

中部大学博士（応用生物学）学位論文

グローバル化する食に対応する  
危害要因物質分析法の構築

Construction of analytical methods for hazardous  
substances to respond for globalization of food

菊川 浩史

2022 年

グローバル化する食に対応する  
危害要因物質分析法の構築

Construction of analytical methods for hazardous  
substances to respond for globalization of food

2022 年 3 月

中部大学大学院 応用生物学研究科

菊川 浩史

# 目次

## 第1章 本研究の背景

1.1 社会的背景	1
1.2 危害要因物質の分析	10
1.3 分析法の性能評価	19
1.4 危害要因物質分析の課題	23
1.5 本研究の目的	26
引用文献	28

## 第2章 農産物に残留するピピリジニウム系除草剤分析の

### 酵素可溶化法に関する研究

2.1 緒言	31
2.2 実験方法	39
2.3 結果及び考察	51
2.4 結言	56
引用文献	58

## 第3章 オクラトキシン A のオンレジン直接蛍光測定法に

### 関する研究

3.1 緒言	61
3.2 実験方法	64
3.3 結果及び考察	68
3.4 結言	76

引用文献	79
<b>第4章 総括</b>	
結語	84
投稿論文	88
謝辞	89

# 第1章 本研究の背景

## 1.1 社会的背景

### 1.1.1 地球環境的課題

気候変動による気象災害が世界中で顕著になっている。2021年9月、国連気候変動枠組条約第26回締約国会議(いわゆるCOP26)が開催された。このCOP26では、世界の平均気温の上昇を「産業革命前から1.5度に抑える努力を追求する」[1]ことが謳われ、石炭火力の段階的削減努力という目標が設定されたが、気候変動政府間パネル(IPCC6次報告書)の中では、現在のような化石燃料での同様な経済発展が継続する場合、つまり最悪の社会経済シナリオであるSSP5-8.5(放射強制力 $8.5\text{ W/m}^2$ )となった場合、2100年には、産業革命前に対して、 $3.3\sim 5.7\text{ }^\circ\text{C}$ 、平均 $4.4\text{ }^\circ\text{C}$ の平均気温上昇が懸念されている[2]。これは2021年に対しても、 $3\text{ }^\circ\text{C}$ 程度の上昇となる。地球温暖化によって、農産物の温度耐性に対しての直接影響も懸念されるが、これまで気温が低い時期に生育が阻害されていた病虫害、微生物などの生育環境へ至適化していく可能性も示唆される(図1-1)。

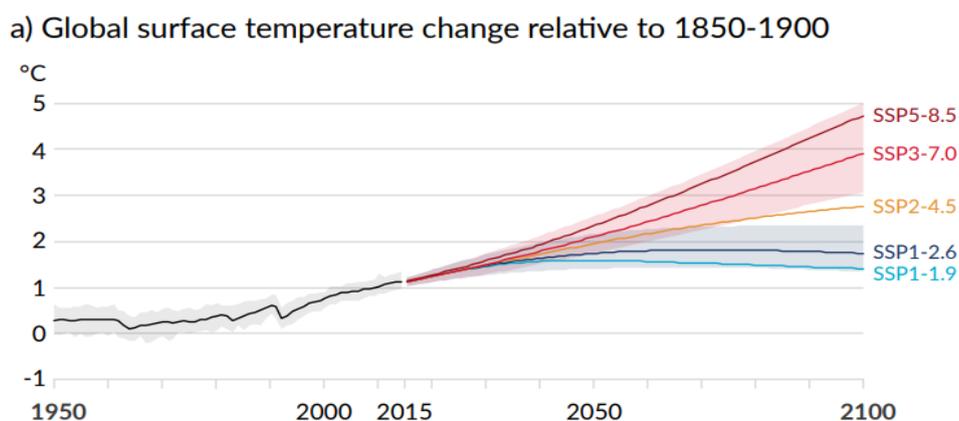


図 1-1 各社会経済シナリオ(SSP1~5)における温暖化の予測

出典：IPCC AR6/WG1 報告書

温暖化は特に低緯度地域で顕著に表れ、また地球全体的な観点としては降水量の増加をもたらす[3-5]。温暖化と多湿化は、昆虫、微生物にとっては好条件になり[6]、農産物への病害虫の増加とこれに伴う農薬などの使用の拡大を招くことが懸念される。また懸念は農産物の栽培中のみの問題にとどまらない。食品の貯蔵、輸送時の微生物汚染やカビの発生に伴うカビ毒の産生にとっても好条件となっていく[7]。

### 1.1.2 国際社会的課題

2015年9月の国連サミットで採択された持続可能な開発目標（Sustainable Development Goals [SDGs]）は、加盟国である日本も外務省を通じて積極的に取り組むことが明示されている。持続可能な開発目標として、採択されたSDGsの17の目標と、その中で、食品分野において特に関与し、寄与できると考える開発目標8つを先の地球温暖化を含め、図1-2に示した。

世界人口の増加は、2021年の78億7500万人に対し、2050年に97億人（23%増）2100年109億人（38%増）が見込まれている[8]。このような中、特に人口の増加が著しい開発途上国において、食品生産性の向上が求められるが、先の地球温暖化の影響から、病害虫や微生物に対する農薬の使用拡大が考えられる。農薬は、1938年のガイギー社によるDDTの殺虫活性の発見を発端として、多くの農薬が開発された。現在、1000種を超えるといわれる農薬であるが、世界各国での80年を超える実使用の中で危険性、あるいは安全性が、時には犠牲を払いながら検証され、現在ではADIなどの科学的知見に基づき、各国ごとの摂取状況とともに評価され、残留基準値が定められている。生産性向上を名目に、安全性を度外視した使用があってはならない。カビ毒の問題はさらに深刻である。カビ毒は、カビの発生に伴い産生される毒素であり、最も代表的なものとしてアフ

ラトキシンが挙げられる。アフラトキシンは1960年に英国で七面鳥が大量死した際に発見され、2020年12月においても米国においてドックフード原料のトウモロコシ汚染によって70頭以上の犬が亡くなっており、未だに汚染を防ぐ実用的な方法が見いだせていない。2004年には、ケニアにて人への中毒事件も起こっており、100名を超える死亡者を出すこととなった。人口増加は開発途上国が中心となるが、このような国は、衛生的なインフラが整備できていないことが多く、カビ毒汚染の可能性はさらに高まる。国連食糧農業機関（FAO）は、2020年に世界で飢餓に苦しんだ人は7億2040万～8億1100万人と推計する報告書を公表した[9]。新型コロナウイルス感染症（COVID-19）流行以前の2019年と比較して1億人以上の急増を伴っている。このような背景をもとに、食わずに死ぬか、食べて死ぬかの選択を迫るような国際社会ではいけない。規制値を超えて危害要因物質を含有する食品が、飢餓に苦しむ国への移送・販売などが行われるようなことは絶対に起こってはいけないことである。

一方で、曖昧な（感覚的な）不安によってゼロリスクを求めて、化学物質の一斉排除は現実的でない。我々はその化学物質の危険性、安全性を「正しく」把握し、その危険度と利益度（リスクとベネフィット）を賢く選択することが重要である。2020年から世界を席卷した、COVID-19と急ぎ開発されたワクチンの接種是非の関係と同様だと考えられる。国際的な危害要因物質に対する規制値の設定とその残留量の「確実」な把握を進めることにより、SDGsの目標1,2,3,10の達成に寄与することが可能となる。

世界人口は増加している中、我国の人口は年々減少しており、2050年には1億人を下回る可能性も示唆されている[10]。すでに我国では、現在の人口においても食品が飽和し、食品ロスが食品業界としては深刻な問題となっており、技術的な期限延長の努力のみならず、賞味期限の年月日表示から年月表示化など、

消費者の理解とともにロス削減に取り組んでいる。2020年度の農林水産省の報告によると、可食な食品廃棄物は、食品関連事業者と一般家庭を合わせると600万トン（2018年度）[11,12]と推定されており、これは世界全体が飢餓に苦しむ国への援助の食料量の約2倍である。SDGsの目標12では、2030年（残り8年）で食料廃棄を半減、損失を減少させることがグローバル指標[13]とされており、飽和する我国の品質の高い食品を積極的に輸出するべき時に来ている。

全ての食品は、地球環境の恵みを受けて得られるものである。食品ロスの低減は、乱獲や不要な開墾の防止、廃棄に使用されるエネルギーの削減が可能となり、SDGs目標の13, 14, 15に寄与に大きく貢献する。



図 1-2 SDGs 17 の開発目標と食品分野が特に寄与できると考える目標 8 つ

(赤枠)

### 1.1.3 日本食のグローバル化

日本の「和食：日本人の伝統的食文化」は、2013年の12月にユネスコの無形文化遺産として登録された。その食文化としての物珍しさもあり、海外においても「Sushi」「Sukiyaki」などを筆頭に、近年では、「Onigiri」「matcha」など、そのまま日本語の名称が通じる食・食品も多くある。また、日本の食品の多様性は世界的にも類を見ない。農産物においては品種改良を重ね、原種がもちうる糖度を大きく超えた果実や野菜の開発、菓子類や加工食品においてもブランド化された定番商品だけでなく、期間限定の味や、例えば、先の抹茶のように各食品とのコラボレーションにより付加価値をつけるもの、企業間での有名ブランド同士のコラボレーション、用途に応じた専用の調味料、海外の食を日本人の嗜好に合わせるアレンジなど、およそ国外の食品企業ではこのような付加価値は考えにくく、食品については、日本は他国を完全にリードした先進国であるといえる。

それは安全性においても同様で、2020年6月に日本においてもHACCPに沿った衛生管理の制度化が実施された。HACCPの制度としての導入は世界から遅れたが、もともと日本の食品製造業におけるベースとしての衛生管理については、戦後直後の1947年（昭和22年）の食品衛生法導入以来、自国民への食の安全・安心を提供するため、その潔癖症ともいえる国民性も後押しし、世界一であるといえる。このような日本の食・食品については、海外からも当然注目され、農林水産省の報告によると2012年度の4,497億円から2020年度の9,860億円と8年で食品の輸出金額は倍以上の伸びを示している（図1-3）[14,15]。また、本2021年度は、すでに1-11月の累計で、1兆779億円に達しており、その輸出金額は、増加の一途をたどっている [16]。

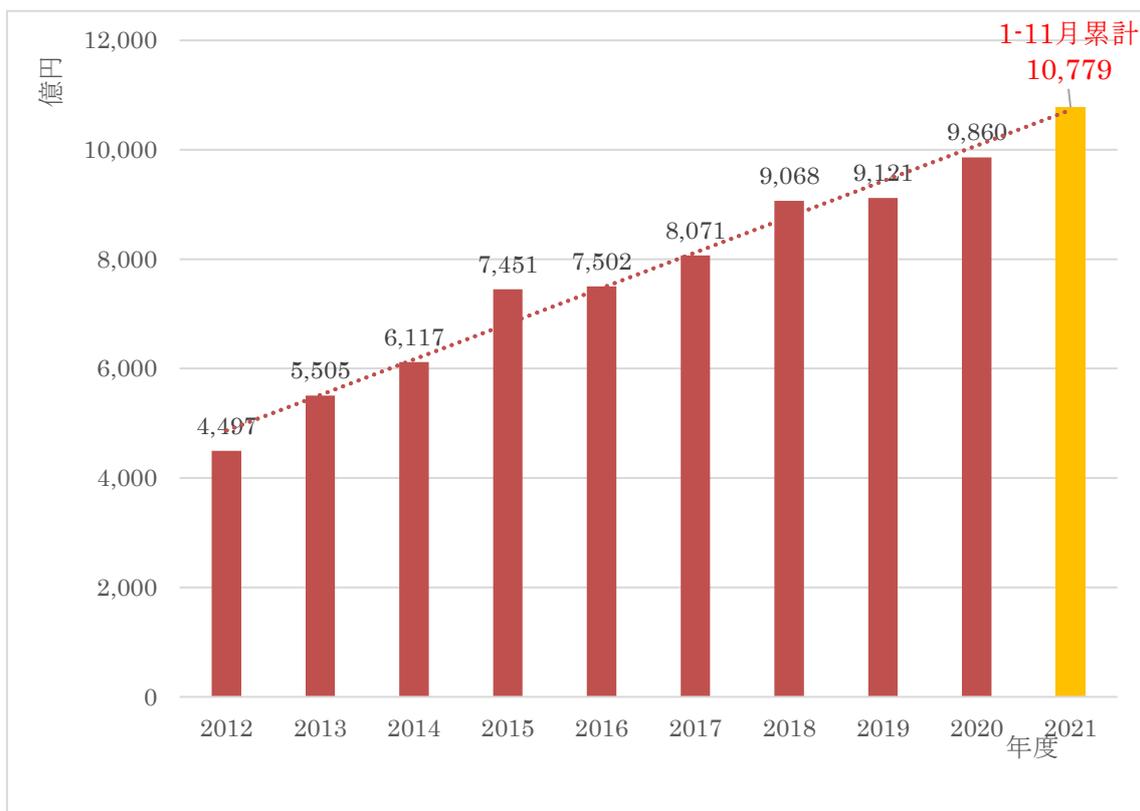


図 1-3 我国の農林水産物の輸出額の推移

出典：「農林水産物・食品の輸出額」農林水産省

しかしながら、一方で日本は肥沃な国土を持ちながら、残念ながら食品原料となる穀類などの大規模生産には至らず、多くを国外からの輸入に頼っている。カロリーベースでは、2020年度で37%であり、畜産食品を生み出す家畜用飼料や、同様に食品原料となるような穀類・油脂類については、基本的には輸入に頼っている現状がある。自給率50%を超えるのは、米、野菜、魚介類程度となっている(図1-4) [17]。EUでの大規模農業の成功例としてオランダの実例が語られることは多い。オランダは九州とほぼ同等の国土でありながら、輸出用の農産物を限定、特化して栽培することで付加価値を高め、近隣の高所得国への販売を積極的に行い、世界第二の農産物出荷国となっている。他の食材に関しては各国からほぼ同量の金額の輸入も行っており、付加価値の高い農産物を出荷し、同様に付加

価値の高い食材を輸入する EU らしいサプライチェーンが敷かれている [18]。日本の現状を鑑みた際も同様なことが考えられる。今後、より戦略的に食品原材料を輸入し、肥育や加工を行い、付加価値を高めて積極的に輸出するといったグローバル化（EU のような国際的なサプライチェーン）に意識を向けていくことが必要である。特に「食欲」は人の根幹的な三大欲の一つであり、世界人口の増加とともに価値ある食品はその需要が高まると推測される。これまで日本の輸出産業として、工業製品がけん引してきたが、これに代わり、食品が今後の日本の主たる輸出産業としての期待が高まっていくと考えられる。

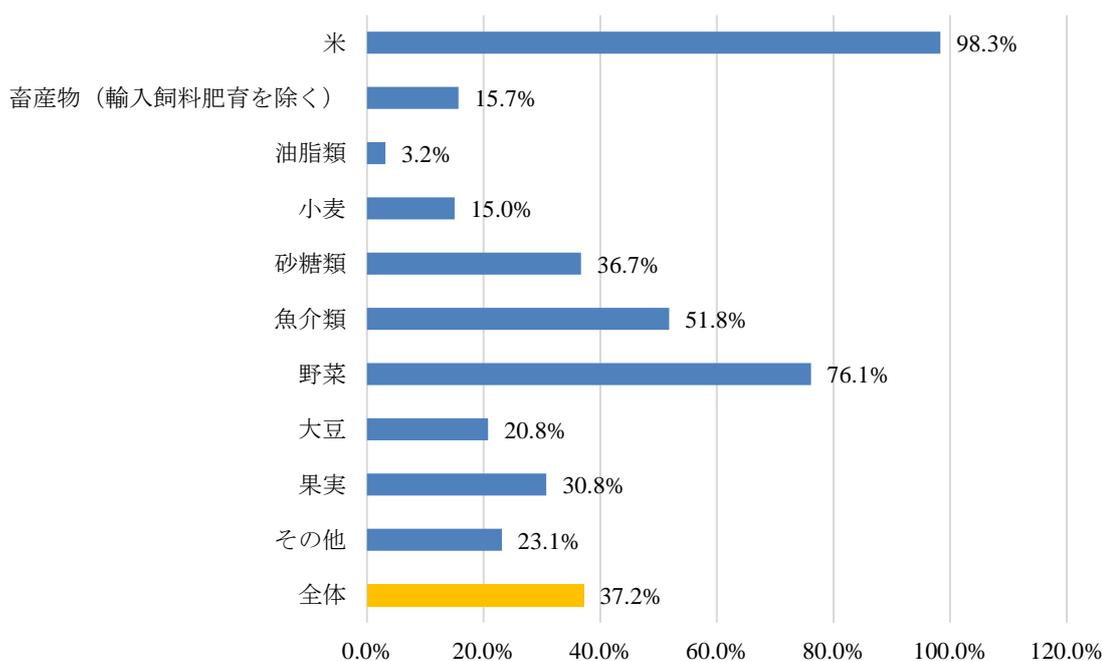


図 1-4 我国のカロリーベースの食料自給率（2020 年度）

出典：「令和 2 年度食料自給率・食料自給力指標について」農林水産省

#### 1.1.4 日本における食のハザードごとの不安程度

日本国民が、現在の食に対してどのような不安を感じているかを理解するために、食品安全委員会が実施した 2020 年度食品安全モニター課題報告「食品の安全性に関する意識等について」の概要を確認すると、カビ毒、残留農薬については、長く有機化学物質としての危害要因の 2 大不安要素になっている。

特に 2020 年度に 2 位に躍進しているカビ毒が顕著な例ではあるが、その不安選択の理由が、「危険性・有害性を示すデータを見て」が最も多くなっていることも特徴である [19]。

これまで危害要因に対して不安を感じた情報源としては、ニュースなどの報道からという回答が多くを占めてきたが、近年の偏った情報（ネット、SNS など「不確か」な情報が氾濫している現状）を鵜呑みにすることの危険性に気が付き、科学的知見に基づいたハザードの判断が、徐々に根付いてきた証拠ともとれる。

この「食品の安全性に関する意識等について」におけるアンケート結果は、あくまでも日本人が自国で食するうえで、という範疇での結果を示すものであるだろうが、今後のさらなる国際的サプライチェーンへの移行という流れから考えると、自国で感じる食への不安は、そのまま他国へ与える食への不安に直結することとなる。すでに自国と他国の不安が時を経ずに直結する国際社会であることは COVID-19 によって証明されている。食品中に含有する危害要因物質として、残留農薬とカビ毒に対する不安は、日本のみでなく、世界各国で抱えている不安であるといえる。

表 1-1 食品の安全性の観点から感じるハザードごとの不安の程度

(出典：食品安全委員会報告書をもとに加工)

年度	1位	2位	3位	4位	5位	6位	7位
2020	有害微生物	<b>カビ毒</b>	いわゆる健康食品	汚染物質（有害金属など）	家畜用抗生物質	<b>残留農薬</b>	容器包装からの溶出化学物質
	83.2 %	<b>72.5 %</b>	60.5 %	59.4 %	57.4 %	<b>56.3 %</b>	55.5 %
2019	有害微生物	家畜用抗生物質	いわゆる健康食品	<b>カビ毒</b>	アレルギー	汚染物質（有害金属など）	容器包装からの溶出化学物質
	85.1 %	66.1 %	62.6 %	<b>61.9 %</b>	59.9 %	53.9 %	52.8 %
2018	有害微生物	家畜用抗生物質	いわゆる健康食品	<b>カビ毒</b>	アレルギー	汚染物質（有害金属など）	放射性物質
	86.7 %	66.9 %	64.9 %	<b>64.6 %</b>	61.8 %	60.9 %	54.0 %
2017	有害微生物	いわゆる健康食品	<b>カビ毒</b>	家畜用抗生物質	アレルギー	放射性物質	汚染物質（有害金属など）
	83.4 %	63.6 %	<b>62.0 %</b>	59.1 %	56.5 %	55.7 %	51.9 %
2016	有害微生物	いわゆる健康食品	<b>カビ毒</b>	家畜用抗生物質	放射性物質	アレルギー	汚染物質（有害金属など）
	82.8 %	61.7 %	<b>61.5 %</b>	59.1 %	56.5 %	55.7 %	51.9 %
2015	有害微生物	いわゆる健康食品	放射性物質	汚染物質（有害金属など）	家畜用抗生物質	<b>残留農薬</b>	食品添加物
	75.7 %	64.4 %	58.4 %	53.2 %	51.8 %	<b>51.3 %</b>	48.0 %
2014	有害微生物	放射性物質	いわゆる健康食品	<b>残留農薬</b>	家畜用抗生物質	汚染物質（有害金属など）	食品添加物
	78.5 %	64.1 %	64.1 %	<b>58.8 %</b>	55.4 %	53.6 %	50.4 %
2009	有害微生物	汚染物質（有害金属など）	<b>残留農薬</b>	家畜用抗生物質	容器包装からの溶出化学物質	遺伝子組み換え	食品添加物
	79.6 %	78.1 %	<b>73.1 %</b>	68.2 %	67.5 %	64.6 %	62.5 %
2004	汚染物質（有害金属など）	<b>残留農薬</b>	家畜用抗生物質	有害微生物	食品添加物	遺伝子組み換え	BSE
	91.7 %	<b>89.7 %</b>	83.5 %	80.9 %	76.4 %	74.7 %	74.5 %

## 1.2 危害要因物質の分析

### 1.2.1 安全性の担保としての「分析」

このように自国のみの問題ではなくなっている食の安全性は、その担保する主たる手段として、「分析」に基づいた結果による判断ということとなる。上記のような社会的背景の中で、食に関する課題を解消するためには、食品中の危害要因物質の確実な「把握」が必要とされる。本研究では、この不安要素として関心の高い、残留農薬とカビ毒について着目することとした。

