

- 再現性試験 (標準品)
- △ 外部精度管理試験
- × 再現性試験 (マトリックス)
- サンプル試験

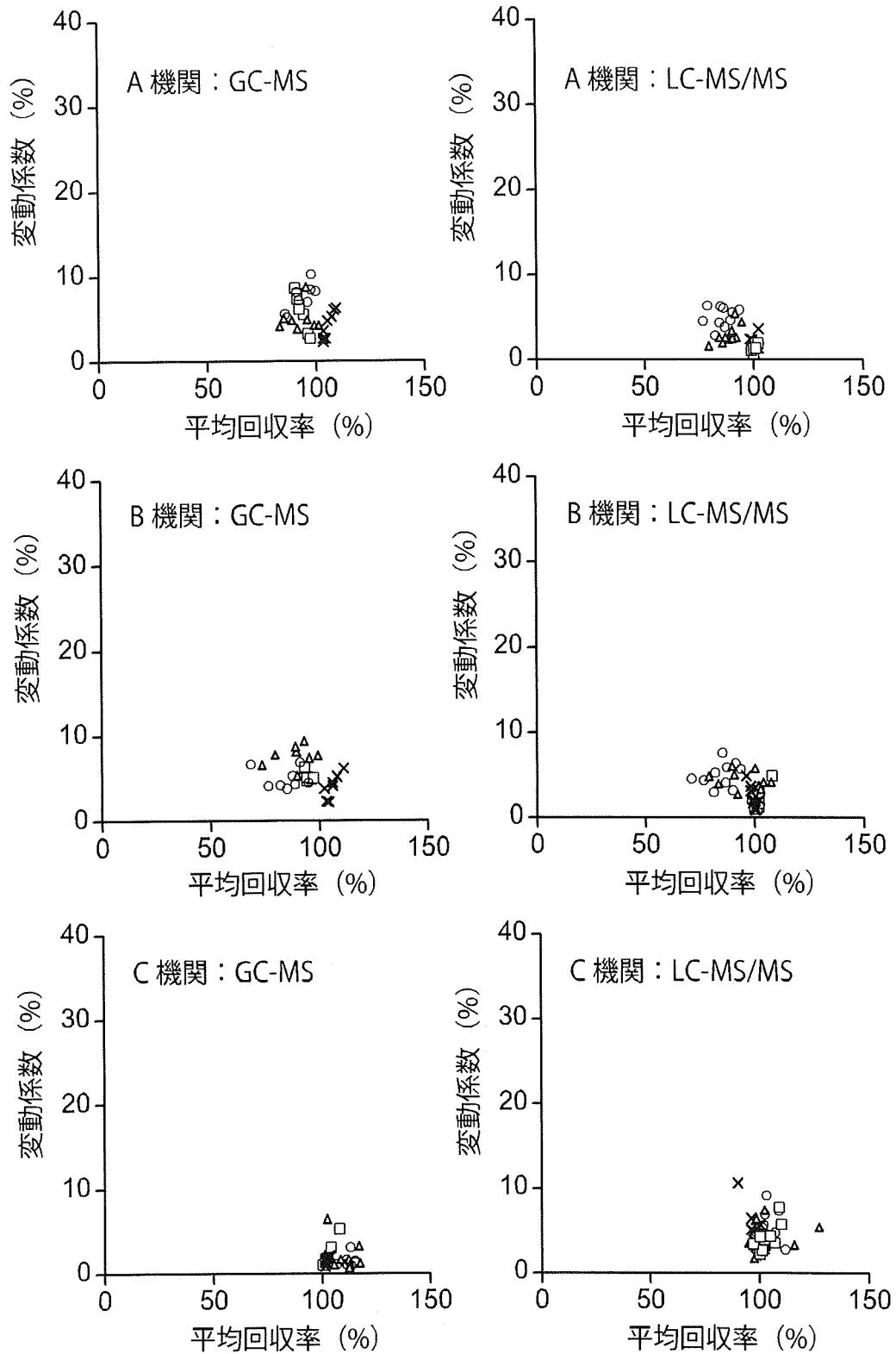


図 5-1. 精度管理試験結果

- 再現性試験 (標準品) △ 外部精度管理試験
 × 再現性試験 (マトリックス) ○ サンプルング試験

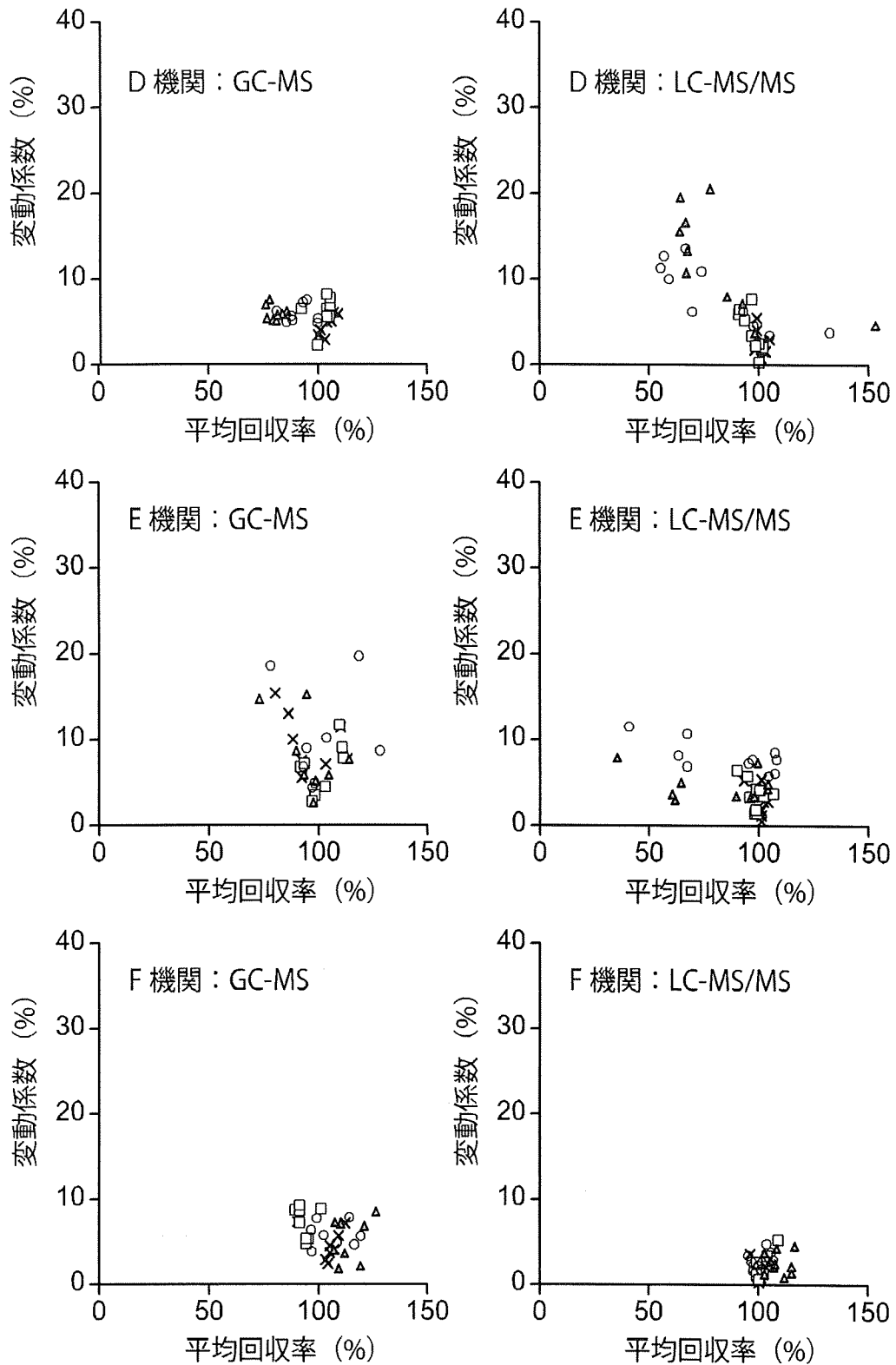


