、植物編-大日本図書」「園芸学会編：園芸作物名編-養賢堂」などを参照し、カタカナ書きとする。学名は例1のように属（第1字目を大文字とする）、種、変種、亜変種の部分にイタリック書体とする。

〔例1〕 リンゴ→*Malus domestica* Borkh.

ウンシュウミカン→*Citrus unshiu* Marc.

動植物体の加工品は〔例2〕のように原則としてひらがなまたは漢字を用いる。

〔例2〕 コムギ→こむぎ粉、小麦粉

サケ→塩さけ

6.2.9 微生物の名称および用語については「日本細菌学会用語委員会編：最新版英和英微生物学用語集（菜根出版、東京都千代田区平河町1-8-13 和田ビル）」などによる。また微生物の学名は、例のようにイタリック書体とする。

〔例〕 微生物の属名のみを記載する場合

Aspergillus sp.

属・種名を記載する場合

Aspergillus oryzae

亜種・変種などを記載する場合

Bacillus cereus var. *mycoides*

特定の菌株などを記載する場合

Escherichia coli K-12

6.2.10 酵素の分離精製，諸性質の解明および応用に関する論文では，対象酵素の酵素番号および系統名を必要箇所に記述する。酵素番号および系統名は国際生化学連合 (I.U.B.) 酵素委員会報告 “Enzyme Nomenclature Recommendations (1984) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, Academic Press (1984)” に準拠する。

〔例 1〕 グルコースイソメラーゼ (E.C. 5.3.1.5, D-Xylose ketol-isomerase)

論文で用いている酵素名が系統名と異なることから，酵素番号と系統名を記述する。

〔例 2〕 トリプシン (E.C. 3.4.21.4)

論文で用いている酵素名が系統名と同一のため，酵素番号だけを記述する。

6.2.11 数および数式については，付記 3 および 6.2.6 の「IUPAC 手引き」を参照する。

6.2.12 引用文献番号は引用順に通し番号とし，本文中の該当箇所に「^{[1]2)}」，「^{[1]-3)}」，「^{[1]3)-5)7)}」のように上付きで指示する。本文の最後に「文献」としてまとめて書く。文献の書き方は付記 4 に従う。引用する文献は直接参照したものに限る。

6.2.13 本文中の脚注は原則として用いないが，やむを得ない場合には本文中の項目の右肩に*，**を用い，例のように書く。

〔例〕

	(本文)	○○○○○○○*	○○○	……………
脚注	{	*○○○○○○○○○	……………	
		○○○○○	……………	
		○○○○○	……………	
	(本文)	○○○○○	……………	

6.2.14 本文原稿は欄外にページ番号をつける。

6.2.15 各ページには行番号をつける。

7 図，写真および表

7.1 図と表は最小限にとどめ，同一内容のものはいずれか一方とする。

7.2 図・写真と表は，A4 サイズに原則ひとつずつとする。英文で図と表を作成する場合は，本文と独立して内容が理解できるような説明文を簡潔に書く。

7.3 図および写真

7.3.1 全ての図は，同一縮尺となるように調整し文字も印刷されたときを考慮し，大きさに気を付ける。印刷された文字の縦長が 1.5 mm 以下とならないようにする。グラフの縦軸の説明文字や物理量 / 単位は下方から上方へ向かって，横軸のそれは左から右へ横書きとする（ただし，

目盛の数字はこの限りでない）。

カラーの図の印刷料金は，付表 1 による。

7.3.2 図・写真と表はコンピュータ画面上でも審査可能な鮮明なものとする。

また，これらは印刷時により解像度の高いものと差し替えることが可能である。カラー印刷も可能であるが，印刷費用は著者が負担する。カラー印刷料金については付表 1 による。

7.4 表

7.4.1 表は原則として A4 判を用いる。

7.4.2 表の題名は，表 1 又は Table 1 として表の上部に，説明などの注記は下部に書く。英文の場合，表題および表中の語句は最初の文字を大文字とし，以下は小文字とする。

