

資料

乳中のアフラトキシン M1 試験法の妥当性評価

井原 紗弥香, 中島 安基江, 福原 亜美

Validation of Aflatoxin M1 Analysis Method in Milk

SAYAKA IHARA, AKIE NAKASHIMA and AMI FUKUHARA

(Received October 2, 2017)

平成27年7月23日付けで厚生労働省から通知された乳に含まれるアフラトキシンM1の試験法について、成分無調整牛乳、無脂肪牛乳および生乳を対象として総アフラトキシン試験法に示す妥当性評価の方法を用いて妥当性評価を実施した。いずれの検体でも、真度70~110%、併行精度20%以下および室内精度30%以下の目標値を満たす結果であった。

さらに、市販牛乳および加工乳を用いて、2種類のイムノアフィニティカラム（以下、「IAC」と略す）による添加回収試験を行ったところ、いずれも70%から120%の回収率が得られた。

キーワード：アフラトキシンM1, 乳, 妥当性評価

緒 言

乳に含まれるアフラトキシンM1（以下、「AFM1」と略す）については、平成27年7月23日付けで厚生労働省から試験法が通知された〔1〕（以下、「通知法」と略す）。

また、平成28年1月23日からは、AFM1が $0.5\mu\text{g}/\text{Kg}$ を超えて検出される乳は、食品衛生法を違反するものとして取り扱うこととなっている〔2〕。

当センターは、平成28年度から食品衛生対策事業の中で当該検査を実施することとなったことから、本検査に係る試験法の妥当性評価を実施した。

また、本試験の前処理に使用するガラス繊維ろ紙については、通知法には粒子保持能 $1\sim 1.5\mu\text{m}$ のホウケイ酸ガラス繊維の使用が記載されている。そこで市販の4種類のガラス繊維ろ紙について処理能力を比較した。

さらに、乳脂肪分の異なる乳を用いて、2種類のIACによる添加回収試験を実施したので、それらの成績も合わせて報告する。

材料と方法

1 試料

(1) 妥当性評価試験

広島県内で流通している市販牛乳2試料（成分無調整牛乳、無脂肪牛乳）と県立総合技術研究所畜産技術センター（以下、「畜技C」と略す）において、搾乳後の貯

乳タンクから直接採取した生乳を試験に供した。

(2) 添加回収試験

妥当性評価試験で使用した市販乳牛2試料と広島県内で市販流通している低脂肪牛乳およびコーヒー牛乳を用いた。

2 試薬および器材

標準品は、和光純薬工業（株）製のAFM1（ $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ アセトニトリル溶液）を使用した。

IACは妥当性評価試験にはRomerLabs社製のAflaStar R（以下、「afS」と略す）を使用した。

添加回収試験には、afSと（株）堀場製作所製のAFLAKING（以下、「afK」と略す）を用いた。

IACのコンディショニングおよび洗浄には、（株）ニッポンジーン製のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用時調製して使用した。

標準品および試験溶液の調整には、シグマアルドリッチ（株）製のアセトニトリル（残留農薬・PCB分析用）を用いた。蒸留水は、和光純薬工業（株）製のHPLC用を用いた。

LC/MS/MS測定にはハネウエル（株）製の0.1%酢酸アンモニウム溶液（HPLC用）および和光純薬工業（株）製のアセトニトリル（HPLC用）を用いた。

ガラス繊維ろ紙の比較については、表1に示す4種類を用いた。

妥当性評価試験では、当センターで残留動物用医薬品等の分析で使用経験のあるBのろ紙を使用した。

表1 比較検証を行ったガラス繊維ろ紙 (製品表示値)

	G社		A社	
	A	B	C	D
粒子保持能 (μm)*	1.2	1.2	1.0	0.8
厚さ (mm)	0.26	0.26	0.44	0.74
直径 (mm)	25	47	47	60
有効ろ過面積 (cm ²)* ²	4.2	9.6	9.6	9.6

