[成果情報名]　**食品からの有害微生物の迅速多重検出法の開発**

[要　　約]　食品に存在する腸管出血性大腸菌 O157:H7、サルモネラ属、リステリアモノサイトゲネスなどの食中毒菌を１本の PCR 反応チューブ内で同時に反応させることにより、公定法と同等またはそれ以上の感度で迅速検出可能な多重検出法を開発した。

[部　　署]　食品総合研究所・企画調整部・食品衛生対策チーム

[連 絡 先]　029-838-8067　taishi@nfri.affrc.go.jp

[成果区分]　普及

[キーワード]　PCR、食中毒、多重検出、微生物検査、食品衛生

[背景・ねらい]

食中毒の未然防止や食品製造現場における検査コストや時間の削減を目的として、迅速かつ一度の工程で多種の食中毒菌（今回では主に食肉由来食中毒細菌）を検出する手法を開発した。従来の公定法では食中毒菌の同定試験に少なくとも３日以上必要であるが、本手法により時間を大幅に短縮した。検出感度においても１細胞の細菌を 24 時間で検出でき、食肉検体での実用も期待できる。

[成果の内容・特徴]

１．食肉由来食中毒細菌で重要な腸管出血性大腸菌 O157:H7、サルモネラ属、リステリアモノサイトゲネスの３種類において、既知の特異的検出プライマーから互いに干渉力の少ないプライマーを選択し、PCR 反応を至適化した。その結果、１分子の標的 DNA が反応管に存在すれば検出可能である反応系を確立した。

２．上記の食肉由来食中毒細菌３種が同程度に共通して増殖できる増菌培地を検討した。緩衝液の至適化・グルコース濃度の加減・pH 保持などにより、18 時間の培養で本法の検出閾値に十分達する条件を見出した。

３．有機溶媒を用いることなく食肉由来食中毒細菌３種の DNA を一括して効率よく抽出する手法を確立した。抽出 DNA 溶液を本法に供することにより、上記食中毒菌の検出が可能であった。これは食肉混在系において試験した場合も同様の結果であった。

４．実際の食品を想定して、牛挽肉や鶏肉に上記微生物を最低濃度（1～10 細胞/25g）接種した検体からの回収試験を試みた。増菌培養を含めて検討した結果、標的以外の常在菌が 10^7 細胞存在している検体においても本法による食中毒菌の特異的検出が可能であった。

[成果の活用面・留意点]

１．従来法ではこれらの食中毒菌の検出には多大な時間やコストを必要とし、さらに熟練の技術を必要とする。本法のプロトコールでは複数の食中毒菌を一括して増菌培養し、DNA 抽出後 PCR 反応により検出できる。

２．従来法では通常３日以上の時間が必要であるところを１日で検出できる。

３．PCR 反応は検出コストが高いと言われているが、本法では３菌を同時検出できることから最終的にコストの大幅削減と作業の効率化が期待できる。

４．PCR 法は様々な高感度検出手法が開発されており、それらの技術と本法を融合することにより、より簡易な検出方法の確立の可能性がある。

５．食肉以外においても応用可能か否かの評価試験を広く行っていく必要がある。

[具体的データ]

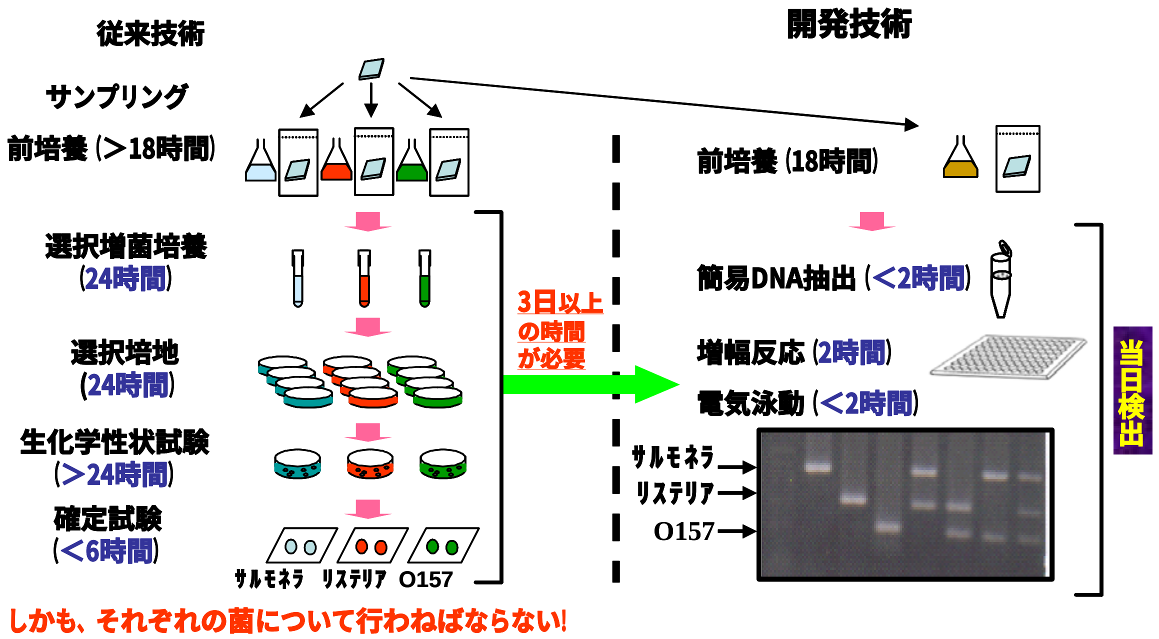


図1．従来法と開発技術の比較

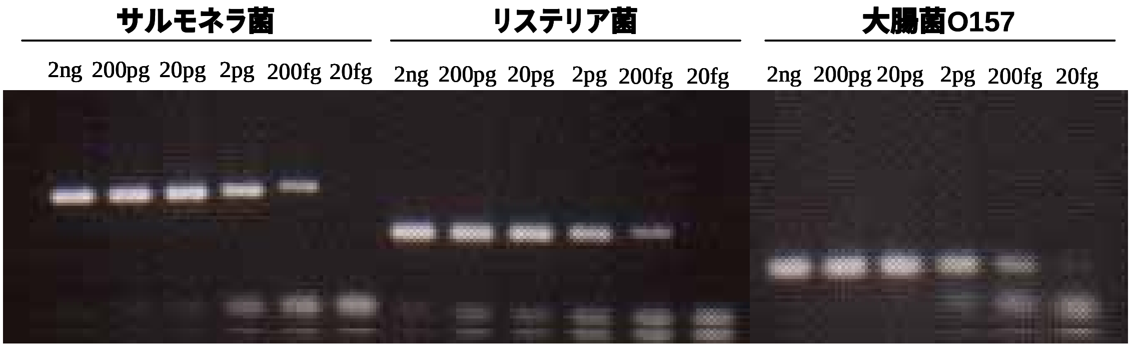


図2．食肉由来食中毒細菌の検出感度実験結果
いずれの食中毒細菌も200フェムトグラム（10^{-15}g）のDNA（およそ1細胞に相当）で検出可能であった。

[その他]

研究課題名：食品衛生微生物検査の簡易迅速化

予 算 区 分：経常

研 究 期 間 ：2003 年度

研究担当者：川崎晋、稲津康弘、川本伸一

発表論文等：

1）川崎晋、川本伸一、一色賢司　他：微生物の多重検査方法、特願 2003-435943、平成 15 年 12 月 26 日出願

[成果情報名] **生鮮野菜の衛生規範の作成**

[要　　約] 生鮮野菜の生産から消費までのフードチェーン全般にわたる食品衛生の向上のため、ＨＡＣＣＰの概念を取り入れた、適正農業規範（ＧＡＰ）への導入を目的とした生鮮野菜の衛生規範を作成した。

[部　　署] 食品総合研究所・企画調整部・食品衛生対策チーム

[連 絡 先] 029-838-8027　shiina@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 普及

[キーワード] 生鮮野菜、衛生規範、ＨＡＣＣＰ、適正農業規範、ＧＡＰ

[背景・ねらい]

平成８年夏に発生した腸管出血性大腸菌0157による集団食中毒事件において、かいわれ大根が原因食材として疑われた。この事件は、生鮮野菜が生産段階で病原微生物に汚染された場合、その野菜が食中毒の原因食材となる可能性があることを強く印象づけたものであり、生産段階からの衛生管理の徹底が重要であることを認識させたものであった。さらに、低脂肪乳（乳業メーカー）による食中毒事件をはじめとする多くの食品衛生問題の発生により、国民の食品の安全性に対する信頼は揺らいでおり、食品の安全確保のための対策の強化が強く要請されている。加工食品では、ＨＡＣＣＰに代表される衛生管理手法が導入され、確立されているが、生鮮野菜においても衛生管理手法の導入が求められている。そこで、生鮮野菜の生産～流通における衛生管理のガイドを作成し、適正農業規範（ＧＡＰ）への導入、普及を図ることを目的とする。

[成果の内容・特徴]

1．平成８年１２月に、ＨＡＣＣＰの概念を導入した「かいわれ大根生産衛生管理マニュアル」を作成し、かいわれ大根生産における衛生管理水準の向上を図った。本マニュアルは、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）および Codex 食品衛生部会における生鮮野菜・果実の衛生規範作成の契機となり、さらに規範作成時には、その内容が参考とされた。
2．平成１１年３月に、「水耕栽培の衛生管理ガイド」を作成し、水耕葉菜類の生産・出荷段階における衛生管理水準の向上を図った。
3．以上の成果および、諸外国における適正農業規範（Good Agricultural Practices，ＧＡＰ）などを参考として、対象を土耕栽培を含む生鮮野菜全般に拡大し、平成１４年３月に、「生鮮野菜生産高度衛生管理ガイドー生産から消費までー」、平成１５年２月に「生鮮野菜衛生管理ガイドー生産から消費までー（簡易版）」（表１）を作成した。農林水産省のホームページにおいても公開し、ガイドの普及、啓発に努めた。
4．平成１５年３月には、「生鮮野菜衛生管理ガイドー生産から消費までー（完成版）」を作成した。図１に、食品衛生思想の普及・浸透のための概念図を示す。
5．１５年度は、１４年度に完成したガイドと関連情報をもとに、「野菜衛生管理技術講習会」のテキストを企画・制作し、平成１５年１１月に第１回講習会を開催した。平成１６年３月には、第２回講習会を開催する。講習会テキストは、PowerPoint（マイクロソフト社製）ファイルの配付資料（Ａ４縦置きの用紙に上下に２枚配置）にノートを含む形式とし、講習受講者が現場での講習、指導等に活用しやすい形式とした（図２）。

[成果の活用面・留意点]

1．生鮮野菜の生産においては、加工食品の製造で適用されているＨＡＣＣＰ手法をそのまま適用することは不可能であるが、ＨＡＣＣＰの概念を可能な範囲で適用し、メリハリのある衛生管理を適用する必要がある。
2．できることから始めて、改善を繰り返すことが重要である。
3．ＧＡＰの導入、普及のためには、指導者の養成と現場担当者の教育・啓発が不可欠であり、今後、そのための講習会等を定期的に開催する必要がある。また、現地実証を通した成功例の紹介を行うとともに、ＧＡＰの認証制度についても検討する必要がある。

[具体的データ]

表１　生鮮野菜衛生管理ガイド（簡易版）の目次

セクション	生産編	流通編	消費編
タイトル	食品の安全は農場から始まる	食品の安全は、食品にかかわる全ての人の責任	生鮮野菜は家庭内でも病原微生物に汚染されることがあります
項目	1．野菜に付着するおそれのある病原微生物 2．作付け前の対策 3．栽培中の対策 4．収穫･調製時の対策 5．集出荷場の対策 6．記録の保存	1．卸売市場の衛生対策 2．販売店（量販店、八百屋直売所）の衛生対策	1．みずみずしい新鮮な野菜を購入しましょう！ 2．冷蔵庫でも交差汚染と温度に注意しましょう！ 3．調理でも交差汚染に注意しましょう！ 4．調理後も病原微生物の増殖に注意しましょう！ 5．残った料理は保管に注意しましょう！
まとめ	野菜栽培の衛生管理の流れ	衛生管理の流れ（卸売市場、販売店）	家庭消費の衛生管理の流れ

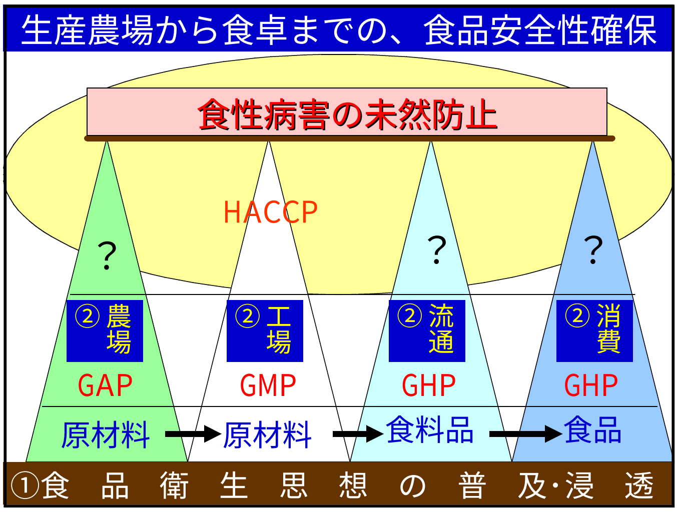


図１　食品衛生思想の普及・浸透

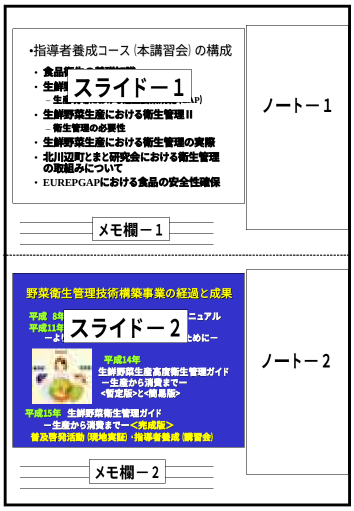


図２　講習会テキストの体裁

[その他]

研究課題名：野菜生産衛生管理講習会用プログラム等の開発

予 算 区 分：経常研究

研 究 期 間：2001～2003年度（2003年度）

研究担当者：椎名武夫、川本伸一、一色賢司（内閣府食品安全委員会）、田中芳一（生研センター）、篠原温（千葉大学）、日佐和夫（（株）ＢＭＬ）、谷口康子（消費・安全局）、高澤良夫（（社）日本施設園芸協会）

発表論文等：

１）田中芳一ほか：「かいわれ大根生産衛生管理マニュアル」、社団法人日本施設園芸協会、（1996）

２）同上：「水耕栽培の衛生管理ガイド」、同上、（1999）

３）同上：「生鮮野菜衛生管理ガイドー生産から消費までー（簡易版）」、同上、（2003）（http://www.maff.go.jp/soshiki/seisan/yasai/yasai.html#dai5）

４）同上：「生鮮野菜衛生管理ガイドー生産から消費までー（完成版）」、同上、（2003）（http://www.maff.go.jp/soshiki/seisan/yasai/4.pdf）

５）日佐伸夫ほか訳：食品の安全は農場からー適正農業規範（ＧＡＰ）導入にあたっての教育・訓練のための手引き（翻訳）、社団法人日本工業技術振興協会「食品流通におけるＨＡＣＣＰ導入協議会」、（2004）

[成果情報名]　玄米半粒を試料とするDNA食味選抜技術

[要　　約] 玄米半粒から DNA を抽出して鋳型とし、デンプン特性やタンパク質特性に関する各種プライマー存在下で PCR を行い、その結果に基づいて食味や物理特性を推定して選抜を行い、胚芽を有する残りの半粒で有望な次世代を育成することができる。

[部　　署] 食品総合研究所・食品素材部・穀類特性研究室

[連 絡 先] 029-838-8045　kenohtsu@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 普及

[キーワード] 玄米半粒、DNA食味選抜、米飯物性

[背景・ねらい]

米の食味判定は、従来、官能検査や物理化学的測定によって行われてきた。前者は、①試料量と時間・労力を要する、②嗜好性の地域や個人による相違がある、等の問題があり、後者は、①精度が官能検査に及ばない、②外観、味等の多面的評価が不可能、等の問題がある。そこで、本研究では、品種特性の基本であるDNAに着目し、①普遍性があり、②微量試料で適用が可能、③成分、物性等の多様な視点からの評価が可能、④精度が高い、という条件を満たす、米の食味の新評価・選抜手法を開発した。

[成果の内容・特徴]

1．世界の各種の米試料からDNAを抽出・精製して鋳型DNAとし、各種のプライマー存在下でＰＣＲを行い、品種、物理特性、食味等の判別に有用なプライマーを開発する。
2．米から抽出・精製したDNAを鋳型とし、各種のプライマー存在下でＰＣＲを行い、増幅された識別バンドDNAの有無を、０または１と２値化することで数値化する。
3．数値化したＰＣＲ結果を説明変数とし、穀物検定協会の「食味評価値」、試験場段階の官能検査結果、米飯物性の付着量やアミロース含量等の物理化学測定値等を目的変数として重回帰分析、主成分分析等の多変量解析を行って作成する食味推定式や物性推定式は高い相関を示す（図１）。
4．一粒あるいは半粒の米から抽出・精製したDNAを鋳型とするＰＣＲ法の結果を用いて、米の食味あるいは物理化学特性を評価・選抜することができる（図２）。例として、ハツシモとコシヒカリを交配し、その$Ｆ_2$種子を用いて上記②③の方法で主成分分析を行い、コシヒカリ型、ハツシモ型、独立型等に分類することができる。
5．交配して得られる玄米または籾の無胚芽半粒で米飯の食味推定を行い、胚芽含有半粒で次世代稲を育成してDNA食味選抜ができる。

[成果の活用面・留意点]

1．育種研究者と連携協力して半粒良食味米選抜の実用化を図る。
2．DNAマーカーの増加と食味推定式の増加を継続する必要がある。
3．本技術は、市販米飯一粒のDNA判別による原料米の食味推定にも使用可能である。

[具体的データ]

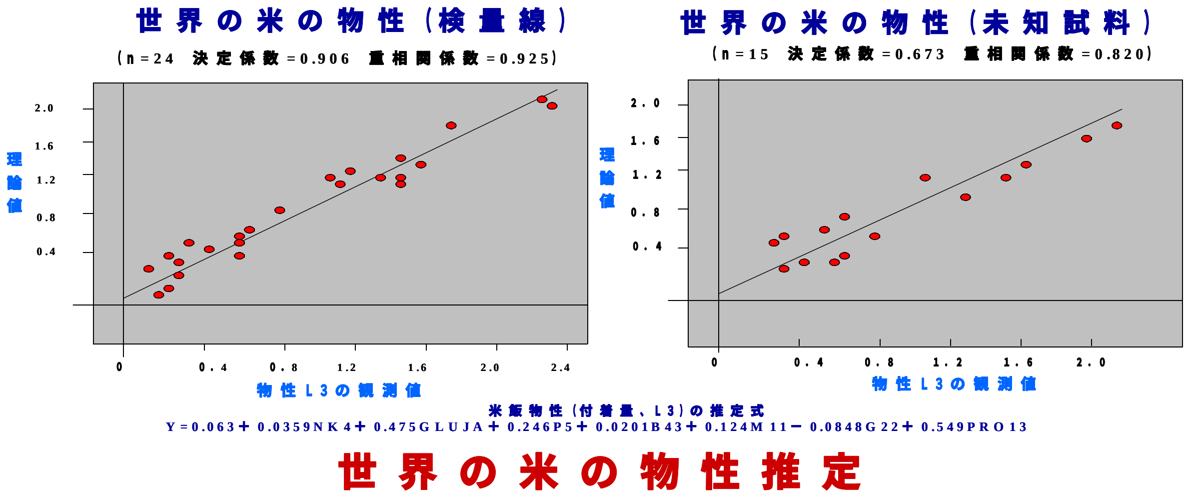
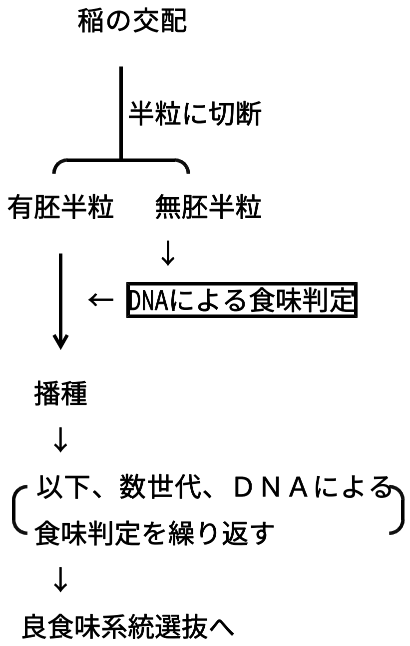


