

トリル900  $\mu\text{L}$ を加え密栓後、良く攪拌する  
(スタンダード2: 10 ng/mL溶液)。その後  
下表に従い、スタンダード1 と2 をHPLC 用  
バイアルにピペッターで分注し、窒素気流  
を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除  
去する。

③ 乾固した残さにTFA0.1 mLを 加え、密  
栓をして激しく攪拌する。室温、暗所で15  
分間、放置したのち注入溶媒0.4 mL を加え  
て混和したものをHPLC 用検量線溶液とす  
る。

④ 作製した6濃度の検量線用溶液50  $\mu\text{L}$   
(試験溶液の注入量が50  $\mu\text{L}$ の場合、試験  
溶液の注入量に合わせる)をHPLC に注入し、  
ピークの高さまたはピークの面積で検量線  
を作成する。

### (3) 定量

試験溶液をHPLC に注入し、得られたクロ  
マトグラムにおいて各アフラトキシンの保  
持時間と一致するピークの高さまたはピー  
ク的面積と「アフラトキシン検量線の作成」  
で求めておいた検量線から試験溶液中の濃  
度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の  
濃度の関係は以下である。

#### ①多機能カラムの場合

試料中の各アフラトキシンの濃度 (ng/g)  
=試験溶液中の各アフラトキシンの濃度  
(ng/mL)  $\times 4 \times 50 \div W$  (試料量)

#### ②アフィニティカラムの場合

試料中の各アフラトキシンの濃度 (ng/g)  
=試験溶液中の各アフラトキシンの濃度  
(ng/mL)  $\times 2 \times 50 \div W$  (試料量)

B1、B2、G1、G2 の合計でトータルアフ  
ラトキシンの濃度を求める。

(v)高速液体クロマトグラフ-質量分析計  
(LC/MS)による分析

LC/MS (またはLC/MS/MS) を用いて試験溶液  
について測定を行う。

### (1)測定条件

#### ①LC/MSの測定例

カラム充てん剤 オクタデシルシリル  
化シリカゲル (粒径3~5  $\mu\text{m}$ ) を用いる。

カラム 内径2.0 mm、長さ150 mm

カラム温度 40  $^{\circ}\text{C}$

LC/MS 移動相アセトニトリル・メタノ  
ール・10 mmol/L 酢酸アンモニウム (2:6:  
15) を用いる。

流速 0.2 mL/min

注入量 5-20  $\mu\text{L}$

質量分析計条件(例)

イオン化モードESI-positive

モニターイオン (m/z) アフラトキシ  
ンB1:313, B2:315, G1:329, G2:331

#### ②LC/MS/MSの測定例

カラム充てん剤 オクタデシルシリル  
化シリカゲル (粒径3~5  $\mu\text{m}$ ) を用いる。

カラム 内径2.0 mm、長さ150 mm

カラム温度 40  $^{\circ}\text{C}$

LC/MS/MS 移動相 メタノール・10 mmol/L  
酢酸アンモニウム

(62:38) を用いる。

流速 0.2 mL/min

注入量 5  $\mu\text{L}$

質量分析計条件(例)

イオン化モード ESI-positive

ドライガス 10L/min at 350 $^{\circ}\text{C}$

ネプライザーガス 345 kPa

フラグメンター 100V

モニターイオン (m/z)

### (2)アフラトキシン検量線の作成 (例)

(LC/MS/MSの場合も同様)

①アフラトキシン標準液 (配付) を室温に

戻した後、100 μLをピペッターでキャップ付きバイアル（褐色シラン処理）にとり、アセトニトリル900 μLを加え密栓後、試験管ミキサー等で完全に溶解する。（スタンダード1：100 ng/mL溶液（B1, G1の濃度：以下同様））。

②①で作製したスタンダード1：100 ng/mL標準溶液100 μLをキャップ付きバイアル（褐色シラン処理）にとり、アセトニトリル900 μLを加え密栓後、良く攪拌する（スタンダード2：10 ng/mL溶液）。その後下表に従い、スタンダード1と2をLC/MS用バイアルにピペッターで分注し、窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去する。

③乾固した残さにLC/MS移動相を0.4mLを加えたものをLC/MS用検量線溶液とする。

④作製した6濃度の検量線用溶液5 μL（試験溶液の注入量が5 μLの場合、試験溶液の注入量に合わせる）をLC/MSに注入し、ピークの高さまたはピークの面積で検量線を作成する。

### (3) 定量

試験溶液をLC/MS（またはLC/MS/MS）に注入し、得られたクロマトグラムにおいて各アフラトキシンの保持時間と一致するピークの高さまたはピーク面積と「(2)アフラトキシンの検量線の作成」で求めておいた検量線から試験溶液中の濃度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の濃度の関係は以下である。なお、機器の感度により希釈し測定した場合はその希釈率を乗ずる。

#### ①多機能カラムの場合

試料中の各アフラトキシンの濃度 (ng/g)  
= 試験溶液中の各アフラトキシンの濃度 (ng/mL) × 4 × 50 ÷ W (試料量)

#### ②アフィニティカラムの場合

試料中の各アフラトキシンの濃度 (ng/g)  
= 試験溶液中の各アフラトキシンの濃度 (ng/mL) × 2 × 50 ÷ W (試料量)

