

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

本研究事業では 国内で販売されているオクラトキシン A (OTA) 測定用のラテラルフローキットを入手し、小麦、ライ麦及び大麦中の OTA のスクリーニングに適しているかの評価を行った。現在日本国内で市販されているキットは A: Rosa Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社)、B: Ochra-Vertu TOUCH (Vicam 社)、C: OTA Lateral Flow Assay Kit (Elabscience 社)、D: QuickScan (EnviroLogix 社)、E: Rapid Test Kit (Meizheng 社)、F: AuroFlow AQ Ochratoxin A Strip Test Kit (PerkinElmer 社) の 6 種であり、これらの性能を添加回収実験 (0, 3, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で検討した。測定は、それぞれのキットのプロトコールに沿って行った。

定量的ラテラルフローキットの回収率は小麦では、A キット 133.3~151.3%、B キット 34.3~73.3%、D キット 76.0~126.7%、E キット 103.3-112.1%、F キット 72.7-171.1%であった。大麦では A キット 130.7~142.2%、B キット 35.6~57.3%、D キット測定不可、E キット 84.3-92.2%、F キット 47.0-118.9%であった。ライ麦では、A キット 112.3~149.3%、B、D、F キットは測定不可、E キット 57.8-86.4%であった。C キットは定性的キットであることから回収率は算出できないが、OTA が 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上含有しているかの有無で判定した場合、小麦、大麦、ライ麦すべてで 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下の含有では陰性、以上の含有では陽性であった。

これらの結果から、小麦を対象にした場合はおおむね試験に供したキットで測定が可能であったが、大麦では 1 キット、ライ麦では 3 キットが測定できないことが明らかになった。この理由としては、測定液の粘性が大きく影響していたことから、ラテラルフローに適する穀類は限られていることが考えられた。今回評価したキットのうち、定量的ラテラルフローでは 2 キット、cut off 値付近の信頼性に問題があるものの定性的ラテラルフローでは 1 キットが小麦、大麦の OTA を測定できる可能性が示された。しかし 1 検体ずつ測定する必要があること、装置などが高価であることから多検体処理を必要とするスクリーニングには適当でないと考えられた。

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、*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の両種で産生され、発がん性や腎毒性を有するカビ毒である。また、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毒性学的にも重要なハザードである。汚染は麦類、種実類、豆類などにみられるが、飼料として摂取された後、畜産物へ移行することから、食品衛生的な対応が必要である。国際的にはコーデックス規格が 1995 年に、小麦、大麦、ライ麦を対象にそれぞれ 5 µg/kg と定められた。

わが国でもコーデックスの規格設定を受けて OTA の規格基準について、食品安全委員会で評価がなされ、令和 5 年 12 月 11 日に開催された薬事・食品衛生審議会（食品衛生分科会食品規格部会）で基準値が設定された。コーデックスに準じて小麦、大麦、ライ麦を規制の対象にするか、米や嗜好品にまで範囲を広げるかについては、わが国における小麦・大麦・ライ麦および小麦・大麦・ライ麦以外の食品からの OTA 経口ばく露状況（インスタントコーヒー、香辛料、ココア、コーヒー豆、そば（乾麺）、チョコレート、ドライフルーツ、ビール、ワインを対象）から判断され、¹⁾ 「小麦及び大麦については、本汚染実態調査による通常年の OTA 経口摂取の推定値が TDI より低かったが、高濃度汚染の発生可能性を考慮した際の健康被害の未然の防止及び国際整合の観点から、基準値をそれぞれ 5 µg/kg と設定することが適当である。なお、ライ麦について、消費量割合は麦類全体で 0.3 % であり、実態調査における OTA の濃度分布もライ麦の方が小麦より低い傾向にあることから、小麦に比べて OTA 摂取量に対する寄与度は極めて低いと考えられる」との結論に至った。この結果を受けて、小麦、大麦、ライ麦を対象にスクリーニングとして使われる簡便迅速試験法の

