

I．総括研究報告

研究分担者 志田（齊藤）静夏

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)
令和5年度 総括研究報告書

「昆虫食」における大規模生産等産業化に伴う安全性確保のための研究

研究代表者 志田(齊藤)静夏 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部・第三室長)

研究要旨

課題 1 有害化学物質の分析法開発及び汚染実態調査

昆虫食に含まれる有害化学物質の汚染実態調査に向けて、有害元素、農薬及びダイオキシン類の分析法を検討した。有害元素の分析法として、マイクロ波分解/誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)法を用いたカドミウム、鉛及びヒ素分析法及び加熱気化型水銀分析計を用いた総水銀分析法の昆虫食への適用性を検討した。カドミウム、鉛及びヒ素分析法の性能を評価(添加濃度 0.1 mg/kg)した結果、真度 97~105%、併行精度及び室内精度 6%未満となった。また、総水銀分析法の性能を評価(添加濃度 0.005 及び 0.2 mg/kg)した結果、真度 97~104%、併行精度及び室内精度 4%未満となった。これらの結果から、いずれも実態調査のための分析法として妥当であることが示された。昆虫食を対象とした新規農薬分析法として、LC-MS/MS 及び GC-MS/MS を用いた農薬一斉分析法を開発した。本法はアセトンで抽出後、多孔性ケイソウ土カラムで脱脂し、3 種の充填剤(オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル(PSA)及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル(SAX))を混合したミニカラム(GC-MS/MS 法はアルミナが積層されたミニカラム)で精製して LC-MS/MS または GC-MS/MS で測定する方法である。添加濃度 0.01 mg/kg で妥当性評価試験を行った結果、LC-MS/MS 法は 144 化合物中 135 化合物、GC-MS/MS 法は 141 化合物中 134 化合物で妥当性評価ガイドラインの真度、精度及び選択性の目標値を満たした。これらの結果から、一部の農薬を除き、昆虫食の汚染実態調査のための分析法として妥当と考えられた。ダイオキシン類分析法として、従来から当所で使用している分析法(従来法)の昆虫食に対する適用性を検討した。その結果、前処理の操作性に大きな問題はないことが確認された。また、世界保健機関(WHO)が毒性係数(TEF)を定めた PCDDs 7 種、PCDFs 10 種及び Co-PCBs 12 種について添加回収試験を行ったところ、回収率 84.1~111.9%、併行精度 1.9~13.3%の良好な結果が得られた。これらの結果から、従来法は昆虫食のダイオキシン類分析法として適用可能であることが示された。本研究で確立した分析法を用いて、来年度以降、国内に流通する昆虫食に含まれる有害化学物質の汚染実態調査を行う予定である。

課題 2 微生物・マイコキシンの汚染実態調査及びリスク評価

国内流通昆虫食の微生物分布およびマイコキシン汚染の実態を調査するため、今年度はこれらの検出法である培養法、分子生物学的手法、質量分析法などについての性能評価等予備検討を実施した。国内に流通するコオロギ、カイコ、ミルワーム等の昆虫食 12 製品を対象として、昆虫食での分布程度が高い細菌および真菌種を明らかにして試験法の絞り込みを行うため、培養法による細菌・真菌の網羅的検出を行った。またそのうち 8 製品については、マイコキシンの添加回収実験を行っての 7 種マイコキシンの一斉分析法の性能評価、および寄生虫 DNA の添加回収実験を行ってのリアルタイム PCR 法の性能評価を行った。その結果、真菌では *Aspergillus* 属菌等が検出されたが、健康影響が比較的強い

