

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）

総合研究報告書

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、2014～2015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した。

2014年度にはアフラトキシン類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種のカビ毒について、それぞれを個別に定量する分析法を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。添加回収試験によって性能を評価後、市販の乳幼児用食品90検体を対象に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、またトウモロコシ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、2015年度にはコーン菓子、コーンスープ及び小麦菓子の3種の食品を対象とした12種のカビ毒一斉同時定量分析法の開発を試みた。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、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、添加回収試験と自然汚染検体を用いた検討の結果、実態調査に用いることが出来る性能を有すると判断した。この一斉分析法を用いて30検体の乳幼児用食品中の12種のカビ毒の定量分析を行い、2年間でトータル120検体の実態調査を行った。

乳幼児用食品についてCodex規格が設定されており、かつ食品安全委員会によって耐容摂取量（1 $\mu$ g/kg体重/日）が提唱されているデオキシニバレノールについて、モンテカルロシミュレーションを用いた曝露量推定を行った。その結果、80パーセンタイル以下のDONの摂取量は0ng/体重kg/日で、99.5パーセンタイルにおいては880ng/体重kg/日であった。以上の結果より、我が国に流通する乳幼児用食品中のDONに対して早急な規制を行う必要性はないと考えられた。

以上の結果より、本研究が目標とした2項目は達成され、乳幼児用食品に対する基準値策定の必要性の判断をする上で重要な科学的根拠を提供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 3 月の時点では、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、初年度に第一段階として、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。次年度には第二段階として、絞り込んだ食品を対象とした 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、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。乳幼児用食品は多種多様なものが市販されているが、本研究においては形状や原材料をもとに、米菓子、小麦菓子、麦茶、コーン菓子、コーンスープ、レトルト食品の計 6 つのカテゴリーに分け、分析法の開発や結果の考察を行うこととした。

### 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  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $B_3$  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。カビ毒の化学構造式を図 1 に示した。

#### カビ毒の分析法

アフラトキシン類の分析については、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。フローチャート、標準品のクロマトグラム及び HPLC 条件は図 2 と 3 に示した。

オクラトキシン A の分析については、2004～2009 年度に厚生労働科学研究によって実施された実態調査で用いられた方法に従い行った。フローチャート、標準品のクロマトグラム及び HPLC 条件は図 3 と 4 に示した。

フモニシン類の分析について、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。フローチャート、標準品のクロマトグラム及び HPLC 条件は図 5 と 6 に示した。

DON、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンの分析については、2010～2015 年度に厚生労働科学研究による汚染実態調査で用いられた方法に従い行った。フローチャート、標準品のクロマトグラム及び HPLC 条件は図 7 と 8 に示した。

12 種カビ毒一斉分析法については、アフラトキシン類、オクラトキシン A とフモニシン類を精製可能なカラムと DON、ゼアラレノン、T-2 トキシンと HT-2 トキシンを精製可能なカラムの 2 種をアダプターで連結することによって一斉に精製する方法を用いた。フローチャート、標準品のクロマト

グラムは図 9 と 10 に示した。

<一斉分析法の 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 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) 329/200

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

オクラトキシン A(positive) 404/239

フモニシン B<sub>1</sub>(positive) 722/352

フモニシン B<sub>2</sub>(positive) 706/336

フモニシン B<sub>2</sub>(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

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)。

#### 添加回収試験

2014 年度は、6 種のカテゴリの乳幼児用食品それぞれについて、それぞれのカビ毒が以下の濃度になるよう添加し、精製・定量を行った。

アフラトキシン類：5 $\mu$ g/kg  
オクラトキシン A：5 $\mu$ g/kg  
フモニシン類：20 及び 100 $\mu$ g/kg  
T-2 トキシン、HT-2 トキシン：10 $\mu$ g/kg  
ゼアラレノン：10 $\mu$ g/kg  
DON：40 $\mu$ g/kg

2015 年度は、コーン菓子、コーンスープと小麦菓子について、それぞれのカビ毒が以下の濃度になるよう添加し、精製・定量を行った。

アフラトキシン類：5 $\mu$ g/kg  
オクラトキシン A：5 $\mu$ g/kg  
フモニシン類：100 $\mu$ g/kg  
T-2 トキシン、HT-2 トキシン：50 $\mu$ g/kg  
ゼアラレノン：50 $\mu$ g/kg  
DON：200 $\mu$ g/kg