農薬は原則、農作物の収穫までに使用されるものであるため、一部、ポストハーベスト農薬（防黴目的）の使用がなければ、収穫直後の残留量分析によって安全性を確認すれば、安心な食生活が期待できることになる。農作物の栽培では、時期を変え、多種の農薬を使用することもある。または、非意図的に近隣で散布された農薬のドリフトによる汚染なども考えられる。このため、栽培時に使用された農薬を網羅的に、かつ確実な量を測定し、規制値との比較、判断できる結果が得られる技術が必要となる。

一方、カビ毒汚染は、農産物の栽培・収穫から、食卓に上るまでいずれの段階でもカビ生育に伴う発生リスクがあり、どの場面においても対応ができる迅速に汚染の有無の判断ができることが必要となる。

よって、この農薬とカビ毒という 2 つの危害要因物質は、有機化合物の微量分析という観点で見た場合は同じカテゴリーではあるが、その期待される分析法の性質・性能が異なることとなる（図 1-5）。

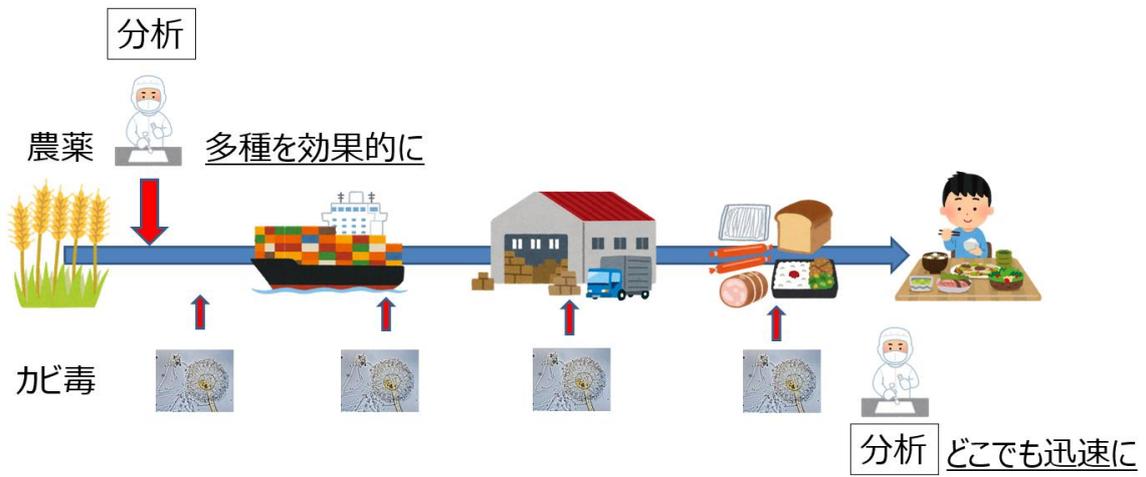


図 1-5 農薬とカビ毒の期待される分析法の性質・性能の違い

## 1.2.2 危害要因物質の分析法

食品中の危害要因物に対する分析法の概要を図 1-6 に示し、その概要を解説する。

### ①試料の均一化



試験部位の採取



粉砕

### ②抽出

分析対象物質の抽出

振とう  
ホモジナイズ



### ③精製

マトリクス除去



LLE



SPE

### ④測定・解析

分析対象物質の検出・定量



GC-MS/MS



LC-MS/MS

図 1-6 食品中の危害要因物質の分析法の概要

### 1.2.1.1 試料の均一化

試料から分析対象部位を取り出し、粉碎して均一化する工程である。分析対象物質が食品全体に均一に存在することはなく、部位によって濃度差が生じる。残留した農薬は、その農薬の特性により、表面に多く残るものや作物に浸透し移行するため組織内に多く残るもの、また、カビ毒は、カビが発生した部位に局在して残留する。このような事由から、汚染に個体差も生じる。分析対象物質の局在や試料の個体差を考慮して、分析結果が試料全体の代表となるよう試料を均一化することは分析結果の良否を分ける重要なポイントである。また、均一化の過程で粉碎時の熱や作物自身の酵素などの成分により分析対象物質が分解することもあるため、分析の対象とする化学物質の物性を考慮して適切な処理を実施する必要がある。また粉碎した試料が粗ければ、抽出時の溶媒との接触機会を妨げることとなり、抽出の効率が落ちることへの配慮が必要となる。

### 1.2.1.2 抽出

抽出は、測定対象とする分析対象物質の化学的物性に基づき、主に極性という指標に合わせて溶解しやすい溶媒を選択することになる。試料と適切な溶媒との混合により、試料中の分析対象物質を溶媒中に溶解、移行させ、取り出すことが目的である。けれども分析対象物質以外の成分(以下、マトリクスと呼ぶ)は、極力抽出はしたくない。なぜなら、マトリクスは全て測定の正しさを阻害する要因となりうるからである。しかし、都合よく分析対象物質のみを確実に抽出できる溶媒は存在せず、常識的には分析対象物質と、これと類似な極性を持つマトリクスも同時に抽出し、取り出した後に可能な限り分析対象物質のみが存在し得るような精製を行い、マトリクスを除去することになる。抽出法、ないしは抽出溶媒の選択は、分析対象物質を効率的に抽出しながら、マトリクスを極力抽出し

ない選択が重要となる。しかしながら、農薬は、農産物を病害虫から守ることを目的として散布される。即効性は当然必要であるが、ある期間の薬効の持続性も期待されるため、作物表面への吸着力を持つものもあれば、根を通じて植物組織内に浸透移行し薬効を持続するものもある。よって、溶解性の高い溶媒を用いれば速やかに、容易に抽出されるというほど簡単ではない。振とう機によって高速に溶媒と試料の積極的な接触機会を与えることや、ホモジナイザーなどによって物理的にも植物組織を一部削りながら接触機会を増やすような操作が必要となることが多い。そのようなことから、分析対象物質を十分に抽出するには、分析対象物質類似の極性を持つ物質も含めて、物理的な力も借りて抽出することが必要となる。また、試料の持つ水分との混和性も必要となるため、アセトン、アセトニトリルやメタノール、及びこれらの混液が好まれることになる。なお、乾燥試料は、水分の介在無くしては、抽出効率が落ちることが 1960 年代から指摘されており [20]、生鮮時の水分量に相当する水を加える、いわゆる「生戻し」操作を行わなくてはならない。また、分析対象物質が疎水性で、油脂の多い試料からの抽出には、メタノールやアセトニトリルなど油脂との混和が十分でない溶媒を使用すると疎水性の分析対象物質の抽出率が落ちることもあり、効果的な抽出には課題が多い。

抽出法は、試料と溶媒との混合による振とう、ホモジナイズなどを使った方法が一般的な分析対象物質に対して用いられるが、一部このような柔和な抽出法では抽出しきれない分析対象物質も存在する。一部の試料への吸着が著しく強く、安定である分析対象物質では、加熱や強酸、強塩基での連続抽出を余儀なくされるもの存在する。

その他、食品中の危害要因物質の抽出に用いられる抽出法（装置）とその特徴を表 1-2 に示す。これらの抽出法は、安定性の高い物質には効果的であるが、大

型な装置となり、また、高温や高圧の危険性が伴う。

表 1-2 食品中の危害要因物質の抽出に用いられるその他の装置

抽出法・抽出装置	主な特徴
ソックスレー抽出装置 (SE: Soxhlet extraction)	分析対象物質より揮発性の高い溶媒をサイフォン形式で連続的に溶媒に抽出する装置、ダイオキシンなど疎水性で安定な物質の抽出に用いられる。トルエンなどを用いて 16 時間の連続抽出 (20 サイクル) が行われる。
高速溶媒抽出装置 (ASE: Accelerated Solvent Extraction)	試料を入れたセル内に高圧で有機溶媒を流すことにより、より溶媒を浸透させ抽出する装置。非常に効果的に抽出可能であるが、同時に多くのマトリクスも抽出され、後の精製に苦労が生じる。圧力や温度に不安定である物質には向かず、ダイオキシンでの実用例がある。
超臨界抽出装置 (SFE: Supercritical Fluid Extraction)	臨界状態の二酸化炭素を溶媒として抽出する。溶媒が常圧・常温では気体であるため、溶媒留去が容易であるが、二酸化炭素を溶媒と見た場合の極性は炭化水素 (ヘキサン) と同程度であるため抽出可能な分析対象物質は制限をうける。一部、アセトンなどの中極性溶媒を添加し、抽出助剤として中極性農薬の抽出に適用した例がある。
マイクロ波抽出装置 (MAE: Microwave Assisted Extraction)	密閉容器内にマイクロ波を照射することにより、水分子が振動し、摩擦熱によって、容器内の圧力と温度が上昇することを利用し抽出する。酸を入れ、酸分解をしながら抽出する無機元素に最も使用される。圧力と熱に不安定な物質には向かない。

### 1.2.1.3 精製

マトリクスとともに抽出された分析対象物質を測定するにあたり、全てのマトリクスは測定を干渉する要因となりうる。分析法として、使用意図に合致する測定結果が得られる性能 (分析法の性能については後述する) を持ち得るまでの除去が必要となる。

危害要因物質の精製については、「液液抽出」と「固相抽出」を用いた 2 種類に大別され、多くの分析法に用いられる。

#### 1.2.1.4 液液抽出（LLE: Liquid-liquid extraction）を用いた精製

交じり合わない 2 液間における分析対象物質の分配比を利用した精製法である。最も一般的に行われるのは水と水に混和しない有機溶媒へ抽出液を入れ、分配させることで、分析対象物質を有機溶媒層へ移行させる操作（いわゆる転溶操作）である。分配平衡に達する時間を早めるため振とう操作を繰り返し、静置して溶媒を分離した後、有機溶媒層を採取する。LLE により抽出液中に含まれる糖類などの水溶性マトリクス、及び水分を除去できる。また逆に、分析対象物質の極性が高い場合は、水層を採取することで、有機溶媒層に、油脂類など疎水性マトリクスを除去するように使う場合もある（図 1-7）。

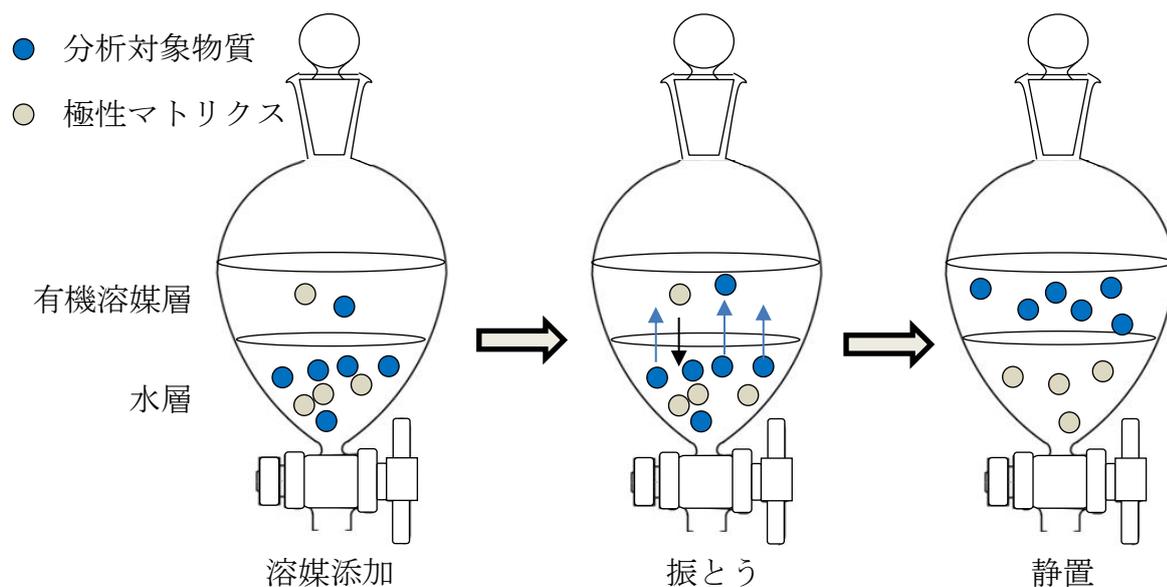


図 1-7 LLE を用いた有機溶媒層への分析対象物質の移行方法

よく有機化合物の極性指標として用いられる  $\log P_{ow}$  値も、オクタノールと水の 2 液間の溶質の分配比を対数化したものである。

### 1.2.1.5 固相抽出（SPE: Solid Phase Extraction）を用いた精製

固相抽出はクロマトグラフィーの分離技術を用いた精製法である。過去は、固相を溶媒に懸濁させ、カラム管に充填するいわゆるオープンカラムという方法が用いられてきたが、近年では細かな粒子で、ポリプロピレンカートリッジ等に充填されたミニカラムが主流となっている。オープンカラムに対して、負荷できる試料量は少なくなるが、分離の安定性は高く、溶出に使用する溶媒量は非常に少なくできるメリットがある。ミニカラムの多くは乾燥状態で販売されているため、事前に溶媒等に湿潤（コンディショニング）させ、固相と通液させる試料液との十分な接触機会を得られるようにしてから使用する必要がある（図 1-8）。

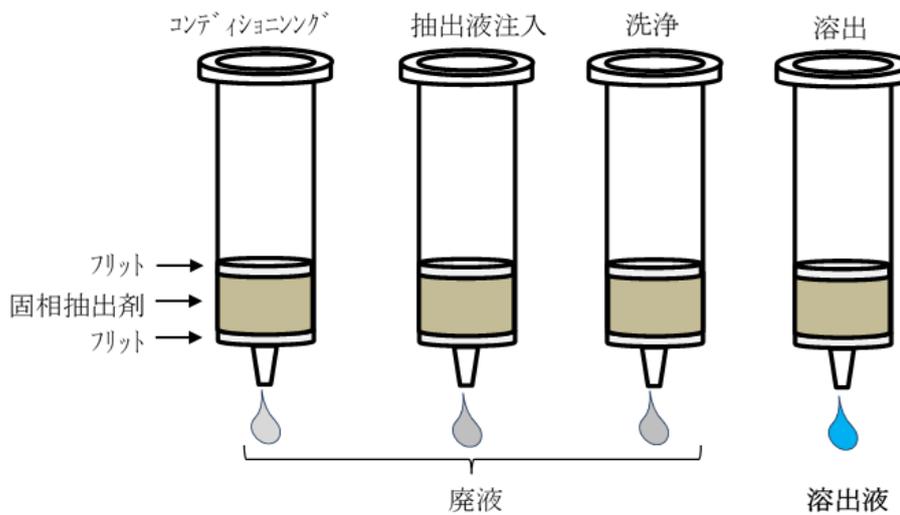


図 1-8 カートリッジカラムの使用方法

主な充填剤の固相抽出の分離原理を表 1-3 にまとめた。

また、近年では担体にモノクローナル抗体を固定化した充填剤をミニカラムに充填したイムノアフィニティーカラムが開発されており、特にカビ毒の分析によく利用されている。選択性の高い抗原抗体結合を利用するため、他の精製法の数百から数千倍のマトリクス除去効果があるとも言われている。

表 1-3 食品分析の固相抽出に利用される主な充填剤

分離原理	主な充填剤	使用法・特徴
逆相（疎水性相互作用）	C18 (Octadecyl) C8 (Octyl)	極性溶媒に溶解した試料液を通液することで疎水性マトリクスを除去する。脱脂目的で多用される。
順相（極性相互作用）	Si (Silica) Al (Aluminina) Fl (Florisil)	極性の低い分析対象物質の精製のため、試料液から極性物質の除去を目的に使用する。もしくは分析対象物質を保持させ、低極性溶媒で洗浄することで油脂分を除去する。GC 測定のためのマトリクス除去には効果が高い。
イオン交換	SCX (Benzenesulfonic acid) SAX (Quaternary ammonium) CBA (Propylcarboxylic acid) PSA (Ethylenediamine-N-propyl) NH <sub>2</sub> (AminoPropyl)	SAX,SCX のような強イオン性の充填剤は分析対象物質の脱着に使用されるが、PSA、NH <sub>2</sub> は溶媒に溶解した脂肪酸の除去などを目的に逆相とイオン交換の中間的效果を期待し、使用される。
吸着	GC (Graphite Carbon) AC (Activated Carbon)	物理構造に大きく依存し、多環芳香族で平面構造を持つものの吸着が極めて高い。農産物試料クロロフィル除去に効果が高い。溶出には同様にベンジル構造を持つトルエンなどが必要となる。
イムノアフィニティー	IA (Immunoaffinity)	抗原抗体結合を利用したカラムで、基本的に目的の物質のみが結合するため極めて精製効果が高い。高額で高い濃度の有機溶媒などは使えないなど取り扱いには注意を要する。使用期限も短い。
ゲルろ過	GPC (Gel Permeation Chromatography)	多孔性粒子を充填することで、分子量（分子サイズ）による分離が可能。分析対象物質の極性に依存する他の固相と精製原理が異なるため、別角度からの精製効果を生むが、大型の装置となる。

### 1.2.1.6 測定

危害要因物質の測定では、微量分析となることから主に、ガスクロマトグラフ (Gas Chromatograph : GC)、もしくは高速液体クロマトグラフ (High Performance Liquid Chromatograph : HPLC) と質量分析計 (Mass Spectrometer : MS) を接続した装置を使用する。精製工程においてもマトリクスを完全に除去することは困難であるため、クロマトグラフィーにより分析対象物質とマトリクスを分離する必要がある。機器に注入した試料溶液中の物質は分析カラム上でクロマトグラフィーにより分離され、カラムから溶出した物質は検出器によって検知される。検出器の応答値は物質の濃度に比例するため、濃度既知の標準物質と比較を行うことにより定量分析が可能となる。GC、HPLC では分析カラムからの溶出時間 (保持時間) が標準物質と一致することにより物質の定性が可能である。しかし、低濃度測定を求める危害要因分析では、測定上の妨害となるマトリクスからの回避のため、2段階の MS フィルターでの分離 (MS/MS) や高分解能 (TOF、磁場型) などの機器が必要となるが、大型でさらに高額なところがデメリットとなる。

## 1.3 分析法の性能評価

### 1.3.1 分析法の性能評価のパラメータ

分析法の性能はバリデーション (妥当性確認) によって評価される。妥当性は、分析法が使用する意図に合致している程度 (Fitness for purpose) を示すものであるが、国際的にも表 1-4 のパラメータについて確認されることが概ね合意されている。

表 1-4 分析法の妥当性を確認する性能パラメータ

性能パラメータ	概要
選択性	他の成分と間違えることなく測定できる能力
検出限界・定量下限（上限）	検出できる最低量・適切に量を計れる最低（最高）量
直線性	標準品との比較で量を換算する検量線を用いる場合のその検量線の直線範囲
真度（回収率※）	分析値がもつ「かたより」の程度  ※本来、真度は、「真値とされる量」との近さのことだが、標準品を意図的に添加した試料を分析して得られる「回収率」をやむをえず代用とすることも多い。
精度	分析値がもつ「ばらつき」の程度のこと、精度には、併行精度、室内精度、室間精度がある。
併行精度	同じ分析法を用い、同じ試験室、同じ分析者が、同じ測定機器を用い、同時に実施した場合のばらつき
室内精度	同じ分析法を用い、同じ試験室、違う分析者が、違う測定機器を用い、違う時に実施した場合のばらつき（違う条件は一つまたは複数）
室間精度	同じ分析法を用い、違う試験室で実施した場合のばらつき ※ばらつきは、一般的に、併行精度<室内精度<室間精度となる。
範囲	妥当な結果が測定できる試料の濃度範囲
堅牢性	施設環境（人、機器、設備など）の変化に対して安定した分析値が得られる程度

危害要因物質の分析については、まず、マトリクスと分析対象物質を見分ける

力「選択性」が求められる。危害要因物質は、ごく低濃度測定が必要があるので、必要な感度、言い換えるなら低い「検出限界」は物質存在の有無の判断に必要であるし、人体影響がある危害要因物質においては、その含有量が重要となるため十分に低い「定量限界（下限）」が必要となる。

規制値判断においては、規制値との一点のみで比較し、その量より多いか少ないかといった判断を得るような分析もあり得るが、一般的には規制値に対してリスクの程度を把握するために、量を正しく知る範囲として、「直線性」「範囲」は重要である。

また当然、測定値には、偶然誤差、統計誤差が含まれてくるため、その程度を「真度」「精度」として求め、測定結果に伴う「不確かさ」として理解しておくことも重要である。特に国際規制に関わる分析を担当する試験所を対象とした分析法について、「堅牢性」は非常に大きなファクターとなる。ある限られた試験所でのみ再現性が高い分析法は、国際サプライチェーンの中で使用する分析法としては、世界の人々から求められるものから乖離することになる。

これらの分析法の性能を評価する各パラメータの中で、特に測定の不確かさに関わり、重要なものとして「真度」と「精度」が挙げられる。他のパラメータの不具合は、この「真度」「精度」にも結果として現れてくるため、この2パラメータの評価と維持は重要と言える。

分析法の性能評価に関して、注意点を挙げるとするなら、特に農薬やカビ毒などに実際の汚染と同様な経緯で残留した作物を期待する濃度で作りに出すことは、コストや労力的に現実的ではないため、ブランク試料に分析対象物質を表面的に加えて、残留疑似試料を作り、その添加量を残留量と読み替えて測定、定量して、添加量との比較を行い、「真度」「精度」を求める、いわゆる添加回収試験で代用を行うことが常となることである。

### 1.3.2 真度および精度の評価法

添加回収試験での評価の問題点は、前述のように添加した分析対象物質は、基本的に試料の表面にのみ存在することになるため、実際に栽培時に散布された農薬、もしくは移送、貯蔵時に発生したカビが産生したカビ毒のように、分析対象物質が存在する状態が違ふことにある。添加回収試験において、添加時に標準品を溶解した溶媒などの影響を受けないような状態（極力少量）や、ある程度の浸透時間を置くことなどの工夫は当然必要であるが、実際の残留試料とは大きく異なる。このことから、添加回収試験によって、真度・精度を求めることは、得られた真度・精度が期待値以下の場合には、分析法の性能が意図される目的に対して不十分である証明にはなるが、期待以上であったとしても十分な性能を有するとは本質的には言えない。真の残留に対しての抽出効率が評価できないからである。本来的には、値付けされた認証標準物質（Certified Reference Materials : CRM）を用いて評価する必要がある。もしくは明らかに十分な抽出が達成できていると評価されている分析法との比較により評価されるべきである。