図１．ＰＣＲ結果に基づく米の物理特性の推定例



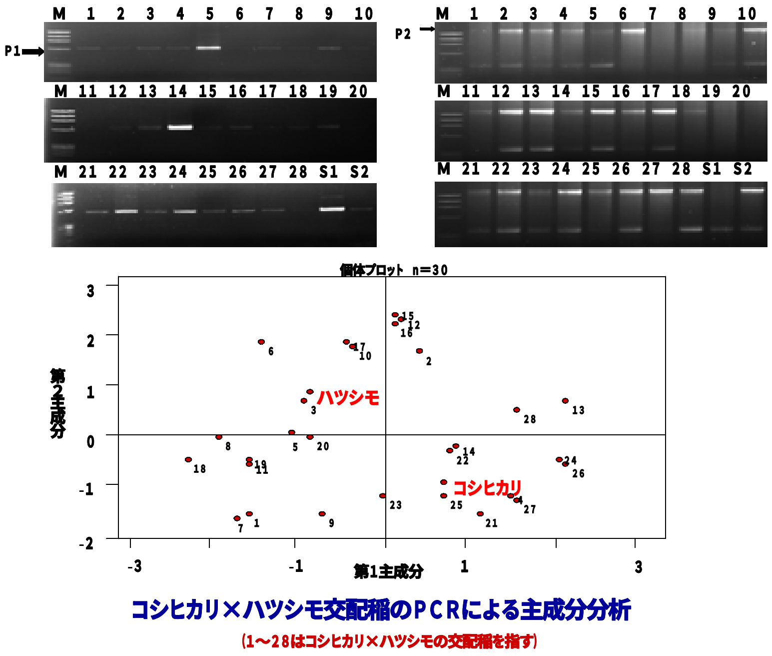


図２．半粒良食味米選抜技術

図３．ハツシモ×コシヒカリ交配後代(F_2)のＰＣＲによる主成分分析の結果

[その他]

研究課題名：広範な特性の米及び変異米の食味特性の解明及び新評価技術

予 算 区 分：生研センター基礎研究事業

研 究 期 間：2000年度～2003年度（2003年度）

研究担当者：大坪研一、岡留博司、中村澄子、鈴木啓太郎

発表論文等：

1）大坪研一ほか：DNA判別による米の食味推定、日本食品科学工学会誌、50(3)、122～132(2003)

2）大坪研一ほか：米のDNA食味判別技術及び籾／玄米半粒による良食味米選抜方法、日本特許出願2001-273689、平成13年9月10日（米国、中国、欧州にも出願中）

[成果情報名]　食品副産物を用いた低コスト耐水性生分解性素材の開発

[要　　約] 食品副産物（廃菌床、オカラ、果汁残渣）や農産物副産物（茎や葉）を副材とするコーングルテンミールから、射出成形法を用いて、低コストで耐水性に優れた生分解性素材を製造する方法を開発した。

[部　　署] 食品総合研究所・食品工学部・製造工学研究室

[連 絡 先] 029-838-8029　seiichi@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 普及

[キーワード] グルテンミール、植物繊維、射出成形、農業資材、包装資材

[背景・ねらい]

食品の加工工程で発生する副産物の処理や再利用は、解決すべき重要な課題である。これらの副産物を、農業や食品分野で用いられる生分解性素材として変換利用し、最終的に土に還元するための研究開発が行われているが、汎用的な利用に不可欠な耐水性が低いこと、さらに成形コストが高く、成形物の形状の自由度が低いこと等から利用が進んでいないのが現状である。本成果においては、トウモロコシ種子に含まれる水不溶性のタンパク質ゼインに注目した。精製ゼインはコストが高いことから、これを多く含むコーングルテンミールを用いて、生産性の高い射出成形法での生分解性素材の製造法を開発した。

[成果の内容・特徴]

1．開発した製造法は、前処理したコーングルテンミールに可塑剤やオカラなどの副産物を添加し、調整後、エクストルーダーでペレット化し、射出成形機を用いて苗ポットなどの生分解性素材を調製するものである。（製造方法：図1）。

2．射出成形法は、生産性の利点（コスト、成形性、成形物の形状の自由度）が多い成形法である。コーングルテンミールを主原料とすることで、成形した素材は耐水性を有する。従来の食品由来の材料は熱溶融時の物性が温度により顕著に変化するため、射出成形処理はこれまで使われていなかったが、各原料の前処理と射出成形機における高い射出圧力の設定と厳密な温度設定、射出スクリューの形状などを改良することで、安定した射出成形が可能である。

3．コーングルテンミールを主原料とし可塑剤（グリセリン）の他に植物繊維を含むオカラや廃菌床などの副産物の添加により、材料のコストの低減と素材の強度の向上が図れる（表1）。また得られた素材は土壌中において約1ケ月で分解する完全生分解性である（図２）。

4．製造法は、コーングルテンミールの他にも、他のタンパク質、澱粉を主原料にした低コストの生分解性素材の開発にも適用できる。

[成果の活用面・留意点]

1．製造にあたっては、原料の調整・ペレット化を行なうエクストルーダー、成形を行なう射出成形機を必要とする。射出成形機においては、汎用的な機種から一部改造を必要とする。

2．育苗ポットの評価試験において、花き苗などの栽培試験を実施して、素材の改善を進めるなど農業用資材、農産物の包装資材などの用途についての検討を実施している。

3．生分解性素材の用途に合わせて、材料の前処理を必要とする。具体的には、食品容器などにおいては、コーングルテンミールの脱臭などの前処理が必要である。

[具体的データ]

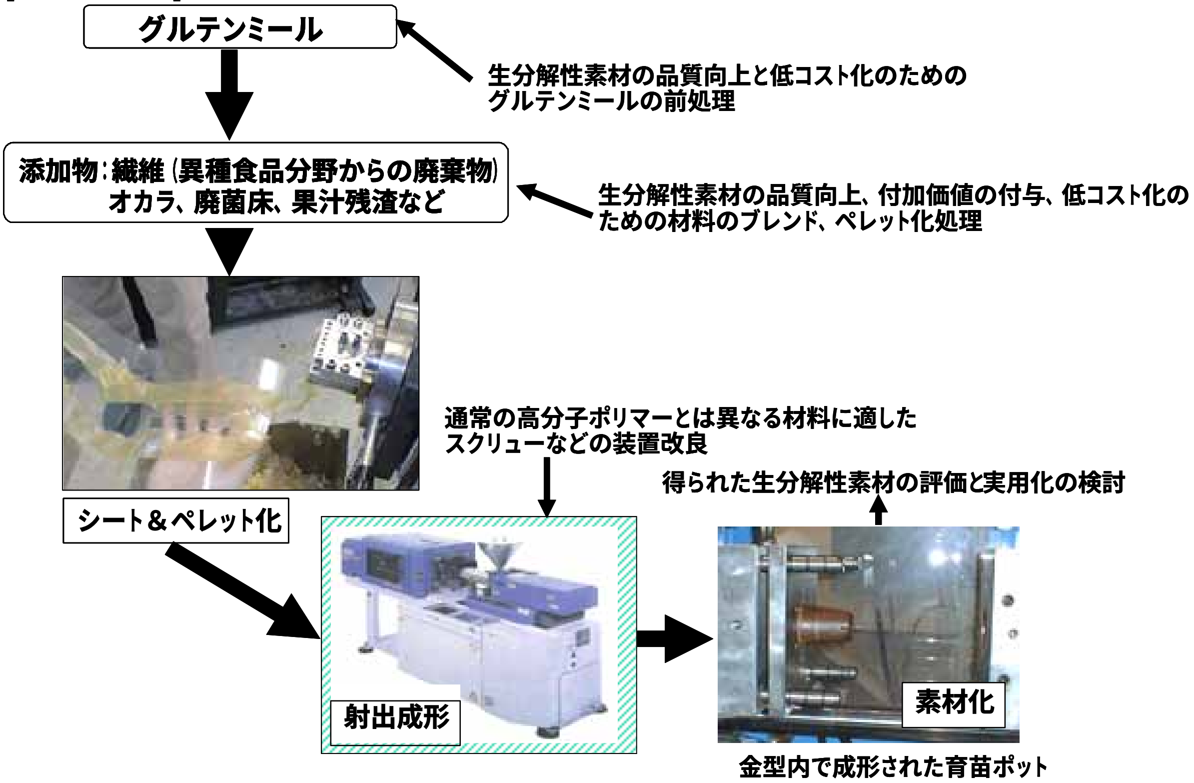


図1　コーングルテンミールを主原料として射出成形法を用いた生分解性素材の製造フロー概略

表1　オカラ添加による強度向上効果

	破断強度 [MPa]	伸張率 [%]
オカラ添加（注）	2.56	4.25
コントロール（コーングルテンミールのみ）	2.29	3.80

注：オカラ添加割合は、乾物ベースで10%

図２　土壌中（20°C一定）で1ケ月経過後の生分解性素材の分解状況

試験前試料（左）、土壌水分10%（中）、30%（右）

[その他]

研究課題名：食品廃棄物由来生分解性素材の実用化のための調査研究

予 算 区 分：委託・環境研究・バイオリサイクルプロジェクト

研 究 期 間：2002年度

研究担当者：五十部誠一郎・竹中真紀子

発表論文等：

1） Q. Wu, H. Sakabe, S. Isobe, Processing and Properties of Low Cost Gluten Meal/Wood Fiber Composite, Ind. Eng. Chem. Res., 42, 6765-6773, 2003

2） 五十部誠一郎、坂部寛、吉野智之、伍強賢、永井光男、富田哲司、矢内徳正、耐水性に優れた生分解性成形品とその製造方法、特許（出願）、2002年第246346、平成14年8月28日

[成果情報名] **高脂肪食で発現量が変化する新たな脂質代謝関連遺伝子と肥満病態の関係**

[要　　約] ラット脂肪組織でのジーンチップ解析により、高脂肪食で発現制御を受ける遺伝子のうち栄養条件による制御の報告のない遺伝子を見出した。正常および肥満モデル動物を用い、遺伝子発現の組織分布と肥満病態特異的な発現変化を解析することにより、これら遺伝子のエネルギー代謝に果たす役割を明らかにできる。

[部　　署] 食品総合研究所・食品機能部・栄養化学研究室

[連 絡 先] 029-838-8083　kushirom@nfri.affrc.go.jp

[成 果 区 分] 参考

[キーワード] 脂肪組織、高脂肪食、脂質、代謝、ラット、ジーンチップ

[背景・ねらい]

食生活の欧米化に伴う脂質の取りすぎが、肥満、糖尿病などの代謝疾患性生活習慣病の発症の大きな要因と考えられている。本研究では、ジーンチップを用い、生体の脂質代謝制御に重要な役割を持つ脂肪組織で脂肪過剰摂取により発現量が変動する新たな脂質代謝関連因子を網羅的に探索する。さらに見出した遺伝子に関し、正常と肥満病態モデル動物での組織別発現量と肥満病態での発現量変化を解析し、生体の代謝制御に果たす役割解明を目指す。

[成果の内容・特徴]

1．ラット腎臓周辺白色脂肪組織でのジーンチップ解析により、種々の脂質代謝関連遺伝子の発現が高脂肪食により変動することを示した。これまで栄養条件による制御の報告のない因子としては、皮膚型脂肪酸結合タンパク質遺伝子（*CFABP*）とレチノール結合タンパク質遺伝子（*RBP*）を見出した。また、これまで報告されていないステアロイル-CoA 不飽和化酵素遺伝子（*SCD*）のアイソザイム特異的な変動を観察した。これら遺伝子の発現は高脂肪食で抑制されるが、睾丸周辺白色脂肪組織と褐色脂肪組織においても発現抑制を受けることをノーザンブロットにより確認した（図1）。

2．Zucker ラット（正常（lean）及び肥満モデル（*fa/fa*））を用い *CFABP*、*RBP*、*SCD1* および *SCD2* 発現の組織局在性をノーザンブロットで解析し、いずれの遺伝子も脂肪組織において比較的高いレベルで発現していることを見出した。

3．統計解析に充分な個体数を用い、*CFABP*、*RBP*、*SCD1* および *SCD2* 高発現組織での肥満病態による発現量変化を定量リアルタイム PCR 法により解析した（図2）。肥満ラットでの *CFABP* 発現は白色脂肪組織で増加したことから、*CFABP* は肥満発現に重要な役割を持つことが示唆された。また、脂肪組織 *SCD1* の肥満病態での発現は大きく増加し、*SCD2* でみられる変化と比較してはるかに大きかった。よって *SCD1* が *SCD2* と比較し、脂肪組織での脂肪沈着に伴う脂質代謝変化により大きな役割を持つことが示唆された。白色脂肪組織での *RBP* 発現は肥満ラットで増加あるいは増加傾向を示した。一方、高発現組織である肝臓での発現量に変化はみられなかった。血清レチノール濃度が肥満ラットで増加する観察と併せ、白色脂肪組織での *RBP* 発現変化がレチノール代謝に重要な役割を持つ可能性が示唆された。

[成果の活用面・留意点]

ジーンチップ解析により見出された高脂肪食で発現が抑制される遺伝子、*CFABP*、*RBP*、*SCD1* および *SCD2* の発現の組織局在性を明確とし、またその発現が肥満病態により変化することを示した。得られた知見は、これら遺伝子が生体のエネルギー代謝やレチノール代謝の制御に重要な役割を果たすことを示す基礎情報であり、肥満の予測や診断分野にも利用できる可能性がある。

[具体的データ]

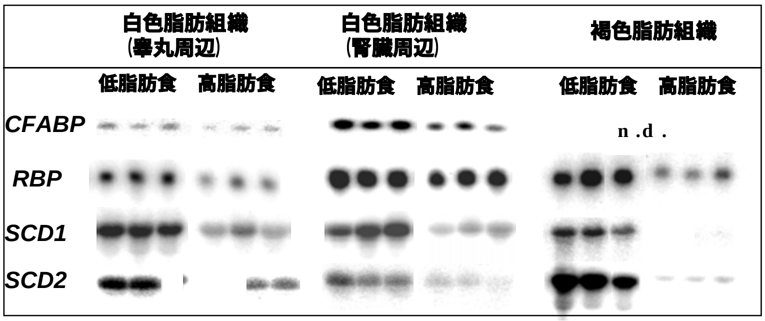


図1．ジーンチップ上で選抜した遺伝子のノーザンブロット解析
CFABP：皮膚型脂肪酸結合タンパク質
RBP：レチノール結合タンパク質
SCD：ステアロイル-CoA不飽和化酵素

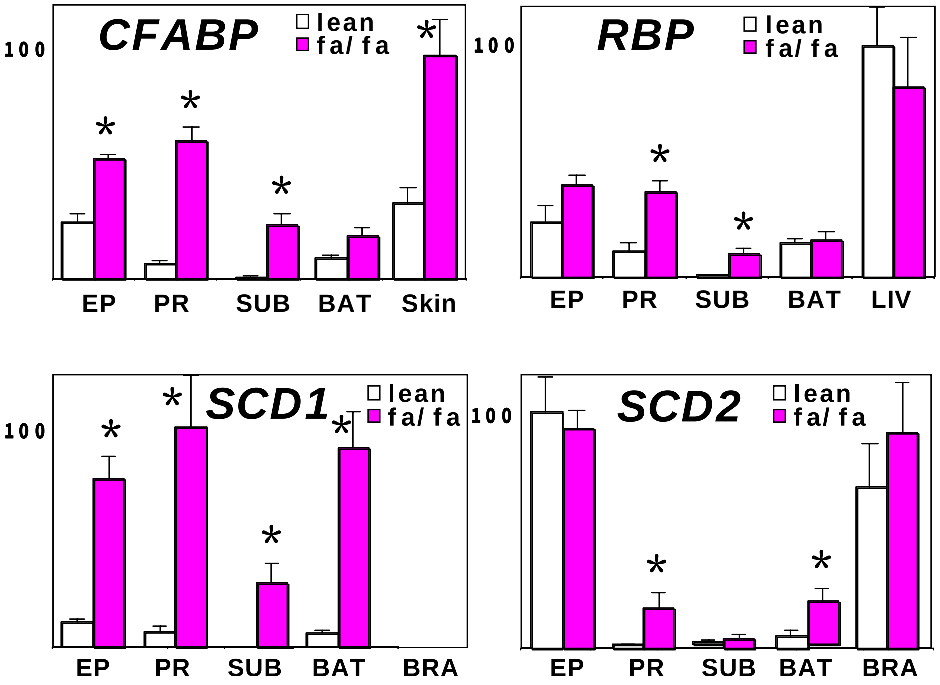


図2．Zucker正常(lean)及び肥満(fa/fa)ラット組織別遺伝子発現量のリアルタイムPCR解析
CFABP：皮膚型脂肪酸結合タンパク質、RBP：レチノール結合タンパク質、SCD：ステアロイル-CoA不飽和化酵素
EP：睾丸周辺白色脂肪組織、PR：腎臓周辺白色脂肪組織、SUB：皮下白色脂肪組織、BAT：褐色脂肪組織、Skin：皮膚、LIV：肝臓、BRA：脳
* を付した値は、正常ラットの値との間に $p<0.05$ の有意差があることを示す

[その他]

研究課題名：栄養バランスが脂質エネルギー代謝関連遺伝子発現に与える影響の解明
予 算 区 分：委託・バイテク先端技術「食品総合」
研 究 期 間：2002～2004 年度（2003 年度）
研究担当者：久城真代、高橋陽子、井手隆
発表論文等：

1）Y. Takahashi, M. Kushiro, K. Shinohara, T. Ide： Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid, Biochimica et Biophysica Acta1 631, 265-273, 2003
2）Y. Takahashi, M. Kushiro, T. Ide： Effect of dietary protein on adipose tissue gene expression in mice, 食品総合研究所報告 68 巻、 印刷中、 2004
3）M. Kushiro, Y. Takahashi, T. Ide： Species dependence in the physiological activity of dietary lignan (sesamin and episesamin) in affecting hepatic fatty acid metabolism, British Journal of Nutrition 91, 印刷中、 2004

[成果情報名]　齧歯類（ラット・マウス）の皮膚を用いて炎症の強さを迅速・高感度に測る

[要　　約] 蛍光色素(FITC)でラベルしたアルブミンを用いてラットの皮膚の炎症状態を血管透過性の亢進を指標にして測定する簡易な方法である。

[部　　署] 食品総合研究所・食品機能部　機能成分研究室

[連 絡 先] 029-838-8055　yuko@nfri.affrc.go.jp,　masaogot@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 参考

[キーワード] 炎症、血管透過性、ラット、蛍光プレートリーダー

[背景・ねらい]

食品のアレルギー・炎症の抑制効果を明らかにするにあたり、炎症によって引き起こされる血漿成分の血管外漏出を測定し、血管透過性の多寡を検討することは効果的な手法である。

