

A. 研究目的

(1)あずき含有食品によるフザリウムカビ毒の暴露評価

今回、3 ヶ年にわたって汚染量の調査をしているいくつかの食品のうちで、もっとも摂取者の割合が高かったのが「あずき含有食品」であった（12%以上の人がか摂取していた）。

（そのほかに検討したものとして、雑穀米、はと麦、コーングリッツ）そこで、このあずき含有食品を主とした場合に、その他の摂取者割合の低い食品が、どのように暴露量に影響を与えるのかを評価するために、まずはあずき含有食品によるフザリウムカビ毒の暴露量をシミュレーションで求めた。

なお、暴露量評価の最後で、平成 23 年度の研究にもとづき、上下 30%の誤差を読み込んで、PMTDI との比較を行った。

(2)はと麦によるフザリウムカビ毒とあずき含有食品の暴露量の合算の暴露評価

はと麦は摂取者割合のもっとも多い年齢層でも、全体の約 0.4%しか摂取をしていない。そこで、このはと麦の暴露量とさきほど求めたあずき含有食品摂取による暴露量との合算を求めることにより、あずき単独の暴露量だけ計算した場合との差を求めることとした。

なお、暴露量評価の最後で、平成 23 年度の研究にもとづき、上下 30%の誤差を読み込んで、PMTDI との比較を行った。

B. 研究方法

1) 食品中のカビ毒含有量のサンプルデータの作成

(1)あずき含有食品におけるカビ毒含有量

3 ヶ年にわたって集められたあずきの 40 サンプルを使って 3 つのフザリウムカビ毒（ゼアラレノン、T-2 トキシン、HT-2 トキシン）の含有量（汚染量）について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。

今回は特別な規制値は存在しないので、規制値によるシナリオは用意しなかった。

LOQ 未満の処理として、WHO GEMS FOOD の規定に従って upper bound (LOQ 未満については、LOQ の半分の汚染があるものとする) と lower bound (LOQ 未満については、汚染を無しとする) の二つのシナリオを用意し、それぞれ 10,000,000 件のシミュレーション・データセットを作成した。

(2)はと麦におけるカビ毒含有量

3 ヶ年にわたって集められたはと麦の 60 サンプルを使って 3 つのフザリウムカビ毒（ゼアラレノン、T-2 トキシン、HT-2 トキシン）の含有量（汚染量）について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。

今回は特別な規制値は存在しないので、規制値によるシナリオは容易しなかった。

LOQ 未満の処理として、WHO GEMS FOOD の規定に従って upper bound と lower bound の二種類のシナリオを用意した。

2) 食品摂取量のサンプルデータ作成

(1) あずき含有食品におけるカビ毒暴露評価

「平成 17 年度~19 年度食品摂取頻度・摂取量調査」より、あずきを含んだ食品の摂取量データを元にして、年齢階層別に摂取量データを作成した。

年齢階層は「1 歳から 6 歳」「7 歳から 14 歳」

「15 歳から 19 歳」「20 歳以上」の 4 つの階層に分けた。摂取量は以下の食品群ごとに計算した。

1 : 食品群「赤飯」(あずき含有割合は 10%と想定)

1118 : 赤飯

2 : 食品群「あんこ」(あずき含有割合は 100%と想定)

4002 : ゆであずき (砂糖なし)

4003 : ゆであずき缶

4004 : こしあん (生)

4005 : さらしあん (乾燥あん)

4006 : つぶしあん (砂糖含む)

3 : 食品群「まんじゅう」(あずき含有割合は 50%と想定)

15001 : 甘納豆 (あずき)

15004 : あん入り生八つ端

15005 : 今川焼き

15007 : うぐいすもち

15008 : かしわもち

15016 : きんつば

15017 : 草もち

15018 : くし団子 (あん)

15020 : げっぺい

15021 : 桜もち (関東風)

15022 : 桜もち (関西風)

15023 : 大福もち

15026 : ちゃつう

15027 : どら焼

15029 : カステラ饅頭

15030 : くずまんじゅう

15031 : くりまんじゅう

15032 : とうまんじゅう

15033 : 蒸しまんじゅう

15034 : あんまん

15036 : もなか

15037 : ゆべし

15069 : あんぱん

4 : 食品群「ようかん」(あずき含有割合は 80%と想定)

15038 : 練りようかん

15039 : 水ようかん

15040 : 蒸しようかん

(2) はと麦摂取による暴露量との合算暴露評価

「平成 17 年度~19 年度食品摂取頻度・摂取量調査」よりはと麦の摂取量データを元にして、年齢階層別に摂取量データを作成した。

C. 研究結果

(1) あずき含有食品におけるカビ毒暴露量

・ゼアラレノン

95%タイルでの暴露量は多くとも3ng/体重 Kg/day 未満。99%タイルでの暴露量は多くとも20ng/体重 Kg/day 未満。

・T2-トキシン

95%タイルでの暴露量は多くとも3ng/体重 Kg/day 未満。99%タイルでの暴露量は多くとも25ng/体重 Kg/day 未満。

・HT-2 トキシン

95%タイルでの暴露量は多くとも3ng/体重 Kg/day 未満。99%タイルでの暴露量は多くとも20ng/体重 Kg/day 未満。

(2) はと麦摂取による暴露量との合計暴露量

そもそも摂取者割合が少ないため、合計しても、あずき単独の暴露量と比べてほとんど暴露量は増えない。増えた場合でも小数点以下第二位の変化にすぎない。

D. 考察

(1) あずき類によるカビ毒の健康被害リスク

・ゼアラレノン

PMTDI は500ng/体重 Kg/day であるが、99%タイルで一番多い暴露量の年齢層・シナリオでも20ng/体重 Kg/day 余りであるので、上下誤差を30%としても、PMTDI よりもはるかに低い。

・T-2 トキシンおよびHT-2 トキシン

PMTDI はT-2 トキシンとHT-2 トキシンの

合計で60ng/体重 Kg/day であるが、99%タイルの一番多い年齢層・シナリオでも45ng/体重 Kg/day であり、上下誤差を30%としてもPMTDI よりも低い。

(2) はと麦摂取による暴露量を加えた合計暴露量による健康被害リスク

ゼアラレノン、T-2 トキシン、HT-2 トキシンのいずれにおいても、あずき単独での暴露量に比べて、はと麦の分を合算しても、暴露量はほとんど増えない。(増えた場合でも小数点以下第二位の水準で増えるに過ぎない。)

それゆえ、日本人のほとんどがこれら食品の摂取によって健康被害を受けることはないと考えられる。

(3) モンテカルロ・シミュレーションについて

最後に、コンピュータシミュレーションであるモンテカルロ法では、得られたサンプルから対数正規分布を仮定することにより母集団のデータを作り出すことから作成したサンプルデータの一部には通常では存在しえない高値のデータが存在していたことは否定できない。それゆえ、シミュレーション結果の解釈には慎重であるべきだが、こうした値は暴露量を過大に評価することはあっても、過小評価するわけではないこと。また、こうした値は分布のかなり右側に存在するので、健康被害リスクの評価基準となる95%タイル付近には影響はない。以上のことから

して、(1)および(2)における日本人の健康被害リスクについての考察は妥当なものだと思われる。

E. 結論

摂取量のより多いあずき類においても日本人の健康に対する悪影響はないものと考え

えられる。また、はと麦のような摂取量の少ない食品は暴露量について寄与する割合が少ない。小麦類などの主食による暴露量評価が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表：特になし
2. 学会発表：特になし。

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

カビ毒を含む食品の安全性に関する調査研究
試験法のバリデーション等に関する研究

研究分担者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者 田中 敏嗣 神戸市環境保健研究所

研究要旨

カビ毒は自然界に生息するカビによって産生され、しばしば農産物や食品を汚染し、ヒトおよび家畜等に健康被害を引き起こす。今後健康被害が予測されるカビ毒に対して基準値設定をして、カビ毒摂取を最小限に抑えることが重要となる。基準値には、その分析値を担保するため試験法の妥当性を評価することが必要になる。試験法の妥当性評価に関しては、国際的なハーモナイゼーションのためにも分析学の専門家や統計的専門家などで組織された評価委員会を設けることが求められている。そのため、本研究において今後我が国で策定されるカビ毒試験法が、国際的に充分通用する試験法であるかを評価するための「カビ毒試験法評価委員会」を設立し、コラボラティブスタディを実施し、その結果を基に試験法の妥当性を評価した。

本研究で評価したカビ毒試験法は、デオキシニバレノールおよびニバレノール同時試験法、アセチル化デオキシニバレノール、総アフラトキシン試験法、総アフラトキシン等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの作成、アフラトキシン M₁ 試験法、フモニシン試験法、フザリウムマイコトキシン：デオキシニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノン同時試験法であった。各試験法のコラボラティブスタディの結果を国際的な機関が示しているクライテリアに基づいて評価し、その妥当性を確認した。また、各試験機関が通知法以外の方法によって試験する場合、その試験法の妥当性を評価するためのガイドラインを策定した。

「カビ毒試験法評価委員会」において検証評価された試験法および検討策定されたガイドラインは基準値策定や汚染実態調査等厚生行政の施策遂行に資することになる。

研究協力者

石黒瑛一 ((財) 日本食品分析センター)
永山敏廣 (東京都健康安全研究センター)
中島正博 (名古屋市衛生研究所生活環境部)

堀江正一 (大妻女子大学 家政学部教授)
山本勝彦 (名古屋学芸大学短期大学部)
内藤成弘 ((独) 農研機構 食品総合研究所)
小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所)

衛生微生物部)
大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部)
吉成知也 (国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部)

A. 研究目的

カビ毒は自然界に存在するカビが産生する二次代謝産物で、しばしば食品等に汚染し、その汚染防止や食品からの除去も困難であることから、ヒトの健康リスク要因となっている。

そのため、ヒトへのカビ毒による健康被害を防ぐには、生産国（地）では農業規範を守り、カビ毒の汚染しやすい環境をつくらないこと、輸入国や消費地では基準値設定をして、カビ毒摂取を最小限に抑えることが最も効果的な方法となる。輸入食品への依存度の高いわが国としては、積極的に今後健康被害が予測されるカビ毒に対しての基準値策定などが必要となる。

法律規制が伴う基準値には、その分析値が担保されていなければならない。そのために、試験法の妥当性を評価することが必要になる。この重要性は国際的な動きとして、多くの国で受け入れられ、AOAC International やIUPAC、ISOなどの国際的な機関が、その評価方法の指針を示している。我が国もカビ毒の汚染実態調査結果や、規制を行うための試験法の国際的ハーモナイゼーションを図るために、その試験法の妥当性を評価出来る組織を設立し、国際的指針に従って検討しておく必要がある。そのため、本研究において試験法および統計学的な専門家に

よって評価する「カビ毒試験法評価委員会」を平成20年に設立し、今後我が国で策定されるカビ毒試験法を対象に妥当性評価を行うこととした。

B. 研究方法

1. カビ毒試験法評価委員会の組織および業務

本委員会は、委員長のほか以下に示すように実務委員として食品のカビ毒あるいは農薬の化学分析の専門家 4 名、統計解析の専門家 2 名および事務局で構成され、将来我が国で基準値が設定された場合に通知法となりうる方法または実態調査に用いられるカビ毒試験法の妥当性を科学的にオーソライズする委員会とした。

1) カビ毒試験法評価委員会組織

(1) 委員長：

田中敏嗣 (神戸市環境保健研究所)

(2) 実務委員：

石黒瑛一 ((財)日本食品分析センター)

永山敏廣 (東京都健康安全研究センター)

