

34. 健康被害防止を目的とした食品中発がん性カビ毒類の迅速かつ簡易な分析法の開発

○後藤 操、服部 涼子（兵庫県立健康生活科学研究所）

【目的】

2004年、ケニアでアフラトキシンにより100名以上が亡くなる中毒事件が発生した。天然物質中で最強の発がん性物質の一つであるアフラトキシンに代表されるカビ毒は、摂食により急性中毒から慢性毒性や発がんなど様々な健康被害を及ぼす化合物である。近年、輸入食品でアフラトキシンの基準値超過事例が相次ぎ、また、流通食品の実態調査でアフラトキシン B₁に加え、B₂、G₁及びG₂の複合汚染の増加傾向が認められ、2011年にはアフラトキシン B₁単独から4種類のアフラトキシンの総量へと規制が強化された。さらに、腎毒性が知られているオクラトキシン A、エストロゲン様作用を持つゼアラレノンなど、その他のカビ毒による複合的な汚染も確認されている。このような状況の中、カビ毒による健康被害の未然防止のためには、より多くの食品、多くのカビ毒に対応した迅速かつ効率的な分析法の開発が重要である。

そこで本研究では、高感度検出が可能な蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ (LC-FL) を用い、最も毒性の強いアフラトキシン類 (B₁、B₂、G₁、G₂) の迅速・簡便なスクリーニング分析法を開発し、多種類の食品への適用を検討した。また、複合汚染の報告のあるトウモロコシを対象試料として、アフラトキシン類、オクラトキシン A、ゼアラレノン、フモニシン B₁ の同時精製を組み合わせた簡便なスクリーニング分析法を検討した。

【方法】

1. 試薬及び試料

- (1) 標準物質：アフラトキシン混合標準溶液 (B₁、B₂、G₁、G₂ の各 25µg/mL) は SIGMA 製、オクラトキシン A 標準溶液 (10µg/mL) 及びゼアラレノン標準溶液 (100µg/mL) は和光純薬製、フモニシン B₁ 標準溶液 (50µg/mL) は Fluka 製をそれぞれ用いた。
- (2) 試薬等：蛍光誘導体化試薬としてトリフルオロ酢酸 (TFA) 及び o-フタルアルデヒド (OPA) を用いた。OPA は、あらかじめ 40mg を精秤し、メタノール 1mL で溶解後、0.1M 四ほう酸ナトリウム溶液 5mL で希釈し、メルカプトエタノール 50µL を添加して OPA 反応溶液とし、使用時まで暗所保存した。試薬はいずれも和光純薬製でアセトニトリル、メタノールは HPLC 用、OPA は生化学用を用い、その他の試薬は全て特級を用いた。

ISOLUTE Myco (60mg/3mL, Biotage 製) 固相カラムは、アセトニトリル 2mL 及び水 2mL でコンディショニングしたものを使用した。

- (3) 試料：全て兵庫県内で市販されている食品を用いた。

2. 試験溶液の調製

(1) アフラトキシン類 (B₁、B₂、G₁、G₂) の分析

粉砕・均一化した試料 5.0g を秤量し、アセトニトリル-水 (9+1) 20mL を加えて 30 分間振とう抽出後、遠心分離を行った。その上澄液 4mL を分取し、水 28mL を加えて抽出希釈液を得た。あらかじめコンディショニングを行った ISOLUTE Myco に抽出希釈液 6mL を負荷後、10mM 酢酸アンモニウム 3mL 及び 10mM 酢酸アンモニウム-アセトニトリル (9+1) 3mL でカラムを洗浄し、0.1%ギ酸含有アセトニトリル 2mL で溶出した。試料溶出液を濃縮乾固後、TFA 0.1mL を添加し、暗所に 15 分静置して誘導体化を行い、アセトニトリル-水 (1+9) 0.9mL を加えて試験溶液とした。

