

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。26 年度に市販の乳幼児用食品 90 検体を対象に 12 種のカビ毒の汚染実態調査を行った結果、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。この結果を受け、今年度はコーン菓子、コーンスープ及び小麦菓子を対象とした 12 種のカビ毒一斉同時定量分析法を開発し、さらにその一斉分析法を用いて乳幼児用食品中の 12 種のカビ毒の定量分析を行った。

2 種のイムノアフィニティーカラムを組み合わせることにより、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、デオキシニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノンの計 12 種のカビ毒を 3 種の食品から同時に精製し、LC-MS/MS による一斉定量を行う方法を考案した。添加回収試験の結果、デオキシニバレノールの回収率が 60～70%であったものの、その他の 11 種のカビ毒については回収率が 100%前後と良好な結果が得られた。また、自然汚染検体を用いた検討の結果、一斉分析法による定量値は個別に分析した場合と同程度であった。

開発した一斉同時分析法を用いて、コーン菓子 7 件、コーンスープ 6 件、小麦菓子 17 件、の合計 30 件について、汚染調査を行った。アフラトキシン類 4 種、オクラトキシン A、T-2 トキシンと HT-2 トキシンについては、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、コーン菓子のみで検出され、最高濃度（B₁、B₂、B₃ の合算値）は 23.2μg/kg であった。DON については、コーン菓子と小麦菓子から検出され、最高濃度はコーン菓子における 22.4μg/kg であった。ゼアラレノンはコーン菓子とコーンスープから検出されたが、汚染濃度は非常に低かった。

以上の結果より、27 年度においては乳幼児用食品におけるカビ毒汚染を効率良く調査するための一斉分析法の開発と、我が国に流通する乳幼児用食品中のカビ毒の汚染実態を明らかにすることに成功した。

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中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 2016 年現在、全食品中の総アフラトキシンに $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 、乳中のアフラトキシン M_1 に $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 、小麦玄麦中のデオキシニバレノール(DON)に $1.1\text{mg}/\text{kg}$ 、リンゴ果汁中のパツリンに $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 の最大レベルはトウモロコシでそれぞれ $10\mu\text{g}/\text{kg}$ と $1750\mu\text{g}/\text{kg}$ が設定されているのに対し、乳幼児用食品ではそれぞれ $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ と $200\mu\text{g}/\text{kg}$ と $1/20 \sim 1/10$ の値が設定されている。2015 年に設定された DON に対する Codex 規格においては、玄麦については最大レベルが $2\text{mg}/\text{kg}$ であるのに対し、穀物を原材料とした乳幼児用食品についてはその $1/10$ の $0.2\text{mg}/\text{kg}$ である。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 2010～2015 年度には小麦、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ために、26 年度に市販の乳幼児用食品 90 検体を対象に 12 種のカビ毒の汚染実態調査を行った。その結果、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。この結果を受け、今年度は第二段階として、コーン菓子、コーンスープ及び小麦菓子を対象とした 12 種のカビ毒一斉同時定量分析法を開発する。さらに第三段階として、一斉分析法を用いて乳幼児用食品中の 12 種のカビ毒を定量分析する。

B. 研究方法

検体

実態調査に用いた乳幼児用食品は、2015 年以内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。

カビ毒標準品

アフラトキシン 4 種 (B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2) 混合用液、DON、T-2 トキシン、HT-2 トキ

シン、ゼアラレノンの粉末は Sigma-aldrich 社製を、フモニシン B₁、B₂、B₃ 溶液は Fluka 社製を、オクラトキシン A の粉末は 和光(株)社製を用いた。フモニシン以外のカビ毒については、アセトニトリルを用いて希釈混合し、終濃度がアフラトキシン類とオクラトキシン A は 0.5µg/mL、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノンは 5µg/mL、DON は 20µg/mL となるような標準溶液を調製した。フモニシン類については、50%アセトニトリルを用いて希釈混合し、終濃度 10µg/mL となるよう調製した。

12 種カビ毒一斉分析法

抽出は、試料 5g に塩化ナトリウム 1g と抽出溶媒メタノール：水 (70 : 30) 20mL を加え、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した。残渣に再び抽出溶媒メタノール：水 (70 : 30) 20mL を加え、20 分間振盪し、遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離した。2 回の抽出液を混合し、10mL を PBS (タブレット、タカラバイオ(株)社製から調製した) 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。

