

Table 5 複数の農薬等が残留した野菜・果実例（柑橘類を除く）

食品名	残留農薬数	残 留 農 薬 物
枝 豆	4	シベルメトリン, フェンプロパスリン, ヘータエントスルファン, クロルピリホス
枝 豆	4	シベルメトリン, フェンプロパスリン, フェンハレレート, DDT
枝 豆	4	シベルメトリン, メタミトホス, フェンハレレート, クロルピリホス
枝 豆	4	シベルメトリン, メタミトホス, フェンハレレート, クロルピリホス
未成熟インゲン	10	メタミトホス, ペルメトリン, フェンハレレート, ピリダヘン, パラチオンメチル, ハラチオン, トリフルラリン, シベルメトリン, シコホール, DDT
未成熟インゲン	5	メタミトホス, シメトエート, フェンハレレート, シベルメトリン, シコホール
未成熟インゲン	4	メタミトホス, シベルメトリン, シコホール, DDT
未成熟インゲン	4	フェンハレレート, シベルメトリン, クロルピリホス, DDT
桜桃	5	プロンミトン, イプロンオン, ヒフェントリン, ペルメトリン, フェンプロパスリン
桜桃	5	プロンミトン, イプロンオン, ヒフェントリン, フェンハレレート, シフルトリン
桜桃	4	プロンミトン, ヒフェントリン, デルタメトリン, シベルメトリン
西洋なし	4	酸化フェンブタスス, ヒフェントリン, シフルトリン, クロルフェナピル
西洋なし	4	クロルピリホス, フェニトロチオン, フェンプロパスリン, フェンハレレート
西洋なし	4	クロルピリホス, 酸化フェンブタスス, ダイアンノン, シコホール
西洋なし	4	クロルピリホス, ピリミホスメチル, ダイアンノン, フェンハレレート
りんご	4	ダイアシノン, シフルトリン, キャプタン, アセタミプリト
りんご	4	クレソキムメチル, キャプタン, イプロンオン, アセタミプリト
りんご	4	酸化フェンブタスス, クロルピリホス, フェンハレレート, クロルフェナピル
レタス	4	メタミトホス, アセフェート, ルフェヌロン, プロシミトン
しゅんきく	4	プロンミトン, キャプタン, ペルメトリン, フェニトロチオン
にんしん	4	フェニトロチオン, トリフルラリン, シエトフェンカルブ, イプロシオン
ふとう	8	メパニピリム, ホルペント, ペルメトリン, フルシオキシニル, フェニトロチオン, トリフルミゾール, シプロシニル, アセタミプリト

Table 6 検査数の多い農薬

平成14年		平成13年	
汚染物名	検査数	汚染物名	検査数
クロルピリホス	3090	マラチオン	2671
マラチオン	2913	クロルピリホス	2631
MEP	2847	ダイアシノン	2453
トルクロホスメチル	2715	フェニトロチオン	2453
ペルメトリン	2707	パラチオンメチル	2444
ダイアシノン	2675	エトリムホス	2401
ピリミホスメチル	2628	トルクロホスメチル	2393
シペルメトリン	2628	ピリミホスメチル	2385
パラチオンメチル	2564	ペルメトリン	2349
フェンハレレート	2535	EPN	2330
エトリムホス	2531	シペルメトリン	2243
EPN	2507	シハロトリン	2232
シハロトリン	2436	プロチオホス	2201
パラチオン	2349	フェンハレレート	2191
総DDT	2340	パラチオン	2179
フルシトリネート	2333	デルタメトリン	2160
プロチオホス	2333	エトプロホス	2051
テルタメトリン	2281	シエトフェンカルブ	1992
エントリン	2231	ペンティメタリン	1945
シクロルホス	2194	シクロルホス	1903

Table 7 検出率の高い農薬

農薬名	分析数	検出数	検出率(%)
イマサリル	329	89	27.1
オルトフェニルフェノール	180	48	26.7
2,4-D	83	17	20.5
チアヘンダソール	533	83	15.6
メタミトホス	539	43	8.0
酸化フェンブタスス	107	7	6.5
クロルピリホス	3090	141	4.6
プロシミトン	1251	56	4.5
ンペルメトリン	2628	113	4.3
フェンプロパトリン	760	30	3.9
クロルフェナピル	614	23	3.7
マンネブ	122	4	3.3
ンネブ	122	4	3.3
マンセブ	124	4	3.2
メパニピリム	67	2	3.0
プロモプロピレート	67	2	3.0
クレソキシムメチル	341	10	2.9
アソキシストロヒン	112	3	2.7
アセフェート	1087	29	2.7
フェンハレレート	2535	67	2.6
イプロシオン	1225	27	2.2
キャプタン	1230	27	2.2

Figure 1 各群からの汚染物摂取量 (ND=0)

