

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

「食品中の有害物質等の評価に関する研究」

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所 合田幸広

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所 豊田正武

国立医薬品食品衛生研究所 米谷民雄

財団法人食品薬品安全センター 内山貞夫

国立医薬品食品衛生研究所 関田清司

平成 13 (2001) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 食品中の有害物質等の評価に関する研究
合田幸広

II. 分担研究報告書

1. 日常食中の汚染物摂取量及び汚染物モニタリング調査研究
豊田正武
2. アフラトキシン告示試験法の改良に関する研究
合田幸広
3. 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究
米谷民雄
4. 菜種油中のステロール類の検索と評価に関する研究
内山貞夫
5. アガリクス茸による健康影響に関する調査研究
関田清司
6. 放射線照射食品の安全性評価について
豊田正武

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告書

食品中の有害物質等の評価に関する研究

合田 幸広

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（総括研究報告書）

食品中の有害物質等の評価に関する研究

主任研究者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所食品部室長

研究要旨

本事業は、食品中の有害物質－汚染物質、天然有害物質等－を場所と時間の軸のなかで、詳細に、継続的に、定性・定量的解析を行うことに意義がある。これらのデータは衛生行政の基礎資料となる。本年度は昨年度に引き続き国内食品汚染実態と、日常経口摂取による暴露状態を明らかにするために、汚染物モニタリング調査及びマーケットバスケット方式による汚染物摂取量調査を実施した。また統計情報部にある蓄積データの食品部への移管に伴う作業として、食品部にサーバを設置し処理用プログラムを作成し、移管作業を完了した。更に、好酸球増多筋肉痛症（EMS）等に関し主に 1999 年に公表された研究論文を検索し、TOS（有毒油症）、5-OHT_{ip} 及びメラトニンに関して概説した。アフラトキシンの試験法については、新規多機能固相抽出カラムと HPLC を利用した方法の有用性が明らかとなった。脳卒中易発性ラット（SHR-SP）への投与で大豆油に比べ生存期間が短縮すると報告されている菜種油の評価については、KB 細胞に対する増殖阻害作用を調べた結果、ブラジカステロールとエルゴステロールに弱い増殖阻害作用が観察されたがその他のステロールには増殖阻害作用は観察されなかった。ブラジカステロールとβ-シトステロールのようにコレステロール含量を減少させる作用を持つステロールがあり、このコレステロール含量を減少させる作用のあるステロールを喫食することにより、心筋と血管の細胞膜のコレステロール含量が現象し膜の脆弱化を誘起することにより生存期間の短縮を引き起こす可能性を支持する結果となった。健康食品として販売され免疫機能亢進や抗癌作用が話題を呼んでいるアガリクス茸について健康影響と安全性を明らかにするため毒性情報に関する文献を調査した。放射線照射食品の安全性評価については文献調査から、照射による誘導放射能、放射線分解物、過酸化物質の生成、変異原性物質の生成についてまとめた。

分担研究者

豊田正武・国立医薬品食品衛生研究所食品部長、合田幸広・国立医薬品食品衛生研究所食品部室長、米谷民雄・国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長、関田清司・国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部室長、内山貞夫・（財）食品薬品安全センター秦野研究所食品衛生外部精度管理調査事業部長

A. 研究目的

食品の安全性及び健全性を確保するために必要な情報は、食品汚染物に関する情報と食品中の天然有害物情報である。食品中

の化学物質の継続的なモニタリングとそれらに対する人間の暴露状態即ち日常の経口摂取量の把握とは、化学物質による食品汚染に関するリスクアナリシスの一環として

食品衛生行政研究に不可欠な二本柱である。最近特に内分泌攪乱作用を示す環境ホルモンによる生体影響が大きくクローズアップされていることから、そのような化合物も含んだ本研究の食品汚染実態調査と暴露量調査は極めて重要な意味を持つ。好酸球増多筋肉痛症（EMS）に関し今後の同様な食中毒発生を未然に防止することを目的に、1999～2000年に公表された関連研究論文を検索した。アフラトキシンの試験法については、新規多機能固相カラムとHPLCを利用した方法の有用性を評価した。脳卒中易発性ラットへの投与で大豆油に比べ生存期間が短縮すると報告されている菜種油について、原因物質の可能性があるとされている植物ステロール類について動物細胞に対する作用を検討するためにヒト鼻咽癌細胞（KB細胞）に対する増殖阻害作用試験とステロールの細胞内への取り込み実験を行いコレステロール含量の比較を検討した。健康食品として販売され免疫機能亢進や抗癌作用が話題を呼んでいるアガリクス茸について健康影響と安全性を明らかにするため毒性情報に関する文献を調査した。放射線照射食品の安全性評価については、諸外国におけるO-157汚染対策としての照射対象食品の拡大化を踏まえ、安全性に関する文献を調査する。

B. 研究方法

1. 日常食の汚染物摂取量及びモニタリング調査研究：1)FAO/WHO 合同食品及び飼料汚染物モニタリング計画に対応して定められた項目等について、食品中の含量を調査したデータの全国的な集計処理と保存を行った。更に全国10ヶ所で実施したトータルダイエツトスタディーの結果につき我が国の平均的データを作成した。2)食品部にサーバを設置し、データ変換及び検索用プログラムを作成し、データの移管を実施

した。

2. 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究：1999～2000年に発表されたEMS、5-OHトリプトファン、有毒油症（TOS、toxic oil syndrome）及びメラトニン健康補助食品に関する論文を、データベースとしてMEDLINE、TOXLINE、SCISEARCHを用いて検索した。

3. アフラトキシン告示試験法の改良に関する研究：新規多機能固相抽出カラム（MlutiSep #228カラム）で精製し、分析に蛍光検出HPLCを利用した方法を検討し、測定妨害の多い食品への応用性を調べた。

4. 菜種油中のステロール類の検索と評価に関する研究：細胞中ステロール類は抽出物をGC/MS(SIM)で定量した。ヒト鼻咽癌細胞（KB）の増殖阻害は、細胞を10%FBS含有イーグルMEM培地で培養し、検液に対するIC50値で示した。取り込み実験はKB細胞を72時間培養して調べた。

