

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)

分担研究報告書

ステリグマトシスチンの迅速簡易測定法の改良と実態調査への応用

研究分担者 小西 良子 (東京農業大学)

研究要旨

本研究事業で初年度に開発したステリグマトシスチン (STC) の迅速簡易測定法である ELISA 法をさらに高感度かつ安定的に改良し、実態調査に適応できる方法として確立した。

STC の分析は精度の高い方法として LC-MS/MS 等の機器分析によって行われているが、食品や飼料等のスクリーニング等多検体を扱う検査には、高コストであり実用的ではない。初年度に開発した ELISA は、感度的には良好であるが、標準曲線の安定性においてやや問題があった。そのため、今年度は、さらなる高感度と標準曲線の安定化を目標として ELISA 法を確立した。さらに本研究で確立した ELISA を用い、回収率による妥当性評価と実態調査への応用のための前処理方法を検討した。その結果、標準品および試料を 100%メタノールで溶解し保存しておくことで ELISA にアプライ前の析出を防止することができ、安定した標準曲線と汚染実態に則した 50% 阻害濃度を得ることができた。また、実態調査の試料は多機能カラムによる前処理を行うことで LC/MS-MS の測定値と相関性の高い値を得ることができた。

A. 研究目的

ステリグマトシスチン (STC) はアフラトキシシン (AF) とともに遺伝毒性のあるマイコトキシシンに分類されている。FAO/WHO 食品添加物専門家会議 (JECFA) では、2016 年にリスク評価が行われ、ベンチマークドーズレベル BMDL₁₀ は 160 µg/kg/day とされた¹⁾。アフラトキシシン B₁ (AFB₁) と比較すると約 1/1000 程度の発がん性と評価されている。構造的には AF と類似しているが、AF 産生菌とは異なる菌種、*Aspergillus* 属の *A.versicolor*、*A.nidulans* などにより産生される²⁾⁻³⁾。

JECFA での評価が行われたことから、今後国内外での規格基準が定められる可能性があるため、STC の汚染実態データの蓄積が喫緊に求められている。そのため実態調査を円滑にスピーディに行うには信頼性の高い分析法、スクリーニング法が求められており、本研究では初年度得られた知見を基に、さらに高感度、安定化を目指し、実態調査に対応できる STC の ELISA を確立することとした。マイコトキシシンは分子量が小さいため、ELISA 法では、間接競合法および直接競合法が用られることが多い。間接競合法では、プレートに STC-キャリアたんぱく質のコンジュゲートを固相化して、対象物質に対する抗特異抗体サブクラス抗体を測定サンプルとコーティングした STC-キャリアたんぱく質とで競合させる手法である。一方直接競合法は、特異抗体を固相化し、測定サンプルと STC-酵素コンジュゲートを競合させる方

法である。

我々は STC と AF が構造的に似ていることに注目し両方を認識できる抗体を特異抗体として用いて、玄米および小麦粉を対象とした直接競合法 ELISA の確立を試みた。初年度は、10%メタノールにあらかじめ溶解させた標準品および試料を用いて測定法を確立したが、測定者によって標準曲線と 50% inhibitory concentration (IC₅₀) のばらつきが大きいという結果が出るのがわかった。そこで、安定した標準曲線が得られ、実態汚染量に則した高感度 ELISA を目指し、最終年度は、酵素-マイコトキシシンコンジュゲートの検討および実態試料の前処理方法の検討を行った。本年度確立した方法を用いて、実態調査を行い、LC-MS/MS での測定結果との比較検討も行った。

B. 研究方法

1. 材料

1-1. 玄米

2021 年度の実態調査で使用した国産玄米 (神奈川県で購入した市販品) の中で LC-MS/MS で測定した結果、STC が検出されなかったものを非汚染米として添加回収試験に用いた。玄米は、500g を粉砕機で 5~10 秒×2 回粉砕を行った後、4°C で保存した。自然汚染玄米として、2021 年度実態調査に用いた神奈川県で購入した市販品を用いた。