* G社は自社の規定された方法で測定。A社はJIS Z 8901に規定された7種粉体分散水を使用し、自然ろ過した時の90%以上を保持できる粒子径としている。

*2 使用したろ過フィルターホルダの有効ろ過面積

3 装置

遠心機は久保田商事(株)製のKUBOTA8010を使用した。

高速液体クロマトグラフはHP-1100シリーズ(Agilent社製)を用い、質量分析装置はAPI-3000(ABSciex社製)を使用した。

4 試験方法

(1) ガラス繊維ろ紙の検証

37℃に加温した牛乳20mLをそれぞれのガラス繊維ろ紙に負荷し、すべてが流出するまでの時間を測定した。また、流出が良好なる紙については、100mLを負荷し、流出時間を測定した。

Aのろ紙は、有効ろ過面積が4.2 cm²である専用のフォルダーにセットしマニホールドと連結させ、減圧ポンプに接続した。残り3種類のろ紙については、有効ろ過面積が9.6cm²の減圧ろ過フィルターホルダにセットし、減圧ポンプに接続した。

(2) 妥当性評価試験

AFM1の分析は、通知法[1](図1)に準じて実施した。畜技Cで採取した生乳は、均質化処理がされていないため、遠心分離操作(2000×g, 15分)を実施後、上層の脂肪層を除去したのち、下層の液体部分をガラス繊維ろ紙でろ過操作を行った。なお、ガラス繊維ろ紙はBを使用した。

妥当性評価は「総アフラトキシン試験法について」[3]に示された方法を参考に、添加濃度は規制値0.5μg/Kgとし、分析者1名が添加試料1日2併行、5日間分析を実施し、選択性、真度(回収率)、併行精度および室内精度について評価した。総アフラトキシンの試験法に示されている各性能パラメーターの目標値を表2に示す。なお、IACはafSを使用した。

表2 真度及び精度の目標値

真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
70 ~ 110	20 ≥	30 ≥

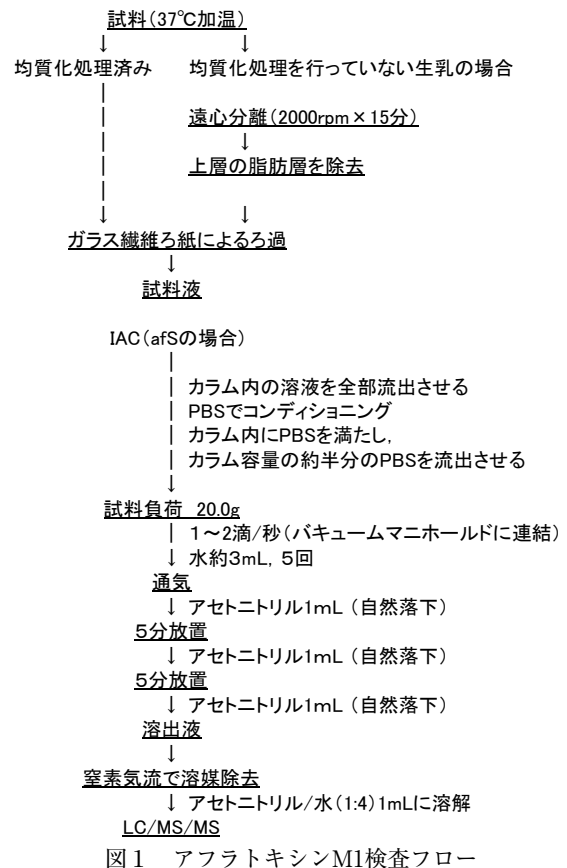


図1 アフラトキシンM1検査フロー

(3) 添加回収試験

あらかじめAFM1を含まないことを確認した試料3種類について、規制値0.5μg/Kg相当のAFM1を添加し、通知法に従って3回の繰返し試験を実施した。それとは別に、AFM1を添加していない各試料について同様の操作を実施し、各IACの溶出液に、それぞれ規制値0.5μg/Kg相当のAFM1を添加し、マトリクス添加標準溶液を調整した。

