

資料

アフラトキシン検査法に関する考察

岩屋 あまね 下堂 蘭 栄 子 榎 元 清 美
 福司山 郁 恵 佐久間 弘 匡

1 はじめに

アフラトキシン（以下「AF」という。）はカビ毒の一つで、天然で最強の発がん性物質であり、熱に強いいため調理加工では分解されないという厄介な性質を持つ。AFを産生する菌は高温多湿の環境を好み、主に熱帯及び亜熱帯地域に分布する。日本で大規模に実施されたAF産生菌の分布調査では、一部の暖地及び南西諸島以南以外からはAF産生菌は検出されなかった^{1) 2)}。そのため、日本国内で生産、製造された食品のAF汚染はほとんどないと考えられていた。

しかし、近年ではAF産生菌が九州や関東の土壌から検出され^{3) 4)}、日本の広い地域に存在している可能性が示唆されている。本県でもAF産生菌が検出されており、特に奄美諸島では高率に検出された¹⁾。また、本県は温暖な気候（温帯～亜熱帯）で、カビの生育に適した高温多湿の環境になりやすいことから、食品のAF汚染が危惧される。しかし、現在までに本県に流通する食品のAF含有量調査を実施した例はなかった。

一方、世界のAF規制の状況を鑑み、日本でも2011年3月31日付けの通知⁵⁾でAF規制が強化され、2011年10月1日より適用されることとなった。これにより、AFB₁量が10ppb未満という規制から、総AF量（AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂）が10ppb未満の規制へと変更になった。

そこで、2010年度から2か年計画で、県内流通食品について、県内産食品を中心に総AF含有量を調査し、その実態を把握することにした。今回は、その前段階として、AF検査法における試料精製カラム及び測定機器等について検討し、知見を得たので報告する。

2 調査方法

2.1 試料

生の穀類、豆類、種実類（以下「生穀類等」という。）の検体として県内産玄米を、焙煎した穀類、豆類、種実類（以下「焙煎豆類等」という。）の検体として県内産

焙煎落花生を、香辛料等の検体として国内産ウコンを用いた。

2.2 試薬等

2.2.1 試薬及び試液

AFの混合標準液は、和光純薬工業(株)製のAF混合液2（各濃度0.25µg/mL）を用いた。

試料の抽出及びHPLC測定には関東化学(株)製のアセトニトリル（HPLC用）及びメタノール（HPLC用）を、LC/MS/MS測定には関東化学(株)製のメタノール（LC/MS用）及び和光純薬工業(株)製の1mol/L酢酸アンモニウム（HPLC用）を用いた。

塩化ナトリウム（残留農薬試験用）、Tween20及びPBS濃縮液は関東化学(株)製を、トリフルオロ酢酸（以下「TFA」という。）（HPLC用）は和光純薬工業(株)製を用いた。

2.2.2 精製ミニカラム

試料液の精製ミニカラムの検討には、表1のとおり、3種類の多機能カラム（以下「MFC」という。）と1種類のイムノアフィニティーカラム（以下「IAC」という。）を用いた。

表1 使用した精製ミニカラム

MFC	Autoprep（昭和電工(株)製）
	InertSep VRA-1（ジーエルサイエンス(株)製）
	InertSep VRA-3（ジーエルサイエンス(株)製）
IAC	AFKAKING（(株)ブラクティカル製）

2.3 装置

試料の粉砕にはWARING社製MX1200XTMを使用した。

ホモジナイザーは、(株)日本精機製作所製ホモジナイザーAM-7を使用した。

試料液の濃縮には、Zymark製Turbo Vapを使用した。

HPLCは、Agilent Technologies製1100シリーズを使用した。LC/MS/MSは、(株)島津製作所製Prominense LCシリーズの高速液体クロマトグラフと、エービーサイエックス社製4000QTRAP質量分析装置を使用した。

2. 4 測定条件

HPLC及びLC/MS/MSの測定条件を、表2及び表3に示す。

表2 HPLC条件

分析カラム	Mightysil RP-18 GP Aqua (内径4.6mm, 長さ150mm, 粒径5µm)
流速	1.0mL/min
注入量	50µL
カラム温度	40°C
移動相	アセトニトリル/メタノール/水 (1:3:6)
検出波長	励起波長 365nm, 蛍光波長 450nm

