

[Note]

照射マンゴーに誘起されるラジカルの緩和現象

菊地正博¹⁾, 小川英之²⁾, 森下憲雄¹⁾, 鶴飼光子³⁾, 小林泰彦¹⁾, 下山雄平²⁾

¹⁾ 独立行政法人日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門 (〒 370-1292 群馬県高崎市綿貫町 1233)

²⁾ 室蘭工業大学大学院工学研究科 (〒 050-8585 北海道室蘭市水元町 27-1)

³⁾ 北海道教育大学大学院教育研究科 (〒 040-8567 北海道函館市八幡町 1-2)

The relaxation phenomena of radicals induced in irradiated fresh mangoes

Kikuchi Masahiro¹⁾, Ogawa Hideyuki²⁾, Morishita Norio¹⁾, Ukai Mitsuko³⁾,
Kobayashi Yasuhiko¹⁾ and Shimoyama Yuhei²⁾

¹⁾ *Japan Atomic Energy Agency, 1233 Watanuki-machi, Takasaki, Gunma 370-1292 Japan*

²⁾ *Muroran Institute of Technology, 27-1 Mizumoto-cho, Muroran, Hokkaido 050-8585 Japan*

³⁾ *Hokkaido University of Education, 1-2 Hachiman-cho, Hakodate, Hokkaido 040-8567 Japan*

Summary

Using the γ -irradiated fresh mangoes followed by freeze-drying and powderization, electron spin resonance spectrometry of specimens was performed. As a result, a strong single peak in the flesh, the pericarp and the seed was observed at $g=2.004$ and attributed to organic free radicals. When relaxation times of the peak was calculated using the method of Lund et al., T_2 showed dose responses according to increasing doses while T_1 was almost constant. Dose responsibility of the relaxation time T_2 obtained from flesh specimens of the mangoes could be measured regardless of the preservation period of 1 to 9 days following γ -irradiation. Therefore, there might be possible to detect the irradiation treatment of fresh mangoes using relaxation time T_2 .

Key words: fresh mango, ESR method, gamma ray irradiation, relaxation time, dose response

はじめに

熱帯果実であるマンゴーにはミバエ類が寄生するため多くの国で輸入の際には厳重な植物検疫が実施される。日本ではマンゴーの検疫処理として蒸熱処理または温湯浸漬処理が用いられているが¹⁾, 完熟した生鮮果実を加熱すると熱によるダメージが懸念される。アメリカでは, 2007年よりマンゴーの検疫処理のための放射線照射が許可されており, 400 Gy以上の線量で処理されている²⁾。アメリカ以外にも,

インド, タイなどでも放射線照射による植物検疫が許可されている³⁾。現在, 日本では放射線照射による検疫処理は許可されていないが, 非加熱処理である照射処理が生鮮果実には適している事を考えると将来的に導入される可能性がある。

照射食品においては, 適切な流通過程を担保するとともに消費者の自由な選択を保障するためには照射履歴判別法(検知法)が必要である。EU標準分析法やCodex標準分析法として認められた検知法として電子スピン共鳴法(ESR法)がある⁴⁾⁻⁶⁾。こ

の方法は、照射で誘起されたフリーラジカルを簡便に何度でも測定できる方法として知られている。しかし、生鮮果実のような高水分含量試料中では照射ラジカルが不安定性なため^{7)~9)}、測定対象とはみなされなかった。

本論文では、ガンマ線照射によって生マンゴー中に誘起されたラジカルを凍結乾燥検体中で測定し、その緩和現象について検討し、検知法としての利用について考察した。

実験方法

生マンゴーは、市中のスーパーマーケットで傷が少なく熟度のほぼ等しいフィリピン産を購入した。照射は室温で⁶⁰Co γ 線を用いて行い、2 kGy/hの線量率を用いて照射時間を変えて必要線量を照射した。照射後保管する場合は4°Cで保管した。果皮、果肉、種子に切分け、-80°Cで凍結後減圧して凍結乾燥を行った。凍結乾燥後の最終到達真空度は0.4 Pa以下であった。乾燥試料を磁製乳鉢で粉碎し、ESR試料管に3 cmの高さになるように入れ、パラフィルムで封じてESR検体とした。サンプル重量は、試料を入れたESR管重量から風袋重量を引いて求めた。

ESR測定は日本電子製RE-3Xを用いた。変調磁場周波数は100 kHzで、Xバンド(9.4 GHz)のマイクロ波を用いて25°Cで測定した。正確な測定条件を知るため、NMR Field Meter ES-FC5(日本電子製)とMicrowave Counter TR5212(ADVANTEST製)を用いて、磁場強度とマイクロ波周波数を実測した。

