

## [ ノート ]

イムノアフィニティーカラムを応用したアフラトキシンの  
迅速スクリーニング

武田 信幸\* 後藤 操

## A Rapid Screening for Aflatoxins using Immunoaffinity Column

Nobuyuki TAKEDA\* and Misao GOTOU

*Health Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health  
and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

A rapid and selective procedure was developed for screening aflatoxins in foods with an immunoaffinity column (IAC) cleanup liquid chromatography using post-column bromination. The sample was extracted with acetonitrile-water (9:1) for nuts, cereal, peppers, and methanol-water (8:2) for peanut butter and dried figs. The sample extract was diluted with 2% Tween-phosphate buffer saline, and applied to IAC. Aflatoxins were eluted with two consecutive 0.2 mL aliquots of acetonitrile. Water (0.2 mL) was added to the second aliquot and the mixture (100  $\mu$ L) was injected onto HPLC. The mean recoveries were >70% with RSDs <11%. Limits of quantitation were estimated to be 0.5 ppb. Using the developed method, 5 samples (peanut:2, peanut butter:2, black pepper:1) were found to contain aflatoxin B1 and/or G1 ranging from 0.5 – 1.6 ppb in 60 commercial samples.

## I はじめに

熱帯から亜熱帯地域に生息するカビが産生するアフラトキシンは、ヒトへの経口発がん性が実証されている唯一の物質であるとされている<sup>1)</sup>。カビが付着した食品はアフラトキシンが含有されている可能性があるため、輸入食品にかかわる食品衛生上の大きな問題のひとつである。兵庫県では、食品の安全性を確保する目的で1981年から市販輸入食品のアフラトキシン試験を実施し、食品衛生法違反食品の排除を行うとともに、県内に流通している食品の汚染実態と特性を明らかにしてきた<sup>2)</sup>。

行政検査においては、多数の検体を正確に試験して迅速に報告し、違反事例などへの対応に科学的根

拠を示す必要がある。また最近では、「食の安全と安心」を脅かす事例が頻発しているため、危機管理の面からも食品を緊急に試験しなければならない事態に遭遇する可能性がある。このような検査を円滑に行うには、それに適した試験法を構築しておく必要がある。そのアプローチの方法には、初めから全検体に精緻な定量法を適用する、あるいは定性試験後に陽性試料を定量する、などが考えられる。輸入食品中アフラトキシン試験については、その検出率は香辛料などで約5%と低いことから<sup>2)</sup>、検査の迅速化には後者の方法を採用するのがより合理的であると考えられる。著者らは、このような目的意識を持って試験法を逐次改善し<sup>3)</sup>、検査実施標準作業書(SOP-6311)<sup>4)</sup>としてまとめた。この方法は、逆相および陰・陽イオン交換能を有する多機能カラムと、アフラトキシン特異的のモノクローナル抗体固定化カラム(イムノアフィニティーカラム: IAC)<sup>5)</sup>を組み合わせているため、夾雑物や妨害物の影響を完全に排除できる。そのため、加工品を含めた全取去検体について、ア

健康科学部

\*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29  
兵庫県立健康環境科学研究所センター  
健康科学部 武田 信幸

フラトキシシン B1 の陽性判定(基準値 10ppb)において困難をきたすことがない。しかし、定量に要する費用と効率の点でやや劣り、試験結果の報告までにやや時間を要するという欠点があった。

今回、これらの問題を解決する目的で、IAC 法のみでの試験法構築を目指し、試料負荷や洗浄・溶出などに関する諸条件を再検討した。その結果、迅速・簡便で特異性が高く、経済的な検査法を確立したので報告する。

## II 材料と方法

### 1. 試料および試薬

試料は、平成20年度に兵庫県内で収去されたピーナツなど輸入食品60検体を用いた。その内訳は、穀類・豆類・種実類計32検体(ピーナツ、ピスタチオ、アーモンド、カシューナッツ、ポップコーン、クルミ)、香辛料17検体(ナツメグ、ブラックペパー、ホワイトペパー、コショウ、唐辛子、クローブ末)および加工品11検体(ピーナツバター、乾燥イチジク)である。

