

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

オクラトキシン A の簡易分析法の検討  
研究分担者 服部 一夫 (東京農業大学)

研究要旨

国内外で販売されているオクラトキシン A (OTA) 測定用の ELISA キットを入手し、小麦、ライ麦及び大麦中の OTA のスクリーニングに使用可能なものがあるか評価を行った。日本国内の輸入代理店を通じて入手が可能であった 4 種の ELISA キットについて、添加回収試験による性能評価を実施した。その結果、A 社製キットでは、大麦における回収率が 111.0~439.0%、小麦における回収率が 35.0~69.0%、ライ麦における回収率が 21.0~52.0%であり、大麦における回収率が高く、小麦、ライ麦では低かった。B 社製キットでは、大麦における回収率が 39.1~45.2%、小麦における回収率が算出不能、ライ麦における回収率が 30.1~44.4%となり、小麦の回収率が測定できなかつたとともに大麦、ライ麦共に回収率が低かった。C 社製キットでは、大麦における回収率が 149.6~216.0%、小麦における回収率が 126.3~150.5%、ライ麦における回収率が 94.3~118.7%であり、大麦の回収率が高めの結果となったが、小麦とライ麦では良好であった。D 社製キットでは、大麦における回収率が 87.5~106.0%、小麦における回収率が 86.5~127.3%、ライ麦における回収率が 87.7~107.6%となり、大麦、小麦、ライ麦ともに良好な回収率が得られた。

以上の結果から、検討した 4 種の ELISA キットのうち、2 種が小麦中の OTA スクリーニングに適応性の高いキットであることが確認された。

研究協力者 小西良子 (東京農業大学)

## A. 研究目的

オクラトキシン A (OTA) は、麦類、種実類、豆類を汚染し、発がん性や腎毒性を有するカビ毒である。産生菌は、*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の両種である。

OTA は血清中タンパク質と結合し、体内に長時間残存することから、蓄積性のあるカビ毒として認識されている。また、畜産物への移行も報告されており、食品衛生的な対応が必要なカビ毒の 1 つである。国際的にはコーデックス規格が 1995 年に、小麦、大麦、ライ麦を対象に 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と定められている。諸外国では EU、韓国、中国などが様々な食品を対象に基準値を設定している。

日本では、2014 年に食品安全委員会から評価書が公表されており、非発がん毒性としての LOAEL は 8  $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$  であり、不確実係数 500 として TDI を 16  $\text{ng}/\text{kg bw}/\text{日}$  としている。一方発がん性の NOAEL は、ラットの 2 年間発がん試験の結果から 15  $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$  と評価し、不確実係数 1000 として TDI を 15  $\text{ng}/\text{kg bw}/\text{day}$  とした。JECFA では 100  $\text{ng}/\text{kg bw}$  を 1 週間の PTWI を設定している。EFSA では、ラットにおいて OTA が腎臓がんを発生させた濃度に基づき、BMDL<sub>10</sub> 14.5  $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$  が提唱された。

食品安全委員会の評価を受けて 2014 年に開催された厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において、OTA の基準値設定の議論がなされ、コーデックス委員会でも基準が定められている小麦等について、当該規格に準じて基準値を検討することが了承されている。そのため、OTA の効率的な検査のためのスクリーニング法の検討を実施し、公定法として採用可能かを判断する基礎的なデータを得ることを目的に本研究を行った。

## B. 研究方法

### (1) 材料

### ①麦類

LC-MS/MS で測定した結果、OTA が検出されなかった小麦、ライ麦および大麦を研究代表者から供与された。これらを添加回収試験に用いた。

### ②ELISA キット

Neogen Veratox (Neogen 社製)、Agra Quant (Romar 社製)、Meizheng OTA (Meizheng 社製)、RIDA screen (R-Biopharm 社製) の 4 種の ELISA キットを用いた。なお、キット名については A、B、C、D 社製と以降は記載する。