8 掲載料

掲載料は付表 2 による

9 別刷

別刷の注文は「別刷注文書」によって行う。

別刷料金は付表 3 による。

10 その他

刷り上がり 1 頁は，本文の場合，702 字詰め用の紙 3 枚，図表原稿の場合，4 枚に相当する。

著者校正は一度だけ行う。英文要旨および英文で書かれた図表については，英文校閲をすませているので，これに従う。

〔付記 1〕 物理量とその記号

1.1 物理量の記号は，論文ごとに定義を明示してから用いる。記号はラテン文字又はギリシャ文字の 1 字（ただし pH は例外）とし，必要な場合に添字（ラテン文字，ギリシャ文字，アラビア数字，ローマ数字から選ぶ），その他の記号をつけることができる。

1.2 物理量の記号は，イタリック体（斜体）で印刷するが，添字についてはそれ自体が物理量を表わすときはイタリック体とし，そうでない場合はローマン体（立体）とする。

1.3 物理量の値は，数値と単位の積である。物理量およびそれを表す記号は，特定の単位の採用を意味するものであってはいけない。（例：“長さを l とする” は正しいが，“cm で測った長さを l とする” は誤りである）

1.4 物理量の記号は 6.2.6 の「IUPAC 手引き」の 2 章に記載されているものについては，できるだけこれに準拠する。記載されていない物理量の記号は，1.2 の原則に従ってなるべく慣用されているものを用いる。

「IUPAC 手引き」の 2 章から抜粋した記号を以下に示す。

(1) 空間と時間		
長さ	length	l
高さ	height	h
半径	radius	r
直径	diameter	d
面積	area	A, A_s, S
体積	volume	V
時間	time	t
速度	velocity	v, u, w, c
(2) 力学		
質量	mass	m
密度	(mass) density	ρ
相対密度	relative density	d
力	force	F
圧力	pressure	p, P
重量	weight	G, W
運動エネルギー	kinetic energy	E_k, T, K
弾性率	modulus of elasticity	E
粘性率・粘度	viscosity	η, μ
(3) 一般化学		
要素粒子の数	number of entities	N
物質質量	amount of substance	n
モル質量	molar mass	M
相対分子質量	relative molar mass,	M_r
(分子量)	(molecular weight)	
相対原子質量	relative atomic mass,	A_r
(原子量)	(atomic weight)	
(溶質) B のモル濃度	amount (of substance)	
	concentration of B,	$c_B, [B]$
(略して B の濃度)	(concentration of B)	
解離度	degree of dissociation	α
(4) 熱力学		
熱	heat	q, Q
仕事	work	w, W
熱力学温度	thermodynamic temperature	T
熱容量	heat capacity	C_p, C_v
浸透圧	osmotic pressure	Π
(相対) 活量	(relative) activity	a
平衡定数	equilibrium constant	K
(5) 電気と磁気		
電荷	electric charge	Q
電流	electric current	I
電位	electric potential	V
電気容量	capacitance	C
誘電率	permittivity	ϵ
抵抗	resistance	R
抵抗率	resistivity	ρ
(6) 電磁放射		

波長	wavelength	λ
放射エネルギー	radiant energy	Q
透過率	transmittance, transmission factor	τ
吸光率	absorptance, absorption factor	α, R
吸光度 (常用対数) (decadic)	absorbance	A
吸光係数, 吸収係数	absorption coefficient	ϵ
モル吸光係数 (常用対数)	molar (decadic)	
	absorption coefficient	

【付記2】 単位および単位記号の書き方

2.1 現在, 単位は国際的に SI [国際単位系を表す記号 (symbol)] であって, 略号ではないので, どの国語でも SI と書く] 単位に統一されつつあるが (参考文献 1) を参照), ここでは SI および慣用されている単位の主なものを記載した. 論文の作成に当たっては, ここに記載した単位を選んで使用する. なお, ここに記載していない特定の量を表す単位については, 著者が論文に定義を明確に示してから用いる.

