

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)

総合研究報告書

簡易迅速検出法の開発
(2019～2021 年度)

研究分担者 小西良子 (東京農業大学)

研究要旨

ステリグマトシスチン (STC) および 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) は 2016 年の JECFA においてリスク評価されたことから、国際的にもそれらの汚染は今後モニタリングの強化など注意を払わなければならないマイコトキシンとなった。STC はアフラトキシンの前駆体であることから、健康被害として発がん性が毒性として挙げられる。STC は *Aspergillus nidulans*、*A. versicolor* などによって産生され、穀物や穀物加工品、ナッツ、コーヒー生豆、スパイス、ビール、チーズなどでの汚染が報告されている。4,15-DAS は、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンと同様のタイプ A のトリコテセン系マイコトキシンであり、毒性として発がん性は認められないが、消化器障害や免疫毒性などが報告されている。そのため上記 2 つのトリコテセンと共に JECFA では 4,15-DAS をグループとして TDI を設定することとなった。

これらマイコトキシンの分析に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、食品や飼料等のモニタリングや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。そこで、分担研究では迅速かつ低コストで行える方法として ELISA による簡便迅速法を検討した。初年度および最終年度に STC を対象とした ELISA を開発した。初年度に開発したプロトコルの改良を最終年度に行い、実態調査に応用できる感度と精度を実現した。次年度には、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンおよび 4,15-DAS の 3 つを同時に測定できる ELISA を市販品から探索することを試みた。T-2 トキシンと 4,15-DAS は同じトリコテセン系マイコトキシンタイプ A に分類されており、構造に類似性が高い。そのため、抗原構造が共通な部位があると考えられ、市販の T-2 トキシン ELISA キットに使われている特異抗体が 4,15-DAS も認識するか否かを 7 種の市販 T-2 トキシン ELISA キットで検討を行った。その結果、検討した市販のキットは全て 4,15-DAS には交差性を示さないことがわかった。

A. 研究目的

FAO/WHO 食品添加物専門家会議(JECFA) は 2016 年にステリグマトシスチン (STC) および 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) のリスク評価を行った。STC は *Aspergillus* 属の *A. versicolor*、*A. nidulans* などにより産生されるマイコトキシンであり、土壌、農作物、特に穀類を広く汚染して

いる。世界的には、穀物、穀物加工品、ナッツ、コーヒー生豆、スパイス、チーズ等で検出されている。我が国の実態調査に関しては、本事業で行っているが、玄米から検出された。毒性を見ると遺伝毒性発がん性があると評価され、ラットを用いた動物試験に基づいた肝血管肉腫のベンチマークドーズレベル BMDL₁₀ は 160 µg/kg/day であった。同じくら

ットでの AflatoxinB₁ (AFB₁) の BMDL₁₀ は 170 ng/kg/day であることから、STC は AFB₁ の 1/1000 程度の発がん性を有すると考えられる。

4,15-DAS の毒性評価では、単独での毒性の情報が少ないことから、JECFA は T-2、HT-2 および 4,15-DAS の 3 つのカビ毒を一つのグループとして、グループ TDI 0.06 µg/kg を設定した。トリコテセン系マイコトキシンの毒性は、強い消化器障害であるが、タイプ A トリコテセン系マイコトキシンの T-2 の毒性は特に ATA 症と呼ばれる白血球減少や放射線障害様症状が現れ、致死率も高い。我々は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）の研究から、北海道地域で T-2、HT-2 が豆類から検出されることを明らかにしているが、4,15-DAS 汚染に関してはほとんど情報がない。

国際的なリスク評価が行われると、今後コーデックス委員会における規制等が審議されることになるが、その時までには我が国における STC および T-2、HT-2、4,15-DAS を対象としたモニタリングのデータが必要となる。分析法としては LC/MS-MS での同時分析法などが開発されているが、高価な装置と技術が必要なため、モニタリングやスクリーニングには迅速簡便な測定法の開発が望まれている。

そのため、本課題の分担研究として、STC および T-2、HT-2、4,15-DAS を対象とする簡便迅速測定法を確立することとした。STC を対象とした簡便迅速測定法は、市販されている ELISA キットがあるものの限られており、高価であり、かつ品質に問題があることから、本研究として開発することとした。T-2 および HT-2 を対象とする簡便迅速測定法は、市販されている ELISA キットが多いことからそれらが 4,15-DAS にも対応できるか否かを検討した。

B. 研究方法

(1) STC ELISA の開発

1) 材料

①玄米

2021 年度の実態調査で使用した国産玄米から非汚染米を添加回収試験に用いた。玄米は、500 g を粉砕機で 5~10 秒×2 回粉砕を行った後、4°C で保存した。自然汚染玄米は、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。