標準原液は、アフラトキシシン4種を含むSigma社製混合メタノール溶液Aflatoxin Kit-M (B1/G1 : 1  $\mu$ g/mL, B2/G2 : 0.3  $\mu$ g/mL)を用いた。

ポストカラム蛍光化試薬は、臭化水素酸ピリジニウムペルブロミド(PBPB, 東京化成) 0.2gを精製水100mLに加えて十分攪拌して飽和水溶液とし、用時調製した<sup>6)</sup>。

2%Tween20-PBS (T-PBS) は、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(ICI社製, Tween20)と生理的リン酸緩衝液(pH7.4, PBS)を2:98 (v/v)で混合して調製した<sup>7)</sup>。

イムノアフィニティークラム(IAC)はVicam社製Afla-Test Pを用いた。カラム内のゲルに亀裂や泡が混入していると、試料や溶出液の流れが不均一となり、回収率や測定値変動の原因となるので使用前にこれらを除去しておく。カラム上部の充填溶液を除去した後、アダプターを連結した注射器に精製水を充填し、カラム下部から精製水をゆっくり押し出す。次いでアセトニトリルで同様の操作を行って泡などを取り除き、さらに精製水で置換する。カラム上部をT-PBSで満たして(約1mL)溶出させ、試料注入のコンディショニングを行う。試料注入および洗浄操作はすべて自然落下で行う。使用後は、アセトニトリル、精製水およびPBS各1mLで順次洗浄し、PBSを充填して冷蔵庫で保存する。長期間保存する場合は防

腐剤として0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSを使用する。

### 2. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ(HPLC)は島津製作所製LC-10Aを用いた。検出は蛍光検出器(RF-10A)を用い、励起波長365nm/蛍光波長460nmで測定した。分析はカラムにInertsil ODS-3 (15cm x 4.6mm, 5  $\mu$ m, GL Sciences), 移動相にアセトニトリル・メタノール・水(1:4:5)を用い、カラム温度40°C, 流速0.8mL/minで行った。ポストカラム蛍光化試薬はLC用ポンプ(LC-10AD)を用いて0.01mL/minで送液し、T型ジョイントで分離カラムからの溶出液と混合し、テフロンコイル(内径0.25mm, 外径1/16 inch, 長さ40cm)内で反応させた。試験溶液は100  $\mu$ LをHPLC装置に注入した。

### 3. 試験溶液の調製

ピスタチオ、落花生またはピーナツでは、殻または薄皮を除去して可食部のみを検体とした。ピスタチオは1kg<sup>8)</sup>を、その他の食品は約100gをフードプロセッサーで粉碎均一化して試料とした。ピーナツバターおよび粉末化されている香辛料は均一化されているものとして、搬入されたままの検体を試料として用いた。

### 定性(スクリーニング)

#### ①香辛料類

試料2gをスクリーキャップ付プラスチック遠心管(50mL)に採り、アセトニトリル・水(9:1) 20mLを加えて30分間振とう後、遠心分離(2,500rpm, 5分間)して清澄な抽出液を得た。抽出液1mL(試料0.1g相当)とT-PBS 5mLを混合してIACカラムに負荷する。全ての試料液を溶出させた後リザーバーを外し、カラム内を順次T-PBS および精製水で満たして溶出し、洗浄する。その後アセトニトリル 0.2mLで2回溶出し、2回目の溶出液のみをLC用バイアルに採取し、精製水0.2mLを加えて混合し試験溶液とする。

#### ②加工品(ピーナツバターおよび乾燥果実類)

ピーナツバターの加工品はアセトニトリル中では十分に分散しないため、メタノールを用いた。試料5gをメタノール・水(8:2) 20mLで抽出し、抽出液0.4mL(試料0.1g相当)とT-PBS2mLを混合し、香辛料類と同様に操作して試験溶液を得る。