2.2 単位記号はローマン体 (立体) で印刷し, 複数を意味する場合でも形を変えてはいけない. 又, 文末にくるとき以外はピリオドをつけない.

【例】 5 cm とし, 5 cms, 5 cm., 5 cms. とはしない.

2.3 接頭語と単位記号の間にはスペースをおかない.

2.4 2つの単位の積を示すときはセンターピリオドをおく.

【例】 N・m とし Nm としない.

2.5 2つの単位の商はスラッシュ (/) 又は割算の横線 (—), あるいは⁻¹で示す. / は決して 2 回以上使用しない.

【例】 m/s, $\frac{m}{s}$, m・s⁻¹

J/(K・mol) または J・K⁻¹・mol⁻¹ とし, J/K/mol としない.

2.6 SI 接頭語

大きさ	接頭語	記号	大きさ	接頭語	記号
10 ⁻¹	デシ	d	10	デカ	da
10 ⁻²	センチ	c	10 ²	ヘクト	h
10 ⁻³	ミリ	m	10 ³	キロ	k
10 ⁻⁶	マイクロ	μ	10 ⁶	メガ	M
10 ⁻⁹	ナノ	n	10 ⁹	ギガ	G
10 ⁻¹²	ピコ	p	10 ¹²	テラ	T
10 ⁻¹⁵	フェムト	f	10 ¹⁵	ペタ	P
10 ⁻¹⁸	アット	a	10 ¹⁸	エクサ	E

2.7 単位と単位記号の表

表中の * 印は SI 基本単位を示し, ** は SI 組立単位で固有の名称と記号をもつものを示した.

(参考文献)

- 1) 国際単位系 (SI) - グローバル化社会の共通ルール - 日本語版国際文書第 7 版, 日本規格協会発行 (1998)

単位と単位記号の表

量	単位の名称 (SI 単位の定義)	単位記号
長	さ	
	メートル (meter)*	m
	マイクロメートル (micro meter)	μm
面	積	
	ナノメートル (nano meter)	nm
	平方メートル (square meter)	m^2
	アール (are) ヘクタール (hectare) } (土地面積に限定)	a ha
体	積	
	立方メートル (cubic meter)	m^3
	リットル (liter), (dm^3)	l, L
	キロリットル (kiloliter), (m^3)	kl, kL
	ミリリットル (milliliter), (cm^3)	ml, mL
平 面	角	
	マイクロリットル (microliter), (mm^3)	μl , μL
	ラジアン (radian)**	rad
	度 (degree)	°
立 体	角	
	分 (minute)	'
	秒 (second)	"
	角	
	ステラジアン (steradian)**	sr
時 間	秒 (second)*	s
	分 (minute), (60s)	min
	時 (hour), (3600s)	h
	日 (day), (86400s)	d
周 波 数	ヘルツ (hertz)**, (s^{-1})	Hz
	メガヘルツ (megahertz)	MHz
回 転 数	回毎分 (revolutions per minute)	rpm
	質 量	
	キログラム (kilogram)*	kg
	グラム (gram)	g
	ミリグラム (milligram)	mg
物 質 量	マイクログラム (microgram)	μg
	トン (ton), (Mg)	t
	モル (mole)*	mol
	(g 分子, g 原子, g イオン, 「当量」などの語は SI 単位では廃止された)	
濃 度	度	
	・モル濃度 (molar concentration または molarity……1 L の溶液の中に含まれる溶質のモル数)	mol/l, mol/L
	(規定濃度 N は用いない)	
	・パーセント (percent) … (溶液中の 2 つの量の比)×100, を意味する. パーセントを使う時は, 次のように, 重量と重量の比か, 容量と容量の比かを明確にして用いる.	%
	・重量パーセント	% (w/w)
	・容量パーセント	% (v/v)
	・(重量 / 容量) パーセント	% (w/v)
	・(容量 / 重量) パーセント	% (v/w)
	・溶液 100 g 当たりの溶質のミリグラム	mg/100 g
	・溶液 100 mL 当たりの溶質のミリグラム (mg% は用いない)	mg/100ml, mg/100mL
・parts per million } (何の比率か明示する)	ppm	
・parts per billion }	ppb	
・parts per trillion }	ppt	