#### DON の曝露量推計

##### 1) 摂取量のデータ

2005～2007 年にかけて行われた「食品摂取量・摂取頻度調査」の調査対象食品のうち、コーン菓子については「コーンスナック摂取量」を、コーンスープについては「クリームコーン缶摂取量」を、小麦菓子につ

いては「ハードビスケット」と「ソフトビスケット摂取量」の合計値を用いた。全年齢のデータから 1 歳から 6 歳までの摂取量のみを抽出した。

##### 2) 曝露量の計算

曝露量はモンテカルロシミュレーション解析用のソフトウェア CRYSTAL BALL (ORACLE 社製) を用いた。3 種それぞれの乳幼児用食品の DON 濃度と摂取量をランダムに選択後に掛け合わせ、さらに 3 種の食品からの DON 曝露量を足し合わせる操作を 100,000 回繰り返した。

#### C. 研究結果

##### 添加回収試験について

##### 1) 2014 年度の個別の分析法

アフラトキシン類 4 種の添加回収試験の結果を表 2 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。コーンスープのアフラトキシン B<sub>2</sub>、レトルト食品のアフラトキシン B<sub>1</sub>とアフラトキシン G<sub>1</sub>の回収率が 67%と若干 70%を下回った。

オクラトキシン A の添加回収試験の結果を表 2 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。

フモニシン類 3 種の添加回収試験の結果を表 3 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。

DON、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンの添加回収試験の結果を表 4 に示した。小麦菓子のゼアラレノン、レト

ルト食品の T-2 トキシンとゼアラレノンの回収率が 70%台であったが、その他は 80 ~ 110%と良好な結果が得られた。

## 2) 2015 年度の一斉分析法

結果を表 5 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。

### 実態調査について

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 検体の調査を実施した。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。そこで 2015 年度は調査対象を絞り、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 検体の調査を行った。2 年間で合計 120 検体の調査を行った。なお、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。

### ・アフラトキシン類の結果(表 6)

アフラトキシン類 4 種のうち、アフラトキシン B<sub>1</sub> が、2014 年度のコーン菓子とコ

ーンスープ 1 検体ずつから検出された。濃度は共に 0.1µg/kg であった。

### ・オクラトキシン A の結果

オクラトキシン A が検出された検体は認められなかった。

### ・フモニシン類の結果(表 7~9)

フモニシン B<sub>1</sub> と B<sub>2</sub> がコーン菓子、コーンスープと米菓子、フモニシン B<sub>3</sub> がコーン菓子と米菓子から検出された。最も陽性率が高かったのはフモニシン B<sub>1</sub> で、コーンスープ(2014 年度)で 58.3%、コーン菓子(2014 年度)で 84.6%、コーン菓子(2015 年度)で 71.4%、米菓子で 9.1%であった。フモニシン B<sub>1</sub> の平均濃度( LB )が最も高かったのがコーンスナック(2014 年度)の 20.8µg/kg で、最高濃度もコーンスナック(2014 年度)の 109µg/kg であった。

### ・T-2 トキシンと HT-2 トキシンの結果(表 10 と 11)

T-2 トキシンが小麦菓子とコーン菓子から、HT-2 トキシンが小麦菓子、コーンスープとコーン菓子から検出された。最も陽性率が高かったのがコーン菓子(2014 年度)中の T-2 トキシンの 46.2%で、最高濃度は小麦菓子(2014 年度)の 9.6µg/kg であった。

### ・ゼアラレノンの結果(表 12)

小麦菓子(2014 年度)、コーンスープ(両年度)、コーン菓子(両年度)と米菓子から検出された。平均濃度( LB )が最も高かったのがコーンスープ(2014 年度)の 1.0µg/kg で、最高濃度もコーンスープ(2014 年度)の 6.9µg/kg であった。

### ・DON の結果(表 13)

小麦菓子(両年度)、コーンスープ(2014年度)、コーン菓子(両年度)、米菓子、レトルト食品から検出された。平均濃度(LB)が最も高かったのがコーン菓子(2014年度)の21.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、最高濃度もコーン菓子(2014年度)の161 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

#### DONの曝露量推定

わが国の乳幼児におけるコーン菓子、コーンスープと小麦菓子からDONの摂取量をシミュレートした結果を表14に示した。80パーセント以下以下のDONの摂取量は0 $\text{ng}/\text{kg}/\text{日}$ で、90、95、98、99.5パーセントにおけるDONの摂取量はそれぞれ6.0、23.9、108、391、880 $\text{ng}/\text{kg}/\text{日}$ であった。