評価が必要とされたため、本研究では、市販のラテラルフロー測定キットの評価を行った。

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玄麦、殻なしライ麦および、殻なし大麦の粉碎物を吉成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。

②ラテラルフロー キット

Rosa Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社)、Ochra-Vertu TOUCH (Vicam 社)、OTA Lateral Flow Assay Kit (Elabscience 社)、QuickScan (EnviroLogix 社)、Rapid Test Kit (Meizheng 社)、AuroFlow AQ Ochratoxin A Strip Test Kit (PerkinElmer 社) の 6 社 6 種類のキットを用いた。

(2) 麦類を用いた添加回収実験

添加回収試験は OTA 原液（アセトニトリル溶液 1 mg/L）を調製して行った。OTA 非汚染麦類を 2 g から 10 g 秤量し、原液を最終濃度 3 µg/kg、5 µg/kg、10 µg/kg になるように添加し、1 昼夜静置して、それぞれの試料とした。陰性対象としてアセトニトリルを、それぞれのキットに添加する OTA 原液と同じ液量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。

(3) 抽出操作

①Rosa Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社) では 70%メタノールを試料 10 g に対して 20 mL の割合で加え約 2 分間振とうした後、遠心操作を行い上清 100 µL と 1.0 mL の OCHRAQ dilution buffer を混和したものをサンプルとし、ストリップに供した。

②Ochra-Vertu TOUCH (Vicam 社) は、専用のカップに試料 5 g に対して同社から販売されているアクアプレミックスを 25 mL 加え、バートウー

PREP ミキサーにセットして30秒間振とうし、V フィルターカップにてろ過したものをサンプルとし、ストリップに供した。

③OTA Lateral Flow Assay Kit (Elabscience社) では、15 mL容遠心管に2 g秤量した試料を入れ、3 mLのメタノールを加え3分振とうした後、遠心し、上清1 mLを異なる遠心管に入れ窒素乾固した。添付のreconstitution buffer 0.3 mLで30秒溶解した。次に120 μ Lをとり、金コロイド標識マイクロウエルにいれ2分間反応させた。泡立っていないようにクリアな液になるように混合した。2分後に金コロイド標識マイクロウエルのすべての液をストリップのサンプルウエルに入れて、5-8分間反応をさせた。

④QuickScan (EnviroLogix 社) では、破砕した試料10 gに試料の5倍量の添付の抽出用bufferを加え、手振りして30秒振とうした後、一部をマイクロチューブにとり2000 x gで3分間遠心分離を行った。反応容器に添付のDB bufferを50 μ Lを分取し、遠心した上清を200 μ L加えたのち、色が均一になるまで混合しサンプルとしストリップに供した。

⑤Rapid Test Kit (Meizheng社) では、破砕した試料5.0 gを50 mL容の遠心チューブに入れ、50%メタノールを20 mL加え、ボルテックスで1分間振とうした後、4000 x gで3分間遠心分離して、上清100 μ Lに対して添付の試料希釈溶液300 μ Lを加えよく混合したものをサンプルとし、ストリップに供した。

⑥AuroFlow AQ Ochratoxin A Strip Test Kit (PerkinElmer社) では、添付の抽出バックに破砕試料10 gを入れ、添付のAQパウダーパック1包を加えた。その後蒸留水37 mLを加え、1分30秒間激しく振とうした。添付のフィルターを漏斗にセットし、10 mLの抽出液を負荷し、2-3 mLのろ過液が得られたらこれをサンプルとし、ストリップに供した。

(4) 測定

定量的ラテラルフローの場合、キャリブレーションも含めて測定に使用する測定器は専用のものを使う必要がある。キットにより、キャリブレーションの方法は異なるが、QR コードなどで読み込むものや、専用機器にあらかじめ搭載されている機器など、様々である。測定値の精度を担保するには、キャリブレーションが正確にできることが必須条件となるが、各社で提供しているキャリブレーションのデータはそれぞれ独自で開発されたものであり、日本で流通している小麦、大麦、ライ麦に対して作られたものではない。品種によってキャリブレーションが使えるかどうか不明なこともあるが、今回の測定値は、各キットが推奨するキャリブレーションを行った場合の回収率とした。