#### ③穀類、豆類および種実類

試料10gをアセトニトリル・水(9:1) 20mLで抽出し、

抽出液0.2mL(試料0.1g相当)とT-PBS 1mLを香辛料類と同様に操作して試験溶液を得る。

定量

試料0.2gに相当する抽出液(香辛料2mL, 加工品0.8mL, 種実類0.4mL)を10mL共栓試験管にとり, エバポレーターを用いて溶媒を除去する。残留物にT-PBS(香辛料2mL, 加工品および種実類1mL)を加えて再溶解し, IACカラムに注入する。全ての試料液を溶出させた後, カラム内を順次T-PBS および精製水で満たして溶出し, 洗浄する。その後アセトニトリル 0.5mLで2回溶出し, エバポレーターを用いて溶媒を除去する。残留物にメタノール0.1mLと精製水0.3mLを加えて溶解し試験溶液とする。

III 結果および考察

通知法<sup>7)</sup>では, IACカラムに負荷する試料は10mL, 洗浄はPBS および精製水各10mLである。1試料につき30mLをカラムに通流しなければならず, アフラトキシン溶出前にはカラム内の残留水分を除去し, さらにプレカラム蛍光誘導体化のためにアセトニトリル溶出液を乾固しなければならない。これらの作業には人員が固定して必要であり, しかも複数試料の同時並行処理ができない。実際の検査では多数試料を取り扱うため, 多大の手間と時間を要する。

そこで, この問題点を解決して効率的な検査が行えるよう種々の条件を再検討した。はじめに, HPLC条件を設定した。アフラトキシンには4種の異性体があり, そのうちG2とB2は蛍光性を有しているが, G1およびB1は蛍光強度が弱い。そのため, LC測定のためにプレカラムまたはポストカラム法による蛍光誘導体化が必要である。本法では, アフラトキシンをLCで分離後, 臭素試薬(PBPB)と混合して蛍光化するポストカラム法を採用した<sup>6)</sup>。分析システムに追加の送液ポンプが必要となるものの, 分離前の試験溶液濃縮操作と個別誘導体化が不要となった。移動相流速0.8mL/min および試薬送液0.01mL/minの条件で, 分析は10分以内で終了し, 必要な検出感度は確保可能であることがわかった(Fig.1)。

つぎに, IACカラムに関する諸条件を再検討した。通知法は溶出にアセトニトリル3mLが必要としているが<sup>7)</sup>, 溶出液を0.2mLごとに採取してアフラトキシン溶出パターンを解析したところ, 実際には0.2-0.4mLの範囲内に負荷量の約90%が溶出してき

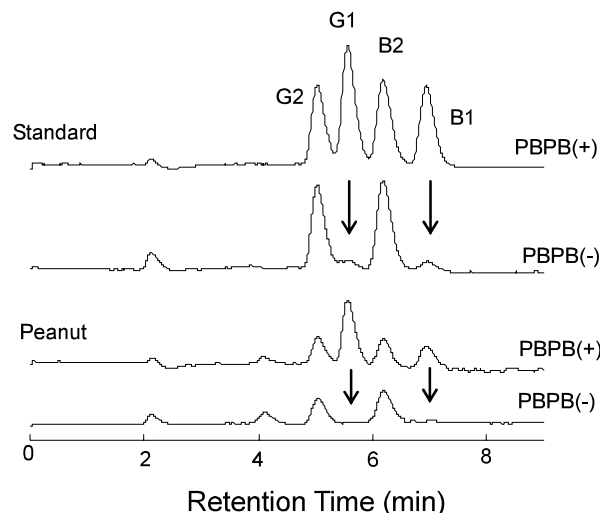


Fig.1 Chromatograms of standard aflatoxins and the extract of peanut sample with and without the post-column reagent (PBPB).

Arrows indicate the disappearance of B1 and G1 by stopping the reagent flow.

