

## コーヒー分析時のオクラトキシンAに関連する不明ピーク (OTA-X) の毒性評価

佐藤朱音・川村 理

### Toxicity of an unknown peak (OTA-X) associated with ochratoxin A in roasted coffee

Akane Sato and Osamu Kawamura

#### Abstract

An unknown peak (OTA-X) was often observed in the chromatogram of ochratoxin A (OTA) analysis in roasted coffee, which was delayed by about 2 minutes from the peak of OTA. OTA-X was estimated to be a compound similar to OTA because it bound to immunoaffinity column (IAC) for OTA, had a retention time close to that of OTA, and a fluorescence similar to OTA. Therefore, OTA-X was isolated and a toxicity test was conducted on HepG2 cells to compare the cytotoxicity of OTA. First, as a result of examining the production conditions of OTA-X, it was found that Arabica coffee beans was better substrate and shallow roast was good. From this roasted coffee, 6 µg of purified OTA-X was obtained by IAC cleanup and preparative HPLC. As a result of the toxicity of OTA in HepG2 cells, it was revealed that the toxicity was about 100 times stronger when serum was not added. As a result of the cytotoxicity of OTA-X under these conditions, OTA-X had almost the same cytotoxicity to HepG2 cells as OTA. OTA-X present in roasted coffee was found to have almost the same level of cytotoxicity as OTA. It was suggested that it was necessary to evaluate in.

Key words : ochratoxin A, coffee, unknown peak, toxicity, OTA-X, immunoaffinity column.

#### 緒 言

オクラトキシンA (ochratoxin A, OTA) は, *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* や *Penicillium verrucosum* などのカビが産生するマイコトキシンで, 麦類を中心とした穀物やその加工品, コーヒー, ココア, ビール, ワインなどを汚染する腎毒性や腎発がん性を有する<sup>(1)</sup>. OTAは, 日本人の血中からも微量ながら高頻度に検出されることが報告されている<sup>(2)</sup>. コーヒーのOTA汚染は広く知られており, 我々もモノクローナル抗体を作製し<sup>(3)</sup>, イムノアフィニティーカラム (immunoaffinity column, IAC) -HPLC法を確立して, 国内, タイやベトナムで市販されていたコーヒー製品の汚染調査を行ってきた<sup>(4, 5)</sup>. これらの分析のクロマトグラムには, OTAより約2分遅れて不明なピーク (以下OTA-X) がしばしば観察された (図1). OTA-Xは, IACと結合すること, OTAとリテンションタイムが近いこと, OTAと類似した蛍光を持っていることからOTAと類似の化合物と推定された. OTAと

類似の化合物であった場合, OTAと同様の毒性を有している可能性があり, OTA-XとOTAの合計量で毒性を評価する必要がある. そこで, OTA-Xを単離して, HepG2細胞での毒性試験を行い, OTAとの細胞毒性の強さを比較した.

#### 方 法

##### 試薬類

OTAは富士フィルム和光純薬 (株) から購入した. *Aspergillus ochraceus* は渡辺麻衣子博士 (国立医薬品食品衛生研究所) から分譲していただいた. アラビカ種 (東ティモール産) とロバスタ種 (インドネシア産) の生コーヒー豆はアマゾンジャパン合同会社から購入した. HepG2細胞は, 理化学研究所バイオリソース研究センター細胞材料開発室より入手した. その他の試薬類は富士フィルム和光純薬 (株) の特級を用いた.

