

Table 5 鉛技能試験 z-スコア

	from mean and SD	from certified value and SD
A	-1.596	-1.911
B	-0.303	-0.427
C	-0.232	-0.346
D	-0.197	-0.305
E	-0.073	-0.163
F	-0.055	-0.142
G	0.440	0.427
H	2.016	2.237

Table 6 汚染物の検出状況

全データ

	総数	検出数	検出率(%)
平成 14 年	検査数 199,338	3,753	1.9
	試料数 10,186	2,204	21.6
平成 13 年	検査数 227,462	5,615	2.5
	試料数 11,239	2,723	24.2
平成 12 年	検査数 259,148	7,757	3.0
	試料数 10,968	3,524	32.1

農薬・動物用医薬品データ

	総数	検出数	検出率(%)
平成 14 年	検査数 191,809	1,423	0.7
	試料数 7,811	855	10.9
平成 13 年	検査数 218,032	2,359	1.1
	試料数 8,403	1,120	13.3
平成 12 年	検査数 242,086	2,651	1.1
	試料数 7,612	1,277	16.8

Table 7 検査数の多い食品

平成 14 年		平成 13 年		平成 12 年	
牛肉	306	牛肉	469	卵	445
卵	282	卵	409	牛肉	419
きゅうり	275	ぶた肉	349	鶏肉	401
ぶた肉	274	鶏肉	302	ぶた肉	399
いちご	264	牛乳	290	井戸水	304
鶏肉	260	玄米	241	水道水	290
トマト	239	ほたてがい	237	牛乳	277
玄米	231	トマト	233	玄米	227
ほたてがい	214	きゅうり	231	バナナ	188
なす	207	バナナ	228	牡蛎	185
ブロッコリー	200	グレープフルーツ	222	グレープフルーツ	172
牛乳	199	なす	220	ほたてがい	169
グレープフルーツ	193	牡蛎	208	きゅうり	166
日本なし	186	オレンジ	203	トマト	140
バナナ	181	日本なし	183	オレンジ	136
ほうれんそう	162	ほうれんそう	175	なす	128
オレンジ	161	ブロッコリー	160	ほうれんそう	122
キャベツ	154	キャベツ	155	キャベツ	113
ねぎ	153	いちご	149	はくさい	110
りんご	151	生乳	139	ブロッコリー	102

Table 8 複数の汚染物の残留例

食品名	残留汚染物数	残留汚染物
ふな	17	BHC, エンドリン, DDE, DDT, DDD, PCB, Zn, Mn, Cu, As, Ni, メチル水銀, シスクロルデン, トランスクロルデン, シスノナクロル, トランスノナクロル, クロルデン
しじみ	14	BHC, DDE, DDT, PCB, TBTO, Zn, Mn, Cu, As, Cr, Pb, Ni, Cd, Hg
牡蠣	6	Zn, Cu, Cd, As, Cr, Pb
日本茶葉	5	クロルピリホス, ピリミホスメチル, プロチオホス, クロルフェナピル, テフルトリン
日本茶葉	4	クロルピリホス, ピリミホスメチル, プロチオホス, クロルフェナピル
ウーロン茶葉	4	ジコホール, シペルメトリン, フェンバレレート, フェンプロパスリン
日本なし	5	アクリナトリン, キヤブタン, フルバリネート, ホルペット, イプロジオン
日本なし	4	カルバリル, キヤブタン, フェンプロパスリン, 酸化フェンブタスズ
日本なし	4	キヤブタン, 酸化フェンブタスズ, シアノホス, ダイアジノン
ぶどう	4	アセフェート, イプロジオン, クレソキシムメチル, シフルトリン
りんご	4	カルバリル, キヤブタン, クロルピリホス, クロルフェナピル
レモン	5	イマザリル, オルトフェニルフェノール, 2, 4-D, チアベンダゾール, クロルピリホス
レモン	4	イマザリル, オルトフェニルフェノール, 2, 4-D, クロルピリホス
グレープフルーツ	4	イマザリル, 2, 4-D, クロルピリホス, マラチオン
オレンジ	4	イマザリル, 2, 4-D, クロルピリホス, カルバリル
バナナ	4	クロルピリホス, イプロジオン, ビテルタノール, ベノミル
えだまめ	5	クロルピリホス, ジコホール, シペルメトリン, フェンバレレート, エチオン
未成熟いんげん	4	クロルピリホス, DDT, ジコホール, シペルメトリン
未成熟いんげん	4	アセフェート, カルバリル, ジフェノコナゾール, メタミドホス
はくさい	4	アセフェート, クロルフェナピル, トリフルラリン, メタミドホス
チンゲンサイ	5	メタミドホス, フルバリネート, フェンバレレート, アセフェート, クロロタロニル

Table 9 検査数の多い汚染物

マラチオン	2671	クロルピリホス	2631
ダイアジノン	2453	フェニトロチオン	2453
パラチオンメチル	2444	エトリムホス	2401
トルクロホスメチル	2393	ピリミホスメチル	2385
ペルメトリン	2349	E P N	2330
シペルメトリン	2243	シハロトリン	2232
プロチオホス	2201	フェンバレレート	2191
パラチオン	2179	デルタメトリン	2160
エトプロホス	2051	ジエトフェンカルブ	1992
ペンディメタリン	1945	ジクロルボス	1903