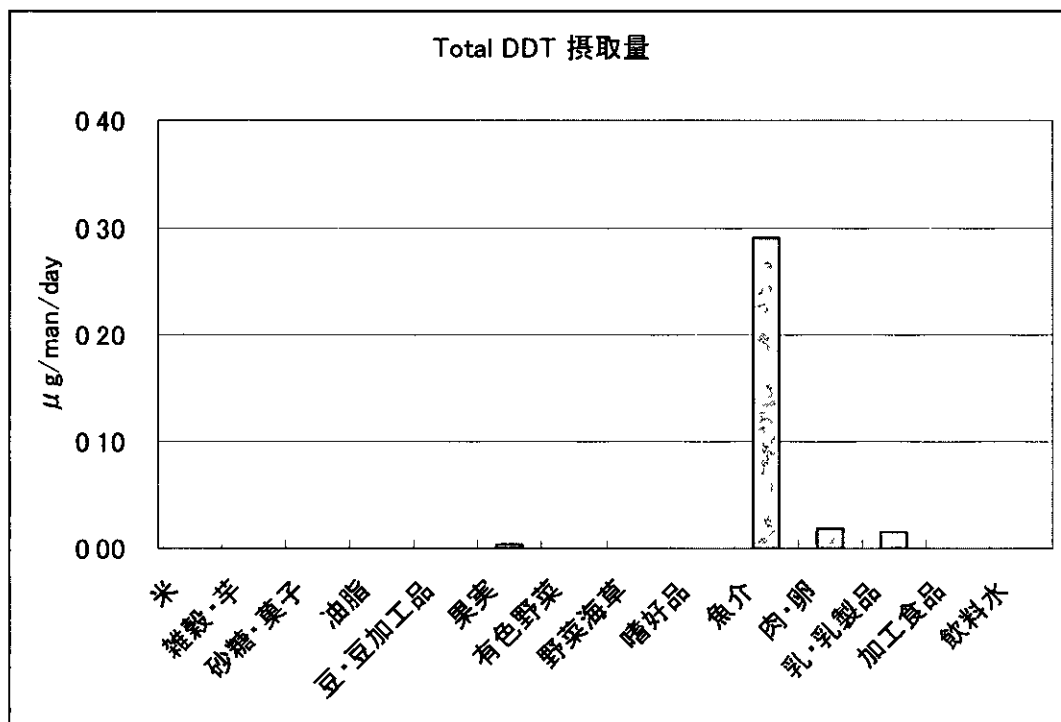
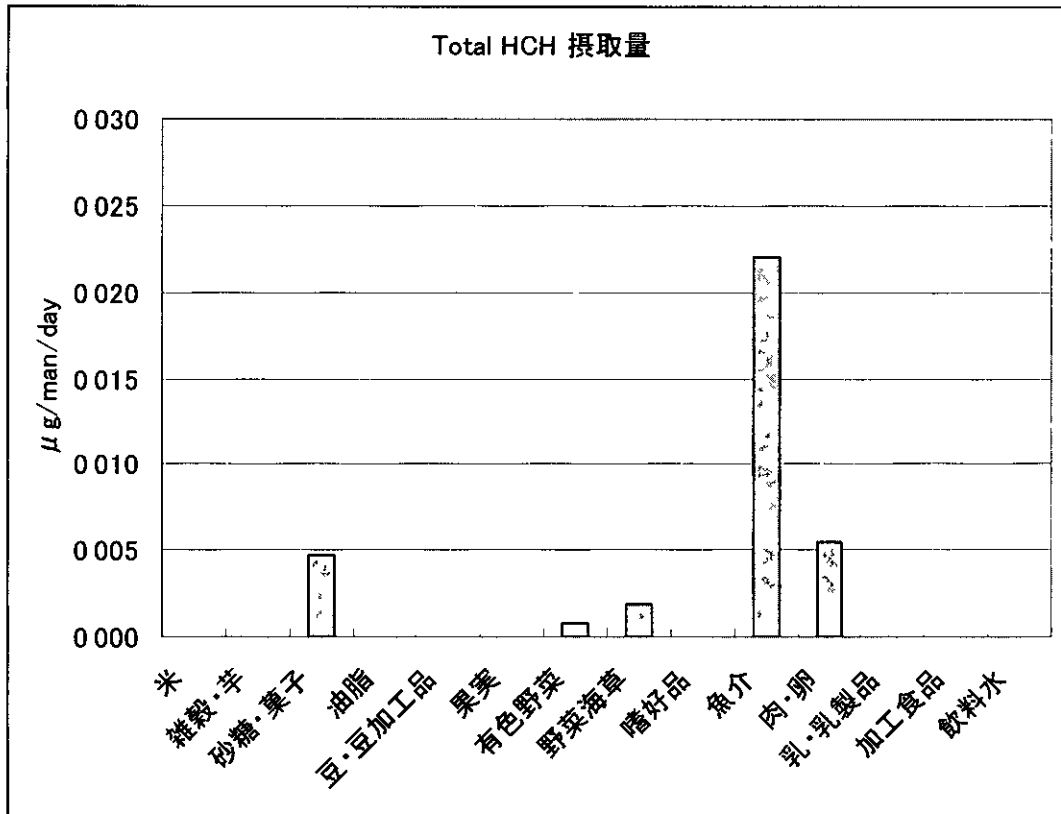


Figure 1 続き

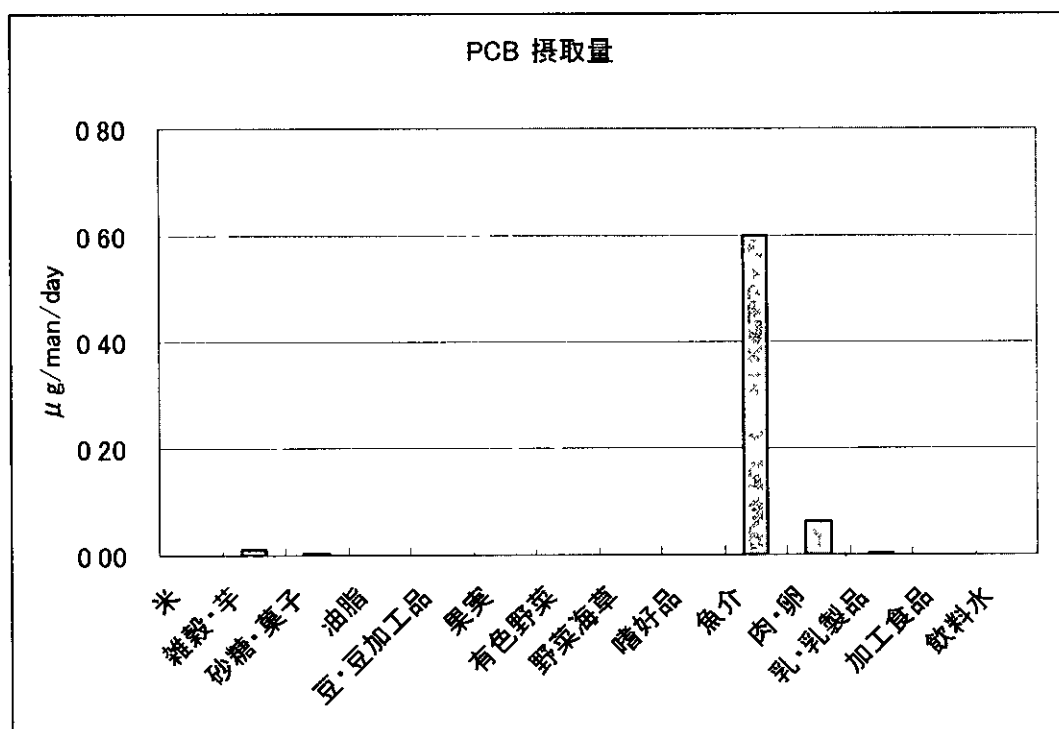
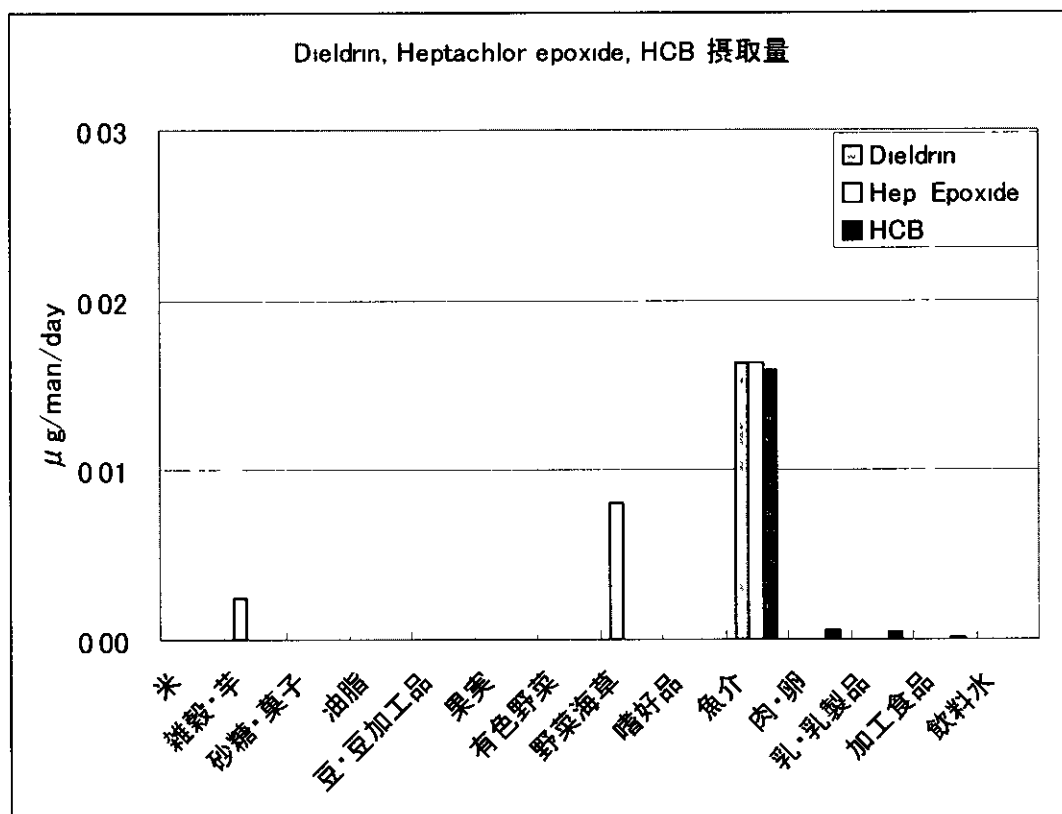