量	単位の名称 (SI 単位の定義)	単位記号
力	ニュートン (newton)**, ($\text{kg} \cdot \text{m} \cdot \text{s}^{-2}$)	N
圧力・応力	パスカル (pascal)**, ($\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$)	Pa
粘度	パスカル秒	$\text{Pa} \cdot \text{s}$
エネルギー・熱量	ジュール (joule)**, ($\text{kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$)	J
温度	カロリー (calorie), (4.184 J) (栄養・代謝に限定)	cal
	ケルビン (Kelvin)*	K
	摂氏 (Celsius), ($0^\circ\text{C} = 273.15\text{K}$)	$^\circ\text{C}$
電流	アンペア (ampere)*	A
電荷・電気量	クーロン (coulomb), ($\text{s} \cdot \text{A}$)**	C
電位差, 電位, 起電力	ボルト (volt), ($\text{J} \cdot \text{A}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)**	V
静電容量	ファラド (farad), ($\text{A} \cdot \text{s} \cdot \text{V}^{-1}$)**	F
電気抵抗	オーム (ohm), ($\text{V} \cdot \text{A}^{-1}$)**	Ω
工率, 放射束	ワット (watt)**	W
インダクタンス	ヘンリー (henry), ($\text{V} \cdot \text{A}^{-1} \cdot \text{s}$)**	H
コンダクタンス	ジーメンス (siemens), ($\text{A} \cdot \text{V}^{-1} = \Omega^{-1}$)**	S
光度	カンデラ (candela)*	cd
光束	ルーメン (lumen), ($\text{cd} \cdot \text{sr}$)**	lm
照度	ルクス (lux), ($\text{m}^{-2} \cdot \text{cd} \cdot \text{sr}$)**	lx
光の波長	マイクロメートル (micrometer)	μm
	ナノメートル (nanometer)	nm
放射能, 放射線	ベクレル (becquerel, 放射性核種の放射能)**, (s^{-1})	Bq
	グレイ (gray, 吸収線量)**, ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2} (= \text{J} \cdot \text{kg}^{-1})$)	Gy
	カウント毎分 (counts per minute)	cpm
	シーベルト (sievert; 線量当量)**	Sv

【付記3】 数と数式

- 3.1** 小数点は0.101とし、.101とはしない。
- 3.2** けた数の区切りは5 530 000とし、5,530,000としない。
- 3.3** 積は 101.325×10^8 とし $101.325 \cdot 10^8$ としない。
- 3.4** 範囲を示す場合は $(1.0 \sim 1.5) \times 10^8$ 又は $(25 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ と書く。
- 3.5** 数学的演算子 (d, Δ など) および数学的定数 (e, π , i など) は、ローマン体で印刷する。
- 3.6** 商を表わす斜線 (/) を用いるとき、混同を避けるためかっこを必要とする。
- ・ $a+b/c+d$ ($=a+bc^{-1}+d$ と混同する) とせず $(a+b)/(c+d)$ とする。
 - ・ $(a/b)/c$ は $a/b/c$ としてはならない。
- 3.7** 二重の添字になる書き方はできる限り避ける。

【付記4】 引用文献の記載法

4.1 著者名

和文著者名は、姓名共に書き、英文著者名は姓を先にし、ついで first および middle name のイニシャルを書く。著者が複数の場合は、各著者名の間に「,」を入れる。ただし、