5. アガリクス茸による健康影響に関する調査研究：キノコとヒドラジン誘導体の毒性関係の論文を多数発表しているUni.of Nebraska Medical CenterのToth博士による6総説を対象に、Agaricus属のキノコ及びこの分野で研究が比較的に進んでいるGyromitra esculenta（アミガサタケ）におけるヒドラジン誘導体の含有、含有誘導体に関する一般毒得性、発癌性、再奇形性について要約し、アガリクス茸との関連性を検討した。さらに総説の引用文献により生物活性に関する文献を調査した。

6. 放射線照射食品の安全性評価について：文献調査の方法としてトキシライン、ダイアログなどの文献調査を行い、またWHO、米国FDA等の資料を中心に検討を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 日常食の汚染物摂取量及びモニタリン

グ調査研究

国内及び輸入食品汚染物のモニタリング件数は今年度約 33 万件が追加され 2001 年初頭現在 283 万件に上った。これらのデータから食品汚染物の検出レベルの経年変化、全国平均値及び汚染食品の種類、汚染レベル等が明らかとなった。また重金属、農薬等の 1 日摂取量を明らかにした。なお各食品群に関し定量下限値の 1/2 を用いても、汚染物の摂取量はその ADI を超えることはなかった。分析機関により測定値に若干変動の見られた鉛の測定法について、標準試料による精度管理を実施した。統計情報部に蓄積されたモニタリングデータの食品部への移管を完了した。また 1977 ~ 1999 年間の食品汚染物 1 日摂取量のデータをまとめて冊子として刊行した。

2. 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究

EMS の発症への関与が疑われている昭和電工製 L-Try に含まれる 6 種不純物のうち Peak C と Peak FF の構造がそれぞれ、3a-hydroxy-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo-[2-3b]-indole-2-carboxylic acid 及び 2-[2-hydroxy-indoline]-tryptophan であると決定された。他の既知の不純物と異なり、両不純物がインドール環を有するために、求電性及び求核性アタックに対し反応し易いことが予測され、EMS の起因物質である可能性が浮上している。5-OH Trp は不定愁訴、セロトニン欠乏症への有効性を証明されないまま現在も店頭で大量に販売されているが、幸いなことに 1991 年のカナダ人女性に EMS 様症状が起こって以来、新たな被害報告はなされていない。時差ボケ用に処方されることもある Melatonin もまた店頭で販売され、本品も melatonin-formaldehyde 縮合産物を始めとした不純物を含んでいることが判明している。Melatonin についての重要な知見はこ

れら縮合産物が 5-OH Trp 中にも見いだされ、L-Try 中の主な不純物の 1 つである Peak E の構造同族体であるという事実である。更に有毒油発症のリスクと個体の遺伝学的感受性に関する新知見が得られている。即ち、HLA class II 抗原である DR-DQ のサブタイプである DR2 を発現し、NAT-2 遺伝子に変異を持つヒトにおいて、本症で死亡した例が有意に多く、また、発症へのリスクも増加するという報告がなされた。

3. アフラトキシン告示試験法の改良に関する研究

新規多機能固相抽出カラムと HPLC を利用した方法では、従来十分な狭雑物除去が行えなかった唐辛子、ナツメグ等の香辛料に関し迅速分析が可能になった。

4. 菜種油中のステロール類の検索と評価に関する研究

KB 細胞に対する増殖阻害作用を調べた結果、ブラジカステロールとエルゴステロールに弱い増殖阻害作用(それぞれ IC₅₀ 78、80 $\mu\text{g} / \text{mL}$) が観察されたがその他のステロールには 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度までは増殖阻害作用は観察されなかった。培地中にブラジカステロール、カンペステロール、 β -シトステロールを添加して培養したグループはコレステロールの他それぞれ添加したステロールが 1.072 ~ 1.165 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度で検出された。コレステロールはコントロールが 2.189 $\mu\text{g} / \text{mL}$ でブラジカステロールは 1.812 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、 β -シトステロールは 1.899 $\mu\text{g} / \text{mL}$ で有意差があった。カンペステロールには有意差はなかった。

5. アガリクス茸による健康影響に関する調査研究

Agaricus 属の茸 27 種と Gyromitra esculenta (アミガサタケ) にヒドラジン誘導体の存在が明らかとなった。一部のヒドラジン誘導体に発癌性を含む毒性が明らかにされていた。また、Ataricus bisporus (ツ

クリタケ：通称マッシュルーム）及び *G.esculenta* で動物実験により発癌作用が確認されていた。しかし、茸の摂取を介したヒドラジン誘導体のヒトの健康への影響は明らかとなっていなかった。胃法アガリクス茸の *A.blazei* Murill に関しては、ヒドラジン誘導体の存在、或いは発癌性を含む毒性に関する報告は見あたらなかった。逆に抗癌（腫瘍）作用に関する文献が多数見られた。これは、アガリクス茸が誘導体を含まない或いは毒性がないことを忌みするものではなく、この分野での研究が行われていないことを意味するものと考えられた。

5. 放射線照射食品の安全性評価について
近年WHOは高線量域での安全性を確認したとして 10kGy を超える照射を認めるよう勧告を出している。そこでそれら安全性評価の根拠となった文献等を参照し、項目別にまとめた。即ち照射による誘導放射能、放射線分解物、過酸化物質の生成、変異原性物質の生成についてまとめたが、安全性に関する詳細な検討は、評価基準などを定めた上、生物系学識経験者を含む毒性専門家によるリスク評価のための検討が必要である。

D. 結論

1. 日常食の汚染物摂取量及びモニタリング調査研究

全国約 63 自治体研究機関との緊密な協力により行われているモニタリング調査、及び 10 機関との協力により行われているトータルダイエツトスタディーによる汚染物摂取量調査結果から、我が国における食品汚染のバックグラウンドレベル及び摂取量が明らかとなり、我が国の食生活の安全性を検証できた。食品部への蓄積データ移管のためサーバを設置し、データ変換及び検索に必要なプログラムを作成し、データの移管を完了した。1977～1999年間の摂取

量データをまとめて冊子を刊行した。

2. 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究

EMS 関連 L-トリプトファン中の 6 種不純物のうち Peak C と Peak FF の構造が決定された。メラトニン中不純物である縮合産物は 5-OH Try 中にも見いだされ、また L-トリプトファン中不純物の Peak E の構造同族体であることが重要な知見である。また有毒油症発症のリスクと個体の遺伝学的感受性に関する新知見が得られている。

