

②

食品照射における $\gamma$ 線の照射影響並びに  
照射検知法開発に関する研究

1 9 9 4 年

河 村 葉 子

# 目 次

緒 言	1
引用文献	4
第1章 食品照射における物理的变化と検知法	6
1. 1 放射線照射による物理的变化	6
1. 2 電子スピン共鳴 (E S R) 法による照射香辛料の検知法 に関する研究	7
1. 2. 1 E S Rのトウガラシスペクトルにおける照射影響	7
1. 2. 2 照射トウガラシE S Rシグナルのラジカル種の推定	10
1. 2. 3 その他の照射香辛料への適用の検討	11
1. 3 熱発光 (T L) 法による照射香辛料の検知法に関する研究	14
1. 3. 1 熱発光法の概要	14
1. 3. 2 直接測定法	14
1. 3. 3 抽出測定法	17
1. 3. 4 再標準化法	20
1. 3. 5 T Lを用いる照射香辛料の検知法の評価	22
1. 4 まとめ	24
引用文献	25
第2章 食品照射における化学的变化と検知法	27
2. 1 放射線照射による化学的变化	27
2. 2 照射グレープフルーツの成分変化に関する研究	27
2. 2. 1 照射グレープフルーツの現状	27
2. 2. 2 照射グレープフルーツの精油成分の変化	27
2. 2. 3 照射グレープフルーツの脂肪酸およびアミノ酸の変化	30
2. 3 照射香辛料の成分変化に関する研究	33
2. 3. 1 照射香辛料のメタノール抽出成分の変化	33
2. 3. 2 照射香辛料の精油成分の変化	37

2. 4	まとめ	39
	引用文献	40
第3章	食品照射における分子生物学的変化と検知法	41
3. 1	放射線照射による分子生物学的変化とその分析手法	41
3. 1. 1	放射線照射による分子生物学的変化	41
3. 1. 2	DNA損傷の検出法と照射検知法への応用	41
3. 2	玄米核DNAの抽出と照射影響	42
3. 2. 1	玄米からの核DNAの抽出	42
3. 2. 2	抽出法の検討	43
3. 2. 3	照射玄米から抽出した核DNAの収量	44
3. 2. 4	照射玄米から抽出した核DNAのゲル電気泳動パターン	45
3. 3	GC-MSによる照射玄米核DNAの塩基変化体の検索	47
3. 3. 1	DNA塩基変化体の測定	47
3. 3. 2	GC-MSによる玄米核DNA塩基変化体の測定法の検討	47
3. 3. 3	玄米核DNA塩基に対する $\gamma$ 線照射の影響	48
3. 4	まとめ	51
	引用文献	52
第4章	食品照射による生物学的変化と検知法	54
4. 1	照射による生物学的変化と発芽抑制	54
4. 1. 1	照射による生物学的変化	54
4. 1. 2	放射線による発芽抑制と照射検知法	54
4. 2	Half-embryoによる照射柑橘類の検知法開発に関する研究	55
4. 2. 1	グレープフルーツ種子の発芽と放射線照射	55
4. 2. 2	グレープフルーツにおけるhalf-embryo testの開発	57
4. 2. 3	グレープフルーツhalf-embryoの発芽に対する $\gamma$ 線照射の影響	58
4. 2. 4	照射グレープフルーツの保存によるhalf-embryo testへの影響	63
4. 2. 5	グレープフルーツhalf-embryo testの改良	63

4. 2. 6	Half-embryo testの照射オレンジおよびレモンへの適用	67
4. 2. 7	Half-embryo testによる照射柑橘類の検知法	69
4. 3	Half-embryo testによる照射リンゴおよびサクランボの検知法開発に関する研究	69
4. 3. 1	リンゴおよびサクランボと放射線照射	69
4. 3. 2	Half-embryo testの照射リンゴへの適用	69
4. 3. 3	Half-embryo testの照射サクランボへの適用	73
4. 3. 4	植物ホルモン添加による発芽促進	74
4. 3. 5	ベンジルアデニンを添加したサクランボのhalf-embryo testと照射影響	76
4. 3. 6	Half-embryo testによる照射リンゴおよびサクランボの検知法	78
4. 4	Germination testによる照射米および小麦の検知法開発に関する研究	79
4. 4. 1	米および小麦と放射線照射	79
4. 4. 2	米の発芽試験と諸条件の検討	79
4. 4. 3	米の発芽におよぼす $\gamma$ 線照射の影響	81
4. 4. 4	小麦の発芽試験と諸条件の検討	84
4. 4. 5	小麦の発芽におよぼす $\gamma$ 線照射の影響	85
4. 4. 6	発芽試験による照射米および小麦のスクリーニング法	88
4. 5	まとめ	89
	引用文献	90
	結論	91
	実験の部	93
	謝辞	103

## 緒 言

食品照射とは、放射能誘起の恐れがない低線量の $\gamma$ 線、電子線等の放射線を食品に照射することにより、発芽抑制、熟度調整、殺虫、殺菌等をおこなう新しい食品保存技術である。従来の食品保存技術としては、加熱、乾燥、冷蔵、冷凍、真空等の物理的手法や、殺菌剤、殺虫剤、保存料の食品への添加等の化学的手法がある。食品照射はそれらの方法と比較して、処理による温度上昇がほとんどなく新鮮なままあるいは冷凍のままで処理できること、密封した状態で照射できるので二次汚染の心配がないこと、食品に殺虫剤、殺菌剤等の化学物質の残留の問題がないこと等の利点がある。食品照射の主な用途としては、ジャガイモ・タマネギ等の発芽防止、穀類・野菜類・果実類等の殺虫、香辛料・冷凍肉・冷凍エビ等の殺菌がある。また実用上用いられる照射線量は、発芽防止で0.15 kGy以下、殺虫で0.3~1 kGy、殺菌で5~30 kGyである<sup>1-5)</sup>。

我が国では、1972年にジャガイモの発芽防止に食品照射が許可されたが、その後許可品目は追加されていない。しかし、1980年に国連食糧農業機関/国際原子力機関/世界保健機関 (FAO/IAEA/WHO) の「照射食品の健全性に関する合同専門委員会」が、平均10 kGy以下の線量で照射した食品の健全性に問題はないという安全宣言を出して以来、各国で食品照射の許可や実用化が一段と促進されてきた。さらに近年エチレンオキサイドや二臭化エチレン等の燻蒸剤やポストハーベストに使用される農薬の安全性が問題となり、この代替技術としても関心が高まってきている。表1に示すように、1991年現在、照射許可国は37ヵ国、許可食品は肉、魚、エビ、穀類、野菜類、果実類、香辛料など115品目にのぼっている<sup>6)</sup>。

照射食品の実用化にともない、照射許可国では照射表示の不正防止や再照射防止等のため、また不許可国では照射食品の流通防止のため、照射の有無を判別する検知法の確立が求められてきた。1987年には欧州議会(EC)において検知法が確立しない限り照射食品の域内の自由流通は認めないことを決定し、1988年にはFAO/IAEA/WHO合同会議が検知法を早期に開発するように決議を行った。しかし、長年の研究にもかかわらず、実用線量における検知法の確立はきわめて困難であり、とくに全ての食品に汎用できる検知法の確立についてはほぼ不可能であると考えられるに至った。一方、個別の食品または食品群毎の検知法については、いくつかの実用可能と思われる報告が提出されはじめた。そこで、FAO/IAEAの主催により1990年から5年計画で「照射食品の検知法に関する共同研究計画」が開始され、検知法の確立をめざすこととなった。

表1. 食品照射許可一覧表<sup>6)</sup>

品目	アルゼンチン	パングラデシュ	ベルギー	ブラジル	ブルガリア	カナダ	チリ	中国	チェコスロバキア	デンマーク	フィンランド	フランス	ハンガリー	インド	インドネシア	イスラエル	イタリア	日本	韓国	キューバ	オランダ	ノルウェー	メキシコ	フィリピン	ポーランド	バキスタン	スペイン	台湾	タイ	南アフリカ	シリア	イギリス	ソ連	アメリカ	ウルグアイ	ユーゴスラビア	ベトナム	
魚																																						
エビ(冷凍, 加熱)																																						
カエル脚																																						
冷凍水産物																																						
家禽肉																																						
豚肉																																						
その他の畜肉																																						
粉末卵																																						
乾燥血液																																						
粉末チーズ																																						
ソーセージ																																						
バレイショ																																						
タマネギ																																						
ニンニク																																						
シャロット																																						
米																																						
小麦・小麦粉																																						
トウモロコシ																																						
穀類																																						
香辛料, 香草																																						
ハーブ茶, 茶抽出物																																						
豆類																																						

品目	アルゼンチン	パングラデシュ	ベルギー	ブラジル	ブルガリア	カナダ	チリ	中国	チェコスロバキア	デンマーク	フィンランド	フランス	ハンガリー	インド	インドネシア	イスラエル	イタリア	日本	韓国	キューバ	オランダ	ノルウェー	メキシコ	フィリピン	ポーランド	バキスタン	スペイン	台湾	タイ	南アフリカ	シリア	イギリス	ソ連	アメリカ	ウルグアイ	ユーゴスラビア	ベトナム	
カカオ豆																																						
コーヒー豆																																						
ピーナッツ																																						
ナッツ類																																						
乾燥野菜																																						
生鮮野菜																																						
パイナップル																																						
バナナ																																						
イチゴ																																						
アボガド																																						
サクランボ																																						
リンゴ																																						
クリ																																						
ブドウ																																						
ナツメヤシ																																						
その他の果実																																						
マッシュルーム																																						
病人食																																						
アラビアガム																																						
酵素製品																																						

この第1回会議(1990年、ワルシャワ)において検知法が備えなければならない技術的原則が検討され、以下のような項目が確認された。すなわち照射および非照射が明らかに区別できる識別性、他の加工法により同様の变化を誘導しない特異性、食品の有用保存期間を通じての測定パラメーターの安定性、再現性と反復性、実用照射レベルまで検知可能な感度等を満たすことなどである。また定量法確立の困難さから、まず定性的な照射の有無を判定する検知法の開発を優先することとした。また誤判別が起こりえない絶対的な照射の有無判別のための検知法の開発は困難と考えられることから、最終判定は複数の独立した方法により総合的になされることが望まれた<sup>7)</sup>。

これまでに提案された照射検知法のうち実用可能と考えられるものとしては、電子スピン共鳴(E S R)法による骨付肉及び魚の骨、海老及び貝類の殻等の測定<sup>8-10)</sup>、熱発光(T L)法による香辛料及び乾燥野菜の測定<sup>11-13)</sup>等極めて少ない。著者は $\gamma$ 線照射による食品の照射影響と検知法開発に関する研究を先駆的に進め、発足当初から上記の「照射食品の検知法に関する共同研究計画」に参加している。

本研究では、香辛料、果実類、穀類等の植物性食品を対象とし、 $\gamma$ 線による照射影響を、物理的・化学的・分子生物学的・生物学的な方向から様々な手法を用いて検索し、その変化を明らかにした。すなわちラジカル生成やエネルギー状態の変化等物理的な変化に対する電子スピン共鳴(E S R)法および熱発光(T L)法による検索、食品成分の化学的な変化に対するガスクロマトグラフィー(G C)法および高速液体クロマトグラフィー(H P L C)法による検索、食品中に含まれる核D N Aの分子生物学的な変化に対する電気泳動法やガスクロマトグラフィー質量分析(G C - M S)法による検索、食品が含有する種子の生物学的変化に対する発芽抑制を指標とする検索等を行った。その結果、E S R法における香辛料の副シグナルの出現、柑橘類やサクランボ、リンゴにおける発芽抑制及び玄米・玄麦における発根抑制、核D N Aにおける分子サイズの減少等を照射による変動因子として見出した。それらについてさらに検討を加え、香辛料では副シグナルを指標としたE S R法、柑橘類等ではhalf-embryo testを照射の有無判別のための検知法として、玄米及び玄麦では発芽試験をスクリーニング法として確立した。またT L法による照射香辛料の検知法についてその実用化の可能性について検討した。

以下にこれらの研究内容を詳述する。

#### 引用文献

- 1) 日本アイソトープ協会編：“アイソトープ便覧”改訂3版 pp. 181-189 丸善(1984)
- 2) 日本アイソトープ協会編：“アイソトープ便覧”改訂3版 pp. 633-644 丸善(1984)

- 3) 伊藤均：“食品保蔵、殺菌への放射線利用” *New Food Industry*, 28(12), 17-22 (1986)
- 4) WHO/FAO編 林徹訳：“食品照射” 光琳(1989)
- 5) 小西幸男：“食品照射における最近の海外動向” *New Food Industry*, 28(12), 23-27 (1986)
- 6) 林徹：“海外における照射食品の現状” *食衛誌*, 32, 361-365 (1991)
- 7) 内山貞夫：“照射食品の検知法に関する国際的動向” *Radioisotopes*, 40, 302-311 (1991)
- 8) N. J. F. Dodd, A. J. Swallow and F. J. Ley: "Use of ESR to identify irradiated food" *Radiat. Phys. Chem.*, 26, 451-453 (1985)
- 9) M. F. Desrosiers: " $\gamma$ -Irradiated seafoods: Identification and dosimetry by electron paramagnetic resonance spectroscopy" *J. Agric. Food Chem.*, 37, 96-100 (1989)
- 10) B. A. Goodman, D. B. McPhail and D. M. L. Duthie: "Electron spin resonance spectroscopy of some irradiated foodstuffs" *J. Sci. Food Agric.*, 47, 101-111 (1989)
- 11) L. Heide and W. Z. Bögl: "Identification of irradiated dried foodstuffs" *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 320, 682-683 (1985)
- 12) L. Heide, R. Guggenberger and K. W. Bögl: "Identification of irradiated spices with luminescence measurements: A European intercomparison" *Radiat. Phys. Chem.*, 34, 903-913 (1989)
- 13) D. C. W. Sanderson, C. Slater and K. J. Cairns: "Thermoluminescence of foods: Origins and implications for detecting irradiation" *Radiat. Phys. Chem.*, 34, 915-924 (1989)
- 14) T. Autio and S. Pinnioja: "Identification of irradiated foods by thermoluminescence of mineral contamination" *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 191, 177-180 (1990)

## 第1章 食品照射における物理的变化と検知法

### 1.1 放射線照射による物理的变化

食品が放射線照射を受けると、まず最初に食品を構成する原子や分子は放射線の荷電粒子との衝突や近傍の通過により無差別にエネルギーを付与され、非常に不安定なイオン対や励起分子を生成する。これらは電離中心の通過した周囲に不均一に存在する。これらの不安定な生成物は近接する分子と反応して活性化イオン、ラジカル、励起分子等を形成する。生物体においては、細胞の約70%をしめる水が水素イオンラジカルや水酸基ラジカル等のラジカルを多数生成する。このように、照射により最初にしかも短時間の間に物質内に引き起こされる、主にエネルギー状態の変化を物理的变化とよぶ。これらの生成物は一般に不安定で、余剰エネルギーを分子内または分子間で移行させて安定な状態に戻る。しかし周辺のマトリックスにより安定化され、活性化イオン、ラジカル、励起分子等の状態で長期間存在する場合もある。

このような物質のエネルギー状態の変化を検出する方法としては、ラジカルを測定する電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance: ESR) 法、励起分子を加熱することにより発光させる熱発光 (Thermoluminescence: TL) 法、過酸化物をルミノール溶液と反応させて測定する化学発光 (Chemiluminescence: CL) 法などがある。

これらの方法については、照射食品の検知のためにいくつかの検討がなされており、ESR法による肉・魚・えび・貝類の骨または殻<sup>1-6)</sup>、香辛料や乾燥野菜<sup>1, 7)</sup>、タマネギの皮<sup>8)</sup>、果実の種子、果柄および果皮<sup>1, 9, 10)</sup>、TL法による乾燥食品、特に香辛料<sup>11-19)</sup>、CL法による香辛料、粉ミルク、タマネギ、ジャガイモ<sup>20, 21)</sup>等の測定が報告されている。これらの方法の中にはかなり実用性の高いものもあり、特にESR法とTL法は有望な手法と考えられる。

一方、香辛料の多くは植物体を乾燥して使用するため保存中に害虫やかびによる被害を受けやすいが、有効で安全性の高い防御法が少ない。しかも、乾燥体であるため照射による品質の劣化を受けにくい。そのため香辛料は照射の実用化が最も進んでいる食品の1つであり、殺虫および殺菌を目的として数十カ国で放射線照射が許可されている。また、殺菌を目的としているために10~30 kGyの高線量照射が行われる場合が多い。そのため、照射香辛料の検知法の開発は急務であった。

そこで、照射香辛料についてESR法によるスペクトルの変化を調べ、新たに見いだした照射特異性のある副シグナルの検知法への適用を検討した。また熱発光法による測定法

の比較検討および実用化の可能性について評価を行った。

### 1.2 電子スピン共鳴 (ESR) 法による照射香辛料の検知法に関する研究

#### 1.2.1 ESRのトウガラシスペクトルにおける照射影響

照射した牛肉、豚肉、家禽肉、魚類、えび、かに、貝類等の検知法としてその骨または殻のESRスペクトルを測定する方法は、骨や殻の中でラジカルが安定化されるため長期間測定可能であり、信頼性が高く、有望な検知法の一つである<sup>1-6)</sup>。

一方、照射香辛料の検知法にESRを用いる試みはDodd<sup>1)</sup>やYang<sup>7)</sup>らによって行われたが、それらは主ピークの変動を指標としており、照射数週間後には判別が不可能となり検知法への適用は困難であると報告された。

そこで、改めてトウガラシ、黒コショウ、白コショウの3種類の香辛料について10、30および50 kGyで $\gamma$ 線を照射し、それらのESRスペクトルの変化について詳細に検討を行った。いずれの香辛料においてもg値2.0043に主シグナルがみられ、照射線量の増加につれてシグナル強度も増加した(Fig. 1 & Fig. 2)。しかしこの主シグナルは香辛料を100°Cで1時間加熱した場合にも増加し照射に特異的ではなかった(Fig. 3)。

一方、照射トウガラシにおいては、主シグナルの他にそれより-30 Gの位置に、非照射トウガラシではみられない副シグナルが存在することを見出した(Fig. 4)。この副シグナルは、主シグナルと比較して強度は1/10~1/4と小さかったが、照射試料にのみ検出さ

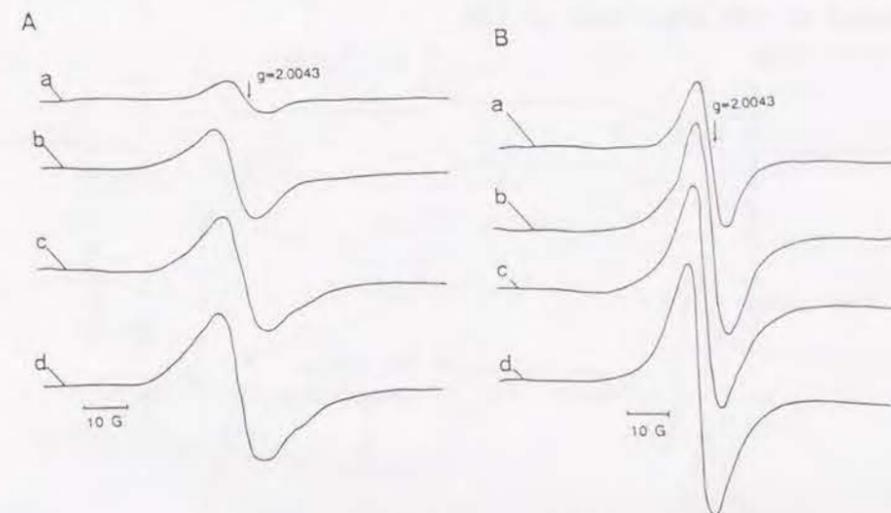


Fig. 1. ESR spectra of radicals produced in white pepper(WP) and black pepper(BP) by  $\gamma$ -irradiation  
A:spectra of WP, B:spectra of BP  
a:unirradiated, b:irradiated at 10kGy, c:at 30kGy, d:at 50kGy  
ESR spectra of WP and BP were measured at amplitudes of 790 and 125, respectively.

れ、また加熱や光照射による生成はみられず照射特異的であった(Fig. 3)。さらにシグナル強度と照射線量には直線的な相関関係がみられた(Fig. 5)。このシグナルの強度は、主シグナルと同様に照射後1~2カ月で大きく減少するがその後はあまり変化せず(Fig. 6)、照射12カ月後においても検出可能であった(Fig. 7)。

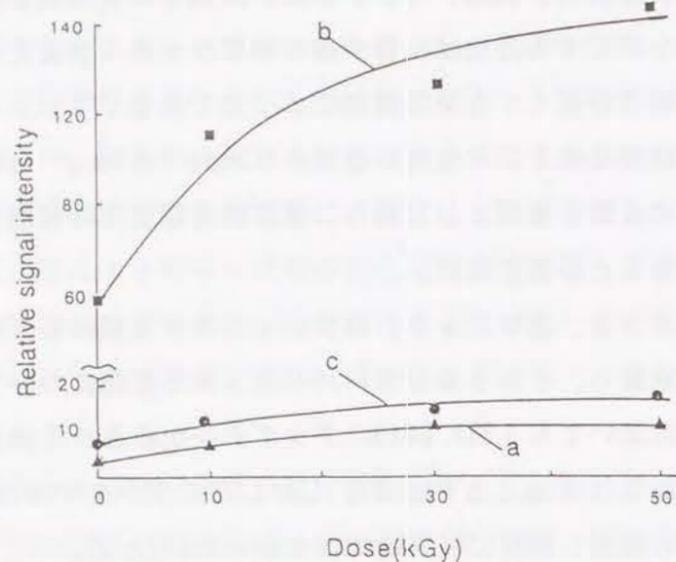


Fig. 2. Radical production in white pepper(WP), Black pepper(BP) and red pepper (RP) by  $\gamma$ -irradiation  
a:WP, b:BP, c:mainsignal in RP.  
The relative signal intensities of the mainsignal with  $g=2.0043$  were measured at the amplitude of 790.

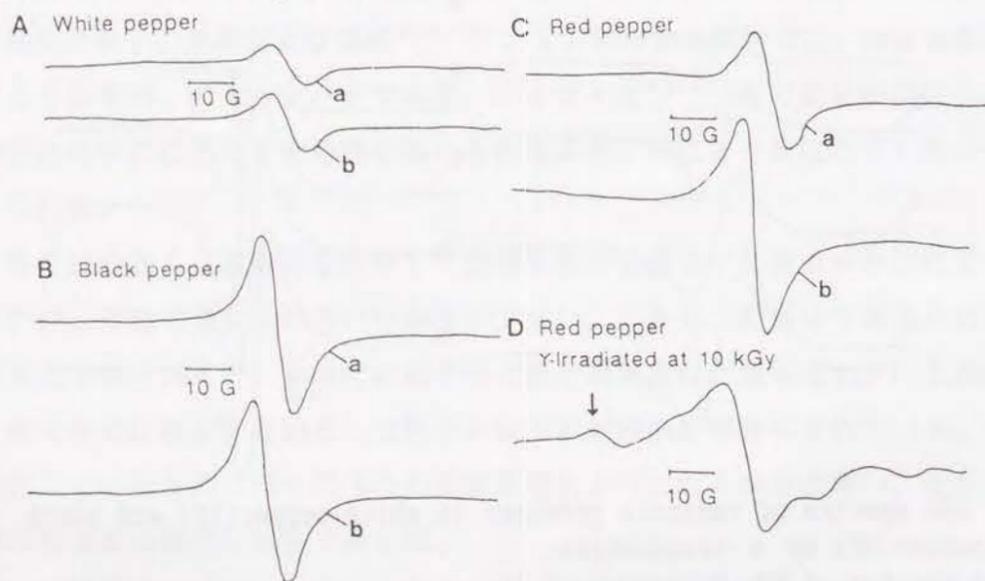


Fig. 3. ESR spectra of the three kinds of peppers heated at 100°C for one hour  
a:intact, b:heated.  
The arrow in spectrum D shows the subsignal.

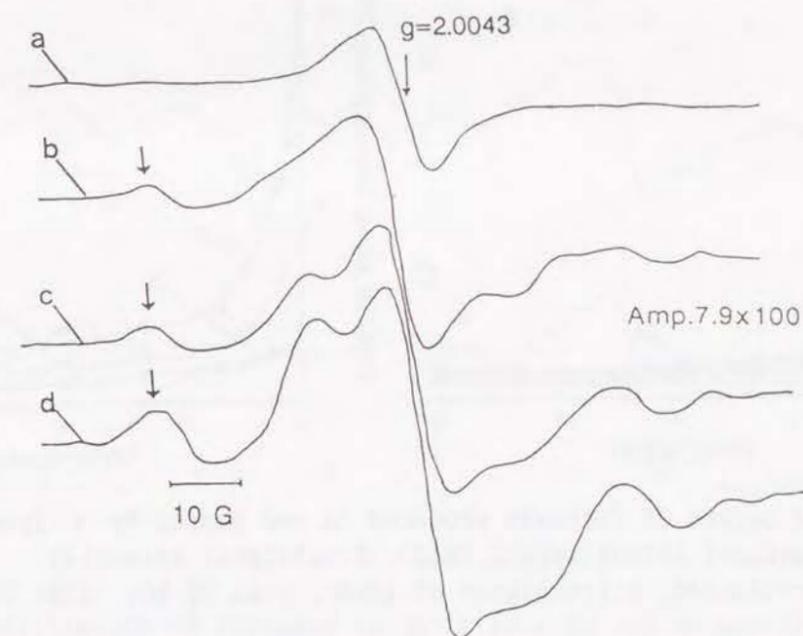


Fig. 4. ESR spectra of radicals produced in red pepper(RP) by  $\gamma$ -irradiation  
a:unirradiated, b:irradiated at 10kGy, c:at 30kGy, d:at 50kGy.  
The arrows show the subsignal.

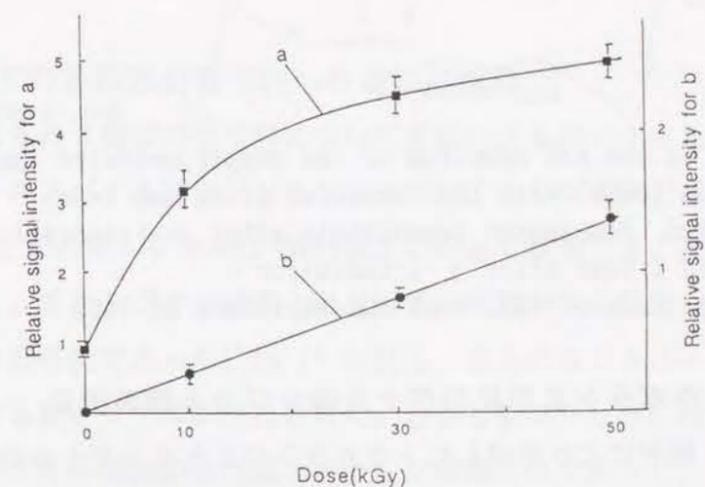


Fig. 5. Relationship between  $\gamma$ -absorption dose and radical production in red pepper(RP)  
a:mainsignal in RP, b:subsignal in RP  
The relative signal intensities in RP were measured at the amplitude of 100 at 17days after  $\gamma$ -irradiation.  
Values are means $\pm$ SD for four trials.

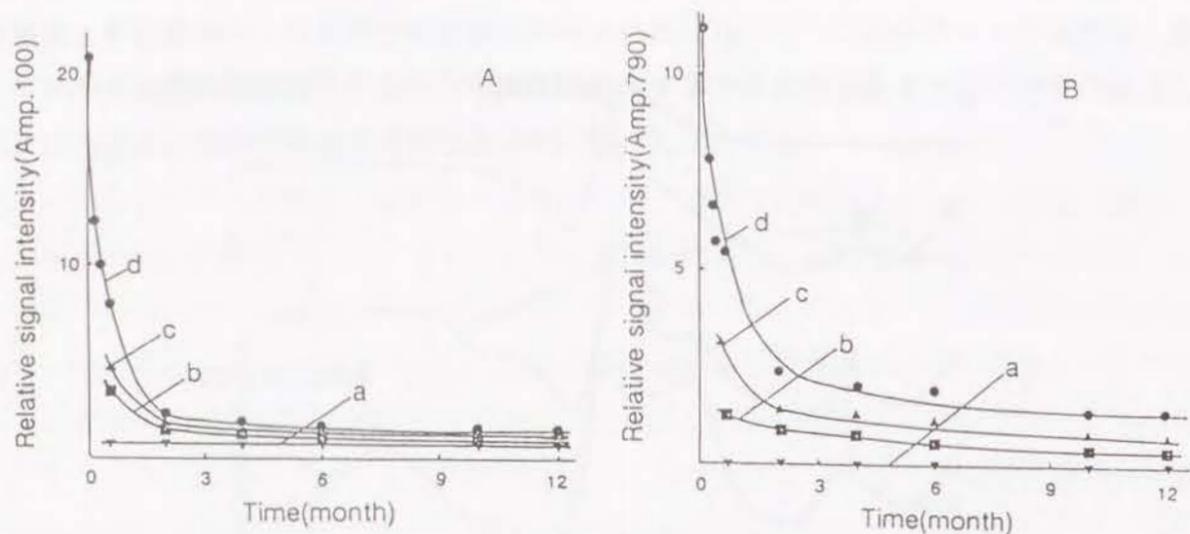


Fig. 6. Decay curves of radicals produced in red pepper by  $\gamma$ -irradiation  
 A: main signal intensity ( $g=2.0043$ ), B: subsignal intensity  
 a: unirradiated, b: irradiated at 10 kGy, c: at 30 kGy, d: at 50 kGy

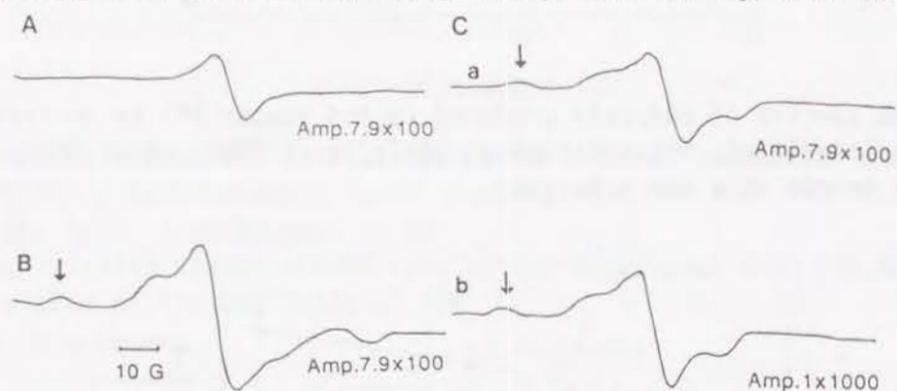


Fig. 7. Comparison of the ESR spectrum of red pepper measured immediately after  $\gamma$ -irradiation (10 kGy) with that measured after one year  
 A: unirradiated, B: measured immediately after  $\gamma$ -irradiation  
 C: measured in 1 year after  $\gamma$ -irradiation  
 a: at the amplitude of 790, b: at the amplitude of 1000

### 1. 2. 2 照射トウガラシ ESR シグナルのラジカル種の推定

新たに見出した、照射により生成したトウガラシの ESR シグナルのラジカル種を推定するために、コンピューターシミュレーションを行った。Fig. 8に示すようにメチルラジカル、フェノキシラジカルおよびパーオキシラジカルのスペクトルを組み合わせることにより、照射トウガラシのスペクトルとよく一致したスペクトルが得られた。このことから、トウガラシの主シグナルは主にフェノキシラジカルとパーオキシラジカル、副シグナルは主にメチルラジカルに由来すると推定された。

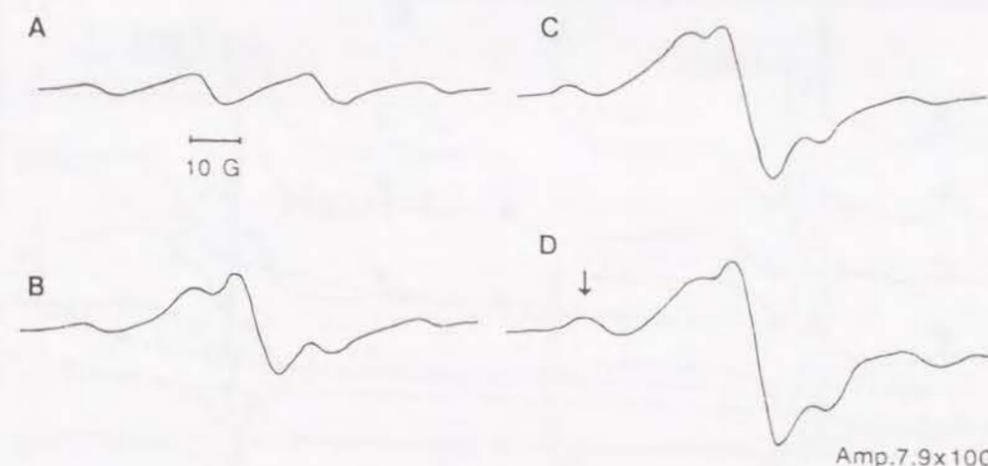


Fig. 8. Identification of radicals in  $\gamma$ -irradiated red pepper (RP) by a computer-simulation method  
 A: a simulated spectrum of methyl radical  
 B: a simulated spectrum of combined methyl and phenoxyl radicals  
 C: a simulated spectrum of combined methyl, phenoxyl and peroxy radicals  
 D: a spectrum of RP  $\gamma$ -irradiated at 30 kGy

### 1. 2. 3 その他の照射香辛料への適用の検討

トウガラシ以外の 8 種類の香辛料について照射による副シグナルの生成の検討を行った。その結果、オールスパイスおよびシナモンにおいてトウガラシと同様の副シグナルが観察された (Fig. 9)。この副シグナルは 5 kGy 以上の照射で検知でき、加熱や光照射により影響を受けなかった。またシグナル強度と照射線量に相関がみられ (Fig. 10)、また照射後 1 年間貯蔵しても検出可能であった (Fig. 11 & 12)。さらにセロリリーフ、ローレル、ターメリックにおいても副シグナルが検出された。しかし黒コショウ、白コショウ、グローブにおいては主シグナルの増加のみで副シグナルは検出されなかった。

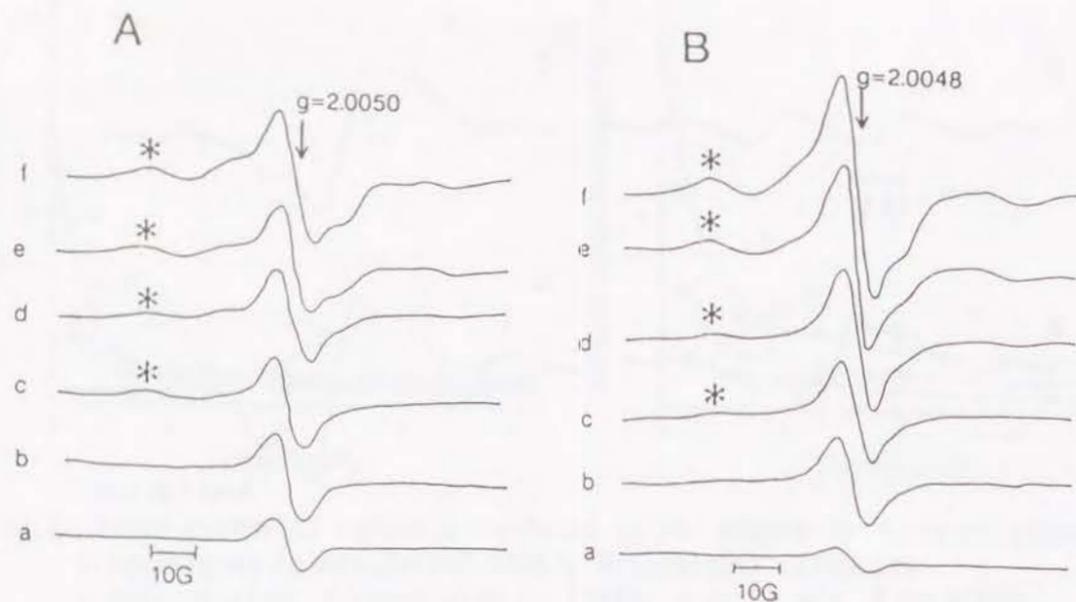


Fig. 9. ESR spectra of irradiated allspice and cinnamon  
 A:allspice, B:cinnamon  
 a:unirradiated, b:irradiated at 3 kGy, c:at 5 kGy, d:at 10 kGy  
 e:at 30 kGy, f:at 50 kGy  
 \*:indicates subsignal.

