

# チーズの二重染色試験法の改良

五十嵐 智大\*, 徳島 将光\*, 松本 啓嗣\*

## Improvement of the double staining test method of cheese

IGARASHI Tomohiro\*, TOKUSHIMA Masamitsu\* and MATSUMOTO Yoshitsugu\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

In the Japanese Customs Tariff Schedules, most dairy products are subject to ad valorem and specific taxes. Cheese is one of the exceptions which is only charged ad valorem tax, thus it is important to distinguish cheese from other dairy products for ensuring the appropriate collection of customs duty. Currently, cheese and other dairy products are identified with help of the several methods such as the Customs Analysis Method No. 124, "Double Staining Test Method of Protein and Fat in Cheese", in which the acrolein used in the method is no longer available. In this study, we investigated substitute reagents for acrolein and succeeded to develop a method to obtain comparable results. In addition, in recent years, cheeses containing more fat than usual are sometimes imported and we have been requested to analyze them. Accordingly we have developed a method to easily discriminate between them and we report this method as well as follows:

### 1. 緒 言

関税率表第 4 類に分類される乳製品の多くは従価税及び従量税が課せられている。チーズはその例外の一つで、従価税のみが課せられていることから、チーズとその他の乳製品の識別は適正かつ公平な関税の徴収のためには重要である。

現状では、税関分析法 No.124「チーズ中のたんぱく質と脂肪の二重染色試験法」に従って脂肪球の観察を行い、チーズとその他の乳製品の識別の一助としているが、この分析法で使用するアクロレイン（2-プロペナル）が終売となり、入手不可能となったため、今後もこの分析法を継続して実施することが困難となった。

本研究では、入手不可能となったアクロレインの代替となる試薬を検討し、アクロレインを使用した場合と遜色ない結果が得られる手法を開発したので報告する。

また、近年脂肪分を多く含むチーズの分析依頼が散見されており、このような試料における脂肪球の観察には熟練を要したが、このような試料においても、過剰な脂肪を除去することにより、脂肪球の観察が容易となるのではないかと考え、その除去法を検討したので併せて報告する。

### 2. 実 験

#### 2.1 試 料

市販のチーズ：3 検体

（カマンベールチーズ・クリームチーズ・ゴーダチーズ）

#### 2.2 試 薬

##### 2.2.1 税関分析法 No.124「チーズ中のたんぱく質と脂肪の二重染色試験法」用試薬

37%ホルムアルデヒド液（ホルマリン）、りん酸二水素カリウム、りん酸水素二ナトリウム十二水和物、塩化カルシウム二水和物、二亜硫酸ナトリウム、塩酸、デキストリン水和物、2-プロパノール（いずれも富士フイルム和光純薬製）、2-メチル-2-プロパノール、アクロレイン（いずれも東京化成工業製）、チオニン酢酸塩、オイルレッド O（いずれもメルク製）

##### 2.2.2 アクロレイン代替試薬

クロトンアルデヒド（2-ブテナール）、メタクロレイン（2-メチル-2-プロペナル）、アクロレインジエチルアセタール（いずれも東京化成工業製）

##### 2.2.3 過剰な脂肪分の除去用試薬

25%グルタルアルデヒド水溶液（富士フイルム和光純薬製）

#### 2.3 装 置

凍結マイクロトーム CM1510（ライカ製）

光学顕微鏡 BX51（オリンパス製）

#### 2.4 実 験

##### 2.4.1 試薬の調製

##### 2.4.1(1) 税関分析法 No.124「チーズ中のたんぱく質と脂肪の二重染色試験法」用試薬

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）

\* 財務省関税中央分析所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

ホルマリン 15 mL, 塩化カルシウム二水和物 1.5 g 及びイオン交換水 135 mL を混合したもの。

りん酸水素ナトリウム水溶液

りん酸二水素カリウム 484 mg をイオン交換水に溶解し、100 mL に定容したもの。

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十二水和物 6.46 g をイオン交換水に溶解し、100 mL に定容したもの。