Figure 1 各群からの汚染物摂取量

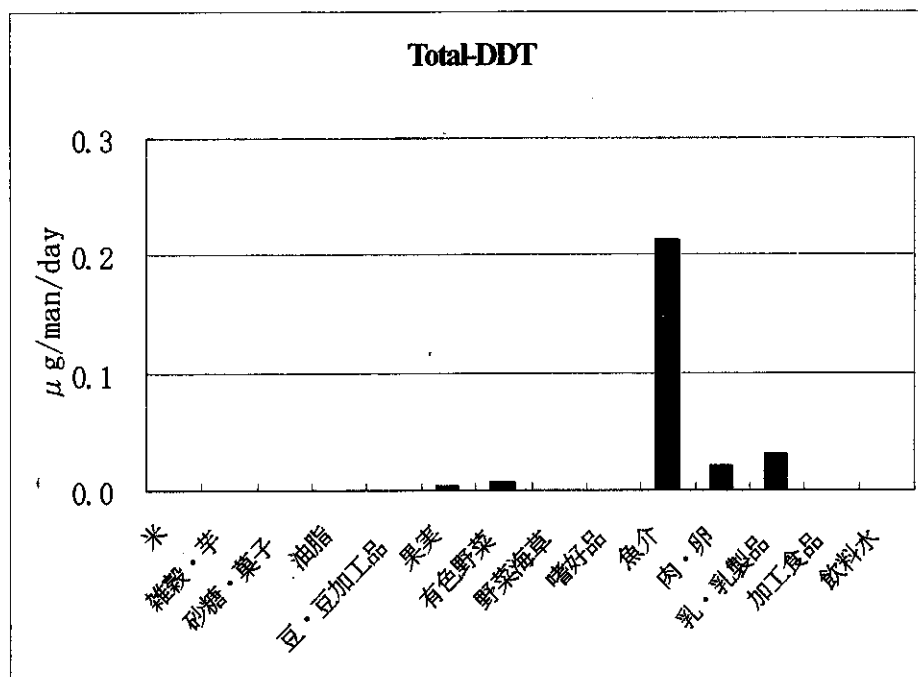
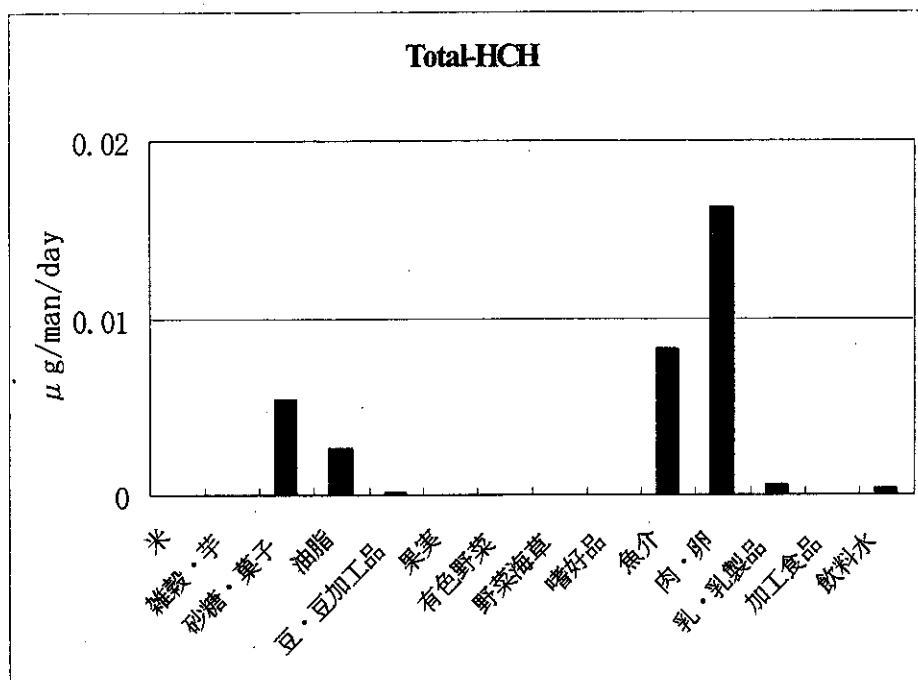