3. アフラトキシン告示試験法の改良に関する研究

多機能固相抽出カラムとしては、Isolute Multimode カラムより Myco Sep カラムで分析時間が短縮されることが分かった。本法は 34 種食品試料の添加回収実験で良好な結果が得られた。本アフラトキシンの分析方法は簡便で、高毒性溶媒を利用せず、従来法とほぼ同等の精度と正確さで分析可能である。また確認試験法として 3 次元蛍光検出器も有用であることが分かった。

4. 菜種油中のステロール類の検索と評価に関する研究

ステロールにはブラジカステロールと β -シトステロールのようにコレステロール含量を減少させる作用を持つステロールがあり、このコレステロール含量を減少させる作用のあるステロールを喫食することにより、心筋と血管の細胞膜のコレステロール含量が現象し膜の脆弱化を誘起することにより生存期間の短縮を引き起こす可能性を支持する結果となった。

5. アガリクス茸による健康影響に関する調査研究

健康食品として販売されているアガリクス茸は菌糸体の培養液、菌糸体の濃縮液、乾燥粉末であったり、通常の茸の摂取方法とは異なる方法で節食されており、大量摂取の恐れも視野に入れ、アガリクス茸のヒ

ドラジン誘導体の分析或いは動物実験によるアガリクス茸の長期摂取による健康への影響について検討するなどの必要があると考えられる。

6. 放射線照射食品の安全性評価について

今回調査した放射線照射食品の毒性試験資料から、評価することは困難であり、安全性に関する詳細な検討は、評価基準などを定めた上、生物系学識経験者を含む毒性専門家によるリスク評価のための検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 合田幸広、穂山浩、大槻崇、藤井明美、豊田正武：多機能カラムと HPLC を利用した食品中のアフラトキシン分析法の応用と改良、食品衛生学雑誌、42(1)、56-62(2001)
- 2) H.Akiyama, Y.Goda, T.Tanaka, M.Toyoda : An analytical method for aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column cleanup, J.Chromatotr.B (submitted).
- 3) Y.Naito, H.Yoshida, T.Nagata, A.Tanaka, H.Ono, N.Ohara : Dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only fat nutrient in spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats. Blood pressure and pathology, Toxicology 146, 197-208 (2000)
- 4) Y.Naito, K.Kasama, H.Yoshida, N.Ohara : Thirteen-week dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat in Wistar

Kyoto rats. Change in blood pressure, Food and Chemical Toxicology, 38, 811-816 (2000)

5) Y.Naito, C.Konishi, N.Ohara : Blood coagulation and osmolar tolerance of erythrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats given rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat, Toxicology Letters, 116, 209-215 (2000)

6) Y.Naito, C.Konishi, H.Katsumaura, N.Ohara : Increase in blood pressure with enhanced Na⁺, K⁺-ATPase activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after 4-week intake of rapeseed oil as the sole dietary fat, Pharmacology and Toxicology, 87, 144-148 (2000)

2. 学会発表

- 1) 五十嵐敦子、松田りえ子、豊田正武：食品汚染物モニタリング調査結果の新規データベース化について、第 37 回全国衛生化学技術協議会年会、講演集 126-127(2000)
- 2) 穂山浩、合田幸広、田中敏嗣、豊田正武：多機能カラムを用いた香辛料中のアフラトキシンの迅速定量法、第 79 回日本食品衛生学会学術講演会、東京 (2001)
- 3) 内藤由紀子、大原直樹：脳卒中易発性自然発症高血圧ラットにおける菜種油長期摂取と膜機能変化、第 74 回日本薬理学会年会、横浜 (2001)

Ⅱ．分担研究報告書

1．日常食中の汚染物摂取量及び 汚染物モニタリング調査研究

豊田 正武

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（分担研究報告書）

平成12年度

日常食の汚染物摂取量及び汚染物モニタリング調査研究

分担研究者 豊田 正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

本事業は、食品中の有害物質－汚染物質、天然有害物質等－を場所と時間の軸のなかで、詳細に、継続的に、定性・定量的解析を行うことに意義がある。これらのデータは衛生行政の基礎資料となる。本年度は昨年度に引き続き国内食品汚染実態と、日常経口摂取による暴露状態を明らかにするために、汚染物モニタリング及びマーケットバスケット方式による汚染物摂取量調査を実施した。また汚染物モニタリングデータ処理のために、食品部内にサーバを設置し、データ処理用プログラムの作成と統計情報部の保存データの食品部への移管を完了した。1977～1999年度までの食品汚染物1日摂取量調査結果のデータをとりまとめ冊子として刊行した。

汚染物摂取量調査協力研究者：

酒井洋、小熊公枝（新潟県保健環境科学研究所）、佐伯政信、長谷川康行（千葉県衛生研究所）、臼井進、日高利夫、高橋京子（横浜市衛生研究所）、宮部正樹、田村征男（名古屋市衛生研究所）、堀伸二郎、桑原克義、池辺克彦（大阪府立公衆衛生研究所）、徳田三郎、小嶋美穂子（滋賀県衛生環境センター）、松岡幸恵、宮村恵宣、重森徹洋（山口県環境保健研究センター）、西岡千鶴、毛利孝明（香川県衛生研究所）、阿部義則、玉那覇康二（沖縄県衛生環境研究所）、松田りえ子、五十嵐敦子（国立医薬品食品衛生研究所）

全国汚染物モニタリング調査協力機関：

北海道立衛生研究所（食品科学部）
札幌市衛生研究所（食品化学係）
函館市衛生試験所（食品試験係）
岩手県衛生研究所（食品衛生部）

宮城県保健環境センター（理科学部）
仙台市衛生研究所（理化学課）
秋田県衛生科学研究所（理化学課）
山形県衛生研究所（理化学課）
福島県衛生公害研究所（理化学課）
茨城県衛生研究所（生活環境部）
栃木県衛生研究所（食品薬品部）
群馬県衛生環境研究所（食品化学科）
埼玉県衛生研究所（水・食品担当）
千葉県衛生研究所（食品科学研究室）
東京都立衛生研究所（生活科学部）
神奈川県衛生研究所（食品化学科）
横浜市衛生研究所（検査研究課）
川崎市衛生研究所（食品検査）
横須賀市衛生試験所（理化学検査担当）
新潟県保健環境科学研究所（生活衛生課）
新潟市衛生試験所（食品係）
富山県衛生研究所（化学部）
石川県保健環境センター（食品薬品化学部）
福井県衛生研究所（生活化学部）

山梨県衛生公害研究所
長野県衛生公害研究所（食品衛生部）
岐阜県保健環境研究所（生活化学部）
静岡県環境衛生科学研究所（医薬品生活部）
愛知県衛生研究所（環境科学課）
名古屋市衛生局（食品衛生課）
三重県衛生研究所
滋賀県衛生環境センター（食品科学係）
京都府保健環境研究所（理化学課）
京都市衛生公害研究所（生活衛生部門）
大阪府立公衆衛生研究所（食品化学課）
大阪市環境科学研究所（衛生分析課）
堺市衛生研究所（食品検査）
兵庫県衛生研究所（食品薬品部）
神戸市環境保健研究所（食品化学部）
姫路市環境衛生研究所（衛生課）
尼崎市衛生研究所（理化学）
奈良県衛生研究所（食品衛生課）
和歌山県衛生公害研究センター（生活理化学部）
和歌山市衛生研究所（生活化学班）
鳥取県衛生研究所（食品科学科）
島根県衛生公害研究所（生活化学科）
岡山県環境保健センター（衛生化学科）
広島県保健環境センター（理化学部）
広島市衛生研究所（生活化学部）
山口県衛生公害研究センター（理化学部）
徳島県保健環境センター（食品衛生課）
香川県衛生研究所（理化学研究室）
愛媛県立衛生環境研究所食品科学科）
高知県衛生研究所（生活化学部）
福岡県保健環境研究所（生活化学課）
福岡市衛生試験所（理化学課）
北九州市環境科学研究所（衛生科学環境係）
佐賀県衛生研究所（理化学試験課）
長崎県衛生公害研究所（衛生科学科）
長崎市保健環境試験所（食品科学科）
熊本県保健環境科学研究所（生活科学部）
宮崎県衛生環境研究所（衛生化学部）
鹿児島県衛生研究所（食品薬事部）
沖縄県衛生環境研究所（保健化学室）

A. 研究目的

食品の安全性及び健全性を確保するために必要な情報は、食品汚染物に関する情報と食品中の天然有害物情報である。食品中の化学物質の継続的なモニタリングとそれらに対する人間の暴露状態即ち日常の経口摂取量の把握とは、化学物質による食品汚染に関するリスクアナリシスの一環として食品衛生行政研究に不可欠な二本柱である。最近特に内分泌攪乱作用を示す環境ホルモンによる食品汚染が大きくクローズアップされていることから、そのような化合物も含んだ本研究の実態調査と暴露量調査は極めて重要な意味を持つ。

B. 研究方法

- 1) 全国汚染物モニタリング計画：FAO/WHO 合同食品及び飼料汚染物モニタリング計画に対応して定められた項目等について、食品中の含量を調査したデータの全国的な集計処理を行った。
 - 2) 全国汚染物摂取量計画：全国 10ヶ所で実施したトータルダイエツトスタディーの結果を集計し、我が国の平均データを作成した。
 - 3) モニタリングデータ処理システムの構築：誤入力をサーチするチェックプログラムを組み込んだウィンドウズ用 Excel によるデータ収集を実施した。また従来厚生省統計情報部の大型コンピュータに保存してあった蓄積データについて、統計情報部より国衛研への移管を要請されたことから、必要なサーバを購入し、蓄積データの変換プログラムを作成し、データ検索システムを構築した。
- 1) 鉛分析の精度管理：分析機関により測定値に若干変動の見られた鉛の測定法について、標準試料による精度管理を実施した。

C. 研究結果及び考察

1) 汚染物モニタリング：国内及び輸入食品汚染物のモニタリング件数は今年度約 33 万件が追加され 2001 年初頭現在 286 万件に上った。これらのデータから食品汚染物の検出レベルの経年変化、全国平均値及び汚染食品の種類、汚染レベル等が明らかとなった。また重金属、農薬等の 1 日摂取量を明らかにした。図に 1993 年から 1999 年の 7 年間の調査汚染物の 1 日摂取量の年次推移を示した。なお各食品群に関し定量下限値の 1/2 を用いても、汚染物の摂取量はその ADI を超えることはなかった。表に、平成 12 年度のモニタリング調査の総検査数、総試料数とそれぞれの検出数を示す。表の下欄は、農薬と動物用医薬品のデータのみの集計である。汚染物の検出率は全データで 3.0%，農薬・動物用医薬品で 1.1% であり、汚染物が 1 つでも検出された試料の割合は、全データで 32.1%、17.8%であった。なお、1 試料当たりで検査される汚染物数が増加しているために、試料当たりの検出率は、見かけ上高くなっている。検出割合が高い食品は、おうとう、オレンジ、レモン、グレープフルーツ、茶であり、検出率の高い農薬は、イマザリル、チアベンダゾール、DDE、BHC であった。

2) モニタリングデータ処理システムの構築：データ収集は以前に開発したウィンドウズ用 Excel に誤入力をサーチするチェックプログラム付きフロッピーにより行った。データの移し換えのためにサーバ (GRANPOWER 5000 モデル 280、30GB 固定ディスク、メモリ 384MB、富士通) を食品部に設置した。またオラクルを用いデータ変換と検索用のプログラム (SymfoWare Navigator) を作成した。

2) 鉛分析の精度管理：10 機関で NIST RM8436 小麦粉標準試料を用いて各機関の分析方法により鉛を分析した。分析値の

RSD は 76.7% と高く、棄却検定後 RDS は 28.3% となった。変動の原因については現在検討中である。

D. 結論

1. 全国約 63 自治体研究機関との緊密な協力により行われているモニタリング調査、及び 10 機関との協力により行われているトータルダイエツトスタディーによる汚染物摂取量調査結果から、我が国における食品汚染のバックグラウンドレベル及び摂取量が明らかとなり、我が国の食生活の安全性を検証できた。

2. 統計情報部より食品部への保存データ移管のため、まずサーバを食品部に設置し、データの変換と検索に必要なプログラムを作成し、実際の移管作業を完了した。

3. 1977 年から 1999 年までの日本における食品汚染物 1 日摂取量調査についてまとめたデータを冊子として発刊した。本冊子は参考のため分担研究報告書の最後に資料として添付した。

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

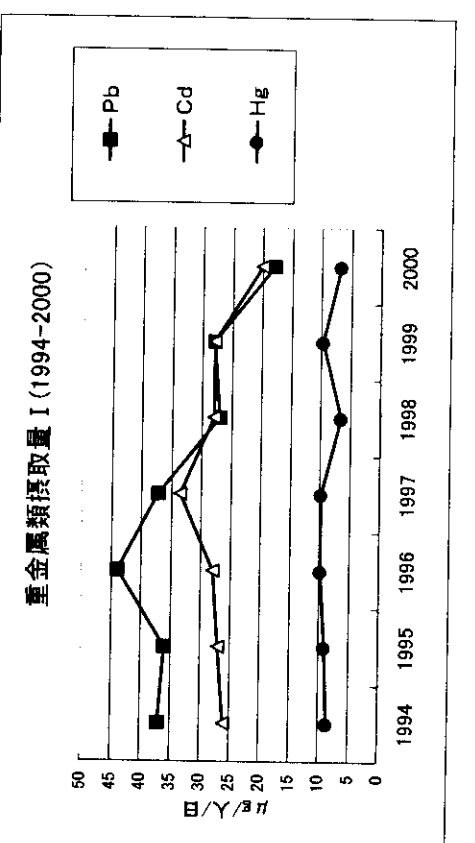
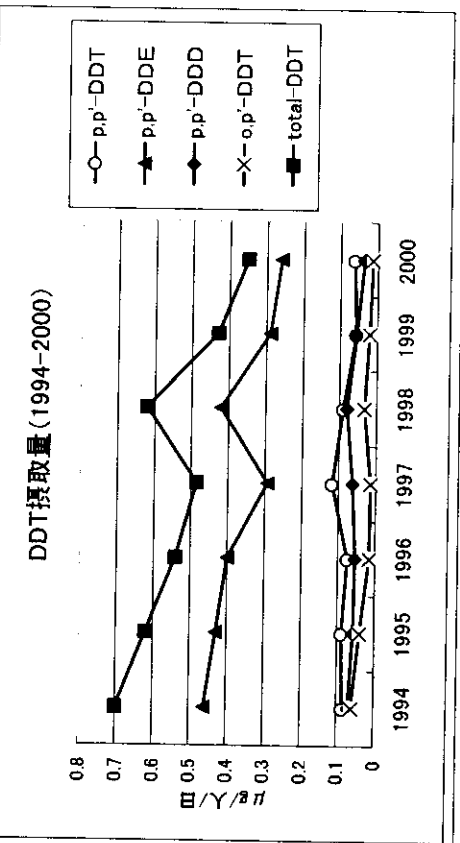
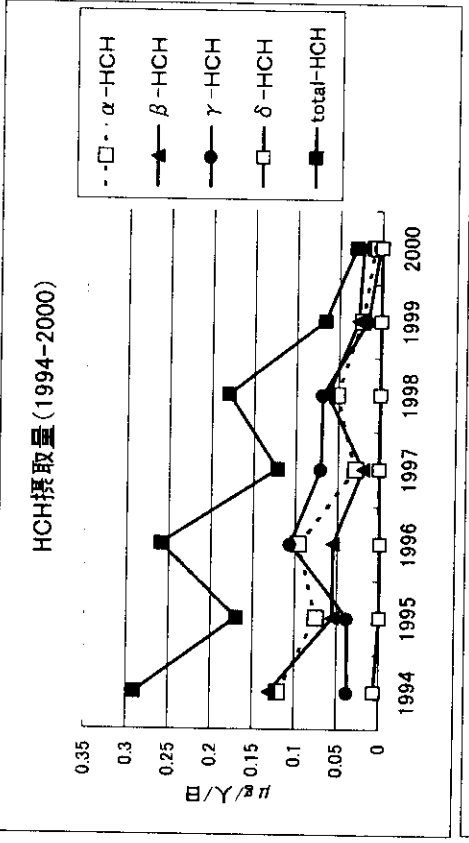
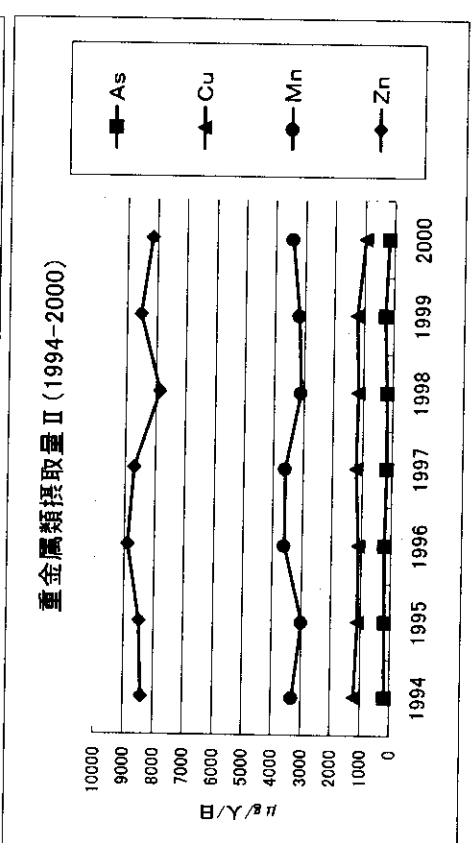
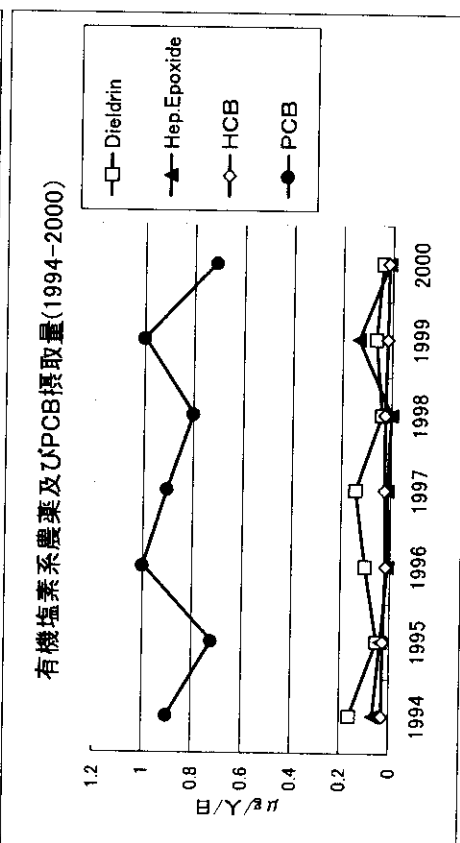
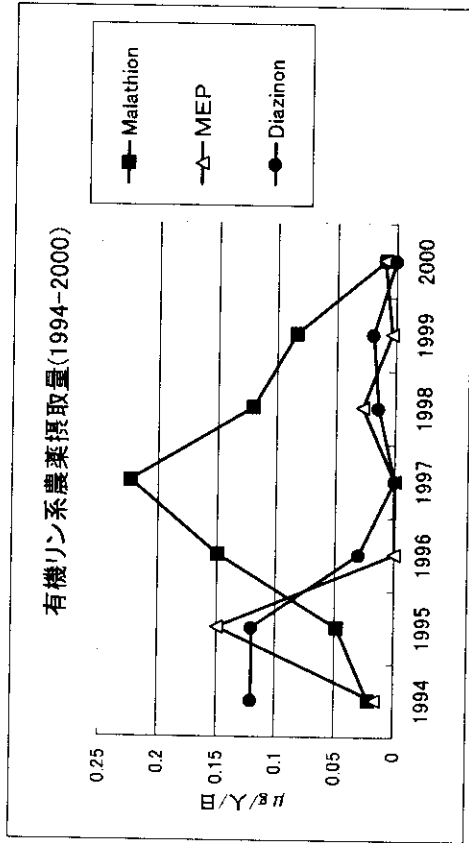
2. 学会発表

五十嵐敦子、松田りえ子、豊田正武：食品汚染物モニタリング調査結果の新規データベース化について、第 37 回全国衛生化学技術協議会年会、講演集 126-127 (2000)

表 平成 12 年度食品汚染物モニタリングデータの解析 (汚染物の検出率)

全データ	総数	検出数	検出率 (%)
検査数	259148	7757	3.0
試料数	10968	3524	32.1
農薬・動物用医薬品 のデータ	総数	検出数	検出率 (%)
検査数	242086	2651	1.1
試料数	6804	1211	17.8

汚染物摂取量年次推移



Ⅱ. 分担研究報告書

2. アフラトキシン告示試験法の改良に関する研究

合田 幸広

生活科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（分担研究報告書）

アフラトキシンの告示試験法の改良に関する研究
分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

動物実験により発ガン性が明らかにされているマイコトキシンキシンであるアフラトキシンの公定分析法の改良を目的として、多機能固相抽出カラムと蛍光検出 HPLC を利用した分析法の検討を行っている。今年度は、これまで従来の多機能固相抽出カラムだけでは、十分な夾雑物除去が行えなかったトウガラシ、ナツメグ等の香辛料に関し研究班の依頼で開発された、新規 MFC である MlutiSep #228 カラムを用いた分析法の検討を行った。その結果、MFC の一定の溶出画分を選択することで、通知による検査対象品目であるトウガラシ、ナツメグ、ハトムギだけでなく、白コショウと黒コショウについても、夾雑物のない良好なクロマトグラムが得られることが判明し、これらの品目についても、毒性の高い溶媒を用いない迅速分析が可能になった。

協力研究者

穂山 浩、豊田正武（国立医薬品食品衛生研究所）

田中敏嗣（神戸市環境保健研究所食品化学部）

岡野清志（マイコトキシン検査協会）

能勢充彦（名古屋市立大学薬学部）

A. 研究目的

我が国では、カビ毒（マイコトキシン）の食品汚染による国民の健康被害を防止するため、マイコトキシンの中で動物実験により発ガン性が明らかにされているアフラトキシンについて、食品中の規格基準が定められ、その分析法が公定法として通知（環食 128 号）されている。しかし本公定法は、分析行程が極めて煩雑で、分析方法の習熟に時間がかかる上、クロロホルム、ベンゼンといった毒性

の高い溶媒を多用しているという問題が指摘されていた。本研究では、この公定法の改良を目的として、多機能固相抽出カラム(MFC)と蛍光検出 HPLC を組み合わせ、毒性の低い溶媒を用いる迅速分析法の検討を行っている。平成 11 年度の検討結果より、MFC である MycoSep #226 カラムを用いてピーナッツ、ライス等の試料については良好な結果を得た。しかし、赤唐辛子、ナツメグ等の香辛料に関しては、HPLC 分析における夾雑ピークが多く、アフィニティーカラムと組み合わせた分析を行わなければならなかった。そこで、本年度は香辛料中からの、より簡易なアフラトキシン分析を目指し、前処理操作に重点を置きさらに検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

穂山らが既に報告（食品衛生学雑誌 37(4), 195-201(1996)）している方法を基に、MFC を、ISOLUTE MULTI MODE から MultiSep #228 カラムに変更した分析を行った。同カラムは、本研究班の依頼により新しく製造されたもので、平成 11 年度に用いた MycoSep #226 カラムより、逆相 C18 の固相が多く含有されている。また、抽出液の押し込み型の MycoSep #226 とは異なり MultiSep #228 の形状は通常の落下型のカラムである。同カラムで精製された試料液を、減圧濃縮乾固後、TFA 処理により蛍光誘導体化し、蛍光検出 HPLC 分析を行った。添加回収実験は、試料 20 g に アフラトキシン B1, B2, G1, G2 を各 5ppb、10ppb 添加して行った。

分析を行った試料は、通知で検査が義務づけられている試料である、トウガラシ、ナツメグ、ハトムギ及び、検疫所のモニタリング分析対象となった白コショウ、黒コショウについて検討した。

蛍光検出器としては、島津 RF-10A XL を使用し、excitation 350 nm、emission 465 nm で観測した。

C. 研究結果・考察

1. 抽出溶媒の検討

赤唐辛子試料を用いて抽出溶媒のアセトニトリルの比率を 80%、85%、90%と変えて抽出した後、MycoSep #226 カラムで前処理し HPLC 分析を行ったところ、90%アセトニトリルの条件で、クロマトグラム上に最も夾雑ピークが少ないことが判明した。次に試料に対する抽出溶媒の比について検討を行った。その結果、試料に対する抽出溶媒の比を 1:2 あ

るいは 1:4 で抽出すると抽出溶媒が試料に吸収され、ろ過した後、抽出液が十分得られず、アフラトキシン添加回収率も一定しないことが判明した。しかし、1:8 で抽出したところ、ろ過後の抽出溶媒量もほぼ添加量に近い量となり、添加回収率も良好であった。