アクロレイン溶液

りん酸二水素カリウム水溶液 50 mL, りん酸水素二ナトリウム水溶液 40 mL 及びアクロレイン 10 mL を混合したもの。

チオニン・シッフ試薬溶液

チオニン酢酸塩 0.2 g にイオン交換水 100 mL を加え、5 分間煮沸し、室温まで放冷後、蒸発した分量のイオン交換水を加える。このチオニン溶液に 2-メチル-2-プロパノール 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、よく攪拌したもの。冷暗所で保管し、用時にろ紙(No.1)でろ過して用いた。

オイルレッドO試薬溶液

オイルレッドO 0.27 g に 2-プロパノールを 90 mL 加えて混合し、60°C で一晩静置したものに、60°C の 1%(W/W)デキストリン水溶液 60 mL を混合し、直ちにろ紙(No.131)でろ過したもの。用時調製した。

#### 2.4.1(2) アクロレイン代替試薬検計用溶液

クロトンアルデヒド溶液及びメタクロレイン溶液

りん酸二水素カリウム水溶液 50 mL, りん酸水素二ナトリウム水溶液 40 mL 及びクロトンアルデヒド 10 mL またはメタクロレイン 10 mL を混合したもの。

アクロレインジエチルアセタール加水分解溶液

りん酸二水素カリウム水溶液 50 mL に、アクロレインジエチルアセタール 10 mL を加え、1 時間攪拌し、そこにりん酸水素二ナトリウム水溶液 40 mL を混合したもの。

#### 2.4.1(3) 過剰な脂肪分の除去用試薬

ホルマリン・グルタルアルデヒド溶液

ホルマリン 15 mL, 25%グルタルアルデヒド 6 mL 及びイオン交換水 129 mL を混合したもの。

#### 2.4.2 顕微鏡観察試料の調製

##### 2.4.2(1) 税関分析法 No.124「チーズ中のたんぱく質と脂肪の二重染色試験法」に基づく調製

包埋用樹脂で包埋後、液体窒素により凍結した試料を、凍結ミクロトームで厚さ 10  $\mu$ m の切片とし、APS コート済のスライドガラスに移し、15 分～2 時間程度乾燥させた。

乾燥した切片を Baker のカルシウム・ホルマリン溶液に 30 分間浸した後、流水で 5 分間洗浄した。

洗浄後室温でアクロレイン溶液に 60 分間浸した後、イオン交換水に 5 分間浸した。更にイオン交換水を交換し同様の操作

を 2 回繰り返した。

その後、チオニン・シッフ試薬溶液に 30 分間浸した後直ちに流水で 20 分間洗浄し、イオン交換水ですすいだ。

次にあらかじめ 37°C にした 60% (V/V) 2-プロパノール水溶液に 1 分間浸した後、37°C のオイルレッドO 試薬溶液に 15 分間浸し、再び 37°C の 60%(V/V) 2-プロパノール水溶液に 2 分間浸した後、流水で 5 分間洗浄し、イオン交換水ですすいだ。

洗浄後切片上に水溶性樹脂封入剤を滴下し、カバーガラスで覆って観察用試料とした。

##### 2.4.2(2) アクロレイン代替試薬の検計

2.4.2(1)と同様に、アクロレイン溶液に代わり、クロトンアルデヒド溶液、メタクロレイン溶液及びアクロレインジエチルアセタール加水分解溶液を用いて観察用試料を調製した。

##### 2.4.2(3) 過剰な脂肪分の除去

包埋用樹脂で包埋後、液体窒素により凍結した試料を、凍結ミクロトームで厚さ 10  $\mu$ m の切片とし、APS コート済のスライドガラスに移し、30 分～2 時間程度乾燥させた。

乾燥した切片を Baker のカルシウム・ホルマリン溶液またはホルマリン・グルタルアルデヒド溶液に 30 分間浸した後、2-プロパノールに 30 秒間浸した。

流水で 5 分間洗浄し、室温でアクロレインジエチルアセタール加水分解溶液に 60 分間浸した後、イオン交換水に 5 分間浸した。更にイオン交換水を交換し同様の操作を 2 回繰り返した。

その後、チオニン・シッフ試薬溶液に 30 分間浸した後直ちに流水で 20 分間洗浄し、イオン交換水ですすいだ。

次にあらかじめ 37°C にした 60% (V/V) 2-プロパノール水溶液に 1 分間浸した後、37°C のオイルレッドO 試薬溶液に 15 分間浸し、再び 37°C の 60%(V/V) 2-プロパノール水溶液に 2 分間浸した後、流水で 5 分間洗浄し、イオン交換水ですすいだ。

