

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)

分担研究報告書

ステリグマトシスチンと 4,15-ジアセトキシシルペノールの汚染実態調査

研究分担者 吉成 知也 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

ステリグマトシスチン (STC) 及び 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) は、2016 年の FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) においてリスク評価がなされ、国際的に注目が集まっている。しかしながら、我が国におけるそれらカビ毒の汚染実態についてはこれまでほとんど報告がない。そこで、本研究事業において STC 及び 4,15-DAS を対象に日本に流通する食品における汚染実態を調査し、得られたデータから曝露評価を実施し、日本人の健康に対するそれらカビ毒の影響を評価することとした。2016 年度は両カビ毒の分析法の妥当性の確認と検出される食品のスクリーニングを行った。

国内の指定検査機関及び地方衛生研究所計 8 機関と協力して分析法の妥当性確認試験を行ったところ、両カビ毒において回収率の平均値は 90~100%に収まり、良好な結果が得られた。このことより、本年度考案した分析法は今後実態調査に用いることが可能と結論付けられた。汚染実態調査の結果では、STC は小麦粉、エン麦、ライ麦、ハト麦、雑穀米、コーングリッツ、アーモンド及びコーヒーにおいて陽性検体 (定量限界値 0.05 µg/kg) が認められた。陽性率が最も高かったのはライ麦の 50%、次いでコーヒーの 40%であった。最高濃度はライ麦における 7.1 µg/kg であった。4,15-DAS についてはハト麦のみから 63%の陽性率で検出され、最高濃度は 137 µg/kg であった。以上の結果から、日本に流通する食品に STC と DAS が混入している実態が明らかになり、実態調査を継続してリスク評価を行うための情報を取得する必要性が示唆された。

研究協力者

森田 剛史 (一財) 日本穀物検定協会

脇 ますみ 神奈川県衛生研究所

竹内 浩 三重県保健環境研究所

谷口 賢 名古屋市衛生研究所

橋口 成喜 川崎市健康安全研究所

中島 正博 名古屋市衛生研究所

本田 俊一 (一財) 日本冷凍食品協会

伊佐川 聡 (一財) 日本食品分析センター

藤吉 智治 (一財) 食品分析開発センター

SUNATEC

A. 研究目的

世界的に汚染頻度が高く、健康被害が予測されるカビ毒は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) で毒性評価が行われ、コーデックス委員会で規格策定が行われている。我が国はコーデックス委員会の加盟国であることから、コーデックス規格を食品の規格基準に採用することが厚生労働省の方針として決められている。

厚生労働省は、リンゴジュース中のパツリン、小麦玄麦中のデオキシニバレノール、全食品中の総アフラトキシン及び乳中のアフラトキシン M₁ に対して規制を行っている。また、コーデックス規格が定められているオクラトキシン A やフモニシンに関しては、本研究事業で実態調査が行われており、オクラトキシン A については食品安全委員会において我が国におけるリスク評価が実施され、フモニシンについては行われているところである。また、JECFA において毒性評価が行われた T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンの 3 種のフザリウムトキシンについても汚染実態調査を行った。

今年度より本事業が研究対象とするステリグマトシスチン (STC) と 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) については、日本における汚染実態はほとんどわかっていない。一方で、STC については欧州食品安全機関 (EFSA) により 2013 年にリスク評価、2015 年に汚染実態調査の結果が報告され、また、2016 年に JECFA においてリスク評価が実施された。4,15-DAS も同様に 2016 年の JECFA で評価され、今後 EFSA においてもリスク評価が実施される予定である。このような背景からこの 2 種のカビ毒に対する関心が国際的に高くなってきている。

STC と 4,15-DAS の確立された分析法は無い。初年度においてはまず分析法を開発する対象食品を決定するためにヨーロッパで実施された実

態調査の結果を参照に STC 又は 4,15-DAS が検出される食品のスクリーニングを行う。

B. 研究方法

(1) STC の汚染実態調査 (フローチャート 1)

