

乳製品のフードディフェンスを目指した ビッグデータ化モレキュラー解析の構築

井之上 浩 一

立命館大学薬学部 准教授

緒 言

加工食品（特に乳製品など）は常に安定かつ、持続的
生産および販売がなければならない。しかし、近年の
ニュースでは、加工食品の汚染や劣化による事例が後を
絶たない。現在、素材・調理などが複雑な乳製品におい
て、予期せぬ汚染や劣化の検査には、フードディフェン
ス（食品防御）の新たな概念が求められる。そのため、
従来のターゲット分析に加え、複雑な未知成分を踏まえ
た測定技術とデータ処理の構築が今後のフードディフェ
ンスでは必須と考えられる。従来までの乳製品に関する
汚染などのモニタリング対象は、ダイオキシンなどの塩
素系化合物、細菌およびマイコトキシン類であった¹⁻³。
しかしながら、2008年に生じたメラミン混入粉ミルク
では、予想不可能な食品汚染（混入事例）が世界中を震
撼させ、中国で5万人以上の乳幼児（3才以下）の被害
が生じた。現在、私たちの食生活分野では、多彩化され
た乳製品と裏腹に全く想定外の汚染などが発生するこ
とがあり、既存の技術や概念では到底解析できないレベ
ルに達している。そこで、予想不可能な乳製品の劣化や汚
染状況の情報に対して、新たなオミクス解析（ノンター
ゲット分析）を考案する⁴。本研究目的を達成するため
には、非選択的理化学分析技術を用いて、食材の膨大か
つ複雑なモレキュラーデータを取得し、詳細な解析のた
めの統計手法を統合的にシステム化することが第一段階
である。このシステムは、乳製品の種別判断、特徴別精
査などへ応用可能と判断しており、十分に利用できる。
そこで、本システムを基盤として、我々は、様々な食品
のビッグデータ取得を目指して、多彩な分離技術や前処
理の追加検討を実施する。具体的には、粉ミルクの網羅
的成分検知を目的として、非選択的検出法（核磁気共鳴
法（NMR）および液体クロマトグラフィー／質量分析
法（LC-MS））で検出された情報をデジタル化（ビッグ
データ化）・多変量統計処理による情報蓄積・解析法の
構築を試みる。つまり、従来までの試験法である対象物

質を分析（ターゲット分析）するのではなく、本研究は、
ビッグデータの統計的モレキュラーパターンにより、加
工食品・製品別の変化を未然に判断できる解析法を検討
する。

実験方法

1. NMRによる基礎的な検討

粉ミルク試料を電子天秤にて1.0 g量りとり、本試料
をプラスチック製チューブに移して、メスピペットで精
製水10 mLを取り、それに加えたものを標準試料とし
た。

調製した試料をさらに、前処理として遠心分離
（14,000 g, 10 min, 4℃）、限外ろ過（14,000 g, 10 min,
4℃）、前処理なしの3つの条件で処理をしたものを試料
としてNMRで測定しスペクトルの確認を行った。

未知汚染物質（メタミドホス）混入試料の調製は、同
様試料を電子天秤にて0.1 g量りとり、本試料をプラス
チック製チューブに移して、メスピペットで精製水
1 mLを取り、それに加えたものを標準試料とした。そ
の後、1,000 ppmの農薬をプラスチック製のチューブに
それぞれ10 μ L、100 μ L取り遠心エバポレーターで乾固
し、そこに、それぞれ、試料を電子天秤にて0.1 g量り
とり、メスピペットで精製水1 mLを取り、それに加
えたものを10 ppm農薬混入試料、100 ppm農薬混入試料
とした。また、20,000 ppmの農薬をそれぞれ50 μ L、
100 μ L取り遠心エバポレーターで乾固し、そこに、そ
れぞれ、試料を電子天秤にて0.1 g量りとり、メスピ
ペットで精製水1 mLを取り、それに加えたものを
1,000 ppm農薬混入試料、2,000 ppm農薬混入試料とし
た。本研究では、有機リン系殺虫剤のメタミドホスを用
いた。以上の試料を遠心分離（14,000 g, 10 min, 4℃）に
て処理した。得られた上澄み溶液を測定サンプルとし
た。上澄み液540 μ Lと重水素60 μ Lを混和し、NMR管
に移しNMRにて測定を行った。

