

# 酵素免疫測定法によるアフラトキシンの分析

矢崎 廣久, 高橋 治男, 中島 慶子, 内村眞佐子

## Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Corn, Corn Products, Peanut Products and Mixed Feeds

Hirohisa YAZAKI, Haruo TAKAHASHI, Keiko NAKAJIMA  
and Masako UCHIMURA

### Summary

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was compared with high performance liquid chromatography method (HPLC) for the determination of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) in corn, corn products, peanut products and mixed feeds. A correlation was good between ELISA and HPLC data for analysis of AFB<sub>1</sub> in 20 naturally contaminated corn. Linear regression equation was  $Y = 1.40x - 1.509$  with correlation coefficient of 0.936. The positive inhibitory effect of extracting impurities from corngrits, cornstarch, sweet corn, butter peanut and peanut butter was actually slight when the two quantitative methods were applied to 78 commercial corn products and peanut products. The result of 8 mixed feeds containing a lot of corn showed that the relationship between analytical figures measured by 2 methods was similar to that in the feeds with only the naturally contaminated corn. The ELISA method has adaptability as a screening method for determination of AFB<sub>1</sub> in corn, corngrits, cornstarch, sweet corn, butter peanut, peanut butter and mixed feeds.

### I はじめに

マイコトキシンの酵素免疫測定法 (ELISA) は、従来、複雑な生体試料中の微量トキシン等を分析対象として開発されてきた<sup>1-3)</sup>。しかし、近年、食品原料及び農産物等の分野では、本法による分析例もしばしば見受けられるようになった<sup>4-6)</sup>。

ELISA法は、抗原への特異性、高感度性及び高価な機器を必要としない等の特性があるが、とりわけ煩雑な前処理操作が省略されるため、短時間に多数の検体処理ができる利点を備えている。

Aflatoxin (AF) 試験に関して、わが国では厚生省通知が出されて以降、分析は落花生及び各種ナッツ類を中心に、日常業務として行われていた。ところが、1988年の異状気象に伴い、米国中西部を中心に大規模な早ばつが発生し、とうもろこしに高濃度のAF汚染が生じるようになった。そこで急速、輸入とうもろこしについてはAF検査の徹底化を図るとともに、食品原料、動物飼

料への汚染防止対策が講じられるようになった<sup>7)</sup>。その為、最近では食品加工及び飼料製造業界を中心に、簡便迅速なELISA法への期待も高まり、その分析的標価が急がれている。

著者らも、数年来ELISA法による分析検討を行っているが<sup>8,9)</sup>、今回は調査品目として重要かつ緊急性も高いとうもろこし、落花生、並びにそれらを原料とする製品について、本法の適用範囲を明確にするため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた化学的分析法との比較検討を行った。

### II 実験方法

#### 1. 試料

1) 原料とうもろこし これらの試料は、1988年米国産原料用のもので、各検体共150 gを入手した。

2) コーン製品及び落花生製品 1989年10月~11月に千葉市内で市販されていたコーン製品、11種46検体及び落花生製品、10種類32検体を集めた。

3) 配合飼料 1989年11月~12月に千葉、船橋、市原のメーカーで製造された豚、家禽類等の飼料8種類を、

各々400gずつ入手した。

2. 試薬

1) AFB<sub>1</sub>標準溶液：ELISA測定用標準液とするために、AFB<sub>1</sub>標準品 (Makor Chemicals製) をメタノールに溶解し、100 μg/ml溶液となるよう調整した。

2) AF混合標準溶液：AFB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及びG<sub>2</sub>の標準品それぞれを、クロロホルムに溶かし、溶液1ml中B<sub>1</sub> 2 μg、B<sub>2</sub> 1 μg、G<sub>1</sub> 3 μg並びにG<sub>2</sub> 2 μgを含むHPLC用混合標準溶液を調整した。

3) トリフルオロアセチル化試薬 (TFA)：アンプル封入し、冷暗所保存の無水トリフルオロ酢酸を用いた。

4) AF用ELISAキット：アフラトキシンB<sub>1</sub>測定用キット；UBE EIA KIT-AFB<sub>1</sub> (宇部興産製) に依り測定を行った<sup>10)</sup>。キット添付試薬のうち、AFB<sub>1</sub>標準溶液は自ら作成したものと置き換えたが、その他の試薬類はそのまま使用した。