### (2) 麦類を用いた添加回収試験

市販の OTA 粉末をアセトニトリルに溶解し、標準品原液 (1  $\text{mg}/\text{L}$ ) を調製した。OTA 非汚染麦類を 5 g 量りとり、原液をそれぞれ 10  $\mu\text{L}$  (最終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、25  $\mu\text{L}$  (最終濃度 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、50  $\mu\text{L}$  (最終濃度 10  $\text{ng}/\text{g}$ ) 添加し、1 昼夜静置したものを添加試料とした。陰性対象としてアセトニトリル 50  $\mu\text{L}$  (最終濃度 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を添加した試料を用いた。その後の抽出工程は、それぞれのキットのプロトコールに従って行った (表 1)。

### (3) 抽出操作

A 社製キットと B 社製キットは、抽出液として 70%メタノールを、C 社製キットでは 60%メタノールをそれぞれ用いた。D 社製キットでは、専用抽出液が付属しており、組成は不明であった。また、A 社製キットと B 社製キットは、抽出液をそのまま ELISA に供したが、C 社製キットと D 社製キットは、試料希釈液で希釈してから ELISA に供した。

### (4) ELISA 測定

それぞれのキットのプロトコールに従って得られた抽出液を、それぞれのキットの手順書に従って ELISA 測定を行った (表 2)。

## (5) 統計処理

ELISA の測定値からの標準曲線の作成と抽出液中の OTA の濃度の計算は、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) ELISA の所要時間

それぞれの ELISA キットの所要時間は、測定者の手技による影響も大きいので、各工程の反応時間+15 分程度として算出した。A 社製キットでは 25-40 分、B 社製キットでは 15-30 分、C 社製キット OTA では 46-60 分、D 社製キットでは 46-60 分であった。

### (2) 標準曲線

図 1 に、それぞれのキットに付帯している標準品を用いて作成した標準曲線を示した。各キットの測定範囲は、各キットのプロトコールによると、A 社製キットは 5-50 ppb、B 社製キットは 2-40 ppb、C 社製キットと D 社製キットの検出限界はそれぞれ 0.05 ppb および 1.25 ppb であった。

### (3) 添加回収試験

大麦、小麦、ライ麦それぞれの回収率を示した (図 2)。

#### ①大麦

A 社製キットでは、2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の濃度を添加した検体において著しく高い回収率が得られた。B 社製キットでは、2、5、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の添加検体でいずれも 50%程度の回収率であった。C 社製キットでは、いずれの添加検体においても回収率は 100~200%の範囲内であった。D 社製キットでは、いずれの添加検体においても回収率は 100%程度であった。

#### ②小麦

A 社製キットではいずれの添加検体においても回収率は 100%未満であった。B 社製キットでは、非特異的な発色が見られ、計測不能であった。C 社製キットでは、すべての添加検体で回収率は 100%~150%の範囲内であった。ELISA などの簡便迅速法では許容範囲と考えられた。D 社製キットでは、5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の添加検体で回収率は 130%であったが、2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  および 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の添加検体では 85%以上の回収率が認められた。

#### ③ライ麦

A 社製キットおよび B 社製キットでは 60%以下の回収率であったが、C 社製キットおよび D 社製キットでは、100%近い回収率が得られた。

### (4) キットによる回収率の違い

4種のキットそれぞれの回収率をまとめた結果を図 3 に示した。

#### ①A 社製キット

大麦における回収率は 111~439%、小麦における回収率は 35~69%、ライ麦における回収率は 21~52%であった。大麦での回収率が高い値とあったが、濃度依存性は認められなかった。小麦とライ麦における回収率は低い傾向にあった。

#### ②B 社製キット

大麦における回収率は 39.1~45.2%、小麦における回収率は測定値が検量線の下限を下回ったため算出不能、ライ麦における回収率は 30.1~44.4%であった。いずれの検体においても回収率は低い傾向であった。

