

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）

## 総括研究報告書

乳幼児用食品におけるカビ毒汚染のリスク評価に関する研究

研究代表者 吉成 知也

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部第四室主任研究官

### 研究要旨

本研究課題は、平成 26 年～27 年度の 2 年間にわたって、「乳幼児用食品を対象としたカビ毒一斉同時分析法の開発」、「の方法を用いたカビ毒汚染実態調査」の 2 項目の達成を目標とする。本年度は同時分析法開発のための前段階として、カビ毒の混入が認められる乳幼児用食品のスクリーニングを行った。

アフラトキシン類 4 種、オクラトキシン A、フモニシン B 類 3 種、DON、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノンの計 12 種のカビ毒について、分析法を 6 種のカテゴリーに分けた乳幼児用食品について開発した。4 種のイムノアフィニティーカラムを用いてそれぞれのカビ毒を精製し、LC-MS/MS による定量を行う方法を考案し、添加回収試験によって妥当性を評価した。

妥当性が示された分析法を用いて、米菓子 11 件、小麦菓子 30 件、コーン菓子 13 件、コーンスープ 12 件、飲料 9 件、レトルト食品 15 件の合計 90 件について、12 種類のカビ毒の汚染調査を行った。アフラトキシン類 4 種については、コーン加工品 2 検体から B<sub>1</sub> が微量であるが検出された。オクラトキシン A については、いずれの検体においても検出されなかった。フモニシン B 類 3 種については、コーンスープとコーン菓子といったコーンを原料とした製品において検出率が 50%を超え、他の製品では検出されなかった。DON については、飲料以外の 5 種のカテゴリーの食品で検出され、特にコーン菓子では検出率が 70%を超えた。T-2 トキシンと HT-2 トキシンについては、コーン菓子において検出率が 40%を上回った。ゼアラレノンはコーンスープとコーン菓子で 30%の検出率であったが、汚染濃度は低く、10 $\mu$ g/kg を超える製品は認められなかった。

以上の結果より、乳幼児用食品を汚染する主要なカビ毒はフザリウム菌由来のフモニシンとトリコテセン系カビ毒であり、またコーンと小麦を原料とする食品において検出頻度・濃度が高い傾向にあることが明らかになった。

研究協力者

成川 絢子 国立医薬品食品衛生研究所

## A. 研究目的

本研究においては、国内に流通する乳幼児用食品に含まれるカビ毒について、「1. 一斉同時定量分析法の開発」及び「2. 汚染実態の調査」の 2 項目を実施する。カビ毒については、我が国では 2013 年現在、全食品中のアフラトキシンに 10 $\mu$ g/kg、小麦玄麦中のデオキシニバレノール (DON) に 1.1mg/kg、リンゴ果汁中のパツリンに 50 $\mu$ g/kg といった規制値又は基準値が定められている。一方、近年の世界的な動向としては食品の種類や摂取対象を勘案し、食品ごとに個別の規制値を設定する動きが活発となっている。特に乳幼児用食品については、体重による影響を勘案し、厳しい規制値が設定される傾向にある。例えば、EU における総アフラトキシンと DON の最大基準値はトウモロコシでそれぞれ 10 $\mu$ g/kg と 1750 $\mu$ g/kg が設定されているのに対し、乳幼児用食品ではそれぞれ 0.5 $\mu$ g/kg と 200 $\mu$ g/kg と 1/20 ~ 1/10 の値が設定されている。また、2013 年 6 月には米国において、カビ毒 HT-2 トキシンが混入した乳児用シリアル製品により被害が生じたことが報告された。このような国際的な動向や被害実態を踏まえ、我が国においても乳幼児用食品に含まれるカビ毒について別枠の基準値設定の必要性についての議論が求められている。上述した本研究の実施事項 1. と 2. は、基準値の必要性の有無を判断するために必須の科学的根拠を得る目的で実施される。

我が国におけるカビ毒の汚染実態については、厚生労働科学研究班を中心に実施されており、2001 ~ 2003 年度には国産の小麦、大麦及び米に含まれる DON、2004 ~ 2006 年度には市販食品中の総アフラトキシン、2004 ~ 2009 年度には穀類と豆類中のオクラトキシン A とトウモロコシ加工品中のフ