Figure 1 続き

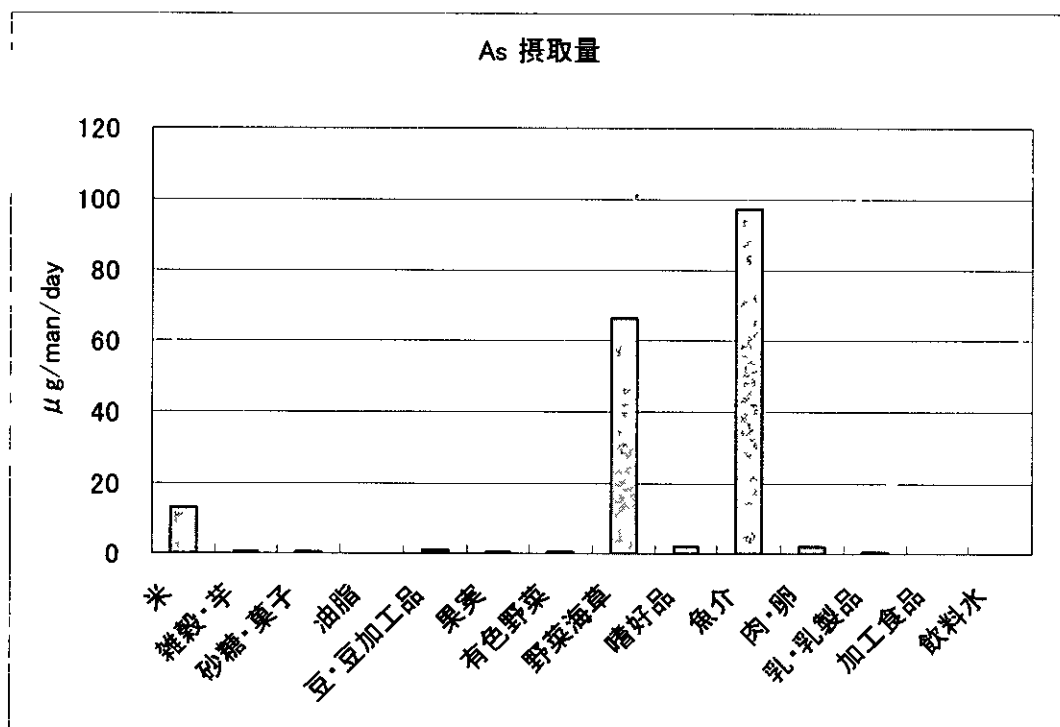
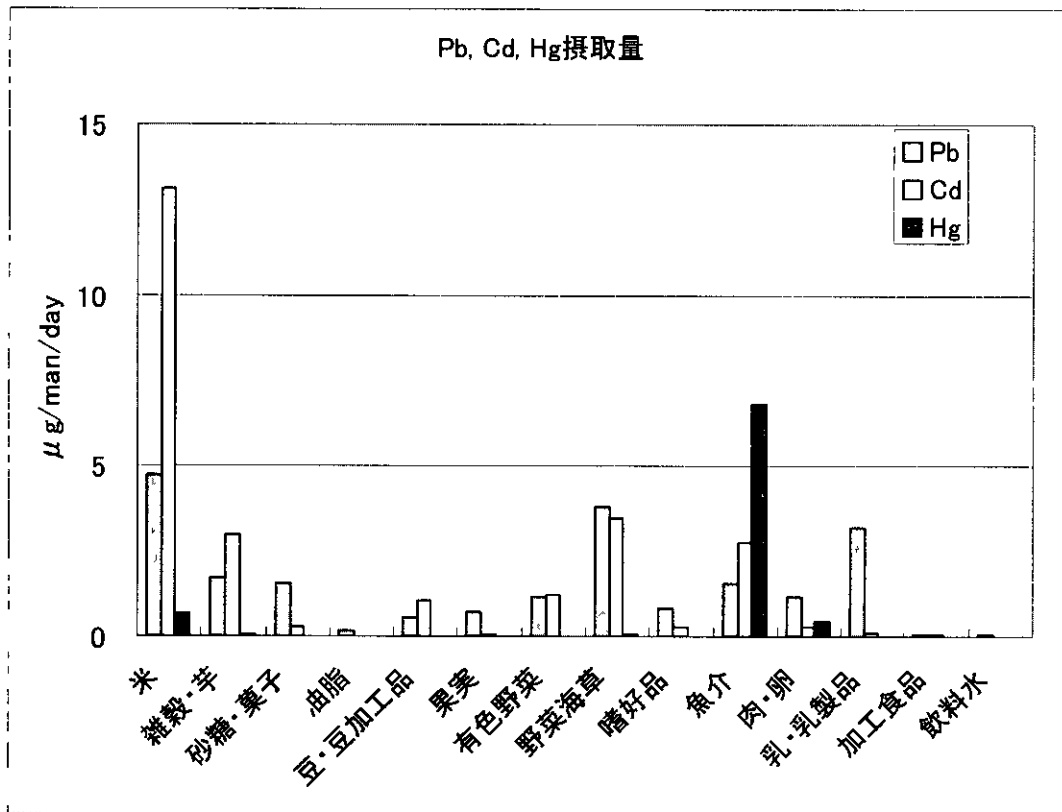
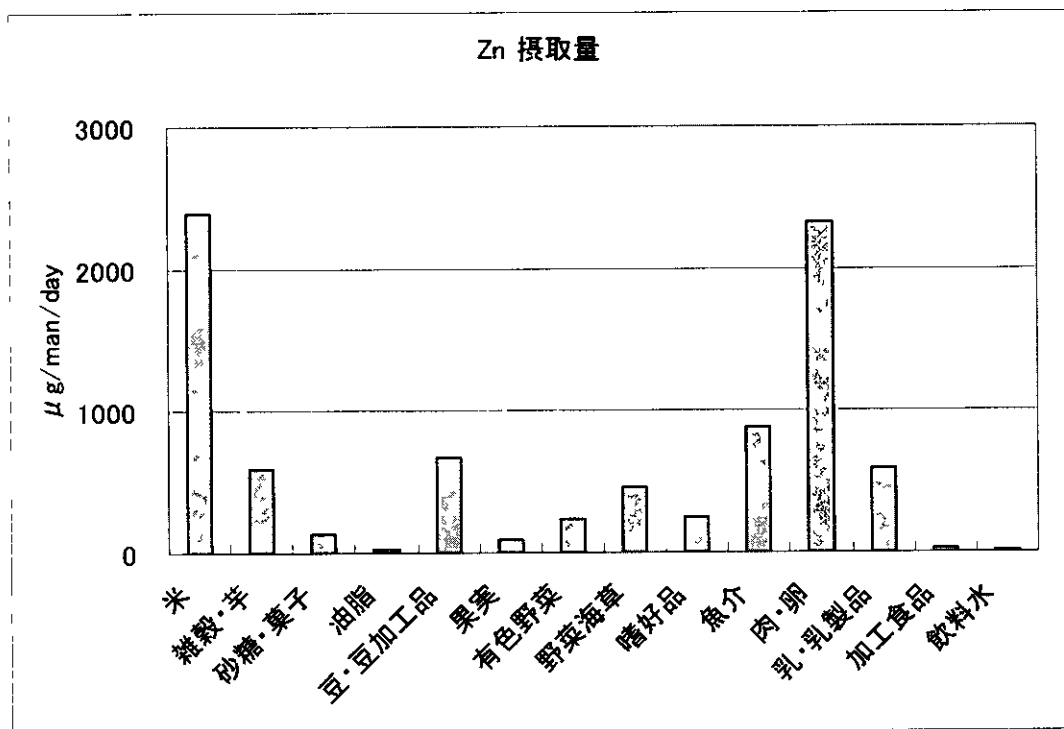
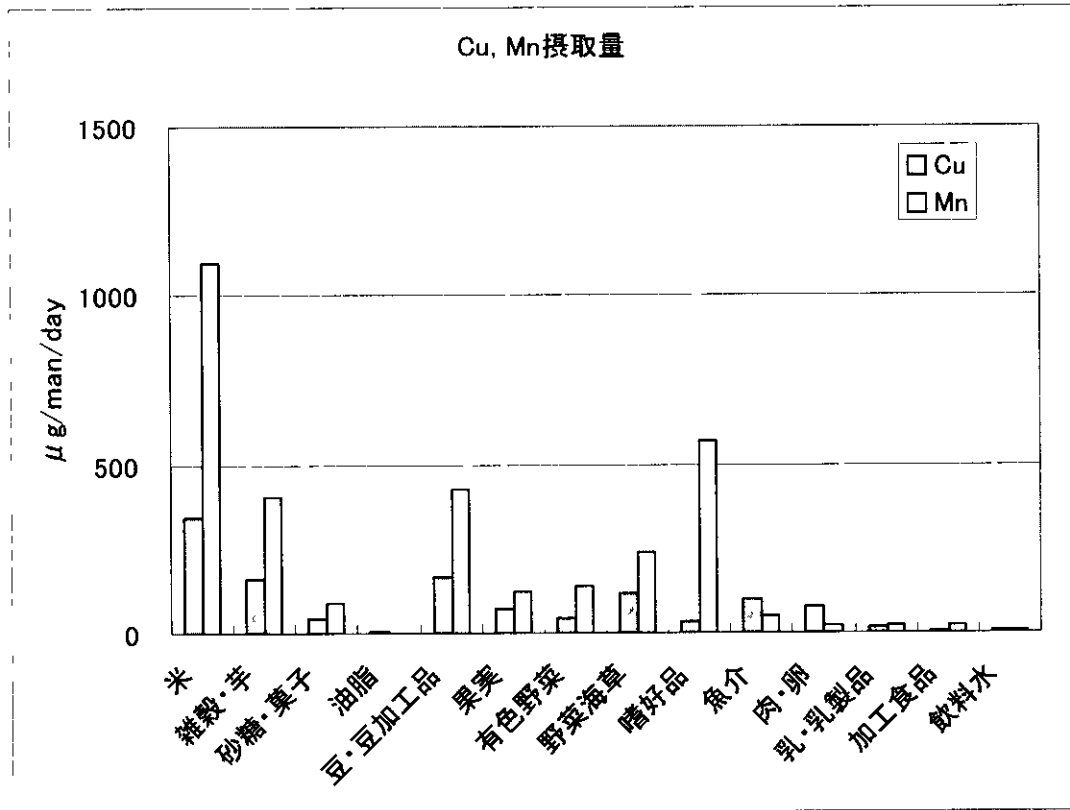


Figure 1 続き



分 担 研 究 報 告

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（食品安全確保研究事業）
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

2002年度から2003年度までに公表された好酸球増多筋肉痛症(EMS)および有毒油症(TOS)に関する論文をまとめた。

EMSに関しては、Tryptophan やミネラル油の摂取と関係が無いEMSの症例報告がなされている。本症例はアメリカCDCのEMS監視基準を満たし、筋肉痛、硬化症、圧痛性非陥没性浮腫および好酸球増多に加え、低蛋白、低アルブミン血症を呈するも、関与が明白なEMS例に比へ、好酸球性筋膜炎、肺病変は観察されなかった。さらに、ステロイド反応性も良好で、数週間経過後に症状の消失をみている。