2 種のイムノアフィニティーカラム(AOF MS-PREP と DZT MS-PREP、R-Biopharm 社製) をアダプターで連結し、リザーバーをさらにその上に装着した(図 1)。ろ過後の希釈液 20mL をリザーバーに添加し、自然落下で溶出させた。蒸留水 20mL で洗浄後、メタノール 1.0mL で溶出後、さらに蒸留水 1.0 mL で溶出した。溶出液はそのまま試験溶液とした。

< LC-MS/MS の測定条件 >

HPLC

装置 : LC-20A シリーズ (島津製作所)

カラム : L-column2 ODS

(METAL FREE)

2.0mm×150mm, 3µm

((一財)化学物質評価研究機構)

カラム温度 : 40

移動相 : A 水

B メタノール

いずれも 2mM 酢酸アンモニウムと 0.5%酢酸を含む

分離条件 : 0分 A : B = 70 : 30

10分 A : B = 10 : 90

12分まで保持

流速 : 0.2mL/分

注入量 : 20µL

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 : 10µL

MS

装置 : 3200 Q Trap システム (ABSciex)

イオン化 : ESI

モニタリングイオン :

アフラトキシン B₁ (positive) 313/241

アフラトキシン B₂ (positive) 315/287

アフラトキシン G₁ (positive) 329/200

アフラトキシン G₂ (positive) 331/189

オクラトキシン A(positive) 404/239

フモニシン B₁(positive) 722/352

フモニシン B₂(positive) 706/336

フモニシン B₂(positive) 706/336

T-2 トキシン (positive) 484/215

HT-2 トキシン (positive) 442/263

DON (negative) 295/265

ゼアラレノン(negative) 317/131

添加回収試験

12 種のカビ毒が陰性であることが確認されたコーンスープ、コーン菓子、小麦菓子の 3 種試料について、12 種のカビ毒が以下の濃度になるよう標準品混合溶液を添加した。

アフラトキシン類：5 μ g/kg

オクラトキシン A：5 μ g/kg

フモニシン類：100 μ g/kg

T-2 トキシン、HT-2 トキシン：50 μ g/kg

ゼアラレノン：50 μ g/kg

DON：200 μ g/kg

(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

12 種カビ毒一斉分析法の開発について

1) 精製法

食品からの複数のカビ毒を精製可能なカラムとしては、多機能カラム、分子鑄型ポリマーなどの固相カラムやイムノアフィニティーカラムが市販されている。一般的に精製能については固相カラムよりもイムノアフィニティーカラムが高いとされているが、固相カラムは価格が安いことや操作が簡便であるという利点がある。そこでまずは固相カラム(スピン型の多機能カラムと分子鑄型ポリマーカラムの 2 種)を用いて予備検討を行ったが、十分な精製効果が得られなかった。固相カラムは未加工の穀類といった比較的加工度の低い食品については精製が可能であることが多いが、本研究

の分析対象であるコーン菓子や小麦菓子といった加工食品が有する複雑なマトリクスには適用できなかったと考える。そこで、固相カラムより精製効果が高いとされているイムノアフィニティーカラムを本研究で用いることとした。文献検索を行ったところ、穀類や乳幼児用食品などに含まれるカビ毒 11 種の同時精製分析を行った研究が報告されていたため、その文献を参考に 3 種類の乳幼児用食品からのカビ毒 12 種の開発を行うこととした¹⁾。

2) 検出法

昨年度は 12 種のカビ毒について、a) アフラトキシン類、b) オクラトキシン A、c) フモニシン類、d) T-2 トキシン、HT-2 トキシン、e) ゼアラレノン、DON の 5 グループに分けて LC-MS/MS を用いて検出を行った。用いた移動相はそれぞれ異なり、アフラトキシン類とオクラトキシン A は酢酸アンモニウム/酢酸の水溶液とメタノール、フモニシン類はギ酸水溶液とアセトニトリル、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノン及び DON は酢酸アンモニウム水溶液とメタノールといったように、それぞれのカビ毒を良好なピーク形状でかつ感度良く検出するために、3 種類の溶媒と使い分けた。しかし、今年度は 1 種の溶媒で 12 種のカビ毒を一斉に検出する必要があるため、まずは最適な溶媒組成の検討を行った。上述の 3 種類の移動相を用いて 12 種のカビ毒を一斉に分析してみたところ、A 溶媒として 2mM 酢酸アンモニウムと 0.5% 酢酸の混合水溶液を、B 溶媒としてメタノールを用いた時にいずれのカビ毒についても良好な感度を得ることが出来た。しかし、フモニシン類のピーク形状が良好でなかったため、B 溶媒にも 2mM 酢酸アンモニウムと 0.5% 酢酸を