実験結果および考察

1. 照射により生マンゴーに誘起されたラジカル検出

これまで食品のフリーラジカルは、植物の乾燥部位または低水分部位の瘦果・種子・果軸等を用いて測定されている^{10)~12)}。生マンゴーの果皮は果肉より低水分含量と考えられたので、最初、照射後の果皮を直接ESR測定することを試みたが、試料中の水分のため共鳴信号を見出すことが出来なかった。そこで、我々は植物組織に対して穏やかな乾燥処理と考えられる凍結乾燥法を用いてマンゴーを乾燥することにした。照射により生マンゴーに誘起される

ラジカルは消滅しやすい事を考慮し、ラジカルを大量に発生させるため50 kGyまで γ 線照射して冷蔵庫で10日間保存した生マンゴーを使用した。その結果、我々は照射された生マンゴーから調製された検体中のラジカルを測定することに成功した(Fig. 1A)。照射された生マンゴーの果皮及び種子から調製された検体のスペクトルも同様であった。ESRスペクトルを1回積分したピーク位置における g 値は、果肉で 2.0041 ± 0.0002 、果皮で 2.0038 ± 0.0003 、種子で 2.0038 ± 0.0002 であり、これまで植物の乾燥部位または低水分部位で測定されたピークの g 値とよく一致していた^{10)~12)}。

マイクロ波強度を変化させた時のメインピークシグナルの逐次飽和挙動(Progressive Saturation Behavior: PSB)をFig. 1Bに示す。照射された生マンゴーから調製された検体で測定されるメインピークは果肉・果皮・種子いずれも約3 mWで飽和し、

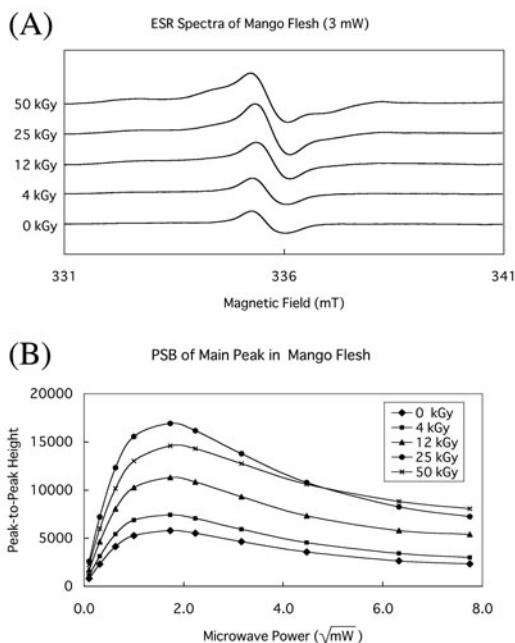


Fig. 1 ESR spectra and progressive saturation behaviors of specimens prepared from irradiated fresh mangoes. (A) Typical spectral changes of mango flesh followed by γ -irradiation. (B) Progressive saturation behavior of mango flesh followed by γ -irradiation.

その後減少した。シグナルの g 値と飽和挙動から、マンゴーで観察されたシグナルは有機フリーラジカルに起因するシグナルであると考えられた。この飽和を示すマイクロ波強度を閾値とすると、黒胡椒では線量により閾値が変化し、閾値で測定されたピーク強度は吸収線量と良い相関があり、外挿法によって照射線量の定量が可能であると報告されている^{13),14)}。マンゴー検体の場合、黒胡椒と異なり果肉・果皮・種子の閾値は線量によらず一定となり、ピーク高の線量依存性については、果肉で 25 kGy まで直線的増加が観察されたが、果皮及び種子では確認できなかったため、限定的であると考えられた。

2. メインピークの緩和現象と線量依存性

Lund らは、PSB からラジカルのスピン格子緩和時間 T_1 とスピン-スピン緩和時間 T_2 を求める事ができると報告している¹⁵⁾。そこで、12 kGy まで照射された生マンゴーから調製された ESR 検体を作製し、ESR 測定で求められたメインピークの PSB から Lund らの方法に従って T_1, T_2 を求めた。この T_1, T_2 について吸収線量に対してプロットしたものを Fig. 2 に示す。その結果、 T_1 は線量に影響されずほぼ一定であるのに対して、 T_2 は線量依存的に変化する事が明らかとなった。最小二乗法で求めた回帰直線の相関係数 R (Table 1) から、果皮や種子より果肉で得られた T_2 の線量依存性が高いと考えられた。データは示さないが、50 kGy まで調べると果肉の T_2 は 10 kGy 以上で増加の傾きはなだらかになった。