とされるマイコトキシンの産生菌種ではなかった。細菌では、最大で 1.2×10^8 cfu/g であった一方で非検出の製品も複数あり製品毎に生菌数に大きな差があること、今回の調査では複数製品から食中毒と関連のある大腸菌群、*Bacillus* 属菌および *Staphylococcus* 属菌が検出された。また真菌よりも細菌の生菌数が高い傾向にあることが示された。今回の調査では昆虫食製品からは動物の腸内や土壌等環境中に広く存在する細菌群が多く分布したことが示され、昆虫食の喫食による食中毒を防ぐためには、他の食品同様に、養殖や加工、保存、調理等の各工程の衛生管理の重要性が示唆された。マイコトキシン分析法については、7 種マイコトキシン一斉分析法は、一斉に検出可能である利点を活かし食用昆虫におけるマイコトキシンのスクリーニングには利用できると考えられた。寄生虫のリアルタイム検出法については、供試した全ての昆虫食製品から、低濃度のクリプトスポリジウムまたはジアルジア DNA を昆虫食から検出できることを示した。次年度は今年度の研究成果から示された適した試験法を用いて、昆虫食製品から微生物およびマイコトキシンの汚染実態調査を実施する予定である。

課題 3 昆虫食のアレルゲン性に関する検討

甲殻類の主要アレルゲンタンパク質は昆虫類のアレルゲンタンパク質と交差反応性を示すことから、昆虫食は甲殻類アレルギー患者においてアレルギー症状を誘発する可能性がある。本課題では、国内で現在市販されている昆虫食のアレルゲン性について甲殻類主要アレルゲン(トロポミオシン)との交差反応性、ならびにアレルギー患者血清との反応性、そして加工工程におけるアレルゲン性の変化について検討する。本年度は、公定検査法として定めている甲殻類アレルゲンの定量検査法(ELISA 法)を用いて、昆虫食に含まれるタンパク質の交差反応性について検討した。昆虫の種類や加工度が異なる12検体を解析に供したところ、すべての検体において甲殻類トロポミオシン特異的抗体が認識するタンパク質が含まれていた。今後、甲殻類アレルギー患者血清を用いた検討を中心に、昆虫食に含まれるタンパク質の健康被害に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要と考えられる。

課題 4 諸外国の規制等の文献調査

昆虫食の安全性確保のために必要なリスク管理について提案することを目的とする本研究のうち、本課題では諸外国及び国際機関等の安全性や規制等に関する情報を継続的に収集し、日本に必要な対策の参考とすることが目的である。また新たに利用されるようになった品種や食品安全上のハザード情報など、関連情報を更新することで変化する状況に対応するための備えとする。今年度はこれまでの諸外国の規制機関情報の概要をまとめるとともにいくつかの文献情報を収集した。また最も利用が進んでいると思われる食用コオロギについて、欧米のリスク評価・リスク管理機関がどのような情報を考慮しているのかを検討した。

研究分担者

志田静夏(国立医薬品食品衛生研究所 食品部・第三室長)

渡辺麻衣子(国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物・第三室長)

安達玲子(国立医薬品食品衛生研究所 生化学部・第三室長)

畠山智香子(国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部・部長)

A. 研究目的

国際連合食糧農業機関(FAO)は 2013 年に報告書「Edible insects: future prospects for food and feed security」を発表し、昆虫はタンパク質やミネラル等の栄養成分が豊富であること、牛や豚等よりも飼料変換効率がよく、環境への負荷を抑制できる

ことから、人口増加による食糧不足の解決の一助となる可能性を示した。この報告書が発表されて以降、養殖昆虫は食糧源や飼料源として注目されており、世界各国で昆虫の養殖や食料化、飼料化に関する研究が行われている。一方で、FAO は報告書「Looking at edible insects from a food safety perspective」(2021 年)の中で、昆虫の養殖や加工において十分管理が行われなければ、有害化学物質や微生物等に汚染する可能性があることと安全性への懸念も示している。昆虫の養殖では、食品廃棄物や農業廃棄物等が飼料として用いられる場合があるが、飼料が有害化学物質や微生物等に汚染されていた場合、飼料を介して昆虫が汚染し、昆虫種/汚染物質によっては蓄積する可能性がある。また、昆虫の養殖は、微生物の増殖に適した温度帯で行われるため、養殖環境等の衛生管理が十分に行われなかった場合、微生物やマイコトキシンによる汚染を受ける可能性が増大する。加えて、甲殻類の主要アレルゲンタンパク質は昆虫類のアレルゲンタンパク質と交差反応性を示すことから、昆虫食は甲殻類アレルギー患者においてアレルギー症状を誘発する可能性があることが指摘されている。このようなことから、EU 等の諸外国では昆虫食の安全性評価が進められている。一方、我が国ではほとんど調査研究が行われておらず、昆虫食の安全性に関する科学的知見は限られている。本研究では以下の 4 課題に取り組むことで、国内に流通する昆虫食の安全性について総合的に調査し、昆虫食全般のリスク管理を検討する際の基礎的データを提供することを目的とした。