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水 (85：15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。添加回収試験の場合はそれぞれのカビ毒で定めた用量を添加し、暗所に 1 時間放置した後に抽出を行った。遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離した。コーヒーについては、抽出液を多機能カラム MultiSep 226 AflaZon+ (Romer Labs 社製) に通し、流出液 5.5 mL を回収した。

精製はイムノアフィニティーカラム (IAC、堀場製作所社製 AFLAKING STC) を用いた。抽出液 5.0 mL をピペッターで 50 mL のメスフラスコにとり、PBS で 50 mL にメスアップした後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。

ろ液 20 mL を IAC に添加し、PBS 10 mL と蒸留水 10 mL 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、残渣をアセトニトリル 0.5 mL で溶解後、さらに蒸留水 0.5 mL を加えてから混合したものを試験溶液とした。

< LC-MS/MS の測定条件 >

HPLC

カラム：InertSustain C18

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度：40

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件：0分 A：B = 60：40

13分 A：B = 10：90

流速：0.2 mL/分

注入量：10 μL

MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：325[M+H]⁺>281

回収率はそれぞれの食品の中で汚染がないものを選び、0.5 µg/kg 及び 5 µg/kg となるよう STC を添加し、抽出、定量を行って算出した。

(2) 4,15-DAS の汚染実態調査(フローチャート2)

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水(85：15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。添加回収試験の場合はそれぞれのカビ毒で定めた用量を添加し、暗所に 1 時間放置した後に抽出を行った。遠心分離(1410g、10 分間)により抽出液を分離した。

精製は多機能カラム(昭和電工社製 Autoprep MF-T 1500)を用いた。抽出液約 10 mL をカラムに入れ、最初の流出液 3 mL は捨て、次いで流出する約 2.4 mL を試験管に採った。その溶出液から 2.0 mL を別の試験管に正確にとり、窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル：水(1：9) 0.5 mL で溶解したものを試験溶液とした。

<LC-MS/MS の測定条件>

HPLC

カラム：InertSustain C18

2.1×150 mm, 3 µm

カラム温度：40

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件：0 分 A：B = 80：20

8 分 A：B = 10：90

12 分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：10 µL

MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：384[M+H]⁺>307

回収率はそれぞれの食品の中で汚染がないものを選び、5 µg/kg 及び 50 µg/kg となるよう STC を添加し、抽出、定量を行って算出した。

(3) コラボラティブスタディ

STC の分析法

国内の 8 分析機関にそれぞれ以下のものを配付し、プロトコールに従った分析を依頼した。

- ・STC 不検出の小麦玄麦破砕物 約 200 g
- ・STC 標準品アセトニトリル溶液(検量線作成用 10 mg/L) 約 2 mL
- ・STC 添加回収試験溶液 0、62.5、625 µg/L の濃度のアセトニトリル溶液 300 µL を入れた小瓶を 2 つずつ。濃度は未記載で番号のみ記した。

・イムノアフィニティーカラム 8 本

4,15-DAS の分析法

国内の 8 分析機関にそれぞれ以下のものを配付し、プロトコールに従った分析を依頼した。

- ・4,15-DAS フリー小麦玄麦粉砕物 約 200 g
- ・4,15-DAS 標準品アセトニトリル溶液(検量線用 10 mg/L) 約 2 mL
- ・4,15-DAS 添加用溶液 0、625、6250 µg/L の濃度のアセトニトリル溶液 300 µL を入れた小瓶を 2 つずつ。濃度は未記載で番号のみ記した。
- ・多機能カラム 8 本

C. 研究結果

(1) STC の汚染実態(表 1、図 1)

穀類及びその加工品 8 品目、豆類及びその加工品 3 品目と木の実 2 品目の合計 233 検体について STC 汚染を調べた。最も陽性率が高かったのはライ麦の 50%であり、続いてコーヒーの 40%、小麦粉(国産)の 39%であった。5 µg/kg 以上の濃度の STC が検出されたのはライ麦とハト麦でそれぞれ 1 件ずつ、1.5~5 µg/kg の濃