我国でのカビ毒（アフラトキシン）及び残留農薬分析での真度・精度の性能評価基準を表 1-5 及び 1-6 に示す。真度・精度は測定する濃度によって許容範囲が決められているが、これは Horwitz 式（近年は Thompson 修正式）[21] に基づく評価基準が国際的に一般化されており、我国の基準もこれを踏襲している。

表 1-5 アフラトキシン分析法で示される真度・精度の性能評価基準

評価対象	試行回数	真度(回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
アフラトキシン B1, B2, G1, G2	5	70 - 110	≤ 20	≤ 30

表 1-6 残留農薬分析法で示される真度・精度の性能評価基準

評価対象濃度 (mg/kg)	試行回数	真度(回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤ 0.001	5	70 - 120	< 30	< 35
> 0.001 - ≤ 0.01	5	70 - 120	< 25	< 30
> 0.01 - ≤ 0.1	5	70 - 120	< 15	< 20
> 0.1	5	70 - 120	< 10	< 15

#### 1.4 危害要因物質分析の課題

2006年6月に我国の残留農薬の規制制度が大きく変更された。これまで、特定の食品に対して指定された農薬のみ（約250種類）残留基準が定められ、原則、残留に対する規制が無い状態で、規制対象とする農薬のみを示したリストであったため、ネガティブリスト制度と呼ばれていた。2000年代に入り、日本で残留基準が設定されていなかった農薬について、輸入食品から高頻度で検出したことから、日本においても残留農薬に対する規制強化の動きが加速し、ポジティブリスト制度が2006年5月に施行されるに至った。ポジティブリスト制度では、原則、全ての農薬等（残留農薬、動物用医薬品、飼料添加物）が規制の対象となり、基準値が設定されていない農薬等については一律基準（0.01 mg/kg）が適用された。これにより、規制対象農薬の大幅な増加と一律基準への対応が必要となった。これまでのネガティブ制度下では、先の危害要因物質の分析法で述べたように、分析対象物質の物性に合わせた分析法が用いられたが、多種の農薬を

一度で測定を可能とする多成分一斉分析法が主流となった。そのような中でも日本に先駆けてポジティブリスト制度を制定していた EU において、2003 年に簡易で迅速な一斉分析法として QuEChERS 法 (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) が報告された [22,23]。QuEChERS 法は溶媒使用量が少なく、濃縮操作が不要であるため、簡易かつ迅速な多成分一斉分析法として世界中で急速に普及した。現在では改良法が EU 標準法である EN 法や AOAC 法として採用されており、国際的な分析法として認知されている [24,25]。

QuEChERS 法とその改良法の概要を図 1-8 に示す。アセトニトリルによる抽出を行い、硫酸マグネシウムにより、塩析と溶媒脱水を同時に行う。遠心分離後、上層を取り出し、これにアセトニトリル層に固相樹脂を入れ、振り混ぜることにより簡易精製を行った後に GC-MS(/MS)、LC-MS(/MS)で測定する方法である。抽出溶媒としてアセトニトリルを採用した理由は、①多くの農薬が持つ極性範囲 (Log Pow 値で約 1-5 程度) に対して抽出適応がある。②塩析を行うことで混和していた水と 2 層に分けることができる。この性質によって、分析上の妨害となるマトリクスの代表である、無極性の油脂類、高極性の糖類などを過剰にアセトニトリルに溶かすことなく農薬を取り出すことができるからである。そのような利便性から、近年、この QuEChERS 法を他の危害要因分析の抽出法として用いようとする論文が数多く出てきている。

オリジナル法 (2003年)	EU法 (EN15662 2008年)	AOAC法 (AOAC 2007.01 2007年)
試料10 g*   アセトニトリル 10 mL   振とう 1分 無水硫酸マグネシウム 4 g 塩化ナトリウム 1 g   振とう 1分 ISTD添加   振とう 30秒   遠心分離 5分 固相抽出 (分散法)	試料10 g*   アセトニトリル 10 mL   振とう 1分 無水硫酸マグネシウム 4 g 塩化ナトリウム 1 g クエン酸3ナトリウム 1 g クエン酸2ナトリウム 0.5 g   振とう 1分 ISTD添加   振とう 30秒   遠心分離 5分 固相抽出 (分散法)	試料15 g*   1%酢酸含有アセトニトリル 15 mL 無水硫酸マグネシウム 6 g 無水酢酸ナトリウム 1.5 g ISTD添加   振とう 1分   遠心分離 1分 固相抽出 (分散法)

\*乾燥試料の場合は、試料量を減らし、水を添加

図 1-8 QuEChERS 法の概略

その特徴を理解し、用途を間違えなければ非常に簡易でよくできた方法であるが、その危険性も理解しておく必要がある。まず理解しておくべきことは、本法が、ポジティブリスト化された多成分の農薬の残留実態を網羅的に確認することを目的として開発されたスクリーニング的な方法という点である。それが時を経るうちに妥当性評価を行うことで利便性の高い定量法としての目的を担う方向に移行してきたことに注意を払う必要がある。定量分析法として評価する際に、まず、アセトニトリルによって抽出できる極性範囲が限定的であるため抽出不足を招く危険性があることが注意点としてあげられる。特に水や油脂分も広範囲に抽出されるアセトンが標準分析法として用いられてきた物質の分析については、本来の抽出効率(真度)が添加回収試験では確認できないことから、CRM や自然残留の作物を使った測定値比較などによる妥当性の評価が必要である。次に、限定的な極性範囲での抽出を行っていることから、精製も非常に簡素化されているため、試料液中に残ったマトリクスと分析対象物質との分離には、高価な GC-MS(/MS) や LC-MS(/MS) の使用が必然となる。試料液中に残ったマ

トリクスは、高分離能の MS や MS/MS ではクロマトグラム上の妨害とはならなくとも、可視化されない部分で、マトリクスによる測定値の干渉であるサプレッションやエンハンスメントを起こしている可能性があり、定量値の真度が不確かなものになることを常に意識する必要がある。マトリクス影響の削減には、結局煩雑な精製を実施することになるか、もしくは試料液を希釈し測定する必要があるため、さらに高価で高感度な MS が必要となり、分析全体を考えたときに Quick、Easy で Cheap な分析法から乖離していくことになりうる。

## 1.5 本研究の目的

本研究の目的は、環境的課題として地球温暖化を踏まえ、世界人口の増加と共に食糧の不足が懸念されるこれからの時代において、食品の国際的サプライチェーンの中で、国際社会の一員として、食の安全と安心を「分析」を通じて届けることを目的としている。GC-MS や LC-MS などクロマトグラフィー技術を用いた分析機器の性能はこの 20 年余りで飛躍的に進歩し、分析技術の簡素化が達成されて来た。しかし一方で、高性能化に伴う機器の高額化は避けられず、高所得な国での活用が主なものとなってしまっている。さらに、機器の高性能化は、多くのブラックボックス化を伴い、また簡易な前処理を生み、分析法としての性能評価もシステムに基づいた定型的な妥当性を得れば良い。といった風潮を感じ、可視化されない部分への配慮の不足を感じることが多い。

そこで本研究では、危害要因物質の分析において、定量性を担保する根幹である「抽出」の効率を上げる技法として、第 2 章で酵素可溶化による抽出法の改良を非常に吸着性の強いビピリジニウム系農薬の抽出に用いることによりその効果を確認した。ビピリジニウム系農薬は、農産物や土壌への吸着が強く、我国では濃硫酸での長時間還流による抽出を伴う分析法である。分析者に対しても過

酷で危険な分析法であるが、酵素を用いることで柔和で効率的な抽出法を検討した。また同時に極弱陽イオン交換性のカラムを開発することにより、強カチオン性物質に対応する有効な LC-MS の測定技術についても検討した。第 3 章では、世界的に汚染が広がっているカビ毒であるオクラトキシン A を対象として、特異的な結合を得られるイムノアフィニティー技術を、少量の抗体量で測定が可能なオンレジンの直接蛍光測定法を検討し、MS のような大型で高額な機器を用いず、分析全体で安価にオンサイト測定できる方法を開発した。

これらの分析技術を通じて、国際的サプライチェーンの安全を担保する「分析」が、その期待される場面に応じた分析法として、期待される性能に近づけることが最大の目標である。

## 引用文献

1. Glasgow Climate Pact, IV. Mitigation, 15-17  
[https://unfccc.int/sites/default/files/resource/cop26\\_auv\\_2f\\_cover\\_decision.pdf](https://unfccc.int/sites/default/files/resource/cop26_auv_2f_cover_decision.pdf)
2. Working Group I contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Technical summary, Total pages 150  
[https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/downloads/report/IPCC\\_AR6\\_WGI\\_Full\\_Report\\_smaller.pdf](https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/downloads/report/IPCC_AR6_WGI_Full_Report_smaller.pdf)
3. Tanaka, H.L., N. Ishizaki and D. Nohara, 2005: Intercomparison of the intensities and trends of Hadley, Walker and monsoon circulations in the global warming projections. SOLA, 1, 77-80, <https://doi.org/10.2151/sola.2005-021>
4. Vecchi, G. A. and B. J. Soden, 2007: Vecchi, G.A. and B.J. Soden (2007), Global Warming and the Weakening of the Tropical Circulation. J. Climate, 20, 4316-4340.
5. Yamaguchi, K., and A. Noda, 2006: Global warming patterns over the North Pacific: ENSO versus AO. J. Meteor. Soc. Japan, 84, 221-241.
6. Curtis, A. Deutsch, Joshua J. Tewksbury, Raymond B. Huey, Kimberly S. Sheldon, Cameron K. Ghalambor, David C. Haak, and Paul R. Martin, PNAS May 6, 2008 105 (18) 6668-6672; <https://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>
7. Satoshi M., Hiroshi F., Tomoaki W. and Takashi C., Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P.H., 55, 2004
8. World Population Prospects 2019 Highlights United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, page 5  
[https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_Highlights.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf)
9. THE STATE OF FOOD SECURITY AND NUTRITION IN THE WORLD 2021  
<https://www.fao.org/3/cb4474en/online/cb4474en.html#>
10. 「我国における総人口の長期的推移」 総務省

[https://www.soumu.go.jp/main\\_content/000273900.pdf](https://www.soumu.go.jp/main_content/000273900.pdf)

11. 「事業系及び家庭系の食品廃棄物発生量、再生利用量の主要国比較」 農林水産省  
[https://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syoku\\_loss/pdf/hyou2.pdf](https://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syoku_loss/pdf/hyou2.pdf)
12. 「食品ロス削減関係参考資料」 消費者庁  
[https://www.caa.go.jp/policies/policy/consumer\\_policy/information/food\\_loss/efforts/pdf/efforts\\_190711\\_0001.pdf](https://www.caa.go.jp/policies/policy/consumer_policy/information/food_loss/efforts/pdf/efforts_190711_0001.pdf)
13. 「SDG グローバル指標(SDG Indicators)」 外務省  
<https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/oda/sdgs/statistics/goal12.html>
14. 「農林水産物・食品の輸出額」 農林水産省  
[https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/e\\_info/attach/pdf/zisseki-274.pdf](https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/e_info/attach/pdf/zisseki-274.pdf)
15. 「令和2年農林水産物・食品の輸出実績（品目別）」 農林水産省  
[https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/e\\_info/attach/pdf/zisseki-277.pdf](https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/e_info/attach/pdf/zisseki-277.pdf)
16. 「2021年10月までの農林水産物・食品の輸出額」 農林水産省  
[https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/e\\_info/attach/pdf/zisseki-299.pdf](https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/e_info/attach/pdf/zisseki-299.pdf)
17. 「令和2年度食料自給率・食料自給力指標について」 農林水産省  
<https://www.maff.go.jp/j/press/kanbo/anpo/210825.html>
18. 「オランダの農業と就業構造」 日本労働研究雑誌 2016年10月号(No.675)  
<https://www.jil.go.jp/institute/zassi/backnumber/2016/10/pdf/016-032.pdf>
19. 「食品安全モニター課題報告「食品の安全性に関する意識等について」の結果（概要）」 食品安全委員会  
[https://www.fsc.go.jp/monitor/monitor\\_report.data/2020kadai-gaiyou.pdf](https://www.fsc.go.jp/monitor/monitor_report.data/2020kadai-gaiyou.pdf)
20. Burke, J.A., & Porter, M.L., (1967) *J. AOAC* **50**, 1260-1262.  
<https://doi.org/10.1093/jaoac/50.6.1260>

21. Michael, T., (2000) *Analyst*, 125, 385-386. <https://doi.org/10.1039/B000282H>
  
22. Anastassiades M., et al., *J. AOAC Int.* 86(2) 412-31. (2003).  
<https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
  
23. Lucini L., et al., (2011) *J Chromatogr Sci*, 49(9), 709-714.  
<https://doi.org/10.1093/chrsi/49.9.709>
  
24. BS EN 15662:2008 <https://doi.org/10.3403/30162467>
  
25. AOAC Official Method 2007.01  
[https://nucleus.iaea.org/sites/fcris/Shared%20Documents/SOP/AOAC\\_2007\\_01.pdf](https://nucleus.iaea.org/sites/fcris/Shared%20Documents/SOP/AOAC_2007_01.pdf)

## 第2章 農産物に残留するピピリジニウム系除草剤分析の 酵素可溶化法に関する研究

### 2.1 緒言

#### 2.1.1 背景

食品中に残留する農薬は、健康に影響のある危害要因物質として世間が注目する化学物質の代表である。我国では、残留農薬に対して2006年にポジティブリスト制度に移行し、これに伴い実質的には800種類を超える農薬に対して規制がひかれることとなった。また、EUをはじめ先進国といわれる多くの諸外国では、すでにポジティブリスト制度が採用されている。このポジティブリスト制度に対応するために発展したのが、多成分一斉分析法である。我国でも残留農薬に対する「一斉分析（試験）法」が厚生労働省より通知されている [1]。多成分一斉分析法は、食品からの1度の抽出操作で得られた試料溶液を用いてその中の微量（通例 ppb [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]レベル）の農薬、数100種類を一度の測定で分析しようとする方法である。よって、これまでの残留農薬試験で用いられてきた「個別分析（試験）法」のように、測定対象とされる物質の物性（主に極性）に合わせた抽出法でなく、網羅的に多様な物性に合わせた抽出法となる。抽出の対象物質の多様化を行えば行うほど、同様な極性を持つ物質も同時に抽出されることとなり、これらは一般にマトリクスと呼ばれ、測定上のあらゆる問題を起こす要因となる。分析対象物質である農薬の極性は、ほぼ水にのみ溶解するものから、ほぼ水には溶けず、油脂には極めて溶解しやすいものまで存在する。個別分析法では、良好な抽出を目指し、水と油脂を同時に溶解可能なアセトンが多用され、その後、極力、分析対象物質のみにする精製を繰り返す。これにより多くのマトリクスは

除去され、定量性の高い分析結果が得られる。他方、多成分一斉分析法は、分析対象物質の物性が絞れないことにより、まず精製は必要最小限となる。先にも述べたとおりに、マトリクスを多く含んだ試料液は、正しい測定を妨害することになる。精製が限定的にならざるを得ないことから、次にとる手段は、分析対象物質“のみ”をできる限り効率的に取り出す抽出法を選択しようとする。食品中の油脂分、たんぱく質や糖類は測定上の不具合を起こす主なマトリクスである。これらのマトリクスを極力、抽出せず、農薬は効果的に抽出する手法となる。そこで採用されたのが、アセトニトリルによる抽出法であり、多成分一斉分析では多用される溶媒となる。アセトニトリルは油脂をほぼ溶解することがない点、取り出した水溶性のマトリクスは、塩析によりアセトニトリルと分離できる点で便利である。これは裏を返すと、水や油脂に近い極性を持つ物質は、十分な抽出ができない可能性を示唆するものでもある。

ポジティブリスト制度以降、この多成分一斉分析法は、これまで個々に抽出し、精製し、測定してきた農薬を一度に測定できるため、その効率性から、世界中で一気に流行した。その最たるものが、QuEChERS法である。

QuEChERS法は、この目的のための簡単な抽出・精製法として開発され、改良されてきた [2-5]。しかしながら、問題は、第1章でも述べたように、スクリーニング法として開発された本法が、妥当性評価を実施して、定量法としての用いられ方をしている点である。妥当性が“真”に評価されたうえで、定量法として用いられることに異論はないが、特に真度の評価法の多くが、「添加回収試験」によるものであることは違和感がある。添加回収試験は、自然に残留した農薬とは、その存在部位が大きく違い、添加回収試験での結果は、見かけの真度が高くなることは明白であり、実際の試料での定量分析では、真の残留量に対して負のバイアスがかかる危険性がある。

そこで本研究では、酵素を用いた細胞壁の溶液化（酵素可溶化法）を用いることにより、抽出効率の向上への期待をし、適用性の検討を行った。

酵素可溶化法は、酵素を用いて植物組織を破壊し、液状化させることを可能とした方法である（図 2-1）。しかし、測定結果を得るまでの迅速さが要求される食品分析では、さまざまな酵素を最適な条件で順次作用させ液状化させるような悠長な時間をとることはできない。また、農薬の抽出効率の向上においては、試料の完全液化は必要ではなく、農薬を十分に離脱する程度の液状化ができればよいと考えられる。笠井らは植物組織における細胞壁周りのペクチン部位を分解するために、ペクチナーゼなどの酵素を必要とせず、短時間で可能なオートクレーブでのペクチン分解処理を提案している [6, 7]。このオートクレーブ処理によるペクチンの除去と、その後のセルロース及びヘミセルロースに対する酵素処理によって抽出効率の向上を図った。

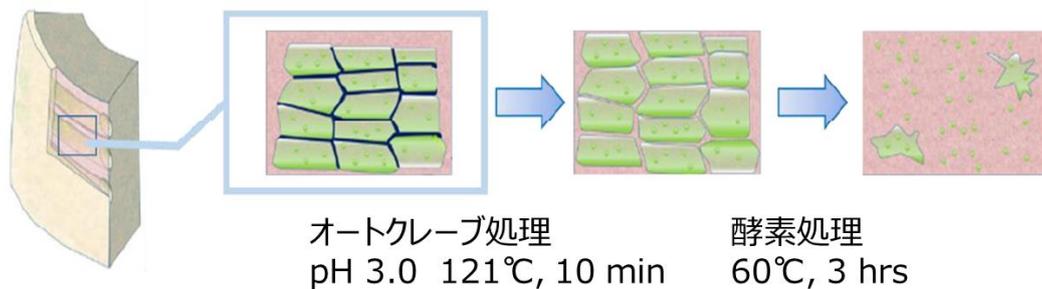


図 2-1 酵素可溶化法による植物組織の液状化概略

今回、検討対象として、ビピリジニウム系農薬を選定した。ビピリジニウム系農薬は、その強いカチオン性から、土壌や植物組織などへの吸着が強く、強酸還元などの過酷な抽出条件が用いられる。本農薬が酵素可溶化法の柔和な条件下で十分な抽出を行うことができれば、他の農薬の抽出効率も引き上げる可能性

が示唆されるためである。

### 2.1.2 ビピリジウム系除草剤

代表的なビピリジウム系除草剤であるパラコート及びジクワットは、速効性と広範囲の接触活性を有する第4級アンモニウム系除草剤である(図 2-2) [8]。ジャガイモ、オリーブ、リンゴ、トマトなど、多くの作物の植え付け前後の雑草防除に使用されている[9, 10]。これら除草剤は、取り扱いの容易さ、低い蒸気圧、高い水溶性、高い土壌結合力などの物理的特性と、その強い除草活性とが相まって、農業分野での広範な使用に適している [11, 12]。ビピリジウム系除草剤は、4級アンモニウムを持つことによる強いイオン性とそれに伴う吸着性を特徴とする農薬である。

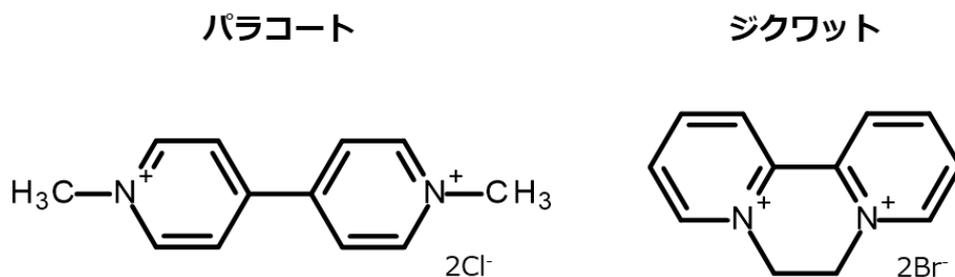


図 2-2 ジクワット及びパラコートの構造式

### 2.1.3 パラコート及びジクワットの分析法の課題

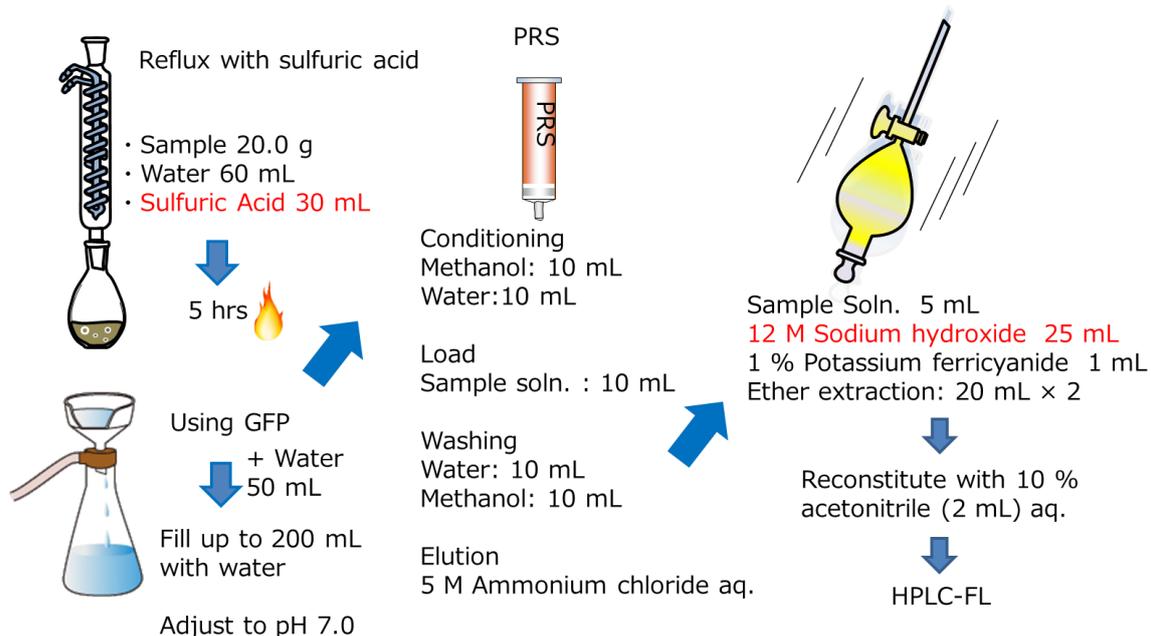


図 2-3 パラコート及びジクワットの厚生労働省通知法概略

濃硫酸を使った還流抽出という非常に危険を伴う抽出操作の後、抽出液をプロピルスルホニルシリカゲルミニカラム (PRS) での精製処理を行っている。PRS は、強陽イオン交換固相である。パラコート及びジクワットはともに 2 価の有機カチオンであるため、中和後、カラムへ通液することで、パラコート及びジクワットの捕捉、そして高濃度塩溶液による溶出を行うことで、精製される。さらに得られた精製液を高濃度アルカリ溶液とフェリシアン化カリウムによる酸化を経て蛍光誘導体物である bipyridone (図 2-4) とした後に有機溶媒による抽出と転溶を行うという、極めて煩雑で高度な熟練者を必要とする方法である。

吸着力の高いパラコート及びジクワットは、他にも硫酸で長時間還流による抽出の分析例が多くある [13-15]。

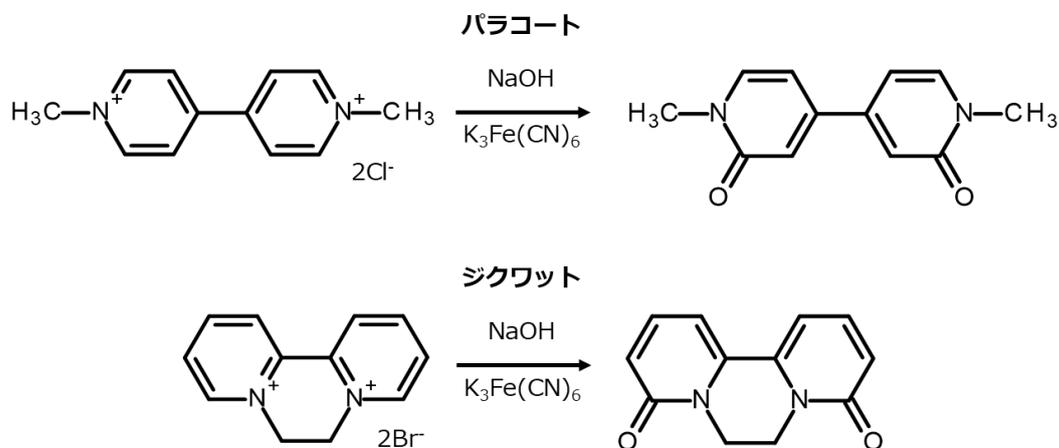


図 2-4 パラコート及びジクワットの蛍光誘導体化（酸化）の概略

また、近年では、EURL-SRM において、高極性農薬の多成分一斉分析法である QuPPE-PO 法 (Quick Polar Pesticides products of Plant Origin and honey) [16, 17] が導入され、ギ酸/メタノール溶液での抽出法が提示されているが、パラコート及びジクワットにおいては抽出力が弱いため、特別に塩酸/メタノール溶液の使用が指示されている (図 2-5) が、レンズ豆ではその抽出率の悪さが指摘されている [18]。

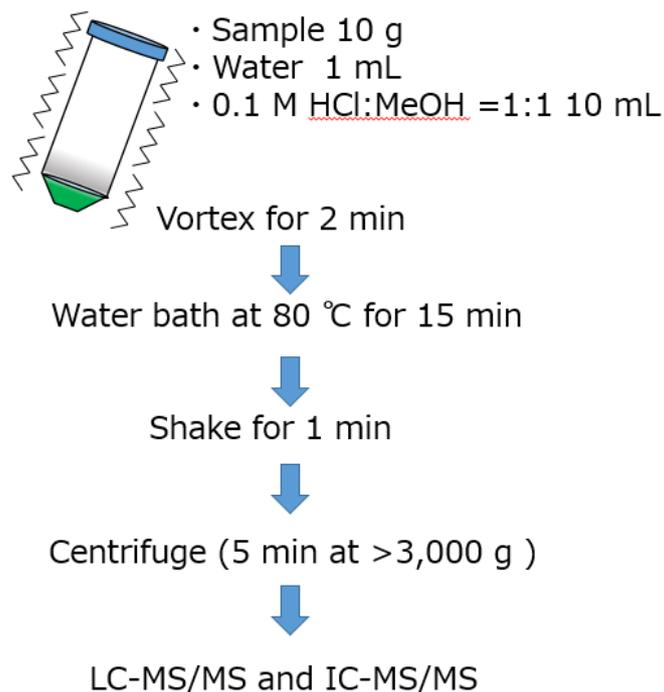


図 2-5 QuPPE-PO 法の概略

他にもマイクロ波での抽出 [19, 20] などの報告例もあるが、いずれも酸を用いた高温、高圧が必要な方法であり、大型の機器が必要となる。

### 2.1.3.2 測定法の課題

一方、これらの農薬はその極性の高さから、HPLC を用いた測定が一般的であるが、HPLC での保持が難しく、困難である。酸化、蛍光化したこれらの農薬においてもその水溶性は高く、汎用される ODS (C18) では保持が弱く、通知試験法では、C30 カラムを用い、更に、移動相もアセトニトリル/水 2:98 (v/v) といった極めて有機溶媒の少ない組成比で展開させることでようやく必要な保持と、両農薬の分離が達成できる。この疎水性の高いカラムと高極性の移動相の組み合わせは、試料溶液に溶けた疎水性マトリクスのカラム内蓄積を生み、通知法の

通り、アイソクラティック溶離を続けると、数十回程度の測定で蓄積したマトリクスの影響により、選択性の高い HPLC-FL においても測定が困難となる（図 2-6）。

また、蛍光化物は不安定で時間とともに劣化（特に室温では）をしていくこと、蛍光化反応が環境条件などにより一定でなく、必ずしも定量的とはいえないため、必ず蛍光化反応は、比較とする標準溶液も、試料の蛍光化と同時に行う必要があり煩雑である。よって、この蛍光化法は、世界的にみるとその採用例は皆無であり、カチオン性の高いイオン形態での LC-MS の ESI-Positive モードで測定するのが一般的である。

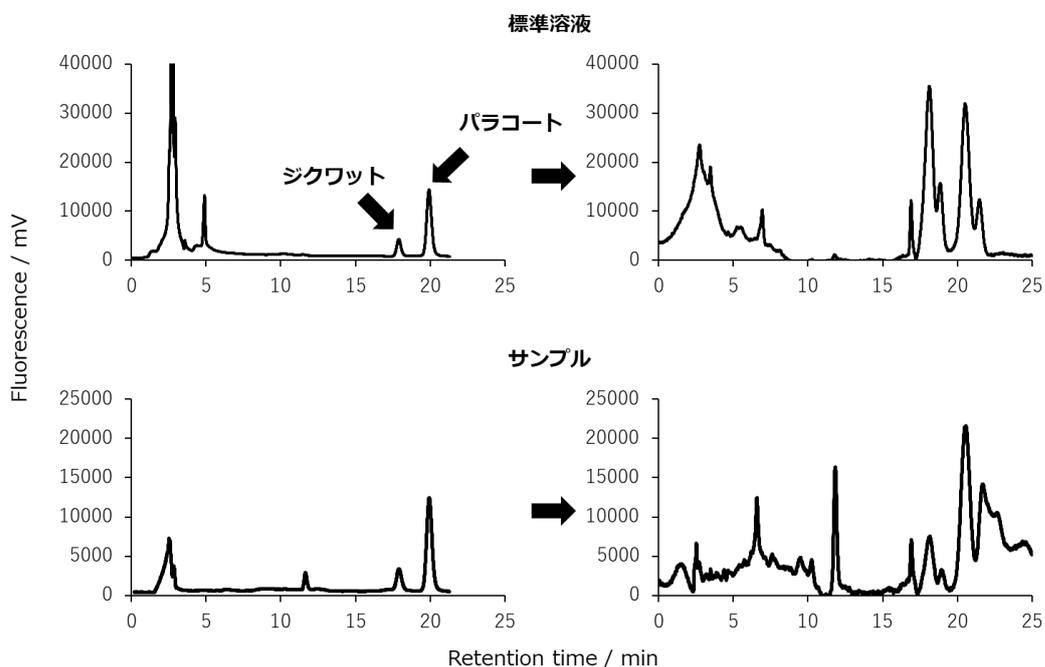


図 2-6 C30 カラムでのマトリクス蓄積によるクロマトグラムの劣化

この他、イオン形態のパラコート及びジクワットに対しては、HILIC カラムを

用いた分析例 [16, 18, 21]、イオンペア剤を用いた ODS カラムでの分析例 [22-24]があるが、HILIC は水比率の高い試料溶液などでは保持が不安定になることやアニオン性物質も同様に保持される。イオンペア剤を用いる方法では、保持の安定化に時間がかかり、常に移動相とともに溶出されるイオンペア剤は、LC-MS のイオン源において干渉を起こし、また汚染原因ともなる。なお、一般的なイオン交換カラムでは、パラコート及びジクワットは保持が強すぎ、溶出には高濃度の酸や塩を必要とするが、LC-MS への導入を難しいものとするため報告例はほとんどない [25]。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試薬

残留農薬用標準品のパラコート二塩化物及びジクワット二臭化物一水和物は、富士フイルム和光純薬株式会社（大阪）から入手した。セルラーゼ GODO-TCF (EC 3.2.1.4) は、合同酒精株式会社（東京）から入手した。ヘミセルラーゼ Amano 90 (EC 3.1.1.73) は、天野エンザイム株式会社（名古屋）から入手した。特級試薬のメタンスルホン酸、クエン酸、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、SDS は、富士フイルム和光純薬株式会社（大阪）から入手した。HPLC 用メタノールは、富士フイルム和光純薬株式会社（大阪）から入手した。容量分析用塩酸溶液 (1 mol/L) は、ナカライテスク株式会社（京都）から入手した。水酸化ナトリウム溶液 (5 mol/L) は、富士フイルム和光純薬工業株式会社（大阪）から入手した。容量分析用水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) は、米山薬品工業株式会社（大阪）から入手した。直径 1/8 インチのテフロンボールは、AS ONE Corp.（大阪）から入手した。Inertsep CBA 弱陽イオン交換樹脂は、ジーエルサイエン

ス株式会社（東京）から入手した。Inertsep CBA 50 mg を 1 mL の SPE カートリッジに充填して使用した。遠心式ポリプロピレン（PP）チューブ（50 mL）は、サルステット株式会社（日本、東京）から入手した。その他、ビピリジニウム系除草剤の非特異的吸着を避けるため、すべての実験操作にプラスチック製の器具を使用した。使用した試液類は、東レ（東京）の超純水製造装置 LV408 で得られた水を用いて調製した。

### 2.2.2 標準溶液の調製

パラコート及びジクワットを 0.1 mol/L 塩酸に溶解して標準原液（0.5 mg/mL）を調製し、-20°Cで保存した。測定用の標準溶液は、測定日ごとに標準原液を水で希釈し用事調製とした。

### 2.2.3 試料

小麦とジャガイモは地元の市場から入手した。0.076 mg/kg のパラコートが残留している乾燥大豆と、0.089 mg/kg のパラコートが残留している乾燥クコの葉は、農業生産者から入手した。これらの試料に含まれるパラコートの量は、厚生労働省通知試験法（硫酸還流法）で確認した。

### 2.2.4 弱陽イオン交換カラム（SDS コート ODS）の作製

LC-MS/MS は、パラコート及びジクワットの分析に最も広く使用されている方法となるが、強いカチオン性のパラコート及びジクワットを適切に分離できる HPLC カラムは先に述べた通り現存しない。よって我々は、LC-MS/MS 測定のためには、ジクワットやパラクワットのような強いカチオン性の物質だけを保持できる弱カチオン性の交換カラムが望ましいと考えた。このようなカラム

であれば、サプレッサーシステムで除去できる低濃度の酸溶出液でパラコート及びジクワットを分離することが可能である。HPLC 溶出液が ESI イオン源に導入される際には、イオン性の物質が少ないことが望ましい。

1 mmol/L SDS 溶液とアセトニトリルを 70 % (v/v) から 80 % (v/v) の間で段階的に混合した溶媒を調製し、これを InertSustain C18 カラムに 0.3 mL/min で 2 時間通液して、弱陽イオン交換カラム (SDS コーティング ODS カラム) を調製した。カラムの性能は、10 mmol/L メタンサルホン酸移動相中のジクワットとパラコートの保持時間、分離及びピーク強度で評価した。HPLC-FL で得られたクロマトグラム (図 2-7) 及び保持時間と分離度のプロット図 (図 2-8) を示す。

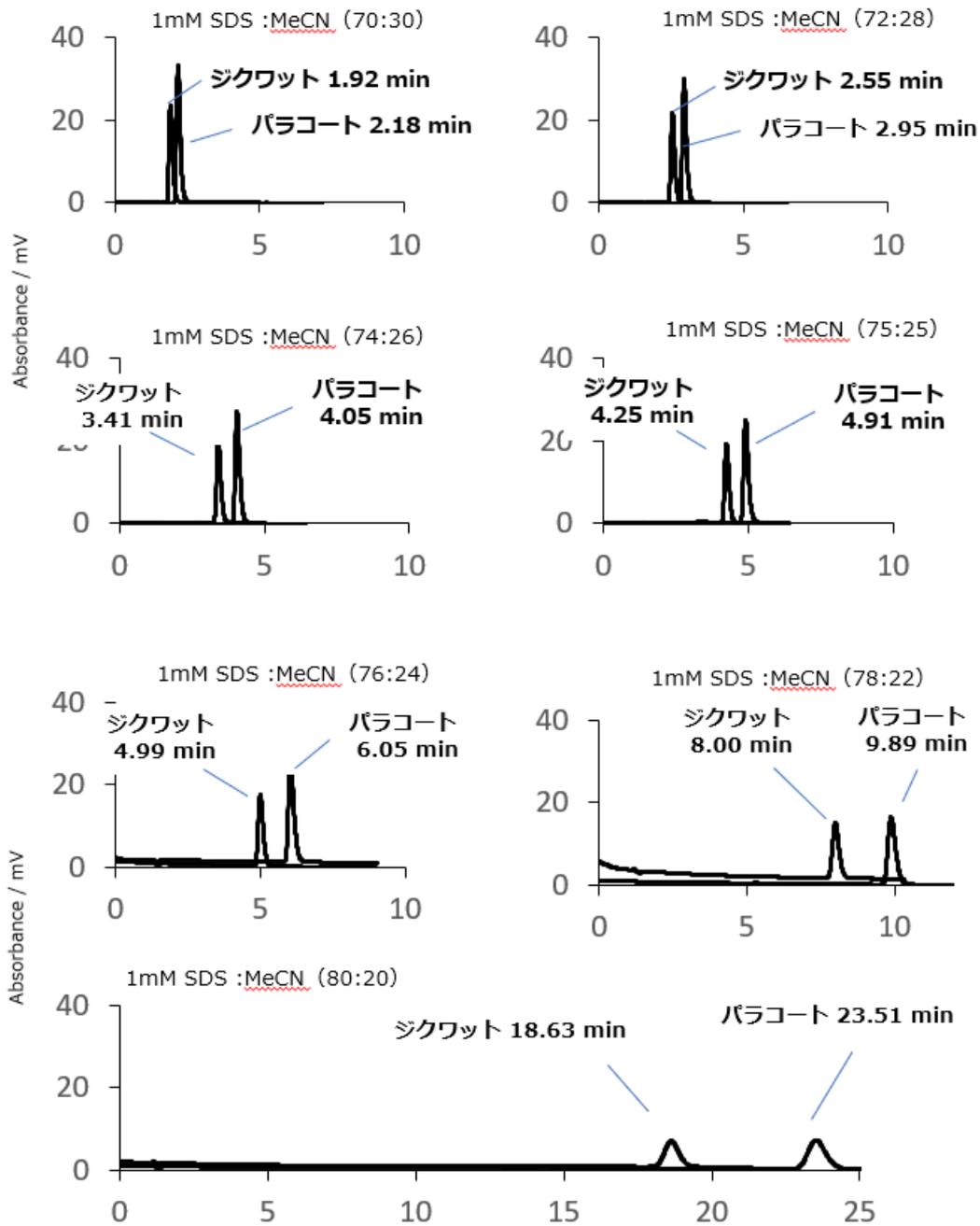


図 2-7 ODS カラムへの SDS コーティング比率別クロマトグラム

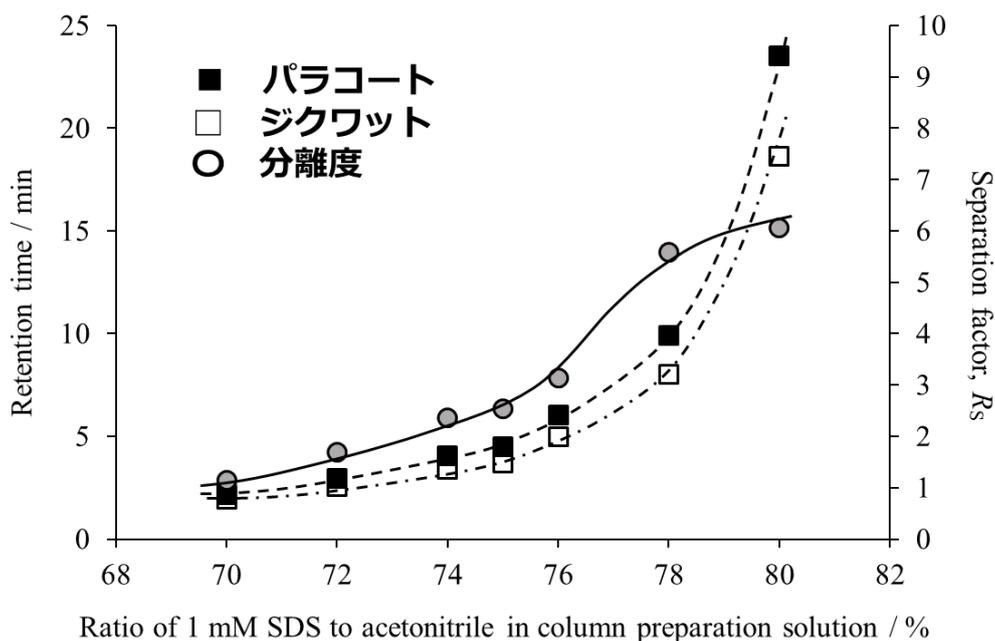


図 2-8 SDS コーティング比率別の保持時間と分離度のプロット図

長い保持時間は、分離度の面で有利ではあるが、ピーク幅が広くなり感度の面で不利に働く。また測定時間の短縮は、結果判定までの時間を短縮することになり、鮮度を求められる食品の分析にとっては望ましい。よって、ピーク分解度が2以上、保持時間が約5分と感度もよい、最適な性能と判断できた75% (v/v) の1 mmol/L SDS 溶液を含むアセトニトリルで SDS コーティングしたカラムを採用することとした。

### 2.2.5 電解再生サプレッサーの導入

強酸であるメタンスルホン酸水溶液を移動相で使用し、LC-MS に導入するためには、バックグラウンドにおけるノイズの低減やイオン化効率の点で導電性イオンを除去することが望ましい。そこで、Thermo Fisher Scientific 製の電解再生サプレッサー (Dionex CERS 500e 2 mm) を HPLC と MS のイオン源の間に接

続(図 2-9) することで、導電性イオンの除去を試みた。再生液(超純水)の電気分解によって発生した水酸化物イオン(OH<sup>-</sup>)は、陰イオン交換膜を経て移動相へ吸入され、移動相中のメタンスルホン酸イオン(CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)は陰イオン交換膜を経て再生液に排出される。吸入されたOH<sup>-</sup>は、移動相中の水素イオン(H<sup>+</sup>)と反応して水となる。再生液と電気を継続して稼働させることで常に検出器には水の状態で流れ込むため、ノイズが低減しイオン源の負担が軽くなるという仕組みである。我々は、この電解再生サプレッサーの効果を、電気伝導度検出器(CD)を用いて確認した。通常、メタンスルホン酸水溶液移動相では、約 3000 μS/cm のバックグラウンドを持つが、電解再生サプレッサーを用いると約 0.5 μS/cm まで低減させることが可能となった。この成果から、高価な MS を使わず、CD 検出器による測定も試みたが、最小検出濃度が 5 ng/mL と高いこと、検量線が直線的でなく、曲線を示したこと、また、マトリクス存在下では、他のカチオン性物質によるピークによって、パラコート及びジクワットのピークが干渉を受けたため、CD 検出器の使用は見送ることとした。

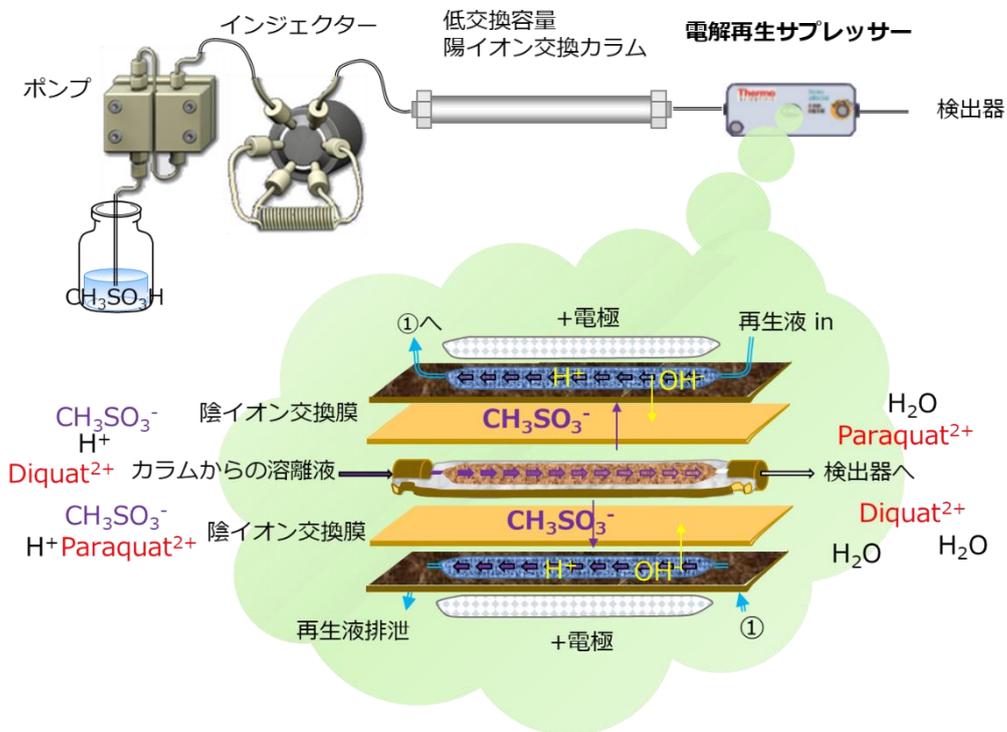


図 2-9 電解再生サプレッサーでのメタンサルホン酸除去の過程図

## 2.2.6 LC-MS/MS 操作条件

LC-MS/MS システムは、API 3200 QTrap トリプル四重極エレクトロスプレーイオン化質量分析計 (Sciex Framingham MA、USA) と、メタンサルホン酸溶離液用の Dionex CERS 500e 2 mm サプレッサー (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) を含む島津 LC-20 HPLC システム (京都) で構成した。SDS をコーティングした InertSustain C18 (3.0 mm i.d. × 75 mm、3  $\mu\text{m}$ 、GL sciences) を用いて、クロマトグラフィーを行った。

移動相は 10 mmol/L メタンサルホン酸溶液で、0.3 mL/min の流速とした。MS/MS の検出は、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いたポジティブイ

オンモードの多重反応モニタリング (MRM) モードで行った。

各分析対象成分の HPLC 保持時間、MRM トランジション (定量用) および定性用 MRM トランジション (定性用) を表 2-1 に示す。

表2-1 パラコート及びジクワットのHPLC保持時間とMRMトランジション

成分名	保持時間, min	プレカーサーイ オン, m/z	定量プロダクト イオン, m/z	定性プロダクト イオン, m/z
ジクワット	4.3	184	128	156
パラコート	5.4	93	171	-
		171	-	77

### 2.2.7 SDS コーティング ODS 及び電解再生サプレッサーを用いた LC-MS/MS 測定システム全体の評価

0.5 mg/mL のジクワット及びパラコート標準原液を純水で希釈し、1、2、5、10、20 ng/mL の実用標準液を調製した。これらの溶液で作成した検量線を図 2-10 に、最小濃度での MRM クロマトグラムを図 2-11 に示す。検量線は、パラコート及びジクワットの標準溶液濃度とピーク面積を用いてプロットした。相関は最小二乗法による回帰分析で求めた。検量線は良好な直線性を示し、決定係数は少なくとも  $r^2 = 0.999$  であった。

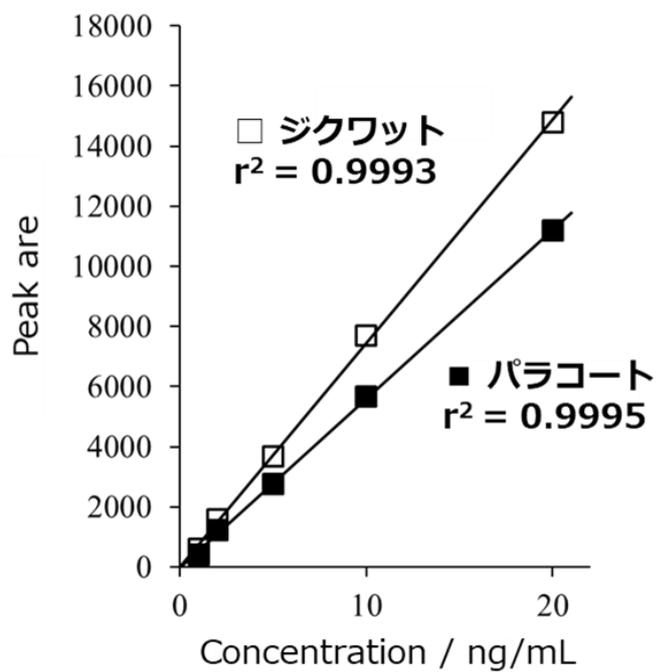


図 2-10 検量線

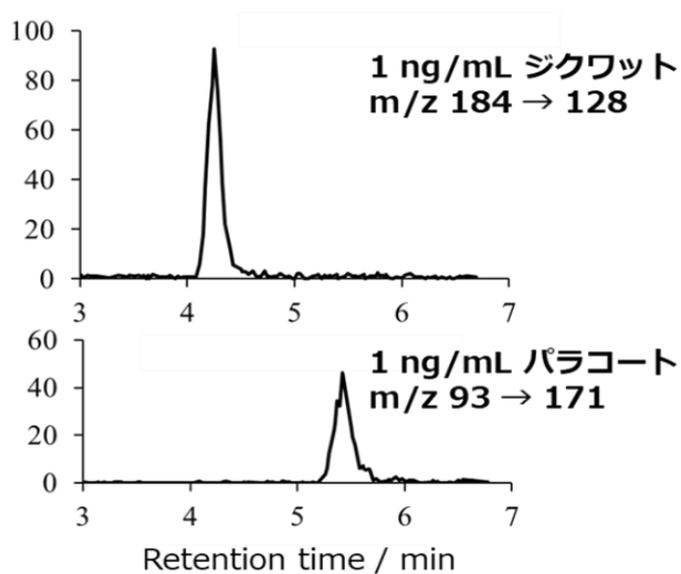


図 2-11 1 ng/mL 標準溶液のMRMクロマトグラム

### 2.2.8 試料溶液の調製

農産物を粉碎し、425  $\mu\text{m}$  のメッシュスクリーンを通した 1 g のサンプルを 50 mL のスクリーキャップ付き PP チューブに入れた。0.1 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 3.0) 7 mL を加え、121  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間のオートクレーブ処理をした。冷却後、5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 270  $\mu\text{L}$  で pH 6 付近まで調整した。

この溶液にセルラーゼ溶液 100  $\mu\text{L}$  と 1 % (w/v) ヘミセルラーゼ溶液 1 mL を加え、10 mL に定容した。テフロンボール 10 個を加えて 2 分間ボルテックスで攪拌し、サンプルと酵素を十分に混合した。PP チューブを 60  $^{\circ}\text{C}$  のインキュベーターに 1~3 時間入れ、細胞壁を溶解した。PP チューブを 10,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液約 5 mL を分離した。この上澄み液をシリンジフィルターでろ過して PP バイアルに移し、LC-MS/MS で測定した。

### 2.2.9 CBA カートリッジカラムによる精製

ジクワット及びパラコート標準液を加えた酵素可溶化液を LC-MS/MS で測定したところ、イオン化率は約 40 % であり、明らかにイオン化が抑制されていることがわかった。糖類の酵素消化により、抽出液中の溶存物質が増加していると考えられるため、これらの物質を除去するための精製を追加検討した。

精製には、カルボキシエチルシリル化シリカゲルミニカラム (CBA : 弱陽イオン交換) を用いた。今回検討したのは、弱カチオン交換体としてカルボキシル基を持つ Inertsep CBA カラムである。CBA は、塩基性または中性であれば解離型 ( $\text{COO}^-$ ) となり被験物質を捕捉し、酸性になれば非解離型 ( $\text{COOH}$ ) となり、捕捉した物質を脱離させる。CBA を用いることで、これら除草剤を他のカチオン性マトリクスから分離できると考えた。パラコート及びジクワットを添加した酵素可溶化液の上清 5 mL に 10 mL の超純水を加え CBA カラムに負荷する。疎水

性マトリックスは 5 mL のメタノールで洗浄し、カチオン性マトリックスは 5 mL の 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8) で行った。図 2-12 に 10 mmol/L メタンズルホン酸水溶液を用いたパラコート及びジクワットの CBA カラムからの溶出プロファイルを示す。

メタンズルホン酸で溶出すると CBA カラムのアニオン性はすぐに失われ、速やかに溶出されると思われたが、ジクワット及びパラコートの溶出は、想像より時間を要した。CBA カラムに吸着した緩衝液中のアルカリ金属イオンをメタンズルホン酸で中和されないと、パラコート及びジクワットは溶出しないと推測された。この結果から、溶出液 5 mL を採取することとした。

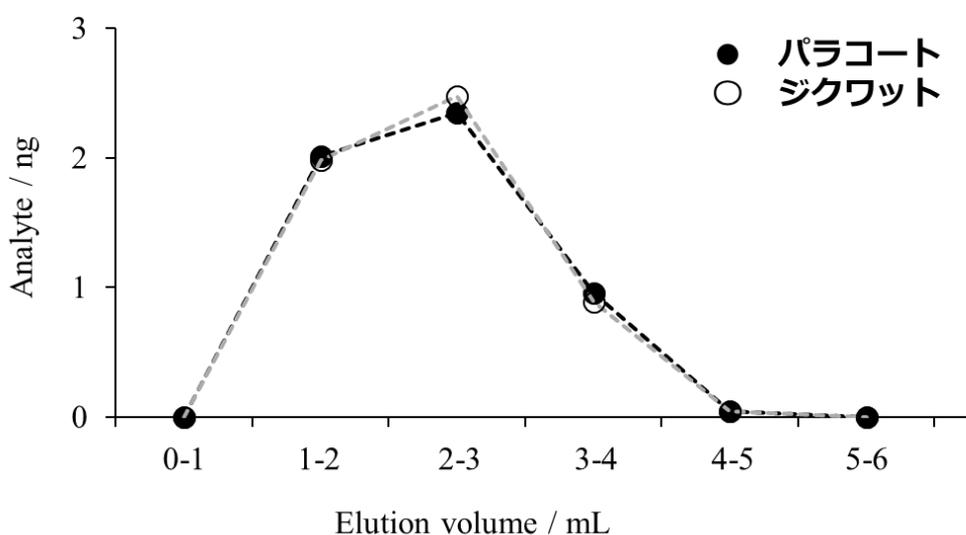


図 2-12 10 mmol/L メタンズルホン酸溶液中での CBA カラム溶出プロファイル

また、対照として、限外ろ過を行った試料溶液と CBA カラム精製を行った試料溶液を HPLC-UV (パラコート:260 nm、ジクワット:310 nm) で測定し、マトリックスの除去効果を確認した (図 2-13 及び 2-14)。

限外ろ過を行った試料溶液では、パラコート及びジクワットのピークがマトリクスとのピークと重なり確認することができなかった。一方、CBA カラム精製を行った試料溶液では、マトリクスは除かれ、非常にきれいなクロマトグラムを示した。なお、CBA カラム精製を行った試料溶液での LC-MS/MS 測定では、ジクワットおよびパラコートに対するイオン化抑制は認められなかった。

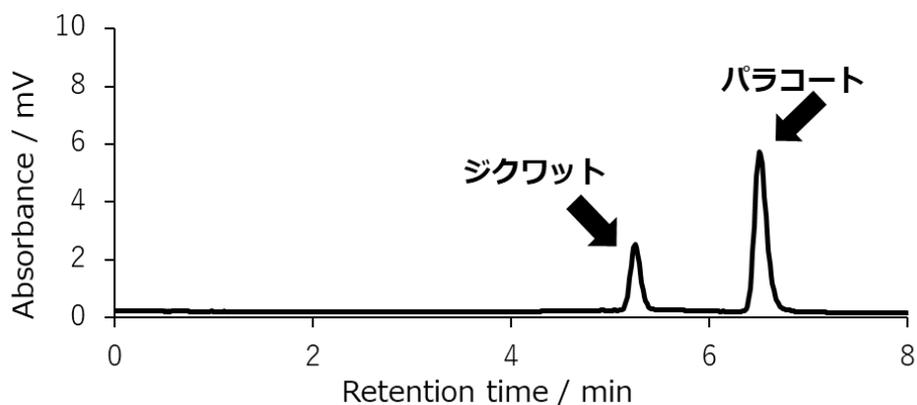


図 2-13 CBA を用いた試料溶液のクロマトグラム

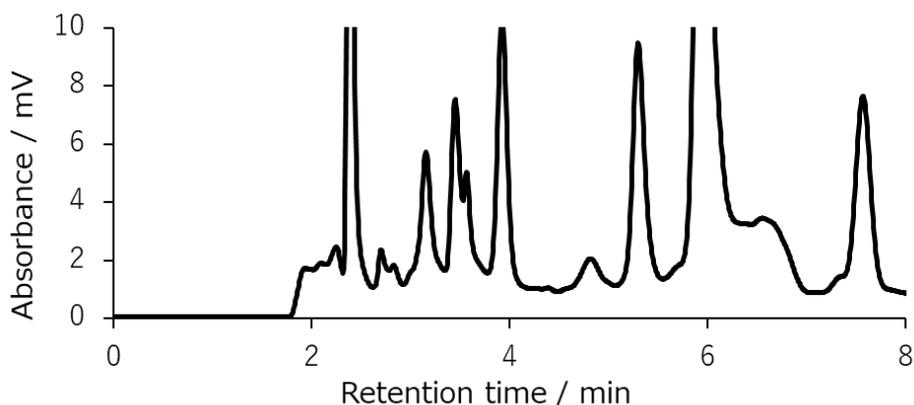


図 2-14 限外ろ過を用いた試料溶液のクロマトグラム

## 2.3 結果及び考察

### 2.3.1 酵素による可溶化の最適化

植物組織は、笠井ら [6,7,26] の方法に準じて可溶化した。細胞壁のラメラ構造を構築するペクチン物質はオートクレーブで破壊される。残った細胞壁の主成分であるセルロースとヘミセルロースを可溶化するために、サンプルを 100  $\mu\text{L}$  のセルラーゼと 1 mL の 1% (w/v) ヘミセルラーゼと混合し、60  $^{\circ}\text{C}$  で 1~3 時間インキュベートした。60  $^{\circ}\text{C}$  という温度は、これら酵素の活性最適温度から考えると高温であるが、我々の目的は完全な可溶化ではなく、除草剤が植物組織から放出される程度の部分的な可溶化である。そのため、処理時間を優先して、より高い温度を選択した。まず、クコの葉の可溶化の程度を目視で確認した。細胞壁の消化の程度を図 2-15 に示す。

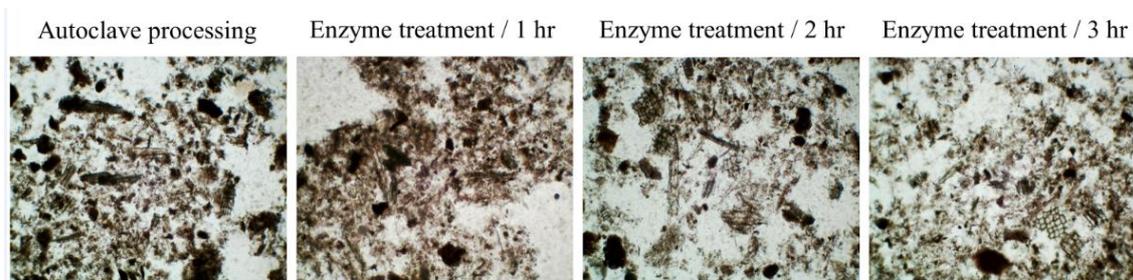


図 2-15 酵素消化過程における細胞組織写真

全体的に、酵素処理の時間が長くなるにつれて、細胞が細かさを増していた。これをさらに定量化するために、酵素処理した溶液を遠心分離して上澄み液の 500 nm での吸光度を測定した (図 2-16)。細胞壁の溶液化によって遠心分離後の上澄み液は明らかに清純度を増しており、LC-MS/MS でのイオン化干渉にも効果があると期待できた。

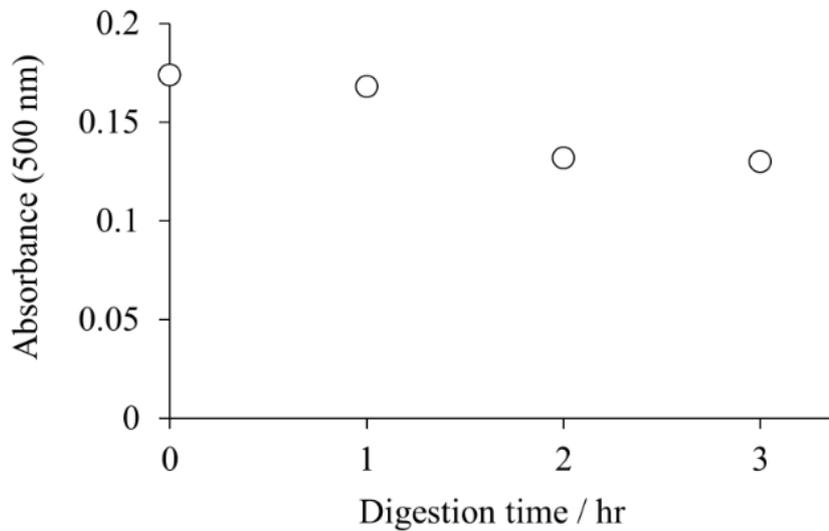


図 2-16 酵素可溶化処理後の上澄み液の吸光度

パラコートが自然残留し、厚生労働省通知試験法で値付けした大豆とクコの葉を用いて、可溶化法の最適条件を確認した。オートクレーブ処理と酵素可溶化の各時間における定量値を表 2-2 に示す。

表 2-2 パラコート残留作物での各処理での定量値 (mg/kg)

パラコート 残留作物	通知法値	オートクレーブ 処理	酵素処理時間		
			1 hr	2 hrs	3 hrs
大豆	0.076	0.086	0.075	0.081	0.071
クコの葉	0.089	0.10	0.096	0.096	0.093

測定は、CBA カラムで精製した試料溶液で行った。いずれの試料も、通知試験法で得られた値とほぼ同じ値を示した。

今回検討したパラコート及びジクワットは浸透移行性が低いため、オートク

レーブ処理のみにおいても十分に抽出されたと考えられる。しかし、定量値は酵素処理時間とともに値付けされた定量値に近づいた。これは酵素処理がマトリクスを減らし（もしくは CBA カラムに捕捉しやすい形に変化させ）、それにより LC-MS/MS のイオン化促進を抑えた結果だと判断できる。浸透移行性の高い農薬の場合、細胞壁を部分的に酵素で消化することで、細胞壁内に取り込まれた農薬をさらに効果的に抽出できると考えられる。

なお、クコの葉を、QuPPE-PO 法で定量したところ、パラコートは 0.034 mg/kg を示し、明らかな抽出不足を示唆する結果となった。

### 2.3.2 パラコート及びジクワットの新規分析法

これらの検討結果から、最終的に構築した分析フローを図 2-17 に示す。酵素可溶化を行った後 CBA による精製を行い、SDS でコーティングした ODS カラムで分離し、移動相として用いたメタンサルホン酸をサプレッサーシステムで除去して LC-MS/MS に導入する方法である。

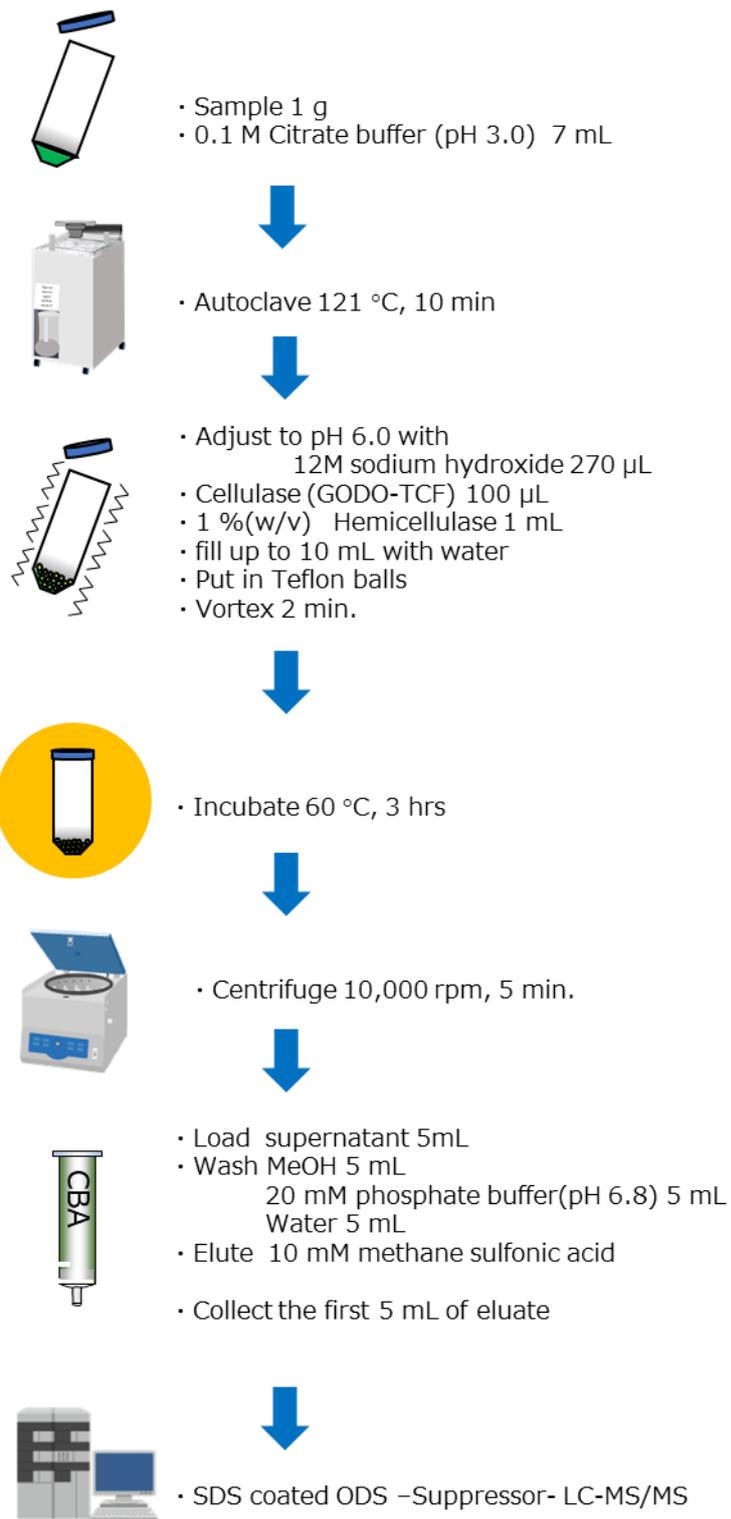


図 2-17 構築された分析法フロー

### 2.3.3 検出限界 (LOD) および定量下限 (LOQ) の算出

実試料での抽出効率に問題ないことが確認できたため、小麦とばれいしよで添加回収試験 (n=3) を行い、この結果から構築した分析法の性能を評価した。

試料 1 g に対し、ジクワットとパラクワットの 1 µg/mL 標準溶液 50 µL を、(0.05 mg/kg 相当量を含むように) 添加した。試料を 30 分間放置した後、上記の手順に従って測定した。その結果を表 2-3 に示す。いずれの作物においても、回収率は 70~120 % の範囲であり、RSD % は 10 % 未満であった。各作物の LOD および LOQ は、複数回の添加回収試験の結果の標準偏差 (SD) から算出し、SD の 3 倍を LOD、SD の 10 倍を LOQ とした。LOD および LOQ の算出結果を表 3 に示す。パラコート及びジクワットの LOQ は、それぞれ 0.0050~0.0061 mg/kg と 0.0028~0.0076 mg/kg の範囲であった。

EU で定められた規制値 [12] 及び日本の規制値の概要を表 4 に示す。これらや一律基準値である 0.01 mg/kg (EU, 日本ともに同値) と比較しても、今回開発した分析法は性能基準を十分に満たすことが確認できた。

表 2-3 添加回収試験の結果及び RSD から求めたパラコート及びジクワットの LOD 及び LOQ

	パラコート 回収率(%)	LOD <sup>a</sup> (mg/kg)	LOQ <sup>b</sup> (mg/kg)	ジクワット 回収率(%)	LOD <sup>a</sup> (mg/kg)	LOQ <sup>b</sup> (mg/kg)
小麦	71.2 ± 1.0	0.0015	0.0050	72.7 ± 0.5	0.0009	0.0028
ばれいしよ	90.4 ± 1.2	0.0018	0.0061	103 ± 2	0.0022	0.0076

<sup>a</sup> 3σ, <sup>b</sup> 10σ

表 2-4 EU 及び日本でのパラコート及びジクワットの規制値(2021 年 12 月現在)

最大残留基準	地域	パラコート (mg/kg)	ジクワット (mg/kg)
小麦	EU	0.02	0.02
	日本	0.05	0.1
ばれいしょ	EU	0.02	0.1
	日本	0.2	0.1
他の農産品	EU	0.02~0.05	0.01~5
	日本	0.04~2	0.01~2
一律基準値	EU	0.01	
	日本	0.01	

## 2.4 結言

これまで吸着性が極めて高いピペリジニウム系除草剤であるパラコート及びジクワットの分析法は、通知試験法では、濃硫酸や強アルカリを用いる過酷で危険な分析を強いられてきた。世界に目を向けても、QuPpe-PO 法など、比較的柔軟な方法は報告されてきたが、これらの方法では、抽出効率が悪く、真の値を定量しきれない。今回開発した酵素可溶化法は、非常に柔和で安全な方法となり、分析者にとっても歓迎される分析法である。この柔軟な抽出法は、マトリクスからの過剰な分解物の生成を最小限に抑えることができ、精製も非常に簡易なものとすることができた。このことは、現在、危害要因物質の測定で多用される LC-MS/MS への負担も減らすことにつながる。また、すべてを通じた新規開発の分析法の性能は、EU や日本の規制値への対応を考慮しても十分に対応できる LOD、LOQ を得ることができた。酵素可溶化法は、さまざまな物性を持つ他の農薬の抽出効率の向上にも期待が膨らむ。今回の研究で対象としたピペリジニウム系除草剤は浸透移行性がほぼないが、浸透移行性を持ち、細胞内に取り込まれる農

薬などは、さらなる条件の最適化は必要となるが、この酵素による細胞壁の部分溶解化を用いることにより、さらに抽出効率が向上することが可能となり、真の残留量を測ることに近づくことが期待される。

さらに欲を言えば、完全溶液化を行えば、固体試料からの抽出効率といったことを考えなくとも液液分配による分配率として評価できるため抽出不十分という概念をなくすこともできる。

本研究で得た酵素可溶化による食品中の農薬の効果的抽出の成果は、今後の危害要因物質の分析法構築に対する有効な抽出法として役立てたいと考えている。

なお、オクラトキシン A について、酵素可溶化法の有効な適用性が示唆されたため、本法の応用例として第 3 章に提示する。

## 引用文献

1. 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法  
第2章 一斉試験法」 厚生労働省  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/zanryu/zanryu3/siken.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/zanryu/zanryu3/siken.html)
2. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., & Schenck, F.J., (2003) *J. AOAC Int.* 86(2), 412. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
3. Lehotay, S. J., Mastovska, K., & Lightfield, A.R., (2005) *J. AOAC Int.* 88(2), 615-29. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.2.615>
4. Rutkowska, E., Lozowicka, B., & Kaczyński, P., (2018) *Food Anal. Methods* 11, 709–724. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1047-3>
5. Lucini, L., & Molinari, G.P., (2011) *J. Chromatogr. Sci.* 49(9), 709-714. <https://doi.org/10.1093/chrscl/49.9.709>
6. Kasai, N., Konishi, A., Iwai, K., & Maeda, G., (2006) *J. Agric. Food Chem.* 54, 6336-6342. <https://doi.org/10.1021/jf0609072>
7. Kasai, N., Murata, A., Inui, H., Sakamoto, T., & Kahn, R.I., (2004) *J. Agric. Food Chem.* 52, 5709-5716. <https://doi.org/10.1021/jf035067v>
8. Pesticide Manual Online available at <https://www.bcp.org/product/bcpc-online-pesticide-manual-latest-version>. Accessed 29 November 2021
9. Pateiro-Moure, M., Arias-Estévez, M., & Simal-Gándara, J., (2013) *Environ. Sci. Technol.* 47, 4984–4998. <https://doi.org/10.1021/es400755h>
10. European Food Safety Authority, (2015) *EFSA J.* 13, 4308. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4308>
11. Taguchi, V.Y., Jenkins, S.W.D., Crozier, P.W., & Wang, D.T., (1998) *J. Am. Soc.*

- Mass Spectrom. 9, 830–839. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(98\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(98)00043-9)
12. EU pesticide database available at [https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en). Accessed 29 November 2021
  13. Guijarro E.C., Yanez-Sedeno P., & Polo Diez L.M., (1987) *Anal. Chim. Acta* 199, 203–208. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)82816-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)82816-0)
  14. Anderson L, Boseley AD (1997) ZENECA Agrochemicals SOP RAM 272/02
  15. Japanese official method. <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-206.html>. Accessed 29 November 2021
  16. Francesquett, J.Z., Rizzetti, T.M., Cadaval Jr., T.R.S., Prestes, O.D., Adaime, M.B., & Zanella, R., (2019) *J. Chromatogr. A* 1592, 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.060>
  17. EURL-SRM QuPPE-PO Method for products of Plant Origin available at [https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl\\_article.asp?LabID=200&CntID=1115&Theme\\_ID=1&Pdf=False&Lang=EN](https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?LabID=200&CntID=1115&Theme_ID=1&Pdf=False&Lang=EN). Accessed 29 November 2021
  18. Kolberg, D.I.S., Mack, D., Anastassiades, M., M. Hetmanski, T., Fussell, R.J., Meijer, T., & Mol, H.G.J., (2012) *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2465-2474. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6340-9>
  19. Pateiro-Moure, M., Martínez-Carballo, E., Arias-Estévez, M., & Simal-Gándara, J., (2008) *J. Chromatogr. A* 1196-1197, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.081>
  20. Winnik, B., Barr, D.B., Thiruchelvam, M., Montesano, M.A., Richfield, E.K., & Buckley, B., (2009) *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 195–201. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2929-z>
  21. Oulkar, D., Shinde, R., Khan, Z., & Banerjee, K., (2019) *Food Addit. Contam.:Part A* 36(1),120-130. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1547424>

22. Mallet, C.R., Lu, Z.L., & Mazzeo, J.R. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 49-58. <https://doi.org/10.1002/rcm.1276>
23. Nagatomi, Y., Yoshioka, T., Yanagisawa, M., Uyama, A., & Mochizuki, N., (2013) *J. Pestic. Sci.* 38(3), 144-146. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D13-008>
24. Chichila, T., & Walters, S., (1991) *J. AOAC Int.* 74(6), 961-967. <https://doi.org/10.1093/jaoac/74.6.961>
25. Nardin, T., Barnaba, C., Abballe, F., Trenti, G., Malacarne, M., & Larcher, R., (2017) *J. Sep. Sci.* 40, 3928-3937. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700579>
26. Kasai, N., Otani, N., Solubilization method of secondary cell wall, Japan patent, JP2017075133 A 2017-04-20

## 第3章 オクラトキシン A のオンレジン直接蛍光測定法に 関する研究

### 3.1 緒言

#### 3.1.1 背景

カビ毒は、第1章でも述べたように栽培から食卓に上るその直前まで、汚染に対して注意を払う必要がある。オクラトキシン A (OTA) は、我国では 2021 年現在、規制値は設けられていないが、アフラトキシンと比較して低温でも産生が起こる点などから、世界の広範囲で汚染が広がっている注目すべきカビ毒である。我国でも実態調査が行われ、2014 年 1 月の食品安全委員会の健康影響評価の評価結果の中で、「汚染状況についてのモニタリングを行うとともに規格基準について検討することが望ましい」と記されている [1]。カビ毒の汚染は、多くが穀類で起こることも問題である。穀類は食糧としての根幹であり、安全な穀類の国際的流通は、飢餓からの脱出に不可欠である。

このような状況から、特に低所得国においてこそ、その安全性を担保する必要がある。HPLC や LC-MS のような高価で、限られた場所でのみ実施可能な分析法は、いくら科学技術的に高い性能を有していても実際に用いることができず役に立たない。安価で容易で、かつ迅速でオンサイトで可能な分析法が必要である。本研究では、OTA を対象とした、簡易な固相蛍光検出装置での直接蛍光測定法を開発することにより、この問題を解決することに取り組んだ。

#### 3.1.2 オクラトキシン A (OTA) の概要

OTA の構造式を図 3-1 に示す。

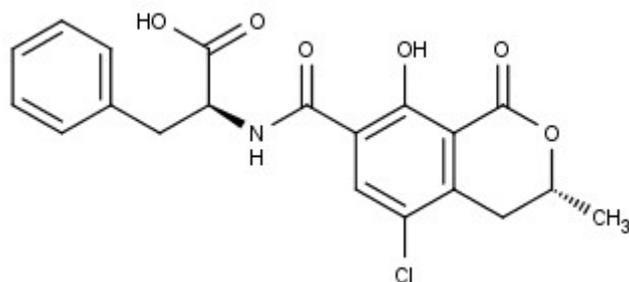


図 3-1 オクラトキシシン A (OTA) の構造式

OTA は、*Aspergillus* 属と *Penicillium* 属に属する真菌が産生する有毒な二次代謝産物である [2]。動物や人間にとって強力な腎毒性、催奇形性、胚毒性、遺伝毒性、神経毒性、発癌性、免疫抑制性を持つ化合物である [3, 4, 5]。OTA を産生する真菌類は、様々な食用作物で生育し、特に穀類・種実類をベースにした加工食品や動物用飼料を経由して二次的にも食品にこのカビ毒の蓄積を引き起こす [6]。特に、コーヒーやココアなど、消費量の多い飲料に OTA の存在が報告されている [7, 8, 9]。コーヒー生豆やカカオ生豆は保管や輸送の過程でのカビの発生によって OTA の汚染を引き起こしたり、加工段階においても温度や湿度によって OTA の産生が増加する可能性がある [10, 11]。汚染された食品を摂取することで OTA に暴露する潜在的なリスクがあるため、OTA はヒトの血液中にも頻繁に検出されている [12, 13, 14]。そのため、食品や飲料に含まれる OTA の含有量を測定するには、高感度で信頼性の高い方法が必要となる。しかし、OTA を定量するために世界で最も使用されている手法は、質量分析計 (MS) と結合した高速液体クロマトグラフ (HPLC) である [15, 16] が、熟練した分析者が必要であり、高価な機器となる。MS での検出感度を向上させるためには、マトリクスによる干渉を排除する精製と濃縮が必要となる。近年、これにはイムノアフィニティーカラム (IAC) が最もよく使われる。IAC による精製は、抗原抗体結合を

用いた精製法であるため、その効果は絶大で、測定上の干渉を最小限にすることが可能である。特に LC-MS の測定で問題となるイオン化におけるマトリクスの干渉を排除することで、マトリクスマッチング検量線を使用したり、高価な安定同位体標識の内部標準物質を利用したりする必要がなくなる [17, 18]。しかし、抗体を用いた IAC には、交差反応性、有機溶媒耐性、使用期限の短さ、コストの高さなど、いくつかの重大な欠点がある [19, 20]。

このような理由から、カビ毒に対して自然な親和性を持つ分子、すなわち人工抗体を開発するための様々な試みがなされており、その一つがアプタマーである。アプタマーは、主にランダムな配列から選択された短いオリゴヌクレオチドのことで、再現性が高く、耐熱性があり、可逆的に折り畳むことができるため、環境変化への耐性が高いとされている [21]。しかし、塩基数が限られているため、特定の相互作用の発現に制約があり、アプタマーの開発と応用を大きく妨げている [22]。現在のところ、残念ながら安定的に供給でき、強い親和性を持つ人工抗体は存在していない。

OTA は本質的に蛍光性を有しているため、蛍光分光法は OTA の検出に適していると思われる。我々はこれまでの研究で、吸着剤表面に捕捉した蜂蜜中の蛍光性抗生物質を固相蛍光で検出する「オンレジン蛍光測定法」を開発した [23]。しかし、このオンレジン蛍光測定法を一般的な加工食品のような複雑なマトリクスを持つ試料で行う場合は、マトリクスの干渉により、吸着剤の親和性の不足が懸念されるため、非常に強い親和性を持つ抗体であれば、この問題を解決すると考えた。そこで、OTA のために開発された IAC 用のモノクローナル抗体 (OTA-IgG) を用いたオンレジン蛍光測定法を検討した。

オンレジン蛍光測定法は、抗体を固定相の表面に置くだけでよいため、IAC と比較して、高価な抗体を大量に必要としない。また、有害な有機溶媒もほとんど

使用する必要がなく、高い感度と選択性を示すことが可能となる。

本研究では、これまでに開発したオンレジン蛍光分光法を OTA 測定に適用するために、効率的に OTA 抗体をグリシジルメタクリレートモノリスディスクに導入する方法を新たに開発した。また、OTA の潜在的な検出を妨げる著しく複雑なマトリクスを持つコーヒー生豆などの試料を用いて、安定性、感度、直線性、選択性に関して分析の性能評価した [24, 25, 26]。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬及び試料

HPLC 用アセトニトリルは、シグマアルドリッチジャパン（東京）から入手した。OTA およびその他の試薬は、富士フイルム和光純薬株式会社（大阪）から入手した。OTA をエタノールに溶解して原液（1 mg/mL）を調製し、-20 °C で保存した。試液に用いた純水は、東レ（東京）の LV408 超純水製造装置によって製造した水を用いて調製した。

直径 8 mm、厚さ 3 mm のポリマーモノリスを以下のように調製した。9.5 g のグリシジルメタクリレートと 0.5 g のエチレングリコールジメタクリレートを 10 mL の 1-プロパノールに懸濁し、そこに 0.1 g の 2,2'-アゾビスジイソブチロニトリルを加えた。その後、5 分間攪拌した後、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) チューブ（内径 8 mm、長さ 10 cm）に入れた。その後、PTFE チューブを密閉し、80 °C で 24 時間加熱してモノリスを形成した。得られたモノリスを、プリント基板用カッター（K-111、ホーザン株式会社製、大阪）を用いて 3 mm の厚さに切り落とし、円盤状にした。合成したモノリスの比表面積と平均細孔径は、BELSORP-mini II（マイクロトラック・ベル社製、大阪）で測定した。

OTA 用のモノクローナル抗体 (OTA-IgG) 溶液は、堀場製作所（京都）から提

供された。

小麦、レーズン、コーヒー生豆、カカオ生豆の試料は市場から入手した。

### 3.2.2 オンレジン蛍光検出器

OTA は、発光ダイオードによる光励起部とフォトダイオードによる測定部で構成された、これまでに当研究室で開発したオンレジン蛍光検出器[23]を用いた(図 3-2)。

本研究では、励起光源側に 375 nm の発光ダイオード(日亜化学工業製、徳島)、フォトダイオードセンサーモジュール S1337 (浜松ホトニクス、静岡)、400 nm のショートパスフィルター (エドモント オプティクス ジャパン製、東京)、検出器側に 450 nm のバンドパスフィルター (バンド幅 10 nm) (エドモント オプティクス ジャパン製) を用いた。



図 3-2 オンレジン蛍光検出器外観

### 3.2.3 OTA-IgG を固定化したモノリスの作製

10 枚のモノリスディスクを水で飽和させ、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のプロテイン G を含む 4 mL の 0.1 mol/L PBS 溶液に室温で 24 時間浸漬し、モノリスディスクにプロテイン G を固定化した。また、モノリスディスク上のモノマーに由来する残りのグリシジル基は、pH 8.5 の 0.1 M Tris-HCl 緩衝液で開環して不活性化した。

OTA-IgG 溶液を 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した。この溶液 40  $\mu\text{L}$  を 10 mL 試験管に入れ、プロテイン G を固定化したモノリスディスク 1 枚を片面だけが浸るように入れ、室温で 24 時間放置した。

このモノリスディスクを 0.02 % アジ化ナトリウムを含む同じ緩衝液で 4  $^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 3.2.4 試験溶液の調製

農産物からの OTA 抽出は Ahmed らによる検証結果から、抽出効率が高いと評価された AOAC のコーヒー生豆中の OTA 公定法を採用した [27]。すなわち、再説した農産物 5 g を 100 mL のメタノール/3%炭酸水素ナトリウム (50:50) で、Ultra-Turrax ホモジナイザー (T18 ベーシック、イカジャパン、大阪) を用いて 3 分間ホモジナイズして抽出した。抽出液 5 mL を 50 mL のスクリュウキャップ試験管に入れ、続いて酢酸エチル 10 mL、水 10 mL、塩化ナトリウム 5 g を加えた。密栓後、5 分間ボルテックスを行った後に、5000 rpm で 10 分間、4  $^{\circ}\text{C}$  で遠心分離した後、酢酸エチル層をナス型フラスコに移した。さらに 5 mL の酢酸エチルで抽出を繰り返し、酢酸エチル層を先のナス型フラスコに移し、合わせた。

この酢酸エチルをロータリーエバポレーターにより濃縮し、窒素を用いて緩やかに乾固した。これを 0.1 mol/L の PBS 含有 50 % エタノール 2 mL で再溶解し、試験溶液とした。

### 3.2.5 オンレジジン蛍光分析

試験溶液のモノリスディスクへの通液を促進するため、吸収性の高いろ紙をモノリスディスクの下に敷き、ろ紙上に置いたモノリスディスクを、抗体の固定化を行った裏面側から 0.1 mol/L リン酸緩衝液 1 mL を通過させてディスクのコンディショニングを行った。その後、上記で抽出した試験溶液全量を同じ側から通液させ、裏面側に固定化された OTA-IgG に OTA を結合させた。その後、抗体固定化面（表面側）から 0.1 mol/L PBS 含有 50 %エタノール 2 mL を用いて、バックフラッシュ洗浄を行った。その後、モノリスディスクの抗体を固定面でオンレジジン蛍光分析を行った。なお、蛍光出力値は、コンディショニング後のモノリスディスクをブランクとして差し引き求めた。操作の概要を図 3-3 に示す。

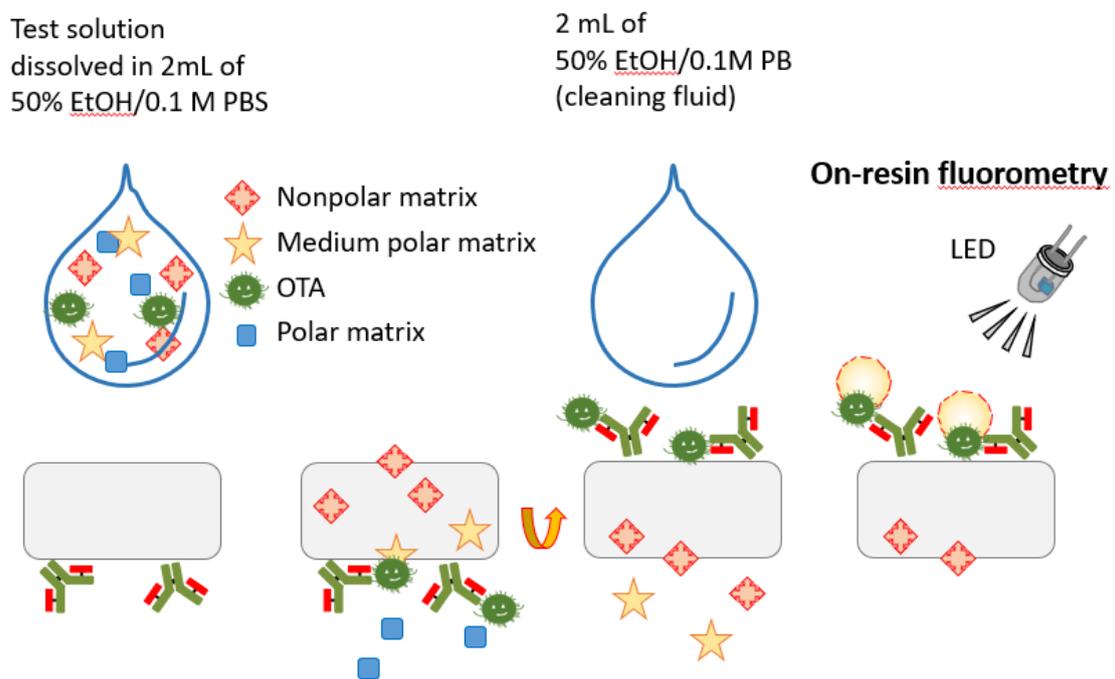


図 3-3 オンレジジン蛍光分析の概要

### 3.3 結果及び考察

#### 3.3.1 モノリスへの OTA-IgG の固定化

IgG の基本構造を図 3-4 に示す。ブルナウアー・エメット・テラー (BET) 法で得られたモノリスの比表面積は  $2.2 \text{ m}^2/\text{g}$ 、平均細孔径は  $2.8 \text{ nm}$  であった。OTA-IgG は大きすぎて小さな孔に入りにくいタンパク質であるため、モノリスの内部には浸透できないと推測した。OTA-IgG は、IgG のアミノ基とモノリスのグリシジル基が直接共有結合することでモノリスに固定化可能である。しかし、この方法では IgG の様々な領域がグリシジル基と反応してしまう。IgG のフラグメント抗原結合領域 (Fab) に影響を与えない別の共有結合法が報告されている[28]。すなわち、IgG の炭水化物部分を酸化してカルボニル基を生成する方法であるが、この方法では IgG に酸化に伴うダメージを与えることになる。

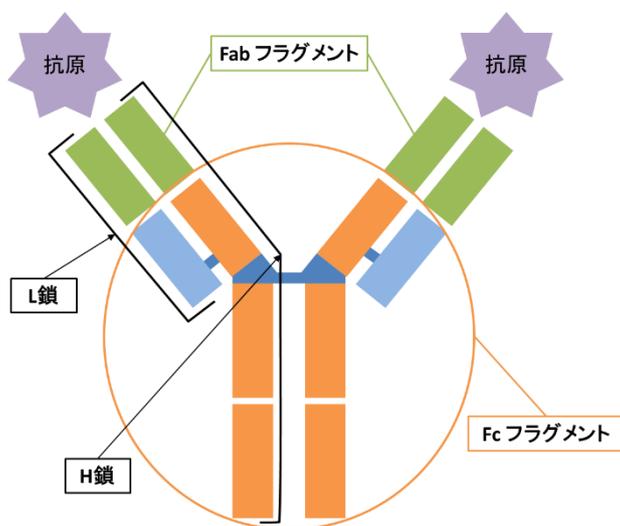


図 3-4 IgG の基本構造

一方、プロテイン G は IgG の固定化可能なフラグメント (Fc) 領域に特異的に結合することが知られている [29] ので、その方法を検討した。まずモノリスにプロテイン G を固定化し、その後、OTA-IgG をプロテイン G に結合させた。モノリスに固定化されたプロテイン G の量は、HPLC を用いて測定した反応液中のプロテイン G 濃度の減少量から算出した。固定化されたプロテイン G の量は、モノリス 1 個あたり  $10 \mu\text{g}$  ( $4.4 \times 10^{-10} \text{ mol}$ ) であった。固相での蛍光検出を容易にするためには、OTA-IgG を部位特異的に固定化することが望まれる。

そこで、 $8 \mu\text{g}$  の OTA-IgG ( $5.4 \times 10^{-11} \text{ mol}$ ) を含むリン酸緩衝液を各モノリスディスクの片面に浸漬した。プロセスの模式図を図 3-5 に示す。

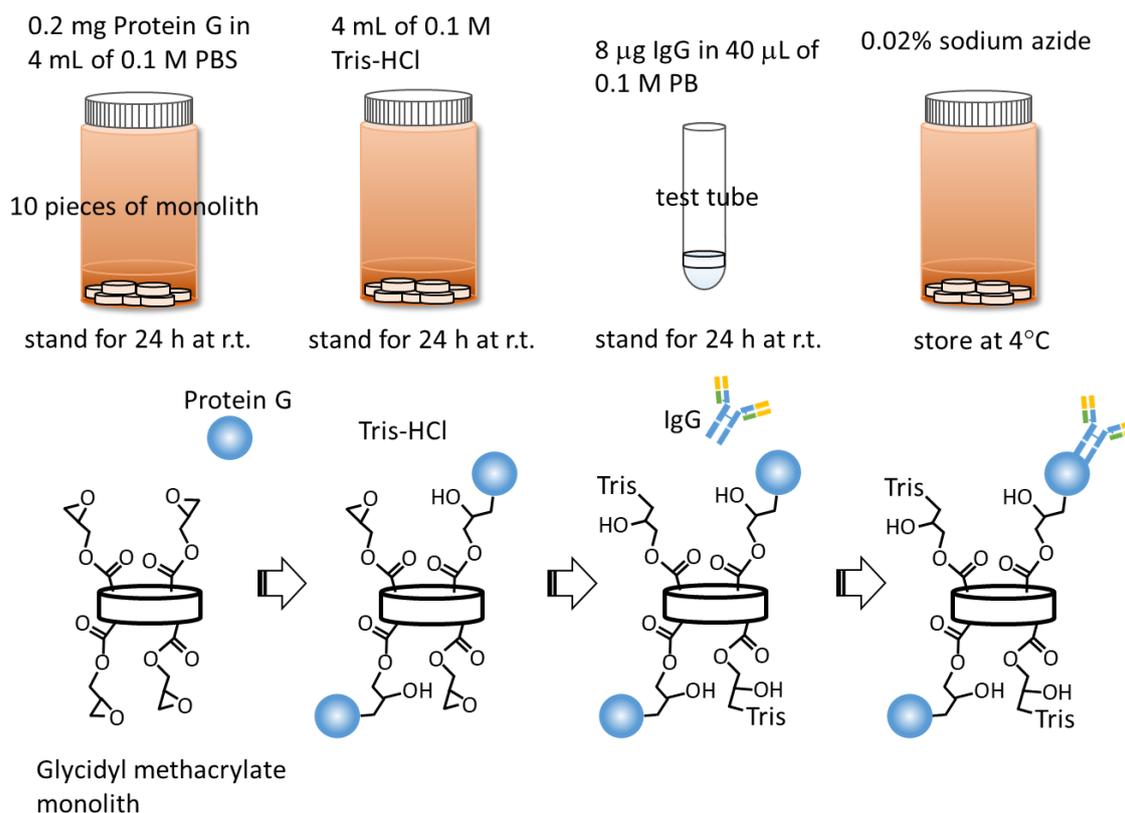


図 3-5 抗体固定化プロセスの模式図

モノリスディスクの OTA 結合容量を測定するために、10 ng/mL OTA 溶液を 50  $\mu$ L ずつ連続して負荷し、OTA の蛍光強度を測定した。OTA の積算曲線を図 3-6 に示す。

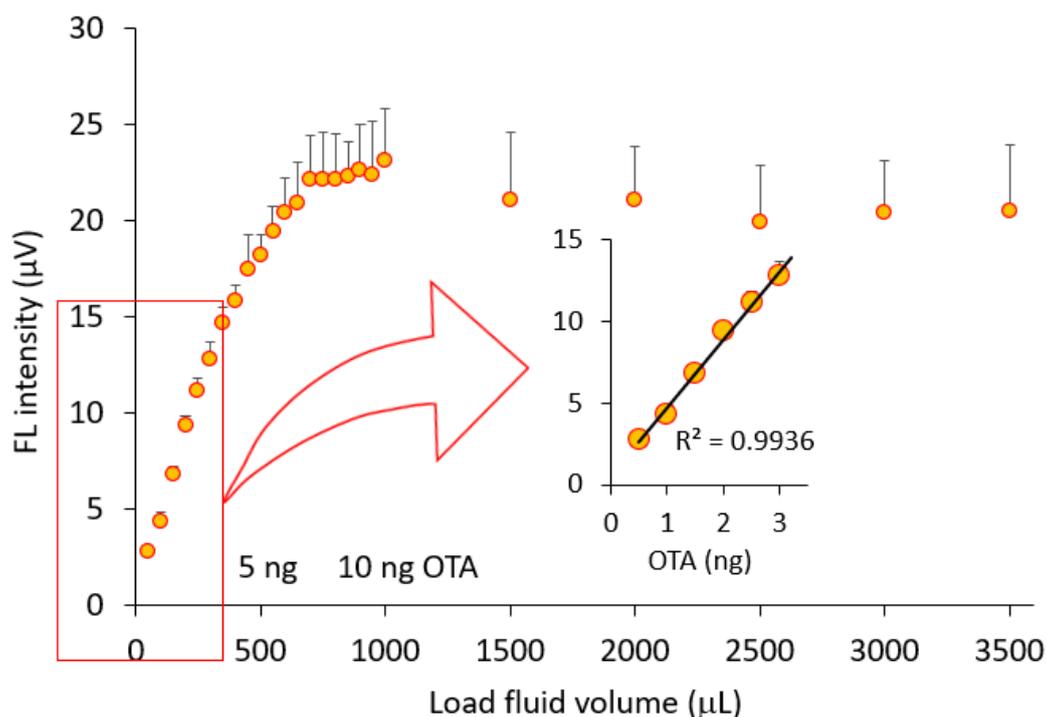


図 3-6 OTA-IgG 固定化モノリス上の OTA の積算曲線 (Ex 375 nm、Em 450 nm $\pm$ 5 nm)

OTA-IgG を固定化したモノリスディスクは、ディスク 1 枚あたり約 10 ng の OTA ( $2.4 \times 10^{-11}$  mol) で飽和状態に達した。捕捉された OTA 分子の数は、固定化された抗体の数とほぼ同じであった。これは、OTA は抗体の 2 つのエピトープに結合できるため、OTA が OTA-IgG の抗原結合部位の半分だけに捕捉されたことを意味することになる。積算曲線は、0.5~3 ng OTA の範囲で直線的であった。また、1 ng の OTA を負荷したときの蛍光強度の相対標準偏差は 10%以内であった。堀場製作所の IAC キットで使用されている OTA カラムは、1 カラムあたり 1 mg の OTA-IgG を使用しているのに対し、今回開発したモノリスディスクは、

1 ディスクあたり約 1/500 の抗体量で調製することができた。高価である OTA-IgG であるが、この量であれば実試料中の OTA を測定するのに十分安価で提供が可能である。

### 3.3.2 直接蛍光法におけるバックグラウンド蛍光強度の除去

今回開発したモノリスディスクには、バックグラウンドとして無視できない蛍光があった。これはモノマーに含まれる重合防止のための酸化防止剤によるものだと当初は考えていたが、モノマーを減圧下で蒸留して再度精製したモノマーを使用して、モノリスを合成したが、バックグラウンドは減少しなかった。OTA の蛍光強度はバックグラウンド強度を大きく上回っていたため、当初、このモノマーは蒸留せずに使用することとした。しかし、試料溶液を測定した場合、蛍光マトリクスの非特異的吸着に基づく蛍光強度は無視することができなかった。そこで、干渉物質を減らすために、試料溶液を酢酸エチルで液-液分配で精製することを試みた [30]。バックグラウンドの蛍光強度はかなり低下したが、OTA を定量するには不十分であった。また、バックグラウンドの蛍光を低減するために、オンレジン蛍光分析装置を改良した。OTA の蛍光波長は、溶液の pH に依存することが知られている [31]。蛍光分析装置の固体支持体が提供するさまざまな環境下で OTA の発光を 435 nm 付近で促進するためには、約 380 nm の励起が必要であった (図 3-7)。

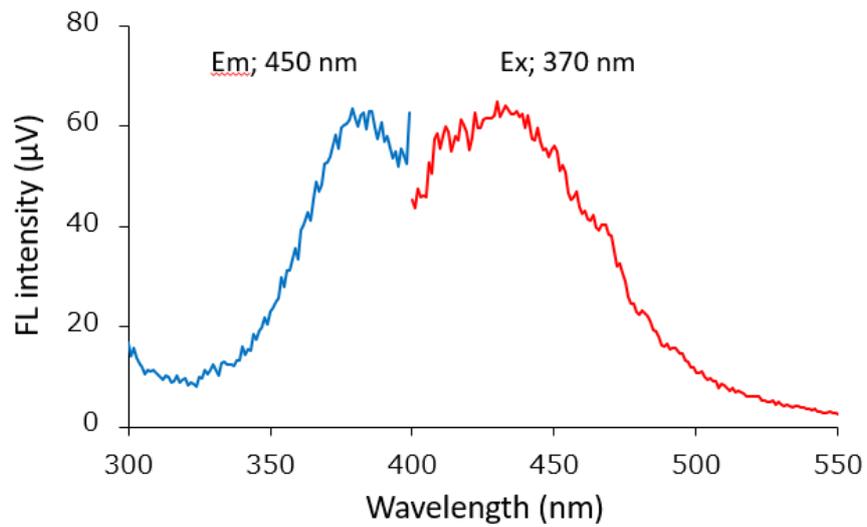


図 3-7 モノリスディスク上での OTA の励起・蛍光スペクトル

そこで、発光ダイオード LED-375 nm を励起光源とし、450 nm のバンドパスフィルター（バンド幅 10 nm）を装置ハウジング内に設置した（図 3-8）。

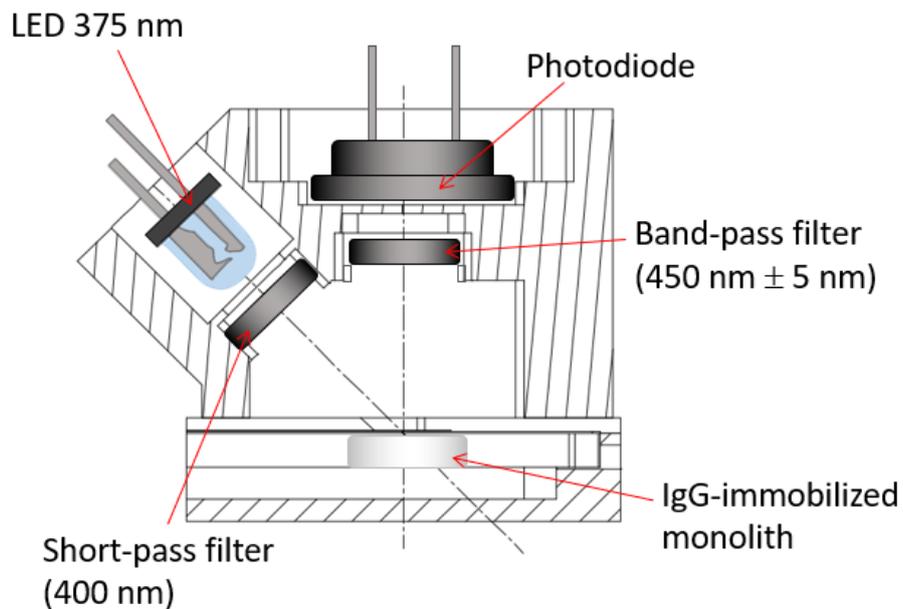


図 3-8 オンレジン蛍光検出器内の構造

これにより、バックグラウンドの蛍光強度を効果的に低減することができた。最終的に、蛍光性の試料マトリクスによる蛍光強度の増加は、試料溶液の負荷方法を変更することで解決した。ポリマーモノリスは、重合により疎水性の骨格を持ち、グリシジル残基の不活化により親水性のイミノ基を持つ [32]。オクタノール-水分配係数 (log Pow 値) が 4.74 である OTA は、水系溶媒中ではモノリスに吸着されたが、50 %エタノール中では OTA はモノリスディスクを通過した。堀場製作所の IgG カラムは、有機溶媒耐性を有しており [33]、50 %エタノール中でも OTA を確実に捕捉した。OTA よりも蛍光マトリクスの方が疎水性が高いと考え、ディスクの抗体固定化側とは反対側の面から試料溶液を負荷すると、疎水性の蛍光マトリクスはモノリスの骨格に吸着し、抗体固定化側には到達しなかった。また、OTA-IgG に捕捉された OTA は、50 %エタノールで洗浄しても解離しなかった。これらの特徴を利用し、バックフラッシュ洗浄により、蛍光マトリクスの干渉を受けずに、抗体固定化面で OTA の蛍光を測定することが可能となった。コーヒー生豆と玄麦小麦を用いた 50 %エタノールでの抗体固定化裏面からの試料溶液の負荷とバックフラッシュ洗浄の効果を図 3-9 に示す。特にコーヒー生豆において劇的な効果があることがわかる。

なお、コーヒー生豆は複雑なマトリクスを持ち、ELISA 法においても偽陽性を与えること [34]や IAC を使用した LC-MS 分析においてもマトリクス干渉を起こしてしまうことで知られている [25]。

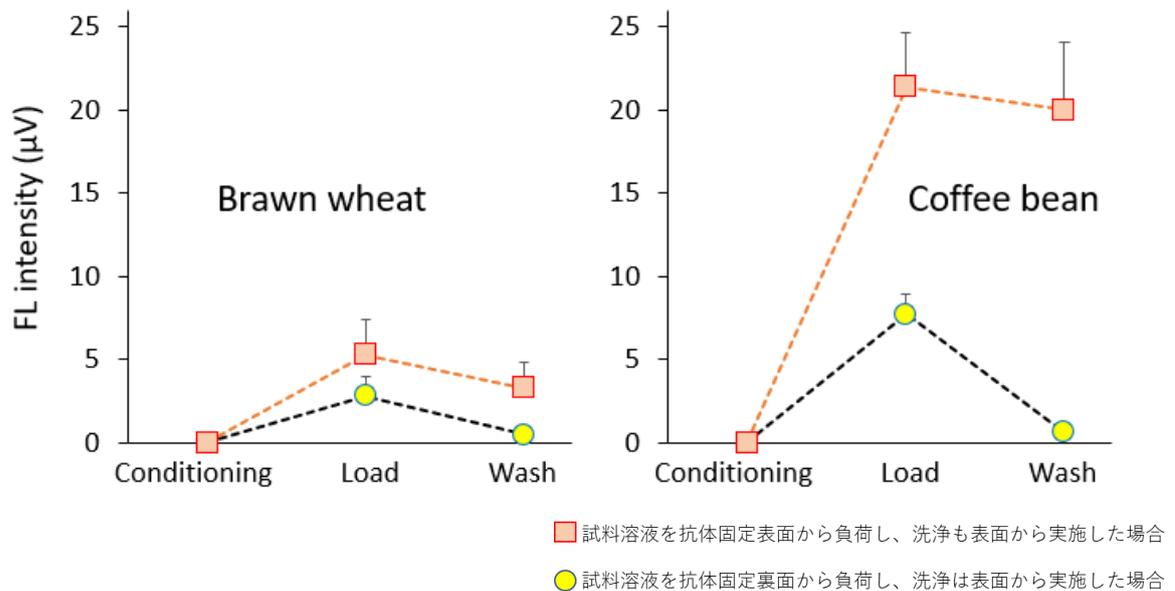


図 3-9 抗体固定化裏面からの試料溶液の負荷とバックフラッシュ洗浄の効果

### 3.3.3 食品試料の分析

OTA は多くの国で規制されており、食品中の OTA の許容値は、食品の種類やカテゴリーにもよるが、概ね  $1\sim 10\ \mu\text{g}/\text{kg}$  となっている [30]。つまり、OTA 測定  
の感度は少なくとも  $1\sim 2\ \mu\text{g}/\text{kg}$  である必要がある。

我々が開発した本法では、モノリスディスク上にコーヒー生豆  $0.25\ \text{g}$  に相当する試料液を負荷し、測定した場合はバックグラウンドの蛍光値は OTA の  $0.57 \pm 0.32\ \mu\text{g}/\text{kg}$  に相当した。バックグラウンドの蛍光値は、試料の量に依存するため、負荷する試料は  $0.25\ \text{g}$  に相当する量で他の食品も実施することにした。コーヒー生豆の他、市場から入手した、カカオ生豆、玄麦小麦、レーズンについて、OTA の残留値を評価した。その結果、すべての食品について OTA 濃度は  $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$  よりも低かった。

また、本法の性能を確認するために、上記の製品に OTA をスパイクし、OTA

の回収率を測定した結果、良好な回収率が得られた（表 3-1）。

表 3-1 食品を用いた添加回収試験結果 (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当添加)

食品	OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回収率 (% $\pm$ RSD%)
玄麦小麦	2.3 $\pm$ 0.2	78 $\pm$ 8
コーヒー生豆	2.7 $\pm$ 0.1	90 $\pm$ 4
レーズン	2.5 $\pm$ 0.1	83 $\pm$ 3
カカオ生豆	2.5 $\pm$ 0.1	83 $\pm$ 3

(n=3)

さらに、スパイクしたブランク試料から算出した検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ) を表 3-2 に示す。期待される 1~2 µg/kg の OTA の残留値を定量可能な性能基準を満たしていた。

表 3-2 食品中の OTA の検出限界および定量下限

食品	LOD <sup>a</sup> (µg/kg)	LOQ <sup>b</sup> (µg/kg)
玄麦小麦	0.55	1.9
コーヒー生豆	0.31	1.0
レーズン	0.24	0.82
カカオ生豆	0.18	0.61

<sup>a</sup> 3σ, <sup>b</sup> 10σ

### 3.4 結言

今回開発した OTA の分析法は、これまで多用されてきた HPLC や LC-MS の前処理として多用されてきた IAC と比較して、OTA-IgG の必要量が 1/500 と非常に少なく済む。またオンレジン法により直接蛍光を方法は、高価な LC、LC-MS を必要とせず、モノリスディスクの片面のみに OTA-IgG を固定し、反対側のディスクに抗体を担持させることで、試料中のマトリクスを除去することができるため、クロマトグラフィーのように測定に時間も要しない、簡便かつ迅速な方法である。よって本法は、場所を選ばず、安価で日常的な OTA 測定に有用な分析法であると考えられる。しかしながら、ベビーフードの基準値への対応など、さらに低い定量下限が求められる (表 3-3)。定量下限を低くするには、主に疎水性のマトリクスから発生するバックグラウンドが持つ蛍光値を低減する必要

がある。今回は、酢酸エチルによる液液分配による精製を行ったため、疎水性のマトリクス除去が十分でなかったことに起因すると考えられるが、これ以上の精製を加えることは迅速性を損なうことになり本意ではない。第 2 章で検討した酵素可溶化法による抽出法をさらに進め、OTA の抽出法として適用することで、さらに定量下限を下げられる可能性がある。暫定的に小麦の OTA 認証標準物質を用いた、酵素可溶化抽出法とオンレジン測定法の組み合わせによる測定を実施した。その結果を図 3-10 に示す。データ数が不十分なことから本論での言及は割愛したが、酵素可溶化法の適用性を確認したところ、認証値に対して良好な値が得られている。抽出法の変更により測定干渉となるマトリクスの成分も変化があることから、各条件の検討はさらに必要であるが、その可能性は期待できるものであり、最適な分析法の構築に向けて継続検討をする所存である。

表 3-3 EU における OTA の規制値

食品	規制値 (µg/kg)
穀類・穀類加工品	3-5
レーズン	10
コーヒー生豆・インスタントコーヒー	5-10
ワイン・ブドウジュース	2
ベビーフード類	0.5
香辛料	15

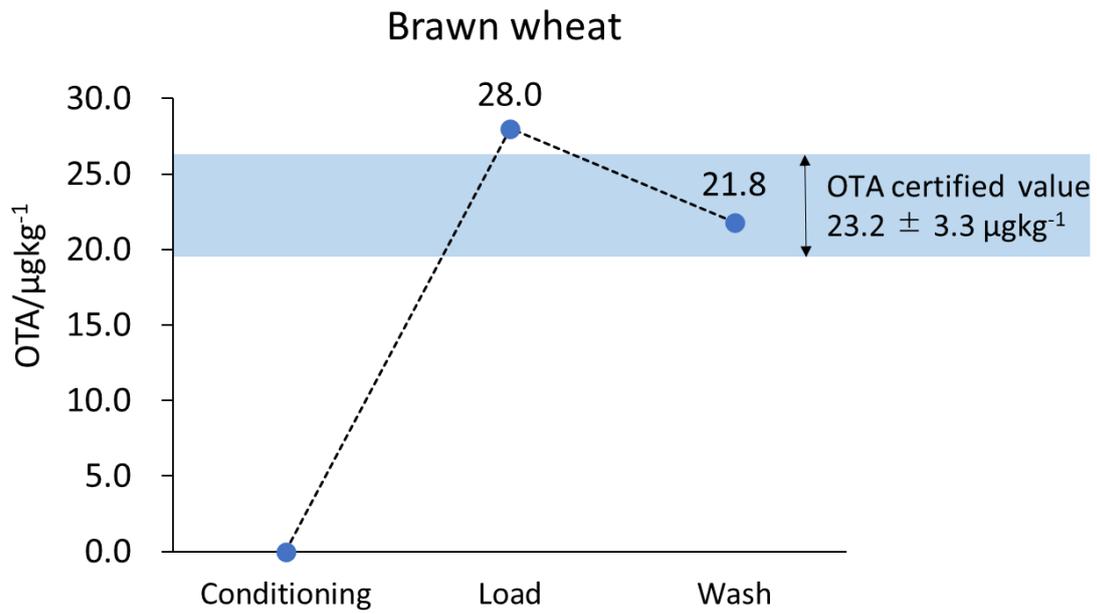


図 3-10 酵素可溶化抽出法とオンレジン測定法の組み合わせによる測定結果※

※ 酵素可溶化液のモノリスディスク負荷時の値とバックフラッシュ洗浄後の値。

洗浄後は、認証値と同等である。

## 引用文献

1. 食品健康影響評価の結果「オクラトキシン A」  
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya200903190ks>
2. Huertas-Pérez, J.F., Arroyo-Manzanares, N., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2017). Solid phase extraction as sample treatment for the determination of Ochratoxin A in foods: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57, 3405–3420.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126548>.
3. Paradells, S., Rocamonde, B., Llinares, C., Herranz-Perez, V., Jimenez, M., Garcia-Verdugo, J. M., Zipancic, I., Soria, J.M., & Garcia-Esparza, M. A. (2015). Neurotoxic effects of ochratoxin A on the subventricular zone of adult mouse brain. *Journal of Applied Toxicology* 35, 737-751. <https://doi.org/10.1002/jat.3061>.
4. Tarazona, A., Gomez, J. V., Gavara, R., Mateo-Castro, R., Gimeno-Adelantado, J. V., Jimenez, M., & Mateo, E. M. (2018). Risk management of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in maize grains by bioactive EVOH films containing individual components of some essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 269, 107-119. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.002>.
5. Marin, D. E., Pistol, G. C., Gras, M. A., Palade, M. L., & Taranu, I. (2017). Comparative effect of ochratoxin A on inflammation and oxidative stress parameters in gut and kidney of piglets. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 89, 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.031>.
6. Kőszegi, T., & Poór, M. (2016). Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins* 8, 111.  
<https://doi.org/10.3390/toxins8040111>.
7. Kilic Altun, S., Fusun, T., Yigin, A., & Gurbuz, S. (2019). Simultaneous screening of total aflatoxins (B1, B2, G1, G2) and ochratoxin A (OTA) in coffee samples. *Fresenius Environmental Bulletin* 28, 6644-6650.
8. Mitchell, N. J., Chen, C., Palumbo, J. D., Bianchini, A., Cappozzo, J., Stratton, J.

- Ryu, D., & Wu, F. (2017). A risk assessment of dietary Ochratoxin a in the United States. *Food and Chemical Toxicology* 100, 265-273.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.037>.
9. Maciel, L. F., Felício, A. L. S. M., Miranda, L. C. R., Pires, T. C., Bispo, E. S., & Hirooka, E. Y. (2018). Aflatoxins and ochratoxin A in different cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) developed in the southern region of Bahia, Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A* 35, 134-143.  
<https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1397293>.
  10. Romani, S., Sacchetti, G., López, C. C., Pinnavaia, G. G., & Rosa, M. D. (2000). Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3616-3619. <https://doi.org/10.1021/jf990783b>.
  11. Sousa, T. M. A., Batista, L. R., Passamani, F. R. F., Lira, N. A., Cardoso, M. G., Santiago, W. D., & Chalfoun, S. M. (2019). Evaluation of the effects of temperature on processed coffee beans in the presence of fungi and ochratoxin A. *J. Food Saf.* 39, e12584. <https://doi.org/10.1111/jfs.12584>.
  12. Skaug, M. A. (2003). Levels of ochratoxin A and IgG against conidia of *Penicillium verrucosum* in blood samples from healthy farm workers. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10, 73-77.
  13. Medina, A., Mateo, E. M., Roig, R. J., Blanquer, A., & Jimenez, M. (2010). Ochratoxin A levels in the plasma of healthy blood donors from Valencia and estimation of exposure degree: Comparison with previous national Spanish data. *Food Additives & Contaminants, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 27, 1273-1284. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.487876>.
  14. Cramer, B., Osteresch, B., Munoz, K. A., Hillmann, H., Sibrowski, W., & Humpf, H-U. (2015). Biomonitoring using dried blood spots: Detection of ochratoxin A and its degradation product 2'R-ochratoxin A in blood from coffee drinkers. *Molecular Nutrition & Food Research* 59, 1837-1843. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500220>.
  15. Meerpoel, C., Vidal, A., Diana di Mavungu, J., Huybrechts, B., Tangni, E. K., Devreese, M., Croubels, S., & De Saeger, S. (2018). Development and validation of

- an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of citrinin and ochratoxin a in a variety of feed and foodstuffs. *J. Chromatogr. A* 1580, 100-109.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.039>.
16. Zhang, Z., Fan, Z., Nie, D., Zhao, Z., & Han, Z. (2019). Analysis of the carry-over of ochratoxin a from feed to milk, blood, urine, and different tissues of dairy cows based on the establishment of a reliable LC-MS/MS method. *Molecules* 24, 2823.  
<https://doi.org/10.3390/molecules24152823>.
  17. Monaci, L., & Palmisano, F. (2004). Determination of ochratoxin A in foods: State-of-the-art and analytical challenges. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 96-103.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-003-2364-5>.
  18. Wilcox, J., Donnelly, C., Leeman, D., & Malrey, E. (2015). The use of immunoaffinity columns connected in tandem for selective and cost-effective mycotoxin clean-up prior to multi-mycotoxin liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis in food matrices. *J. Chromatogr. A* 1400, 91-97.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.053>.
  19. Castegnaro, M., Tozlovanu, M., Wild, C., Molinie, A., Sylla, A., & Pfohl-Leskowicz, A. (2006). Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Molecular Nutrition & Food Research* 50, 480–487.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200500264>.
  20. Şenyuva, H. Z., & Gilbert, J. (2010). Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B* 878, 115-132.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.042>.
  21. Gotrik, M. R., Feagin, T. A., Csordas, A. T., Nakamoto, M. A., & Soh, H. T. (2016). Advancements in aptamer discovery technologies. *Acc. Chem. Res.* 49, 1903-1910. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00283>.
  22. Zhu, Z., Song, Y., Li, C., Zou, Y., Zhu, L., An, Y., & Yang, C.J. (2014). Monoclonal surface display SELEX for simple, rapid, efficient, and cost-effective aptamer enrichment and identification. *Anal. Chem.* 86, 5881-5888.  
<https://doi.org/10.1021/ac501423g>.

23. Yamamoto, A., Yoshii, S., Suematsu, C., Tatematsu, M., Shoji, H., Kato, Y., Saito, M., & Inoue, Y. (2013). An optosensing device for detecting tetracycline antibiotics in honey. *Anal. Methods* 5, 773-777. <https://doi.org/10.1039/C2AY25667C>.
24. Vatinno, R., Aresta, A., Zambonin, C.G., & Palmisano, F. (2008). Determination of ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1187, 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.020>.
25. Kokina, A., Pugajeva, I., & Barkevics, V. (2016). Improved sensitivity of ochratoxin A analysis in coffee using high-performance liquid chromatography with hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry (LC-QqQLIT-MS/MS). *Food Addit. Contam.* 33, 693-702. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1152138>.
26. Benites, A. J., Fernandes, M., Boletto, A. R., Azevedo, S., Silva, S., & Leitão, A.L. (2017). Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Contr.* 73, 1223-1228. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.037>.
27. Ahmed, N. E., Farag, M. M., Soliman, K. M., Abdel-Samed, A. K. M., & Naguib, K. M. (2007). Evaluation of methods used to determine ochratoxin A in coffee beans. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9576-9580, <https://doi.org/10.1021/jf072558x>.
28. Gonzalez-Martinez, M. A., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A., Abad, A., & Montoya, A. (1997). Development of an automated controlled-pore glass flow-through immunosensor for carbaryl. *Anal. Chim. Acta* 347, 199-205. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00003-2).
29. Sjöbring, U., Björck, L., & Kastern, W. (1991). Streptococcal protein G – Gene structure and protein binding properties. *J. Biol. Chem.* 266, 399-405.
30. Chapuis-Hugon, F., Boisbaudry, A., Madru, B., & Pichon, V. (2011). New extraction sorbent based on aptamers for the determination of ochratoxin A in red wine. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1199-1207. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4574-y>.

31. Li, T., Jeon, K-S., Suh, Y. D., & Kim, M. G. (2011). A label-free, direct and noncompetitive FRET immunoassay for ochratoxin A based on intrinsic fluorescence of an antigen and antibody complex. *Chem. Commun.* 47, 9098-9100. <https://doi.org/10.1039/C1CC12604K>.
32. Wei, J., Bai, X. Y., Yan, J. (2003). Water-swelling hydrophobic porous copolymers based on divinylbenzene and methyl acrylate: Preparation and water-swelling behavior. *Macromolecules.* 36, 4960-4966. <https://doi.org/10.1021/ma0216831>.
33. Uchigashima, M., Yamaguchi, Y., Narita, H., Nakajima, M., & Miyake, S. (2012). Development of an immuno-affinity column for ochratoxin analysis using an organic solvent-tolerant monoclonal antibody. *Methods* 56, 180-185. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.09.006>.
34. Lee, H-J., Meldrum, A. D., Rivera, N., & Ryu, D. (2014). Cross-reactivity of antibodies with phenolic compounds in pistachios during quantification of ochratoxin A by commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits. *J. Food. Protection* 77, 1754-1759. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-189>.

## 第4章 総括

### 結語

地球環境が温暖化など、著しい変化が起こる中、世界人口はますます増加の傾向にある。肥沃な土地は限られ、食糧生産が可能な土地も限られる。飢餓に直面している国も少なくはない。一方で、我国においては、日々新しい食品が製造され、そして余り、廃棄される、いわゆる食品ロスが大きな問題となっている。ゼロリスクを求めがちな潔癖症ともいえる我国の国民性も、この食品ロスに大きく寄与してしまっていると考えられる。

日々大量の食品を廃棄しているような状況にも関わらず、カロリーベースで食卓に上る食品のおよそ7割を輸入に頼っている。地球環境から得られた多くのエネルギーを廃棄のために使っている現状がある。食の問題は、すでに自国の話のみでなく、地球全体での食糧供給について考える国際的なサプライチェーンの時代となっている。

そのような加速する食のグローバル化において、安全な食を供給するに、その担保の手段として「分析」がある。分析によって、食品中の危害要因物質の量を測り、そして科学的に導き出された規制値を持って担保する。しかしながら、この「分析」についての課題は多い。科学の進歩とともに、言い換えれば人智とともに、化学物質の安全性、危険性が理解されてきた。近年、危害要因となりうる物質については、ポジティブリスト制度が引かれ、原則、食品に含有されてはいけない物質として規制がかかるようになってきた。このような中で分析を実施しなければならない物質は年々増加の一途をたどっている。各研究者は、これら危害要因物質を網羅的にかつ簡便に測定できないかと日々努力を重ね、分析機

器の性能向上とともに達成されつつある。しかし、網羅的に測定する技術は、散漫を招き深さが欠如していることに注意を向ける必要がある。

危害要因物質として我国でも関心の高い農薬の分析は、その代表的な例といえる。農薬は、現在 1000 種を超えるといわれ、農業生産の際に使われる殺虫効果、殺菌効果、成長抑制などの効果を持つ物質の総称であり、化学的、物理的性質は多岐にわたる。これらを網羅的に測定するには、クロマトグラフによる分離と質量分析計による分離・検出が主な手段となる。この GC-MS(/MS) や LC-MS(/MS) の近年の性能向上は著しく、選択的に目的とする物質のみを検出する能力は極めて高い。しかし、選択的に「見える化」が可能な機器であればあるほど、その能力にマスキングされ、「見えなくなった」部分が拡大していることに気づく必要がある。選択性の高い機器の出現は、測定対象とする目的物質の抽出から精製の手段を「安易」に簡略化する風潮につながり、真の含有量を知りえていない可能性に盲目となってしまいう危険性がある。特に種類の多い農薬は、多数の農薬を一気に測定したいという欲求から、すでに多成分一斉分析法として簡便な抽出・精製法が開発され、世界的に流行している。網羅的多成分分析、すなわち準定量的なスクリーニング分析法という当初の目的を忘れ、「利便性の高い分析方法」ということのみ傾き、これが先行し、危害要因物質の「定量法」として適用拡大がされている。近年、分析法は、意図する目的に対する性能評価を行ってから使用することが当たり前となっているが、この性能評価において添加回収試験が代用として多用される。添加回収試験では真に食品中に含有した危害要因物質の抽出効率とは違うことを理解する必要がある。

このような状況から、問題提起も含め、第 2 章で多成分一斉分析法では分析が困難なピピリジニウム系農薬を対象として、酵素可溶化による高吸着性物質の抽出効率の向上の研究を行った。その成果として、柔和な条件で効率の高い抽

出法が確立できた。この成果は、可溶化条件の最適化は別途必要であるが、他の危害要因物質の効果的な抽出法として提案できるものである。さらには他の抽出法と組み合わせることで相乗効果も期待されるため、継続して研究を進めたいと考える。

また、農薬と同様に食の安心を妨げるものとして関心の高いカビ毒においては、危害要因をもつ有機化合物であることは農薬と違いはないが、合成開発される農薬とは違い、発生するカビの種に起因して産生する毒素であることから、その種類は限定的である。しかし、意図的に使用し残留する農薬とは違い、その汚染・残留の場面が絞れないことから、迅速・簡便に残留量が把握できる必要がある。カビ毒分析においても近年は農薬と同様に、LC-MS/MS などの高額で、大型な機器を用いた分析法が多く報告されているが、測定場所を選ぶ分析法はカビ毒測定において本質的な期待とはかけ離れている。必要な分析技術の性能は、オンサイトで可能なことであるはずである。この問題点に対して、第3章では、現在、世界的汚染が顕著で、徐々に問題が表面化し、我国においても規制値制定に動きつつあるオクラトキシン A を研究対象として選定し、意図する性能を持った迅速分析法について検討を行った。その成果として、クロマトグラフィーなどに頼らず、抗体を導入した小型ディスク上に直接光を当て、発せられた蛍光を測定する方法によって、迅速かつ安価で、オンサイトで測定可能な分析法が確立できた。本来の分析法の性能の高さは、その利用する意図に即しているかを評価しなくてはならない。本研究では、試料液の調製について煩雑さが残るため、適用の可能性が示唆された酵素可溶化法との組み合わせでの最適化を追求したいと考えている。

地球環境が変化する中、人口増加に対応し、食のグローバル化に伴う国際的食品サプライチェーンが必要となっている現代において、また、新型コロナウイルス

ス感染症（COVID-19）に翻弄され、外出もままならない 2022 年年初においても、豊かな食生活の維持は、生活の質を維持するうえで最も重要である。分析というカテゴリーで、食の問題にかかわる一員として、この研究を通じて得られた技術知識、及び感じた課題点を忘れることなく、今後、さらに要求が高まっていく食の安全に貢献していき、飢餓に苦しむ人たちの食生活を豊かにできる分析者でありたいと願い、そうなれるように研鑽していく所存である。

## 投稿論文

1. A label-free, direct solid-phase fluorimetric analysis of ochratoxin A in agricultural products with monoclonal antibody-immobilized monolith

**Koji Kikukawa**, Miki Fukui, Ayano Oka, Ryohei Yamamoto, Atsushi Yamamoto, Mikiko Uchigashima, Takeshi Kono, Daisuke Kozaki, Shuji Kodama

Food Chemistry, Volume 346, 1 June 2021, 128736

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128736>

2. An Enzymatic Solubilization Method to Analyze Bipyridinium Herbicide Residues in Agricultural Products

**Koji Kikukawa**, Takara Koide, Keisuke Yagi, Tomoharu Fujiyoshi, Satoru Kosaka, Ryohei Yamamoto, Naoya Kasai, Atsushi Yamamoto

Food Chemistry (2022 年 1 月 投稿中)

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、「哲学を持って」と、終始適切なご指導とご鞭撻を賜りました中部大学応用生物学部食品栄養科学科 山本 敦 教授に深く感謝申し上げます。

本研究の報告会、審査会において、常に丁寧なご助言とご指導をいただきました中部大学応用生物学部 堤内 要 教授、並びに 石田 康行 教授に深く感謝申し上げます。

本研究における酵素使用についてご指導いただきました山本 良平 先生に感謝申し上げます。

本研究の実験において多大な協力をいただきました中部大学大学院応用生物学研究科 博士前期課程 小出 高羅 氏に心から感謝いたします。

農薬、カビ毒の分析法について、ご指導とご助言をいただきました一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC 藤吉 智治 氏、八木 啓介 氏に感謝いたします。

また、このような研究の機会を与えていただきました一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC 役員の皆さま、職員の皆さま、本当にありがとうございました。

最後に、企業人と学生の二足の草鞋に、理解と協力をいただき、生活面、精神面で支えてくれた妻と昨年急逝した義母に、また、同じ立場の大学院生、大学生として、叱咤激励をくれた子どもたちに深い感謝の意を表して謝辞と致します。