

鳥取県産農水産物のブランド化を支援する 化学分析データ解析手法の高度化

環境学部環境学科 山本 敦史

1. はじめに

1.1 食品の表示を巡る状況

昨今の健康食品ブームによって、非常に多くの健康食品が市場に溢れている。一部の製品は科学的根拠を示さず、著名人が製品を用いたことによる感想のみを広告として用いるものもある。製品の有効性はその広告において強調表示されることが多く、一般消費者に無条件、無制約に当てはまるものと受け取られることがある。消費者庁は食品等の表示の信頼性を確保する観点から定期的に食品表示に係る取締りを強化しており、2019年度の取締りでは栄養成分等保健事項の表示違反が前年度から34件増の49件見つかった。2015年に食品表示法が施行され、また同年、機能性表示食品制度が始まっている。機能性表示食品は国が審査する特定保健用食品とは異なり、事業者の責任において科学的根拠に基づき機能性を表示したものである。機能性の評価は最終製品を用いた臨床試験を行うか、機能性に関与する成分に関する文献調査によって行われる。文献調査による方法は比較的事業者の負担の少ない方法であるが、それでも機能性に関与する成分の分析を行う必要がある。図1に示すように制度開始から登録件数は増加し、2020年4月時点で2500件以上の食品が登録されている。機能性表示食品制度は食品業界にとって食品のPR手段として受け入れられたといえる。機能性表示食品に関して、届出時に消費者庁は有効性の検証を行わない一方で、届出で有効性の科学的根拠とされる内容に疑義が生じた場合は事業者の確認作業や改善を求めるとしており、結果として登録の撤回に繋がるケースも増え、2019年度は89件が撤回されている。健康食品等の有効性に対して、十分な根拠を示すことが今まで以上に求められていると言える。

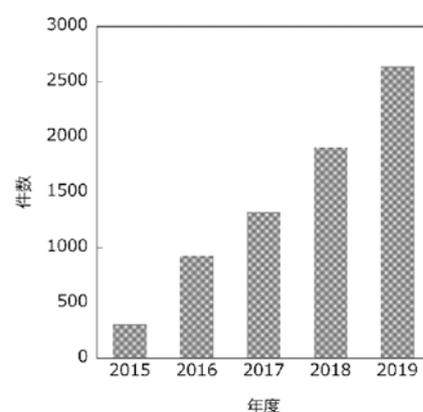


図1. 機能性表示食品の登録件数から取り下げ件数を除いた正味の累積登録数

1.2 連携支援計画

2015年10月にまとめられた「鳥取県元気づくり総合戦略」では、高品質な農産物を高付加価値化し農林水産業を活性化していくことが謳われている。担い手不足などの課題を抱える農業分野であるが、鳥取県の主要な産業の一つである。鳥取県内では近年新規就農者数が増加傾向にある他、果樹・野菜など新品种の開発など将来につながる動きもある。地域の特性を活用した事業を支援するための国の取り組みに2017年に制定された地域未来投資促進法がある。地域未来投資促進法は、地域の特性を活用した事業を支援するために地域が策定した連携支援計画を国が承認する形となっている。二十世紀

梨やラッキョウが鳥取の農産物として有名であるが、他にも白ネギや日本きのこセンターが開発した「鳥取茸王」等多くの食材が県内に存在している。事業者からは、製品のブランド化・高付加価値化のために、食味や機能性成分の見える化に対する要望がある一方で、それらを実現するための化学分析の環境やデータに基づくマーケティング戦略などの支援体制は十分ではない。そのため、環境大学を中心とした8機関が事業支援を行う連携支援計画を策定し、2019年12月に承認を得ることができた。計画での支援件数は2020年度2件、2021年度3件としており、策定に際して様々な事業者に聞き取りを行い連携に前向きな姿勢であった事業者と実績作りを行う。