添加したところ、ピーク形状が改善した。さらにカラムをメタルフリーの素材のものをを用いることで、さらなるピーク形状の改善が認められた。標準品の LC-MS/MS クロマトグラムを図 2 及び 3 に示した。なお、良好な感度を得るために、DON とゼアラレノンはネガティブモード、それ以外の 10 種のカビ毒はポジティブモードでイオン化を行う必要があるが、本研究で用いた LC-MS/MS は分析中のネガティブモードとポジティブモードの切り替えが出来ないため、一つの試験溶液を両モードで 2 回測定することとした。標準品のピークから S/N 比を求め、S/N=3 と 10 に相当する濃度をそれぞれ検出限界値と定量限界値として算出した(表 1)

3) 抽出法の検討について

まずは既報の方法¹⁾に従い、添加回収試験を実施した。抽出方法と回収率を表 2 に示した。アフラトキシン類、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンについては良好な回収率が得られたものの、コーン菓子とコーンスープ中のフモニシン類とオクラトキシン A、3 種の食品の DON において回収率が 60%を下回った。一部のカビ毒の回収率が低かった原因として、抽出溶媒中のメタノールが抗原抗体反応に影響した可能性が考えられたため、抽出溶液の希釈率を 5 分の 1 から 13 分の 1 に変更したが、フモニシン類の回収率は改善しなかった。

そこで、抽出溶媒を 70%メタノールからフモニシンの抽出に一般的に用いられる組成のもの(アセトニトリル:メタノール:水=1:1:2 の混液)に変更し、さらに抽出効率を上げるために抽出回数を 2 回とした。アセトニトリルによる抗体への影響を軽減するために抽出溶液の希釈率を 9 分の 1 と

した。また、抽出回数と希釈率を増やしたことで試験溶液中のカビ毒の濃度が下がり、定量限界値が下がることを防ぐために、カラムからの溶出液を窒素気流によって乾固し、再溶解する濃縮操作を加えた。この方法で添加回収試験を行った結果を表 3 に示した。コーン菓子の結果においてはフモニシンの回収率が上昇し、12 種全てのカビ毒で回収率が 60%を上回った。しかし、アフラトキシン B₁、アフラトキシン G₁ とオクラトキシン A の回収率は 70%以下で、さらにバラつきが大きく値が 50%を下回ることもあった。小麦菓子の結果においては、アフラトキシン類の回収率が 19~42%と非常に低い値であった。この他にも抽出溶媒を PBS やアセトニトリル水溶液に変更して検討したものの、十分な回収率が得られなかった。これらの結果から、抽出溶媒にアセトニトリルを含む溶液を用いると回収率がばらつくこと、抽出液の希釈倍率を上げても回収率は改善しないこと、溶出液の濃縮操作も回収率のばらつきの原因となることがわかった。そこで、抽出は 70%メタノール溶液を用いて 2 回行い、希釈は 5 分の 1 とし、溶出液は濃縮せずに直接 LC-MS/MS 分析に供することとした。その結果を表 4 と図 4 に示した。コーン菓子における OTA と 3 種の食品における DON の回収率が 60~70%であったものの、他のカビ毒の回収率は 80~110%と良好であった。また、値のバラつきもほとんどが 10%未満と良好であった。以後、この方法を 12 種カビ毒一斉分析法として用いることとした。

4) 自然汚染検体を用いた検討

上述の添加回収試験に加え、今年度開発した一斉分析法の性能を評価するために、カビ毒を個別に測定した値と一斉分析法の

定量値の比較を行った。その結果を表 5 に示した。コーン菓子中のフモニシン類については、2 つの方法で同程度の定量値が得られた。コーンスープにおいては個別の分析ではフモニシン B₁ が 1.8µg/kg 検出されたが、同時分析法では検出されなかった。DON についてはコーン菓子とコーンスープともにほぼ 2 つの方法で同程度の定量値が得られた。その他のカビ毒については全て ND（検出限界値未満）であった。

5) 一斉分析法を用いた実態調査

2015 年度は、コーン菓子 7 検体、コーンスープ 6 検体、小麦菓子 17 検体の計 30 検体について、一斉分析法を用いて 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。

Lower bound(LB): 定量限界値(LOQ) 未満の値を全て 0 とし、平均値を算出する。

Upper bound(UB): 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。

・コーン菓子の結果(表 6)

アフラトキシン類 4 種、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びオクラトキシン A が定量限界値以上の濃度で検出された検体は認められなかった。フモニシン類については B₁ が 71.4% と最も高頻度で検出され、平均濃度(LB-UB) は 3.7-3.8µg/kg で、最大濃度は 13.7µg/kg であった。ゼアラレノンの陽性率は 42.9%、平均濃度(LB-UB) は 0.4-0.7µg/kg であり、最大濃度は 1.5µg/kg であった。DON の陽性率は 100%、平均濃度は 13.7µg/kg であり、最大濃度は 22.4µg/kg であった。