モニシン、さらに 2010 年度からは小麦、大麦と市販食品中の T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンが対象とされた。しかし、乳幼児用食品は調査対象に含まれておらず、汚染実態についての情報は全く得られていない。本研究においては、第一段階として、様々な種類のものが存在する乳幼児用食品についてカビ毒汚染が確認されるものを絞込む。第二段階として、絞り込んだ食品を対象とした 13 種のカビ毒一斉同時定量分析法を開発する。第三段階として、一斉分析法を用いて乳幼児用食品中の 13 種のカビ毒を定量分析する。このような効率的な方法により、これまでは個別のカビ毒について数年ずつ費やして行われた調査を 2 年間という極めて短期間かつ少人数で完了することが、本研究の最大の特色である。

## B. 研究方法

実態調査に用いた乳幼児用食品は、2014 年 4 月と 10 月に東京都又は神奈川県の小売店などからランダムに購入したものをを用いた。

### アフラトキシン類の分析法

精製は、平成 23 年 8 月 16 日発出食安発 0816 第 2 号「総アフラトキシンの試験法」に従い行った。抽出は、試料 5g に抽出溶媒メタノール：水 (80 : 20) 20mL を加え、30 分間振盪することで行った。遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離した。抽出液 5mL を蒸留水 20mL で希釈後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。なお、添加回収試験を実施する場合には、秤量後の試料にカビ毒を添加し、30 分間風乾した後に抽出作業を行った。

ろ液 10mL をイムノアフィニティーカラム(堀場製作所社製 AFLAKING)に添加し、蒸留水 10mL で洗浄後、アセトニトリル 3

mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣を 20%メタノール 0.5mL に溶解し、試験溶液とした。

< LC-MS/MS の測定条件 >

HPLC

カラム : InertSustain C18

2.1mm×150mm, 3 $\mu$ m

カラム温度 : 40

移動相 : A 10mM 酢酸アンモニウム  
/1%酢酸

B メタノール

分離条件 : 0分 A : B = 60 : 40

9分 A : B = 10 : 90

12分まで保持

流速 : 0.2mL/分

注入量 : 10 $\mu$ L

MS

イオン化 : ESI

モニタリングイオン :

アフラトキシン B<sub>1</sub> (positive) 313/241

アフラトキシン B<sub>2</sub> (positive) 315/287

アフラトキシン G<sub>1</sub> (positive) 329/243

アフラトキシン G<sub>2</sub> (positive) 331/189

標準溶液 ( 4 種それぞれ 1 $\mu$ g/mL ) の LC-MS/MS クロマトグラムを図 1 に示す。

オクラトキシン A の分析法

精製には 2004 ~ 2009 年度に厚生労働科学研究による汚染実態調査で使われた方法を用いた。抽出は、試料 5g に抽出溶媒メタノール : 水 ( 60 : 40 ) 20mL を加え、30 分間振盪することで行った。遠心分離 ( 1410g、10 分間 ) により抽出液を分離した。抽出液 10mL を蒸留水 10mL で希釈後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。

ろ液 10mL をイムノアフィニティーカラ

ム ( 堀場製作所社製 OCHRAKING ) に添加し、PBS6mL と蒸留水 6mL で洗浄後、メタノール : 酢酸 ( 98 : 2 ) 3mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル : 水 : 酢酸 ( 30 : 69 : 1 ) 0.5mL に溶解し、試験溶液とした。

< LC-MS/MS の測定条件 >

HPLC

カラム : InertSustain C18

2.1mm×150mm, 3 $\mu$ m

カラム温度 : 40

移動相 : A 10mM 酢酸アンモニウム  
/1%酢酸

B メタノール

分離条件 : 0分 A : B = 60 : 40

9分 A : B = 10 : 90

12分まで保持

流速 : 0.2mL/分

注入量 : 10 $\mu$ L

MS

イオン化 : ESI

モニタリングイオン :

オクラトキシン A (positive) 404/239

標準溶液 ( 1 $\mu$ g/mL ) の LC-MS/MS クロマトグラムを図 1 に示す。

フモニシン類の分析法

2004 ~ 2009 年度の厚生労働科学研究による汚染実態調査では強陰イオン性交換体カートリッジによる精製法が用いられたが、その方法では加工品で良好な回収率が得られなかったため、イムノアフィニティーカラムを用いる方法を新規に開発した。