1.3 化学分析による農産物含有成分の見える化

食品には、栄養面でのはたらきである一次機能としての糖類・タンパク質・脂質・ミネラル・ビタミンからなる主要成分、色素・食味・香りといった嗜好面のはたらきを持つ二次機能の成分の他にも非常に多くの成分が含まれる。生活習慣病などの疾患の発症リスクを低減するといったはたらきは三次機能と呼ばれ近年注目を集めている。しかしながら、含まれる成分が膨大であるために、その全てを知ることは極めて困難である。すべての成分が分析することができる技術は存在しないが、非常に多くの成分を同時に分析できる手法は質量分析法等有力とされるものがあり、生命科学系の分野ではタンパク質や低分子代謝物を包括的に評価するプロテオミクスやメタボロミクスといった手法が確立されつつある。疾患の診断や医薬品の開発にも活用されることが期待されており、データ解析等関連する分野の進歩も著しい。質量分析は文字の通り、含まれる成分の質量を測定する技術であり、他の技術に対して、同時に多くの成分が含まれていてもそれぞれの成分の質量を測定できることが特長である。また、測定できる質量の精密さも大きく進化しており、測定できた成分が何であるか事前に分かっていたなくても質量の情報からそれが何であるかを明らかにできることも多い。しかしながら、測定できる質量が精密であればあるほど、データの容量が増大し、一回の測定でデータのファイルサイズが数百MBになることも頻繁にある。このため、人の力でデータを読むことには限界があり、データ解析の効率化・高度化は非常に大きな課題である。本研究課題ではプロテオミクス・メタボロミクスの分野で開発されているソフトウェアも活用し、食品成分から得られたデータを解析し機能性成分の探索や他の製品との差別化に活用できる手法の確立を目指す。

2. 実験

2.1 分析機器と測定条件

分析機器にはサイエックス社の液体クロマトグラフExionLCADと質量分析計X500Rを用いた。液体クロマトグラフィーのカラムは化学物質評価機構のL-Column2 ODSおよび、昭和電工のHILICpak VG-50 2Dを用いた。L-Column2は疎水性の高い成分の分析に、VG-50は親水性の高い成分の分析に用いた。質量分析計のイオン化はエレクトロスプレーイオン化を用い、正イオンモード、負イオンモードそれぞれで測定した。X500Rは二ヶ所の質量分離部をもつタンデム質量分析計であり、前段の質量分離部で成分の質量を測定した後、質量分析計内で窒素ガスと衝突させることにより、分子を断片化することができる。断片の質量を後段の質量分離部で測定することができる。分子は原子が結合する

ことでできているが、その結合の強さは同じではなく、弱いもの強いものが必ず存在する。衝突により、弱い結合が切断することから、分子内のどこに弱い結合があるかがわかる。分子を構成する原子の質量は炭素を除いて整数ではないために、端数を持つ。これを精密な質量で解析すると、それぞれの断片にどの原子がいくつ含まれているかを導くことができ、分子式を決定できた断片を組み合わせることで元の分子の構造を推定することができる。

2.2 食品試料

食品試料は、県内産を含む赤ワイン、大豆製品、エリンギも用いた。赤ワインの産地等について表1に示す。ワインを水、あるいは90%アセトニトリル水溶液で希釈して0.2 μ mのディスポーザルメンブレンフィルターでろ過したものを分析した。エリンギはみじん切りにして1g量り取り、味噌は1gとり試験管に入れ10mLのメタノールあるいは水で超音波抽出を20分行った。黒豆茶は80-85 $^{\circ}$ Cに加熱したお湯で3分間抽出した。抽出後の試料をメタノールあるいは水、90%アセトニトリル水溶液で100, 1000, 10000倍に希釈したものを作成し、0.2 μ mのディスポーザルメンブレンフィルターでろ過したものを分析した。

