

牛乳中のアフラトキシンM₁ 分析における遠心分離操作の必要性

Necessity of Centrifuge Operation for Analysis of Aflatoxin M₁ in Milk

西村 一彦 橋本 諭 藤井 良昭 加賀 岳朗

Kazuhiko NISHIMURA, Satoshi HASHIMOTO, Yoshiaki FUJII and Takero KAGA

Key words : aflatoxin M₁ (アフラトキシンM₁) ; milk (牛乳) ; centrifuge (遠心分離)

アフラトキシン類は、*Aspergillus flavus* 等が産生するカビ毒であり、食品ではアフラトキシン B₁, B₂, G₁, G₂ の総和としての総アフラトキシンについて規制が行われている¹⁾。また、アフラトキシン B₁ に汚染されたとうもろこしなどを飼料として乳牛などに与えた場合、体内で代謝が行われ代謝物アフラトキシン M₁ が乳中に排出されることが国際的に問題視され、日本でも平成 28 年 1 月より規制が行われている²⁾。本通知と併せて提示された「乳中のアフラトキシン M₁ 試験法」(以下通知試験法)³⁾ では、生乳や非均一化(ノンホモ)乳については、ガラス繊維ろ紙の目詰まりを防ぐために遠心分離操作を行うこととしている。一方、生乳やノンホモ乳以外については特別な記載がなく、遠心分離を行うことなしにガラス繊維ろ紙でろ過すればよいと解釈できる。しかし我々が検討した牛乳のうちノンホモの記載がない牛乳でもガラス繊維ろ紙で目詰まりが生じ、その後の分析が実施できない事例が確認された。本研究では目詰まりの有無と遠心分離操作による牛乳のクリーム層と乳脂肪量について検討を行ったところ、一定の知見が得られたので以下に報告する。

方 法

1. 試 料

北海道内で流通している市販牛乳 15 試料を使用した。

2. 試薬及び標準品

標準品は、和光純薬工業(株)製のアフラトキシン M₁ (AFM₁) (0.5 μg/mL アセトニトリル溶液) を使用した。ガラス繊維ろ紙は Whatman 社製ガラス繊維ろ紙 934 AH (150 mm) を、イムノアフィニティカラムには Romer Labs 社製 AflaStar R を、リン酸緩衝生理食塩水錠剤は MP Biomedicals 社製を使用した。溶媒には、和光純薬工業(株)製残留農薬・PCB 試験用ジエチルエーテル、石油エーテル、エチルアルコール、HPLC 用アセトニトリル、LC/MS 用超純水及び特級アンモニア水を使用した。

3. 装 置

遠心機は久保田商事(株)の KUBOTA5930 を使用した。高速液体クロマトグラフは、(株)島津製作所製の Prominence20A シリーズを用い、カラムは、和光純薬工業(株)製の Wakosil-II 5C18 HG (4.6 mm×150 mm, 5 μm) を使用した。移動相としてアセトニトリル：水 (1 : 3 v/v) を使用し、カラム温度 40°C、流速 1.0 mL/min、注入量 100 μL で分析した。検出器には蛍光検出器 RF-20 A を使用し、励起波長 365 nm、蛍光波長 435 nm で分析を行った。

4. 試験方法

1) 牛乳試料のガラス繊維ろ紙の目詰まり

37°C に加温した牛乳 20 mL をガラス繊維ろ紙に負荷し、受け器に 15 mL 目盛り付き試験管を用いて 5 mL 流出するまでの時間を測定した。目詰まりにより 5 mL 流出してこない場合は、10 分、20 分での流出容量を記録した。10 分以内に 5 mL 以上流出したものを「目詰まり無し」、それ以外を「目詰まり有り」と判定した。

2) クリーム層厚さの測定

37°C に加温した牛乳 25 mL に遠心分離操作 (2,000×g, 15 分間) を実施し、表層にできたクリーム層の厚さをノギスにより目視で測定した。

3) 乳脂肪分の測定

乳脂肪分はマジョニア管の代わりに 50 mL ネジ口付き遠沈管を用い、レーゼ・ゴットリーブ法に従い分析を行った⁴⁾。

4) アフラトキシン M₁ 分析と妥当性評価

牛乳中のアフラトキシン M₁ 分析は、すべての試料で遠心分離操作 (2,000×g, 15 分間) を実施し、通知試験法に従い分析を行った。また試験法の妥当性評価は「総アフラトキシン試験法について」⁵⁾ に示された方法に準じ、牛乳に規制値 0.5 μg/kg 相当のアフラトキシン M₁ を添加し、分析者 1 名が 1 日 2 検体を 5 日間分析する枝分かれ実験計画により実施した。

5) 統計処理

クリーム層厚さ、乳脂肪分の結果は Scheffe's F test で多重比較を行い、有意水準は危険率5%未満とした。これらの解析は「4 Steps エクセル統計 Statcel 2」を用いて行った⁶⁾。

結果及び考察

ガラス繊維ろ紙の目詰まり、遠心分離操作によるクリーム層厚さ、乳脂肪分の結果を表1に示す。ガラス繊維ろ紙で「目詰まり無し」の牛乳をMp1~5、「目詰まり有り」の牛乳をMc1~6、目詰まりが認められ、容器の表示やホームページ等で非均一化牛乳（以下ノンホモ牛乳）と確認できた牛乳をNH1~4とした。目詰まりした牛乳は10分、20分とろ過を継続しても流出量の増加は認められなかった。このことから、目詰まりが生ずるとその後の操作を行うことができないことが判明した。遠心分離操作後のクリーム層厚さはMpで1.4-2.5 mm（平均1.9 mm、標準偏差0.54 mm）、Mcで2.6-4.0 mm（平均3.4 mm、標準偏差0.51 mm）、NHで2.6-3.9 mm（平均3.4 mm、標準偏差0.58 mm）と統計学的にMpとMc、MpとNHのクリーム層厚さに有意差が認められた（5%有意水準）。一方、乳脂肪分はMpで4.0-4.7%（平均4.2%、標準偏差0.28%）、Mcで4.0-4.6%（平均4.3%、標準偏差0.23%）、NHで3.5-5.4%（平均4.3%、標準偏差0.86%）と統計学的に有意差は認められなかった（5%有

意水準）。これらの結果から、ガラス繊維ろ紙の目詰まりは、乳脂肪の量では無く、遠心分離操作で形成されるクリーム層厚さ、つまり脂肪球の大きさが影響していると推察された。ノンホモ牛乳の脂肪球の大きさは通常0.1~10 μm 、平均3 μm であり、脂肪球の比重は他の成分よりも低いことから、牛乳を静置しておく脂肪に富んだクリーム層と脱脂乳部分に分離が生じる⁷⁾。脂肪球を2 μm 以下に細砕すると脂肪球の浮上が非常に遅くなることから、現在、流通している多くの牛乳の脂肪球は1.0 μm 程度に細かく壊されている⁷⁻⁸⁾。通知試験法で指定されているガラス繊維ろ紙の粒子保持能は1.5 μm であり、脂肪球の大きさが1.5 μm 以上の牛乳で目詰まりが生じると考えられた。通知試験法でも、生乳やノンホモ乳のように脂肪球が大きい牛乳の検査には、遠心分離操作が必要とされており、表示等からノンホモ牛乳と確認できた4検体では遠心分離操作を行わないと目詰まりが確認された。しかし、均一化処理の有無については表示義務がなく⁹⁾、試料包装のみからノンホモ牛乳であるかどうかを確実に見分けることは困難である。今回の検討でもノンホモ牛乳であると判明しなかった11試料の約半数、6試料で目詰まりが認められた。

そこで、牛乳の表示にかかわらず遠心分離操作を行う方法で通知試験法の妥当性評価と試料の分析を実施した。「総アフラトキシン試験法」の通知では試験法に加え、妥当性評価の方法も示されていたが⁵⁾、「アフラトキシン M₁試験法」の通知では妥当性評価の方法は示されていない³⁾。

表1 牛乳（目詰まり、クリーム層厚さ、乳脂肪分、アフラトキシン M₁）分析結果

	ガラス繊維ろ紙目詰まり	5 mL 流出時間 (sec)	10 min 後 流出量 (mL)	20 min 後 流出量 (mL)	クリーム層厚さ (mm)	乳脂肪分 (%)	AFM ₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
Mp	1	無	45		2.4	4.0	ND	
	2	無	121		1.6	4.2	ND	
	3	無	13		1.5	4.3	ND	
	4	無	50		1.4	4.0	ND	
	5	無	31		2.5	4.7	ND	
Mc	1	有		0.2	4.0	4.4	ND	
	2	有		0.2	3.9	4.0	ND	
	3	有		0	3.3	4.1	ND	
	4	有		1.5	3.3	4.5	ND	
	5	有		0.2	0.2	2.6	4.6	ND
	6	有		0.2	0.2	3.3	4.2	ND
NH	1	有		0.2	0.2	3.9	3.5	ND
	2	有		0	0	3.8	4.4	ND
	3	有		2.0	2.0	2.6	5.4	ND
	4	有		0	0	3.5	3.7	ND

Mp：ガラス繊維ろ紙目詰まり無し牛乳
NH：非均一化（ノンホモ）牛乳
ND：定量限界未満（0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）

Mc：ガラス繊維ろ紙目詰まり有り牛乳
AF：アフラトキシン

そこで、総アフラトキシンの妥当性評価の方法に準じて、妥当性評価を行った。その結果、真値 95.7% (目標値 70~110%)、併行精度 4.1% (目標値 20%以下)、室内精度 15.6% (目標値 30%以下) と目標値を満たしていた。また求められる定量下限値 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ も十分に満たしていた。牛乳 15 検体のアフラトキシシ M_1 濃度は、いずれも定量下限未満であった。

本研究の結果、容器の表示から牛乳試料のホモジナイズの有無を判断することが難しく、アフラトキシシ M_1 を安定して検査するためにはすべての試料で遠心分離操作を行う必要性が認められた。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬品食品局安全部食安発 0331 第 5 号「アフラトキシシを含有する食品の取扱いについて」、平成 23 年 3 月 31 日
- 2) 厚生労働省医薬品食品局安全部食安発 0723 第 1 号「乳に含まれるアフラトキシシ M_1 の取扱いについて」、平成 27 年 7 月 23 日
- 3) 厚生労働省医薬品食品局安全部食安発 0723 第 5 号「乳に含まれるアフラトキシシ M_1 の試験法について」、平成 27 年 7 月 23 日
- 4) 日本薬学会編：乳製品試験法・注解 改訂第 2 版，金原出版株式会社，東京，1984，pp.87-89
- 5) 厚生労働省医薬品食品局安全部食安発 0816 第 2 号「総アフラトキシシの試験法について」、平成 23 年 8 月 16 日
- 6) 柳井久江：4 Steps エクセル統計，星雲社，東京，1998，pp.8-234
- 7) 日本薬学会編：乳製品試験法・注解 改訂第 2 版，金原出版株式会社，東京，1984，pp.223-226
- 8) 津郷友吉，山内邦男：牛乳の化学，地球社，東京，1975，pp.220
- 9) 食品衛生研究会編：平成 27 年度版食品衛生小六法 I (法令)，新日本法規，名古屋，2014，pp.38-43