課題 1 有害化学物質の分析法開発及び汚染実態調査

国内に流通する昆虫食を対象に有害化学物質(有害元素、農薬及びダイオキシン類)の汚染実態

を把握し、昆虫食の喫食による健康危害リスクについて考察することを目的とした。本年度(1年目)は、昆虫食に含まれる有害化学物質の汚染実態調査に向け、昆虫食を対象とした有害元素(カドミウム、鉛、ヒ素及び水銀)、農薬及びダイオキシン類分析法を検討した。有害元素及びダイオキシン類は当所で従来から用いている方法の昆虫食に対する適用性を検討した。農薬については昆虫食を対象とした新規一斉分析法を開発し、その妥当性を評価した。

課題 2 微生物・マイコキシンの汚染実態調査及びリスク評価

昆虫の養殖は真菌・細菌の増殖に適した温度・湿度で行われるため、昆虫食製品にこれらの微生物が混入・増殖する可能性は十分にある。また養殖環境における水や土壌から、ヒトに健康被害を及ぼす寄生虫が昆虫を汚染する可能性も想定する必要がある。これらの微生物が食用昆虫を汚染し、食中毒が起こるリスクがある。その一方で、昆虫食の微生物衛生学的安全性に関わるデータは不足しており、特に日本国内に流通する昆虫食製品を対象とした調査報告は非常に少ない。

昆虫食を含む食品上でマイコトキシン産生菌が増殖した場合に、食品はマイコトキシンに汚染される可能性がある。日本における食品中のマイコキシンの規制については、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(DON)、全食品中の総アフラトキシン(アフラトキシン B₁: AFB₁、アフラトキシン B₂: AFB₂、アフラトキシン G₁: AFG₁、アフラトキシン G₂: AFG₂)および乳中のアフラトキシン M₁ に対して規制値又は基準値が設定されている。また、2023 年 12 月に実施された薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において、オクラトキシン A(OTA)の規制に関する

議論がなされ、小麦と大麦について基準値を設定することが了承された。昆虫食でも、これら 7 種のマイコトキシンの汚染実態調査を把握する意義は大きい。

昆虫食を汚染する寄生虫については、過去に汚染実態を報告するデータは無いことから、対象候補として、土壌や水を汚染することが知られる寄生虫から、クリプトスポリジウム、赤痢アメーバ、ジアルジア、サイクロスポーラ、トキソプラズマ、エキノコックスといった原虫類を想定した。これらの簡便な培養法は存在しないため、検出には遺伝子検査法を使用する必要がある。

そこで本研究では、国内流通昆虫食の微生物分布およびマイコトキシン汚染の実態を調査するために、今年度はこれらの検出法である培養法、分子生物学的手法、質量分析法などについての性能評価等予備検討を実施した。

課題 3 昆虫食のアレルゲン性に関する検討

昆虫食が新たなタンパク源として注目される中、昆虫には甲殻類に似たアレルゲンが含まれており、「えび」や「かに」にアレルギーを持つ人ではアレルギー反応を引き起こす可能性がある」と指摘されている。また、国内において、昆虫を喫食したことによるアナフィラキシー症状を呈した症例の報告があり、海外では同様のアナフィラキシー発症事例が多数報告されている。したがって、昆虫食に対する需要の拡大は、国民に健康被害の生じる懸念が残るため、安全性に関する研究を進展させ、毒性にかかわる科学的知見を収集することが望まれる。

昆虫食のアレルゲンは、甲殻類のアレルゲンと構造が非常によく似た相同タンパク質が含まれている。主要アレルゲンの一つにトロポミオシンがあり、これは熱に強い性質をもつため、加熱調理してもアレルギー反応を引き起こす可能性が残る。研究