2. MFC による前処理法の検討

逆相の固相重量を増加した MultiSep #228 カラムを用い、まず通常の使用法通り、抽出液 5 mL をそのままカラムに負荷し、得られた溶出液について蛍光 HPLC 分析を行ったが MycoSep #226 カラムと同様、クロマトグラム上に妨害ピークが検出された。アフラトキシンは、MycoSep #226 及び MultiSep #228 で用いられている担体には、全く保持されないことが知られている。他方、夾雑成分は、保持されている可能性がある。そこで、カラムの溶出画分を選べば、夾雑物の混入が少ないクロマトグラムが得られる可能性があると考え、MultiSep #228 カラムの溶出液を溶出の順に 1 mL ずつ 3 分画し、誘導体化の後、蛍光 HPLC 分析を行った。各 3 画分の HPLC クロマトグラムを Fig. 1 に示す。各 3 画分のアフラトキシンの回収率は同じであったが、夾雑ピークは MultiSep #228 カラムの溶出順に増加した。そこで以後、最も良好なクロマトグラムが得られた最初の溶出液 1mL を用い、分析を行うことにした。

3. HPLC 条件の検討

得られた試料溶液 0.5 mL を蒸発乾固後、TFA で誘導体化し HPLC 分析を行った。Inertsil ODS-3 (3 μ m)、GL-phenyl-3、ODSPAK F511 について検討した結果、Inertsil ODS-3 (3 μ m, 4.6 mm i.d. X 250 mm) が夾雑ピークとの分離

が良い上、アフラトキシンのピーク形状に関して最も良好であり、本カラムを以後の分析に使用することにした。

4. 添加回収実験

赤トウガラシ、黒コショウ、白コショウ、ナツメグ、ハトムギにおいて添加回収実験を行った。その結果、すべての試料において82%以上の回収率を得た。各試料のクロマトグラムを Fig.2 (赤唐辛子)、Fig.3(黒コショウ)、Fig.4(白コショウ)、Fig.5 (ナツメグ) Fig.6(ハトムギ)に示す。添加回収実験の結果を Table 1 に示す。なお、別にピーナッツ、アーモンド、ピスタチオ、コーン、黒ゴマにおいても MultiSep #228 カラムを利用した本法において全て回収率 80%以上の良好な結果が得られている。

5. コラボ実験

3 機関で本法に従ってコラボ実験をおこなったところ、ナツメグで G1 が 71%の回収率を示した他は全て回収率 80%以上の良好な結果が得られた。

D. 結論

本研究班の依頼で製造された MFC を用い、新しい前処理操作と HPLC を利用して、アフラトキシンの簡便で、毒性の高い溶媒を利用しない分析法を開発した。本法により、通知で分析が義務づけられた試料の内、これまで MFC にアフィニティーカラムを組み合わせた

分析を行う必要のあった、香辛料等の食品 (赤トウガラシ、ナツメグ、ハトムギ) においても、MFC による前処理操作のみで分析が可能となった。また、検疫所での分析検体の多い、白コショウ、黒コショウで良好な回収率で分析が可能であることを示した。以上、これまでの研究と合わせ、通知で分析が義務付けられた全ての食品において、簡便で、毒性の高い溶媒を用いない MFC と蛍光検出 HPLC を組み合わせた方法で、アフラトキシンの分析が可能となった。

E. 研究発表

論文発表

1. 合田幸広、穂山浩、大槻崇、藤井明美、豊田正武、多機能カラムと HPLC を利用した食品中のアフラトキシンの分析法の応用と改良、食品衛生学雑誌、42(1)、56-62 (2001).
2. Hiroshi Akiyama, Yukihiro Goda, Toshitsugu Tanaka and Masatake Toyoda. An analytical method for aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column cleanup *J. Chromatogr. B (submitted)*.

学会発表

1. 穂山浩、合田幸広、田中敏嗣、豊田正武：「多機能カラムを用いた香辛料中のアフラトキシンの迅速定量法」第 79 回日本食品衛生学術講演会、東京、2001 年 5 月。

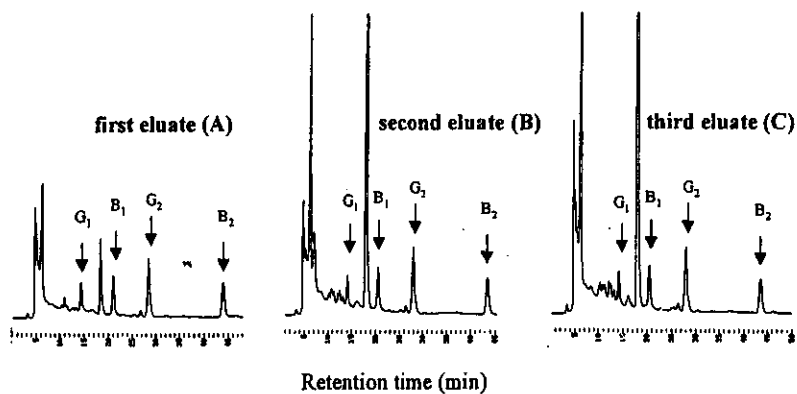


Fig.1 Typical HPLC chromatograms of the first eluate (A), second eluate (B) and third eluate (C) of aflatoxin-spiked (each 10 ng/g) red pepper extract from MultiSep #228 cartridge column

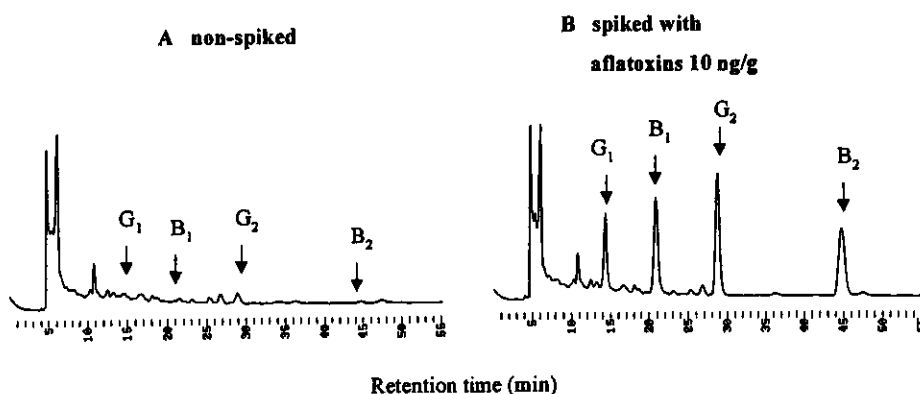


Fig.2 Typical chromatograms of sample solutions from non-spiked red pepper (A) and red pepper spiked with aflatoxins B1, B2, G1 and G2 [10 ng/g] (B)

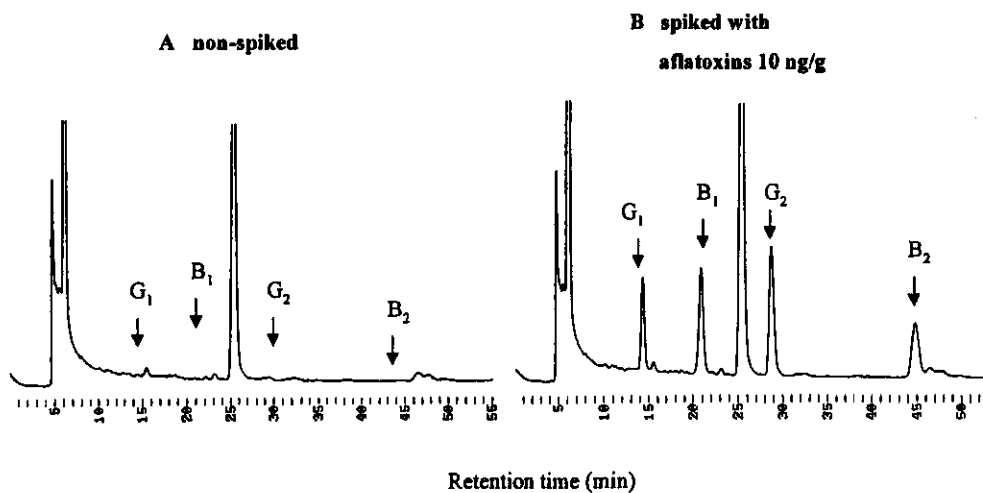


Fig.3 Typical chromatograms of sample solutions from non-spiked black pepper (A) and black pepper spiked with aflatoxins B1, B2, G1 and G2 [10 ng/g] (B)

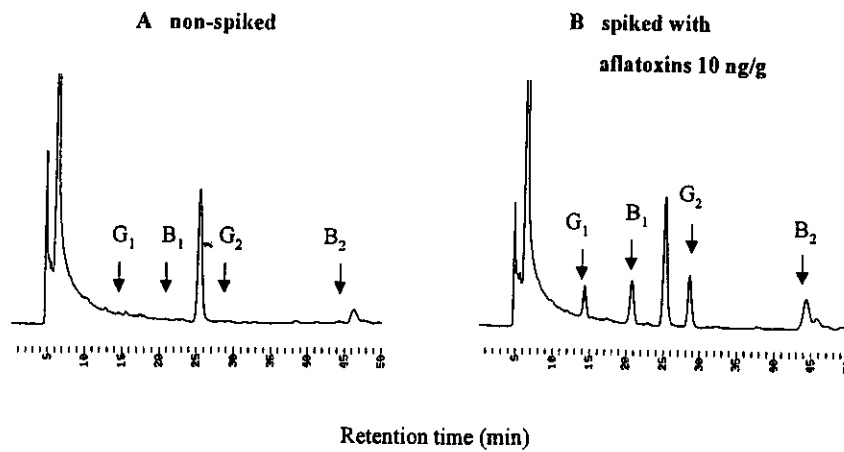


Fig.4 Typical chromatograms of sample solutions from non-spiked white pepper (A) and white pepper spiked with aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ [10 ng/g] (B)

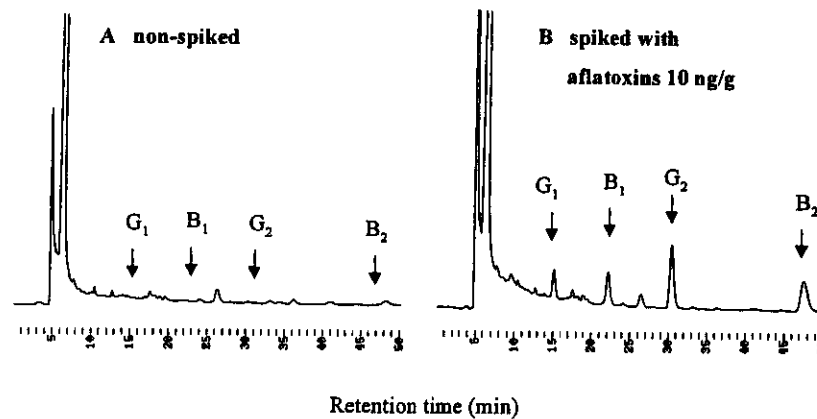


Fig.5 Typical chromatograms of sample solutions from non-spiked nutmeg (A) and nutmeg spiked with aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ [10 ng/g] (B)

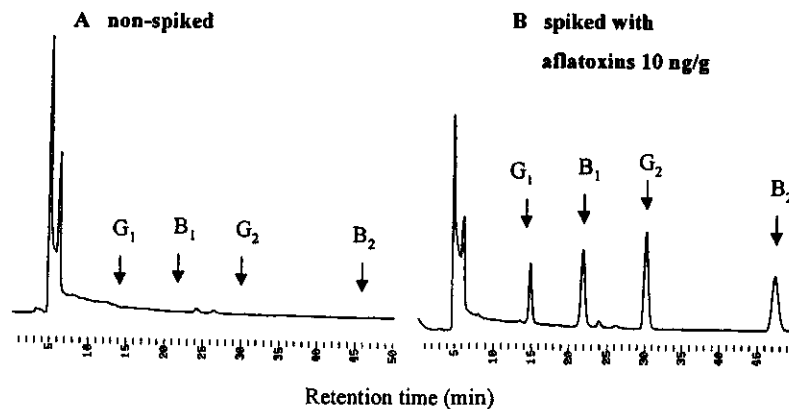


Fig.6 Typical chromatograms of sample solutions from non-spiked tear grass (A) and tear grass spiked with aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ [10 ng/g] (B)