Figure 1 続き

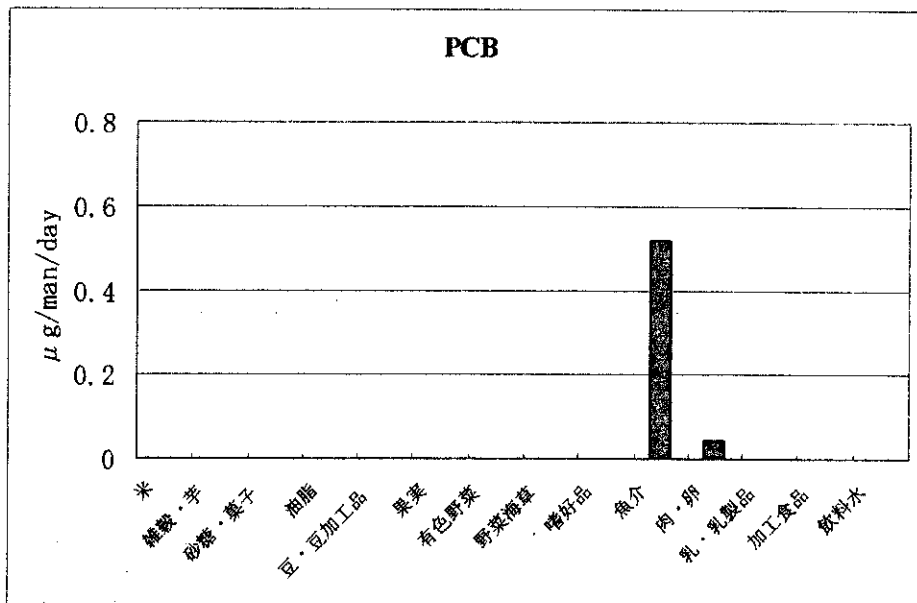
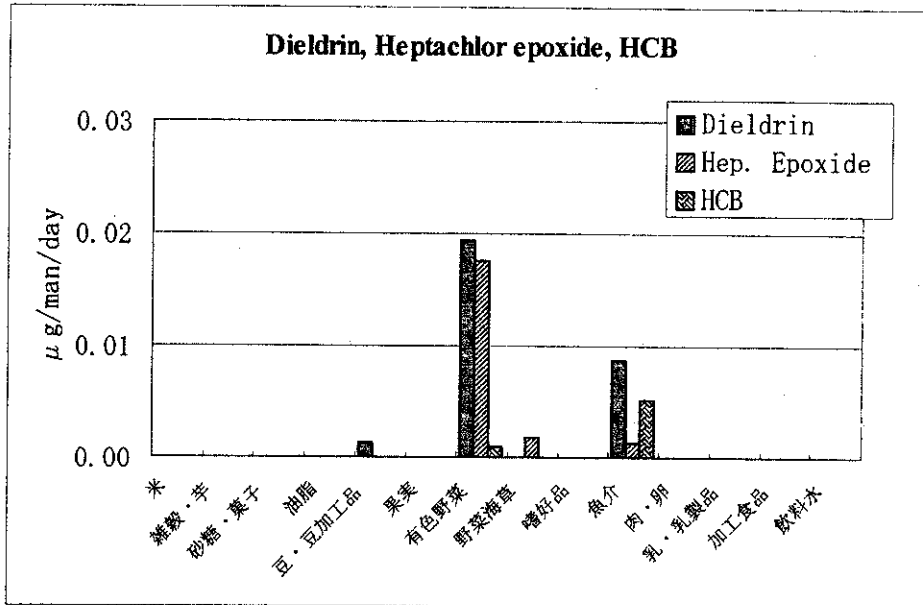


Figure 1 続き

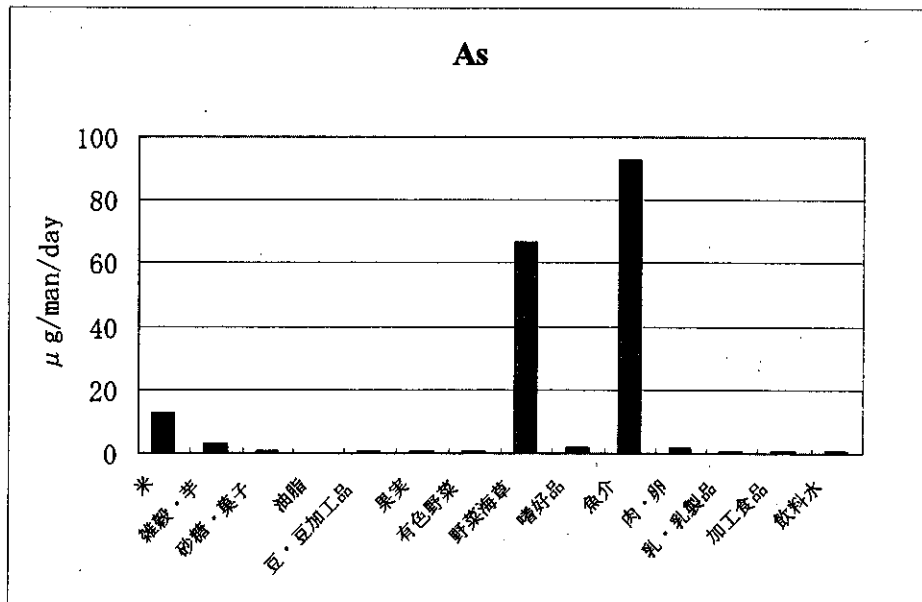
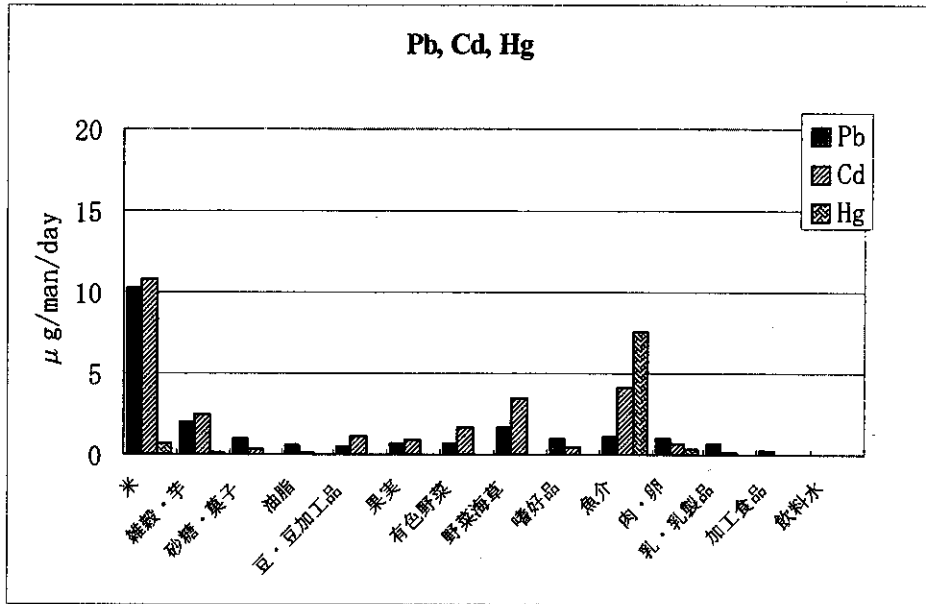