洗浄後切片上に水溶性樹脂封入剤を滴下し、カバーガラスで覆って観察用試料とした。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 アクロレイン代替試薬の検計

2.4.2(1)及び 2.4.2(2)により調製した試料の顕微鏡観察像を Fig.1 に示す。

アクロレイン溶液の代替としてメタクロレイン溶液を用いた場合では、たんぱく質がほぼ染色されていないことが確認できた。

クロトンアルデヒド溶液を用いた場合では、アクロレイン溶液よりはやや劣るものの、たんぱく質が青色に染色されており、構造の確認が可能であることが示唆された。

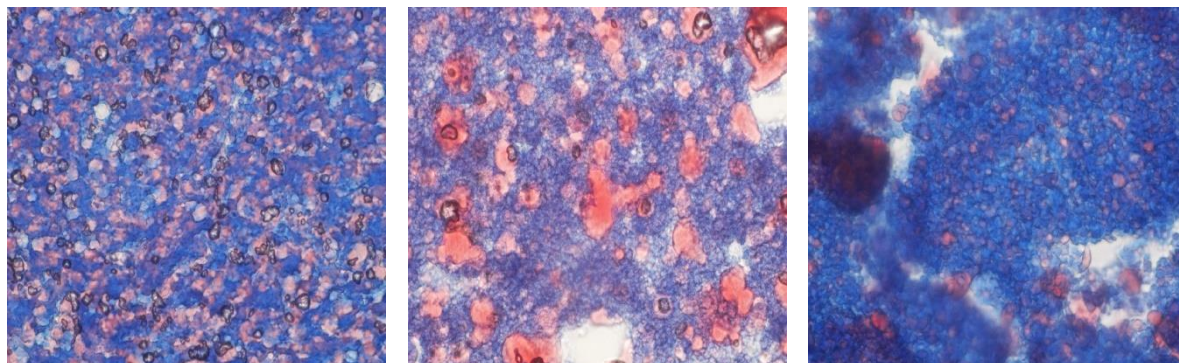
アクロレインジエチルアセタール加水分解溶液を用いた場合では、アクロレイン溶液と遜色なく、たんぱく質が青色に染色され

ており、構造の確認が可能であった。

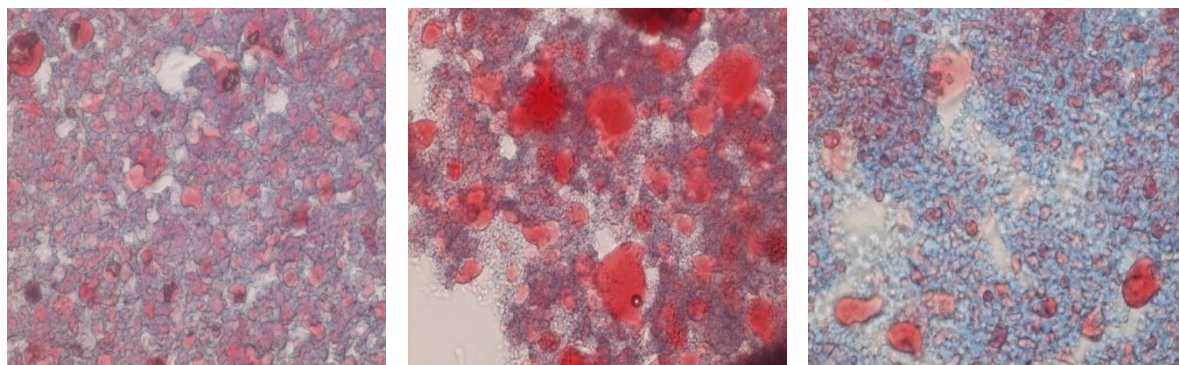
以上から、アクロレインの代替試薬としては、アクロレイン溶液と同等の時間で遜色なく染色されるアクロレインジエチルアセタールを選択した。