未知劣化試験の評価については、試料を電子天秤にて1.0 g量りとり、本試料をプラスチック製チューブに移して、メスピペットで精製水10 mLを取り、それに加えたものを標準試料とした。対象試料を電子天秤にて1.0 g量りとり、本試料を密封の可能なプラスチック製チューブに移して、メスピペットで精製水10 mLを取り、それに加えたものを、それぞれ冷凍(-80℃)、冷蔵(10℃)、インキュベート(38℃)の各条件で1日間保存した。測定直前に新たに標準試料を調製し、計4試料を遠心分離(14,000 g, 10 min, 4℃)にて処理した。得られた上澄み液540 μ Lと重水素60 μ Lを混和し、NMR管に移しNMRにて測定を行った。

NMRの測定条件は表1に示す。

2. LC-MSによる基礎的な検討

各粉ミルクを電子天秤にて1.0 g量り、本試料をプラ

表1 NMRの測定条件

NMR	Bruker社製 AVANCE III HD
NMR解析ソフト	Top Spin (Bruker BioSpin社)
多変量解析ソフト	Amix (Bruker BioSpin社)
Temperature	300 K
Pulse program	noesygppr1d
Time domain size	65536
Pulse angle	90°
Acquisition time	3.98 s
Relaxation delay	4.00 s
Frequency of ch.1	4.70 ppm
Receiver gain	203
Dummy scan	4
Scan	256
Spinning	0 Hz

スチック製チューブに移して、メスピペットで精製水10 mLを取り、それに加えた。その後、本試液を限外ろ過(14,000 g, 10 min, 4℃)にて処理した。得られた採取液200 μ Lとアセトニトリル200 μ Lを混和し、フィルターろ過を行い、測定試料とした。

また、未知汚染試料調製については、NMR同様の操作を実施した。LC-MSの測定条件は表2に示す。

結 果

1. NMRによる前処理などの基礎的な検討

本実験は、NMR測定を用いて最適な迅速かつ簡便な前処理条件の検討を行った。粉ミルク1.0 gに精製水1 mLを加えた試料に対して、前処理をしないもの、遠心分離(14,000 g, 10 min, 4℃)にて処理したもの、限外ろ過(14,000 g, 10 min, 4℃)にて処理したものの3条件でのサンプルをNMRで測定を行い、得られたスペクトルで比較検討を行った。図1に得られた各スペクトルを示した。[1]が前処理をしないもの、[2]が遠心分離にて処理したもの、[3]が限外ろ過にて処理したもののスペクトルを示している。前処理なしで測定したサンプルに比較して、遠心分離、限外ろ過したサンプルは強度や形状が良いスペクトルが得られた。また、遠心分離と限外ろ過の処理したサンプルのスペクトルに大差がみられないことから、本実験では、より簡便な前処理操作として、遠心分離による粉ミルクサンプルの前処理を採用することとした。

次に、粉ミルクに未知物質(農薬)が人為的に添加された場合、NMR測定により評価できるかの基礎的な検

表2 LC-MS測定条件

UPLC	: Waters ACQUITY™ Ultra Performance LC
TOF-MS	: Waters LCT Premier™ XE
解析ソフト	: MarkerLynx XS, SIMCA
Column	TSKgel ODS-100Z (2.0×150 mm, 3 μ m) (東ソー株式会社) 逆相系カラム TSKgel Amide-80 (2.0×150 mm, 2 μ m) (東ソー株式会社) HILICモード
Column Temperature	: 40℃
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Mobile Phase	: A: 0.1% ギ酸水溶液、B: 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
Injection volume	: 10 μ L
Gradient	TSKgel ODS-100Z: B=2-2-98-98-2-2% (0-5-30-40-40.1-50 min) TSKgel Amide-80: B=95-95-10-10-95-95% (0-5-30-40-40.1-50 min)
Ion mode	: Electrospray positive (W mode)
Capillary voltage	: 10 V
Desolvation temperature	: 350℃
Source temperature	: 120℃
Cone gas flow	: 50 L/h
Desolvation gas flow	: 650 L/h
MS Range	: m/z 100-1000

