

マイコトキシン汚染検体前処理用カラム 「Trapper DON/NIV」の開発

(株式会社フロンティア研究所) 佐々木道代・加藤美穂子

はじめに

私達の食生活はカビの恩恵に依るものが多い。たとえば、発酵食品の代表である味噌、醤油、また近年人気の塩麴などはすべて麹カビと称される糸状菌類の働きにより醸造されたものである。食品以外でカビが人類の健康面に貢献した代表例としては、ペニシリウム属から発見された抗生物質のペニシリンがある。しかしカビは、病原体や人体に有害な成分を産生するものも多い。代表的な有害成分はカビ毒（マイコトキシン）と称されるが、このカビ毒に汚染された食品や食材の流通を阻止するために、国内ではカビ毒汚染検査が実施されている。本稿では、マイコトキシン汚染検体の前処理用ツールとして開発したイムノアフィニティーカラム「Trapper DON/NIV」(図1) について紹介する。

カビ毒とは

カビ毒は、カビが産生する有害な代謝産物である。カビ毒に汚染された穀類を食料、飼料としてヒトや家畜が摂取することにより、発ガン性、肝臓、腎臓、原因不明の胃腸障害などの直接被害のみならず、酪農業では生産阻害や生乳の汚染など2次的被害の影響も懸念されている。現在カビ毒は300種類以上の報告があるが、日本国内では3種類のカビ毒（デオキシニバレノール、アフラ

トキシン、パツリン）について食品衛生法で暫定残留基準値が制定されている。カビ毒の中でも毒性の高いアフラトキシンは、アスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*) などから産生され、りんごジュースやりんご果汁などにおいて汚染が確認されるパツリンは、ペニシリウム属、アスペルギルス属などの青カビから産生される。今回、筆者らが開発対象としたのは、アカカビの原因であるフザリウム属から産生されるトリコテセン系マイコトキシンのデオキシニバレノール (DON) およびニバレノール (NIV) である。このカビ毒は主に小麦やトウモロコシなどの穀物において汚染が確認されるもので、アジアモンスーン気候の影響を受ける日本では発生件数が多い。DONならびにNIVの発生地域には国内でも差があり、特に北海道以南の地域ではDONおよびNIVの複合汚染が指摘されている。現在、DONの暫定残留基準値は、小麦などヒトが摂取するものに関しては1.1 ppm¹⁾、家畜飼料などにおいては4.0 ppm²⁾と設定されている。しかしNIVは、欧州食品科学委員会のリスク評価において、一日当たりの暫定的耐容摂取量がDONよりも低値で報告されているものの³⁾、国内では未だ基準値設定には至っていないのが現状である。

前処理カラム Trapper DON/NIV とは

カビ毒分析において、通知試験法のHPLCやLC/MSなどによる機器分析法を選択した場合、汚染検体を精製、濃縮する必要がある。その場合のツールとしては、イムノアフィニティーカラムや多機能カラムの使用が一般的である。今回開発した機器分析用前処理カラムは、抗原-抗体反応を利用したイムノアフィニティーカラムである。このカラムは、抗原となるカビ毒（今回はDON、NIV）(図2) に対して特異的に反応するモノクローナル抗体をカラム担体に結合させたものである。

現時点では、暫定残留基準値が制定されているトリコテセン系マイコトキシンはDONのみであるため、開発当時DONおよびNIVの双方を高収量でなおかつ高純度



図1. Trapper DON/NIV

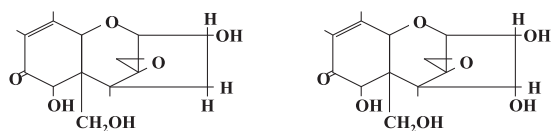


図2. Deoxynivalenol (DON) (左) と Nivalenol (NIV) (右)

で回収できるイムノアフィニティーカラムは販売されていなかった。将来的にNIVとの複合汚染の把握が必須になることを考慮し、DONおよびNIVともに同時精製可能な「マルチカラム」としての上市を目標に開発を行った。

抗体作製から製品化まで

DONおよびNIVは、図2に示すように共にトリコテセン骨格を持つ類似した構造であるが、非常に特徴的な差がある。DONは4位がHのみであるのに対し、NIVは酸素原子が1個付加しOHとなっていることである。このわずか一か所の違いが、抗体の作製を大変困難なものにしてきた。特にアフィニティーカラムに使用できる抗体は、その性質に対し要求する項目が多く、さまざまな条件をクリアしたものしか製品化の検討へと進むことができない。反応性がよいように見えても選択されない確率は高く、製品化の検討段階まで進むことができるのは、非常に狭き門なのである。さらに抗体調整の困難さに追い打ちをかけるような出来事も起きた。抗体作製における最重要かつ最低条件は抗原材料の確保である。開発当初入手が可能であったNIVが、どこの試薬メーカーでもごく少量(なおかつ高額)での取り扱いに変更になってしまったのである。開発作業そのものも停滞し、頓挫する可能性のある中、抗原材料の確保にも頭を悩ませる結果となった。しかしさまざまなハードルはあったものの、ようやく選抜された抗体を元に製品化への検討を開始することができた。誰でも簡易に使用できる製品であること、DONおよびNIVの回収率に開きが出ないこと、

製造コストは安く、など克服すべき課題は山積していた。技術の詳細は省かせて頂くが、商品開発には付き物である試行錯誤を繰り返した結果、当初の予定をクリアできる製品がようやく完成した。

前処理カラム Trapper DON/NIVの応用範囲とこれから

今回開発したカラムは、DONおよびNIVに対する高い特異性や保持能力、さらにクリーンアップ能力の高さなどが利点である。DONおよびNIVは高極性のため、有機溶媒抽出を選択しなくても水系抽出が可能であるという特徴を活かし、

- 1) 水抽出した検体溶液をそのまま、または希釈するだけで直接カラムに通すことができるため、有機溶媒の使用量を低減させられる。結果として、環境負荷を最小限に抑えることが可能。
- 2) サンプル添加から回収までの所要時間も10-15分程度。
- 3) カラムからの溶出にはグリシン-塩酸など、酸性溶液のほか、MS、HPLC分析用に塩を含まない酸性溶液や有機溶媒のいずれも選択が可能。

などの利点が挙げられる。このカラムは、小麦、トウモロコシなどの他、家畜飼料となる牧草、サイレージ、配合飼料、ペットの餌、ビールなどへの対応も可能にした。今後、DON、NIV以外の低分子量物質に対するモノクローナル抗体の多様化を進め、さまざまな検討を駆使して新たなイムノアフィニティーカラムを開発していきたい。

文 献

- 1) 厚生労働省行政情報：平成14年5月21日，食発第0521001号。
- 2) 農林水産省行政情報：平成14年7月5日，14生畜第2267号。
- 3) http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/chem_niv.pdf