C. 研究結果

本研究で対象にしたキットには定量的キットと定性的キットの2種類がある。回収率は定量することで算出されることから、定量キットでは回収率で評価した。

(1) 食品目ごとの回収率 (定量的ラテラルフローキット)

大麦、小麦、ライ麦ごとの回収率を示した(図1)。

①小麦

Dキットでは、OTA 3 μ g/kg 添加サンプルにおいて定量限界以下となったが、その他のキットでは使用したOTA濃度において、検出は可能であった。Aキットの回収率は3、5、10 μ g/kgで100%以上であった。

Bキットの回収率は、OTA 10 μ g/kg濃度で73%であったが、それ以外の濃度では50%以下であった。Dキットでは、5、10 μ g/kgでは70%以上の回収率を示した。Eキットは3、5、10 μ g/kgのすべての濃度で100%に近い良好な回収率であった。Fキットでは低濃度では回収率は高く

なり、高濃度では低くなる傾向が見られたが、すべての濃度で70%以上であった。

定性的ラテラルフローキットであるCキットでは、3 µg/kgでは陰性、5、10 µg/kgで陽性となった(図2)。

②大麦

大麦に対応できる定量的キットはA、B、E、Fの4キットであった。Dキットでは、サンプル液の粘性が強かったため、サンプルがキット内のろ紙上で展開できなかった。Aキットは小麦と同じくすべての濃度で100%以上の回収率であった。Bキットでは検出はできたが、回収率はすべての濃度で70%以下であった。Eキットでは3 µg/kg濃度では3回測定したうち1回だけ回収率が70%以上であったが、2回は検出限界以下となった。5、10 µg/kg濃度では70%以上の回収率であった。Fキットは3、5 µg/kgで70%以上の回収率であったが、10 µg/kgでは50%に満たなかった。

定性的ラテラルフローキットであるCキットでは3 µg/kg以下は陰性、5、10 µg/kgでは陽性となった(図2)。

③ライ麦

定量的キットでは、AキットとEキットしか適応できなかった。Aキットは3濃度とも100%以上の回収率であった。Eキットは3 µg/kg濃度では検出限界以下となり、5 µg/kgでは回収率が70%以下であったが、10 µg/kgでは70%以上であった。

定性ラテラルフローキットであるCキットでは3 µg/kg以下は陰性、5、10 µg/kgでは陽性となった(図2)。

(2) 各社のラテラルフロー測定に関する所見(表1)

①Aキット

本キットは測定範囲0~30 µg/kg、検出限界は2 µg/kg、対象試料は小麦、大麦、ライ麦など、測定時間は35分程度であった。専用のリーダー

が必要で、そのキャリブレーションは測定前に毎回行うが、煩雑で時間がかかった(30~50分程)。また、同じサンプルを異なる日に測定すると多少測定値が変動した。

有効な反応(Valid

Test)はControlのLineが確実に確認された場合であり、されない場合やあいまいな場合は無効(Invalid Test)となる。

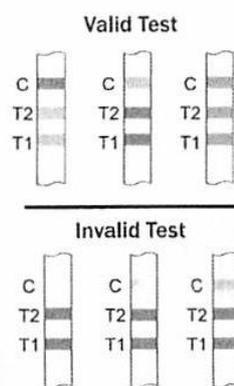
②Bキット

本キットは測定範囲0~30 µg/kg、検出限界は2 µg/kg、対象試料はコーン、大麦、小麦などである。測定時間は35分程度であった。測定には専用チューブ、ミキサーおよび測定機器が必要である。特筆すべきことは、ライ麦抽出液の粘性が高いのでストリップの展開が遅いため測定不可であること、およびVICAM専用チューブを使用しないといけないため、多検体ある場合はそのチューブの数量により制限がかかり洗浄時間が余分にかかった。キャリブレーションはキットに付属しているQRコードを読み込んで行うが、ライ麦のキャリブレーションコードはまだなかったため、小麦のキャリブレーションコードで行った。全体的に低い回収率である理由は、キャリブレーションが測定した麦類に合致していないことが考えられた。