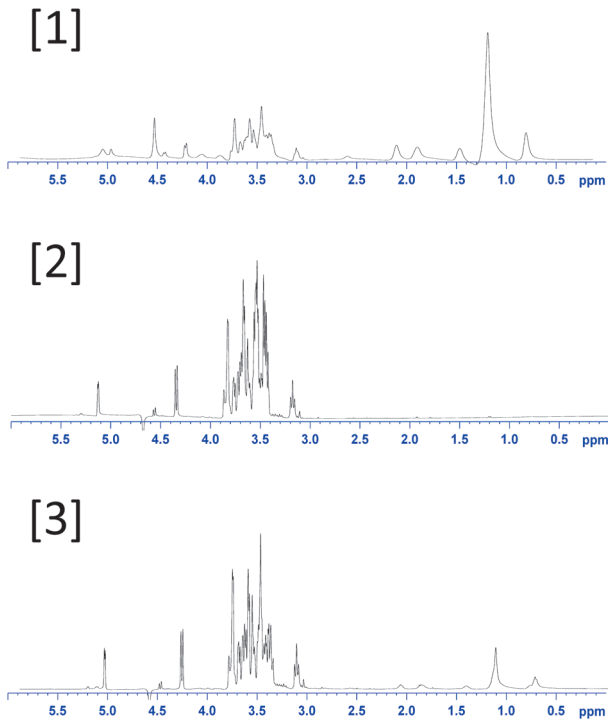


図1 NMR測定による粉ミルクの前処理検討 (1H-NMRスペクトル)

[1] 前処理なし [2] 遠心分離法 [3] 限外ろ過膜法

討を実施した。添加した農薬はメタミドホスである。添加濃度は10 ppm, 100 ppm, 2,000 ppmで評価を行った。各サンプル調製、前処理を行い、NMR測定で得られた結果を多変量解析 (PCA) で評価した。PCAでの結果を図2に示した。それぞれ、黒のプロットが農薬の添加されていない粉ミルク、青のプロットが10 ppmになるように添加した粉ミルク、緑のプロットが100 ppmになるように添加した粉ミルク、赤のプロットが2,000 ppmになるように添加した粉ミルクを示している。

PCAの結果、100 ppm以下の農薬濃度では濃度依存的な変化をみることができなかった。2,000 ppm程度の濃度 (測定時サンプルに絶対値で1 mg程度) の混入があれば第一主成分において明らかな識別が可能であった。

次に、粉ミルクを劣化させることによる含有成分変化が本手法で評価できるか検討を行った。NMRにて、粉ミルク試料 (標準試料、各条件下の冷凍 (-80°C)、冷蔵 (10°C)、インキュベート (38°C) で1日間保存した試料の計4試料) を分析したデータにおいて、PCAを行った。PCAの結果を図3に示した。赤のプロットがコントロールの標準試料、緑のプロットが冷凍 (-80°C) 条件下で保存したサンプル、黒のプロットが冷蔵

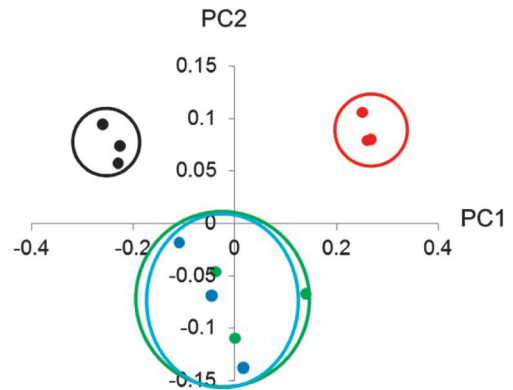


図2 NMRによるPCAプロット (粉ミルク中未知物質 (メタミドホス) の汚染評価)

● Blank ● 100 ppm 混入サンプル
● 10 ppm 混入サンプル ● 2,000 ppm 混入サンプル

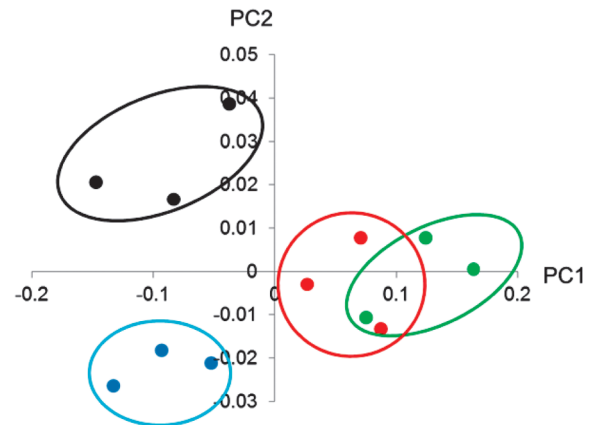


図3 NMRによるPCAプロット (粉ミルクの劣化評価)

● 標準サンプル ● 10°C 保存サンプル
● -80°C 保存サンプル ● 38°C 保存サンプル

(10°C) 条件下で保存したサンプル、青のプロットがインキュベート (38°C) 条件下で保存したサンプルを示している。この結果から、各条件下で保存したサンプルごとに分けることができ、中でも特に温度をかけて保存したサンプルはPC1において分かれ、識別することが可能であった。