度範囲の STC が検出されたのはライ麦と小麦粉（国産）でそれぞれ 1 件ずつであった。平均濃度が最も高かったのはライ麦とハト麦の 0.3 µg/kg で、続いてコーヒーの 0.2 µg/kg であった。最大濃度はライ麦の 7.1 µg/kg であった。小麦粉（輸入）、エン麦、雑穀米、米及びアーモンドにおいて陽性検体が認められたが、濃度は全て 0.5 µg/kg 以下であった。ビール、小豆、黒豆及びクルミでは陽性検体は認められなかった。

（ 2 ） 4,15-DAS（表 2）

穀類 4 品目と小豆の合計 102 検体について 4,15-DAS の汚染を調べた。小麦、ライ麦、エン麦及び小豆に陽性検体はなく、ハト麦でのみ陽性検体が認められ、陽性率は 63% であった。ハト麦における平均濃度は 20 µg/kg、最大濃度は 137 µg/kg であった。

（ 3 ） コラボラティブスタディ

STC の分析法

各機関から得られたデータをまとめ、統計学的パラメーターを算出した結果を検討した。ブランクの検体の定量値はいずれの機関においても 0.05 µg/kg 未満であった。0.5 µg/kg 添加群の回収率は 80 ~ 110% で平均値が 100%、5 µg/kg 添加群の回収率は 70 ~ 112% で平均値が 92% であった。室間相対標準偏差 (RSD_R) は 0.5 µg/kg 及び 5 µg/kg 添加群でそれぞれ 10% 及び 12% で、HorRat は 0.4 及び 0.6 であった。

4,15-DAS の分析法

各機関から得られたデータをまとめ、統計学的パラメーターを算出した結果を検討した。ブランクの検体の定量値はいずれの機関においても 0.5 µg/kg 未満であった。5 µg/kg 添加群の回収率は 77 ~ 116% で平均値が 97%、50 µg/kg 添加群の回収率は 75 ~ 116% で平均値が 94% であった。室間相対標準偏差 (RSD_R) は 5 µg/kg 及

び 50 µg/kg 添加群でそれぞれ 12% 及び 12% で、HorRat は 0.6 及び 0.6 であった。

D. 考察

（ 1 ） STC の汚染実態

日本における STC の汚染実態については情報がほとんど得られていなかったため、初年度は幅広い食品群を対象に汚染調査を行った。その結果、麦類、コーングリッツ、米類などの穀類やコーヒー、アーモンドにおいて STC 陽性検体が認められた。小麦粉については国産と輸入に分けてデータを示したが、陽性率は国産で 39%、輸入で 5% と差があった。また、国産の検体の中でも特に北海道産のものにおいて陽性率、汚染濃度共に高い傾向であった。EFSA から 2015 年に報告されたヨーロッパでの調査の結果では、小麦粉 85 検体における STC の検出率は 4% で、最高濃度は 0.66 µg/kg であった。国産の小麦粉における STC の汚染頻度と最高濃度はともにヨーロッパの結果よりも高く、小麦の STC 汚染には地域差が生じている可能性が考えられた。ライ麦については北海道産、アメリカ産、カナダ産、ドイツ産が主であるが、小麦粉と同様に北海道産で陽性率が高かった。米において陽性率は 30% であったが、最高濃度は 0.1 µg/kg で、小麦やライ麦と比較すると汚染レベルは低かった。ヨーロッパでの実態調査では米 28 検体中 27 検体から STC が検出され、そのうち 10 検体が 1.5 ~ 5 µg/kg の範囲で汚染しており、最高濃度は 5.5 µg/kg であり、我々の結果よりも高い汚染レベルであった。穀類以外ではコーヒーにおいて STC が 1.1 µg/kg 検出された検体が認められた。コーヒーでは STC 以外にもアフラトキシン類やオクラトキシン A が検出されることが知られており、複合汚染が生じている可能性がある。