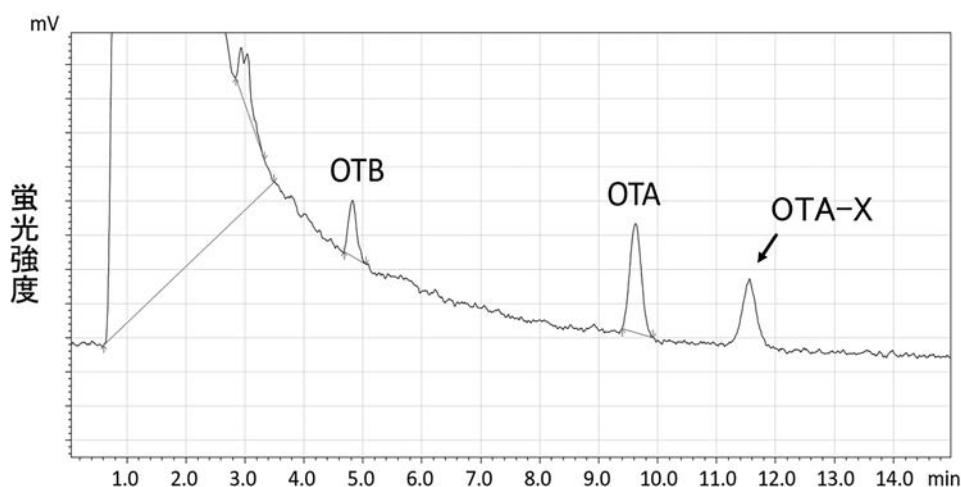


図1 コーヒー中のオクラトキシンA分析時のHPLCのクロマトグラム

#### *Aspergillus ochraceus* を培養したコーヒー豆の焙煎前と焙煎条件でのOTAとOTA-Xの動態

アラビカ種とロバスタ種のコーヒー生豆25 gを100 mLの三角フラスコに入れ、5 mLのイオン交換水を加え、高压蒸気滅菌(121°C, 20分間)を行った。PDA斜面培地で前培養した*A. ochraceus*を0.1% (w/v) Tween 80水溶液を10 mL入れ、胞子を懸濁させた。この懸濁液を0.2 mLずつ滅菌したコーヒー生豆に加えた。27°Cで1週間培養を行った。培養後、高压蒸気滅菌を行った。次に60°Cで24時間、コーヒー生豆を乾燥させた。コーヒー豆焙煎機(カフェプロ101, ダイニチ工業(株))の最も弱い焙煎条件(酸味・浅め, 約220°C, 3分間)と最も強い焙煎条件(苦味・深め, 約225°C, 5分間)でそれぞれ焙煎した。*A. ochraceus*を植菌しなかった検体、焙煎を行わなかった検体、弱い焙煎または強い焙煎を行った検体それぞれをIAC-HPLC法で分析した。

#### IAC-HPLC法

川村らの方法<sup>(4)</sup>で行った。すなわち、粉碎し、微粉末にしたレギュラーコーヒー10 gをコーヒーフィルターに量りとり、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を加え、電源を入れ熱水で抽出した。放冷後、抽出液36 mLに5%NaHCO<sub>3</sub>を4 mLを加えてpH 7.4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(室町ケミカル(株))にOTB.2抗体<sup>(3)</sup>結合ゲルを0.3 mL充填し、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水pH 7.4(Dulbecco's phosphate buffered saline, 以下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%CH<sub>3</sub>CN 1 mLで再溶解し、HPLC分析を行った。HPLCはいずれも(株)島津製作所のシステムコントローラー(SCL-10A<sub>vp</sub>)、送液ユニット(LC-20AD)、オートインジェクター(SIL-20A<sub>HT</sub>)、カラムオープン(CTO-10A)、蛍光検出器(RF-20A<sub>xs</sub>)とカラム(Shim-pack XR-ODS, 3.0 mm i.d.×100 mm)を用い、移動相には、アセトニトリル:水:酢酸(40:58:2, v/v/v)を使用し、注入量は10 µL、流速は0.5 mL/min、カラム温度は50°C、波長は335 nm(励起)、465 nm(蛍光)で行った。

#### 分取HPLC

最も高濃度のOTA-Xが得られる条件が、アラビカ種に植菌し、酸味・浅めの焙煎であったので、1 kgのアラビカ種の生豆に*A. ochraceus*を植菌し、27°Cで1週間培養した。滅菌・乾燥後に酸味・浅めで焙煎した。この焙煎コーヒー豆を粉碎後、上記のIACでクリーンアップを行った。IACの溶出液を分取HPLCで精製した。分取HPLCでは、カラムにCapcell Pak C18 MG S-5, 4.6×250 mm, 粒子径5 µm((株)大阪ソーダ)を用い、500 µLを注入し、移動相にCH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O:AcOH=40:58:2(v/v/v)を用い、流速1.0 mL/minでOTA-Xの分画を分取した。1回の分取HPLCでは、OTA-Xを完全に分離できなかったため分取を2回繰り返した。

#### HepG2細胞での細胞毒性試験

96ウェル培養プレート(Thermo Scientific BioLite, #130188)にHepG2細胞を1×10<sup>4</sup>細胞/ウェルずつ播種

し、10%ウシ胎仔血清（Fetal bovine serum, FBS）を加えたDMEM培地（高グルコース、L-グルタミン、フェノールレッド、HEPES 含有）で5%CO<sub>2</sub>、37℃で24時間前培養を行った。培地を吸引除去した後、10% FBSを含むDMEM培地とFBSを含まないDMEM培地で0~10 µg/mLのOTA溶液を調製した。これらを各ウエルに10 µLずつ加え72時間培養した。細胞毒性は、Cell Counting Kit-8（株）同仁化学研究所）を用い仕様書に従い操作した。すなわち、72時間培養後、各ウエルにCell Counting Kit-8溶液を10 µLずつ加え攪拌し、37℃で4時間37℃反応させた後、マイクロプレートリーダーで450 nmで各ウエルの吸光度を測定した。OTA-Xは、FBSを含まないDMEM培地で0~10 µg/mLの溶液を調製し、各ウエルに10 µLずつ加え72時間培養した。以下の操作は上記と同様に行った。

### 結果および考察

#### コーヒー豆の品種と焙煎条件でのOTAとOTA-X濃度の比較

コーヒー豆の品種と焙煎条件でのOTAとOTA-X濃度の比較した結果を表1に示した。まず、購入したアラビカ種とロバスタ種を苦味・深め（約225℃、5分）で焙煎し、IAC-HPLC法で分析した。その結果、それぞれOTAが29.5と8.1 µg/kg検出された。OTA-Xの蛍光強度はOTAと同じと仮定して算出した濃度はそれぞれ、3.1と0.7 µg/kgであり、OTAの自然汚染があった。OTA-Xの生豆で*A. ochraceus*を培養したと焙煎前のOTAの濃度は、アラビカ種が3,856 µg/kgでロバスタ種が945 µg/kgでアラビカ種の方が4.1倍も高かった。ロバスタ種は高濃度のカ

フェインを含むので、これら*A. ochraceus*の生育またはOTAの生産を抑制した可能性が示唆された。また、焙煎前のコーヒーではOTA-Xは検出されなかった。

酸味・浅め（約220℃、3分）焙煎した場合、アラビカ種のOTAとOTA-Xの濃度はそれぞれ942と350 µg/kgであり、酸味・浅め焙煎でOTAは1/4.1に減少した。ロバスタ種の酸味・浅め焙煎のOTAとOTA-Xの濃度はそれぞれ336と123 µg/kgであり、酸味・浅め焙煎でOTAは1/2.8に減少した。苦味・深め（約225℃、5分）焙煎した場合、アラビカ種のOTAとOTA-Xの濃度はそれぞれ207と135 µg/kgであり、酸味・浅め焙煎からOTAはさらに1/4.6に減少した。ロバスタ種のOTAとOTA-Xの濃度はそれぞれ44.8と25.3 µg/kgであり、酸味・浅め焙煎からOTAはさらに1/4.9に減少した。また、酸味・浅め焙煎でのOTA/OTA-Xの値は、アラビカ種とロバスタ種で0.37であったが、苦味・深め焙煎でのOTA/OTA-Xの値は、アラビカ種で0.65、ロバスタ種で0.56であり、OTAに対するOTA-Xの割合は増加していた。

以上の結果から、OTA-Xはコーヒー中のOTAを焙煎した際に生じるOTA由来の物質であり、OTAからまずOTA-X生成され、さらに加熱するとそれ以外の物質へと変化/分解する可能性が示唆された。

#### OTA-Xの精製と推定構造

アラビカ種を酸味・浅め焙煎した場合に最もOTA-Xが高濃度であったので、アラビカ種の生豆に*A. ochraceus*を植菌・培養し、滅菌・乾燥後に酸味・浅め焙煎した。コーヒーから抽出後、IACでクリーンアップ後、分取HPLCで精製した。1回目の分取時のHPLCのクロマトグラムを図2Aに示した。24~26分付近のOTA-Xのピーク

表1 コーヒー豆の品種と焙煎条件でのOTAとOTA-X濃度の比較

カビの培養	焙煎条件	毒素	アラビカ種	ロバスタ種	アラビカ種/ロバスタ種
なし	苦味・深め (約225℃, 5分)	OTA (µg/kg)	29.5	8.1	3.6
		OTA-X (µg/kg)	3.1	0.7	4.4
		OTA-X/OTA	0.11	0.08	1.4
なし	なし	OTA (µg/kg)	3,856	945	4.1
		OTA-X (µg/kg)	ND	ND	-
		OTA-X/OTA	-	-	-
<i>A. ochraceus</i> を培養	酸味・浅め (約220℃, 3分)	OTA (µg/kg)	942	336	2.8
		OTA-X (µg/kg)	350	123	2.8
		OTA-X/OTA	0.37	0.37	1.0
	苦味・深め (約225℃, 5分)	OTA (µg/kg)	207	44.8	4.6
		OTA-X (µg/kg)	135	25.3	5.3
		OTA-X/OTA	0.65	0.56	1.2

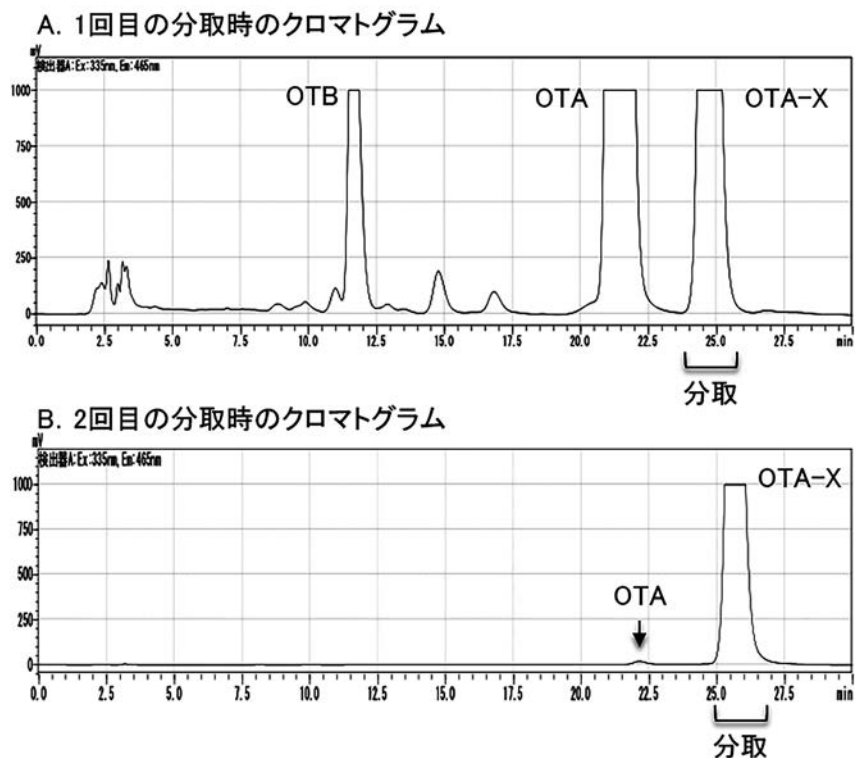


図2 OTA-Xの分取HPLC時のクロマトグラム

を分取した。1回目の分取した画分には微量のOTAが含まれていたため、2回目の分取を行った。約200時間の操作の結果、精製したOTA-Xを6 $\mu$ g得た。

OTA-XのUVスペクトルを測定した結果、236 nmと333 nmに極大吸収があった。OTAの極大吸収は215 nmと333 nmであることから、OTA-XはOTAとほぼ変わらない共役系を有している可能性が強く示唆された。Bittnerら<sup>(6)</sup>は、コーヒー豆を焙煎するとHPLCのクロマトグラムではOTAの直後に14*R*-OTAが出現し、約3分後に14-decarboxy-OTAが出現すると報告しているため、今後、LC/MSなどを行い構造を決定する必要がある。

#### HepG2細胞での細胞毒性試験

OTAは腎毒性物質として知られているため、まず、アフリカミドリザルの腎臓上皮細胞由来のVero細胞でOTAの毒性試験を行った。しかし、10 $\mu$ g/mLのOTAで約40%程度しかVero細胞に対する毒性を示さなかった。そこで、ヒト肝がん由来のHepG2細胞での毒性試験を行った。OTAは血清蛋白質と結合して毒性が弱まる可能性が指摘されていたため、10%FSB添加と無添加でHepG2細胞への毒性を比較した。その結果を図3に示した。血清ありの場合は、1 $\mu$ g/mLまでのOTAを加えてもほとんど毒性は認められなかったが、3 $\mu$ g/mLから細胞毒性が認

められ、10 $\mu$ g/mLではほぼすべての細胞が死滅した。血清無しの場合、OTAを加えなくともやや吸光度は低下したがそれほど大きくは低下していなかった。0.04 $\mu$ g/mLのOTAから毒性がではじめて0.1 $\mu$ g/mL以上のOTA添加ではほぼすべての細胞が死滅した。このことから、FSB添加した培地ではOTAが血清蛋白質と結合し、HepG2細胞への毒性が約100倍も弱まることが明らかになった。

FSBを添加しない培地でOTA-Xの毒性試験を行った。その結果(図4)、OTA-XとOTAのHepG2細胞への毒性はほぼ同じであり、0.03 $\mu$ g/mL以上で細胞毒性がではじめて0.1 $\mu$ g/mL以上ではほぼすべての細胞が死滅した。この結果から、OTA-Xは少なくともHepG2細胞へはOTAとほぼ同程度の細胞毒性を有していることが明らかになった。

焙煎したコーヒー中に存在するOTA-XはOTAとほぼ同程度の細胞毒性を有していることが明らかになったため、コーヒーのOTAのリスク評価を行う場合はOTA-Xとの合計量で評価する必要性が示唆された。しかしながら、現時点ではOTA-Xの明確な構造式、物理化学的性質、毒性に関する情報が不十分なので、今後、OTA-Xを効率的に生産し、構造決定や様々な毒性試験を行う必要がある。

