

イムノアフィニティークラム-HPLC法による国内市販コーヒー製品の オクラトキシンAとBの汚染調査

川村 理, 鈴木祐介, 佐々木絢子

Occurrence of ochratoxin A and B in the domestic commercial coffee products by immunoaffinity column-HPLC method

Osamu Kawamura, Yusuke Suzuki and Ayako Sasaki

Abstract

We developed an immunoaffinity column-HPLC method for detection ochratoxin A (OTA) and B in coffee products using our OTB.2 monoclonal antibody. We collected the domestic commercial 48 roasted coffee, 30 instant coffee, and 53 drinking coffee samples and analyzed. In the roasted coffee, OTA was detected in 62.5% of samples. It's average is 0.18 ppb (ng/g). OTB was detected in 37.5% of samples. It's average is 0.07 ppb. In the instant coffee, OTA was detected in 73.3% of samples. It's average is 0.46 ppb. OTB was detected in 26.7% of samples. It's average is 0.22 ppb. In drinking coffee, OTA was detected in 86.6% of samples. It's average is 0.0077 ppb. OTB was detected in 0.036% of samples. It's average is 0.011 ppb. However, these concentration were compared on these 3 types coffee products drinking formula, roasted coffee (8.07 pg/mL) is higher than drinking coffee (6.67 pg/mL) and instant coffee (5.00 pg/mL).

Key Words : ochratoxin A, ochratoxin B, roasted coffee, instant coffee, drinking coffee, monoclonal antibody, immunoaffinity column

緒 言

オクラトキシンA (ochratoxin A, OTA, Fig.1) は、肝臓・腎臓障害などの毒性を有しており、麦類、トウモロコシ、米、これらの加工品、ワイン、ビール、コーヒー、乾燥果実、肉類など 広範囲な食品を汚染している⁽¹⁾。また、オクラトキシンB (OTB) は、OTAの脱クロル体であり、OTAよりは毒性が弱いながら同様に肝臓・腎臓障害などの毒性を有している⁽²⁾。日本国内で市販されているコーヒー製品を汚染していることが報告されている

が⁽³⁾、OTBの汚染に関する報告はほとんどない。そこで、我々が作製したOTAとOTBと同程度に反応するモノクローナル抗体OTB.2⁽⁴⁾を用いたイムノアフィニティークラム (IAC) 法-HPLC法を確立し、国内市販のレギュラーコーヒー、インスタントコーヒー及び液体コーヒー製品を分析し、コーヒー製品中のOTAとOTBの汚染レベルを明らかにすることを目的に実験を行った。

材料および方法

材料及び標準液

2006年から2008年に香川県内を中心に市販されていたレギュラーコーヒー48検体、インスタントコーヒー30検体及び液体コーヒー (缶コーヒーなど) 53検体を実験に供した。

HPLCの移動相は和光純薬社製のHPLC用試薬を、その他の試薬は特級又は同等品を用いた。

OTAとOTBはシグマアルドリッチ社製を用いた。OTAは10 µg/mLになるようにメタノールに溶解し、吸光度を

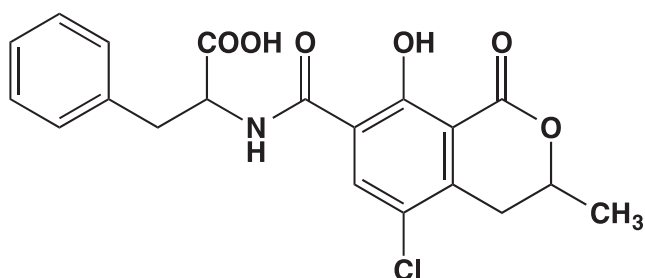


Fig.1 オクラトキシンAの構造式

測定し、333 nmのモル吸光係数6,400から正確な濃度を算出した。また、OTBも同様にエタノールに溶解し、吸光度を測定し、318 nmのモル吸光係数6,900から正確な濃度を算出した。OTAとOTB溶液を希釈混合し、それぞれが1 µgになるように小試験管に分注し、溶媒を完全に留去し、-20°Cで保存した。必要に応じて、再溶解し実験に用いた。