5) カラムクロマト用フロリジル：セップバック・フロリジルカートリッジ (Waters社製) を使用した。

6) メタノール：HPLC用メタノールは、ドータイトスペクトロゾール メチルアルコール (和光純薬) を移動層に用いた。

7) その他の溶媒、試薬類はすべて市販特級品を使用した。

3. 装置

1) マイクロプレートリーダー：ダイナテックオートリーダーMR580 (Dynatech社製)

2) 粉碎機：日本精機遠心式粉碎機 ZM-1型

3) 高速液体クロマトグラフ：蛍光検出器付日本分光高速液体クロマトグラフ Twinkle

4) ロータリーエバポレーター：東京理化ロータリーエバポレーター V型

4. 試料の調整

試料は150~300gを、粉碎機を用いて12メッシュ以下の粉体とした後、十分に攪拌を繰返してから、ELISA用に10g、また化学分析用には20gをサンプリングして、各々の分析に供した。

5. ELISA分析

粉末試料10gに55%メタノール水25ml加え、振とう抽出、ろ過の後に試料溶液とした。EIA-AFB<sub>1</sub>キットは供給プレートにAFB<sub>1</sub>-BSAが感作されており、試料液を添加後、ホースラディッシュパーオキシダーゼで標識したモノクローナル抗体を入れ、競合反応させ、付着抗体量をOPDの発色により測定した<sup>10)</sup>。なお、キット使用は添付の説明書に準拠し、1試料当たりプレートの3wellを用いて平均し、測定値を算出した。

6. 化学分析 (HPLC法)

化学分析の分離・抽出操作は、都衛研のフロリジルカラム法に準じて行った<sup>11)</sup>。また、定量操作としてのHPLC測定は、以下の手順に従った。すなわち、フロリジル・セップバックカラムでクリーンアップし、ロータリーエバポレーターにて濃縮乾固した抽出物残査に、TFA試薬0.1mlを加え、栓をして振り、15分間放置した後、アセトン-水 (1+9) 0.9mlを追加してHPLC分析用試験溶液とした。それとは別に、AF混合標準溶液を一定量とり、上記と同様な操作を行い、TFA化AFB<sub>1</sub>がml当り50~200ngの濃度範囲で、数段階の検量線用標準液を調整した。

(HPLC測定条件)

カラム：Inertsil ODS (5 μm, 4.6 φ×150mm) ガスクロ工業、温度45℃

移動層：メタノール-水 (1+1)、流速0.9ml/min

検出器：FL検出器、Ex365nm、Em450nm

サンプル量：10 μl

III 結果及び考察

1. 原料とうもろこしへのELISA法の適用

AF自然汚染原料用コーンの分析結果を表1に示した。

表1 アフラトキシン自然汚染コーンによるELISA法と化学分析法の比較

試料 (No.)	ELISA分析値(ppb)		HPLC分析値(ppb)	
	AF	AF-B <sub>1</sub>	AF-B <sub>1</sub>	AF-B <sub>2</sub>
1	0.8	—	—	—
2	0.9	—	—	—
3	1.0	—	—	—
4	1.0	—	—	—
5	1.1	—	0.1	—
6	0.6	—	0.2	0.1
7	0.8	—	0.2	—
8	1.1	—	0.2	—
9	1.3	—	0.2	—
10	1.3	—	1.1	—
11	1.1	—	1.9	0.2
12	1.8	—	2.2	0.1
13	8.5	—	5.1	0.4
14	7.8	—	9.8	1.3
15	4.5	—	12.4	1.6
16	8.6	—	14.4	1.1
17	16.0	—	14.2	0.6
18	18.5	—	24.0	2.5
19	40.0	—	28.4	4.9
20	72.0	—	41.9	5.4

化学的分析結果に基づいて、濃度順に整理すると、ELISA分析値は化学分析に比べ、トータル濃度としてAF低濃度側では高い値として現われ、1 ppb付近を界に、それを上回る濃度では逆転した傾向が見られる。さらにまた、濃度が数十ppbを越える範囲では、ELISA値の方が大巾に高くなっている。このような現象は、配合飼料の結果（表4参照）にも伺われるが、方法自体の原理的な問題か否かは現在のところ不明である。