なお、IACはafKとafSを使用した。

5 測定条件

LC/MS/MSによるAFM1の測定条件を表3に、AFM1のモニターイオンおよび測定パラメーターを表4に示した。

6 検量線

標準品0.5μg/mLアセトニトリル溶液を適宜希釈し、1ng/mLから20ng/mLの検量線用標準溶液を調製した。これらの標準溶液を装置に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積を用いて検量線を作成した。

表3 LC-MS/MSの測定条件

LC条件	
カラム	Inertsil®ODS-4 (3.0mm*150mm, 3µm, GL Sciences社製)
カラム温度	40度
流量	0.2mL/分
移動相	A液: 0.1vol%酢酸アンモニウム溶液 B液: アセトニトリル
注入量	5µL
グラジエント条件	(% B) (30) → 1分 (30) → 7分 (90) → 3分 (90)
MS/MS条件	
イオン化モード	ESI positive
イオンスプレー電圧	4500V
イオンソース温度	450℃
測定モード	MRM

表4 アフラトキシンM1のモニターイオンおよび測定パラメータ

	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
AFM1	329	259	66	350	35	16

DP:Declustering Potential
FP:Focusing Potential
CE:Collision Energy
CXP:Collision Cell Exit Potential

表5 妥当性評価結果

	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
成分無調整牛乳	77.3	4.7	6.7
無脂肪牛乳	82.1	4.3	5.5
畜枝C生乳 (遠心分離済み)	98.5	2.9	3.1

カラムは AflaStar R を使用

結果及び考察

(1) ガラス繊維ろ紙の検証

Aのろ紙は目詰まりや漏れが確認され、20mLすべてはろ過されなかった。Bのろ紙の流出時間は70秒程度であった。CおよびDのろ紙の流出時間は5秒以内であった。そこで、CおよびDのろ紙に100mLを負荷したところ、Cのろ紙の流出時間は10秒以内であり、Dのろ紙の流出時間は15秒以内とどちらも迅速であった。

一般的には、粒子保持能の値が小さいほど、またろ紙の厚みがあるほど、ろ過にかかる時間が遅くなると考えられるが、想定と異なる結果となった。

今回の妥当性評価試験では、これまで当センターで使用経験のあるBのろ紙を使用したが、より迅速に分析するためには、CおよびDのろ紙を前処理に用いた妥当性評価試験を実施する必要があると考えられた。

(2) 妥当性評価試験

① 選択性

いずれの試料においても、妨害ピークはなく、AFM1を選択的に測定できることが確認できた。

② 真度 (回収率)

真度は77.3%から98.5%であり、表2の目標値を満た

した (表5)。

③ 併行精度および室内精度

一元配置の分散分析を用いて算出した結果、併行精度は2.9%から4.7%、室内精度は3.1%から6.7%であり (表5)、いずれも表2に示した妥当性評価の目標値を満たす結果であった。

以上の結果から、本法は、成分無調整牛乳、無脂肪牛乳および生乳においてAFM1の試験法として妥当であると考えられた。

(3) 添加回収試験

各IACを比較したところ、表6に示すとおり、いずれも回収率は70%から120%の範囲内で良好な結果であった。今回の妥当性評価試験では、通知法に記載されている試料量20.0gに対応したafSを使用した。一方、試料量10.0gに設定されているafKでも良好な結果が得られた。afKを使用することで迅速性が期待できることから、afKについても妥当性を確認する必要があると考えられた。

各試料を比較したところ、大きな差はないもののコーヒー牛乳で回収率が低く、ばらつきが大きい傾向が見られた。通知法では、IACに試料を注入した後、毎秒1から2滴の流速で流出させる事になっているが、試料によ

