

平成 28 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

研究分担報告書

食品中に残留するマイコトキシン分析に関する精度管理体制の構築に関する研究：固相分散抽出法および固相蛍光誘導体化法を用いた HPLC による食品中アフラトキシンの微量分析とその精度管理

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財)食品薬品安全センター
研究分担者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
研究協力者	伊藤 里恵	星薬科大学 薬品分析化学教室
研究協力者	黒川千恵子	さいたま市健康科学研究センター 生活科学課食品化学係
研究協力者	近藤 貴英	さいたま市健康科学研究センター 生活科学課食品化学係
研究協力者	石井 里枝	埼玉県衛生研究所 化学検査室
研究協力者	櫻井 光	横浜市衛生研究所 理化学検査研究課
研究協力者	橋口 成喜	川崎市健康安全研究所 食品担当
研究協力者	林 孝子	神奈川県衛生研究所 理化学部 食品化学グループ
研究協力者	谷口 賢	名古屋市衛生研究所 食品部
研究協力者	加藤美穂子	(株)フロンティア研究所

研究要旨

食品中アフラトキシン(AFs)の微量分析に際して、新たな前処理法を前年度までに構築したので、本年度の研究事業として外部精度管理を実施した。その際、総AFs(G_1, B_1, G_2, B_2)分析では白コショウを試料として、また、アフラトキシン M_1 (AF- M_1)分析ではチーズを用いてそれぞれ精度管理用の試料を作製して同様に精度管理を実施した。その結果、総 AFs では、室間相対標準偏差(RSD_R)は、高濃度添加試料(20 ng/g)で26%未満、低濃度添加試料(2 ng/g)では29%未満と良好であった。これらを HorRat 値で算出するとそれぞれ 1.13~1.18 および 1.22~1.31 であり、いずれも国際食品規格委員会(CAC)で規定した HorRat 値の許容範囲(2)内であり、本試験法の室間再現精度は良好であることが確認された。

また AF- M_1 の分析結果として、 RSD_R は、高濃度添加試料(1 ng/g)では20%未満、低濃度添加試料(0.1 ng/g)では31%未満と良好であった。これらを HorRat 値で算出するとそれぞれ 0.90 および 1.40 であり、CAC で規定した HorRat 値の許容範囲内であった。本研究で開発された方法は、従来法に比べて閉鎖性の高い実験手法で行えることから、実験者への AFs の曝露が低減され、現行の公定法に代わる信頼性の高い分析方法を示すことが可能となった。

A. 研究目的

マイコトキシン的一种であるアフラトキシン (AFs) は、*Aspergillus* 属が産生するカビ毒で、主に AF-B₁、AF-B₂、AF-G₁ および AF-G₂ などがある。AFs の毒性としては、肝機能障害や肝細胞ガン、遺伝毒性などが挙げられ、特に AFB₁ は、天然物質中で最も強い発ガン性物質とも言われている。そのため、日本では全食品に対して、総 AFs (AF-B₁、AF-B₂、AF-G₁ および AF-G₂) で 10 µg/kg 以下に規制されている。しかし、食品中に残留する AFs が微量でも、発ガンのリスクは無視できないことから、規制値付近あるいはその濃度以下で AFs が残留している食品をモニタリングするためにも、簡便・迅速且つ精度の高い、食品中 AFs の微量分析法が必要とされている。

食品中アフラトキシン (AFs) の微量分析において、従来法では操作が煩雑であることや実験者への AFs の曝露が危惧されるといった問題点があった。そこで昨年度までの本研究事業において、これらの問題を解決するために、前処理法として、イムノアフィニティーゲルを用いた固相分散抽出 (SPDE) 法および固相蛍光誘導体化法を併用した分析法を考案した。また、2015 年 7 月 23 日に乳中のアフラトキシン M₁ (AF-M₁) の規制値が設定され、2016 年 1 月 23 日から適用されることになった。そこで、今後の規制値設定が予想される乳製品 (チーズ) においても、その対策としてこれまでに構築した香辛料中の AFs 分析法を基にして新たに実用的な試験法を構築した。

本年度は、これら 2 種類の構築した AFs の微量分析法について、精度管理用の試料 (香辛料およびチーズ) を作製し、複数の外

部検査機関 (8 機関) に配布して分析法の外部精度管理試験を実施することとした。

B. 研究方法

総 AFs および AF-M₁ の分析方法としては、抽出過程が異なるものの、SPDE を用いたクリーンアップと蛍光誘導体化はほぼ同様に行った。詳細は昨年度に報告済みのものがベースとなっている。概略のフローチャートを図 1 に示した。

本項では外部精度管理試験方法の概略を以下に示す。

(1) 外部精度管理試験

香辛料としては、市販の白コショウに AFs を添加し、精度管理試験用の標準試料を添加して、高濃度試料 A (20 ng/g) と低濃度試料 B (2 ng/g) の 2 種類を調製した。

チーズについては、市販の固形チーズに予め試料と同重量の抽出液を添加して、軽くホモジナイズして“泥状(スラリー状)”としたものに精度管理試験用の標準試料を添加して、高濃度試料 (1 ng/g) と低濃度試料 (0.1 ng/g) の 2 種類を調製した。

本試験に参加協力してもらう検査機関 (8 機関) に当該試料と実験に必要な試薬類を配布し、また操作プロトコールを指定して分析を依頼した。室間精度管理のデータ解析には一元配置分散分析を行って相対標準偏差を算出し、更に HorRat (Horwitz ratio) 値も合わせて算出した。

C. D. 研究結果および考察

(1) 香辛料中総 AFs 分析の室間再現精度

昨年度までの本研究事業において開発した分析方法について、操作性および検出感度向上を目指して若干の改良を行うと共に、

精度管理用の試料(香辛料)を作製し、複数の外部検査機関(8 機関)に配布して分析法の室間再現精度を評価するための試験を実施した。

その結果、真度の評価として、全体的な回収率は、試料Aおよび試料B共に概ね70%程度であった(表1)。また、アフラトキシンの種類では、AF-G₂とB₂ではやや低め(61~71%)となったが、AF-G₁とB₁では約69~77%と良好であった。これは、使用したイムノアフィニティーゲルが、4種類に交差反応を示すことが製品上で謳われているが、食品衛生上、特に問題となるAF-B₁に強く反応するようになっていたため、構造式が類似したB₁とG₁の回収率がG₂とB₂に比べて高い値を示したものと推察された。

なお、B₁とG₁に関しては、今回の測定方法において“固相蛍光誘導体化法”を行ったが、良好な回収率が示されたことから、この手法も実用性の観点から問題ないことが示されたと考える。

精度の評価として、8検査機関の室間精度を相対標準偏差(RSD_R)で算出したところ、試料A(高濃度添加)では26%未満、他方、試料B(低濃度添加)では29%未満であった(表2)。更に、室間再現精度についてはHorRat値で評価することとした。なお、その評価として国際食品規格委員会(Codex Alimentarius Commission : CAC)では、許容範囲を2以内と定めている。その結果、試料Aでは1.13~1.18、他方、試料Bでは1.22~1.31であり(表3)、CACでの許容範囲以内であった。この結果から、本試験法の室間再現精度は良好であることが確認された。

また、各検査機関の実測データを評価すると、8機関中7機関は、同一試料2回トラ

イアルの平均値が4種類のAFs全てにおいて、“全検査機関の平均値 ± SD”にほぼ入っていた(図2および図3)。残りの1機関も平均値 ± 2SD以内にほぼ入っていた。検査機関の出す分析値の信頼性を評価するための、いわゆる「技能試験」において、JISでは付与された値(assigned value)からの偏りを表すzスコアの絶対値が、2以内であればその分析結果は「満足」と判断される。このことから、今回の外部精度管理試験に参加した各検査機関は、いずれも技能的に問題が無いことも確認された。

(2) チーズ中AF-M₁分析の室間精度管理

昨年度までの本研究事業において開発した分析方法について、その有用性・有効性を検証することを目的として、精度管理用の試料(チーズ)を作製し、複数の外部検査機関(8 機関)に配布して分析法の室間精度管理試験を実施した。

その結果、真度の評価として、試料Aおよび試料Bの回収率は、概ね93%および104%程度であった(表4)。このことから、本研究で使用したイムノアフィニティーゲルは、総AFsと同様にAF-M₁にも十分な交差反応を示し、且つ本試験法にて開発したSPDEおよび固相蛍光誘導体化法が有効であることが確認された。

精度の評価として、8検査機関の室間精度を相対標準偏差で算出したところ、試料A(高濃度添加)では20%未満、他方、試料B(低濃度添加)では31%未満であった(表4)。これらをHorRat値で算出すると試料Aでは0.90、他方、試料Bでは1.41であり(表4)、いずれもCACで規定したHorRat値の許容範囲(2)内であった。

また、各検査機関の実測データを評価す

ると、8 機関中 5 機関は、高濃度試料測定の前平均値が “ 全検査機関の前平均値 ± SD ” にほぼ入っており、残りの 3 機関もわずかに “ 前平均値 ± SD ” からはみ出してはいたが、“ 前平均値 ± 2SD ” には十分に入っていた(図 4-(A))。また、低濃度試料においても、8 機関中 6 機関は、“ 前平均値 ± SD ” にほぼ入っており、残りの 2 機関も “ 前平均値 ± 2SD ” に十分に入っていた(図 4-(B))。以上の結果から、チーズ中 AF-M₁ 分析における本試験法の精度も良好であることが推察された。

E . 結論

食品中 AFs の分析に関して、従来の公定検査法では操作が煩雑であること、実験者への AFs の曝露が危惧されること、食品の種類によって夾雑物の種類や量が異なることから、前処理法を使い分けなければならないといった問題点があった。そこでこれらの問題点を克服するために、食品中 AFs の前処理法としてイムノアフィニティーゲルを用いた SPDE 法および固相蛍光誘導体化法を構築し、精度管理試験を実施した。その結果、白コショウ中の総 AFs 分析およびチーズ中 AF-M₁ 分析においていずれも良好な真度と精度が得られ、残留試験法として十分に実用性があることが示された。

本研究を実施することにより、現行の公

定法に代わる微量分析が可能な信頼性の高い AFs および AF-M₁ の分析方法を示すことが可能となり、食品衛生に大いに寄与することが期待される。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Koichi SAITO, Junki ISHII, Misaki NANIWA, Saya NOBUMOTO, Rie ITO ; Trace Analysis of Aflatoxins in Spices by HPLC Coupled with Solid-Phase Dispersive Extraction Followed by Fluorescence Derivatization, and its Accuracy Management for Method Validation ; International Symposium of Mycotoxicology 2016 (ISMycO2016) (Nov.30-Dec.2/2016, Tokyo)

H . 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

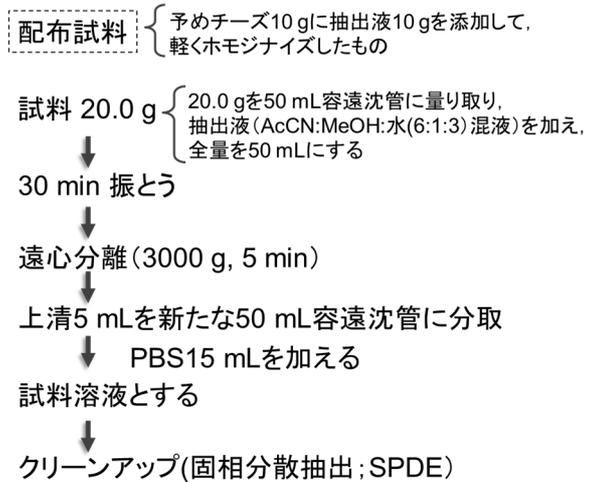
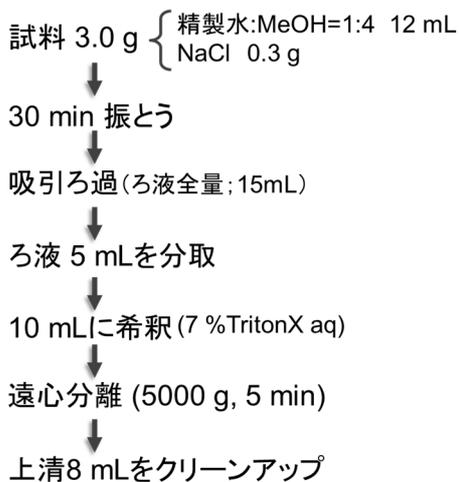
なし

2. 実用新案登録

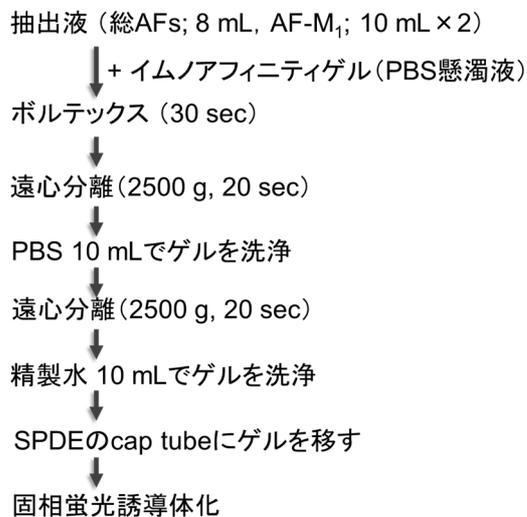
なし

3. その他

なし



(B)



(C)

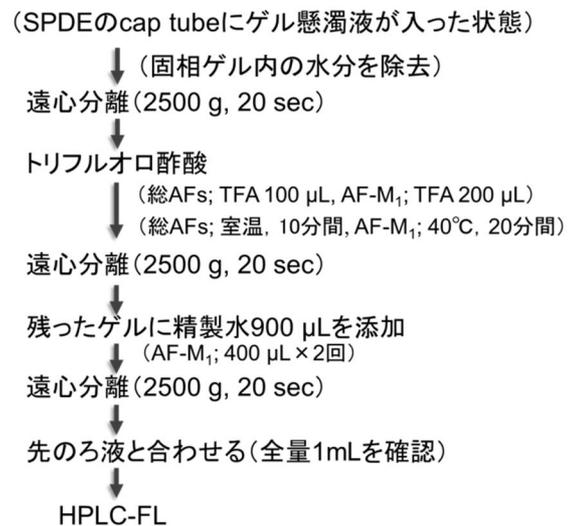


図1 香辛料中総AFsおよびチーズ中AF-M1分析フローチャート

(A);抽出(香辛料), (A');抽出(チーズ), (B) クリーンアップ,
(C) 固相蛍光誘導体化

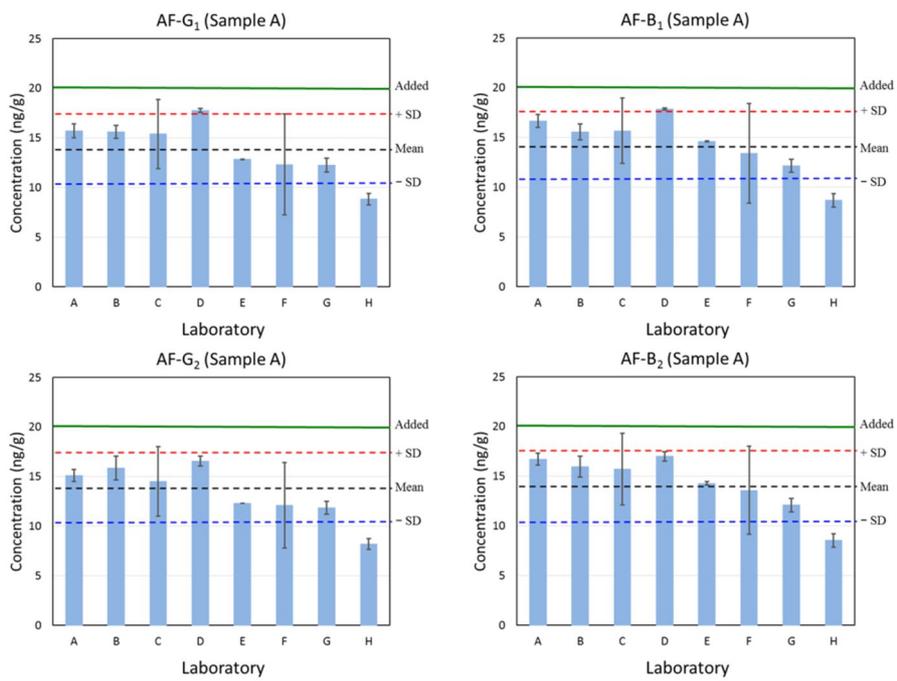


図2 室間精度管理試験結果（白コショウ，高濃度試料(20 ng/g)）
A-H；検査機関(各2回トライアル)

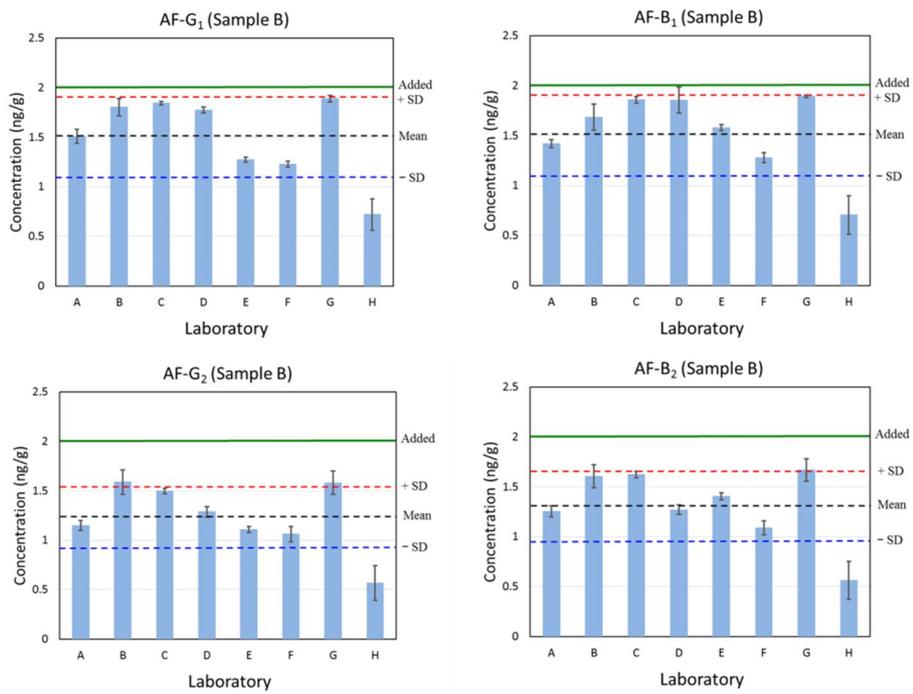


図3 室間精度管理試験結果（白コショウ，低濃度試料(2 ng/g)）
A-H；検査機関(各2回トライアル)

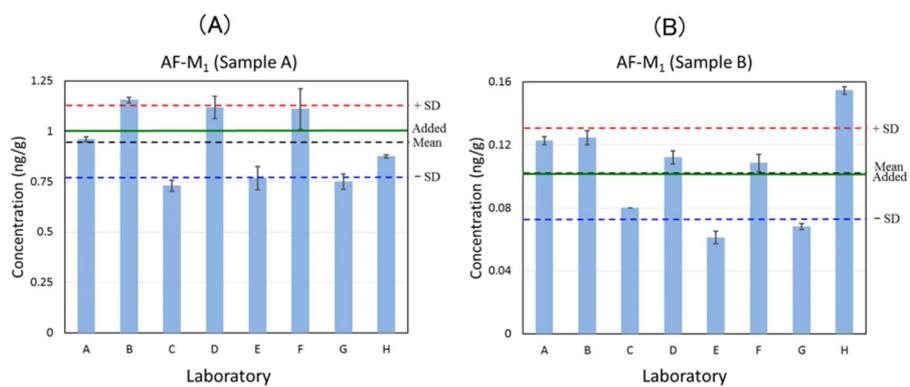


図4 室間精度管理試験結果(チーズ)
 (A); 高濃度試料(1 ng/g), (B); 低濃度試料(0.1 ng/g)
 A-H; 検査機関(各2回トライアル)

表 1 白コショウ中 AFs 分析の室間精度管理試験結果(平均回収率)

	Added (ng/g)	Average recovery (%)			
		AF-G ₁	AF-B ₁	AF-G ₂	AF-B ₂
Sample A	20	69.2	71.6	66.6	71.2
Sample B	2	75.3	76.7	61.5	65.5

(n=8 x 2)

表 2 白コショウ中 AFs 分析の室間精度管理試験結果(RSD: 相対標準偏差)

	RSD (%)			
	AF-G ₁	AF-B ₁	AF-G ₂	AF-B ₂
Sample A	25.9	25.2	25.7	24.8
Sample B	27.5	26.9	28.8	28.9

Sample A : 20 ng/g, Sample B : 2 ng/g

表 3 白コショウ中 AFs 分析の室間精度管理試験結果(HorRat 値)

	HorRat value*			
	AF-G ₁	AF-B ₁	AF-G ₂	AF-B ₂
Sample A	1.18	1.15	1.17	1.13
Sample B	1.25	1.22	1.31	1.31

Sample A : 20 ng/g, Sample B : 2 ng/g

*: Thompson's modification

表 4 チーズ中 AF-M₁ 分析の室間精度管理試験結果

	Added (ng/g)	Recovery (%)	RSD (%)	HorRat value*
Sample A	1	93.3	19.8	0.90
Sample B	0.1	103.9	30.9	1.40

(n=8 x 2)

*: Thompson's modification