しかし、これまで血管透過性の測定に使用されてきた染色色素を用いる方法は、色素を皮膚からアルカリ加水分解により抽出し、中和した後に比色するという煩雑な操作が必要であり、感度も低い。そこで、高感度かつ迅速に測定ができ、さらには有害な物質の使用を最低限に抑えた測定方法の開発を目的とする。

[成果の内容・特徴]

1．この血管透過性測定方法は，蛍光色素であるFITC（フルオロセインイソチオシアネート）でラベルした牛血清アルブミンをラットの尾静脈に投与し、血漿成分の漏出の指標として蛍光プレートリーダーで測定するものである（図２）。

2．従来法で用いていた変異原性を有する染色色素（ダイレクトブルー）に代わり、蛍光ラベルしたアルブミンを用いることから、安全かつ感度が高い。

3．色素の抽出操作（アルカリ加水分解およびその中和）が不要で、皮膚の光透過性を高めるために用いる有機溶媒は極少量で済む。

4．多検体を同時に測定できる蛍光プレートリーダーを用いることにより、簡易迅速な測定ができる。

5．起炎物質としてヒスタミンを皮内投与し、本法により血清漏出量を測定した。図１に示すように、起炎物質の量に応じ、血清漏出量が増加することから、血管透過性の測定が可能である。なお、本法における検出限界はヒスタミン200ng/site（ラット）、50ng/site（マウス）であり、それぞれ、10μg/siteおよび1.25μg/siteまで容量依存的な漏出量の増加が確認されている。

[成果の活用面・留意点]

本手法を用いた測定においては、24wellプレートの測定が可能な、蛍光プレートリーダーが必要である。尾静脈への蛍光色素の投与および起炎剤の皮内接種は（とくにマウスにおいて）、熟練を必要とする。

[その他]

研究課題名：ラット皮膚反応を用いた食品中の抗アレルギー成分の探索

予算区分：経常

研究期間：2001～2003年度（2003年度）

研究担当者：石川祐子、後藤真生、八巻幸二（現東北農研セ）

発表論文等：

1）Yamaki K, Ishikawa-Takano Y, Goto M, Kobori M, Tsushida T: An improved method for measuring vascular permeability in rat and mouse skin, J Pharmacol, Toxicol, Methods 48, 81-86 (2002)

2）八巻幸二、石川祐子：動物の血管透過性の高感度迅速測定方法、特許出願番号2003-287673

[具体的データ]

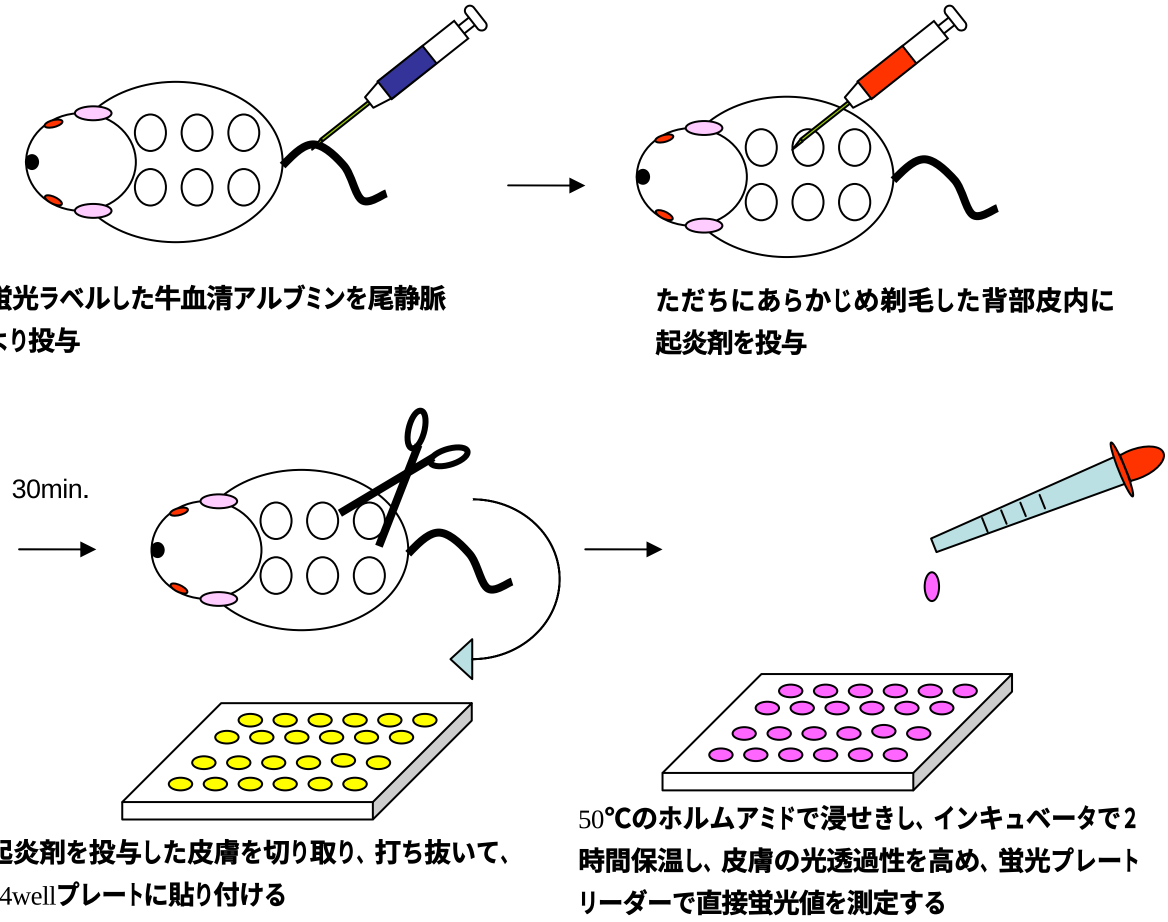
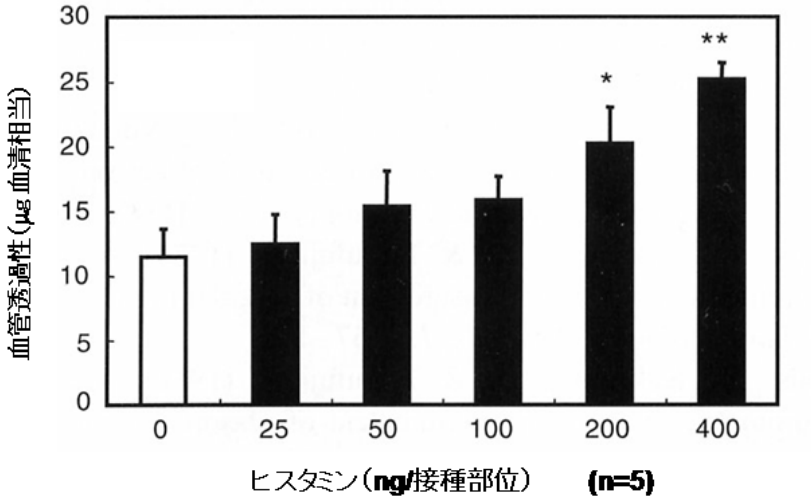


図１、測定の具体的方法



*** < 0.05, ** < 0.01**

図２、ラットにおけるヒスタミン投与による血管透過性の検出限界

[成果情報名] **マイコトキシン分析法の変遷と精度の向上:Proficiency Testingの結果からの解析**

[要　　約] アフラトキシン、オクラトキシンAの分析法とその真度に関して、WHOとFAPASの４半世紀のデータを解析した。その結果、分析法の中心が薄層クロマトグラフィーから、液体クロマトグラフィーに移ると共に、ｚスコアーで評価した分析の真度も大幅に向上していることが明らかとなった。また、この間、定量分析法としての酵素抗体法（ELISA）の利用は進んでいなかった。

[部　　署] 食品総合研究所・流通安全部・安全性評価研究室

[連 絡 先] 029-838-8085　nagasima@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 参考

[キーワード] アフラトキシン、オクラトキシン A、分析精度、分析法、Proficiency Testing

[背景・ねらい]

穀類等をカビが加害することで生じるマイコトキシンには種々のものが知られており、近年その規制に対する動きも急速なものがある。この規制を考えた時、実際の分析を行う分析機関の精度管理は、その規制の信憑性、食飼料の安全性を確保する上で重要なことである。そのため近年は、技能試験等によりその真度を評価、管理する方向が強まっている。しかしながら実際に用いられる分析法は多様であり、また変化も著しいものがあり、漠然と真度も向上しているのではと考えられてはいるものの、精密に検証されたことはなかった。そのため今回は、マイコトキシンの中でも特に高感度な分析が要求されているアフラトキシン（AF）およびオクラトキシンＡについて、その分析法の変化とそれに伴っての真度の変化を検討し、実際に用いられている分析法がどのように変遷し、その真度はどうなって来たのかを明らかにした。

[成果の内容・特徴]

世界保健機構（WHO)、および英国中央科学研究所（CSL)によるProficiency Testing（FAPAS)のデータを元に、AFB_1、AFM_1及びオクラトキシンＡの分析法の変化、及びその間の真度の変化を検証した。とうもろこし中のAFB_1については、1978年、1989年のWHO及び2002年のFAPASのデータを、小麦中のオクラトキシンＡについては1988年のWHO、2003年のFAPASのデータを解析に用いた。分析法に関しては可能な範囲で記載されている参照文献に当たり、検出法を確認した。また分析結果の評価は、データを比較するために統一し、現在FAPASで用いられている方法で基本となる統計量を求め、その値を元にｚスコアーで評価する方法を用いた。

トウモロコシおよびピーナツ中のAFB_1の分析では、1978年には９０％程度の機関が薄層クロマトグラフィー（TLC)を用いていたが、1989年では約５０％、2002年には１０％以下となった。この間に液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた結果は、５％程度から８０％を超えるようになっていた。ELISAによる分析は1989年、2001年とも１０％以下であった。この間に分析が良好に行われていることの目安として考えられる$|z|\leqq 2$のデータの割合はトウモロコシでは５０％から８０％程度に増加していた。

粉乳中のAFM_1では、分析の要求感度の問題もあり、HPLCの使用割合がより高く、また真度の向上もより急速（1989年、４３％、2002年、７４％）であった。また小麦中のオクラトキシンAに関しても、AFM_1とほぼ同様の傾向が見られた。

[成果の活用面・留意点]

今回の解析では、各々のデータセットを出した時の参加分析機関についての解析をしていない。このため、データを提出した分析所の性格、変化によるデータへの影響は解析されていない。またあくまでも全体として真度が向上していることを示すものであり、個々の分析機関の真度に関しては、個々の分析機関の管理にゆだねられる。また、分析法に関しても、TLCによる分析の真度が、HPLCによる分析の真度に対して劣るといったことを示すものでもない。

[具体的データ]

表１．解析に用いたデータおよび解析結果の概要

分析対象	マトリックス	プログラム	実施年	平均値 (μg/kg)	データ数	|z|≦ 2 の割合 (%)
ｱﾌﾗﾄｷｼﾝ B_1	ﾄｳﾓﾛｺｼ	WHO No. 78-2	1978	14.9	111	50
		WHO No. 89-1	1989	111	221	62
		FAPAS 0446	2002	6.78	71	82
	ﾋﾟｰﾅﾂ	WHO No. 78-1	1978	8.44	109	60
		WHO No. 89-2	1989	13.0	201	62
		FAPAS 0447	2002	4.19	101	77
ｱﾌﾗﾄｷｼﾝ M_1	粉乳	WHO No. 89-3	1989	0.49	117	43
		FAPAS 0445	2002	0.26	74	74
ｵｸﾗﾄｷｼﾝ A	小麦粉	WHO No. 87-4	1988	182	103	57
		FAPAS 1721	2003	6.61	85	85

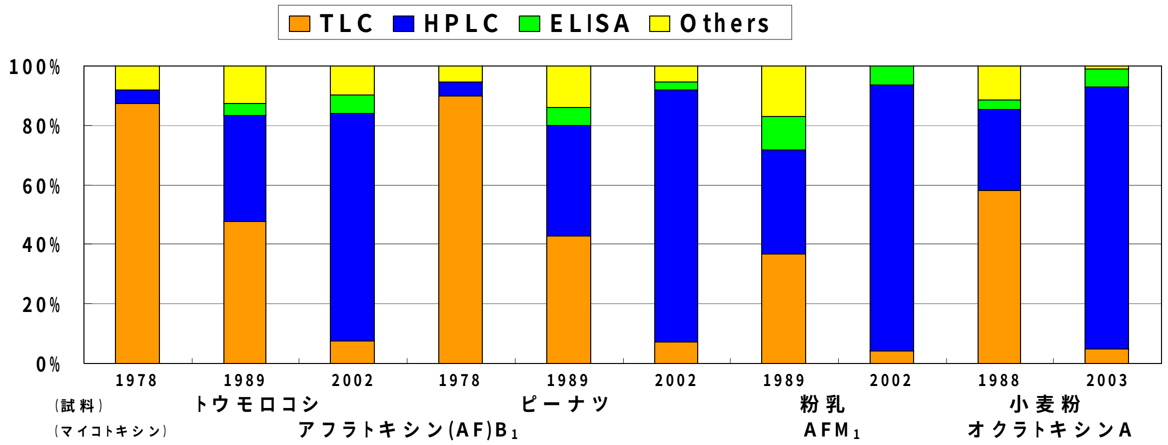


図１．WHO、FAPAS の分析で用いられた分析法の変化

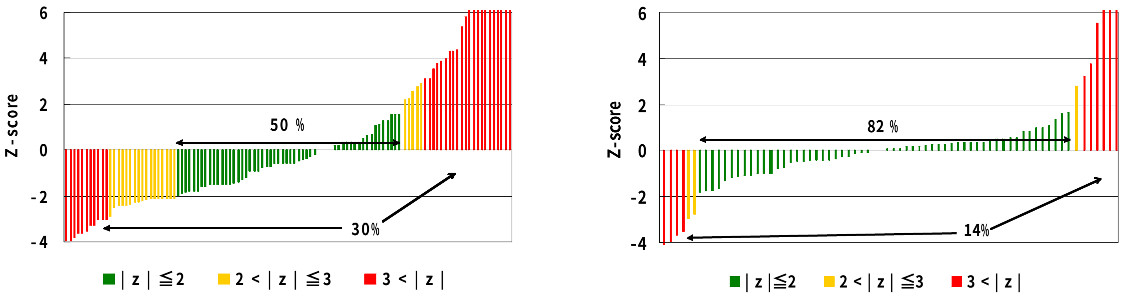


図２．トウモロコシの AFB_1 分析におけるｚスコアーの割合の変化（左：1978 年、右：2002 年）

[その他]

研究課題名：精度管理における試料調製と基準値確認に向けて高精度分析法の開発

予 算 区 分：食品総合

研 究 期 間：2002～2004年度（2003年度）

研究担当者：後藤哲久、長嶋等

発表論文等

１）Y. Honma, S. Naito, A. Earnshaw, H. Nagashima and T. Goto: Progress in the acuracy of mycotoxin analysis in the last quarter century, Mycotoxins, 54 (1) 33-38 (2004)

[成果情報名] **倒伏浸水したイネからの玄米のマイコトキシン汚染**

[要　　約] コメは、マイコトキシン汚染の少ない穀物である。ところが、1998年には、台風で倒伏し水に浸かった稲があり、得られた玄米の多くは褐色に着色していた。この年は、国内ではムギの赤かび病が大発生した年でもあったので、このコメについてトリコテセン系マイコトキシンの抽出を行い、分析した。その結果、デオキシニバレノール（DON）、フザレノン-X（Fus.-X）、ニバレノール（NIV）のトリコテセン系マイコトキシンが検出された。コメでのDONの汚染は報告されているが、 Fus.-Xの汚染報告は初めてである。

[部　　署] 食品総合研究所・流通安全部・微生物制御研究室

[連 絡 先] 029-838-8069　kjtanaka@nfri.affrc.go.jp

[成 果 区 分] 参考

[キーワード] 浸水、コメ、マイコトキシン汚染、GC-MS

[背景・ねらい]

コムギに*Fusarium*属菌が感染すると赤かび病が発生し、しばしばデオキシニバレノール（DON）やニバレノール（NIV）等のトリコテセン化合物に汚染される。1998年には、コムギの赤かび病が多発した。この年、台風が襲来し稲が水に浸かるという事故が発生し、籾すりをした玄米が褐色になったものがあった。コムギが赤かび病になった田圃では*Fusarium*属菌が多く残っていると考えられ、この玄米に赤かび病菌が感染しトリコテセン汚染が起こっていることが推察されたので、分析を行った。

[成果の内容・特徴]

1．コメはマイコトキシン汚染の少ない穀物であるが、上記の玄米をトリコテセンについて分析した結果、DON、フザレノン-X（Fus.-X）、 NIVのトリコテセン系マイコトキシンが検出された。確認するため、標準トリコテセンをTMS化したものと玄米からの抽出物をRomers社製の#227のカラムを使用し精製した濃縮物をTMS化して、GC-MSで分析した。結果を図１に示した。左側部分は、TMS化した標準トリコテセンのトータルイオンクロマトグラムとDON、Fus.-XおよびNIVのマススペクトルを示しており、右側部分は、TMS化した玄米抽出物のトータルイオンクロマトグラムとPeak 1、Peak 2、Peak 3のマススペクトルを示している。このように、Peak 1はDON、Peak 2はFus.-X、Peak 3はNIVとマススペクトルが一致したので、分析した玄米中にはこれらのマイコトキシンが含まれていたことが明かとなった。

2．ECD-GCで分析したトリコテセンの含有量は、表１に示した。No.2のサンプルでは、DON、Fus.-XおよびNIVがかなりの濃度で含まれていた。

3．コメでのDONの汚染は報告されているが、 Fus.-Xの汚染報告は初めてである。

[成果の活用面・留意点]

異常な状態の玄米からではあるが、トリコテセン系マイコトキシンが検出された。コメは籾殻に包まれ、今まではマイコトキシン汚染は少ないと考えられてきた。今後は開花期、収穫期などに多雨な時期を過ごしたコメについては、マイコトキシン汚染の可能性を考えていかなければならないと思われる。倒伏したイネが浸水した場合の対処法は、トリコテセン系マイコトキシンの汚染が考えられるので、着色していればそのまま食用とすることは、見合わせた方がよいであろう。

[具体的データ]