(2) 多成分分析

粉砕・均一化した試料 5.0g を秤量し、アセトニトリル-水 (1+1) 20mL を加えて 30 分間振とう抽出後、遠心分離を行った。その上澄液 8mL を分取し、水 32mL を加えて抽出希釈液を得た。あらかじめコンディショニングを行った ISOLUTE Myco に抽出希釈液 6mL を負荷後、水 3mL 及びアセトニトリル-水 (1+9) 3mL でカラムを洗浄した。0.1%ギ酸含有アセトニトリル 2mL 及びメタノール 2mL で溶出後、アフラトキシン類 (AFs) 分析用として 1mL、オクラトキシン A (OTA) 及びゼアラレノン (ZEN) 分析用として 2mL、フモニシン B₁ (FB₁) 用として 1mL を分液した。いずれの試料溶出液も濃縮乾固し、AFs 分析用には TFA 0.1mL 添加後、暗所に 15 分静置して誘導体化を行い、アセトニトリル-水 (1+9) 0.9mL を加えて試験溶液とした。また、OTA 及び ZEN 分析用はアセトニトリル-水 (1+1) 1mL、FB₁ 分析用はアセトニトリル-水 (3+7) 1mL にそれぞれ溶解し試験溶液とした。FB₁ の試験溶液は、LC 測定直前に、あらかじめ調製した OPA 反応溶液と 1 : 1 で混合し測定した。

3. 装置及び測定条件

装置：島津製作所製の LC-20A システムを用いた。

測定条件

(1) AFs の分析；カラム：Inertsil ODS-3 (GL サイエンス製，5 μ m，4.6mm \times 250mm)

移動相：アセトニトリル-水-メタノール(1+6+3.5) カラム温度：40 $^{\circ}$ C

流速：1.0ml/min. 注入量：20 μ l 測定波長 (励起波長/蛍光波長)：365nm/450nm

(2) 多成分分析；カラム：XBridge BEH C18 (Waters 製，3 μ m，4.6mm \times 150mm)

移動相：AFs；アセトニトリル-水-メタノール(1+6+3)、

OTA 及び ZEN；アセトニトリル-リン酸-水-メタノール (42+0.4+52+6)

FB₁；Ⓐアセトニトリル-水-酢酸 (30+69+1)、Ⓑアセトニトリル-水-酢酸 (60+39+1)

グラジエント：Ⓑ40%(0分) \rightarrow (5分) \rightarrow 88%(26分) \rightarrow (29分) \rightarrow 100%(30分)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C 流速：0.7ml/min. 注入量：20 μ l

測定波長 (励起波長/蛍光波長)：AFs；365nm/450nm、

ZEN；276nm/460nm、OTA；330nm/460nm、FB₁；335nm/440nm

【結果及び考察】

1. アフラトキシン類 (B₁、B₂、G₁、G₂) のスクリーニング分析法の検討

(1) 分析法の検討

アフラトキシン類 (AFs) の分析では、精製にイムノアフィニティカラム (IAC) あるいは多機能カラム (MFC) が汎用されている。IAC は夾雑ピークが少ないが、試料やロット間で回収率が安定しないことがあり、また MFC は作業が容易で有効期限は長い、夾雑ピークが多い¹⁾。現在、多種類の IAC、MFC が利用可能で、分析時には試料により適応したカラムが選択されている。今回、ポリマー固相にカビ毒保持官能基が修飾された、IAC 及び MFC とは異なるタイプのカラムを精製に用い、ピーナッツを試料として検討を行った。

AFs の抽出では、アセトニトリル-水 (1+1)、(4+1)、(9+1) 及びメタノール-水 (4+1) の 4 種類の有機溶媒を比較した。その結果、アセトニトリル-水 (4+1) 及び (9+1) で同程度に夾雑物が少なく、公定法²⁾で用いられているアセトニトリル-水 (9+1) を採用した。精製工程では、カラムへの通液量、洗浄液量及び溶出液の最適条件を検討した結果、通液量 6mL、洗浄液量 3mL、溶出液が 0.1%ギ酸含有アセトニトリル 2mL の条件で十分な回収率が得られた。ピーナッツに AFs を規制値 (各 2.5ng/g) 相当となるよう添加した試料のクロマトグラムを図 1 に示した。

(2) 食品類における回収率の測定

主に MFC が用いられている、穀類 (ソバ、トウモロコシ)、種実類 (ピーナッツ、ピスタチオ、アーモンド)、豆類 (大豆、ひよこ豆) と主に IAC が用いられている、乾燥果実類 (レーズン、スライス)、加工食品 (ピーナッツバター) の 5 系統 10 種類の食品で、本分析法の適用を検討した。LC 分析において、移動相を公定法²⁾と同様にアセトニトリル-水-メタノール (1+6+3) で行ったが、レーズン等で AF と夾雑ピークが重複した。