緩和時間 T_1 はスピン軌道の相互作用により化学結合に沿ってエネルギーが流れてエネルギーを失う過程に依存している¹⁶⁾。照射により T_1 が変化しないという事は、放射線が化学結合が切断されてラジカルが生成した後でもまだ別の結合からエネルギーが流れていく経路が存在していると考えられる。

また、緩和時間 T_2 は不対電子のスピン同士の相互作用を反映している¹⁷⁾。果肉・果皮・種子の T_2 が異なる線量依存性を示すという事は、生マンゴー中で、フリーラジカルが存在する生体高分子を取りまく水分含量の違いを反映している可能性がある。即ち、水分含量が異なる状況下では、化学結合の切断によりフリーラジカルを持つようになった生体高分子の自由度が異なり、移動しやすさに差異が生じるため、スピン同士の距離に依存した相互作用の違い

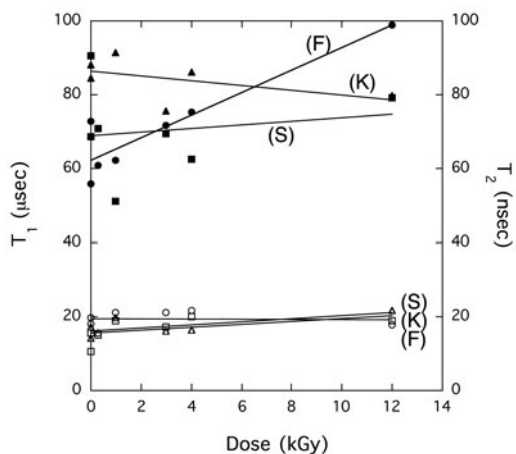


Fig. 2 Relationship between relaxation time (T_1 and T_2) and absorbed doses. Open and filled symbols indicate T_1 and T_2 , respectively. Squares, circles and triangles showed specimens from mango skin (S), flesh (F) and seed (K), respectively.

Table 1 Parameters of linear least squares against T_1 - and T_2 -dose dependency.

Relaxation Time*	A	B	R
T_1 (Skin)	15.47	0.39957	0.53126
T_1 (Flesh)	19.39	-0.026075	0.0504
T_1 (Kernel)	16.134	0.41484	0.70216
T_2 (Skin)	68.877	0.48588	0.16872
T_2 (Flesh)	62.175	3.0677	0.92867
T_2 (Kernel)	86.29	-0.6371	0.50149

Parameters for $y = A + Bx$ (x : 0 to 12 kGy, y : T_1 or T_2)

R: correlation factor

*The relaxation time is given under the unit of T_1 (μ sec) or T_2 (nsec).

が T_2 線量依存性の違いとして検出されたのかも知れない。

3. 緩和時間の経時変化

緩和時間 T_2 は、線量依存性があることが明らかとなり、特に果肉検体で直線性が良かったので、3 kGy までの実用線量域で照射されたマンゴー果肉における経時変化について検討した。照射後すぐに果肉と果皮の分離を行い -80°C で凍結して凍結乾燥処理した検体 (Fig. 3 の Day-0) では、吸収線量の増加に

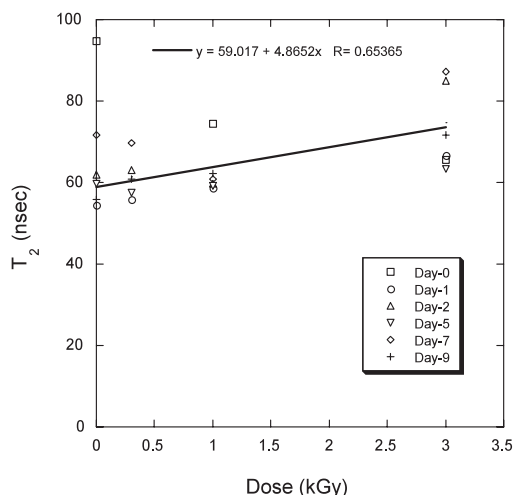


Fig. 3 Temporal change on relaxation time T_2 of main peak.

つれて緩和時間 T_2 が減少していた。一方、照射された生マンゴーを 4°C の冷蔵庫で1日から9日後まで保管した後、果肉と果皮の分離を行い -80°C で凍結して凍結乾燥処理した検体 (Fig. 3のDay-1 ~ Day-9) では、どの検体もほぼ同様に T_2 が吸収線量の増加とともに緩やかに増加する線量応答を示した。このDay-1 ~ Day-9の結果から回帰直線を求めると、その直線は Fig. 2の果肉について緩和時間 T_2 (●) で求めた回帰直線とほぼ等しかった。

