

技術レポート

2 イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のアフラトキシンの定量

青山 幸二*, 渡部 千会*

1 緒 言

近年注目を浴びているイムノアフィニティーカラム (IAC) は、アガロースゲル等の担体にモノクローナル抗体を固定化したものをミニカラムに詰めた精製用カラムであり、特にカビ毒の分析に利用されている。IAC は選択性の高い抗原抗体反応を利用するため、1 本のカラムで大半の夾雑物質を取り除くことができ、かつ、液体クロマトグラフ等に試料溶液を大量に注入できるため、目的成分を高感度で測定することが可能である。また、有機溶媒の使用量の軽減、操作の簡易性等の利点もある。

カビ毒の中には規制値が数 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) レベルもしくはそれ以下のものも見られるため、その規制値に対応するには ppt (ng/kg) レベルでの定量が可能な分析法が必要である。その上、近年では、迅速性も求められているため、その両方の要求を満たすことが必要となってきた。なお、IAC を用いた分析法は 1991 年以降、AOAC International (AOACI) の Official Methods of Analysis (OMA) ¹⁾ (表 1) にいくつか採用されている。

現在、我が国では、カビ毒の一つであるアフラトキシンについては、配合飼料中のアフラトキシン B₁ (AFB₁) として指導基準値 ²⁾ が設定されている。しかしながら、Codex や EU 等ではトータルアフラトキシン (AFB₁, アフラトキシン B₂ (AFB₂), アフラトキシン G₁ (AFG₁) 及びアフラトキシン G₂ (AFG₂) の総量) として規制値を設定する趨勢である。

そこで、アフラトキシン 4 種類の定量法について、より正確で、より低レベルまでの定量を可能にするため、IAC の適用について検討したので報告する。

表 1 OMA of AOACI に採用されている IAC を用いたカビ毒分析法一覧

番号	カビ毒*	対象試料
991.31	AFB ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	とうもろこし, 生ピーナッツ, ピーナッツバター
999.07	AFB ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	ピーナッツバター, ピスタチオペースト, イチジクペースト, パプリカパウダー
2000.16	AFB ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	ベビーフード
2003.02	AFB ₁	牛用飼料
2000.08	AFM ₁	牛乳
2001.04	FMB ₁ , B ₂	とうもろこし, コーンフレーク
2000.03	OTA	大麦
2000.09	OTA	焙煎コーヒー豆
2001.01	OTA	ワイン, ビール
2004.10	OTA	生コーヒー豆

* AF : アフラトキシン (B₁, B₂, G₁, G₂ 及び M₁),
 FM : フモニシン (B₁ 及び B₂),
 OTA : オクラトキシン A

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2 実験方法

2.1 試料

市販の飼料原料及び分析法検討用に作成された試験飼料をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

2.2 試薬

1) アフラトキシスタンダード

AFB₁, AFB₂, AFG₁ 及び AFG₂ スタンダード (3 µg/mL, ベンゼン-アセトニトリル (49+1) 溶液, Supelco 製) それぞれ 1 mL とベンゼン-アセトニトリル (49+1) 2 mL を正確に混合したものをアフラトキシスタンダード混合原液 (この液 1 mL は各アフラトキシスタンダードとして 500 ng を含有する。) とした。アフラトキシスタンダード混合原液をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に各アフラトキシスタンダードとして 1 ng 及び 10 ng を含有するアフラトキシスタンダード混合中間標準液を調製した。なお、スタンダード原液及び混合標準原液は-20°C 以下で保存した。

2) 溶媒はすべて液体クロマトグラフ用試薬を用いた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) はタブレット (Sigma 製) を用いて調製した。その他の試薬は特級試薬を用いた。

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ: Agilent Technologies 製 1100 Series

2) 振とう器: タイテック製 RECIPRO SHAKER SR-2W

3) 遠心エバポレーター: 東京理化学製 CVE-3100

4) 高速遠心分離器: 久保田商事製 KM-15200

5) ろ紙: Advantec 製 5A

6) ガラス繊維ろ紙: Whatman 製 934-AH, GF/F 及び Advantec 製 GF-75

7) IAC: R-Biopharm Rhône 製 Easi-Extract Aflatoxin, Vicam 製 AflaTest WB 及び Romer Labs 製 AflaStar FIT

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 50.0 g を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、塩化ナトリウム 5 g 及びメタノール-水 (4+1) 150 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液をろ紙でろ過し、ろ液 5 mL を 50 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、標線まで PBS を加えて希釈した。希釈した溶液をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を IAC による精製に供する試料溶液とした。

