

# 飲料用植物粉末のDNA分析における種識別の検討

松島 紋子\*，大田 朋樹\*，中山 清貴\*

## Species identification of plants of vegetable powder for green juice by DNA analysis

Ayako MATSUSHIMA\*, Tomoki OTA\* and Kiyotaka NAKAYAMA\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Amid rising health awareness, various vegetable powders are being used as raw materials of green juice in recent years. It is necessary to identify the plant species of these vegetable powders for customs work such as HS classification, however, it is difficult to identify the vegetable powders based on morphological observation. Therefore, we examined whether the vegetable powders could be identified by DNA-based analysis. To extract DNA from the vegetable powders, it was effective to use the CTAB method. We tried to identify vegetable powder samples (ten commercially obtained samples) by the direct sequencing method using several regions (*rbcL*, *matK*, *trnL* and *ITS1*) using available DDBJ (DNA Data Bank of Japan) data. As a result, all of the samples were successfully identified at the genus level and six were identified at the species level.

## 1. 緒 言

近年、健康志向の高まりを背景に、野菜不足の解消や美容・健康のため、またサプリメントとして、手軽に摂取のできる植物飲料が数多く流通している。中でも、飲料用植物粉末は、使いやすく、種類も豊富である。これらの植物粉末の原料となる植物は、ケールや大麦若葉、アルファルファなど様々である。

植物粉末の関税率表上の分類は、その植物粉末の原料となる植物によって異なる。たとえば、ケールであれば、その他の野菜として第07.12項、大麦若葉であれば、その他の植物性生産品として第12.12項、アルファルファであれば、第12.14項に分類される。これらの間には、税率格差もあることから、植物粉末の原料植物種の識別は、関税分類における重要な分析である。しかし、植物粉末の状態では、形態学的な特徴はほとんど残っておらず、外観での識別は困難である。そのため、種の識別にはDNA分析が有効であると考えられる。

これまでの研究で、広範囲の植物に使用のできるユニバーサルプライマーがいくつか知られており、その中でも、植物種の違いを反映する特定の遺伝子領域の塩基配列を用いて、種の同定を行うDNAバーコーディングの研究が進められている<sup>1)-8)</sup>。陸上植物のバーコード領域としては、葉緑体DNAの*rbcL*領域及び*matK*領域が提案されているが<sup>4), 8)</sup>、これら2領域だけでは、種の識別が困難な場合もあり、他の領域を用いた識別法の研究もおこなわれている<sup>6), 7), 9)</sup>。

本研究では、植物粉末からのDNAの効率的な抽出法を検討すると共に、ユニバーサルプライマーを利用したDNA分析により、市場に流通している各種飲料用植物粉末の原料植物種の識別が可能であるかを検討した。植物種の識別では、葉緑体DNAの*rbcL*遺伝子の部分領域(以下、*rbcL*領域) *matK*遺伝子の部分領域(以下、*matK*領域) *trnL*(UAA)遺伝子のインtron領域(以下、*trnL*領域) 及び核リボソームDNAのinternal transcribed spacerの前半領域(以下、*ITS1*領域)の塩基配列を決定し、インターネット上のDDBJ(DNA Data Bank of Japan)でBlast(Basic Local Alignment Search Tool)検索を行い、各種飲料用植物粉末が、科、属、種又は変種のいずれまで識別可能かについて調査した。

## 2. 実 験

### 2.1 試料

試料は、市販の飲料用植物粉末(10検体)を用いた。いずれの検体も形態学的な知見から種の特定はしておらず、検体名は商品のラベルに表示されていた名称を用いた。詳細についてはTable1に示す。

Table 1 Vegetable powder samples analyzed in this study and their identification result

試料名	Sample name	Origin	Appearance	Identification result
大麦若葉	Young barley leaves	no info.	green powder	<i>Hordeum vulgare</i>
桑	Mulberry	no info.	green powder	<i>Morus</i> spp.
アルファルファ	Alfalfa	Argentina	greenish brown powder	<i>Medicago sativa</i>
小麦若葉	Young wheat leaves	Australia	green powder	<i>Triticum</i> spp.
ケール	Kale	Japan	green powder	<i>Brassica oleracea</i>
ゴーヤ	Bitter gourd (or Bitter melon)	China	light brown powder	<i>Momordica charantia</i>
アシタバ	Angelica keiskei	South Korea	olive green powder	<i>Angelica</i> spp.
モロヘイヤ	Jew's mallow (or Nalta jute)	Egypt	greenish brown powder	<i>Crochorus olitorius</i>
キダチアロエ	Aloe arborescens	Japan	olive green powder	<i>Aloe</i> spp.
お茶	Green tea leaves	Japan	green powder	<i>Camellia sinensis</i>