図 5-2. 精度管理試験結果

- 再現性試験 (標準品) △ 外部精度管理試験
- × 再現性試験 (マトリックス) ○ サンプル試験

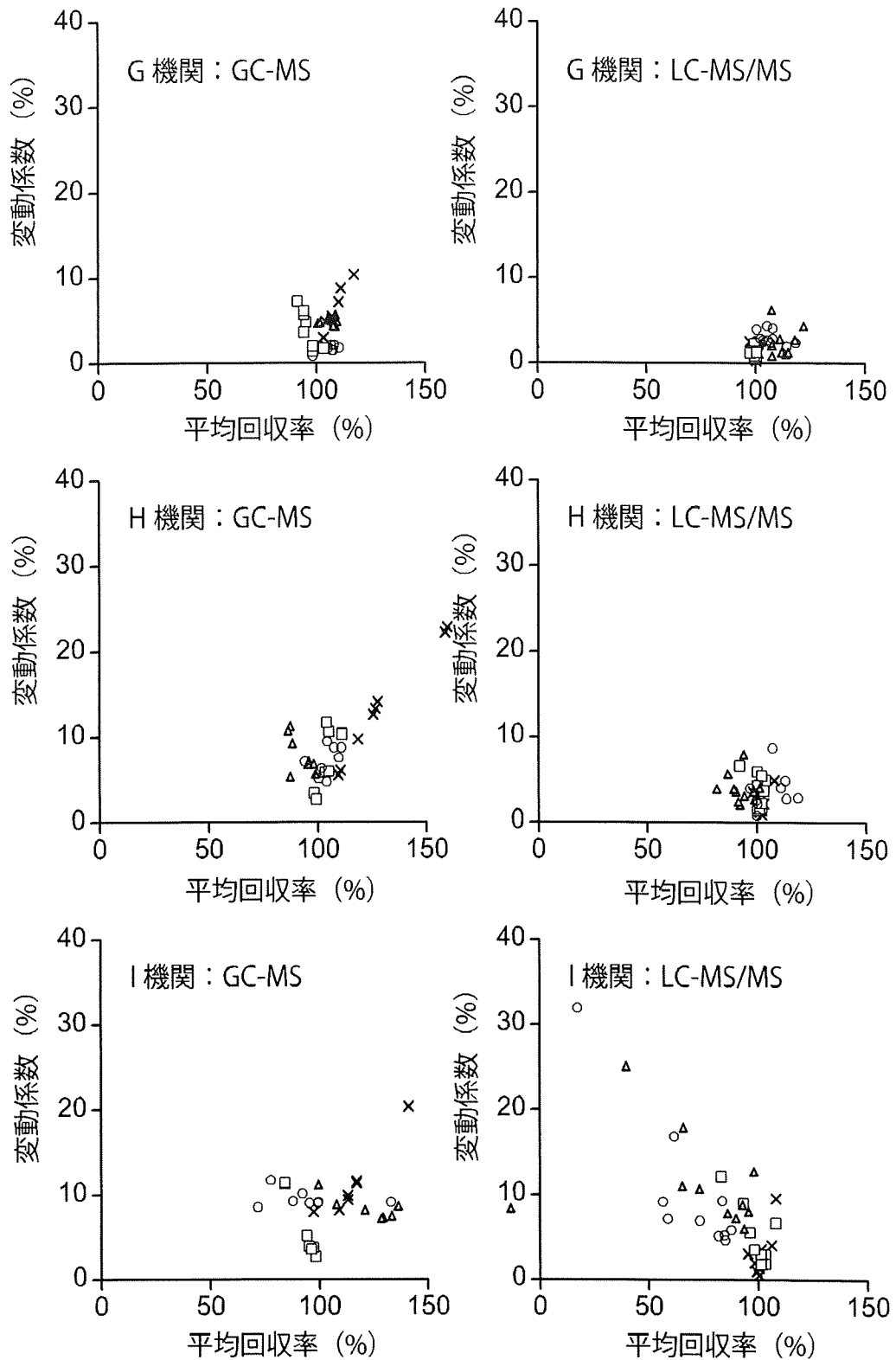


図 5-3. 精度管理試験結果

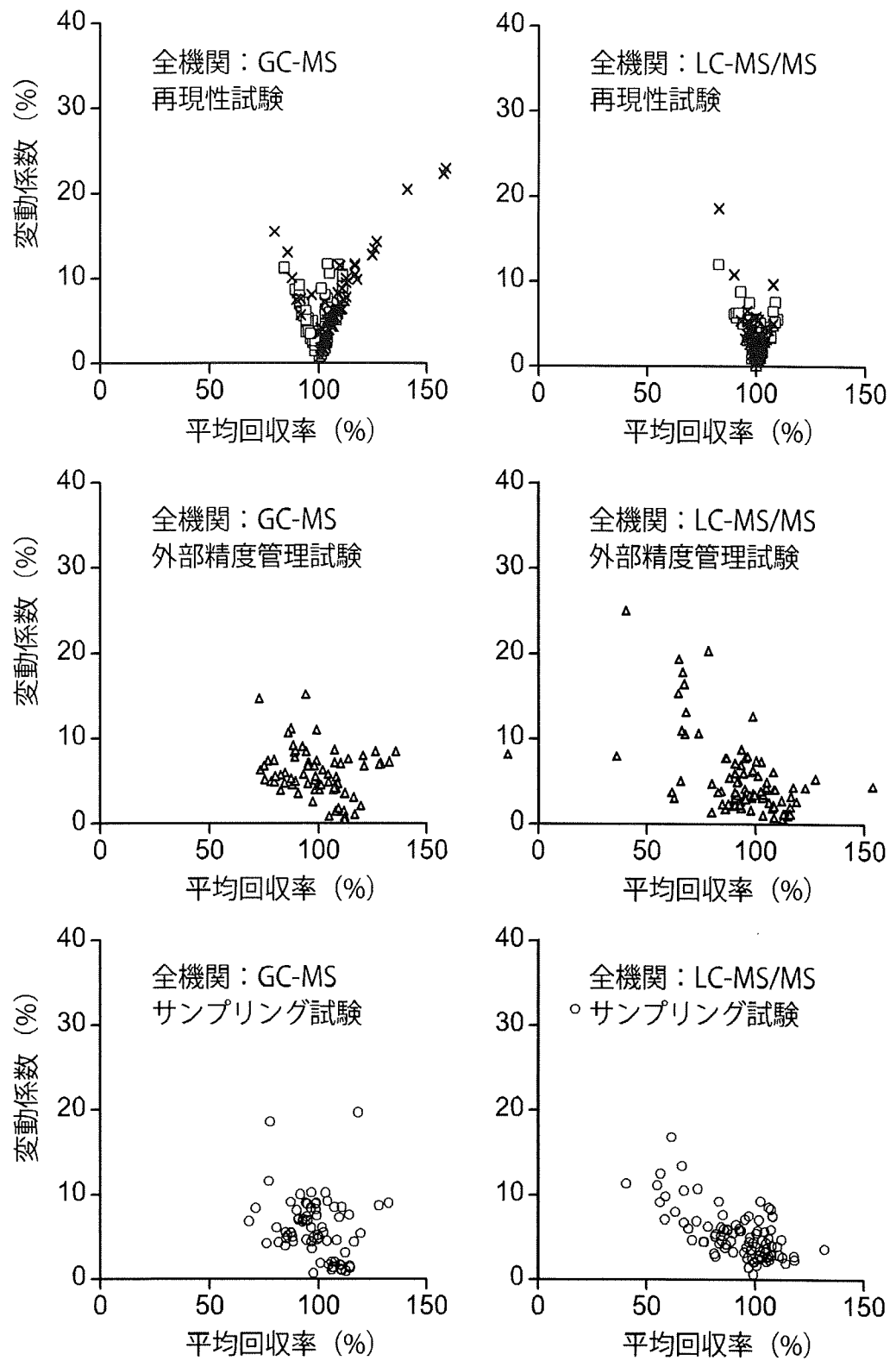
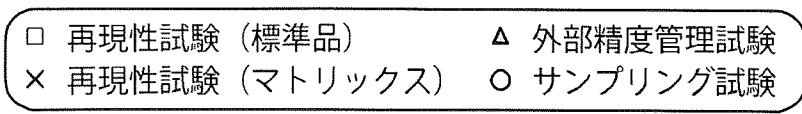