有毒油症に関しては、1981-1995年の間に発症した20,000人を超す被害者を対象としたcohort研究が為され、予後決定因子ならびにTOS患者に好発するCarpal tunnel syndrome（手根管症候群）との関連性が調べられている。その結果、40歳以下の女性の予後が最も悪く、肝疾患や肺高血圧症および心血管系疾患による死亡例が一般人口に比へ有意に高い事や、中枢ならびに末梢神経症状も多発しており、多変量ロジスティック解析の結果、TOS患者における神経障害発生のodds ratioが3.32と計算されている。これらの知見は、一般人口と比較した場合に、手根管症候群を含む神経障害が有意に好発することを示唆すると共に、これら患者の身体的、経済的自立への重大な障害になっていることが指摘されている。

本研究は、必須アミノ酸であるL-

研究協力者

齋藤博士（国立相模原病院 臨床研究センター）

長岡（兵野）恵（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）

A 研究目的

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)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6報を基にEMS, TOS研究の現状を概観し、現時点における結論を演繹した。

B 研究方法

2002～2003年度の間に発表されたEMSおよび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。しかし、国内には所蔵がないスペイン語雑誌の論文で且つ英文要旨から重要とは思われなかった論文、および過去の論文の総説については、本報告書には含めなかった。そのため、6報について内容をまとめた。

C 研究結果および考察

2002～2003年度に発表された論文の内容を以下に概説する。

1 EMS

1989年のEMS 1,345症例のうちの191症例(14%)はL-トリプトファン製品摂取歴が証明されていない。これら症例は、関連例に比へ、末梢浮腫、発赤、硬化症様皮膚病変、脱毛症および神経障害が目立つものの、好酸球数の増多や肺高血圧症等の肺病変が無いことから、予後は良いとされている。61才のユタヤ系女性に全身の重篤な筋肉痛と軽度運動障害を契機として発症したEMS症例では、トリプトフ

アン摂取、ミネラル油を含む環境汚染物質、血液疾患治療薬を含む薬剤摂取および特記すべき既往歴も無かった。検査所見は好酸球増多(950 cells/mm³)、抗核抗体(180)、低蛋白(55 g/l)ならびに低アルブミン(25 g/l)血症を示唆したものの、甲状腺刺激ホルモン値は正常範囲であった。さらに、感染ならびに悪性新生物の関与も否定された。皮膚病変部からの生検材料による組織学的検査では無傷の表皮と血管周囲への好酸球、リンパ球および若干の上部表皮へのコラーゲン層の肥厚を伴わない好中球浸潤が観察された。40 mg プレトニソロンとPUVA (psoralen+ultraviolet A)の処方に反応し、浮腫、低蛋白、低アルブミン血症は3週間後に消失した¹⁾。EMS患者総数の14%がL-トリプトファン摂取と無関係に発症している、という事実はあまり認識されておらず、興味を持たれる。

2 TOS

1981-1995年の間に発症し、生存している全患者を対象にした予後決定因子、好発疾患、とりわけ手根管症候群(Carpal tunnel syndrome)との関連性が調べられている。20,084人から成るTOS患者団における男女比は2:3、死亡例1799人をとっても、女性優位であった。さらに、TOS絡みて死亡した356人で見ても、女性か男性のほぼ2倍を占めていた。40歳以下の

女性患者の生存期間が最も短く、合併疾患発症危険率(相対危険率,RR)も、肝疾患(RR,3.8)、肺高血圧症(RR,3.19)、運動神経障害(RR,2.24)、肺感染(RR,1.54)、および好酸球増多(RR,1.14)の順で高かった。これらは、全TOS患者の中で40才以下の女性の子供が最も悪く、肝疾患や肺高血圧症で死亡する危険率が高いことを意味している²⁾。

TOSの早期にはコレステロール、グルコース、トリグリセリドのレベルの上昇が見られ、高血圧や慢性期における心血管系疾患の引き金になることから、背景となる危険因子が調べられている。35-65才のTOS患者1,862人を調査し、標準化発生危険率(SPR)を高血圧1.35、喫煙1.27、高コレステロール血症1.10と算出した。これらSPRの値は最重症TOS患者で有意に高値を示し、一般人口との比較においても有意に心血管系疾患が好発するとの結論を得ている³⁾。

手根管症候群についても関連性が調べられている。本症候群を1981-2001年の間に発症したTOS患者89人を、非発症TOS患者638人と比較調査し、多変量ロジスティック解析を実施し、次のodds比が算出された。すなわち、神経障害3.32(1.47-7.50)、血栓塞栓症2.63(1.36-5.06)、女性好発2.63(1.36-5.06)、全身硬化症0.43(0.24-0.80)、喫煙0.26(0.12-0.59)、女性における結合織炎好発

2.53(1.06-5.70)であった。神経障害のodds比は一般人口の本神経障害発症へのodds比より有意に高く、手根管症候群が神経障害を有するTOS患者に好発する、との結論を下している⁴⁾。

行動科学的ならびに精神神経学的障害の実態も調べられている。8人のTOS患者および79人の対照者にKaufman簡略知覚テスト(K-BIT)、Progama(PIEN)およびGoldbergうつ病認識プログラムに準拠したアンケートを実施し、コンピューター解析および熟練ナースの手による定量的神経動態ならびに神経生理学的テストを行い、総合評価を行った。有毒物暴露は利き手、非利き手にかかわらず、双方の指の強さを低下させると共に、指やつま先の振動触知性閾値を有意に増大させた。加えて、神経心理学的症状が有意に増加し、暴露18年後のTOS患者、とりわけ女性患者に中枢ならびに末梢神経学的変化が多発している実態が指摘された⁵⁾。

これら患者の機能、身体ならびに精神障害に関しては、国際分類(ICIDH, International Classification of Impairments, Disabilities and Handicaps)およびStanford健康アセスメントに準拠したアンケートを基に調べられた。不可逆的運動障害を負った292人のTOS患者を対象とし、障害の程度はLondon Handicap Scaleを利用して測定された。214人の患者に対するインタビューの結果

から、運動関連障害の多発が示唆され、これら障害は加齢と共に増大し、若年男性に頻発する行動障害を除き、女性に頻発していた。平均ハンディキャップスコアは 78.0 ± 12.7 と計算され、身体的独立ならびに経済的自己満足性に対する重大な障害となっていると結んでいる⁶⁾。

D 結論

EMS および TOS に関して、今年度はレトロスペクティブかつ cohort 研究が全てを占めた。

EMS 患者の 14% が L-トリプトファンやミネラル油摂取に無関係であることはあまり知られていない。おおまかな症状の一致は見られるものの、予後を決する肺高血圧症や心血管障害の発症頻度において、摂取関連例とは異なり、これらが同一疾患か否かは興味を持たれる。