Figure 1 続き

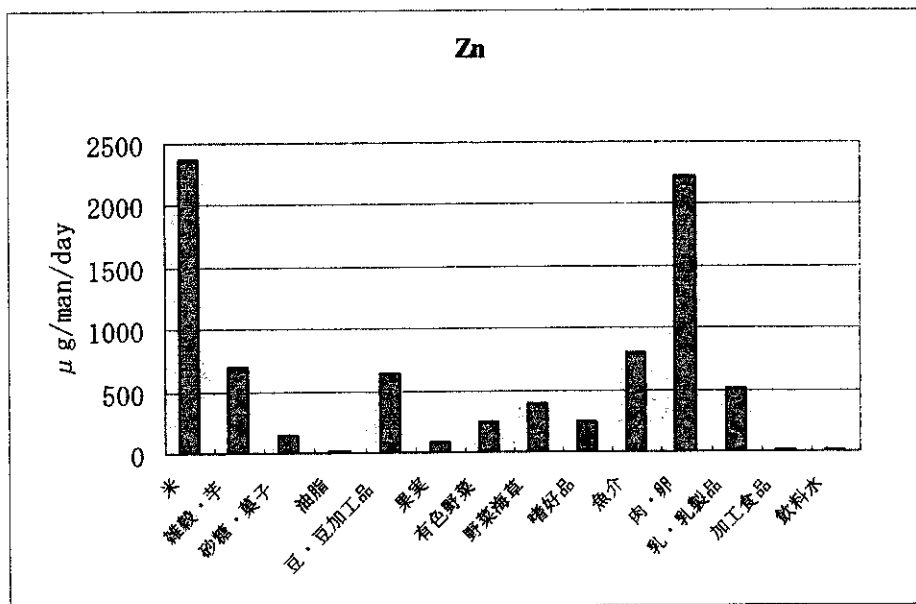
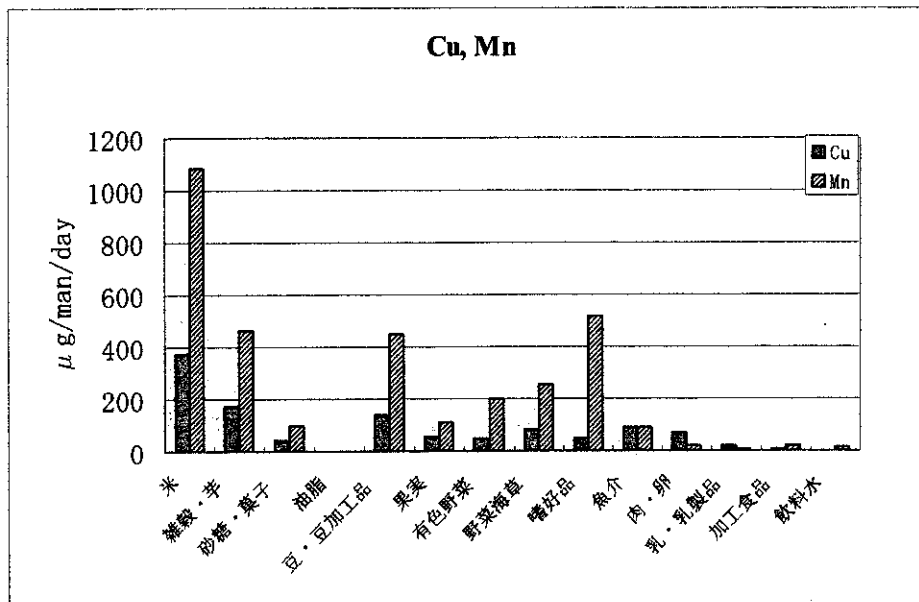
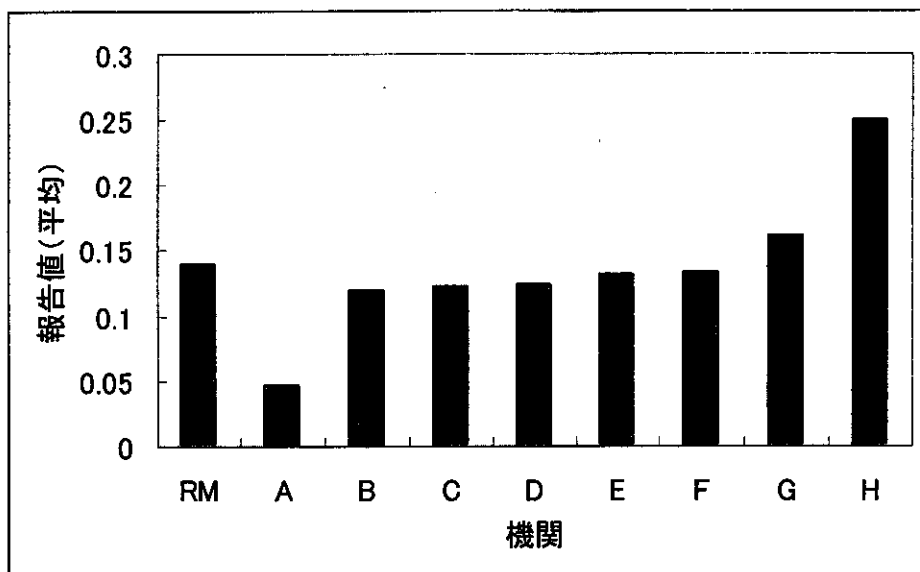