表 1. 測定した赤ワイン

番号	ブドウ品種	生産年	原産国・地域
Wine 1	カベルネ・ソーヴィンヨン	2014	フランス
Wine 2	カベルネ・ソーヴィンヨン	2018	アルゼンチン
Wine 3	カベルネ・ソーヴィンヨン	2018	チリ
Wine 4	カベルネ・ソーヴィンヨン	2017	カリフォルニア
Wine 5	カベルネ・ソーヴィンヨン	2015	鳥取
Wine 6	カベルネ・ソーヴィンヨン	2017	スペイン
Wine 7	カベルネ・ソーヴィンヨン	2014	フランス
Wine 8	カベルネ・ソーヴィンヨン	2018	チリ
Wine 9	ピノノワール	2017	ドイツ
Wine 10	ピノノワール	2013	ニュージーランド
Wine 11	ピノノワール	2016	チリ
Wine 12	ピノノワール	2016	カリフォルニア
Wine 13	ピノノワール	2018	フランス
Wine 14	メルロ	2017	イタリア
Wine 15	カベルネ・ソーヴィンヨン	2017	イタリア
Wine 16	メルロ、カベルネ・ソーヴィンヨン	2015	フランス
Wine 17	メルロ	2017	島根
Wine 18	カベルネ・ソーヴィンヨン	2017	フランス
Wine 19	メルロ、カベルネ・ソーヴィンヨン	2012	フランス
Wine 20	メルロ	2012	フランス
Wine 21	コルヴィーナ他	2011	イタリア
Wine 22	マルヴァジア・ビアンカ他	2008	イタリア

2.3 データ解析ソフトウェア

得られたデータはサイエックス社のソフトウェアSCIEX OSおよび、理化学研究所研究グループが公開しているソフトウェアであるMS-DIAL [1]を用いて解析した。MS-DIALでデータを読み込むためにデータファイルをMSConvertを用いてmzml形式に変換した。

3. 結果と考察

3.1 大豆製品の分析結果

図1に正イオンモードで得られた疎水性成分の分析結果を示す。明るい白色で示されている部分が、成分の検出されたところを表しており、それぞれに精密な質量が測定されている。溶媒だけを測定し

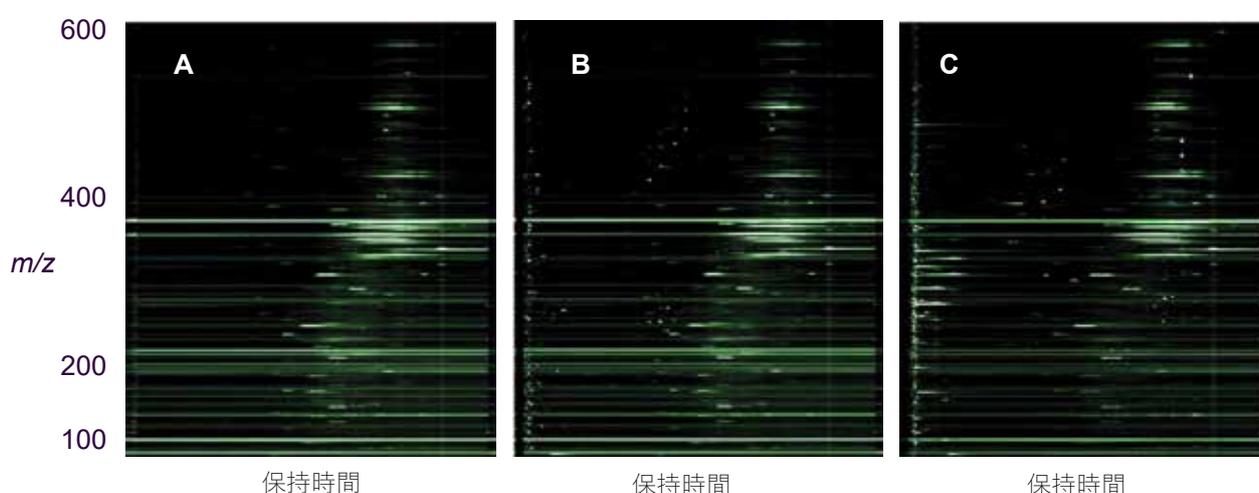


図1. 正イオンモードで測定した試料の分析結果 (A: 溶媒のみ, B: 黒豆茶, C: 味噌)