図 5-4. 精度管理試験結果まとめ

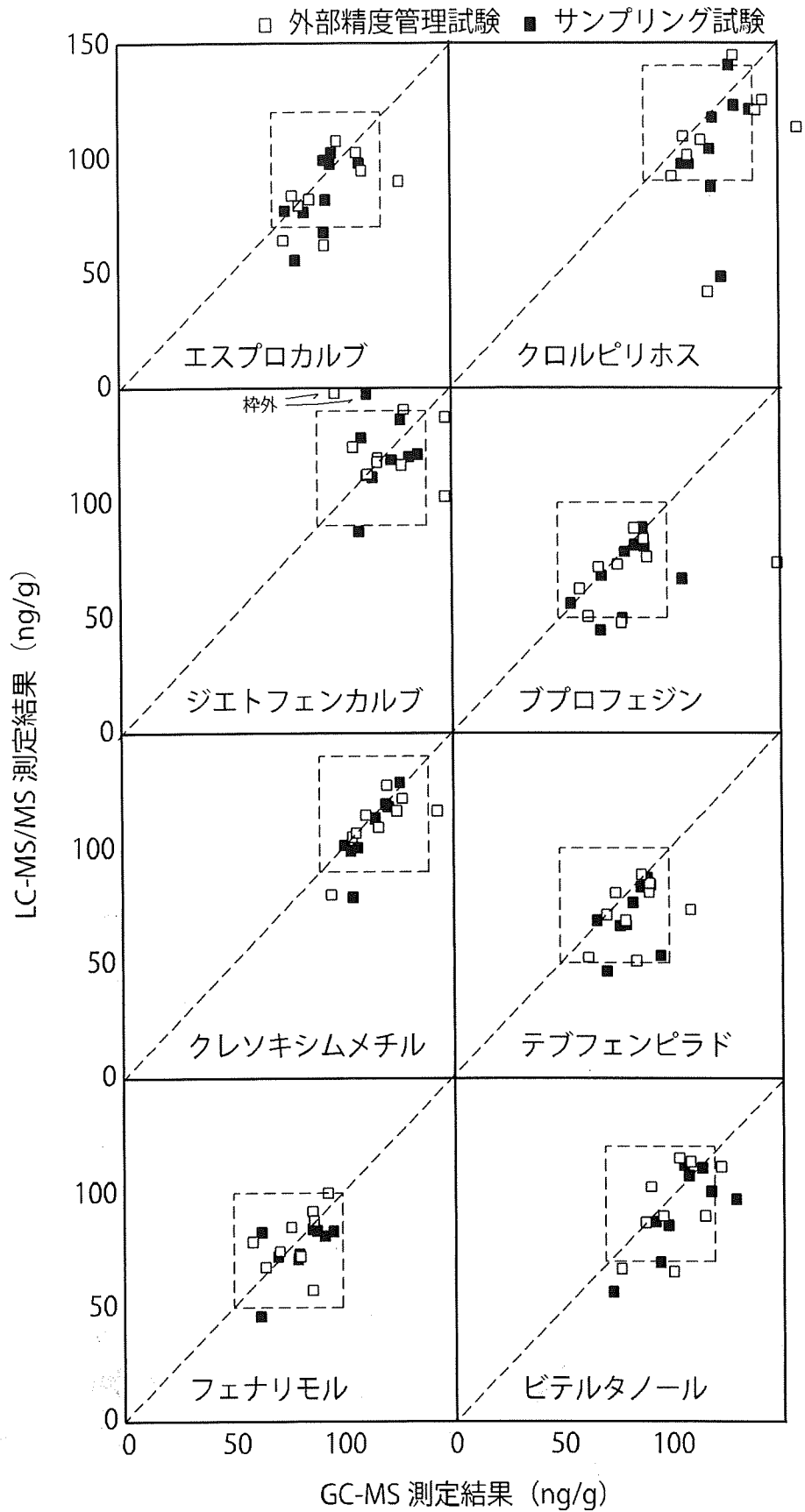
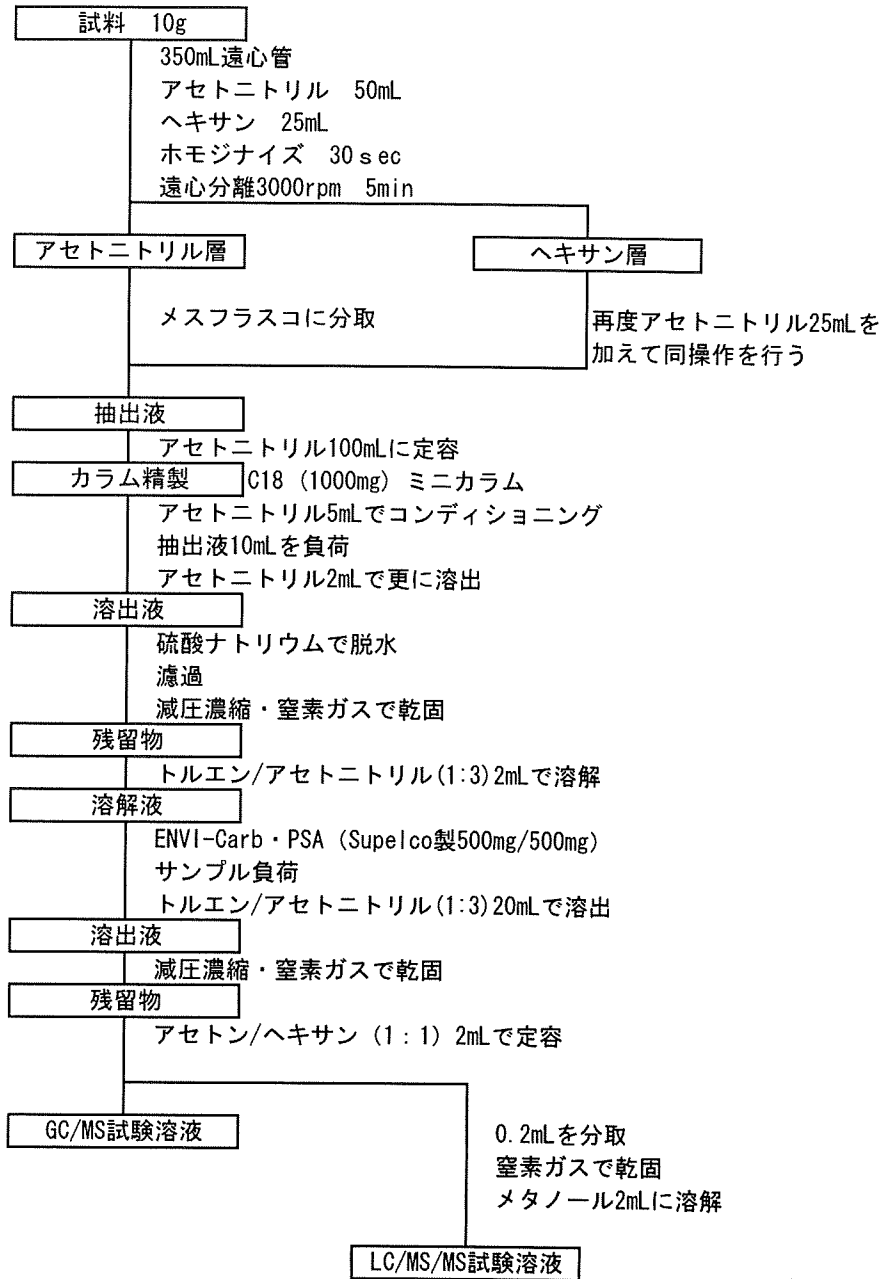