2. LC-MSによる未知物質混入および劣化評価への応用

粉ミルクは多くの成分 (添加物、乳成分、脂質など) を含有しており、その成分分離分析を行うため、逆相系カラムおよびHILICモードを検討した。本実験は移動相に0.1%ギ酸水溶液および0.1%ギ酸アセトニトリル溶液を用い、検出にはエレクトロスプレーイオン化ポジティブ (ESI-ポジティブ) モードを利用した。ESI-ポジ

表3 LC-MSによって検出されたピーク検出数

	N	HILIC (amide 80)			ODS (ODS-100Z)			合計
		検出数	平均	SD	検出数	平均	SD	平均検出数
Sample 1	1	1333			1140			
	2	1399			1139			
	3	1397	1333.8	90.5	1146	1144.5	6.5	2478.3
	4	1206			1153			
Sample 2	1	1398			598			
	2	1496			584			
	3	1390	1371.0	123.8	569	581.5	12.6	1952.5
	4	1200			575			
Sample 3	1	1153			1104			
	2	1247			1112			
	3	1140	1142.8	88.4	1131	1116.8	11.5	2259.6
	4	1031			1120			

タイプモード (m/z 100-1000) で測定を行い、保持時間として0.5分から40分で検出化合物数を得た。表3に検出化合物数を示した。逆相系カラムで約1,040化合物、HILICモードで約1,300化合物が検出された。そして、両モードでの測定を合算させることで、約2,230化合物を得ることができた。よって、本手法にはより多くの成分を検出するために、逆相モードとHILICモードを合算させる手法を採用することとした。

次に、粉ミルクに未知物質（メラミン）が人為的に添加された場合、本手法が有用であるか検討を行った。LC-MSにて、2種の粉ミルク試料（標準試料、100 ppmメラミン混入試料）計4サンプルをHILICモード（TSKgel Amide-80）、逆相系カラム（TSKgel ODS-100Z）の両分離モードで分析した。それぞれのメラミン混入試料において未知物質として混入したメラミンのピーク (m/z 127.03) を抽出し、HILICモード（TSKgel Amide-80）、逆相系カラム（TSKgel ODS-100Z）の両分離モードで未知物質と設定した汚染の原因であるメラミンを検出することができた。測定し得られたデータにおいて、統計的な解析であるPCAを行った（図4）。赤色および緑のプロットがそれぞれの標準試料として、青および黄色が未知汚染物質（メラミン混入）である。PCAにおいて粉ミルクの種類別だけでなく基準試料と汚染試料が明らかに判別可能であった。

次に、粉ミルクに未知物質（農薬類）が人為的に添加された場合、本手法が有用であるか検討を行った。添加した農薬はエトフェンプロックス、アセタミプリド、メタミドホス、マラチオンの4種である。LC-MSにて、粉ミルク試料（標準試料、10 ppm農薬混入試料）をHILICモード（TSKgel Amide-80）、逆相系カラム（TSKgel

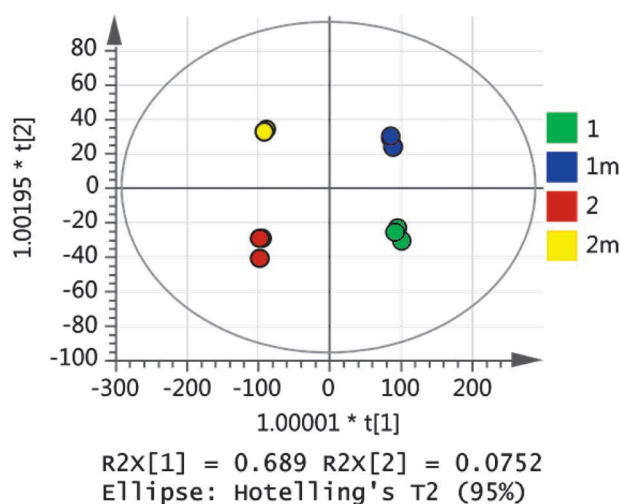


図4 LC-MSによるPCAプロット（粉ミルクの未知汚染（メラミン）の評価）

- Sample 1 標準サンプル
- Sample 1 100 ppmメラミン混入サンプル
- Sample 2 標準サンプル
- Sample 2 100 ppmメラミン混入サンプル

ODS-100Z) の両分離モードで分析した。それぞれの未知物質（農薬）混入試料において未知物質として混入した各農薬のピークを抽出し検出を確認した。分析したデータにおいて、統計的な解析であるPCAを行った（図5）。青色のプロットが標準試料、赤色のプロットがエトフェンプロックス、水色のプロットがメタミドホス、緑色のプロットがアセタミプリド、黄色色のプロットがマラチオンの混入試料として示している。PCAにおいて基準試料と各農薬の汚染試料が明らかに判別可能であった。