（ 2 ） 4,15-DAS の汚染実態

STCと同様に4,15-DASの日本における汚染実態の情報もほとんど得られていないため、4,15-DASの生産菌であるフザリウム属が感染しやすい穀類と4,15-DASの類縁体であるT-2トキシンが高頻度で検出された小豆を対象に調査を行った。その結果、ハト麦においてのみ陽性検体が認められた。ハト麦においては国産と東南アジア産の両方に4,15-DAS陽性検体が認められたが、汚染濃度は東南アジア産の検体の方が高い傾向にあった。昨年度までの調査の結果でT-2トキシンやHT-2トキシンが検出された小麦や小豆では4,15-DASは検出されなかったことから、4,15-DASの汚染が生じる条件はT-2トキシンやHT-2トキシンと異なると考えられる。

(3) コラボラティブスタディ

STCについては、汚染実態調査の結果と摂取量を勘案し、小麦玄麦を対象に分析法の妥当性を検証することにした。4,15-DASについては、ハト麦のみで陽性検体が認められたが、ハト麦の摂取量はそれほど多くないことを勘案し、まずはSTCと同じく小麦玄麦で分析法を検討することとした。

Codexが定める分析法の性能のガイドラインによると、添加濃度が1、10及び100 µg/kgの試験における回収率はそれぞれ40～120%、60～115%及び80～110%の範囲内に収まること、RSD_Rはいずれの添加濃度においても44%以下であることとなっている。今回実施したSTC及び4,15-DASのコラボラティブスタディではこれらのクライテリアを満たした。また、Commission Regulation (EC) No 836/2011ではHorRatが2未満であることとされており、このクライテリアも今回の結果は満たした。以上の結果より、今年度検証したSTCと4,15-DASの分析法の妥当性は確認されたと考えられた。

E. 結論

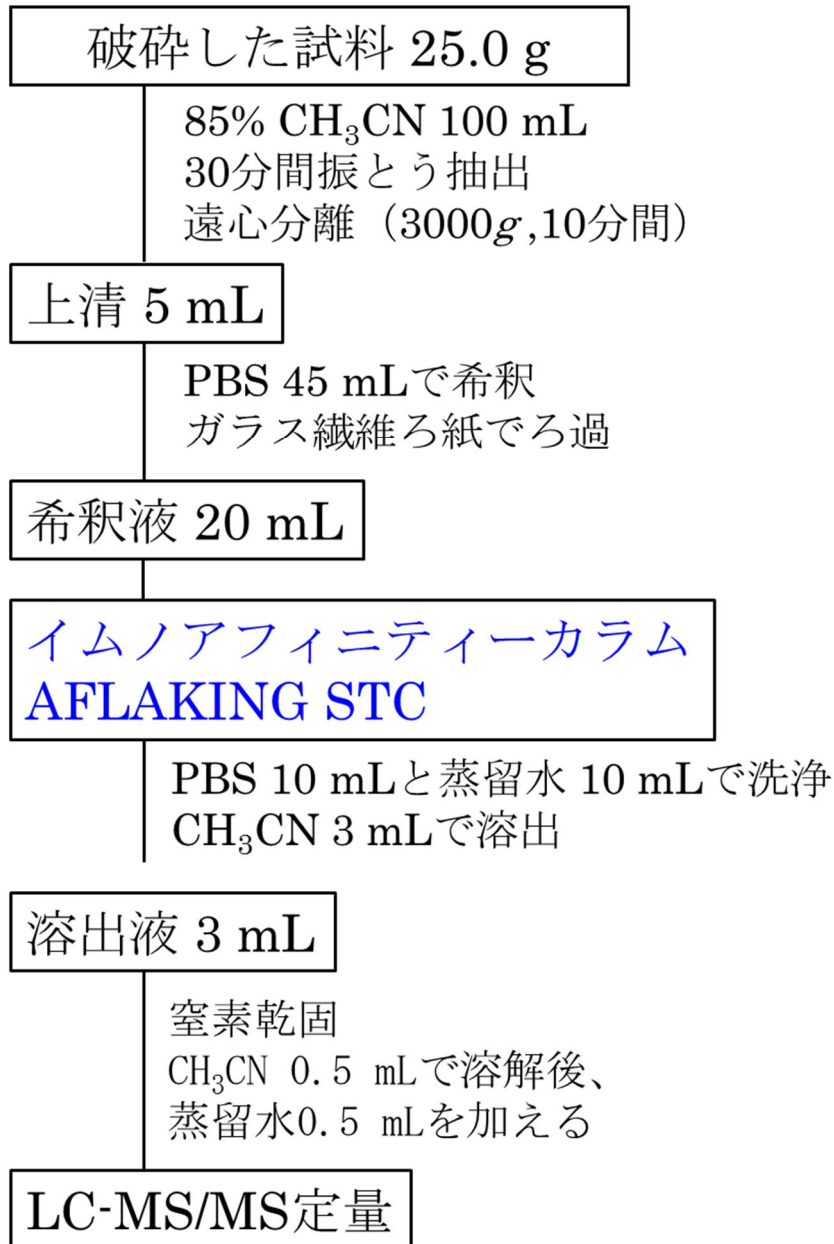
STCと4,15-DASについて日本に流通する食品を対象に汚染実態調査を行った。STCは穀類を中心に幅広い食品で汚染が生じていることが確認された。4,15-DASはハト麦でのみ陽性検体が認められ、T-2トキシンと比べると汚染の範囲が限定的であることがわかった。また、コラボラティブスタディを実施し、STCと4,15-DASの分析法に妥当性があることを確認した。来年度は妥当性の確認された分析法を用い、検体数を増やした調査を行う。