## 2.2 プライマー及び分析装置

### プライマー

#### rbcL 領域

rbcLa\_F<sup>4)</sup> 5' - ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'  
rbcLa\_R<sup>4)</sup> 5' - GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'

#### matK 領域

3F\_KIM f<sup>4)</sup> 5' - CGTACAGTACTTTGTGTTACGAG -3'  
1R\_KIM r<sup>4)</sup> 5' - ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC -3'

#### trnL 領域

trnL\_c<sup>1)</sup> 5' - CGAAATCGGTAGACGCTACG -3'  
trnL\_d<sup>1)</sup> 5' - GGGATAGAGGGACTTGAAC -3'

#### ITS1 領域

ITS-A<sup>2)</sup> 5' - GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG -3'  
ITS-C<sup>2)</sup> 5' - GCAATTACACCAAGTATCGC -3'

分光光度計 : GeneQuant RNA/DNA Calculator  
( amersham pharmacia biotech )

PCR 増幅装置 : Veriti 96well Thermal cycler ( Applied Biosystems )

画像解析装置 : BIO-PROFILE System2 ( VILBER LOURMAT )

DNA シークエンサー : 3500 XL Genetic Analyzer  
( Applied Biosystems )

## 2.3 実験

### 2.3.1 DNA 抽出方法の検討

予めポリビニルピロリドン約 20 mg 及びジルコニア・ビーズ 1 個を入れた 2 ml 容のエッペンチューブに試料をそれぞれ約 10 mg 量り取り、CTAB 法で DNA を抽出した。また、試料をそれぞれ約 10 mg 量り取り、DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini kit ( 以下、キット法 ) で DNA を抽出した。キット法による DNA 抽出は、添付のプロトコルに従い、最終容量を 100  $\mu$ l とした。各抽出方法で得られた DNA 抽出液について、260 nm における吸光度 ( $A_{260}$ ) を測定し、DNA の収量を求めた。DNA の収量は、 $A_{260} = 1$  のとき、DNA 濃度 50 ng/ $\mu$ l として算出した。また、DNA 抽出液の精製度は、280 nm における吸光度に対する 260 nm における吸光度比 ( $A_{260}/A_{280}$ ) 並びに 230 nm における吸光度に対する 260 nm における吸光度比 ( $A_{260}/A_{230}$ ) より評価した。DNA の収量及び精製度の確認は、2 点並行で行い、その平均値を用いた<sup>10)</sup>。

2.3.2 PCR法によるユニバーサル領域の增幅及び塩基配列の決定 各試料から抽出した DNA を錠型として、rbcL 領域、matK 領域、trnL 領域及び ITS1 領域の 4 領域をそれぞれ TaKaRa Ex Taq polymerase を用いて PCR 法で增幅した。PCR の反応溶液は、いずれの領域においても、DNA 抽出液 ( 約 100 ng/ $\mu$ l ) : 1  $\mu$ l、10  $\times$  Ex Taq buffer : 3.0  $\mu$ l、dNTP mixture ( 2.5 mM each ) : 2.4  $\mu$ l、プライマー ( 20  $\mu$ M ) : 各 0.5  $\mu$ l、Ex Taq polymerase ( 5 U/ $\mu$ l ) : 0.1  $\mu$ l、滅菌水 : 22.5  $\mu$ l ( 合計 30  $\mu$ l に調製 ) とした。PCR の反応条件は、いずれの領域においても、熱変性 95 ( 4 分 ) を行った後、94 ( 30 秒 ) 55 ( 1 分 ) 72 ( 1 分 ) のサイクルを 30 回繰り返した後、伸長反応 72 ( 10 分 ) を行った。

2% アガロースゲル電気泳動により、増幅した DNA 断片 ( PCR 産物 ) の有無を確認した後、得られた PCR 産物をイソプロパノール沈殿により精製し、PCR 反応と同じプライマーを用いて、Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit で、添付のプロトコルに従いサイクルシークエンス反応を行った。

