

図 12-9 照射ハンバーグパテの測定マスクロマトグラム例 (m/z 98)  
(機関：H)

厚生労働科学研究費補助金(食品の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 24 年度 分担研究報告書

食品中に残留するマイコトキシンに関する精度管理体制の  
構築に関する研究

分担研究者 中澤 裕之

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

「食品中に残留するマイコトキシンに関する精度管理体制の構築に関する研究:ELISA キットおよび GC/MS による食品中の微量デオキシニバレノール分析法の検討とその精度管理」

|       |       |                |
|-------|-------|----------------|
| 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 | 中澤 裕之 | 星薬科大学 薬品分析化学教室 |
| 協力研究者 | 斉藤 貢一 | 星薬科大学 薬品分析化学教室 |
| 協力研究者 | 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 |

研究要旨

食品汚染カビ毒（マイコトキシン）の一種であるデオキシニバレノール（DON）について、本分担研究ではビール中 DON に着目し、流通過程などフィールドでの迅速な DON 分析への活用が期待される市販 ELISA キットを採用し、分析法バリデーションなどを検討した。ELISA は検出感度（検出限界）、検量線の直線性および IC<sub>50</sub> 値において食品分析法として十分な性能を有していることが示されたが、ビール中に残留する DON のレベルは極めて微量であり、低濃度の実試料分析に際してはマトリックス由来の影響を受けることが分かった。そこで試料前処理法としてアセトニトリル抽出と、多機能カラム MycoSep®#227 を用いてクリーンアップすることにより、ELISA の感度と精度は向上し、フィールドでの DON スクリーニングにおける有用性が示唆された。また、DON のシリル化を伴った GC/MS 法を併用することにより、定性能力を高めると共に、定量値の信頼性確保の評価を行った。本研究は、従来から設定されているマイコトキシンの規制値や対象食品見直しのための提言を行うことを目的とした。

A. 研究目的

デオキシニバレノール（DON）は、赤かび病菌として知られるフザリウム属真菌が産生するかび毒（マイコトキシン）であり、主に穀類（麦類、米、トウモロコシ等）を汚染することが知られている。

物性として、DON を含むトリコテセン類の

マイコトキシンは熱安定性が高く、120℃で安定、180℃でやや安定、210℃では 30～40 分で分解する。製粉により、通常、ふすまに高く、小麦粉には低く含有される。調理過程として麺類およびスパゲッティの調理中にゆで汁に相当量移行する。また、パンの発酵・焼成過程で概ね半分に減衰する

が、酵母による分解はないとされている。従って、通常の調理過程ではあまり減毒されないと考えられる。動物実験における DON の急性毒性として、吐き気、嘔吐、下痢、腹痛、食欲減退および発熱等が知られている。他方、慢性毒性としては、免疫機能の抑制などが報告されている。

わが国では小麦に含有する DON の暫定的な基準値として 1.1 mg/kg が定められた。この基準値は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会合で定められた暫定的最大 1 日耐容摂取量および国民栄養調査による小麦類の 1 人当たり 1 日摂取量に基づき、小麦から小麦粉への DON の減衰を考慮した科学的知見に基づいて定められたものである。

昨年度の本分担研究において、DON による麦類への汚染実態調査報告データを再考察したところ、小麦中 DON の汚染状況（汚染濃度および汚染率）については、あまり大きな経年変動は無かったが、大麦に関して汚染率は増加傾向にあることが窺われた。また、麦類加工品についても調査報告を精査した結果、大麦を原料とした加工食品であるビールから微量ではあるが DON が検出された。「国民栄養調査報告」では、ビールの日当たりの摂取量が 58.6 g/日であることが示されているが、ビール趣向のある人の実際の摂取量は、この値をはるかに超えていると推察される。そのため、このようなケースではヒトへの DON 曝露量も多くなり、JECFA で設定されている暫定耐容一日摂取量 (1  $\mu$ g/kg bw/day) を超えることが懸念された。しかしながら、現在のところ、大麦やその他の加工食品について DON の残留基準値が設けられていない。

そこで本分担研究ではビール中 DON に着

目し、流通過程などフィールドでの迅速な DON 分析への活用が期待される市販 ELISA キットを採用し、分析法バリデーションなどを検討したところ、試料中 DON 濃度 100 ng/mL において、ELISA は検出感度（検出限界）、検量線の直線性および IC<sub>50</sub> 値において食品分析法として十分な性能を有していることが示された。しかし、ビール中に残留する DON のレベルは極めて微量であり、低濃度の実試料分析に際しては、マトリックス由来の影響を受けることが分かった。実際、農林水産省による平成 20 年の調査結果では、20 検体中に 1 検体のみ検出されているが、その際に用いた LC/MS/MS による検出限界は試料（ビール）中に換算して 50 ng/mL であり、実態調査を行うためには、より高感度な測定が必要と考えられた。そこで本年度の研究においては、昨年度において基礎研究した市販 ELISA キットを活用してより高感度測定を可能とするために、試料前処理法について検討した。また、ELISA と GC/MS 法を併用することにより、定性能力を高めると共に、定量値の信頼性確保の評価を行った。

本研究は、従来から規制されている DON について、従来から設定されている規制値や対象食品見直しのための提言を行うことを目的としており、そのための基礎データとなる、ELISA や機器分析による精度管理の整備を行うものである。