表3 LC/MS/MS条件

LC条件				
分析カラム	Inertsil ODS-3 (内径2.1mm, 長さ150mm, 粒径4µm)			
流速	0.2mL/min			
注入量	5µL			
カラム温度	40°C			
移動相	メタノール/10mM酢酸アンモニウム (31:19)			
MS/MS条件				
(測定対象物質)	(AFB ₁)	(AFB ₂)	(AFG ₁)	(AFG ₂)
Q1/Q3	313/241	315/287	329/243	331/245
DP	96V	86V	96V	66V
CE	53V	37V	39V	43V
イオン化モード	ESI・ポジティブモード			
イオンスプレー電圧	5.5kV			
イオンソース温度	500°C			

2. 5 試験溶液の調製

試料液の調製は、平成22年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会研究発表会の教育講演「カビ毒汚染対策の動向と総アフラトキシン分析」において提示された総アフラトキシン分析法(案)(以下「総AF分析法(案)」という。)に従い、図1-1~3のとおり実施した。

2. 6 添加回収試験

添加回収試験を行う試料には、試料50.0gにAF混合液

2(各濃度0.25µg/mL)を0.5mL加え(試料中各濃度2.5ng/g), 30分室温放置後, 同様に試験に供した。

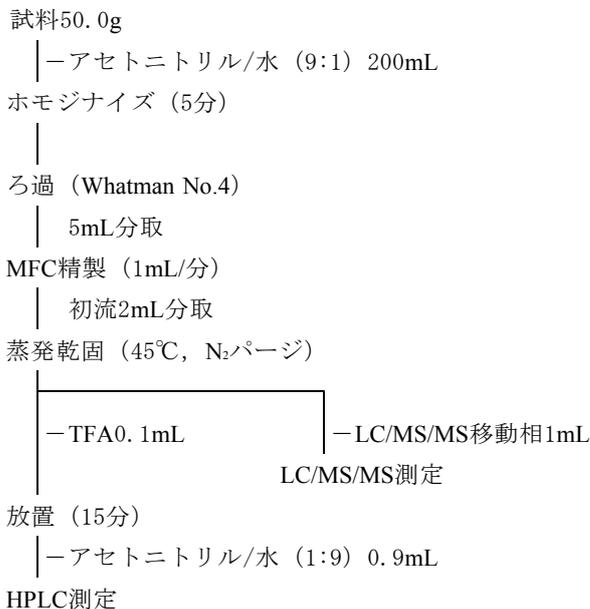


図1-1 MFC法 (生穀類等)

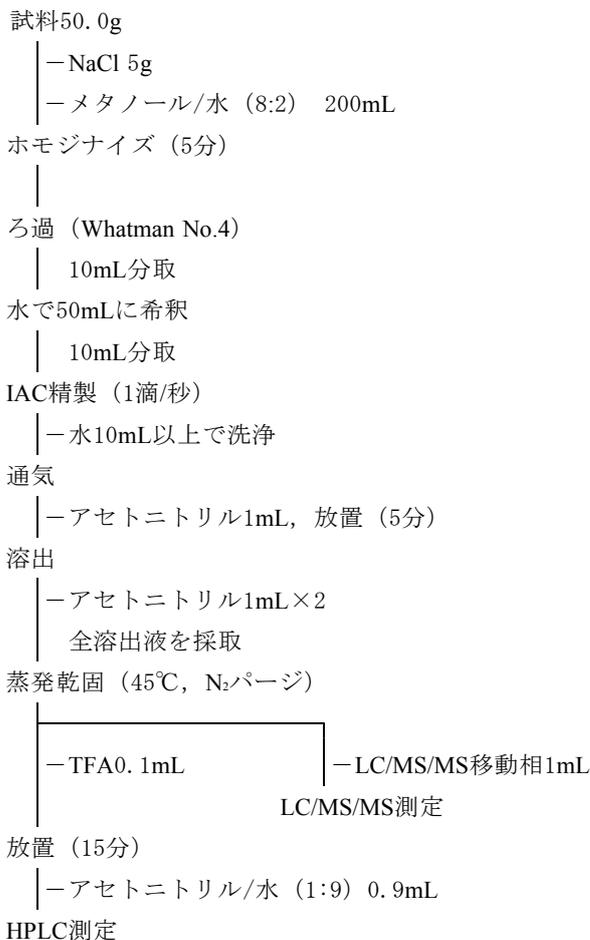


図1-2 IAC法 (焙煎豆類等)