両分析法で得られた値を用いて線形回帰直線を作成したものが図1で、相関係数（ $r = 0.936$ ）より、両方法は正の相関が強いと考えられる。今回の化学分析法は、世界的に主流となっているAOACのCB法を改良したものであり、落花生、コーン等については添加回収や市販品の分析調査により、ほぼ満足な成績が得られている<sup>11,12)</sup>。そこで本法を基準にして、ELISA法に関する統計的推定を試みてみると、原料コーンでは、化学分析で10ppb（国が定めるガイドライン）の値が得られる試料をELISA法で測ると、12.5ppbとなり、化学分析値20ppbの場合は、ELISA値26.5ppbになると推定される。

2. 各種コーン製品へのELISA法の適用

各種加工コーン及び市販コーン製品についても、ELISA法と化学分析法による定量値の比較検討を行った。11種46検体の調査結果は表2の通りで、化学分析では全

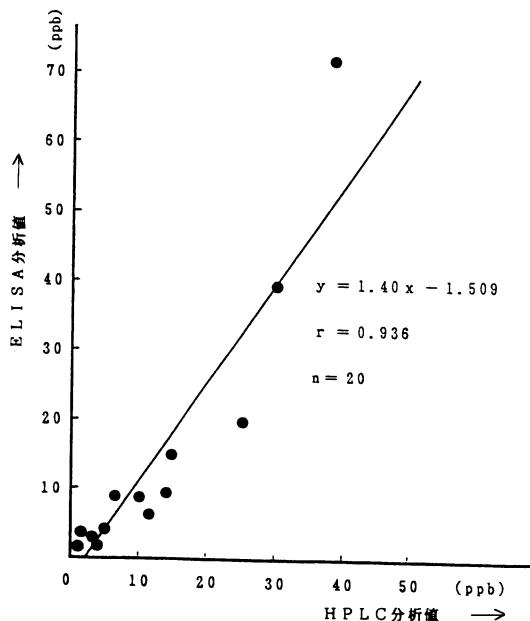


図1 AF汚染コーンのELISA分析法と化学分析法による分析値の関係

表2 加工コーンおよびコーン製品へのELISA法の適用

試料	(ppb)	ELISA法による測定値								化学分析
コーンスターチ	0.2	0.2								不検出
トリオース (黄)	0.7									"
コーングリッツ (白)	0.4									"
" (黄)	0.4									"
ポップコーン	1.1	0.9	2.1	1.5	2.1	5.3				"
" (ジャイアントタイプ)	125									"
スイートコーン										
" (缶詰、ホールタイプ)	—	—	0.2	0.3						"
" (缶詰、クリームタイプ)	—	—	—							"
インスタントスープ										
" (ポタージュ、粉末)	9.3	32.5	4.8	14.8	10.0	23.0	7.8	20.5		"
" (ポタージュ、液状)	1.0									"
クレーミングパウダー	2.9	5.0								"
マーガリン	—									"
ヤングコーン	—									"
コーンフレーク	3.5	12.0	4.0	8.5	1.6					"
スナック菓子	1.1	0.8	3.4	7.0	1.1	1.4	6.0	9.0	4.5	"

ての試料がAF不検出であったにもかかわらず、ELISA法では125ppb～不検出までの巾広い値となった。しかしながら、試料の種類や原料成分に注目すると、比較的類似の傾向が観察される。すなわち、コーンスターチ、コーングリッツ等のように、原料に対して単に粉碎、水処理調整をほどこした程度の加工コーン、並びにスイートコーン、ヤングコーンのように水煮加工した缶詰類については、すべて不検出ないしは0.5ppb以下の値が得られている。ところが、ポップコーン、インスタントスープ、コーンフレーク及びスナック菓子等について見ると、大多数の検体にかなり高い値が認められる。これらの製品については、製造過程で油脂、粉乳、香辛料、色素及び各種調味料等が添加されるため、抽出段階でこれら来雑物質の混入が生じ、その影響に起因すると考えられる。

3. 落花生及び落花生製品へのELISA法の適用<sup>13)</sup>

前項と同様に、落花生及び種々の市販落花生製品について、両分析法を適用した結果を表3に示す。化学分析でAFが検出されたのは、焙煎後粉碎加工を施した“粉末ピーナッツ”1検体のみであったが、ELISAでは全検体ともポジティブであった。ELISA値は183～1.2ppbの範囲に及んでいるが、コーン製品の場合と同様、各品