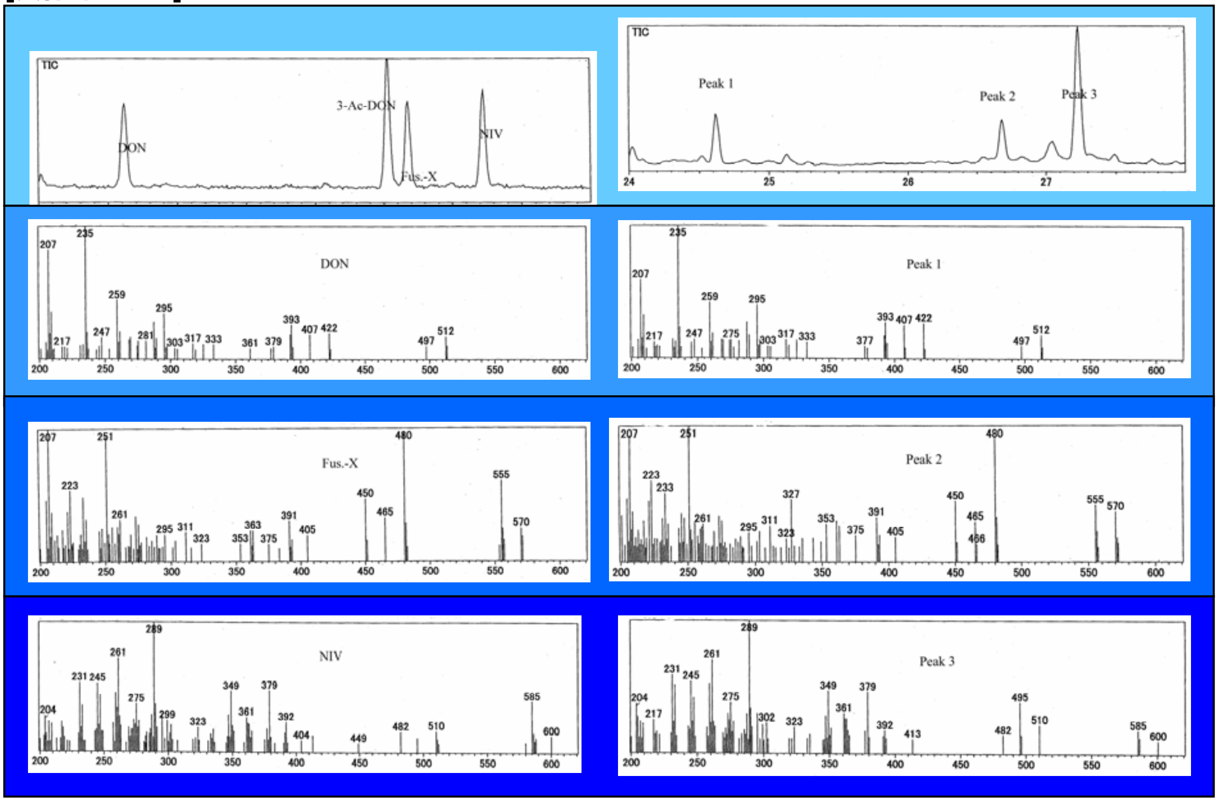


図１．TMS 化した標準トリコテセンおよび玄米抽出物のトータルイオンクロマトグラムとマススペクトル
左側の図は標準トリコテセンから，右側の図は玄米抽出物から得られた。

表１．倒伏し水に浸かった日本産米からのトリコテセンの自然汚染

玄米サンプル	DON (μg/g)	Fus.-X　(μg/g)	NIV (μg/g)
No. 1	0.12	**非検出***	0.20
No. 2	2.9	1.9	2.2

*非検出-----検出限界 0.02 μg/g

[その他]

研究課題名：マイコトキシンの分析法の開発と汚染防止技術の開発（食品総合）

予 算 区 分：食品総合

研 究 期 間 ：2003～2004 年度（2003 年度）

研究担当者：田中健治

発表論文等：

１）田中健治、小林秀誉、永田忠博、真鍋　勝：2004.1.23、倒伏し水に浸かった日本産米のトリコテセン自然汚染、第 55 回マイコトキシン研究会学術講演会、一般演題４

２）Tanaka K., Kobayashi H., Nagata T., Manabe M.,: Natural occurrence of trichothecenes on lodged and water-damaged domestic rice in Japan, J. Food Hyg. Soc. Jpn., 45(2)　(掲載予定)

[成果情報名]　大豆ホエー熱可溶性タンパク質の凍結変性保護効果

[要　　約] 大豆から分画調製したホエー熱可溶性タンパク質は牛血清アルブミンと同程度の凍結変性保護活性をもち、その主要成分はデハイドリンである。

[部　　署] 食品総合研究所・食品素材部・タンパク質素材研究室

[連　絡　先] 029-838-8051　michiko@affrc.go.jp

[成果区分] 参考

[キーワード] 凍結変性保護タンパク質、大豆ホエー、デハイドリン

[背景・ねらい]

大豆には、βーアミラーゼやレクチン等の様々な活性をもつタンパク質が存在し、その多くはホエー画分に含まれる。私たちはこれまでに、ホエータンパク質のひとつとしてデハイドリン（グループ 2LEA タンパク質）を見出し、その特性を明らかにしてきた。デハイドリンは凍結や乾燥から組織を保護する働きがあるとされ、食品の品質保持等への応用が期待される。本課題では、大豆タンパク質からデハイドリンを効率的に単離する方法を検討した。

[成果の内容・特徴]

１．大豆粉末から酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.2)によりホエータンパク質を抽出し、これを沸騰水中で 10 分間加熱、遠心分離し、ホエー熱可溶性画分を得た。ホエー画分では、大豆の主要タンパク質であるグリシニンとβコングリシニンが等電点沈殿により除去され、酵素類やトリプシンインヒビター等が主成分となる。ホエー熱可溶性タンパク質画分では、26kDa デハイドリンが主要タンパク質として検出され、その他にプロテアーゼインヒビターやいくつかの未同定の耐熱性タンパク質が含まれる（図１）。

２．凍結保護作用の指標とされる、ウサギ筋由来乳酸脱水素酵素の凍結融解失活に対する保護活性を測定した（図２）。ホエー熱可溶性タンパク質の CP_{50} 値(酵素活性を 50%保持するのに必要なタンパク質濃度)は 15.8μg/ml で、牛血清アルブミンと同程度の保護活性をもつことが明らかとなった。これは、水溶性タンパク質の約 20 倍、精製ダイズデハイドリンの約 1/3 の活性に相当し、簡便な分画処理により凍結変性保護成分が効率的に濃縮されることが示された。

[成果の活用面・留意点]

大豆タンパク質から、牛血清アルブミン度と同程度の凍結変性保護活性をもつ、ホエー熱可溶性タンパク質画分を得た。電気泳動パターンから、保護活性はデハイドリン含量を反映しているものであるが、デハイドリン以外にも未同定の耐熱性タンパク質も含まれており、これらのタンパク質が、ある程度寄与している可能性も考えられる。

[具体的データ]

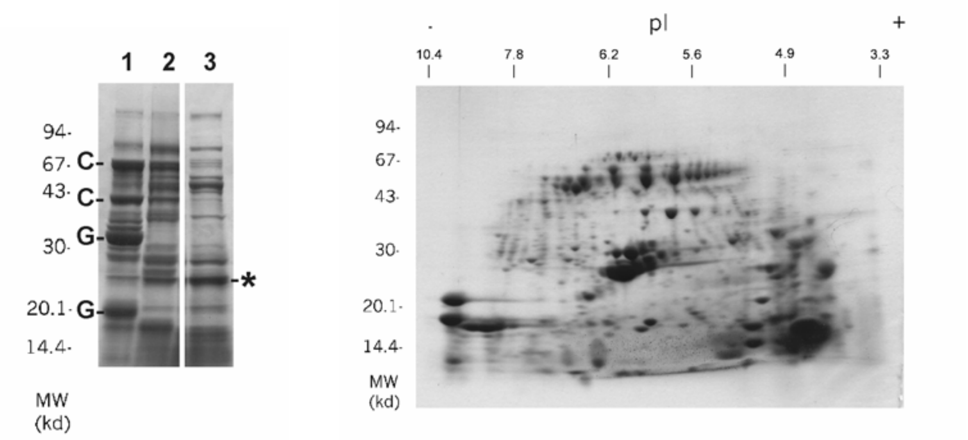


図1. 大豆熱可溶性ホエータンパク質の SDS-PAGE (左) と二次元電気泳動 (右)

1, **水溶性画分** 2, **ホエータンパク質** 3, **熱可溶性ホエー画分**

C, **βコングリシニン**;G, **グリシニン**;*, **デハイドリン**

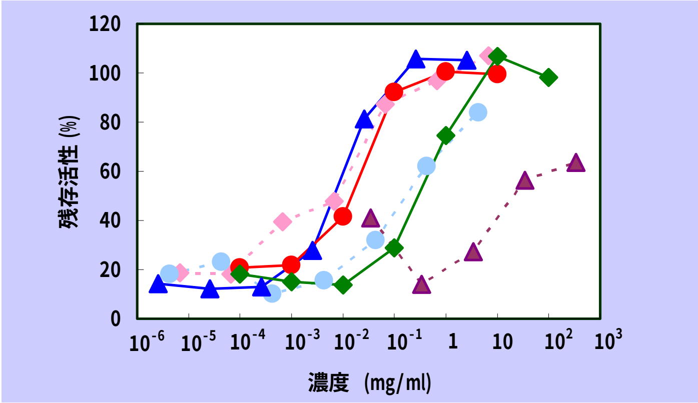


図2. 乳酸脱水素酵素に対する保護活性

◆大豆水溶性画分 ●大豆熱可溶性ホエー
▲精製デハイドリン ◆牛血清アルブミン
●卵白アルブミン ▲ショ糖

[その他]

研究課題名：大豆熱可溶性タンパク質の理化学的特性の解明

予 算 区 分：経常

研 究 期 間：2002～2005 年度（2003 年度）

研究担当者：門間美千子

発表論文等：

1）門間美千子：大豆ホエー熱可溶性タンパク質の凍結変性保護効果、日本食品科学工学会誌、50(9)、pp.428-430 (2003)

2）M.Momma 他：Peptide Mapping and Assessment of Cryoprotective Activity of 26/27-kDa Dehydrin from Soybean Seeds, Biosci. Biotech. Biochem., 67(8) p.1832-1835 (2003)

3）門間美千子：米糠に含まれるグループ２LEA タンパク質（デハイドリン）の二次元電気泳動と乳酸脱水素酵素に対する凍結変性保護活性、 食品総合研究所研究報告、 67, p.15-20 (2003)

[成果情報名] **アビジン遺伝子を導入したイネの玄米は貯穀害虫の成育を阻害する**

[要　　約] 鶏卵の糖タンパク質であるアビジンの遺伝子を導入した形質転換イネの玄米は、貯穀害虫であるヒラタコクヌストモドキに対して虫害抵抗性を示す。

[部　　署] 食品総合研究所・食品素材部・穀類特性研究室、流通安全部・食品害虫研究室

[連　絡　先] 穀類特性研究室029-838-8045　kenohtsu@nfri.affrc.go.jp

URL　http://www.nfri.affrc.go.jp/guidance/soshiki/sozai/kokuruitokusei.html

[成 果 区 分] 参考

[キーワード] アビジン、米、貯穀害虫防除、遺伝子組み換え

[背景・ねらい]

収穫した米に対して、貯穀害虫による被害を防ぐために薫蒸剤が使用される場合がある。近年、消費者側の安全性志向、また環境調和型の農業が求められている中で、化学薬剤の過剰な使用は問題である。農薬・燻蒸剤の使用を低減させる一つの手段として、遺伝子組み換えにより、イネに虫害抵抗性を賦与することが考えられる。鶏卵に含有されている糖タンパク質であるアビジンは、ビオチンと強固に結合する性質を持ち、このアビジンを害虫が摂取すると、成育に必要なビオチンが欠乏するので成育が抑制される。イネにこのアビジン遺伝子を導入すれば、その米は虫害抵抗性を持つことが期待できる。

[成果の内容・特徴]

１．導入した遺伝子は、オオムギαアミラーゼのシグナル配列を付加したアビジン遺伝子である。形質転換イネの作出は、「日本晴」を宿主としたアグロバクテリウム法による。

２．形質転換イネの特徴は、種子（玄米）でアビジンが合成され、葉では合成されないので植物体の成育を阻害しないことである（図－１）。

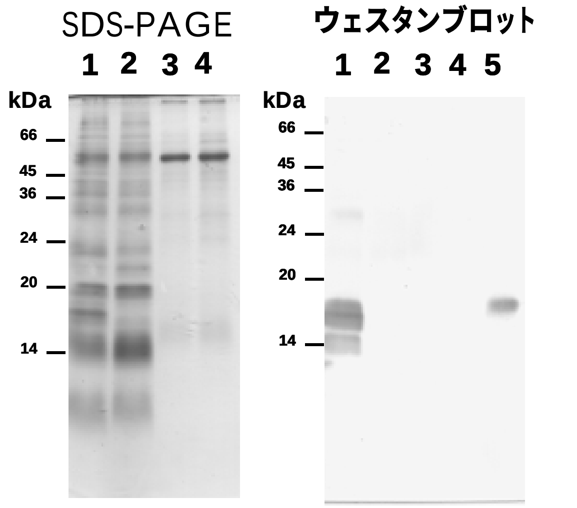
３．玄米に含まれるアビジン含量は、No.17系統において平均113ppmであった（図－２）。No.17系統は、作出した18系統の中で、最も高い含有量を示した。

４．形質転換イネの虫害抵抗性については、No.17系統の玄米粉を用いて、ヒラタコクヌストモドキの飼育試験を行った（表－１、図－３）。供試した20頭のうち、アビジン玄米粉を用いた試験区では成虫となる個体はなく、全て死亡し、アビジン玄米に虫害抵抗性があることが判明した。

[成果の活用面・留意点]

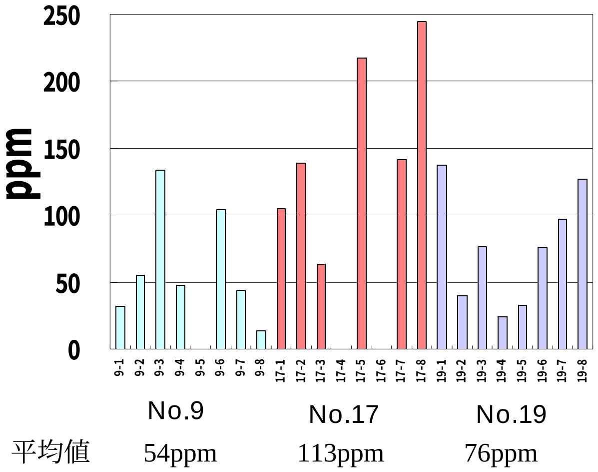
特に米の低温保管が困難な場合に有効な技術であると考えられる。なお、コメ中のアビジンは炊飯により失活しビオチン結合能が無くなることは確認済みであるが、今後、実用化するためには環境への影響やヒトへの安全性の確認が必要である。

[具体的データ]



図－１アビジンが合成されるイネの部位

１：アビジン形質転換体・玄米、２：対照・玄米、３：アビジン形質転換体・葉、４：対照・葉、５：標準アビジン



図－２ELISA によるアビジン含量の測定

８個体ずつ測定した。No.9、No.17、No.19 の結果。表示した数値は平均値。

表－１　アビジン米を餌としたヒラタコクヌストモドキ飼育試験

	生存個体頭数	羽化した成虫頭数	幼虫の体重（μg）
	２週間後	１ヶ月後	２週間後
アビジン米	２(10%)	０(0%)	１３０
対照米	１８(90%)	１６(80%)	４３４

図－３ヒラタコクヌストモドキ

[その他]

研究課題名：酵素阻害タンパク質遺伝子の複合導入による病虫害抵抗性イネの作出

予 算 区 分：次世代型植物

研 究 期 間：2001～2003年度（2003年度）

研究担当者：與座宏一、大坪研一、今村太郎、宮ノ下明大

発表論文等：

１）與座ら：アビジンをコードする人工合成遺伝子、特許出願、2003-159214号、平成15年６月４日

２）與座ら：アビジン遺伝子導入イネ玄米による貯穀害虫ヒラタコクヌスモドキの生育阻害効果、農芸化学会(2004)

[成果情報名]　食生活における脳機能研究への近赤外分光分析法(NIRS)の応用

[要　　約] リンゴの皮むきに伴う脳活動を NIRS で計測し、大脳皮質運動領域に加えて、前頭前野が活性化していることを初めて見出した。NIRS は食生活における脳機能研究に有効な方法である。

[部　　署] 食品総合研究所・食品工学部・製造工学研究室

[連　絡　先] 029-838-7357　dan@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 参考

[キーワード] 近赤外分光分析法、NIRS、脳機能、リンゴ、皮むき、食生活、調理

[背景・ねらい]

人間の食生活は様々な脳の働きによって支えられている。しかし、食生活における脳活動を測定することは技術的に困難であったため、これまで、食生活を脳活動の観点から捉えた研究はなかった。一方、近年開発の進んでいる、近赤外分光分析法（NIRS）による脳活性の測定は、従来の脳機能計測法に比べて拘束性が低く、食生活と脳活動の関係を調べる上で、有用な手法となる可能性があった。そこで、食生活における重要な要素である調理活動の代表例として、リンゴの皮むき時における大脳皮質の活性化パターンを、NIRS を用いて調べた。

[成果の内容・特徴]

１．これまでの脳研究における知見を考慮すると、リンゴの皮むきといった、複雑な運動に関しては、運動野、運動前野、補足運動野といった、大脳皮質の運動関連領域での活性が予想されるが、本研究では、これらに加えて前頭前野での活性化が起こるかどうかを調べた。

２．従来の脳機能測定法との対応を取るために、機能的磁気共鳴画像法（fMRI）と NIRS の同時測定を試みた。fMRI 環境下では、安全上の理由から「リンゴの皮むき」は行えないため、「リンゴの皮むきのまね」をする際の脳活性化パターンを調べた（図１）。この結果、運動野、運動前野、補足運動野といった、運動関連領域に顕著な活性がみられたが、前頭前野では活性化は認められなかった（図２）。

３．NIRS のみの測定（図３）によって、「リンゴの皮むき」をする際の前頭前野での脳活性化を調べたところ、有意なレベルでの脳活性が認められた（図４）。

４．これらにより、リンゴの皮むきは前頭前野の活性化を伴う活動であることが分かった。

５．前頭前野のどのような機能に関するか、本研究では詳細な因果関係の解析はできないが、「危険な刃物の動きに注意を向けつつリンゴを微妙に動かす」といった作業が、前頭前野のワーキングメモリー（作業記憶）を活性化している可能性が高いと推定している。

６．NIRS は、「リンゴの皮むき」といった食生活に伴う脳活動の計測に有効である。

[成果の活用面・留意点]

１．食生活に伴う脳活動を客観的に記述することが可能となり、食生活を脳活動の観点から捉えるための端緒が得られた。

２．現時点の脳機能研究における知見の範囲では、「リンゴの皮むきが脳機能向上に役立つ」という解釈は短絡的であり、このような解釈は避けるべきである。

３．「食生活を通じて様々な脳の部位を使う」という指針を明示した上で、運動領域に加えて前頭前野の活性化を誘起するために、リンゴの皮むきや、それに類する調理活動を行うといった目的には、本知見を活用することは可能である。

[具体的データ]

図1 fMRI環境下でのリンゴの皮むきのまね

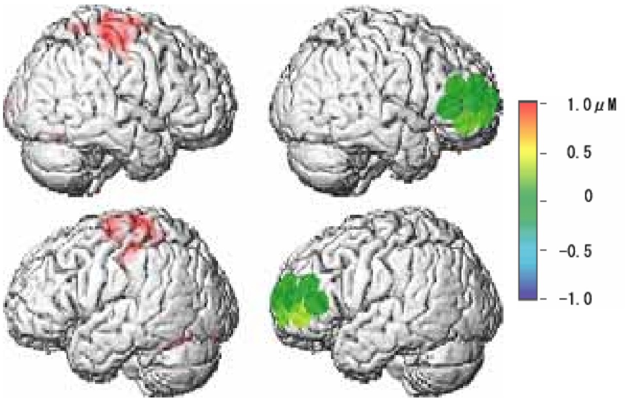


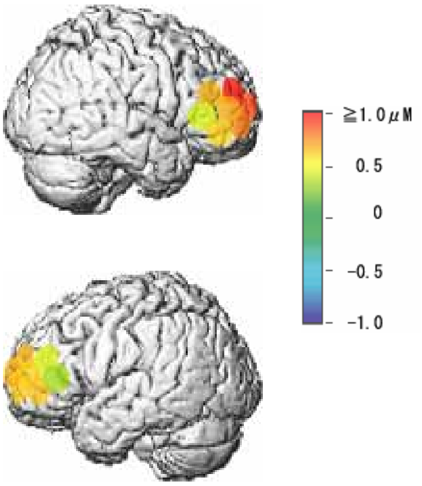
図2　NIRS, fMRI同時計測による、リンゴの皮むきのまねに伴う脳活動の測定

左の列の赤く示した領域が、fMRIで有意な活性を示した部位。運動領域を中心とした部位に活性化が認められる。右の列はNIRSによる前頭前野の測定領域を示している。カラーバーは脳の活性化を酸化ヘモグロビン濃度の上昇として表している。前頭前野には顕著な活性は認められない。