試料50.0g
 | -アセトニトリル/メタノール/水 (6:1:4) 200mL
 ホモジナイズ (5分)
 |
 ろ過 (Whatman No.4)
 | 10mL分取
 Tween20溶液で100mLに希釈
 | 20mL分取
 IAC精製 (1滴/秒)
 | -0.01%Tween20-PBS 10mL以上で洗浄
 | -水10mL以上で洗浄
 通気
 | -アセトニトリル1mL, 放置 (5分)
 (以下, 焙煎豆類等のIAC法に同じ)

図1-3 IAC法 (香辛料等)

3 結果及び考察

3.1 精製カラムの検討結果

AF検査における試料抽出液の精製には, MFC又はIACが使用される。MFCは安価で操作性は良いが精製効果は高くなく, 一方のIACは精製効果は高いが操作が煩雑で高価, という特徴がある。総AF分析法 (案) においては, 生穀類のみMFCによる精製を行い, それ以外の食品ではIACを用いる方法が示された。

そこで, 生穀類について3種類のMFC及びIACを用いて精製し, MFCとIACの精製効果等について比較検討するとともに, MFCの種類による精製効果等の比較を行った。また, IAC精製が示された焙煎豆類について, MFC精製が適用できないか検討を行った。

3.1.1 玄米抽出液の精製効果, 回収率等について

生穀類である玄米の抽出液について, 各精製カラムで精製しHPLCで測定した時のクロマトグラムを図2-1に, AF標準液のHPLCクロマトグラムを図2-2に示した。4種類の精製カラムのうち, IAC (AFLAKING) が最も精製効果が高かったが, AFG₁とAFB₁のピークの近傍に夾雑物の小さいピークが出現した。3種類のMFCの中ではVRA-3が最も精製効果が高く, VRA-1も十分な精製能力があり, 各AFのピークに影響するような夾雑ピークは見られなかった。Autoprepは精製効果が比較的低く, 各AFのピークの近傍に玄米由来の夾雑ピークが検出された。

玄米を用いて添加回収試験を行った結果, 各精製カラムの回収率は図3のとおりであった。Autoprepは夾雑ピークの影響でAFG₁の回収率が120%を超過した。それ以外