1-2. 小麦粉

2021 年度の実態調査で使用した小麦粉 (神奈川県で購入した市販品) の中で LC-MS/MS

で測定した結果 STC が検出されなかったものを非汚染小麦粉として添加回収試験に用いた。

1-3. STC-biotin の作成

STC とグリコール酸を強酸性溶液中で反応させ、グリコール酸誘導体 (STC-GA) を調製した。STC-GA と N'-ヒドロキシスクシニド (Thermo Scientific 社製) をジメチルホルムアミド中で反応させ、中間体を作成後、Ezlink Pentylamine Biotin (Thermo Scientific 社製) を加えた。生成物を HPLC で分取し、STC-biotin を得た。

2. 直接競合 ELISA

2-1. Aflatoxin_{B2}-Horse Radish Peroxidase conjugate (AFB₂-HRP) を用いた直接競合 ELISA

初年度に開発した方法で行った。96 穴プレート (Nunc-ImmunoTMPlate II、サーモフィッシャーサイエンティフィック株) の各ウェルにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈したマウス抗 IgG ヤギ抗体 (Scientif 社製、4 μg/mL) を 100 μL ずつ加え、4°C で一晩静置した。抗体を除いた後、PBS に溶解した 0.4% ウシ血清アルブミン (BSA、和光純薬工業株式会社) を各ウェルに 300 μL ずつ加え、4°C で一晩または室温で 1 時間静置した。0.4% BSA を除いた後、各ウェルに PBS に溶解した 0.2% BSA で希釈したマウス抗 AF 抗体 (MoAb2-3、HORIBA 社から提供) (100 ng/mL) を 100 μL ずつ加え、室温で 1 時間静置した。静置後 0.02% tween 20-PBS で 1 回洗浄を行い、45 μL ずつ 0.2% BSA を各ウェル

にいれ、STC 標準品 (MAKOR CHEMICALS LTD) を最終濃度で 0.1~30 ng/mL (6 段階) になるように 100%メタノールで 10 倍濃度に溶解したものを 5 μL ずつ加えよく攪拌した。さらに各ウェルに AFB₂-HRP、(HORIBA 社から提供、最終濃度 150 ng/mL) を 50 μL ずつ加え一時間静置し競合反応させた。その後 0.02% Tween 20-PBS で 3 回洗浄を行い、TMB Substrate Reagent (BD 社) を 100 μL ずつ加え、10 分間静置した。0.5 N H₂SO₄ を 100 μL ずつ加え反応を止め、マイクロプレートリーダー (Powerscan-HT, DS Phama Biomedical 社、USA) で 450 nm および 630 nm における吸光度を測定した。

2-2. STC-biotin を用いた直接競合 ELISA

2-1.の方法でマウス抗 AF 抗体までの反応は同様に行い、AFB₂-HRP の代わりに STC-biotin を用い 1 時間反応させた後、HRP conjugated Streptavidin (proteintech Inc., USA) を 1 時間反応させ、酵素反応を行った。2-1.と同様に吸光度の測定を行った。

2-3. STC-HRP を用いた直接競合 ELISA

2-1.の方法でマウス抗 AF 抗体までの反応は同様に行い、AFB₂-HRP の代わりに STC-HRP (Creative Diagnostics, NY., USA) を用い、1 時間反応させた後、酵素反応および吸光度の測定は、2-1.と同様である。

3. 玄米および小麦粉の前処理の検討

添加回収および実態調査の対象となる玄米および小麦粉検体の前処理を、以下の 3 つの方法で検討した。

3-1. Autoprep MF-A による検討

2.5 g の玄米又は小麦粉にアセトニトリル：水（85:15）10 mL を加え 30 分間振とうし、遠心分離（3,000rpm 5 分）したものを抽出液とした。Autoprep MF-A（昭和電工（株））をメモリのついた試験管に入れ、抽出液 3 mL を加え、自然落下させた。メモリを見て 1mL まで流出液が到達したら、別の試験管にカラムを移し 1.2-1.4 mL の流出液を得た。流出液 1.0 mL をガラス製の試験管に移し、窒素気流で乾固し、100 μ L のメタノールで溶解し、ELISA に供した。