目別には顕著な類似傾向が表れている。表に見られるように、ピーナッツ菓子や味付ピーナッツのELISA値は高く、バターピーナッツ及びピーナッツバターについては1～2ppb程度の低い値となった。

これら高い値を示す菓子類は、原料豆に砂糖、小麦粉、色素、調味料等を加えているので、本分析のように水メタノール抽出により、当然混入されてくる。しかし、味付ピーナッツについては、原料に塩味を施し煎っただけなので、高い値の原因が渋皮からの抽出物に由来するとしか考えられない。一方、バターピーナッツ及びピーナッツバター等は、渋皮を除きヤシ油で揚げた後、バター、食塩、糖、ショートニング、クリーム及び乳化剤等を加えるので、分析時の抽出来雑物はかなり雑多と思われる。にもかかわらず、これらの製品が低い値を示す点は大変意外なことである。

ELISA法がこれら試料に対して見かけ上高い値を示す要因が、モノクローナル抗体へのCross Reactionなのか、あるいはマイクロプレートリーダー（波長492nm）に関する単なる発色妨害反応によるのかは今回の実験では確認できなかった。

表3 落花生及び落花生製品へのELISA法の適用

試料	(ppb)		ELISA法による測定値			化学分析
生落花生	8.5	13.8				不検出
いりぎや	4.0	5.0	6.5	5.5		“
味つけピーナッツ	43.0	35.0	63.0	53.0	48.0	“
バターピーナッツ	1.2	1.8	1.5	1.3		“
粉末ピーナッツ	3.3*	2.7**				B <sub>1</sub> 0.4* —**
ピーナッツ煎餅	23.0	29.0				不検出
ピーナッツ菓子(糖衣)	100	10.8				“
“ (マコロンビー、花豆)	63.0	61.0	25.0			“
“ (チョコレート衣)	183					“
落花生甘納豆	3.3					“
甘露煮ピーナッツ	1.2					“
ピーナッツバター	1.3	1.8	1.9	2.2		“
“ (ペーストタイプ)	1.2					“

4. 配合飼料へのELISA法の適用

今回分析した8種類の配合飼料は、豚、ニワトリ等の市販飼料であった。化学分析によると、表4の通り、低濃度ながらいずれの試料からもAFは検出され、AFB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>ともに確認された試料も2検体あった。全般的にELISA値は化学分析値を若干下まわる傾向が見られ、これは前述のAF汚染コーンの場合と非常に良く似ている。

また、ELISA法と化学分析法の定量値が、互いに近

似している試料は、その飼料中でコーンの配合割合(%)が比較的高いものに限られている。このことから、配合飼料中の種々の成分、すなわち麦類、きな粉、ぬか、ふすま、油かす、並びに魚粉、肉骨粉等については、ELISA法への妨害効果がほとんど無く、分析結果としては、むしろ多量に含まれるコーンの性質が顕著に現れることが判明した。

表4 配合飼料へのELISA法の適用

試料名	飼料中のコーンの配合率 (%)	その他の穀類*の配合率 (%)	ELISA測定AF値(ppb)	化学分析	
				AF-B <sub>1</sub> (ppb)	B <sub>2</sub>
子豚育成用配合飼料	50.7	26.7	5.7	6.1	0.6
肉豚肥育用配合飼料	53.3	26.0	1.0	3.3	
幼すう育成用配合飼料	68.7	0	1.0	1.2	
中すう育成用配合飼料	50.0	11.00	0.5	0.4	
成鶏飼育用配合飼料	46.7	19.0	4.8	5.7	1.1
成鶏飼育用配合飼料	44.1	20.0	1.3	2.1	
ブロイラー肥育前期用配合飼料	46.0	13.0	1.2	3.7	
ブロイラー肥育後期用配合飼料	57.0	8.0	1.4	1.6	

\* その他の穀類とは大麦、小麦、ライ麦、きな粉、ソルガム等

#### IV まとめ

AF検出の際、検査対象として最も重要かつ緊急性も高いコーン、落花生及びそれらの製品について、ELISA法の適用性を明らかにするために、化学分析法との比較検討を行った。