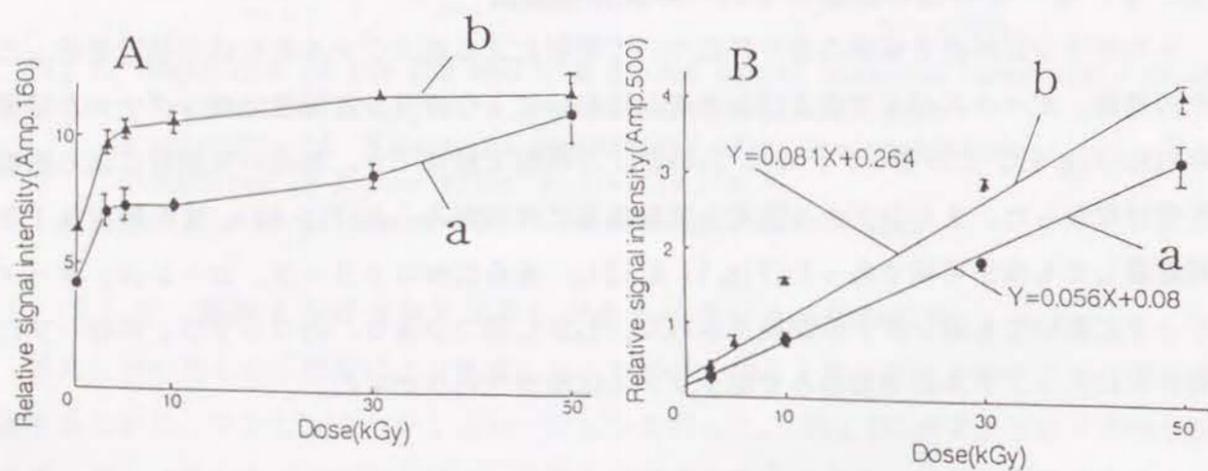


Fig. 10. Dose-response curves of mainsignal and subsignal in irradiated allspice and cinnamon  
 A:mainsignal, B:subsignal, a:allspice, b:cinnamon  
 Values are means  $\pm$ SD for four trials.

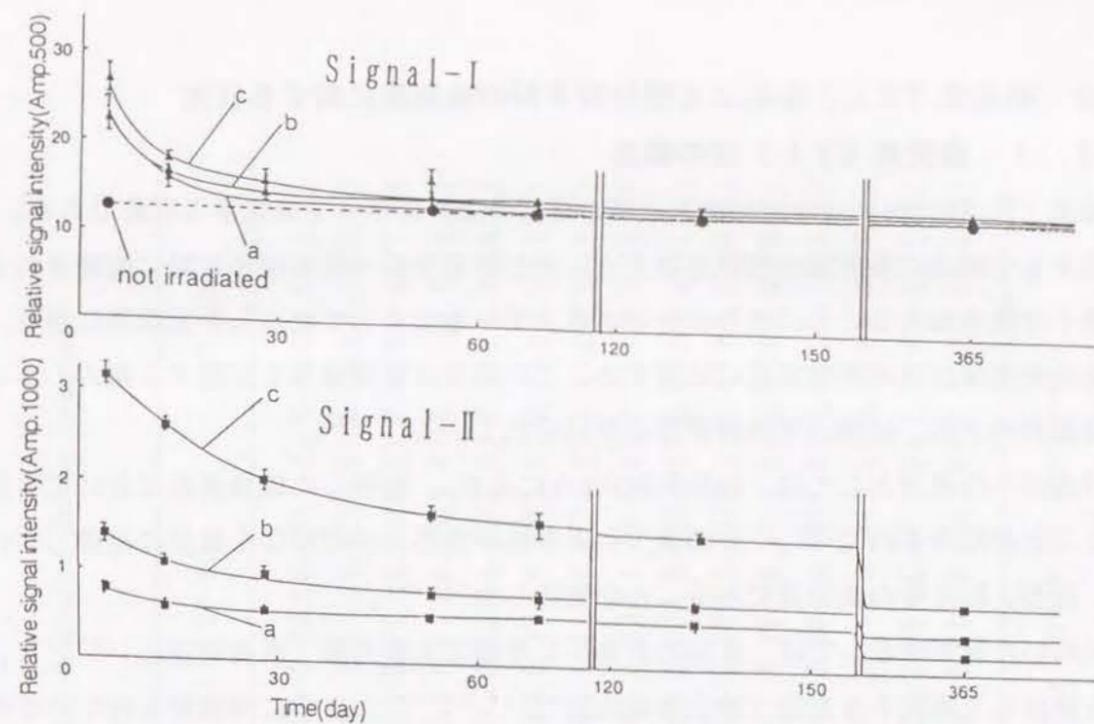


Fig. 11. Time-course of intensities of mainsignal and subsignal in irradiated allspice stored at room temperature (average 25°C)  
 a:irradiated at 5 kGy, b:at 10 kGy, c:at 30 kGy  
 Signal-I:mainsignal, Signal-II:subsignal  
 Values are means  $\pm$ SD for four trials.

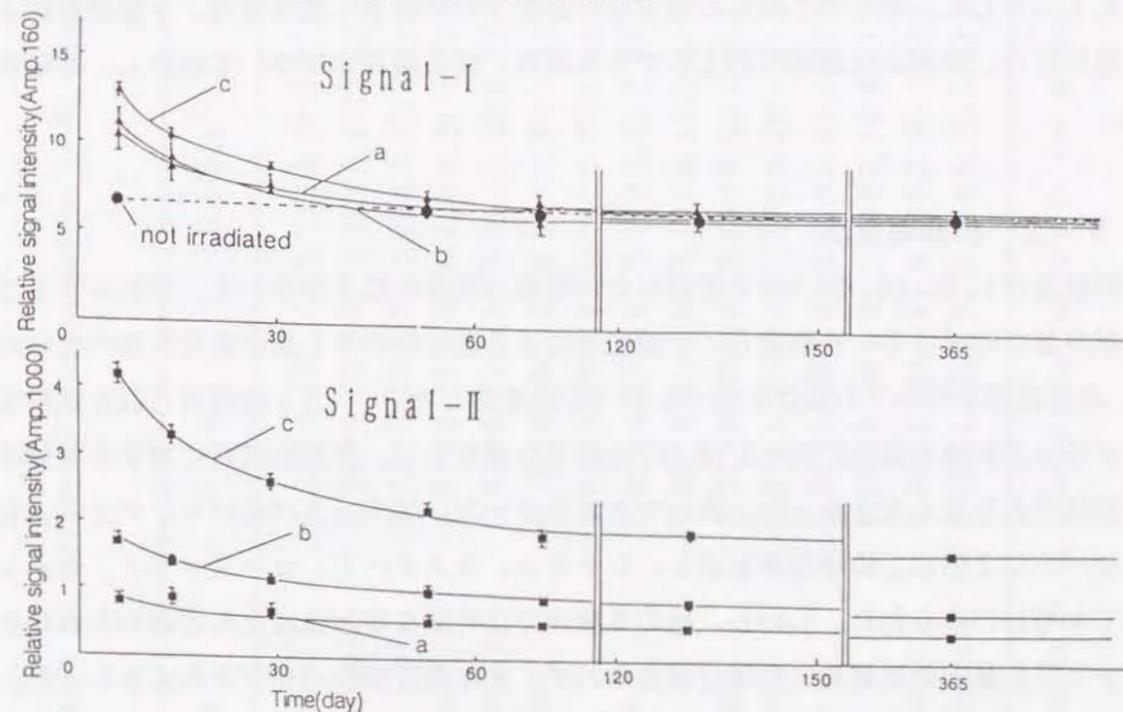


Fig. 12. Time-course of intensities of mainsignal and subsignal in irradiated cinnamon stored at room temperature(average 25°C)  
 a:irradiated at 5 kGy, b:at 10 kGy, c:at 30 kGy  
 Signal-I:mainsignal, Signal-II:subsignal  
 Values are means  $\pm$ SD for four trials.

### 1. 3 熱発光 (TL) 法による照射香辛料の検知法に関する研究

#### 1. 3. 1 熱発光 (TL) 法の概要

熱発光 (TL:Thermoluminescence) とは、温度の上昇に伴って発光する現象である。格子欠陥をもつ結晶に放射線が照射されると、生じた電子の一部が格子欠陥に捕獲されるが、捕獲電子は熱を加えることにより余分のエネルギーを光として放出し安定状態に戻る。このときの発光量はほぼ照射線量に比例する。この現象は被爆線量を測定する熱ルミネッセンス線量計や土器、鉱物の年代測定等に用いられている<sup>22, 23)</sup>。

照射食品への適用としては、1985年Heideらにより、照射した乾燥食品においてTLを生じることが報告された<sup>11)</sup>。その後TLの本体が食品自体ではなく食品に附着している石英、長石、粘土等の鉱物質であることが判明した<sup>12-14)</sup>。

TLを用いた検知法としては、食品のままTLを測定する方法 (直接測定法)<sup>15-17)</sup>、鉱物質を抽出して測定する方法 (抽出測定法)<sup>12-14, 18, 19)</sup>、さらに再照射を行ないその前後のTL量の比をとる方法 (再標準化法)<sup>14, 18, 19)</sup>が報告されている。

そこで、これら3種類のTLによる照射食品の検知法について検討することとした。試料には我が国の市販香辛料を用い、さらに香辛料の流通期間が長いことから照射後1年経過したものとした。そしてこれらの測定法の分析上の問題点、抽出溶媒、 $\gamma$ 線照射によるTL値の変化、照射の有無判別法としての可能性、検出限界等について検討し、評価を行った。

#### 1. 3. 2 直接測定法

非照射及び1、5、10、30 kGyで照射した14種類15検体の粉末香辛料を、前処理することなく試料皿にのせてTLを測定し、 $\gamma$ 線照射による香辛料のTL量の変化を調べた (Table 1)。非照射香辛料のTL量は0.05~0.87 nC/mgを示した。一方 $\gamma$ 線照射された試料ではターメリックが最も高い2.30~3.28 nC/mgのTL量を示し、非照射試料に対する増加率も38~53倍であり最も大きかった。次いでセロリリーフ、ブラックペッパー、タイム、レッドペッパーが2倍以上の増加率を示し、シナモン、マスタード、ローズマリー、セージにおいても増加がみられた。しかし、他の5検体では有意な増加はほとんど認められなかった。またTL量と照射線量に相関は認められず、また測定値のバラツキも大きかった。

これらの結果を分布図で示し香辛料全体としての変化を調べたところ (Fig. 13)、 $\gamma$ 線照射によるTL量の増加はみられたが、非照射試料と30 kGy照射試料においても分布範囲が大きく重複していた。

Table 1. Effect of  $\gamma$ -irradiation on TL Intensity of Spices Measured Whole Samples

Spices	0 kGy	1 kGy	5 kGy	10 kGy	30 kGy
Allspice	0.18±0.03(1.0)	0.20±0.06(1.1)	0.27±0.05(1.5)	0.22±0.05(1.2)	0.22±0.06(1.2)
Black-pepper	0.24±0.03(1.0)	0.51±0.21(2.0)	1.49±2.20(6.0)	1.11±0.42(5.0)	0.64±0.60(3.0)
Celery leaf	0.46±0.13(1.0)	1.06±0.35(2.0)	2.45±1.54(5.0)	2.76±0.93(6.0)	2.61±0.95(7.0)
Cinnamon (1)	0.07±0.07(1.0)	0.13±0.05(1.9)	0.11±0.04(1.5)	0.17±0.05(2.4)	0.21±0.07(2.9)
Cinnamon (2)	0.07±0.01(1.0)	0.05±0.03(0.7)	0.07±0.01(1.0)	0.15±0.11(2.3)	0.33±0.59(4.6)
Coriander	0.18±0.03(1.0)	0.24±0.03(1.3)	0.26±0.02(1.4)	0.37±0.10(2.0)	0.35±0.05(1.9)
Lorel	0.86±0.17(1.0)	1.14±0.07(1.4)	1.14±0.22(1.4)	1.11±0.25(1.3)	1.04±0.30(1.2)
Mustard	0.09±0.01(1.0)	0.19±0.06(2.0)	0.13±0.03(1.4)	0.92±1.49 (10)	0.20±0.06(2.0)
Nutmeg	0.05±0.01(1.0)	0.13±0.16(2.6)	0.05±0.00(1.0)	0.07±0.03(1.4)	0.07±0.01(1.4)
Red-pepper	0.24±0.06(1.0)	0.81±0.54(3.0)	1.56±1.35(6.5)	0.84±0.36(3.5)	1.47±0.57(6.0)
Rosemary	0.87±0.11(1.0)	1.57±0.27(1.8)	2.32±0.39(2.7)	2.99±0.97(3.5)	2.31±0.53(2.7)
Sage	0.31±0.03(1.0)	0.56±0.43(1.8)	0.45±0.05(1.4)	0.80±0.59(2.6)	0.71±0.18(2.3)
Thyme	0.28±0.04(1.0)	1.09±0.19(3.9)	0.83±0.18(2.9)	1.54±0.56(5.4)	2.19±0.46(7.7)
Turmeric	0.06±0.02(1.0)	3.28±2.74 (53)	2.30±1.19 (38)	2.39±1.42 (39)	2.75±1.97 (44)
White-pepper	0.29±0.05(1.0)	0.36±0.05(1.2)	0.45±0.09(1.5)	0.41±0.04(1.4)	0.35±0.08(1.2)

Data: mean of TL intensity(nC/mg)±S.D. for 5 or more trials. ( ) : rate of increase.

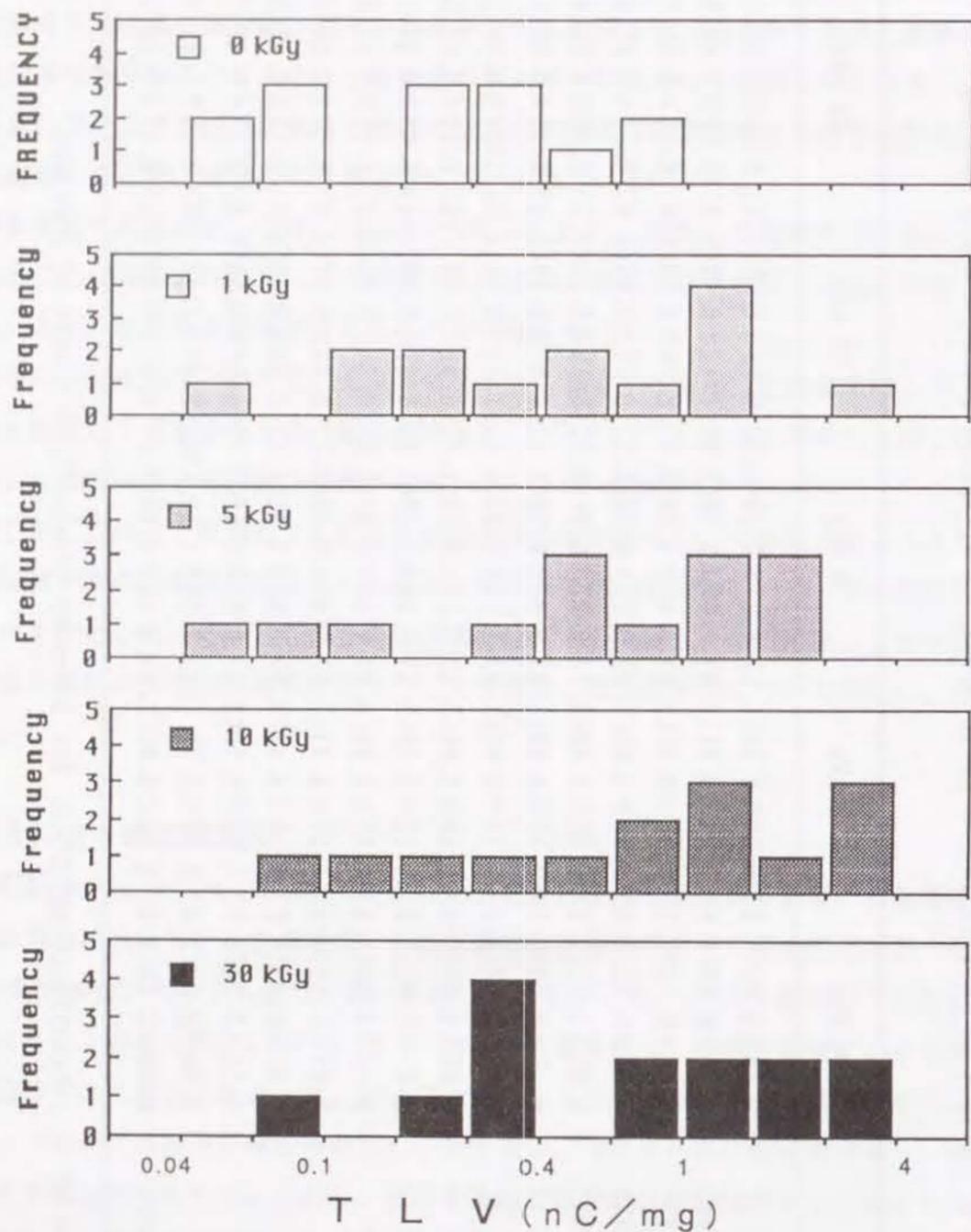


Fig.13. TL intensity ranges of unirradiated and irradiated spices measured whole samples

直接測定法は非常に簡便であり、またHeideらは照射香辛料において10 kGyから判別可能であると報告しているが<sup>16)</sup>、今回の結果からは30 kGy照射試料においても照射の有無を判別することは困難であった。

### 1. 3. 3. 抽出測定法

#### 1) 鉍物質の抽出

19種類27検体の香辛料を用いて抽出測定法の検討を行った。これらの香辛料には Autioら<sup>18)</sup>が報告しているような肉眼で識別できる混入物はみられなかった。抽出溶媒についてはポリタングステン酸ナトリウム溶液が比重2以上あり香辛料と鉍物質の分離に適しているが、高価で有害性がありしかも我が国では入手に時間がかかる。そこで代替として比重1.6のタングステン酸ナトリウム飽和溶液の使用可能性を検討したところ、粉末香辛料27検体中17検体で良好な抽出物を得ることができた。

またバジル、セロリリーフ、マジョラム、マスタード、セージ、スターアニス、タイムの7検体は、タングステン酸ナトリウム飽和溶液では十分な分離が得られなかったが、ポリタングステン酸ナトリウム溶液によりほぼ良好な抽出物を得ることが出来た。これら7検体は微粉末であり、粒子が非常に細かいため、沈降しやすいものと思われる。このように最初にタングステン酸ナトリウム飽和溶液で抽出を行うと、試料の約2/3で良好な抽出物が得られ、分離が不十分な場合も抽出物にポリタングステン酸ナトリウム溶液を加えることにより使用量を削減することができるので、2種類の溶媒による抽出を行うこととした。各種香辛料における鉍物質画分の収率はTable 2に示すように、0.02~5.28%であった。しかし、収率1%以上の試料はいずれもその大部分が混入した有機物であり、今回用いた香辛料中の鉍物質の含有率はおよそ0.1%以下と推定された。

しかし、オールスパイス2検体及びシナモン1検体はポリタングステン酸ナトリウム溶液を用いると全く沈降物が得られず測定が不可能であった。これらの香辛料は植物体の内部を用いているために鉍物質の付着がほとんどなかったものと考えられる。

#### 2) $\gamma$ 線照射によるTL量の変化

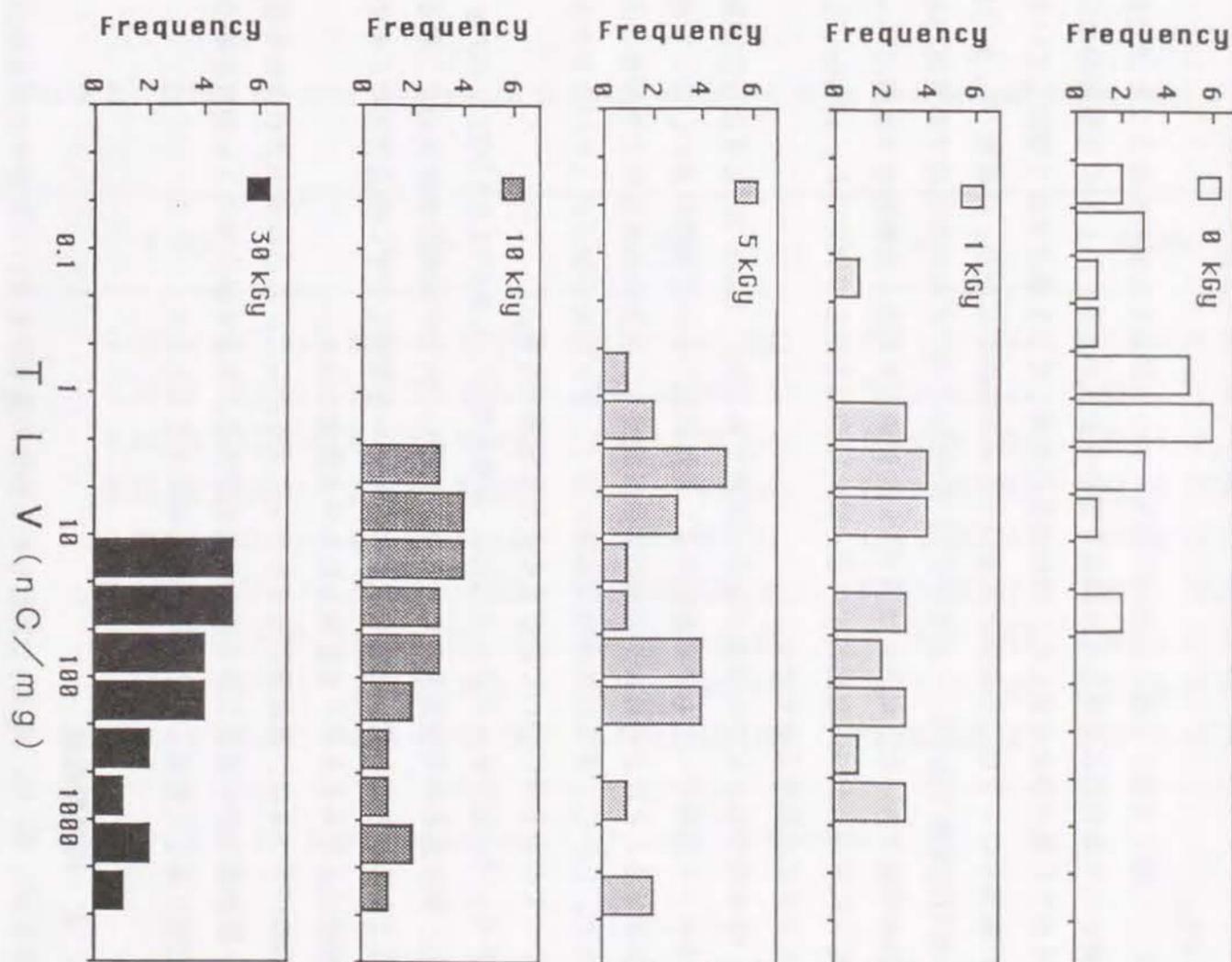
非照射及び1、5、10、30 kGyで照射した19種類27検体の香辛料のうち、抽出物を得ることができた18種類24検体についてTL量を測定し、 $\gamma$ 線照射の影響を検討した(Table 2)。その結果、今回測定したすべての試料において $\gamma$ 線照射によるTL量の大幅な上昇が観察された。すなわち、非照射では0.02~38.3nC/mgだったTL量が、1 kGy照射では0.21~

Table 2. Effect of  $\gamma$ -irradiation on TL Intensity of Minerals Separated from Spices

Spices	Yield (%)	TL Intensity (nC/mg)				
		0 kGy	1 kGy	5 kGy	10 kGy	30 kGy
Basil	1.18±0.79	0.56±0.17(1.0)	5.42±2.74(9.7)	1.79±0.99(3.2)	9.97±8.52(5.0)	48.9±3.15 (87)
Black-pepper (1)	0.07±0.01	1.86±0.55(1.0)	67.6±27.7 (36)	165± 68 (89)	235± 60(126)	313± 79(168)
Black-pepper (2)	0.18±0.04	1.20±0.08(1.0)	1.93±0.46(1.6)	2.35±0.75(2.0)	3.01±1.10(2.6)	19.5±14.3 (16)
Celery leaf	0.14±0.01	2.14±0.87(1.0)	567± 157(265)	947± 175(442)	1048± 233(489)	1284± 144(600)
Cinnamon (1)	0.10±0.05	0.27±0.19(1.0)	2.53±1.09(9.6)	4.01±4.73 (15)	4.92±1.36 (18)	24.3±22.3 (92)
Cinnamon (2)	0.40±0.09	0.03±0.00(1.0)	0.21±0.15(6.7)	1.27±1.03 (40)	4.52±3.65(141)	12.6±11.5(393)
Coriander (1)	0.17±0.03	0.60±0.08(1.0)	1.99±0.82(3.0)	7.08±5.27 (11)	4.36±2.43(7.0)	15.6±10.8 (26)
Coriander (2)	0.09±0.03	0.79±0.22(1.0)	7.12±2.53(9.0)	3.88±3.19(4.9)	11.3± 8.1 (14)	63.4±60.7 (80)
Cummin	1.29±0.54	3.67±1.44(1.0)	115± 36 (31)	162± 55 (53)	537± 128(146)	184± 79 (50)
Dill	5.28±2.37	0.53±0.69(1.0)	7.23±7.72 (14)	16.4± 5.7 (31)	17.6± 8.7 (33)	25.1±19.9 (47)
LoREL	0.06±0.01	0.17±0.06(1.0)	24.7±10.4(145)	3.23±0.09 (19)	23.4±11.6(138)	19.8± 2.0(117)
Marjoram	4.13±0.62	0.05±0.03(1.0)	7.85±4.42(157)	51.6±26.5(1032)	29.4±14.6(588)	114± 38(2272)
Mustard	1.29±0.45	0.02±0.01(1.0)	3.14±5.13(157)	1.59±0.63 (80)	5.11±5.58(256)	11.4±10.9(570)
Nutmeg (1)	0.03±0.01	0.10±0.04(1.0)	2.33±0.96 (25)	29.8±42.0(314)	16.1±13.5(167)	53.6±17.3(563)
Nutmeg (2)	0.11±0.12	0.05±0.02(1.0)	1.59±0.96 (32)	5.04±0.12(101)	2.37±2.58 (47)	64.8±66.1(1296)
Red-pepper	0.04±0.01	38.3±35.3(1.0)	790± 330 (21)	2179± 766 (57)	2090±1136 (54)	2112± 184 (55)
Rosemary (1)	0.31±0.29	1.96±1.37(1.0)	112± 47 (57)	67.0±40.4 (34)	91.4±45.9 (47)	153± 63 (78)
Rosemary (2)	0.58±0.33	1.13±0.21(1.0)	37.4±16.8 (33)	53.6±17.3 (47)	39.7±26.6 (35)	24.0±12.8 (21)
Sage	0.02±0.01	2.89±1.44(1.0)	117± 79 (41)	26.9± 4.4(9.0)	74.6±20.9 (26)	93.1± 0.0 (32)
Staranis	0.04±0.03	0.88±0.53(1.0)	77.1± 0.0(7.6)	126± 0(142)	68.0±28.4 (77)	831± 0(944)
Thyme	0.25±0.08	1.87±0.72(1.0)	40.9±15.9 (22)	95.0± 4.1 (51)	168± 66(106)	242± 38(129)
Turmeric (1)	0.20±0.06	25.2±12.3(1.0)	873± 43 (35)	2327± 522 (92)	2802± 139(111)	1810± 509 (72)
Turmeric (2)	0.13±0.07	5.33±1.72(1.0)	282± 62 (53)	149± 45 (28)	113± 64 (21)	118± 91 (22)
White-pepper	0.02±0.01	1.24±0.00(1.0)	2.11±0.10(1.7)	6.21±0.00(5.0)	14.8±12.0 (12)	30.3±31.9 (24)

Data: mean of TL intensity(nC/mg)±S.D. for 5 or more trials. ( ) : rate of increase.

Fig. 14. TL intensity ranges of unirradiated and irradiated spices measured minerals separated from them



873 nC/mgで1.6~265倍、5 kGy照射では1.27~2327 nC/mgで2.0~1032倍、10 kGyでは2.37~2802 nC/mgで2.6~588倍、30 kGyでは12.6~2112 nC/mgで16~2272倍に達した。このように抽出物のTL量は、ほとんどの香辛料において非照射試料と1 kGy以上照射した試料に有意な差があり、コントロールとなる同一ロットの非照射試料があれば判別が可能であった。

しかし、一般に流通する食品においては同一ロットの非照射試料を得ることはできない。そこで照射の有無判別の基準となる閾値を定める必要がある。Fig. 14に各照射線量における香辛料のTL量の分布を示した。照射線量に相関してTL量は大きく増加しているが、香辛料の種類やロットによる変動が大きいため分布範囲が広がり、非照射と1、5、10 kGy照射の判別は困難であった。非照射と30 kGy照射についても分布に若干の重複があり完全な判別は困難であった。たとえば10 nC/mgを閾値とすると、非照射の2試料は誤って照射と判定されるが、30 kGy照射のすべての試料は照射と正しく判定され、30 kGy以上のスクリーニングには適用可能である。

また、香辛料全体としての閾値の設定は困難であるが、Table 2に示すように同種類の香辛料はロットが異なっても非照射時のTL量は近似している場合が多い。そこで測定件数を増加させることにより各香辛料毎の閾値を設定し、判別の確度を向上させることが可能であろう。しかし、香辛料の種類は非常に多く、また産地や部位によるバラツキが予想され、すべての香辛料について設定することは困難である。

レッドペッパー及びターメリック(1)は、非照射時のTL量が38.3及び25.2 nC/mgと非常に高く、照射済みの可能性も考えられた。しかしこれらの試料は照射後のTL量も極めて高いことから、付着していた鉱物質がエネルギーを蓄積しやすい結晶であり、そのため自然放射線によりエネルギーを蓄積したものと推測された。

測定値のバラツキは、直接測定法よりさらに大きかった。これは抽出された鉱物質のエネルギー蓄積量が粒子毎に大きく異なるためである。そこで抽出物のTL測定の場合も、5回以上繰り返して測定し、その平均値を求めたこととした。

### 1. 3. 4 再標準化法

非照射及び1、5、10、30 kGyで照射した9検体の香辛料を用いて再標準化法を検討した。試料は抽出測定法に従って抽出物のTL量(1次TL量)を測定したのち、その残渣を1 kGyで再照射し、再びTL量(2次TL量)を測定してTL比を求めた(Table 3)。その結果、すべての香辛料においてγ線照射によるTL比の大幅な増加が観察された。非照射試

Table 3. Effect of γ-irradiation on TL Ratio of Spices Using Renormalized Measurement

Spices	0 kGy	1 kGy	5 kGy	10 kGy	30 kGy
Basil	0.06 ± 0.06(1.0)	0.76 ± 0.31 (12)	1.24 ± 0.97 (21)	1.75 ± 1.27 (29)	2.23 ± 0.96 (37)
Black-pepper	0.30 ± 0.14(1.0)	1.78 ± 0.39(5.9)	0.84 ± 0.38(6.1)	1.73 ± 1.34(5.8)	3.35 ± 1.72 (11)
Cumin	0.03 ± 0.01(1.0)	0.74 ± 0.22 (25)	0.98 ± 0.36 (33)	1.18 ± 0.30 (39)	1.87 ± 1.49 (62)
Dill	0.01 ± 0.00(1.0)	2.31 ± 2.91(231)	1.41 ± 1.03(141)	2.76 ± 3.48(276)	3.62 ± 5.12(362)
Marjoram	0.02 ± 0.03(1.0)	0.91 ± 0.63 (46)	1.42 ± 0.86 (71)	2.47 ± 1.12(124)	1.69 ± 0.45 (85)
Nutmeg	0.04 ± 0.06(1.0)	10.2 ± 15.4(255)	2.06 ± 0.00 (52)	5.62 ± 5.49(141)	260 ± 65(6500)
Rosemary	0.05 ± 0.05(1.0)	1.16 ± 0.65 (23)	2.12 ± 0.62 (42)	1.53 ± 0.91 (31)	2.38 ± 2.03 (48)
Staranis	0.24 ± 0.13(1.0)	1.94 ± 0.00(8.1)	3.86 ± 0.00 (16)	2.16 ± 1.21(9.0)	3.59 ± 0.00 (15)
Turmeric	0.01 ± 0.00(1.0)	0.34 ± 0.03 (34)	1.16 ± 0.45(116)	1.13 ± 0.34(113)	1.57 ± 0.20(157)

Data: mean of TL ratio ± S.D. for 5 or more trials. ( ): rate of increase.