の精製カラムでは全てのAFで良好な回収率 (90~100%) であった。

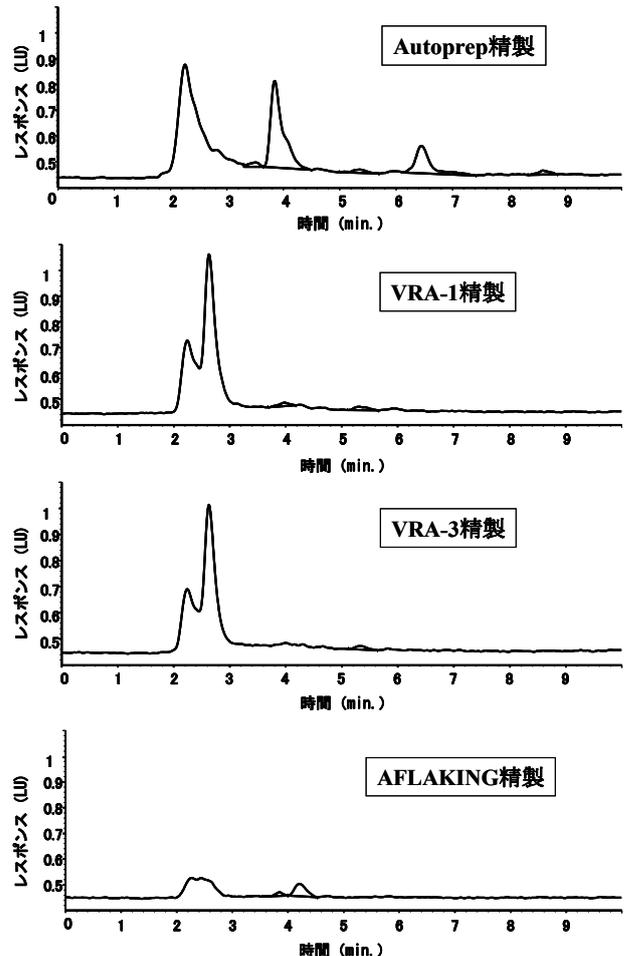


図2-1 玄米抽出液のHPLCクロマトグラム

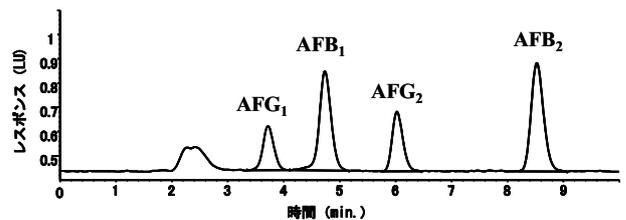


図2-2 AF標準液のHPLCクロマトグラム

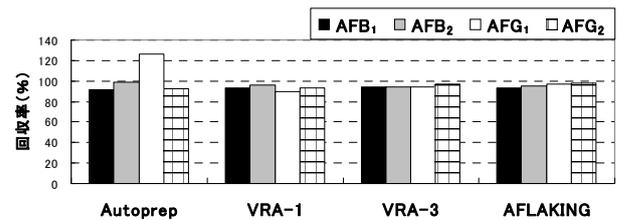


図3 各精製カラムのAF回収率

精製カラムの操作性については、図1-1~3でも示したとおり、MFCを用いた場合が、IACを用いた場合よりも処理工程が少なく操作が簡単で、試験溶液の調製時間は半分以下であった。また、操作性に優れたMFCの中でも、VRA-1及びVRA-3はカラムの内径が大きいため通液性が良く、Autoprepに比べ短時間で精製ができた。

以上の結果から、以後のAF検査においては、玄米のように夾雑物が少ない生穀類等には、精製効果が高く回収率も良好で、操作性に優れたVRA-3を用いることにした。

3. 1. 2 焙煎落花生抽出液の精製効果について

焙煎豆類等の試料として焙煎落花生を用い、その抽出液について、MFCの中で精製効果が最も高いVRA-3で精製し、その精製効果について検討した。

その結果、図4に示したとおり、MFCでは十分に精製が行えず、試料由来の巨大夾雑ピークがAF測定を妨害することが分かった。一方、IACによる精製を行った場合は試料由来の巨大な夾雑ピークは除去され、AF測定を行うことができた(図4)。

以上の結果から、以後のAF検査においては、生穀類等のように夾雑物の少ない食品以外には、精製効果が非常に高いIACを用いる必要があることが確認できた。

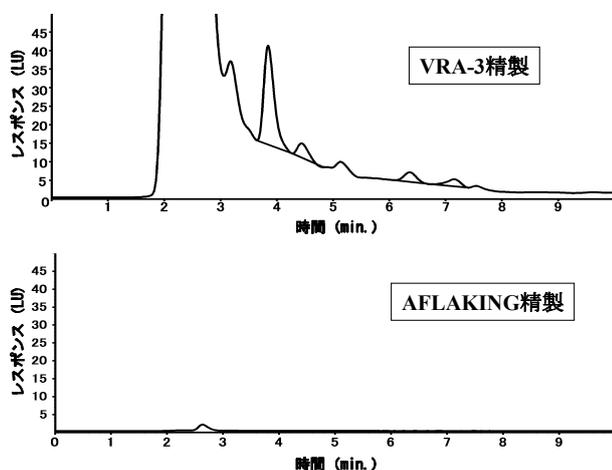


図4 焙煎落花生抽出液のHPLCクロマトグラム

3. 2 測定機器の検討結果

公定法⁶⁾においては、AFの定性定量試験にはHPLCを用い、確認試験でLC/MS/MSを用いることとなっている。しかし、HPLC測定はTFAによる誘導体化が必要なため、LC/MS/MS測定より処理工程が一つ増え、操作が煩雑になる。一方、LC/MS/MS測定は定性能に優れ、夾雑ピークも少ないという利点がある。そのため、HPLC測定を

行わず、LC/MS/MSにより定量試験と確認試験を同時に実施することはできないか検証するため、HPLC測定とLC/MS/MS測定の結果について比較検討を行った。

玄米、落花生及びウコンについて添加回収試験(n=2~5)を実施し、HPLCとLC/MS/MSで測定したところ、図5に示すとおり、LC/MS/MSよりもHPLCで測定した結果の方が高い定量値が得られた。その原因として、LC/MS/MSによる測定では、試料溶液中の夾雑物等によりイオン化抑制が起こり、定量値が低くなることが考えられた。