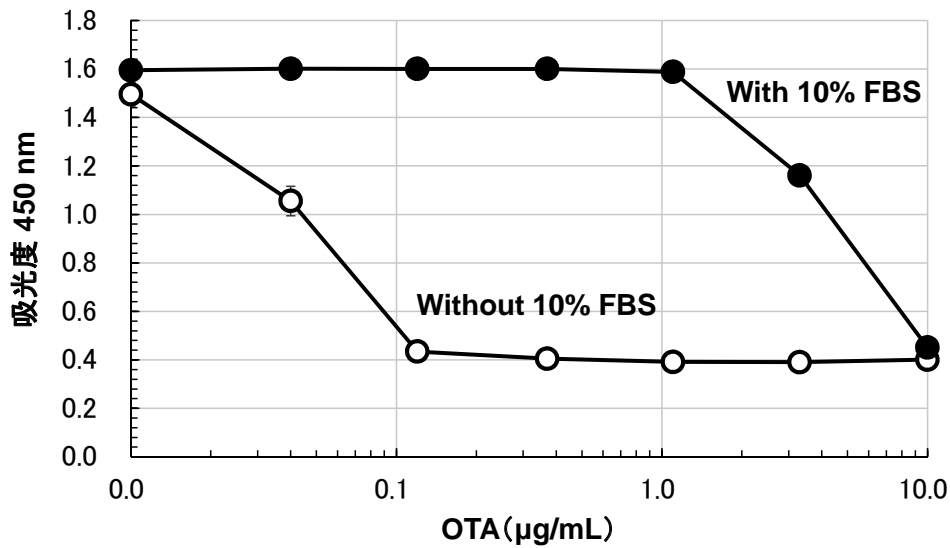


図3 オクラトキシンAの血清あり／なしでのHepG2細胞への毒性の比較

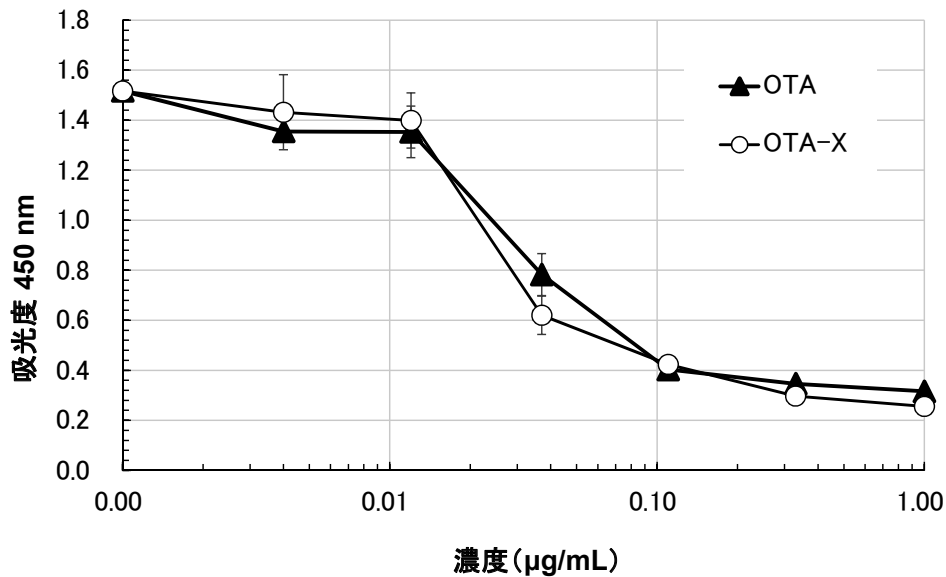


図4 OTA-XとオクラトキシンAのHepG2細胞への毒性の比較

## 摘 要

コーヒー製品のオクラトキシンA (OTA) 分析のクロマトグラムにはOTAより約2分遅れて不明なピーク (以下OTA-X) が観察された。OTA-Xは、IACと結合すること、OTAとリテンションタイムが近いこと、OTAと類似した蛍光を持っていることからOTAと類似の化合物と推定された。そこで、OTA-Xを単離して、HepG2細胞での毒性試験を行い、OTAとの細胞毒性の強さを比較した。まず、OTA-Xの生成条件を検討した結果、アラビカ種の生豆に*A. ochraceus* を植菌・培養し、滅菌・乾燥後に酸

味・浅め焙煎したときに最大になることを確信した。この焙煎コーヒーからIACでのクリーンアップと分取HPLCで精製OTA-Xを6 μgを得た。HepG2細胞でのOTAの毒性試験を行った結果、血清を添加しない方が毒性が約100倍強くであることを明らかにした。この条件でOTA-Xの細胞毒性試験を行った結果、OTA-XはHepG2細胞に対してOTAとほぼ同程度の細胞毒性を有していた。焙煎したコーヒー中に存在するOTA-XはOTAとほぼ同程度の細胞毒性を有していることが明らかになったので、コーヒーのOTAのリスク評価を行う場合はOTA-Xとの合計量で評価する必要性が示唆された。



## 謝 辞

*Aspergillus ochraceus* を分譲していただいた渡辺麻衣

子博士（国立医薬品食品衛生研究所）に深く感謝いたします。

## 引 用 文 献

- (1) 本山 聖子, 小山 典子: オクラトキシンAのリスク評価, *JSM Mycotoxins* 66 (1), 31-35 (2016).
- (2) Ueno, Y., Maki, S., Lin, J., Furuya, M., Sugiura, Y. and Kawamura, O.: A 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC, *Food and Chemical Toxicology* 36, 445-449 (1998).
- (3) 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).
- (4) 川村 理, 鈴木 祐介, 佐々木 絢子: イムノアフィニティーカラム-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, 香川大学農学部学術報告, 67, 47-53 (2015).
- (5) Kraisate Wongworapat, Mi Huynh Tu Ho, Manita Soon-tornjanagit, Osamu Kawamura: Occurrence of ochratoxin A and ochratoxin B in commercial coffee in Vietnam and Thailand. *JSM Mycotoxins*, 66, 1-6, (2016)
- (6) Bittner, A., Cramer, B., and Humpf, H.-U.: Matrix Binding of Ochratoxin A during Roasting. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 12737-12743 (2013).