料におけるTL比は0.01~0.30と低いが、1 kGy照射では0.34~10.2、5 kGyでは0.84~3.86、10 kGyでは1.13~5.62、30 kGyでは1.57~260となり、照射試料のTL比は非照射試料の5.8~6500倍であった。理論的には、TL比は最初に照射されていた線量と同一線量で再照射された場合には1、高い線量で照射されていれば1より大きく、また非照射の場合には1より小さくなる。実際には保存期間中の減衰や試料のバラツキ等によりやや低めで幅ができることになる。今回の測定結果はこれとよく一致していた。

Fig. 15に各照射線量におけるTL量の分布を示した。非照射試料と照射試料のパラメータの分布範囲の重複がほとんどみられず、直接測定法や抽出測定法と比較して、判別能力が格段に向上した。非照射と5 kGy以上照射した試料では完全に判別が可能であった。またヒストグラム上、非照射試料と1 kGy照射試料のTL比が重なって見えるが、非照射のTL比の最高値は0.30、1 kGy照射の最低値は0.34であり重複はしていない。

従って、TL比の閾値を0.3に設定すれば、照射されたすべての検体が正しく判定されるが、非照射の1検体が照射と誤判定されることになる。一方閾値を0.4~0.7の間に設定すれば、1 kGy照射の1検体が非照射と誤判定されるものの、5 kGy以上照射したすべての検体と1 kGy照射の約90%が正しく判定され、非照射検体の誤判定もない。閾値を決定するためには、さらに多くの試料について測定を行う必要があるが、今回の結果からはTL比0.5を閾値とするのが妥当ではないかと思われる。

### 1. 3. 5 TLを用いる照射香辛料の検知法の評価

香辛料に付着しているある種の鉱物質は、 $\gamma$ 線照射により結晶中にエネルギーを蓄積し、それによりTLの増加をひきおこすため、照射の有無判別の指標として非常に有用であると考えられる。今回の実験においては、その実用性を評価するために、測定が困難であると予想される試料を用いて比較検討を行った。すなわち、鉱物質の含有量が低い精製された市販の香辛料で、しかも照射後1年間経過した試料を用いた。

その結果、直接測定法により香辛料をそのまま測定すると、香辛料中の鉱物質が極めて低いこと、香辛料自体がバックグラウンドを上昇させる場合があることなどにより、照射試料と非照射試料に有意な差が見られない場合も多く、全体として照射の有無を判別することはほぼ不可能であった。

一方、抽出測定法により鉱物質を抽出して測定を行うと、同一ロットではコントロール試料と照射試料のTL量に大幅な差がみられ、照射の判別を行うことは容易である。しかし、一般に流通する食品ではコントロール試料を得ることはできない。そこで照射の有無

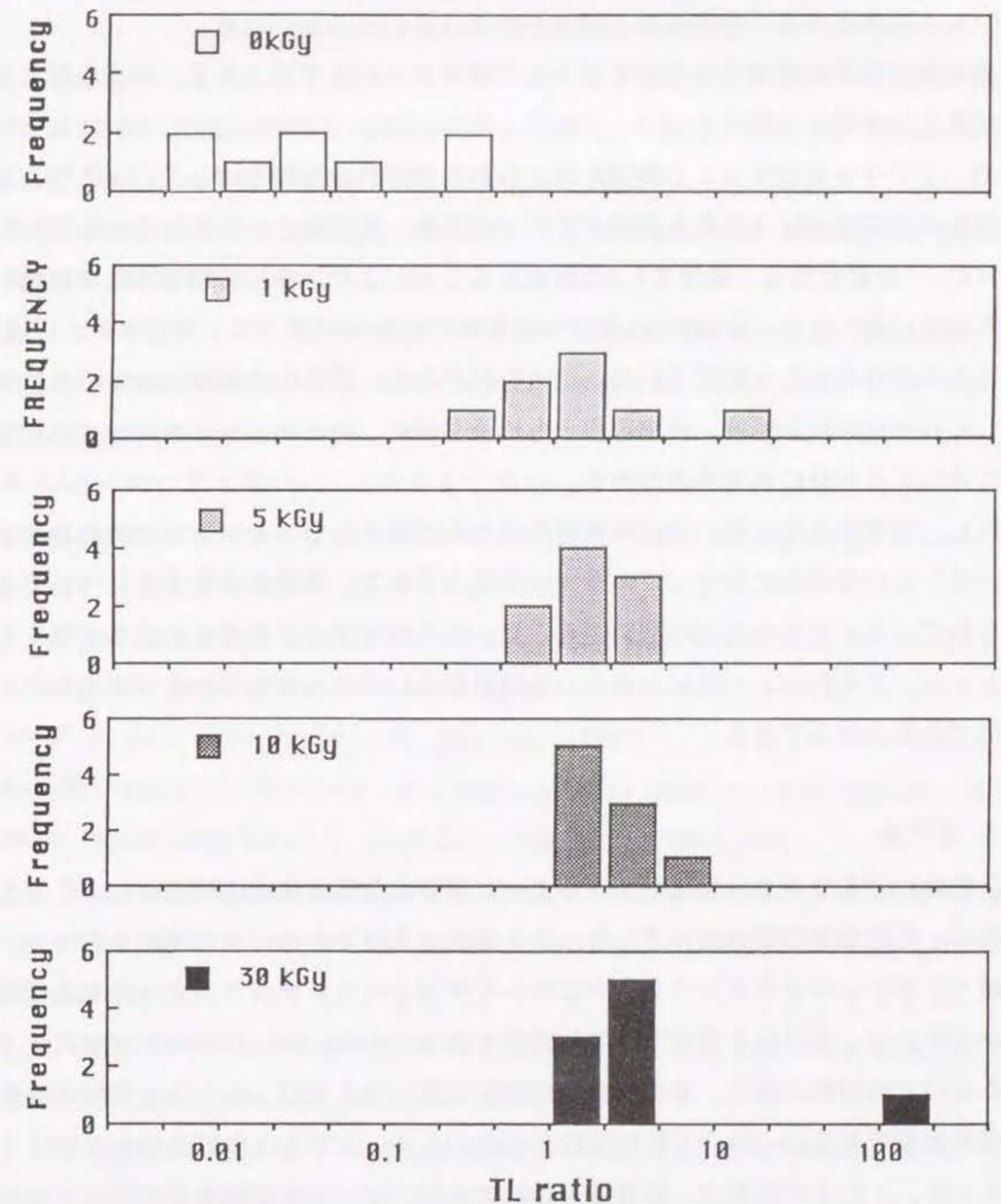


Fig. 15. TL ratio ranges of unirradiated and irradiated spices using renormalized measurement

を判別する基準となる閾値を定める必要がある。一方TL量は、測定用試料中に含有される鉍物質の性質および量により大きく変動するため分布に大きな幅があり、非照射試料と10 kGy以下の照射試料との判別は困難である。30 kGy照射試料ではほぼ判別可能であるが、10 nC/mgを閾値とすると非照射の2検体が誤判定されることになる。

再標準化法はその問題点を克服するために考え出された手法である。抽出物の1次TL量を測定した残渣に再照射を行い、2次TL量を測定して両者の比をとることにより、試料毎のバラツキを相殺することができた。しかも香辛料の種類やロットによる差、さらに測定機器や測定方法による差も相殺することになり、検知法として実用性にも優れたものとなった。照射判定も、閾値を0.5と設定することにより、今回の精製され照射後1年経過した試料においても、5 kGy以上照射した試料ではすべて誤りなく判別され、1 kGy照射試料でも約90%が正しく判定された。以上の結果から、香辛料の照射の有無の検知法としてTLの再標準化法が精度、検出限界ともに最も優れ、照射表示や不許可輸入品の法的な規制に対しても十分に適用可能である。

ただし、再標準化法においては再照射を行う必要があるが、そのための照射施設が限られていることが実用化にあたっての最大の問題点である。再照射の簡易化について検討が進められているがまだ十分ではない。そこで、抽出測定法により得られたTL量をもとにスクリーニングを行い、一定以上を示した試料についてのみ再標準化法で判定を行うのが実用的であると結論できる。

#### 1. 4 まとめ

食品照射によるラジカル生成やエネルギー状態等の物理的変化を明らかにし、またそれらを基にした検知法の開発をめざして、ESR法およびTL法による検討を行った。

照射トウガラシのESRスペクトルにおいて検出されたメチルラジカル由来と推定される副シグナルは、非照射トウガラシでは検出されないため、副シグナルの有無により判定が行えるので識別性が高く、また加熱や光照射によっても生成しないなど照射特異性があり、実用線量である5~10kGyで検知可能な感度があり、しかも1年間の保存に耐える安定性があった。これらの特徴は、従来検討されてきた主ピークを指標とする方法と比較して照射検知法として極めて有用であることを示している。さらにこの副シグナルがオールスパイス、シナモン、セロリリーフ、ローレル、ターメリックにおいても検出されたことから、さらに広範な香辛料に適用可能であると示唆された。

TL法については、直接測定法、抽出測定法、再標準化法について、照射後1年経過した香辛料を用い照射の有無判別の可能性を検討した。直接測定法による照射と非照射の判

別は不可能であった。抽出測定法では $\gamma$ 線照射により熱発光量が大幅に上昇したが、判別にはまだ不十分であった。再標準化法を用いると、1 kGy照射試料では90%、5 kGy以上の照射試料では完全に判別可能であり、検知法として非常に優れていることが確認された。

#### 引用文献

- 1) N. J. F. Dodd, A. J. Swallow and F. J. Ley: "Use of ESR to identify irradiated food" *Radiat. Phys. Chem.*, 26, 451-453 (1985)
- 2) N. J. F. Dodd, J. S. Lea and A. J. Swallow: "ESR detection of irradiated food" *Nature*, 334, 387 (1988)
- 3) M. F. Desrosiers: " $\gamma$ -Irradiated seafoods: identification and dosimetry by electron paramagnetic resonance spectroscopy" *J. Agric. Food Chem.*, 37, 96-100 (1989)
- 4) B. A. Goodman, D. B. McPhail and D. M. L. Duthie: "Electron spin resonance spectroscopy of some irradiated foodstuffs" *J. Sci. Food Agric.*, 47, 101-111 (1989)
- 5) M. H. Stevenson and R. Gray: "An investigation into the effect of sample preparation methods on the resulting ESR signal from irradiated chicken bone" *J. Sci. Food Agric.*, 48, 261-267 (1989)
- 6) M. F. Desrosiers: "Electron spin resonance for monitoring radiation-processed meats containing bone" *J. Food Sci.*, 56, 1104-1105 (1991)
- 7) G. C. Yang and M. M. Mossoba: "An EPR study of free radicals generated by gamma-radiation of dried spices and spray-dried fruit powders" *J. Food Qual.*, 10, 287-294 (1987)
- 8) M. F. Desrosiers and W. L. McLaughlin: "Onion skin as a radiation monitor" *Radiat. Phys. Chem.*, 35, 321-323 (1990)
- 9) J. Raffi and J. P. Agnel: "Electron spin resonance of irradiated fruits" *Radiat. Phys. Chem.*, 34, 891-894 (1989)
- 10) D. R. Maloney, B. J. Tabner and V. A. Tabner: "An electron spin resonance study of some gamma-irradiated fruits" *Radiat. Phys. Chem.*, 39, 309-314 (1992)
- 11) L. Heide and W. Bögl: "Identification of irradiated dried foodstuffs" *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 320, 682-683 (1985)

- 12) H. Y. Göksu-Ögelman and D. F. Regulla: "Detection of irradiated food" *Nature*, 340, 23 (1989)
- 13) D. C. W. Sanderson, C. Slater and K. J. Cairns: "Detection of irradiated food" *Nature*, 340, 23 (1989)
- 14) D. C. W. Sanderson, C. Slater and K. J. Cairns: "Thermoluminescence of foods: Origins and implications for detecting irradiation" *Radiat. Phys. Chem.*, 34, 915-924 (1989)
- 15) L. Heide, R. Guggenberger and K. W. Bögl: "Identification of irradiated spices with luminescence measurements: An European intercomparison" *Radiat. Phys. Chem.*, 34, 903-913 (1989)
- 16) L. Heide and K. W. Bögl: "Identification methods for irradiated food luminescence and viscosity measurements" *Int. J. Radiat Biol.*, 57, 201-219 (1990)
- 17) A. Behere, S. R. Padwal Desai, S. M. D. Rao and P. M. Nair: "A simple method for identification of irradiated spices" *Radiat. Phys. Chem.*, 40, 27-30 (1992)
- 18) T. Autio and S. Pinnioja: "Identification of irradiated foods by thermoluminescence of mineral contamination" *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 191, 177-180 (1990)
- 19) S. Pinnioja, T. Autio, E. Niemi and O. Pensala: "Import control of irradiated foods by the thermoluminescence method" 196, 111-115 (1993)
- 20) W. Bögl and L. Heide: "Chemiluminescence measurements as an identification method for gamma-irradiated foodstuffs" *Radiat. Phys. Chem.*, 25, 173-185 (1985)
- 21) M. S. Chang, L. H. Chen, Z. T. Tsai and Y. K. Fu: "Identification of gamma-irradiated foodstuffs by chemiluminescence measurements in Taiwan" *Radiat. Phys. Chem.*, 39, 449-454 (1992)
- 22) 日本生物物理学会編: 続生物物理学講座(3)物理的測定法Ⅲ p. 329-331 (1968) 丸善
- 23) 大木道則、大沢利昭、田中元治、千原秀昭編: 化学大辞典 p. 1729 (1989) 東京化学同人

## 第2章 食品照射における化学的变化と検知法

### 2. 1 放射線照射による化学的变化

食品が放射線照射を受けると、前章で述べたようにまず照射エネルギーが付加され不安定な活性化イオン、ラジカル、励起分子等が生成される物理的变化がおこる。次にそれらは周辺に存在する分子と反応し、エネルギーをより安定な状態に変化させようとする。生物体においては、糖、タンパク質、脂肪、精油成分等の生体成分と反応し、付加または分解により新たな化合物の形成や既存の化合物の増減等をひきおこす。このような物理的变化に引き続いて起こる化合物の生成、分解等の変化を放射線照射による化学的变化と呼ぶ。化学的变化を指標とした照射検知法としては、照射に特有な化合物の生成が望ましいが、照射に特有でしかも実用線量でも検出可能という条件を満たすことはきわめて難しい。それらの化合物の検出にはガスクロマトグラフィー(GC)法や液体クロマトグラフィー(HPLC)法等が用いられる。

照射検知の可能性があると報告されている化合物は、鶏肉・豚肉・魚肉・エビにおける *o*-チロシン<sup>1)</sup>、脂肪・肉類におけるアルカン類およびアルケン類、とくに heptadecene、tetradecene および hexadecadiene<sup>2-4)</sup>、鶏肉・豚肉等における 2-alkylcyclobutanone 類<sup>5)</sup> で、主に  $\gamma$  線照射により脂肪から生成する化合物である。また照射による食品成分の化学的变化を明らかにすることは、検知法開発のためだけではなく照射食品の安全性や栄養価の点からも重要である。

### 2. 2 照射グレープフルーツの成分変化に関する研究

#### 2. 2. 1 照射グレープフルーツの現状

グレープフルーツ (*Citrus paradisi* Macf.) はその大部分を米国など諸外国からの輸入に依存している。米国ではグレープフルーツ等柑橘類に寄生する地中海ミバエの殺虫燻蒸に二臭化エチレン(EDB)を使用してきたが、その発ガン性が明らかになったため使用禁止となり、その代替の1つとして  $\gamma$  線照射を許可した。我が国に輸出する場合には他の方法を用いることになっているが、輸入食品監視のため検知法を開発する必要があった。

#### 2. 2. 2 照射グレープフルーツの精油成分の変化

照射グレープフルーツの精油成分に関しては、Moshonasら<sup>6)</sup> が照射による  $\beta$ -ピネンの分解を報告している。そこで非照射および 0.3~2 kGy 照射したグレープフルーツの外果皮

よりディーン・スターク蒸留装置を用いて精油成分を抽出し、水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ(FID-GC)により測定を行った(Fig.1 & Fig.2)。精油成分の多数のピークが検出され、そのうちの15種類については、GCおよびガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS)を用い標準品により同定を行った。ピークパターンを比較すると個体によると思われる変動はみられたが、非照射試料と照射試料で有意な差異は認められなかった(Table 1)。



Fig.1. Gas chromatogram of essential oil in a grapefruit Peak  
a:  $\alpha$ -pinene, b:  $\beta$ -pinene, c: dipentene, d: isooctyl acetate  
e: *n*-nonyl aldehyde, f: *sec*-octyl alcohol, g: citronellal  
h: *n*-octyl acetate, i: *n*-decyl aldehyde, j: linalol, k: *n*-octyl  
alcohol, l: terpineol, m: *n*-decyl acetate, n: geranyl acetate  
o: citronellol

Table 1. Effect of  $\gamma$ -Irradiation on  $\beta$ -Pinene Content in Grapefruit Peel

Dose(kGy)	Number	$\beta$ -Pinene content(ppm)
0	4	38.5 $\pm$ 19.5
0.3	4	46.9 $\pm$ 8.6
0.5	4	56.0 $\pm$ 23.9
1	4	51.2 $\pm$ 6.5
2	4	42.4 $\pm$ 11.2



Fig.2. Gas chromatogram of essential oil in a grapefruit irradiated at 2 kGy  
a:  $\alpha$ -pinene, b:  $\beta$ -pinene, c: dipentene, d: isooctyl acetate  
e: *n*-nonyl aldehyde, f: *sec*-octyl alcohol, g: citronellal  
h: *n*-octyl acetate, i: *n*-decyl aldehyde, j: linalol, k: *n*-octyl  
alcohol, l: terpineol, m: *n*-decyl acetate, n: geranyl acetate  
o: citronellol

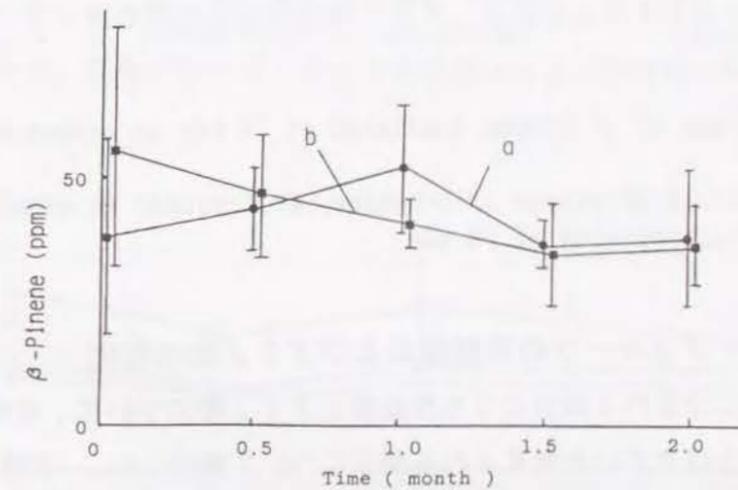


Fig.3. Time course of  $\beta$ -pinene in unirradiated and irradiated grapefruits for the duration of storage at 10°C for 2 months  
a: unirradiated, b: irradiated at 0.5 kGy

また、 $\beta$ -ピネンの定量をおこなったところ、やはり個体差が大きく、照射試料と非照射試料を比較すると有意な差は見られず、照射線量との相関もみられなかった。また2ヵ月保存した場合も、 $\beta$ -ピネン含有量は、非照射試料、照射試料ともに有意な変化はみられなかった(Fig. 3)。

次に $\beta$ -ピネン標準品の $\gamma$ 線照射による分解を検討したところ、*n*-ヘキサン溶液中では分解がみられたものの、純品およびエタノール溶液中では分解は見られなかった(Fig. 4)。

以上より、 $\beta$ -ピネンは $\gamma$ 線照射に対して比較的安定であるという Moshonasら<sup>6)</sup>とは異なる結果が得られた。また他の精油成分も実用線量の範囲ではほとんど変化がみられなかった。

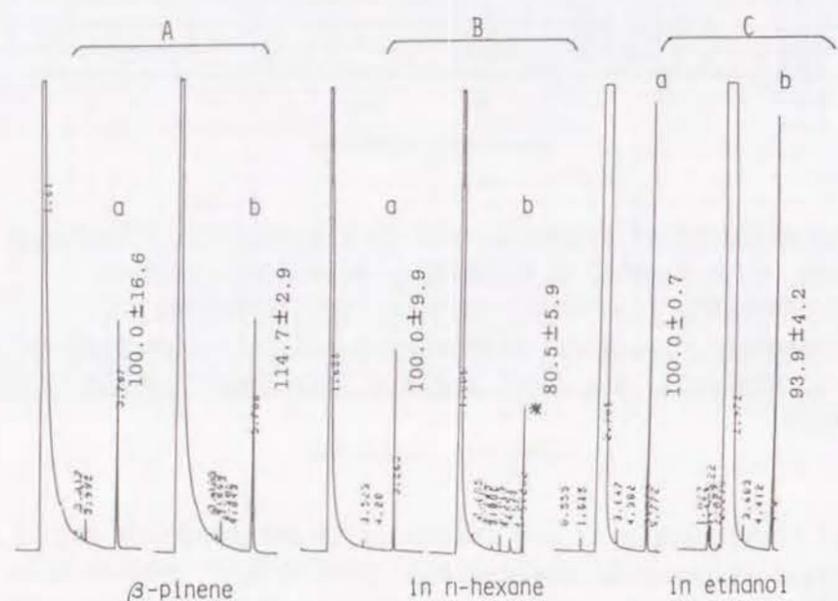


Fig. 4. Gas chromatograms of  $\beta$ -pinene irradiated at 10 kGy in *n*-hexane and ethanol

A:  $\beta$ -pinene itself, B:  $\beta$ -pinene in *n*-hexane, C:  $\beta$ -pinene in ethanol  
a: unirradiated, b: irradiated at 10 kGy

### 2. 2. 3 照射グレープフルーツの脂肪酸およびアミノ酸の変化

照射グレープフルーツに含まれる成分のうち脂肪酸とアミノ酸について、食用部分である果汁および照射影響をうけやすいと考えられる種子について検討した。非照射および0.3~2 kGy照射したグレープフルーツの種子および果汁をクロロホルムで抽出し、クロロホルム層および水層に分離した。クロロホルム層はメチル化後FID-GCにより脂肪酸を測定し、水層は遠心分離後アミノ酸分析計により水溶性アミノ酸を測定した。

種子中の脂肪酸については、非照射試料においてパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸およびリノレン酸が検出された。照射後は2 kGyでリノレン酸が僅かに減少したものの他には変動が見られなかった(Fig. 5)。また照射後1ヵ月間の保存によっても変化しなかった。

一方、果汁中の脂肪酸については、非照射においてパルミチン酸、リノール酸およびリノレン酸が検出された。照射直後は2 kGyでパルミチン酸およびリノール酸の増加がわずかにみられたが(Fig. 6)、さらに1ヵ月間保存したところ、3種類の脂肪酸とも1 kGy照射で有意に増加していた(Fig. 7)。

種子中の水溶性アミノ酸については、グルタミン酸、アラニン、アルギニン、セリン等多くのアミノ酸が検出されたが、個体による含有量の変動が大きく、いずれも非照射試料と照射試料に有意な差は認められなかった。

一方、果汁中のアミノ酸については、アルギニン、アスパラギン酸、セリン等多くのアミノ酸が検出されたが、やはり個体による含有量の変動が大きく、非照射試料と照射試料にはほとんど有意差はみられなかったが、グルタミン酸およびリジンでは若干の減少傾向がみられた(Fig. 8)。

照射影響を受けやすいと考えられる種子においては脂肪酸、アミノ酸共に含有量に変動はみられなかった。一方、食用部分である果汁においてはアミノ酸の含有量にはほとんど変動はみられなかったが、脂肪酸の含有量には照射およびその後の保存による増加がみられた。しかしこれらの変化は、照射の判別に用いられるほどには顕著ではなかった。また増加がみられた化合物は必須脂肪酸であり、他の成分の大きな変化や新規生成物もみられないことから、照射グレープフルーツの栄養価および安全性に問題はないと考えられる。

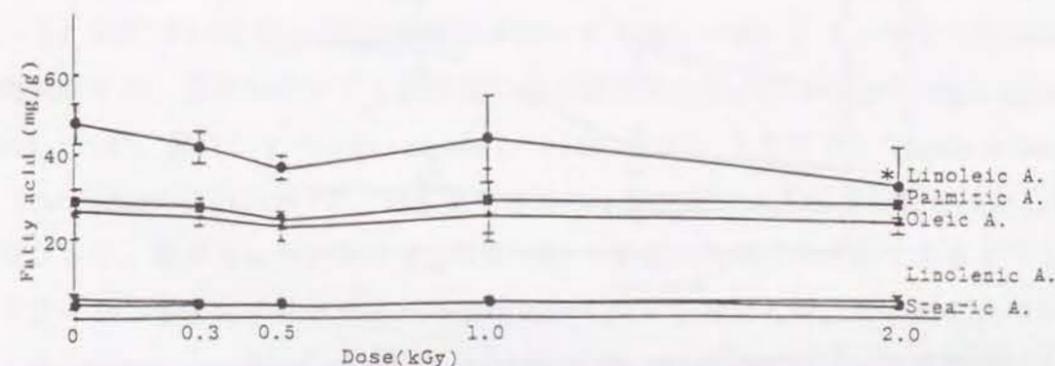


Fig. 5. Effect of  $\gamma$ -irradiation on contents of fatty acid in grapefruit seeds soon after irradiation

\*:  $p < 0.01$  ( $n=4$ )

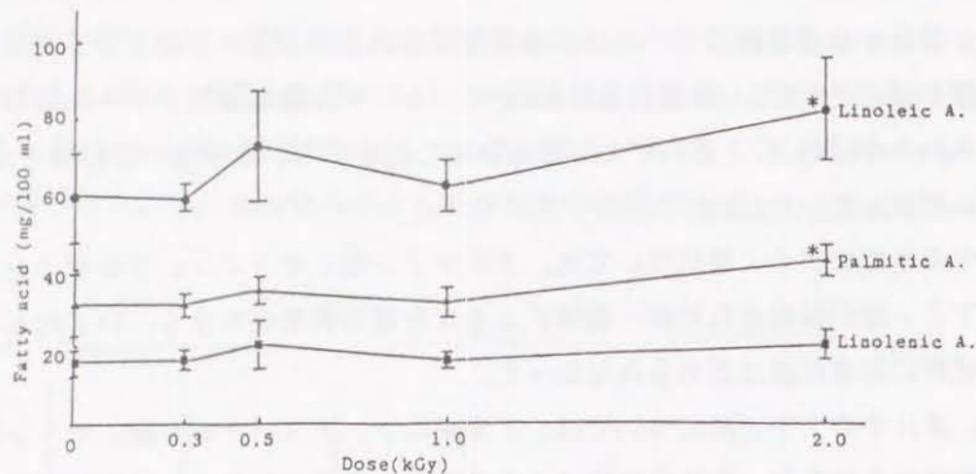


Fig. 6. Effect of  $\gamma$ -irradiation on contents of fatty acid in grapefruit juice soon after irradiation  
\*:p < 0.01 (n=4)

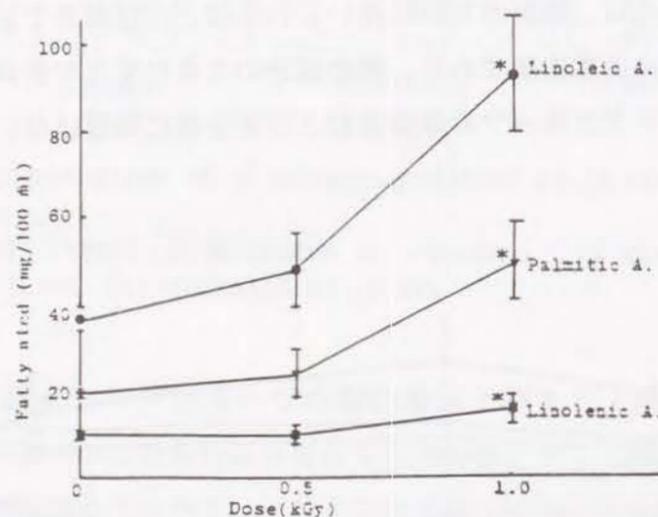


Fig. 7. Effect of  $\gamma$ -irradiation on contents of fatty acid in grapefruit juice one month after irradiation  
\*:p < 0.01 (n=4)

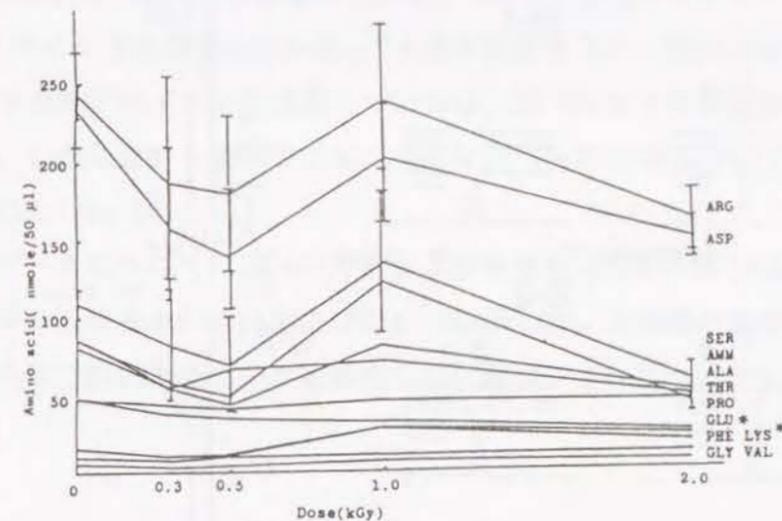


Fig. 8. Effect of  $\gamma$ -irradiation on contents of amino acid in grapefruit juice soon after irradiation  
\*:p < 0.01 (n=4)

## 2. 3 照射香辛料の成分変化に関する研究

### 2. 3. 1 照射香辛料のメタノール抽出成分の変化

香辛料は保存中に害虫またはかびによる被害を受けやすい。そのため香辛料の殺虫、殺菌を目的として数十カ国で放射線照射が許可されており、最も実用化が進んでいる食品の1つである。乾燥体であるため照射による品質の劣化を受けにくく、しかも殺菌を目的としているために10~30 kGyの高線量照射が行われることが多い。そこで安全性の確認と検知法開発のため、香辛料の中でも我が国で最も使用量の多い白コショウ(*Piper nigrum* L. without rind)、黒コショウ(*Piper nigrum* L. with rind)、トウガラシ(*Capsicum annuum* L. var. *frutescens* L.)について、高線量を含めた $\gamma$ 線照射による成分変動を検討した。

白コショウ、黒コショウ、トウガラシについてその主たる辛味成分であるピペリンまたはカプサイシンを含有するメタノール抽出画分の変化を検討した。非照射および5~50kGy照射した白コショウ、黒コショウ、トウガラシにメタノールを加えて可溶性成分を抽出し、トウガラシはさらにクロロホルム分配により精製した。試験溶液はHPLCに注入し、紫外部検出器(UV)および蛍光検出器(FR)によりピペリンおよびカプサイシンの定量およびそれ以

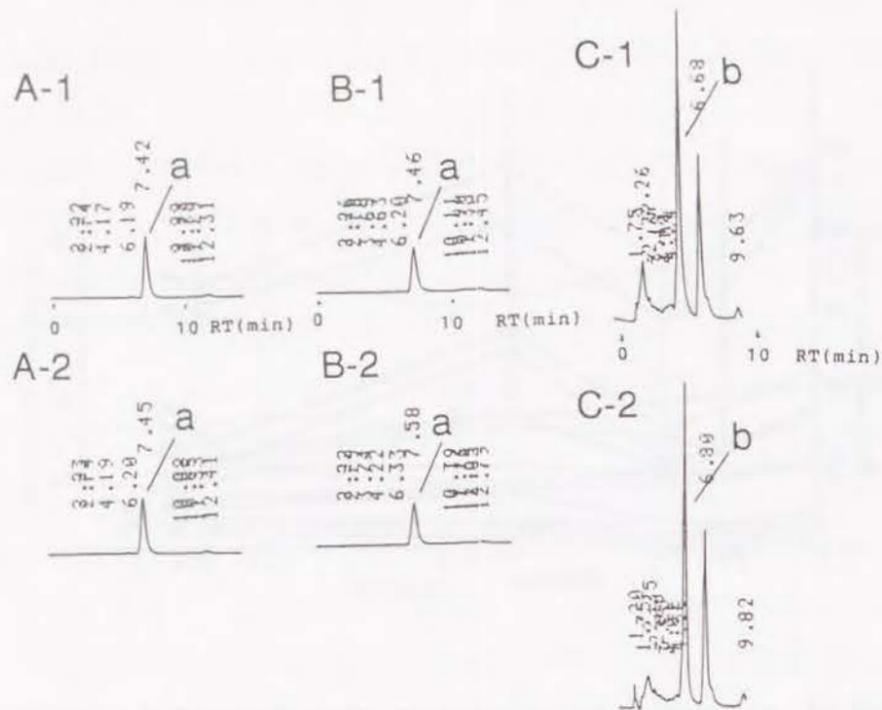


Fig. 9. HPLCs of piperine and capsaicin in methanolic extracts from black pepper (BP), white pepper (WP) and red pepper (RP) unirradiated and irradiated at 50 kGy  
 A-1:unirradiated BP, A-2:irradiated BP, B-1:unirradiated WP  
 B-2:irradiated WP, C-1:unirradiated RP, C-2:irradiated RP

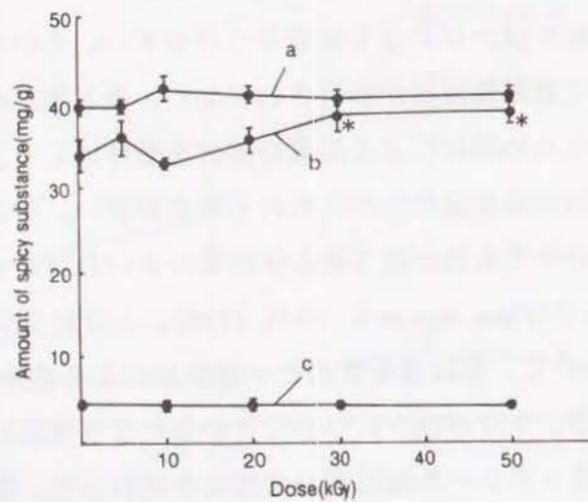


Fig. 10. Effects of irradiation on contents of piperine in BP and WP, and capsaicin in RP  
 a:piperine in BP, b:piperine in WP, c:capsaicin in RP  
 \*:significantly different from control ( $p < 0.01$ )

50 kGy照射および未照射の黒コショウ、白コショウ及びトウガラシのピペリンまたはカプサイシンのUV検出器におけるクロマトグラムをFig. 9に示した。未照射試料では黒コショウ中に $39.4 \pm 1.3 \text{ mg/g}$ 、白コショウ中に $33.5 \pm 2.2 \text{ mg/g}$ のピペリン、トウガラシ中に $4.3 \pm 0.3 \text{ mg/g}$ のカプサイシンを含有していた。γ線を照射すると、黒コショウ中のピペリン及びトウガラシ中のカプサイシンの含量については、50 kGyまでの各線量において変動はみられなかった。しかし白コショウ中のピペリンは30 kGy照射で14.0%、50 kGy照射で14.7%の増加がみられた(Fig. 10)。

それ以外のピークについては50 kGy照射および非照射の各香辛料のUVおよびFR検出器によるクロマトグラムを各々Fig. 11およびFig. 12に示した。3種類の香辛料および各検出器をあわせると全体で約40本のピークを検出した。黒コショウについて主なピークの照射線

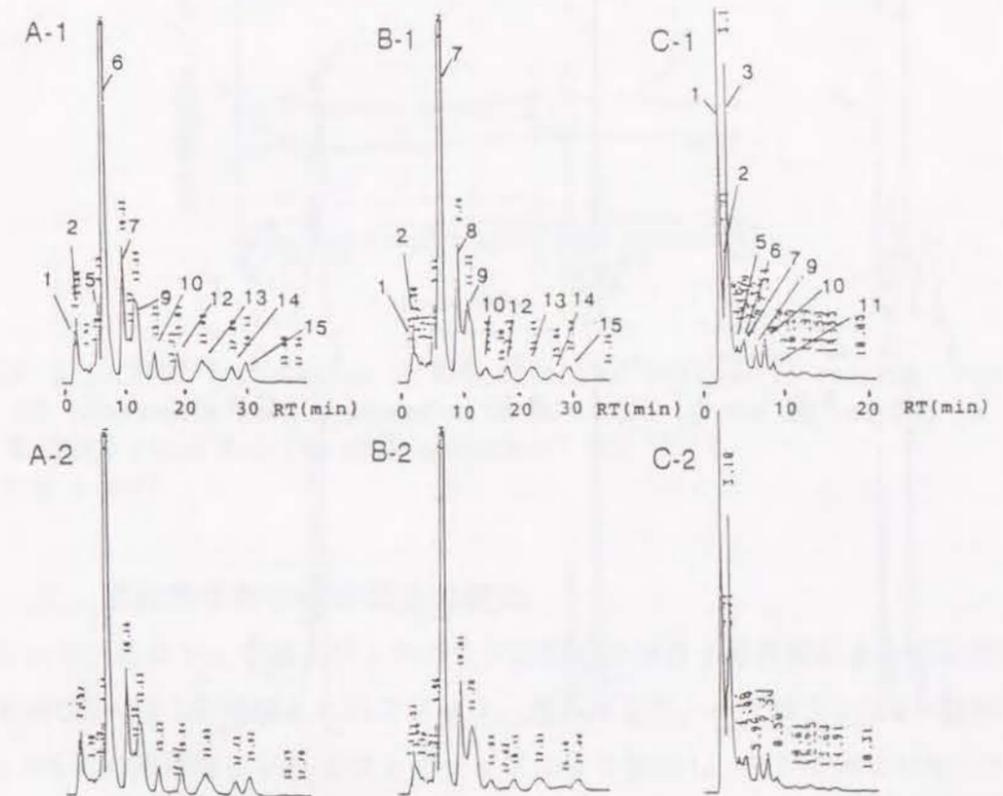


Fig. 11. HPLCs of methanolic extracts from BP, WP and RP unirradiated and irradiated at 50 kGy with a UV detector  
 A-1:unirradiated BP, A-2:irradiated BP, B-1:unirradiated WP  
 B-2:irradiated WP, C-1:unirradiated RP, C-2:irradiated RP  
 Monitored A and B at 254 nm and C at 280 nm.  
 Peak 6 of A and peak 7 of B represent piperine.