図3　NIRSによるリンゴの皮むき時の脳活動測定

図4　NIRSによる、リンゴの皮むきに伴う脳活動測定

NIRSによる前頭前野の測定領域を示している。カラーバーは脳の活性化を酸化ヘモグロビン濃度の上昇として表している。前頭前野の広い範囲で酸化ヘモグロビン濃度の上昇がみられる。



[その他]

研究課題名：健康長寿社会に向けた食品開発のための食品物性・感性科学的研究（生研センター）、ＮＩＲＳデータの確率的脳表投影法開発（NEDO）、重点領域調理工学（食総研重点領域研究）

予 算 区 分：生研センター・新技術新分野創出のための基礎研究推進事業、NEDO・産業技術研究助成事業、食総研・重点領域調理工学

研 究 期 間：2002～2003 年度（2003 年度）

研究担当者：檀一平太、岡本雅子、檀はるか、神山かおる、五十部誠一郎、鈴木建夫、坂本晋子（食総研）、清水公治、小田一郎、小西郁夫、武尾和浩、網田孝司（島津製作所）

発表論文等：

1）Okamoto, M. *et al.* :Multimodal assessment of cortical activation during apple peeling by NIRS and fMRI. NeuroImage, (2004), in press

[成果情報名]　ＤＮＡコメットアッセイによる放射線照射食肉の検知

[要　　約] 食品照射の線量範囲に適合したDNAコメットアッセイ用の画像解析ソフトを新規に開発した。ガンマ線照射した食肉の判別に応用し、DNAコメット像を自動判定で迅速解析し、得られた数値パラメータから、鶏肉および豚肉の照射の履歴の判定と線量推定ができる。

[部　　署] 食品総合研究所・食品工学部・電磁波情報工学研究室

[連 絡 先] 029-838-8047　setsuko@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 参考

[キーワード] 食品照射、検知、食肉、コメットアッセイ、画像解析

[背景・ねらい]

近年、国外では牛肉や鶏肉の放射線殺菌が実施されているが、国内ではこれらの処理が禁止されており、輸入食品の履歴保証の点から検知技術の確立が必要である。DNAコメットアッセイはスクリーニング法としてCodexの分析法にも採用されている簡便な方法で、顕微鏡画像の肉眼観察で照射の推定が可能とされている。しかし、実際の検査への導入にあたっては、個々の細胞画像を解析して数値化し、統計処理して記録・報告することが想定される。本研究では、DNAコメットアッセイにおいて、食品照射の線量範囲に適合した、画像解析ソフトを新規に開発し、実際の照射食品（肉類）の判別に応用した。

[成果の内容・特徴]

1．開発したのは、殺菌に用いられるkGyオーダーの放射線照射の検出にも有効な、大きなDNA損傷を検出できるアルゴリズムを搭載した、コメットアッセイ用の新規画像解析ソフトウエアである。

2．解析は、①画像の分析リストへの登録、②画像解析とパラメータ計算、③結果の保存の手順で進められる。100枚以上の登録画像を一括処理後、全解析画像データの保存と計算パラメータをCSV形式での書き出しが可能である。

3．画像解析アルゴリズムには、各細胞のDNA領域とバックグラウンドの自動識別、DNA中の核領域と損傷部領域の自動判別と中心位置の決定、核及び損傷部の面積と輝度の積算が組み込まれ、その結果から細胞の全長（Total Length）やモーメント（Tail Moment）などの解析パラメータを推算する（図１）。

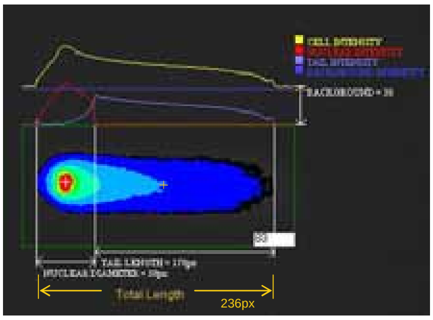
4．凍結下で0～5kGyの範囲でガンマ線照射した豚肉及び鶏肉について、図２の手順でコメットアッセイを行い、得られた顕微鏡画像の解析を行った。画像解析ソフトの導入により、各処理条件につき100枚の画像を120秒程度の速度で自動一括解析することができた。解析画像の例を示す（図３）。

5．解析パラメータ中､非照射1kGy以上の照射との差が大きいTotal lengthは照射の判別に有効であり､線量依存性が高いTail Momentは、線量推定に有効である（図４）。

[成果の活用面・留意点]

DNA コメットアッセイに画像解析システムを導入することで、照射食肉の迅速なスクリーニングが可能である。ただし、DNA 鎖の切断は、放射線照射以外の要因、凍結融解や加熱によっても生じるので、本法は一次スクリーニング法と位置づけ、DNA 切断が検出された場合は、化学分析法など他の方法による確認を行うことが望ましい。なお、開発したソフトウエアは、変異原性試験（アルカリコメットアッセイ）のデータ解析にも有効である。

[具体的データ]



Total Length ：細胞の全長
Ratio : 全輝度に対する損傷部 (Tail)輝度の比率
Tail Intensity/Cell Intensity
Tail Distance ：核の中心からTailの中心までの距離
Tail Center – Nuclear Center
Tail Moment ：モーメント Tail Distance ＊Ratio

図1．解析パラメータの定義

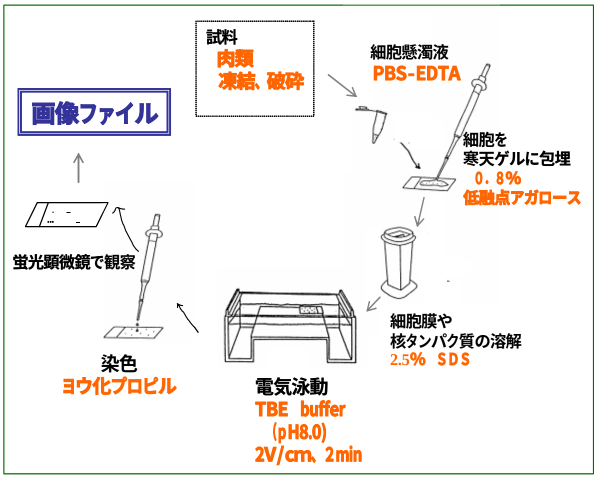


図2．コメットアッセイの流れ（EN13784 に準拠）

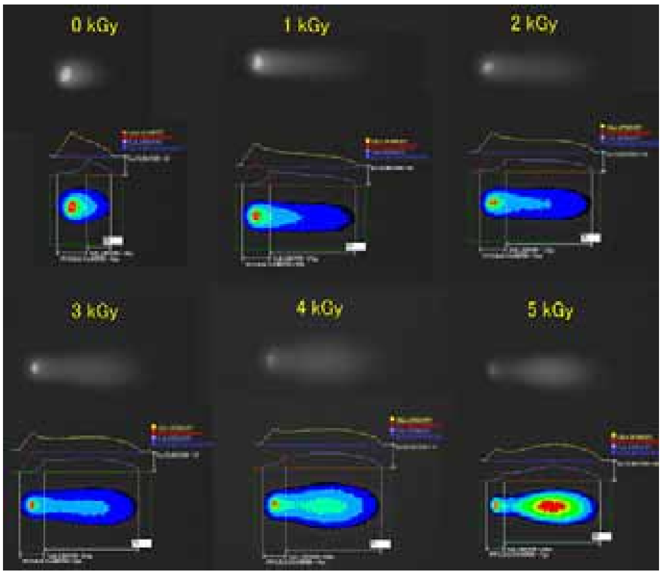


図3．ガンマ線照射した豚肉細胞のコメット像の解析例

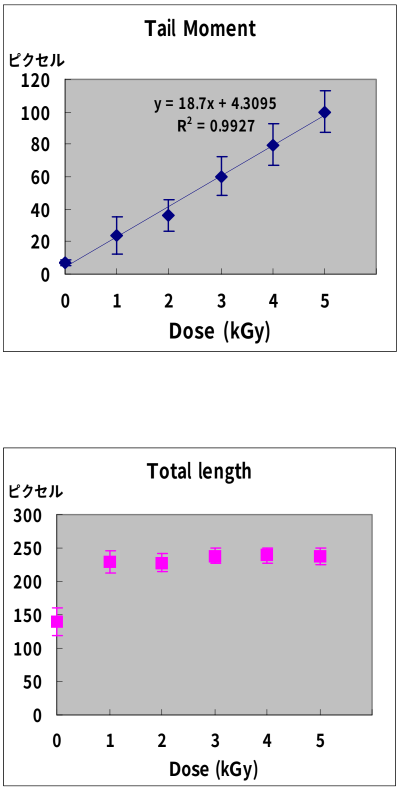


図4．解析パラメータの線量依存性

[その他]

研究課題名：化学分析法による放射線照射肉類の検出
予 算 区 分：農水省委託プロ（食品総合）
研 究 期 間：2003～2004 年度（2003 年度）
研究担当者：等々力節子、杉山純一、宇田渉（(有）ユーワークス)、吉本 英治（(有）ユーワークス）

[成果情報名]　**模擬的環境下における麹菌・パン酵母の生残性**

[要　　約]　土壌、廃水、生ゴミ処理等を模した模擬的環境を確立した。これらの環境中に麹菌胞子及びパン酵母を接種し、経時的に検出を行った結果、パン酵母は供試環境中で生残性が低いが､麹菌は土壌中及び廃水モデルにおいて長期にわたり残存することが明らかになった。

[部　　署]　食品総合研究所・応用微生物部・糸状菌研究室、酵母研究室

[連 絡 先]　029-838-8077　kusumoto@nfri.affrc.go.jp、029-838-8066　csuzuki@nfri.affrc.go.jp

[成 果 区 分]　参考

[キーワード]　麹菌、パン酵母、模擬的環境、生残性

[背景・ねらい]

乳酸菌、パン酵母、麹菌、納豆菌などの食品微生物においては、既に実用可能な組換え微生物が開発されているが、実用化のための安全性評価指針が策定されていない。食品あるいは有用物質生産等において組換え微生物を有効に活用するためには、開放系で利用する際の環境安全性について評価手法を確立する必要がある。ところが､これまでは実用株の環境中における動態等でさえほとんど知見が見られなかった。本課題では、食品微生物の組換え体の環境安全性評価の前段階として、麹菌およびパン酵母実用株の環境中における高感度な識別技術および土壌、廃水、生ゴミ処理等のモデル系を確立し、模擬的環境中におけるこれらの菌の生残性を評価することを目的とする。

[成果の内容・特徴]

１．模擬的環境としては、プラスチックボトルに入れた黒土あるいは川砂（25゜C）を土壌モデル、水道水を培養基質としたバッチ培養（5L、室温）を廃水のモデルとした。また生ゴミ処理のモデルとしては、家庭用の生ゴミ処理機に封じ込め対策および処理過程の測定装置を施し（図１）、モデル生ゴミ（野菜、果物、米飯、肉、魚を混合）の微生物分解過程のモニタリングが可能となった。

２．麹菌においてはピリチアミン耐性、パン酵母においてはシクロヘキシミド耐性のマーカーを付与した。麹菌は胞子懸濁液を、酵母では生細胞を、共に滅菌水で洗浄後、模擬環境中に接種した。サンプルを経時的に採取し、土壌及び生ゴミサンプルは滅菌水で抽出後、選択培地を用いて培養･検出を行った。

３．土壌モデル中および廃水モデルにおける供試実用酵母の生菌数は、接種後日数とともに同様に漸減し、モデル土壌では40 日、モデル廃水では25 日程度で計数限界以下にまで低下した（図２、図３）。

４．実用麹菌のモデル土壌中における生残性は高く、60 日以上に渡りほぼ同様の生菌数が検出された（図４）。廃水モデルにおいては約60 日に渡り検出された。モデル生ゴミ中では、28 日程度で検出限界以下に低下した（図５）。麹菌は使用環境によっては長期に渡り残存する可能性が考えられた。

[成果の活用面・留意点]

本課題では模擬的環境の構築、供試菌株の作出および供試菌株の検出法について検討し、模擬的環境における供試菌株の消長について試験研究が可能となった。本課題で検討された生残性評価手法は、実際の環境により近い環境条件下における生残性の評価に適応可能である。麹菌生菌数の正確な計測については、胞子形成や菌糸の断片化による残存菌数の過大評価の可能性があり、更に検討を要する。供試菌株の種類、消長の追跡期間、モデル環境の種類等、本課題の成果をふまえてさらなるデータの蓄積が必要である。

[具体的データ]

図１　生ゴミ処理機

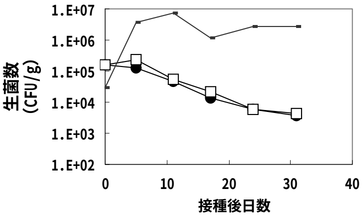


図２　モデル土壌中の酵母生菌数の推移

—●— 野生型株　—□— G418耐性株　—— 細菌

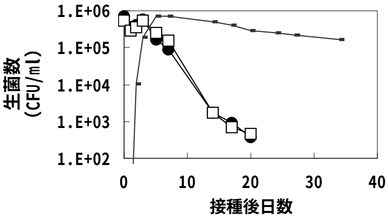


図３　モデル廃水中の酵母生菌数の推移

—●— 野生型株　—□— G418耐性株　—— 細菌

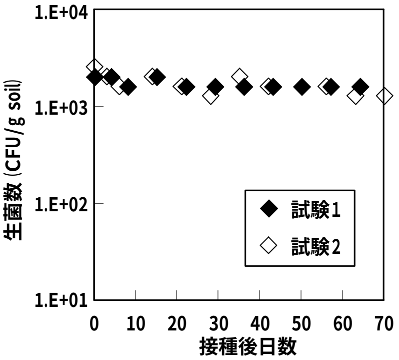


図４　黒土中の麹菌生菌数の変動

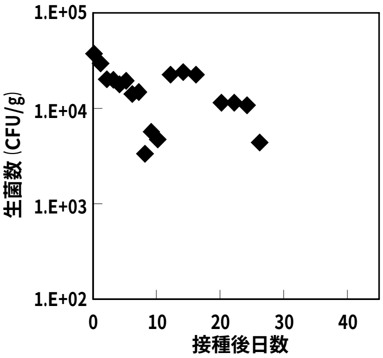


図 5　生ゴミ処理機運転中の麹菌生菌数の変動

[その他]

研究課題名：組換え微生物の環境安全性評価手法の開発に関する研究

予 算 区 分 ：組換え体安全性確保

研 究 期 間 ：2002～2003 年度（2003 年度）

研究担当者：楠本憲一、柏木　豊、島　純、鈴木チセ

発表論文等：

1）Kusumoto, K., *et al.*：Survivability of *Aspergillus oryzae* in the artificial environment. 11th European Congress on Biotechnology 2003, Abstract p701

2）楠本、栗原、木村、鈴木、柏木：麹菌の環境中における生存性について、平成 15 年度第 55 回日本生物工学会講演要旨集 p188

3）Kusumoto, K., *et al.*：High viability of *Aspergillus oryzae* in soil and tap water. *in preparation*

4）安藤　聡、岡野 江津子、島 純、鈴木 チセ：冷凍耐性製パン用酵母の環境中における生残性評価手法の確立、日本農芸化学会 2004 年度大会講演要旨集

[成果情報名] **新たに作出した麹菌用ジーントラップベクター**

[要　　約] 麹菌における網羅的遺伝子破壊株作成法及びその遺伝子破壊株の高効率選抜法を合わせて開発した。本手法を用いることにより、未知遺伝子の発見、その破壊株の取得及びその DNA 配列の取得を一度に行うことが出来る。

[部　　署] 食品総合研究所・応用微生物部・糸状菌研究室
[連 絡 先] 029-838-8077　satosuz@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 参考
[キーワード] 麹菌、ポストゲノム、遺伝子機能解析、タグライン

[背景・ねらい]

麹菌ではゲノム情報が明らかとなり、研究はポストゲノムの段階に入った。現在コンピューターによる遺伝子機能推定が行われているが、塩基配列の相同性の情報だけでは遺伝子機能を完全に解明することは出来ない。他生物においては、網羅的な遺伝子破壊株を収集した研究基盤が確立しており、研究者の依頼に応じて分譲され、それぞれの遺伝子機能解析に役立てられている。麹菌においても、そのような遺伝子破壊株の蓄積が必要であり、そのための網羅的遺伝子破壊法と、破壊株の効率的な選抜法の開発が求められている。

[成果の内容・特徴]

1．麹菌における網羅的遺伝子破壊株作成法の開発のため、麹菌用ジーントラップベクターを開発した。（図１）本ベクターはピリチアミン耐性をマーカーとし、レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質遺伝子を保持する。
2．本ベクターの特徴は、レポーター遺伝子の直前で切断、直鎖化した後にゲノム内にランダムに挿入した場合、ゲノム内在遺伝子を分断破壊し、そのコード領域に正方向に挿入された場合にのみ当該内在遺伝子のプロモーター配列を利用してレポーター遺伝子である緑色蛍光タンパク質を発現させるものである。
3．緑色蛍光を指標にすることにより、遺伝子破壊が成功した株のみを効率的に選抜することが可能である。
4．多数の遺伝子破壊株候補を 96 穴プレート上で培養し、蛍光画像解析装置による測定を網羅的に行い、遺伝子破壊に成功した株のみを高効率に選抜する方法を開発した。(図２)
5．本選抜法では、菌体量依存的に蛍光強度を増す赤色蛍光色素によって菌体を均一に染色することにより、計測時菌体量を定量し、菌体量あたりの緑色蛍光強度を算出する。遺伝子破壊株は緑色蛍光タンパクを発現するため、菌体量あたりの緑色蛍光強度の大きい株を選抜することにより、容易に遺伝子破壊株を得ることができる。
6．上記の二つの手法を用いて実際に遺伝子破壊株を取得した。(図３)

[成果の活用面・留意点]

本研究により開発された手法を用いることにより、網羅的に遺伝子を破壊した麹菌株の集団を高効率に得ることが出来る。本手法は麹菌の機能未知遺伝子の解析に有用であり既にいくつかの新規遺伝子について実績がある。現時点では麹菌遺伝子破壊株の情報は不十分であり、今後、本手法を多くの麹菌研究者に利用してもらうことにより、共通の研究基盤を拡充することが望まれる。本手法は麹菌の他、数種の糸状菌にも応用可能であり、利用を研究目的に限ることを条件に依頼により提供可能である。

[具体的データ]