たデータと比較することにより、大豆製品由来の成分を見分けることができる。試料Aについて最も高い強度で検出されていたのは m/z 255.0649の成分であった。 m/z は質量に相当する値であり実査には質量分析計は m/z を測定している。正イオンモードでシグナル強度が強かったものを順にP1, P2, P3のようにラベル付けた。それぞれの断片の質量についても表2に示す。P1について、その断片の質量から構造を解析すると図2のように考えること

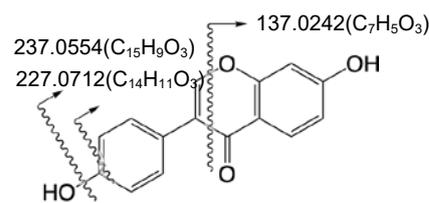


図2. 断片の精密質量を用いた構造の解析

ができる。この分子はダイゼインであり、大豆イソフラボンの主要な成分である。同様に解析して含まれると推定される構造についても表2に示した。ダイゼイン、ゲニステイン等の遊離イソフラボンの他、配糖体であるダイジン、ゲニスチンも多く見られていた。また、大豆に含まれるサポニンであるソヤサポニンIが多く検出されていた。他にも、僅かではあるがソヤサポニンII、ソヤサポニンIIIも見られた。ソヤサポニンは血圧上昇因子の阻害活性が知られている[3]。多くの成分は黒豆茶、味噌ともに共通の成分が検出されていたが、味噌ではオリゴ糖、脂肪酸、アミノ酸誘導体も多く見えていた。大豆由来のイソフラボンは現時点の機能性表示食品にも60件以上登録のある良く知られた機能成分でもある。一方、サポニンは登録件数3件と機能性表示としての活用はまだされていない状態である。

表2.精密質量の解析から推定した含有成分の構造

番号	質量	断片の質量	推定される成分名	構造式
P1	255.0649	65.0389, 91.0550, 137.0242, 181.0659, 199.0759, 227.0712, 237.0554	ダイゼイン	
P2	417.1192	137.0251, 199.0760, 227.0714, 255.0660	ダイジン	
P3	459.1284	137.0251, 199.0760, 227.0714, 255.0660	アセチルダイジン	
P4	271.0599	65.0389, 91.0550, 149.0235, 153.0189, 197.0613, 243.0685, 253.0515	ゲニステイン	
P5	943.5264	423.3622, 441.3724, 599.3933, 797.4670	ソヤサポニン I	
P6	433.1129	153.0192, 215.0710, 243.0673, 271.0619	ゲニスチン	
P7	475.1236	153.0192, 215.0710, 243.0673, 271.0619	アセチルゲニスチン	
P8	330.0599	69.0341, 97.0294, 98.9852, 119.0358, 136.0624	環状-AMP	

3.2 エリンギの分析結果

エリンギは3社で生産されたものについて分析した。図3に正イオンモードで得られた親水性成分の分析結果を示す。二糖類やグリセロリン酸コリンなどA, B, Cに多くの共通の成分が含まれていた一方で、図中白い円で記した中の成分についてA社のエリンギのみで検出されていた。この成分についての精密質量を解析すると、これはベタインと考えられた。A社の製品にはベタインが多く含まれていることが示唆された。栽培条件がAとB, Cのものでは異なっており、栽培条件が含まれる成分に影響していることが考えられた。ベタインはてん菜の学名*Betavulgaris*に由来するアミノ酸の一種で、てん菜の他、ハウレンソウやキノコ類に含まれることが知られている。ベタインには動脈硬化の危険因子として知られるホモシステインを低減する作用や非アルコール性肝炎における肝臓の脂肪変性を減少させる効果等が報告されている[4] [5]。