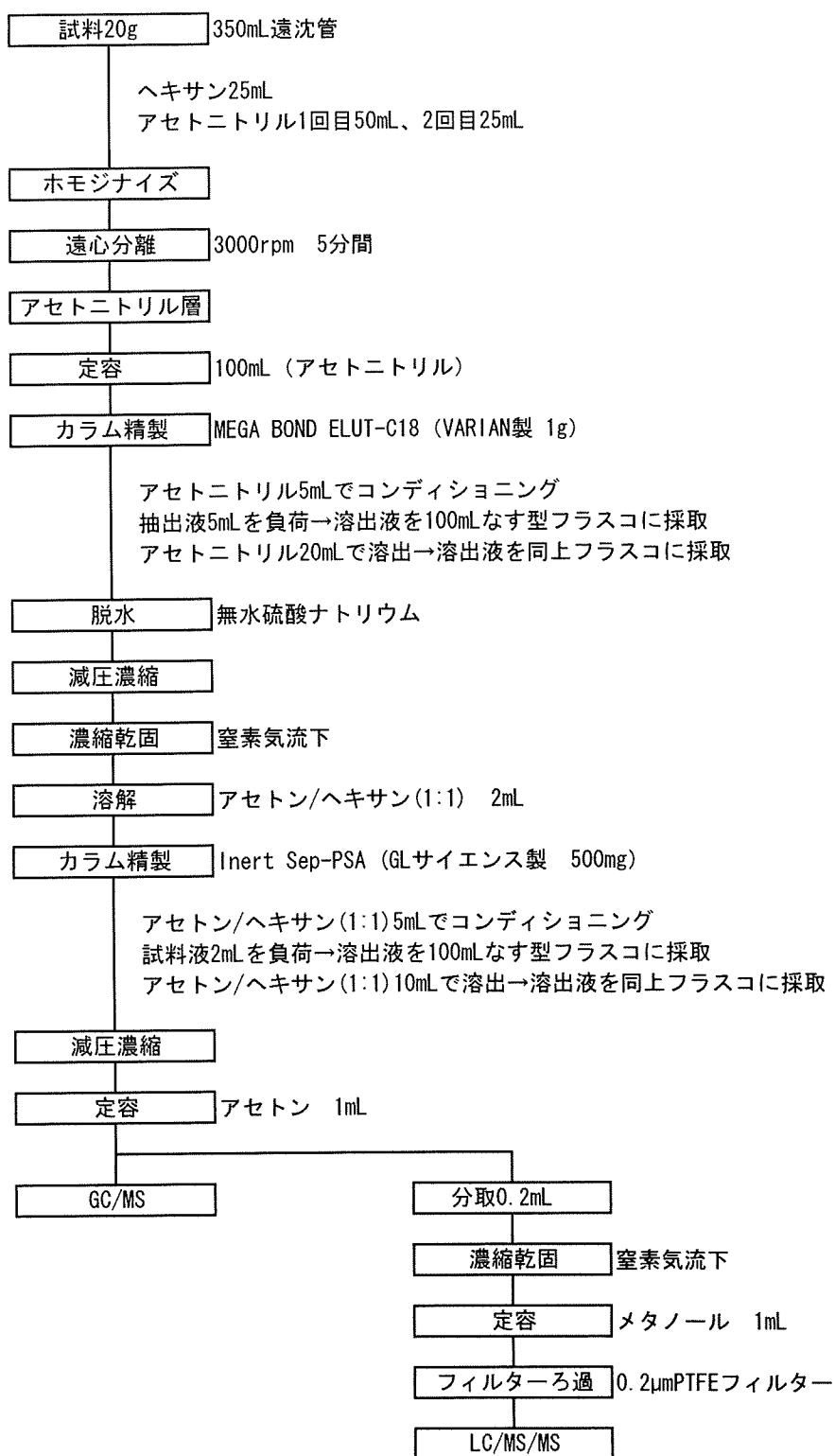
図 6. 各精度管理試験結果における測定機器間相関図

資料1-1 A機関 分析フロー

検 査 フ ロ ー



資料1-2 B機関 分析フロー



資料1-3 C機関 分析フロー

試料採取

パンケーキ 10 g
内部標準 (NAC-d7、Fenitrothion-d6、Chlorpyrifos-d10) 20 μ g (2.0 μ g/g)
30分間放置

水、アセトン-ヘキサン (2 : 3) 抽出

水10 mL加え、30秒間ホモジナイズ
アセトン-ヘキサン (2 : 3) 100 mLで2分間ホモジナイズ抽出
毎分2,500回転で5分間遠心分離後、有機層及び水層を吸引る過
残渣をアセトン-ヘキサン (2 : 3) 50 mLで再度1分間ホモジナイズ抽出
毎分2,500回転で5分間遠心分離後、有機層及び水層を吸引る過
ろ液を合わせ、15 mL以下まで減圧濃縮

多孔性ケイソウ土カラム (20 mL保持用) 抽出

Extrelut (Merck)

塩化ナトリウム5 gを加え、残渣を負荷
酢酸エチル150 mLで洗い込み、注入
溶出液を40°C以下で減圧濃縮 (約1 mLまで)
緩やかに窒素を吹き付けて乾固

GPC分画

残渣をアセトン-シクロヘキサン (1 : 4) に溶解して10 mLに定容
毎分3,000回転で10分間遠心分離後、上清4 mLを注入
59~130mLの画分を分取

SAX/PSAカートリッジカラム精製

カラムを予めアセトン10 mL、次いでヘキサン10 mLで洗浄
59~130mLの画分負荷
アセトン-ヘキサン (1 : 1) 20 mLで溶出
負荷液および溶出液を合わせ、40°C以下で減圧濃縮 (約1 mLまで)
緩やかに窒素を吹き付けて乾固
アセトン-ヘキサン (1 : 1) に溶解して4 mLに定容

GC-MS (1 g試料/mL)

GC-MS (1 g試料/mL)

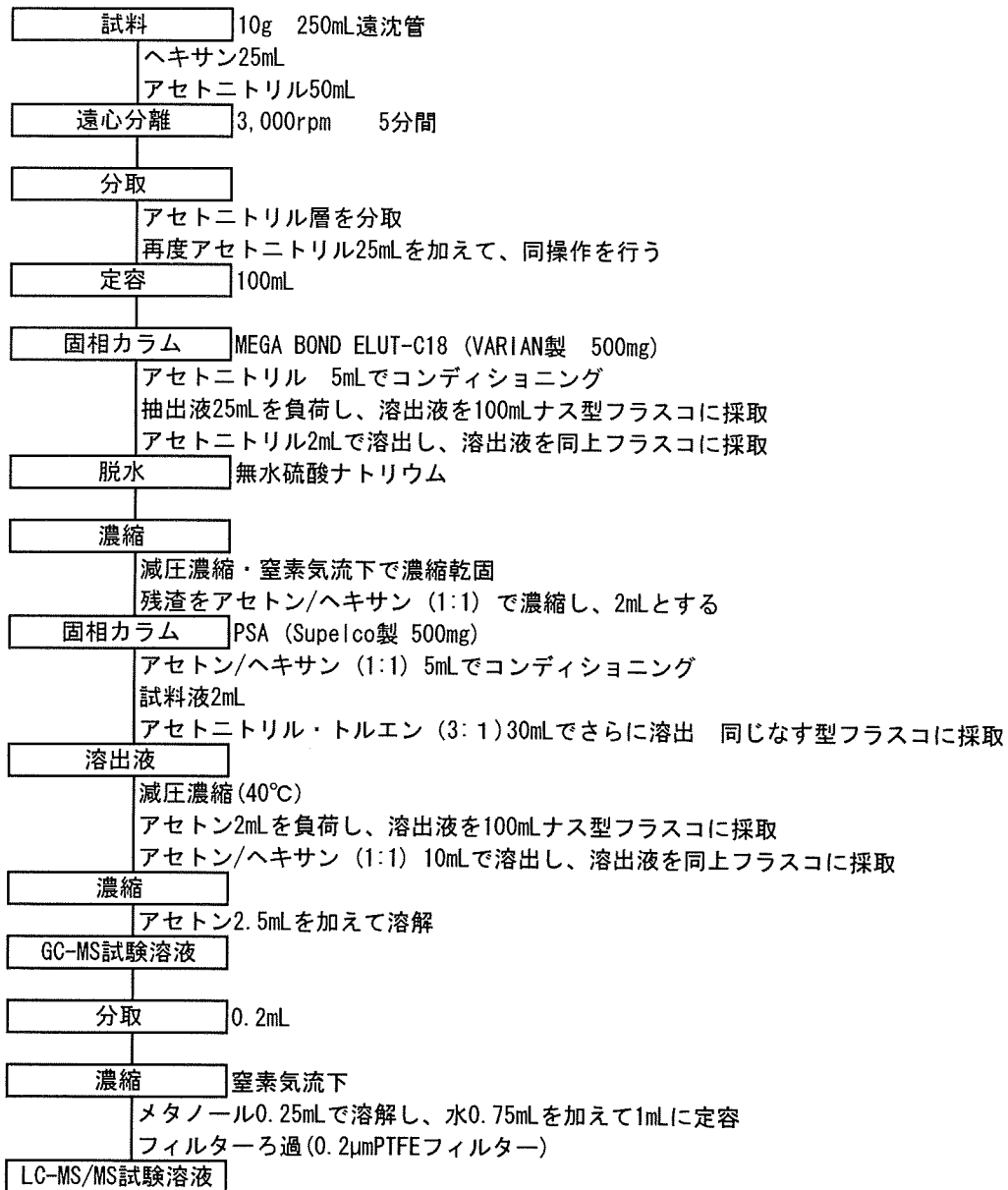
200 μ Lを分取
緩やかに窒素を吹き付けて乾固
メタノール1 mLに溶解

LC-MS/MS (0.2 g試料/mL)