量とピーク高の相関を調べたところ(Fig. 13)、ピーク1は50 kGy照射で21.1%の有意な増加がみられた。また、ピーク1、7、12、14および15は5 kGyと20 kGy照射で増加がみられた。これらは照射以外のファクターによると思われるが原因は不明である。白コショウについては、黒コショウとほぼ同じHPLCパターンを示した(Fig. 11 & 12)。ピーク8と9が50 kGyにおいて21.6%および31.2%の減少を示したが、有意な変化はみられなかった。トウガラシについて主なピークの照射線量とピーク高の相関を調べたところ(Fig. 14)、ピーク4において50 kGy照射で60.9%と有意な減少がみられピーク1に若干の増加がみられたが、他にはあまり変化はみられなかった。

以上示したように、3種類の香辛料のメタノール抽出成分は $\gamma$ 線照射により若干の変動はみられたが明確な変化は見られず、また照射によると考えられる新たな生成物も見いだされなかった。

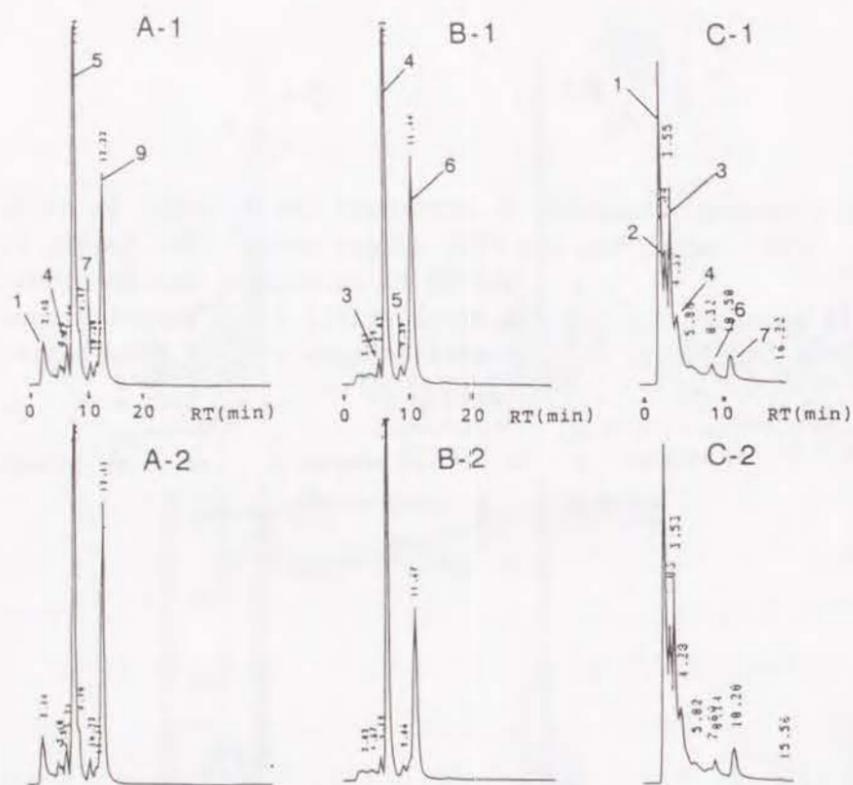


Fig. 12. HPLCs of methanolic extracts from BP, WP and RP unirradiated and irradiated at 50 kGy with a fluorescence detector  
 A-1: unirradiated BP, A-2: irradiated BP, B-1: unirradiated WP  
 B-2: irradiated WP, C-1: unirradiated RP, C-2: irradiated RP  
 Monitored A and B: Ex. at 410 nm, Em. at 500 nm  
 Monitored C: Ex. at 370 nm, Em. 430 nm  
 Peak 5 of A and peak 4 of B represent piperine.

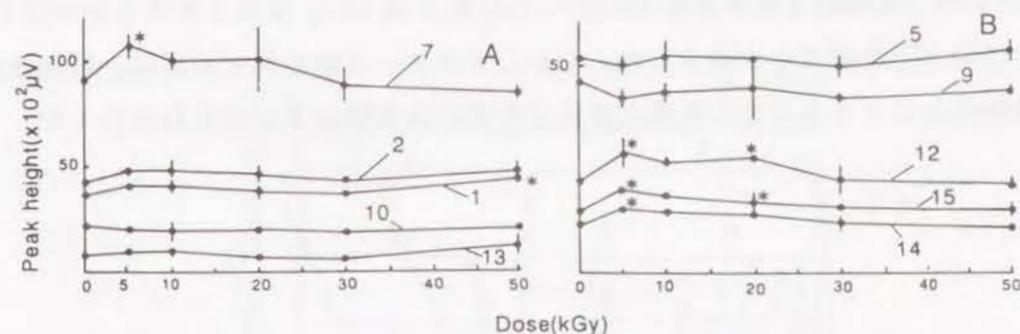


Fig. 13. Effect of irradiation on components of methanolic extract from BP  
 All components were measured at 254 nm and numbers stand for the peak numbers of Fig. 11 A.  
 \*:  $p < 0.01$

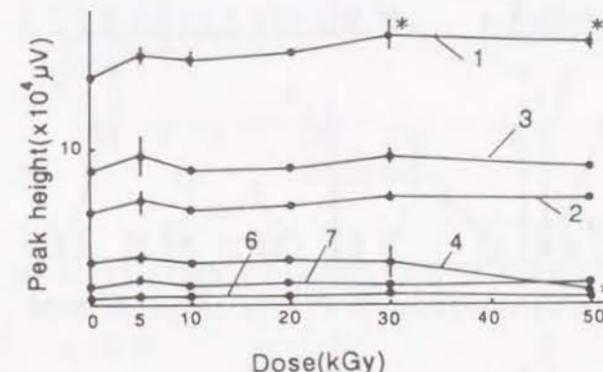


Fig. 14. Effect of irradiation on components of methanolic extract from RP  
 All components were measured with Ex. at 370 nm and Em. at 430 nm  
 Numbers stand for the peak numbers of Fig. 12, C.  
 \*:  $p < 0.01$

### 2. 3. 2 照射香辛料の精油成分の変化

白コショウ、黒コショウおよびトウガラシの精油成分の $\gamma$ 線照射による変化を検討した。非照射および5~50 kGy照射した白コショウ、黒コショウ、トウガラシは、精油抽出装置により1.5時間加熱還流しn-ヘキサントラップにより抽出し、FID-GCおよびGC-MSにより、定性および定量した。

Fig. 15に非照射および50 kGy照射のガスクロマトグラムを示した。黒コショウおよび白コショウでは12本のピークを見だし、GC-MSにより5本のピークについて同定した。トウガラシでは3本のピークが見いだされたが同定はできなかった。それらのピークについ

て $\gamma$ 線照射の影響を検討したところ、黒コショウではピーク11が、白コショウではピーク9、11、12が50 kGy照射でわずかな増加がみられた(Fig. 16)。またトウガラシではピーク2が30および50 kGy照射でやや減少した。しかしメタノール抽出物と同様に、精油成分においても検知法となりうるような明確な変化や新規の生成物は見いだされなかった。

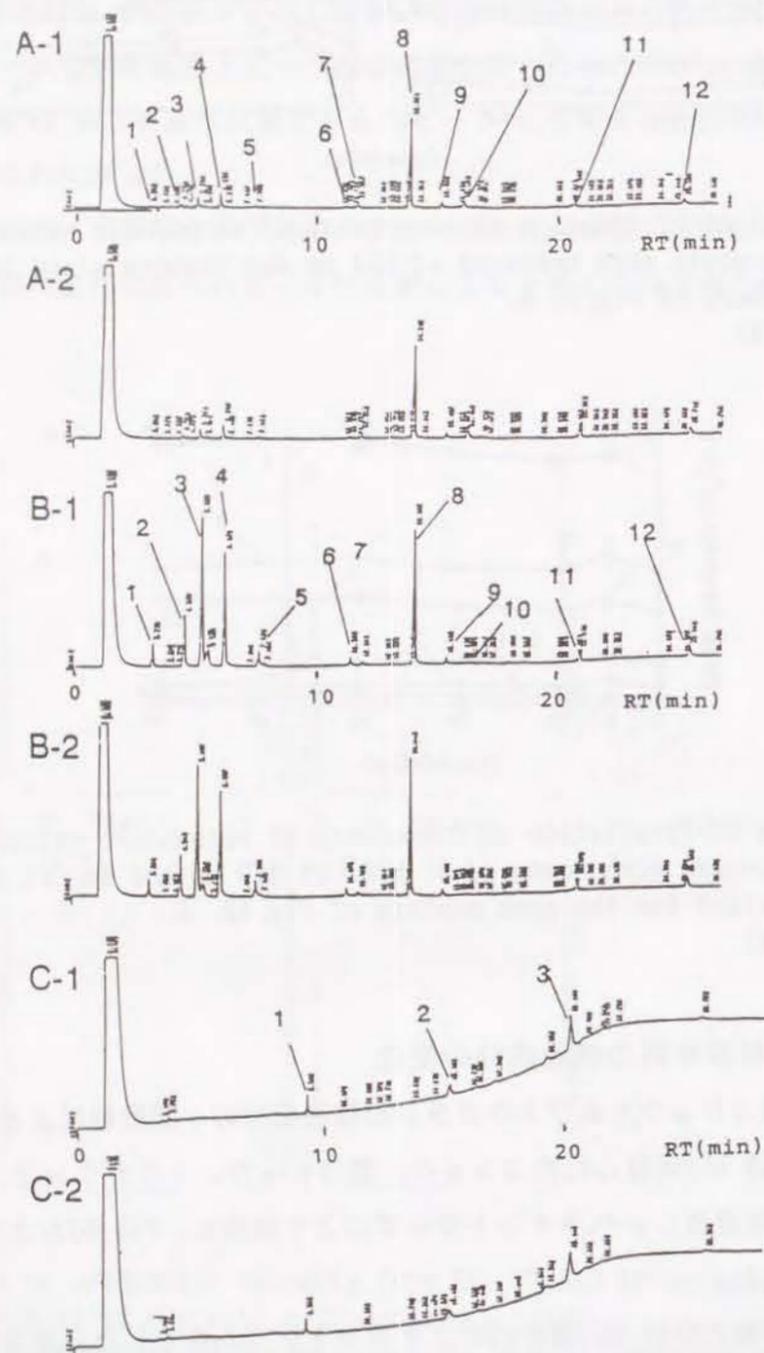


Fig. 15. Gas chromatograms of essential oil from BP, WP and RP unirradiated and irradiated at 50 kGy  
A-1: unirradiated BP, A-2: irradiated BP, B-1: unirradiated WP  
B-2: irradiated WP, C-1: unirradiated RP, C-2: irradiated RP

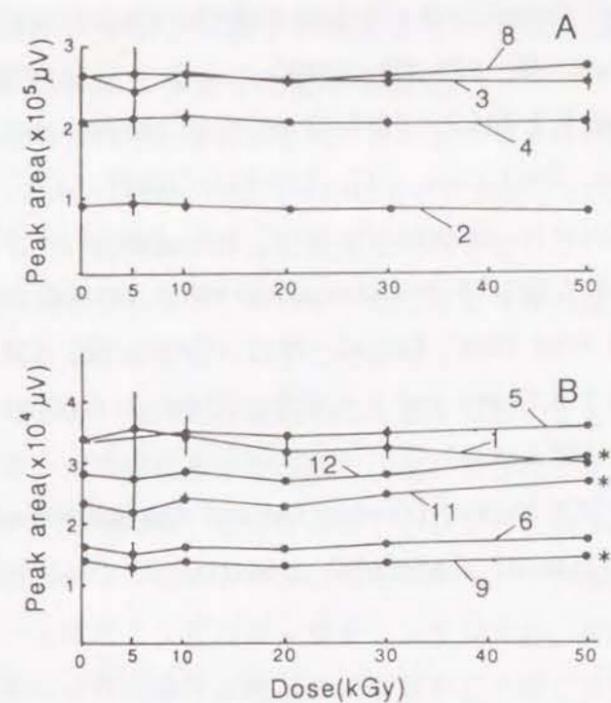


Fig. 16. Effect of irradiation on components of essential oil from WP All components were measured by FID-GC and numbers stand for the peak numbers of Fig. 15 B.

\*:  $p < 0.01$

## 2. 4 まとめ

$\gamma$ 線照射によるグレープフルーツおよび香辛料の成分変化をGCおよびHPLCを用いて検索したが、いずれも大きな変化は見いだされず、これらは検知法としては適用できないことが明かとなった。しかしこのことは、これらの食品成分が実用線量以上の高線量の $\gamma$ 線照射に対してもかなり安定で分解しがたいことを示しており、安全性や栄養価の点から評価される結果である。

## 引用文献

- 1) W. Meier, R. Burgin and D. Frohlich: "Analysis of *o*-tyrosin as a method for identification of irradiated chicken and the comparison with other methods" Radiat. Phys. Chem. 35, 332-336 (1990)
- 2) M. F. Dubravich and W. W. Nawar: "Effect of high-energy radiation on the lipids of fish" J. Agric. Food Chem., 17, 639-644 (1969)
- 3) W. W. Nawar: "Radiolytic changes in fats" Rad. Res. Rev., 3, 327-334 (1972)
- 4) K. M. Morehouse and Y. Ku: "A gas chromatographic method for identification on gamma-irradiated frog legs" Radiat. Phys. Chem., 35, 337-341 (1990)
- 5) M. H. Stevenson, A. V. J. Crone and J. T. G. Hamilton: "Irradiation detection" Nature, 344, 202-203 (1990)
- 6) M. G. Moshonas and P. E. Shaw: "Irradiation and fumigation effects on flavon, aroma and composition of grapefruit products" J. Food Sci. 47, 958-960 (1982)

## 第3章 食品照射における分子生物学的変化と検知法

### 3. 1 放射線照射による分子生物学的変化とその分析手法

#### 3. 1. 1 放射線照射による分子生物学的変化

生物体が放射線照射を受けたときに引き起こされる分子生物学的な変化とは、化学的変化のうち特にDNA (deoxyribonucleic acid) の変化に関わる部分をさしている。DNAは複雑な高次構造をもち、生命体の維持に重要な役割を担っている。そのためDNAに微細な化学的変化が引き起こされると、それがやがてはDNAの高次構造の変化に派生し、さらには生物学的に大きな変化をもたらすことになる。

放射線が照射されると、一般の物質と同様に生物体においても、まず無差別に照射エネルギーが付与されイオン対や励起分子が生成し、次に活性化イオン、ラジカル等を形成する。それらはDNAの反応性の高い部分を攻撃し、DNAに微小な化学変化を引き起こす。DNAの初期損傷は塩基および糖における活性化イオン、ラジカル、励起分子等の形成が主なものである。たとえばチミンアニオンやチミンラジカル、デオキシリボースラジカル等である。また放射線により直接リン酸基の鎖切断が引き起こされることもある。これらの初期損傷は可逆的な場合も多い。また他の生体内物質、特に水から生じたラジカルの攻撃を受け、塩基や糖の付加体が形成され、エネルギーの分子内転移により塩基の環の開裂や塩基の遊離が生じる。またリン酸基の結合に開裂がおこるとDNA鎖の一本鎖切断を生じ、さらに対をなすDNA鎖の一本鎖切断が近傍で生じた場合には二本鎖切断となる。また二本鎖間の水素結合の開裂、他のDNAやタンパク質との架橋(cross link)も生じる。これらの化学変化はDNAの高次構造に変化を与え、また二重らせんのゆるみやらせん構造の消失を引き起こすこととなる。このようなDNAの構造の変化が生物情報の維持と発現を阻害する引金となり、酵素活性の低下、突然変異、細胞死、さらには個体死といった生物変化をひき起こす<sup>1-4)</sup>。

#### 3. 1. 2 DNA損傷の検出法と照射検知法への応用

放射線や化学物質等によるDNA損傷の検出は、損傷の種類に応じて様々な手法が開発されている。DNA鎖切断の検出法としては、フィルター溶出法(Filter elution)、シヨ糖密度勾配沈降法(sucrose velocity sedimentation)、ゲル電気泳動法(gel electrophoresis)により二本鎖切断を、またそれらをアルカリ性で操作することにより一本鎖切断を含めた全DNA鎖切断を検出できる。その他DNA沈澱法(DNA precipitation)、

nick transrationによっても1本鎖切断および2本鎖切断が検出できる。鎖切断、塩基・糖の損傷、架橋等によるDNA高次構造のみだれの検出法としては核酸沈降法(nucleoid sedimentation)、alkaline unwinding法、halo microfluorescence法、comet assay法等が報告されている<sup>3-5)</sup>。

また立体構造の変化を引き起こす前の塩基や糖の初期損傷については、ヌクレオシドの変化を液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離し、電気化学検出器、蛍光検出器、質量検出器等により検出する方法、塩基の変化をGC-MSにより検出する方法、ジヒドロチミンやチミングリコールの抗体を用いる酵素免疫法(ELISA)、変化がおこって不安定になった部位を検出するenzyme-sensitive site assay法等が報告されている<sup>6)</sup>。

一般にDNA損傷の研究は、抽出したDNAや培養細胞を用いたものが多く、in vivoでは化学物質や放射線を多量に与えることにより生じた大きな損傷を検出している場合がほとんどで、しかも動物を用いた報告はかなりあるが、植物を用いたものは非常に少ない<sup>7-10)</sup>。

DNAは放射線照射に対してとくに感受性が高いので、DNA損傷を指標とする照射の有無判別法は可能性が高いと考えられ、またγ線照射に特異的な変化を見いだすことができれば広範な食品に適用可能な検知法が確立出来ると期待されている。しかし実用線量程度の低線量のγ線照射により生じるDNA損傷を検出することは難しく、照射食品の検知をめざして多くの試みがなされているが可能性の高いと考えられる報告は極めて少ない<sup>11)</sup>。

この章では植物体の中で最も照射感受性が高いといわれる種子のうち、最も重要な食品の一つである米の核DNAを対象とすることとした。またγ線照射による米の核DNAの変化をゲル電気泳動法、GC-MS法等を用いて検索を行った。

### 3. 2 玄米核DNAの抽出と照射影響

#### 3. 2. 1 玄米からの核DNAの抽出

微生物や動物およびそれらの培養細胞からの核DNAの抽出は比較的容易であるが、植物の場合は細胞壁を持つこと、核DNAのサイズが大きいことなどのため必ずしも容易ではない。また植物では葉や根およびカルスからの抽出が一般的であり、種子の場合も水に浸出して十分に柔らかくし、さらに発芽させてから抽出を行うことが多く、硬質でしかもでんぷんが多い玄米はDNA抽出の対象としてはあまり用いられていない。しかし、玄米は乾燥して休眠状態にあるため酵素活性が低下しており、照射によって引き起こされたDNAの損傷が修復されにくく、温存されている可能性がある。また照射された玄米では発

芽が抑制されるため、発芽させたものを試料として用いることは不可能な場合もある。そこで乾燥した玄米から直接DNAを抽出する方法を検討することとした。

#### 3. 2. 2 抽出法の検討

植物からの核DNAの抽出法としては、CTAB(Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide)法<sup>12)</sup>とフェノール法<sup>13)</sup>が一般的である。液体窒素中で粉碎した玄米について各々の方法によりDNA抽出を試みた。いずれの方法も原法のままでは抽出率が低かったので、抽出用バッファー、沈澱用バッファー等の量や反応時間を検討し、最終的に実験の部に示す方法とした。

CTAB法およびフェノール法で得られた玄米核DNAについてUV吸収法により純度の検定および定量を行ったところ、UV吸収スペクトルはいずれも典型的なDNAのパターンを示した(Fig. 1)。吸光度による純度の検定を行ったところ、260 nmと280 nmの吸光度比は1.83および1.68で2より小さく、また320 nmと260 nmの吸光度比は0.04および0.05でいずれも0.05以下であり(Table 1)、両者ともRNAの混入はほとんどなく純度に問題はなかった。しかし、その収量はフェノール法ではCTAB法の約7%にすぎず、極めて低かった(Table 1)。また1%アガロースのミニゲル電気泳動においては、CTAB法で抽出した核DNAは鮮明な1本のバンドを示したが、フェノール法で抽出したものでは帯状を示し抽出操作によるDNA鎖の切断が推測された。

以上より、玄米からの核DNAの抽出には収率がよく、しかも切断が少ないCTAB法を用いることとした。

Table 1. UV absorption ratio and yield of DNA extracted from rice using CTAB method and phenol method

Method	Absorption ratio		Yield (%)
	A260/A280	A320/A260	
CTAB	1.83	0.04	0.026 ± 0.001
Phenol	1.68	0.05	0.002 ± 0.001

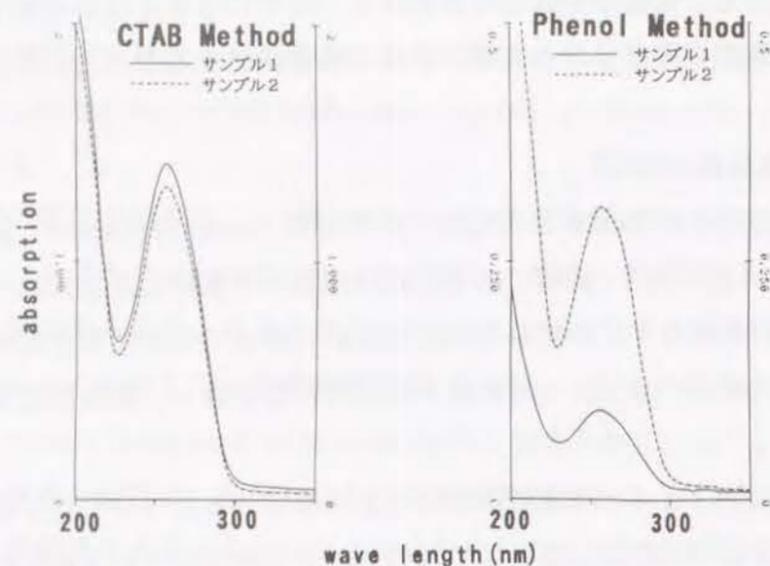


Fig. 1. UV absorption spectra of nuclear DNA extracted from rice using CTAB method and phenol method

### 3. 2. 3 照射玄米から抽出した核DNAの収量

玄米に1、5、10および30 kGyの照射線量で $\gamma$ 線照射を行い、非照射の玄米とともにCTAB法により核DNAを抽出した。その収量をUV吸収法とゲル電気泳動法により定量し、各照射線量における核DNAの収量をTable 2に示した。UV吸収法における収量は玄米10gあたり2.6~5.3mgであり、ゲル電気泳動法の $0.8 \times 10^{-2} \sim 3.3 \times 10^{-2}$ mgと比較して100~400倍高かった。また、UV吸収法における収量はバラツキはあるものの照射線量に対して一定の傾向はみられなかったが、ゲル電気泳動法における収量は照射線量の増加につれて明かな減少がみられた。

Table 2. Yield of DNA extracted from rice unirradiated and irradiated at 1, 5, 10 and 30 kGy measured with UV absorption(UV) method and gel electrophoresis(GEP) method

Irradiation Dose (kGy)	Yield of DNA (mg)	
	UV Method	GEP Method
0	3.6	$3.3 \times 10^{-2}$
1	4.0	$2.3 \times 10^{-2}$
5	5.3	$1.4 \times 10^{-2}$
10	4.0	$1.1 \times 10^{-2}$
30	2.6	$0.8 \times 10^{-2}$

UV吸収法とゲル電気泳動法で算定された収量に大きな差がみられるのは、後者においては、ゲル電気泳動で $\lambda$ フェージDNA標準品と同じ位置にバンドを形成した数十~数百kbp相当の分子サイズの画分のみを定量しているのに対し、前者では電気泳動時にウェル内に留まって泳動しなかった巨大なDNAも含めて定量しているためと考えられる。すなわち、今回の方法で玄米から抽出された核DNAは大部分が巨大DNAであり、ゲル電気泳動で泳動できる数十~数百kbpのDNAは0.2~1%と推定された。また玄米が $\gamma$ 線照射を受けたとき、巨大DNAは変化をほとんど受けないか、受けてもまだ分子サイズが大きくその変化が検知できなかったものと思われるが、ゲル電気泳動法で測定される分子サイズの小さいDNAは、照射線量に相関して損傷を受けタンパク質等とのクロスリンクにより抽出されなくなり、抽出可能なDNA画分が減少したものと推定される。

### 3. 2. 4 照射玄米から抽出した核DNAのゲル電気泳動パターン

非照射および照射玄米からCTAB法により抽出した核DNAについて、サブマリン型泳動装置を用いてゲル電気泳動パターンの検討を行った。1.2%アガロースゲルによる泳動パターン(Fig. 2-A)は、いずれも $\lambda$ フェージDNA標準品とほぼ同じ位置にバンドを形成しており数十kbp以上のサイズを示した。しかし照射線量の増加と共にそのバンドの幅が広がる傾向がみられた。1.2%のゲルでは数十~数百kbpの分子サイズを分離することが出来ないため、0.3%アガロースゲルを用いさらに詳細な分子サイズの検討を行ったところ、非照射試料では核DNAの画分は100kbp以上を示していたが、照射線量の増加と共にDNAサイズは下がり、30kGyでは大部分が20kbp以下を示した(Fig. 2-B)。すなわち玄米核DNAのうちの $\lambda$ フェージDNA近傍の画分は、 $\gamma$ 線照射による鎖切断により分子サイズが低下することが明らかとなった。

このように、 $\gamma$ 線照射による影響は玄米の特に100kbp近傍の分子サイズのDNAにおいて、DNA抽出時の収量の減少やDNAサイズの低下として顕著にあらわれた。とくに、30kGy照射においてDNAサイズの低下が明確に観察され、DNA鎖切断によるものと推定された。一方収量の低下は、さらに低い線量から段階的に観察されており、照射により引き起こされるDNAとタンパク質とのクロスリンクによる抽出阻害が主な原因ではないかと推定された。

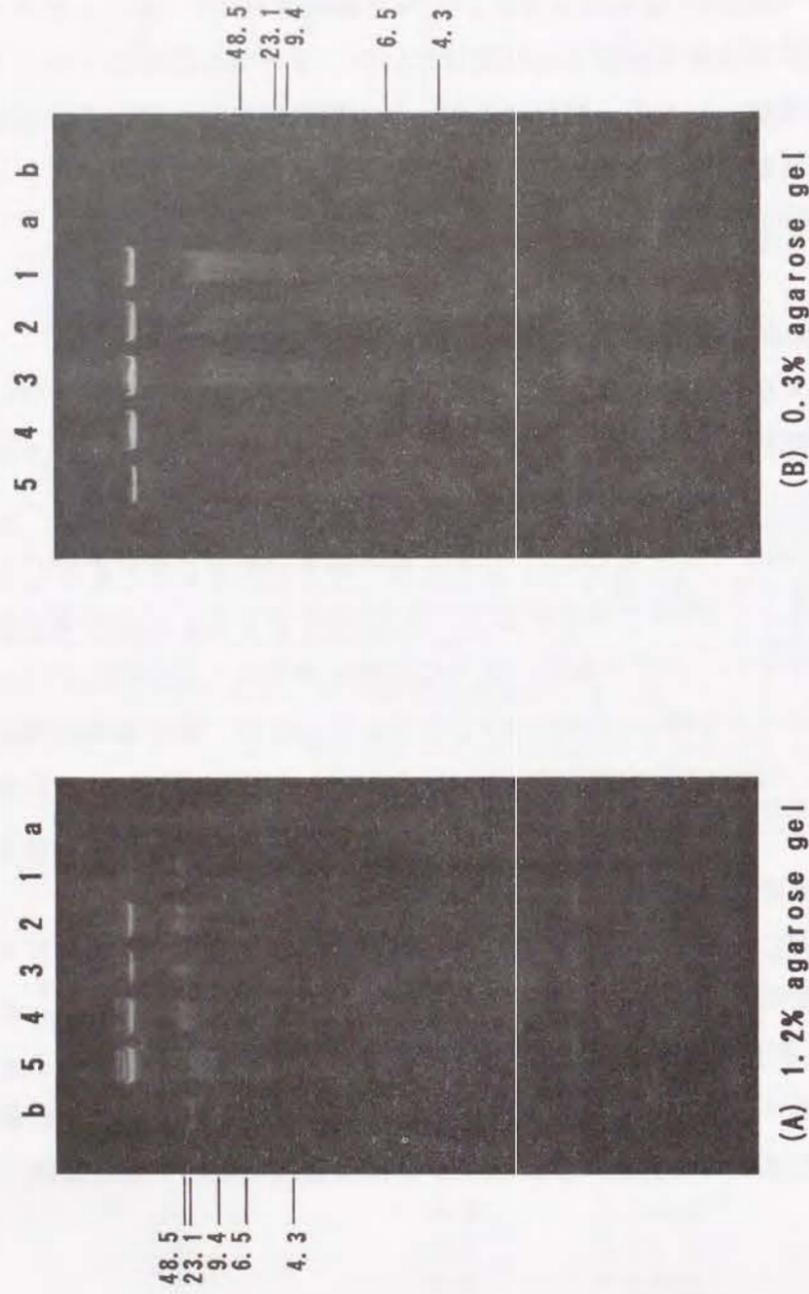


Fig. 2. Gel electrophoresis from DNA extracted from unirradiated and irradiated rice  
 1: unirradiated, 2: irradiated at 1 kGy, 3: irradiated at 3 kGy  
 4: irradiated at 10 kGy, 5: irradiated at 30 kGy  
 a:  $\lambda$ -DNA (48.5 kbp), b: DNA size marker,  $\lambda$ /HindIII digest (23.1, 9.4, 6.5, 4.3 kbp)

### 3. 3 GC-MSによる照射玄米核DNAの塩基変化体の検索

#### 3. 3. 1 DNA塩基変化体の測定

DNA塩基の修飾は、 $\gamma$ 線照射によって生じるラジカルや活性化イオンのアタックおよびそれに引き続く化学変化により生じる。チミングリコール、8-ヒドロキシアデニン、8-ヒドロキシグアニン等が知られているほか、DNA標準品を用いた実験により多くの変化体の生成が確認されている。それらの検出法として、化学検出器付HPLC法による8-ヒドロキシグアニンの分析、ELISA法によるチミングリコールの分析等が報告されている<sup>6)</sup>。一方、DizdarogluらはGC-MSを用いてDNA塩基変化体を分析する方法を開発し、塩基やDNAの標準品、DNA抽出物等への適用を検討してきた<sup>14-19)</sup>。この方法は同時に多数の変化体を検出し、しかもスペクトルにより確認できる利点がある。そこでこの方法を玄米から抽出した核DNAの塩基および変化体の測定に適用することを検討し、さらに照射によるDNA塩基の変化の検索を試みた。

#### 3. 3. 2 GC-MSによる玄米核DNA塩基変化体の測定法の検討

C TAB法により玄米から抽出したDNA溶液をGC-MSに導入するため、DNAの加水分解法およびトリメチルシリル(TMS)化法の検討を行った。加水分解は抽出したDNAを凍結乾燥した後、ギ酸により150°C 30分間反応させると最も収率がよかった。また、TMS化はBSTFA (bis-(trimethylsilyl)-tri-fluoro acetamide) 溶液にアセトンを1:1で混合した試薬を用い、140°C 30分間反応させた場合が最も収率がよかった。さらにGC-MSの測定条件についても検討し、実験の部に示す条件を定めた。

そこで、非照射玄米より抽出したDNAの塩基をGC-MSにより測定したところ、Fig. 3に示すトータルイオンクロマトグラム(TIC)がえられた。検出された多数のピークについて、リテンションタイムとマススペクトルをもとに標準品および文献値から同定を試みたところ、2本の内部標準ピーク(6-アザチミン、8-アザアデニン)および4種類5本のDNA塩基ピーク(シトシン2本、チミン、アデニン、グアニン各1本)のほかに、5-ヒドロキシシトシン、チミングリコール、8-ヒドロキシアデニンおよび8-ヒドロキシグアニンの4種類のDNA塩基変化体のピークが確認された。DNA塩基変化体は非照射玄米中にも、ある程度存在していたものと思われるが、DNA抽出操作中にも人為的に生成した可能性もある。

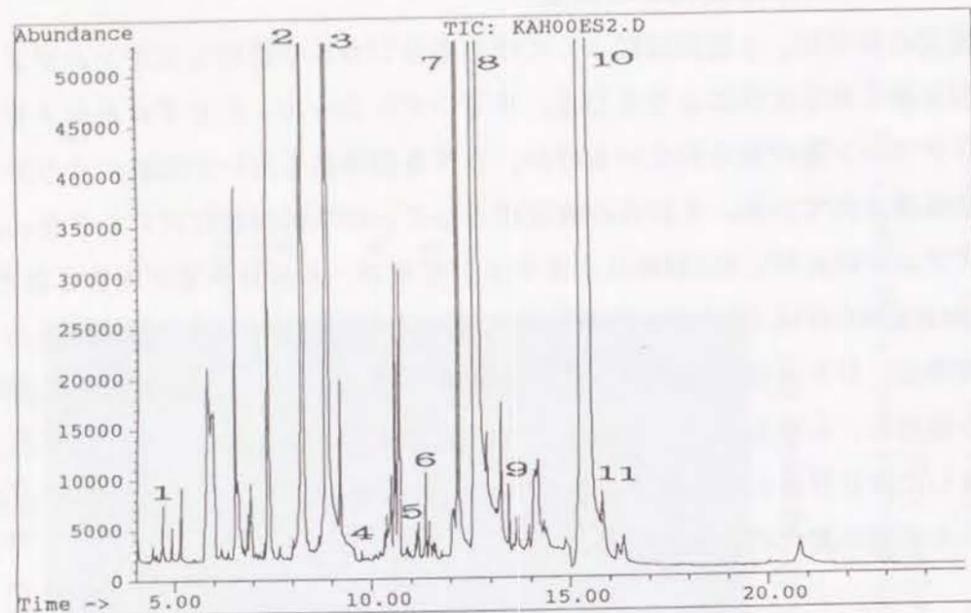


Fig. 3. GC-MS-TIC plots of DNA bases extracted from unirradiated rice  
 The column was a fused silica capillary coated with 5% phenylmethyl silicone (12.5 m×0.2 mm id.) programmed from 100 to 250°C at 7°C/min.  
 1:thymine, 2 & 4:cytosine, 3:6-aza-thymine(IS), 5:5-hydroxy cytosine  
 6:thymine glycol, 7:8-aza-adenine(IS), 8:adenine, 9:8-hydroxyadenine  
 10:guanine, 11:8-hydroxyguanine

### 3. 3. 3 玄米核DNA塩基に対するγ線照射の影響

3. 2. 3で調製した1、5、10および30 kGy照射した玄米の核DNAを、加水分解およびTMS化後 GC-MSで測定したところ、Fig. 4~7に示すトータルイオンクロマトグラム(TIC)が得られた。いずれのクロマトグラムも、非照射玄米のDNAとほぼ一致したパターンを示した。

そこで5-ヒドロキシシトシン、チミングリコール、8-ヒドロキシアデニンおよび8-ヒドロキシグアニンの4種類のDNA塩基変化体について、内標を基準としたピーク面積を比較したところ、若干のバラツキはあるものの照射と非照射に有意な差は認められず、照射線量に依存した傾向もみられなかった。また非照射試料に存在しない新たなピークも見出されなかった(Table 3)。

このことから、今回検出されたDNA塩基変化体の大部分は、照射以外の原因により玄米DNA中にすでに存在していたと推定されるが、抽出段階で人為的に生成した可能性も

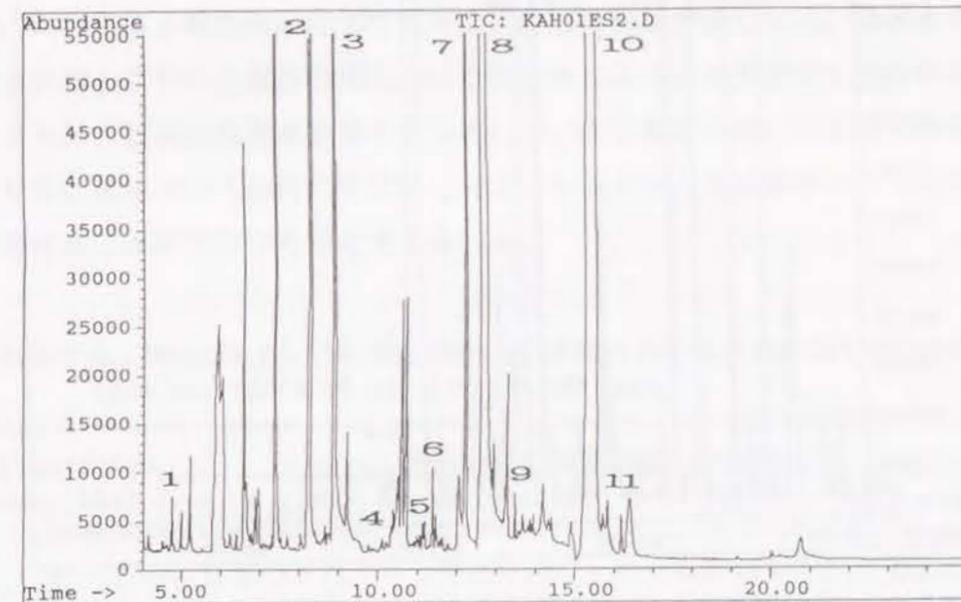


Fig. 4. GC-MS-TIC plots of DNA bases extracted from irradiated rice at 1 kGy  
 GC conditions and legend are the same as Fig. 3.