Figure 2 鉛技能試験結果



分 担 研 究 報 告 書

必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究

米谷 民雄

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究
（文献調査による最新の研究情報と現段階での結論）

分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨 2001 年から 2002 年度までに公表された好酸球増多筋肉痛症 (EMS), 5-hydroxytryptophan (5-OHTrp) および有毒油症 (TOS) に関する論文 11 報をまとめた。店頭で容易に入手でき、うつ病や不定愁訴に対して処方される抗うつ剤の代替として使用される機会が増えている 5-OHTrp に、Peak X1 と呼ばれる不純物の共存が認められている。この Peak X1 は調査した 6 種類の全ての製品に含まれており、神経毒と目される 4,5-tryptophan-dione (Trp-4, 5D) であることが明らかになった。製品により 0.5-10.3% の範囲で存在する Trp-4, 5D は EMS 発症に関連した L-tryptophan 製品にも検出され、広範に使用されることへの警鐘が鳴らされている。

TOS 事故に関連すると考えられている脂肪酸アニリド、マウスに投与する精力的な研究が続けられており、Koller らのグループから注目される報告がなされた。脂肪酸アニリドは、遺伝的感受性を持つ個体に自然発症する自己免疫様症状の出現時期を早めこそすれ、それ自身で TOS の急性期に類する症候を惹起できないと指摘し、起因物質としてよりは増悪物質としての関与を示唆している。一方、WHO や Carlos III 健康研究所の支援を 15 年間受けている科学委員会から、長期生存者の健康影響に関する報告がなされている。それによれば、発症後期の死亡率の上昇は見られず、血清中の可溶性 IL-2 受容体濃度の上昇を伴う強皮症をはじめとした慢性症状の出現が有意になることが報告された。また、1981 年当時をシミュレートした工程で製造された油中にも検出できた PAP という化合物の脂肪酸エステルが最有力起因物質と考えられるが、現時点での断定はできていないと結んでいる。

研究協力者

斎藤博士（国立相模原病院 臨床研究センター）

A. 研究目的

本研究は、必須アミノ酸である L-トリプトファン製品の摂取により発生した好酸球増多筋肉痛症 (EMS, eosinophilia-myalgia syndrome), 抗うつ剤の代替として使用されている 5-hydroxytryptophan (5-OHTrp) ならびにアニリンで変性されたナタネ油の摂取により発生した有毒油症 (TOS, toxic oil syndrome) の原因や症状について文献調査し、それにより、国民の安全な食生活に寄与することを目的としている。前年度の報告書以降に発表された論文を検索し、該当した 11 報を基に EMS, TOS および 5-OH Trp 研究の現状を概観し、さらに現時点における結論を演繹した。

B. 研究方法

2001 年から 2002 年度の間に発表された EMS、5-OHTrp、TOS に関する論文を、データベースとして MEDLINE を用いて検索した結果、11 報に到達することができた。

C. 研究結果及び考察

2001 年から 2002 年度の間に公表された論文の内容を以下に概説する。

1. EMS および 5-OHTrp

EMS 発生に関連した 5-OHTrp 製品や店頭販売されている 5-OHTrp 標品に Peak X と呼ばれる一群の不純物が存在することは既に知られていた。Klarskov らは LC-ECD、LC-MS、さらに LC-MS/MS 法を用いて Peak X₁ と命名された成分の分析を実施し、その構造が、

4, 5-tryptophan-dione (Trp-4, 5D) であること明らかにした。神経毒と目される本物質は、店頭販売されていた 6 種の 5-OHTrp 製品全てに含まれ、事故関連 5-OHTrp 製品中に存在していた Trp-4, 5D の量の 0.5-10.3% に相当する計算になる¹⁾。

5-OHTrp は単極性うつ病や不定愁訴等に対する、古典的抗うつ剤の代替として使用されている。Shaw らは、様々なデータベースや専門雑誌から、3 人の reviewer が独立して収集した 108 回の 5-OHTrp 処方例を対象にして、効能の有無をプラセボと比較検討している。科学的評価基準を満たしたトライアルは 64 人の患者が関わった 2 トライアルのみであったが、5-OH Trp に抗うつ効果を認めた (Peto Odds Ratio 4.10, 95%信頼区間 1.28-13.15)。しかし、EMS 事故関連 tryptophan 製品と共通の不純物が含まれることは既知であり、5-OHTrp と Trp の臨床的な有用性は現在のところ限られていると結論している²⁾。

2. TOS

1981 年にスペインで起きた未曾有の TOS の発生から 20 年という節目を迎えたためと思われるが、20 年間に俯瞰した報告がなされている。Diggle は、後になって 20 年前の食品管理体制を批判するのは簡単であるが、1981 年に TOS が発生した当時すでに多くの人が、何故輸入されたフランス製ナタネ油中のアニリンが合法的混和物とされたのか、何故このような混和物を

含む油がしばしばスペインで非合法的に再生され、特別な困難も無く市場に出回るのか、疑問に感じたと振り返っている³⁾。

Posada de la Paz とも、20 年を振り返っている。食糧を製造、供給する際の管理規制システムに欠陥があった場合は、先進国においてさえ、大きな事件になりうる例である。製造工程を変更することが何をもたらすかを十分に考えないと、L-tryptophan 製品による EMS 発症を招いたりする。リスクは管理規制システムが充分でない途上国ではさらに大きい。毒性物質であるジエチレングリコールを不正に添加したグリセリンで製造されたパラセタモールのエリキシル剤による Haiti での小児の腎不全例もある。事故油中の脂肪酸アニリドが起因物質だとした場合、その存在比からして、ppm オーダーで強い毒性を発揮したことになる⁴⁾。

TOS 発生から 15 年にわたって WHO のヨーロッパ地方事務局ならびにマドリードの Carlos III 健康研究所の支援を受けている科学委員会から、起因物質の同定、毒性と作用様式の評価、病因の立証、ならびに後期に出現してくる身体への影響等に関して、報告書が提出されている。それによれば、① TOS 発症後期での死亡率の上昇は無い、②生存者では、強皮症をはじめとした慢性症状が優位に発現する、③動物での再現はできていない、④血清中の可溶性 IL-2 受容体濃度の上昇が認められる、⑤現状における最有力起因物質

の候補は、3-(N-phenylamino)-1,2-propanediol (PAP) の脂肪酸エステルとされている。PAP は、1981 年当時をシミュレートした工程で作られた油の中にも検出できたが、最終的な結論には未だ至っていないとしている⁵⁾。

TOS に関連した人工合成有毒油 (synthetic toxic oil, STO) と対照油 (control oil, CO) が LC-MS と LC-MS/MS で分析法され、両油の比較がされている。MS 測定には、四重極型のもので精密に質量を測定できるタイプの、両者の機種が使われている。CO はアニリンを混和されていないので、それを除去する精製工程をうけていない油である。STO 中に PAP のモノエステル誘導体、脂肪酸アニリドの双方を検出できたが、米国 CDC 内で議論された PAP の di-, tri-置換体は検出できなかった。その原因は抽出法の違いかもしれないとしている。TOS を起こした有毒油と STO には $m/z = 356$, $m/z = 358$ を有する共通のイオンが存在し、両者がリノレインとオレイン酸に由来する脂肪酸アニリドであること意味している。抽出に使用したメタノールやエタノールが比較的極性の高い溶媒であるために、CDC で行われた分析に比べ、より親水性の高い成分が抽出されたとしている。精密に質量を分析できる MS を有する LC-MS と LC-MS/MS は複雑な混合物を迅速かつ詳細に分析するための強力な手段であるとしている⁶⁾。

TOS の動物モデルに関する報告がいくつかのラボから出されている。Hard

は、血管炎、好酸球増多や血清 IgE 値の上昇等、急性期に出現する特徴をメルクマールにして TOS 再現を試みている報告をレビューしている有毒油のテストや起因物質の同定に有効な系統や種として、NZB マウス hybrid, MRL/lpr, SJL/J の strain, さらに好酸球増多を呈するトランスジェニックマウスモデルも使える。ラットでは、Brown Norway が最も適当であり、免疫複合体による疾患ならびに血管炎を惹起できる。遺伝的な下地のあるビーグル犬も候補であり、ミンク、フェレット（ケナガイタチ）をはじめとした他の外来種も有毒油をテストする際の有効な候補になる可能性があるとしている⁷⁾。

Koller らは MRL/lpr マウスを使って、有毒油や3種の金属の影響を検討している。TOS 発生時に被害者を出した家庭から収集した事故油 (C0756) と RSD (2% aniline で変性し、かつ PAP diester の混合物をエンリッチした油), RSA (2% aniline を含むが、PAP diester を含まない油) と命名された合成有毒油の3種の油と、水銀 (50 ppm), カドミウム (100 ppm), 鉛 (50 ppm) を投与した。油は人の消費に似せて2つの用量 (そのまま又は10倍希釈して) 経口投与された。金属は飲料水に混合して連続的に与えられた。5週、10週間後に半数ずつ殺処分し、体重、各臓器重を量った後、選んだ臓器の組織病理学的検討を加えた。10週後には、カドミウム、鉛投与マウスでの体重減少が観察され、C0756 を希釈し

ないで投与した場合にはコントロールに比べ有意な体重増加が起こった。RSA を原液もしくは10倍に希釈して投与した群の体重あたりの腎重は10週後に減少したが、水銀、カドミウム投与群では、逆に増加した。さらに、自然発育や本マウスに自然発生してくる組織障害の進行への影響も調べている。それによれば、原液 C0756、水銀および鉛は通常発生してくる糸球体腎炎の進行を阻害し、肝内胆管系血管周囲への単核白血球集積を惹起した。さらに、腎糸球体内やリンパ系臓器内血管系に形成された結節性病変の進行を早め、胸腺内にはプラズマ細胞が観察されるようになる。投与した3種類の油の全てが5週後に、体重あたりの胸腺重ないし脾臓重比率の増加に示される MRL/lpr マウスで自然に起こってくる特徴的症候である、リンパ球増殖性シンドロームの発生時期を早めた。この結果は、本マウスでの胸腺、脾臓、リンパ節や腎臓内に起こる自然障害の進行に、3種類の油や金属が関わっていることを示唆するものである⁸⁾。

同じく Koller らは、試験油、キャノーラ油 (コントロール), 水、もしくは50 ppm の水銀 (ポジティブコントロール) を原液または10倍希釈して MPL/lpr マウスに投与し、Ig 値変化および自己抗体産生の有無を検討している。投与5週後の血清 IgG1, IgG2a, IgE の各アイソタイプ、抗核、コラーゲン type II, ヒストン、一本鎖 DNA (ssDNA) および二本鎖 DNA (dsDNA)

