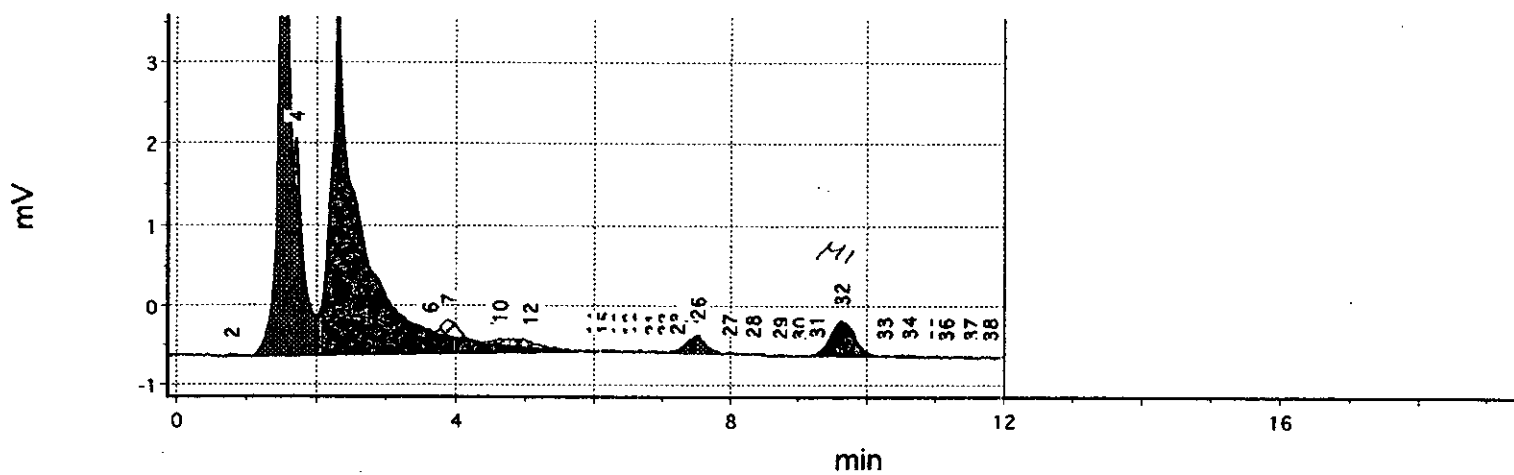
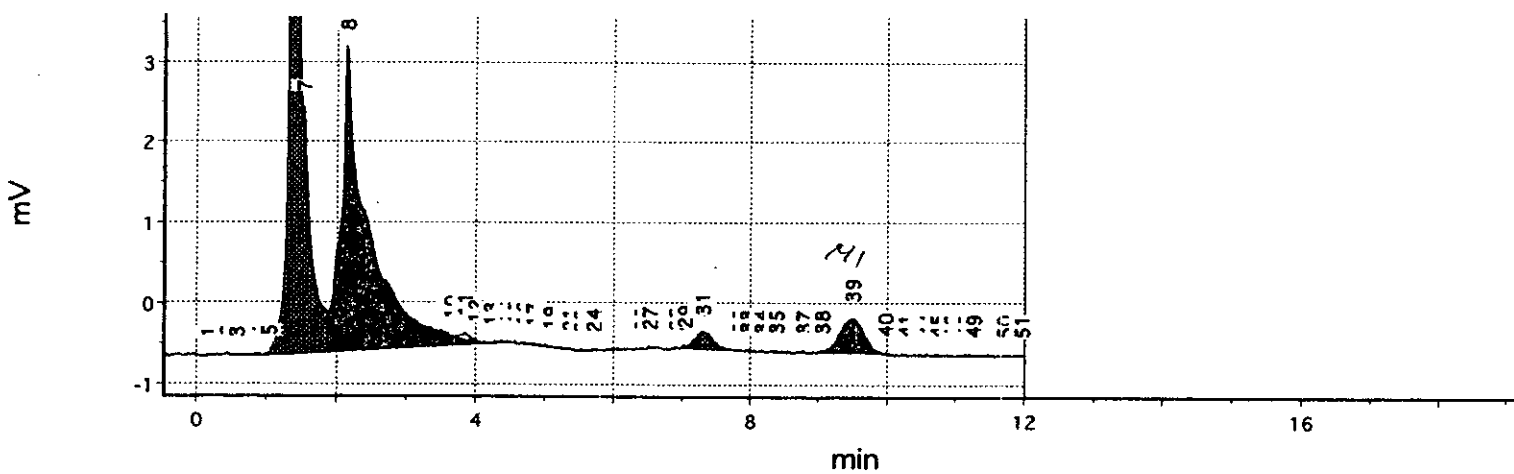


