

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

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

オクラトキシン A (OTA) は、穀類、木の実、香辛料、果実類などを汚染するカビ毒であり、小麦、大麦及びライ麦を対象にコーデックス規格が定められている。我が国でも実態調査の結果、輸入麦類等に汚染が検出されたため、食品衛生法における基準値が議論されている。

本研究事業の分担研究として、OTA の規格基準が設定されたのちに利用できるスクリーニングテストとして、迅速簡便法を検討した。現在市販されている OTA の迅速簡便法はイムノクロマト法(ラテラルフロー法)と ELISA 法の 2 種類がある。それぞれの市販品には 4~6 種類のキットがある。そこで、2022 年度は ELISA キット 4 種の市販品を対象に、小麦、大麦、ライ麦の非汚染試料を用いて、OTA の添加回収試験を行い、性能を検討した。2023 年度は、イムノクロマトキット 6 種の市販品を 2022 年度と同様に小麦、大麦、ライ麦の非汚染試料を用いて、OTA の添加回収試験を行い、性能を検討した。2024 年度は、前年度までの結果を踏まえて、良好な性能を示したものを ELISA キットとイムノクロマトキットからそれぞれ 2 種類選び、OTA の人工汚染小麦及び大麦を用いて、機器分析による測定値との相関を検討した。その結果、2024 年度で用いた 2 種の ELISA キット及び 2 種のイムノクロマトキットの測定値は、いずれも機器分析による測定値との相関係数が 0.96 以上であったことから、OTA のスクリーニング法として使用可能であると考えられた。

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、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* 属及び *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 2008 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 $\mu\text{g}/\text{kg bw/day}$ であり、不確実係数 500 として TDI を 16 $\text{ng}/\text{kg bw}$ としている。一方、発がん性の NOAEL はラットの 2 年間発がん試験結果から 15 $\mu\text{g}/\text{kg bw/day}$ と評価し、不確実係数 1000 として 15 $\text{ng}/\text{kg/day}$ とした。JECFA では 100 $\text{ng}/\text{kg bw}$ を 1 週間の PTWI と設定している。EFSA では同じ 1 週間単位での TWI を 120 $\text{ng}/\text{kg bw}$ としている。

これらの評価をうけて、食品衛生法の規格基準が設定された場合を考慮し、スクリーニングに用いられる迅速簡便測定法を検討した。カビ毒の迅速簡便測定法は、すでに規制が行われている総アフラトキシン及びデオキシニバレノールを対象に検討されており、スクリーニングとして使用できるキットのガイドラインが通知されている。本分担研究は OTA 用の市販キットの性能を確認することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 材料

①添加回収試験に用いた麦類

LC-MS/MS で測定した結果、OTA が非検出

(0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満) の小麦、ライ麦及び大麦を研究代表者から供与された。

②人工汚染麦

研究代表者が調製した人工汚染小麦 16 検体及び大麦 16 検体を用いた。汚染濃度は知らされていない状態で測定を行った。

③ELISA キット

Neogen Veratox (Neogen 社)、Agra Quant (Romar 社)、Meizheng OTA (Meizheng 社)、RIDA SCREEN (R-Biopharm 社) の 4 種の ELISA キットを用いた。

④イムノクロマトキット

ROSA Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社)、Ochra-Vertu TOUCH (Vicom 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 種類のキットを用いた。

(2) 麦類を用いた添加回収実験

ELISA 法及びイムノクロマト法の添加回収試験は、OTA 原液 (1 mg/L in アセトニトリル) を用いて実施した。OTA 非汚染麦類を 5 g 量とり、OTA 原液を 10 μL (最終濃度 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、25 μL (最終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、50 μL (最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 添加し、1 昼夜静置したのち、それぞれの試料とした。陰性対象としてアセトニトリル 50 μL (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。ELISA キットの測定値からの濃度計算は、統計処理ソフト GEN 5 (Version 2.0, Biotek, Vermont, USA) を用いた。イムノクロマトキットでは、機器に付属している統計ソフトに基づいて濃度を計算した。

C. 研究結果

(1) ELISA キットの結果

2022 年時点において日本で入手可能な市販 ELISA キットを用いた。小麦、大麦、ライ麦を用いた添加回収試験により性能評価を行った。

その結果 RIDA SCREEN で回収率が最も高かった。Meizheng OTA では、大麦で回収率が 200%を超えたが、小麦、ライ麦では 100%程度の良好な結果が得られた。

(2) イムノクロマトキットの結果

2023 年時点において日本で入手可能な市販のイムノクロマトキットを用いた。小麦、大麦、ライ麦を用いた添加回収試験により性能評価を行った。定量用キット 5 種類のうち、小麦に使用できるキットは 5 種類 (3 $\mu\text{g/kg}$ を検出できるのは 4 種)、大麦に使用できるキットは 4 種類、ライ麦に使用できるキットは 2 種類 (3 $\mu\text{g/kg}$ を検出できるのは 1 種) であった。

(3) 人工汚染麦類を用いた性能検討結果

(1) 及び (2) の結果を踏まえて、スクリーニング検査に使用可能なキットを ELISA キット及びイムノクロマトキットを 2 種ずつ選択した。人工汚染麦類中の OTA 濃度は、機器分析 (HPLC 法) で測定し、その分析値とキットでの測定値の相関係数を求めた。その結果、4 キットとも相関係数は 0.96 以上であった。

D. 考察

食品衛生法での OTA の規格基準の設定に関する取り組みは進んでおり、現在厚労省での審議は終了し、最終段階の食品安全委員会の審議を待つのみとなっている。厚労省での審議では、OTA の基準値設定は妥当であり、汚染実態の結果から、規制対象は小麦及び大麦としている。この審議結果を受け、本事業では、2022 年度の ELISA キットの検討から 2 キット、2023 年度でのイムノクロマトキットの検討から 2 キットを選抜し、2024 年度には人工汚染麦類で性能を評価した。人工汚染麦類の OTA 汚染濃度との相関係数は良好であり、いずれのキットも 0.96

を上回った。このことから、2024 年度に性能評価を実施した 4 キットはスクリーニングに使用可能であると考えられた。

スクリーニングに使用する簡便迅速キットは、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最も求められるので、分析値の正確さよりも、偽陰性が出ないこと、cut off 値を保証することが重要である。OTA の場合、日本では基準値は 5 $\mu\text{g/kg}$ と設定されることから、cut off 値は 2~2.5 $\mu\text{g/kg}$ 程度が適当である。

今回検討した迅速簡便キットは、それぞれ長所、短所を有している。ELISA 法では、1 キット 96 ウェルが標準であるので、1 キット当たり 40 検体以上の測定が可能 (1 検体を 2 ウェル測定し、検量線用に 12 ウェルを使用する場合) となるが、それより少ない検体数の場合は、費用効率は下がる。一方、イムノクロマトキットでは、サンプル数が少ない生産現場や原料チェックには有効であるが、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が挙げられる。これらのことから、目的に則した迅速簡便法を用いることが推奨される。

E. 結論

2022 年度には ELISA キット、2023 年度にはイムノクロマトキットの性能評価を行った。2024 年度には、前年度までの検討で良好な結果が得られたキットを選別し、OTA 人工汚染麦類を用い、機器分析の結果との相関を調べた。その結果、2024 年度に評価した ELISA キット 2 種及びイムノクロマトキット 2 種では、いずれも相関係数が 0.96 以上であったことから、OTA のスクリーニングに使用可能と考えられた。