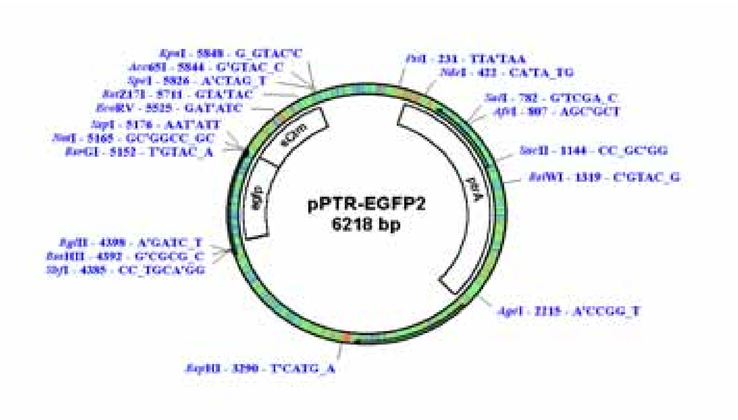


図１　ジーントラップベクター制限酵素地図

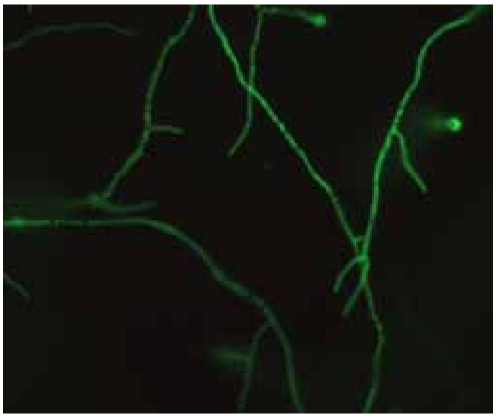


図３　遺伝子破壊株顕微鏡写真

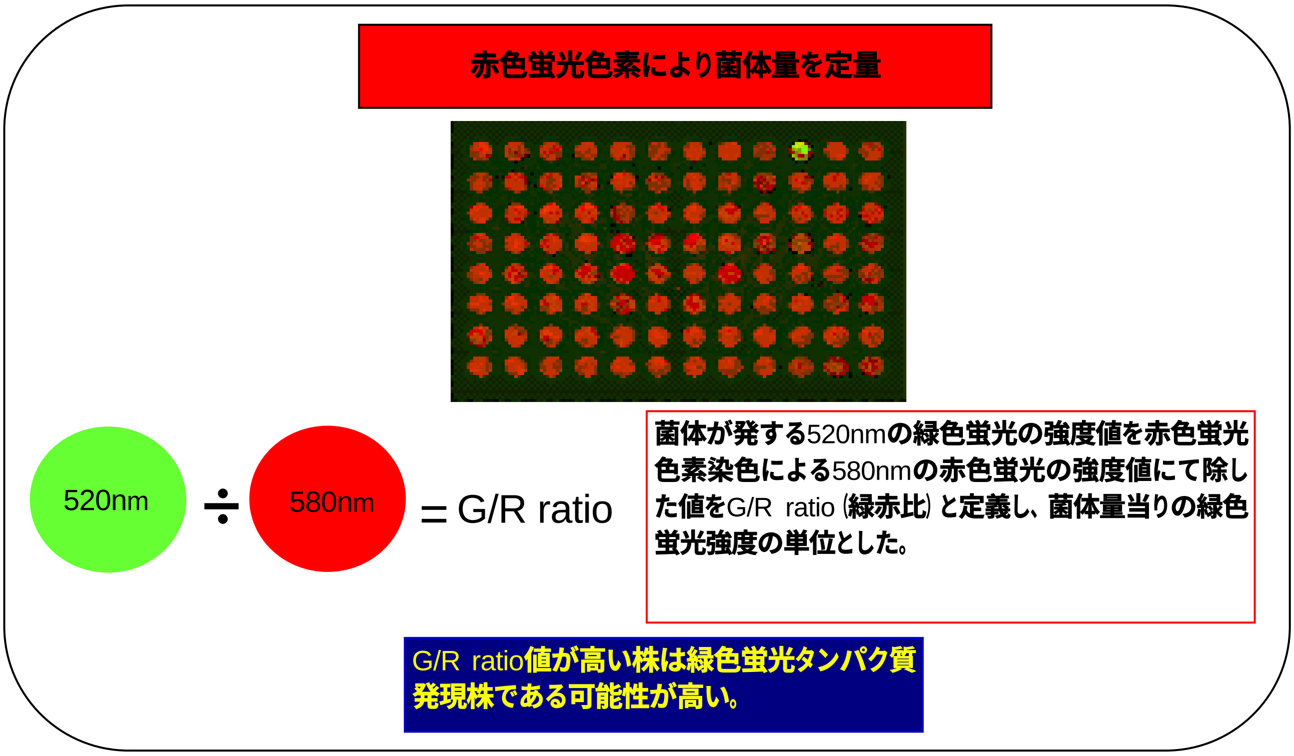


図２　遺伝子破壊株の高効率選抜法

[その他]

研究課題名：麹菌の形態変化にともなう高発現遺伝子の制御機構の解明

予 算 区 分：形態・生理プロジェクト

研 究 期 間：2001～2003 年度（2003 年度）

研究担当者：鈴木　聡、柏木　豊

発表論文等：

１）S. Suzuki, H. Taketani, K. Kusumoto, and Y. Kashiwagi: High-throughput Screening for Isolation of Enhanced Green Fluorescent Protein Expressing Transformants of Filamentous Fungus Using an Image Analyzer, J. Biosc. Bioeng., 96, 313-316 (2003)

２）S. Suzuki, K. Kusumoto and Y. Kashiwagi: Construction of a gene trap vector, pPTR-EGFP1, for the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*, Rep. Natl. Food Res. Inst., 67, 33-38 (2003)

３）柏木豊、楠本憲一、鈴木聡：特許　糸状菌の菌体量測定法　特願 2003-292703

[成果情報名]　納豆の粘質物の生産と分解を制御する機構

[要　　　約]　納豆菌のγ-グルタミルトランスペプチダーゼがポリグルタミン酸をエキソ型に分解する活性を有すること及び当該酵素遺伝子の発現がグルタミン酸によって抑制されることを明らかにした。

[部　　　署]　食品総合研究所・応用微生物部・発酵細菌研究室

[連　絡　先]　029-838-8075　yosifumi@nfri.affrc.go.jp

[成果区分]　参考

[キーワード]　納豆菌、粘質物、ポリグルタミン酸、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ

[背景・ねらい]

ポリグルタミン酸は納豆の糸引き成分として品質に大きな影響を与える。ポリグルタミン酸は優れた保湿性やカルシウム吸収促進作用があり、肌荒れ防止や皮膚機能改善を目的とした化粧品への添加物や特定保健用食品として利用されている。ポリグルタミン酸の発酵生産では、分解による収量減少が重要な問題になっている。本研究は、γ-グルタミルトランスフェラーゼのポリグルタミン酸の分解活性を詳細に解析するとともに本酵素遺伝子の発現制御メカニズムを分子生物学的手法で究明した。

[成果の内容・特徴]

1．納豆種菌である宮城野株に由来するNAFM5株の培養液からγ-グルタミルトランスフェラーゼを均一に精製した。

2．精製酵素のポリグルタミン酸分解活性は極めて強く、大腸菌の当該酵素の100倍以上であった。従って、ポリグルタミン酸分解活性は納豆菌のγ-グルタミルトランスフェラーゼに特異的な機能であると推察される。

3．HPLCで反応生成物を経時的に分析した結果、分解反応はN-末端側からエキソ型に進行することとD-およびL-γ-グルタミル結合に対する選択性はないことが明らかになった(表１)。

4．当該酵素の遺伝子（*ggt*）の破壊株を用いて酵素が発酵中のポリグルタミン酸分解への関与を調べた結果、変異株ではポリグルタミン酸の分解が起こらないことが判明した。

5．当該酵素の生産は反応生成物であるグルタミン酸によって抑制されることを見出した(図１)。

6．プライマー伸張法で*ggt*の転写開始点を決定し、グルタミン酸は*ggt*遺伝子の転写を抑制することを明らかにした(図２)。

[成果の活用面・留意点]

ggt 遺伝子破壊株では、ポリグルタミン酸の分解が抑制されるのでポリグルタミン酸を高収量で安定に生産することが出来る。*ggt* 変異株を利用したポリグルタミン酸製造法の特許を申請している。

[具体的データ]

表１．納豆菌γ-グルタミルトランスフェラーゼのポリグルタミン酸及びγ-グルタミルテトラペプチド分解活性

γPGA[a]		γ-D-Glu-(γ-L-Glu)$_3$		(γ-L-Glu)$_3$-γ-D-Glu	
Sp. act[b]	Km(μM)	Sp. act[b]	Km(μM)	Sp. act[b]	Km(μM)
8.6	9.0	10.7	8.0	11.2	8.0

[a] γPGA, ポリグルタミン酸；[b] 比活性（μmol D-又はL-グルタミン酸／mg蛋白質／分）

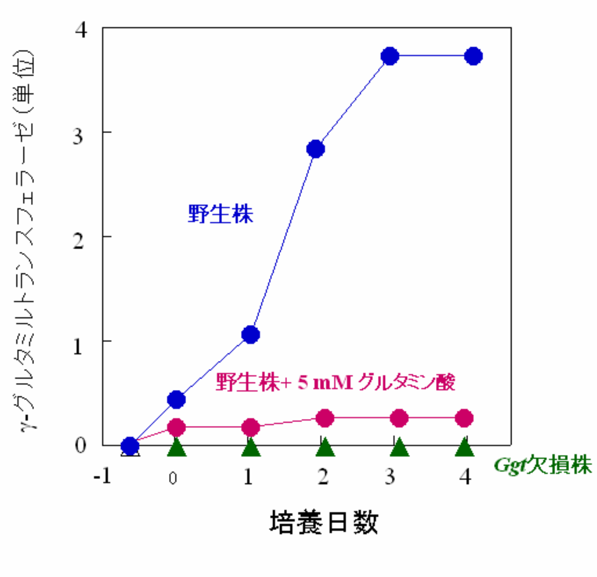


図１．グルタミン酸によるγ-グルタミルトランスペプチダーゼの生産阻害

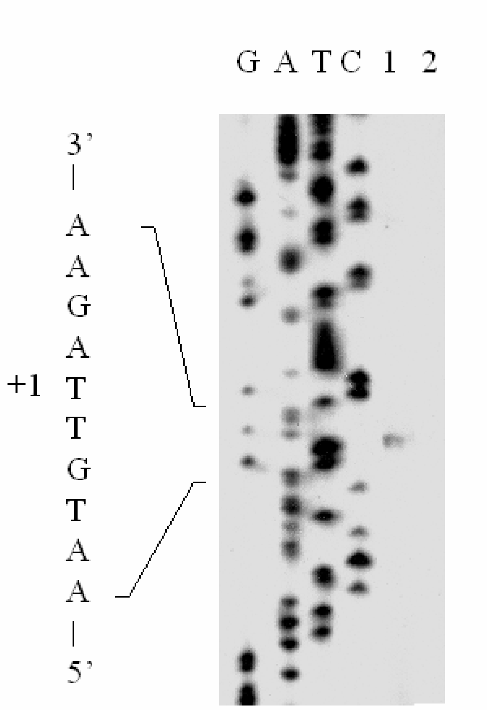


図２．*ggt*遺伝子のプライマー伸長解析。 1，グルタミン酸無添加、2，グルタミン酸添加

[その他]

研究課題名：微生物の社会的機能を活用した物質生産系構築のための分子生物学的研究

予算区分：パイオニア

研究期間：2001～2003年度（2003年度）

研究担当者：木村啓太郎、伊藤義文

発表論文等：

1）木村啓太郎、伊藤義文：γ-ポリグルルタミン酸分解酵素欠損変異株、その取得法及び変異株を用いたγ-ポリグルルタミン酸の製造法、特許願２００２年、第０３０２３７号（平成１４年２月７日出願）

2）伊藤義文：納豆菌のバイオテクノロジー、微生物利用の大展開（今中忠行編、エヌ・ティー・エス）、p. 657-663（2002）

3）K. Kimura and Y. Itoh: Characterization of Poly-γ-glutamate Hydrolase Specified by a Bacteriophage Genome: Possible Role in Phage Infection of *Bacillus subtilis* Encapsulated by Poly-γ-glutamate, Appl. Environ. Microbiol., 69(5), 2491-2467 (2003)

[成果情報名]　苦味低減酵素の活性を制御する分子内シャペロン

[要　　　約] タンパク質の分解物（苦味ペプチド）の苦味を低減する酵素（アエロモナスアミノペプチダーゼ）の前駆体酵素を解析したところ、その活性を制御する分子内シャペロン領域が存在することを見出した。

[部　　　署] 食品総合研究所・生物機能開発部・酵素機能研究室

[連　絡　先] 029-838-8071　stnirasa@nfri.affrc.go.jp

[成 果 区 分] 参考

[キーワード] 苦味低減酵素、アエロモナスアミノペプチダーゼ、苦味ペプチド、分子内シャペロン、前駆体酵素

[背景・ねらい]

消化吸収性を向上させた食品や機能性食品を製造する際に、食品中に含まれるタンパク質を分解酵素により処理することがある。しかし、これにより生じるタンパク質の分解物（苦味ペプチド）によって、食品に苦味が生じてしまうことが、技術開発上の大きなネックとなっている。これまでに我々は、この苦味を低減する酵素（アエロモナスアミノペプチダーゼ）を単離し、この酵素を大豆タンパク質や乳に含まれるタンパク質であるカゼインから調製した苦味ペプチドに作用させると、その苦味が急速に低減することを明らかにした。さらに、苦味低減酵素の前駆体に、酵素の活性発現に必要な分子内シャペロン領域が存在することを見出した。

[成果の内容・特徴]

1．苦味低減酵素（アエロモナスアミノペプチダーゼ）の遺伝子構造を解析したところ、成熟酵素領域のN末端側にプロペプチドが存在することが明らかとなった（図１）。

2．N末端プロペプチドを含む前駆体酵素を生産し、性質を調べたところ、苦味低減酵素の活性化にはN末端プロペプチドが必須であり、分子内シャペロンとしての役割を担っていることが明らかとなった（図２）。

3．分子内シャペロン領域は成熟領域の酵素活性を阻害していることが明らかとなった（図３）。

4．プロセシング酵素により分子内シャペロン領域を分解すると、酵素が活性化することが明らかとなった（図３）。

[成果の活用面・留意点]

分子内シャペロン領域を用いて、苦味低減酵素の活性化および活性阻害を行えることから、活性が阻害されている前駆体酵素とプロペプチドを分解するプロセシング酵素を併用することにより、酵素活性を任意に発現させることが可能となる。

[具体的データ]

図１　苦味低減酵素（アエロモナスアミノペプチダーゼ）の前駆体の構造

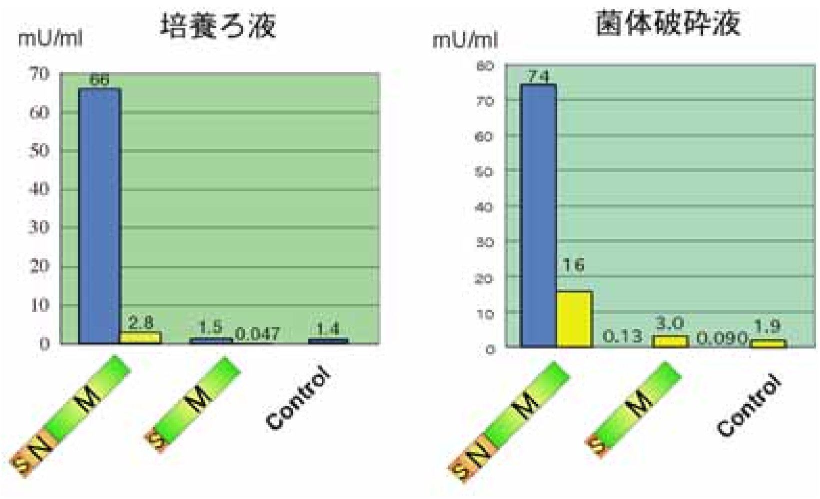
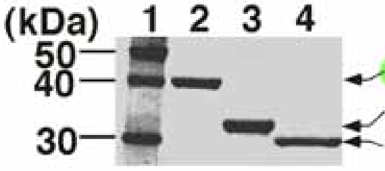


図２　大腸菌に前駆体酵素遺伝子および成熟体酵素遺伝子を導入した場合の

培養ろ液および菌体破砕液上清のアミノペプチダーゼ活性

青いバーはプロセシング酵素処理後、黄色いバーはプロセシング酵素処理前の活性を示す。



	Km (mM)	kcat (s^{-1})
Pro-apAC	0.21 ± 0.015	0.93 ± 0.023
Protease-treated apAC	0.14 ± 0.030	40 ± 4.7
Native apAC	0.14 ± 0.030	44 ± 5.3

基質: L-Leu-*p*-nitroanilide

図３　前駆体酵素のプロセシングと各種酵素の活性

プロセシングされた前駆体酵素と天然酵素の分子量が異なっているのはプロセシング部位の違いによる。

[その他]

研究課題名：プロテインメモリー現象によるタンパク質の構造変化と保持機構の解明

予 算 区 分 ：科研費

研 究 期 間 ：2002～2004 年度（2003 年度）

研究担当者：韮澤　悟

発表論文等：

１）Tang B, *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2003) **301**, 1093

２）Tang B, *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2002) **296**, 78

[成果情報名]　担子菌ネナガノヒトヨタケの新規遺伝子組換えマーカーの開発

[要　　約] 担子菌ネナガノヒトヨタケからフルトラニル抵抗性変異遺伝子を単離した。この遺伝子は担子菌の遺伝子組換え体選抜マーカーとして利用できる。

[部　　署] 食品総合研究所・生物機能開発部・細胞機能研究室

[連 絡 先] 029-838-8050　yasuito@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 参考

[キーワード] 担子菌、遺伝子組換えマーカー、コハク酸脱水素酵素

[背景・ねらい]

担子菌のモデル生物と言われるネナガノヒトヨタケでは、分子生物学的研究を行う際に必要な遺伝子組換え体選抜用のマーカー遺伝子が限られるため、実用的なマーカー遺伝子の開発が望まれている。本研究では、担子菌に特異性の高い薬剤フルトラニルに抵抗性を示す突然変異遺伝子を単離し、その特性を解析することにより、担子菌の組換え体選抜マーカーへの活用を図る。

[成果の内容・特徴]

1．フルトラニル耐性変異遺伝子をネナガノヒトヨタケ変異株のゲノムライブラリより単離した。本変異遺伝子はコハク酸脱水素酵素複合体Ｃサブユニット(SdhC)遺伝子に１塩基変異が生じ、これに伴い１アミノ酸置換が起こったものである(塩基配列及びアミノ酸配列：DDBJ accession No. AB092687, AB092688)。

2．コハク酸脱水素酵素はミトコンドリア画分に存在し、コハク酸から電子をキノンへ伝達する反応を触媒するが、フルトラニルはこの反応を阻害する。変異株及び変異遺伝子組換え株から単離したミトコンドリアでは、フルトラニル存在下でもコハク酸を基質とした電子伝達反応が野生株に比べ阻害されない（図１）。

3．本研究で変異が見出された周辺のアミノ酸配列は、大腸菌ホモログ蛋白質においてキノン結合部位として知られている。担子菌の野生型酵素ではフルトラニルがキノン結合部位周辺に結合しキノンの結合を妨げるが、変異による構造変化でフルトラニルの結合は低下する一方で、キノン結合には影響が少ないため、酵素活性が維持されると考えられる（図２）。

4．本変異遺伝子はネナガノヒトヨタケの遺伝子導入実験において、組換え体選抜のためのマーカー遺伝子として利用できる（図３）。

[成果の活用面・留意点]

1．フルトラニル耐性変異遺伝子を用いたネナガノヒトヨタケの遺伝子組換え体選抜系を開発した。本変異遺伝子はネナガノヒトヨタケの遺伝子組換え研究に利用できる。

2．フルトラニルは他の担子菌類（ヒラタケ等）に対しても有効であるが，他の担子菌について利用するには、同様の変異遺伝子を作製する必要がある。

[具体的データ]

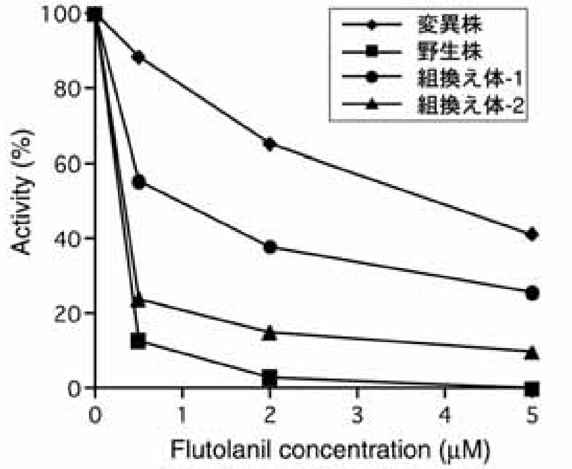


図1　フルトラニル抵抗性株及び組換え株のフルトラニル存在下におけるSdh活性。
フルトラニル耐性変異株及び遺伝子組換え株はフルトラニル存在条件でもキノン還元活性があった。組換え体-1及び2はそれぞれ5コピー，1コピーの変異遺伝子が導入されている。活性は単離ミトコンドリアのコハク酸を基質としたシトクロームC還元反応により測定。組換え体では内在の野生型SdhC及び組換え変異型のSdhCが同時に存在し，感受性型，耐性型のSdh複合体が共存するため（Sdh複合体の量は変わらない），変異株より耐性度が低いと考えられる。