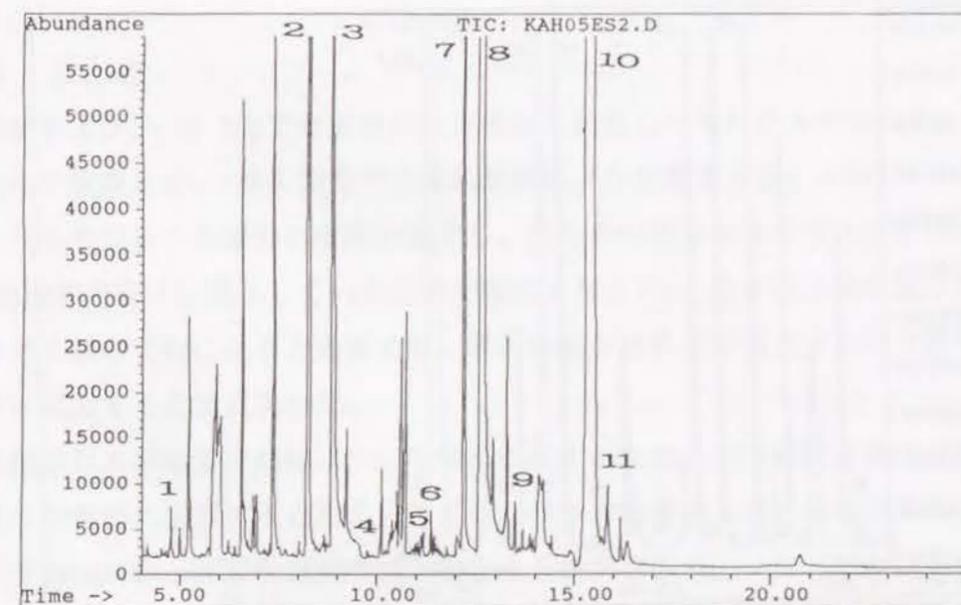


Fig. 5. GC-MS-TIC plots of DNA bases extracted from irradiated rice at 5 kGy  
 GC conditions and legend are the same as Fig. 3.

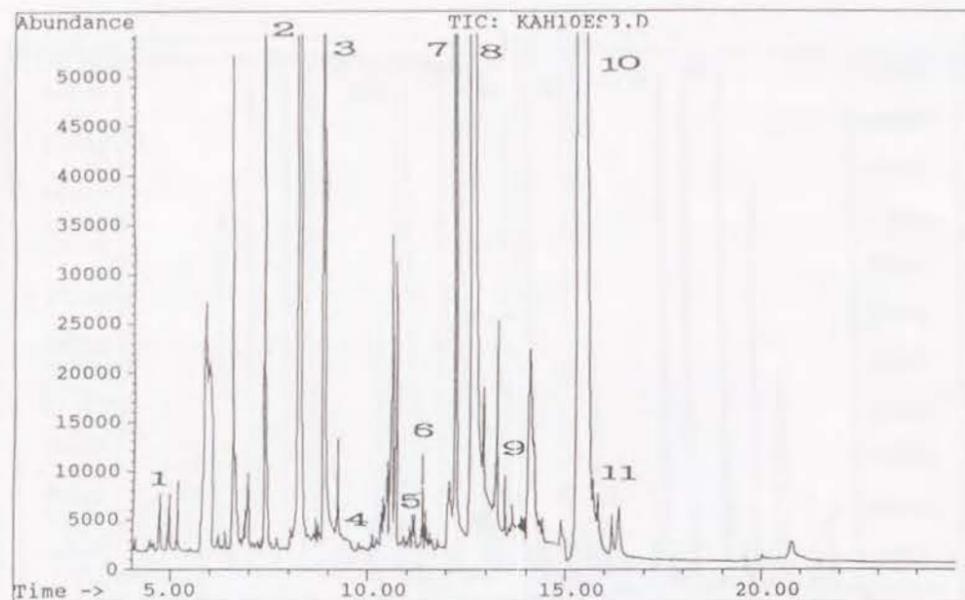


Fig. 6. GC-MS-TIC plots of DNA bases extracted from irradiated rice at 10 kGy  
GC conditions and legend are the same as Fig. 3.

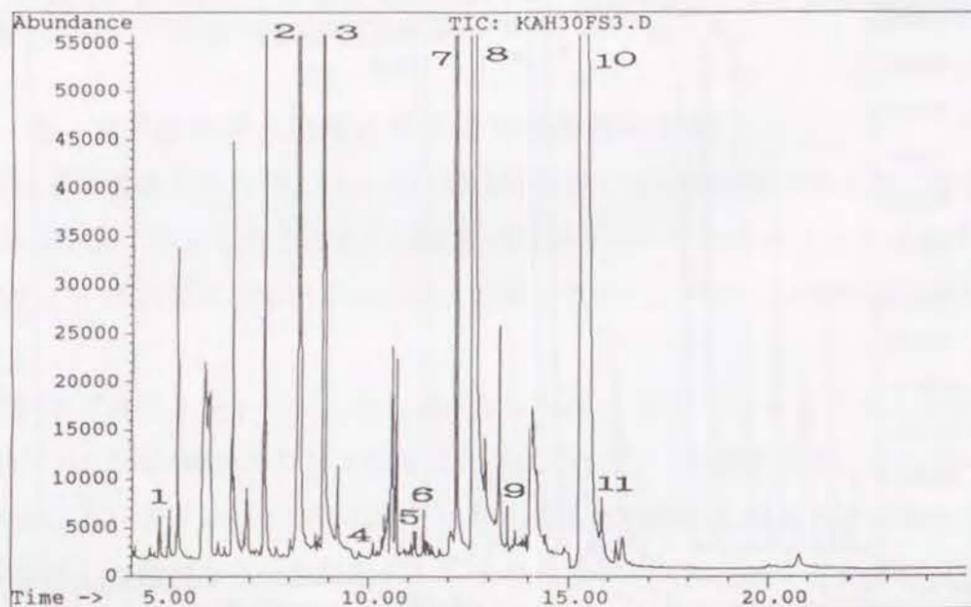


Fig. 7. GC-MS-TIC plots of DNA bases extracted from irradiated rice at 30 kGy  
GC conditions and legend are the same as Fig. 3.

高い。また $\gamma$ 線照射によって玄米核DNA中に生じた塩基変化体の量は今回検出した量よりもはるかに少量であり測定値のバラツキの中に埋没し検出できなかったものと思われる。玄米中においては $\gamma$ 線照射に対して種々の生体防御機構が働くため、DNA水溶液や培養細胞等と比較してDNA塩基の変化がはるかに生じにくいと推定される。そのため生体中で生じるDNA塩基の損傷を検出するためには、より感度の高い測定法を開発していただくだけではなく、抽出時に人為的に生ずると考えられるDNA塩基損傷をさらに低く抑える方法を開発することが重要であると考えられる。

Table 3. Amounts of the DNA base products in nuclear DNA extracted from unirradiated and irradiated rice

Irradiation dose(kGy)	amount of DNA base products*			
	thymine glycol	5-OH cytosine	8-OH adenine	8-OH guanine
0	$1.0 \times 10^{-2}$	$0.8 \times 10^{-3}$	$0.8 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$
1	$1.2 \times 10^{-2}$	$0.7 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$
5	$0.8 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^{-2}$
10	$0.4 \times 10^{-2}$	$1.1 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-2}$	$1.4 \times 10^{-2}$
30	$0.9 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-2}$	$1.6 \times 10^{-2}$

\*:Peak area of product/peak area of internal standard

### 3.4 まとめ

非照射および1~30 kGyで照射された玄米から抽出した核DNAについて、 $\gamma$ 線照射による変化を検索した。抽出物をゲル電気泳動により比較すると、 $\lambda$ -DNAとほぼ同じ分子サイズをもつDNA画分の収率が減少し、またその画分の分子サイズが100kbp相当以上から20kbp相当以下に低下していることが明らかとなった。分子サイズの低下は $\gamma$ 線照射によるDNA鎖の切断によると推定され、収率の減少はDNA鎖とタンパク質等とのクロスリンクに起因すると推定された。

玄米核DNAの塩基変化体について明らかにするため、GC-MSによる検討を行った。照射により特異的に生成すると考えられていたDNA塩基の5位または8位の水酸化体やチミングリコールが、非照射試料の抽出物からも検出された。一方、照射試料においては、同様にDNA塩基の5位または8位の水酸化体やチミングリコールが検出されたが、その量は非照射試料とほぼ同じであり、 $\gamma$ 線照射による有意な変化はみいだされなかった。

$\gamma$ 線照射によりDNAの抽出率の減少や分子サイズの低下が観察されたが、照射による変化は小さく、しかも個体毎の変動が大きいため、検知法に適用することは不可能と判断

された。

#### 引用文献

- 1) 日本アイソトープ協会編：アイソトープ便覧改訂3版 p.184-187 (1984) 丸善
- 2) R. Teoule: "Radiation-induced DNA damage and its repair" *Int. J. Radiat. Biol.*, 51, 573-589 (1987)
- 3) S. Powell and T. J. McMillan: "DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation" *Radiotherapy and Oncology*, 19, 95-108 (1990)
- 4) N. L. Oleinick: "Ionizing radiation damage to DNA: Molecular aspects" *Radiat. Res.*, 124, 1-6 (1990)
- 5) S. J. Whitaker, S. N. Powell and T. J. McMillan: "Molecular assays of radiation-induced DNA damage" *Eur. J. Cancer*, 27, 922-928 (1991)
- 6) J. Cadet and M. Weinfeld: "Detecting DNA damage" *Anal. Chem.*, 65, 675-682 (1993)
- 7) A. El-Metainy, M. Takagi, S. Tano and H. Yamaguchi: "Radiation-induced single-strand breaks in the DNA of dormant barley seeds" *Mutat. Res.*, 13, 337-344 (1971)
- 8) A. El-Metainy, S. Tano, K. Yano and H. Yamaguchi: "Chemical nature of radiation induced single-strand breaks in the DNA of dormant barley seeds in vivo" *Radiat. Res.*, 55, 324-333 (1973)
- 9) S. Tano and H. Yamaguchi: "Repair of radiation-induced single-strand breaks in DNA of barley embryo" *Mutat. Res.*, 42, 71-78 (1977)
- 10) J. Veleminsky and T. Gichner: "DNA repair in mutagen-injured higher plants" *Mutat. Res.*, 55, 71-84 (1978)
- 11) E. Marchioni, M. Tousch, V. Zumstegg, F. Kuntz and C. Hasselmann: "Alteration of Mitochondrial DNA: A method for the detection of irradiated beef liver" *Radiat. Phys. Chem.*, 40, 485-488 (1992)
- 12) M. G. Murray and W. F. Thompson: "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA" *Nucleic Acids Res.*, 8, 4321-4325 (1980)
- 13) M. A. Frederic ed.: "Current Protocols in Molecular Biology" 2.4.1-2.4.5 (1990) John Wiley and sons

- 14) M. Dizdaroglu: "The use of capillary gas chromatography-mass spectrometry for identification of radiation-induced DNA base damage and DNA base-amino acid cross-links" *J. Chromatogr.*, 295, 103-121 (1984)
- 15) M. Dizdaroglu: "Application of capillary gas chromatography-mass spectrometry to chemical characterization of radiation-induced base damage of DNA: Implications for assessing DNA repair processes" *Anal. Biochem.*, 144, 593-603 (1985)
- 16) M. Dizdaroglu and D. S. Bergtold: "Characterization of free radical-induced base damage in DNA at biologically relevant levels" *Anal. Biochem.*, 156, 182-188 (1986)
- 17) A. F. Fuciarelli, B. J. Wegher, E. Gajewski, M. Dizdaroglu and W. F. Blakely: "Quantitative Measurement of radiation-induced base products in DNA using gas chromatography-mass spectrometry" *Radiat. Res.*, 119, 219-231 (1989)
- 18) E. Gajewski, G. Rao, Z. Nackerdien and M. Dizdaroglu: "Modification of DNA base in Mammalian chromatin by radiation-generated free radicals" *Biochemistry*, 29, 7876-7882 (1990)
- 19) M. Dizdaroglu, Z. Nackerdien, B. Chao, E. Gajewski and G. Rao: "Chemical nature of in vivo DNA base damage in hydrogen peroxide-treated mammalian cells" *Arch. Biochem. Biophys.*, 285, 388-390 (1991)

## 第4章 食品照射による生物学的変化と検知法

### 4.1 照射による生物学的変化と発芽抑制

#### 4.1.1 照射による生物学的変化

放射線による生物学的な変化は、生体内の物理的な変化及び化学的な変化に続いて誘起される。生体内分子、とくに生命の根源に関わるDNAが損傷を受け、さらには修復を受けずに固定されると、代謝異常、細胞分裂の遅れ、染色体異常、細胞死、ついには個体死などの生物反応が引き起こされる。食品照射により期待される発芽抑制、熟度調整、殺虫、殺菌などの作用は、放射線によるこれらの生物反応に由来する。すなわち発芽抑制および熟度調整は食品である植物体中のある種の酵素活性阻害、殺虫および殺菌は食品に附着する害虫および細菌の個体死によっておこる。

生物反応を指標とした検知法としては、食品中の微生物数の異常な減少や微生物叢の変化を指標とした方法<sup>1-4)</sup>、発芽を指標とした方法<sup>5, 6)</sup>等が報告されているが、実用に耐えうる検知法とはなっていない。

#### 4.1.2 放射線による発芽抑制と照射検知法

植物体において、種子の幼根や幼芽は放射線感受性が最も高い部位の一つであり、種子に低線量の放射線を照射すると発芽が促進され、それ以上の線量では発芽が抑制される。この放射線による発芽抑制は、1936年にL. MetlitzkyらがX線照射によるジャガイモの発芽防止作用を報告したのが最初であるが、現在では非常によく知られた放射線効果であり、ジャガイモやタマネギ等の芽止めに利用されている。放射線の発芽抑制作用の照射検知法への適用については、下村らがジャガイモの休眠芽にジベレリンまたはカイネチン処理を行うと、非照射では7日以内に芽を生じるが、0.07kGy以上照射した場合には芽が生長しないことにより照射の有無の検知が可能となること<sup>6, 6)</sup>を、また熱海らが照射小麦および米の発芽期の根端における細胞分裂後期のブリッジの出現により照射の有無を検知出来ること<sup>7)</sup>を報告している。しかし、一般に植物の種子では種々の原因で発芽しない場合も多いので発芽率は変動しやすく、また発芽までの期間が長くかかるなど検知法としての適用には困難な問題が多いため実用化は困難と考えられていた。

そこで、柑橘類、リンゴ、サクランボ、米、麦等に対する放射線の発芽抑制作用について検討するとともに、改良を加え、実用可能な検知法の開発を行った。

なお「発芽」とは、一般には種子等からの芽の伸長と根の伸長の両者を含めており、い

ずれであるかを区別をしていないが、この論文では芽の生長の開始を発芽(shooting)、根の生長の開始を発根(rooting)と区別して示すこととする。

### 4.2 Half-embryo による照射柑橘類の検知法開発に関する研究

#### 4.2.1 グレープフルーツ種子の発芽と放射線照射

グレープフルーツについては、第2章で述べたように照射検知法の必要性が高いが、成分の変動を指標にして照射の有無を検知することは出来なかった。そこでグレープフルーツ果実中に含有される種子について、 $\gamma$ 線照射による発根および発芽の変化について検討を行った。グレープフルーツに0.3、0.5、1および2kGyの線量で $\gamma$ 線を照射しその種子を培養したところ、根については発根はみられるが長さは抑制を受けて有意に短くなり、一方芽については0.3kGy照射から発芽が完全に抑制された(Table 1)。

Table 1. Effect of  $\gamma$ -irradiation on germination of grapefruit seeds

Incubation days	Rooting(%)				Shooting(%)			
	0 kGy	0.3kGy	0.5kGy	1.0kGy	0 kGy	0.3kGy	0.5kGy	1.0kGy
6	50	0	30	20	0	0	0	0
10	90	10	50	20	0	0	0	0
19	100	90	80	50	100	0	0	0
28	100	90	80	50	100	0	0	0

このように、発芽に対する照射影響は極めて顕著であり、しかも0.3kGyからと感受性が高く照射の有無検知の指標として有望であると考えられた。しかし非照射試料において、種子の発芽状況が栽培種やロット、さらには個体により大きく変動し、培養1週間後に発芽するものもあれば、2カ月経っても発芽しないものも多く、発芽率も0~100%まで大きく変動し、再現性も悪かった。そのためこのままでは種子の発芽抑制を指標とした照射検知法は困難であり、非照射種子の発芽率の向上、発芽期間の短縮および変動の低減を行う必要があった。

そこで植物ホルモンの添加による発根および発芽の促進を試みた。ルビーレッド種グレープフルーツの種子に発根促進作用を持つインドール酢酸(IAA)を10および100ppm添加して培養をおこなったところ、無添加の種子では発根まで13日かかったが、10 ppm添加では培養9日後に発根率80%に達し発根までの期間が短縮された(Fig. 1)。しかし発芽促進に

効果はみられなかった。また発芽促進作用のあるジベレリン酸(GA)を添加したところ、100ppm添加において発芽開始が23日目から16日目に短縮され、発芽率が25日目で10%から40%に上昇した(Fig. 2)。このようにやや改善はみられたが、検知法に適用するにはまだまだ不十分であった。

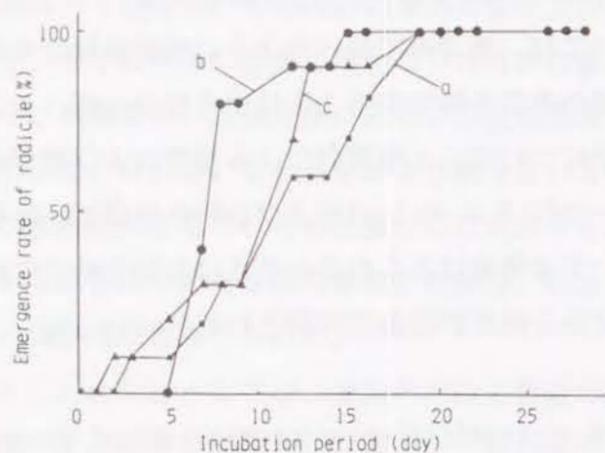


Fig. 1. Effect of indole-3-acetic acid(IAA) on the emergence of radicle of grapefruit seeds  
a:incubation in sterilized water, b:incubation in 10 ppm IAA  
c:incubation in 100 ppm IAA

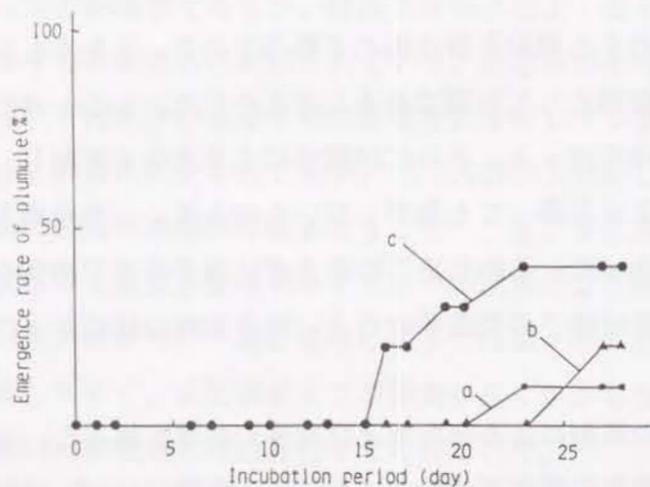


Fig. 2. Effect of gibberellic acid(GA) on the emergence of plumule of grapefruit seeds  
a:incubation in sterilized water, b:incubation in 10 ppm GA  
c:incubation in 100 ppm GA

#### 4. 2. 2 グレープフルーツにおける half-embryo test の開発

グレープフルーツの種子は、硬い外種皮と柔らかく薄い内種皮が周囲を取り囲んでおり、内部はいくつかの胚が集まって1個の塊状をなしている。また各々の胚は2枚の子葉と幼根から出来ている。一方、一般に種子は種皮に損傷をうけると発根および発芽が促進されることが知られている。そこで種子に様々な段階で損傷を与え、発根および発芽の様子を観察した。すなわち、ルビーレッド種グレープフルーツの種子をそのまま、外種皮を剥離したもの、内種皮も剥離して摘出後分離した胚、胚の子葉を1枚除去し子葉1枚と幼根のみにしたものを、各々23°Cにおいて蒸留水のみで培養し比較した。なお胚から子葉を1枚除去して得られた、1枚の子葉と幼根から構成される部分を half-embryoと名付けた。

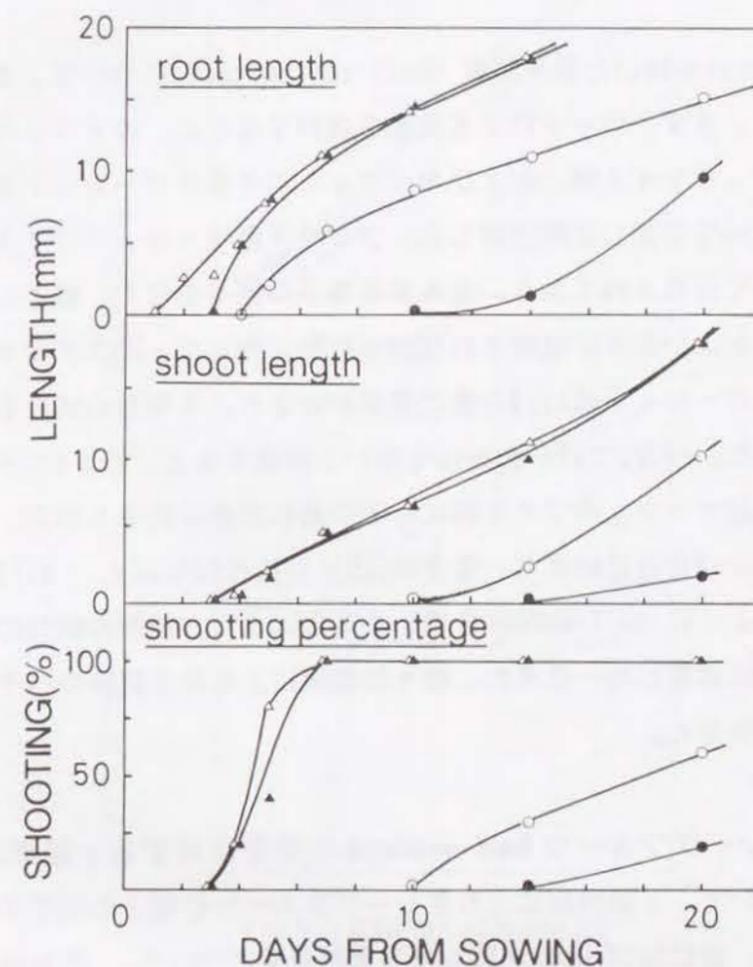


Fig. 3. Comparison of growth with intact seed(●), seed with testa removed(○), embryo(▲) and half-embryo(△) of grapefruit.

その結果は Fig. 3に示すように、発根の開始日は各々14日目、5日目、4日目および2日目、発芽の開始日は各々20日目、14日目、4日目および4日目となり、種子そのままと比較して外種皮の剥離、胚の摘出、さらに片子葉の切除により大幅に短縮された。また発芽率も種子そのままでは培養20日目で20%、外種皮剥離では60%であったが、胚およびhalf-embryoでは5日目ですでに100%に達した。

このように胚または half-embryoを調製してから培養すると、発根および発芽の開始時期が大幅に短縮され、さらに発芽率が大幅に上昇した。また、胚とhalf-embryoを比較すると、後者では幼根が表面に露出しているため観察が容易であり、しかも微妙な変化を観察することが出来るために、2日早く発根を観察出来た。このように、発芽試験に種子から調製した half-embryoを用いることにより、発芽期間を大幅に短縮し、しかも発芽率を向上させることができた。その結果、発芽抑制を照射検知法に適用することが可能と考えられた。

そこでhalf-embryoを用いた発芽試験 (half-embryo test)について、さらに詳細な検討を行うこととした。まず、ロットによる変動を検討するため、カリフォルニア産およびフロリダ産のマーシュホワイト種、およびカリフォルニア産ルビーレッド種の3種類から調製した half-embryoを培養し比較検討した。フロリダ産マーシュホワイト種は果皮がやや青く未成熟な状態で採取されており、含有する種子の数も少なく、種子のまま培養すると30日後も全く発根および発芽が観察されなかったが、カリフォルニア産マーシュホワイト種は6日後に、ルビーレッド種は14日後に発根が始まり、3種類の試料の発根、発芽の時期が大きく異なった。一方、half-embryoを用いて培養すると、Fig. 4に示すように発根、発芽ともフロリダ産マーシュホワイト種に若干の遅れがみられるものの、いずれも発根は1~2日目、発芽は3~4日目に始まり、発芽率は5日目には50%以上、6日目にはすべて100%に達した。このように half-embryoを用いることにより3種類の試料の発根および発芽時期、発芽率ともに非常に均一化され、様々な要因による発芽試験のバラツキをきわめて小さくすることが出来た。

#### 4. 2. 3 グレープフルーツ half-embryo の発芽に対する $\gamma$ 線照射の影響

4. 2. 1において、 $\gamma$ 線照射によりグレープフルーツの種子の発芽が抑制されることを明らかにしたが、次にhalf-embryoにおける照射影響について、照射線量やロットによる変動等の検討を行った。そこで、カリフォルニア産およびフロリダ産のマーシュホワイト種グレープフルーツに、各々 0.05、0.15、0.3および0.5kGyの4段階で $\gamma$ 線を照射し、

それらからhalf-embryoを調製して培養し、根および芽の伸長、発芽率等を14日間観察した。なお後者はやや青みがかって硬く種子も小さく、両者には熟度においても差があった。

Fig. 5の写真は、照射および非照射のカリフォルニア産グレープフルーツから調製した half-embryoの、培養0日、5日、7日および14日目の生長の様子を示している。非照射および0.05kGy照射においては、5日目で、根は5 mm余に伸び1~2 mmの芽の伸長も認められた。7日目では根は約10 mm、芽は約3 mmに、14日目には根は15~20 mm、芽は5~10 mmに伸び、葉の形成も見られた。しかし、0.15および0.3kGy照射した場合には、5日目で根は2~3 mmになるがそれ以上の伸長は見られず次第に根端が褐変し、また発芽はほとんど見られなかった。

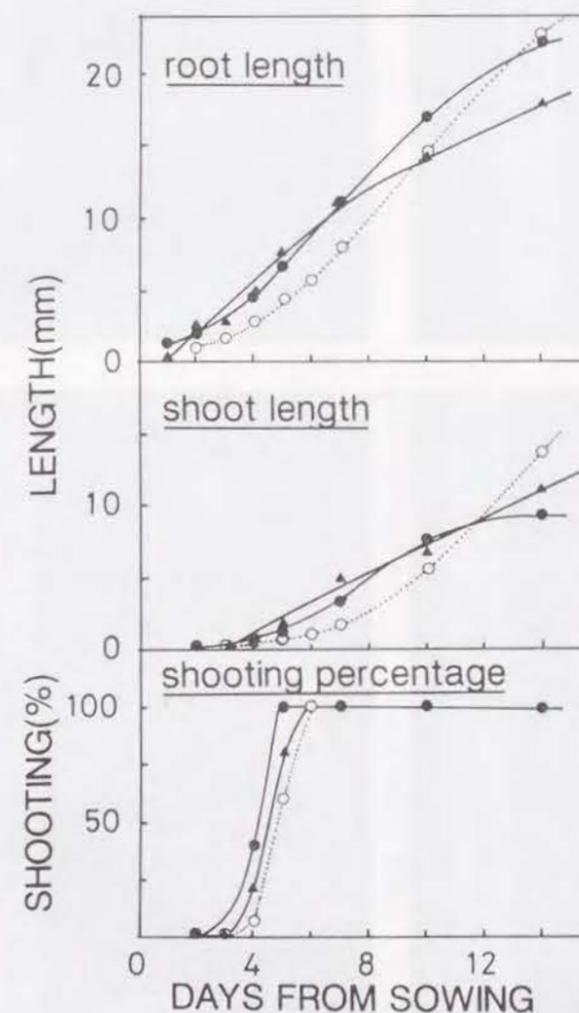


Fig. 4. Comparison of growth curve with three lots of unirradiated grapefruits  
 ●: Marsh White from California, ripe  
 ○: Marsh White from Florida, unripe  
 ▲: Ruby Red from California, ripe

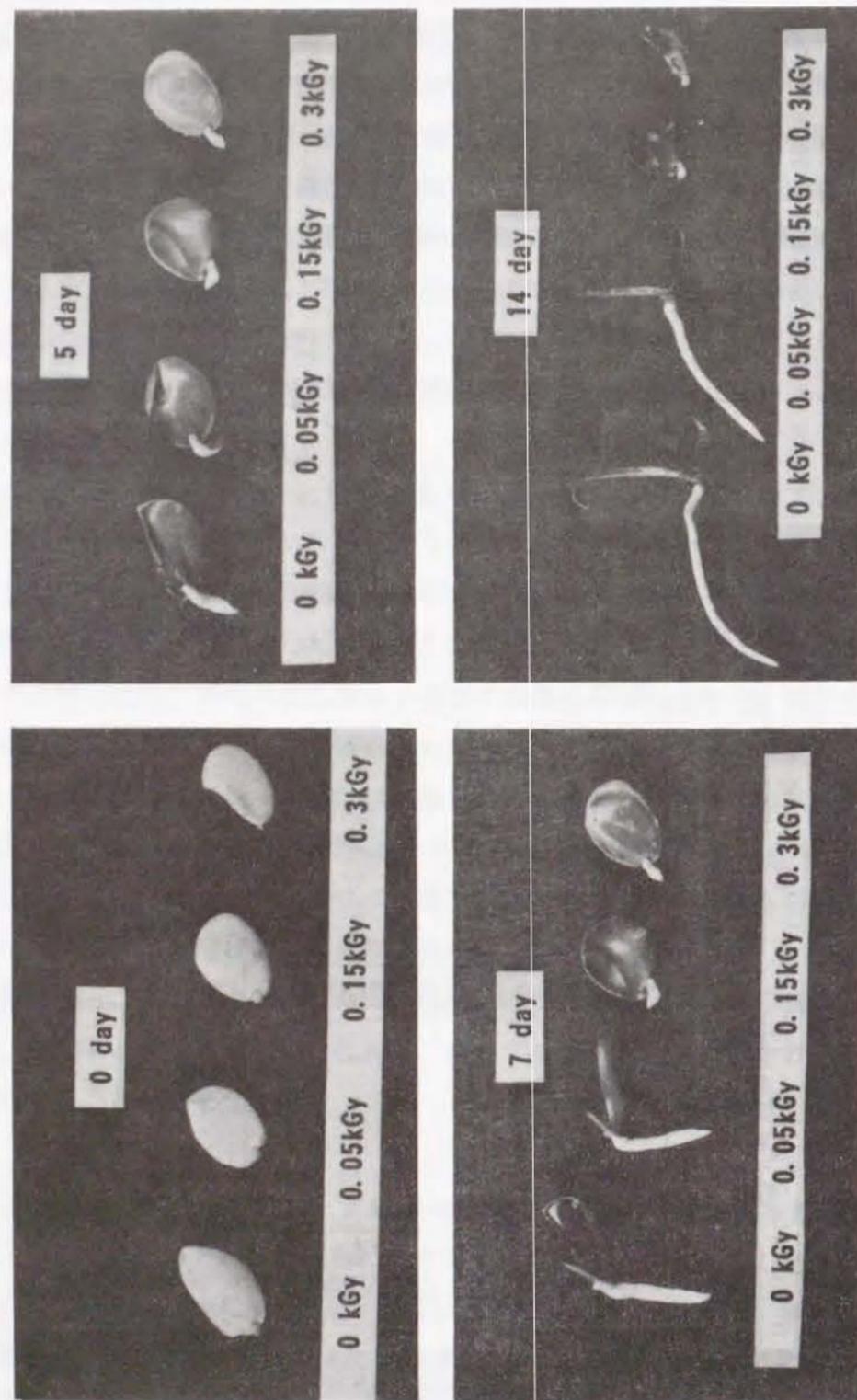


Fig. 5. Growth of half-embryos extracted from unirradiated and irradiated grapefruit var. Marsh White from California after 0, 5, 7 and 14 days incubated at 23°C

Fig. 6にカリフォルニア産、Fig. 7にはフロリダ産グレープフルーツから調製した half-embryoの生長曲線および発芽率をまとめた。両者は根の生長および芽の生長ともに非常によく一致した照射影響を示した。すなわち、0.05kGy照射では非照射と比較してやや遅れは見られるものの6日目で発芽率は100%に達し、根や芽の伸長も見られた。ところが0.15 kGy照射では根はわずかな伸長が見られたものの、芽は10%しか発芽せずそれらも1 mm程度の伸長が認められたのみであり、さらに高線量である 0.3および0.5kGyでは発芽は全く認められなかった。

このようにグレープフルーツから調製したhalf-embryoは、種子のままの培養と同様に0.15kGy以上のγ線照射により顕著な発芽抑制を受け、しかも産地、熟度、個体等による変動がほとんどなく再現性も優れていることが明らかとなった。

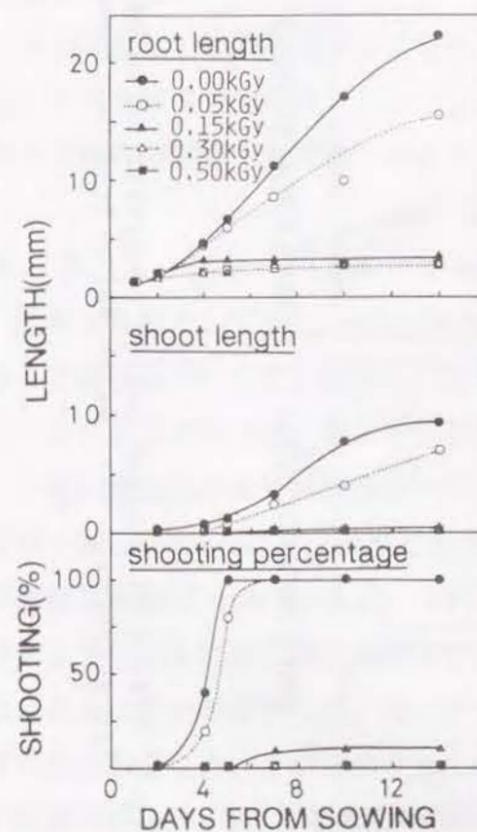


Fig. 6. Effect of  $\gamma$ -irradiation on half-embryo extracted from ripe grapefruit var. Marsh White from California