#### D. 考察

##### 分析法について(2014年度)

添加回収試験の結果、オクラトキシンA、DON、T-2トキシン、HT-2トキシン及びゼアラレノンについては良好な結果が得られた。アフラトキシン類の一部で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。フモニシン類については米菓子において十分な回収率が得られなかったが、その他の食品については60~100%に範囲に収まった。

##### 一斉分析法について(2015年度)

添加回収試験の結果、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0.2 $\text{mg}/\text{kg}$ 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。一斉分析法においては、T-2トキシン、HT-2トキシン、ゼアラレノン、DONの定量限界値が2014年度の実施した個別の分析法と比較して高かった。この原因としては、一斉分析法における移動層がそれぞれのカビ毒に対して最適な組成でないことと、カラムからの溶出液を濃縮する段階が無いためと考えられる。しかし、それぞれのカビ毒の汚染実態や諸外国における規制値を踏まえると、一斉分析法における感度は実態調査を行う上では十分であると考えられた。

#### 実態調査

##### 1) 検出率について

全体的な傾向としては、アフラトキシン類やオクラトキシンA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、フモニシン類、トリコテセン類やゼアラレノンといった*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

アフラトキシンB<sub>1</sub>が2014年度のコーン加工品2検体から検出されたが、濃度は共に0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と日本で設定されている規制値10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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アフラトキシンB<sub>1</sub>に対しては0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ という低い規制値が設定されており、今回アフラトキシンB<sub>1</sub>が検出された2検体はその規制値と同レベルであった。2015年度の検体からは検出されなかったが、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5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度のものが

2014 年度に 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 においてもその規制値は  $FB_1$  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、2014 年度のコーン菓子 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、2014 年度の小麦菓子 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。

ゼアラレノンについて、その汚染濃度は低く、陽性の 19 検体全て  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  以下で、最大値は 2014 年度のコーンスープの  $6.9\mu\text{g}/\text{kg}$  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。

#### 曝露評価について

コーン菓子、コーンスープと小麦菓子の 3 種類の食品による乳幼児における DON の曝露量推定を行った結果、99.5 パーセントイルにおける摂取量も食品安全委員会が提唱する DON の耐容一日摂取量 (TDI)  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日を下回っていた。このことから、乳幼児用食品中の DON に対して早急な規制を行う必要性はないと考えられる。しかし、今回曝露評価に用いたデータ数は 2 年間で収集した 120 検体のみであることや、99.5 パーセントイルにおける摂取量が  $880\text{ng}/\text{kg}$  体重/日と TDI に近い値であったことを踏まえると、今後も乳幼児用食品中の DON の実態調査を継続し、より正確な摂取量のデータを取得し、規制の必要性の有無を判断することが適切と考えられる。また、食品安全委員会による DON とニバレノールの評価書(平成 22 年 11 月 18 日付け府食第 872 号)において、過去に実施された曝露評価の結果が示されているが、99 パーセントイルにおける摂取量が  $2.58\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日(規制なし)となっている。本研究と過去の曝露評価において、用いた摂取量のデータは同一であるが、カビ毒の汚染量のデータについては本研究では乳幼児用食品を、過去の曝露評価では小麦玄麦の汚染量を用いており、これが摂取量に違いが出た原因と考えられる。玄麦の汚染量から曝露量を算出する場合、各食品における DON の減衰率を推定して行っているため、実際の食品の汚染量から算出する場合と比較して

誤差が大きくなると考えられる。よって、本研究において行った乳幼児用食品の汚染量から推定した摂取量がより実情を反映した値と考えられる。

#### E. 結論

初年度においては、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、コーン菓子、コーンスープ及び小麦菓子といったトウモロコシや小麦を原料とした食品群において、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。そこで次年度にはその 3 種の食品群について、効率の良いカビ毒汚染実態調査を実施するために、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、開発した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。さら

に 30 種の乳幼児用食品について、一斉分析法を用いた調査を行い、2 年間で計 120 検体の調査結果を得た。食品安全委員会において耐容摂取量が設定されている DON について、モンテカルロシミュレーションによる曝露量推計を行った結果、99.5 パーセントイル値においても TDI を下回っていた。以上の結果より、本研究は乳幼児用食品に対する基準値策定の必要性の判断をする上で重要な科学的根拠を提供することに成功した。

#### 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)