AF自然汚染コーンによる両分析法の比較解析では、2つの方法の間には強い正の相関性がみられた。

これらの分析法を、コーンと落花生の市販製品に適用したところ、両分析法の値の間にはかなりの開きが存在するが、ELISA法の値を各品目毎に調べると、データに類似の傾向が観察され、コーングリッツ、コーンスターチ、スイートコーン（缶詰）、バターピーナッツ及びピーナッツバター等に限れば、來雜物による“正の妨害効果”は比較的低いものであった。

ELISA法を、コーンの配合率の高い配合飼料に適用したところ、來雜物の影響はほとんど無く、原料コーンの分析結果と類似していた。

したがって、ELISA法は、分析対象品目を限定すれば、ガイドラインレベルでのスクリーニング法として活用され得る見込があり、さらに前処理操作を工夫すれば、より広範な品目に適用できる可能性を備えている。

#### 謝辞

研究を行うにあたり、有益なご助言及び文献等いただいた食品薬品安全センター、粟飯原景昭部長、並びに国立衛生試験所、一戸正勝室長に深謝いたします。また、分析試料の一部をご供与下さった千葉県農業化学検査所、大橋眞一課長に深謝いたします。

なお、本研究の一部は、厚生省がん研究班における

「生体高分子結合型アフラトキシンの免疫学的試験法」の分担研究として行われたものです。

#### 文献

- 1) Pestka, J.J., Gaur, P.K., and Chu, F.S.: Quantitation of aflatoxin B<sub>1</sub> and aflatoxin B<sub>2</sub> antibody by an enzyme-linked immunosorbent microassay, Appl. Environ. Microbiol., 40, 1027-1031, 1980.
- 2) Wild, C.P., Pionneau, F.A., Montesano, R., Mutiro, C.F., and Chetsanga, C.J.: Aflatoxin detected in human breast milk by immunoassay, Int. J. Cancer, 40, 328, 1987.
- 3) 上野郁子: 免疫測定法によるかび毒の検出—モノクロナール抗体使用による進展—, 防菌防黴, 14, 9-16, 1986.
- 4) Chu, F.S., Fan, T.S.L., Zhang, G., and Xu, Y.: Improved enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B<sub>1</sub> in agricultural commodities, ibid., 70, 854-857, 1987.
- 5) Cole, R.J., Dorner J.W., Kirksey, J.W. and Dowell, F.E.: Comparison of visual, enzyme-linked immunosorbent assay screening, and HPLC methods in detecting aflatoxin in farmers stock peanut grade samples, Peanut Science, 15, 61-63, 1988.
- 6) Ueno, I.: A simple and improved enzyme-immunosorbent assay method for microquantitation of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanuts and blood plasma, Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxcol., 21, 24-27, 1985.

- 7) 検疫所業務管理室長,「米国から輸入されるとうもろこしの取扱いについて」, 衛検第244号, 昭和63年10月5日(通知)
- 8) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三, 上野郁子, 祓川貴美江, 上野芳夫: コーヒー豆中のアフラトキシン疑似物質について, マイコトキシン, 17, 62, 1983.
- 9) 矢崎廣久, 高橋治男, 小倉 廣, 太田原美作雄: 酵素免疫測定法によるアフラトキシン分析について, 第27回千葉県公衆衛生学会講演要旨, 71, 1989.
- 10) Itoh, Y., Hifumi, E., Sudoh, K., Uda, T., Ohtani, K., Kawamura, O., Nagayama, S., Satoh, S., and Ueno, Y. : Detection of aflatoxin B<sub>1</sub> by direct ELISA, *ibid.*, 26, 31-35, 1987.
- 11) Kamimura, H., Nishijima, M., Yasuda, K., Ushiyama, H., Tabata, S., Matumoto, S., and Nishijima, T. : Simple, rapid cleanup method for analysis of aflatoxins and comparison with various methods, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68, 458-461, 1985.
- 12) 田端節子, 上村 尚, 田村行弘, 安田和男, 牛山博文, 橋本秀樹, 西島基弘, 二島太一郎: アフラトキシンの食品汚染実態とその推移, *食衛誌*, 28, 395-401, 1987.
- 13) Dorner, J. W. and Cole R. J. : Comparison of two ELISA screening tests with liquid chromatography for determination of aflatoxins in raw peanuts, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 962-964, 1989.