抽出は、試料 4g に抽出溶媒メタノール : アセトニトリル : 水 ( 25 : 25 : 50 ) 10mL 加え、20 分間振盪することで行った。遠心

分離（1410g、10 分間）により抽出液を分離後、沈殿物に再度同量の抽出液を加えて抽出後、遠心分離（1410g、10 分間）により抽出液を分離した。2 回の抽出液を合わせた。抽出液 5mL を PBS20mL で希釈後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。

ろ液 10 mL をイムノアフィニティーカラム（VICAM 社製 FumoiTest）に添加し、PBS10mL で洗浄後、80%メタノール 4mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル：水：ギ酸（25：75：0.1）0.4mL に溶解し、試験溶液とした。

#### < LC-MS/MS の測定条件 >

##### HPLC

カラム：Inertsil ODS-4

3.0mm×50mm, 2 $\mu$ m

カラム温度：40

移動相：A 0.1%ギ酸水溶液

B アセトニトリル

分離条件：0 分 A：B = 75：25

5 分 A：B = 50：50

8 分まで保持

流速：0.2mL/分

注入量：10 $\mu$ L

##### MS

イオン化：ESI

モニタリングイオン：

フモニシン B<sub>1</sub> (positive) 722/334

フモニシン B<sub>2</sub> (positive) 706/336

フモニシン B<sub>3</sub> (positive) 706/336

標準溶液（4 種それぞれ 10 $\mu$ g/mL）の LC-MS/MS クロマトグラムを図 2 に示す。

DON、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンの分析法

精製には 2010 年度から実施されている

厚生労働科学研究による汚染実態調査で使われている方法を用いた。抽出は、試料 5g に抽出溶媒メタノール：水（75：25）20mL を加え、30 分間振盪することで行った。遠心分離（1410g、10 分間）により抽出液を分離した。抽出液 10mL を正確にピペッターなどで 50mL のメスフラスコにとり、PBS で 50mL にメスアップした後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。

ろ液 5 mL をイムノアフィニティーカラム（R-Biopharm Rhone 社製、DZT MS-PREP）に添加し、蒸留水 5mL で洗浄後、メタノール 2mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣を 10%アセトニトリル 0.5mL に溶解し、試験溶液とした。

#### < LC-MS/MS の測定例 >

##### HPLC

カラム：Inertsil ODS-4

3.0mm×50mm, 2 $\mu$ m

カラム温度：40

移動相：A 10mM 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件：0 分 A：B = 95：5

8 分 A：B = 10：90

14 分まで保持

流速：0.2mL/分

注入量：10 $\mu$ L

##### MS

イオン化：ESI

モニタリングイオン：

DON (negative)

T-2 トキシン (positive) 484/305

HT-2 トキシン (positive) 442/263

ゼアラレノン (negative) 317/131

標準溶液(DON 40 $\mu$ g/mL、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンはそれぞれ

10 $\mu$ g/mL)の LC-MS/MS クロマトグラムを  
図 3 に示す。

(倫理面への配慮)

実態調査を実施する乳幼児用食品について、  
風評被害等の懸念を避けるために、製品名  
及び製造販売業者名は一般に公開されない  
よう配慮する。

### C. 研究結果

以下、アフラトキシンを AF、オクラトキ  
シンを OT、フモニシンを FB、T-2 トキシ  
ンを T-2、HT-2 トキシンを HT-2、ゼアラ  
レノン を ZEN と略す。

実態調査の対象について

市販されている乳児用食品はその原材料  
や形状が多種多様であり、カビ毒の汚染レ  
ベルも種類ごとに大きく異なることが予想  
された。そこで結果の解釈をわかりやすく  
するため、乳幼児用食品を 6 種のカテゴリ  
ー(米菓子、小麦菓子、コーン菓子、コー  
ンスープ、飲料、レトルト食品)に分ける  
ことにした。

添加回収試験について

分析法の妥当性を検証するために、6 種  
のカテゴリの食品それぞれについて、添加  
回収試験を実施した。

AF 類 4 種の添加回収試験の結果を図 4  
に示した。米菓子と飲料では 4 種 AF の回  
収率が 80%を、小麦菓子とコーン菓子  
では 70%を上回り良好な結果が得られた。  
コーンスープの AFB<sub>2</sub>、レトルト食品の  
AFB<sub>1</sub> と AFG<sub>1</sub> の回収率が 67%と若干  
70%を下回った。