2) IAC による精製

IAC 内の溶液を液面がカラム内ゲルの上面に達するまで 1 秒間に 1 滴程度の流速で流出後、カラム筒の上端まで PBS を加え、同様に流出させた。更に PBS を加え、液面がカラム筒の半分程度になるまで流出させた。IAC の上にリザーバーを連結し、試料溶液 15 mL を正確に加え、液面がカラム内ゲルの上面に達するまで流出させた。一旦リザーバーを取り外し、カラム筒の上端まで PBS を加え、半分程度流出させた後、再びリザーバーを取り付け、PBS 15 mL を加え、カラムを洗浄した。PBS 流出後リザーバーを取り外し、カラム筒の半分程度まで水を加え流出させた後、水 15 mL で同様にカラムを洗浄した。リザーバーを取り外し、空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を取り除いた後、褐色スクリーニング試験管をカラムの下に置き、アセトニトリル 1 mL を加えて各アフラトキシンを溶出させた。5 分程度放置後、アセトニトリル 1 mL を 2 回加え、再び各アフラトキシンを溶出させた。空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を

溶出させ、すべての溶出液を誘導体化反応に供する試料溶液とした。

3) 誘導体化反応

試料溶液を 50°C 以下でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。残留物にトリフルオロ酢酸 100 μL を正確に加え、栓をして振り混ぜた後 15 分間放置した。これに水-アセトニトリル (9+1) 900 μL を正確に加えて振り混ぜ、プラスチック製遠心沈殿管に移し、5,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

同時に、1 ng/mL のアフラトキシン混合中間標準液 50 μL 及び 100 μL 、10 ng/mL の中間標準液 100 μL 、500 μL 及び 1,000 μL をそれぞれ褐色スクリー栓試験管に正確に入れた。50°C 以下でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し、以下試料溶液と同様に誘導体化を行い、1 mL 中に各アフラトキシンとして 0.05 ng, 0.1 ng, 1 ng, 5 ng 及び 10 ng を含有する各アフラトキシン標準液を調製した。

4) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各アフラトキシン標準液それぞれ 50 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを作成し、ピーク高さより試料中の各アフラトキシン量を算出した。

なお、液体クロマトグラフの測定条件を表 2 に示した。

表 2 液体クロマトグラフ測定条件

検出器	蛍光検出器 (励起波長360 nm, 蛍光波長450 nm)
カラム	Mightysil RP-18 GP (内径4.6 mm, 長さ250 mm, 粒径5 μm)
カラム槽温度	45°C
溶離液	水-メタノール-アセトニトリル-0.2 mol/L酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) (11+6+2+1)
流速	1.0 mL/min

3 結果及び考察

3.1 分析法の検討

本法を検討するにあたっては、OMA of AOACI¹⁾に採用されている方法、ISO に採用予定である方法 (ISO/FDIS 17375) 及び厚生労働省による食品中のカビ毒汚染実態調査に使用された方法³⁾⁻⁵⁾を参考に、飼料及び多種類の IAC に適用可能であると思われる方法を設定した。

とうもろこし、マイロ及び試験飼料 8 種類を用いて回収率の確認を行った。初めに試料溶液の IAC への負荷量を 30 mL (試料 1 g 相当量) で検討を行ったところ、試験飼料の一部で回収率が 70%を下回るものが見られた。

IAC を用いた分析では、オクラトキシン A の分析の際のカフェインのように、特定の物質が抗原抗体反応を阻害し回収率を低下させることがあり^{6),7)}、この現象は IAC に負荷する量を減らすことによりある程度改善されることが知られている。そこで、IAC への負荷量を 15 mL (試料 0.5 g 相当量) に変更したところ回収率が改善された。

3.2 添加回収試験

IAC の種類による回収率及び繰返し精度の違いを確認するために添加回収試験を実施した。

2.3 に示した 3 種類の IAC (A, B 及び C) について回収率及びその相対標準偏差 (RSD) を求めるため、とうもろこし及びマイロに、各アフラトキシンとしてそれぞれ 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加

した試料について、本法に従って3回分析を行った。その結果を表3に、得られたクロマトグラムの一例を図1に示した。なお、マイロの一部で自然汚染によるものと思われる異常値が見られたため、それらは $n=2$ の結果を示した。

表3のとおり、とうもろこしについては、Aではほぼ良好な結果が得られた。B及びCでは全体的に回収率が低かったが、特にアフラトキシシンGグループの回収率が低く、CではRSDの値も高かった。また、マイロについては、A及びBでは良好な結果が得られたが、CではアフラトキシシンGグループの回収率が多少低かった。