## B. 研究方法

### (1) 抽出・クリーンアップ

ビール 10 mL にハイフロースーパーセル 2 g、アセトニトリル 40 mL を加え、1 時間混合した。その後、減圧ろ過を行い、ろ液を

濃縮乾固した。アセトニトリルと水の混合溶液 (84 : 16) 10 mL で残留物を再溶解し、クリーンアップ用多機能カラム MycoSep®#227 を用いて精製し、ELISA 用の試験溶液とした (図 1)。GC/MS 法に供する際には、下記のトリメチルシリル (TMS) 化を行った。

#### (2) トリメチルシリル (TMS) 誘導体化

上記 (1) の試験溶液から 1 mL を分取し、内標準物質 (IS) として 500 ppb の  $^{13}\text{C}_{15}$ -DON を 200  $\mu\text{L}$  添加し、窒素乾固した。残留物に TMS 誘導体化試薬 (BSTFA : TMCS : TMSI = 3 : 2 : 3) 100  $\mu\text{L}$  を加え、80°C で 1 時間反応させて TMS 化を行った。その後、ヘキサン 1000  $\mu\text{L}$  と水 750  $\mu\text{L}$  を加えて振とう抽出し、ヘキサン層を GC/MS 法の試験溶液とした。

#### (3) DON 測定用 ELISA

ELISA には、市販キット「DON」 (株) フロンティア研究所製) および「RIDASCREEN® DON」 (R-Biopharm 社製) を用いた。これら ELISA キットの測定原理は、抗 DON モノクローナル抗体を用いた直接競合法である。概略は以下の通りである。抗マウス IgG 捕捉抗体が固定化された 96 穴ウェルプレートに、DON 標準品 (または検体)、次に HRP 標識 DON を加え、最後に抗 DON 抗体を順次加えて競合反応させる。得られた HRP-DON-抗体複合体の酵素 (HRP) 活性を測定することにより、検体中の DON 濃度を求める。

なお、実際の使用方法はキット付属の取扱説明書に準じて行った。

#### (4) GC/MS 法

Agilent 社製 GC6890 および 5973MSD を使用した。GC カラムには DB-5MS (Agilent 社製 ; 30 m × 0.25 mm I.D. , 0.25  $\mu\text{m}$ ) を

用い、昇温プログラムは 40°C (1 min) → 20°C /min → 280°C (3 min) → 20°C/min → 300°C (5 min) とした。IS として  $^{13}\text{C}_{15}$ -DON を用い、DON の定量イオンを m/z 235、確認イオンを m/z 512、および IS の定量用イオンを m/z 304 と設定し、SIM モードにて検出した。

#### (5) 精度管理試験 (分析法バリデーション)

真度、併行精度および室内再現精度など分析法バリデーションのために、市販のビールを対象として添加回収試験を行った。抽出・クリーンアップ操作は上記 (1) に準じて行った。DON 添加濃度は高濃度 (100 ng/mL) および低濃度 (10 ng/mL) とし、一日に 2 回測定を併行して繰り返し、これを 5 日間行って得られたデータを一元配置分散分析法で統計解析した。

### C. D. 研究結果および考察

#### (1) 抽出・クリーンアップの一考察

予試験として、ビールの抽出・精製を行わずに PBS 希釈のみで ELISA による添加回収試験を行ったところ、高濃度 (100 ppb) においては「DON」および「RIDASCREEN® DON」のいずれのキットも平均回収率は 90% 以上であり、精度管理試験においても、併行再現性および室内再現性は共に 15% 以下と良好な結果が得られた。また、 $\text{IC}_{50}$  値の比較から、「RIDASCREEN® DON」がビール分析用の ELISA として、より高感度測定に適していることが分かった。しかし、低濃度 (20 ppb) では回収率が悪く、バラツキも大きくなったため、前処理としてアセトニトリル抽出および多機能カラムによる試料精製法を検討した。その結果、PBS 希釈のみで行うよりも低濃度での測定が可能となった。

「RIDASCREEN® DON」を使用した添加回収試験での平均回収率は、低濃度（10 ppb）および高濃度（100 ppb）のいずれも 90%以上であり、試料中の検出限界は 3 ng/mL と、高感度な微量分析が可能となった（図 2）。また、精度管理試験でも併行再現性および室内再現性共に 25%以下と良好な結果が得られた（表 1）。

#### (4) GC/MS 法との比較

ELISA と同一試料を用いて GC/MS 法を検討したところ、絶対検量線法により添加回収試験を行うと結果にバラツキが認められた。そこで IS として  $^{13}\text{C}_{15}$ -DON を添加することにより、低濃度（10 ng/mL）、高濃度（100 ng/mL）共に平均回収率が 100%に近い値が得られ、精度管理試験でも併行再現性および室内再現性は共に 10%以下と良好な結果が得られた（表 2）。10 ng/mL 添加試料における代表的なクロマトグラムを図 3 に示した。

#### E. 結論

本研究結果から、ビールの前処理法を再検討することによって、スクリーニング法としての ELISA の有用性が確認され、更に、GC/MS 法を併用することで高感度且つ高精度な定性・定量性が確保された。

今後の展開としては、同定・確認法としてより高感度測定が可能な高分解能 GC/MS や LC/MS/MS の適用を検討し、ビールを試料とした精度管理用試料を作製して室内再現精度について検討する。

また、国内産、外国産のビールで国内に流通しているものをできるだけ多く入手し、本年度で検討した ELISA と GC/MS 法を用いて、ビール中の DON 残留汚染の実態調査を

行い、ビールからの DON 摂取のリスク評価を行う予定である。

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

ビール 10mL  
 ↓ + ハイフロースーパーセル 2 g, アセトニトリル 40 mL  
 振とう混和  
 ↓  
 ろ紙ろ過  
 ↓  
 ろ液を濃縮乾固  
 ↓  
 アセトニトリル+水(84:16) 10 mLで再溶解  
 ↓  
 多機能カラム(MycoSep® #227)でクリーンアップ  
 ↓  
 ELISA または GC/MS用試験溶液(GC/MSではこの後にTMS化)

図 1 試料前処理法のフローチャート

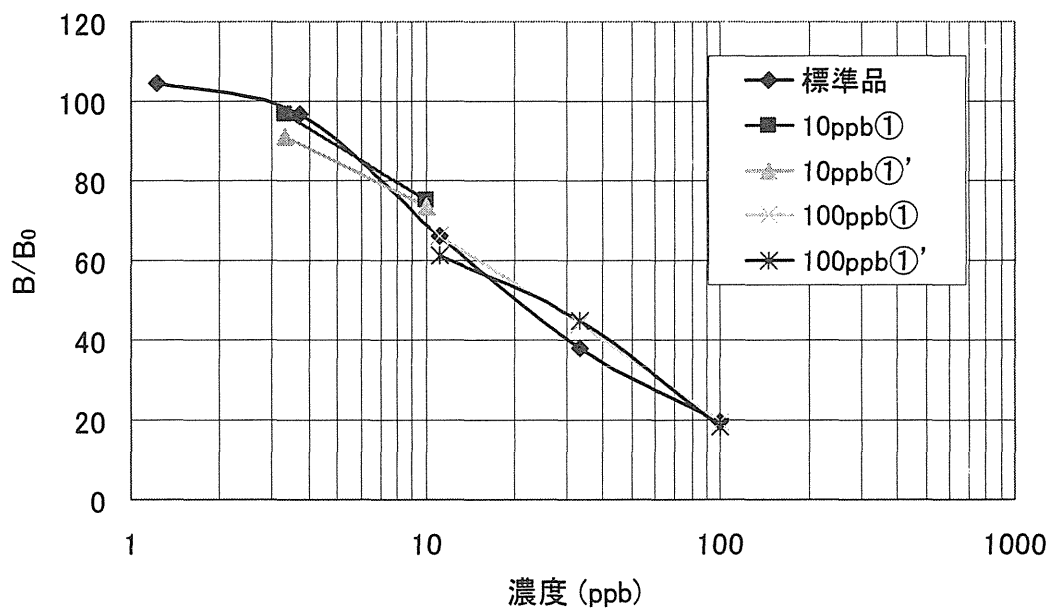


図 2 ELISA による検量線と測定結果

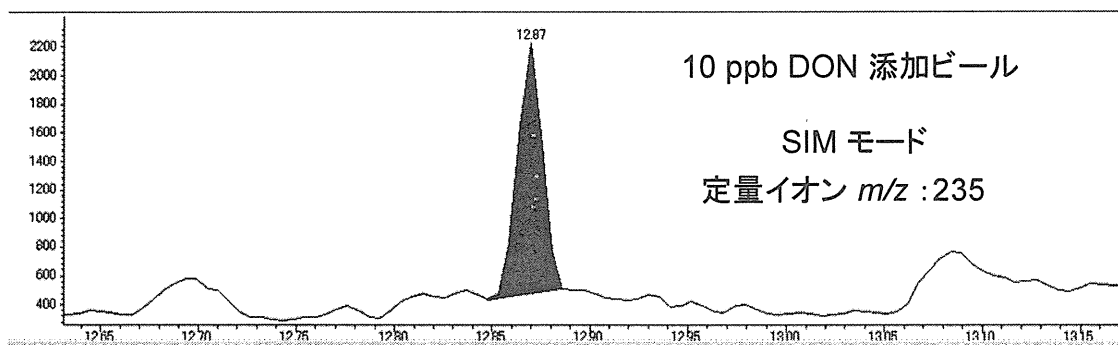


図3 添加回収試験における GC/MS クロマトグラム



表 1 ELISA による精度管理実験結果

| ELISA       |          |         |           |
|-------------|----------|---------|-----------|
| 添加濃度        | 平均回収率(%) | 併行精度(%) | 室内再現精度(%) |
| 10 ppb      | 96.8     | 23.8    | 23.1      |
| 100 ppb     | 93.8     | 1.3     | 10.8      |
| 検出限界: 3 ppb |          |         | n = 12    |

表 2 GC/MS による精度管理実験結果

| GC/MS       |          |         |           |
|-------------|----------|---------|-----------|
| 添加濃度        | 平均回収率(%) | 併行精度(%) | 室内再現精度(%) |
| 10 ppb      | 108.2    | 2.3     | 8.7       |
| 100 ppb     | 100.9    | 3.2     | 4.3       |
| 検出限界: 5 ppb |          |         | n = 10    |

厚生労働科学研究費補助金(食品の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 24 年度 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と

精度管理体制の構築に関する研究

分担研究者 斉藤 貢一

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の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と精度管理体制の構築に関する研究：シクロピアゾン酸の ELISA の開発と分析法バリデーション」

|       |       |                |
|-------|-------|----------------|
| 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 | 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

食品汚染カビ毒（マイコトキシン）の一種であるシクロピアゾン酸（CPA）について、簡便、迅速かつフィールドで使える ELISA の検討を行った。ELISA としては汎用されている間接競合法を採用し、プレート固相化用 conjugate を独自に作製し、測定条件の最適化を行った。その結果、CPA 標準品において 1~100 ng/mL の範囲で良好な検量線が得られた。

食品試料としてナッツ類（ピーナッツ）を選び、その前処理法について検討した。抽出には、LC-UV 測定法の検討（平成 22 年度研究報告）に際して用いた高速溶媒抽出法（ASE）を採用し、更にクリーンアップ法として固相分散抽出法（SPDE）を併用した。構築した ELISA の妥当性を評価するため、添加回収試験（10  $\mu$ g/g 添加）により真度や精度の評価を試みた結果、検量線の中～高濃度領域（10-100ng/g）での測定では、平均回収率は 4.6~95%、併行精度は 3.3~4.6%と、ピーナッツ中 CPA は定量的に分析可能であることが示された。他方、検量線の低濃度領域（1 ng/g）での測定では、平均回収率は 56.3%と若干低めであったが、併行精度は 5.6%と良好であった。室内再現精度については、大きなバラツキが認められた。

また、クロスチェックのための LC-UV 法により、ELISA 用の試料溶液を再測定したところ、平均回収率、併行精度および室内再現精度はいずれも良好であった。

これらの結果から、開発した ELISA はナッツ類を対象とした CPA のスクリーニング法として十分に実用性があり、また同一試料溶液について LC-UV 法を併用することでクロスチェックが行えることが示された。

## A. 研究目的

現在、日本の食料自給率はカロリーベースで40%程度であり、これは半世紀前に比べてほぼ半減となっている。そのため必然的に輸入食品が増加しており、衛生管理が不十分な場合、カビの発生やカビ毒（マイコトキシン）汚染など食品衛生上の問題が危惧されている。マイコトキシンによる食品汚染問題は輸入食品だけでなく、国内でも発癌性のあるアフラトキシン B<sub>1</sub>を含んだ米、いわゆる事故米穀を、工業用（非食用）として仕入れておきながら、酒造会社や菓子メーカーに転売した事件などは比較的記憶に新しい最近の出来事である。また、2011年にはアフラトキシン類（B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>）の総量規制（10 μg/kg）が施行（2011年10月1日）され、食品中に残留するマイコトキシンなど微量有害化学物質に対する社会的な関心は高まっている。

このように、従来から規制されているマイコトキシンについては、その規制値や対象食品見直しのための提言を行うことが必要と考えられる。他方、未規制のマイコトキシンについては、今後の規制値検討を念頭において、分析法の構築と精度管理体制の基礎検討を行うことが必須と考えられる。

そこで本研究班では、未規制のマイコトキシンとしてシクロピアゾン酸（CPA）に着目した。CPAは、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属の菌が産生し、肉、ピーナッツ、卵または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ことに加えて、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。そのため、CPAやアフラト

キシンの摂取による健康被害が懸念されている。

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。これまでの当分担研究班では、実際にCPA汚染が疑われた我が国古来の伝統的発酵食品の一つである液状調味（めんつゆ）や、農産物の中でも特にアフラトキシン汚染などカビ毒が発生し易い食品として、ピーナッツとコーンを選択して、LC-UVやLC-TOFMSを用いた簡便・迅速なCPA定量分析法を構築した。また、CPA汚染食品の標準マテリアル作製に着手し、更に内部・外部精度管理へのトライアルを行って、構築したCPA分析法および作製したCPA汚染標準マテリアルの妥当性評価を試みてきた。更に昨年度においては、液状調味料を試料とした、フィールドで使えるELISAの開発を行うと共に、定量分析法としての精度が問われるELISAについて、測定値の信頼性を評価するための分析法バリデーションなど基礎検討を行った。

本年度は、主にアフラトキシンとの同時汚染が懸念される食品試料（ナッツ類）の抽出・前処理方法を検討し、分析法バリデーションとして、精度管理のための併行再現精度および室内再現精度についてELISAとLC-UV法を併用して比較検討した。

また、ELISAについては、CPA conjugateを独自に調製し、市販品との性能比較も行った。

## B. 研究方法

### (1) ELISAプレートの調製

CPAのウサギポリクローナル抗体は、フロンティアサイエンス社から購入した。

CPA conjugate は以下のように作製した；アセトン 0.25mL に CPA 2.5mg を溶解し、1,1-Carbonyldiimidazole 2.5mL を加え、室温で 1 時間反応させた。その後、精製水 0.2 mL を加えて反応を停止させた。次に 0.1 M の炭酸水素ナトリウム溶液 0.5 mL で溶解したポリリジン 2.5 mg を加え、4°C で 24 時間攪拌した。その後、0.1M の PBS (pH 7.2) で 24 時間透析した後、1 mg/mL になるよう PBS で希釈・調製した。また市販 CPA conjugate との比較・検討を行った。

CPA-ポリリジン conjugate (1  $\mu$ g/ml Carbonate Buffer pH8.5) 100  $\mu$ L をグライナー社製マイクロプレートに加え、2 時間放置して固相化を行った。1%スキムミルク-PBS を 360  $\mu$ L 加え、1 時間放置してブロッキングを行った後、0.02% Tween20-PBS で 3 回洗浄を行い、CPA 測定用 ELISA プレートを調製した。

#### (2) CPA 測定(ELISA)

ELISA プレートに希釈系列を 50  $\mu$ L 加え、続いて第一抗体 (CPA ウサギ抗血清：25000 倍希釈) を 100  $\mu$ L 加え、1 時間反応させた。希釈系列は、CPA 標準品 1000 ng/mL を調製し、この液を、適宜 PBS で希釈 (1~1000 ng/mL) したものと、ブランクとしての PBS の、計 8 種類を用いた。反応後、B/F 分離を行い、第二抗体 (Anti Rabbit IgG (H+L)、HRP conjugate：6000 倍希釈) を 100  $\mu$ L 加えて 1 時間放置し、ウェルに結合した第一抗体に第二抗体を反応させた。その後、再び B/F 分離を行い、tetra-methylbenzidine (TMB) 100  $\mu$ L を加え、15 分間放置して発色させた後、1 N 硫酸 100  $\mu$ L を加えて反応を停止し、直ちにプレートリーダーを用いて波長 450 nm (リファレンス波長 590 nm)

で吸光度を測定した。

#### (3) CPA 測定 (LC-UV)

LC 装置には、日立社製 655A-12 (HITACHI L-500 LC Controller 付き) を、検出器には島津製作所製 SPD-6AV を用い、測定波長は 220nm とした。LC カラムには、DIONEX 社製 Acclaim<sup>®</sup> Mixed-Mode WAX-1 (4.6 mm i. d.  $\times$  150 mm、5  $\mu$ m) を用い、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 1 mL/min とし、試料注入量は 20  $\mu$ L とした。

#### (4) 試料溶液の調製

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ピーナッツを選択した。試料調製操作手順としては、抽出に高速溶媒抽出法 (ASE) を採用し、装置には DIONEX 社製 ASE-300 を用いた。ASE 用の抽出セル (33mL 容) の底部に円筒ろ紙を挿入し、ハイフロースーパーセル (珪藻土) 約 1 g を積層した後、予めミルで粉碎した試料 2.5 g にハイフロースーパーセル 3.0 g を加えて混和したものを充填した。さらに、ハイフロースーパーセルを抽出セルの入り口部分まで満たし、ASE-300 に設置した。ASE 操作条件は、抽出溶媒 50%メタノール、抽出温度 25°C (室温)、圧力 1500 psi とし、抽出サイクル 1 回とした。得られた抽出液を減圧下で乾固し、1%メタノール 1 mL で再溶解したものを固相分散抽出法 (SPDE) でクリーンアップした。SPDE の操作手順の概略を図 1 に示した。SPDE の固相には Waters 社製 Oasis<sup>®</sup> HLB (30 mg) を用い、キャップチューブ内で分散後、@ろ過フィルター<sup>TM</sup> でろ過 (2500 g, 10 sec) し、精製水で洗

浄 (1mL×3) 後、メタノールで溶出 (1mL×3) した。この溶出液を減圧下で乾固した後、1%メタノールで 1mL に定容し、試験溶液とした。

#### (5) 分析法バリデーション

真度、併行精度および室内再現精度など分析法バリデーションのために添加回収試験を行った。食品試料には、ピーナッツを選択し、上記 (4) 試料溶液の調製に従って調製した原液および PBS で適宜希釈したものを測定用試料とし、ELISA および LC-UV を用いて測定した (図 2)。CPA 添加濃度は 10 μg/g とし、一日に 2 回測定を併行して繰り返し、これを 6 日間行って得られたデータを一元配置法で統計解析した。

### C. D. 研究結果および考察

#### (1) 自家調製した ELISA プレート固相化用の CPA conjugate と市販品との比較検討

CPA の ELISA 測定において要となるプレートへの固相化のための CPA conjugate については、市販品の場合、製造ロットによって若干感度や純度のバラツキがあることがこれまでの本研究で散見された。そこで、CPA とポリリジンとの conjugate を自家調製して、市販品との性能比較を検討した。CPA 標準品 (1.0 ng/mL~1000 ng/mL) を用いてそれぞれの conjugate を用いた際の検量線を作成したところ、図 3 に示すように、自家調製した CPA conjugate は市販品と比べて感度的にも同等であることが確認された。そこで本年度の研究においては、自家調製した CPA conjugate を用いて実験を行った。

#### (2) ELISA のバリデーションおよび実試料分析におけるマトリックス効果の影響検討

ELISA の基本的操作条件は前年度に検討した内容に準拠し、ピーナッツ分析における添加回収試験を実施した。CPA 標準品 0.01 ng/mL ~10000 ng/mL の範囲において、縦軸に B/B<sub>0</sub> を、横軸を濃度の対数とした片対数グラフで検量線をプロットしたところ、逆シグモイド曲線が得られ、1 ng/mL ~100 ng/mL の範囲で良好な直線性が得られた。また、試料溶液のシグモイド曲線も標準品とほぼ一致し、1 ng/mL ~100 ng/mL の範囲でマトリックスの妨害を受けることなく、測定可能であることが示された (図 4)。

#### (3) 実試料分析における抽出クリーンアップ法の検討

ピーナッツの試料調製操作手順としては、平成 22 年度の報告と同様に、抽出に ASE を採用した。実試料を ELISA で分析した場合のマトリック効果の影響について検討したところ、ASE 抽出だけではクリーンアップが不十分であったため、Oasis<sup>®</sup> HLB を用いた固相抽出法を検討した。しかし、固形試料の場合、粉碎した際の微粒子が抽出液に移行して固相抽出カートリッジを目詰まりさせることがあったため、この問題点を克服するための方法として固相分散抽出法 (SPDE ; 参考資料 : 日本法科学技術学会 第 16 回学術集会講演要旨集 p. 36) を採用した。SPDE には固相抽出カートリッジ Oasis<sup>®</sup> HLB の充填剤 (30mg) を用いた。その結果、SPDE では抽出液が目詰まりすることなく、また、試料溶液で作製したマトリックス検量線は、マトリックスが存在しない CPA 標準品の検量線と良好に一致した (図 4)。このことから、ELISA における、マトリックスの影響を除外するためのピーナッツの簡便な前処理法として、ASE と SPDE が有効であると考え

られた。

なお、ELISA に供する試験溶液としたメタノール-PBS 混液中の、至適メタノール濃度については、前年度と同様に、メタノールが抗体に及ぼす影響を考慮し、低濃度の1%メタノールを採用した。

### (3) 分析法のバリデーション

構築した ELISA の妥当性を検証するために、添加回収試験(試料中濃度 10  $\mu$ g/g)で、真度、併行精度および室内再現精度など分析法バリデーションを行った。その結果、ELISA の検量線測定範囲の 1、10 および 100 ng/g の 3 点について平均回収率から真度の信頼性を検証したところ、表 1 に示すように 1 ppb では低めの値 (56.3%) であったが、IC<sub>50</sub> 付近の 10ppb と検量線範囲上限の 100ppb では、69.3%および 95.0%と、ほぼ満足できる良好な値が得られた。これらの結果から、実試料での測定値については、10~100ppb の範囲で信頼性があることが確認された。

また、一元配置法により、上記測定ポイントにおける併行精度と室内再現精度を求めたところ、併行精度は 3.3~5.6%といずれの測定ポイントとも良好であったが、室内再現精度は 1ppb の測定ポイントでは 140.9%と変動が大きくなったが、10ppb および 100ppb では 39.7%および 49.7%と、いずれも室内再現精度の相対標準偏差の数値としては若干高めであった。しかし、本実験がプレート作製から行う ELISA であることを考慮すると、スクリーニング法としてほぼ満足できる値であると思われた。

なお、ELISA 測定で用いた同一試料について、LC-UV により再測定を行い、同様に一元配置法で真度、併行精度および室内再現精

度を求めたところ、表 2 に示すように真度(回収率)は 76.8%、併行精度は 3.9%、室内再現精度は 5.8%となり、ELISA と同様に添加回収率はやや低めであったものの、併行精度、室内再現精度のいずれも良好な結果が得られた。

### E. 結論

本法は、CPA 汚染が危惧される食品(ピーナッツ)の実態調査においてスクリーニングとして適用可能であり、本研究を遂行することによって、輸入食品など市場に流通する食品の安心・安全性評価や、今後の規制値導入の検討に際して重要な情報を提供することに大いに寄与することが期待される。

今後の研究計画としては、更に本分析法の精度管理を行うために、ナッツ類の精度管理用試料を作製して、室内再現精度を検討すると共に、より微量な残留分析を行うために LC/MS/MS 法の適用を検討する。また、夾雑物の多い様々な食品に対応するため、より特異性の高い前処理法(イムノアフィニティなど)の適用を検討し、更に、機器分析法と ELISA の比較・バリデーション(精度管理)を実施する予定である。

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

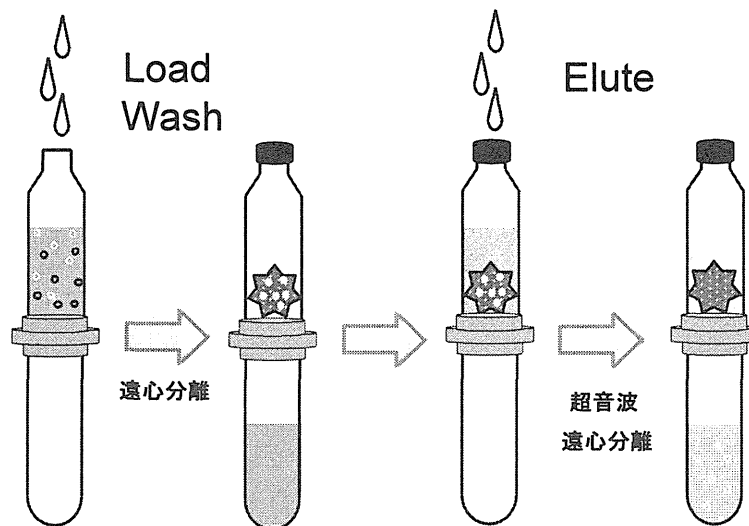


図1 固相分散抽出法 (SPDE: Solid Phase Dispersive Extraction) の操作手順

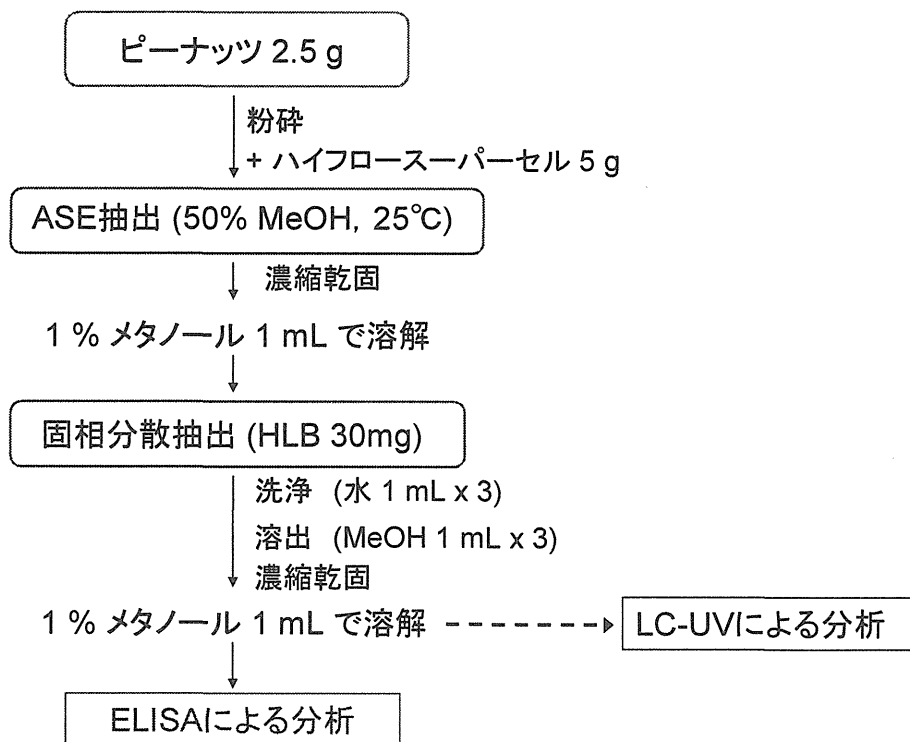


図2 試料前処理プロトコール



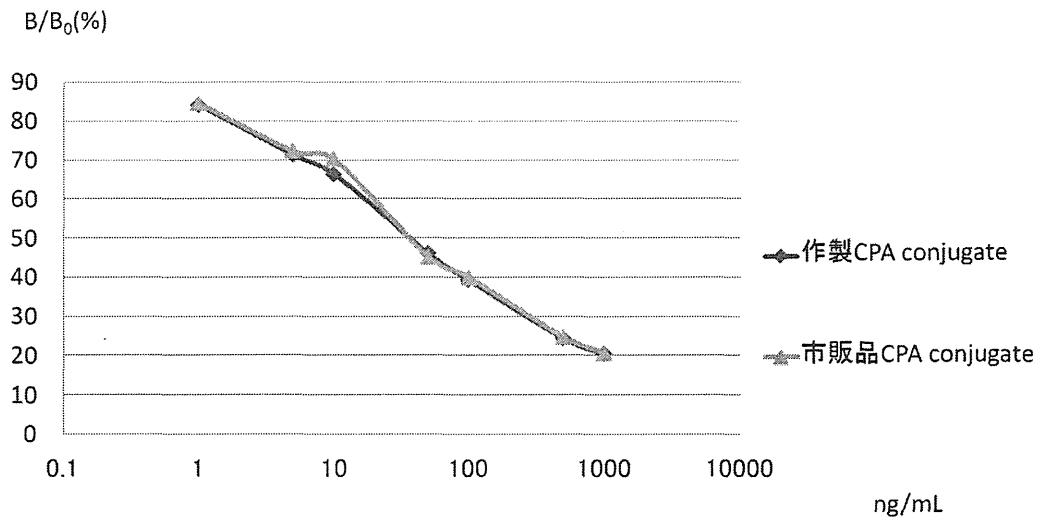


図3 自家調製した CPA conjugate と市販品との比較

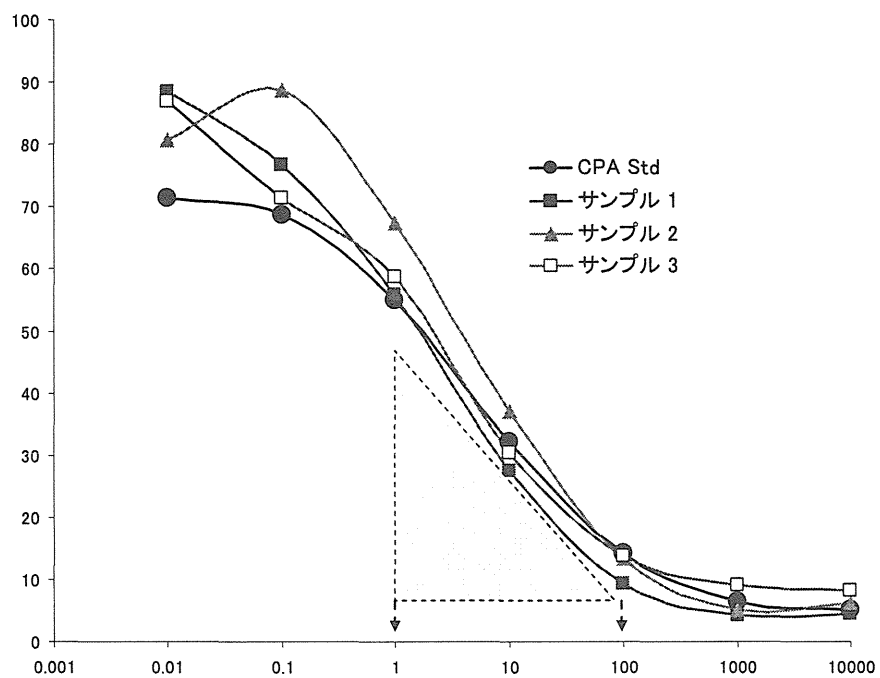


図4 検量線範囲および実試料分析における抽出クリーンアップ効果の検討

表1 ELISAによる分析法バリデーション  
(内部精度管理)

| 測定濃度    | 平均回収率<br>(%) | 併行精度<br>RSD (%) | 室内再現精度<br>RSD <sub>r</sub> (%) |
|---------|--------------|-----------------|--------------------------------|
| 1 ppb   | 56.3         | 5.6             | 140.9                          |
| 10 ppb  | 69.3         | 4.6             | 39.7                           |
| 100 ppb | 95.0         | 3.3             | 49.7                           |

CPA添加濃度: 10 µg/g (ピーナッツ)

n = 12

表2 LC-UVによる添加回収率, 併行精度および室内再現精度

| CPA添加濃度 | 回収率<br>(%) | 併行精度<br>RSD (%) | 室内再現精度<br>RSD <sub>r</sub> (%) |
|---------|------------|-----------------|--------------------------------|
| 10 µg/g | 76.8       | 3.9             | 5.8                            |

試料: ピーナッツ

n = 5

厚生労働科学研究費補助金(食品の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 24 年度 分担研究報告書

食品中の残留農薬等試験検査におけるマトリックスの

影響評価に関する研究

分担研究者 村山 三徳

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の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

－食品中の残留農薬等試験検査におけるマトリックスの影響評価に関する研究－

|       |      |                        |
|-------|------|------------------------|
| 主任研究者 | 小島幸一 | (財)食品薬品安全センター 秦野研究所 所長 |
| 分担研究者 | 村山三徳 | (社)食品衛生協会食品衛生研究所 課長    |
| 研究協力者 | 伊藤偵啓 | (社)食品衛生協会食品衛生研究所       |
| 研究協力者 | 吉田裕一 | (社)食品衛生協会食品衛生研究所       |

研究要旨

食品中の残留農薬等試験検査においては、ガスクロマトグラフ質量分析計、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた試験検査方法が汎用されている。質量分析計を検出器として用いた方法は、検出可能な化合物が多いうえに選択性が高いことから、様々な試験検査の場において応用が広がっているが、検体由来のマトリックスの影響を受けやすく、測定値の安定性が従来の検出器より劣る欠点がある。本研究では、クロマトグラフィーの質量分析計検出器におけるマトリックス効果の軽減をはかり、検査機関の信頼性確保に寄与する事を目的とした。

各種クロマトグラフ質量分析計を用いた試験検査方法において、マトリックスは検体の種類により異なり、試験検査の抽出、精製方法によっても異なる。マトリックス効果を補正するにはマトリックス標準品を用いる方法が一般的であるが、その手法についての具体的な研究はされていない。本年度の研究では、食品中の残留農薬、食品添加物等の各種クロマトグラフ質量分析計を用いた試験検査において、絶対検量線法、マトリックス検量線法、試験溶液への標準溶液添加法を比較した結果、マトリックス効果の補正方法としては、試験溶液への標準溶液添加法が優れている結果が得られた。

A. 研究目的

わが国における、食の安全・安心施策を推進するため、厚生労働省は、平成 18 年度に、ポジティブリスト制度を導入し、800 種類を超える農薬等に残留基準を設定した。また、検疫所並びに登録検査機関においては、海外から輸入される食品中の残留農薬レベルについてのモニタリング検査や輸入検査の実施を、地方自治体の衛生研究所等においては、国内市場の食品についての取

去検査等の実施を、食の安全確保のリスク管理施策の一環として実施している。これらの検査の中でも、特に、輸入食品検査においては、違反の判定結果の精度の不確かさが 2 国間での貿易上の摩擦等を生じる危険性があることから、輸入食品検査に用いる検査法については、その精確さが厳しく求められている。

ポジティブリスト制度以来、増大する残留農薬等試験検査に対応するために、ガス