

**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-ジアセトキシシルベ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-ジアセトキシシルベノール(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暴露評価を実施し、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。本年度は、昨年度検討した分析法では十分な回収が得られない食品を対象とした分析法の開発及び市販流通食品を対象とした汚染実態調査を行った。

STCについては、9食品目計182検体の調査を行った。その結果、小麦粉、ハト麦、ソルガム、米、ライ麦、大麦及びインスタントコーヒーにおいてSTC陽性検体が認められた。陽性率が最も高かったのは国産小麦粉の90%、次いでハト麦の42%であった。最高濃度はハト麦における4µg/kgであった。4,15-DASについては、8食品目165検体の調査を行った。その結果、4,15-DASはハト麦、ソルガム、小豆及びコーングリッツの4食品目において検出された。ハト麦で陽性率67%、平均値が9µg/kgと汚染レベルが最も高かった。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った。特にSTCは小麦やコーヒーといった日本人において摂取量が高い食品に混入していることから、重点的に調査を行っていく必要性が示唆された。

研究協力者

佐藤 英子	川崎市健康安全研究所	藤吉 智治	(一財)食品分析開発センター
竹内 浩	三重県保健環境研究所		SUNATEC
谷口 賢	名古屋市衛生研究所	本田 俊一	(一財)日本食品検査
中島 正博	名古屋市衛生研究所	宮崎 光代	(一財)日本食品分析センター
橋口 成喜	川崎市健康安全研究所		
脇 ますみ	神奈川県衛生研究所		
飯塚 誠一郎	(一財)日本食品分析センター		
七戸 八重子	(一財)日本食品検査		
笛木 周平	(一財)日本食品分析センター		

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、CODEX 委員会で規格策定が行われている。我が国は CODEX 委員会の加盟国であることから、CODEX 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、CODEX 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、それら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た。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。

昨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-ジアセトキシスシルペノール (4,15-DAS) については、日本に流通する食品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。

2016 年度では、分析法を確立するためにコラボラティブスタディを実施した。さらに両カビ毒が検出される食品のスクリーニングを行い、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。今年度は昨年度検討した分析法が適用できないインスタントコーヒーや乾燥いちじくなどの食品を対象とした分析法の開発と検体数を増やした調査を行った。

B. 研究方法

(1) STC の汚染実態調査

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 STC の標準溶液を添加し (終濃度 0.5 又は 5.0 µg/kg)、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。乾燥イチジクについては、包丁で細かく切断後、ドライアイスと共にロボクープカッターミキサーで粉碎した。抽出時にセラライト約 20 g を加えた。

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。インスタントコーヒーについては、抽出液 1.0 mL をピペッターで 100 mL のメスフラスコにとり、PBS で 100 mL にメスアップした。ビールについては、一晩置いて脱気した検体 5.0 g を 50 mL のメスフラスコにとり、PBS で 50 mL にメスアップした。

希釈液 20 mL (ビールのみ 5 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。インスタントコーヒーについては、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 μ L

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 μ g/kg 及び 5 μ g/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

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。

ビールについては、試料 10.0 g をピペッターで 50 mL のメスフラスコにとり、蒸留水で 50 mL にメスアップした。あらかじめメタノール 0.2 mL と蒸留水 0.2 mL で前処理した Monospin C18 (GLサイエンス社製) に希釈液 0.5 mL を負荷した。蒸留水 0.3 mL で洗浄後、アセトニトリル 0.3 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：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 μ m

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 μ L

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 μ g/kg 及び 50 μ g/kg となるよう STC を添加し、抽出、定量を行って算出した。

C. 研究結果

(1) 添加回収試験

STC の添加回収試験の結果 (表 1) においては、回収率は 80~120% の範囲に収まり、4,15-DAS の添加回収試験の結果 (表 2) においては、回収率は 80~110% の範囲に収まった。

(2) STC の汚染実態 (表 3、図 1)