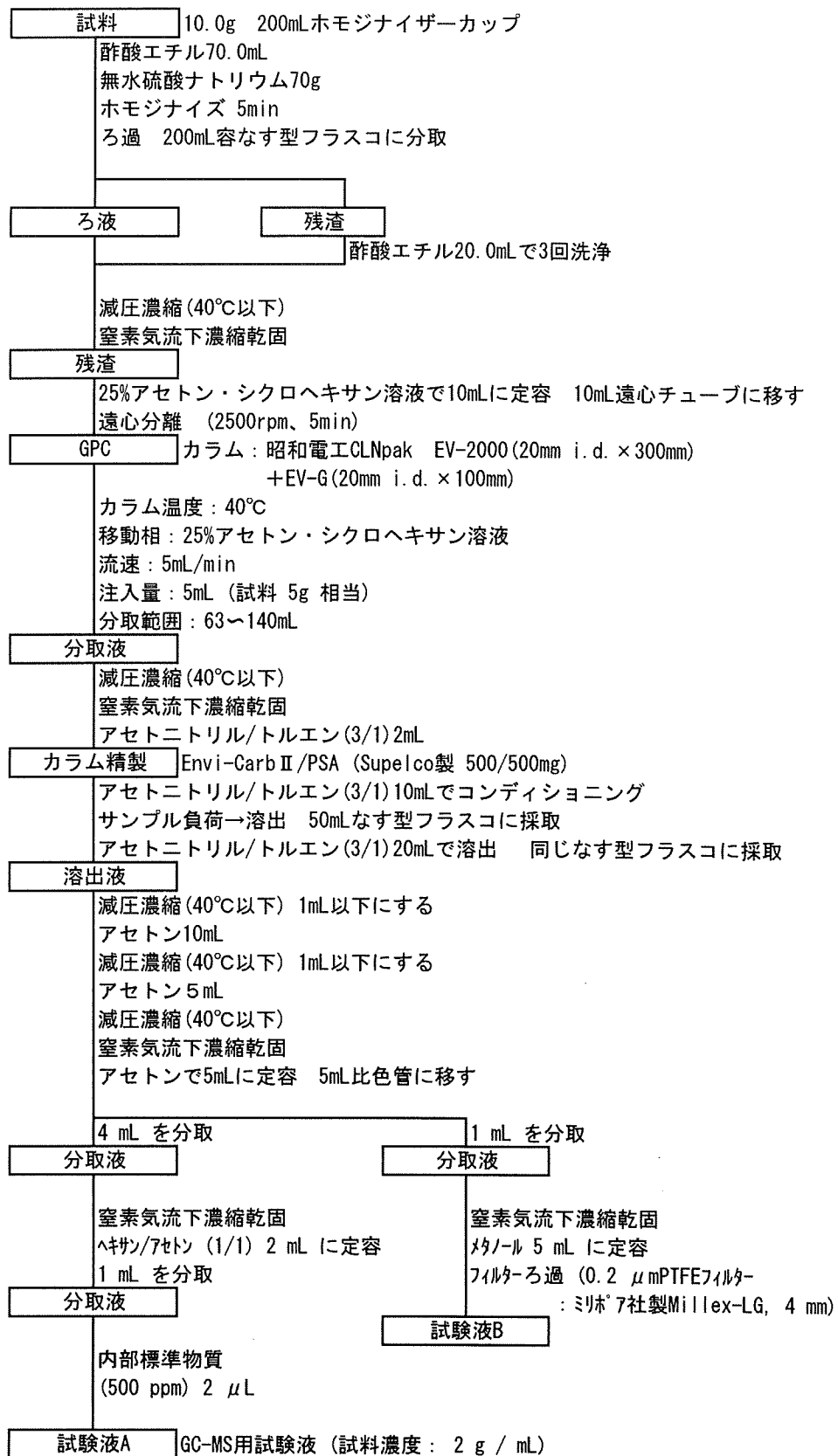
資料1-4 D機関 分析フロー



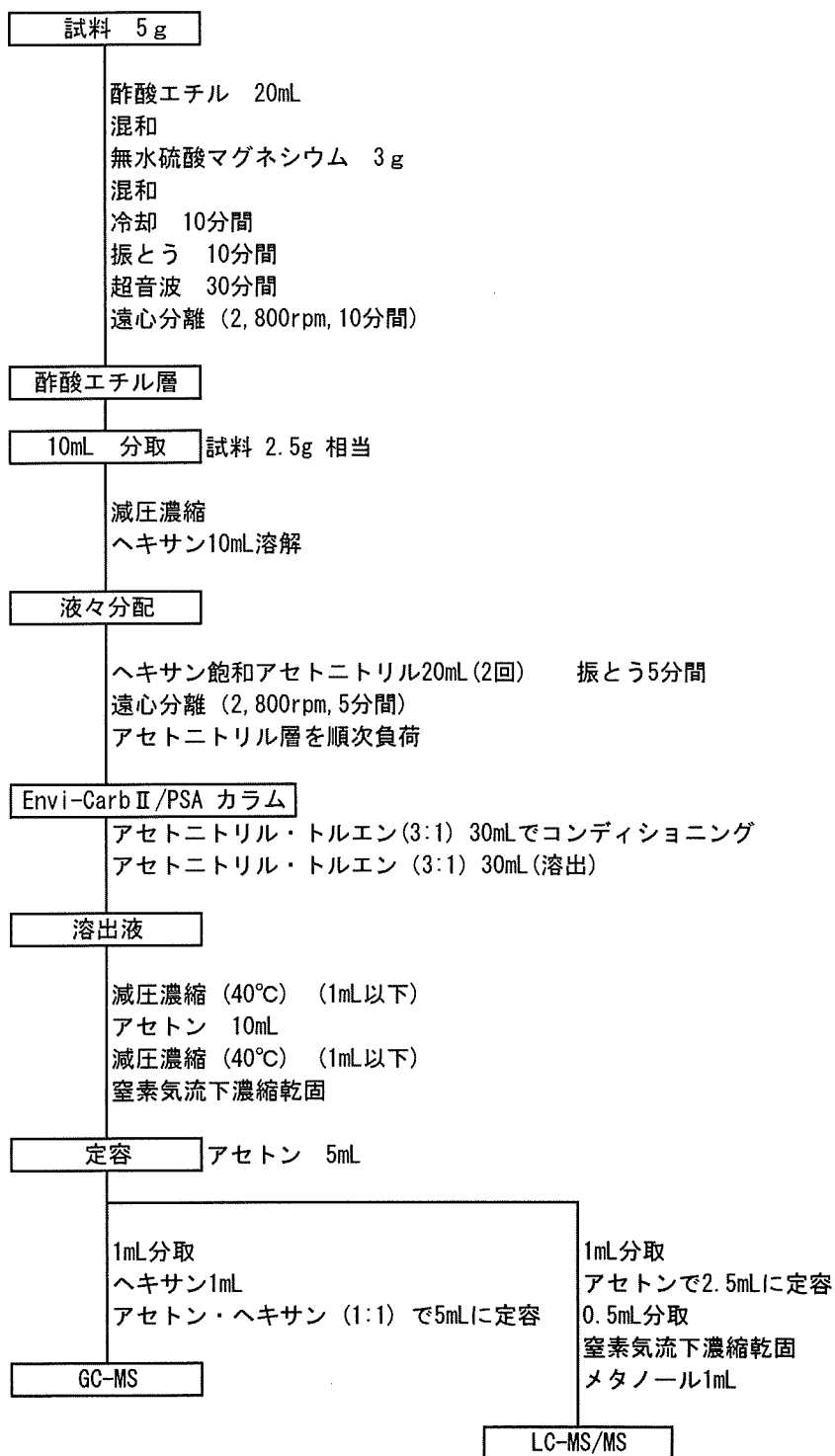
資料1-5 E機関 分析フロー



資料1-6 F機関 分析フロー

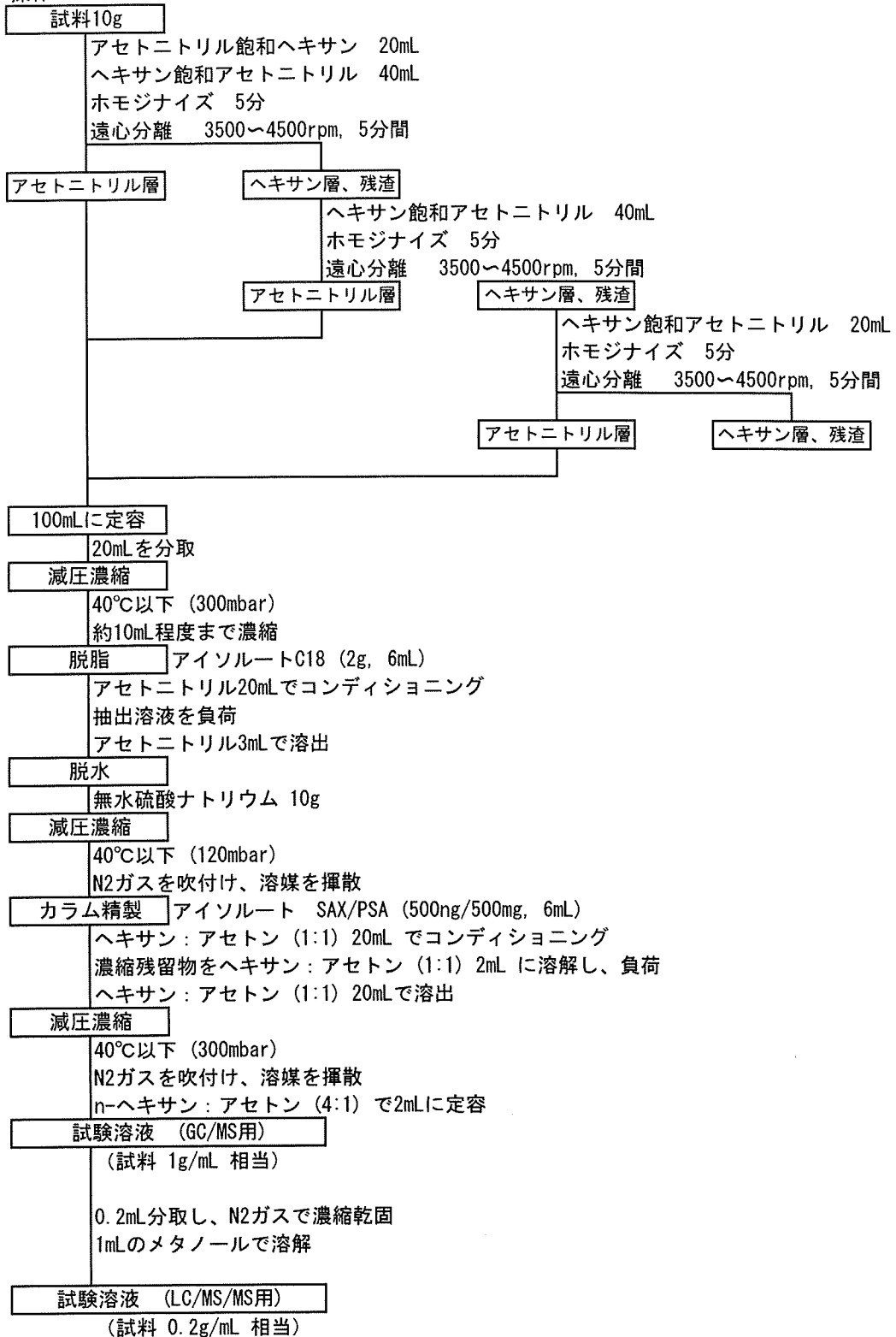


資料1-7 G機関 分析フロー

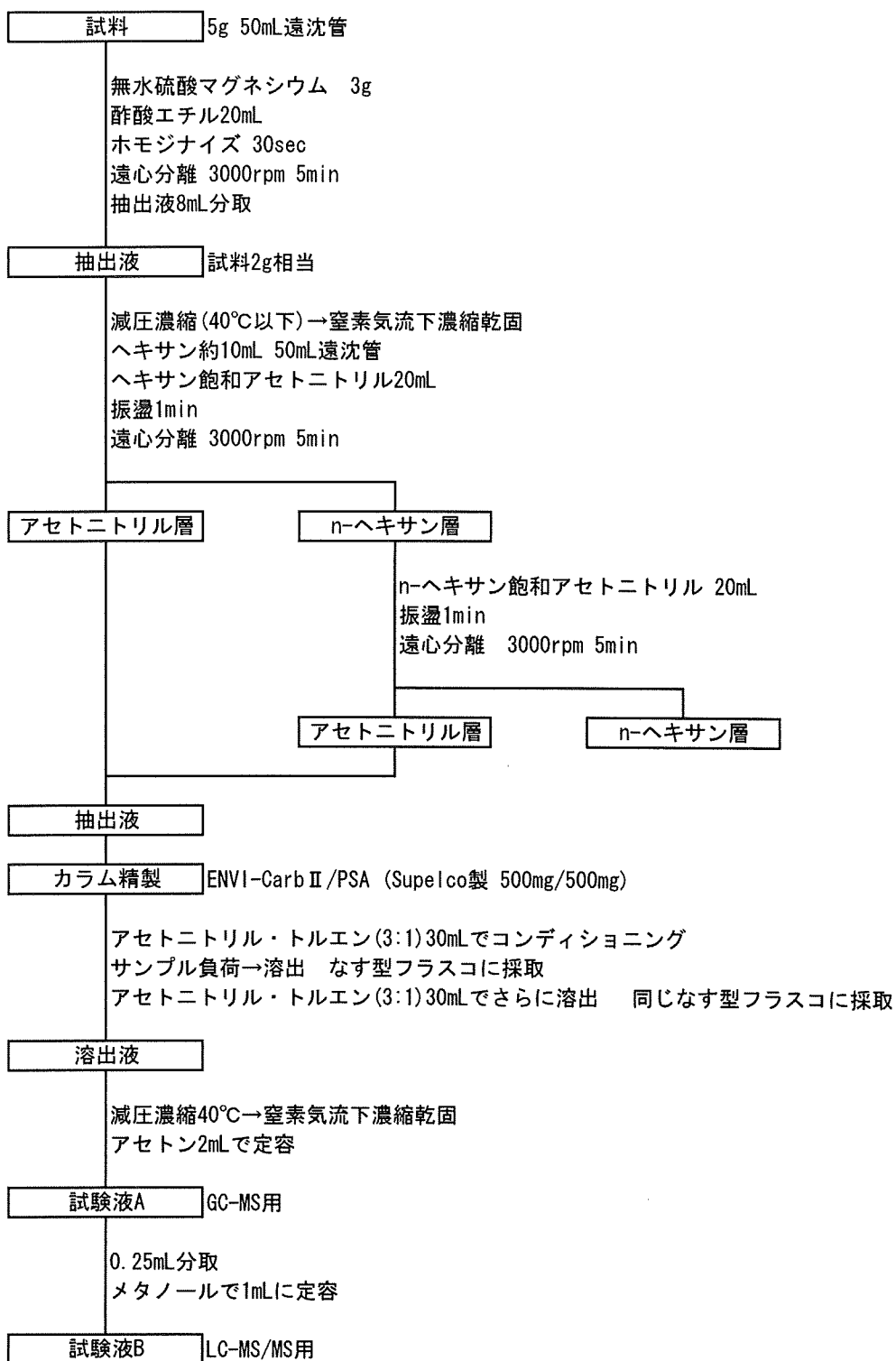


資料1-8 H機関 分析フロー

操作フロー



資料1-9 I機関 分析フロー



資料2 GC-MS 分析条件

機関名	A	B	C	D	E	F	G	H	I
メーカー	Agilent	Shimadzu	Shimadzu	Waters	Thermo Fisher	Agilent	Agilent	Agilent	Agilent
機種	HP7890A	GCMS-QP2010	GCMS-QP2010	QuattroMicroGC	Trace GC	6890N	7890A	6890N	6890
使用カラム販売元	VARIAN	Restec	Restec	Agilent	Agilent	J&W	J&W	Agilent	Agilent
カラム名称	VF-5ms	Rtx-5MS	Rxi-5SIL MS	DB-5ms	DB-5ms	HP-5MS	DB-5ms	DB-5MS	DB-5MS
カラム内径	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm
カラム長さ	30m	30m	30m	30m	30m	30m	30m	30m (+3.3m)	30m
カラム膜厚	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm
キャリアーガス	ヘリウム	ヘリウム	ヘリウム	ヘリウム	ヘリウム	ヘリウム	ヘリウム	ヘリウム	ヘリウム
流量制御	定流量	定流量	定流量	定流量	定流量	定圧	定流量	定流量	定流量
流量/圧力	1.0ml/min	1.69 mL/min	40cm/sec	1.0ml/min	1.0ml/min	16.75 psi	1ml/min	1.0ml/min	1.0ml/min
注入方式	スプリットレス	スプリットレス		スプリットレス	Pulsed splitless	スプリットレス	PTV	スプリットレス	スプリットレス
試料注入量	2.0 μl	1.0 μl	2.0 μl	1.0 μl	2.0 μl	2.0 μl	25 μl	2.0 μl	2.0 μl
注入口温度	250°C	280 °C	250°C	250°C	240°C	250 °C	70~280 °C	250 °C	250°C
昇温条件	60°C (1min) → 20°C/min → 140°C (0min) → 8°C/min → 300°C (5min)	50°C (1min) → 25°C/min → 125°C (0min) → 10°C/min → 300°C (10min)	60°C (1min) → 20°C/min → 160°C → 10°C/min → 300°C (10min)	60°C (1min) → 20°C/min → 140°C (0min) → 8°C/min → 300°C (5min)	50°C (2min) → 25°C/min → 125°C → 10°C/min → 300°C (4min)	70°C (2min) → 25°C/min → 150°C → 3°C/min → 200°C (8°C/min → 280°C (10min) → 20°C/min → 300°C	70°C (4min) → 25°C/min → 125°C → 5°C/min → 300°C (9min)	50°C (1min) → 25°C/min → 125°C → 10°C/min → 300°C (7.5min)	60°C (1min) → 20°C/min → 140°C (0min) → 8°C/min → 300°C (5min)