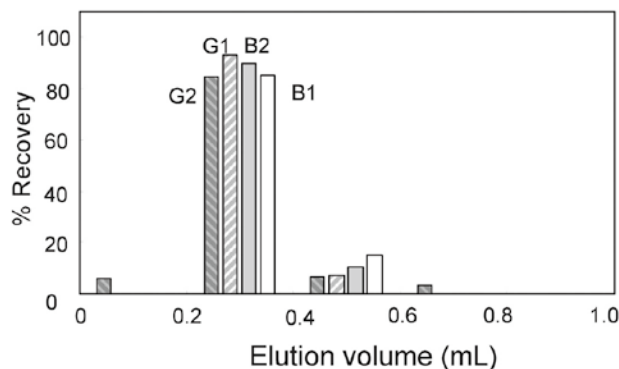


Fig.2 Elution profile of aflatoxins from IAC column (Afla-Test P) with acetonitrile.

ていることがわかった (Fig.2)。この画分だけを試験溶液とすれば濃縮は不要であり, 操作の簡便化と短時間化が図られる。しかし, この画分を直接HPLCに注入すると正常なピーク形状が得られなかった。そこで, 同量の精製水を加えて試験溶液の極性を高くしたところ, LCカラムによく保持されるようになり, 各アフラトキシンのピーク形状は改善され (Fig.1), さらに大量の試験溶液(100μL)をLCに注入可能となった。

そこで上記で得られた諸条件が, 実際の試料溶液に適用可能か, また通知法で示された負荷・洗浄などに要する液量が適正か否かなどを検討した。試料溶液は, ナツメグ抽出液(アセトニトリル90%)にアフラトキシンB1が10ppbとなるように添加して調製した。通知法では抽出液の10倍希釈液(アセトニ

トリル 9%) 10mL を負荷しているが<sup>7)</sup>, 本法では負荷量を少なくする目的で抽出液 1mL を T-PBS 5mL で希釈することとした(アセトニトリル 15%). その結果, G2 の回収率が約 50%と低いものの B1, B2 および G1 では約 80%以上という良好な回収率が得られ, 本法が実試料に適用可能であることが示唆された. G2 の低回収率は負荷液中のアセトニトリル濃度(15%)が高いためと思われる<sup>5)</sup>. 通知法で示されているカラム内残留水分の除去については, その操作の有無で回収率は影響されなかったので省略することとした. さらに, 洗浄溶液(精製水および T-PBS)の量を種々変更してもクロマトグラム上のアフラトキシン溶出部位での妨害ピークは認められず, 1mL 程度の洗浄で十分であった(Fig.1). これらの条件を採用することで手間と時間の大幅な削減が可能となり, 作業効率が極めて向上した. ナツメグ抽出液にアフラトキシン B1 および G1 では 1~10 ppb, B2 および G2 では 0.3~3 ppb となるよう添加して用量-反応関係を調べたところ良好な直線関係 ( $r^2 = 0.97 - 0.99$ ) が得られ, 本法がスクリーニング法として使用可能であることが示された. このときの検出限界値はいずれも 0.5ppb であった.

IAC カラムは通常の固相抽出カラムと比べて高価であるため, 通知法においてはアフラトキシンの判定が困難な場合においてのみ使用することとされている<sup>7)</sup>. しかし, 再使用すればコストは低減化される. そこで, 極めて高い効果が期待される精製手段を低コストで全検体に適応できるように, カラム再使用の可能性を検討した. 試料としてアフラトキシンを添加したナツメグ(香辛料類), ピーナツバター(加工品)およびピスタチオ(種実類)を用い, 同一カラムを 5 回連続再使用し, 各回でのアフラトキシン結合能を測定した. その結果, Fig.3 A-C に示したようにナツメグ (15%アセトニトリル溶液, 6mL 負荷) では, カラムの再使用回数を増すごとにアフラトキ

シン G 群への結合能がほぼ直線的に減少することがわかった. しかし, その傾向はピーナツ (15%メタノール溶液, 2.4mL) およびピスタチオ (15%アセトニトリル溶液, 1.2mL) では見られなかった. 一方, B 群への結合能はいずれの試料においても再使用による減少傾向は認められなかった. アフラトキシン規制は B1 のみで行われ(基準値 10ppb), また自然汚染においては G 群が検出される頻度は B 群より低く, また G 群のみの検出事例は報告されていないことを考え合わせれば<sup>2)</sup>, B1 を指標としたスクリーニング目的でカラムを再使用することは実用上問題ないと考えられた. ただし, 従来からの定量下限値 0.5ppb<sup>4)</sup>を採用するには, 再使用カラムで 0.5ppb の B1 を含む試料はすべて見落とすことなく検出できなければならない. そこで, 過去に比較的高頻度でアフラトキシンが検出されたものや夾雑物が多いと判明している代表的試料(ピスタチオ, ピーナツ, ナツメグ, ブラックペパー, 唐辛子, ピーナツバター)を用いて試験したところ, 全ての試料でこの濃度の B1 をクロマトグラム上で視認できることがわかった. 以上のことから, 本法をスクリーニング法として使用することとした.

他方, 抽出液の有機溶媒を除去した後 T-PBS で再可溶化して IAC カラムに負荷すると, B 群 G 群ともに再使用に伴う結合量低下は認められず, G2 の回収率も大きく改善されることも判明した(Fig. 3D). この方法を用い, 3 種類の食品(ナツメグ, ピーナツバター, ピスタチオ)にアフラトキシンを B1 として 2ppb および 5ppb 添加して再現性と精度を求めたところ, 各添加濃度とも平均回収率は 70%以上, RSD は 11 以下と良好な値を示し, 本法が定量法として優れていることが示された(Table 1). B1 の定量限界値は 0.5ppb とした. 以上のことから, 希釈法で迅速スクリーニングを行い, 何らかのピークを見出した試料は溶媒除去法で定量を行う, という分析プロトコ

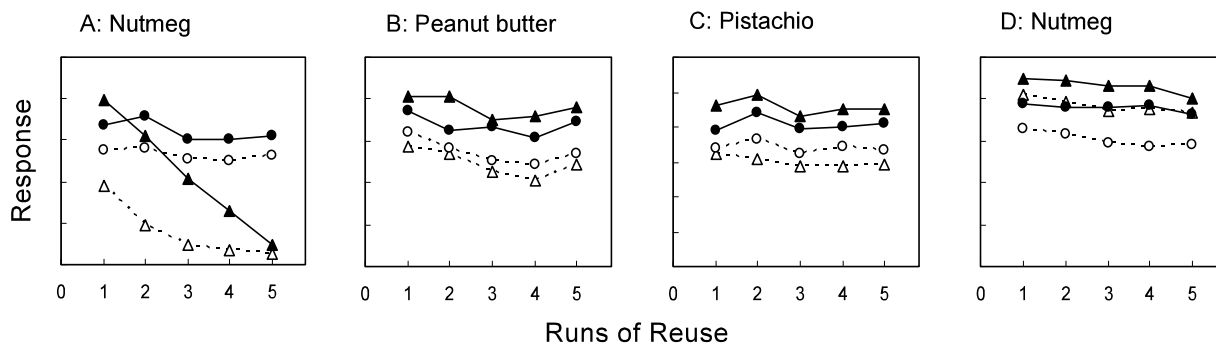


Fig.3 Effect of reuse on IAC column performance  
 A - C: Extract diluted with T-PBS was applied. D: Extract was evaporated before application.  
 Closed circle: B1, open circle: B2, closed triangle: G1, open triangle: G2.

Table 1 Recoveries of Aflatoxin B1,B2,G1 and G2 (n=5)

	Nutmeg		Peanut Butter		Pistachio	
	Average (%)	RSD (%)	Average (%)	RSD (%)	Average (%)	RSD (%)
<b>2 ppb</b>						
B1	77.6	1.7	73.6	3.7	81.4	10.3
B2	71.5	2.7	75.0	4.0	79.1	11.1
G1	78.6	5.7	81.1	2.7	86.6	6.7
G2	70.6	8.3	75.8	2.4	76.3	5.4
<b>5 ppb</b>						
B1	85.6	3.4	74.0	6.7	95.0	4.7
B2	78.4	2.6	76.0	4.1	95.5	3.2
G1	92.1	3.1	75.0	10.7	91.7	11.1
G2	70.7	6.3	78.8	7.3	99.1	9.8

ールが可能となった。

本法はポストカラム法でB1およびG1を蛍光化して測定を行っているため、試薬送液を停止すれば、それらの蛍光ピークは大きく減少する。この蛍光強度変化はオンラインでの確認法として応用可能である(Fig. 1)。最終的には質量分析装置で行うべきであるが、この方法を用いれば簡易にB1およびG1の確認が行われ、誤認(false positive)を防ぐことができる。

本法を用いて市販輸入食品 60 検体を試験した。スクリーニング段階で 7 検体からアフラトキシンを検出し、定量試験で汚染食品 5 検体を見出した(①ピーナツ: G1 1.6ppb, B1 0.5ppb, ②ピーナツ: G1 0.5ppb, B1 0.6ppb, ③ピーナツバター: B1 1.2ppb, ④ピーナツバター: B1 0.6ppb, ⑤ブラックペパー: B1 0.6ppb)。これらの食品では、試薬送液停止による簡易確認法を用いてB1およびG1の確認を行った(Fig.1)。ピーナツバターが示す比較的高頻度でかつ低濃度の汚染や香辛料の汚染は通例的に見られることであるが<sup>3)</sup>、全粒ピーナツ商品からのアフラトキシン検出は極めて稀であり、しかも 1 例は G1 濃度が B1 よりも高い値を示した。従来から、アフラトキシン類のなかでは B1 が検出頻度および濃度ともに最も高いとされてきた。本例が特例的なものなのか、アフラトキシンを産生するカビに変化が生じているのか、カビ発生と関連する天候の影響なのか、などは不明である。今後とも調査を継続して、汚染の程度だけでなくその質の変化も注意深く観察していく必要があると考える。

#### IV 要 旨

特異的アフィニティーカラムと臭素によるポスト

カラム蛍光化HPLCを組み合わせた輸入食品のアフラトキシン検査法を確立した。食品の希釈抽出液をカラムに負荷してスクリーニングし、陽性試料は抽出液の溶媒を除去した後カラム処理して定量するという 2 段階法を採用することで検査全体の迅速化を可能とした。また、高価なカラムの再使用が可能であることを実証して経済的な方法とした。本法の定量下限値は 0.5ppb で、添加濃度 2ppb および 5ppb での平均回収率は 80.8%, 平均 RSD は 5.7 であった。60 検体の市販食品を分析し、ピーナツ・ピーナツバター・ブラックペパーなど 5 検体から 0.5~1.6ng/g のアフラトキシンを検出した。

#### 謝 辞

本調査を行うに当たり、試料の収集にご尽力いただいた兵庫県健康福祉部生活衛生課および県下各健康福祉事務所の関係各位に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 栗飯原景昭 他: 食品の安全性評価, pp30-35 (1983), (学会出版センター, 東京)
- 2) 武田信幸: 輸入食品中のアフラトキシン検査 10 年間のまとめ, 兵庫衛研報, **31**, 164-167(1996)
- 3) 武田信幸, 西海弘城: 輸入食品中のアフラトキシン検査(平成 8~11 年度)および厚生省告示分析法の問題点について, 兵庫衛研報, **34**, 206-209 (1999)
- 4) 兵庫県立健康環境科学研究所 検査実施標準作業書(SOP 6311) 豆類等のアフラトキシン試験 平成 17 年 8 月 31 日
- 5) 中島正博: 食品分析におけるイムノアフィニティーカラムの応用 食衛誌, **42**, J-1 - J7 (2001)
- 6) Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study : *J. AOAC Int.*, **83**, 320-340(2000)
- 7) 医薬食品局食品安全部監視安全課長: カビ毒(アフラトキシン)を含有する食品の取り扱いについて, 食安監発第 0728004 号, 平成 20 年 7 月 28 日
- 8) 医薬食品局食品安全部監視安全課長: アフラトキシン検査におけるサンプリングについて, 食安監発第 177 号, 平成 13 年 8 月 16 日