図2　フルトラニル抵抗性遺伝子は選抜マーカーとして使用できる。
フルトラニル抵抗性遺伝子を導入処理し，フルトラニル耐性で選抜された組換え体（下の２株）は，フルトラニル添加培地上で旺盛な生育を示す。

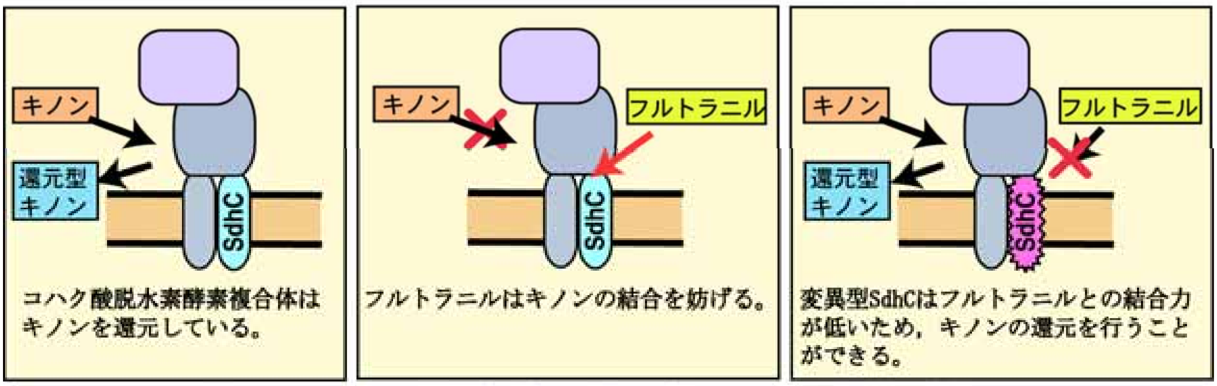


図2　**フルトラニルによるコハク酸脱水素酵素の阻害作用と変異型SdhCによる抵抗性の機構。**

[その他]

研究課題名：担子菌の薬剤耐性獲得機構の解明とその利用

予 算 区 分：経常

研 究 期 間：2002～2003 年度（2003 年度）

研究担当者：伊藤康博

発表論文等：

1） Y. Ito, H. Muraguchi, Y. Seshime, S. Oita, S. O. Yanagi： Flutolanil and carboxin resistance in *Coprinus cinereus* conferred by a single amino acid substitution in cytochrome *b*560 subunit of succinate dehydrogenase complex (Complex II), Proceedings of the UJNR, **32**, 263-268(2003)

[成果情報名]　**国産と中国産ネギは無機元素組成で判別できる**

[要　　約]　ネギ中のNa, P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, Ba, Co, Ni, Rb, Mo, Cd, Cs, La, Ce, Tlの20元素の濃度を用いて線型判別分析（LDA）または/およびSIMCA（Soft Independent Modeling of Class Analogy）を行うことにより，ネギ１本の材料で、国産か中国産かを判別できる。

[部　　署]　食品総合研究所・分析科学部・分析研究室

[連 絡 先]　029-838-8059　ariyama@affrc.go.jp

[成果区分]　参考

[キーワード]　ネギ、原産地判別、無機元素分析、ケモメトリックス、線型判別分析、SIMCA

[背景・ねらい]

相次ぐ食品の原産地表示の偽装により、消費者の食品表示に対する不信感が増大している。消費者の食品表示に対する不信感を払拭するためには、食品の原産地表示を徹底させることが必要である。日本に輸入される生鮮ネギの大部分は中国産であるが、日本品種の開発輸入によるものであり、品種判別で産地は特定できない。そこで、無機元素組成によりネギの原産国を判別する手法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1．ネギ中の20元素を定量することにより、ネギ1本の材料で、について国産か中国産かを判別できる手法である。

2．LDAでは、モデリングに用いた103試料について97%の適中率で判別できた。このモデルを用いた89試料のネギ1本についての予測では94%の適中率が得られた。

3．SIMCAでは、モデリングに用いた103試料を含む192試料について96%の適中率で判別できた。

4．LDAとSIMCAを組み合わせて判断したところ、国産を中国産とする好ましくない誤りは81試料中ゼロだった。逆に中国産を中国産ではないとする誤りは111試料中7試料あった。両方の手法を組み合わせることで結果をクロスチェックでき、より信頼性の高い判別を行うことが可能である。

* SIMCA：分類したい各クラスについて主成分分析を行うことで最適なモデルを構築し、各モデルからの距離に基づいて試料を分類するパターン分類手法。

[成果の活用面・留意点]

1．過塩素酸対応のドラフトまたはマイクロ波分解装置と、20元素を迅速かつ精確に測定できる誘導結合プラズマ発光分析計および誘導結合プラズマ質量分析計を保有している機関であれば、データを蓄積している食品総合研究所と連携してネギの原産国を判別することが可能である。食品表示のチェックを業務としている（独）農林水産消費技術センターでの利用が考えられる。

2．信頼性を維持するためには、定期的に産地の確かなネギを入手して分析することでデータを蓄積し、モデルの有効性を確認していくことが必要である。

[具体的データ]

試料にはネギ25本分または1本分を粉砕処理した下記の計216検体を試料として用いた。

1．産地の確かなネギ25本分：1-1国内産53産地67検体、1-2 中国産3産地36検体

２．産地の確かなネギ1本分：2-1国内産14産地14検体、2-2中国産3産地75検体

３．店頭から買い上げたネギ1本分：3-1国産表示24検体

LDA では試料１を、SIMCA では試料１と試料 3-2 の一部をモデリングのために使用

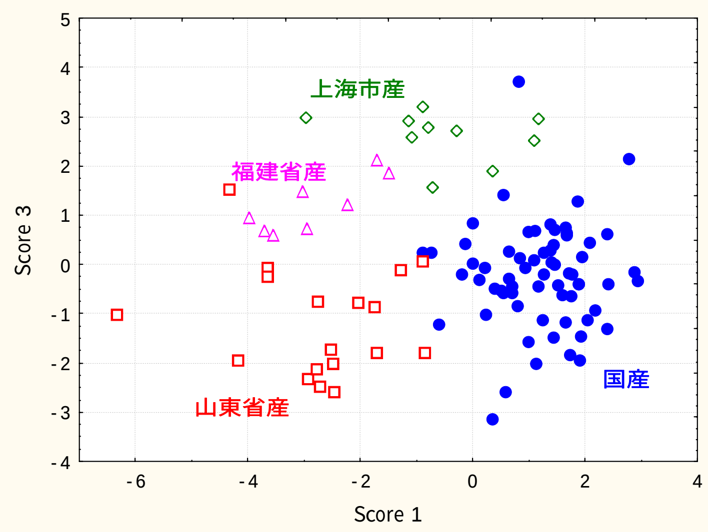


図１　産地の確かな国産 65 試料（この図は 2 試料を除いたモデルを使用），中国産 36 試料に対する Na，P，K，Ca，Co，Cu，Zn，Sr，Cd，Cs，Ba，Tl の 12 元素濃度に基づく線型判別関数のスコア１ vs．３（作成された３つの判別関数の内、２つの関数に各元素濃度を代入した値）のプロット

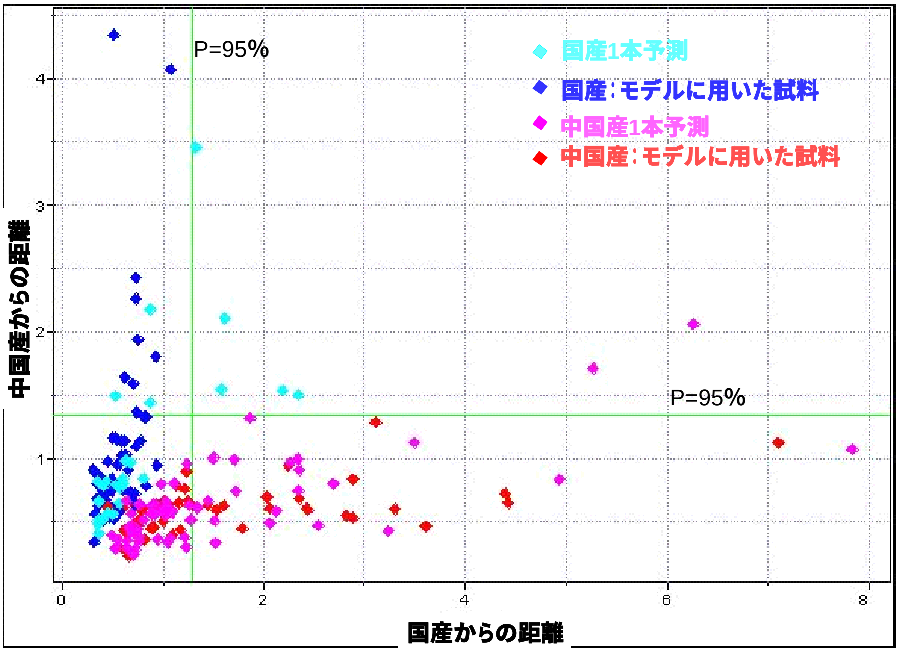


図２　20 元素を用いた SIMCA モデルによる、産地の確かな 192 試料の予測

[その他]

研究課題名：微量元素組成によるネギの原産国スクリーニング判別技術の開発

予 算 区 分：行政対応特別研究（ネギ・イグサプロ）

研 究 期 間：2001～2003年度（2003年度）

研究担当者：有山薫、堀田博、安井明美

発表論文等：

１）有山薫、堀田博、安井明美、ネギの産地判別のための無機元素測定法の確立と予備的検討、分析化学、52（11）969-978（2003）

[成果情報名] **低温貯蔵した生ジャガイモを揚げ調理すると多量のアクリルアミドを生じる**

[要　　約] 生のジャガイモを低温で貯蔵すると糖含量が増加し、揚げ調理に用いると強い焦げ色がつくばかりでなく多量のアクリルアミドを生成する。冷蔵庫に保存したジャガイモは、素揚げ調理を避けた方がよい。

[部　　署] 食品総合研究所・分析科学部・状態分析研究室
[連 絡 先] 029-838-8033　chuda@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 参考
[キーワード] アクリルアミド、ジャガイモ、家庭内調理、ポテトチップ

[背景・ねらい]

揚げたりオーブンで焼いたりして製造された食品中にアクリルアミドが高濃度で検出されることが、2002 年 4 月にスウェーデンから発表された。以後、日本国内外で分析法の確立や市販加工食品の分析がすすめられ、さまざまな形で情報が公開されている。中でも、ポテトチップをはじめとするジャガイモを高温加熱した食品はアクリルアミド生成量が大きくなり易いことが知られているが、おなじ種類の食品でも値が 10 倍以上異なる場合がある。そこで、生のジャガイモの生理変化による成分の変動が関連していると考え、低温貯蔵したジャガイモを用いて加工前の成分と加工後のアクリルアミド濃度の関係を調べた。

[成果の内容・特徴]

1．ジャガイモを約 20°Cの室温と 2°Cの低温で貯蔵し、糖、アミノ酸含量の変化と、ポテトチップに揚げ加工後のアクリルアミド濃度を調べた。
2．２週間の低温貯蔵ではアクリルアミド濃度が 1 キログラムあたり 20 ミリグラムと、室温貯蔵の濃度の 10 倍近くに上がった。
3．ポテトチップ中のアクリルアミド濃度は、生のジャガイモ中の還元糖の量と高い相関をもつことが実験的に明らかとなった（図１）。
4．低温貯蔵により糖含量の増加したイモから加工したポテトチップは、アクリルアミド含量の増加に加えて焦げ色による色調の著しい悪化も認められる（図２）。
5．家庭内調理における留意点について、ホームページ上によく尋ねられる質問とその回答として、Q&A の形で公開した。

[成果の活用面・留意点]

生のジャガイモを低温貯蔵すると糖含量が増えることは以前から知られており、ポテトチップ製造メーカーでは揚げ色が悪くなる原因として避けられている。家庭内でも今後、同様な配慮が望まれる。デンプンが糖に変わるのはジャガイモが生きているためで、加工品の低温貯蔵や冷凍食品では糖は増えない。また、糖が増加したイモも、煮たり蒸したりする調理法ではアクリルアミドは生成せず、甘みを生かした調理では歓迎される。

[具体的データ]

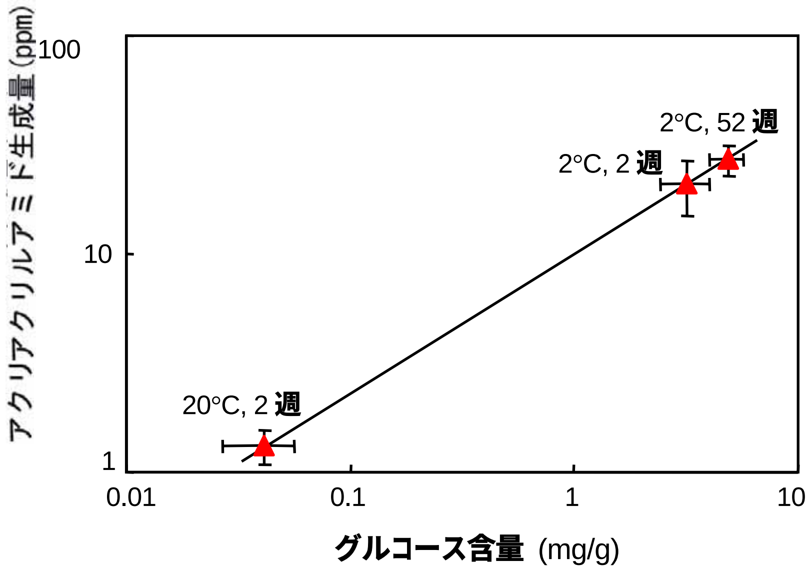


図１　生イモの還元糖量と揚げ加工後のアクリルアミド生成量
還元糖をグルコースで代表させたが、フルクトースも同様に増加する。

図２　異なる温度で２週間貯蔵したイモで調製したポテトチップ
（左：室温、右：低温（２℃））低温貯蔵のものは揚げ色に顕著な褐変が見られる。

[その他]

研究課題名：食品中のアクリルアミド分析法の開発、バレイショ加工時のアクリルアミド生成に関わる要因解明と低生成型品種・系統の選定

予 算 区 分：食品総合

研 究 期 間：2003～2004 年度（2003 年度）

研究担当者：忠田吉弘（消費技術センター併任）、小野裕嗣、箭田浩士、高田明子（農研機構・北農研）、遠藤千絵（農研機構・北農研）、森元幸（農研機構・北農研）

発表論文等：

1） Y. Chuda *et al.*：Effect of Physiological Changes in Potato Tubers (*Solanum tuberosum* L.) after Low Temperature Storage on the Level of Acrylamide Formed in Potato Chips, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**(5), 1188-1190 (2003)

2） 独立行政法人食品総合研究所：食品中のアクリルアミドについて、http://aa.iacfc.affrc.go.jp/

［成果情報名］**動物型および植物型スフィンゴ糖脂質の簡易判別法**

［要　　約］由来生物により異なる構成糖をもつ動物型、植物型のスフィンゴ糖脂質を、アニスアルデヒド硫酸を用い発色させることにより、視覚的に構成糖ならびにその由来の判別が可能である。これにより以前の主たる原料であった牛脳由来の動物型と植物、酵母由来の植物型スフィンゴ糖脂質を迅速、簡易に判別できる。

［部　　署］農業・生物系特定産業技術機構・北海道農業研究センター・畑作研究部・流通システム研究チーム

［連 絡 先］電話 0155-62-9280、電子メール k.saito@affrc.go.jp

［成 果 区 分］普及

［キーワード］スフィンゴ糖脂質、アニスアルデヒド硫酸、薄層クロマトグラフィー

［背景・ねらい］

スフィンゴ糖脂質は、図１に示す構造の複合糖脂質で、セラミド、セレブロシドとも呼ばれる。従来、これらスフィンゴ糖脂質の主な供給源は牛脳であったが BSE の発生以降、人体にとってより安全な植物、酵母を原料とした製造に切り替わりつつある。構造的には、牛を代表とする動物型の場合はガラクトースを、植物または微生物などの植物型ではグルコースを構成糖として有し、その分析はスフィンゴ糖脂質を構成糖などの各成分に分解後、成分ごとに HPLC 法などで分析されている。しかしこの方法では分析に時間を要し迅速な判別ができない現状にある。そこで動物型および植物型スフィンゴ糖脂質の迅速、簡易な判別法の提供を試みた。

［成果の内容・特徴］

１．試料をシリカプレートにスポットし、アニスアルデヒド：硫酸：エタノール＝1：1：18 の発色試薬を噴霧し 80～120℃程度で加熱することで、各糖質、構成糖に応じた発色を生じ視覚的な判別が可能である（表１）。

２．試料中各分子種の判別や、クロロホルム-メタノール混液より抽出した脂質粗抽出物を試料とした場合も、薄層クロマトグラフィーと組み合わせることで判別が可能である（図２）。

３．多検体の試料も、発色のみであれば数十分、粗抽出や薄層クロマトグラフィーなどの操作を含めても半日以内に、スフィンゴ糖脂質の構成糖の判別ならびに動物型、植物型の判別が可能である。

［成果の活用面・留意点］

１．スフィンゴ糖脂質の製造、品質管理に適用可能である。

２．気温など発色環境などにより発色色調にロット差が生じるため、標準品の発色を毎回同時に行い標準品との比較により試料の判別を行う。

３．混合試料の場合、標準品とは異なる混合比率に応じた色調を生じる。この場合薄層クロマトグラフィーなどにより分離したのち発色、判別を行う。

［具体的データ］

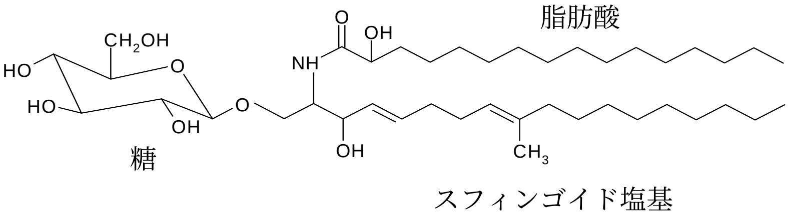


図１　スフィンゴ糖脂質の構造例

表１　糖質およびスフィンゴ糖脂質の発色比較

試料	発色試薬			
	アニスアルデヒド硫酸	50%硫酸	アンスロン硫酸	オルシノール硫酸
グルコース	紺	茶色	茶色	赤紫
ガラクトース	緑	茶色	茶色	赤紫
ラクトース	濃緑	茶色	茶色	赤紫
グルコシルセラミド	紺	赤紫	赤紫	赤紫
ガラクトシルセラミド	緑	赤紫	赤紫	赤紫
ラクトシルセラミド	濃緑	赤紫	赤紫	赤紫