③Cキット

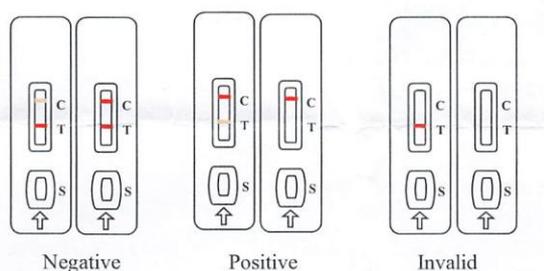
本キットは定性分析キットであり、専用機器の必要はなく、目視で判定を行なえる。

測定範囲は明記がなかった。検出限界は5 µg/kgであり、対象試料はコーン、大麦、小麦などで、測定時間は約40分を要した。定性分析のため、判定はControlのLineが必ず検出され、



抗体との競合反応であるので T の Line が検出されないもしくは薄くなる場合が陽性となる。

特筆すべきことは、窒素ガス乾固に 10~15



分くらい時間がかかるので、1 検体の所要時間が長くかかったこと、展開液（金コロイド粒子）の反応を待つ時間が細かく指定されているのでサンプル数が多いと煩雑になることである。

④D キット

本キットの測定範囲は 1.5~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、検出限界は 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、対象試料はコーン、小麦などが測定可能である。測定時間は 30 分程度であった。判定には専用の機器が必要である。

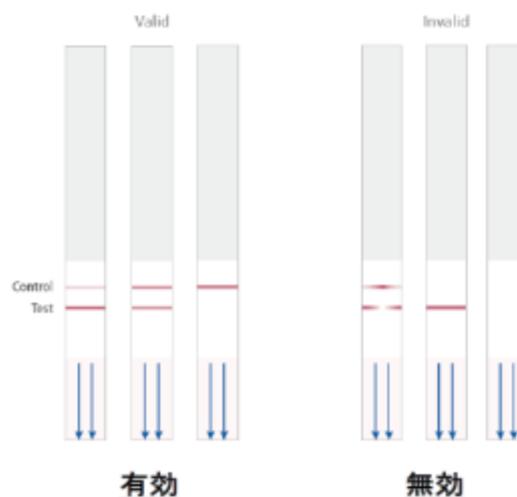
判定は、Control とサンプルの 2 本の Line が確認された場合、定量が可能となる。特筆すべきことは、大麦・ライ麦ともにストリップの展開が遅く、測定不可であった。

⑤E キット

本キットの測定範囲は 0~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、検出限界は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、対象試料は穀類（飼料）であり、測定にかかる時間は 30~35 分程度であった。専用のインキュベーターと測定機器が必要である。キャリブレーションは専用のバーコードを読み込ませて行う。特筆すべきことは、ストリップをサンプル添加前と後にインキュベートする必要があり、流れ作業ではできないため、多検体の測定は困難と考えられた。ライ麦はサンプル液に混濁が認められたため、2 回遠心分離操作を行った。

⑥F キット

本キットの測定範囲は 2~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、検出限界は 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、対象試料は小麦であり、測定にかかる時間は 20 分程度であった。判定は Control の Line が目視で確認されるものを、専用の測定機器に入れ Line の濃淡から濃度を計算する。Control の Line の一部が欠けた場合や検出しない場合は無効となる。



D. 考察

表 2 に本研究で扱った 6 種類のラテラルフローキットについての測定結果を示した。小麦、大麦、ライ麦において測定が可能だったのは A キットと C キットのみであった。OTA 検出用のラテラルフローキットが対象としている食品（飼料）は、コーン、穀類、小麦、大麦であり、ライ麦も測定できると明記しているのは A キットのみであった。