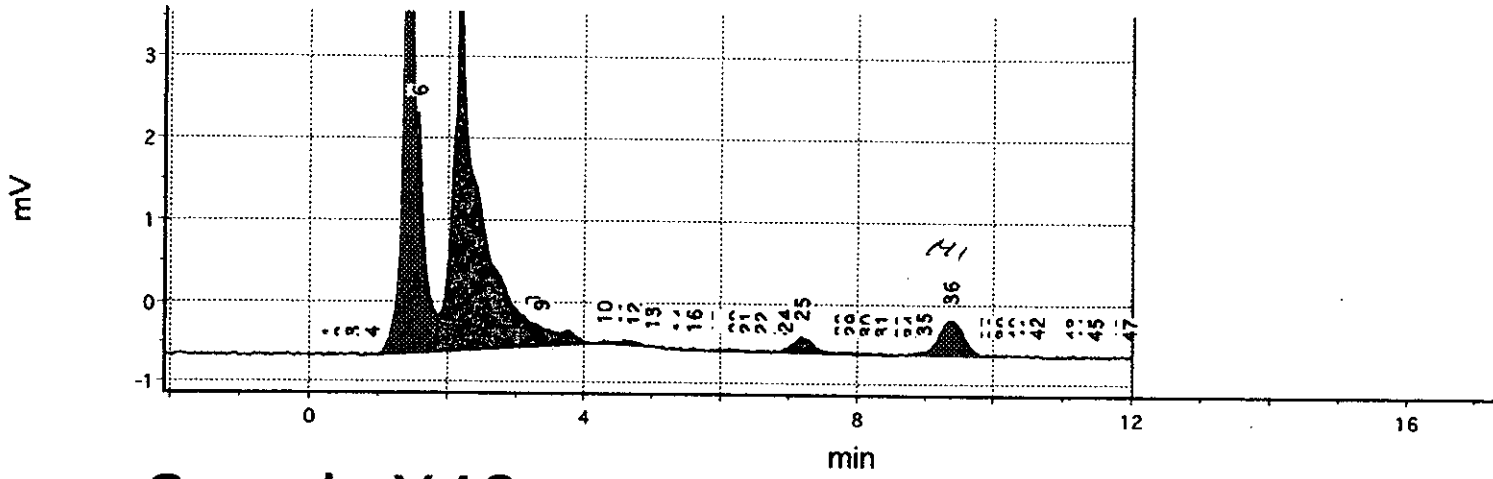
Sample Y45



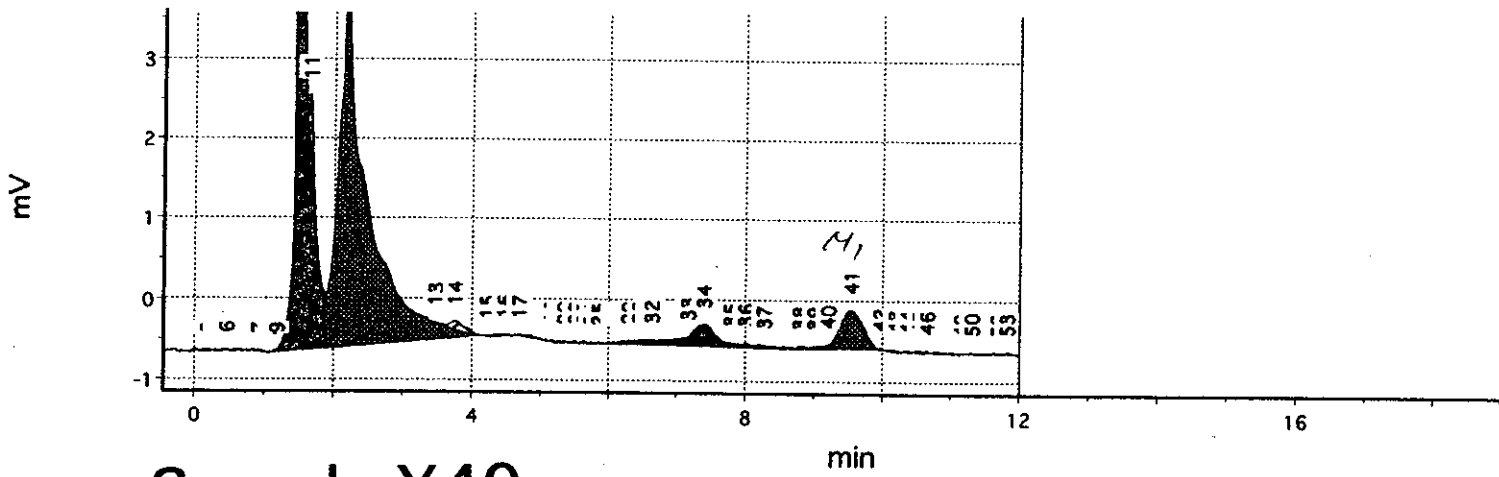
Sample Y46



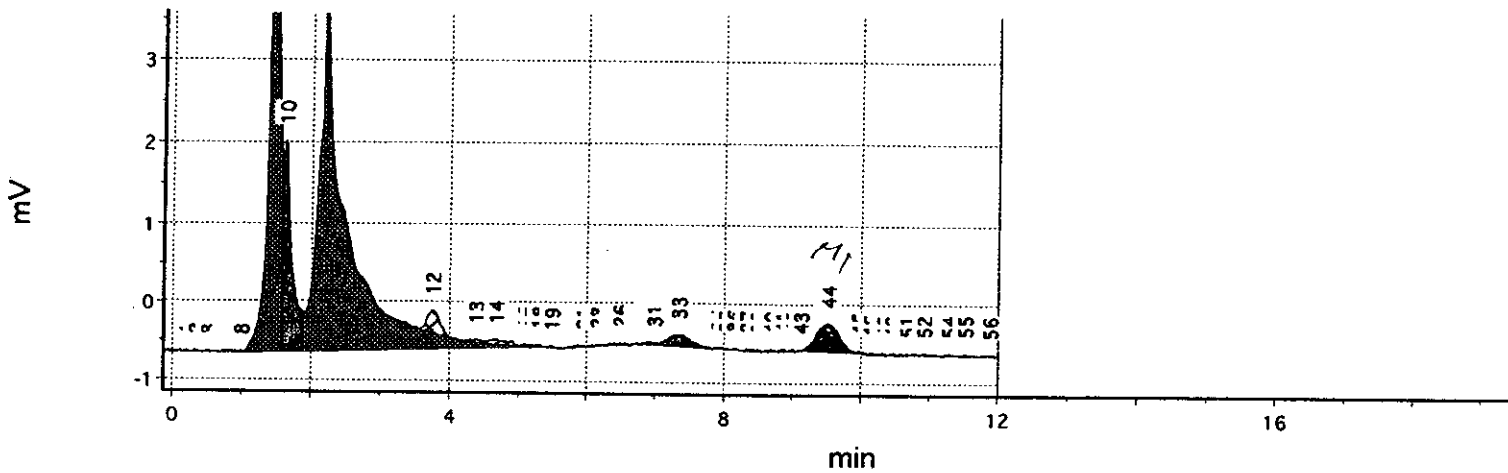
Sample Y47



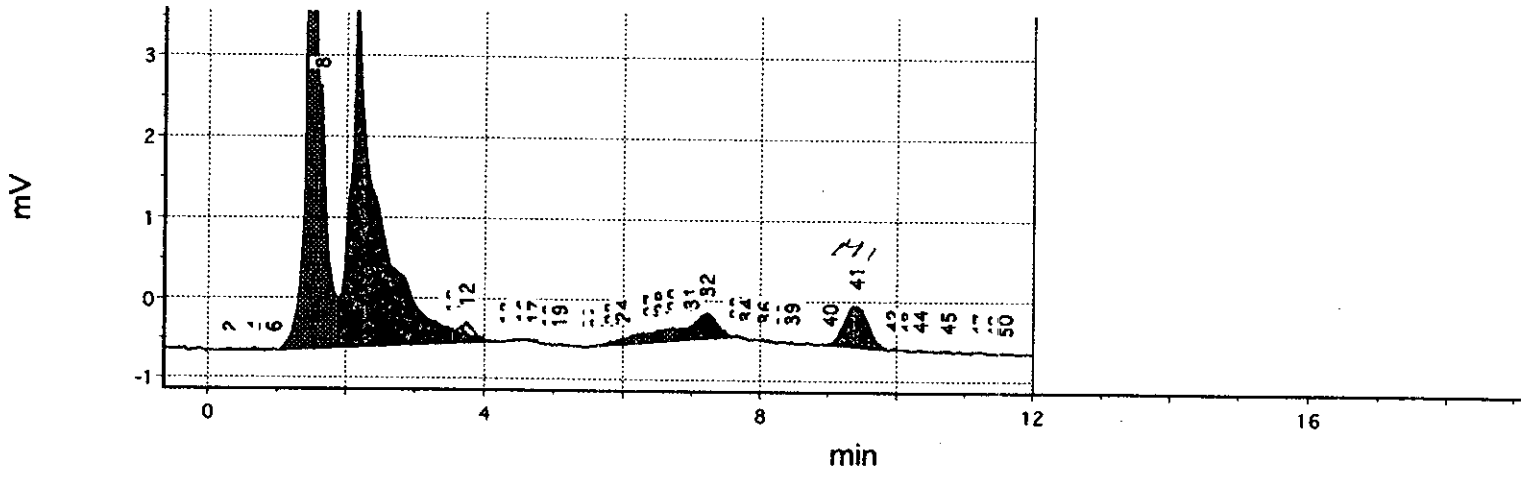
Sample Y48



Sample Y49

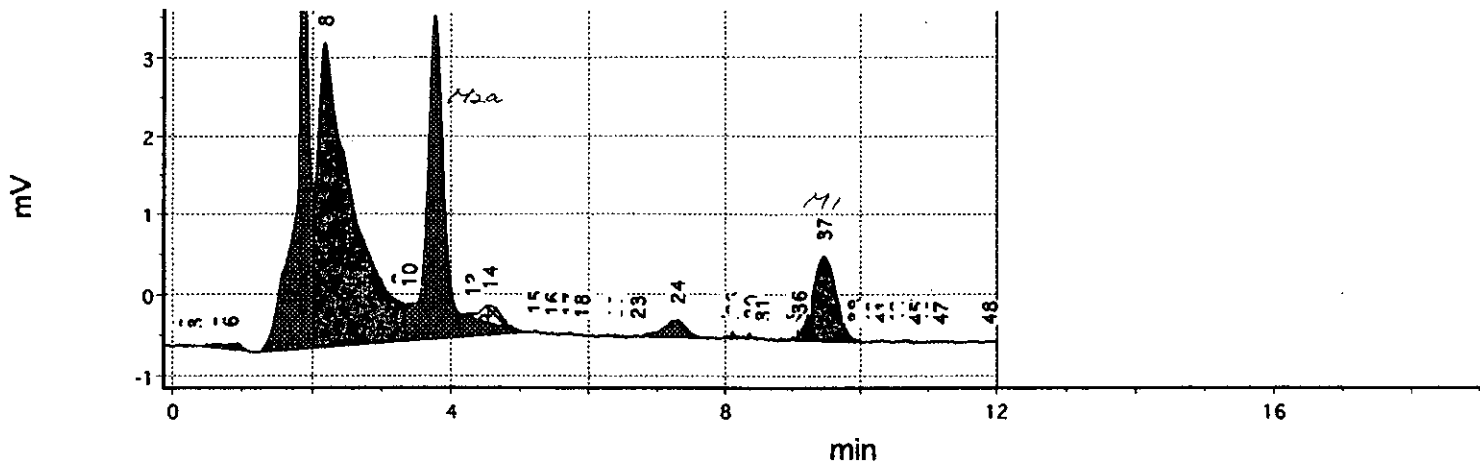


Sample Y50

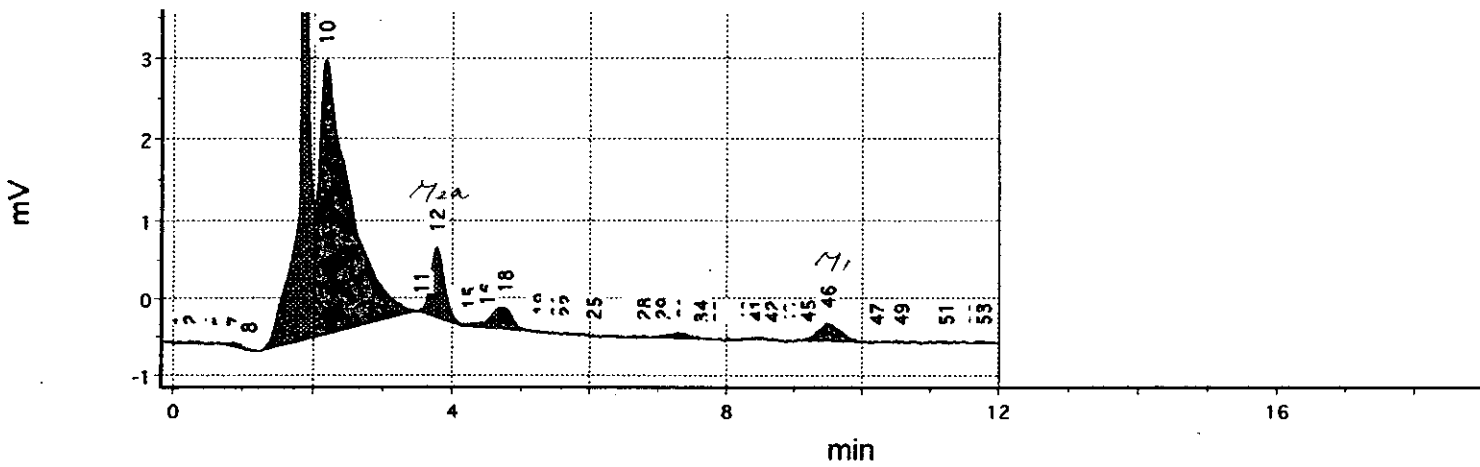


03/05/2002 data

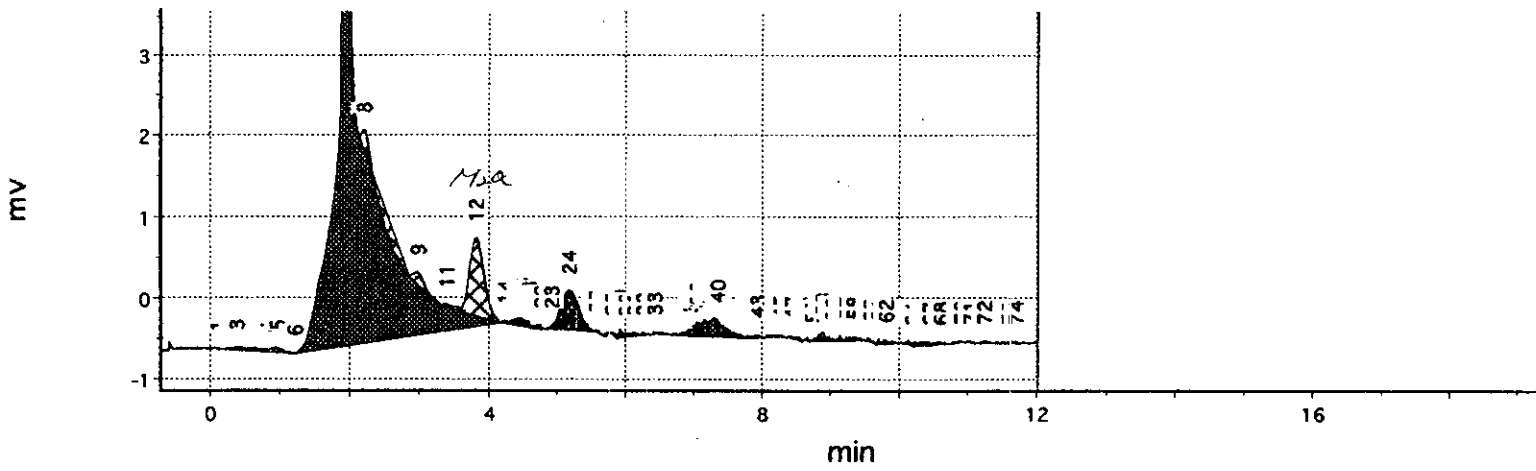
St. Af M1 0.07 ng + TFA / injection



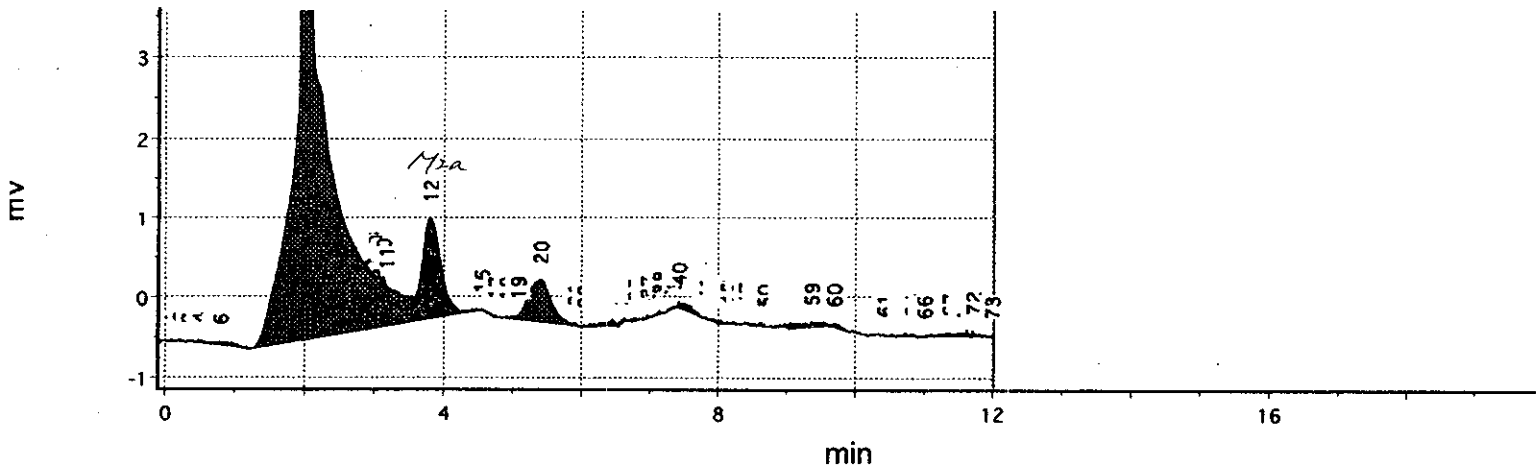
St. Af M1 0.014 ng + TFA / injection



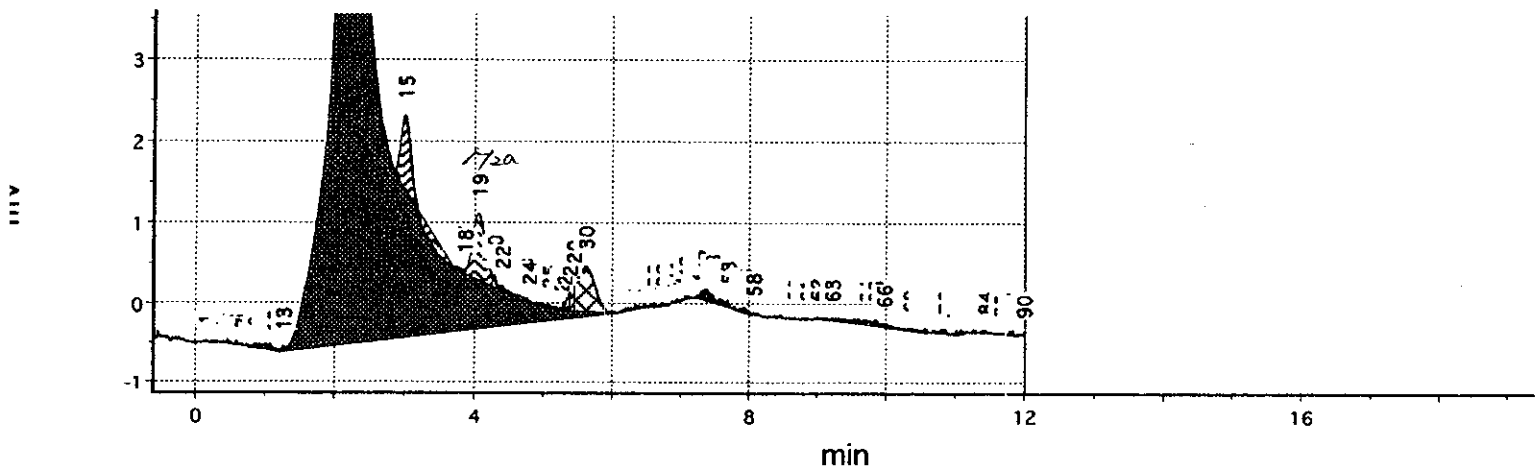
Sample 1 + TFA



Sample 3 + TFA



Sample 4 + TFA



食品中のかび毒のリスクアセスメントに関する調査研究

分担研究者 中島 正博（名古屋市衛生研究所 研究員）

研究要旨

乳・乳製品中のアフラトキシンM₁(AFM₁)について、CODEX (FAO/WHO 合同食品規格計画)委員会において、近々基準値 (0.5 µg/kg) の採択が行われる見通しであり、日本における汚染実態調査を早急に行うことが必要となってきた。そこで日本全域を A から K 地域までの 11 地域に分け、その内 F、I、J 地域において市販されている牛乳 52 検体について AFM₁ 汚染調査を行った。分析法については、低レベルの AFM₁ を測定するためにイムノアフィニティカラムを用いた高速液体クロマトグラフ法を新たに開発し、検出限界は 0.001 µg/kg であった。