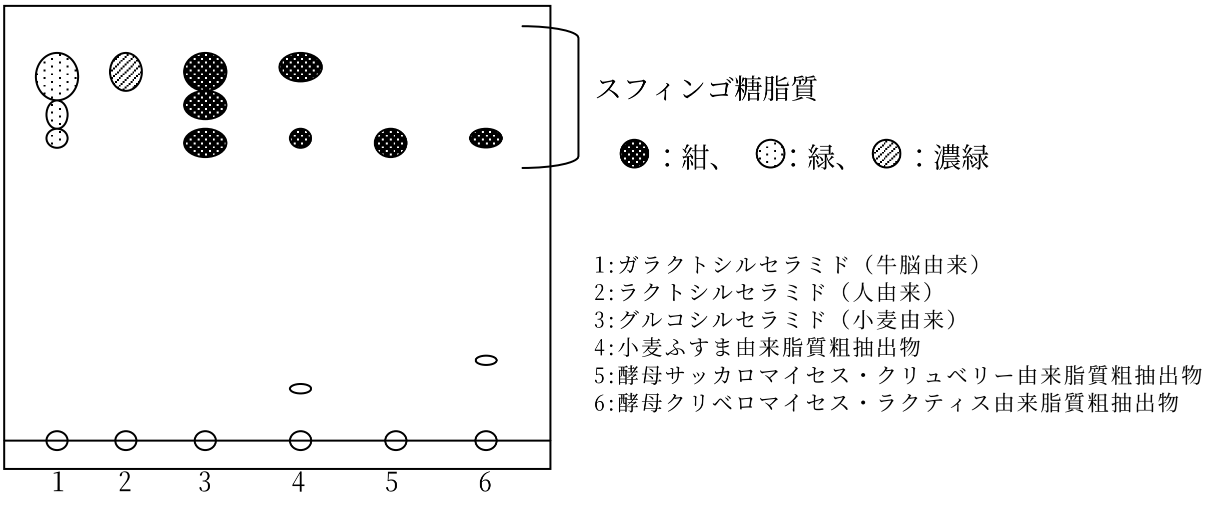


図２　粗抽出物試料の薄層クロマトグラフィーとアニスアルデヒド硫酸試薬による分析
（シリカプレートを用いクロロホルム：メタノール：水＝65：16：2で展開）

［その他］

研究課題名：好アルカリ発酵微生物の機能解析とその利用、セレブロシド及び関連脂質高蓄積酵母の分子育種による作出

予 算 区 分：科振調（若手任期付支援）、生研センター新事業創出

研 究 期 間：2001～2003年度（2003年度）、2002～2006年度（2003年度）

研究担当者：斎藤勝一、高桑直也、小田有二

発表論文等：1）斎藤ら（2003）特願2003-063181

［成果情報名］好アルカリ微生物を利用した中華麺品質の改良

［要　　約］チーズスターターなどに利用されるブレビバクテリウム（*Brevibacterium*）属細菌を中華麺に添加し恒温、熟成することで、添加菌の発酵作用により色調改善、防腐、防カビ効果を有する中華麺が製造でき中華麺品質の改良が可能である。

［部　　署］農業・生物系特定産業技術機構・北海道農業研究センター・畑作研究部・流通システム研究チーム

［連 絡 先］電話 0155-62-9280、電子メール k.saito@affrc.go.jp

［成果区分］参考

［キーワード］中華麺、ブレビバクテリウム、色調改善、防腐、防カビ

［背景・ねらい］

中華麺は、黄色味の調整や保存のため様々な着色料や保存料が使われている。これら添加物を用いることでアルコール臭等が残り食味や色調の悪化が時として生じる。中華麺の風味、食感を損なわず従来の添加物に代わる品質改良法の提供を目的に、微生物添加による技術開発を行った。

［成果の内容・特徴］

1．表１の培地を用い 25℃で培養した湿菌体または市販の凍結乾燥粉末菌体を、表２の配合で中華麺に添加し麺帯作成を行う。麺帯の状態でポリ袋中 25℃または 10℃で恒温熟成を行い、適宜製麺を行う。

2．恒温熟成後、BL1、BL2、B8添加で黄色味が向上し、BCについては他に比べやや白味を帯びるが、全菌株とも褐変防止の効果がある。ゆで後の官能評価も全菌株とも未添加のコントロールより良好である（表3）。

3．BL1、BL2では10℃、BCでは25℃、B8では両温度の恒温熟成で、麺帯中の雑菌の抑制と麺帯表面のカビの発生が抑制される（図１）。

［成果の活用面・留意点］

1．BC、BL1、BL2 は、クリスチャンハンセン社よりチーズスターターとして市販されている。B8 株は当所および（独）産業技術総合研究所特許生物寄託センター（寄託番号 FERM P-18692）で保有しており、許諾手続きを経て分譲が可能である。

2．恒温熟成温度および期待する色調に応じた菌株選択を行う。

3．中華麺用の強力粉の他、中力粉など小麦粉の種類を問わず効果の適用が可能である。

［具体的データ］

表１　培地組成

成分	g/L
グルコース	10.0
酵母エキス	5.0
ポリペプトン	5.0
リン酸水素二カリウム	1.0
硫酸マグネシウム	0.2
炭酸ナトリウム*	5.0

*炭酸ナトリウムのみ別滅菌後
他成分と混合。混合後のpH9.5。

表２　中華麺配合

成分	乾燥粉末菌体添加	湿菌体添加	未添加
小麦粉	100	100	100
炭酸カリウム	0.6	0.6	0.6
炭酸ナトリウム	0.4	0.4	0.4
食塩	1	1	1
細菌	1*	1**	0
水	31	31	32

配合割合は小麦粉100に対する重量部。
*市販スターターの乾燥粉末重量。**培養集菌後の湿菌体重量。

表３　細菌添加中華麺（ゆで麺）の官能評価結果

細菌		ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ･ｶｾﾞｲ BC	ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ･ﾘｰﾈﾝｽ BL1	ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ･ﾘｰﾈﾝｽ BL2	ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ･ﾍﾙﾎﾞﾙﾑ B8	未添加	ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ･ｶｾﾞｲ BC	ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ･ﾘｰﾈﾝｽ BL1	ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ･ﾘｰﾈﾝｽ BL2	ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ･ﾍﾙﾎﾞﾙﾑ B8	未添加
恒温	温度	25°C					10°C				
	期間	1日					7日				
官能評価	味	○	○	○	○	△	△	○	○	○	×
	色	△	○	○	◎	×	△	○	○	◎	×
	食感	△	○	○	○	△	△	○	○	○	△
	におい	○	△	△	○	△	○	○	○	○	△

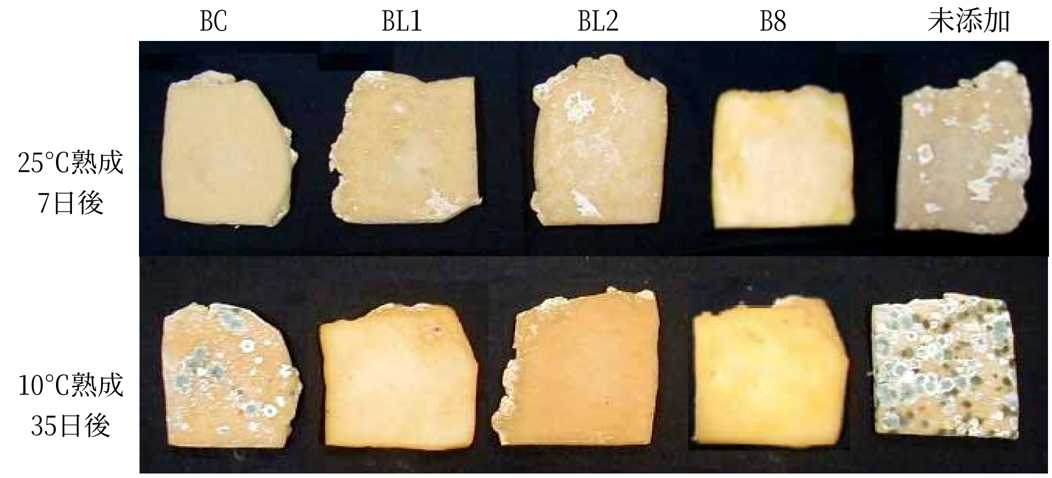


図１　細菌添加中華麺生地の恒温試験結果

［その他］

研究課題名：好アルカリ発酵微生物の機能解析とその利用

予算区分：科振調（若手任期付支援）

研究期間：2001～2003 年度（2003 年度）

研究担当者：斎藤勝一、小田有二、山内宏昭、桑原達雄、高田兼則、西尾善太

発表論文等：

1) Saito et al. (2003) Food Sci. Technol. Res. 9:40-44.
2) 斎藤ら (2002) 特願 2002-044702
3) 斎藤ら (2003) 特願 2003-035092

1. 貯蔵食品害虫の天敵、ホウネンカメムシ(*Joppeicus pradoxus*) の捕食生態							
〔要 約〕 捕食性カメムシの一種であるホウネンカメムシ(*Joppeicus pradoxus*)は、コクヌストモドキ等の貯穀害虫の補食量が大きく、貯穀害虫の天敵として有望である。							
所属	食品総合研究所･流通安全部･食品害虫研究室 タイ農務省			連絡先	029(838)8081		
推進会議名	国際農林水産業	専門	食品品質	対象	稲類	分類	研究

[背景･ねらい]

貯蔵食品害虫の防除には、主にくん蒸剤（臭化メチルとリン化水素）や接触殺虫剤（マラチオン、フェニトロチオン等）が長年使用されてきた。しかし、臭化メチルには地球のオゾン層破壊作用があることが判明し、先進国では 2005 年には検疫用等一部を除き使用禁止になる。さらに、リン化水素や接触殺虫剤にはそれに抵抗性を持つ貯蔵食品害虫が出現し、害虫防除が困難になりつつある。現在、くん蒸剤に代わる食品の安全性を重視した害虫防除方法の開発が求められており、化学農薬を使用しない天敵を用いる害虫防除技術の開発は重要である。

[成果の概要･特徴]

1. 日本やタイの穀物や飼料など食品が貯蔵されている施設（精米所、貯蔵倉庫など）で天敵を調査した結果、タイから捕食性カメムシであるホウネンカメムシ（*Joppeicus pradoxus*）が発見された。
2. ホウネンカメムシ成虫は貯蔵食品害虫の卵や幼虫に対する捕食範囲が広い（表1）。
3. ホウネンカメムシの雄、雌成虫について、48 時間絶食させたのち、各タッパーに1個体ずつ投入し温度 30℃、湿度 70%の条件に 24 時間放置してその捕食数を数えると、餌密度が高いと、コクヌストモドキ終齢幼虫は 5-6 匹以上、ノシメマダラメイガ2齢幼虫は 10 匹以上捕食する（図1、2）。すでにアメリカで天敵として販売されているミナミアシブトハナカメムシ *Xylocoris flavipes* は、ほぼ同じ条件で平均 2 頭/日、最高 3 頭/日しか食べていない。この点ではホウネンカメムシは天敵として有望である。
4. 温度条件 25，28，30，32，34，35℃で、ヒラタコクヌストモドキの卵を餌に用いてホウネンカメムシを飼育した場合、1齢幼虫から成虫羽化までの発育日数は、32℃で最も発育日数が短く 60.2 日となる。

[成果の活用面･留意点]

1. 米倉庫、精米所での放飼試験を行い、ホウネンカメムシの有用性を証明する必要がある。
2. 他の天敵、特に寄生蜂との併用の効果について検討し、ホウネンカメムシを用いた貯穀害虫制御システムを確立する必要がある。

[具体的データ]

表1 貯蔵食品害虫に対するホウネンカメムシの捕食範囲

	発育ステージ			
種名	卵	若齢幼虫	終齢幼虫	成虫
コクヌストモドキ	○	○	○	
ヒラタコクヌストモドキ	○	○	○	
カシミールコクヌストモドキ	○	○	○	
ノコギリヒラタムシ		○	○	
チャマダラメイガ		○		
スジコナマダラメイガ		○		
スジマダラメイガ		○		
ガイマイツヅリガ		○		
ノシメマダラメイガ		○		

○:捕食可能

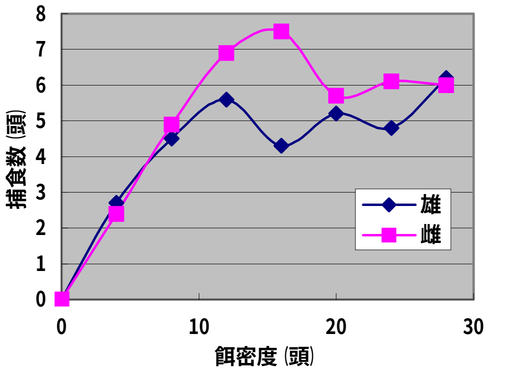


図1 コクヌストモドキ終齢幼虫に対するホウネンカメムシ成虫の平均捕食頭数

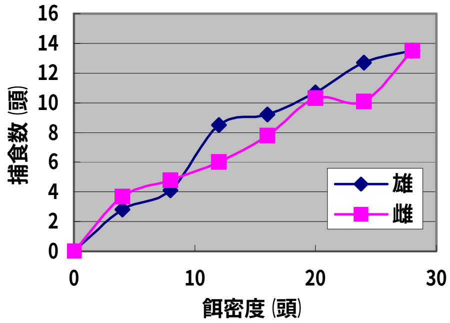


図2 ノシメマダラメイガ2齢幼虫に対するホウネンカメムシ成虫の平均捕食頭数

[その他]

研 究 課 題:貯穀害虫における生物的防除技術の開発

予 算 区 分:国際プロ〔収穫後損耗防止〕

研 究 期 間:2003 年度(2002～2004 年度)

研究担当者:宮ノ下明大(食品総合研究所) 今村太郎(食品総合研究所) Porntip Visarathanonth (タイ農業局) Chuwit Sukprakarn(タイ農業局)

発表論文等:貯穀食品害虫防除用生物農薬およびその防除方法、特許出願準備中

［成果情報名］明太子原材料の遺伝子鑑定法
［要　　　約］明太子の原材料となるスケソウダラの卵巣卵と、その代替品として製品や輸入原料に混入しているマダラ２魚種の簡便な遺伝子鑑定法を開発した。本手法は、我が国で明太子製造に供されている国産及び輸入原料の主要な原産地に対応している。
［部　　　署］中央水産研究所・生物機能部・生物特性研究室
［連　絡　先］生物特性研究室　045-788-7615（内線 351）
［成 果 区 分］参考
［キーワード］明太子、卵巣卵、スケソウダラ、マダラ、遺伝子鑑定

－－－

［背景・ねらい］

新ＪＡＳ法の施行により、水産加工食品には原材料種や原産地の表示が義務付けられた。その対象食品の１つである「明太子」は、スケソウダラの卵巣卵のみを原材料として製造しなければばならない。しかし近年、我が国近海のスケソウダラ資源はほぼ枯渇状態となり、明太子の国内供給量の約８３％（２０００年、期首在庫除く）をロシアやアメリカ等からの輸入卵巣卵に依存している。また９０年代からは、ロシア海域でもスケソウダラ資源の減少が進み、原料品質の悪化とともに原料価格の高騰が明太子製造業にとって深刻な問題となっている。そのため、スケソウダラに比べて商品価値が低く、かつ形態判別が困難なスケソウダラ近縁のマダラ属卵巣卵を輸入原料や明太子製造過程等で混入させた偽装表示の明太子製品の流通が報告されている。

［成果の内容・特徴］

１．スケソウダラとマダラの卵巣卵を対象に、ミトコンドリア・ゲノムのチトクロームｂ遺伝子５′領域を指標としたＰＣＲ－ＲＦＬＰ（ＰＣＲ制限酵素断片長多型）による簡便な魚種識別技術を開発した。
２．明太子原材料の主要原産地である北海道、アラスカ及びロシア産のスケソウダラ及びマダラ属魚類の中でも世界的に漁獲量が多く、卵巣卵が我が国においても比較的入手しやすいアラスカ産の太平洋マダラとアイスランド産の大西洋マダラの２魚種を検討対象とした。
３．スケソウダラ３産地及びマダラ２魚種の各３個体について当該領域の塩基配列を解読し、本手法で用いる制限酵素の認識部位に変異がないことを確認した。
４．動物の卵にはＰＣＲ等の分子生物学的操作を阻害する物質が多く含まれる。そのため原料魚卵及び加工済み明太子製品から混入物が少ない高純度なゲノムＤＮＡの調製法も開発した。

［成果の活用面・留意点］

我が国における明太子原材料供給量は年間約６．５万トン（２０００年）もあるため、市場に流通している製品の原材料鑑定には行政機関等による検査体制の整備が必要である。また約３．８万トン（同）の輸入原料については、通関時に検査済証明証等の提出を義務付けるのが有効な偽装防止策である。

［具体的なデータ］

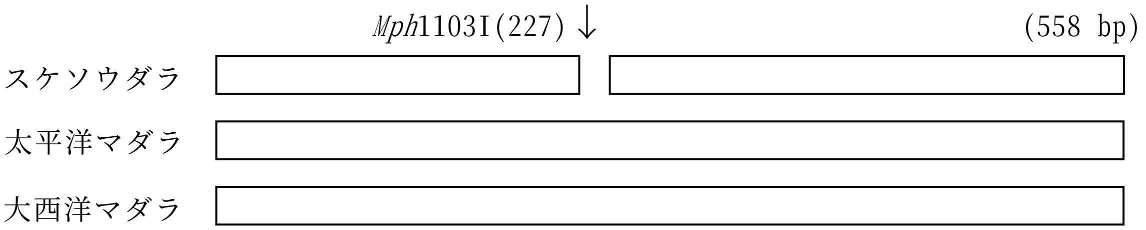


図１　スケソウダラ、太平洋マダラ及び大西洋マダラのチトクロームｂ遺伝子５′領域における制限酵素認識部位の模式地図.

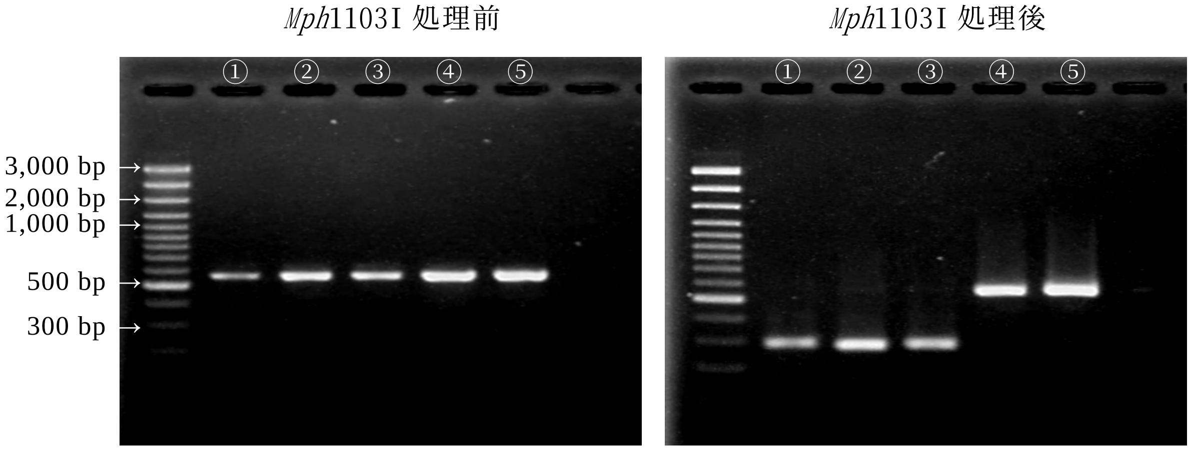


図２　タラ科ユニバーサルプライマーを用いたスケソウダラ（①ロシア、②北海道、③アラスカ）、太平洋マダラ（④アラスカ）及び大西洋マダラ（⑤アイスランド）の卵巣卵からのチトクロームｂ遺伝子５′領域の制限酵素処理.

［その他］

研究課題名：近縁魚類等の種判別および漁獲地域判別技術の開発

予 算 区 分：先端技術を活用した農林水産研究高度化事業

研 究 期 間：2002～2004 年度

研究担当者：荒西太士、塚本理子、沖本宜音、泉庄太郎、吉田由香、井澤舞子

発表論文等：

１）Aranishi F, Tsukamoto A, Okimoto T, Izumi S. Authentication of codfish roes by PCR-RFLP analysis（投稿予定）.