#### ③C 社製キット

大麦における回収率は 149.6~216.0%、小麦における回収率は 126.3~150.5%、ライ麦における回収率は 94.3~118.7%であった。

#### ④D 社製キット

大麦における回収率は 87.5~106.0%、小麦における回収率は 86.5~127.3%、ライ麦における

回収率は 87.7~107.6%となった。

#### D. 考察

ELISA は、迅速性、簡易性、効率性からみて、現在スクリーニングとして使用される方法として一般的である。すでに日本でもアフラトキシンおよびデオキシニバレノールのスクリーニング法に使われており、妥当性も検証されている。

本分担研究では、OTA を対象にして、現時点において日本で入手可能な市販 ELISA キットを用いて、その適応性を検討した。そのために、OTA 非汚染大麦、小麦、ライ麦を用いた添加回収試験を行い、回収率を評価した。各キットの分析時間については、いずれも 60 分以内であり、迅速性があると考えられた。

定性的なスクリーニングのために使用する簡便迅速法では、cut off 値による判定の妥当性が重要であると考えられる。あるレベル以上の濃度で汚染している検体を迅速に選別し、疑わしい検体に対しては理化学的手法で定量するというプロセスが、検査の効率化を実現する。総アフラトキシン（規制値 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）の公定法においては、ELISA の cut off 値は 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と設定されている。

OTA の場合、日本がコーデックス規格と同じ基準値を設定した場合、5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  となるため、cut off 値は 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  となると想定される。そこで 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の回収率を穀類ごと、メーカーごとに見た。なお、ELISA キットの回収率の性能基準としては、令和 3 年 9 月 30 日付け生食発 0930 第 2 号「小麦中のデオキシニバレノール試験法について」において、60~140%の範囲内であることが示されていることから、その値を参考とした。A 社製キットについては、大麦の 2 及び 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  添加検体で 140%を超え、小麦の 5 及び 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  添加検体とライ麦の全検体で 60%を下回ったことから、スクリーニングには適さないと考えられた。B 社製キットについては、3 種

類の麦の全検体で回収率が 60%を下回ったので、適さないと考えられた。C 社製キットでは、大麦の全検体で回収率は 140%を上回ったが、小麦とライ麦では性能基準の範囲内であった。D 社製キットでは、3 種の麦類の全検体において回収率は性能基準の範囲内であり、想定 cut off 値で安定した測定が可能と考えられた。

次に、回収率が良好でなかったキットに関してその原因を考察した。表 3 に 4 つのキットのプロトコールをそれぞれ示した。A 社製キットおよび B 社製キットに共通して、メタノールで抽出後希釈の工程がなかった。そのため、麦類の夾雑物が ELISA 反応に影響を与えた可能性が示唆された。また、コンジュゲートを入れた後で白濁したことから、ミセルができることで正しい抗原抗体反応ができなかった可能性が考えられた。

#### E. 結論

現時点において日本で入手できる市販 ELISA キットを用いて、大麦、小麦、ライ麦を用いた添加回収試験を行い、その適応性を検討した。その結果、D 社製キットの回収率が参考とした性能基準の範囲内であり、3 種類の麦への高い適応性が示された。C 社製キットでは、大麦には適応しなかったが、小麦、ライ麦には適応する可能性が示された。今後は、品種の違いによる影響等を検討する必要がある。さらに自然汚染麦類を用いて、LC-MS/MS による分析値との相関性を明らかにして、適応性の高い ELISA キットに関しては、妥当性の評価を行い、スクリーニングテストに取り入れることが可能かを明らかにしていく必要がある。

#### F. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. Uchiyama Y, Yamazaki D, Kobayashi N, Kanda Y, Sugita-Konishi Y.

Electrophysiological effect of citreoviridin on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2022;63:210-217.

2. Su J, Zhu B, Inoue A, Oyama H, Morita I, Dong J, Yasuda T, Sugita-Konishi Y, Kitaguchi T, Kobayashi N, Miyake S, Ueda H. The Patrol Yeast: A new biosensor armed with antibody-receptor chimera detecting a range

of toxic substances associated with food poisoning. *Biosens Bioelectron* 2022;219:114793.