3-2. HLB Oasis の検討

HLB Oasis（6 cc/200mg, Waters, MA, USA）のコンディショニングは、メタノール及び水で行った。抽出液を窒素乾固したのち 20% アセトニトリルで再溶解し、HLB Oasis に供した。その後 70% メタノールで洗浄し、100%アセトニトリルで流出させ、窒素気流で乾固し、100 μ L のメタノールで溶解し、ELISA に供した。

3-3. 限外ろ過

90%メタノールで抽出した試料抽出液を Nanosep®centrifugal Devices with Omega 10K（Pall life science MI,USA）に入れ、12,000 rpm 10 分遠心したろ液を窒素乾固し、試料 1 g/mL 相当になるようにメタノールで溶解し ELISA に供した。

4. 玄米および小麦粉を用いた添加回収実験

4-1. 玄米を用いた添加回収試験

添加回収試験は STC 原液（50 mg/L in アセトニトリル）をメタノールで希釈し、0.25

mg/L（添加液 1）、0.075 mg/L（添加液 2）及び 0.025 mg/L（添加液 3）の溶液を 1 mL ずつ調製した。STC 非汚染玄米を 2.5g 量りとり、添加液 1,2,3 をそれぞれ 200 μ L ずつ添加し、一時間静置したのち、それぞれの前処理試料とした。STC の最終添加濃度は、それぞれ 20、6、2 μ g/kg となる。添加回収液および自然汚染米の測定も Autoprep MF-A を前処理に用いた。

4-2. 小麦粉を用いた添加回収実験

4-1.の玄米と同様の方法で添加回収試験を行った。

5.統計処理

ELISA による濃度計算は、統計処理のソフト GEN 5（Version 2.0, Biotek, Vermont, USA）を用いた。

C. 研究結果

1. 直接競合 ELISA の改良

初年度検討した直接競合 ELISA の問題点として 1) 標準曲線が測定者によりばらつきがでる、2) 玄米の添加回収および自然汚染の測定値が玄米の種類による影響をうける、3) 自然汚染玄米の汚染濃度に適応できていない、の 3 つが挙げられた。そのため、今年度はこれらの問題を解決するため、それぞれの検討を行った。

1.1 標準品および試料のメタノール濃度の検討

初年度のプロトコールでは 10%メタノールに標準品および試料をあらかじめ溶解して、ELISA のウェルに入れる方法であったが、10%メタノールでは、STC が十分に溶けない可能性が指摘された。そのため、標準品および試料を

溶解するメタノールの濃度を上げることによる ELISA の感度への影響を検討した。図 1 で示されるように最も感度が良かったのは 10% メタノールであり、メタノール濃度を上げるにつれて感度が低下した。このことから 10% メタノールにあらかじめ溶解することをせず、10 倍濃度で 100% メタノールに溶解したものをウェル内で 0.2% BSA-PBS と混合し、最終濃度 10% メタノールにする方法を行った。その結果、測定者の違いによる標準曲線および IC₅₀ の値のばらつきが少なくなり、安定して 1.2-1.5 ng/mL の IC₅₀ が得られるようになった (図 2、表 1)。

1.2 試料の前処理の検討

玄米や小麦粉はタンパク質や脂質を含むため、ELISA において非特異的発色または発色阻害を引き起こすことがある。実態調査では、多種の玄米や小麦粉を使用することから、その品種の違いによらず、安定した測定結果を得るために、前処理の効果を検討した。検討方法としては 3 通り用いた。

Autoprep MF-A 多機能カラムを用いた場合は、回収率が良好であったが、HLB Oasis SPE カラムおよび限外ろ過法では、発色が阻害され、回収率の計算ができなかった。この結果から、汚染試料は Autoprep MF-A 多機能カラムによる前処理を行って測定することとした。

1.3 酵素—マイコトキシンコンジュゲートの検討と高感度化

高感度化を目的に 2 種類の酵素—マイコトキシンコンジュゲートを使ったプロトコールを検討した。STC-HRP と STC-biotin + Streptavidin-HRP の組み合わせである。しかし、