F. 研究業績

【学会発表】

1) 吉成知也、竹田名菜水、寺嶋淳、小林直樹、小西良子：発がん性を有するカビ毒ステリグマトシスチンの我が国に流通する食品における汚染実態、第112回日本食品衛生学会学術講演会(2016.10)

フローチャート1 ステリグマトシスチンの分析法



フローチャート 2 4,15-ジアセトキシシルペノールの分析法



表1 ステリグマトシスチンの汚染実態

製品	検体数	陽性数	各濃度 (µg/kg) に含まれる検体数				平均濃度 (µg/kg)	最大濃度 (µg/kg)
			LOQ-0.5	0.5-1.5	1.5-5	>5		
穀物								
小麦粉 (国産)	31	12 (39 %)	11		1		0.1	2.5
小麦粉 (輸入)	19	1 (5 %)	1				0.008	0.1
オーツ麦	10	1 (10 %)	1				0.01	0.1
ライ麦	30	15 (50 %)	9	4	1	1	0.3	7.1
ハト麦	23	4 (17 %)	1	3		1	0.3	5.3
コーングリッツ	12	2 (17 %)		2			0.1	1.0
雑穀米	10	2 (20 %)	2				0.06	0.3
米	10	3 (30 %)	3				0.03	0.1
ビール	13	0 (0 %)						
豆類								
小豆	14	0 (0 %)					-	-
黒豆など	11	0 (0 %)					-	-
コーヒー	30	12 (40 %)	8	4			0.2	1.1
木の实								
クルミ	10	0 (0 %)	0				-	-
アーモンド	10	2 (20 %)	2				0.03	0.2

LOQ : 0.05 µg/kg

図1 ステリグマトシスチンの汚染実態（陽性率）

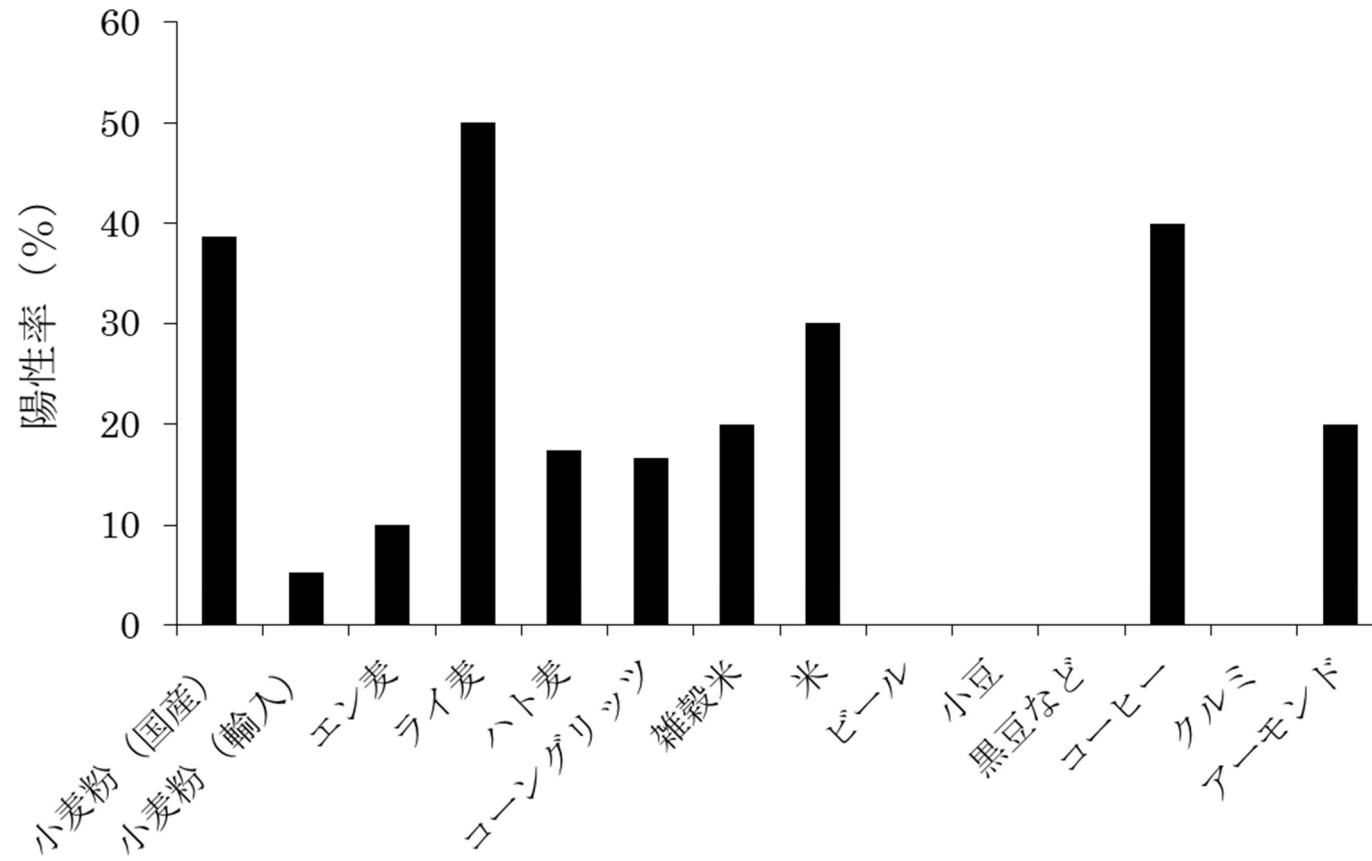


表2 4,15-ジアセトキシシルペノールの汚染実態

食品名	検体数	陽性数	各濃度範囲 (µg/kg) に含まれる検体数				平均濃度 (µg/kg)	最大濃度 (µg/kg)
			LOQ-1.5	1.5-5	5-50	>50		
小麦粉 (国産)	31	0 (0 %)						
小麦粉 (輸入)	18	0 (0 %)						
エン麦	10	0 (0 %)						
ライ麦	13	0 (0 %)						
ハト麦	16	10 (63 %)	3	1	4	2	20	
小豆	14	0 (0 %)						

LOQ : 0.5 µg/kg

参考資料

「穀物中のシアセトキシシルペノール試験法」

「食品中のステリグマトシスチン試験法」

個票