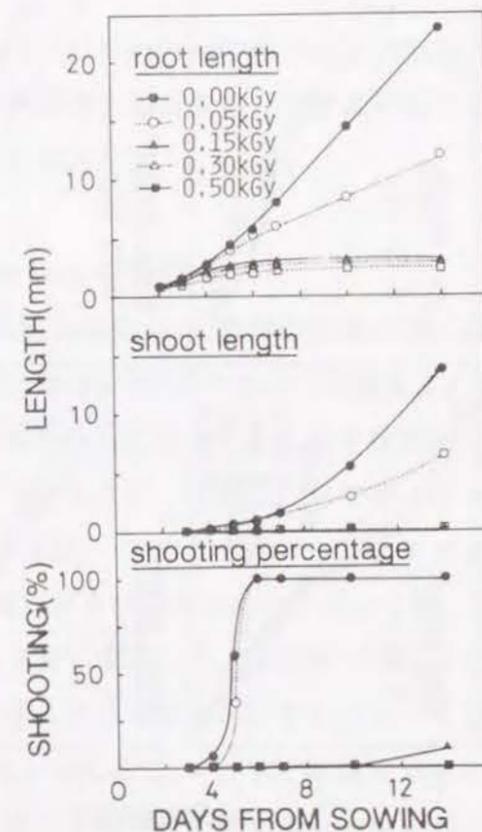


Fig. 7. Effect of  $\gamma$ -irradiation on half-embryo extracted from unripe grapefruit var. Marsh White from Florida

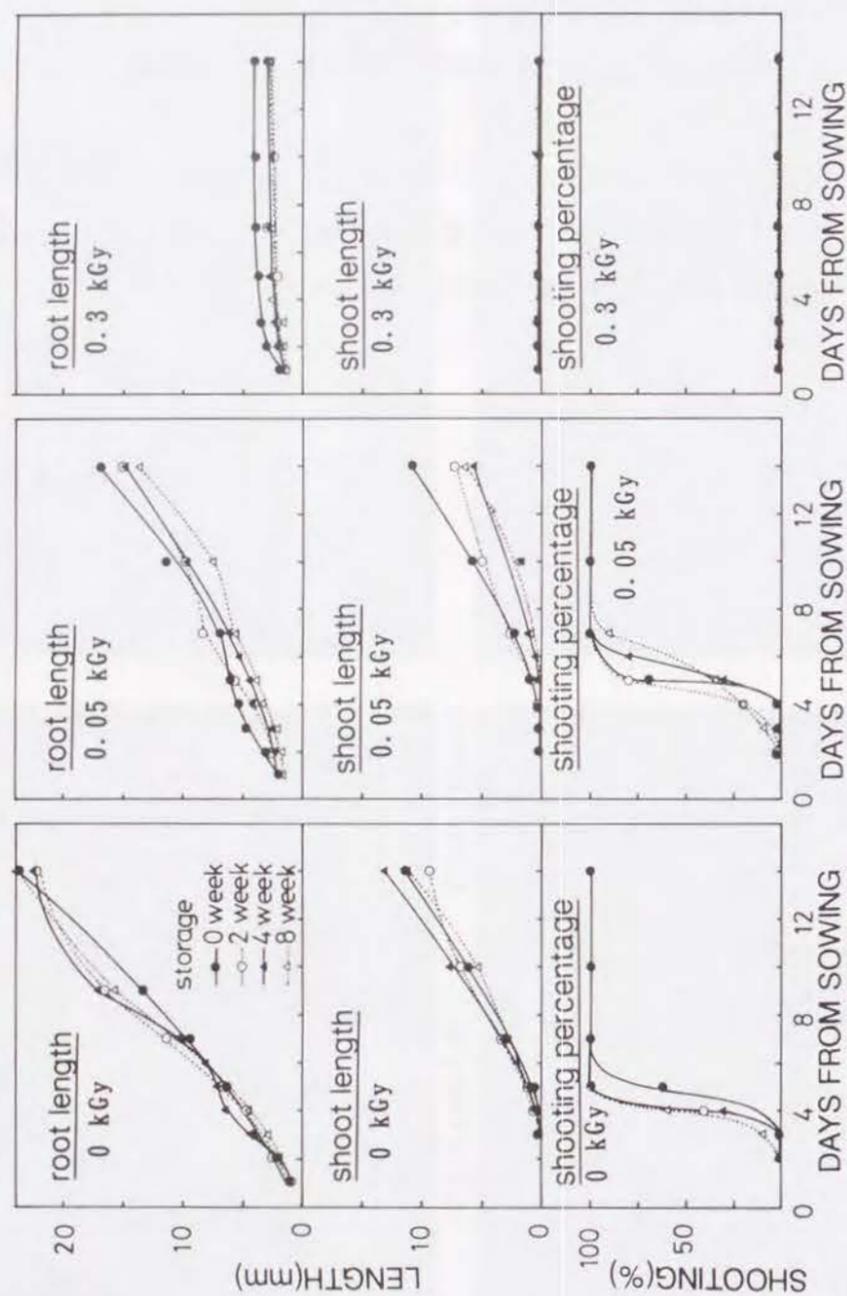


Fig. 8. Effect of storage period on growth curve of half-embryos extracted from ripe grapefruit var. Marsh White from California, stored at 10°C in carton

#### 4. 2. 4 照射グレープフルーツの保存による half-embryo test への影響

照射グレープフルーツを長期間保存すると、修復等により発芽能力が回復することが懸念された。そこで、カリフォルニア産マーシュホワイト種グレープフルーツを0.05および0.3kGyで照射し、照射直後および、10°Cで2、4、6、8週間保存後にhalf-embryo testを実施した。その結果、Fig. 8に示すように、非照射においては貯蔵によりかえって発芽時期が早まる傾向がみられたものの、根や芽の伸長には変化がみられなかった。また0.05kGy照射においても、貯蔵により発芽時期が早まるが、根や芽の伸長は低下する傾向が見られた。一方0.3kGy照射においては、発芽は完全に抑制を受けたままで回復はみられず、根の生長がさらに抑制される傾向が見られた。すなわちグレープフルーツの貯蔵により熟度が高くなり half-embryoの発芽時期は早まるが、一方、 $\gamma$ 線照射による損傷は貯蔵により修復を受けず、かえって増幅されることが示唆された。またグレープフルーツにおいては、長期間の貯蔵は果実に損傷を与え商品価値を低下させるため通常の貯蔵期間は数カ月以内と推定される。

以上より、 $\gamma$ 線照射によるグレープフルーツの half-embryoの発芽抑制は照射後の貯蔵によっても修復を受けず、グレープフルーツ果実が商品価値を保って貯蔵可能な期間は照射の有無の判別が十分可能であることが明らかとなった。

#### 4. 2. 5 グレープフルーツ half-embryo test の改良

照射検知法としてhalf-embryoを用いる発芽試験を開発し、照射の有無判別に優れていることを明らかにした。しかし、非照射のhalf-embryoの発芽率が50%を超えるためには、4~5日必要であった。そこで判別に要する期間をさらに短縮することを検討した。

一般に柑橘類の発芽試験は20~25°Cで行われているため、培養は23°Cで行ってきたが、改めてhalf-embryoにおける至適温度の検討を行った。フロリダ産マーシュホワイト種から調製したhalf-embryoを15°C、23°C、30°C、35°Cおよび40°Cで培養したところ、Fig. 9に示すように35°Cにおける生長が最も速く、次いで30°Cであった。また40°Cでは少し生長が見られるがやがて腐敗した。35°Cにおいては培養3日目で発芽が始まるがすべてがほぼ一斉に発芽するため、その日のうちに発芽率100%となるので、23°Cで培養するのと比較して所要日数は約1/2となり大幅に短縮された。またカリフォルニア産マーシュホワイト種においてもよく一致した結果が得られた。

次に35°Cにおける照射および非照射 half-embryoの根や芽の生長の比較を行った。Fig. 10に示すように、0.05kGy照射では、非照射と同様に3日後には100%発芽し、根および芽

はともにやや緩やかではあるが順調に生長した。しかし、0.15kGy以上の照射を受けたものでは根の生長はわずかであり、発芽は完全に抑制された。23°Cで培養した場合と比較すると、根や芽の生長に及ぼす $\gamma$ 線照射の影響は全く同様に発現したが、その生長速度は35°Cの方が約2倍であった。このように、培養温度を35°Cに設定することにより3~4日で照射の有無が判明するので、グレープフルーツにおけるhalf-embryo testの培養温度は35°Cに変更することとした。

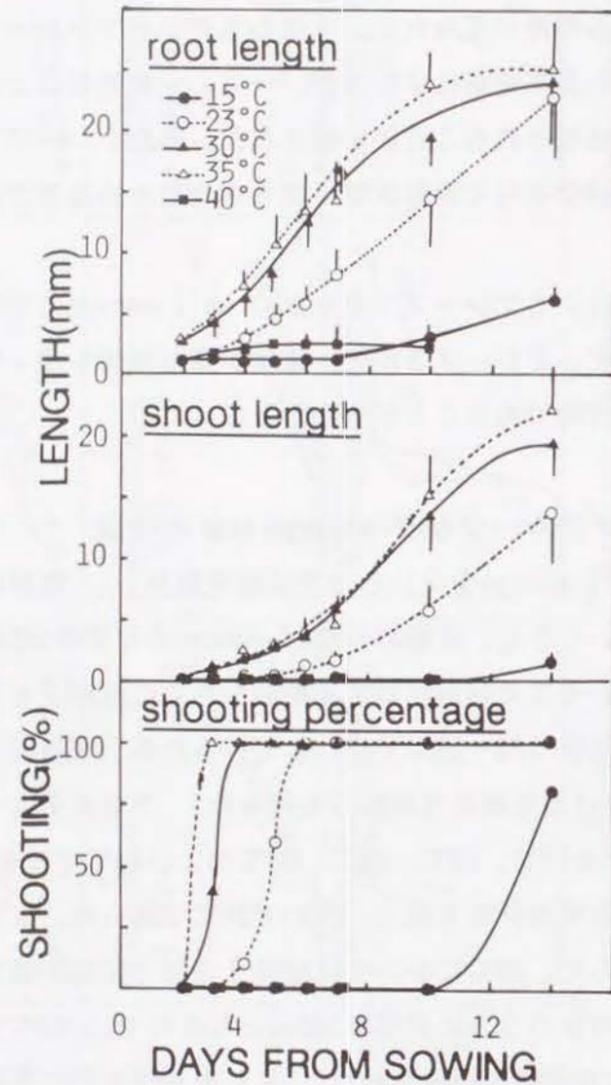


Fig. 9. Effect of temperature on growth curve of half-embryos extracted from grapefruit var. Marsh White from Florida.

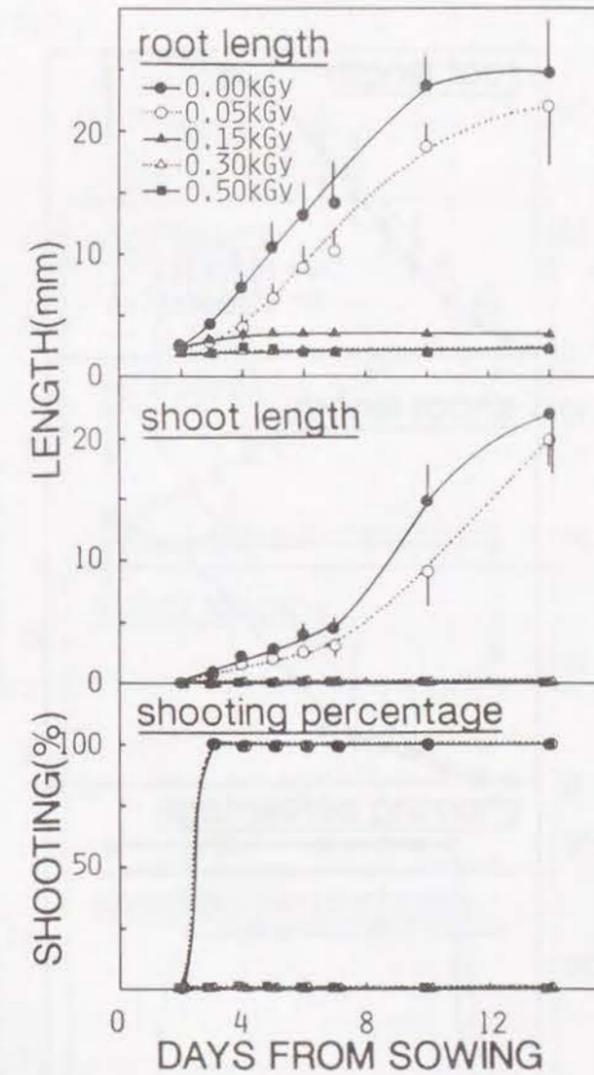


Fig. 10. Effect of  $\gamma$ -irradiation on growth curve of half-embryos extracted from grapefruit var. Marsh White from Florida when incubated at 35°C.

一方、half-embryoの培養に植物ホルモンであるジベレリンを添加し、さらに発芽を促進させることを検討したところ、根および芽の生長、発芽の開始ともやや促進される傾向は見られたが有意差はみられなかった(Fig. 11)。そこでジベレリン添加は行わないこととした。

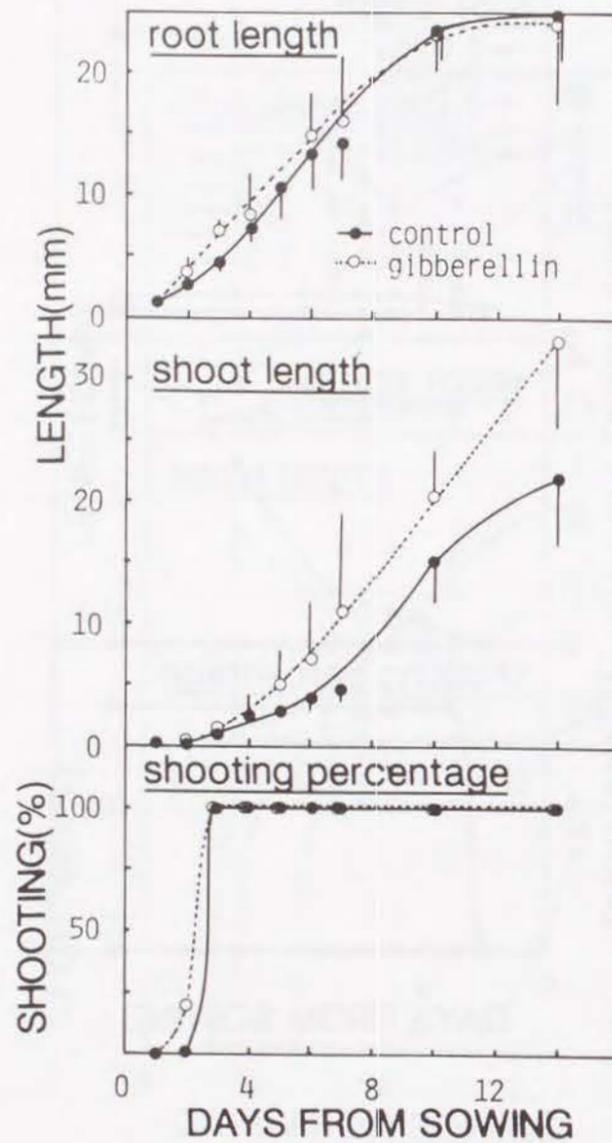


Fig. 11. Effect of gibberellin on growth curve of half-embryos extracted from grapefruit var. Marsh White from Florida when incubated at 35°C

#### 4. 2. 6 Half-embryo test の照射オレンジおよびレモンへの適用

カリフォルニア産バレンシア種オレンジ(*Citrus sinensis* Osbeck)およびアリゾナ産レモン(*Citrus limon* Burm. f.)の種子から調製したhalf-embryoの培養温度を検討したところ、グレープフルーツと同様に35°Cが至適培養温度であった。

そこで、非照射、0.05、0.15、0.3および0.5kGyで照射した果実からhalf-embryoを調製し、培養を行ったところ、Fig. 12およびFig. 13に示すようにグレープフルーツとよく一致した照射影響が観察された。

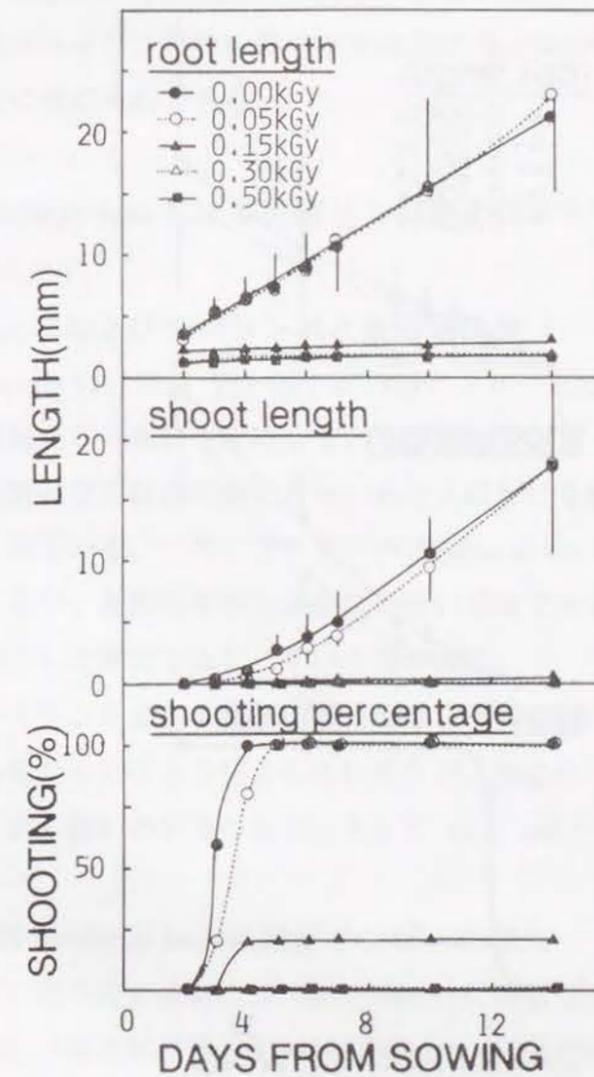


Fig. 12. Effect of gamma-irradiation on growth curve of half-embryos extracted from oranges when incubated at 35 °C.

すなわち、非照射および0.05kGy照射では3~5日目に100%発芽し、根や芽は順調に生育した。また0.15kGy照射では発芽はほぼ抑制され、0.3kGy以上の照射では完全に発芽が抑制された。また、この実験に用いたレモンはやや緑色を帯び、使用した種子にもやや未成熟なものが含まれていたが、その影響は見られなかった。

以上のことからhalf-embryo testは、照射検知法としてオレンジやレモンにも全く同様に適用可能であった。また他の柑橘類にも適用可能と推定された。

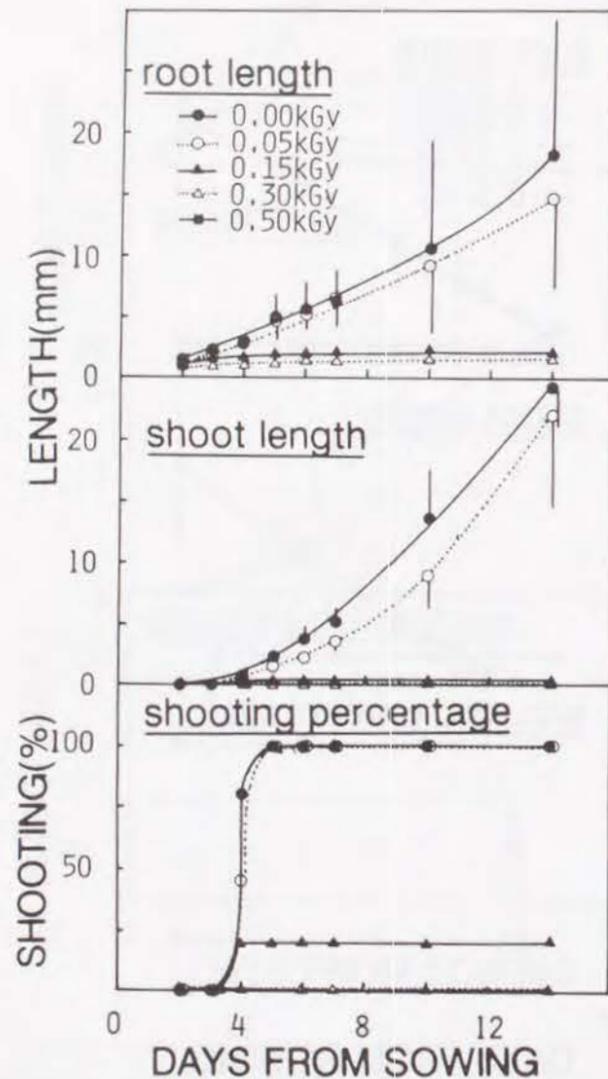


Fig.13. Effect of gamma-irradiation on growth curve of half-embryos extracted from lemons when incubated at 35 °C.

#### 4. 2. 7 Half-embryo test による照射柑橘類の検知法

これまでの結果から、グレープフルーツだけではなくオレンジ、レモン等も含めた柑橘類の照射の有無の検知法として、half-embryo の発芽の有無が有用な指標となることが明らかとなった。そこで照射柑橘類のhalf-embryo testによる検知法を以下のように設定した。

果実に含まれる種子を摘出して、外種皮および内種皮をピンセットで除き、得られた塊状の胚を分離する。その中で最も大きい胚を選び、子葉を1枚除去して half-embryoを調製する。ふたつきシャーレ中の蒸留水で浸したろ紙上に、half-embryoを10粒以上のせて35℃で培養し、その発芽(芽の長さ0.5mm以上)の有無を観察する。4日目の発芽率が50%未満の場合は「照射」、4日目までに発芽率が50%以上になれば「非照射」と判定する。判定までの期間は2~4日、照射線量の検出限界は0.15kGyである。また照射後2ヶ月以上保存しても十分に判定可能である。

#### 4. 3 Half-embryo test による照射リンゴおよびサクランボの検知法開発に

##### 関する研究

##### 4. 3. 1 リンゴおよびサクランボと放射線照射

リンゴ(*Malus pumila* Will)は、我が国では1994年より一部の国からの輸入が解禁された。海外では殺虫を目的として照射を許可している国があり、とくにリンゴに寄生するコリンゴガの殺虫駆除に放射線照射が有効であり、輸出入における防疫上の問題を解決するために、照射が検討されている。一方、サクランボ(*Prunus avium* L.)は、国内産のほか外国産の輸入も増加しているが、腐敗しやすく保存性の低い果実である。そのため、海外では熟度調整や殺虫を目的として照射を許可している国がある。

リンゴおよびサクランボの照射検知法としては、Maloneyらが電子スピン共鳴法の検討を行ったが成功しなかったことを報告している<sup>8)</sup>が、他にはみられなかった。そこでリンゴおよびサクランボの照射の有無の検知法として half-embryotestを試みた。

##### 4. 3. 2 Half-embryo test の照射リンゴへの適用

リンゴについて、種子のままおよび half-embryoに調製し30℃で培養して生長を比較した。Half-embryoは、1日目に発根、3日目に発芽し、4日目には発根率100%、発芽率80%、根の長さ27 mm、芽の長さ5 mmに達した。一方、種子のままの場合、2日目に発根し、4日目に発根率20%となったが、7日目までには発芽は観察されなかった。このようにリンゴ

においても half-embryoに調製することにより、種子のままよりも発根、発芽が大幅に促進されることが明かとなった。

次に、half-embryoの培養温度について 20、25、30、35および40℃で検討したところ、根および芽の生長はともに30℃が最も速く、ついで35℃および25℃であり、40℃ではほとんど生長しなかった(Fig. 14)。そこで培養温度は30℃に設定することとした。

さらに、リンゴ half-embryoの生長に対する照射影響について検討するため、非照射および0.05、0.15、0.3、0.5、1.0および2.0kGyでリンゴを照射した後、half-embryoを調製して培養を行った。Fig. 15に示すように、根においては、1日目に全ての線量で発根が始まり、2日目には非照射、0.05および0.15kGy照射で発根率100%、3日目には0.3kGy以上も100%に達した。根の長さは照射線量の増加とともに短くなり、照射による明確な抑制が観察された。一方、芽においては、1日目に非照射が、2日目に0.05kGy照射が発芽し、いずれも3日目には発芽率80%を超え、4日目には90%に達した。しかし、0.15kGy以上照射したものは7日目でもほとんど発芽がみられず、またわずかに発芽したものでも、それ以上生長せずやがて枯れた。そのため、1mm以上に生長したもののみを発芽とみなすこととした。Fig. 16は4日目のhalf-embryoの写真であるが、照射により根の生長が抑制されており、また非照射および0.05kGyに発芽がみられるが、0.15kGy以上照射したものでは発芽はみられなかった。

以上のようにリンゴのγ線照射により、half-embryoの根および芽の生長は大きな影響を受けた。とくに顕著であったのは、柑橘類と同様に発芽であり、0.15kGy以上の照射で発芽がほぼ完全に抑制された。また、非照射の発芽率が80~90%に到達する日数も短かく、リンゴの half-embryoの発芽の有無は、照射の有無判別の指標として有用であることが明らかとなった。そこで、リンゴの half-embryo testによる照射検知法を以下のように設定した。

リンゴに含まれる種子を摘出して、種皮をピンセットで剥離し、胚を得る。胚の子葉を1枚除去してhalf-embryoを調製する。ふたつきシャーレ中の蒸留水で浸したろ紙上に、half-embryoを10粒以上のせ、30℃で培養してその発芽(芽の長さ1.0mm以上)の有無を観察する。3日目の発芽率が50%未満の場合は照射、3日目までに発芽率が50%以上になれば非照射と判定する。判定までの所要日数は1~3日、照射線量の検出限界は0.15kGyである。

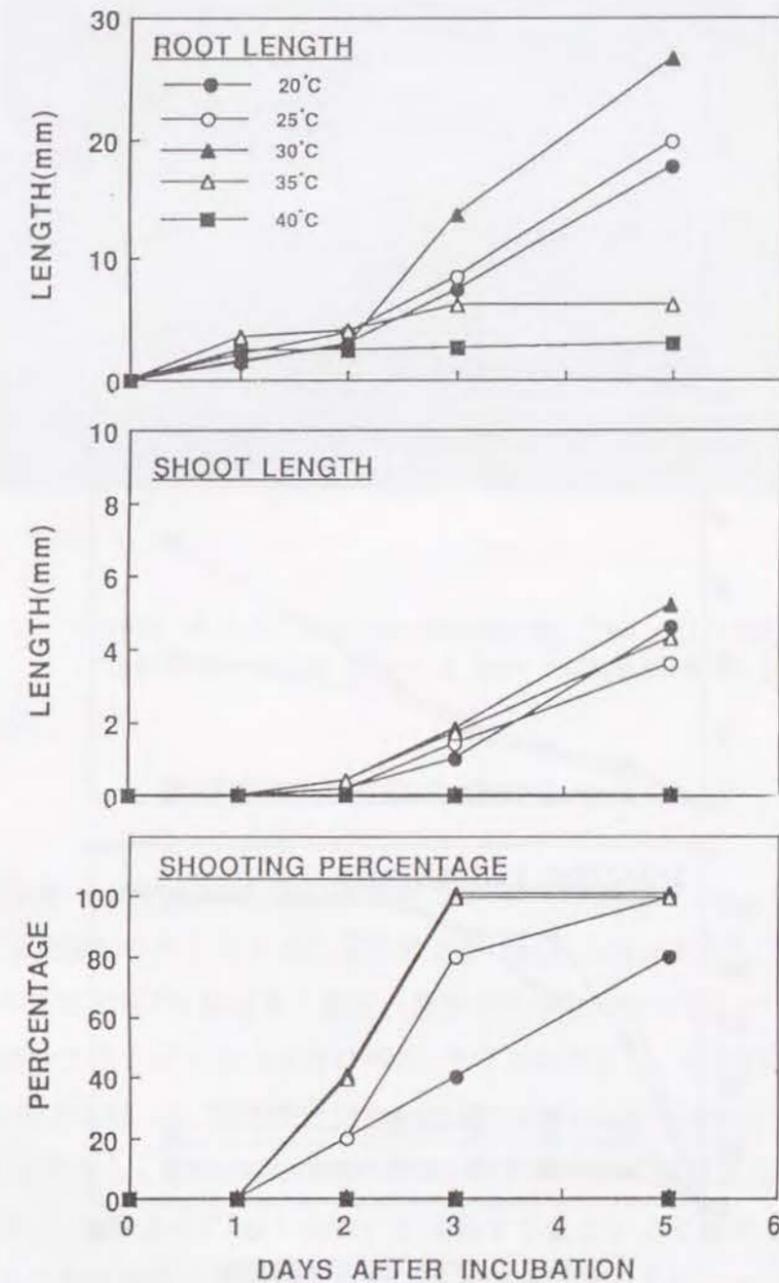


Fig. 14. Effect of incubation temperature on the growth of half-embryo extracted from apples

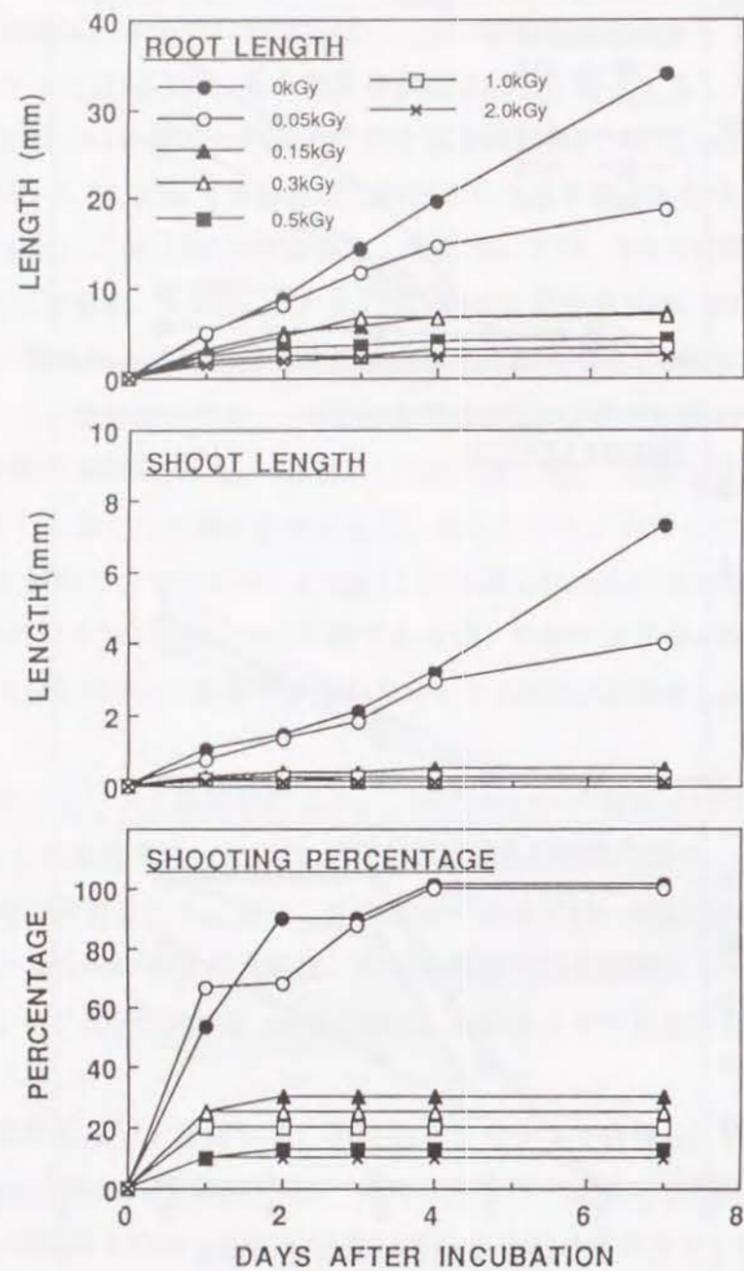


Fig. 15. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the growth curve of half-embryos extracted from apples incubated at 30°C

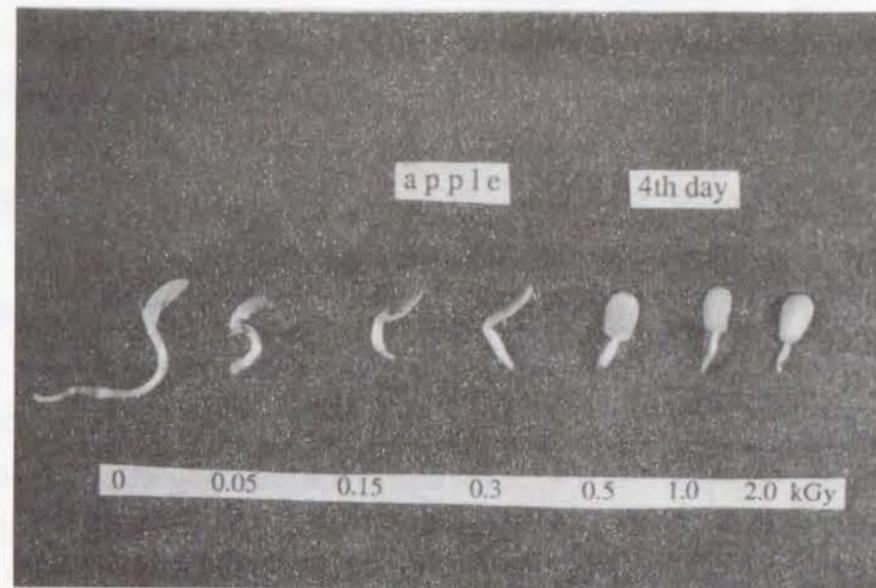


Fig. 16. Growth of half-embryos extracted from unirradiated and irradiated apples after 4 days incubation at 30°C

#### 4. 3. 3 Half-embryo test の照射サクランボへの適用

国内産および米国産のサクランボの種子および half-embryoを25°Cで培養したところ、いずれも種子のままでは7日後も全く発根、発芽がみられなかった。一方half-embryoの場合には、国内産サクランボでは4日目に発根、5日目に発芽し、7日目には発根率100%、発芽率80%で根の長さは10 mm、芽の長さは2 mmに達した。また米国産サクランボでは3日目に発根、5日目に発芽し、7日目には発根率70%、発芽率60%で根の長さは10 mm、芽の長さは2 mmに達した。このようにhalf-embryoを調製することにより根および芽の生長が著しく促進され、また国内産および米国産による差もほとんどみられなかった。

次に、至適温度を求めるために half-embryoを20、25、30、35および40°Cで培養したところ、根および芽とも25°Cの生長が最も速く、続いて20°Cであった。また、35および40°Cではほとんど生長がみられず5日目には腐敗してしまった。そこで、サクランボのhalf-embryoの培養温度は25°Cに設定することとした(Fig. 17)。

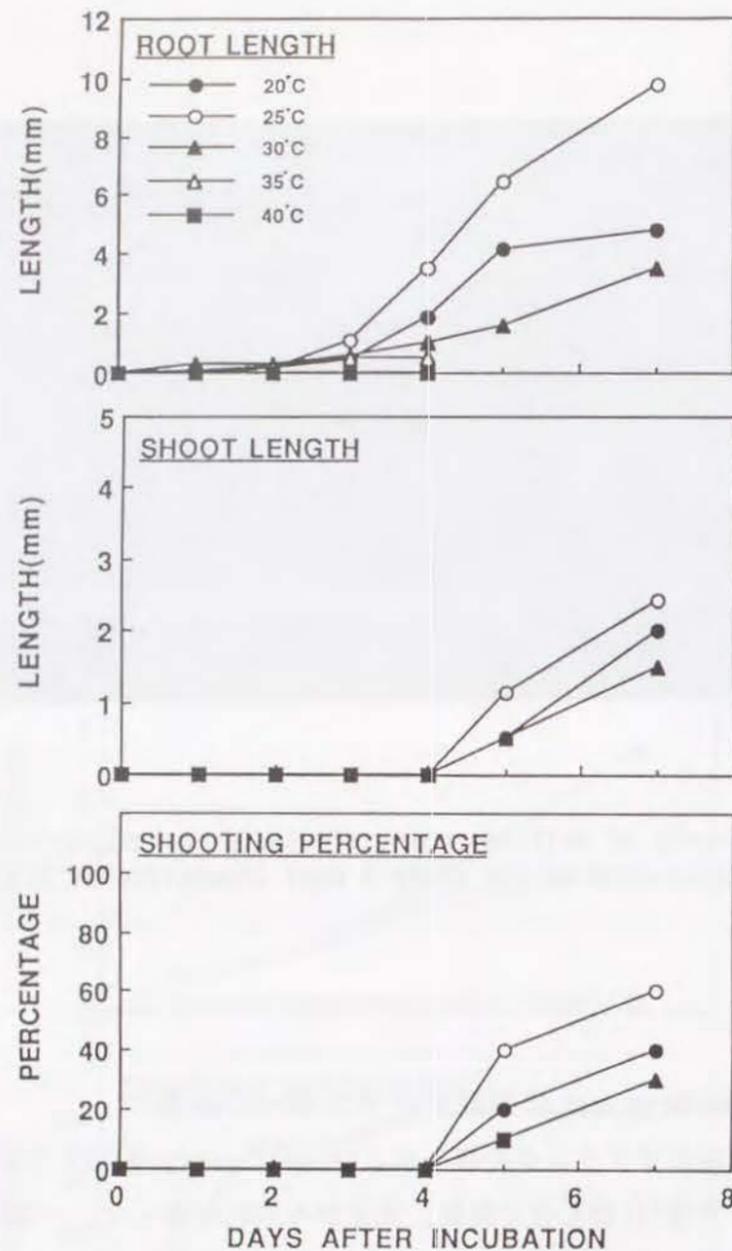


Fig.17. Effect of incubation temperature on the growth of half-embryo extracted from cherries

#### 4. 3. 4 植物ホルモン添加による発芽促進

サクランボのhalf-embryoは、至適培養温度である25°Cにおいても、発芽率が50%を超えるのに7日以上かかり、検知法とするためにはさらに短縮する必要があった。そこで発芽を促進させるために植物ホルモンの添加を試みた。植物ホルモンとして、オーキシン作用をもつインドール酢酸、インドール酪酸、2,4-ジニトロフェノキシ酢酸および $\alpha$ -ナフタレン酢酸、サイトカイニン作用をもつカイネチン、ジベレリン、ベンジルアデニンの7種類について各々10 $\mu$ Mに調製し、その溶液を用いて非照射サクランボのhalf-embryoを培

養した。その結果、根の生長を最も促進させたのはベンジルアデニンであり、2,4-ジニトロフェノキシ酢酸、カイネチンおよびジベレリンにおいても促進がみられた。一方、芽の生長において促進を示したのはベンジルアデニンのみであり、発芽率は3日目で40%、4日目で100%に達した(Table 2)。

根および芽の両方の生長を最も促進させたベンジルアデニンについて、その至適濃度を求めるため、0.1、0.5、1.0、5.0および10 $\mu$ Mの5段階の濃度に調製しサクランボのhalf-embryoを培養した。根においては10 $\mu$ Mと5 $\mu$ Mが最も促進した。また芽においては10 $\mu$ Mが最も促進し、4日目で発芽率は90%、長さは1.7mmに達した(Table 3)。

このように、サクランボのhalf-embryoは10 $\mu$ Mベンジルアデニン溶液で培養することにより、発芽時期および芽の生長が大きく促進され、4日目で発芽率が90%に達することが明らかになり、検知法における所要日数も短縮された。

Table 2. Effect of plant hormones on shooting percentage of half-embryos extracted from cherries

Plant Hormones	Shooting(%)			
	2 days	3 days	4 days	7 days
Control	0	10	20	80
3-Indoleacetic acid	0	0	0	20
3-Indolebutylic acid	0	0	40	90
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	0	0	40	80
$\alpha$ -Naphthylacetic acid	0	0	50	80
Giberellin	0	20	30	80
Kinetin	0	20	40	90
Benzyladenine	0	40	100	100

Concentration of plant hormones is 10 $\mu$ M.