OTA の添加回収試験の結果を図 5 に示  
した。小麦菓子、コーンスープ、コーン  
菓子、飲料で回収率が 90%を、米菓子  
とレトルト食品では 80%を上回った。

FB 類 3 種の添加回収試験の結果を図 6  
に示した。コーン菓子については、両濃  
度において 3 種ともに 80%を超え、良  
好な結果が得られた。小麦菓子、コー  
ンスープ、飲料、レトルト食品及び飲  
料では回収率は 70%前後であった。な  
お、図には示していないが、米菓子に  
ついては 30~50%と十分な回収率が  
得られなかった。

DON、T-2、HT-2 及び ZEN の添加回  
収試験の結果を図 7 に示した。小麦菓  
子の ZEN、レトルト食品の T-2 と ZEN  
の回収率が 70%台であったが、その他  
は 80~110%と良好な結果が得られた。

実態調査

2014 年度は、米菓子 11 検体、小麦菓  
子 30 検体、コーンスープ 12 検体、コー  
ン菓子 13 検体、レトルト食品 15 検体  
及び飲料 9 検体の計 90 検体について、  
12 種のカビ毒の汚染調査を行った。平  
均値の算出については、以下の様に行  
った。

下限平均濃度：定量限界値 (LOQ) 未  
満の値を全て 0 とし、平均値を算出  
する。

上限平均濃度：検出限界値 (LOD) 未  
満の値を検出限界値に、検出限界値  
以上定量限界値未満の値を定量限界  
値とし、平均値を算出する。

1) AF4 種の結果 (表 1)

AF4 種のうち、AFB<sub>1</sub> のみが検出され  
た。検出されたのはコーンスープと  
コーン菓子それぞれ 1 検体で濃度は  
共に 0.12 $\mu$ g/kg であった。

2) OTA の結果

OTA はいずれの検体からも検出され  
なかった。

3) FB3 種の結果 (表 2)

コーンスープとコーン菓子において  
主に検出され、特にコーン菓子では  
FB<sub>1</sub> が 84.6%、

FB<sub>2</sub>が53.8%、FB<sub>3</sub>が46.2%と高い検出率であった(図8)。汚染濃度(FB<sub>1</sub>、FB<sub>2</sub>とFB<sub>3</sub>の合計値)については、陽性の20検体のうち18検体で50µg/kg以下であったが、150µg/kgを上回るものが2検体あった(図9)。

#### 4) T-2、HT-2の結果(表3)

T-2が小麦菓子とコーン菓子で、HT-2が小麦菓子、コーン菓子及びコーンスープで検出された(図10)。コーン菓子におけるT-2の検出率は46.2%と高いものの、最大値は0.3µg/kgと汚染濃度は低かった。陽性の10検体のうち、9検体でT-2とHT-2の合算値が1µg/kgと汚染濃度は低いが、小麦菓子の1検体において合算値が10µg/kgを上回った(図11)。

#### 5) DONの結果(表4)

飲料以外の5つのカテゴリーで検出され、小麦菓子で40.0%、コーンスープで41.7%、コーン菓子で69.2%と高い検出率であった(図10)。DONが検出された31検体のうち、19検体で10µg/kg以下と汚染濃度は低かったが、コーン菓子2検体とコーンスープ1検体で50µg/kg以上の汚染が確認された(図12)。

#### 6) ZENの結果(表5)

小麦菓子、コーンスープ、コーン菓子と米菓子において検出された(図10)。陽性の15検体全てにおいて10µg/kg以下と汚染濃度は低かった(図13)。

### D. 考察

#### 添加回収試験について

OTA、DON、T-2、HT-2及びZENについては良好な結果が得られた。AF類の一部で70%を若干下回ったが、スクリーニングには十分な回収率と考えた。米菓子においてFB類の十分な回収率が得られなかった。

FBの精製については厚生労働科学研究の実態調査では強陰イオン交換(SAX)カラムが用いられたため、予備検討でSAXを用いて米菓子中のFBの精製を試みたが、十分な回収率が得られなかった。本研究ではイムノアフィニティーカラムを用いたが、米菓子でFBが検出されたものは1検体のみで、またその1検体にはコーンも材料として含まれており、他の食品の傾向からFBはコーン由来と推測された。よって回収率が30~50%であることを考慮にいても、米菓子からFB類は検出されないと考えた。