中島正博 (名古屋市衛生研究所)

堀江正一 (大妻女子大学)

(3) 統計学的評価委員：

山本勝彦 (名古屋学芸大学短期大学部)

内藤成弘 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所)

(4) 事務局 (作業部会)：

小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部)

大西貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部)

吉成知也 (国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部)

所衛生微生物部)

各委員の任期は1年間で、評価対象のカビ毒によって臨時委員を設けることがある。

なお、事務局は作業部会も兼ねており、試験法のプロトコールの作成、コラボティブスタディに用いる試薬の調製、配布、データの収集などを行う。事務局は評価には関与しない。

2) 評価委員会による試験法の妥当性評価までの流れ

(1) 委員会に属する作業部会委員がプロトコール(案)を作成し、委員会に提出する。

(2) 委員会はプロトコールのプレビューし、必要な修正を申し出でる。

(3) 作業部会は修正し国立医薬品食品衛生研究所のHPに掲載し、一般からのパブリックコメントを求める。

(4) パブリックコメントを委員会が検討し、さらに必要であれば適切な修正を申し入れる。

(5) これらの修正がなされたプロトコールを最終的なコラボラティブスタディ用プロトコールとしてHPに掲載し、同時に一般からのコラボラティブスタディ参加機関(11-12機関)を募る。

(6) 作業部会が試料等を作成し、コラボラティブスタディを実施する。

(7) 結果を作業部会がまとめ、委員会に提出する。

(8) 委員会は、その結果を基に試験法の妥当性の有無を評価する。

(9) 妥当性があると評価された試験法はHPに公開する。

2. 妥当性評価を行った試験法の概要

1) 小麦のデオキシニバレノールおよびニバレノールの同時試験法の妥当性確認試験

(1) プロトコールの作成

「小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について」(平成15年7月17日食安発第0717001号)において示された試験法を基に、国内汚染が問題となっているニバレノールを同時に分析できる試験法を検討し、試験法を確立した。これを基に作製されたコラボティブスタディ用プロトコールが事務局から提出され、評価委員会で、試料の妥当性、均一性、普及性などを検討し、ホームページ上で公開したのちパブリックコメントを募集した。その結果を考慮に入れ修正し、最終プロトコールとした。

(2) 試験法の概要

試料 25g をアセトニトリル：水(85：15) 100mL を加え、30分間激しく振り混ぜ抽出した後、3,000rpm で5分間遠心分離し、上清液を抽出溶液とする。

多機能ミニカラム(Autoprep MF-T 1500, 昭和電工社製および MultiSep #227, Romer Labs 社製)に抽出溶液 10-20mL を入れ、毎分1mL以下の流速で流出させる。デオキシニバレノールおよびニバレノールが流出する分画の約4mLをすり合わせ試験管、又は共栓付き試験管に採り、溶出液とする。

高速液体クロマトグラフ(HPLC)用試験溶液にあつては、溶出液の2.0mLを共栓付き試験管に正確に採り、45℃以下で溶媒を除去する。上記の残留物にアセト

ニトリル、水およびメタノールの混液 (5 : 90 : 5) 1.0mL を加えて溶かした後、10,000rpm で5分間遠心分離し、上清液を試験溶液とする。

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS・LC-MS/MS) 試験溶液にあつては、この溶出液の 1.0mL を共栓付き試験管に正確に採り、45°C以下で溶媒を除去する。残留物に移動相 1.0mL を加えて溶かした後、10,000rpm で5分間遠心分離し、上清液を試験溶液とする。HPLC-UV、LC-MS・LC-MS/MS を用いて測定する。

2) アセチル化デオキシニバレノール試験法の妥当性確認試験

(1) 試験法の概要

試料 25g をアセトニトリル：水 (85 : 15) 100mL を加え、30分間激しく振り混ぜ抽出した後、3,000rpm で5分間遠心分離し、上清液を抽出溶液とする。

多機能ミニカラム (Autoprep MF-T 1500, 昭和電工社製) に抽出溶液 10mL を入れ、毎分 1mL 以下の流速で流出させる。最初の流出液 3mL は捨て、次に流出する 2.4mL を溶出液とする。

この溶出液の 2.0mL を共栓付き試験管に正確に採り、45°C以下で溶媒を除去する。上記の残留物に移動相 1.0mL を加えて溶かした後、10,000rpm で5分間遠心分離し、上清液を試験溶液とする。LC-MS/MS を用いて測定する。

3) 落花生の総アフラトキシン試験法の妥当性確認試験

(1) 試験法の概要

(i) 多機能カラム用試料50.0gにアセト

ニトリル：水 (90 : 10) 200mLまたはメタノール：水 (95 : 5) 200mLを加え、5分間程度静置した後、ブレンダーで5分間

(3000rpmが適当) ブレンドする。ろ過または遠心分離 (3000 rpm, 5分間) し、抽出溶液とする。

抽出溶液2.5-3mL を多機能カラム

(Autoprep MF-A, 昭和電工社製および MultiSep #228, Romer Labs社製) にゆっくり注入し、1分間に1.0mL以下の流速で流出する。アセトニトリル：水 (90 : 10) 抽出溶液は最初に溶出される流出液1mL 液をとる。メタノール：水 (95 : 5) 抽出溶液は最初に溶出される流出液1mL は捨て、次の流出液1mLとり、試料溶液とする。

(ii) イムノアフィニティカラム用試料

50.0gに塩化ナトリウム5.0g およびメタノール：水 (8 : 2) を200mL加え、5分間 (3000rpmが適当) ブレンドする。ろ過または遠心分離 (3000rpm, 5分間) し、抽出溶液とする。

抽出溶液10mLに水を加え50mLとし、混合した溶液をろ過し、その10mLをカラムに注入する。カラムをPBS10mLおよび水 10mL以上で洗浄し、アセトニトリル3mLで溶出し、試料溶液とする。