各IACは同じロットのものをを用いたが、以上のように、同じロット内でも得られた値にばらつきが多いものが見られた。また、回収率についても低いものが見られた。このため、回収率及びRSDの目標値をそれぞれ70~120%及び20%以下とすると、IACを用いた分析法を飼料分析基準とするには、更なる検討が必要であると考えられた。

表3 添加回収試験（各アフラトキシシンとして0.5 µg/kg 相当量添加）

試料	IAC	AFB ₁		AFB ₂		AFG ₁		AFG ₂	
		回収率 ^{a)}	(RSD ^{b)})	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)
とうもろこし	A	71.8	(3.4)	80.3	(1.5)	73.9	(17.4)	75.6	(15.8)
	B	59.1	(15.5)	67.8	(16.1)	46.8	(5.3)	49.9	(5.8)
	C	68.0	(6.2)	75.6	(5.3)	53.5	(31.8)	52.3	(31.2)
マイロ	A	77.2 ^{c)}	(0.4)	82.9	(1.0)	86.5 ^{c)}	(2.1)	87.5 ^{c)}	(0.6)
	B	75.9	(2.3)	82.0	(0.9)	80.5	(6.8)	81.8	(1.7)
	C	72.3	(4.2)	76.2	(2.1)	69.1	(15.2)	63.9	(7.4)

a) 平均回収率, $n=3$

b) 相対標準偏差

c) $n=2$

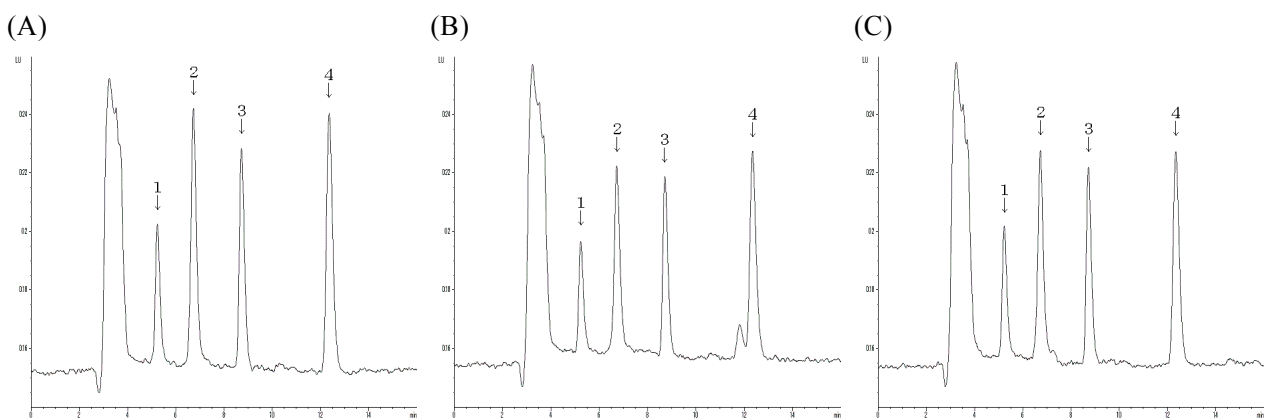


図1 添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例

測定条件は表2のとおり。

(A) 標準液（各アフラトキシシン 0.25 ng/mL）

(B) とうもろこし

(C) マイロ

矢印は1：AFG₁誘導体（AFG_{2a}），2：AFB₁誘導体（AFB_{2a}），3：AFG₂，4：AFB₂

文 献

- 1) Horwitz, W. ed.: "Official Methods of Analysis of AOAC International", 18th Ed., Maryland, USA, AOAC International (2005).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：“飼料の有害物質の指導基準の制定について”，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 3) Sugita-Konishi, Y., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S. and Kumagai, S.: *J. Food Prot.*, **69**, 1365 (2006).
- 4) 厚生労働科学研究費補助金，食品の安全性高度化推進研究事業，食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究，平成 16 年度総括・分担研究報告書（主任研究者 小西良子）(2005).
- 5) 厚生労働科学研究費補助金，食品の安心・安全確保推進研究事業，食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究，平成 17 年度総括・分担研究報告書（主任研究者 小西良子）(2006).
- 6) Castegnaro, M., Tozlovanu, M., Wild, C., Molinié, A., Sylla, A. and Pfohl-Leszkowicz, A.: *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 480 (2006).
- 7) Entwisle, A.C., Williams, A.C., Mann, P.J., Russell, J., Slack, P.T. and Gilbert, J.: *J. AOAC Int.*, **84**, 444 (2001).