(2) 学会発表  
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表 1 各 ELISA キットの抽出条件と抽出方法

	A社製キット	B社製キット	C社製キット	D社製キット
抽出方法	<p>5 g添加試料に70%メタノール溶液20 mLを加える</p> <p>①激しくshake×5 min</p> <p>②遠心分離機3500 rpm×5 min</p> <p>③100 <math>\mu</math>Lを使用</p> <p>★ライ麦のみ50%メタノール溶液を使用</p>	<p>5 g添加試料に70%メタノール溶液25 mLを加える</p> <p>①激しくshake×3 min</p> <p>②遠心分離機3500 rpm×5 min</p> <p>③100 <math>\mu</math>Lを使用</p>	<p>5 g添加試料に60%メタノール溶液25 mLを加える</p> <p>①激しくshake×10 min</p> <p>②遠心分離機3500 rpm×5 min</p> <p>③上澄み液200 <math>\mu</math>lに試料希釈buffer 600 <math>\mu</math>L加えVortex× 5 sec</p> <p>④50 <math>\mu</math>Lを使用</p>	<p>5 g添加試料に専用抽出液25 mLを加える</p> <p>①Vortex 10 sec</p> <p>②激しくshake 5 min</p> <p>③遠心分離機3500 rpm×5 min</p> <p>④上澄み液1 mLに試料希釈buffer 1 mL加える</p> <p>⑤50 <math>\mu</math>Lを使用</p> <p>★ライ麦のみ2.5g添加試料に専用抽出液25 mLを加え、後は同上。</p>

表2 各 ELISA キットのプロトコール

	A社製キット	B社製キット	C社製キット	D社製キット
ELISA	<p>①サンプルとSTD各2個ずつ分の希釈wellと抗体固定wellをフォルダーに置く</p> <p>②Conjugate液100 μLを希釈wellに加える</p> <p>③サンプル、STD 100 μLを希釈wellに加える</p> <p>④ピペットで3回攪拌後、抗体wellに100 μL加える</p> <p>⑤10 min 室温で incubate</p> <p>⑥蒸留水で5回洗浄し水分除去</p> <p>⑦Substrate液100 μLを加える</p> <p>⑧10 min incubate</p> <p>⑨Stop液100 μL加える</p> <p>⑩650 nmで 20 min以内に測定</p>	<p>①サンプルとSTD各2個ずつ分の希釈wellと抗体固定wellをフォルダーに置く</p> <p>②Conjugate液200 μLを希釈wellに加える</p> <p>③サンプル、STD 100 μLを希釈wellに加える</p> <p>④ピペットで3回攪拌後、抗体wellに100 μL加える</p> <p>⑤10 min 室温でincubate</p> <p>⑥蒸留水で5回洗浄し水分除去</p> <p>⑦Substrate液100 μLを加える</p> <p>⑧5 min 室温で incubate</p> <p>⑨Stop液100 μL加える</p> <p>⑩450 nm/630 nmで10 min以内に測定</p>	<p>①サンプルとSTD各2個ずつ分のwellをフォルダーに置く</p> <p>②各サンプルとSTD 50 μLずつを各wellに加える</p> <p>③抗体液50 μLを加え 1 min攪拌</p> <p>④15 min遮光・室温でincubate</p> <p>⑤250 μL専用洗浄液で4回洗浄後、水分除去</p> <p>⑥Enzyme Conjugate液100 μLをwellに加える</p> <p>⑦15 min遮光・室温でincubate</p> <p>⑧250 μL専用洗浄液で4回洗浄後、水分除去</p> <p>⑨Substrate A 50 μL加えた後 Substrate B 50 μL加え、1 minやさしく攪拌</p> <p>⑩15 min 遮光・室温でincubate</p> <p>⑪Stop液 50 μLを加え攪拌する</p> <p>⑫450 nm/630 nmで5 min以内に測定</p>	<p>①サンプルとSTD各2個ずつ分のwellをフォルダーに置く</p> <p>②各サンプルとSTD 50 μLずつをwellに各加える</p> <p>③Conjugate液50 μLを加えやさしく攪拌する</p> <p>④30 min遮光・室温でincubate</p> <p>⑤250 μL専用洗浄液で2回洗浄後、水分除去</p> <p>⑥Substrate液100 μLを加えやさしく攪拌する</p> <p>⑦15min 遮光・室温でincubate</p> <p>⑧Stop液 100 μLを加え攪拌する</p> <p>⑨450 nm/630 nmで15 min以内に測定</p>

表3 各 ELISA キットのサンプル調製法の比較

	A社製キット	B社製キット	C社製キット	D社製キット
抽出条件	70%メタノール (ライ麦: 50%メタノール)  5 g試料に20 mL抽出溶媒	70%メタノール  5 g試料に25 mL抽出溶媒	60%メタノール  5 g試料に25 mL抽出溶媒	専用抽出溶液 (ECO extractor)  5 g試料に25 mL抽出溶媒 (ライ麦:2.5 g試料に25 mL抽出)
抽出方法	shake 15 min 遠心分離 3500 rpm × 5 min	shake 5 min 遠心分離 3500 rpm × 5 min	shake 10 min 遠心分離 3500 rpm × 5 min	vortex 10 sec shake 5 min 遠心分離 3500 rpm × 5 min
希釈	なし	なし	専用bufferで4倍希釈 少し白濁	専用bufferで2倍希釈 少し白濁
希釈率	4倍	5倍	20倍	10倍(ライ麦のみ20倍)
抽出液	黄色(ライ麦 > 小麦) 白濁(大麦)	黄色(ライ麦 > 小麦) 白濁(大麦)	黄色(ライ麦 > 小麦) 白濁(大麦)	少し茶色
注意点	Conjugate液をいれると白濁	Conjugate液をいれると白濁	抗体液を入れても変化なし	Conjugate液を入れても変化なし

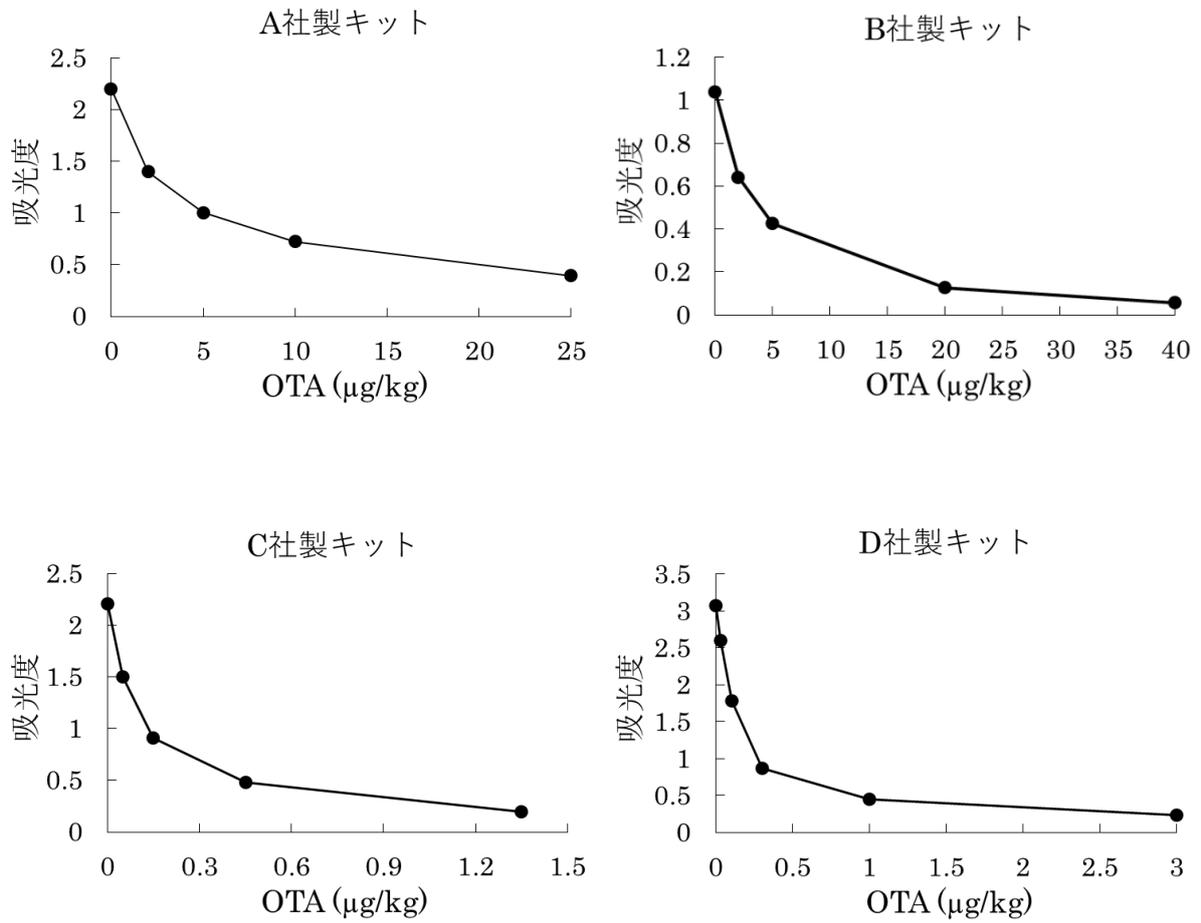


図 1. 各 ELISA キットにおける標準曲線

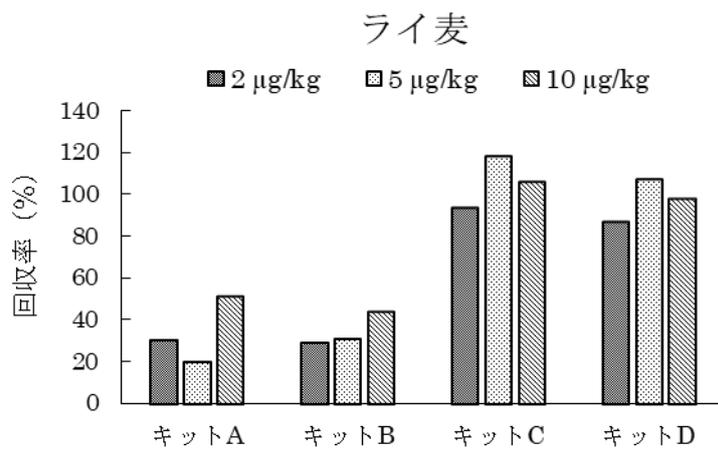
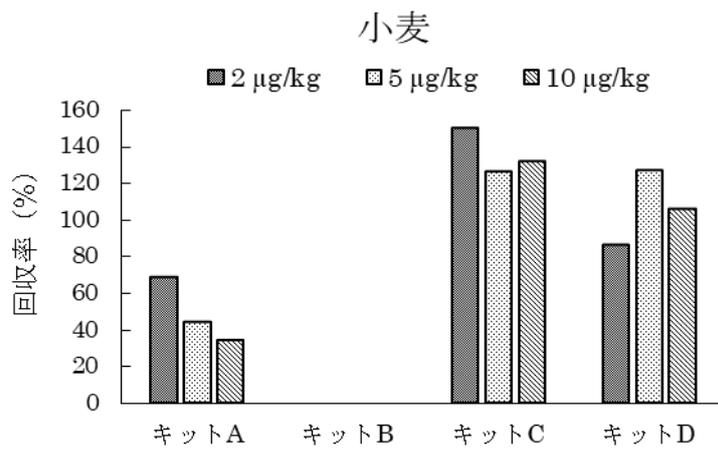
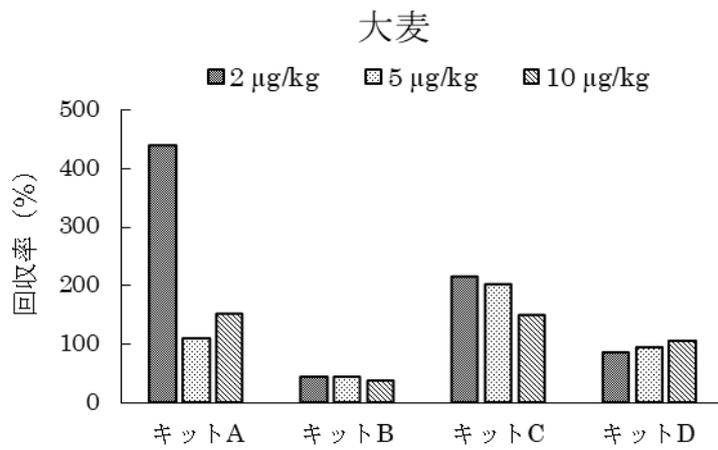


図2 各麦における回収率

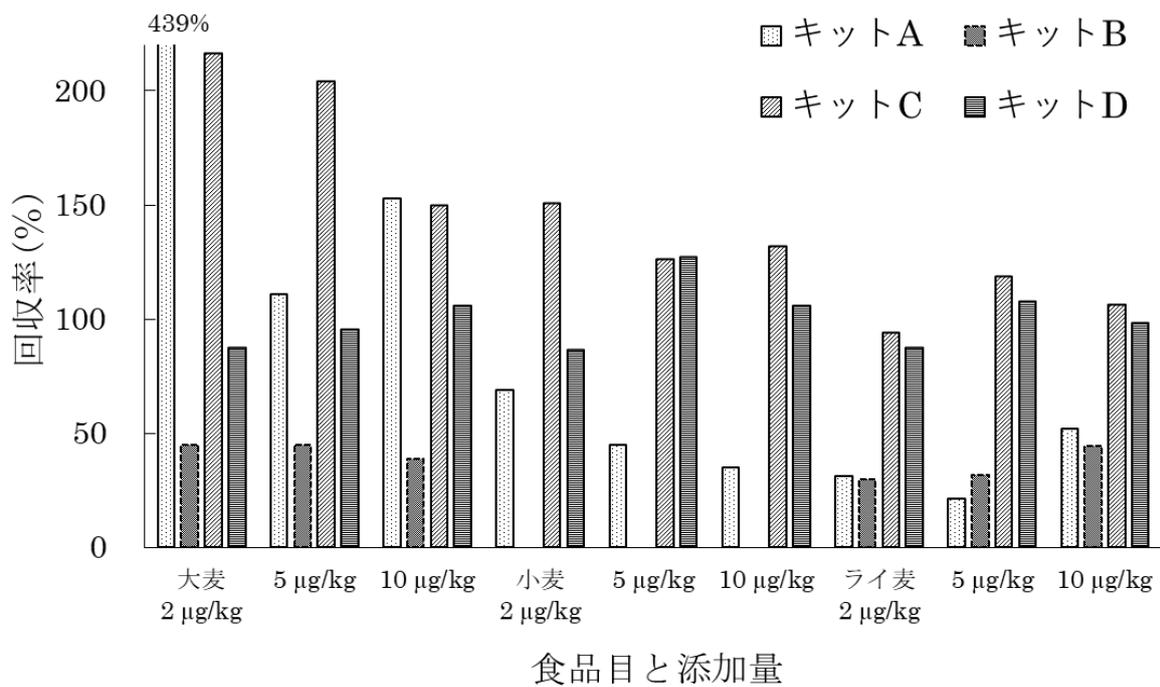


図 3. 各 ELISA キットにおける回収率