有毒油の摂取に伴う健康への影響は、女性、とりわけ 40 才以下に強く現れ、肝疾患ならびに肺高血圧症に起因した死亡例が有意に多発している。さらに、心血管系疾患や手根管症候群、運動機能障害や神経障害も TOS 被害者に好発し、身体的自立ならびに経済的自立への深刻な障害となっている。

E 文献

1 L Margolin, "Non-L-tryptophan related eosinophilia-myalgia syndrome with hypoalbuminemia

and hypoalbuminemia" *J Rheumatol* 30(3), 628-629 (2003)

2 P Sanchez-Porro Valaddes, M Posada de la Paz, P de Andres Copa, O Gimenez Ribota, I Abaitua Borda, "Toxic oil syndrome survival in the whole cohort between 1981 and 1995" *J Clin Epidemiol* 56(7), 701-708 (2003)

3 A Gomez De La Camara, M A Gomez Mateos, P Ferrand Vivas, M T Barianca Oyague, I Abiatua Borda, M Posada De La Paz, "Prevalence of cardiovascular risk factors in a cohort of affected by the toxic oil syndrome" *Med Clin (Barc)* 121(11), 405-407 (2003)

4 E Estirado de Cabo, M Posada de la Paz, P de Andres Copa, M Plaza Cano Mdel, M L Carcia de Aguinaga, C Suarez Alvarez, B Braun Saro, "Carpal tunnel syndrome A new feature in the natural history of TOS?" *Eur J Epidemiol* 18(10), 983-993 (2003)

5 MP de la Paz, RM Philen, F Gerr, R Letz, M J Ferrari Arroyo, L Vela, M Izquierdo, CM Arribas, IA Borda, A Ramos, C Mora, G Matesanz, M T Roldan, J Pareja,

“ Neurologic outcomes of toxic oil syndrome patients 18 years after the epidemic ” Environ Health Perspect 111(10), 1326-1334 (2003)

- 6 M C Martín-Arribas, M Izquierdo Martínez, P de Andrés Copa, M J Ferrari Arroyo, M Posada de la Paz,
“ Characteristics of disability and handicap among toxic oil syndrome (TOS) cohort patients a cross-sectional study, 17 years after the original food intoxication ” Disabil Rehabil 25(20), 1158-1167 (2003)

分 担 研 究 報 告

かび毒試験法の改良に関する研究

小西 良子

厚生科学研究費補助金（生活安全総合計画事業）
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 田中 敏嗣 神戸市環境保健研究所
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

パツリンは、コーデノクス委員会による規制値の設定に伴い我が国でもリンゴ果汁において基準値が設定され、平成16年6月から施行される。またオクラトキシン A は、コーデノクス委員会にて現在ステップ6の段階であり、近い内に規制値の設定が予定されるかび毒である。本研究の目的は、これらのカビ毒の公定試験法を開発し、評価を行うことである。今年度は昨年度検討を行ったパツリンおよびオクラトキシン A のいくつかの試験法を対象に inter-laboratory study を行い、評価した。パツリンでは、リンゴシユース（クリアタイプ、混濁タイプ）を対象に AOAC 995 10 法、AOAC 2000 2 法およびケムエルート法において妥当性試験を行った。オクラトキシン A では、イムノアフィニティー法による分析法および多機能前処理カラムを用いて、生コーヒー豆、コーングリッソ、玄小麦、干しぶどうを対象に評価をおこなった。その結果、パツリンの分析法としては AOAC 995 10 法が簡便でかつ良好な HORATT 値が得られたことから、公定試験法として十分妥当性であることが示された。オクラトキシン A の分析法は、食品の種類によって適当な方法を選択する必要があることが示された。

A 研究目的

パツリンは、リンゴシユースに汚染事例が多いカビ毒であり、*Penicillium expansum* によって産生される。コーデノクス委員会ではすでにリンゴ果汁での基準値が 50 ppb と設定されており、我が国もそれを受けて平成 16 年 6 月からリンゴ果汁を原料とするものに対してパツリン含有量が 50 ppb を超えてはならないという規格基準を適用する。この改正に伴い、パツリンの公定試験法の設定が急務である。そこで本研究では昨年度までの基礎的実験結果を踏まえて 11 機関の参加のもとパツリンの分析試験法の検討と

妥当性試験を行うものである。

また、オクラトキシン A (OTA) は、穀類、コーヒー、とうもろこし等に汚染するカビ毒で、*Aspergillus ochraceus* や *Penicillium verrucosum* 等のカビが産生する。最近ドライフルーツにおける汚染例も報告されている。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ことから、コーデノクス委員会も基準値設定を検討している。現在ステップ6まですすんでいるため、近い将来に基準値が設定されることが予想される。そのため、あらかじめ公定法に適した試験法を確立する

ことが必須である。昨年までの結果から、イムノアフィニティーカラム (IAC) で精製し、HPLC を用いて検出する方法が、大麦、焙煎コーヒー豆、ビールおよびワインに対して有用であることが明らかになっている。また、最近食品中のオクラトキシン A 精製のための多機能カラムが開発された。そこで本研究では、IAC 法と多機能カラム法の両者を公定試験法として評価するために 5 機関で妥当性試験を行うことを目的とした。

B 研究方法

1) パツリン

(I) 妥当性試験参加機関

(財) 食品環境検査協会, アサヒビール (株) 分析研究所, 日本食品分析センター, 東京都健康安全センター, 神戸市環境保健研究所, 名古屋市衛生研究所, 横浜検疫所輸入食品検査検査センター, (独) 消費技術センター, 明治乳業 (株) 食品開発研究所 本部, 神戸検疫所センター理化学課, 国立医薬品食品衛生研究所

(II) 試料

妥当性試験に供した試料は自然汚染リンゴジュース 2 点、添加回収用リンゴジュース 2 点の合計 4 点であった。添加回収試験は、あらかじめパツリン汚染のないことをたしかめた市販のリンゴジュースに、493ng/g または 202ng/g のパツリンを、抽出する 1 時間前に添加し、自然汚染試料と同じく抽出精製を行い、分析した。