分担者である安達らは、昆虫を原料とする健康食品には甲殻類トロポミオシン特異的抗体が反応するタンパク質が含まれていること、そして、甲殻類アレルギーの患者が昆虫食を喫食することにより、アレルギー症状が誘発される可能性があること等をこれまで示してきた。そこで、本分担研究では、国内で現在流通している市販昆虫食のアレルゲン性について甲殻類主要アレルゲン(トロポミオシン)との交差反応性、ならびにアレルギー患者血清との反応性、そして加工工程におけるアレルゲン性の変化について検討する。

食物アレルゲンを含む加工食品は、食品表示法にてアレルゲンの表示が義務付けられており、表示を検証するための公定検査法が定められている。令和 5 年度は、公定検査法を用いて、入手可能な昆虫食 12 検体について、昆虫食に含まれるタンパクの甲殻類アレルギーにおける交差反応性を検証した。

課題 4 諸外国の規制等の文献調査

食品としての昆虫は一部地域で比較的少数が利用されてきたことはあるものの、大規模生産・流通はこれまで行われてこなかった。近年、特に 2013 年の FAO による食用昆虫報告書発表以降、地球環境への負荷を軽減できるとして昆虫を蛋白源として使おうと動きがあり、日本でも食用昆虫の産業化がおこりつつある。食品の安全性の確保は一義的には食品事業者の責任ではあるが、昆虫食のようなこれまであまり経験のないものについては通常の商品とは異なる制度を作ったりガイドラインを作成したりするケースが多い。日本では昆虫食について特別な制度はないが今後必要になる可能性もある。こうした状況を背景に、この課題では諸外国の制度の調査と文献調査を行い、本研究班の他の分担課題での昆虫食における有害化学

物質、微生物、マイコトキシンの汚染実態調査や、アレルギー性や飼料・加工による影響検討の進展に並行して随時更新する。

B. 研究方法

課題 1 有害化学物質の分析法開発及び汚染実態調査

[1] 検体

有害元素及び農薬の分析法の検討にはインターネットを介して購入した昆虫食 8 製品 (23-001～23-007 及び 23-009) を用いた (表 1)。ダイオキシン類の分析法の検討には 3 製品 (23-001～23-003) を用いた。

[2] 試料調製

パウダー製品であった 23-003 はそのまま分析に用いた。その他の検体は有姿状態で販売されていたため、粉碎装置 GM200 及び GM300 (いずれも Verder Scientific 製) を用いて試料調製 (均質化) したものを分析に用いた。なお、回転刃はチタンコーティングされたもの、容器はポリカーボネート製のものを使用した。調製した試料は分析まで -30℃ で保管した。

[3] 分析法

I. 有害元素 (カドミウム、鉛及びヒ素)

分析用試料 0.50 g を石英製分解容器に量り採り、硝酸 5 mL 及び過酸化水素水 2 mL を加えた。水 5 mL 及び過酸化水素水 2 mL を加えた TFM (変性ポリテトラフルオロエチレン) 製分解容器に前述の石英製分解容器を入れ、マイクロ波試料前処理装置 (ETHOS One; Milestone 製) により分解した。分解は次の条件で行った。70℃ 2 分間 → 50℃ 1 分間 → 20 分間で 200℃ まで升温し、200℃ で 10 分間保持 (総分解時間: 33 分間)

分解後の溶液に混合内部標準溶液 0.5 mL を添

加後、水で 50 mL に定容し、ICP-MS (iCAP Q; Thermo Fisher Scientific 社製) により測定した。なお、内部標準元素にはインジウム及びタリウムを用いた。