サイクルシークエンス反応後、エタノール沈殿法により未反応蛍光色素を除去し、DNA シークエンサーにより各 PCR 産物の塩基配列を決定した。得られた塩基配列からプライマー配列を除去した後、インターネット上の DDBJ で Blast 検索を行った。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 DNA 抽出方法の検討

飲料用植物粉末からの効率的な DNA 抽出方法を検討するため、CTAB 法及びキット法の 2 つの方法で DNA 抽出を行った。各試料から得られた DNA の収量及び DNA 抽出液の精製度を Table 2 に示す。

Table 2 Yields and purity of DNA extracted from vegetable powders, comparison of the CTAB method and Kit method

	CTAB method		Yield (μg/mg)	Kit method		Yield (μg/mg)
	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>		A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	
Young barley leaves	1.80	1.75	3.45	0.98	1.66	0.35
Mulberry	1.57	1.79	2.78	0.62	1.79	0.35
Alfalfa	1.33	1.76	1.53	0.73	1.68	0.35
Young wheat leaves	2.04	1.78	6.14	1.39	1.65	0.92
Kale	1.56	1.76	3.34	0.66	1.76	0.28
Bitter gourd	1.19	1.73	2.50	0.30	1.60	0.24
Angelica keiskei	0.87	1.76	1.23	0.67	1.70	0.36
Jew's mallow	1.36	1.73	2.64	0.42	1.69	0.21
Aloe arborescens	1.08	1.75	1.25	0.49	1.68	0.20
Green tea leaves	1.31	1.76	1.85	1.01	1.68	0.48

Kit means DNeasy® Plant Mini kit (QIAGEN)

Yield (μg/mg) = A<sub>260</sub> × 50 × extract volume (ml) / amount of sample (mg)

DNA の収量は、全ての試料において、キット法よりも CTAB 法で抽出した方が 3-12 倍高かった。また、DNA の精製度においては、タンパク質除去の指標となる A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> は、1.2-2.5 の範囲内であることが原則とされている<sup>10)</sup>が、全ての試料において、キット法で 1.6-1.8、CTAB 法で 1.7-1.8 であることから、いずれの方法においても良好であることが示された。一方、A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> は、糖、フェノール等の低分子化合物由来の夾雑物の指標とされており、値が 2 未満ものは夾雑物の影響により PCR 反応が阻害されることがあると報告されている<sup>10)</sup>。A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> は、キット法では、ほとんどの試料において 1 以下であり、CTAB 法では、ほとんどの試料において 1-2 となった。いずれの抽出方法においても、植物由來の糖やポリフェノールなどの夾雑物の影響により PCR 反応が阻害される可能性が示唆された。しかし、キット法に比べ、CTAB

法の方が、A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> の値が大きいため、CTAB 法を用いて抽出した DNA 抽出液の方がキットを用いた抽出液よりも夾雑物の影響が小さいと考えられる。

以上の結果から、植物粉末からの DNA の抽出には、CTAB 法を用いる方法が有効であることが分かった。

### 3.2 飲料用植物粉末の DNA の状態

CTAB 法を用いて抽出した DNA の状態をアガロース電気泳動法にて調べた結果を Fig.1 に示す。小麦若葉及びお茶では約 10 kbp にバンドが観察され、比較的断片化していない DNA が抽出された。一方、他の 8 試料については、スマア状のバンドが観察され DNA の断片化が進んでいることが判明した。