Table 3. Effect of benzyladenine concentration on shooting percentage of half-embryos extracted from cherries

Concentration ( $\mu$ M)	Shooting(%)			
	2 days	3 days	4 days	5 days
0	0	0	10	10
0.1	0	0	20	30
0.5	0	10	10	30
1.0	0	0	20	60
5.0	0	0	60	60
10.0	0	30	90	90

#### 4. 3. 5 ペンシルアデニンを添加したサクランボの half-embryo test と照射影響

非照射および0.05、0.15、0.3、0.5、1.0および2.0kGy で照射した国内産サクランボから調製したhalf-embryoを10 $\mu$ Mペンシルアデニン溶液で培養し、照射影響の発現を検討した。Fig. 18に示すように、非照射では2日目に発芽が始まり発芽率が50%、4日目には90%に、0.05kGy照射では2日目に20%、4日目に100%に達した。一方、0.15kGy以上照射した

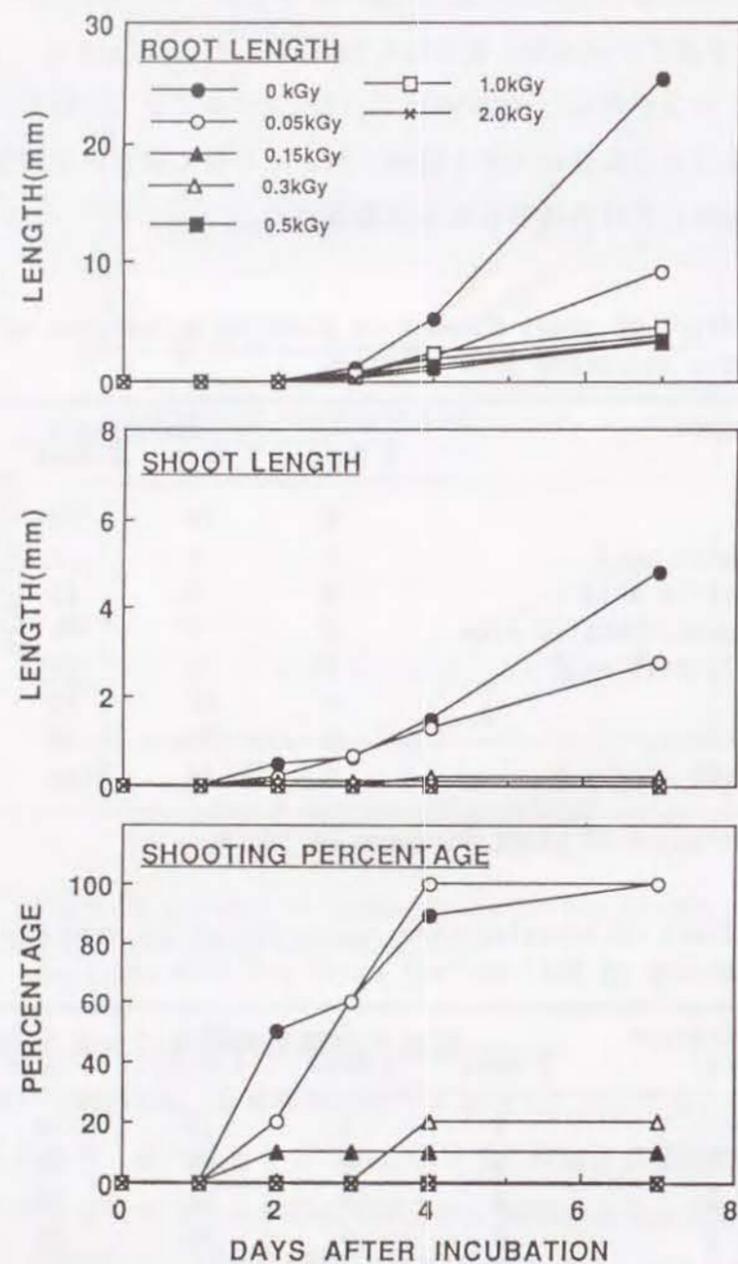


Fig. 18. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the growth curve of half-embryos extracted from cherries incubated at 25°C with 10 $\mu$ M benzyladenine

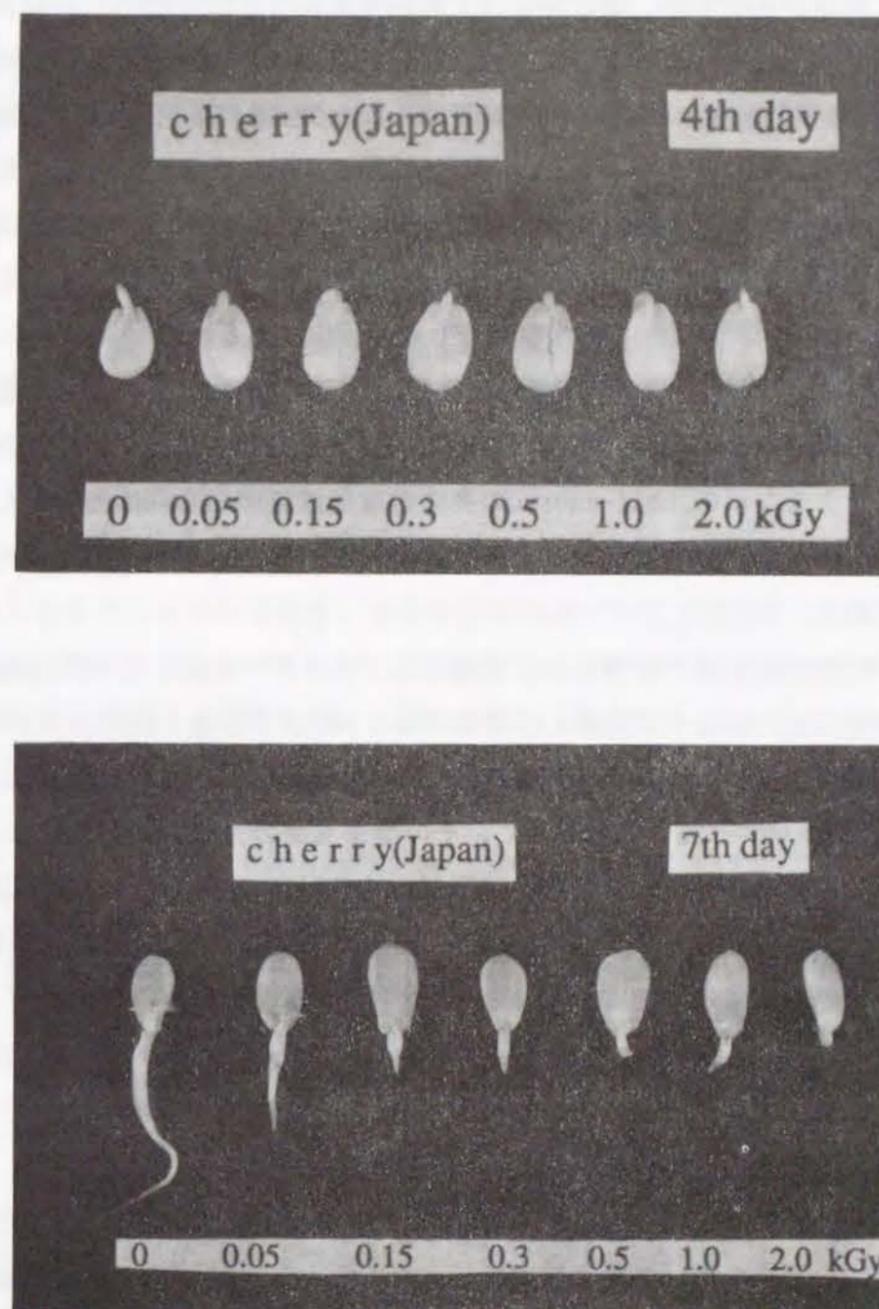


Fig. 19. Growth of half-embryos extracted from unirradiated and irradiated cherries after 4 and 7 days incubation at 25°C with 10 $\mu$ M benzyladenine

ものでは7日目になってもわずかな発芽しかみられなかった。また根については、いずれも3~4日目に発根が始まるが、根の伸長は $\gamma$ 線照射により線量に相関した抑制がみられた。Fig. 19に培養4日目および7日目のhalf-embryoの写真を示した。非照射および0.05kGy照射では、4日目で発芽が観察され、7日目では芽は一段と生長しているが、0.15kGy以上照射したものは発芽はみられなかった。また照射線量に相関して根の伸長抑制がみられた。さらに、輸入サクランボについても検討を行ったところ、0.15kGy以上で完全に発芽が抑制され、照射線量に相関して根の伸長が抑制されるなど、国内産サクランボとよく一致した結果が得られた。

柑橘類やリンゴと同様に、サクランボのhalf-embryoも $\gamma$ 線照射による影響が最も顕著であるのは発芽であり、0.15kGy以上の照射ではほぼ完全に発芽が抑制された。以上の結果から、サクランボのhalf-embryoの発芽の有無は、照射判別の指標として有用であることが明らかとなった。そこで、サクランボのhalf-embryo testによる照射検知法を以下のように定めた。

サクランボに含まれる種子を摘出し、外種皮はプライヤーを用いて内部を傷めないように割り、内種皮はピンセットで剥離して胚を得る。胚の子葉を1枚除去してhalf-embryoを調製する。ふたつきシャーレ中の10 $\mu$ Mベンジルアデニン溶液で浸したろ紙上に、half-embryoを10粒以上のせ、25 $^{\circ}$ Cで培養して、その発芽(芽の長さ1.0mm以上)の有無を観察する。4日目の発芽率が50%未満の場合は照射、4日目までに発芽率が50%以上になれば非照射と判定する。判定までの所要日数は2~4日、照射線量の検出限界は0.15kGyである。

#### 4. 3. 6 Half-embryo test による照射リンゴおよびサクランボの検知法

リンゴおよびサクランボの照射の有無判別法として、柑橘類と同様にhalf-embryoを用いた試験を適用できることが明らかとなった。至適培養温度は、柑橘類35 $^{\circ}$ C、リンゴ30 $^{\circ}$ C、サクランボ25 $^{\circ}$ Cと果実毎に異なった。またサクランボは発芽に時間がかかるため、10 $\mu$ Mベンジルアデニン溶液を用いて発芽促進を行った。しかし、試験法の主要部分は全く同一であり、しかも検出できる照射線量の限界も0.15kGyと一致していた。柑橘類、リンゴ、サクランボは種類、果実や種子の大きさ、構造等が全く異なるにもかかわらず、同じ照射線量に発芽抑制の臨界点をもっていることは興味深かった。

### 4. 4 Germination test による照射米および小麦の検知法開発に関する研究

#### 4. 4. 1 米および小麦と放射線照射

米(*Oryza sativa* L.)および小麦(*Triticum aestivum* L.)は世界的に最も重要な農作物であり、貯蔵性が高いことから長期間保存されることが多い。貯蔵中の害虫防除のため、一般に低温貯蔵や農薬燻蒸が行われているが、 $\gamma$ 線照射による防除を許可している国もある。

照射米および小麦の検知法に関する報告は極めて少ないが、熱海ら<sup>7)</sup>は照射により米や小麦の芽や根の伸長が抑制されることを、Ramarathnamら<sup>8)</sup>は米の発芽率が低下することを報告しており、発芽による検知の可能性が示唆された。そこで米や小麦の発芽に対する $\gamma$ 線の照射影響、および外種皮の有無、品種、貯蔵期間等について検討を行った。

#### 4. 4. 2 米の発芽試験と諸条件の検討

米は食用としては一般に外種皮である殻をとった玄米の状態での貯蔵および流通している。そこで玄米の状態での発芽の可能性、もみ米との相違について比較検討した。アキニシキのもみ米と玄米について培養を行ったところ、Fig. 20に示すように脱穀直後では発根および発芽の時期や伸長に差は見られなかったが、脱穀後1ヶ月以上経過すると玄米の方が生長が良く、特に根長において有意な差がみられることが判明した。そこで試験には玄米を用いることとした。

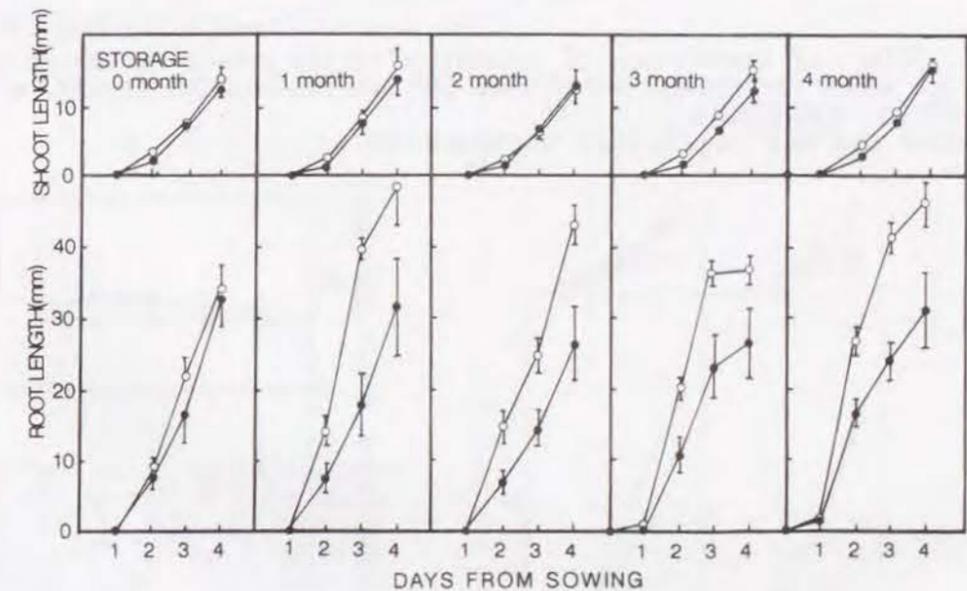


Fig. 20. Effect of husk at incubation and storage time on the growth curves of rice seeds var. Akinishiki with husk(●) and without husk(○). Shoot and root length show the means $\pm$ SE.

次に、玄米の発芽のための培養温度の検討を行った。アキニシキ、キララ397、ササニシキの3栽培種の玄米を25、30、35℃で培養したところ、Fig. 21に示すように、30および35℃では全体にほぼ同じような順調な伸長を示し、4日目の根の長さのみ30℃が上回っていた。しかし、25℃では根および芽ともに伸長に遅れがみられた。また、3品種で同様の結果が得られ品種による差は見られなかった。そこで玄米の培養温度は30℃とした。

また、種子の保存温度や保存期間の芽や根の伸長におよぼす影響を調べたところ、室温、45℃および-20℃で5ヶ月間保存しても芽の伸長には影響が見られず、また根の伸長については変動が大きく、保存による一定の傾向はみられなかった(Fig. 22)。

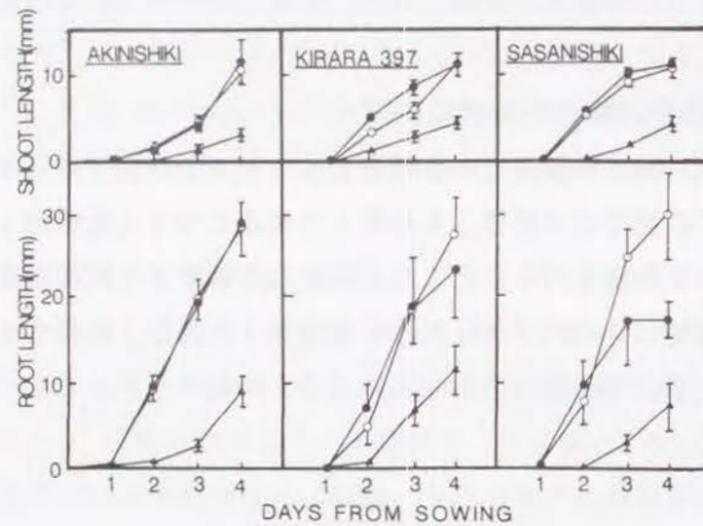


Fig. 21. Effect of temperature of incubation on the growth curves of husked rice seeds var. Akinishiki, Kirara 397 and Sasanishiki at 35°C(●), 30°C(○) and 25°C(▲). Shoot and root length show the means  $\pm$  SE.

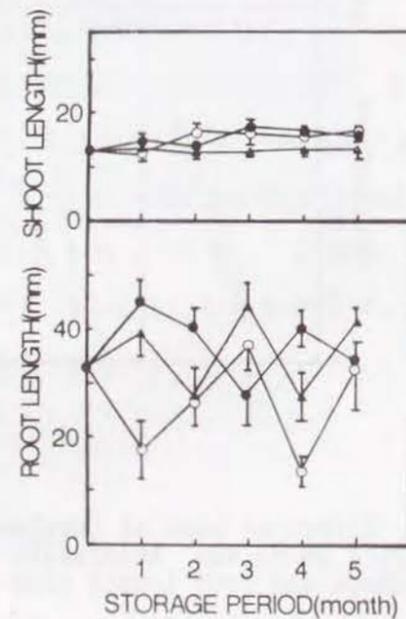


Fig. 22. Effect of storage temperature and period on shoot and root length of rice var. Akinishiki at room temp. (●), 45°C(○) and -20°C(▲). Shoot and root length show the means  $\pm$  SE at 4 days after sowing.

#### 4. 4. 3 米の発芽におよぼす $\gamma$ 線照射の影響

$\gamma$ 線照射が米の芽や根の伸長におよぼす影響および殻の有無による差異について検討を行った。アキニシキのもみ米および玄米に、0.05、0.15、0.3、0.5、1.0および2.0kGyの6段階で照射を行い、非照射試料とともに培養を行ったところ、Fig. 23に示すような結果が得られた。すなわち、根はもみ米では3日目の0.15kGy照射から、玄米では0.3kGy照射から、芽ではいずれも4日目の0.5kGy照射から非照射と比較して有意な抑制がみられた。Fig. 24は培養3日目の玄米の生長を示しているが、照射により根の生長が大きく抑制されているのが明らかである。以上のように、もみ米と玄米はともに照射により根および芽の生長が抑制され、照射線量に相関がみられた。またもみの有無による有意な差はみられなかった。

次に、品種間の差異を検討するため、キララ397、コシヒカリ、ササニシキ、ツキノヒカリ、ニッポンバレの5品種の玄米に $\gamma$ 線照射を行い、芽や根の伸長を比較した(Fig. 25)。いずれの品種においても、アキニシキと同様に、根の伸長は0.05kGyでは非照射とほとんど差が無くむしろ促進がみられたが、0.3kGy以上照射を受けた玄米では有意に抑制された。また0.15kGy照射においてはコシヒカリやツキノヒカリで非照射とほぼ同様、その他はやや抑制を受けるものの、順調な伸長が見られた。一方、芽の伸長においては、根に比べて差は小さいが0.3または0.5kGy以上照射したすべての品種で有意な抑制がみられた。また発芽率や発根率を比較すると、実用線量である0.3~2.0kGyでは80~100%であり、照射による低下はみられなかった(Table 4 and 5)。

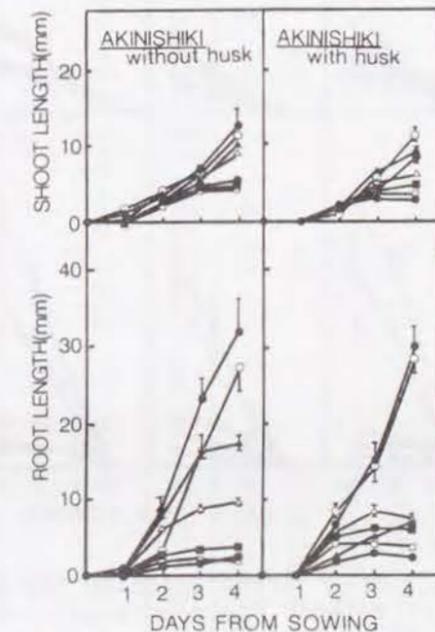


Fig. 23. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the growth curves of rice seeds var. Akinishiki with and without husk: unirradiated(●), 0.05kGy(○), 0.15kGy(▲), 0.3kGy(△), 0.5kGy(■), 1.0kGy(□) and 2kGy(●).

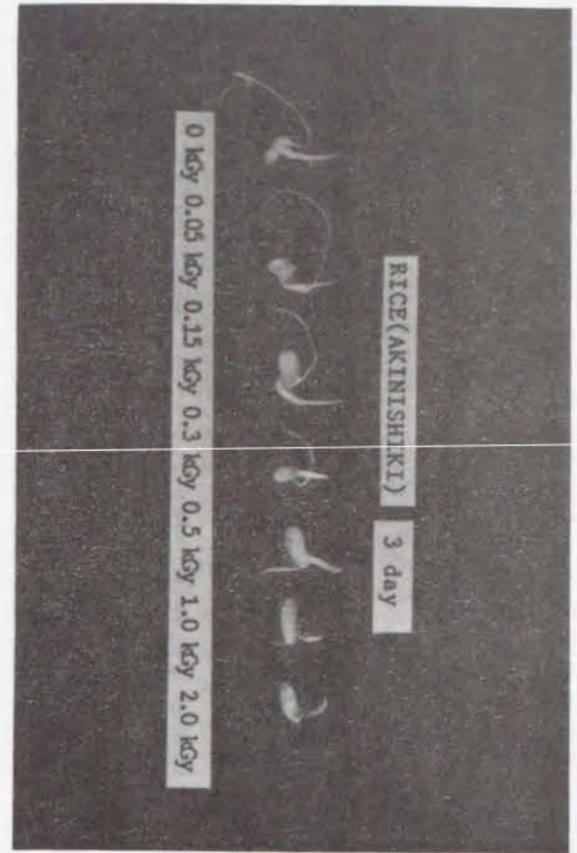


Fig. 24. Growth of  $\gamma$ -irradiated husked rice seeds var. Akinishiki after 3 days

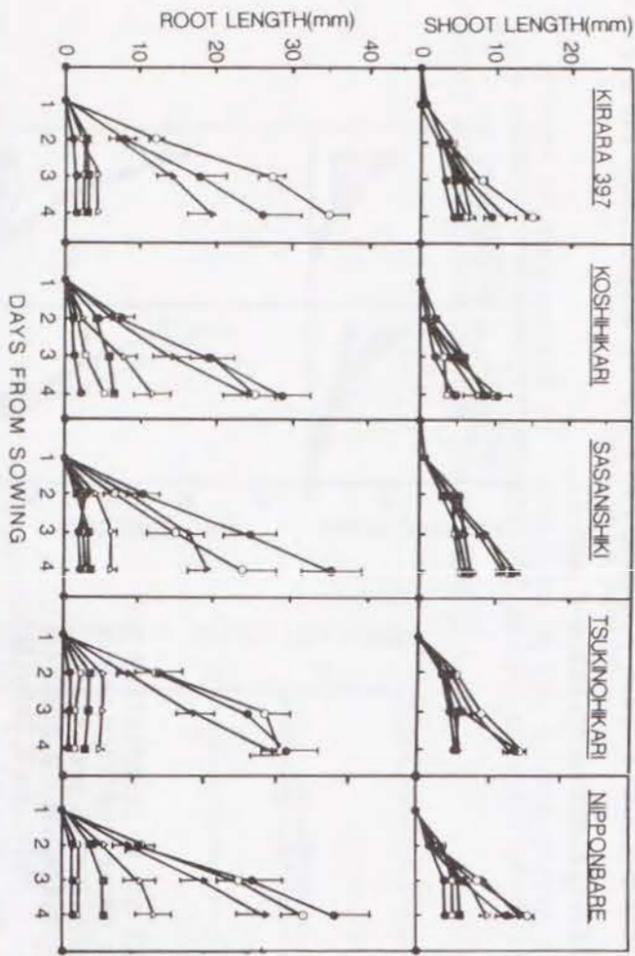


Fig. 25. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the growth curves of five rice varieties without husks: unirradiated ( $\bullet$ ), 0.05kGy ( $\circ$ ), 0.15kGy ( $\blacktriangle$ ), 0.3kGy ( $\triangle$ ), 0.5kGy ( $\blacksquare$ ), 1.0kGy ( $\square$ ) and 2.0kGy ( $\bullet$ ).

Table 4. Shoot percentage of  $\gamma$ -irradiated husked rice of six cultivars

Cultivar	0 kGy	0.05 kGy	0.15 kGy	0.3 kGy	0.5 kGy	1.0 kGy	2.0 kGy
Kirara 397	90 %	100 %	90 %	100 %	90 %	90 %	80 %
Koshihikari	90	90	90	90	100	90	100
Sasanishiki	100	100	100	100	100	90	100
Tsukinohikari	100	100	100	100	100	100	100
Akinishiki	100	100	100	100	100	100	100
Nipponbare	80	100	100	100	100	100	100

Table 5. Root percentage of  $\gamma$ -irradiated husked rice of six cultivars

Cultivar	0 kGy	0.05 kGy	0.15 kGy	0.3 kGy	0.5 kGy	1.0 kGy	2.0 kGy
Kirara 397	80 %	100 %	90 %	90 %	90 %	90 %	80 %
Koshihikari	90	90	80	80	100	90	80
Sasanishiki	100	100	100	100	80	80	100
Tsukinohikari	90	100	100	80	90	100	90
Akinishiki	100	90	100	100	90	100	100
Nipponbare	80	100	100	90	100	90	90

さらに、Fig. 26に示すように照射した玄米を1年間保存して照射影響の変化を検討したところ、0.15kGy以下では変動はあるものの根の十分な伸長が見られたが、0.5kGy以上では品種や保存期間に関わらず根の伸長は強く抑制された。

このように、米の発芽試験における照射影響は、根の伸長抑制に最も強く発現した。そこで十分に有意な差がでる3日目の根長を基準にし、根長が10 mm以下を照射と判定するならば、照射線量0.5kGyから判別が可能である。

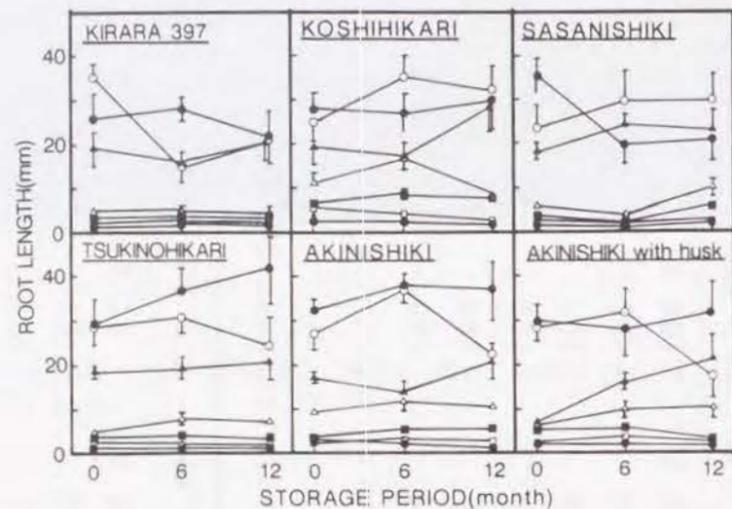


Fig. 26. Change of root length of five rice cultivars without husks attended with storage period after  $\gamma$ -irradiation: unirradiated (●), 0.05kGy (○), 0.15kGy (▲), 0.3kGy (△), 0.5kGy (■), 1.0kGy (□) and 2.0kGy (●).

#### 4. 4. 4 小麦の発芽試験と諸条件の検討

小麦は外種皮をとった玄麦の状態での貯蔵、流通されており、殻付きの小麦の入手は困難であった。そこで小麦については実用上からも望ましい玄麦を用いて検討することとした。

まず、玄麦を発芽させるための培養温度の検討を行った。シラサギ種の玄麦を15、20、25、30および35℃で培養したところ、Fig. 27で示すように最初の3日間は30℃の生長が最も速いが、4日目では芽は25℃、根は20℃および25℃の方が速かった。短期間で判定を下すことを目的としていることから、培養温度は初期に生長が速い30℃とした。

また種子の保存温度や保存期間の芽や根の伸長におよぼす影響を調べたところ、室温、45℃および-20℃で5ヶ月間保存した場合、芽および根の伸長についてはバラツキが大きいものの一定の傾向はみられず保存による影響は認められなかった(Fig. 28)。

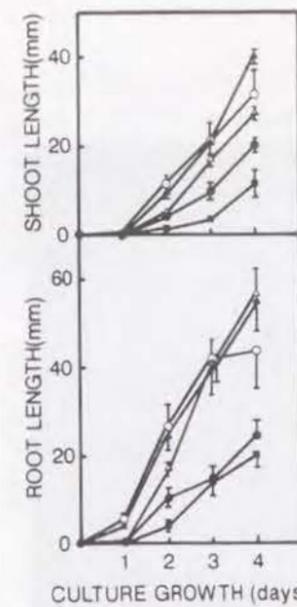


Fig. 27. Effect of culture temperature on the growth of wheat, var. Shirasagi, at 35°C (●), 30°C (○), 25°C (▲), 20°C (△) and 15°C (■).

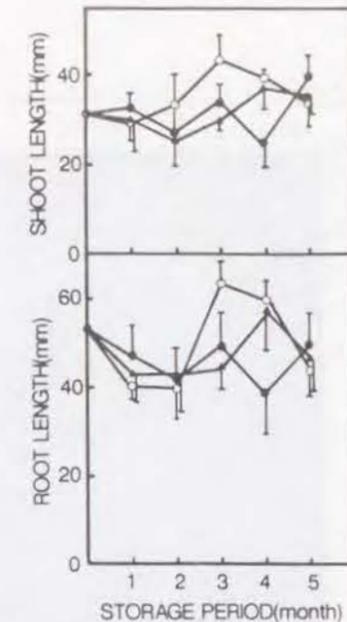


Fig. 28. Effect of storage on the growth of wheat, var. Shirasagi at room temp. (●), 45°C (○) and -20°C (▲).