②小麦粉

2021 年度の実態調査で使用した市販小麦粉（神奈川県で購入した市販品）から非汚染小麦粉を添加回収試験に用いた。

2) 直接競合 ELISA

AflatoxinB₂-Horse Radish Peroxidase conjugate (AFB₂-HRP、HORIBA) を用いた直接競合 ELISA を行った。図 1 にプロトコルを示した。96 穴プレート (Nunc-ImmunoPlate II、サーモフィッシャーサイエンティフィック株) の各ウェルにマウス抗 IgG ヤギ抗体 (Scientific 社製、4 µg/mL) をコーティングしたのち 0.4% ウシ血清アルブミン (BSA、和光純薬工業株式会社) でブロッキングを行った。洗浄後 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) を加え、室温で反応させ洗浄した。45 µL の 0.2% BSA をあらかじめ入れた各ウェルに 100% メタノールで溶解した標準品および試料を 5 µL 加えよく攪拌した。すぐに AFB₂-HRP (HORIBA 社から提供、最終濃度 150 ng/mL) を 50 µL ずつ加え競合反応させた。洗浄後、TMB Substrate Reagent (BD 社) により発色させ、0.5 NH₂SO₄ により反応を止めた。プレートリーダー (Powerscan-HT、DS Pharma Biomedical 社、USA) で 450 nm および 630 nm における吸光度を測定した。

3) 試料の前処理法

ELISA に供する試料は、ELISA 反応への妨害物質を除くため Autoprep MF-A (昭和電工 (株)) による前処理を行った。

(2) 4,15-DAS の ELISA

1) 使用した ELISA キット

T-2 又は T-2/HT-2 測定用 ELISA キットとして MAX Signal T-2 ELISA kit (PerkinElmer)、T-2 Toxin ELISA Test kit (Meizheng Bio-Tech)、AgraQuant T-2 Toxin ELISA test (Romer Labs)、RIDASCREEN T-2 Toxin (R-Biopharm AG)、RIDASCREEN T-2/HT-2 Toxin (R-Biopharm AG)、Celer T2 (Eurofins)、Veratox for T-2/HT-2 (NEOGEN) の 7 種類を用いた。

2) 4,15-DAS の添加濃度

4,15-DAS は、市販の ELISA キットに添付されている各マイコトキシンの標準品の濃度を参考に、その 1000 倍濃度までの溶液を実験に用いた。その際、適量の stock solution を窒素乾固したのち、各メーカーが用いている buffer により順次希釈した。

3) ELISA の手順

ELISA の操作は、各メーカーの説明書に従って行った。

(3) 統計処理

STC ELISA での濃度計算は、統計処理のソフト GEN 5 (Version2.0, Biotek, Vermont, USA) を用いた。T-2 および T-2/HT-2 ELISA キットでの濃度計算は、メーカー付属の計算ソフトを用いた。

C. 研究結果

(1) STC ELISA の開発

初年度検討した直接競合 ELISA の以下の 2 つの問題点について改良を行った。①測定者による標準曲線、50% 阻害濃度 (IC_{50}) のばらつき、②玄米品種の違いによる測定値のばらつきが認められる。①の対処として、STC の標準品および試料の溶解メタノールの濃度を工夫することで、安定して 1.2~1.5 ng/mL の IC_{50} が得られるようになった。②の対処としては、Autoprep MF-A 多機能カラムを用いることで、ELISA 測定を妨害する物質を取り除くことができた。

表 1 に、今年度確立した ELISA を用いた玄米および小麦粉の添加回収試験と汚染試

料の測定結果を示した。添加回収試験では、玄米と小麦粉で 90% 以上の回収率が得られた。

(2) 4,15-DAS の ELISA

表 2 に 7 社の T-2 または T-2/HT-2 用の ELISA キットを用いて 4,15-DAS との交差性を検討したが、いずれのキットにおいても交差性は認められなかった。