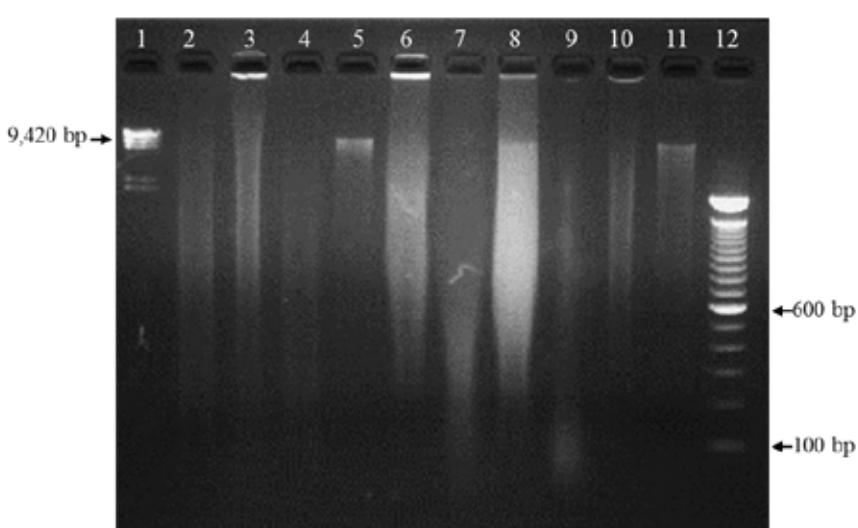


Fig.1 Qualities of the DNA extracted by CTAB method

Lane 1: λ/Hind III digested, Lane 2: Barley young leaves, Lane 3: Mulberry, Lane 4: Alfalfa, Lane 5: Wheat young leaves, Lane 6: Kale, Lane 7: Bitter gourd, Lane 8: Angelica keiskei, Lane 9: Jew's mallow, Lane 10: Aloe arborescens, Lane 11: Green tea leaves, Lane 12: 100 bp DNA ladder  
The electrophoresis was performed on 2 % agarose gel in TAE buffer including ethidium bromide.

### 3.3 PCR 産物の電気泳動

各試料の植物種の識別を行うため、近年、陸上植物のバーコード領域として公開されている葉緑体 DNA の *rbcL* 領域及び *matK*

領域<sup>4), 8)</sup> 並びに比較的近縁種の識別に利用されている葉緑体 DNA の *trnL* 領域及び核リボソーム DNA の ITS1 領域の計 4 領域のプライマー<sup>1), 2), 4)</sup> を用いて PCR を行った (Fig.2)。