### 実態調査

#### 1) 検出率について

図14に今年度調査を実施した90検体におけるカビ毒の検出率を示した。全体的な傾向として、AF類やOTAといった*Aspergillus*属真菌が生産するカビ毒の検出率は非常に低く、FB類、トリコテセン類やZENといった*Fusarium*属真菌が生産するカビ毒の検出が主であった。

#### 2) 検出濃度について

AFB<sub>1</sub>がコーン加工品2検体から検出されたが、どちらも0.12µg/kgと日本で設定されている基準値10µg/kgと比較すると非常に低濃度であった。しかし、EUにおいては乳幼児用食品中のAFB<sub>1</sub>に対しては0.10µg/kgという低い規制値が設定されており、今回AFB<sub>1</sub>が検出された2検体はその規制値を超えていた。次年度もコーン加工品中のAF類については注視する必要があると考えられた。

フモニシン類について、コーンスープにおける汚染濃度は全て5µg/kg以下であり、低レベルであった。一方コーン菓子においてはFB<sub>1</sub>濃度が100µg/kg程度のものが2検体認められた。ただ、フモニシンについ

て最も厳しい規制を行っている EU においてもその基準値は  $FB_1$  と  $FB_2$  の合計値  $200\mu\text{g}/\text{kg}$  であり、フモニシンの毒性の観点からは汚染レベルは低いと考えられた。

DON について、ほとんどの検体において  $100\mu\text{g}/\text{kg}$  以下であったが、コーン菓子 1 検体において  $160\mu\text{g}/\text{kg}$  が検出された。日本においては小麦に対してのみ暫定基準値  $1100\mu\text{g}/\text{kg}$  が設定されているが、EU においては乳幼児用食品に規制値  $200\mu\text{g}/\text{kg}$  が設定されている。その規制値を上回ってはいないものの、近い濃度を含む検体が確認されたことから、コーンを原料とする食品中の DON については注視する必要があると考えられた。

T-2 トキシンと HT-2 トキシンについて、これらカビ毒の検出感度が高いため、検出はされるものの、汚染濃度は低かった。これらカビ毒について規制を行っている国は少ないが、ロシアにおいて乳幼児用食品中の T-2 トキシンに対する規制値  $50\mu\text{g}/\text{kg}$  が設定されている。この規制値を上回る検体は認められなかったが、小麦菓子 1 検体において HT-2 トキシン  $9.6\mu\text{g}/\text{kg}$  が検出された。平成 22 年度より厚生労働科学研究によって実施されている T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの汚染実態調査の結果において、直接摂取する食品で HT-2 トキシンが  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  検出されるものは非常に限られており、乳児用食品においても T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの汚染調査を実施する必要性が示された。

ZEN について、その汚染濃度は低く、陽性の 15 検体全て  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  以下で、最大値はコーンスープの  $6.9\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。EU においては乳幼児用食品中の ZEN について規制値  $20\mu\text{g}/\text{kg}$  が設定されており、今回調査

を行った検体の中で EU の規制値を超えるものはなかったものの、コーン加工品については調査を継続する必要性が考えられた。

## E. 結論

計 90 検体の乳幼児用食品について 12 種のカビ毒の汚染実態を調査した。その結果、主にコーン加工品において、フモニシン類やトリコテセン類といったフザリウム属真菌により生産されるカビ毒汚染が生じている実態が明らかとなった。EU において乳幼児用食品中のカビ毒に対して設定されている規制値を上回る検体は認められなかったものの、規制値に近い濃度のフモニシンや DON の共汚染が生じている検体があり、毒性の相乗作用により未知の健康被害を引き起こす懸念が考えられた。

以上の結果より、本研究の第一段階である「カビ毒汚染が生じている乳幼児用食品の絞込み」は完了した。来年度は第二段階として、コーン加工品についてカビ毒同時精製・定量法を開発し、第三段階としてその分析法を用いた汚染調査を実施する。得られた結果より、乳幼児食品中のカビ毒のリスク評価を行う。

## F. 研究発表（本研究に関するもの）

### 1. 学会発表

吉成 知也、成川 絢子、大西 貴弘、寺嶋 淳：乳幼児用食品におけるカビ毒汚染のリスク評価に関する研究

第 108 回日本食品衛生学会学術講演会  
(2014.12)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし