

Feature Article

アプリケーション

カビ毒分析用前処理カラム「SmartColumn」の開発

Development of an Immunoaffinity Column “SmartColumn” for Mycotoxin Analysis

内ヶ島 美岐子

Mikiko UCHIGASHIMA

食品中のカビ毒アフラトキシン、オクラトキシンを分析する際に必要な前処理用カラム「SmartColumn」シリーズを開発した。「SmartColumn」は、抗体を利用したイムノアフィニティーカラムであり、カラムの性能は抗体に依存するところが大きい。抗体から自社で開発、作製することにより、従来のイムノアフィニティーカラムよりも有機溶媒耐性の高いカラムを開発することができた。その結果、食品から有機溶媒を用いて抽出した抽出液を、少ない希釈でカラムに負荷することができ、希釈により濁りが生じて分析の難しかった試料についても分析できるようになった。アフラトキシン用カラム「AFLAKING」、オクラトキシン用カラム「OCHRAKING」、どちらもアセトニトリル濃度20%まで使用可能である。

“SmartColumn” products consisting in “AFLAKING” and “OCHRAKING” were developed for mycotoxin analysis. This product is an immunoaffinity column whose performance depends on the antibody used. The newly developed IAC was the best regarding organic solvent-tolerance at the time the product was launched. Both “AFLAKING” and “OCHRAKING” can be used for acetonitrile having a concentration of up to 20%.

はじめに

カビ毒とは、カビの二次代謝物として産生される化学物質のうちで、ヒトや家畜、魚類などに対して有害な作用を示す物質の総称であり、現在300種類以上のカビ毒が報告されている。これらのカビ毒は自然毒であるため、食品への汚染を防止することは困難であり、また、比較的熱に強いので、通常の加工・調理ではカビ毒に汚染された食品から除去することは困難である。そこで、健康被害の予想されるカビ毒に対しては国が規制値を策定することにより、カビ毒の摂取を最小限に抑えている。現在、国内では、アフラトキシン(Aflatoxin：AF)、パツリン、デオキシニバレノールに規制値が設定されており、それぞれに通知法として、妥当性評価された試験方法がある。カビ毒の分析には主に高速液体クロマトグラフィー(High-performance liquid chromatography：HPLC)を用い

るが、食品そのままでは分析できないため、溶媒を用いて食品から抽出した溶液をHPLCで分析することになる。この抽出溶液には様々な夾雑物質が含まれるため、精製しなければならず、この精製に用いるのがイムノアフィニティーカラム(Immunoaffinity column：IAC)であり、AF分析用の前処理カラム「AFLAKING」は、AF分析の通知法に掲載されたIACである。

IACは、アガロースゲルに目的物質に対する抗体を結合させたカラムで、抽出液中の目的物質を特異的に捕捉することにより、精製、濃縮することができる。しかし、IACは、たんぱく質である抗体を利用しているため、一般的に有機溶媒に弱い^[1]。例えば、AF分析では、食品からAFを抽出する際に有機溶媒を使用するため、カラムに負荷する際には水での十分な希釈が必要であるが、希釈による液量の増加や沈殿物の発生などが問題となる。そこで、

有機溶媒耐性の高い抗体を作製することで、従来のIACよりも少ない希釈で使用できるIACを開発できた。

アフラトキシン用 イムノアフィニティーカラム

AFは天然物中で最強の発がん性物質とされており、日本でも規制値が設定されている。2011年10月に、それまでAFB1のみの規制であったのが、トータルAF (Total Aflatoxin : TAF)として類縁体であるAFB1, B2, G1, G2を合わせた総量規制となった。このため、IACに使用する抗体もこれらのすべてのAF類縁体に同等に反応し、さらに有機溶媒耐性も高い抗体が必要である。Figure 1にその4種類のAF類縁体の構造を示す。

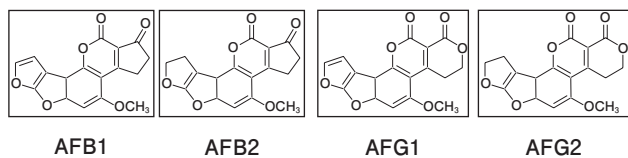


Figure 1 Structures of TAF

抗AF抗体作製

AFは低分子化合物であり、それ自体に免疫原性がないため、免疫原としてAFB2とたんぱく質であるKLH*1との結合体を調製し^[2, 3]、これをマウスに免疫した。AFに対する抗体価の上昇したマウスの脾臓細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞と細胞融合し、ハイブリドーマを得た。その中から、Figure 1のすべてのAFに反応し、有機溶媒耐性の高いものをスクリーニングし、スクリーニングによりハイブリドーマを選択した後、細胞クローニングし、モノクローナル抗体産生細胞を得た。さらに、この中からもっとも反応性が高く、かつ有機溶媒耐性が高かつ

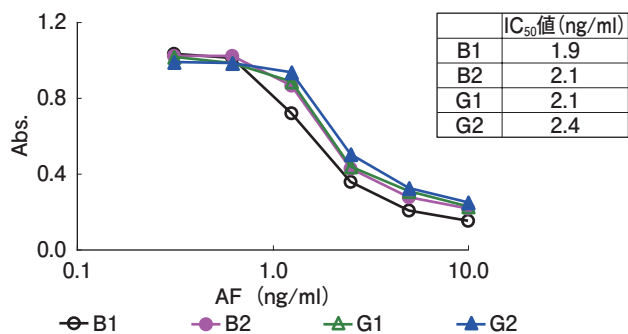


Figure 2 Reactivity of the antibody with AF in ic-ELISA

た抗体産生細胞を、マウスの腹腔内に接種し採取された腹水からモノクローナル抗体を精製し、以降の実験に用いた。

調製したモノクローナル抗体のAFに対する交差反応性を間接競合ELISA*2によって調べた。固相化抗原にはAFと牛血清アルブミン結合体を用いて、抗体と各AFとの競合反応を行った。Figure 2は、その結果であるが、IC₅₀値*3は、B1が1.9 ng/mL, B2が2.1 ng/mL, G1が2.1 ng/mL, G2が2.4 ng/mLとなり、すべてのAFに対して同等の反応性を有した抗体であることがわかった。次に、この抗体の有機溶媒耐性について調べた。AF分析の通知法では、抽出液がアセトニトリルであるため、ここでもアセトニトリル耐性を調べた。Figure 3は、AFB1における間接競合ELISAの結果であるが、アセトニトリル耐性は、10%→20%→30%→40%と濃度依存的に低下したが、40%まで反応性が認められ、50%ではほとんど反応性はなかった。このことから、アセトニトリル40%まではAFと反応する抗体が得られたことがわかる。

*1: Keyhole Limpet Hemocyanin : スカシ貝ヘモシアニン

*2: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay : 抗原あるいは抗体を固相に結合し、液相の抗原あるいは抗体に酵素を標識して抗原抗体反応させ、反応後に洗浄することによって未反応物を除去し、固相に結合した酵素の活性を検出する測定法

*3: 50% of inhibition concentration value : 吸光度を50%阻害する濃度

IACの作製

目的の抗体が得られたことがわかったので、次にこの抗体を用いてIACを作製した。ゲルは、活性化済みアガ

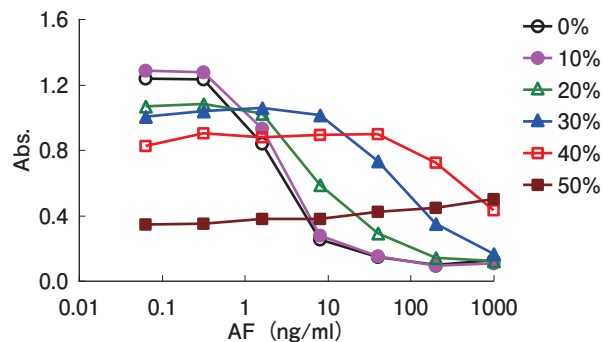


Figure 3 Acetonitrile tolerance of MoAb2-3 reactivity with AFB1 in ic-ELISA : 1, 10, 20, 30, 40, and 50% acetonitrile. Acetonitrile percentages are the final acetonitrile concentrations in the competitive reaction mixture.

ロースゲルを使用し、カップリングバッファーは、PBS、ブロッッキングバッファーはモノエタノールアミン、洗浄バッファーは、0.1 M酢酸ナトリウムを用いた。まず、ゲルを1 mMの塩酸で洗浄後、抗体と4℃で4時間反応を行った。4℃で一晩ブロッッキング後、洗浄し、このゲルをエンブティーカラムに詰め、IACとした。作製したIACのアセトニトリル耐性はFigure 4の通りである。アセトニトリル濃度20%まで、すべてのAFに対してほぼ100%の回収率が得られた。B1, B2については、アセトニトリル濃度40%まで100%の回収率が得られた。

次に、実サンプルでの添加回収試験を行った。AFは主に熱帯地方で産生されるため、汚染は輸入食品に多く、とうもろこし、ピーナッツ、はとむぎ、スパイス類などがある。この中でもスパイス類は、HPLC分析において、夾雑物の影響が大きく正確に測れない、また、精製にIACを使用すると、抽出液を希釈した際に懸濁してしまい回収率が悪くなるという問題があり、分析が難しいとされている。そこで、今回作製したIACを用いて、スパイス類の分析方法について検討したところ、HPLCのクロマトグラムにおいても各AFピークへの夾雑物の影響はなく、Table 1に示したような良好な回収率が得られた。

これらの結果から、開発したカラムは、高濃度の有機溶媒でも使用することができ、抽出液の希釈が少なく、迅速・簡便にクリーンアップすることができることを確認できた。また、これまでクリーンアップが難しいとされていたターメリック、黒こしょうなどのスパイス類でも問題なく使用できることがわかった。

オクラトキシン用 イムノアフィニティーカラム

海外では、FAOとWHOの下部組織であるコーデックス

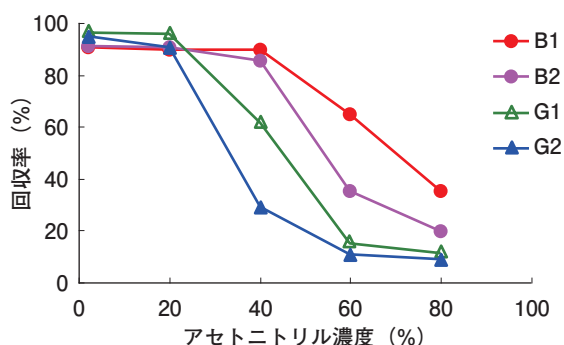


Figure 4 Acetonitrile tolerance of the prepared IAC : AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2

委員会が規制値を設定しており^[4]、TAF、オクラトキシン ((Ochratoxin)以降OT)、AFM1などに規制値が設定されている。日本もコーデックス委員会に従って、規制値を設定していく方針であり、今後TAF以外のカビ毒にも規制値が設定されていくと思われる。そこで、この規制値設定予定に沿って、SmartColumnのシリーズ化を目指し、OT用IACを開発した。

抗OT抗体作製

AF用IACと同様、まずは抗体の開発を行った。OT分析でもアセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒を用いて食品からOTを抽出しなければいけないため、OT用IACでも、AFと同様、有機溶媒耐性が必要である。また、OTには類縁体化合物であるOTA、OTBがある。そこで、有機溶媒耐性の高く、また、OTAにもOTBにも同等に反応する抗体の開発を目指した。抗体作製方法はAFと同様に、OTAとKLHとの結合体を調製し、これをマウスに免疫した。このマウスの脾臓細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞と細胞融合し、ハイブリドーマを得た。ハイブリドーマをスクリーニングし、最もOTA、OTBとの反応性が高く、有機耐性の高い抗体を産生するクローン細胞を樹立した。得られた抗体の反応性を間接競合ELISAによって調べた結果、IC50値は、OTAが27 ng/mL、OTBが17 ng/mLとなり、OTAにもOTBにも反応する抗体が得られた。また、抗体の有機溶媒耐性は、アセトニトリル濃度が20%まで、メタノール濃度が30%まで耐性があり、有機溶媒耐性の高い抗体が得られたことがわかった。

IACの作製

得られた抗体を用いて、AFと同様の方法で、IACを作製した。市販されているOT用IACは、試料からの抽出液をカラムに負荷後、PBSで洗浄し、さらに10 mM酢酸アンモニウム溶液で洗浄する必要がある。洗浄時に精製水が使用できると、10 mM酢酸アンモニウム溶液を準備する手間が省けるが、精製水で洗浄すると回収率が下がって

Table 1 Mean total TAF recoverie extracted with 90% acetonitrile from spiked food samples by means of the prepared IAC cleanup

	パプリカ	白胡椒	唐辛子	シナモン	ターメリック	コリアンダー
B1	91	97	97	78	101	92
B2	89	98	98	82	92	91
G1	99	88	99	87	89	91
G2	99	86	99	89	90	92

しまうため、精製水は使用できない。一方、今回作製したIACは、酢酸アンモニウム溶液で洗浄しても精製水で洗浄しても回収率に差はなく、どちらも使用可能であることがわかった。以降の実験はすべて精製水で洗浄を行った。

作製したIACの有機溶媒耐性について調べた。OTの汚染は広い地域に分布しており、AFよりも多くの種類の食品が汚染されるため、抽出溶液も食品によって、メタノールを使用したりアセトニトリルを使用したりしなければならない。そこで、メタノールとアセトニトリルについてそれぞれ耐性を調べた。その結果、メタノール耐性について、OTAではメタノール濃度70%まで、OTBではメタノール濃度60%まで、ほぼ100%の回収率が得られ、アセトニトリル耐性について、OTAではアセトニトリル濃度40%まで、OTBではアセトニトリル濃度20%まで、ほぼ100%の回収率が得られた。以上のことから、今回得られた抗体で作製したIACは、OT抽出に用いられる有機溶媒であるメタノール、アセトニトリルに耐性が高いことがわかった。次に、作製したIACでの実サンプルの添加回収試験の結果をTable 2に示す。小麦は60%アセトニトリルで抽出後、PBSで2倍希釈、ココアは70%メタノールで抽出後、0.01%Tween20含有PBSで2.3倍希釈した。ワインは1%ポリエチレングリコール・5%炭酸水素ナトリウム溶液で希釈するだけで、IACに適用した^[5]。

Table 2 Recovery of OTs in spiked food samples by the prepared IAC.

	小麦	ココア	赤ワイン
OTA	100	102	95
OTB	91	103	99

おわりに

開発したIACは、AF用IAC「AFLAKING」、OT用IAC「OCHRAKING」として販売中である。有機溶媒耐性抗体を作製し、それをIACに使用することで、従来の製品よりも高濃度な有機溶媒をカラムに負荷することができるようになった。その結果、今まで難しいとされてきた試料についても分析することができるようになり、また、前処理の簡便化、時間短縮にもつながった。

AFLAKINGは、総アフラトキシン分析の通知法にも収載され、検疫所をはじめ、食品メーカーでの品質管理部門、受託分析施設等でご使用いただいている。

食に対する関心が高まる中、今後もカビ毒分析を通じて

食の安心・安全に貢献していきたいと考える。

参考文献

- [1] Scott, P. M.; Trucksess, M. W. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis, *J. AOAC Int.*, 1997, **80**, 941-949.
- [2] Chu, F. S.; Ueno, I. Production of antibody against aflatoxin B1 Appl. *Environ. Microbiol.* 1977, **33**, 1125-1128
- [3] Chu, F. S.; Hsia, M. T. S.; Sun, P. S. Preparation and characterization of aflatoxin B1-1-(O-carboxymethyl)oxime, *J. AOAC* 1977, **60**, 791-794.
- [4] Codex general standard for contaminants and toxins in foods, *CODEX STAN* 193-1995, **24**
- [5] Y. Sugita-Konishi, M. Nakajima, S. Tabata, E. Ishikuro, T. Tanaka, H. Norizuki, Y. Itoh, K. Aoyama, K. Fujita, S. Kai, S. Kumagai, *J. Food Prot.* **69**(2006)1365-1370.



内ヶ島 美岐子

Mikiko UCHIGASHIMA

株式会社 堀場製作所
開発本部 アプリケーション開発センター
医用開発部