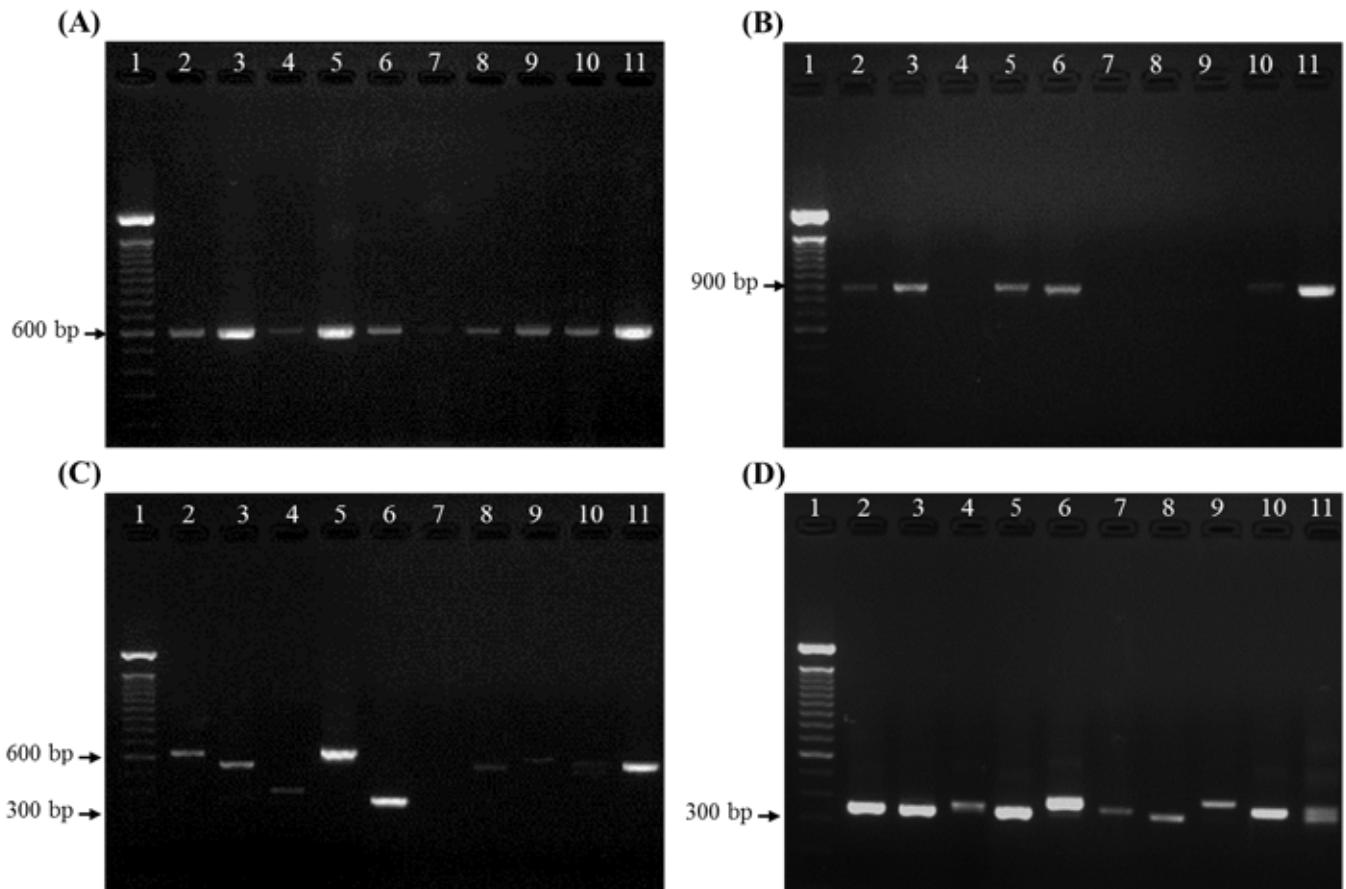


Fig.2 PCR amplification of DNA extracted from the vegetable powder samples for 4 regions, A: *rbcL* region, B: *matK* region, C: *trnL* region and D: ITS1 region  
Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2: Barley young leaves, Lane 3: Mulberry, Lane 4: Alfalfa, Lane 5: Wheat young leaves, Lane 6: Kale, Lane 7: Bitter gourd, Lane 8: Angelica keiskei, Lane 9: Jew's mallow, Lane 10: Aloe arborescens, Lane 11: Green tea leaves  
Each electrophoresis was performed on 2% agarose gel in TAE buffer including ethidium bromide.

*rbcL* 領域では、全ての試料で 600 bp 付近に単一なバンドが確認された。*matK* 領域では、アルファルファ、ゴーヤ、アシタバ及びモロヘイヤの 4 試料において、バンドが確認されなかったが、他の 6 試料については 900 bp 付近に単一なバンドが確認された。*trnL* 領域では、キダチアロエで 2 本のバンドが確認され、ゴーヤやバンドが確認されなかったが、他の 8 試料においては、300-600 bp で単一なバンドが確認された。ITS1 領域では、お茶で 2 本のバンドが確認されたが、他の 9 試料においては 300 bp 付近に単一なバンドが確認された。

### 3.4 塩基配列の決定及びデータベースとの照合

単一のバンドが確認された各 PCR 産物について、DNA シークエンサーにより塩基配列を決定し、得られた塩基配列を用いて、インターネット上の DDBJ で Blast 検索を行った。それぞれの最も相同性が高い登録データは、以下のとおりである。

#### (1) 大麦若葉

*rbcL* *Hordeum vulgare*(オオムギ) HQ600432 相同性(100%)  
*matK* *Hordeum vulgare*(オオムギ) HQ600011 相同性(100%)  
*trnL* *Hordeum vulgare*(オオムギ) KF600708 相同性(100%)  
ITS1 *Hordeum vulgare*(オオムギ) FJ593180 相同性(100%)  
試料は、オオムギ(*Hordeum vulgare*)と識別される。

#### (2) 桑

<i>rbcL</i>	<i>Morus indica</i>	DQ226511	相同性(100%)
	<i>Morus alba</i> (カラヤマグワ)	KF031063	相同性(100%)
<i>matK</i>	<i>Morus indica</i>	DQ226511	相同性(100%)
	<i>Morus alba</i> (カラヤマグワ)	AB038183	相同性(100%)
<i>trnL</i>	<i>Morus alba</i> (カラヤマグワ)	AF400592	相同性(99 %)
ITS1	<i>Morus alba</i> (カラヤマグワ)	HQ144174	相同性(100%)
	<i>Morus bombycis</i> (ヤマグワ)	AM042006	相同性(100%)