2 種類とも特異抗体への結合が見られず、用量依存性のある結果は得られなかった。この原因として、STC に他のタンパク質またはビオチンを結合させることにより、STC が、抗 AF 抗体に結合しにくくなるのではないかと考えられた。もし、これらのコンジュゲートを使うなら、STC に対する抗体を、2 次抗体として用いている抗 AF 抗体の代わりに独自の抗 STC 抗体を作成する必要がある。

2. 回収率と汚染試料の測定結果

表 2 に、今年度確立した ELISA を用いての添加回収と汚染試料の測定結果を示した。玄米では 6 回行った回収率の平均と標準偏差は 2 μg/kg STC 添加では 114.5 ± 25.8%、6 μg/kg STC 添加では 94.6 ± 17.3%、20 μg/kg STC 添加では 121.2 ± 11.6% と 2 μg/kg STC 添加においてはややばらつきが大きい結果であったが、いずれも 90% 以上という高水準を示した。汚染玄米を用いた測定結果では 1 μg/kg 付近の汚染米でも LC-MS/MS での測定値とほぼ同等であり、5.67 μg/kg の汚染濃度の玄米ではやや高めに出たものの、スクリーニングとしては充分信頼性における結果が得られることがわかった (図 3)。

小麦粉では自然汚染試料がなかったことから、添加回収率のみの測定であったが、6 回行った平均と標準偏差は 2 μg/kg STC 添加では 117.9 ± 11.1%、6 μg/kg STC 添加では 96.0 ± 7.5%、20 μg/kg STC 添加では 91.5 ± 3.9% であり、良好な回収率であると言える (表 3)。

D. 考察

本研究の初年度に開発した STC 用 ELISA では、測定可能範囲は 0.59~13.34 ng/mL であり、IC₅₀ は 2.3 ng/mL であった。今年度改良した結

果、測定可能範囲は 0.1~10.0 ng/mL、IC₅₀ は 1.2 ng/mL となり、より高感度の系を確立することができた。汚染実態調査で検出された試料を使った実態調査への応用においても、1.17 µg/kg の STC 汚染玄米から ELISA で検出されたことは実用化に向けて大きな進歩である。

STC の ELISA は、論文上、モノクローナル抗体を用いた間接競合 ELISA⁴⁾や直接競合 ELISA⁵⁾、ポリクローナル抗体を用いた直接競合 ELISA⁶⁾ など報告例があるが、市販されている種類は少なく、また品質に問題がある。本研究では、AF と交差性を持つモノクローナル抗体を用いた ELISA ではあるが、国産の米や小麦粉では AF の汚染例は報告されていないので⁷⁾、この研究で確立した ELISA 法は国産玄米と小麦粉のスクリーニングに適用できると考えられた。

前処理については Oplatowska-Stachowiak らが米、トウモロコシ、及び小麦を対象とした ELISA を報告した時に QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) 法を用いて前処理法を行っている⁵⁾。本研究では、QuEChERS より工程数の少ない Autoprep MF-A 多機能カラム法を用いて良好な結果が得られた。STC は 85%アセトニトリルで抽出するが、ウェルに添加するときに 10%メタノール溶液を使用することから玄米、小麦粉の成分が混入する可能性は非常に高い。Autoprep MF-A 多機能カラムは、試料の 85% アセトニトリル抽出液から AF を選択する one step カラムとして開発されたものである⁸⁾。STC の精製にも有効であること、玄米、小麦粉の不純物の除去にも使用できることは、本研究で初めて実証された。

E. 結論

本研究で改良した ELISA 法は、測定可能範囲は 0.1~10.0 ng/mL であり、IC₅₀ は 1.2 ng/mL であった。玄米、小麦粉とも 2.0 µg/kg 以上では 90%以上の回収率を示し、汚染玄米を用いた測定でも LC-MS/MS との相関性が取れていることが明らかになった。このことから、国産玄米および小麦粉の STC 汚染食品のスクリーニングには充分に対応できる方法であると考えられた。