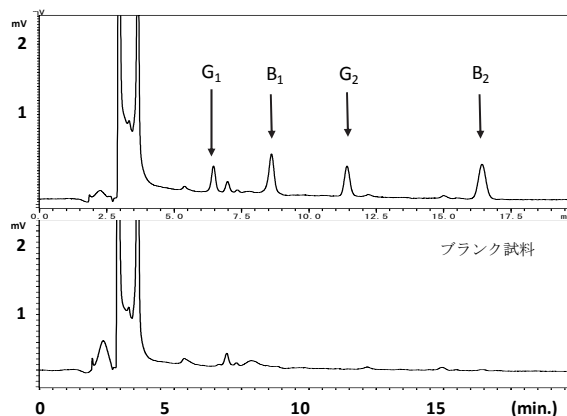


図 1 ピーナッツ試料中のアフラトキシン類のクロマトグラム

表 1 食品中アフラトキシン類の回収率

食品	アフラトキシンB ₁	アフラトキシンB ₂	アフラトキシンG ₁	アフラトキシンG ₂
	回収率 (%) (平均±S. D.、n = 3)			
ソバ	95.7 ± 12.1	93.2 ± 5.9	104.4 ± 11.0	84.6 ± 7.4
トウモロコシ	87.2 ± 14.8	86.0 ± 9.7	80.2 ± 8.7	90.0 ± 10.1
アーモンド	88.5 ± 7.5	89.3 ± 6.2	83.8 ± 9.3	79.4 ± 3.4
ピスタチオ	78.5 ± 11.4	80.3 ± 14.4	76.2 ± 5.8	71.8 ± 1.4
ピーナッツ	83.9 ± 3.2	95.3 ± 3.7	75.5 ± 5.9	84.0 ± 3.4
大豆	91.2 ± 0.8	93.1 ± 5.8	87.1 ± 1.4	92.6 ± 2.4
ひよこ豆	101.2 ± 10.3	96.0 ± 2.1	90.5 ± 6.1	90.4 ± 1.7
レーズン	92.0 ± 4.6	91.2 ± 5.8	91.7 ± 15.5	84.7 ± 8.5
バナナスライス	101.5 ± 10.7	90.6 ± 12.4	95.1 ± 20.5	73.9 ± 11.6
ピーナッツバター	89.4 ± 4.6	100.6 ± 5.7	80.3 ± 9.3	76.1 ± 10.2

そこで、移動相の有機溶媒比率を比較した結果、アセトニトリル-水-メタノール (1+6+3.5) で夾雑ピークを分離できたため、この移動相条件を採用した。表 1 に各食品に対する AFs (添加濃度 : 各 2.5ng/g) の回収率を示した。回収率は 71.8%~104.4%の範囲で、いずれの食品も良好な結果が得られ、定量限界は、いずれも 0.2ng/g であった。

本分析法は、MFC あるいは IAC で使い分けが必要であった食品類に対し、1 種類のカラムによる同じ前処理作業で精製可能であり、簡易・迅速にアフラトキシンを分析できた。

2. 多成分カビ毒のスクリーニング分析法の検討

トウモロコシを試料に汚染実績のあるカビ毒のうち、AFs (B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2)、オクラトキシン A (OTA)、ゼアラレノン (ZEN)、フモニシン B_1 (FB_1) の計 7 種類を添加し、ISOLUTE Myco による同時精製を組み合わせた多成分分析法を検討した。

7 種類のカビ毒の同時精製に際し、抽出溶媒はアセトニトリル-水 (1+1) でこれらのカビ毒は安定であった。精製工程では、カラムへの通液量及び洗浄液量がそれぞれ 6mL 及び 3mL で良好な回収率が得られた。しかし、溶出液は 0.1%ギ酸含有アセトニトリル 2mL のみでは回収率が低値となったため、さらにメタノール 2mL で溶出することで改善した。

AFs、OTA 及び ZEN の同時分析法の報告はあるが、ジクロロメタンを用いる上、工程数が多く煩雑である³⁾。そこで、得られた溶出液を AFs 用、OTA 及び ZEN 用、 FB_1 用の 3 系統に分液し、それぞれ LC 測定に適した試験溶液に調製した。分液した試料溶液は、いずれも N_2 で濃縮乾固し、AFs 用は TFA による誘導体化、OTA 及び ZEN 用はアセトニトリル-水 (1+1) への再溶解、 FB_1 用はアセトニトリル-水 (3+7) への再溶解と、簡易な作業で短時間に試験溶液を調製できた。LC の測定では、AFs の分析後、引き続き OTA 及び ZEN の分析が可能であるため、オートサンプラのプログラムにより、効率良く測定作業を行うことができた。 FB_1 については OPA による蛍光誘導体化を行い測定した。