英文の場合、最後の名前の前は and のみを入れる。

4.2 論文題名

引用論文の題名を書く。

4.3 雑誌名

和文雑誌名は原則として略さない。欧文雑誌の略名は原則として最近の国際規格の ISO 4、およびそれに準拠して ISSN 国際センターが作成する目録マニュアル「ISSN Manual. Cataloguing Part」と略語表「List of Title Word Abbreviations」(<http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>) に従う。略記形が不明の場合は、略記せずに完全誌名を記述する。

同じ雑誌が連続して引用される場合も“同上”、“ibid.”は用いないで繰返して書く。

4.4 巻数, 頁数, 発行年

巻数はボールド体で書く。巻数を表記しない雑誌では、巻数の位置に発行年を西暦で書く。頁数は引用論文の最初と最後の頁数を - で結んで書き、次いで発行年を () で書く。

4.5 単行本の場合

著者名, 章のタイトル, 書名, 版数, 巻数, 編集者名, 出版社, 発行地, 頁数 (最初と最後), 発行年の順に書く。

4.6 特許の場合

特許権者または出願者名，題名，特許番号または公告番号，年月日の順に書く。

4.7 学会講演要旨集等の場合

学会要旨等は原則として引用しない。やむを得ず引用する場合は，講演者名，題名，学会大会資料名，頁数（複数頁の場合は最初と最後の頁数を - で結ぶ），開催地，開催年の順に書く。

4.8 文献記載例

- 1) 三ヶ日温子，薩摩橙大，温州みかんのカロチノイドに関する研究（第2報）近赤外線照射による温州ミカン果皮カロチノイドの変質，日本食品科学工学会誌，**48**，123-456（2001）。
- 2) Yoshida, K., Kirimura, O. and Danna, G., Change in the amount of SDS-insoluble membrane components by oxidants during breadmaking. *J. Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 99-999（2001）。
- 3) 佐藤昌康，味の知覚，「味覚の生理学」，第1版（朝倉書店，東京），pp. 1-22（1991）。
- 4) Mendel, D.S., Gene and chromosome. In “Introduction to quantitative genetics,” 1st ed. (Ronald. Press. Co.), pp. 9-99（1999）。
- 5) 三井清司，色素分析一般，「植物色素-実験・研究への手引き」，第2版，林 孝三編，（養賢堂，東京），pp. 93-150（1988）。
- 6) Yokota, T., Brassinosteroids. In “Comprehensive natural products chemistry,” Vol. 8, eds. Barton, D.H. R., Nakanishi, K. and Meth-Cohn, O. (Vol. ed., Mori, K.), Pergamon, pp. 99-107（1999）。
- 7) 藤山京司，早乙女成弘，上島輝光，小谷悠久，浸透圧の測定方法及び装置，特許第2802344号（2001.1.11）。
- 8) 深海潜太，食品花子，水産勝尾，畜産育雄，東京湾雑魚の魚種および異なる醤油麹が魚醤油の品質と成分に及ぼす影響，日本食品科学工学会第48回大会講演要旨集，p. 47，香川（2001）。

4.9 雑誌略名例

ボールド部分のみ残し，イタリックの部分は略す。単語の途中で略した場合はピリオドを打つ。

Agricultural and Biological Chemistry
Analytical Biochemistry
Analytical Chemistry
Applied and Environmental Microbiology
Archives of Biochemistry and Biophysics
Bakers Digest
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
Biochemical and Biophysical Research Communications
The Biochemical Journal