D. 考察

ELISA 法は、一度に多検体を短時間で測定できること、特異抗体を用いることから対象物への特異性が高いことでマイコトキシン測定においてスクリーニングやモニタリングに活用されている。ELISA 法には、様々な種類あり、対象物質の分子量が大きい場合には直接法が用いられるが、マイコトキシンのような低分子を検出する場合には間接競合法および直接競合法が用いられることが多い。間接競合法は、プレートにマイコトキシン-キャリアたんぱく質のコンジュゲートを固相化して、対象物質に対する特異抗体を測定サンプルとマイコトキシン-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、マイコトキシン特異抗体の抗体サブクラスに対する抗体、例えば特異抗体がマウスモノクローナル IgG 抗体の場合であれば、ヤギ抗マウス IgG 抗体を特異抗体で反応しやすいように固相化したのち、測定サンプルと競合物質—酵素コンジュゲートを競合させる方法である。しかし間接競合法は多量のマイコトキシン-キャリアたんぱく質コンジュゲートが必要となりコスト的にも高くなる可能性がある。また工程数が多いため、不確実性も高くなる。そこで STC の ELISA としては、間接競合法より工程数の少ない直接競合 ELISA の開発を行った。

本研究で開発した STC 用 ELISA は、測定可能範囲は 0.1~10.0 ng/mL、 IC_{50} は 1.2 ng/mL であった。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 汚染玄米から検出が可能であり、5 つの自然汚染玄米 (いずれも 1–5 ng/g) において、LC-MS/MS の測定値と良い相関性が得られており、実用化に向けての可能性が示唆された。

本研究で開発した ELISA は、AF 特異抗体と AFB₂-HRP を競合物質として用いた方法であるため、AF が汚染している試料においては、本 ELISA で陽性と判定された場合、LC-MS/MS において AF の汚染と STC の汚染の両方を測定することとなる。しかし ELISA はスクリーニングの一環としてとらえれば、AF と STC の共汚染を測定できる ELISA として活用は広がる。現状、我々の実態調査からは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、この研究で確立した ELISA 法は国産玄米と小麦粉の ELISA としては適用できると考えられた。

特異抗体を利用する ELISA 法のメリットを利用して、グループ TDI として今後測定法の開発が必要な 4,15-DAS についてもその応用性を検討した。T-2、HT-2、4,15-DAS は、ともにタイプ A トリコテセン系マイコトキシンに属し、構造上、8 位に置換基がないか、水酸基またはエステル結合が存在しているもので類似性が高い。構造的に見て、T-2 と 4,15-DAS は 2 位から 7 位までの構造が同じであることから、この部位を認識している特異抗体であれば、4,15-DAS も認識することが考えられる。そこで現在市販されている T-2 の ELISA キットにおいて 4,15-DAS と交差性はあるか否かを検討した。現在日本で購入できる ELISA キットとして市販されている製品は、T-2 または T-2/HT-2 を対象としたものである。そこで、7 種の T-2 用 ELISA キットについて、4,15-DAS が測定できるかを検証した。しかし、7 種類すべてにおいて 4,15-DAS に対する交差性はほとんど認められなかったことから、これらのキットに含まれている抗体は、4,15-DAS と T-2 の共通する構造は認識しないことがわかった。これら

の結果から、市販の T-2 又は T-2/HT-2 用 ELISA キットを用いてグループ TDI に指定されている 3 種のマイコトキシンを同時に認識することはできないことがわかった。そして 3 つのカビ毒が共通する部位を認識する抗体を作成すれば、3 種検出 ELISA は可能であると考えられた。

E. 結論

本研究は、3 年間を通じて、2016 年 JECFA においてリスク評価された STC および 4,15-DAS を対象とした ELISA 法の確立を目標に行った。STC を対象とした ELISA の測定可能範囲は汚染実態に適したものであり、汚染試料の測定値も LC-MS/MS と相関性が取れていることから、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として確立することができた。一方、T-2、HT-2 トキシンのグループ PMTDI に組み入れられた 4,15-DAS の ELISA においては、現在市販品として購入できる T-2/HT-2 測定を対象にした ELISA キットを用いて 4,15-DAS の測定は出来ないことが明らかになり、3 種のタイプ A トリコテセン系マイコトキシンを同時に認識する ELISA の開発が今後必要になることが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

【論文発表】

1) Takashima, K., Nakajima, K., 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, 69-83.2021.