F 地域においては、21 検体中 20 検体から AFM₁ が検出し、その濃度範囲は 0.001 ~ 0.008 µg/kg であり、平均濃度は 0.005 µg/kg であった。I 地域では 11 検体中 11 検体から検出し、その濃度範囲は 0.004 ~ 0.012 µg/kg であり、平均濃度は 0.008 µg/kg であった。J 地域では 20 検体中 20 検体から検出し、その濃度範囲は 0.003 ~ 0.009 µg/kg であり、平均濃度は 0.005 µg/kg であった。第 56 回 JECFA(FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会)や第 32 回 CODEX 委員会において、世界各国における牛乳中の AFM₁ 濃度が報告されているが、日本における汚染濃度はヨーロッパ、ラテンアメリカ、極東地域よりも低く、中東地域、カナダのそれと同程度であった。

A. 研究目的

アフラトキシンはこうじかびの一種である *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* 等が産生する肝毒性および肝ガン性を持つか

び毒であり、主に図 1 に示したような種類がある。中でもアフラトキシン B₁(AFB₁)は天然物の中で最強の発ガン物質と言われている。AFB₁に汚染された飼料を動物が摂取すると体内で代謝され AFB₁ の水酸化代謝物であるアフラトキシン M₁(AFM₁)となり乳中に排泄される¹⁾。AFM₁ の発ガン性は動物種によって異なるが、AFB₁ の約 1/10 と報告されている¹⁾。1960 年代の終わりより世界各国で牛乳中の AFM₁ 汚染調査が行われており^{2)~5)}、その汚染濃度は比較的 low 0.5 µg/kg 以下であったと報告されている。しかしながら、AFM₁ の発ガン性、検出頻度の高さ、乳・乳製品の消費量の多さ、乳児・児童が比較的多く消費する事等を考慮すると、乳・乳製品中の AFM₁ 汚染をコントロールする方法を確立することは大切であ

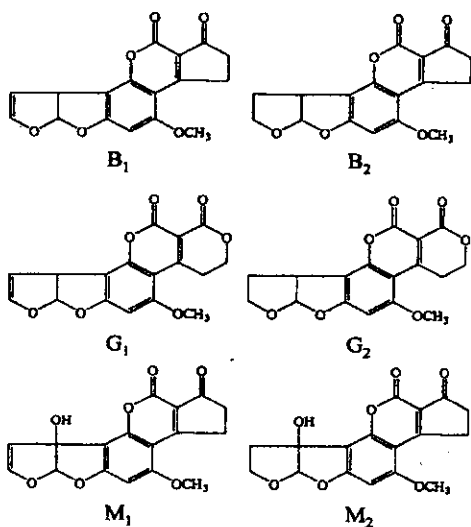


図 1. アフラトキシンの構造式

る。そのため世界各国では牛乳中 AFM₁ の規制値が決められており、その値はアメリカ、メルコスール(南米協同市場体)等では 0.5µg/kg、EC(欧州共同体)では 0.05µg/kg としている。また、近々Codex は AFM₁ の規制値 0.5µg/kg を採択する動きがある。我が国では、かび毒の規制値は AFB₁ だけで AFM₁ の規制値は無く、また、これまでに国内産の乳・乳製品における広範囲な AFM₁ 汚染調査はなされていない。こうしたことから、我が国における規制値設定を検討するため、早急に国内に流通している乳・乳製品の AFM₁ 汚染実態を明らかにすることが必要である。

本研究の目的は、我が国に流通している牛乳を広範囲かつランダムに収集し、AFM₁ の汚染実態を調査し、そのリスクを究明することにある。

B. 研究方法

a) 試料

日本を A 地域から K 地域までの 11 地域に分け、その内 F 地域、I 地域、J 地域で市販されている牛乳それぞれ 21, 11, 20 検体計 52 検体を購入し試料とした。

b) AFM₁ 試験法

① 機器・器具

アフィニティカラム－アフラテスト P (VICAM)

(ア) ガラス繊維ろ紙－Glass fiber filter 934 AH 15cm (Whatman)

(イ) リザーバー－セツバックリザーバー 30ml 容 (Waters) 又は注射器等

(ウ) バキュームマニホールド

(エ) アルミブロックヒーター

(オ) 可変式マイクロピペット－10ml, 1000µl, 200µl 容

(カ) マイクロシリンジ－10µl, 100µl(レオダイン用、オートインジェクターの

場合は不要)

(キ) HPLC (高速液体クロマトグラフィー)－カラム: Inertsil ODS-3, 5µm, 4.6×250mm (GLサイエンス)、ポンプ: Jasco 880-PU、流速 1.0ml/min (日本分光)、カラムオープン: Sugai U-620、温度 40°C (スガイケミー)、蛍光検出器: RF 10AXL、励起波長 365nm、蛍光波長 435nm (島津)、データ処理装置: CR4A (島津)

(ク) 試験管かくはん機－Vortex mixer

(ケ) バイアルビン－Silanized Amber Screw Top Vial, 15×45mm, 4ml (スベルコ)

② 試薬

(ア) アセトニトリル－HPLC grade

(イ) 移動相－アセトニトリル－水 (25+75) 又はアセトニトリル－0.2M K-PO₄ buf, pH5.0－水 (25+5+75)

(ウ) 注入液－アセトニトリル－水 (20+80)

(エ) 標準液－Stock solution: 1 µg/ml (ベンゼン－アセトニトリル=9+1 またはアセトニトリル)、HPLC 注入用標準液: 10ng/ml、stock solution 10µl をバイアルビンにとり窒素で蒸発乾固後、注入液 1ml を加え、Vortex mixer で 30 秒攪拌する

③ 試験溶液の調製

(ア) ミルクを約 37°C に加温し、ガラスフィルターでろ過する。

(イ) アフィニティカラムの上キャップにキリ等で小さな穴をあけ、カラムからはずす。カッター等で半分程切り落としコネクターを作成する。リザーバーをコネクターにしっかりとはめる。カラムをバキュームマニホールドにセツ

トする（ストップコック必要）。カラム内液を半分ほど捨て、コックを閉め、リザーバーをしっかりと固定する。

(ウ)ろ過したミルク 20ml をすぐリザーバーに移し、コックを開き自然落下させる

(エ)リザーバー内のミルクがほとんど無くなった後、カラム内のミルク全てが流出前に少量の蒸留水でリザーバーを洗浄し、自然落下させる。その後リザーバーをはずし、カラム内を蒸留水で満たし、洗浄する。これを8回繰り返す（トータル 10ml 程の洗浄）。洗浄後、注射器等でカラムをつなげ、強く押し、カラム内の水を取り除く。カラムをバキュームマニホールドからはずし、バイアル上または試験管にセットし、アセトニトリル 1ml をカラム内に入れ、注射器で軽く押し、カラム内の空気を取り除くと自然落下が始まる。溶出が終わったら、さらに 1ml のアセトニトリルを加える。これをあと2回繰り返す（トータル 4ml 溶出）。その後、注射器で空気を流し、カラム内の溶液をさらに出す。

(オ)バイアル又は試験管をアルミブロックヒーター（40℃）に移し、窒素気流下で蒸発乾固させる。注入溶液 1ml を入れ、Vortex mixer 等で激しく 30 秒攪拌し、試験溶液とする。

④ 定量

試験溶液及び HPLC 注入用標準液の 100 μ l をそれぞれ高速液体クロマトグラフィーに注入し、試験溶液から得られたクロマトグラム上のピークの保持時間及び高さを標準液のピークと比較して定性、定量を行う。

⑤ 添加回収実験

Stock solution 10 μ l を 500ml 三角フラス

コにとり、窒素で蒸発乾固させ、牛乳 200ml を加え、10 分間超音波処理後十分に攪拌し、ガラス繊維ろ紙にてろ過する（AFM₁ 濃度 0.05 μ g/kg）。直ちにアフィニティカラムにのせ試験溶液と同様の操作を行う。

⑥ 確認

試験溶液の高速液体クロマトグラム上に標準溶液のピークと同様なピークが検出された場合に以下の確認試験を行う。

試験溶液 500 μ l を他のバイアルビンにとり、窒素で蒸発乾固後 200 μ l のヘキサン及び 50 μ l のトリフルオロ酢酸(TFA)を加え密栓し、Vortex mixer で 30 秒攪拌する。その後アルミブロックヒーター（40℃）にバイアルをセットし、20 分間加温する。TFA の臭いが完全に消えるまで窒素で蒸発乾固し、0.5 μ l の注入液を加えよく攪拌する。また、標準液を用いて同様な操作を行う。試験品及び HPLC 注入用標準液の 100 μ l をそれぞれ高速液体クロマトグラフィーに注入し、試験品から得られたクロマトグラム上のピークの保持時間を標準液のピークと比較して定性を行う。

C. 研究結果

今回用いた AFM₁ の確認は、AFM₁ を TFA 処理し AFM₁ ヘミアセタール体(AF_{2a})を作成することにより、高速液体クロマトグラム上の AFM₁ のピークが消滅し、新たに AF_{2a} のピークが現れる方法を用いた。AFB₁ の場合も TFA 処理により AFB₁ ヘミアセタール体が形成されるが、この反応は瞬時に行われる。しかし AFM₁ の場合は図 2、3 に示されるように、AF_{2a} への変換に時間がかかり、全ての AFM₁ が AF_{2a} に変換されるのに 40℃で 20 分間かかることが判明した。従って、確認時の TFA 処理時間を 20 分間とした。

図2, 図3

AFM₁ 分析法のフローチャートを図4に示した。牛乳中 AFM₁ の精製、濃縮に市販のイムノアフィニティカラムを用いた。イムノアフィニティカラムはアフラトキシンに特異的な抗体を担体に結合させており、今回用いたアフラテスト P は AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁、AFM₂ を特異的に結合できる。このイムノアフィニティカラム法は、従来用いられてきた化学分析法と比べ、発ガン性を持つ塩素系有機溶媒を使用せず比較的安全な有機溶媒を使用する、操作方法が簡単で短時間に目的物質を濃縮精製ができ、また、その特異性のため分析時に測定を妨害する不純物をほとんど取り除く事が可能なため、低レベルの目的物質を測定することができる等の利点を持つため⁶⁾、近年世界各国においてかび毒分析の公定法として用いられるようになっている。

図4

今回4ヶ所の機関において調査を行ったが、今回用いた分析法のバリデーションを行うためそれぞれの機関において、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度における添加回収実験を行い、室内相対標準偏差(RSD_r)及び室間相対標準偏差(RSD_R)を求めた。RSD_rは4.6%であり、RSD_Rは8.0%であった。ここで0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度における予想されるRSD_R (RSD_R predicted)は71%であり、HORRAT値(RSD_R/RSD_R predicted)は0.1となり精度の良い分析法であった。また筆者が行った添加回収実験結果を表1に示した。AFM₁を0.005 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度で添加したとき、回収率は91.4%、相対標準偏差(RSD)は17%であり、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のとき、回収率は96.0%、RSDは5.5%であった。以上の結果より、この分析法によって出された結果は信頼性がある

ことが判明した。

表1

図5にAFM₁、AFM₂及びAFM_{2a}標準液の代表的な高速液体クロマトグラムを示した。それぞれの保持時間は13.5分、10.2分及び5.1分であり、それぞれのピークはよく分離していた。またそれぞれの検出限界は0.001、0.0003、及び0.0002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

図5

図6に牛乳より検出されたAFM₁及びAFM₂の典型的な高速液体クロマトグラムを示した。今回の調査ではここに示したように、AFM₁だけでなく、AFB₂の代謝物であるAFM₂もたびたび検出された。このことは飼料がAFB₁だけでなくAFB₂にも汚染されていたことを示している。

図6

図7にAFM₁確認の高速液体クロマトグラムを示した。(1)に示されるように、AFM₁が牛乳試料から検出された場合には、TFA処理することにより、(2)のようにAFM₁のピークが消失し、新たにAFM_{2a}のピークが現れた。AFM₂の場合その構造に二重結合を持っていないため、ヘミアセタール体が形成されないため、変化は無い。なお、今回の調査においてAFM₁が検出された試料については全てこの確認を行って陽性であったことが判明している。

図7

表2にJ地域における牛乳中のAFM₁調査

結果を示した。試料20検体中20検体からAFM₁が検出され、その濃度範囲は0.003~0.009 µg/kgで、平均濃度は0.005 µg/kgであった。また、AFM₂は試料20検体中9検体から検出され、その濃度範囲は0.0008~0.0020 µg/kgであった。

表3にI地域における牛乳中のAFM₁調査結果を示した。試料11検体中11検体からAFM₁が検出され、その濃度範囲は0.004~0.012 µg/kgで、平均濃度は0.008 µg/kgであった。また、AFM₂は試料11検体中7検体から検出され、その濃度範囲は0.0016~0.0034 µg/kgであった。

表4にF地域における牛乳中のAFM₁調査結果を示した。試料21検体中20検体からAFM₁が検出され、その濃度範囲は0.001~0.008 µg/kgで、平均濃度は0.005 µg/kgであった。また、AFM₂は試料21検体中9検体から検出され、その濃度範囲は0.0003~0.0021 µg/kgであった。

表2, 3, 4

D. 考察

今回調査したF、I、J地域の牛乳試料では低濃度(平均0.006 µg/kg)ではあるが高頻度(52検体中51検体、98.1%)でAFM₁が検出された。また、AFM₂もしばしば検出された。このことは各地域で用いられている乳牛用の飼料がAFB₁またはAFB₁およびAFB₂に汚染されていることを示している。一般に動物飼料中のAFB₁の約0.3~6.2%が乳中のAFM₁に変換されることが報告されている⁶⁾。また、5~40 µg/kgのAFB₁で汚染された飼料摂取と乳中のAFM₁濃度には直線関係があり、次式で示される。

$$\text{AFM}_1 (\text{ng/kg milk}) = [1.19 \times \text{AFB}_1 \text{ intake} (\mu\text{g/cow/day})] + 1.9$$

今回の汚染濃度から上式を用いて飼料のAFB₁濃度を計算してみると0.3 µg/kgとなった。上式は5~40 µg/kgのAFB₁で汚染されていた場合のものであるから、この低い汚染濃度場合必ずしも正しくはないが、現在、我が国における乳牛用飼料のAFB₁規制値10 µg/kgの1/30程度の低い汚染濃度であることが分かった。

世界各国の乳中のAFM₁汚染濃度はヨーロッパで0.023 µg/kg(10,778試料)、ラテンアメリカで0.022 µg/kg(893試料)、極東で0.36 µg/kg(1,191試料)、中東で0.005 µg/kg(231試料)、アフリカで0.002 µg/kg(15試料)、カナダで0.015 µg/kg未満(81試料)であったと報告されている⁶⁾。今回の調査の結果、我が国における乳中の平均汚染濃度が0.006 µg/kgであったことを考慮すると、比較的低い汚染濃度であることが分かった。

第56回のJECFAの会議においてAFM₁のリスクアセスメントが行われた⁷⁾。そこでは現在、AFM₁の摂取量、BおよびC型肝炎ウイルスの感染および肝ガンとの容量作用関係についての十分な疫学調査は無いため、AFB₁のそれを利用し評価を行っている。そこではAFM₁の発ガン効力はB型肝炎ウイルス非保有者においては0.001 cancers/100,000 persons/year/ng/kg of body weight/dayであり、B型肝炎ウイルス保有者においては0.03 cancers/100,000 persons/year/ng/kg of body weight/dayであったと報告されている。平成10年度総務庁の「家計調査年報」によれば、一世帯(3.31人)当たりの年間牛乳の消費量は111.7リットルであり、これから一日当たりの消費量を計算すると、約92.5mlとなる。これと牛乳試料中のAFM₁平均汚染濃度0.006 µg/kgを用いてAFM₁の一日摂取量を計算すると(牛乳20mlは約20.5gに相当)、約0.57 ngとなる。ヒトの平均体重を60kgとす

ると、体重 1kg 当たりの摂取量は約 0.01ng となる。上記の JECFA の報告では、B 型肝炎ウイルス非保有者において体重 1kg 当たり 1ng の AFM₁ を一日当たり摂取した場合、年間 1 億人当たりで 1 人がガンに罹ると計算されるから、今回の調査結果からはさらに 1/100 の割合であることが分かる。つまり日本で AFM₁ に汚染された牛乳を毎日摂取したとしても年間 100 億人のうち 1 人のガン患者が増える割合であると考えられ、AFM₁ 摂取によるリスクは問題ないと考えられる。

E. 結論

今回の調査により日本における牛乳は AFM₁ により低濃度であるが、高頻度に汚染されていることが判明した。しかし、この汚染濃度は世界各国と比較しても低いレベルであり、現在、EU が提唱している AFM₁ の基準値 0.05 µg/kg、また、Codex が採択しようとしている基準値 0.5 µg/kg のどちらでも日本においては問題ないことが判明した。また、牛乳からの AFM₁ 摂取によるヒトの健康に対するリスクもほとんど問題ないと考えられた。しかし、乳牛飼料は間違いなく AFB₁ に汚染されており、今後もこの汚染レベルが上がらないよう注意、監視をすることが必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 参考資料

1) Wood, G. A., Aflatoxin M₁, in *Mycotoxins and Phycotoxins* (R. P. Sharma and D. K. Salunkhe eds.) CRC

Press, Boca Ration, Florida, pp. 145-164, 1991

2) Van Egmond, H. P. Aflatoxin M₁: Occurrence, toxicity, regulation, in *Mycotoxins in Dairy Products* (Van Egmond, H. P., ed.), Elsevier Applied Science, London, pp. 11-55, 1989

3) Brown, C. A., Aflatoxin M in milk. *Food Technol. Austral.* 34, 228-231, 1982

4) Jonker, M. A., Van Egmond, H. P., and Stephany, R. W., Mycotoxins in food of animal origin. Report EU Community Reference Laboratory on Residues, CRL document 389002 095, RIVM-National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, the Netherlands (1999)

5) Van Egmond, H. P., Svensson, U. K., and Frémy, J. M., Mycotoxins, in *Monograph on residues and Contaminants in Milk and Milk Products*, International Dairy federation, Special Issue 9701 Brussels, pp. 79-88 (1997)

6) Nakajima, M., Mycotoxin Analysis Using Immunoaffinity Columns. "Proceeding of International Symposium of Mycotoxicology '99, Mycotoxin Contamination: Health Risk and Prevention Project" *Mycotoxins supplement '99*, 172-179 (1999)

7) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 56th meeting, Geneva, 6-15 February 2001

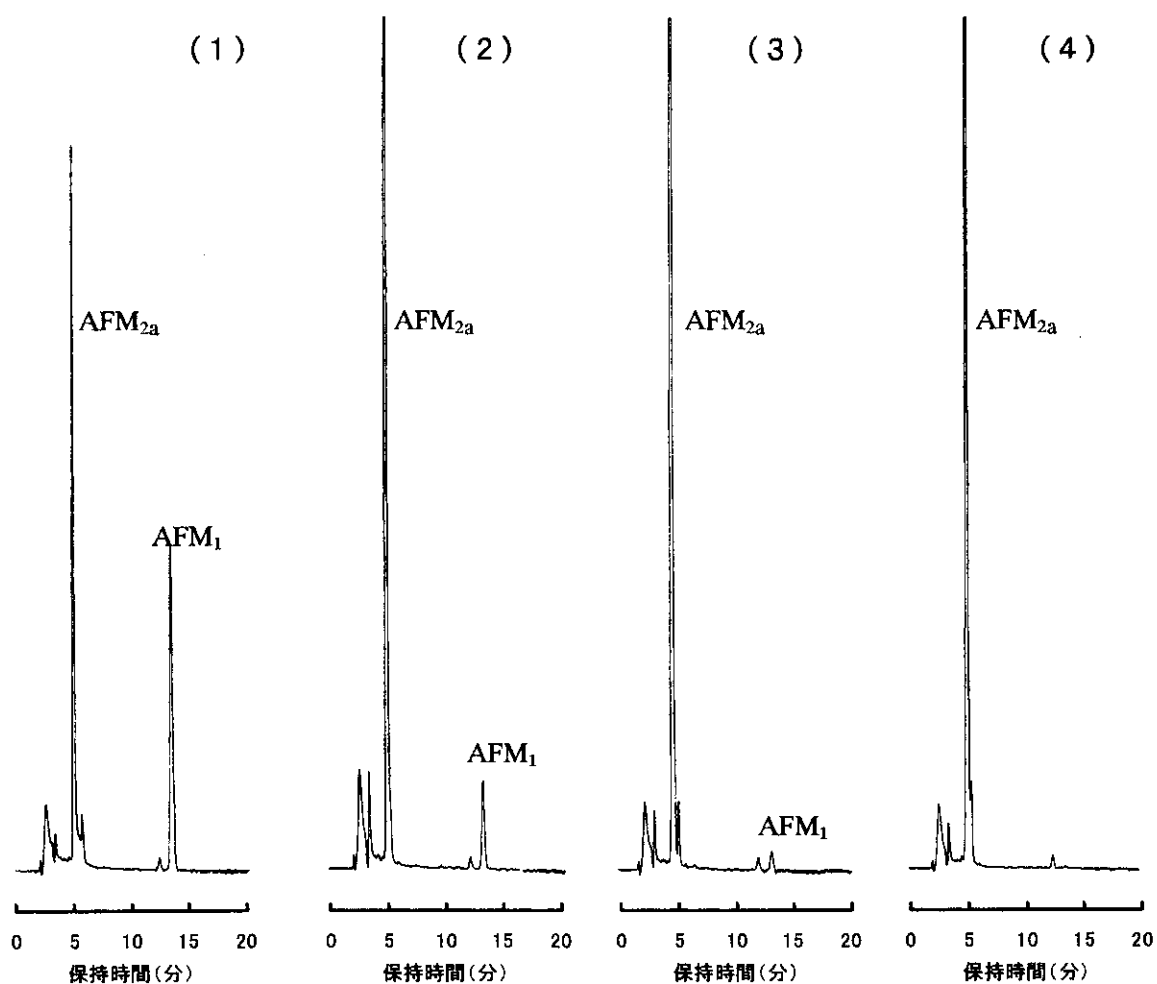


図2. トリフルオロ酢酸 (TFA) 処理による AFM₁ から AFM₁ヘミアセタール体 (AFM_{2a}) 形成時の高速液体クロマトグラム
 (1); 30秒処理、(2); 5分処理、(3); 10分処理、(4); 20分処理

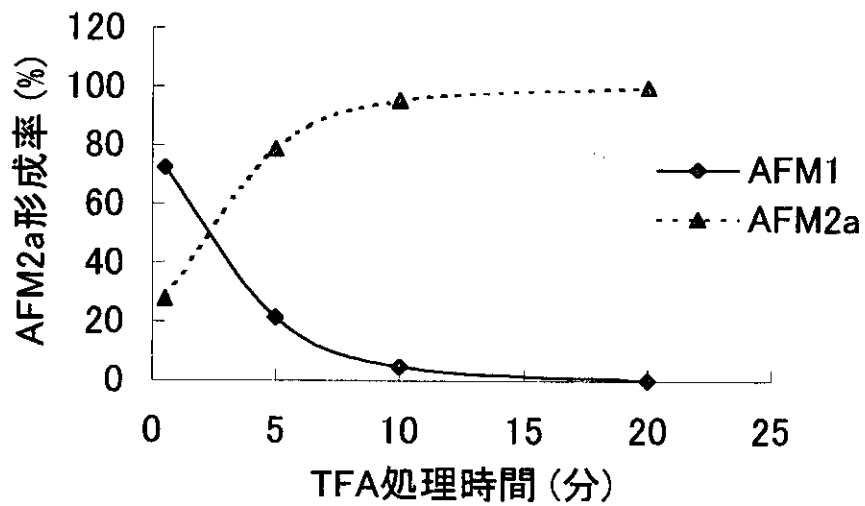


図3. アフラトキシン M₁ ヘミアセタール体 (AFM_{2a}) 形成におけるトリフルオロ酢酸(TFA) 処理時間の影響

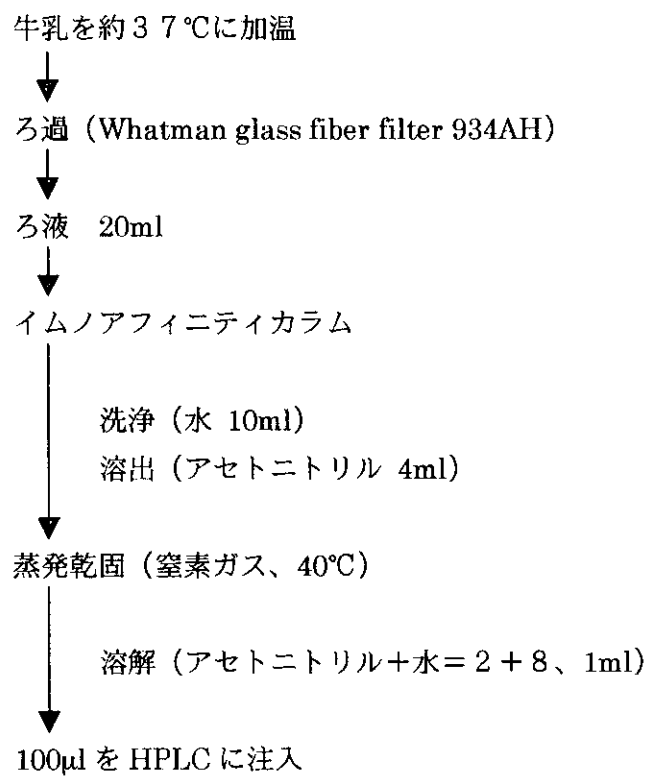


図4. 牛乳中 AFM₁ 分析法

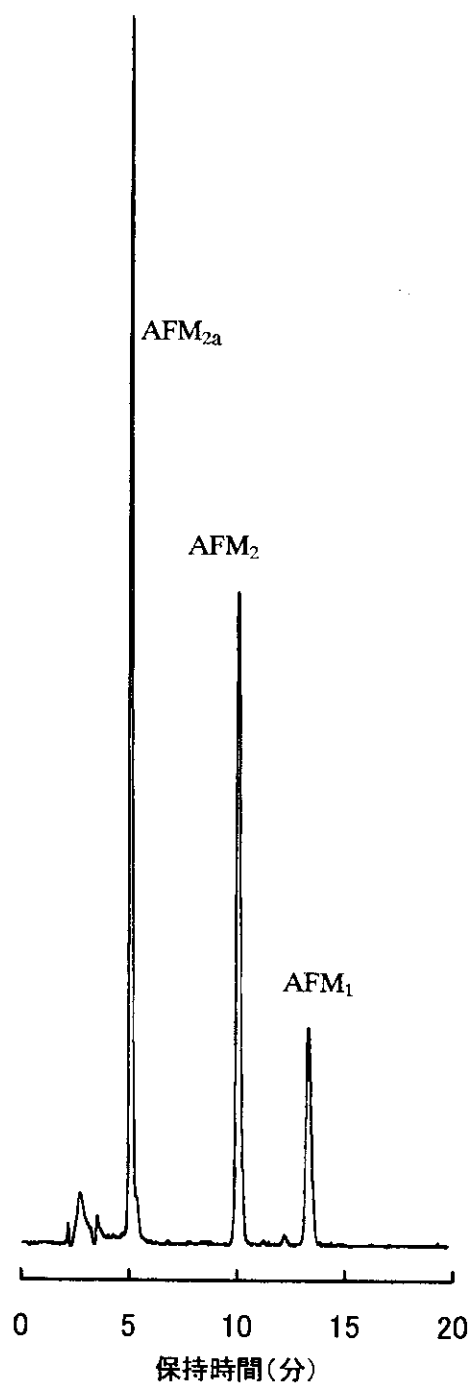


図5. AFM₁、AFM₂及びAFM_{2a}標準液の高速液体クロマトグラム
各標準液の濃度；0.5 ng/ml
保持時間：AFM_{2a}；5.1分、AFM₂；10.2分、AFM₁；13.5分

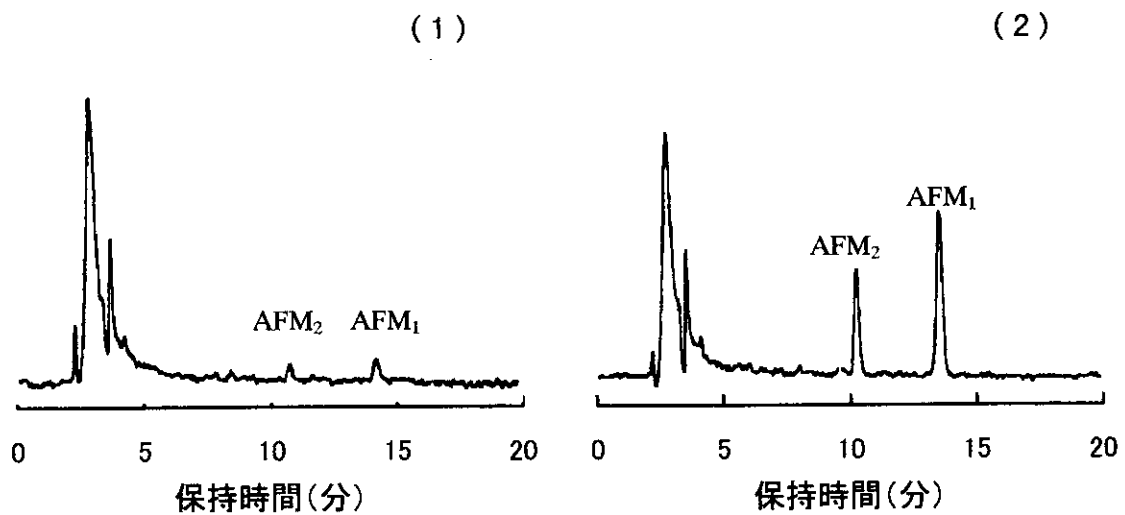


図6. 市販牛乳中 AFM₁ 及び AFM₂ の高速液体クロマトグラム

(1) 試料 F-21 ; AFM₁ 0.001 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 AFM₂ 0.0003 $\mu\text{g}/\text{kg}$

(2) 試料 F-20 ; AFM₁ 0.008 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 AFM₂ 0.0017 $\mu\text{g}/\text{kg}$

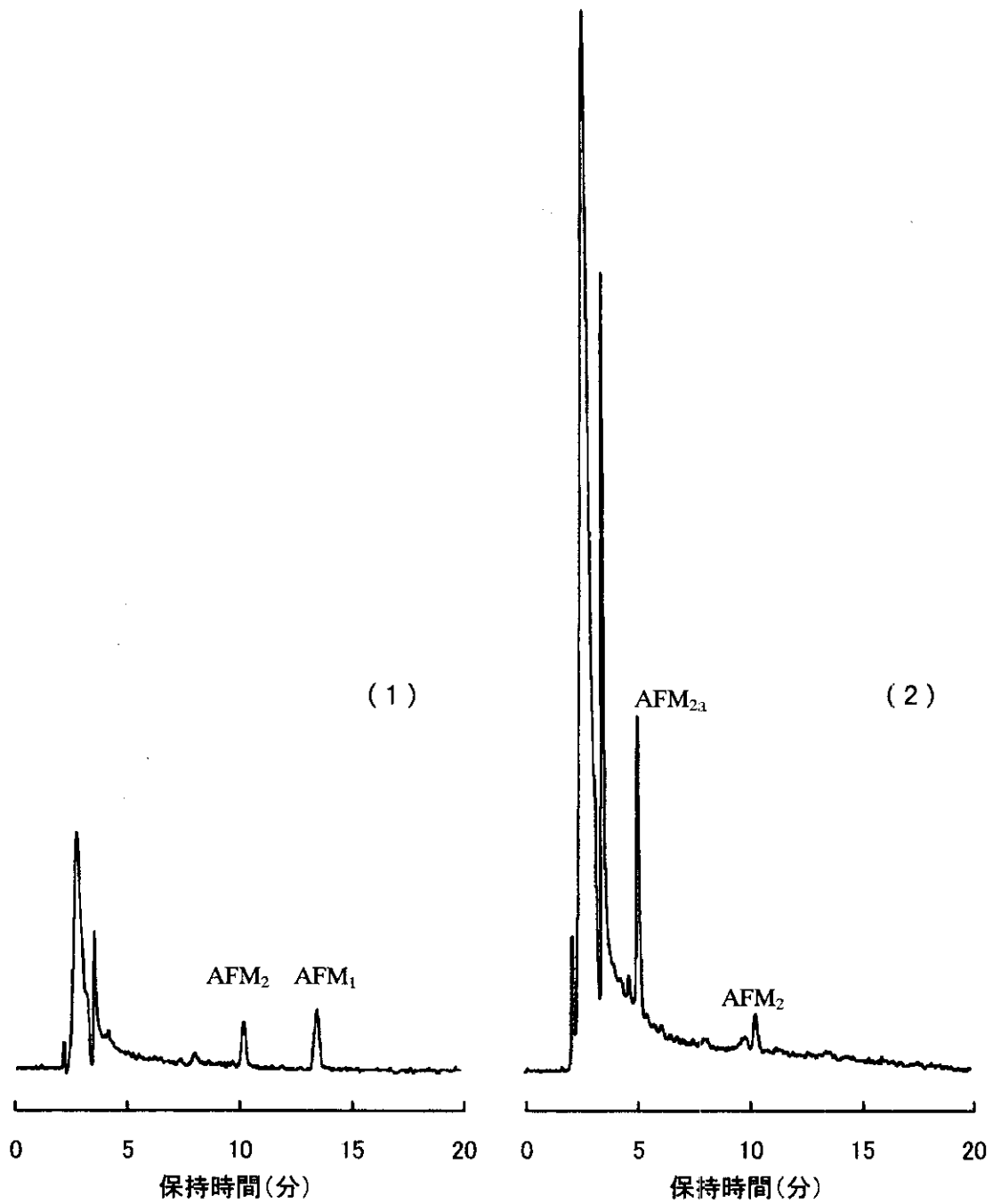


図7. 市販牛乳中 AFM₁ および AFM₂ と AFM₁ 確認の高速液体クロマトグラム

(1) 試料 J-18 : AFM₁ 0.003 μg/kg, AFM₂ 0.0028 μg/kg

(2) 試料 J-18 中 AFM₁ の確認 : AFM_{2a} 0.003 μg/kg

表1. AFM1の牛乳からの添加回収結果

添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰り返し回数	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
0.005	5	91.4	17.0
0.05	5	96.0	5.5

表2. J 地域における市販牛乳中のAFM₁及びAFM₂濃度

検体No.	AFM ₁ 濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AFM ₂ 濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	0.006	0
2	0.005	0
3	0.004	0
4	0.005	0
5	0.003	0
6	0.006	0
7	0.007	0.0016
8	0.005	0
9	0.009	0.0016
10	0.005	0
11	0.007	0
12	0.007	0.0020
13	0.004	0.0017
14	0.006	0
15	0.004	0
16	0.008	0.0020
17	0.006	0.0016
18	0.003	0.0008
19	0.006	0.0011
20	0.003	0.0009
平均	0.005	0.0007

表3. I地域における市販牛乳中のAFM₁及びAFM₂濃度

検体No.	AFM ₁ 濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AFM ₂ 濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	0.005	0
2	0.012	0.0034
3	0.005	0
4	0.010	0.0019
5	0.007	0.0018
6	0.010	0.0016
7	0.010	0.0022
8	0.011	0.0029
9	0.004	0
10	0.009	0.0019
11	0.006	0
平均	0.008	0.0014