B1、B2、G1、G2の合計でトータルアフラトキシンの濃度を求める。

#### 3) 乳中のアフラトキシンのM1試験法の妥当性

事務局が作製したプロトコル案を評価委員会で検討し、ホームページ上に公開、寄せられたパブリックコメントを検討したのち、コラボラティブスタディプロトコルとして以下の様に決定した。

「乳中のアフラトキシンのM1の分析法」コラボラティブスタディプロトコル

#### 操作手順

##### (i). 前処理

(1) 添加用牛乳の場合：37℃に温めて穏やかに攪拌後、天秤 [5.1 (1)] で正確に100.0gを共栓付き三角フラスコ [5.1 (5)] に量り取る。これに添加用アフラトキシンのM1溶液100 μLをピペッター等 [5.1 (2)] で加え、攪拌し、10分間超音波 [5.1 (20)] をかける。

約45 mLを50mL容プラスチック遠心チューブに移し、遠心分離 (3000 rpm、5分間) する。

汚染牛乳の場合：37℃に温め、10分間超音波をかける。メスシリンダー等で約50 mLを量り、共栓付き三角フラスコにとる。約45 mLを50 mL容プラスチック遠心チューブに移し、遠心分離 (3000 rpm、5分間) する。

粉末乳の場合：室温に戻した後、天秤で正確に5.0 gをメスフラスコに量りとり、50℃の温水30 mL程度に溶かし、37℃程度に冷やした後、37℃の水で正確に50 mL

にする。10分間超音波をかける。

(2) ガラスロートにガラス繊維ろ紙をセットし、(1)をろ過する。粉末乳のろ過が困難な場合は遠心分離(3000 rpm、5分間)する。ろ液を共栓付き三角フラスコにとり、試料溶液とする。試料溶液は出来るだけ早くイムノアフィニティーカラムに注入する。(時間が経過するとろ液がカラムに詰まる場合あり。)

(ii). カラム(イムノアフィニティーカラム)による精製法

<イムノアフィニティーカラムの取り扱い上の注意>

カラム内にはPBSが充填されていて、カラム上部には僅かに空気が入っている。そのため、横に倒すと空気がカラム(充填剤)に触れてしまい、その結果良好な回収率が得られなくなるため、保存時から分析終了時まで直立の状態を保っている必要がある。もし、ゲル上の白いフリッツ表面に気泡が溜まっていたら、タッピングして除去すること。

① イムノアフィニティーカラム(配付は室温になるまで放置する。

② きり等でイムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けてから上キャップをはずした後、下キャップをはずし、必要であれば開栓したストップコックを取り付け、カラム架台あるいはバキュームマニホールドにセットする。カラム内溶液を自然落下で排出後、あらたにPBSでカラム内を満たし、自然落下で排出させる。再度PBSでカラム内を満たし、PBSを半分程排出させた後、ストップコックを閉じるか下キャップを付ける。

③ アダプターでリザーバーとカラムを連

結する。

④ 前処理で得られた試料溶液を天秤で正確に20.0 g、ピペーター等に量りとる。ピペーター等でイムノアフィニティーカラムに全量注入する。ピペーターを少量の精製水で洗い、それをアフィニティーカラムに注入する。粉末乳を処理した試料溶液については20.0 mLをピペーター等で正確に注入する。ストップコックを開き、1~2滴/秒の速さでろ液を排出させる。途中、排出速度が非常に遅くなった場合には、ゲル上の白いフリッツ表面に泡が付着していることがあるので、リザーバーおよびカラムを手で保持し、試料ろ液がこぼれないよう注意し、カラムを指等でタッピングし泡を取り除く。全てのろ液を排出させたのち、リザーバーを取り除く(ポリプロピレン等のプラスチック製リザーバーの場合、リザーバーの洗浄は必要無いが、ガラス製注射筒を用いた場合には、全ての試料溶液を排出させる前に少量の精製水で注射筒内を洗浄し、イムノアフィニティーカラムに注入する)。カラムを精製水15 mL以上で洗浄し(精製水でカラム内を満たし排出させる操作を5回繰り返す)、アダプターを取り付けたシリンジ等で強く通気しカラム内の水分を十分に追い出す。その後キャップ付きバイアルあるいは同等品にアセトニトリル1 mLで溶出し5分間放置後、アセトニトリルを1 mLずつ2回、合計3 mLで溶出させ、さらにアダプターを取り付けたシリンジ等で強く通気し、ゲル内のアセトニトリルを排出させる。

⑤ 窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去する。

⑥ HPLC注入液アセトニトリル:水(2:8) 1.0 mLを加えたものを試験管ミキサー等で

完全に溶解する。HPLC用ガラスバイアルにうつす。試験溶液が濁っている場合はエッペンドルフ用チューブなどにうつし、10,000 rpm以上、5 分間遠心し、その上清をHPLC用ガラスバイアルにうつす。これをHPLC用試験溶液とする。

(iii). 高速液体クロマトグラフ (HPLC) による測定

HPLCを用いて試験溶液について測定を行う。

(1)測定条件 (例)

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径3~5  $\mu\text{m}$ ) を用いる。

カラム内径4.6 mm、長さ150 mm 又は250 mm

カラム温度 40  $^{\circ}\text{C}$

HPLC 移動相アセトニトリル：水 (25 : 75) を用いる。

流速 0.6-1.0 mL/min

検出波長 励起波長365 nm、蛍光波長435 nm で測定する。

注入量 20-100  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{L}$ を推奨)

(2)アフラトキシンM1検量線の作成

① アフラトキシンM1標準液 (配付) を室温に戻した後、100  $\mu\text{L}$ をピペッターでキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) にとり、アセトニトリル900  $\mu\text{L}$ を加え密栓後、試験管ミキサー等で完全に溶解する。(スタンダード1 : 100 ng/mL溶液)

② ①で作製したスタンダード1 : 100 ng/mL標準溶液100  $\mu\text{L}$ をキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) にとり、アセトニトリル900  $\mu\text{L}$ を加え密栓後、試験管ミキサー等で完全に溶解する。(スタンダード2 : 10 ng/mL溶液)

③ ②で作製したスタンダード2 : 10 ng/mL標準溶液100  $\mu\text{L}$ をキャップ付きバイアル

(褐色シラン処理) にとり、アセトニトリル900  $\mu\text{L}$ を加え密栓後、試験管ミキサー等で完全に溶解する。(スタンダード3 : 1 ng/mL溶液)

④ その後下表に従い、スタンダード1、2、3 をHPLC用バイアルにピペッターで分注し、窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去する。

⑤ 除去したのち、HPLC注入液アセトニトリル：水 (2:8) 1.0 mLを加えて、よく混和したものをHPLC用検量線溶液とする。

④ 作製した8濃度の検量線用溶液100  $\mu\text{L}$  (試験溶液の注入量に合わせる) をHPLCに注入し、ピークの高さまたはピークの面積で検量線を作成する。

(3) 定量

試験溶液をHPLCに注入し、得られたクロマトグラムにおいてアフラトキシンM1の保持時間と一致するピークの高さまたはピークの面積と「(2)アフラトキシンM1検量線の作成」で求めておいた検量線から試験溶液中の濃度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の濃度の関係は以下である。

①添加用牛乳、汚染牛乳の場合

試料中のアフラトキシンM1の濃度 (ng/g)  
= 試験溶液中のアフラトキシンM1の濃度 (ng/mL)  $\div$  W

W = 牛乳量 (例 : 20.01 g)

②粉末乳の場合

試料中のアフラトキシンM1の濃度 (ng/g)  
= 試験溶液中のアフラトキシンM1の濃度 (ng/mL)  $\div$  W/2.5

W = 粉末乳量 (例 : 5.00 g)

(注)

アフラトキシン M1 は発ガン性があるので、操作は手袋を装着し、実験台にはベン

チコート等を使用し、汚染に気をつけること。また、乳を使用した容器・器具は1%次亜塩素酸ナトリウム液に2時間以上浸漬した後、通常の洗浄、棄却を行うこと。

4) 食品中に残留する総アフラトキシン及びアフラトキシンB<sub>1</sub>に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて

食品衛生法に定めている総アフラトキシン及びアフラトキシンB<sub>1</sub>試験法以外の方法によって試験をする場合に、その試験法の妥当性を各試験機関が評価するためのガイドラインについて、平成19年11月15日付け食安発第1115001号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」を参考に以下の内容をカビ毒試験法評価委員会で検討した。

- ガイドラインの趣旨
- ガイドラインの対象
- 用語の定義
- 評価の方法
  - (i) 選択性
  - (ii) 真度（回収率）
  - (iii) 精度
- 添加を行う食品及び添加濃度

### C. 研究結果及び考察

1. デオキシニバレノール(DON)及びニバレノール(NIV)の一斉分析法

(1) HPLC-UVを用いたDON/NIVの一斉分析法

(2) LC/MS (LC/MS/MS) を用いたDON/NIVの一斉分析法

表1-1から1-6にコラボラティブスタディの結果を示した。

(3) 定量下限と検出下限

HPLC-UV 検出法の定量下限と検出下限は、

本共同試験の前に行われた予備試験によつて求められたもので、表1-7に示した。

LC/MS/MS法の定量および検出限界は、それぞれの機種により大きく異なったため、今回は算出しなかった。

(4) 「カビ毒試験法評価委員会」による評価得られた有効なデータから、室内併行性(RSD<sub>r</sub>)と室間併行性(RSD<sub>R</sub>)を算出し、その値からHorRat値を評価した。本コラボラティブスタディに用いた添加量である0.1 mg/kgから1.0 mg/kgまでの範囲において、本分析法の妥当性は認められると判断された。また、2種類の多機能カラムにおける有意な分析値の差は認められず、両者とも分析法に使用するのに問題はないと判断された。

(5) コラボラティブスタディ参加機関

1	(株)日清製粉グループ本社
2	アサヒビール(株)
3	キリンホールディングス(株)
4	キューピー(株)研究所
5	(独)農林水産消費安全技術センター
6	韓国農業科学技術院 National Institute of Agricultural Science & Technology
7	(財)日本食品分析センター
8	(財)日本冷凍食品検査協会
9	神奈川県衛生研究所
10	サントリー(株)
11	(財)日本穀物検定協会
12	(独)農林水産消費安全技術センター仙台センター

2. 落花生の総アフラトキシン試験法の妥当性確認のためのコラボラティブスタディ

(1) コラボラティブスタディの結果

落花生に総アフラトキシンを添加した試料における回収率及び RSDR はそれぞれ 89.3 % から 95.6 %、16.4 % から 18.7 % でいずれも良好な結果であった。

また、自然汚染試料の測定結果は 18.7 ng/g で期待濃度の 95.9 % で、RSDR は 18.4 % であった。

定量限界は多機能カラムでは B1、G1 0.8 µg/kg、B2、G2 0.24 µg/kg、総（トータル）アフラトキシンで 2.08 µg/kg、イムノアフィニティカラムでは B1、G1 0.4 µg/kg、B2G2 0.12 µg/kg 総（トータル）アフラトキシンで 1.04 µg/kg であった。

(2) 「カビ毒試験法評価委員会」による評価

得られた有効なデータから、室内併行性 (RSDr) と室間併行性 (RSDR) を算出し、その値から HorRat 値を評価した。本コラボラティブスタディに用いた総アフラトキシン添加量である 8 ng/g から 32 ng/g までの範囲において、本分析法の妥当性は認められると判断された。

(i) 抽出溶剤としてメタノールを使用し、多機能カラムで精製した後、HPLC で測定した場合

抽出溶剤としてアセトニトリルを用いた方法と比較した場合、回収率はやや低い傾向及び妨害成分がやや多く認められたが、真度、精度等において許容の範囲で本分析法の妥当性は認められると判断された。

(ii) 精製カラムとしてイムノアフィニティカラムを使用し精製した後、HPLC で測定した場合多機能カラムを用いた方法と比較した場合、回収率はやや低い傾向が認められたが、精度、HorRat 値において良好な結果で本分析法の妥当性は認められると判断さ

れた。

(iii) LC/MS による測定結果

イムノアフィニティカラムによる精製した場合と多機能カラムを用いた値を比較すると、RSDr、RSDR、HorRat がいずれも低い結果であった。アフラトキシン分析において LC/MS 測定、特に ESI によるイオン化法は試験溶液中のマトリックスに影響されやすいことが知られていることから、イムノアフィニティカラムの精製能力が高いことが示唆される。また、分析結果のばらつきが大きい機関が認められ、HPLC に比べ測定の精度に問題点があることが示唆されたことから、事前の LC/MS の測定の留意点等検討する結果であった。

(3) コラボラティブスタディ参加機関

1	(財) マイコトキシン検査協会
2	アサヒビール(株)
3	明治乳業(株)
4	日本エコテック(株)
5	(財) 食品分析開発センター SUNATEC
6	(株) 日清製粉グループ本社
7	川崎市衛生研究所
8	(財) 食品環境検査協会
9	(財) 日本冷凍食品検査協会
10	キューピー(株) 研究所
11	森永製菓(株)

3. 乳中のアフラトキシン M1 試験法の妥当性確認のためのコラボラティブスタディについて

(1) コラティブスタディの結果

乳に添加した試料及び粉末乳における回収率及び RSDR はそれぞれ 88.2 % から 94.5 %、6.3 % から 11.9 % であった。

また、自然汚染乳の測定結果は 0.46 ng/g

で期待濃度の 92.0 %で RSDR は 8.3 %でい  
ずれも良好な結果であった。

定量下限値は液体乳に換算して 0.002  
ng/g から 0.050 ng/g で、機関間や使用機器  
による差が認められた。

(2) 「カビ毒試験法評価委員会」による評価  
得られた有効なデータから、室内併行性  
(RSD<sub>r</sub>) と室間併行性(RSD<sub>R</sub>)を算出し、  
その値から HorRat 値を評価した。本コラ  
ボラティブスタディに用いた総アフラトキシ  
ン添加量である 0.05 ng/g から 1.0 ng/g  
までの範囲において、本分析法の妥当性は  
認められると判断された。

(3) コラボラティブスタディ参加機関

1	(財) 日本食品分析センター
2	キューピー(株)研究所
3	雪印乳業(株)
4	川崎市衛生研究所
5	(財) 食品分析開発センター SUNATEC
6	森永製菓(株)
7	明治乳業(株)
8	日本エコテック(株)
9	浜松市保健環境研究所
10	三重県保健環境研究所

4. 食品中に残留する総アフラトキシン及  
びアフラトキシン B<sub>1</sub>に関する試験法の妥  
当性評価ガイドラインについて

(1) 評価の方法

カビ毒試験法評価委員会で検討した結果  
次のような結論に至ったため、これを厚労  
省薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会食  
品規格部会への提案事項とした。

食品ごとにアフラトキシンを添加して、  
測定結果から以下のパラメーターを求め、  
それぞれの目標値等に適合していることを

確認する。また、次に示す方法以外は、平  
成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001  
号「食品中に残留する農薬等に関する試験  
法の妥当性評価ガイドラインについて」に  
準じる。

(i) 選択性

アフラトキシンを含まない試料(ブラン  
ク試料)について操作を行い、定量を妨害  
するピークがないことを確認する。

(ii) 真度(回収率)

同一濃度のアフラトキシンを添加した試  
料 5 個以上を試験法にしたがって、定量し、  
得られた定量値の平均値の添加濃度に対す  
る比率を求め、これを回収率とする。目標  
値は表 7 のとおりとする。

(iii) 精度

添加試料の分析を繰り返し、定量値の標  
準偏差および相対標準偏差を求め、併行精  
度および複数の分析者または分析日による  
室内精度を評価する。目標値は表 2 のと  
おりとする。

(2). 添加を行う食品及び添加濃度

(i) 添加を行う食品の種類

添加を行う食品は、原則として試験法を  
適用しようとする食品から選択する。

(ii) 添加濃度

添加濃度は、原則として各アフラトキシ  
ン 2.5 ng/g の合計 10 ng/g とする。

(iii) 添加試料を作成等に当たっての留意  
事項

手順は平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第  
1115001 号「食品中に残留する農薬等に関  
する試験法の妥当性評価ガイドラインにつ  
いて」に準じる。但し、標準溶液の添加後  
よく混合し、一時間放置した後抽出操作を  
行う。

#### (iv) 定量限界

各アフラトキシン 1 ng/g

以上のそれぞれの基準に適合していることを確認することとし、各試験機関が評価するためのガイドラインとした。

#### E. 結論

国際的ハーモナイゼーションを踏まえて、実態調査およびレギュレーションに用いるカビ毒試験法に対し、その妥当性を科学的に評価する委員会を設置した。委員会は分析学の専門家と統計学の専門家および事務局により構成される。この委員会の役割は、AOAC International および ISO 等の国際機関の評価方法にならい、次の9つの段階を経て行われる。

- 1) 委員会に属する作業部会委員がプロトコール(案)を作成し、委員会に提出する。
- 2) 委員会はプロトコールのプレビューし、必要な修正を申し出でる。
- 3) 作業部会は修正し国立医薬品食品衛生研究所のHPに掲載し、一般からのパブリックコメントを求める。
- 4) パブリックコメントを委員会が検討し、さらに必要であれば適切な修正を申し入れる。
- 5) これらの修正がなされたプロトコールを最終的なコラボラティブスタディ用プロトコールとしてHPに掲載し、同時に一般からのコラボラティブスタディ参加機関(11-12機関)を募る。
- 6) 作業部会が試料等を作成し、コラボラティブスタディを実施する。
- 7) 結果を作業部会がまとめ、委員会に提出する。
- 8) 委員会は、その結果を基に分析法の妥

当性の有無を評価する。

9) 妥当性があると評価された方法はHPに公開する。

本事業の3年間に小麦玄麦中のデオキシニバレノールおよびニバレノール一斉試験法、落花生のトータルアフラトキシン試験法、牛乳・粉ミルクのアフラトキシンM1試験法の3つの試験法にの妥当性を評価し、いずれも公定法として耐えうるものであるとの評価が得られている。さらに最近の分析機器の発展に伴って、それぞれの機器で妥当性が確認できることを目的として、総アフラトキシン等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの作成を行った。

これらの結果は、基準値設定とともに妥当性が検証された分析法として、厚生行政に資することとなる

#### 参考文献

- 1) Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U.-S., Sugiura, Y., Ueno, Y.: *J. Agric. Food Chem.* 36, 979-983 (1988)
- 2) Yoshizawa, T.: in *Mycotoxins and Animal Foods*, Smith, J.E. and Henderson R.S. eds., CRC Press, Inc., pp. 306-312 (1991)
- 3) *Environmental Health Criteria 105*, Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecens, Ergot, WHO, Geneva, (1990)
- 4) Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Tabaka, S., Nakajima, M., Nouno, M., Nakaie, Y., Chonan, T., Aoyagi, M., Kibune, N., Mizuno, K., Ishiguro, E., Kanamaru, N., Minamizawa, M., Aita, N., Kushiro, M., Tanaka, K., Takatori, K.: *Mycopathologia*,



161, 239-243 (2006)

## F. 研究発表

### < 学会発表 >

1) 滝埜昌彦(アジレントテクノロジー株式会社)、田中宏輝 ((社)全日本検数協会、現、サントリー株式会社)、田中敏嗣(神戸市環境保健研究所)、小西良子(国立医薬品食品衛生研究所)：第94回日本食品衛生学会学術講演会、平成19年10月26-27日、静岡県立大学

2) 中島正博、永山敏廣、石黒瑛一、内藤成弘、伊藤嘉典、鎌田洋一、小西良子、山本勝彦、田中敏嗣：デオキシニバレノール及びニバレノール同時分析法妥当性試験の評価。

第96回学術講演会日本食品衛生学会、神戸、2008.9

3) 中島正博(名古屋市衛生研究所)、永山敏廣(東京都健康安全研究センター)、石黒

瑛一(日本食品分析センター)、堀江正一(大妻女子大学)、内藤成弘(農研機構・食品総合研究所)、伊藤嘉典、大西貴弘、鎌田洋一、小西良子(国立医薬品食品衛生研究所)、山本勝彦(名古屋学芸大学)、田中敏嗣(神戸市環境保健研究所)：トータルアフラトキシン試験法の妥当性評価、第98回日本食品衛生学会学術講演会、函館国際ホテル、平成21年10月8-9日

## G. 知的所有権の取得状況

なし

表1-1 HPLCによるDONの分析

前処理法	1.0mg/kg添加		0.5 mg/kg添加		0.1 mg/kg添加	
	MF-T 1500	#227	MF-T 1500	#227	MF-T 1500	#227
参加試験室数	12	12	12	12	12	12
有効試験室数	11	11	11	11	11	11
回収率 (%)	93.3±6.5	100.0±4.2	94.1±3.5	101.5±3.4	91.0±2.4	106.1±2.2
RSD <sub>r</sub> (%)	1.1	1.7	6.0	7.6	7.6	11.5
RSD <sub>R</sub> (%)	7.2	4.3	8.0	6.8	25.2	21.0
HorRat	0.45	0.27	0.45	0.38	1.12	0.9

表1-2 HPLCによるNIVの分析

前処理法	1.0mg/kg添加		0.5 mg/kg添加		0.1 mg/kg添加	
	MF-T 1500	#227	MF-T 1500	#227	MF-T 1500	#227
参加試験室数	12	12	12	12	12	12
有効試験室数	11	11	11	11	11	11
回収率 (%)	76.1±5.3	80.6±9.0	78.2±3.7	84.2±3.7	71.9±2.3	90.6±1.7
RSD <sub>r</sub> (%)	4.5	2.1	3.6	3.9	10.7	7.2
RSD <sub>R</sub> (%)	7	11.5	9.6	9.1	31.4	18.1
HorRat	0.44	0.72	0.54	0.51	1.39	0.8

表1-3 HPLCによる自然汚染小麦の分析

前処理法	DON		NIV	
	MF-T 1500	#227	MF-T 1500	#227
参加試験室数	12	12	12	12
有効試験室数	11	11	11	11
平均定量値	0.99	1.06	1.06	1.11
RSD <sub>r</sub> (%)	4.3	2.1	5.8	4.5
RSD <sub>R</sub> (%)	9.5	7.4	8.3	12.9
HorRat	0.6	0.5	0.52	0.57

平均定量値 (単位: mg/kg)

表1-4 LC/MS/MSによるDON分析

前処理法	1.0mg/kg添加		0.5 mg/kg添加		0.1 mg/kg添加	
	MF-T 1500	#227	MF-T 1500	#227	MF-T 1500	#227
参加試験室数	11	11	11	11	11	11
有効試験室数	11	11	11	11	11	11
回収率 (%)	96.4±12.7	100.0±8.2	101.1±6.8	104.1±4.4	105.1±1.8	110.8±1.6
RSD <sub>r</sub> (%)	6.4	5.7	3.8	4.3	6.9	6.7
RSD <sub>R</sub> (%)	9.4	8.3	10.8	8.5	17.5	14.8
HorRat	0.59	0.52	0.61	0.48	0.77	0.65

表1-5 LC/MS/MSによるNIV分析

前処理法	1.0mg/kg添加		0.5 mg/kg添加		0.1 mg/kg添加	
	MF-T 1500	#227	MF-T 1500	#227	MF-T 1500	#227
参加試験室数	11	11	11	11	11	11
有効試験室数	11	11	11	11	11	11
回収率 (%)	80.2±6.5	84.3±5.4	82.6±4.1	87.8±4.4	84.2±1.6	90.8±2.3
RSD <sub>r</sub> (%)	2.0	4.7	3.4	6.6	6.8	6.2
RSD <sub>R</sub> (%)	8.3	6.5	10.2	10.2	18.6	22.0
HorRat	0.52	0.41	0.57	0.58	0.82	0.97

表1-6 LC-MS/MSによる自然汚染小麦の分析

自然汚染 前処理法	DON		NIV	
	MF-T 1500	#227	MF-T 1500	#227
参加試験室数	11	11	11	11
有効試験室数	11	11	11	11
平均定量値	1.01	1.09	1.09	1.17
RSD <sub>r</sub> (%)	6.1	9.1	4.9	6.3
RSD <sub>R</sub> (%)	16.1	16.5	14.5	13.9
HorRat	1.00	1.00	0.91	0.87

平均定量値 (単位: mg/kg)

表 1-7 デオキシニバレノール(DON)及びニバレノール(NIV)の検出限界と定量限界

	検出限界	定量限界
DON	0.05mg/kg	0.1mg/kg
NIV	0.05mg/kg	0.1 mg/kg

表 2 真度（回収率）および精度の目標値

対象マイコトキシン	試行回数(回)	真度（回収率）%	併行精度%	室内精度%
総アフラトキシン	5	70-120	25>	30>
アフラトキシンB <sub>1</sub>	5	70-120	25>	30>

## 第1回カビ毒試験法評価委員会議事録

1 日 時：平成20年6月17日（火）午後2時半より5時半

2 場 所：名古屋市衛生研究所 会議室

（名古屋市瑞穂区萩山町1-11, TEL 052-841-1511）

3 参加者：石黒瑛一（（社）日本科学飼料協会）

伊藤嘉典（国立医薬品食品衛生研究所）

鎌田洋一（国立医薬品食品衛生研究所）

小西良子（国立医薬品食品衛生研究所）

田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）

永山敏廣（東京都健康安全研究センター）

中島正博（名古屋市衛生研究所）

山本勝彦（名古屋学芸大学短期大学部）

参考人：吉田英治（（株）プラクティカル）

4 議 題：

1) カビ毒試験法評価委員会と委員について

カビ毒試験法評価委員会の設立趣旨と委員の紹介およびその役割について田中委員長から説明があった（設立趣旨および委員の紹介およびその役割についてはHPを参照されたい）。

2) カビ毒試験法評価委員会の概要について

本委員会をどのように組織するかを審議し、以下のように委員を次の2つのグループに分けた。

(1) 実務担当（プロトコルの適正、実行性などの評価を担当）、

(2) 統計学的評価委員担当（試料の均一性、コラボスタディ後の結果を評価）

各委員の任期は1年間であり、評価対象のカビ毒によって臨時委員を設けることもある。

なお、事務局は作業部会も兼ねており、分析法のプロトコルの作成、コラボラティブスタディに用いる試料の調製、配布、データの収集などをおこなう。事務局は評価には関与しない。

コラボラティブスタディに関しては IUPAC/ISO/AOAC の international harmonized protocol を参考に評価を行うこと。

で合意された。

### 3) 今年度計画と分担について

今年度はトータルアフラトキシン試験法のコラボラティブスタディを行うこと。落花生、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ、アーモンドを対象に行うことが承認された。試験法は現在の通知法である多機能カラムでの前処理法とイムノアフィニティーカラムでの前処理法を検討する予定である。分析法は高速液体クロマトグラフィー蛍光検出法と高速液体クロマトグラフィー質量分析法の2方法を検討する。

タイムスケジュールとしては、9月までに最終プロトコル(案)を提出させる。9月中旬に第2回会議を開催し、プロトコルの最終結論を出し、10月中旬からHPに掲載しパブリックコメントを求める。11月中旬にコラボプロトコルをHPに掲載し、コラボレータを募集する。翌年1月から2月にかけてコラボスタディを実施し、3月末までに評価を終了する。

なお、昨年度行ったコラボラティブスタディ「小麦のデオキシニバレノールおよびニバレノール同時試験法」について、妥当性評価のためのクライテリアを IUPAC/ISO/AOAC の international harmonized protocol や EC のクライテリアを参考に設定し、それに従ってその妥当性の評価を行う（9月をめどに）。

## 第2回カビ毒試験法評価委員会議事録（案）

1 日 時：平成20年7月14日（月）午前10時より12時15分

2 場 所：東京都健康安全研究センター 会議室

3 参加委員：石黒瑛一（（社）日本科学飼料協会）

伊藤嘉典（国立医薬品食品衛生研究所）

田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）

永山敏廣（東京都健康安全研究センター）

中島正博（名古屋市衛生研究所）

内藤成弘（（独）農研機構 食品総合研究所）

鎌田洋一（国立医薬品食品衛生研究所）

小西良子（国立医薬品食品衛生研究所）

### 4 議 題：

#### 1) 統計学的評価委員からの説明

（独）農研機構 食品総合研究所 内藤成弘委員が新たに加わったことから、内藤委員から農水省でのコラボティブスタディの取り組みに関して説明があった。

#### 2) コラボティブスタディ「小麦のデオキシニバレノールおよびニバレノール同時試験法」の妥当性評価

作業部会から出されたデータを評価した結果

DONおよびNIVそれぞれの濃度が0.1mg/kgから1.0mg/kgまでの範囲であれば本試験法は妥当性がある。との結論を下した。

### 第3回カビ毒試験法評価委員会議事録

1 日 時：平成20年12月11日（水）午後2時より5時30分

2 場 所：神戸市環境保健研究所 会議室

3 参加委員：石黒瑛一（（社）日本科学飼料協会）

田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）

中島正博（名古屋市衛生研究所）

小西良子（国立医薬品食品衛生研究所）

4 議 題：

1) DON・NIV一斉分析法の評価報告書について

原案をもとに、委員から出されたコメントおよび修正案を検討し、HPに公表する最終版を作成した。

2) コラボラティブスタディ「トータルアフラトキシン試験法」のプロトコールの評価

原案をもとに、委員から出されたコメントおよび修正案を検討し、HPに公表する案を作成した。今後の予定は、約1ヶ月間パブコメを募集し、プロトコール最終版を作成後、コラボラティブスタディ参加機関を公募する。

以上



平成21年度第1回カビ毒試験法評価委員会議事録

- 1 日時：平成21年6月3日（火）午前11時半より午後2時
- 2 場所：国立医薬品食品衛生研究所 28号館第1・2会議室
- 3 参加者： 石黒瑛一（（財）日本食品分析センター）
- 内藤成弘（（独）農研機構 食品総合研究所）
- 中島正博（名古屋市衛生研究所）
- 鎌田洋一（国立医薬品食品衛生研究所）
- 小西良子（国立医薬品食品衛生研究所）
- 佐久間久子（国立医薬品食品衛生研究所）
- 渡辺 康（国立医薬品食品衛生研究所）

4 議題：

配付資料一覧：

- ・議事録（案）A4一枚
- ・資料1-1「食品中のアフラトキシンの成分規格の設定に係る審議経緯等」
- ・コラボ結果：HPLC、LCMS、HPLC測定条件、LCMS測定条件、プロトコール（表）
- ・分析法バリデーションの結果、マトリックス検量線、ピスタチオ（IAC）各A4一枚
- ・平成20年度報告書

1) トータルアフラトキシン試験法の妥当性の評価落花生コラボラティブスタディについて

本コラボの目的は、（1）木の実のトータルアフラトキシン試験法の確立と、アセトニトリルの不足の状況（今年初め）を鑑み、メタノール抽出多機能カラムの可能性を探る。（2）LC/MS/MSでの定量、定性の可能性を見極める。対象検体は落花生で行った。

## 2) トータルアフラトキシシンコラボの結果について

事務局よりプロトコールの説明があった。

- ・多機能カラムを前処理に用いる方法：抽出溶媒はアセトニトリル、メタノール

IAC カラムを前処理に用いる方法：抽出溶媒はメタノール

多機能カラム法のみ自然汚染落花生を測定し、抽出溶媒の違いを判断する。

添加液の濃度は以下の通りである。

A液 (B 1 : 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、B 2 : 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、G 1 : 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、G 2 : 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、トータル32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

B液 (B 1 : 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、B 2 : 1.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、G 1 : 7.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、G 2 : 1.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、トータル20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

C液 (B 1 : 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、B 2 : 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、G 1 : 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、G 2 : 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、トータル8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

・全般的に LCMS の結果では B 2、G 2 で RSDR が大きい値であった。HPLC はの結果ではいずれの前処理でも良好の結果が得られた。

## 3) 妥当性の審議

HPLC を用いた試験法では、コラボの評価パラメーターから、試験法としての妥当性に問題はないと判断された。

LCMS を用いた試験法では、使用機種による感度の違いが大きいため、低濃度においてばらつきが大きく、ホラット値も大きい場合も出てくるので、確認試験としての使用に関しては問題はないが、定量試験としては、LCMS のメンテナンス、精度管理を徹底させるなど、検討が必要である。

検量線の範囲は B1G1 は 0.2~20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、B2G2 は 0.05~5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  とする。

本コラボの定量限界は多機能カラム B1G1 0.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、B2G2 0.24  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、トータル値で 2.08  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、IAC では B1G1 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、B2G2 0.12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  トータル値で 1.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と判断された。

一般には規制値の 1/10 で担保できないといけない。しかし今回の場合は 0.1mg/kg 未満の測定だから、残留農薬のルールでは規制値の 1/2、Codex の CCMAS の最新案では 2/5 で ok になる〔内藤先生ご助言〕。

実態調査の場合は IAC とするなど。各機関で定量限界を低める努力をすべきだが基準値の場合は上記の考え方でいく。

本試験法は、トータルアフラトキシンの汚染濃度が 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  から 3 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  まで担保される。

平成21年度 第2回カビ毒試験法評価委員会議事録

日時：平成22年3月11日（木）

場所：国立医薬品食品衛生研究所

1) 議題：

- (1) アフラトキシシン M1 コラボの評価について
- (2) 総アフラトキシシン分析のクライテリア(案)について
- (3) 総アフラトキシシンおよび B1 分析通知法(案)について
- (4) その他

2) 資料：

- ・資料 1-1 アフラトキシシン M1 コラボ結果 まとめ
- ・資料 1-2 アフラトキシシン M1 コラボ プロトコール他
- ・資料 1-3 アフラトキシシン M1 コラボ結果 検定表
- ・資料 2-1 総アフラトキシシン分析通知法 (案)
- ・資料 2-2 アフラトキシシン B1 分析通知法 (案)
- ・資料 2-3(参考)アフラトキシシン B1 分析通知法 H20. 7. 28
- ・資料 2-4 アフラトキシシン試験法の妥当性評価ガイドライン(案)
- ・資料 2-5(参考)農薬試験法の妥当性評価ガイドライン

3) 内容：

(1) アフラトキシシン M1 コラボの評価

- ・アフラトキシシン M1 コラボラティブスタディは、平成22年1月12日発送、2月末締め切りで行った。測定はHPLCのみで行った。添加試料(A液1.0ng/g、B液0.5ng/g、C液0.05ng/g、D液ブランク液(アセトニトリル液))、自然汚染乳、粉末乳(FAPASより購入)の6試料を配付した。11機関に発送したが、1機関が対応出来ず、10機関からデータ提出があった。
- ・低濃度添加試料C液(添加0.05ng/g)の回収率、RSDr、RSDR及び修正HorRatはそれぞれ88.2%、7.4%、8.1%、0.37で良好な結果を示し妥当性が認められた。
- ・ブランク液の扱いについて意見が出された。1機関の分析値の信頼性が高い場合はその数値を引くこともある。定量性のしっかりしている機関、分析専門の機関等の値を採用する方が望ましいのではとの意見が出され、平均値が0.01ng/gとなっているのでこれをブランク値として測定値を補正することにする。
- ・FAPASのレポートに記されている付与された値を真値として粉末乳の回収率計算した。
- ・機関9の値は室内でのばらつきが大きく、なんらかの要因が考えられること、手順がブランク通りではなかったことから除外することにした。
- ・クロマトグラフより、機関10は使用機器に問題があると判断された。
- ・機関10はクロマトグラムからも検出器ランプの劣化の可能性も高い。
- ・以後コラボの際は、標準溶液を測定し、ある一定のS/N比をクリアーしてから実際の試