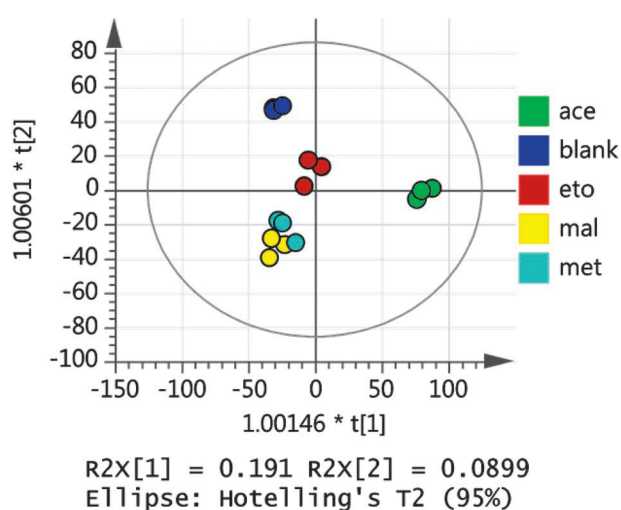


図5 LC-MSによるPCAプロット (粉ミルクの未知汚染 (農薬類) の評価)

- 標準サンプル
- 10 ppm アセタミプリド混入サンプル
- 10 ppm エトフェンプロックス混入サンプル
- 10 ppm マラチオン混入サンプル
- 10 ppm メタミドホス混入サンプル

考 察

まず初めに、NMR測定による粉ミルクの質的評価および前処理の基礎的検討を実施した。NMRの測定では、前処理に粉ミルク試料を溶解し、遠心分離するだけでその上澄みをサンプルとして測定が可能であった。よって、本実験ではNMR測定の前処理に遠心分離の操作を採用することとした。未知物質混入試験では、農薬を添加し、NMR測定後、PCAにより評価を行った。その結果、100 ppm以下の低濃度の添加では濃度依存的な変化を確認することができなかった。2,000 ppm以上(測定試料中に絶対量で1 mg程度)の混入があればPCAにおいて明らかな識別を行うことが可能であった。劣化試験では、水に溶解させた粉ミルクをインキュベーター(38℃)、冷蔵(10℃)、冷凍(-80℃)の条件下で1日保存し、コントロールと比較し評価を行った。その結果、各条件下で保存したサンプルごとに分けることができ、中でも特に温度をかけて保存したサンプルはPC1において分かれ、識別することが可能であった。劣化による粉ミルク製品中の成分の変化をPCAにおいて評価することが可能であったと考えられる。本実験によりNMR測定による評価は、簡便な前処理による測定が可能であり、すべての含有成分を分析対象とできるた

め、網羅的な解析が可能であった。しかし、微量にしか混入せずにサンプル中の成分比に大きな変化がみられない場合にはそれらを検出、PCAによる識別を行うことは困難であったが、高濃度の異物混入や成分比の大きな変化がみられる場合にはそれらを検出しPCAによる識別を行うことが可能であった。

LC-MSでは、さらなる感度評価ができるため、2種類の分離手法を採用して様々な未知汚染物質へ応用を試みた。未知物質の汚染評価試験では、未知物質としてメラミン、農薬、重金属が混入された場合を想定して評価を行った。未知物質の汚染評価試験では未知物質としてメラミンや農薬を粉ミルク中に混入した場合、混入した化合物をLC-MSで測定し検出されることで、他の試料と異なるピークが得られ、PCAにおいて判別が可能であった。

要 約

本研究では、乳製品のフードディフェンスを目指したビッグデータ化モレキュラー解析の構築を目指した。乳製品には、代表的な粉ミルクを採用し、理化学的分析技術には、NMRおよびLC-MSを用いた。本実験から、NMRでは感度面に問題があり、消費者への危害が懸念される食品汚染レベルを直接的に評価することは難しいと考えられた。一方で、LC-MSでは、数ppmレベルにおいても検出することが可能であり、問題と考えていた極性に関する測定範囲も2つの分離モードを利用することで達成できた。そのため、メラミンや農薬類のように外部から意図的に混入される恐れを未然に検知できた。今後は、さらに重金属や微生物などの想定外の汚染評価へ応用することを検討する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) R. Malisch, et al.: *Sci. Total Environ.*, **492**, 2-10, 2014.
- 2) J. N. Selvaraj, et al.: *Food Addit. Contam. Part A*, **32**, 440-452, 2015.
- 3) R. M. Kent, et al.: *Nutrients*, **7**, 1217-1244, 2015.
- 4) K. Inoue, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 1228-1234, 2013.