Biochemistry

Biochimica et Biophysica Acta
Biotechnology and Bioengineering
Carbohydrate Research
Cereal Chemistry
European Journal of Biochemistry
FEBS Letters
Federation Proceedings
Food Science and Technology International, Tokyo
Food Science and Technology Research
Food Technology
Food Technology in Australia
HortScience
International Journal of Food Science and Technology
Journal of Agricultural and Food Chemistry
The Journal of Applied Bacteriology
Journal of Bacteriology
The Journal of Biochemistry
The Journal of Biological Chemistry
The Journal of Cell Biology
Journal of Chromatographic Science
Journal of Chromatography
Journal of Dairy Science
Journal of Fermentation and Bioengineering
Journal of Food Science
Journal of Food Technology
Journal of General Microbiology
Journal of Lipid Research
Journal of Molecular Biology
Journal of Nutrition
Journal of Stored Products Research
Journal of Texture Studies
Journal of the American Chemical Society
Journal of the American Oil Chemists Society
Journal of the American Society for Horticultural Science
Journal of the Association of Official Analytical Chemists
Journal of the Science of Food and Agriculture
Lipids
Nature
Phytochemistry
Plant and Cell Physiology
Plant Physiology
The Rice Journal
Science
Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung

4.10 引用 URL

データベースやホームページなどは更新・削除され，参照できなくなる恐れがあるので，引用はできるだけ避ける。

引用する際には、引用 URL 番号は引用順に通し番号とし、本文中の該当箇所に、「ⁱ⁾ⁱⁱ⁾」, 「^{i)~iii)}」, 「^{i)ii)~iv)vi)}」のように上付きで指示する。「文献」の次に「引用 URL」と書き、URL をまとめて書く。なお、該当する情報を入手した年月日を括弧内に記入する。

記載例

引用 URL

- i) <http://www.jsfst.or.jp/journal/index.html> (2008. 9. 3)

【付記 5】 印刷上の活字の指示

特別な理由のない限り、立体のギリシャ文字は次のものに限る。

$\Gamma, \Delta, \alpha, \beta, \gamma, \delta, \mu, \Pi, \pi, \Sigma, \Omega$

上付き又は下付き記号としては、原則として次のものを用いることができる。

マル	,	'	,	"	,	∞	,	*	,	
+	,	-	,	†	,	ダガー	,	ダブルダガー	,	プリムソル
				‡	,	‡	,	Φ		

付 表

付表1 カラー（原色版）印刷料金（円）

カラー印刷 1頁 60 000 円	・2頁以上で表裏印刷とならない場合、 追加1頁当たり 30 000 円 ・表裏印刷となる場合は、1枚2頁で 2×60 000 円
2色カラー印刷 1頁 40 000 円	・2頁以上で表裏印刷とならない場合、 追加1頁当たり 20 000 円 ・表裏印刷となる場合は、1枚×2頁で 2×40 000 円

付表2 掲 載 料 (円)

頁 数	報文、技術論文	研究ノート、速報
2 以下	5 000	5 000
3	5 000	17 000
4	5 000	29 000
5	5 000	41 000
6	17 000	*
7	29 000	*

*以後1頁加えるごとに12 000円を加算する

付表3 別刷価格表（抜粋）

(円)

	50部（表紙なし）	100部（〃）	150部（〃）	200部（〃）
2頁	2 800	3 800	5 300	6 800
4頁	3 800	5 300	7 300	8 800
6頁	4 800	6 800	9 300	10 800
8頁	5 800	8 300	11 300	12 800
表紙付き加算	3 000	3 800	4 700	5 600

(注) 一件につき手数料 800 円含む

フルカラー頁を含む別刷りの場合は、1部につき 40 円を加算する

2色カラー頁を含む別刷りの場合は、1部につき 30 円を加算する

付表4 英文校閲料（円）

1 編	2 650
-----	-------

食品総合研究所研究報告

第80号

平成28年3月 印刷 平成28年3月 発行
(非売品)

編集者 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
発行者 食品総合研究所

所長 大谷敏郎

(〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12)

印刷所 茨城県土浦市大畑565-2
筑波印刷情報サービスセンター協同組合

本誌より転載・複製をする場合は食品総合研究所の許可を得て下さい。