9 食品目計 182 検体の調査を行った。最も陽性率が高かったのは国産小麦粉の 90% であり、続いてハト麦の 42%、輸入小麦粉の 40%、ライ麦の 39% であった。平均濃度が最も高かったのはハト麦の 0.5 μ g/kg で、続いて国産小麦粉の 0.1 μ g/kg、インスタントコーヒーの 0.09 μ g/kg であった。中央値が算出されたのは国産小麦粉の 0.06 μ g/kg のみであった。最大濃度はハト麦の 4 μ g/kg であった。輸入小麦粉、米、ライ麦及び大麦において陽性検体が認められたが、濃度は全て 0.5 μ g/kg 以下であった。小豆及びビールでは陽性検体は認められなかった。

(3) 4,15-DAS (表 4、図 2)

8 食品目計 165 検体について 4,15-DAS の汚染を調べた。最も陽性率が高かったのはハト麦の 67% であり、次いでソルガムの 57% であった。平均濃度が最も高かったのはハト麦の 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。ソルガム、小豆及びコーングリッツに陽性検体は認められたが、汚染濃度は全て 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下であった。最大濃度はハト麦における 54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

D. 考察

(1) STC の汚染実態

昨年度実施した調査において、STC は国産小麦粉、ライ麦、ハト麦及びインスタントコーヒーから主に検出された。それら食品については今年度も調査を行った結果、STC が検出され、平均濃度は昨年度の結果と同程度であった。今年度より新たに検査対象としてソルガムを加えたが、7 検体中 1 検体のみから STC が検出された。アフリカにおいてソルガムの STC 陽性検体の 10% から 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の濃度で STC が検出されたとの報告¹⁾があるため、調査は継続する必要がある。

日本以外の地域における STC 汚染については、最近中国に流通するビールと小麦製品における報告がなされた^{2, 3)}。ビール 101 検体からは STC は検出されなかったが、小麦 31 検体においては陽性率が 53.1% (LOD 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、平均値が 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大値が 0.31 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。この結果は我々の調査と同レベルであった。

(2) 4,15-DAS の汚染実態

昨年度と同様にハト麦において陽性検体が多く認められた。日本産よりも東南アジア産の検体で検出濃度が高い傾向も同様であった。一部の穀類で 4,15-DAS は検出されたが、検出濃度は非常に低かった。2 年間の調査では日本で摂取される主要な穀類中に 4,15-DAS の汚染は確認されていない。

E. 結論

昨年度に引き続き、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 は小麦やコーヒーといった日本人における摂取量が多い食品で検出されることが確認された。暴露推定を行うために、それら食品における汚染データの収集を来年度重点的に実施する。4,15-DAS についてはハト麦茶などのハト麦の加工品における汚染データを来年度収集する。

F. 参考文献

- 1) WHO Technical Report Series, No.1002, 2007
- 2) Zhao Y et al. Food Addit Contam Part B Surveill. 2018, 11(1):9-14.
- 3) Zhao Y et al. Food Addit Contam Part B Surveill. 2017, 10(1):64-68.

G. 研究業績

【論文発表】

- 1) [Yoshinari, T.](#), [Takeda, N.](#), [Watanabe, M.](#), [Sugita-Konishi, Y.](#): Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified Forms of 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. [Toxins \(Basel\)](#). 2018, 10(5). pii: E178. doi: 10.3390/toxins10050178.

表1 STCの添加回収試験の結果

食品名	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (平均値 \pm 標準偏差)		
小麦粉	0.5	107.8	\pm	1.6
	5	118.7	\pm	6.3
ハト麦	0.5	105.7	\pm	6.5
	5	107.6	\pm	1.6
ソルガム	0.5	108.6	\pm	3.8
	5	107.9	\pm	2.0
小豆	0.5	92.3	\pm	1.3
	5	103.4	\pm	0.8
米	0.5	88.9	\pm	1.4
	5	96.2	\pm	2.8
ビール	0.5	91.2	\pm	2.4
	5	90.0	\pm	1.7
ライ麦	0.5	86.8	\pm	2.3
	5	88.4	\pm	1.4
乾燥いちじく	0.5	97.9	\pm	9.3
	5	90.8	\pm	2.4
大麦	0.5	91.1	\pm	1.8
	5	92.2	\pm	0.6
インスタントコーヒー	0.5	87.7	\pm	3.5
	5	80.3	\pm	2.9