(III) 試験方法

妥当性試験は AOAC 995 10 法, AOAC 2000 2 法およびケムエルト法の 3 試

験法で行った。

(III)-1 機器

- (1) 共栓付きガラス遠心管 (30ml 容)
- (2) ホールピペットおよびそれに類するもの
- (3) 濃縮装置 (ロータリーエハポレーター、および窒素吹き付け装置等)
- (4) 0.45 μ m ポアサイズシリコンフィルター (水系フィルター)
- (5) 高速液体クロマトグラフ ポンプ、注入システム、UV 検出器、カラム恒温槽、記録計
- (6) HPLC 用 ODS カラム (4.6 mm id X 150-250 mm、粒径 3-5 μ m)
- (7) 10ml 容スピノガラス遠心管またはそれと同等のもの
- (8) 試験管ミキサー (ホルテノクス等) 超音波装置またはこれと同等のもの
- (9) なす型フラスコまたは同等なもの
- (10) ケイノウ土カラム (ケムエルト CE1020 バリアン社製)
- (11) 駒込ピペット、パスツールピペットおよびメスピペット
- (12) 液相分離ろ紙 (Whatman 1PS 同等品)
- (13) 漏斗
- (14) 100ml 容 分液漏斗, コニカルヒーカー, それに類するもの

(III)-2 試薬

- (1) アセトニトリル (LC グレードまたは同等のもの)
- (2) 蒸留水 (LC グレードまたは同等のもの)
- (3) 1.5% 炭酸ナトリウム溶液 (特級)
- (4) 硫酸ナトリウム (特級)

(5) 抽出溶媒—酢酸エチル (LC グレードまたは同等のもの)

(6) 酢酸 (特級)

(7) 酢酸溶液 (pH4) — 蒸留水に pHメーターで測定しながら酢酸を加え、pH4 に調製する。

(8) LC 用溶離液—アセトニトリル (LC グレードまたは同等のもの) / 蒸留水 (LC グレードまたは同等のもの) を 4 : 96 の割合で調製する。

(9) 検量線用標準溶液—最終濃度が 0.05µg/ml, 0.1µg/ml, 0.25µg/ml, 0.5µg/ml になるように酢酸溶液 (pH4) を加え、調整する。

(III)-3 手順

(III)-3-1 AOAC 995 10 法

<抽出および精製>

(1) 試料を正確に 5.0g 量りとり共栓付きガラス遠心管に入れ、抽出溶媒 10 ml を加える。

(2) 1 分間激しく攪拌し、酢酸エチル層 (上層) を採取し、抽出液とする。

(3) 残った水層 (下層) に再度抽出溶媒 10ml を加え、1 分間激しく攪拌し、酢酸エチル層 (上層) を採取し、(2) の抽出液と合わせる。同様の操作を再度繰り返す。

(4) 抽出液に 1.5%炭酸ナトリウム溶液 2 ml を加え、30 秒激しく攪拌する^{註1}。

(5) 酢酸エチル層 (上層) を採取し、漏斗に約 5g の硫酸ナトリウムを上積したものに通し、脱水ろ過しながらなす型フラスコに入れる。

(6) (5) の残りの炭酸ナトリウム層 (下層)

に酢酸エチル 5ml を加え激しく攪拌する。

(7) 酢酸エチル層 (上層) を採取し、(5) で用いた硫酸ナトリウムを洗いなから脱水ろ過する。

(8) (7) の酢酸エチルは 40°C以下で、ロータリーエバポレーターでほとんどの溶媒を除去し、試料溶液とする。

(9) (8) の試料溶液を少量の酢酸エチルでナス型フラスコを洗いながら、スピノノガラス試験管またはハイアル等に移す。これを 3 回繰り返す。

(10) (9) の試料溶液を窒素吹き付け装置で濃縮乾固する。

(11) 酢酸溶液 (pH4) 1.0 ml を正確に加え、試験管ミキサー 超音波装置で攪拌する。

(12) 0.45µm のフィルターでろ過した液を、高速液体クロマトグラフィー用試験溶液とする。

(III)-3-2 AOAC 2000 2 法

<抽出および精製>

(1) 試料を正確に 10.0g 量りとり分液漏斗に入れ、抽出溶媒 20 ml を加える。

(2) 1 分間激しく攪拌し、水層 (下層) はコニカルヒーカーにとり、酢酸エチル層 (上層) を採取し、抽出液とする。

(3) (2) で採取した水層 (下層) を再度分液漏斗にもとし抽出溶媒 20ml を加え、1 分間激しく攪拌し、水層 (下層) はコニカルヒーカーにとり、酢酸エチル層 (上層) を採取し、(2) の採取した抽出液と合わせる。

(4) (3) で採取した水層 (下層) を再度分液漏斗にもとし抽出溶媒 20ml を加え、1 分間激しく攪拌し、水層 (下層) はすてる。

酢酸エチル層（上層）を採取し、(2)の採取した抽出液と合わせる。

(5)抽出液に1.5%炭酸ナトリウム溶液4mlを加え、30秒激しく攪拌する。

(6)水層（下層）はコニカルヒーカーにとり、酢酸エチル層（上層）を採取し、漏斗に約15gの硫酸ナトリウムを上積したものに通過し、脱水ろ過する。

(7)で採取した水層（下層）を分液ロートに戻し、酢酸エチル10mlでコニカルヒーカーを洗いなから分液ロートに加え、激しく30秒攪拌する。

(8)水層（下層）は捨て、酢酸エチル層（上層）を採取し、(6)で用いた硫酸ナトリウムに通過し、脱水ろ過する。

(9)酢酸エチル10mlで(6)で用いた硫酸ナトリウムを洗浄する。この操作を2回繰り返す。

(10)ろ液をナス型フラスコに移し、40℃以下で、ロータリーエバポレーターでほとんどの溶媒を除去し、試料溶液とする。

(11)(10)の試料溶液を少量の酢酸エチルでナス型フラスコを洗いながら、スピノツガラス試験管またはハイアル等に移す。これを3回繰り返す。

(12)移しかえた抽出液を窒素吹き付け装置で濃縮乾固する。

(13)酢酸溶液（PH4）10mlを正確に加え、試験管ミキサー・超音波装置で攪拌する。

(14)0.45μmのフィルターでろ過したろ液を、高速液体クロマトグラフィー用試験溶液とする。

(III)-3-3 ケイソウ土法

(III)-3-3 手順

<抽出および精製>

(1)試料を30-50ml容ガラス遠心管に正確に50g量りとり、ケイソウ土カラム20ml容に負荷する。

(2)(1)のガラス遠心管の内壁を水5mlで洗い、洗液を(1)のケイソウ土カラムに負荷する。さらに同様の操作を再度行う（洗浄水の計10ml）。

(3)約10分間放置後、100ml容分液漏斗を(1)のケイソウ土カラムの下に置く。

(4)酢酸エチル5mlを(1)のガラス遠心管に加え、ガラス遠心管の内壁を洗浄し、(1)のケイソウ土カラムに庄ぐ。

(5)負荷した酢酸エチルがケイソウ土カラムに浸透した後、同様の操作を3回繰り返す（計20ml）。

(6)酢酸エチル60mlを(1)のケイソウ土カラムに連続して負荷し、溶出する酢酸エチルを100ml容分液漏斗に集める。

(7)全ての酢酸エチルが溶出した後、少量の酢酸エチルでケイソウ土カラム[1(10)]の先端部の外側を洗浄し、(7)の分液漏斗に加える。

(8)上部のケイソウ土カラムを外し、メスピペトで1.5%炭酸ナトリウム溶液4mlを(7)の分液漏斗に加え、30秒間激しく振とうする。

(9)静置後、分離した水層（下層）を速やかに除去する。

(10)(7)の分液漏斗中の酢酸エチルを液相分離ろ紙を使用してナスフラスコに脱水ろ過する。

(11) 酢酸エチル 5ml で分液漏斗の内壁及(10)のろ紙を洗い、洗液を先のナスフラスコに加える。この操作を 2 回繰り返す。

(12) さらに酢酸エチル 5 ml で液相分離ろ紙を洗う。同様の操作を 2 回繰り返す。駒込ピペトでガラスロートの脚部の内側を少量の酢酸エチルで洗い、洗液を先のナスフラスコに加える。

(13) (12)の酢酸エチルが約 1 ml になるまで減圧濃縮し、濃縮液をスピノツ管に移す。酢酸エチル 1 ml で 3 回でナスフラスコの内壁を洗浄し、洗液を先のスピノツ管に加える。

(14) スピノツ管内の酢酸エチルを窒素ガス気流で留去する。残留物に pH 4.0 の酢酸溶液 1 ml を正確に加え、ミキサーおよび超音波にて十分に溶解させ試験溶液とする。

IV 検量線の作成

検量線用標準溶液を用いて、検量線を作成する。

V 測定条件

測定は高速液体クロマトグラフィー装置によりおこなった。測定条件は下記のとおりである。

測定条件

カラム ODS カラム (4.6 mm i.d. X 250 mm, 5 μ m)

溶離液 アセトニトリル及び水 (4 : 96)

流速 1 ml/min

カラム槽温度 40°C

検出器 紫外分光光度検出器 (波長 276nm)

注入量 40 μ l

VI 定量

試験溶液から得られたクロマトグラムについて、事前に作成した検量線を用いて、ピーク高法またはピーク面積法により定量した。

試料中のパツリン量は次式によって算出した。

パツリン濃度 (ng/g) = A (測定値, ng/ml) \times
1 ml - 試料 (g)

2) オクラトキシン

(I) 妥当性試験参加機関

(財) 食品環境検査協会、アサヒビール (株) 分析研究所、日本食品分析センター、東京都健康安全センター、神戸市環境保健研究所、名古屋市衛生研究所、横浜検疫所輸入食品検査センター、(独)消費技術センター、明治乳業 (株) 食品開発研究所 本部、神戸検疫所センター理化学課、国立医薬品食品衛生研究所

(II) 試料

生コーヒー豆、コーングリッツ、玄小麦、干しぶとうを用いた。干しぶどう以外は 20 メッシュの篩いに通過するように破碎した。生コーヒー豆、コーングリッツ、玄小麦はあらかじめオクラトキシン A の汚染がないことを確認し、添加回収試験に用いた。添加量は 0.5ng/g および 5ng/g であった。

(III) 試験方法

オクラトキシン A の定量法 (多機能カラム法、IAC 法)

(III)-1 機器

- (1) 前処理用多機能カラム (MultiSep #229, Romer Labs, Inc 社製)
- (2) 前処理用イムノアフィニティーカ

ラム(IAC, OchiaTest WB, VICAM 社製)

- (1) ろ紙 Whatman No 4
- (1) ガラス繊維ろ紙 Whatman 934AH
- (1) 共栓つき三角フラスコ 100ml、200ml 容またはそれに類するもの
- (1) 振とう器
- (1) カラスロート 直径 90mm、75mm
- (1) メスフラスコ 1000ml、100ml
- (1) マイクロンリンシあるいはマイクロピペット 1000 μ l、200 μ l、100 μ l 容
- (10) ホールピペット 10ml、8ml、4ml 容
- (11) メスシリンダー 50ml 容
- (12) 10ml 目盛り付き試験管または同等のもの
- (13) リザーバー Sep-Pak 用 60ml、Waters またはガラス注射器等
- (14) ガラス注射器 20ml 容
- (15) リザーバーアダプター リザーバーと前処理カラムとの連結用
- (16) ストップコック 固相抽出用
- (17) シラーン処理褐色バイアル Supelco, 4ml、キャップ付き
- (18) ハキュームマニホールドまたはカラムスタント
- (19) 濃縮装置 窒素吹きつけ装置付きアルミブロックヒーターあるいは遠心エバポレーター等
- (20) 高速液体クロマトグラフ ポンプ、注入システム、蛍光検出器、カラムヒーター、テカノサー、記録計
- (21) LC 用 ODS カラム 4.6mm i.d. \times 250mm、粒径 5 μ m
- (22) 計量器 25.0g を小数点第 1 位まで正確

に量ることができるもの

- (23) 試験ミキサー ホルテノクス等
- ### III-2 試薬
- (1) アセトニトリル LC グレード
 - (2) メタノール LC グレード
 - (3) 精製水 LC グレードまたは同等のもの
 - (4) 酢酸 特級
 - (5) 炭酸水素ナトリウム 特級
 - (6) 酢酸アンモニウム 特級
 - (7) 1%炭酸水素ナトリウム水溶液 炭酸水素ナトリウム 10g を 1000ml メスフラスコにとり、精製水で溶解後、1000ml に定容する。
 - (8) 多機能カラム用抽出溶媒 アセトニトリル-精製水 (86+14)、アセトニトリル 86 容、精製水 14 容の割合で混合する。最低 2000ml 必要。
 - (9) IAC 用抽出溶媒 メタノール-1%炭酸水素ナトリウム水溶液 (7+3)、メタノール 7 容、1%炭酸水素ナトリウム水溶液 3 容の割合で混合する。最低 2000ml 必要。
 - (10) IAC 用希釈液 PBS-0.01% Tween 20、PBS 錠 5 個を 1000ml メスフラスコにとり、約 800ml の精製水で溶解後、Tween 20 100 μ l を加え、精製水にて 1000ml に定容する。最低 2000ml 必要。
 - (11) IAC 用洗浄液 10mmol/l 酢酸アンモニウム水溶液、酢酸アンモニウム 0.77g を 1000ml メスフラスコにとり精製水で溶解後、1000ml に定容する。
 - (7) LC 注入液 アセトニトリル-精製水-酢酸 (30+70+1)、アセトニトリル 30 容、精製水 70 容、酢酸 1 容の割合で混合する。