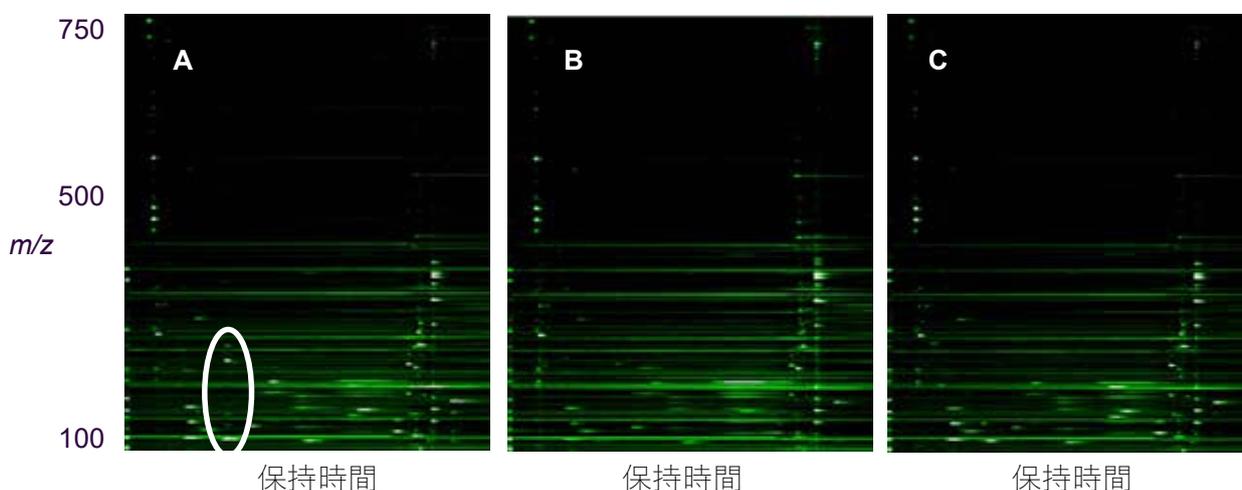
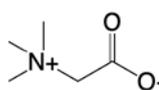
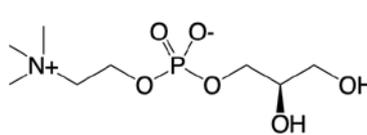
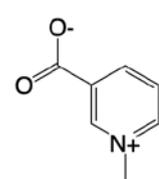
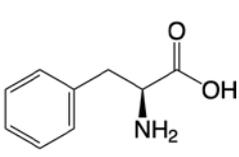
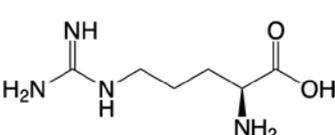
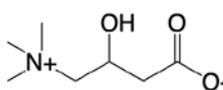


図3. 正イオンモードで測定した試料の分析結果 (A社, B社, C社)

表3.精密質量の解析から推定した含有成分の構造

番号	質量	断片の質量	推定される成分名	構造式
P1	360.1491	85.0281, 97.0288, 109.0290, 127.0391, 145.0494, 163.0604	二糖類	
P2	118.0863	58.0648	ベタイン	
P3	258.1098	60.0813, 86.0974, 98.9847, 104.1075, 125.0002	グリセロリン酸コリン	
P4	225.123	84.0815, 96.0452	???	
P5	138.0547	65.0394, 78.0346, 92.0502, 94.0660	トリゴネリン	
P6	166.0861	77.0393, 79.0548, 91.0548, 93.0706, 103.0550, 120.0814	フェニルアラニン	
P7	175.1186	60.0562, 70.0660	アルギニン	
P8	162.1121	43.0182, 60.0816, 85.0292, 102.0921, 103.0394	カルニチン	

3.3 ワインの分析結果

液体クロマトグラフ質量分析計の測定では一度で数千の成分を検出できるが、試料数が増えた場合、膨大なデータを用いて試料間の比較をすることは容易ではない。MS-Dialを用いると検出された成分について各試料間での差異を図4に示すように明確に視覚化することができる。