そこで、日本で基準値設定が行われる小麦と大麦を対象を絞ると、適応可能なキットは A、B 及び C キットの 3 種類となった。E キットは大麦に OTA を 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加したとき擬陰性が出る可能性があったため、△になっているが、ほかの条件では良好な回収率が得られていた。

スクリーニングテストとして使用する簡便迅速法では、分析値の正確さよりも、cut off 値が重要である。ある程度以上汚染している検体を迅速に検出できることがもっとも求められる。

OTA の場合、日本は 5 µg/kg と設定されたことから、cut off 値は 2 µg/kg ~2.5 µg/kg 程度が適当である。この観点から A, B 及び C キットの 3 種類を見てみると、A, B キットはともに検出限界が 2 µg/kg、C キットは検出限界が 5 µg/kg であった。そこで、この 3 種について考察していく。

A キットは定量キットであり、回収率は本評価に使用した濃度で 100% 以上であり、やや高い傾向にあった。OTA 無添加のサンプル液でも小麦では 1.0-1.8 µg/kg、大麦では 3 検体のうち 1 検体で 1.3 µg/kg を示す値が検出されたが、いずれも検出限界以下であったことから、スクリーニングとして用いる場合には 2 µg/kg ~2.5 µg/kg を cut off 値と設定すれば使用できると考えられた。但し、キットの単価が他のキットの 3 倍ほどするため、費用対効果は低くなる。

B キットは定量キットである。ライ麦の OTA は測定できなかった。小麦、大麦の回収率は低かったが、測定は可能であった。今回はキットに付属しているキャリブレーションプログラムを使用しているが、このキャリブレーションは測定値に大きく影響を及ぼすことから、わが国で使用を検討する場合に、わが国の流通麦に合ったキャリブレーションをメーカーに作成してもらう必要がある。キット単価としては他のキットと同等であった。

C キットは検出限界 5 µg/kg の定性キットであるが、小麦、大麦及びライ麦において 5 µg/kg 添加以上では陽性、3 µg/kg では陰性であった。擬陽性は確認されず高価な機器も必要としないため、迅速簡便法としては適していると評価できるが、cut off 値から考えると本研究の目的に使用するには難しいと思われた。

いずれのキットも前処理に時間を要するため、多検体のスクリーニングには適さないことから、

生産現場や原料チェックなどに用いる方法として有用と考える。

E. 結論

現時点において日本で手に入る市販ラテラルフローキットを用いて、OTA 非汚染大麦、小麦、ライ麦を用いた添加回収試験を行い、その適応性の評価を行った。

6 種類のキットを検討した結果、小麦および大麦に使用できるキットでかつ回収率が 70% 以上のものは 1 種類のみであった。しかしその 1 種類もコストがかかりすぎる短所がある。すなわち現時点ではスクリーニングにラテラルフローキットを用いることは現実的ではないと考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

参考文献

- 1) 薬事・食品衛生審議会（食品衛生分科会食品規格部会）資料
https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/000019545_9_00006.html. 2024 年 3 月 26 日現在