#### 4. 4. 5 小麦の発芽におよぼす $\gamma$ 線照射の影響

$\gamma$ 線照射による玄麦の芽や根の伸長におよぼす影響を種々の品種について検討した。輸入小麦のNo1CW、WW、ASW、HRW、PHおよびNSの6栽培品種、国産小麦のホロシリ、シラサギ、チホク、タフネおよび農林61号の5栽培品種について、0.15、0.3、0.5、1.0、2.0、5.0および10.0kGyの7段階で照射を行い、非照射試料とともに培養を行った。

その結果、Fig. 29の培養2日目の写真、Fig. 30の輸入小麦およびFig. 31の国産小麦の生長曲線で示すように、芽および根の生長ともに、照射線量0.3kGy以上では照射線量に相関した生長抑制が観察された。一方0.15kGy照射では品種により促進と抑制の両方の場合がみられた。また根の伸長の方が芽の伸長よりも強く抑制されており、照射0.3kGy以上の場合は、培養4日後にいずれの品種においても根長が20mm以下であった。根において有意な生長抑制が観察される臨界照射線量は、PH種が0.15kGyで最も照射感受性が高く、ホロシリが1.0kGyで最も低く、その他の品種は0.3~0.5kGyであった。全体に輸入小麦の方が感受性が高い傾向があったが、種による変動は比較的小さかった。

また発芽率は照射5.0kGy以下で70~100%、発根率は2.0kGy以下で70~100%であり低線量では発根率の低下はみられなかった。しかし、10.0kGyの発芽率および5.0kGy以上の発根率には低下がみられた。このように根や芽の伸長のほうが発根および発芽率よりも照射影響が発現しやすく、また、伸長および率ともに芽よりも根の方が照射感受性が高かった(Table 6 and 7)。

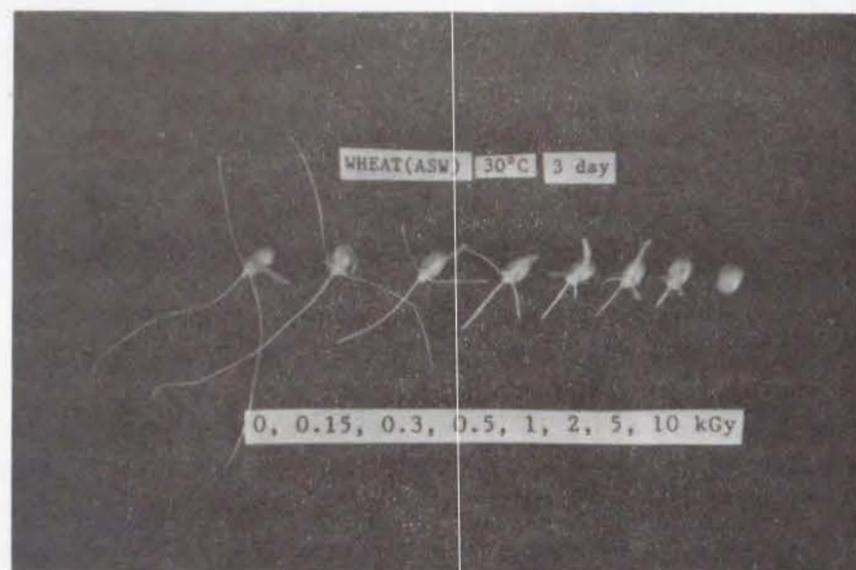


Fig. 29. Growth of  $\gamma$ -irradiated wheat, var. ASW, after 3 days of cultivation

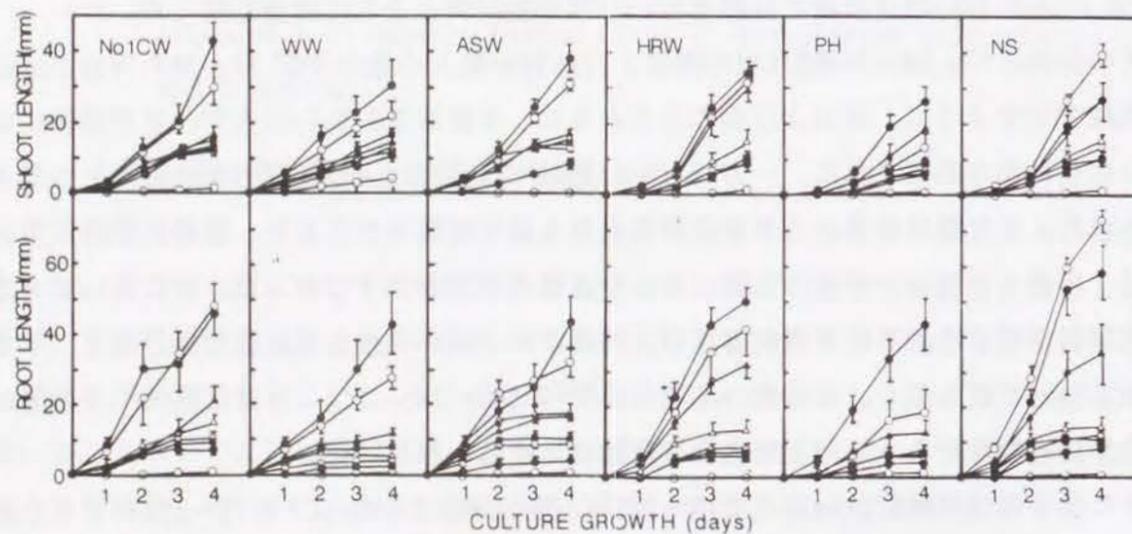


Fig. 30. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the growth curves of six varieties of imported wheat: unirradiated( $\bullet$ ), 0.15kGy( $\circ$ ), 0.3kGy( $\blacktriangle$ ), 0.5kGy( $\triangle$ ), 1.0kGy( $\blacksquare$ ), 2.0kGy( $\square$ ), 5.0kGy( $\bullet$ ) and 10.0kGy( $\circ$ )

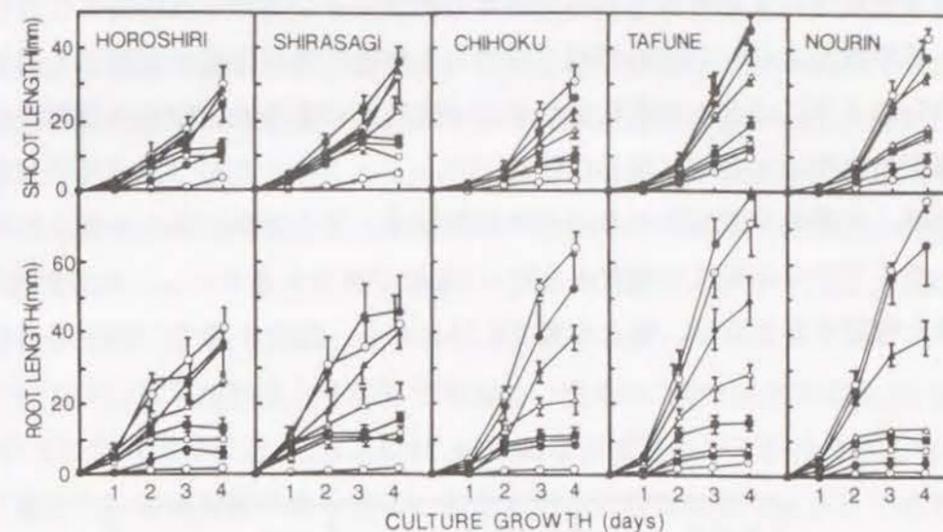


Fig. 31. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the growth curves of five varieties of domestic wheat: unirradiated( $\bullet$ ), 0.15kGy( $\circ$ ), 0.3kGy( $\blacktriangle$ ), 0.5kGy( $\triangle$ ), 1.0kGy( $\blacksquare$ ), 2.0kGy( $\square$ ), 5.0kGy( $\bullet$ ) and 10.0kGy( $\circ$ )

Table 6. Shoot Percentages of  $\gamma$ -Irradiated Wheat

Cultivar	0	0.15	0.3	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0 kGy
No. 1CW	90%	100%	100%	100%	90%	90%	100%	50%
WW	100	100	100	80	100	90	100	70
ASW	100	100	100	100	100	100	80	0
HRW	100	90	100	80	90	100	90	40
PH	100	100	80	80	100	90	90	30
NS	100	100	80	90	90	100	90	70
Horoshiri	80	90	100	100	90	90	90	80
Shirasagi	100	80	100	90	100	90	100	100
Chihoku	70	100	100	100	100	100	90	70
Tafune	90	90	90	100	100	100	100	90
Nourin No. 61	100	100	100	100	100	100	70	80

Table 7. Root Percentages of  $\gamma$ -Irradiated Wheat

Cultivar	0	0.15	0.3	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0 kGy
No. 1CW	90%	100%	100%	100%	90%	90%	100%	30%
WW	90	100	90	80	80	90	80	10
ASW	100	100	100	100	100	100	60	0
HRW	100	90	100	80	90	90	90	40
PH	100	70	80	90	100	90	70	20
NS	100	100	80	90	90	100	90	30
Horoshiri	80	90	100	100	90	90	90	70
Shirasagi	100	80	100	90	100	90	100	30
Chihoku	70	100	100	100	100	100	90	60
Tafune	90	90	90	100	100	90	100	90
Nourin No. 61	100	100	100	100	100	100	70	80

一方、5品種について照射後12ヶ月間保存し発芽および発根状況の変化について観察したところ、非照射および0.15kGy照射では保存1年後に根の伸長が増加する傾向が見られたが、0.5kGy以上ではほとんど変化はなく、 $\gamma$ 線照射による発根抑制は長期間の保存によっても修復を受けないことが判明した(Fig. 32)。

このように、小麦の発芽試験における照射影響は、米と同様に根の伸長において最も強く現れた。そこで十分に有意な差がみられる4日目の根長を基準にし、根長が20 mm以下であれば照射と判定するならば、輸入小麦で0.5kGyから、国産小麦で1.0kGyから判別可能である。

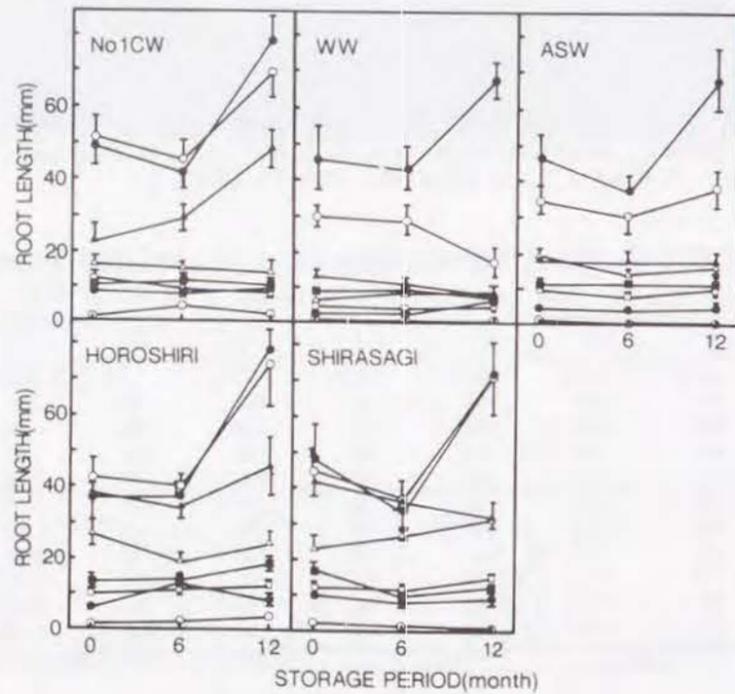


Fig. 32. Root length of five wheat cultivars subjected to various storage periods after  $\gamma$ -irradiation: unirradiated(●), 0.15kGy(○), 0.3kGy(▲), 0.5kGy(△), 1.0kGy(■), 2.0kGy(□), 5.0kGy(●) and 10.0kGy(○)

#### 4. 4. 6 発芽試験による照射米および小麦のスクリーニング法

米および小麦は、 $\gamma$ 線照射により根の伸長が強く抑制された。そこで米および小麦の照射の有無の検知法として発芽試験を行い、その根長を指標とすることが可能であることを明らかにした。照射を受けた米や小麦の根長はいずれも大きく抑制を受けその変動も小さかった。しかし非照射の米や小麦の根長は、個体による変動が大きく、また種子が直接外界に暴露されているため長期間の保存、高温保存、薬剤処理など照射以外の要因によっても抑

制を受けることが考えられる。そのため米や小麦の根長を指標とする試験は、照射の有無の判定には、信頼性が十分とはいえない。しかし根の伸長が十分であれば確実に非照射であり、また検出限界以上の線量で照射した場合には、確実に根の伸長が抑制されること、また試験操作が極めて容易であることから、スクリーニング試験として十分に有用であると考えられる。また高温保存や薬剤処理の場合には、根の伸長抑制と発根率の低下が同時に発現する場合が多い。そこで、照射米および小麦のスクリーニング試験を次のように設定することができる。

米については、玄米10粒以上を30℃で培養し、発根率50%以上で培養3日目までに根長が10 mm以上になれば非照射、3日目に10 mm未満ならば照射の可能性ありと判定し、発根率50%未満については判定不能とする。判定までの所要日数は2~3日であり、照射線量の検出限界は0.5kGyである。

また小麦については、玄麦10粒以上を30℃で培養し、発根率50%以上で培養4日目までに根長が20mm以上になれば非照射、4日目に20mm未満ならば照射の可能性ありと判定し、発根率50%未満については判定不能とする。判定までの所要日数は2~4日であり、照射線量の検出限界は輸入小麦で0.5kGy、国産小麦で1.0kGyである。

#### 4. 5 まとめ

$\gamma$ 線照射は細胞分裂の頻度の高い部位に最も大きな損傷を与えるといわれているが、本研究においても幼根や幼芽の生長が最も照射影響を受けやすく、また照射後長期間を経ても修復されなかった。そこで、これらの抑制作用を照射の有無検知法に適用することが可能と考えられた。柑橘類、リンゴ、サクランボにおいては、種子のままではなく half-embryoに調製することにより個体差や種差等による変動を大幅に低減し、しかも判定までの所要期間を大幅に短縮させることができた。そこでこのhalf-embryoを用いることにより精度が高く、実用可能な照射検知法を確立した。また、米や小麦においては玄米や玄麦を用いることにより、流通段階の商品における照射のスクリーニングを可能とした。これらの方法は感受性が高い発芽抑制を指標としているため、低線量の検知が可能であり、食品照射における殺虫の実用線量に対応できる。果実類の検出限界である0.15kGyは、現在までに報告された検知法のなかでも最も感度が高い試験法の1つである。

今回開発した柑橘類、リンゴおよびサクランボのhalf-embryo testによる照射検知法および米および小麦の発芽試験による照射スクリーニング法は、上記のように照射検知法として優れた方法であり、しかも特別な装置の必要がなく、簡便かつ安価であり、実用面においても多くの利点をもつ方法である。

## 引用文献

- 1) T. B. Tjaberg, B. Underdal and G. Lunde: "The effect of ionizing radiation on the microbiological content and volatile constituents of spices" J. Appl. Bacteriol., 473-478 (1972)
- 2) K. J. A. Van Spreekens and L. Toepoel: "Food Preservation by Irradiation" Vol. 2, pp. 150-170 (1978), International Atomic Energy Agency, Vienna.
- 3) S. K. Tamminga, R. R. Beumer and E. H. Kampelmacher: "Food Preservation by Irradiation" Vol. 2, pp. 171-183 (1978), International Atomic Energy Agency, Vienna.
- 4) B. P. Betts, L. Farr, P. Bankes and M. F. Stringer: "The detection of irradiated foods using the direct epifluorescence filter technique" J. Appl. Bacteriol., 64, 329-335 (1988)
- 5) 下村裕子、栗山悦子、高居百合子: "ジャガイモの照射処理有無の判定 (第1報) 照射による休眠芽の形態変化" 食衛誌, 13, 531-535 (1972)
- 6) 下村裕子、栗山悦子、高居百合子: "ジャガイモの照射処理有無の判定 (第2報) ジベレリンおよびカイネチンによる休眠芽の形態変化" 食衛誌, 13, 536-541 (1972)
- 7) 熱海智子、俣野景典: "照射食品の検知法に関する研究  $\gamma$ 線照射による小麦および米の組織形態学的検討" 食品照射, 8, 1-10 (1973)
- 8) D. R. Maloney, B. J. Tabner and V. A. Tabner: "An electron spin resonance study of some gamma-irradiated fruits" Radiat. Phys. Chem., 39, 309-314 (1992)
- 9) N. Ramarathnam, T. Osawa, S. Kawakishi and M. Namiki: "Effect of oxidative damage induced by  $\gamma$ -irradiation on germination potentials of rice seeds" J. Agric. Food Chem., 35, 8-11 (1987)

## 結 論

$\gamma$ 線照射による食品の物理的、化学的、分子生物学的、生物学的な変化および照射の有無判別のための検知法開発について研究を行った。得られた結果を以下に要約する。

1. 電子スピン共鳴法により、照射トウガラシから新たに生成した副シグナルを見出した。このシグナルは照射に特異的で線量に相関があり、メチルラジカル由来と推定された。実用線量の照射で検知可能であり、照射1年後も安定であった。またオールスパイス、シナモン等他の照射香辛料からも副シグナルが検出された。そこでこの副シグナルを指標として、トウガラシ等の照射香辛料の検知法を開発した。
2. 熱発光法により照射後1年経過した香辛料の照射の有無検知の可能性を検討したところ、直接測定法では判別は不可能であり、抽出測定法では $\gamma$ 線照射により熱発光量の大幅な上昇がみられたが判別にはまだ不十分であった。一方、再標準化法を用いると1kGy照射試料では約90%、5kGy以上照射した試料では100%判別可能であり、検出限界、分析精度等も検知法として非常に優れていることを確認した。
3. ガスクロマトグラフおよび高速液体クロマトグラフ等を用いて、グレープフルーツの精油成分、脂肪酸、アミノ酸、および香辛料のメタノール抽出成分、精油成分について、照射による変化を調べた。グレープフルーツ果汁中の脂肪酸に増加が見られたが、個体の変動に比較して十分に有意な差ではなく、また他には大きな変動や新規物質の生成は検出されず、検知法への適用は不可能であった。しかしこのことは食品成分が実用線量の $\gamma$ 線照射に対してかなり安定であることを示しており、安全性の面から評価される。
4. 照射玄米より抽出した核DNAについて、アガロースゲル電気泳動を用いて検討したところ、 $\lambda$ -DNAと同程度の分子サイズを持つDNA画分の収量が減少しており、また分子サイズも数百kbp相当から数十kbp相当に低下していることが判明した。抽出率の低下はDNA鎖とタンパク質とのクロスリンク、分子サイズの低下はDNA鎖の切断に起因すると推定された。

5. 照射玄米より抽出した核DNAについて、ガスクロマトグラフ質量分析計によりDNA塩基およびその変化体の多成分分析法を検討し、その照射影響を検討した。その結果、5-ヒドロキシシトシン、チミングリコール、8-ヒドロキシアデニンおよび8-ヒドロキシグアニンの4種類のDNA塩基変化体が検出されたが、非照射玄米から抽出したDNAと比較して有意な差はみられなかった。
6. グレープフルーツの種子から調製した子葉1枚と幼根で構成される half-embryoは、種子のまま培養した場合と比較して、発芽までの期間を飛躍的に短縮させ、また栽培種、ロット、個体等による変動を大幅に減少させることを見出した。また、half-embryoの生長に対する照射影響を検討したところ、照射線量に相関して発根の遅れ、根の伸長の抑制等が観察された。特に発芽は0.15kGy以上の照射でほぼ完全に抑制された。そこで、half-embryoの発芽の有無を指標とした照射の判別について諸条件を検討し検知法として確立した。
7. オレンジおよびレモンにおいても、グレープフルーツと同一条件のhalf-embryo testを照射検知法として適用することが可能であった。また、リンゴおよびサクランボについてもhalf-embryo testの適用を検討したところ、培養温度を各々の至適温度とし、またサクランボについてはベンジルアデニンを添加し発芽を促進することにより、照射検知法として適用可能となった。また、いずれの果実においてもγ線照射による発芽抑制の検出限界は0.15kGyであった。
8. 米や小麦においては、流通段階の形態である玄米および玄麦を用い、根の長さを指標とする発芽試験が、照射判別のスクリーニング試験として有用であることを見出した。

国際的な食品流通の活性化により、照射食品のますますの増加が予想され、照射の有無判別のための検知法の必要性が高まってきている。本研究により検討した確立された食品の照射影響や照射検知法は、現在進められている国際的な標準検知法設定に大きく寄与すると共に、我が国の食品衛生に対しても大きく貢献するものと考えられる。

## 実験の部

### 第1章 食品照射による物理的变化と検知法

#### 1. 試料

香辛料は市販品を購入しまたは製造業者より入手した。

トウガラシ	( <i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>Frutescens</i> L.)
黒コショウ	( <i>Piper nigrum</i> L., with rind)
白コショウ	( <i>Piper nigrum</i> L., without rind)
オールスパイス	( <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr)
シナモン	( <i>Cinnamomum cassia</i> Blume) ( <i>Cinnamomum zeylaricum</i> Blume)
セロリリーフ	( <i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i> DC.)
ローレル	( <i>Laurus nobilius</i> L.)
ターメリック	( <i>Curcuma longa</i> L.)
クローブ	( <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb)
ローズマリー	( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)
コリアンダー	( <i>Coriandrum sativum</i> L.)
ナツメグ	( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.)
タイム	( <i>Thimus vulgaris</i> L.)
セージ	( <i>Salvia officinalis</i> L.)
マスタード	( <i>Brassica juncea</i> Czern)
バジル	( <i>Ocimum basilicum</i> L.)
クミン	( <i>Cuminum cyminum</i> L.)
ディル	( <i>Anethum graveolens</i> L.)
マジョラム	( <i>Origanum majorana</i> L.)
スターアニス	( <i>Illicium verum</i> Hook f.)

#### 2. 試薬

ESR用マーカー：酸化マンガン(MnO)

TL用抽出溶媒：

タングステン酸ナトリウム（和光純薬工業製）飽和溶液 比重 1.6g/ml

ポリタングステン酸ナトリウム（Aldrich製）溶液 比重 2.1g/ml

### 3. 装置

電子スピン共鳴装置(ESR) : TES-FE2XG、データ処理装置 (日本電子製)

熱発光測定装置(TLD) : TLD4000型熱発光線量計システム (Harshow製)

### 4. 試料の照射

ESR用試料は、日本原子力研究所高崎原子力研究所ウェットタイプ<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 平板線源により、線量率3~10kGy/hrで10、30および50kGyの3段階の照射線量で、TL用試料は東京都立アイソトープ総合研究所 AL-TABLE型<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 線照射装置により、線量率0.33~10kGy/hrで1、5、10および30kGyの4段階の照射線量で照射を行った。

### 5. 電子スピン共鳴測定法

粉末状試料 200mgを精秤後、ESR用石英製測定管に入れパラフィルムで密閉し、以下の条件で測定した。

< ESRの測定条件 >

Temperature: 23°C

Power : 1 mW

Field : 3369 ± 50 G

Sweep time : 2 min

MOD. : 6.3 G

Amplitude : 32~1000

Response : 0.1

Sample size: 200 mg

ラジカル強度はシグナルの頂上から谷までの距離で表し、強度の補正はMnOを用いて行った。g値はMnO (g=1.981) をマーカーとして次式より求めた。

$$g_x = g_s H_0 / (H_0 - \Delta H)$$

ここで $g_x$ は測定試料のg値、 $g_s$ はマーカーの磁場値(1.981)、 $H_0$ は測定したフィールド(3369 G)、 $\Delta H$ はMnOシグナルからの磁場数(G)を表している。

### 6. 熱発光用試料の前処理法

試料に抽出溶媒を加え5分間超音波をかけた後、2500rpmで2分間遠心分離し 上層を除去し沈降物を得た。沈降物は水で2回洗浄後さらにアセトンで2回洗浄した。その後、50°Cで一晩乾燥させ測定用試料とした。

### 7. 熱発光測定法

測定用試料を1 mg精秤し、熱発光測定装置の加熱板上の試料皿にのせ、カバーガラスをかけて熱発光量(TLV : nC/mg)を測定した。

< TL測定条件 >

予備加熱温度 : 50°C

測定温度 : 50~350°C

温度上昇率 : 10°C/sec

## 第2章 食品照射による化学的变化と検知法

### 1. 試料

グレープフルーツは輸入業者より、香辛料は製造業者より入手した。

グレープフルーツ(*Citrus paradisi* Macf.) Marsh White種 米国産

トウガラシ (*Capsicum annuum* L. var. *Frutescens* L.) 中国産

黒コショウ (*Piper nigrum* L., with rind) マレーシア産

白コショウ (*Piper nigrum* L., without rind) マレーシア産

### 2. 試薬

精油成分標準品 :  $\alpha$ -ピネン、 $\beta$ -ピネン、ジペンテン、酢酸 *n*-オクチル、酢酸イソオクチル、酢酸 *n*-デシル、酢酸ゲラニル、*n*-ノニルアルデヒド、*n*-デシルアルデヒド、*n*-オクチルアルコール、*sec*-オクチルアルコール、シトロネラール、シトロネロール、リナロール、テレピネオール (以上和光純薬工業製)

脂肪酸標準品 : パルミチン酸メチル、ステアリン酸メチル、オレイン酸メチル、リノール酸メチル、リノレイン酸メチル、*n*-ヘプタデカン酸メチル (以上和光純薬工業製)

メチル化剤 : 5%塩化水素メタノール溶液 GC用(和光純薬工業製)

### 3. 装置

水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ(FID-GC) : HP5890A FID付、インテグレーター HP3392A (Hewlett Packard製)

アミノ酸分析計 : 835型 (日立製作所製)

高速液体クロマトグラフ(HPLC) : コントローラー L-5000、ポンプ655-A、紫外検出器 UV-655A、蛍光検出器 F-1000、インテグレーター D-2000 (日立製作所製)

ガスクロマトグラフ-質量分析装置(GC-MS) : HP5890 SERIES II、MS HP5971A、コンピュ

ーター VECTRA Q5/165 (Hewlett Packard製)

精油定量装置 (前田製作所製)

#### 4. 試料の照射

日本原子力研究所高崎原子力研究所ウエットタイプ  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  平板線源により、グレープフルーツは線量率0.03~0.12kGy/hで0.3、0.5、1.0および2.0kGyの4段階の照射線量、香辛料は線量率3~10kGy/hで10、30および50kGyの3段階の照射線量で $\gamma$ 線照射を行った。

#### 5. グレープフルーツ中の精油成分の分析

グレープフルーツの果皮は精製水50mlを加え氷冷しながら破碎均一化し、精製水150mlにより精油定量装置に移し、*n*-ヘキサン10mlを加え1時間加熱還流して精油成分を抽出し、FID-GCにより測定した。

<FID-GC測定条件>

カラム: ヒューズドシリカキャピラリーカラム Carbowax 20M、長さ25m、

内径0.2mm (Hewlett Packard製)

カラム温度: 50°C(4min)-4°C/min-200°C(5min)

注入口温度、検出器温度: 250°C

キャリアーガス:  $\text{N}_2$  1.2ml/min

注入量: 1 $\mu$ l

#### 6. グレープフルーツ中の脂肪酸およびアミノ酸の測定

グレープフルーツの種子ホモジネートまたは果汁にクロロホルムを加えて抽出し、クロロホルム層を脂肪画分、水層をアミノ酸画分とした。クロロホルム層は $\text{N}_2$ 気流下減圧乾固し、5%塩化水素メタノールでメチル化したのち、FID-GCにより脂肪酸を定量した。また、水層は遠心分離したのち、アミノ酸分析装置により水溶性アミノ酸を定量した。

<FID-GC測定条件>

カラム: ヒューズドシリカキャピラリーカラム DB-WAX、長さ30m、内径0.53mm

(J&W製)

カラム温度: 180°C(2min)-8°C/min-240°C(3.5min)

注入口温度: 220°C、検出器温度: 250°C

キャリアーガス: He 5ml/min、注入量: 1 $\mu$ l

#### 7. 香辛料中のメタノール抽出画分の分析

粉末状の香辛料にメタノールを加えて振とう抽出し、ろ過後HPLCにより測定した。ただしトウガラシの場合はメタノール抽出画分に精製水を加えクロロホルムに転溶後、脱水濃縮しメタノールに溶解してHPLCにより測定した。

<HPLC測定条件>

カラム: Nucleosil 100-5C<sub>18</sub>、長さ150mm、内径4.6mm

流速: 1ml/min

溶出液: I メタノール-水-酢酸(70:28:2)

II アセトニトリル-水-酢酸(20:79:1)

紫外検出器: 254~342nm

蛍光検出器: EX. 300~410nm、EM. 400~500nm

注入量: 10 $\mu$ l

#### 8. 香辛料中の精油成分の分析

粉末状の香辛料は精製水と沸騰石を加え、精油定量装置により1.5時間加熱還流して精油成分を抽出し、FID-GCにより定性、定量しGC-MSにより確認した。

<FID-GC測定条件>

カラム: ヒューズドシリカキャピラリーカラム DB-WAX、長さ30m、内径0.53mm

(J&W製)

カラム温度:

黒コショウおよび白コショウ 60°C(2min)-7°C/min-200°C(5min)

トウガラシ 60°C(2min)-20°C/min-180°C(1min)-4°C/min-228°C(15min)

注入口温度: 150°C、検出器温度: 250°C

キャリアーガス: He 8ml/min

注入量: 1 $\mu$ l

<GC-MS測定条件>

イオン化電圧: 70eV

インレット温度: 280°C

マスレンジ: 25~250

その他は<FID-GC測定条件>に同じ

### 第3章 食品照射による分子生物学的変化と検知法

#### 1. 試料

米 (*Oriza sativa* L.) 栽培種; 日本晴 国内産

#### 2. 試薬

DNA標準品: 牛胸腺デオキシリボ核酸 (SIGMA製)

DNA塩基標準品: チミン、シトシン、アデニン、グアニン (以上和光純薬工業製)

CTAB抽出用試薬:

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) (SIGMA製)

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) (同仁化学研究所製)

セチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB) (和光純薬工業製)

リボヌクレアーゼ A (RNase) (Boehringer Mannheim製)

TEバッファー; 10mM Tris-HCl、1mM EDTA

抽出用バッファー; 1% CTAB、50mM Tris-HCl、10mM EDTA、0.7M NaCl

CTAB溶液; 10% CTAB、0.7M NaCl

沈澱用バッファー; 1% CTAB、50mM Tris-HCl、1mM EDTA

High salt TEバッファー; 1M NaCl、10mM Tris-HCl、1mM EDTA

クロロホルム混液; クロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)

液体窒素

電気泳動用試薬:

アガロース (SIGMA製)

エチジウムブロマイド (SIGMA製)

ブロムフェノールブルー (関東化学製)

キシレンシアノール (ナカライテスク製)

フィコール (Pharmacia社製)

$\lambda$ -DNA標準溶液;  $\lambda$ ファージDNA溶液 (タカラ製) を1/10TEで希釈

泳動用バッファー (TAE); 2M Tris-acetate pH8.0、0.05M EDTA、用時50倍希釈

泳動用色素; 0.5% ブロムフェノールブルー、0.25% キシレンシアノール

25% フィコール

GC-MS用試薬:

内部標準; 6-アザチミン、8-アザアデニン (以上SIGMA製)

1%トリメチルクロロシラン含有ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセタミド

(BSTFA) (PIERCE製)

#### 3. 装置

サブマリン型電気泳動装置

ミニゲル電気泳動装置: Mupid-2 (アドバンス製)

凍結乾燥器: DURA-DRY (FTS SYSTEMS製)

水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC): GC HP5890A FID付

インテグレーター HP3392A (Hewlett Packard製)

ガスクロマトグラフ-質量分析装置 (GC-MS): GC HP5890 SERIES II、MS HP5971A

コンピューター VECTRA Q5/165 (Hewlett Packard製)

#### 4. 試料の照射

東京都立アイソトープ総合研究所 AL-TABLE型<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 線照射装置により、玄米は線量率1~5kGy/hで1、5、10および30kGy、DNAおよび塩基標準溶液は線量率0.11~0.33kGy/hで0.33、0.66および1.0kGyの $\gamma$ 線照射を行った。

#### 5. 玄米核DNAの抽出法 (CTAB法)

玄米は液体窒素下で粉碎後さらに磨砕し粉末とした。沸騰寸前の抽出用バッファーを加え55°C30分間振とうした。上層にCTAB溶液を加えてゆっくり混ぜ、さらに等量のクロロホルム混液を加え20分間ゆるやかに振とう後、2500rpmで25分間遠心分離した。上清に沈澱用バッファーを混ぜ一晩放置した後、2500rpmで10分間遠心分離した。沈澱物をHigh salt TEバッファーで溶解し、55°C30分間インキュベート後、2500rpmで10分間遠心分離した。上清にイソプロパノールを静かに加え一晩放置し、2500rpmで10分間遠心分離した。沈澱物を70%エタノールで2回洗浄後乾燥し、1/10TE溶液を加え55°C30分間インキュベートし溶解した。RNaseを加え37°C一晩加温し、DNA溶液とした。

#### 6. 核DNAの定量法

① UV吸収法: 希釈したDNA溶液の260nmの吸光度を測定し $\lambda$ -DNA標準溶液の検量線により定量した。また、260nm、280nmおよび320nmの吸光度を測定し、A260/A280およびA320/A260を求めて純度を確認した。

② 電気泳動法: エチジウムブロマイドを含有する1%アガロースのミニゲルのスロットに、希釈したDNA溶液と $\lambda$ -DNA標準溶液を泳動色素とともに注入し、100Vで15~25

分間泳動後、 $\lambda$ -DNA と同位置における蛍光強度を比較して定量した。

## 7. GC-MSによるDNA塩基変化体の測定

DNA標準品および抽出したDNA溶液は、凍結乾燥後ギ酸を加え150°C 30分間加水分解した。さらにBSTFA混液を加え140°C30分間反応させてトリメチルシリル化し、GC-MSのSCAN modeおよびSIM(Selected Ion Monitor) modeで測定した。

### <GC/MSの測定条件>

カラム：ヒューズドシリカキャピラリーカラム Ultra 2 (5% Phenyl methyl silicone)、長さ12.5m、内径0.2mm、膜厚0.11 $\mu$ m (Hewlett Packard製)

カラム温度：70°C(2min)-10°C/min-250°C(5min)

注入口温度：250°C

キャリアーガス：He 0.78ml/min

イオン化電圧：70eV

インレット温度：280°C

注入量：1 $\mu$ l

### <GC-MS-SIMにおける設定イオン>

SIM modeの場合は下記に従い、各時間毎に選択する質量数を変更するプログラムにより測定を行った。

Table 1. SIM time program

Retention Time(min)	Selected Ion(m/z)
4.0~ 9.6	240, 254, 256, 270, 271, 312, 326
9.6~12.5	259, 265, 280, 328, 343, 433, 448
12.5~15.0	264, 265, 279, 280, 352, 367
15.0~25.0	352, 367, 440, 455

## 第4章 食品照射による生物学的変化と検知法

### 1. 試料

グレープフルーツ(*Citrus paradisi* Macf.) Marsh White種およびRubby Red種

以上米国産

オレンジ (*Citrus sinensis* Osbeck) Valencia種

米国産

レモン (*Citrus limon* Burm. f.) 米国産

サクランボ (*Prunus avium* L.) 国内産および米国産

リンゴ (*Malus pumila* Mill. var domestica Schneid) 国内産

米 (*Oriza sativa* L.)

キララ397、コシヒカリ、ササニシキ、ツキノヒカリ

アキニシキおよび日本晴種 以上国内産

小麦 (*Triticum aestivum* L.)

Hard Red Winter(HRW)、Western White(WW)および

Northern Spring(NR)種 以上米国産

No.1 Canadian White(NolCW)種 カナダ産

Australian Standard White(ASW)およびPrime Hard(PH)種

オーストラリア産

シラサギ、ホロシリ、チホク、タフネおよび農林61号種

以上国内産

### 2. 試薬

インドール酢酸、ジベレリン酸、インドール酪酸、ベンジルアデニン (以上IGMA製)

2,4-ジニトロフェノキシ酢酸 (東京化成工業製)

$\alpha$ -ナフタレン酢酸、カイネチン、ジベレリン (和光純薬工業製)

### 3. 試料の照射

東京都立アイソトープ総合研究所AL-TABLE型<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 線照射装置により、線量率1kGy/hで柑橘類は0.05、0.15、0.3、0.5および1.0kGyの5段階、サクランボ、リンゴおよび米はさらに2.0kGyの6段階、小麦は0.15、0.3、0.5、1.0、2.0、5.0および10.0kGyで $\gamma$ 線照射を行った。

### 4. Half-embryoの調製法

柑橘類、サクランボおよびリンゴは果実を割り種子を摘出した。種子は外種皮と内種皮を剥離して胚を取り出し、子葉の一方に幼根を残すようにして他方の子葉を除去し half-embryoとした。グレープフルーツ等は多胚性のため種子1個に複数の胚が含まれているので最も大きい胚を用いた。また幼根に損傷があるものは除いた。

## 5. Half-embryoおよび種子の培養法

シャーレにろ紙を2枚重ねて敷き蒸留水（植物ホルモンを添加する場合はその指定された溶液）で浸し、half-embryoまたは種子を10粒以上おきふたをしてアルミホイルで包み、指定された温度で培養した。その後経時的に発根、発芽を観察した。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に対して御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました京都大学薬学部横山 陽教授に深甚の謝意を表します。

また、本研究の遂行に際し、御指導と御協力をいただいた国立衛生試験所食品部部長 斎藤 行生博士および前食品部第2室室長 内山 貞夫博士に心より感謝の意を表します。

さらに、本研究の機会を与えて下さり、また御助言、御鞭撻を賜りました国立衛生試験所所長 内山 充博士および食品添加物部部長 山田 隆博士に深く感謝いたします。