以上の結果より、公定法どおり、定量試験はLC/MS/MSではなくHPLCにより測定し、確認試験をLC/MS/MSで行うこととした。

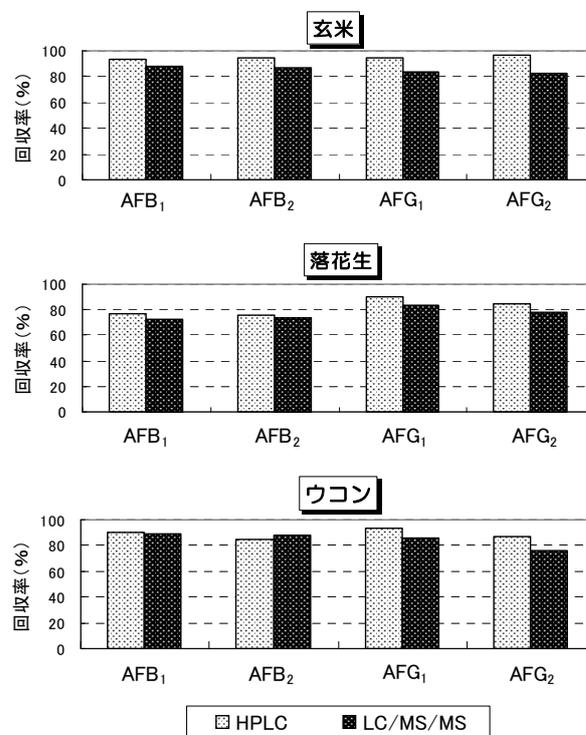


図5 添加回収試験結果

3. 3 試料調製における注意点

AF検査において注意を要する処理操作について、若干の検討を行ったので、結果を以下に示す。

3. 3. 1 IAC精製工程における注意点

(1) 通液速度の影響

IAC法で添加回収試験(n=5)を実施した際に、結果にバラツキが見られることがあった。試料液をIACに注入する際の通液速度が影響していることが考えられたことから、以下のとおり検討を行った。

玄米を用いて添加回収試験を行い、公定法に記載されているとおり約1滴/秒で通液させた場合と、最高速（約3滴/秒）で通液させた場合のAF回収率を図6に示した。通液速度が速いと回収率が低い傾向が見られ、特にAFG₁及びAFG₂は回収率が低く、70%未満であった。通液速度が速いとIACによる保持が不十分になると考えられた。試料液をIACに注入する際は、通液を公定法どおり約1滴/秒で行うことが重要であることが分かった。

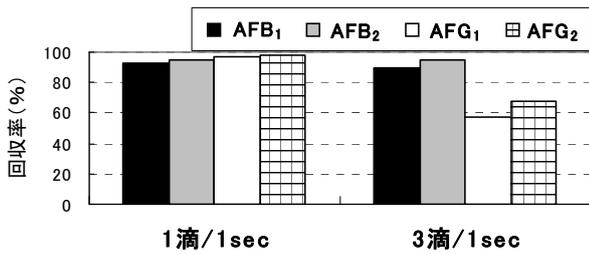


図6 IAC流速検討結果（玄米抽出液）

(2) Tween20の影響

香辛料等のように夾雑物が多い試料の抽出液の場合、水で希釈をすると濁りが発生し回収率が低下することがあるため、濁りを取る作用のあるTween20溶液による希釈が推奨されている（図1-3）。そこで、Tween20溶液による回収率への影響について以下のとおり検討を行った。

ウコン抽出液にAF標準液を最終濃度で1ppbになるように添加し、Tween20溶液（3%、5%、10%）及び水で希釈をしてIACの通液試験を行い、回収率の比較検討を行った。その結果、Tween20溶液で希釈した場合は濁りのない試料液が得られ、回収率も水で希釈した場合に比べ高く、Tween20の有効性が確認できた（図7）。また、Tween20溶液の濃度が高くなるほど回収率が低下する傾向が見られたことから、Tween20溶液を用いる場合には、濁りが取れる最低限の濃度で使用する事が望ましいと思われる。

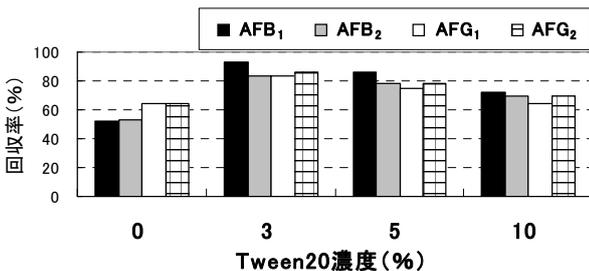


図7 Tween20添加試験結果（ウコン抽出液）

3. 3. 2 蒸発乾固の工程における注意点

IACで精製シガラスバイアルに採取した試料液を、窒素ガスパーズで蒸発乾固させる工程で、溶媒が乾固した後に、更に窒素パーズを長時間続けると、定量値が低下する傾向が見られた。

そこで、1ppbのAF標準液をシラン処理済ガラスバイアル及びポリプロピレン（以下「PP」という。）のバイアルに採取し、窒素ガスパーズで乾固が終了した後も更に20分乾燥を続け、AF量を測定した。図8に示すとおり、ガラス容器で20分余分に窒素ガスパーズを実施した場合は、定量値が0.81~0.91ppbと低かった。一方、AFが吸着しにくいPP容器で長時間パーズをした場合では、定量値は0.92~1.00ppbで、ほとんど減少が見られなかった。このことより、窒素ガスパーズを乾固後も長く続けると、ガラスバイアルにAFが吸着し定量値が減少するものと思われた。ガラスバイアルを使用する場合は、蒸発乾固の工程で、溶媒が乾固した後は速やかに次の工程に移行することがポイントで、乾固しすぎないように注意する必要がある。

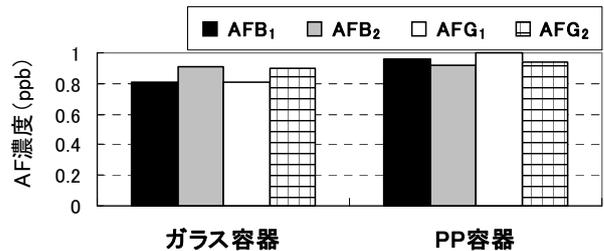


図8 窒素ガスパーズの容器の影響（AF標準液1ppb）

4 まとめ

AF検査法について検討を実施した結果、次のような知見が得られた。

- 1) 精製用ミニカラムについて検討を行った結果、玄米のように夾雑物の少ない食品では、MFCが操作性が良く精製効果も十分であった。しかし、それ以外の夾雑物の多い食品ではMFCでは精製が不十分なため、IAC精製でなければAF測定は難しいことが分かった。また、MFCの種類によっても精製効果や操作性に違いが見られた。
- 2) AF含量の測定機器については、LC/MS/MSを用いる方が工程が少なく簡易ではあるが、夾雑物によるイオン化抑制のためか、定量値が低くなる傾向がみられた。公定法どおり、定量試験はHPLCで行い、確認試験をLC/MS/MSで行うことが望ましい。
- 3) 試料液調製の際、以下の点に注意を要することが分

かった。

- a 試料抽出液をIACに注入する際は、1滴/秒で通液すること。
- b 夾雑物の多い食品についてはTween20溶液による希釈が有効であるが、用いるTween20溶液の濃度はなるべく低い方が望ましい。
- c IAC精製後に窒素パージで蒸発乾固する際は、乾固し過ぎないように注意すべきである。

2011年8月に厚生労働省から新しい総AF検査法⁷⁾が通知されたが、今回検討を行った総AF分析法(案)とは、抽出溶媒や対象食品等に関して異なる点があった。今回検討した内容をふまえ、新しい総AF検査法についても今後検討を実施していく予定である。

参考文献

- 1) 真鍋勝, 鶴田理, 他; 日本におけるマイコトキシン生産アスペルギルス属数菌種の分布について, 第4回マイコトキシン研究会一般講演要約, 3/4, 31~35 (1976)
- 2) Manabe, M. & Tsuruta, O. ; Geographical Distribution of Aflatoxin-producing Fungi Inhabiting in Southeast Asia, JARQ, 12, 224~227 (1978)
- 3) Hiroshi, O. & Michihiko, S. ; Population Levels of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in Field Soils in Two Areas of Kyushu District, Ann. Phytopath. Soc. Japan, 58 (2), 208~213 (1992)
- 4) 斉藤道彦, 岡崎博, 他; 茨城県および千葉県内の畑土壌における*Aspergillus flavus* および *A. parasiticus* の分布調査, 食品総合研究所報, 72, 31~35 (1976)
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知; アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて (食安発0331第5号), 2011年3月31日
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知; カビ毒 (アフラトキシン) を含有する食品の取扱いについて (食安監発第0728004号), 2008年7月28日
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知; 総アフラトキシンの試験法について (食安発0816第1号), 2011年8月16日