F. 参考文献

- 1) JECFA : JECFA/83/SC- 1 - JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES Eighty-third meeting. (SUMMARY AND CONCLUSIONS).2016
- 2) European Food Safety Authority (EFSA) : Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. EFSA Journal. 11(6), 81, 2013, doi: 10.2903/j.efsa.2013.3254
- 3) Díaz, Nietoa, CH., Granerob, AM., Zonb, M. A., Fernández, H.: Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. Food and Chemical Toxicology. 118, 2018. doi:10.1016/j.fct.2018.05.057
- 4) Kong, D., Xie, Z., Liu, L., Song, S., Kuang, H., Cui, G., Xu, C.: Development of indirect competitive ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of sterigmatocystin in cereal products. Food and Agricultural Immunology. 28, 260-273, 2017, doi:

10.1080/09540105.2016.1263985

- 5) Oplatowska-Stachowiak, M., Reiring, C., Sajic, N., Haasnoot, W., Brabet, C., Campbell, K., Elliott, C. T., Salden, M. : Development and in-house validation of a rapid and simple to use ELISA for the detection and measurement of the mycotoxin sterigmatocystin . *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410, 3017–3023, 2018. doi:10.1007/s00216-018-0988-8
- 6) Singh, G., Ligia Velasquez, L., Huet, A., Delahaut, P., Gillard, N., Koerner, T., Development of a polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for determination of sterigmatocystin in wheat and corn flours, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 36(2):327-335. 2019
- 7) Yoshinari, T., Takeuchi, H., Kosugi, M., Taniguchi, M., Waki, M., Hashiguchi, S., Fujiyoshi, T., Shichinohe, Y., Nakajima, M., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y. : Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 36(9), 1404-1410, 2019, doi: 10.1080/19440049.2019.1628359
- 8) Tanaka, K., Sapou, Y., Naito, S., Kushiro,

M., Nakagawa, H., Preparation of a reference material containing sterigmatocystin. *Food Additives & Contaminants: Part A* Volume 25, 2008

F. 健康危機情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takashima, K., Nakajima, K., Saori Shimizu, S., Ojima, R., Tang, Q., Okano, H., Takahashi, Y., Ozawa, S., Jin, M., Yoshinari, T., Yoshida, T., Sugita-Konishi, Y., Shibutani, M., Disruption of postnatal neurogenesis and adult-stage suppression of synaptic plasticity in the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to sterigmatocystin in rats. *Toxicol Lett*, 349, 69-83. doi: 10.1016/j.toxlet.2021.06.006.

2. 学会発表

1) 吉成知也、小西良子、他 市販 ELISA kit によるタイプトリコテセン系カビ毒の迅速簡易測定法の検討 第 117 回日本食品衛生学会 学術講演会, 2021.11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