クロトンアルデヒドについては、たんぱく質を染色することが可能であるものの、アクロレインと同等の時間では染色が弱いことから、選択しなかった。

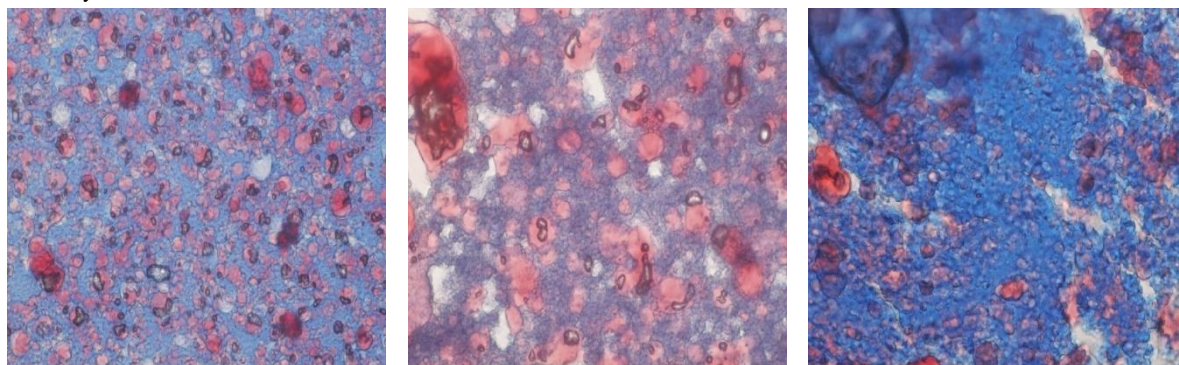
(A) acrolein



(B) methacrolein



(C) crotonaldehyde



(D) acrolein diethyl acetal hydrolysate

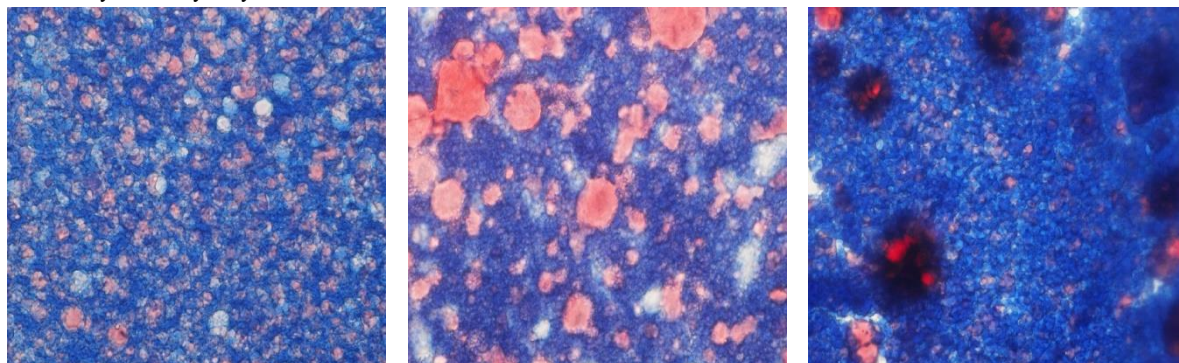


Fig. 1 Microscope images of double staining test with acrolein and alternatives (left: Camembert cheese, center: cream cheese, right: Gouda cheese).



### 3.2 過剰な脂肪分の除去

脂肪分を多く含むチーズの二重染色試験法の結果を Fig.2 に示す。脂肪球の外側まで脂肪分が広がっており、脂肪球の観察が困難となっていることがわかる。そこで、過剰な脂肪分を除去することで、脂肪球の観察が容易にならないかと考え、検討を行った。

2.4.2 (3)により調製した試料の顕微鏡観察像を Fig.3 に示す。

いずれの試料においても、2-プロパノール処理を行わなかった場合 (Fig.1-(D)) と比較して、脂肪球の外部に広がった脂肪分が洗い流されていることが確認できた。

固定化を Baker のカルシウム・ホルマリン溶液で行ったものでは、脂肪を除去しすぎてしまい、発色が薄くなっている場合があったが、ホルマリン・グルタルアルデヒド溶液を用いた物では、脂肪の発色も良好であった。