照射後1日以上経過した場合、その経過日数に依らず T_2 が同じ線量依存性を示す理由としては次のような事が考えられる。照射直後の生マンゴーには多くの照射フリーラジカルが誘起されるが、それらの多くは再結合などで消滅する。そして照射から1日以上経過した段階では、ラジカルはセルロースなどの生体高分子上でのみ安定して存在するようになる。つまり ESR では安定な生体高分子ラジカルを信号として測定している事に起因するのかも知れない。

Fig. 3のDay-0の検体で、線量の増加につれて T_2 が減少した事は、照射により化学結合の切断が増え不対電子のスピン-スピン相互作用が増加した結果であると説明できる。一方、照射後1日以上経過した検体では、フリーラジカルを持つ生体高分子が移動して距離が離れるために相互作用が弱くなり、 T_2

が長くなったと考えられる。

実験的に求められた回帰直線では照射1日後から9日後まで殆ど変化しないため、生マンゴーの照射処理で通常用いられる 3 kGy 程度までは照射後経過日数に関係なく照射の有無を評価できる可能性が示唆された。しかし、実用的な場面を考えると、マンゴー個体差に起因する測定誤差も無視できないので実用線量域での検知法として適用できるか否かはさらに多くの試料を用いた検証が必要と考えられる。

まとめ

γ 線照射された生マンゴーを凍結乾燥して粉碎後 ESR 測定を行なった。その結果、果肉・果皮・種子を用いて $g=2.004$ に1本線のメインピークが観測された。Lundらの方法で、そのピークの緩和時間を計算したところ、 T_1 はほぼ一定であったが、 T_2 は吸収線量の増加とともに変化し、線量依存性が確認された。照射後1日以上経過した生マンゴーの果肉から求められる T_2 を用いると、少なくとも照射9日目までは保存期間に依らず T_2 の線量依存性は変化しない事がわかった。したがって、緩和時間 T_2 を用いて生マンゴーの照射の有無を判定できる可能性がある。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省原子力基礎基盤戦略研究イニシアティブにより実施された「実用化が予想される食品への放射線利用に関する基礎研究」の成果である。

参考文献

- 1) 植物防疫法施行規則, 別表二 (第九条関係) 付表第二, 第十五, 第十六, 第十七, 第三十六, 第四十三, 第四十八, 第五十. (平成21年6月3日農林水産省第38号 [第214次改正]).
- 2) Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Importation of Mangoes From India, Office of Federal Register, Washington D.C., USA, p.10902-10907 (2007).
- 3) IAEA, Food Irradiation Clearances Database, <http://nucleus.iaea.org/NUCLEUS/nucleus/Content/Applications/FICdb/BrowseDatabase.jsp>
- 4) EN1786. Foodstuffs-Detection of irradiated food

- containing bone-Method by ESR spectroscopy. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium (1996).
- 5) EN1787. Foodstuffs-Detection of irradiated food containing cellulose-Method by ESR spectroscopy. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium (2000).
- 6) EN13708. Foodstuffs-Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium (2001).
- 7) Boshard, J.A. P. et al. An inherent dosimeter for irradiated foods: papayas. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **22**, p.316-318 (1971).
- 8) Raffi, J. J. et al. Electron spin resonance identification of irradiated strawberries. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.* **84**(10), p.3359-3362 (1988).
- 9) 後藤典子, 田辺寛子. 照射セルロースに特有なラジカルの ESR ピークによる照射イチゴの検知. *食品照射*. **37**(1, 2), p.12-16 (2002).
- 10) Raffi, J. J.; Agnel, J. P. L. Electron spin resonance identification of irradiated fruits. *Radiat. Phys. Chem.* **34**(6), p.891-894 (1989).
- 11) Tabner, B. J.; Tabner, V. A. An electron spin resonance study of gamma-irradiated grapes. *Radiat. Phys. Chem.* **38**(6), p.523-531 (1991).
- 12) Maloney, D. R. et al. An electron spin resonance study of some gamma-irradiated fruits. *Radiat. Phys. Chem.* **39**(4), p.309-314 (1992).
- 13) Shimoyama, Y. et al. Advanced protocol for the detection of irradiated food by electron spin resonance spectroscopy. *Radiat. Phys. Chem.* **76**, p.1837-1839 (2007).
- 14) 亀谷宏美 ほか. 照射ナツメグ (*Myristica fragrans*) の ESR による検知. *Radioisotopes*. **58**(5), p.179-185 (2009).
- 15) Lund, A. et al. Relaxation time determination from continuous-wave microwave saturation of EPR spectra. *Radiat. Res.* (in press).
- 16) 石津和彦. “実用 ESR 入門—生命科学へのアプローチ.” 東京, 講談社, p.302 (1981).
- 17) Alger, R. S. “Electron Paramagnetic Resonance: Technique and Applications.” New York, John Wiley and Sons, p.508 (1968).

(2009年7月13日受理)