OTA (20.0ng/g)、ZEN (0.8 μ g/g)、 FB_1 (4.0 μ g/g) を添加した試料のクロマトグラムを図 2 及び図 3 に示した。また、添加回収試験では規制値を考慮した濃度のカビ毒を添加した試料の回収率を表 2 に示した。なお、OTA、ZEN、 FB_1 の国内の規制値は ZEN (飼料 : 1.0 μ g/g) の他は未設定で、各国の主な規制値 (例 ; OTA (生穀類 : 5.0ng/g (EU)) を参照した。回収率は 81.0%~100.8%の範

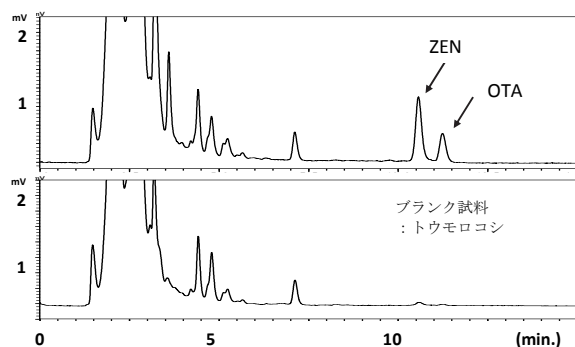


図 2 オクラトキシンA及びゼアラレノンのクロマトグラム

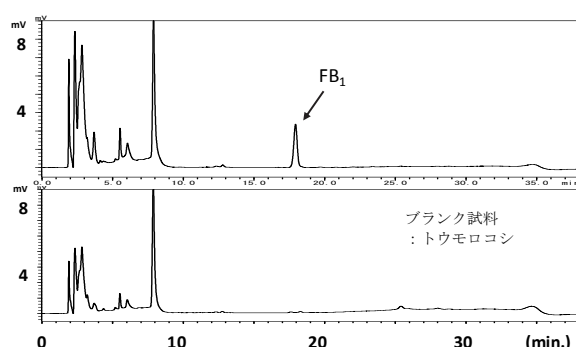


図 3 フモニシン B_1 のクロマトグラム

囲で、いずれのカビ毒においても良好な結果であった。また、定量限界はAFsでG₁が1.0ng/g、B₁、B₂、G₂は各0.5ng/g、OTAが2.0ng/g、ZENが20.0ng/g、FB₁が100.0ng/gであった。

本分析法は、簡便な前処理作業により7種類のカビ毒を同時精製でき、感度及び回収率ともに良好であった。

表 2 トウモロコシ中カビ毒の添加回収率

	添加濃度 回収率 (%) (n=3)	
	(ng/g)	平均±S. D.
アフラトキシンB1	2.5	95.9 ± 7.5
アフラトキシンB2	2.5	94.5 ± 3.6
アフラトキシンG1	2.5	81.0 ± 2.7
アフラトキシンG2	2.5	98.9 ± 3.4
ゼアラレノン	200.0	100.8 ± 7.9
オクラトキシンA	5.0	95.0 ± 5.5
フモニシンB1	200.0	82.1 ± 9.0

【まとめ】

(1) 最も毒性の強いアフラトキシン類のLC-FLによる分析法を検討した結果、これまで異なる抽出・精製工程が必要であった食品群を、簡易な作業で一律に前処理を行うことができた。感度及び回収率とも良好であり、健康被害を未然に防ぐため、幅広い食品に対し、迅速かつ効率的にアフラトキシン汚染をサーベイランスする上で、有用なスクリーニング分析法と考えられる。今後、さらに多くの食品に対し適用性を検討する予定である。

(2) 今回検討した分析法は、7種類のカビ毒を簡便な抽出・精製工程で同時に精製することができ、感度及び回収率ともに良好であった。カビ毒が原因かどうか疑われる食中毒事例において、迅速に対応可能なスクリーニング分析法として活用できると考えられる。

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成を頂きました公益財団法人大同生命厚生事業団並びに関係者の皆様に心より感謝いたします。

【参考文献】

- 1) 田端節子：食衛誌, 53, 129-138(2012)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：平成23年8月16日、食安発0816第1号
- 3) Göbel, R. et al. : J. AOAC Int., 87, 411-416(2004)

【経費使途明細】

使途内容	金額 (円)
カビ毒標準品購入費 (オクラトキシンA等3物質)	156,276
分析用カラム購入費 (X Bridge BEH C18)	34,125
分析用器具・消耗品購入費 (デジタルシリンジ、ディスポシリンジ等)	113,843
旅費 (助成金贈呈式出席)	820
合計 (助成金300,000円、交通費5,000円及び預金利息64円含む)	305,064