抗体結合ゲルの作製

OTAとOTBと同程度に反応するモノクローナル抗体OTB.2抗体産生ハイブリドーマは、無血清培地であるhybridoma-SFM培地（ベンジルペニシリン100 unit/ml, ストレプトマイシン100 µg/mLを含む）に数日間かけて馴化した後、大量培養（5.5 L）を行った。培養上清を回収した後、硫酸を40%飽和になるように加え、4°Cで16時間ゆっくりと攪拌し硫酸分画を行った。8,000×gで30分間遠心し、抗体画分を得た。抗体は少量のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解後、1LのPBSに対して、4回透析した。透析後、280 nmの吸光度から抗体濃度を算出し、SDS-PAGEを行い、純度を確認した。

精製したOTB.2抗体とイムノアフィニティー担体（アフィゲル10）を添付されたプロトコールに従って結合させた。すなわち、アフィゲル10（10 mL）をG3ガラスフィルター上に移し、保存液を吸引ろ過後、純水（10 mL）で3回洗浄した。洗浄したアフィゲル10に15 mLの精製OTB.2抗体（39 mg）を加え、室温で2時間ゆっくり攪拌しながら反応させた。反応後、G3ガラスフィルター上に移し、吸引ろ過を行った。アフィゲル10の未反応部位のブロッキングを行うために、1Mエタノールアミン-塩酸緩衝液（pH 8.0）15 mLを加え、室温で1時間ゆっくり攪拌しながら反応させた。反応後、G3ガラスフィルター上に移し、吸引ろ過を行った後、10 mLのPBSで10回洗浄した。抗体を結合させたゲルは0.1% NaN₃を含むPBSに懸濁し、4°Cで保存した。

レギュラーコーヒー中のOTAとOTBの抽出とクリーンアップ

粉碎し、微粉末にしたレギュラーコーヒー10 gを市販のコーヒーフィルターに量りとり、添加回収実験では、OTAとOTBがそれぞれ1.0 ppbになるように添加し、キヌワイプで蓋をし、1晩室温で暗所に静置した。市販のコーヒーメーカーEUPA（ユーパ）TSK-191A（水容器一体型ドリップ式）を用いて蒸留水140 mLで抽出した。抽出液36 mLに5% NaHCO₃を4 mLを加えてpH 7.3に調整した。ガラス繊維ろ紙（ADVANTEC GS-25）でろ過した溶液をサンプル溶液とした。

ムロマックカラムSに抗体結合ゲルを0.3 mL充填し、PBS 10 mLで平衡化を行い、サンプル溶液を10 mL負荷させた。PBS 10 mLでゲルを洗浄後、メタノール3 mLで溶出し、通気させて溶出液を完全にカラムから除去させて試験管に分取した。溶出液は減圧乾固した後、40% CH₃CN 0.2 mLで再溶解し、HPLC分析を行った。HPLCは、送液ユニット；LC-10AD_{VP}、システムコントローラー；SCL-10A_{VP}、カラムオープン；CTO-10A_{XL}、蛍光検出器；RF-10AD_{XL}^{SUPER}オートインジェクター；SIL-10AD_{VP}いずれも（株）島津製作所製を用いた。また、カラムは、SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ MG, 4.6×250 mm（粒径5 µm）を用い、移動相は、CH₃CH₂O:ACOH（40：58：2, v/v/v）、流速は1 mL/min、検出波長は335 nm（励起）465 nm（蛍光）で、カラムオープン40°C、蛍光検出器温度25°C、サンプル注入量は50 µLで行った。

なお、使用したIACは再使用のため溶出後、さらにメタノール 5 mL、次いでPBS 10 mLでゲルを洗浄し、0.1% NaN₃を含むPBSに置換し、4°Cで保存した。

インスタントコーヒー及び液体コーヒー中のOTAとOTBの抽出とクリーンアップ

インスタントコーヒー 5 gに約80 mLの1% NaHCO₃を加え溶解後、超音波を15分間かけた後、30分間攪拌した。1% NaHCO₃を加え100 mLにメスアップした。混和後、3,000 rpmで15分間遠心し、上清を等量のPBSで希釈した後、ガラス繊維ろ紙（ADVANTEC GS-25）でろ過し、サンプル溶液とした。また、添加回収実験は、レギュラーコーヒーと同様に行った。

液体コーヒーと5% NaHCO₃（pH=8.5）を9：1の割合で混合して、pHをほぼ中性に調整した後、ガラス繊維ろ紙（ADVANTEC GS-25）でろ過し、サンプル溶液とした。いずれも、レギュラーコーヒーと同様にIACでクリーンアップを行った後、HPLC分析を行った。

メチルエステル誘導体によるOTAとBの確認

OTAとBメチルエステル誘導体を作製⁽⁵⁾し、HPLCで分析し、OTAやBと思われるピークが検出された検体のOTAとBの確認を行った。まず、HPLC用の分析サンプル溶液を蓋付試験管に0.1 mL移して減圧乾固した後、三フッ化ホウ素-メタノール錯体（メルク・ジャパン）0.5 mLを加えて60°Cで1時間加温した。冷水1.5 mLを加えて反応を停止させた。1.5 mLのクロロホルムで2回抽出を行い、クロロホルム層を蒸留水1.5 mLで2回洗浄した後、減圧乾固した。0.1 mLの40%アセトニトリルに再溶解し、HPLC分析を行った。

結果および考察

添加回収実験

レギュラーコーヒーの場合、70%メタノール抽出や熱水抽出法についても検討したが、市販のドリップ式コーヒーメーカーを用い抽出する方法が最もクロマトグラムが良好 (Fig.2) で回収率も高かった。コーヒー製品へのOTAとOTBの添加回収実験の結果をTable 1に示した。インスタントコーヒーの0.2 ppbと液体コーヒー0.04 ppb添加で、OTAの回収率は110%を超えていたが、これは、微量の自然汚染OTAの影響と考えられた。それ以外の回収率はいずれも90%以上でRSDも7%以下で良好な結果

であった。また、レギュラーコーヒーでのS/N=10から算出した定量限界はOTAとOTBそれぞれ0.023 ppbと0.035 ppbであった。

IACの連続使用回数の検討

レギュラーコーヒー抽出液にOTAとOTBをそれぞれ1.0 ppb相当量を添加し、IACを連続使用した場合の回収率の低下の有無を検討した。その結果をFig.3に示した。10回連続使用しても回収率の低下は確認できなかった。すなわち、OTB.2抗体結合IACは少なくとも10回以上の使用が可能であることが判明した。

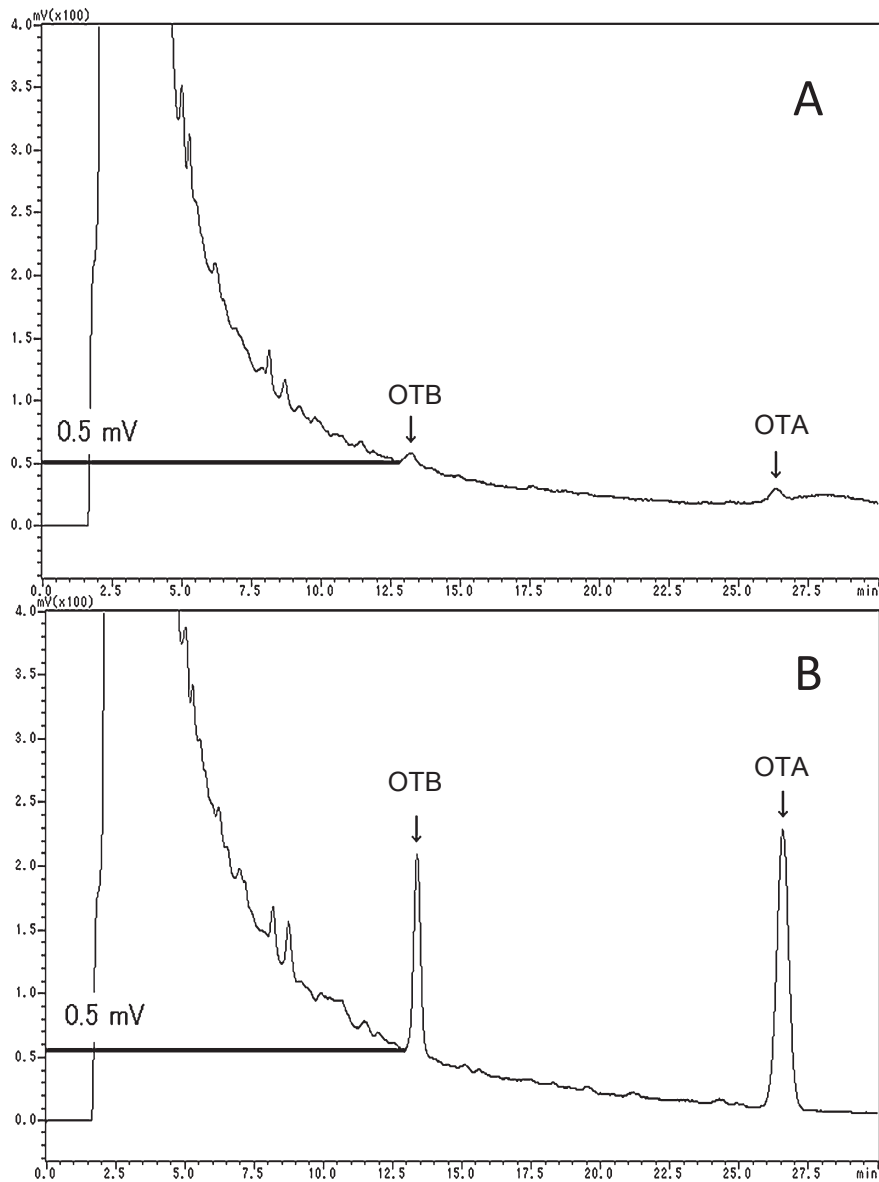


Fig.2 レギュラーコーヒーのクロマトグラム

A: 無添加のレギュラーコーヒー, B: OTAとOTBをそれぞれ1 ppb添加したサンプル

Table 1 コーヒー製品へのOTAとOTBの添加回収実験の結果

サンプル (実験数)	OTAとOTBそれぞれの 添加量 (ppb)	OTA		OTB	
		回収率±SD (%)	RSD (%)	回収率±SD (%)	RSD (%)
レギュラーコーヒー (n=4)	0.2	96.6±3.6	3.8	100.7±5.7	5.7
	1.0	93.1±5.8	6.2	98.5±5.6	5.7
	5.0	94.3±6.3	6.6	96.4±7.0	7.2
インスタントコーヒー (n=3)	0.2	117.8±3.2	1.5	100.3±2.4	2.3
	1.0	100.5±3.2	2.7	96.0±1.9	1.9
	5.0	100.6±0.4	0.4	99.1±0.6	0.6
液体コーヒー (n=3)	0.04	113.9±0.9	0.7	105.9±3.0	2.8
	0.2	100.9±0.4	0.4	100.2±0.3	0.3
	1.0	93.2±1.0	1.1	93.3±0.4	0.5

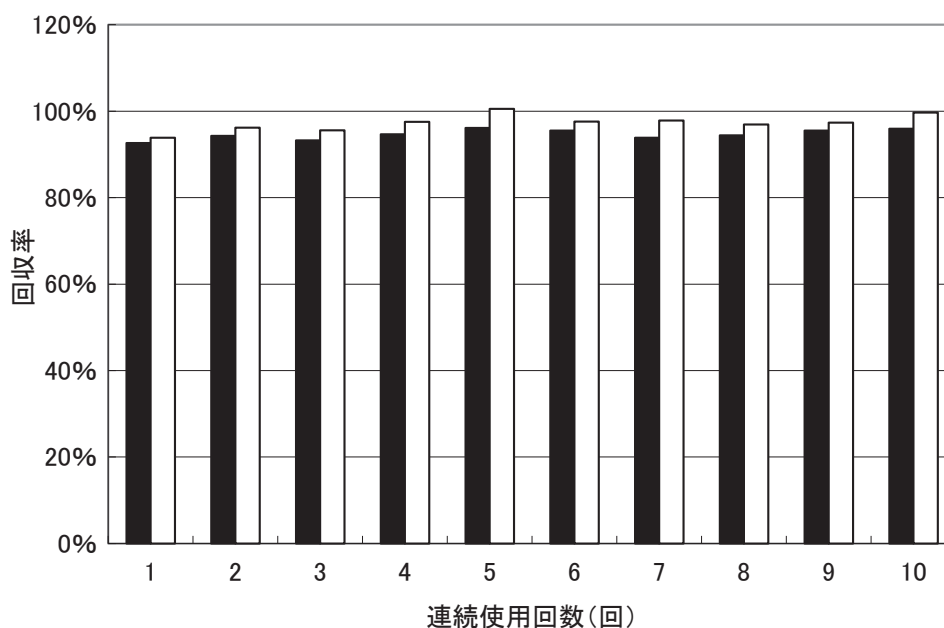


Fig.3 レギュラーコーヒーを同一のイムノアフィニティーカラムで連続してクリーナップしたときの回収率の変化

■ :OTA, □ :OTB

レギュラーコーヒー

国内市販のレギュラーコーヒー48検体の分析結果をTable 2に示した。OTAは62.5%の検体から平均0.18 ppb (最大0.60 ppb) 検出された。OTBは37.5%の検体から平均0.07 ppb (最大0.18 ppb) 検出された。OTBの検出頻度はOTAの60%で、OTBの汚染平均濃度はOTAの37%程度であった。また、OTAの汚染濃度が高い検体でOTBが検出される傾向が認められたが、RC0618とRC0618ではOTAは検出限界以下であったが、微量のOTBを検出した検体であった。また、日本では規制値は未設定であるが、EUのレギュラーコーヒー中のOTAの基準値 5 ppbを超えるものはなかった。

インスタントコーヒー

国内市販のインスタントコーヒー30検体の分析結果をTable 3に示した。OTAは73.3%の検体から平均0.46 ppb (最大1.44 ppb) 検出された。OTBは26.7%の検体から平均0.22 ppb (最大0.56 ppb) 検出された。インスタントコーヒーは、レギュラーコーヒーよりオクラトキシンの汚染頻度と濃度が共に高い傾向が認められた。OTBの検出頻度はOTAの36%で、OTBの汚染平均濃度はOTAの48%程度であった。また、レギュラーコーヒーの場合と同様にOTAの汚染濃度が高い検体でOTBが検出される傾向が認められ、OTAは検出限界以下の検体ではOTBも検出されなかった。また、日本では規制値は未設定であるが、EUのOTAのインスタントコーヒー中の基準値10 ppbを超えるものはなかった。

Table 2 レギュラーコーヒー（48検体）の分析結果

サンプル	OTA ppb (ng/g)	OTB ppb (ng/g)	サンプル	OTA ppb (ng/g)	OTB ppb (ng/g)
RC0601	ND*	ND	RC0627	ND	ND
RC0602	0.51	0.09	RC0628	0.09	ND
RC0604	0.47	0.16	RC0629	0.44	0.08
RC0605	0.07	ND	RC0630	0.15	ND
RC0606	0.40	0.07	RC0631	0.05	ND
RC0608	0.07	0.04	RC0632	0.07	ND
RC0609	0.15	ND	RC0633	0.41	0.07
RC0610	ND	ND	RC0634	0.06	ND
RC0611	0.04	ND	RC0635	0.07	ND
RC0612	0.16	0.05	RC0636	0.29	0.07
RC0613	0.13	0.06	RC0637	ND	ND
RC0614	0.12	0.04	RC0638	ND	ND
RC0615	0.26	0.05	RC0639	0.13	ND
RC0616	0.06	0.04	RC0640	0.03	ND
RC0617	0.60	0.18	RC0641	ND	ND
RC0618	ND	0.05	RC0642	ND	ND
RC0619	ND	0.04	RC0643	ND	ND
RC0620	ND	ND	RC0644	ND	ND
RC0621	ND	ND	RC0645	ND	ND
RC0622	0.11	0.04	RC0646	0.05	ND
RC0623	ND	ND	RC0647	ND	ND
RC0624	ND	ND	RC0648	0.25	0.05
RC0625	0.03	ND	RC0649	0.10	ND
RC0626	0.05	ND	RC0650	ND	ND
全ての平均値 (NDの検体を0 ppbとして計算)				0.11	0.02
				陽性検体の平均値	0.18
				陽性検体の検出率	62.5%
					37.5%

*定量限界以下

Table 3 インスタントコーヒー（30検体）の分析結果

サンプル	OTA ppb (ng/g)	OTB ppb (ng/g)	サンプル	OTA ppb (ng/g)	OTB ppb (ng/g)
IC0601	0.10	ND*	IC0616	0.17	ND
IC0602	0.06	ND	IC0617	ND	ND
IC0603	ND	ND	IC0618	0.28	0.06
IC0604	0.07	ND	IC0619	0.75	0.19
IC0605	ND	ND	IC0620	0.11	ND
IC0606	0.25	ND	IC0621	ND	ND
IC0607	0.09	ND	IC0622	0.27	ND
IC0608	0.93	0.08	IC0623	0.14	ND
IC0609	1.23	0.25	IC0624	0.21	ND
IC0610	0.14	ND	IC0625	ND	ND
IC0611	ND	ND	IC0626	ND	ND
IC0612	0.07	ND	IC0627	1.44	0.56
IC0613	ND	ND	IC0628	0.24	0.06
IC0614	1.08	0.15	IC0629	2.56	0.46
IC0615	0.14	ND	IC0630	0.17	ND
全ての平均値 (NDの検体を0 ppbとして計算)				0.350	0.060
				陽性検体の平均値	0.456
				陽性検体の検出率	73.3%
					26.7%

*定量限界以下

Table 4 液体コーヒー (53検体) の分析結果

サンプル	OTA ppb (ng/mL)	OTB ppb (ng/mL)	サンプル	OTA ppb (ng/mL)	OTB ppb (ng/mL)
DC0601	0.002	ND	DC0629	0.004	0.003
DC0602	0.005	ND	DC0630	0.004	0.003
DC0603	0.013	0.003	DC0631	0.005	0.002
DC0604	ND*	ND	DC0632	0.002	ND
DC0605	0.002	0.001	DC0633	0.009	0.002
DC0606	0.004	ND	DC0634	0.012	0.006
DC0607	0.003	ND	DC0635	0.008	0.004
DC0608	0.011	0.002	DC0636	0.024	0.008
DC0609	ND	ND	DC0637	0.011	0.004
DC0610	0.028	0.005	DC0648	0.002	0.003
DC0611	0.01	0.002	DC0638	0.008	0.002
DC0612	0.008	ND	DC0639	0.014	0.005
DC0613	ND	ND	DC0640	0.003	ND
DC0614	0.011	ND	DC0641	0.007	0.002
DC0615	0.014	0.002	DC0642	0.002	ND
DC0616	0.004	ND	DC0643	0.003	ND
DC0617	ND	ND	DC0619	0.002	ND
DC0618	ND	ND	DC0644	0.002	ND
DC0620	0.007	0.003	DC0645	0.002	ND
DC0621	0.012	0.006	DC0646	ND	ND
DC0622	0.007	0.005	DC0647	0.002	ND
DC0623	0.004	ND	DC0649	0.003	ND
DC0624	0.006	0.003	DC0650	0.004	ND
DC0625	0.010	0.003	DC0651	ND	ND
DC0626	0.048	0.011	DC0652	0.002	ND
DC0627	0.005	0.002	DC0653	0.003	ND
DC0628	0.003	ND			
全ての平均値 (NDの検体を0 ppbとして計算)				0.0067	0.0017
陽性検体の平均値				0.0077	0.0036
陽性検体の検出率				86.8%	47.2%

*定量限界以下

液体コーヒー

国内市販の液体コーヒー53検体の分析結果をTable 4に示した。OTAは86.6%と高頻度で平均0.0077 ppb (最大0.048 ppb) 検出された。OTBは47.2%の検体から平均0.036 ppb (最大0.011 ppb) 検出された。液体コーヒーは、レギュラーコーヒーやインスタントコーヒーよりオクラトキシンの汚染頻度が高い傾向が認められた。OTBの検出頻度はOTAの54%で、OTBの汚染平均濃度はOTAの48%程度であった。また、レギュラーコーヒーやインスタントコーヒーの場合と同様にOTAの汚染濃度が高い検体でOTBが検出される傾向が認められ、OTAは検出限界以下の検体ではOTBも検出されなかった。

コーヒー製品中のOTAとOTBの比較

レギュラーコーヒー、インスタントコーヒー及び液体コーヒーで、見かけ上オクラトキシンの汚染濃度に差が認められる。これを補正するためにヒトが摂取する飲用時の濃度で3者を比較した。レギュラーコーヒーで

Table 5 飲用時のOTAとOTBの汚染濃度の比較

コーヒー製品	OTA ppt (pg/mL)	OTB ppt (pg/mL)	
レギュラーコーヒー	全ての平均値*	8.07	1.79
	陽性検体の平均値	12.93	4.79
	陽性検体の検出率	62.5%	37.5%
インスタントコーヒー	全ての平均値*	5.00	0.86
	陽性検体の平均値	6.51	3.21
	陽性検体の検出率	73.3%	26.7%
液体コーヒー	全ての平均値*	6.67	1.72
	陽性検体の平均値	7.69	3.65
	陽性検体の検出率	86.6%	47.2%

*NDの検体を0 ppbとして計算

は粉末10 gを140 mLで抽出、インスタントコーヒー粉末2 gを140 mLに溶解した場合の濃度で飲用時の濃度を算出した。その結果をTable 5に示した。OTAの飲用時の濃度で比較した場合、検出限界以下の検体の濃度を汚染がないと仮定して計算したすべての平均濃度では、レ

ギュラーコーヒーが8.07 ppt (pg/mL) で最も高く、次いで液体コーヒー (6.67 ppt)、インスタントコーヒー (5.00 ppt) の順であった。OTBでも同様の結果であった。すなわち、コーヒー製品中では、オクラトキシン摂取のリスクが最も高いのがレギュラーコーヒー、次いで、液体コーヒー、インスタントコーヒーの順であることが分かった。

しかし、今回分析した国内市販コーヒー製品のOTAの汚染濃度は最大のものでもEUの規制値の約1/8程度であり、直ちに健康影響が生ずるとは考えにくい。しかしながら、63~87%と高頻度で発がん性が指摘されているオクラトキシン類が検出されることから継続的にコーヒー製品のOTAの汚染調査を行っていく必要があると考えられた。

摘 要

コーヒー製品中のオクラトキシン類の分析のためにOTAとOTBと同程度に反応するモノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティーカラム (IAC) 法-HPLC法を確立した。レギュラーコーヒーの場合、市販のドリップ式コーヒーメーカーを使用し熱水抽出すること

で良好なクロマトグラムと高い回収率を得た。レギュラーコーヒーとインスタントコーヒーでは、OTAとOTBをそれぞれ0.2~5.0 ppb添加し場合の回収率は、93.1~117.8%でRSDは7%以下であった。液体コーヒーでは、OTAとOTBをそれぞれ0.04~1.0 ppb添加し場合の回収率は、93.2~113.9%でRSDは3%以下であった。国内市販のレギュラーコーヒー48検体、インスタントコーヒー30検体及び液体コーヒー53検体を収集し分析した。その結果、レギュラーコーヒーではOTAは62.5%の検体から平均0.18 ppb (最大0.60 ppb) 検出された。OTBは37.5%の検体から平均0.07 ppb (最大0.18 ppb) 検出された。インスタントコーヒーでは、OTAは73.3%の検体から平均0.46 ppb (最大1.44 ppb) 検出された。OTBは26.7%の検体から平均0.22 ppb (最大0.56 ppb) 検出された。液体コーヒーでは、OTAは86.6%と高頻度で平均0.0077 ppb (最大0.048 ppb) 検出された。OTBは47.2%の検体から平均0.036 ppb (最大0.011 ppb) 検出された。しかしながら、飲用時で比較した場合、レギュラーコーヒーが8.07 ppt (pg/mL) で最も高く、次いで液体コーヒー (6.67 ppt)、インスタントコーヒー (5.00 ppt) の順で、レギュラーコーヒーでオクラトキシンリスクが高いことが判明した。

引 用 文 献

- (1) Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M. : A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiol.*, 7, 187-198 (2010).
- (2) Heussner, A.H., Dietrich, D.R., O'Brien, E. : In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. *Toxicol. In Vitro*, 20, 332-341 (2006).
- (3) 農林水産省：食品安全に関するリスクプロファイルシート オクラトキシンA, 更新日:2014年2月14日.
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/140214_ota.pdf
- (4) 川村 理, 鈴木祐介：オクラトキシンBに対するモノクローナル抗体の作製, 香川大学農学部学術報告, 65, 25-28 (2013).
- (5) Monaci, L., Tantillo, G., Palmisano, F. : Determination of ochratoxin A in pig tissues by liquid-liquid extraction and clean-up and high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem*, 378, 1777-1782 (2004).