やSmに対する抗体価を調べたところ、事故油投与はIgG1に対するIgG1:IgG2a比を5~10週後の時点でシフトさせたが、血清総IgG濃度を有意に変化させなかった。しかし、全身性の自己免疫反応を刺激し、未希釈RSDの投与は、有意ではないが、抗コラーゲン(10週)、抗ヒストン(10週)、dsDNA(5, 10週)抗体価の上昇をさせた。未希釈C0756は抗核(5週)、コラーゲン(5週)およびdsDNA(5, 10週)自己抗体価の上昇を、10倍希釈RSA投与では、5週目のssならびにdsDNA自己抗体を上昇させた。この結果は、事故関連油がMRL/lprマウスの幼若期に自然発症してくる全身性自己免疫反応を誘導、亢進させることを示唆するとともに、血清中自己抗体濃度と突発性自己免疫症候群の進展との間に有意な正の相関があることを示している⁹⁾。

Kollerらはさらに研究を進め、自己免疫疾患様の自然発症は無いが、化学物質での誘導が可能なH-2s型主要組織適合抗原を持つ、A. SWマウスでの検討している。3種類(C0756, RSD99, RSA99)の油を投与したいずれのマウスにおいても、体重減少、自己免疫様疾患を惹起できなかったばかりか、血清IgG1, IgG2a, IgE値もシフトせず、自己抗体の形成も確認できなかった。一方、塩化第二水銀を投与されたマウスでは、観察した全ての時点で、体重あたりの臓器重の比率の増加と、IgG1, IgG2a, IgE値および抗核、抗コラーゲン抗体価の上昇を確認できた。こ

れら一連の結果は、A. SWマウスにおいては、事故油自身はTOS類似の自己免疫様疾患を発症させず、ongoingな自己免疫様疾患の進行のみ早めていることを示唆する¹⁰⁾。

Hessは、環境化学物質と自己免疫疾患と題したreviewの中で、hydrazines, tartrazines, hair dyes, trichloroethylene, 産業排ガス、有害廃棄物、さらには、シリカ、水銀、カドミウム、金やLカナバニンなどが自己免疫様疾患を誘導する可能性があり、その数は今後とも増え、EMSやTOSのような大事件につながる危険性があると指摘している。近年、環境に関連した免疫疾患の定義と同定に関する指針が提示されており、WHOからも環境に関連する様々な問題の提起がなされている¹¹⁾。

D. 結論

店頭で入手した6種類の5-OHTrp製品の全てに含まれるPeak X1と呼ばれる不純物が神経毒作用を持つ4,5-tryptophan-dioneであると決定された。5-OHTrpには一定の抗うつ効果は認められたが、本不純物がEMS発症に関わったL-tryptophan製品中にも検出されていることから、類似する疾患の発生が危惧されている。

自己免疫様疾患を自然に発症するマウスへの有毒油の投与は急性期のTOS症状に類似する徴候の出現を有意に早めるが、化学物質の投与でのみ発症し自然発症することが無いA. SW系統(H-2s)マウスへの投与では、無影響

であった。この結果は、事故油のマーカである脂肪酸アニリドがTOSの起因物質ではなく、遺伝的感受性を持つ対象者における、増悪因子であることを示唆するものと思われる。

EMS やTOS に関して得られた知見をベースに、製品の厳密な評価を実施することにより、今後、同様な事故を未然に防止し、国民の安全な食生活に寄与することとができると考えられる。しかしながら、両者の発症要因に関しては、未だ十分に解明できていないのが実情である。

E. 文献

1. K. Klarskov, K. L. Johnson, L. M. Benson, J. D. Cragun, G. J. Gleich, M. Wrona, X. R. Jiang, G. Dryhurst, S. Naylor, Structural characterization of a case-implicated contaminant, "Peak X," in commercial preparations of 5-hydroxy-tryptophan" *J. Rheumatol* 30, 89-95 (2003)
2. K. Shaw, J. Turner, C. Del Mar, "Tryptophan and 5-hydroxy-tryptophan for depression" *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003198 2002(1)
3. G. E. Diggle, "The toxic oil syndrome: 20 years on" *Int. J. Clin. Pract.* 55(6), 371-375 (2001)
4. M. Posada de la Paz, R. M. Philen, I. A. Borda, "Toxic oil syndrome: the perspective after 20 years" *Epidemiol. Rev.* 23(2), 231-247 (2001)
5. E. Gelpi, M. P. Paz, B. Terrachini, I. Abaitua, A. G. Camara, E. M. Kilbourne, C. Lahoz, B. Nemery, R. M. Philen, L. Soldevilla, S. Tarkowski, "The Spanish toxic oil syndrome 20 years after its onset: a multidisciplinary review of scientific knowledge" *Environ. Health Perspect.* 110(5), 457-464 (2002)
6. F. W. Crow, J. D. Cragun, K. L. Johnson, M. C. Ruiz, M. P. Paz, S. Naylor, "On-line HPLC-UV-mass spectrometry and tandem mass spectrometry for the rapid delineation and characterization of differences in complex mixtures: a case study using toxic oil variants" *Biomed. Chromatogr.* 16, 311-318 (2002)
7. G. C. Hard, "A search for an animal model of the Spanish toxic oil syndrome" *Food Chem. Toxicol.* 40(11), 1551-1567 (2002)
8. L. D. Koller, B. V. Stang, M. P. Paz, M. V. Ruiz Mendez, "Pathology of "toxic oil" and selected metals in the MRL/lpr mouse" *Toxicol. Pathol.* 29(6), 630-638 (2001)
9. L. D. Koller, B. V. Stang, J. A. Hall, P. M. Posada, M. V. Ruiz Mendez, "Immunoglobulin and autoantibody responses in MRL/lpr mice treated with 'toxic oil'" *Toxicol.* 178(2), 119-133 (2002)
10. A. R. Weatherill, B. V. Stang,