無機ヒ素は一般財団法人日本食品分析センターに委託して分析を行った。

II. 水銀

総水銀は加熱気化型水銀分析計 MA-3000 (日本インスツルメンツ製) を用いて測定した。試料 100 mg をセラミック製サンプルボード (日本インスツルメンツ製) に精密に量り採り、測定に供した。水銀濃度が 0.01 mg/kg 未満の試料及び標準溶液の測定には低濃度用の吸光セル、0.01 mg/kg 以上の測定には高濃度用の吸光セルを用いた。試料は 150℃ で 1 分乾燥後、250℃ で 10 分間加熱し、さらに 800℃ で 2 分間加熱した。検量線用標準溶液は 150℃ で 1 分乾燥後、800℃ で 2 分間加熱した。なお、サンプルボードは、約 5 mol/L 硝酸に 12 時間以上浸け置きした後、水でよくすすぎ、使用する直前に 750℃ で 3 時間加熱した。これを冷却後、加熱気化型水銀分析計により 850℃ で 4 分間再加熱したものを使用した。

メチル水銀は一般財団法人日本食品分析センターに委託して分析を行った。

IV. 農薬

LC-MS/MS で測定可能な農薬 144 化合物及び GC-MS/MS で測定可能な農薬 141 化合物を対象とした。

1. 抽出

1) 乾燥試料

試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトン 100 mL を加え、ホモジナイザーを用いて約 1 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し

た。残留物を採り、アセトン 50 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、水 20 mL を加えた後、アセトンを加えて正確に 200 mL とした(抽出液)。

2) 冷凍試料

試料 20.0 g にアセトン 100 mL を加え、ホモジナイザーを用いて約 1 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り、アセトン 50 mL を加えて約 1 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした(抽出液)。

2. 多孔性ケイソウ土カラム精製

抽出液 8 mL (乾燥試料: 試料 0.4 g 相当、冷凍試料: 0.8 g 相当) を採り、エタノール 5 mL を加えてエバポレーターで 0.5 mL 以下まで濃縮後、窒素気流下で溶媒を除去した。残渣をアセトニトリル飽和ヘキサン 3 mL に溶解して多孔性ケイソウ土カラムに負荷し、5 分間放置後、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で溶出した。これをエバポレーターで濃縮後、窒素気流下で溶媒を除去し、残留物をアセトニトリル 1 mL に溶解した。

3. ミニカラム精製

1) LC-MS/MS 対象農薬

InertSep VRA-PR (1600 mg) にアセトニトリル 5 mL を注入し、コンディショニングした。これに「2. 多孔性ケイソウ土カラム精製」で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル 10 mL で溶出した。溶出液をエバポレーターで濃縮後、窒素気流下で溶媒を除去し、メタノール(乾燥試料の場合は 2 mL、冷凍試料の場合は 4 mL) に溶解して試験溶液とした。

2) GC-MS/MS 対象農薬

InertSep AL-N/VRA-PR (400 mg/1600 mg) にアセトニトリル 5 mL を注入し、コンディショニングした。

これに「2. 多孔性ケイソウ土カラム精製」で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル 10 mL で溶出した。溶出液をエバポレーターで濃縮後、窒素気流下で溶媒を除去し、アセトン/ヘキサン(1:1) (乾燥試料の場合は 2 mL、冷凍試料の場合は 4 mL) に溶解して試験溶液とした。

4. 測定

LC-MS/MS 測定は Nexera X3 (島津製作所製) 及び Triple Quad 7500 (Sciex 製)、GC-MS/MS 測定はガスクロマトグラフ 7890 (Agilent Technologies 製) 及び質量分析計 Xevo TQ-XS (Waters 製) を用いて行った。

IV. ダイオキシン類

分析対象項目は、WHO が毒性係数 (TEF) を定めた PCDDs 7 種、PCDFs 10 種及び Co-PCBs 12 種の計 29 種とした。

ダイオキシン類の分析は、「食品中のダイオキシン類の測定方法暫定ガイドライン」(以下、ダイオキシン類測定方法ガイドライン) に準じた。測定は、高分解能 GC/MS 装置 7890 (Agilent Technologies) /MStation JMS-800D UltraFOCUS (日本電子(株) 社製) を用いて行った。