・コーンスープの結果(表 7)

ゼアラレノン以外のカビ毒の濃度は全て定量限界値であった。ゼアラレノンの陽性率は 16.7%、平均濃度(LB-UB) は 0.1-0.3µg/kg であり、最大濃度は 0.7µg/kg であった。

・小麦菓子の結果(表 8)

DON 以外のカビ毒の濃度は全て定量限界値未満であった。DON の陽性率は 23.5%、平均濃度(LB-UB) は 3.4-7.1µg/kg であり、最大濃度は 16.5µg/kg であった。

3 種の食品における陽性率と平均濃度(LB) を図 5 及び 6 にまとめた。

D. 考察

一斉分析法の開発について

昨年度の市販乳幼児用食品 90 検体のカビ毒実態調査の結果において、コーン菓子、コーンスープ及び小麦菓子において DON やフモニシン類が主に検出された。そこで今年度は実態調査の対象をそれら 3 種の食品に絞ることとし、また効率の良い調査を行うために 12 種のカビ毒一斉分析法の開発を最初に試みた。LC-MS/MS による一斉検出の条件とイムノアフィニティーカラムによる精製法を検討し、最適なプロトコルを考案し、添加回収試験によって評価を行った。その結果、DON の回収率が他のカビ毒と比較して低いものの、他のカビ毒については良好な結果が得られたため、一斉分析に用いることができると判断した。ただ、DON については回収率が 60 ~ 70% であり、実際に含まれる濃度より定量値が低くなる可能性がある。乳幼児用食品中の DON については Codex 規格で最大レベル 0.2mg/kg が設定されてことから厳密な定量値を求

める必要があるため、DONの回収率の改善は今後の検討課題である。一方で、実態調査のために入手した乳幼児用食品を用いて、個別にカビ毒を精製、定量した結果と一斉分析法により定量した結果を比較したところ、DONとフモニシンにおいてほぼ同様の定量値が得られた。2検体のみの検討であるため十分な考察は出来ないが、コーン菓子というグループに分類した食品の中でもそれぞれの加工度の違いによって回収率に差が生じる可能性が考えられる。また、DONとフモニシン類以外のカビ毒については自然汚染されたサンプルが手に入らなかったため、既存の方法と一斉分析法の比較を行うことは出来なかった。自然汚染検体を用いた分析法の性能の評価も今後の課題である。

実態調査

今年度は、一斉分析法を開発した3種の食品群に絞って実態調査を行った。コーン菓子についてはフモニシン類、DONとゼアラレノンが検出されたが、ゼアラレノンの汚染レベルは非常に低かった。フモニシン B₁の陽性率は70%と高かったものの、最も定量値が高い検体でも B₁と B₂の合算値が19µg/kgであり、EUにおいて乳幼児用食品に設定されている最大レベル(B₁と B₂の合算値)200µg/kgを大きく下回っていた。DONについて、陽性率は100%と極めて高いものの、最大でも22.4µg/kgであり、CodexやEUにおいて設定されている最大レベル(共に200µg/kg)を大きく下回って

いた。

コーンスープについては、ゼアラレノンのみが陽性であったが、定量値は最大でも0.7µg/kgであり、汚染レベルは非常に低かった。

小麦菓子については、DONのみが陽性であったが、陽性率は23.5%とコーン菓子と比較すると低い値であった。定量値は最大でも16.5µg/kgであり、CodexやEUにおいて設定されている最大レベル(共に200µg/kg)を大きく下回っていた。

E. 結論

昨年度の実態調査においてカビ毒汚染が認められた3種の乳幼児用食品群(コーン菓子、コーンスープ及び小麦菓子)について、12種のカビ毒一斉分析法を開発した。添加回収試験と自然汚染検体を用いた検討により、その一斉分析法は実態調査に使用できる性能を有すると判断した。30種の乳幼児用食品について、一斉分析法を用いてカビ毒汚染実態調査を行った結果、コーン菓子からフモニシン類とDONが高頻度で検出された。以上の結果より、本研究においては乳幼児用食品におけるカビ毒汚染を効率良く調査するための分析法の開発と、我が国に流通する乳幼児用食品中のカビ毒の汚染実態を明らかにすることに成功した。

F. 参考文献

1) Wilcox J et al. J Chromatogr A. 1400: 91-79, 2015.