(iii) HPLCで測定する場合、試料溶液の 0.5mLをキャップ付きバイアルあるいは同等品に正確にとり、窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去し、乾固する。残留物にトリフルオロ酢酸

(TFA) 0.1mL を加え、密栓して試験管ミキサー等で激しく攪拌する。室温、暗所で15分間放置したのち注入溶媒アセトニトリル：水 (1 : 9) 0.4mL を加えて混和したものをHPLC用試験溶液とし、測定す

る。

LC-MS・LC-MS/MS で測定する場合、試験溶液の 0.4mL をキャップ付きバイアルあるいは同等品へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去する。残留物を移動相 0.4mL で溶解後、LC-MS・LC-MS/MS 用試験溶液とし、測定する。

4) 食品中に残留する総アフラトキシンおよびアフラトキシン B₁ に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて

食品衛生法に定めている総アフラトキシン試験法（食安発 0816 第 1 号、平成 23 年 8 月 16 日）以外の方法によって試験をする場合に、その試験法の妥当性を各試験機関が評価するためのガイドラインについて、平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」を参考に以下の内容をカビ毒試験法評価委員会で検討した。

- ガイドラインの趣旨
- ガイドラインの対象
- 用語の定義
- 評価の方法
 - (i) 選択性
 - (ii) 真度（回収率）
 - (iii) 精度
- 添加を行う食品および添加濃度
- 定量下限値

5) 乳中のアフラトキシン M1 試験法の妥当性確認試験

(1) 試験法の概要

試料 20.0g（粉末乳は 5g を水で 50mL

とする）をイムノアフィニティカラムで精製し、HPLC-FL を用いて測定する。

6) フモニシン類試験法の妥当性確認試験

(1) 試験法の概要

試料 20g をメタノール：水（3：1）100mL を加え、15 分間激しく振り混ぜ抽出した後、3,000rpm で 5 分間遠心分離し、上清液を抽出溶液とする。

強塩基性陰イオン交換体ミニカラム（BOND ELUT LRC-SAX, Varian 社製、InertSep LSC SAX, GL Sciences 社製）に抽出溶液 10mL を注入し、メタノール・水（3：1）8mL で洗浄した後、メタノール・酢酸（99：1）14mL で溶出し、試料溶液とする。窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去する。残留物をアセトニトリル・水（1：1）1.0mL で溶解後、LC-MS・LC-MS/MS を用いて測定する。

7) フザリウムマイコトキシン：デオキシニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノンの同時試験法の妥当性確認試験

フザリウムマイコトキシンは食品を同時汚染することが知られており、その一斉試験法は有用ある。複数の抗体を充てんしたイムノアフィニティカラムを前処理に用いた試験法の試験妥当性確認を行った。

(1) 試験法の概要

試料 25g をメタノールおよび水の混液（75：25）100mL を加え、30 分間激しく振り混ぜ抽出した後、3,000rpm で 5 分間遠心分離し、上清液を抽出溶液とする。

抽出溶液 10mL に PBS40mL を加え混合した溶液 5mL をイムノアフィニティカラム (DZT MS-PREP, R-BIOPHARM RHONE 社製) に注入する。カラムを水 10mL 以上で洗浄し、メタノール 3mL で溶出し、試料溶液とする。窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去する。残留物を移動相で溶解後、LC-MS/MS を用いて測定する。

8) コラボラティブスタディ参加機関

試験法の妥当性確認のための共同試験への参加機関は次の通り。

アサヒビール(株)

(一財)化学物質評価研究機構

神奈川県衛生研究所

川崎市衛生研究所

韓国農業科学技術院 National Institute of Agricultural Science & Technology

キリンホールディングス(株)

キューピー(株)研究所

協同飼料(株)

サントリービジネスエキスパート(株)

島津製作所(株)

(財)食品環境検査協会

(財)食品分析開発センターSUNATEC

台湾医薬食品局

(株)日清製粉グループ本社

日本エコテック(株)

(財)日本食品分析センター

(財)日本冷凍食品検査協会

(財)日本穀物検定協会

(独)農林水産消費安全技術センター仙台センター

(独)農林水産消費安全技術センター

浜松市保健環境研究所

(財)マイコトキシシン検査協会

三重県保健環境研究所

明治乳業(株)

森永製菓(株)

雪印乳業(株)

C. 研究結果および考察

1. デオキシニバレノール (DON) およびニバレノール (NIV) の同時試験法の妥当性確認のコラボラティブスタディについて

1) コラボラティブスタディの結果

(1) HPLC-UV を用いた DON/NIV の一斉試験法の結果は DON、NIV とも回収率 72%~106%、室間併行精度 (RSDR) 4.3~25.2、HorRat は 2 以下であった。自然汚染小麦では RSDR 7.4~12.9、HorRat は 2 以下であった。

(2) LC/MS (LC/MS/MS) を用いた DON/NIV の一斉試験法の結果は DON、NIV とも回収率 80%~110%、RSDR 6.5~17.5、HorRat は 2 以下であった。自然汚染小麦では RSDR 13.9~16.5、HorRat は 2 以下であった。

(3) 定量下限

HPLC-UV 法の定量下限は DON、NIV 共に 0.1mg/kg であった。LC/MS/MS 法の定量下限は、それぞれの機種により大きく異なったため、今回は算出しなかったが、HPLC-UV 法より低濃度の定量が可能であった。

2) 「カビ毒試験法評価委員会」による評価

得られた有効なデータから、室内併行精度 (RSDr) と RSDR を算出し、その値から HorRat 値を評価した。本コラボラティ

ブスタディに用いた添加量である 0.1 mg/kg から 1.0mg/kg までの範囲において、本試験法の妥当性は認められると判断された。また、2種類の多機能カラムにおける有意な分析値の差は認められず、両者とも試験法に使用するのに問題はないと判断した。

2. アセチル化デオキシニバレノール試験法の妥当性確認試験のコラボラティブスタディについて

1) コラボラティブスタディの結果

表 2 に結果を示した。回収率は 81.1% ~95.5%、RSDR12.4~30.7、HorRat は 2 以下であった。自然汚染小麦では RSDR14.3~39.2、HorRat は 2 以下であった。

2) 「カビ毒試験法評価委員会」による評価

得られた有効なデータから、RSDr と RSDR を算出し、その値から HorRat 値を評価した。本コラボラティブスタディに用いた添加量である 10mg/kg から 150mg/kg までの範囲において、本試験法の妥当性は認められると判断した。

3. 落花生中の総アフラトキシン試験法の妥当性確認のコラボラティブスタディについて

1) コラボラティブスタディの結果

(1) HPLC による分析結果

多機能カラムを前処理に用いた場合、抽出溶媒として使用したアセトニトリル、メタノール共に、落花生に総アフラトキシンを添加した試料における回収率および RSDR はそれぞれ 89.3%~95.6%、16.4%

~18.7%でいずれも良好な結果であった。また、自然汚染試料の測定結果は 18.7ng/g で期待濃度の 95.9%で、RSDR は 18.4%であった。アフィニティカラムを前処理に用いた場合においても回収率 80%以上、RSDR25%以内にあり、HorRat 値は 1.1 以内に収まった。

定量限界は多機能カラムでは総アフラトキシンで 2 μ g/kg、イムノアフィニティカラムでは 1 μ g/kg であった。

(2) 「カビ毒試験法評価委員会」による評価

得られた有効なデータから、RSDr と RSDR を算出し、その値から HorRat 値を評価した。本コラボラティブスタディに用いた総アフラトキシン添加量である 8ng/g から 32ng/g までの範囲において、本試験法の妥当性は認められると判断された。

(i) 抽出溶剤としてメタノールを使用し、多機能カラムで精製した後、HPLC で測定した場合、抽出溶剤としてアセトニトリルを用いた方法と比較した場合、回収率はやや低い傾向および妨害成分がやや多く認められたが、真度、精度等において許容の範囲で本試験法の妥当性は認められると判断した。

(ii) 精製カラムとしてイムノアフィニティカラムを使用し精製した後、HPLC で測定した場合多機能カラムを用いた方法と比較した場合、回収率はやや低い傾向が認められたが、精度、HorRat 値において良好な結果で本試験法の妥当性は認められると判断された。

(iii) LC-MS・LC-MS/MS による分析結果
イムノアフィニティカラムによる精製

した場合と多機能カラムを用いた値を比較すると、RSDr、RSDR、HorRat がいずれも低い結果であった。アフラトキシン分析において LC-MS・LC-MS/MS 測定、特に ESI によるイオン化法は試験溶液中のマトリックスに影響されやすいことが知られていることから、イムノアフィニティカラムの精製能力が高いことが示唆される。また、分析結果のばらつきが大きい機関が認められ、HPLC に比べ測定の精度に問題点があることが示唆されたことから、事前の LC-MS・LC-MS/MS の測定の留意点等検討する結果であった。

4. 食品中に残留する総アフラトキシンおよびアフラトキシン B₁に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて

1) 評価の方法

カビ毒試験法評価委員会で検討した結果次のような結論に至ったため、これを厚労省薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会食品規格部会への提案事項とした。

食品ごとにアフラトキシンを添加して、測定結果から以下のパラメーターを求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認する。また、次に示す方法以外は、平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」に準じる。

(1) 選択性

アフラトキシンを含まない試料（ブランク試料）について操作を行い、定量を妨害するピークがないことを確認する。妨害ピークを認める場合は各アフラトキシン濃度 1.25 μ g/L に相当するピーク面積

（又は高さ）と比較し 1/10 未満であることを確認する。

(2) 真度（回収率）

同一濃度のアフラトキシンを添加した試料 5 個以上を試験法にしたがって、定量し、得られた定量値の平均値の添加濃度に対する比率を求め、これを回収率とする。目標値は表 2 のとおりとする。

(3) 精度

添加試料の分析を繰り返し、定量値の標準偏差および相対標準偏差を求め、併行精度および複数の分析者または分析日による室内精度を評価する。目標値は表 2 のとおりとする。

2) 添加を行う食品および添加濃度

(1) 添加を行う食品の種類

添加を行う食品は、原則として試験法を適用しようとする食品から選択する。

(2) 添加濃度

添加濃度は、原則として各アフラトキシン 2.5ng/g の合計 10ng/g とする。

(3) 添加試料を作成等に当たっての留意事項

手順は平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」に準じる。但し、標準溶液の添加後よく混合し、一時間放置した後抽出操作を行う。

(4) 定量限界

各アフラトキシン 1ng/g

以上のそれぞれの基準に適合していることを確認することとし、各試験機関が評価するためのガイドラインとした。

5. 乳中のアフラトキシン M1 試験法の妥

当性確認のコラプティブスタディについて

1) コラプティブスタディの結果

乳に添加した試料および粉末乳における回収率および RSDR はそれぞれ 88.2%~94.5%、6.3%~11.9%であった。

また、自然汚染乳の測定結果は 0.46ng/g で期待濃度の 92.0%で RSDR は 8.3%でいずれも良好な結果であった。

定量下限値は液体乳に換算して 0.002 ng/g~0.050ng/g で、機関間や使用機器による差が認められた。

2) 「カビ毒試験法評価委員会」による評価

得られた有効なデータから、RSDr と RSDR を算出し、その値から HorRat 値を評価した。本コラボラティブスタディに用いた総アフラトキシン添加量である 0.05 ng/g から 1.0ng/g までの範囲において、本試験法の妥当性は認められると判断した。

6. フモニシン試験法の妥当性確認のコラボラティブスタディについて

1) コラボラティブスタディの結果

表 4 に結果を示した。回収率は 78.6%~92.8%、RSDR7.6~30.2、HorRat は 2 以下であった。自然汚染小麦では RSDR6.7~20.5、HorRat は 2 以下であった。

2) 「カビ毒試験法評価委員会」による評価

得られた有効なデータから、室内併行性 (RSDr) と室間併行性 (RSDR) を算出し、その値から HorRat 値を評価した。本コラボラティブスタディに用いた添加量であるフモニシン B1 は 100 mg/kg から 1000

mg/kg、B2 および B3 は 10mg/kg から 100 mg/kg までの範囲において、本試験法の妥当性は認められると判断された。また、2種類の強塩基性陰イオン交換カラムにおける有意な分析値の差は認められず、両者とも試験法に使用するのに問題はなないと判断した。

7. フザリウムマイコトキシン試験法の妥当性確認のコラボラティブスタディについて

1) コラボラティブスタディの結果

回収率は 77%~108%、RSDR6.9~31.2、HorRat は 2 以下であった。

2) 「カビ毒試験法評価委員会」による評価

得られた有効なデータから、RSDr と RSDR を算出し、その値から HorRat 値を評価した。本コラボラティブスタディに用いた添加量であるデオキシニバレノールは 20mg/kg から 100mg/kg、T-2、HT-2、ゼアラレノン は 6mg/kg から 30mg/kg までの範囲において、本試験法の妥当性は認められると判断した。

8. LC-MS・LC-MS/MS 測定による留意事項

カビ毒試験法における測定法として、HPLC が多用されてきたが、測定物質の情報は保持時間のみで、同定能力が不十分で確認同定が必要となることがある。一方 LC-MS や質量分析部に分析管を 2 本直列に配置した LC-MS/MS は試料の構造情報が得られることから確認同定に極めて有効である。

エレクトロスプレーイオン化 (ESI) は他のイオン化法と比較して、容易で検

出感度が高いことから汎用され、大気圧化学イオン化 (APCI) は ESI でイオン化できない低分子量化合物の分析に適しているなど、高極性物質が多いカビ毒の測定には両法とも有用なイオン化法である。

一方、留意すべきことは、食品中のマトリックスやインターフェースの汚れ等によるイオン化抑制が起こり、定量測定に影響する。総アフラトキシンの共同試験で認められたように食品中のマトリックスによってデータのばらつきが大きくなる。

図 2 に小麦試料におけるイオン化法によるカビ毒のイオン化抑制について示した。APCI に比べ汎用されている ESI の方が影響が大きく、高極性物質のフザリウムマイコトキシンでは特に顕著である。

このように、有用な機器であるが、定量測定においてはその特性や原理を十分把握する必要がある。また、クライテリアサンプルを測定するなど真の測定データが得られる機器の状態を確認する必要がある。

E. 結論

国際的ハーモナイゼーションを踏まえて、実態調査およびレギュレーションに用いるカビ毒試験法に対し、その妥当性を科学的に評価する委員会を設置した。委員会は分析学の専門家と統計学の専門家および事務局により構成される。この委員会の役割は、AOAC International および ISO 等の国際機関の評価方法にならい、次の 9 つの段階を経て行われる。

1) 委員会に属する作業部会委員がプロトコール (案) を作成し、委員会に提出する。

2) 委員会はプロトコールのプレビューし、必要な修正を申し出でる。

3) 作業部会は修正し国立医薬品食品衛生研究所の HP に掲載し、一般からのパブリックコメントを求める。

4) パブリックコメントを委員会が検討し、さらに必要であれば適切な修正を申し入れる。

5) これらの修正がなされたプロトコールを最終的なコラボラティブスタディ用プロトコールとして HP に掲載し、同時に一般からのコラボラティブスタディ参加機関 (11-12 機関) を募る。

6) 作業部会が試料等を作成し、コラボラティブスタディを実施する。

7) 結果を作業部会がまとめ、委員会に提出する。

8) 委員会は、その結果を基に試験法の妥当性の有無を評価する。

9) 妥当性があると評価された方法は HP に公開する。

本研究で評価したカビ毒試験法は、デオキシニバレノールおよびニバレノール同時試験法、アセチル化デオキシニバレノール、総アフラトキシニン試験法、総アフラトキシン等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの作成、アフラトキシニン M₁ 試験法、フモニシン試験法、フザリウムマイコトキシン：デオキシニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノン同時試験法であった。各試験法のコラボラティブスタディの結果を国際的な機関が示しているクライテリアに基づいて評価し、その妥当性を確認した。また、各試験機関が通知方以外の方法によって試験する場合、その試験法の妥当性を評価するためのガイドラインを策

定した。

「カビ毒試験法評価委員会」において検証評価された試験法および検討策定されたガイドラインは基準値策定や汚染実態調査等厚生行政の施策遂行に資することになる。

参考文献

- 1) Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U.-S., Sugiura, Y., Ueno, Y.: *J. Agric. Food Chem.* **36**, 979-983 (1988)
- 2) Yoshizawa, T.: in *Mycotoxins and Animal Foods*, Smith, J.E. and Henderson R.S. eds., CRC Press, Inc., pp.306-312 (1991)
- 3) *Environmental Health Criteria 105*, Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecens, Ergot, WHO, Geneva, (1990)
- 4) Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Tabaka, S., Nakajima, M., Nouno, M., Nakaie, Y., Chonan, T., Aoyagi, M., Kibune, N., Mizuno, K., Ishiguro, E., Kanamaru, N., Minamizawa, M., Aita, N., Kushiro, M., Tanaka, K., Takatori, K.: *Mycopathologia*, **161**, 239-243 (2006)
- 5) Tanaka, H., Takino, M., Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Toriba, A., Hayakawa, K.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 3119-3125 (2009)
- 6) Tanaka, H., Takino, M., Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Leeman, D., Toriba, A., Hayakawa, K.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 2445-2452 (2010)

F. 研究発表

< 学会発表 >

- 1) 滝埜昌彦(アジレントテクノロジー株式会社)、田中宏輝 ((社)全日本検数協会、現、サントリー株式会社)、田中敏嗣 (神戸市環境保健研究所)、小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所) : 第 94 回日本食品衛生学会学術講演会、平成 19 年 10 月 26-27 日、静岡県立大学
- 2) 中島正博、永山敏廣、石黒瑛一、内藤成弘、伊藤嘉典、鎌田洋一、小西良子、山本勝彦、田中敏嗣 : デオキシニバレノールおよびニバレノール同時試験法妥当性試験の評価. 第 96 回学術講演会日本食品衛生学会, 神戸, 2008.9
- 3) 中島正博 (名古屋市衛生研究所)、永山敏廣 (東京都健康安全研究センター)、石黒瑛一 (日本食品分析センター)、堀江正一 (大妻女子大学)、内藤成弘 (農研機構・食品総合研究所)、伊藤嘉典、大西貴弘、鎌田洋一、小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所)、山本勝彦 (名古屋学芸大学)、田中敏嗣 (神戸市環境保健研究所) : トータルアフラトキシン試験法の妥当性評価、第 98 回日本食品衛生学会学術講演会、函館国際ホテル、平成 21 年 10 月 8-9 日

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1 LC-MS/MSによるデオキシニバレノールおよびアセチル化デオキシニバレノールの
共同試験結果

<表 1-1 デオキシニバレノールの結果>

	添加量 (µg/kg)				自然汚染試料	
	無添加	10	50	150	小麦	トウモロコシ
平均値	3.0	13.5	50.3	148.5	782.6	968.8
回収率(%)	-	98.8	94.7	97.0	-	-
RSDr (%)	-	9.0	7.7	11.4	7.1	5.5
RSDR (%)	-	12.4	29.1	26.7	14.3	22.1
HorRat	-	0.6	1.3	1.3	0.9	1.4

<表 1-2 3-アセチルデオキシニバレノールの結果>

	添加量 (µg/kg)				自然汚染試料	
	無添加	10	50	150	小麦	トウモロコシ
平均値	-	8.7	47.7	134.1	9.7	7.0
回収率(%)	-	86.6	95.5	89.4	-	-
RSDr (%)	-	10.3	5.3	9.4	6.7	5.1
RSDR (%)	-	28.4	18.4	20.3	16.1	39.2
HorRat	-	1.3	0.8	0.9	0.7	1.8

<表 1-3 15-アセチルデオキシニバレノールの結果>

	添加量 (µg/kg)				自然汚染試料	
	無添加	10	50	150	小麦	トウモロコシ
平均値	-	8.2	43.0	121.7	22.3	156.5
回収率 (%)	-	81.3	86.0	81.1	-	-
RSDr (%)	-	6.3	6.3	11.2	7.4	8.7
RSDR (%)	-	29.4	30.7	30.6	25.8	25.4
HorRat	-	1.3	1.4	1.4	1.2	1.2

表2 真度(回収率)および精度の目標値

対象マイコトキシン	試行回数(回)	真度(回収率)%	併行精度%	室内精度%
総アフラトキシン	5	70-110	25>	30>
アフラトキシンB ₁	5	70-110	25>	30>

表3 HPLCによるアフラトキシン M₁ の共同試験結果

	添加量(μg/kg)				汚染試料	
	無添加	0.05	0.5	1.0	粉末乳 FAPAS	乳
平均値	0.0010	0.044	0.458	0.899	0.447	0.514
回収率 (%)	-	88.2	91.6	89.9	94.5	-
RSDr (%)	3.1	7.4	2.1	4.3	8.9	4.6
RSDR (%)	7.1	8.1	6.3	6.6	11.9	8.3
HorRat	0.32	0.37	0.29	0.30	0.54	0.38

表4 フモニシンの共同試験結果

<表 4-1 フモニシン B₁ の結果(BOND ELUTLRC-SAX) >

	添加量(μg/kg)				自然汚染試料	
	無添加	100	500	1000	コーン 1	コーン 2
平均値	22.7	107.9	440.1	852.6	610.3	1185.2
回収率 (%)	-	85.2	83.5	83.0	-	-
RSDr (%)	12.1	5.2	8.0	3.7	5.8	4.6
RSDR (%)	12.6	10.0	9.6	10.1	8.2	6.7
HorRat	0.6	0.4	0.5	0.6	0.5	0.4

<表 4-2 フモニシン B₁ の結果(InertSep LRC-SAX) >

	添加量(μg/kg)				自然汚染試料	
	無添加	100	500	1000	コーン 1	コーン 2
平均値	22.9	106.9	421.5	829.7	578.1	11p3.7
回収率 (%)	-	84.1	79.7	80.7	-	-
RSDr (%)	16.4	7.0	7.7	5.5	4.8	5.0
RSDR (%)	15.0	7.6	8.7	7.8	9.3	10.1
HorRat	0.7	0.3	0.5	0.5	0.5	0.6

<表 4-3 フモニシン B₂の結果(BOND ELUTLRC-SAX)>

	添加量(μg/kg)				自然汚染試料	
	無添加	100	500	1000	コーン 1	コーン 2
平均値	10.3	19.1	49.6	91.9	344.3	667.1
回収率 (%)	-	87.9	78.6	80.6	-	-
RSDr (%)	15.0	13.6	10.2	5.7	4.0	4.6
RSDR (%)	26.7	26.8	25.1	10.4	8.6	9.7
HorRat	1.2	1.2	1.1	0.5	0.5	0.6

<表 4-4 フモニシン B₂の結果(InertSep LRC-SAX)>

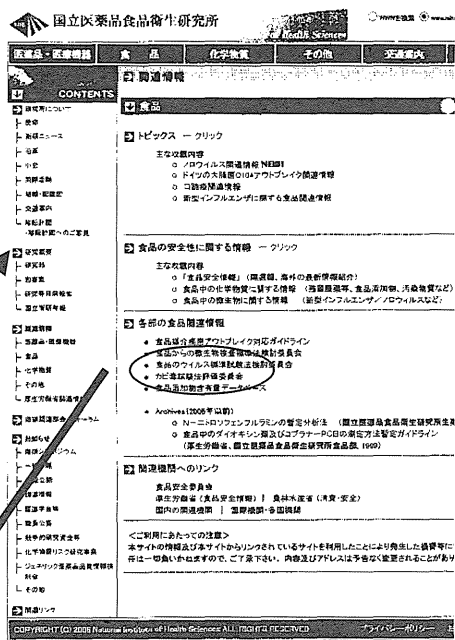
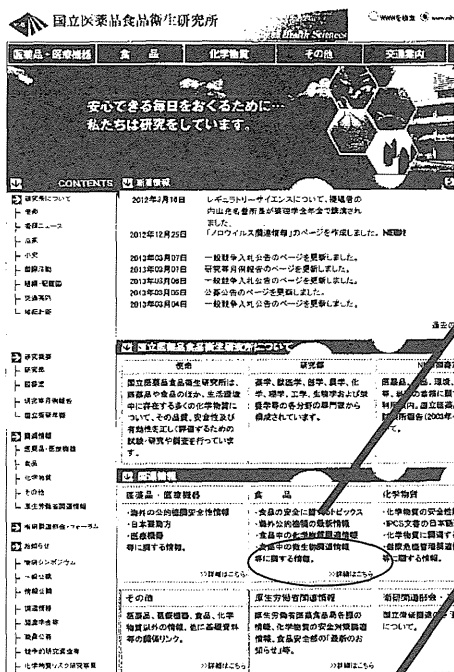
	添加量(μg/kg)				自然汚染試料	
	無添加	100	500	1000	コーン 1	コーン 2
平均値	10.1	19.4	51.9	92.7	323.8	594.9
回収率 (%)	-	92.8	82.7	81.6	-	-
RSDr (%)	17.4	15.4	7.4	7.2	4.1	4.1
RSDR (%)	27.9	30.2	19.0	12.2	10.5	20.5
HorRat	1.3	1.4	0.9	0.5	0.6	1.2

<表 4-5 フモニシン B₃の結果(BOND ELUTLRC-SAX)>

	添加量(μg/kg)				自然汚染試料	
	無添加	100	500	1000	コーン 1	コーン 2
平均値	3.1	11.4	42.7	86.1	94.0	201.0
回収率 (%)	-	83.1	79.0	83.0	-	-
RSDr (%)	16.3	9.1	5.9	7.1	7.4	5.2
RSDR (%)	24.0	26.1	26.1	12.3	9.3	12.5
HorRat	1.1	1.2	1.2	0.5	0.4	0.6

<表 4-6 フモニシン B₃の結果(InertSep LRC-SAX)>

	添加量(μg/kg)				自然汚染試料	
	無添加	100	500	1000	コーン 1	コーン 2
平均値	3.0	11.1	43.8	84.5	89.7	186.2
回収率 (%)	-	81.2	81.7	80.1	-	-
RSDr (%)	17.4	8.4	6.4	9.2	6.1	4.3
RSDR (%)	22.2	25.6	20.1	9.5	9.9	10.9
HorRat	1.0	1.2	0.9	0.4	0.4	0.5



カビ毒試験法評価委員会

○委員会概要

設立趣旨 委員会名簿 評価までの流れ

○最新情報 (2012年05月)

・アセチル化DONの分析法とフモニン類の分析法のコラボラティブスタディの結果を掲載しました。

ご協力、誠にありがとうございました。

→評価された試験法のページへ

カビ毒試験法評価委員会

new ○評価された試験法

DON/NIV一斉分析法

☆コラボラティブスタディ結果報告書

生乳中のアフラトキシンM1試験法

☆コラボラティブスタディ結果報告書

ピーナッツのトータルアフラトキシン試験法の妥当性試験報告書

アセチル化DONの分析法(2012-05)

☆コラボラティブスタディ結果報告書

フモニン類の分析法(2012-5)

☆コラボラティブスタディ結果報告書

図1 カビ毒試験法評価委員会活動および妥当性評価確認試験と終了した試験法をホームページに掲載

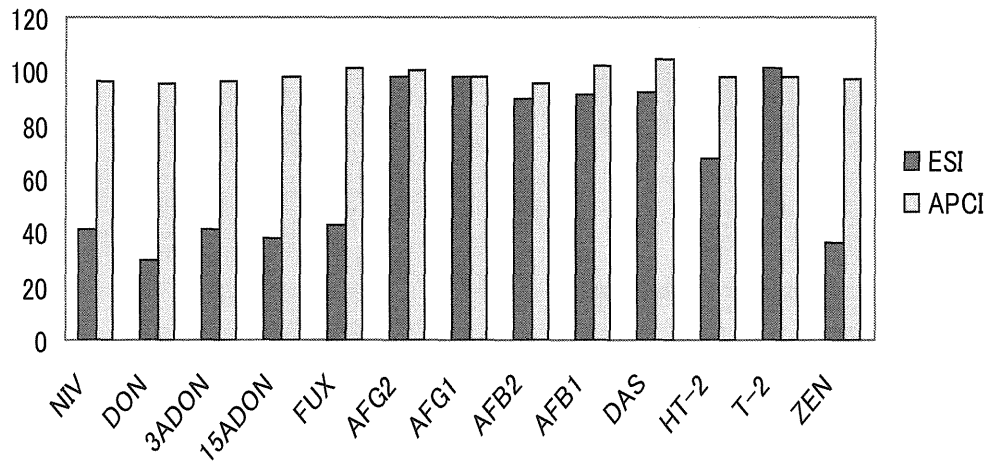


図2 小麦試料におけるLC-MS/MS イオン化法でのカビ毒のイオン化抑制