MS、MS/MS

機関名	A	B	C	D	E	F	G	H	I
メーカー	Agilent	Shimadzu	Shimadzu	Waters	Thermo Fisher	Agilent	Waters	Agilent	日本電子
機種	7000A	GCMS-QP2010	GCMS-QP2010	QuattroMicroGC	ITQ1100	MS5975	QuattroMicroGC	5973Network	Automass Sun
イオンソース温度	290°C	280 °C	300°C	250°C	280°C	280°C	250°C	280°C	250°C
イオン源温度	260°C	200°C	200°C	250°C	240°C	230°C	250°C	230°C	210°C
測定方式	MRM	SIM	SIM	SIM	SCAN	SIM	MRM	SIM	SIM

資料3 LC-MS/MS 分析条件

機関名	A	B	C	D	E	F	G	H	I
メーカー	Shimadzu	Waters	Shimadzu	Waters	Waters	Shimadzu	Shimadzu	Shiseido	Waters
機種	LC-20	Acquity UPLC	Prominence UFLC	Acquity UPLC	Alliance2695	Prominence	Prominence	NANOSPACE	Acquity UPLC
使用カラム販売元	Waters	Waters	Shiseido	Waters	Imtakt	Waters	化学物質評価研究機構	Shiseido	Waters
カラム名称	Atlantis C18	Xterra MS C18	Capcell Pak C18 A0	ACQUITY BEH C18	Cadenza CD-C18	Xbridge ODS	L-co lumn2 ODS	Capcell Pak C18 A0	ACQUITY BEH C18
カラム粒子径	3 μm	3.5 μm	3 μm	1.7 μm	3 μm	3.5 μm	3 μm	3 μm	1.7 μm
カラム内径	2.1mm	2.1mm	2mm	2.1mm	2mm	2.1mm	2.1mm	2mm	2.1mm
カラム長さ	150mm	150mm	150mm	100mm	100mm	150mm	150mm	150mm	100mm
移動相	A: 0.05%ギ酸含有10mM酢酸アンモニウム溶液 B: メタノール	A: 5mM酢酸アンモニウム水溶液 B: メタノール	A: 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B: アセトニトリル	A: 0.1%ギ酸水溶液 B: アセトニトリル	A: 1mMギ酸アンモニウム水溶液 B: メタノール	A: 5mM酢酸アンモニウム水溶液 B: 5mM酢酸アンモニウム水溶液	A: 5mM酢酸アンモニウム水:メタノール=95:5 B: 5mM酢酸アンモニウム水:メタノール=5:95	A: 10mM酢酸アンモニウム水溶液 B: メタノール	A: 10mMギ酸アンモニウム水溶液 B: 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液
流速	0.2mL/min	0.2mL/min	0.2mL/min	0.2mL/min	0.2mL/min	0.2mL/min	0.2mL/min	0.2mL/min	0.2mL/min
インジェクション量	3 μl	5 μl	3 μl	5 μl	5 μl	5 μl	10 μl	5 μl	5 μl
カラムオーブン温度	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C

