

氏名	和田 文晴
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記号番号	博理工甲第 1058 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	液体クロマトグラフィーによる食品中のかび毒及び糖類の分析法開発
論文審査委員	委員長 教授 渋川 雅美 委員 准教授 齋藤 伸吾 委員 教授 松岡 浩司 委員 教授 小林 秀彦 委員 東京薬科大学薬学部 教授 柳田 顕郎

論文の内容の要旨

第一章では研究の背景として、食品等に含まれる化学物質の分析に係る現状と課題について述べた。

食品中に含有されることで問題となる化学物質には、食品添加物のように意図的に添加するもの、農薬のように生産の過程で使用したものが残留する可能性があるもの、及びかび毒のように自然発生し、非意図的に汚染するものがある。かび毒の一種であるオクラトキシン A (OTA) は地球上の広い範囲で汚染が確認されている。OTA は我が国ではまだ規制対象となっていないが、欧州では穀類等について基準値が設定されている。穀類の中でも、とうもろこしは輸入量が最も多く、かび毒による汚染も頻発している。とうもろこしはペットフードの原料として多用されていることから、ペットフード中の OTA 汚染実態を把握するには、妥当性の確認された分析法が必要である。しかしながら、ペットフード中には動物性のタンパク及び脂質並びに植物性のタンパク、炭水化物及び脂質、更に様々な添加物及び無機成分が含まれ、試料マトリックスが極めて複雑であることから、分析法の整備が困難である。

また、糖類はヒトや動物の生命維持のための重要な栄養素であるとともに、一部の希少糖は一般的な糖であるグルコース等とは異なる生理活性を有することから、食品及び飲料水の食味や機能性といった付加価値を高めるための調味料・添加物としても利用されている。今日我々が日常的に摂取する食品中には様々な糖類及び糖アルコールが使用されており、これらの種類及び濃度を把握すること、あるいは糖類が含まれていないことを確認することは健康維持のためにも重要である。このような背景から糖質の簡便かつ実用的な分析法の確立が求められているが、糖類の分離分析は容易ではない。糖類には様々な種類があるが、これらの分子はいずれも基本的には炭素、水素及び酸素のみで構成されており、化学構造が類似しているため分離が困難である。また、紫外及び可視部に特徴的な吸収を持たず、エレクトロスプレーイオン化法及び大気圧化学イオン化法でイオン化しにくいいため、一般に液体クロマトグラフィーと組み合わせて使用される紫外可視分光光度計及び質量分析計による検出が困難である。このため、誘導体化等の煩雑な前処理操作や、非特異的な検出器を用いた分析法に頼らざるを得ない状況である。

上記のような背景から、本研究ではその有害性から今後法律等によって規制されることが見込まれる化学

物質である OTA 及び濃度の把握が必要となる化学物質として糖類を対象とし、主に液体クロマトグラフィーを応用し、ペットフード等の複雑な試料マトリックスに適用可能で、選択的かつ高感度な試験法を開発することを目的とした。

第二章では高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いたペットフード中の OTA の分析法を開発し、分析法の詳細及び妥当性の確認結果を述べた。食品及び家畜用の飼料を対象とした OTA の分析法は従来から存在するが、複雑な試料マトリックスを含むペットフードに適用することは困難であった。そこで、OTA を特異的に保持するイムノアフィニティーカラム（IAC）を用いて試料マトリックスをクリーンアップし、HPLC により分析する系を構築した。IAC には比較的有機溶媒耐性の高いものを採用した。犬用及び猫用のドライ、セミドライ及びウェットタイプのペットフード試料合計 10 種類を用いて添加回収試験を実施し、開発した分析法の妥当性を確認したところ、全ての試料において OTA の良好な回収率が得られた。OTA の定量下限値（LOQ）及び検出限界（LOD）は各試料について目標を達成することができた。また、複数の試験機関を対象とした試験室間試験においても良好な結果が得られたことから、本分析法は様々なペットフード試料における OTA の分析法として適していることが確認された。

第三章では塩素付加 - 液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた糖類の一斉分析法開発について検出及び分離条件の検討結果を述べた。糖はプロトン化及び脱プロトン化によるイオン化が困難な物質であるため、比較的親和性の高い塩化物イオンを付加してイオン化する方法を検討した。塩素供与体としてはクロロホルム及びジクロロメタンを用いた方法があるが、これらは発がん性が指摘されている物質であるため、分析用としての使用は好ましくない。そこで本研究では新たに 発がん性のリスクが低いクロロアセトニトリルを塩素供与体として検討し、ジクロロメタンよりも糖を高感度に分析できることを見出した。糖の分離にはアミノプロピル基及びアミド基を固定相に化学修飾したカラムを用いた。この手法を菌類を原料とする健康食品に含まれる糖の同定及び定量に適用した。

論文の審査結果の要旨

本学位論文は、その有害性から今後法律等によって規制されることが見込まれるかび毒と糖類についての分析法開発に関するものであり、液体クロマトグラフィーを用いて、特に加工食品をはじめとする複雑な試料にも適用可能な方法を確立し、実試料についての検証により極めて有用であることを示している。第1章で研究背景、第2章と第3章で研究成果、第4章で結論、そして第5章で総括と展望が述べられている。

第1章

研究の背景、これまで用いられている食品等の分析法、かび毒の種類と毒性、糖類の食品としての機能と有害性、及び研究の目的が述べられている。

第2章

オクラトキシン A は穀類等に付着するコウジカビが生産するかび毒の一種で、哺乳動物に対して腎毒性及び発がん性が認められていることから、今後我が国においても規制対象となることが見込まれている。穀類の中でも、とうもろこしは輸入量が最も多く、かび毒による汚染も頻発している。とうもろこしはペットフードの原料として多用されており、犬は特にオクラトキシン A に対して感受性が高いことから、ペットフード中のオクラトキシン A 汚染実態を把握するため、妥当性の確認された分析法が必要である。しかしながら、ペットフード中には動物性のタンパク及び脂質に加え植物性のタンパク、炭水化物及び脂質、さらに様々な添加物及び無機成分が含まれ、試料マトリックスが極めて複雑であることから、分析が困難である。そこで、本論文では抗原抗体反応によってオクラトキシン A を選択的に保持するイムノアフィニティーカラムを用いて試料マトリックスを除去し、HPLC により定量する分析法を開発した。分析法開発に当たって、オクラトキシン A を高感度に検出するため、抽出溶媒、HPLC の溶離条件及び蛍光検出条件を検討し、最適化した。イムノアフィニティーカラムとして有機溶媒耐性の高いものを採用して、高い精製効率と回収率を得ることに成功した。犬用及び猫用のドライ、セミドライ及びウェットタイプのペットフード試料合計 10 種類を用いて添加回収試験を実施し、開発した分析法の妥当性を確認して、すべての試料においてオクラトキシン A の良好な回収率が得られることを明らかにした。さらにオクラトキシン A の定量下限値及び検出限界はペットフードの分析に十分適用可能であることを確認した。また、複数の試験機関を対象とした試験室間試験においても良好な結果が得られたことから、本分析法は様々なペットフード試料中のオクラトキシン A の分析法として妥当であることが確認された。

第3章

糖は動物にとって必要不可欠な栄養素であると同時に、過剰摂取により健康に悪影響を及ぼす物質でもある。近年、その生理活性が注目され、様々な種類の糖及び糖アルコールが食品に利用されている。このことから、糖の同定と定量を可能にする実用的な分析法が必要とされているが、その化学構造から分離及び検出の両面において困難が多く、有効な方法が確立されていない。本論文では、液体クロマトグラフ質量分析計において移動相に添加、あるいはポストカラムで導入した塩素供与物質により、糖が塩素付加体として大気圧化学イオン化法でイオン化され、ネガティブモードで高感度に検出可能であることを利用し、クロマトグラフィーによる分離が困難な糖及び糖アルコールを同時に分析する方法を確立した。分析対象物質とした 29 種類の糖及び糖アルコールを、アミノプロピル基結合シリカゲルを充填剤とするカラム及びエチレン架橋型ハイブリッド粒子にアミド基を化学修飾したカラムを用いて分離し、各々の保持時間とモニターイオンの組み合わせによって、一部の四炭糖を除き、ほとんどの糖を同定可能とした。また、この分析法は定量分析に

も適用可能である。塩素供与物質として利用可能なクロロホルム及びジクロロメタンは発がん性などの有害性があるが、より安全性の高いクロロアセトニトリルが塩素供与物質として利用可能であり、イオン化効率の面でクロロホルム及びジクロロメタンよりも優れていることを発見した。本論文で開発した糖の分析法は選択性が高く、高感度であることから、複雑な試料の前処理操作を必要とせず、簡便に糖の同定と定量を行うことが可能である。

第4章

食品等に含まれるかび毒の含有量を求める方法として本論文（第1章）で開発した分析法が、経口摂取による化学物質のばく露量を評価する上でも有効であることを述べている。

第5章

オクラトキシン A のさらなる回収率向上のための改良法、従来のカラムでは分離が困難な糖を分離するための新規固定相を用いたカラムの開発方針など、今後の研究の展開について述べている。

以上のように本研究では、高性能イムノアフィニティーカラムによる前処理と蛍光検出高速液体クロマトグラフィーを用いて、複雑な試料マトリクス中のかび毒（オクラトキシン A）を定量する分析法を開発し、その妥当性を示した。ペットフードには穀類が原料として用いられることが多く、かび毒による汚染の可能性が高いため、本研究の成果はペットフードの検査に利用され、愛玩動物試料の安全確保に寄与することが期待される。また、クロロアセトニトリルの添加によって糖を塩素付加体として質量分析計で高感度検出できることを発見し、クロロアセトニトリルを含む移動相を用いる高速液体クロマトグラフィー／質量分析法により、糖及び糖アルコールの分析法を開発した。この方法は、多くの食品等に添加されている糖及び糖アルコールの定性及び定量分析への適用が期待される。したがって、本論文は博士（工学）の授与にふさわしいものと判断し、学位論文審査委員会は合格と判定した。