課題 2 微生物・マイコトキシンの汚染実態調査及びリスク評価

[1] 検体

国内で市販されている昆虫食製品 12 種類 (23-001~23-007、23-009 及び in02~in05) を検体として使用した(表 1)。

[2] 微生物培養法

来年度以降に昆虫食における真菌・細菌汚染実態調査の対象菌を決定するために、今年度は網羅的に分布する菌種を把握する目的で、培養法による網羅的菌検出を行った。

①汚染微生物の分離

各食用昆虫検体 25 g を 225 ml の PBS ×1 と混合し、ストマッカーを用いて 60 秒間懸濁した。これを試験原液とした。試験原液は PBS ×1 を用いて 10 倍段階希釈した後、初期検討として 12 製品中 5 種類の検体については、真菌網羅的分離の目的で dichloran rose-bengal chloramphenicol (DRBC) 培地および dichloran glycerol (DG-18) 培地、細菌網羅的分離の目的で plate count agar (PCA) 培地、pepton glucose-yeast extract agar (PGY) 培地、VRBG 培地およびチオグリコレート寒天培地、計 6 種類の平板培地 1 枚ずつに 100 μ L 塗抹した。残りの 7 検体では初期検討結果を参照し、violet red bile glucose agar (VRBG) 培地およびチオグリコレート寒天培地を除いた 4 種類の平板培地 1 枚ずつに 100 μ L 塗抹した。DRBC 培地および DG-18 培地は 25°C で 7 日間の好気培養を行った。PGY 培地は 25°C で 5 日間の好気培養を行った。PCA 培地および VRBG 培地は 37°C で 2 日間の好気培養を行った。チオグリコレート寒天培地は 37°C でアネロパック(三菱ガス化学株式会社)を用いて、添付の実験マニュアルに従い、2 日間の嫌気培養を行った。培養後、生菌数の計測を行った。生育したコロニー数を計測し、平板 1 枚あたりのコロニー形成単位 colony forming unit (cfu) を求めた。さらに培地に接種した希釈液の濃度から、昆虫食 1 g あたりの cfu を算出し、cfu/g の単位を用いて表わした。計測後、各培地上に形成されたコロニーについて、目視で認識できるレベルのコロニーの形態的特徴を指標として分類後、16 株を上限として各グループから網羅的に分離し、同定に供した。

②分離株の分類・同定

真菌は形態学的指標を同定に導入した。分離株コロニーを目視および実体顕微鏡にて観察し、図

譜と比較して同定した。

分子生物学的指標による同定方法については、液体培養した菌体から、真菌では DNeasy mini kit (株式会社 Qiagen) を用いて、細菌では DNA 抽出にはシカジーニース DNA 抽出試薬 ST (関東化学株式会社) を用いて、DNA を抽出した。これらをテンプレートとして、真菌では rDNA の 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S の部分塩基配列の PCR、細菌では 16s rDNA の部分塩基配列の PCR を行い、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo fisher Scientific Ltd.) およびキャピラリーシーケンサー 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific Ltd.) を用いて塩基配列のシーケンスを行った。配列決定後、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースに登録された配列との相同性検索を行い、相同率を参照した。真菌では、検出菌がマイコトキシン産生菌であるか否かを検討するためより詳細に同定する必要がある。上述の相同性検索の結果分離株が *Aspergillus* または *Penicillium* 属であった場合には *b-tub* 部分塩基配列を、*Fusarium* 属であった場合には *EF1- α* 部分塩基配列を決定し、NCBI のデータベースに登録された配列との相同性検索を行い、相同率を参照した。

[3] 質量分析法によるマイコトキシン検出法

マイコトキシンの質量分析法では、粉碎した各検体にアフラトキシン類 4 種、DON、OTA およびゼアラレノン (ZEN) の 7 種のマイコトキシンを一定量添加後、イムノアフィニティーカラムによる精製法と LC-MS/MS による検出法を組み合わせた以下のマイコトキシンの一斉分析法について、添加回収試験により性能評価を行った。また、イムノアフィニティーカラムの性能を評価するための比較対象として、精米においても同様の添加回収試験を実施

