チーズ中のたんぱく質と脂肪の二重染色試験法

この試験方法は、関税定率法別表第04.06 項に掲げるチーズに該当するか否か確認する必要があるものについて適用するものとし、関税定率法別表第 04.05 項に掲げるバター又はデイリースプレッド（油中水滴型の乳化したもの）等、明らかに他の項に分類されるものには適用しない。

1. 試験方法の概略 この試験方法は、試料中のたんぱく質と脂肪の組織構造を顕微鏡で観察し、標準的なチーズのものと比較することにより、たんぱく質の凝固状態を確認するもので、以下の手順により行う。

① 凍結組織切片の作製

② 切片の二重染色処理

③ 透過型光学顕微鏡による観察

2. 試薬及び器具

(1) Baker のカルシウム・ホルマリン溶液（10 %ホルマリン・1 %塩化カルシウム水溶液）

ホルマリン（試薬特級・35-38 %ホルムアルデヒド水溶液）15 mL 及び塩化カルシウム二水和物 1.5 g を 200 mL 容三角フラスコに量り取り、イオン交換水 (1) 135 mL を加えて溶解する。

(2) ホルマリンーグルタルアルデヒド溶液（10 %ホルマリン・1 %グルタルアルデヒド水溶液）

ホルマリン（試薬特級・35-38 %ホルムアルデヒド水溶液）15 mL 及び 25 %グルタルアルデヒド溶液（試薬一級）6 mL を 200 mL 容三角フラスコに量り取り、イオン交換水 (1) 129 mL を加えて混合する。

(3) 36 mmol/L りん酸二水素カリウム水溶液

りん酸二水素カリウム 0.49 g を 200 mL 容三角フラスコに量り取り、水 100 mL を加えて溶解する。

(4) 0.18 mol/L りん酸水素二ナトリウム水溶液

りん酸水素二ナトリウム 1.28 g を 100 mL 容三角フラスコに量り取り、水 50 mL を加えて溶解する。

(5) 10 %アクロレインジエチルアセタール溶液

アクロレインジエチルアセタール 10 mL に 36 mmol/L りん酸二水素カリウム水溶液 50 mL を加え、1 時間激しくかくはんする。次に、0.18 mol/L りん酸水素二ナトリウム水溶液 40 mL を加え、十分に混合する (2)。用時調製すること。

(6) 1 mol/L 塩酸

濃塩酸 8.2 mL に水を加え、全量を 100 mL とする。

(7) 1 %（w/w）デキストリン水溶液

デキストリン水和物 0.6 g を共栓付三角フラスコに量り取り、イオン交換水 (1) 60 mL を加えてかくはんした後、共栓を取り付けて 60 ℃で一晩静置する。使用直前まで加温し続けること。

(8) チオニン・シッフ試薬溶液（たんぱく質染色溶液）

チオニン酢酸塩 0.2 g にイオン交換水 (1) 約 100 mL を加え、5 分間煮沸し、室温まで放冷した後、蒸発した分量のイオン交換水 (1) を加える。このチオニン溶液に 2-メチル-2-プロパノール（*tert*–ブチルアルコール）100 mL、1 mol/L 塩酸 30 mL 及び二亜硫酸ナトリウム 2 g を加え、よくかくはんする (2)。冷暗所で約 1 週間保存することが可能で、使用時には室温に戻した後、定性用ろ紙（JIS P 3801 に規定する 1 種）でろ過してから使用する。

(9) オイルレッド O 試薬溶液（脂肪染色溶液）

オイルレッド O 0.27 g に 2-プロピルアルコール 90 mL を加えて混合し、60 ℃で一晩静置した後、

1 %（w/w）デキストリン水溶液 60 mL を加えて振り混ぜ、直ちに定性用ろ紙（JIS P 3801 に規定する 3 種）でろ過する。使用する 1 時間前に調製する。

(10)　60 %（v/v）2-プロピルアルコール水溶液

(11)　スライドグラス

シランコーティング（APSコート）されたもの。

(12)　水溶性樹脂封入剤

チオニン（青色）及びオイルレッドO（赤色）のいずれの色素とも親和性がないもの。

(13)　試料凍結包埋用樹脂

市販の凍結ミクロトーム用コンパウンドを使用する。

(14)　凍結包埋用冷却剤

液体窒素又はアセトン中にドライアイスを投入したものを使用する。

注 1)　イオン交換水とあるのは、蒸留水でなくイオン交換水を用いる。

注 2)　ドラフトチャンバー内で調製する。

3.　機器及び装置

(1)　凍結ミクロトーム

切片作製ハウジング内の温度をマイナス30 ℃まで冷却することが可能なもの。

(2)　透過型光学顕微鏡

100～400 倍での観察が可能なもの。

4.　顕微鏡観察用試料の調製　試料を以下の手順で樹脂内に凍結・固定した後、凍結ミクロトームで作製した切片を二種類の染色溶液で二重染色し、顕微鏡観察用試料とする。

(ⅰ)　アルミホイルで 1 cm×1 cm×2 cm 程度のカップ[(3)]を作製する。作製したカップ内に、凍結包埋用樹脂を底面から約 2 mm の高さまで加え、次に 5～8 mm 角の試料（試料の中心部分を切り出したもの）を入れ、さらに凍結包埋用樹脂を、試料がカップに直接触れないように注意しながら、試料が完全に覆われるまで加える（図 1 参照）[(4)]。

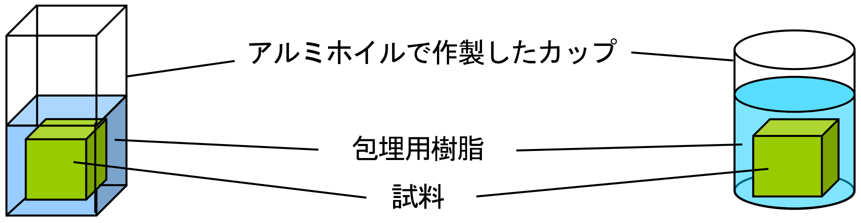


図 1

(ⅱ)　カップを半分程度まで凍結包埋用冷却剤に浸せきし、凍結包埋用樹脂の中心部が凍結する直前に、カップ全体を凍結包埋用冷却剤に 2～3 秒間浸せきした後、冷却剤から取り出す。

(ⅲ)　数秒後、再びカップ全体を冷却剤に 2～3 秒間浸せきした後、冷却剤から取り出す。この操作を凍結包埋用樹脂が完全に凍結するまで繰り返した後、マイナス 20 ℃以下の冷凍庫で保存する[(5)]。

(ⅳ)　(ⅲ)で作製した試料からアルミホイルを除いた後、凍結ミクロトームの試料支持具に固定し、試料を包んでいる凍結包埋用樹脂の大部分をナイフ等で除去した後、切片作製ハウジング内の温度をマイナス 20 ℃[(6)]、刃角度を 0～5 度に設定した凍結ミクロトームで約 10 μm 厚の切片を切り出す[(7)]。

(ⅴ)　切り出した切片をスライドグラス上に貼付し、15 分～2 時間程度室温で風乾する。続けて、室温で

Baker のカルシウム・ホルマリン溶液に 30 分間浸せきすることで組織を固定[8]した後、流水で 5 分間洗浄する。

(vi) ドラフトチャンバー内において、室温で 10 %アクロレインジエチルアセタール溶液に 60 分間浸せきした後、イオン交換水[1]に 5 分間浸せきする。さらにイオン交換水[1]を交換し 5 分間浸せきする操作を 2 回繰り返し、アクロレインジエチルアセタール溶液を完全に除去する。

(vii) 室温でチオニン・シッフ試薬溶液（たんぱく質染色溶液）に 30 分間浸せきし、たんぱく質を青色に染色する。切片が貼付されたスライドグラスを取り出した後、直ちに流水で 20 分間洗浄し、さらにイオン交換水[1]ですすぐ。

(viii) あらかじめ 37 ℃に加温した 60 %（v/v）2-プロピルアルコール水溶液に 1 分間浸せきした後、37 ℃のオイルレッド O 試薬溶液（脂肪染色溶液）に 15 分間浸せきし、脂肪を赤色に染色する。

(ix) 再び 37 ℃の 60 %（v/v）2-プロピルアルコール水溶液に 2 分間浸せきした後、流水で 5 分間洗浄し、さらにイオン交換水[1]ですすぐ。

(x) 染色した切片上に水溶性樹脂封入剤を滴下し、カバーグラスで覆って観察用試料とする。

注 3) 紫外可視分光光度計用の試料セルを型として成型するとよい。あるいは、直径約 1.5 cm のフェルトペン等を用いて円筒形に成型してもよい。

注 4) 試料に亀裂が多く存在する場合には、凍結包埋用樹脂が試料内部に十分に浸透するよう、20～30 分間静置した後（ii）以降の操作を行い、それ以外の場合は、直ちに（ii）以降の操作を行ってよい。

注 5) （iv）～（x）の操作に約 1 日を要することから、一旦保存のため冷凍するものである。

注 6) 脂肪分が多い試料の場合、更に 5～10 ℃低い温度に設定するとよい。

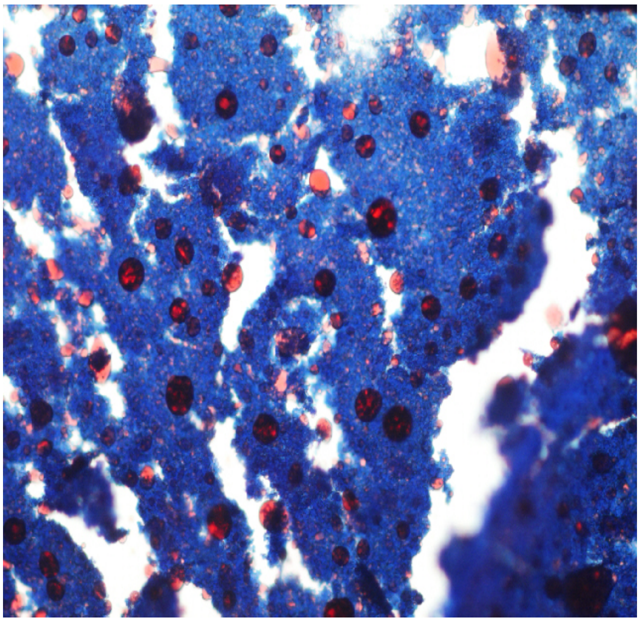
注 7) 大きさが十分でしわのない切片が望ましい。

注 8) 脂肪分が多く、顕微鏡観察像が全面的に赤色に染色されることにより、脂肪球の観察が困難な試料の場合は、Baker のカルシウム・ホルマリン溶液に代えてホルマリン－グルタルアルデヒド溶液を使用し、30 分間浸せきし、さらに 2-プロピルアルコールに 30 秒間浸せきした後、流水で 5 分間洗浄したうえで、（vi）以降の操作を行った切片も作成する。

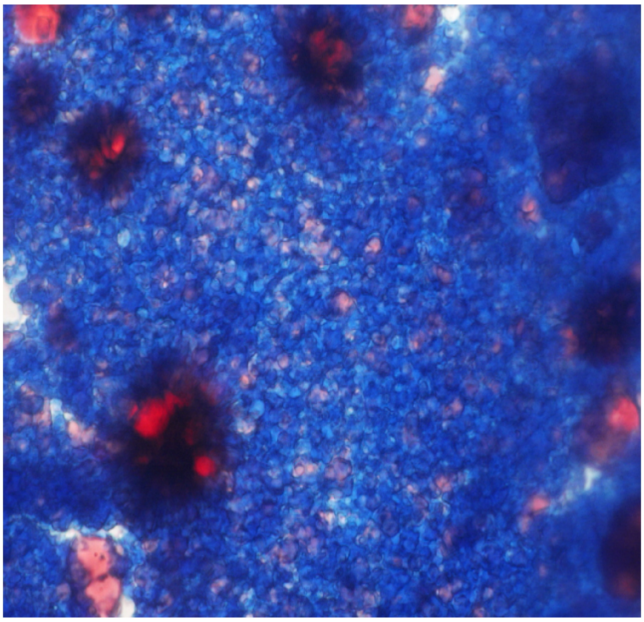
5. 顕微鏡による観察 4. で作製した観察用試料について、透過型光学顕微鏡を使用し、まず総合倍率 100 倍で、次に 400 倍で染色した組織を観察する。同様に標準的なチーズ（ゴーダ、カマンベール、クリーム等）を対照として比較し、観察用試料に「チーズ」の組織上の特徴が認められるか判断する。

(参考) 「チーズ」の組織上の特徴

たんぱく質（青色に染色）は孤立することなく網目構造を形成し、脂肪球（赤色に染色）を取り囲むように分布している（図２～５参照）。

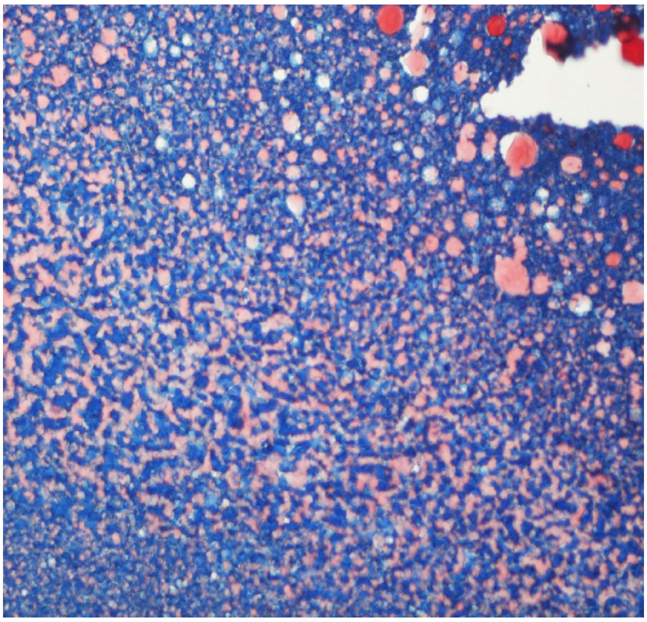


総合倍率×100

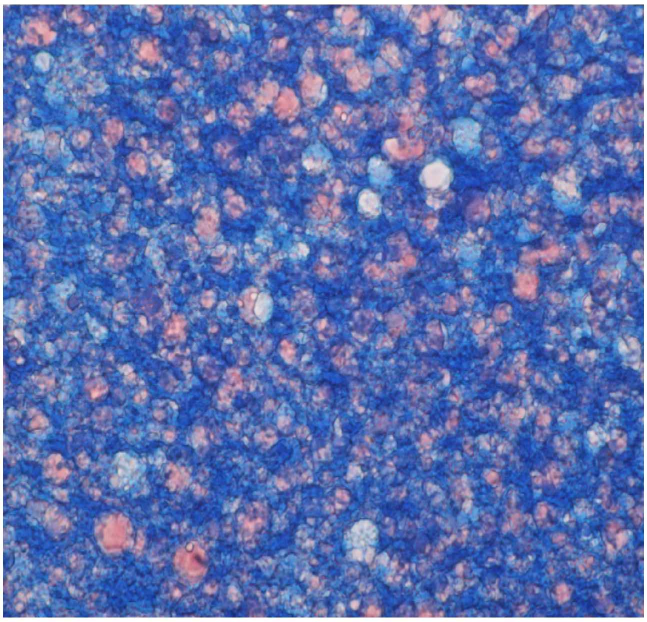


総合倍率×400

図２　ゴーダチーズの顕微鏡写真

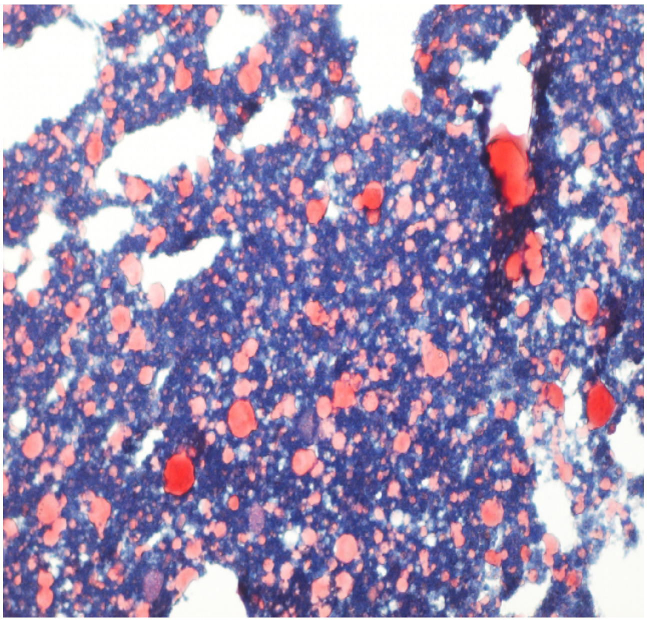


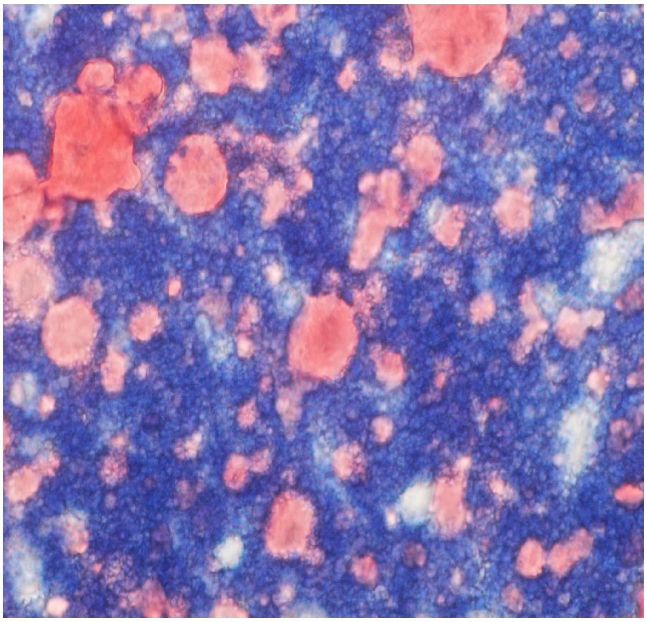
総合倍率×100



総合倍率×400

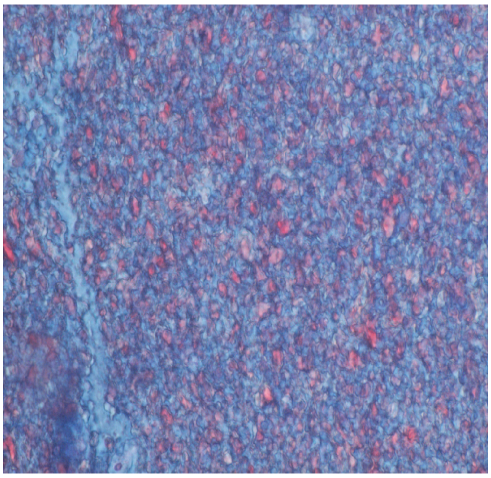
図３　カマンベールチーズの顕微鏡写真



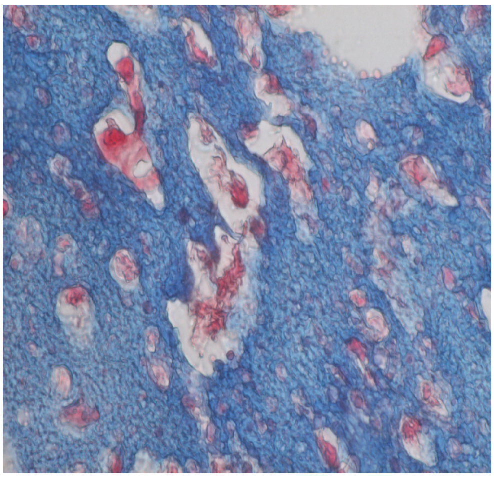


総合倍率×100　　　　総合倍率×400

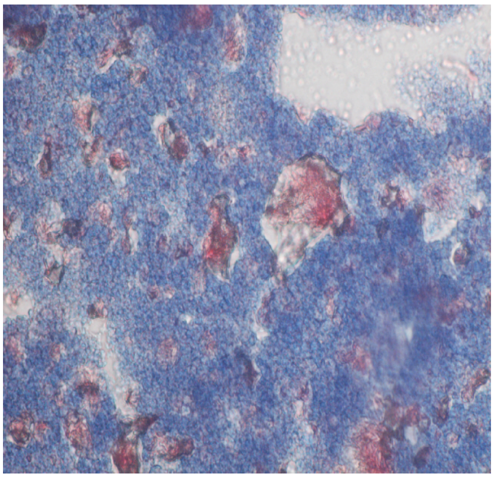
図４　クリームチーズの顕微鏡写真



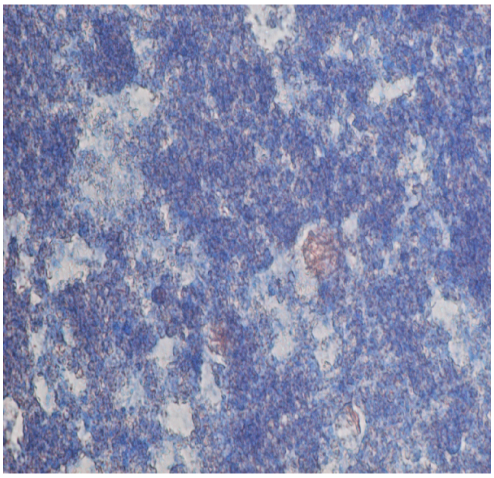
ゴーダチーズ



カマンベールチーズ



クリームチーズ



マスカルポーネチーズ

図５　注８)の方法による顕微鏡写真（いずれも総合倍率×400）

6. 参考文献

(1) 長縄貴直，渡邊康一，神崎文次，太田智章，虹川久美子，細野明義，山口高弘：ミルクサイエンス，51，33（2002）

(2) 五十嵐智大、徳島將光、松本啓嗣、丸田陽洋、大嶋秀克：畜産技術，787，25（2020）