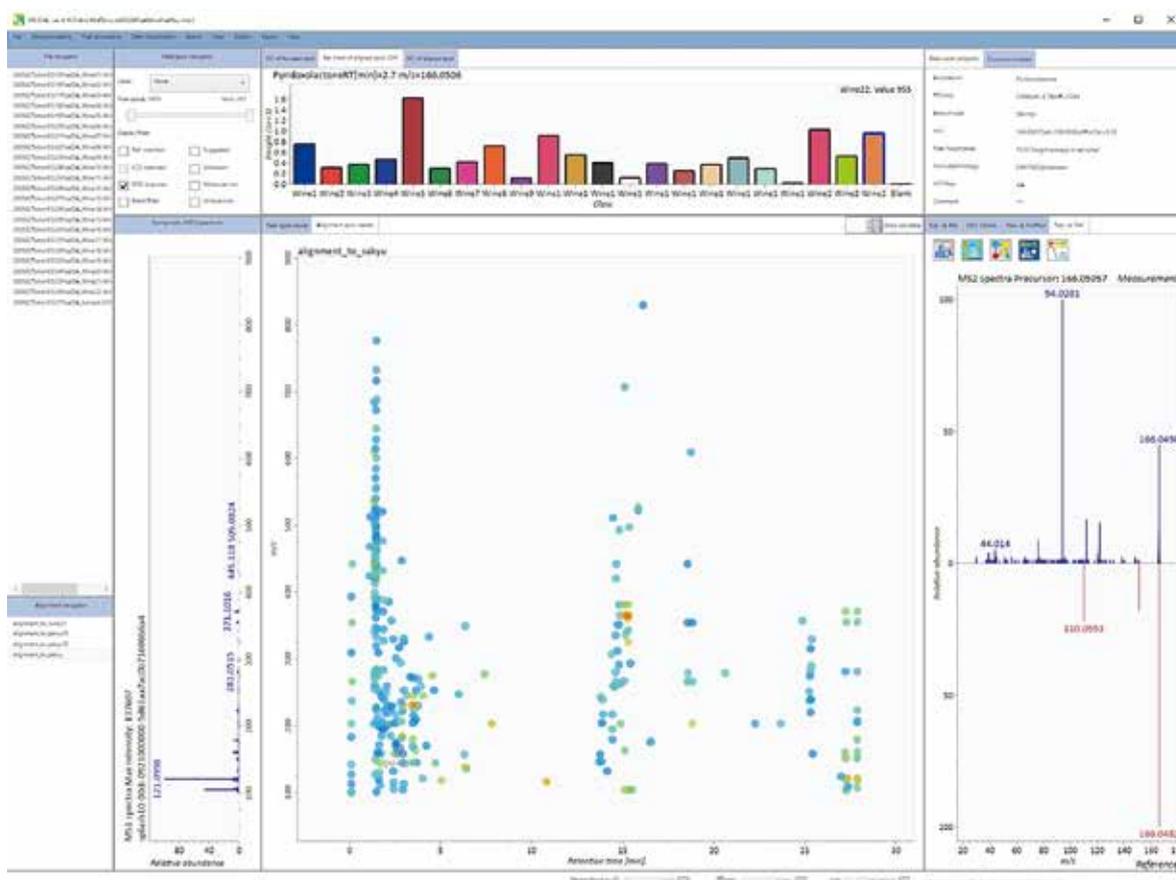


図 4. 検出された成分の試料間での比較画面

また、各成分のシグナル強度を用いて主成分分析等の統計解析を行い、試料の違いを視覚化することも可能である。しかしながら、各試料の測定ごとの誤差の許容範囲や、成分の検出精度にばらつきがあり、解析手法にはさらなる最適化が必要と考えられた。

参考文献

- [1] H. Tsugawa, T. Cajka, T. Kind, Y. Ma, B. Higgins, K. Ikeda, M. Kanazawa, J. VanderGheynst, O. Fiehn, and M. Arita, *Nat. Methods*, 12, 523 (2015).
- [2] R. Adusumilli and P. Mallick, “Proteomics – Methods and Protocols” ed. by L. Comai, J. E. Katz and P. Mallick, Springer Verlag, Berlin (2017), Chap. 23, p.339.
- [3] 高橋砂織：日本醸造協会誌、110：636-648 (2015).
- [4] M. A. Pajares and D. Pérez-Sala, *Cell. Mol. Life Sci.*, 63, 2792 (2006).
- [5] B. A. Neuschwander-Tetri, *Am. J. Gastroenterol.*, 96, 2534 (2001).