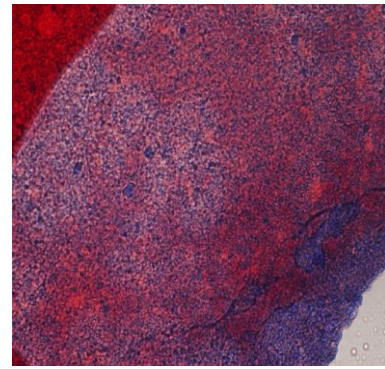
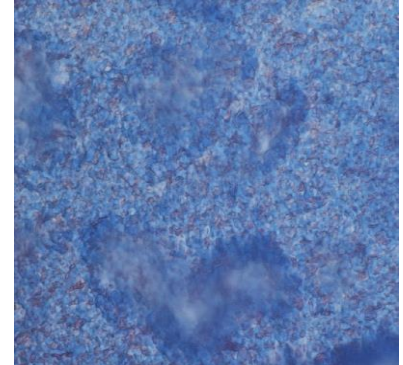
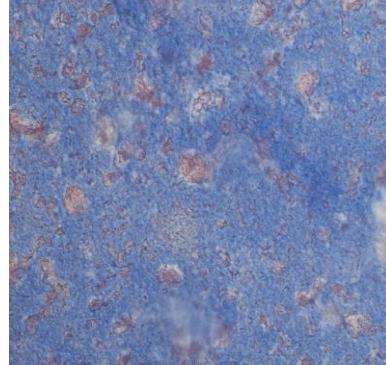
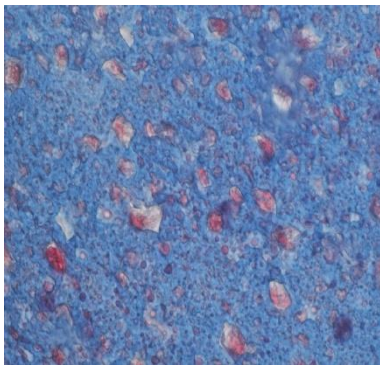


Fig.2 Microscope images (X400) of double staining test for much fat containing cheese.

#### (A) Baker's calcium chloride - formalin solution



#### (B) Formalin - glutaraldehyde solution

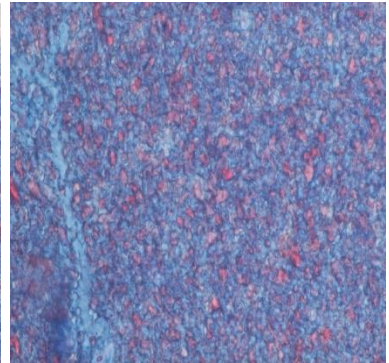
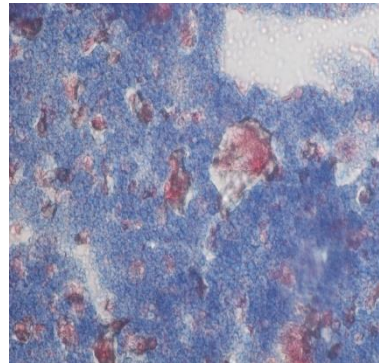
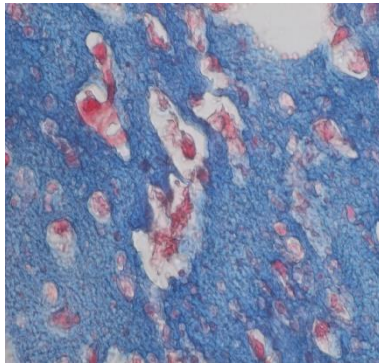


Fig. 3 Microscope images of double staining test with washing by 2-propanol after fixation. (left: Camembert cheese, center: cream cheese, right: Gouda cheese).

## 4. 要 約

本研究では税関分析法 No.124「チーズ中のたんぱく質と脂肪の二重染色試験法」で用いるアクロレイン試薬の代替として、アクロレインジエチルアセタールをりん酸酸性溶液中で加水分解することで得られるアクロレインを用いても良好な結果が得られるこ

とを見出した。

また、脂肪分を多く含むチーズの分析に際して、ホルマリン・グルタルアルデヒド溶液による固定化後に、2-プロパノールに短時間浸漬することで、過剰な脂肪分を除去し、脂肪球の観察が容易になることが示唆された。

## 文 献

- 1) 税関分析法 No.124 「チーズ中のたんぱく質と脂肪の二重染色試験法」