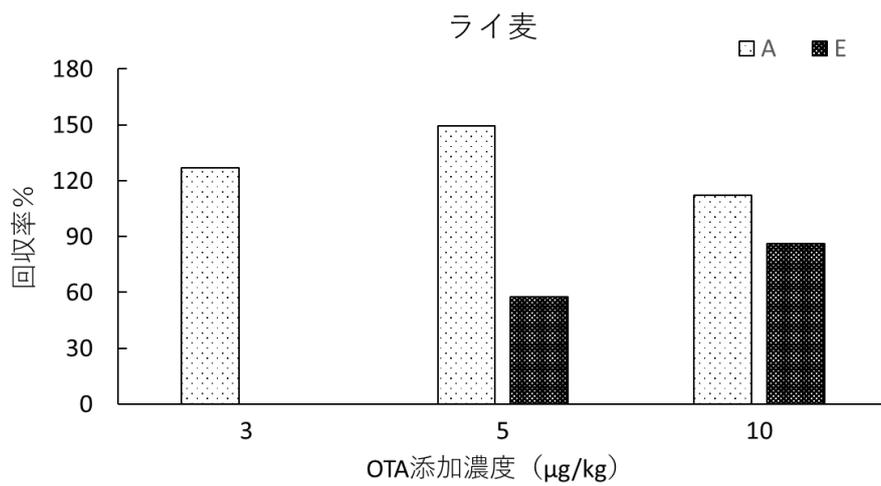
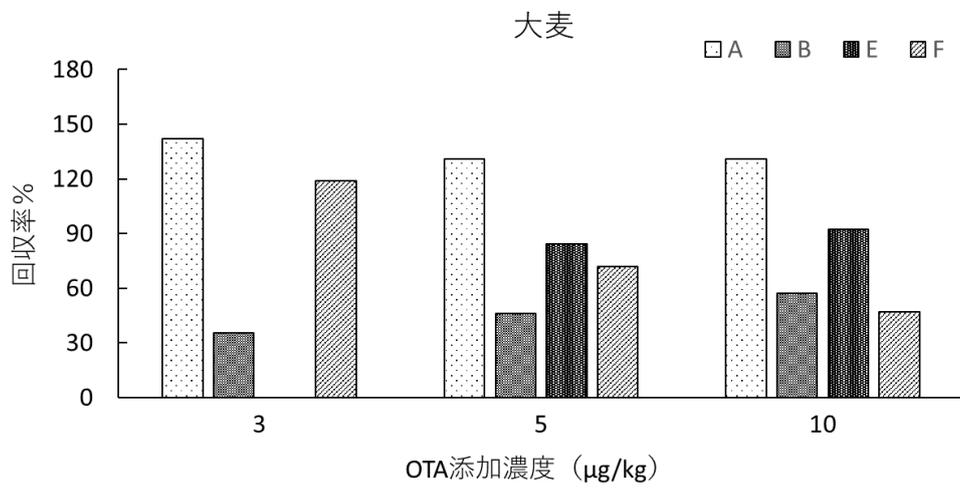
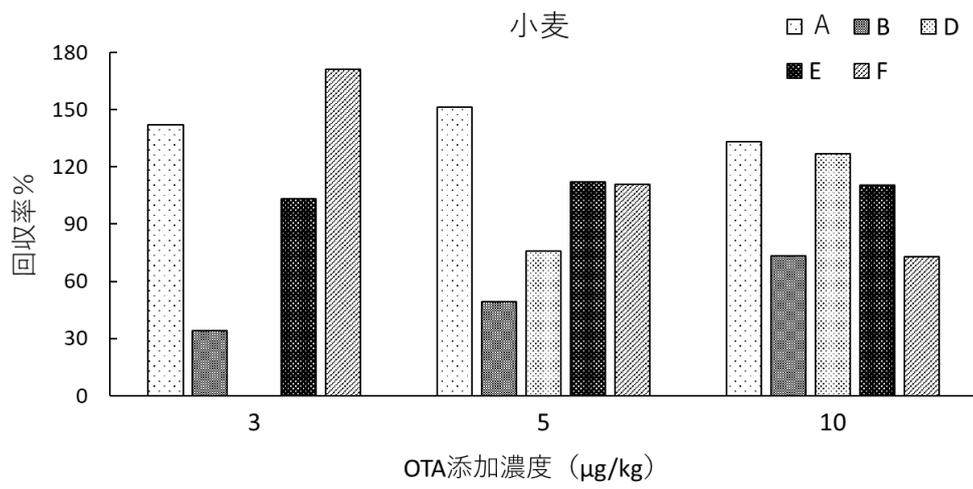
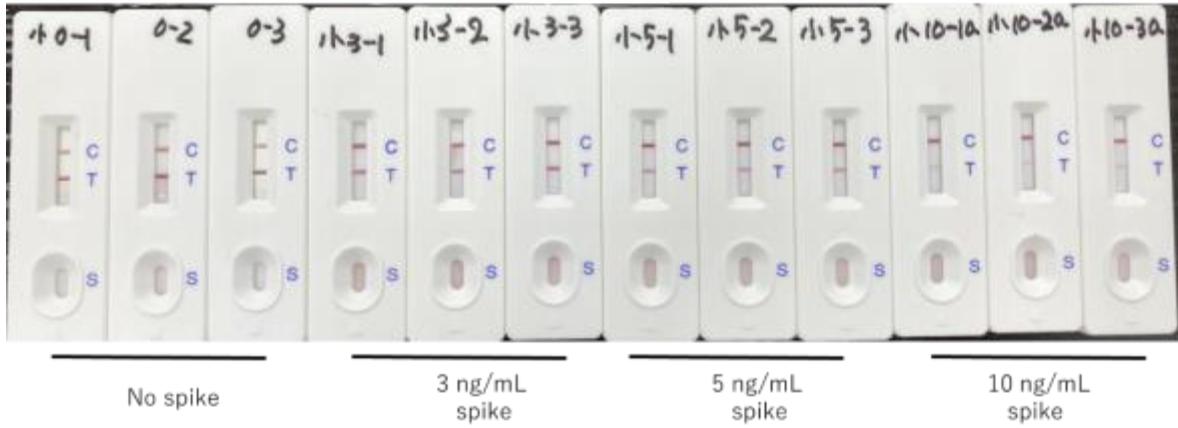
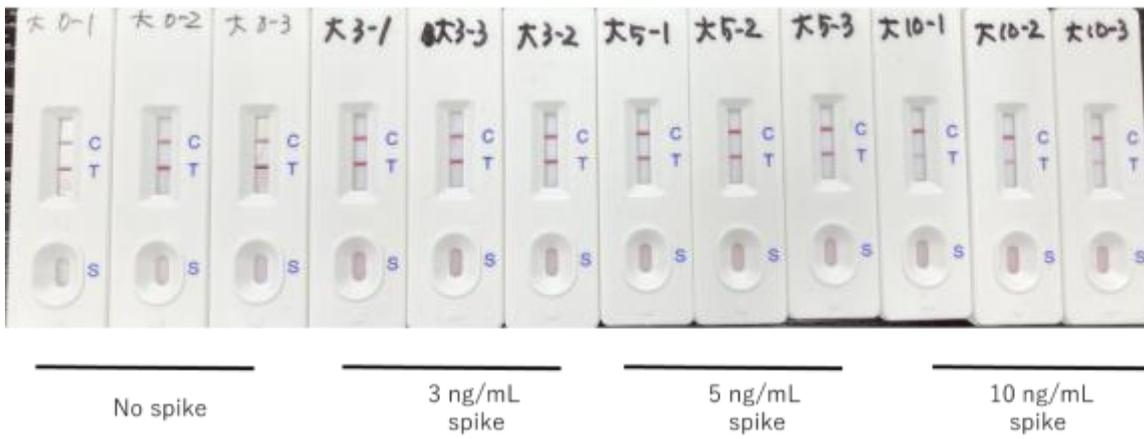


図1 食品目別の回収率

小麦



大麦



ライ麦

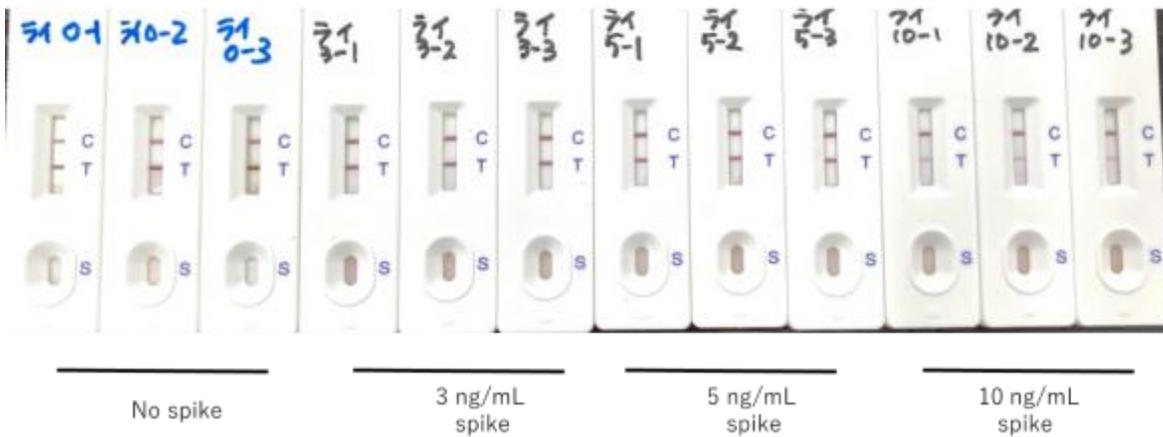


図2 定性キットの判定写真

表1 各キットの比較

キット名	A	B	C
測定範囲	0~30 µg/kg	0~30 µg/kg	記載なし
検出限界	2 µg/kg	2 µg/kg	5 µg/kg
検出機器	専用	専用	なし
定量/定性	定量分析	定量分析	定性分析
対象試料	小麦、大麦、ライ麦など	コーン、大麦、小麦など	穀類、飼料
測定時間	約 35 分	約 20 分	約 40 分
試料	5 g	5 g	2 g
注意点	リーダーのキャリブレーションの確認が煩雑で時間がかかる(30~50分程)。そのためか、日によって多少測定値が変動した。	①ライ麦抽出液の粘性が高いためストリップの展開が遅く、測定不可。 ②VICAM 専用チューブを使用しないといけないため洗浄時間が余分にかかった。	①窒素乾固に 10~15 分かかった。 ②定性分析のため、機器の準備がなく、窒素乾固以外は取り扱いが簡単だったが、展開液の反応を待つ時間が細かく指定されているのでサンプル数が多いと煩雑になると思われる。

表1 各キットの比較 (つづき)

キット名	D	E	F
測定範囲	1.5～30 µg/kg	0～30µg/kg (0～200µg/kg)	2～100 µg/kg
検出限界	1.5 µg/kg	5 µg/kg (25 µg/kg)	2 µg/kg
検出機器	専用	専用	専用
定量/定性	定量分析	定量分析	定量分析
対象試料	小麦、コーン	穀類 (飼料)	小麦
測定時間	約 30 分	30～35 分	約 25 分
試料	5 g	5 g	10 g
注意点	大麦・ライ麦ともにストリップの展開が遅く、測定不可。抽出液を薄めて測定しても測定は不可。	①ライ麦のみ混濁があったので2度遠心分離を行った。 ②インキュベートが2回あるため、サンプル数が多くなると、煩雑になると思われる。	①ライ麦は、ストリップの展開が遅く、測定が不可。 ②大麦・小麦共に、測定は出来たが、測定値と添加量の用量依存性が見られなかった。 ③試料調製の方法により、試料を10g以下のスケールに出来なかった。

表 2 各キットの総合評価

	A 定 量 分 析	B 定 量 分 析	C 定 性 分 析	D 定 量 分 析	E 定 量 分 析	F 定 量 分 析
小 麦	○ 擬 陽 性 +	○ 擬 陽 性 +	○	△	○	△ 擬 陽 性 +
大 麦	○	○	○	×	△	△ 擬 陽 性 +
ラ イ 麦	○	×	○	×	△	×

擬陽性の有無は、添加なしの試料の結果から評価した。