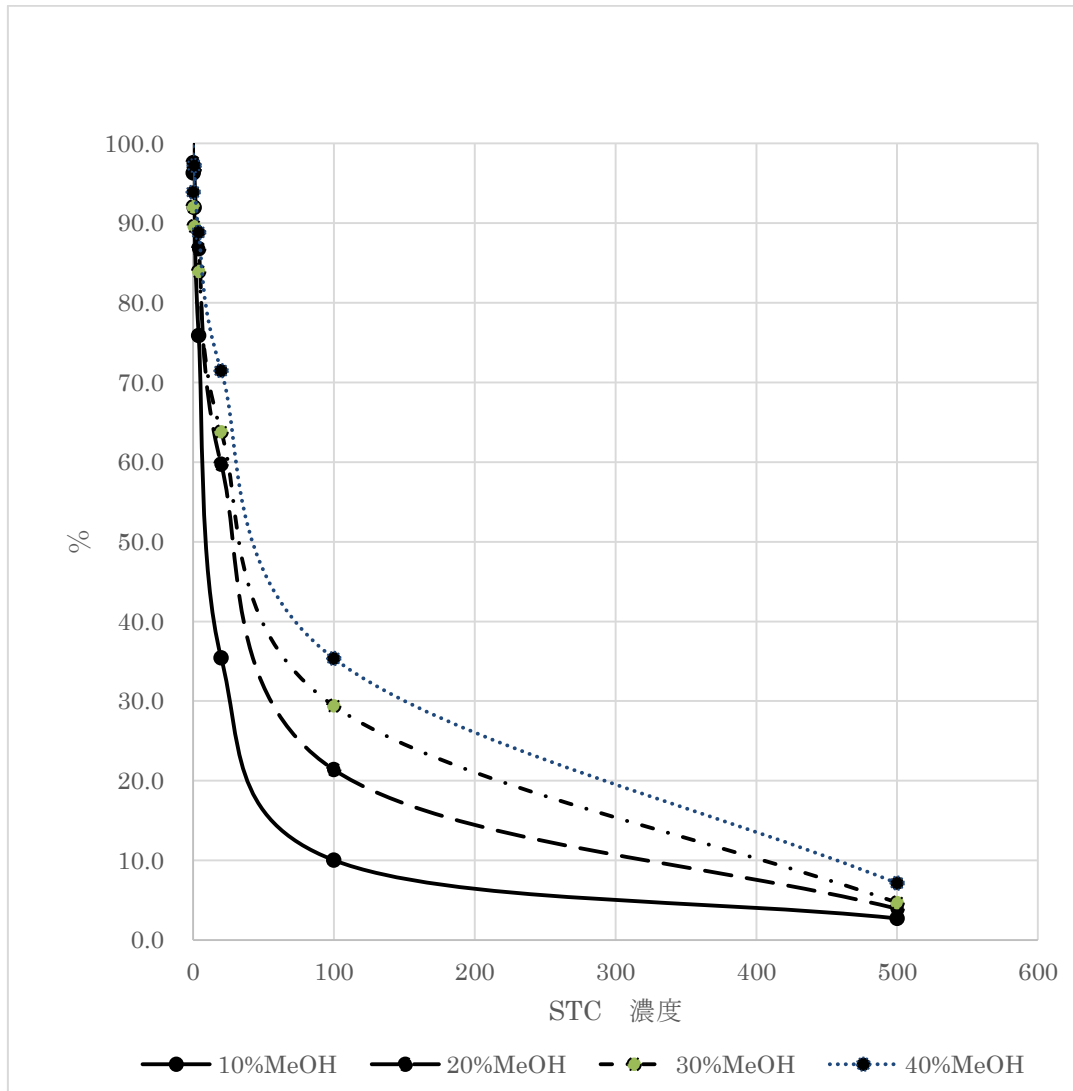


図 1. ELISA に供する試料および標準品のメタノール溶液濃度の検討

STC: ステリグマトシスチン

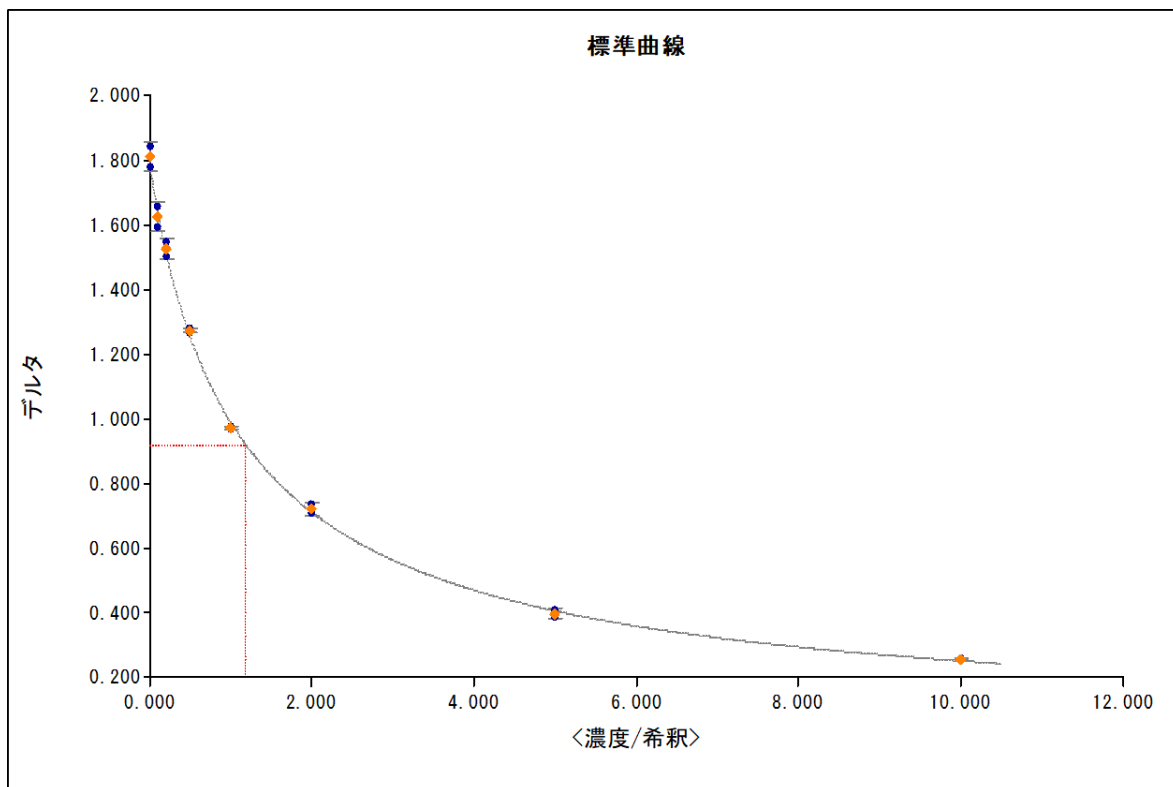


図 2. 改良した ELISA による標準曲線
 50 % Inhibitory Concentration=1.19 ng/mL

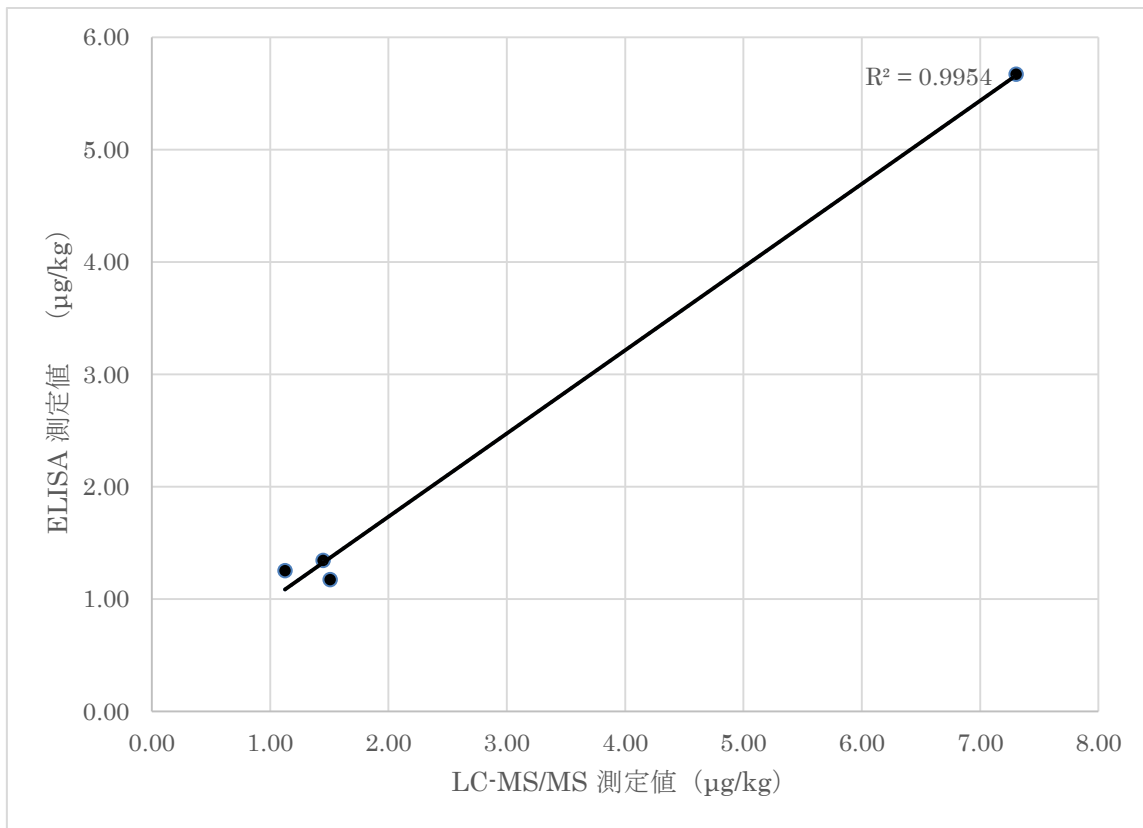


図 3. 汚染玄米における ELISA と LC-MS/MS の相関性

表 1. 改良した STC ELISA のプロトコール

1. 96 well ELISA 用 plate に Goat anti-mouse IgG (H+L) Secondary antibody を 5-10 μ g/mL in PBS に調製し、100 μ L/ウェルでまく。
2. 4 $^{\circ}$ C 下一晩インキュベート後、ウェル内の液を捨てる。
3. 0.4 % BSA を 300 μ L/ウェル入れ、1 時間室温で放置後、ウェル内の液を捨てる。
4. Mouse anti- AFs antibody (50 ng/mL) in 0.2% BSA in PBS を 100 μ L/ウェル入れ、1 時間室温で放置する。
7. 0.02% Tween 20 in PBS 350 μ L/well 洗浄 1 回
8. well に 0.2% BSA in PBS を 45 μ L / well 入れ、STC standard または試料 in 100 % methanol を各 well に 5 μ L/well 入れて、よく攪拌する。
9. すぐ AFB ₂ -HRP in 0.2% BSA in PBS(最終濃度 150 ng/mL)を、50 μ L/well 入れる。
10. 1hr. RT
11. 0.05% Tween 20 in PBS 350 μ L/well 洗浄 3 回
12. TMB 基質溶液 (BD 製、A+B を等量混合) を作成して 100 μ L/well 入れる。
13. 0.5N H ₂ SO ₄ を 100 μ L/well 入れる。
14. ELISA reader 450 nm (バックグラウンド 630 nm) で測定

表 2. 玄米における回収率と汚染試料の測定値

A) 添加回収試験

添加量	測定値 (ng/g)	回収率 (%)	平均±標準偏差 (%)
2 µg/kg	2.63	131.6	114.5±25.8
	2.83	141.5	
	2.79	139.3	
	1.99	99.3	
	1.70	84.9	
	1.81	90.5	
6 µg/kg	6.09	101.4	94.6±17.3
	5.71	95.2	
	6.98	116.3	
	5.40	90.1	
	3.86	64.3	
	6.03	100.5	
20 µg/kg	21.14	105.7	121.2±11.6
	21.58	107.9	
	25.28	126.4	
	26.79	133.9	
	25.02	125.1	
	25.64	128.2	

B) 自然汚染検体

玄米検体	ELISA 測定値 (ng/g)	LC-MS/MS 測定値 (ng/g)
自然汚染①	1.40	1.34
自然汚染②	1.08	1.25
自然汚染③	6.92	5.67
自然汚染④	1.46	1.17

表 3. 小麦粉における回収率

添加量	測定値 (ng/mg)	回収率 (%)	平均±標準偏差 (%)
2 µg/kg	2.10	105.1	117.9±11.1
	2.19	109.7	
	2.48	124.0	
	2.44	121.9	
	2.70	135.1	
	2.23	111.5	
6 µg/kg	6.19	103.2	96.0±7.5
	5.73	95.6	
	5.50	91.6	
	5.66	94.4	
	5.14	85.6	
	6.35	105.9	
20 µg/kg	17.56	87.8	91.5±3.9
	18.01	90.1	
	18.09	90.5	
	17.77	88.8	
	18.73	93.6	
	19.69	98.4	