【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

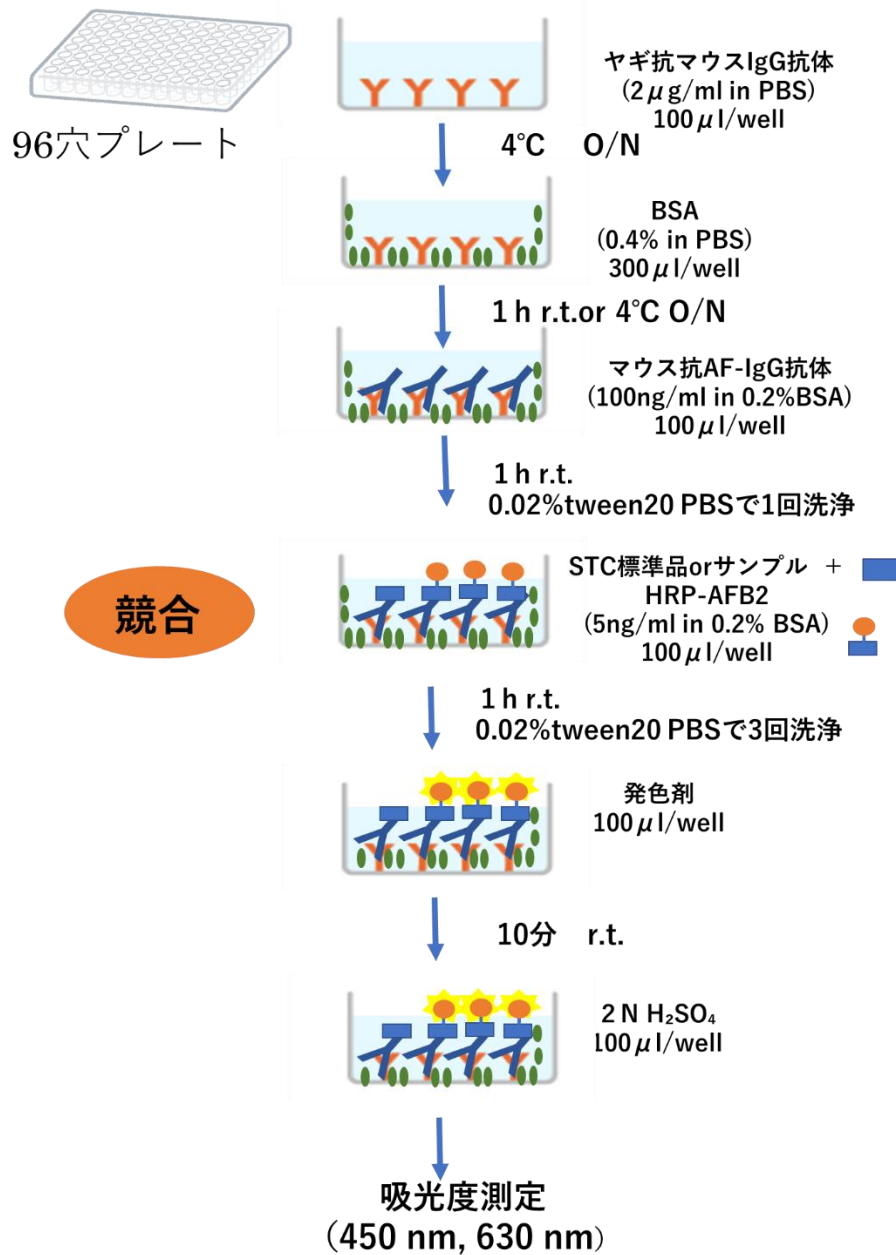


図1. プロトコール：ステリグマトシスチンの ELISA 法

STC ; ステリグマトシスチン、O/N ; 一昼夜、 r.t.;室温、HRP-AFB2 ; ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ

表 1. STC ELISA の性能評価結果

A) 玄米

添加回収試験	回収率 (% , n=6)	
STC 添加 2 ppb	114.5 ±25.8	
STC 添加 6 ppb	94.6±17.3	
STC 添加 20 ppb	121.2±11.6	
自然汚染検体	測定値	LC-MS/MS 測定値
検体①	1.40 ppb	1.34 ppb
検体②	1.08 ppb	1.25 ppb
検体③	6.92 ppb	5.67 ppb
検体④	1.46 ppb	1.17 ppb

B) 小麦粉

		回収率 (% , n=6)
STC 添加	2 ppb	117.9 ±11.1
STC 添加	6 ppb	96.0±7.5
STC 添加	20 ppb	91.5±3.9

表 2. 市販 T-2 toxin 用 ELISA キットにおける 4,15-DAS への交差性

製品名	製造元	交差性		
		T-2 toxin	HT-2 toxin	4,15-DAS
MAX Signal T-2 ELISA kit	PerkinElmer	○	×	×
T-2 Toxin ELISA Test kit	Meizheng Bio-Tech	○	×	×
AgraQuant T-2 Toxin ELISA test	Romer Labs	○	×	×
RIDASCREEN T-2 Toxin	R-Biopharm AG	○	×	×
RIDASCREEN T-2/HT-2 Toxin	R-Biopharm AG	○	○	×
Celer T2	Eurofins	○	△	×
Veratox for T-2/HT-2	NEOGEN	○	○	×