試料は、クワ属(*Morus spp.*)と識別される。

#### (3) アルファルファ

*rbcL* *Medicago sativa*(アルファルファ) HQ590181 相同性(100%)

<i>matK</i>	バンドがないため塩基配列を決定できなかった		
<i>trnL</i>	<i>Medicago sativa</i> (アルファルファ)	JN617183	相同性(100%)
ITS1	<i>Medicago sativa</i> (アルファルファ)	AF053142	相同性(100%)
試料は、アルファルファ( <i>Medicago sativa</i> )と識別される。			

#### (4) 小麦若葉

<i>rbcL</i>	<i>Triticum turgidum</i>	HQ894421	相同性(100%)
	<i>Triticum aestivum</i> (パンコムギ)	HQ590312	相同性(100%)
<i>matK</i>	<i>Triticum aestivum</i> (パンコムギ)	AF164405	相同性(100%)
	<i>Triticum spelta</i>	HQ8944243	相同性(100%)
<i>trnL</i>	<i>Triticum aestivum</i> (パンコムギ)	KC912694	相同性(100%)
<i>ITS1</i>	<i>Triticum aestivum</i> (パンコムギ)	FJ609737	相同性(100%)
試料は、小麦属( <i>Triticum spp.</i> )と識別される。			

## (5) ケール

<i>rbcL</i> <sup>†</sup>	<i>Brassica oleracea</i> (ヤセイカンラン種)	HQ619736	相同性(100%)
	<i>Brassica rapus</i> (ラバ種)	GQ861354	相同性(100%)
<i>matK</i> <sup>†</sup>	<i>Brassica oleracea</i> (ヤセイカンラン種)	JN584952	相同性(100%)
	<i>Brassica rapus</i> (ラバ種)	JF807906	相同性(100%)
<i>trnL</i> <sup>†</sup>	<i>Brassica oleracea ver. Capitata</i> (キャベツ)	AY752712	相同性(100%)
	<i>Brassica oleracea ver. Gemmifera</i>		

ITS1<sup>†</sup> *Brassica oleracea* ver. *Botrys* GQ891876 相同性(100%)  
試料は、ヤセイカンラン種(*Brassica oleracea*)と識別される。

(6) ゴーヤ

<i>rbcL</i> <sup>†</sup>	<i>Momordica foetida</i>	DQ535829	相同性(99%)
	<i>Momordica charantia</i>	JN407272	相同性(99%)
<i>matK</i> <sup>†</sup>	バンドがないため塩基配列を決定できなかった		
<i>trnL</i> <sup>†</sup>	バンドがないため塩基配列を決定できなかった		
ITS1 <sup>†</sup>	<i>Momordica charantia</i>	GQ845154	相同性(99%)
試料は、ナガレイシ種( <i>Momordica charantia</i> )と識別される。			

## (7) アシタバ

<i>rbcL</i> <sup>†</sup>	<i>Angelica apaensis</i>	HQ686932	相同性(100%)
	<i>Angelica dahurica</i>	GQ436629	相同性(100%)
<i>matK</i> <sup>†</sup>	バンドがないため塩基配列を決定できなかった		
<i>trnL</i> <sup>†</sup>	<i>Angelica gmelini</i>	GQ244570	相同性(100%)
<i>ITS1</i> <sup>†</sup>	<i>Angelica gigas</i>	DQ647697	相同性(99 %)
	<i>Angelica dahurica ver. Formosana</i>	JX022910	相同性(99 %)

試料は、シシウド属(*Angelica spp.*)と識別される。

(8) モロヘイヤ

<i>rbcL</i> <sup>‡</sup>	<i>Oceanopapaver neocaledonicum</i>	AF523842	相同性(99%)
<i>matK</i>	バンドがないため塩基配列を決定できなかった		
<i>trnL</i> <sup>†</sup>	<i>Corchorus longipedunculatus</i>	AM159144	相同性(98%)
	<i>Corchorus lconfusus</i>	AM159146	相同性(98%)
<i>ITS1</i>	<i>Corchorus olitorius</i>	FJ161701	相同性(100%)

試料は、モロヘイヤ(*Corchorus olitorius*)と識別される。

## (9) キダチアロエ

<i>rbcL</i>	<i>Aloe arborescens</i> (キダチアロエ)	JX572272	相同性(100%)
	<i>Aloe ferox</i> (アロエフェロックス)	JQ025022	相同性(100%)
<i>matK</i>	<i>Aloe humilis</i>	AY323719	相同性(98 %)
	<i>Aloe glauca</i>	AJ511396	相同性(98 %)
<i>trnL</i>	バンドが2本のため塩基配列を決定できなかった		
<i>ITS1</i>	<i>Aloe ferox</i> (アロエフェロックス)	JQ025327	相同性(100%)
	<i>Aloe challisii</i>	JQ025355	相同性(100%)

(10) お茶

<i>rbcL</i>	<i>Camellia oleifera</i> (ツバキ)	GQ436646	相同性(100%)
	<i>Camellia sinensis</i> (チャノキ)	AF380037	相同性(100%)
<i>matK</i>	<i>Camellia sinensis</i> (チャノキ)	AF380077	相同性(100%)
<i>trnL</i>	<i>Camellia sinensis</i> (チャノキ)	KF562708	相同性(99 %)
	<i>Camellia oleifera</i> (ツバキ)	JQ975031	相同性(100%)
ITS1	バンドが2本のため塩基配列を決定できなかった 試料は、チャノキ ( <i>Camellia sinensis</i> )と識別される。		
†	該当の種又は変種の塩基配列がデータベースに登録されていない		
‡	該当の属の塩基配列がデータベースに登録されていない		

以上の相同性検索の結果から、大麦若葉 (*Hordeum vulgare*) アルファルファ (*Medicago sativa*) モロヘイヤ (*Corchorus olitorius*) 及びお茶 (*Camellia sinensis*) については種レベルの識別が可能であった。ケール (*Brassica oleracea* var. *acephala*) 及びゴーヤ (*Momordica charantia* var. *pavel*) は、種よりも下位の分類である変種である。これらは、種レベルの識別は可能であるが、変種間の塩基配列にほとんど差がないことから同種内の別変種との識別には至らなかった。桑 (*Morus spp.*) 小麦若葉 (*Triticum spp.*) アシタバ (*Angelica keiskei*) 及びキダチアロエ (*Aloe arborescens*) については、種間の塩基配列にほとんど差がないこと又は登録データの不足により種の識別には至らなかったが、属レベルの識別は可能であった。

4. 要 約

飲料用の植物粉末からのDNA抽出方法を検討した結果、CTAB法での抽出方法が有効であることがわかった。市販の飲料用植物粉末を対象として、広範囲の植物種に利用できる複数のユニバーサルプライマー(*rbcL*領域、*matK*領域、*trnL*領域及びITS1領域を対象とする)を用いてダイレクトシーキングエンス法で塩基配列を決定し、種の識別が可能であるか検討した。その結果、今回用いた試料において、種の識別が可能なものは6試料(大麦若葉、アルファルファ、モロヘイヤ、お茶、ケール及びゴーヤ)属までの識別が可能なものは4試料(桑、小麦若葉、アシタバ及びキダチアロエ)であった。

## 文 献

- 1) Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J: *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105 (1991).
- 2) Blattner F R: *BioTechniques*, **27**, 1180 (1999).
- 3) Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell J M, Kesanakurthi R P, Haidae N, Savolaine V: *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B Biological Sciences*, **360**, 1889 (2005)
- 4) CBOL Plant Working Group: *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 12794 (2009).
- 5) Li F W, Kuo L Y, Rothfels C J, Ebihara A, Chiou Q L, Windham M D, Pryer K M: *PLoS ONE*, **6**, e26597 (2011).
- 6) de Groot G A, During H J, Maas J W, Schneider H, Vogel J C, Erkens H J: *PLoS ONE*, **6**, e16371 (2011).
- 7) Hollingsworth P M, Graham S W, Little D P: *PLoS ONE*, **6**, e19254 (2011).
- 8) Bafeel S O, Arif I A, Bakir M A, Al Homaidan A A, Al Farhan A H, Khan H A: *Genetics and Molecular Research*, **11**, 1934 (2012)
- 9) 松木吏弓, 阿部聖哉, 島野光司, 竹内亨, 梨本真: 日本生態学会誌, **58**, 105 ( 2008 )
- 10) 新家薰子, 清水隆二, 芹川俊彦, 安田和弘, 竹田正美, 大西道代: 石川県保健環境センター研究報告書, **48**, 42 ( 2011 ) .