- K. O'Hara, L. D. Koller, J. A. Hall,
"Investigating the onset of
autoimmunity in A. SW mice
following treatment with 'toxic
oil' " *Toxicol. Lett.* 136(3),
205-216 (2003)
11. E. V. Hess, "Environmental
chemicals and autoimmune disease:
cause and effect" *Toxicol.*
181-182, 65-70 (2002)

分 担 研 究 報 告 書

かび毒試験法の改良に関する研究

小西 良子

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合計画事業）

分担研究報告書

かび毒試験法の改良に関する研究

分担研究者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者 中島 正博 名古屋市衛生研究所
協力研究者 田端 節子 東京都立衛生研究所

研究要旨

パツリンおよびオクラトキシン A は、近い将来コーデックス委員会による規制値の設定が予定されるかび毒である。国内で消費される食品のうち輸入食品の占める割合が高い我が国にとっては、その規制値を世界標準に整合させることは必要である。本研究の目的は、これらのカビ毒の公定試験法をあらかじめ開発し、バリデーションをすることである。今年度はパツリンおよびオクラトキシン A に関して、公定試験法を開発する基礎実験を行った。パツリンでは、リンゴジュースを対象に今まで報告されている AOAC 法、ISO 法など数種の試験法に改良をくわえ、検討を行った。オクラトキシン A では、イムノアフィニティ法による分析法を市販カラムを用いて、種々の食材に対する最適な分析方法を検討した。その結果、パツリンの分析法としては AOAC 法が簡便でかつ良好な回収率が得られ、公定試験法として有用である可能性が示された。オクラトキシン A では、焙煎コーヒー豆、生コーヒー豆、コーングリッツ、玄小麦、玄大麦での回収率はおおむね 75%以上であり、公定試験法としてイムノアフィニティ法は充分有効であることが示された。

A. 研究目的

パツリンは、*Penicillium expansum* が産生するカビ毒であり、おもにリンゴジュースに汚染が認められる。今までにその試験法は数多く開発され、いくつかはバリデーションされている（表 1）。しかし、まだ、日本国内では公定試験法は設定されていない。オクラトキシン A (OTA) は主として *Aspergillus ochraceus* や *Penicillium verrucosum* 等のカビが産生するクマリン骨格を持つかび毒である。OTA は

腎毒性を持ち、またげっ歯類に対しては発ガン性があることが報告されている。現在までに報告されている OTA 分析法としては主として以下のものがある。①リン酸酸性下クロロホルム抽出、セライトカラムによる精製、薄相クロマトグラフ (TLC) 検出、②炭酸水素ナトリウム水溶液抽出、クロロホルムによる液-液分配、C18 カートリッジ精製、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 検出、③リン

強陰イオン交換体カートリッジ精製、HPLC 検出、④メタノールあるいはアセトニトリル水抽出、イムノアフィニティーカラム (IAC) 精製、HPLC 検出。①あるいは②の方法は操作が煩雑で長時間を要し、しかも近年、地球環境保護と分析者の健康保護の立場から、発がん性が示されているクロロホルム等の塩素系溶媒の使用は世界的に抑制されているため分析法としては不適格であると考えられる。④の IAC 法は、その操作性、短時間分析、比較的安全な溶媒の使用等の利点があり、現在世界各国のマイコトキシン公定分析法として広く採用されている。Official Method of Analysis of AOAC International (OMA)では、近年マイコトキシン分析に IAC 法を数多く採用しており、OTA 分析法についても 2000 年以降には、大麦、焙煎コーヒー豆、ビールおよびワインに対して IAC 法が採用されその有用性が証明されている。本研究では、今まで発表された方法を踏まえて日本で公定試験法として有用な方法を開発し、バリデーションを行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) パツリン

(1) 定量法の検討

(A) 5-ヒドロキシフルフラール(HMF)およびパツリンの標準品を用いて HPLC 法でのパツリンの定量分析法に適したカラムおよび移動相の検討をおこなった。

HPLC の分析条件としては次の 4 条件を比較検討した。

a) 移動相：アセトニトリル 3%：0.095%過酸化水素水 97%

カラム：イナートシル ODS 3V 4.6mm X 250 mm

b) 移動相：0.8%THF：水 99.2%

カラム：イナートシル ODS 3V 4.6mm X 250 mm

c) 移動相：アセトニトリル 5%：水 95%

カラム：イナートシル ODS 3V 4.6mm X 250 mm

d) 移動相：アセトニトリル 4%：水 96%

カラム：イナートシル ODS 3V 4.6mm X 250 mm

カラム温度はすべて 40℃、流速 1.0 ml/min、測定波長 276nm で検出を行った。装置は Waters 2695 を用いた。

(B)パツリンの抽出、精製法として、次の 3 種類を比較検討した。検討は添加回収実験で行った。

①検体 5 ml(5g)を 50 ml の褐色遠心管にとり酢酸エチル 10ml をくわえ、1 分間振とうさせ、酢酸エチル層を分取する。これを 2 回くり返したのち 1.5%炭酸ナトリウム溶液を 2ml 加え 1 分間振とうする。上層の酢酸エチル層を別の遠心管に移し下層の水層に酢酸エチル 5ml を加え 1 分間振とうの後その上層を先に分取した酢酸エチル層に加えて 1 g の硫酸ナトリウムにより脱水ろかをおこなう。ろ液をナスフラスコに移してから減圧濃縮する。PH4.0 の酢酸溶液 0.5 ml で残留物を溶解し HPLC での分析に供する。

① 検体 10 ml(10 g)を 5ml し、ケムエルト 20 ml 用(バリアン社製)に通す。水 5ml をくわえた洗い込みを 2 回繰り返す。約 10 分間放置したのち、酢酸エチル 80ml で溶出させ