表2 4.15-DASの添加回収試験の結果

食品名	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 ($\text{平均値} \pm \text{標準偏差}$)
小麦粉	5	98.4 \pm 2.2
	50	100.0 \pm 5.7
ハト麦加工品	5	94.2 \pm 4.7
	50	92.8 \pm 5.2
ソルガム	5	94.9 \pm 1.7
	50	88.6 \pm 1.7
小豆	5	100.5 \pm 5.4
	50	91.0 \pm 3.4
コーングリッツ	5	105.0 \pm 4.0
	50	94.7 \pm 3.0
ビール	5	80.9 \pm 1.6
	50	85.6 \pm 1.4
ライ麦	5	97.2 \pm 2.8
	50	100.2 \pm 1.7
大麦	5	103.8 \pm 3.6
	50	104.5 \pm 0.8

表3 ステリグマトシスチンの汚染実態

食品名	検体数	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	陽性率 (%)	各濃度範囲に含まれる検体数				平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	中央値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
					LOQ-0.5	0.5-1.5	1.5-5	> 5			
国産小麦粉	20	0.002	0.006	90	17	1			0.1	0.06	0.5
輸入小麦粉	20	0.003	0.01	40	8				0.02	<LOD	0.1
ハト麦	24	0.01	0.04	42	5	1	4		0.5	<LOD	4
ソルガム	7	0.01	0.04	14	1				0.04	<LOD	0.3
小豆	14	0.008	0.03	0					-	-	-
米	10	0.008	0.03	10	1				0.04	<LOD	0.4
ビール	20	0.01	0.04	0					-	-	-
ライ麦	28	0.01	0.02	39	11				0.04	<LOD	0.5
大麦	15	0.008	0.03	13	2				0.004	<LOD	0.03
インスタントコーヒー	24	0.03	0.1	21	3	2			0.09	<LOD	0.8

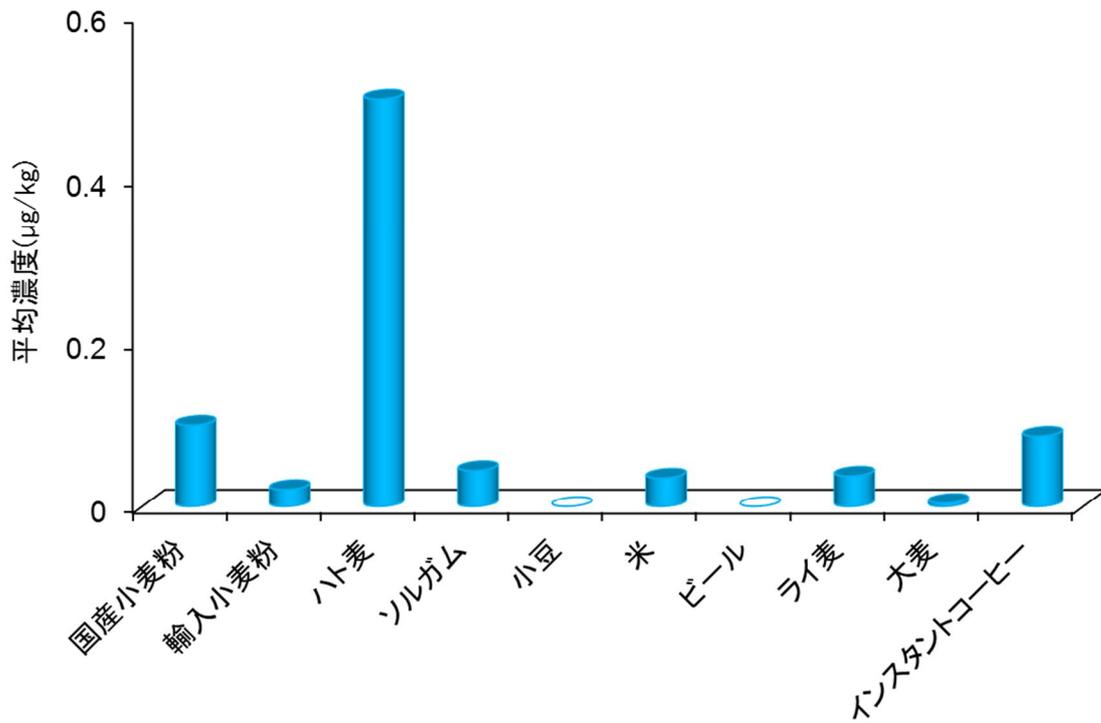


図1 ステリグマトシスチンの汚染実態（平均濃度）

表 4 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	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	陽性率 (%)	各濃度範囲 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) に含まれる検体数				平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	中央値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
					LOQ-1.5	1.5-5	5-50	>50			
国産小麦粉	20	0.1	0.2	0					-	-	-
輸入小麦粉	20	0.1	0.2	0					-	-	-
ハト麦	24	0.1	0.2	67	5	1	9	1	9	1	54
ソルガム	7	0.1	0.2	57	4				0.3	0.2	1
小豆	16	0.1	0.2	19	3				0.05	<LOD	0.3
コーングリッツ	15	0.1	0.2	27	4				0.1	<LOD	1
ビール	20	0.2	0.6	0					-	-	-
ライ麦	28	0.1	0.2	0					-	-	-
大麦	15	0.06	0.2	0					-	-	-

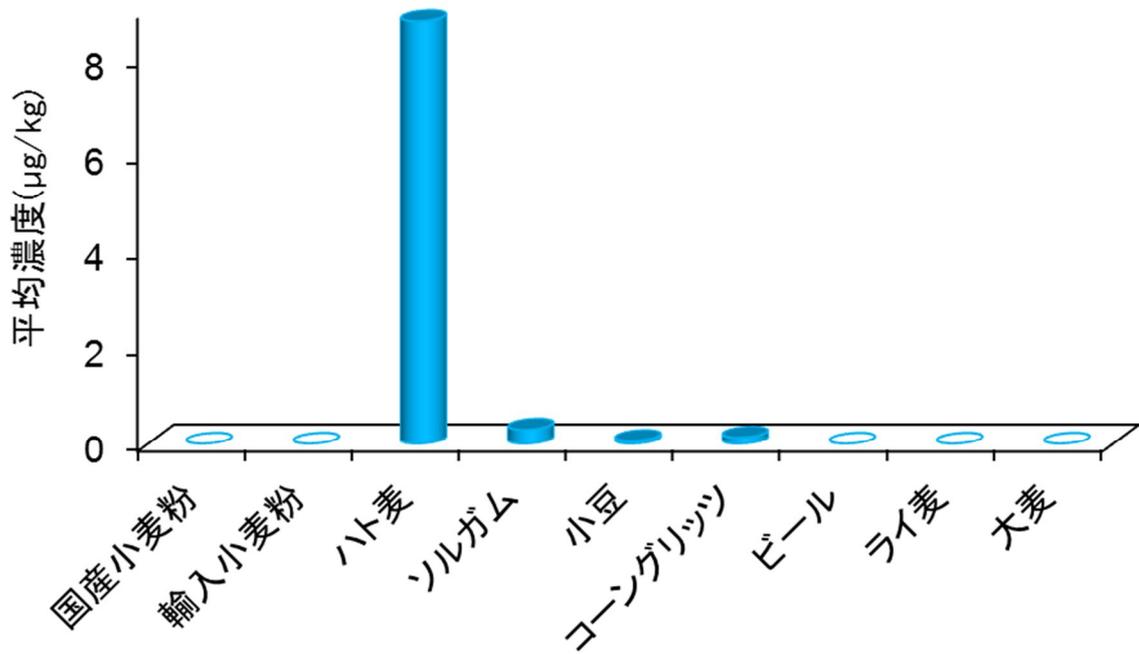


図2 4,15-DASの汚染実態(平均濃度)