表6 添加回収試験結果

種類	カラム	平均回収率 (%)	標準偏差	CV (%)	マトリクス添加回収率 (%)
成分無調整牛乳	afK	78.1	4.9	6.2	88.0
	afS*	77.3	5.0	6.5	84.7
低脂肪牛乳	afK	76.3	4.3	5.7	87.4
	afS	83.2	1.1	1.4	89.5
無脂肪牛乳	afK	81.9	2.1	2.6	97.8
	afS*	82.1	4.4	5.3	85.9
コーヒー牛乳	afK	77.9	6.1	7.8	84.0
	afS	71.8	9.7	13.5	85.8

n=3 ただし*は妥当性評価の結果を再掲 (n=10)

afK:AFLAKING

afS:AflaStar R

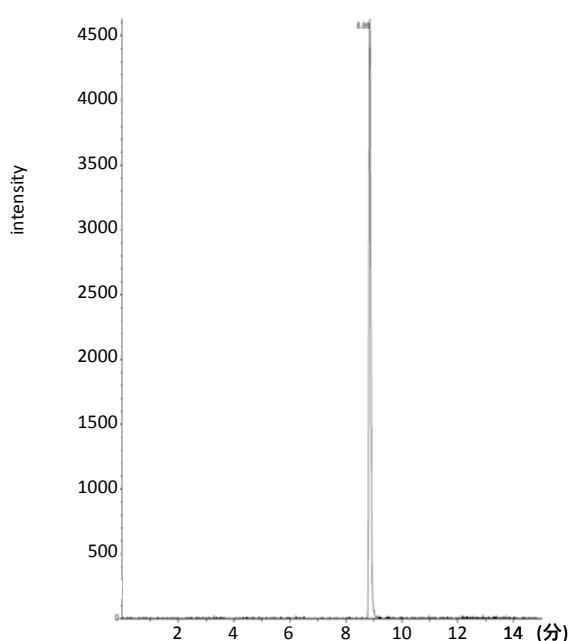


図2 5µg/Kg相当を添加したマトリクス添加標準溶液

り通液速度を一定に保つことが困難なものがあつた。岩屋ら [4] は通液速度が毎秒3滴の場合では回収率が低くなることを報告していることから、通液速度との関係も検証する必要があると考えられた。

マトリクス添加標準溶液の回収率は90%未満のものが多かった。これは、試料溶液中に夾雑物が存在するためイオン化抑制がおこり、回収率が低くなったと考えられる。今回、図2のようにMRMクロマトグラムには夾雑ピークは確認されていないが、IACの溶出液が白濁している試料が存在した。後藤ら [5] は、LC-FLのクロマトグラムなどから脂質の除去を検討しており、本法においても、白濁の改善および夾雑物の除去方法の検討が必要であると考えられた。

結 語

AFM1試験法の妥当性評価試験を実施したところ、選択性、真度、併行精度および室内精度すべてにおいて目標値等を満たした。これにより、成分無調整牛乳、無脂肪牛乳および生乳について、本法の妥当性を確認することができた。

さらに、乳脂肪分の異なる乳を用いて、2種類のIACによる添加回収試験を実施したところ、いずれも回収率は70%から120%の範囲内で良好な結果であった。

今後、迅速かつ多種の加工乳および乳製品中のAFM1検査に対応するため、前処理や精製方法について検討を進め、県民の食の安全・安心の確保に寄与していきたい。

妥当性評価試験を実施するにあたり、生乳の提供にご協力いただきました県立総合技術研究所畜産技術センターに深謝いたします。

文 献

- [1] 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「乳に含まれるアフラトキシンM1の試験法について。平成27年7月23日食安発0723第5号
- [2] 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知。乳に含まれるアフラトキシンM1の取扱いについて。平成27年7月23日食安発0723第1号
- [3] 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知。総アフラトキシンの試験法について。平成23年8月16日食安発0816第2号
- [4] 岩屋あまね, 下堂蘭栄子, 榎元清美, 福司山郁恵, 佐久間弘匡. 鹿児島県環境保健センター所報. 2011;12:77-82.
- [5] 後藤操, 林幸子, 服部涼子, 吉田昌史. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告. 2017;8:22-25.