MS

機関名	A	B	C	D	E	F	G	H	I
メーカー	Applied Biosystems	Waters	Applied Biosystems	Waters	Applied Biosystems	Applied Biosystems	Applied Biosystems	Thermo	Waters
機種	Triple Quad 5500	Quattro Premier XE	API4000	Quattro Premier XE	API3000	4000 Q TRAP	API-4000	Quantum ULTRA	Quattro Premier XE
イオン化モード	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
イオンブレイ電圧	5000V	1000V	5500V	1000V	3000V	5500V	5500V	3000V	3200V
イオン源温度	600°C	120°C	600°C	120°C	500°C	450°C	400°C	300°C	450°C

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）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 21 年度 分担研究報告書

食品中に含まれるマイコトキシン検査法の検討と
精度管理体制の構築に関する研究

分担研究者 齊藤 貢一

平成 21 年度 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）

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

「食品中に含まれる残留有害物質のうち低い安全性基準値の検査方法の検討と
精度管理体制の構築に関する研究」

主任研究者	小島 幸一	(財)食品薬品安全センター
分担研究者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	細江 智夫	星薬科大学 薬化学教室
協力研究者	加藤美穂子	(株)フロンティア研究所
協力研究者	岩崎 雄介	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	伊藤 里恵	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	中澤 裕之	星薬科大学 薬品分析化学教室

研究要旨

食品中に含まれる残留有害物質のうち、低い安全性基準値の検査方法の検討と精度管理体制の構築に関する研究を行うため、食品中の有害化学物質であるカビ毒（マイコトキシン）を調査・研究対象として取り挙げた。本年度は、食品を対象とした分析法が確立されていないシクロピアゾン酸(CPA)について、昨年度の研究成果を基にして、汎用性が高く同定も可能なフォトダイオードアレイ・紫外検出-液体クロマトグラフィー(LC-UV・PDA)を用いた分析法を構築し、更に、食品として液状調味料に CPA 産生菌を接種・培養して、実試料からの検出を試みた。また、スクリーニング法として ELISA を構築するために、CPA に特異的なポリクローナル抗体を作製してその有用性の基礎検討を行った。

A. 研究目的

食品中微量汚染化学物質の中には、分析技術が未熟であった時代に基準値が作成されたものがあるが、最近では分析機器の進歩などにより、遙かに高感度に微量分析が行えるようになったものもある。このような微量汚染化学物質は、実際の検査機関の現場で検出されても、基準値が設定された当時の（測定感度の低い）公定法では、“検出下限値以下”と判定されるものが少なくない。その代表的な微量汚染化学物質として、アフラトキシンやパツリン、ペニシリン酸などマイコトキシンが挙げられる。シクロピアゾン酸

(CPA)は、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属の菌が産生し、肉、ピーナッツ、卵、飼料中などから検出されている。CPA は動物実験において体重減少、下痢および痙攣などの急性毒性を発現する有害な物質である。生理活性としては、ラット肝臓 GOT, GPT, γ -GTP 活性の増加をもたらす。またラット骨格筋の筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase を特異的に阻害し、これに共役する Ca^{2+} の能動輸送を抑制する作用を有している。中毒事例としては、これまでに七面鳥、ウズラ、犬など家畜や動物が数例報告されているが、ヒトにおいても中毒の疑いがある事例が報告されている。

更に、食品への汚染に関しては、毒性が高いアフラトキシンとの同時汚染が起こることも報告されている。また近年、CPA がムレ肉発生原因の一つであるという報告や、伝統的な醸造食品や白チーズの製造に使用されてきた菌に CPA 産生能があること、また CPA が鶏肉・鶏卵やヒツジ乳汁に移行・蓄積することも報告されている。そのため、CPA 摂取による健康被害が懸念される。

従来、アフラトキシンを始めとして、マイコトキシンの分析法は数多く報告されているが、CPA の分析報告は未だ少ない。昨年度の研究では、CPA 産生が疑われる *Penicillium* 属のカビの培養上清や菌体からの検出・同定を目的として、定性能力の高い飛行時間型質量分析計(LC・TOFMS)を用いた分析法の検討を行い、その有用性を示すことができた。しかし、この分析法では、食品試料を対象とした抽出・クリーンアップなど前処理操作の検討が不十分であり、また、特殊な分析機器である TOFMS の使用や、MS 検出における問題点であるイオンサプレッションによる定量精度の低さといった問題点を有していた。そこで本研究では、汎用性が高く同定も可能なフォトダイオードアレイ・紫外検出-液体クロマトグラフィー(LC-UV・PDA)を用い、定量精度の高い前処理操作を検討することで、信頼性の高い食品中 CPA の分析法構築を試みた。

B. 研究方法

(1) LC-UV・PDA による測定法の検討

LC 装置には、HITACHI L-6300 ポンプおよび JASCO MD-910 多波長検出器を用いた。分析用カラムには、DIONEX 社製 Acclaim Mixed-Mode WAX-1(4.6 mm i.d. x 150 mm)を、移動相にはアセトニトリル:25mM リン酸緩衝液(pH6.0) = (7:3)を用いた。カラム温度は 40°C、移動相流速は 1mL/min とし、試料注入量は 10 μ L とした。

(2) 試料および試料調製法の検討

食品試料には、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属などのカビによる汚染が考えられる食品として液状調味料(めんつゆ)を用いた。液状調味料からの抽出には有機溶媒による液液抽出法を採用し、クリーンアップ

のための前処理用固相抽出には、Waters Oasis HLB, MCX および MAX を用いた。測定方法のフローチャートを Fig.1 に示した。

CPA 産生菌には *Penicillium commune* を選択し、菌株については、かずさ DNA 研究所から入手したもの(NRBC5363, 6327, 7224, 7746)および実際に液状調味料から分離した菌株(K-18)を用いた。これらの菌株を市販の液状調味料(めんつゆ)に接種し、20°C にて 2 ヶ月間静置培養した後、自然ろ過(ろ紙, No.2, アドバンテック社製)によって菌体および培養ろ液に分離した。ろ液はそのまま測定用試料とした。菌体は凍結乾燥し、秤量後、ポジトロンホモジナイザーで粉末状になるまで破碎し、メタノールで抽出(超音波, 10 min)した後、遠心分離(1000 g, 10 min)した上清をメタノール抽出液とした。この抽出操作を 3 回繰り返した後、減圧濃縮により溶媒留去したものを測定用試料とした。

(4) CPA のポリクローナル抗体作製

CPA に対するウサギポリクローナル抗体の作成は、W.Yu ら(J.Agric.Food.Chem., 1998, 46, 1012-1017)の方法に準じて行った。すなわち、CPA と活性化 KLH とを反応させて CPA ポリクローナル抗体作製用の抗原(CPA-KLH)を調製し、ウサギに Freund's Complete Adjuvant や Freund's Incomplete Adjuvant と等量混和したエマルジョンを数回投与した。その後、抗体価の上昇を ELISA にて確認し、抗 CPA 抗体として血清を得た。

C. D. 研究結果および考察

(1) 食品中 CPA 測定条件の検討

LC カラムには、すでに昨年度において検討した、逆相モードと陰イオン交換モードを併せ持つ DIONEX 社製 Acclaim[®] Mixed-Mode WAX-1 を使用した。このカラムは、移動相中の有機溶媒としてアセトニトリルを、他方カウンターイオンとしてリン酸緩衝液を用いる(アセトニトリル:25mM リン酸緩衝液(pH6)=7:3)ことから、MS への適用は困難であったが、LC-UV で測定する限りにおいては、理論段数やピーク形状など、検討したカラムの中で最も良好なカラム性能を示した。今年度、検出器として定性用には PDA を、定量用には UV を用いることで

より高感度且つ高精度で検出が可能となり、検量線は0.1~10 µg/mLの間で良好な直線性($r=0.999$)を得ることができた。

前処理方法として、実試料分析を想定して溶媒抽出および固相抽出による回収率の検討を行った。溶媒抽出では酢酸エチル、メチル-*t*-ブチルエーテル(MTBE)、ジエチルエーテル、トルエン等を検討したところ、酢酸エチルでの回収率が最も優れていた(Fig.2)。

また塩析効果による回収率への影響を検討したところ、精製水では両者に差は認められなかったが、実試料(めんつゆ)では、NaCl添加によって回収率が向上した。

更に、めんつゆを試料として液性(pH)変化による抽出率への影響を検討したところ、pH8以上で良好な回収率が得られた(Fig.3)。なおLCクロマトグラムにおいては、pH8以下で見られた夾雑物由来ピークが、pH9以上で著しく減少したことから(Fig.4)、溶媒抽出の液性はpH9以上に調整することとした。

固相抽出では、逆相モードのHLB、逆相モード+陰イオン交換モードを併せ持つMAXおよび逆相モード+陽イオン交換モードを併せ持つMCXを検討したところ、HLBとMCXにおいて良好な回収率が得られたが、溶出液濃縮の容易さ等を考慮して、固相にはHLBを用いることとした。なお、今後、めんつゆ以外の食品試料を処理するにあたり、HLB単独ではクリーンアップが不十分な場合には、HLBとMCXを併用することで、より効果的なクリーンアップができると考えられた。

(2) 実試料からのCPA検出

構築した分析法を実試料に適用するため、液状調味料(めんつゆ)に*Penicillium commune*を接種・培養し、CPA産生について分析・調査した。この際、LC-UVのクロマトグラム上、CPAの保持時間と一致するピークが検出された場合、PDA検出器でUVスペクトルを測定することで、CPAの同定を容易に行うことが可能となった。その結果、Table 1に示したように、一種類の菌株(NRBC6327)においては、培養後のろ液および菌体からCPA産生が確認された。このことから、この食品のように一般家庭においても長期間保管される食品が*Penicillium*

*commune*に汚染された場合には、CPA産生の可能性があることが推察された。

(3) 抗CPAウサギポリクローナル抗体の基礎的検討

本検討において作製した抗CPAウサギ血清は、免疫開始35日目ではCPAに対する反応性が著しく低く(Fig5, Day 35)、またCPAに対する特異抗体の産生量も少なかった。ELISA測定系への構築には、抗体価の上昇ならびに特異抗体の産生濃度を高めるのが不可欠と考え、再度追加投与および採血を継続しながら産生抗体の反応性をモニターした。その結果、投与開始後154日目の採血血清のうち、FS0015のウサギ個体は血清希釈1/3200のOD450が1.0を超えており、CPAに対する抗体が産生されていることが推察された(Fig.5, Day 154)。

E. 結論

今回の研究で構築した分析法は、液状調味料のめんつゆを対象食品としてCPAを測定できることが実証された。更に、めんつゆでの*Penicillium commune*を接種・培養した実験により、この種の菌株の中には実際にCPAを産生する可能性を有するものがあることが示された。また、CPAのポリクローナル抗体を作製することができ、今後のELISAによる簡便で汎用性の高いスクリーニング測定法を構築できることが示された。

本法をCPA汚染が危惧される食品に適用することで安全性評価を行うことが可能と考えられ、今後、実用的な分析法としての活用が期待される。

また、今後の研究として、CPAの産生が確認された試料を用いて、本分析法の併行精度、室内再現精度、室間再現精度など精度管理を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(論文発表および学会発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |