

食安監発第 0713001 号

平成 18 年 7 月 13 日

各検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部監視安全課長
(公印省略)

トウモロコシ中のアフラトキシンの試験法について

アフラトキシンを含有する食品の試験法については、平成 14 年 3 月 26 日付け食監発第 0326001 号（以下「第 0326001 号通知」という。）により通知したところであるが、昨年末以来の米国産トウモロコシのアフラトキシンの検査の需要急増を踏まえ、検査時間短縮等の観点から簡易測定装置（キット）を用いた試験法の評価を行ってきた。

今般、国立医薬品食品衛生研究所等における検討結果を踏まえ、別添に示す方法においても第 0326001 号通知による試験法陰性の判定を行って差し支えないこととするので、ご了知の上、必要に応じて活用されたい。

なお、これらの試験法で陰性と判定できない場合にあっては、第 0326001 号通知に示す試験法により検査を実施されたい。

(別添)

トウモロコシ中アフラトキシン試験法

以下に示すキットを用いた試験法により、陰性と判断された場合を除き、平成14年3月26日付食監発第0326001号別添における試験法により陽性か否かの判断を行う。

1. 使用可能キット

Charm 社製「チャーム ROSA アフラトキシンテスト」

R-Biopharm AG 社製「RIDA スクリーン FAST アフラトキシン」

R-Biopharm Phone 社製「アフラカード BI (2ppb)」

Romer 社製「AgraQuant Afla」

Romer 社製「AgraStrip Afla」

2. 操作方法

別紙1から5までの各キットの操作方法による。

3. 全体的留意事項

- ・測定に使用する試料は、規定の方法でサンプリングしたものを均一に混合した後、検査に供すること。
- ・使用期限及び保存温度を確認し、遵守すること。
- ・キット及び試薬類は使用前に室温にもどしておくこと。
- ・分析値のバラツキを抑え安定した結果を得るために、2以上の反復した分析を行い、分析値の突き合わせ等により再現性を確認すること。
- ・定量の検査法の場合、分析対象試料の多寡にかかわらず、分析を実施する都度、プレート毎に標準品を用いて検量線を作成し、データの解析を行うこと。また、検量線の相関係数が0.98以下の場合には、分析キットの操作手順等に問題があると考えられるので、操作手順等を確認の上、改めて分析を行うこと。
- ・操作法および抽出効率の確認のため、必ず実施機関においてロットごとに以下に示す確認用溶液を作成し、定量の検査法においては回収率を、定性の検査法においては陰性ではないことを確認すること。なお、定量の検査法において、専用の機器を用いるものには、採取した検体中の濃度を表示するものがあるため、検体から抽出までの希釈倍率に注意すること。

アフラトキシン B1 確認用溶液の調製

精密に秤量したアフラトキシン B1 とメタノール溶液を用いて標準確認用溶液を調製する。調製例として、正確に 1.0mg の秤量が保証されたもの又は正確に 1.0mg 秤量を行ったアフラトキシン B1 を容器に入れ、メタノール溶液 50mL を加え、激しく攪拌し、確認用原液を作成する。確認用原液 0.5mL を採り、メタノール溶液で 200mL とし、さらに、この溶液 1.0mL を採り、メタノール溶液で 20mL とし、確認用溶液を調製する。なお、メタノール溶液は、各キットの抽出操作で用いるメタノールの濃度とすること。Sigma 社等から入手可能な正確に秤量された市販品を用いると便利である。また、標準溶液調製法として、AOAC 掲載の方法 (Mary W.Trucksess:AOAC, 17 th version, Chapter 49, P3-5, 2000) が有効である。

- 各キットを販売する販売者より詳細な取扱説明書を入手し、技術的な習得を行うこと。
- 試験結果については、結果を写真等で保存することが望ましい。

「チャーム ROSA アフラトキシンテスト」

A. 機器・試薬

70%メタノール (メタノール/蒸留水混液 (70:30))

チャーム ROSA 専用インキュベーター

チャーム ROSA リーダー (キャリブレーションストリップ付属のもの)

ROSA アフラトキシンテスト付属バッファー

ROSA アフラトキシンテスト (定量測定) ストリップ

B. 粉砕・抽出方法

採取した検体を粉砕、均一化した試料 10 g をブレンダー容器あるいは共栓付きナスフラスコに量り採る。これに 70%メタノールを 20mL 加え、ブレンダー又は振とう機で3分間振とうする。ろ紙 (Whatman No.1) でろ過又は 1000 x g、10分間遠心し、ろ液又は上清を採る。

C. 測定方法

ろ液又は上清 100 μ L に付属のバッファー 1 mL を加え、混和した後、300 μ L をテストストリップに添加して専用のインキュベーターにて 10 分間加温 (45 $^{\circ}$ C) を行う。専用のリーダーを用いて数値を読み取る。

D. 結果の評価方法

4 ppb 以下の場合、陰性と判断する。

E. 留意事項

キットの付属として陽性検体が添付されているが、全体的留意事項に示す標準溶液を用いて測定の正確性を担保すること。

「RIDA スクリーン FAST アフラトキシン」

A. 機器・試薬

70%メタノール (メタノール/蒸留水混液 (70:30))
マイクロプレート/マイクロストリップ用リーダー
マイクロタイタープレート
アフラトキシン標準液各種
抗アフラトキシン抗体
酵素複合体 (ペルオキシダーゼ標識アフラトキシン)
基質・色素原液
反応停止液
マイクロプレートリーダー

B. 粉碎・抽出方法

採取した検体を粉碎、均一化した試料 10 g をブレンダー容器あるいは共栓付きナスフラスコに量り採る。これに 70%メタノールを 50mL 加え、ブレンダー又は振とう機で3分間振とうする。ろ紙 (Whatman No.1) でろ過又は 1000 x g、10分間遠心し、ろ液又は上清を採る。この溶液 1ml に蒸留水 1ml を加え、試験溶液とする。

C. 測定方法

試験溶液 50 μ L 及び 50 μ L の各標準液をマイクロタイタープレートの各ウェルに入れ、50 μ L の酵素複合体を各ウェルに加えて混和する。さらに 50 μ L の抗アフラトキシン抗体を各ウェルに加えてよく混和し、室温 (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) で 10 分間静置する。ウェル中の溶液を捨て、蒸留水を用いて3回以上洗浄した後、余剰の蒸留水を十分に除去する。各ウェルに基質・色素原液を 100 μ L 加え、よく混和し、室温で反応させる。5分後、停止液 100 μ L を加え、反応を停止する。混和した後、マイクロプレートリーダーを用いて、450nm で各ウェルの吸光度を測定する。

D. 結果の評価方法

4 ppb 以下の場合、陰性と判断する。

E. 留意事項

基質・色素原液および停止液はピペットを用いて正確に加えること。

「アフラカード B1 (2ppb)」

A. 機器・試薬

80%メタノール (メタノール/蒸留水混液 (80:20))

テストカード

クリーンアップカラム

試料希釈バッファー

洗浄バッファー

反応停止液

酵素複合体

酵素複合体希釈液

基質液

試料用チューブ

B. 粉碎・抽出方法

採取した検体を粉碎、均一化した試料 10 g をブレンダー容器あるいは共栓付きナスフラスコに量り採る。これに 80%メタノールを 20mL 加え、ブレンダー又は振とう機で 3 分間振とうする。ろ紙 (Whatman No.4) でろ過又は 1000 x g、10 分間遠心分離し、ろ液又は上清を採る。その溶液を 80%メタノールで 2 倍希釈し、5 mL を付属のカラムに注入した後、圧を加える。カラム通過後の溶液 1 mL を試料希釈バッファーに加えて混和し、試験溶液とする。

C. 測定方法

試験溶液 500 μ L をテストカードに滴下し、吸収させる。吸収後、予め調製した酵素複合体液を滴下し、吸収させる。その後、洗浄バッファー 100 μ L を滴下し、吸収させた後、余剰の水分を十分に除去する。基質液 100 μ L を滴下し、5 分間反応後、反応停止液 100 μ L を滴下する。反応停止液を吸収させた後、直ちに結果を読み取る。

D. 結果の評価方法

キットにおいて陰性と示される場合、検体を陰性と判断する。

E. 留意事項

陰性の判定は、取扱説明書に掲載の写真等を参考に、複数人で判断すること。

「AgraQuant Afla」

A. 機器・試薬

70%メタノール：メタノール及び蒸留水の混液 (70:30)

マイクロウェルホルダー

抗アフラトキシン抗体コートマイクロウェル

希釈用ウェルストリップ

アフラトキシン標準液各種

アフラトキシン酵素複合体

基質溶液

停止液

マイクロプレートリーダー

B. 粉碎・抽出方法

採取した検体を粉碎、均一化した試料 10 g をブレンダー容器あるいは共栓付きナスフラスコに量り採る。これに 70%メタノールを 50mL 加え、ブレンダー又は振とう機で3分間振とうする。ろ紙 (Whatman No.1) でろ過又は 1000 x g、10分間遠心分離し、ろ液又は上清を採り、試験溶液とする。

C. 測定方法

希釈用ウェルに酵素複合体液 200 μ L 入れ、これに標準液又は試験溶液 100 μ L ずつ加え、3回吸排出を行う。この溶液 100 μ L を抗アフラトキシン抗体コートマイクロウェルに移し、室温で15分間反応させる。反応後の溶液を捨て、各マイクロウェルを蒸留水を用いて5回洗浄する。余剰の蒸留水を十分に除去した後、基質液 100 μ L を入れ、室温で反応させる。5分後、停止液 100 μ L を加えて、反応を停止する。混和した後、マイクロプレートリーダーを用いて 450nm で各ウェルの吸光度を測定する。

D. 結果の評価方法

4 ppb 以下の場合、陰性と判断する。

E. 留意事項

「AgraStrip Afla」

A. 機器・試薬

70%メタノール：メタノール及び蒸留水の混液 (70:30)

マイクロウェルホルダー

抗体金コンプレックスコートマイクロウェル

希釈液

アフラトキシン試験紙

B. 粉砕・抽出方法

採取した検体を粉砕、均一化した試料 10 g をブレンダー容器あるいは共栓付きナスフラスコに量り採る。これに 70%メタノールを 20mL 加え、ブレンダー又は振とう機で3分間振とうする。ろ紙 (Whatman No.1) でろ過又は 1000 x g、10分間遠心分離し、ろ液又は上清を採り、試験溶液とする。

C. 測定方法

ウェルに希釈液 50 μ L を入れ、5回ピペットを用いて吸排出して、ウェルに付く抗体金コンプレックスを溶解する。更にろ液又は上清 50 μ L 加え、3回ピペットを用いて吸排出を行う。アフラトキシン試験紙をウェル中の溶液に浸し、5分間静置し、吸収、反応させる。試験紙を取り出し結果を読み取る。

D. 結果の評価方法

キットにおいて陰性と示される場合、検体を陰性と判断する。

E. 留意事項

陰性の判定は、複数人で判断すること。