した。

破碎した検体 10 g にアセトニトリル、メタノールと水(1:1:2)の混合液 50 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。一部を 50 mL 容のプラスチックチューブに移し、1,710 g で 10 分間遠心分離した。上清 5 mL に PBS35 mL を加えて混合後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液 20 mL をイムノアフィニティーカラム MaxSignal IAC 4 in 1 (PerkinElmer 社製)に添加後、自然落下で通液した。精製水 3 mL を 6 回カラムに通し、洗浄後、シリンジで残存する水分を除去後、2%の酢酸を含むメタノール 3 mL でマイコトキシンを溶出した。窒素気流により溶出液を乾固した後、1%の酢酸を含む 30%アセトニトリル水溶液 1 mL に溶解後、LC-MS/MS により計 7 種のマイコトキシンを定量した。

[4] リアルタイム PCR 法による寄生虫検出法

寄生虫の検鏡等による形態学的確認を伴わず簡便な、リアルタイム PCR 法による原虫 DNA の検出系を検討した。今年度はクリプトスポリジウムとジアルジアに対する検査方法を対象とした。

クリプトスポリジウムとジアルジアは、遺伝子検査キットが市販されているため、これらのキットが昆虫食で使用できるか検討した。クリプトスポリジウムまたはジアルジアの市販検査キットに付属の陽性コントロールプラスミドを粉碎した検体に添加し、キットの説明書に従いここから直接 DNA を抽出した。その後これをテンプレートとして、各検出キットの説明書に従いリアルタイムPCRを行って寄生虫 DNA を検出した。使用キットは、クリプトスポリジウムの検出には Cycleave RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit(株式会社タカラバイオ)を使用した。本キットは、*Cryptosporidium parvum*、*C. hominis*、*C. meleagridis*、*C. canis*、*C. felis*、*C. muris*、*C. andersoni*、*C. baileyi*、*C. bovis*、*C. wrairi*

を検出することができる。ジアルジアの検出には Cycleave RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit(株式会社タカラバイオ)を使用した。本キットは、*Giardia lamblia*、*Giardia psittaci*、*Giardia microti* を検出することができる。DNA の抽出には、QIAamp DNA mini kit (株式会社 QIAGEN)を使用した。

課題 3 昆虫食のアレルゲン性に関する検討

[1] 検体

国内で市販されている昆虫食製品 12 種類(23-001~23-012)を検体として使用した(表 1)。

[2] 甲殻類 ELISA キットによる測定

アレルゲンを含む食品の表示制度における義務表示品目であるえび・かにの表示を検証するための ELISA キット 2 種(FA テスト EIA-甲殻類(島津ダイアグノスティクス(株)製、以下 S キット)、及び、甲殻類キット II「マルハニチロ」(マルハニチロ(株)製、以下 M キット)を用い、上記の昆虫食 12 検体について各キットにおける反応性を検討した。検体からのタンパク質抽出に関しては、通常の方法(室温で一晩(12 時間以上)振とう)に加えて、昆虫が含有するプロテアーゼによるタンパク質分解の可能性を考慮し、プロテアーゼ阻害剤(Halt Protease Inhibitor Cocktail(Thermo Fisher Scientific 社製))を添加する方法、及び加熱抽出法(100°C、30 分)も合わせて検討した。

課題 4 諸外国の規制等の文献調査

世界各国の食品安全担当機関やリスク評価担当機関によるここ数年の発表を収集した。PubMed の文献検索および EurekAlert でのプレスリリースの監視等から、いくつかの文献をピックアップした。

C. 研究結果及び考察

課題 1 有害化学物質の分析法開発及び汚染実態調査

[1] 試料調製の検討

試料調製には、1 kg 程度まで処理可能な GM300 (Verder Scientific 製) を用いた。重金属のコンタミを防止するため、回転刃はチタンコーティングされたもの、容器はポリカーボネート製のものを使用した。各検体を試料調製した結果、23-001 及び 23-002 のように脂質含量が高く、粘性が高いもの及び 23-005 のように繊維質が多いものでは粉碎中に回転が停止し、均質化するのが困難であった。そこで、検体約 1 kg を 200～300 g ずつに分け、より高い回転数で粉碎可能な GM200 (Verder Scientific 製) を用いて均質化した後、得られた試料を合わせ GM300 で再度、粉碎、混合したところ、いずれの試料も均質化することができた。このため、試料調製は検体を 200～300 g ずつに分け、GM200 で均質化後、得られた試料を合わせて GM300 で粉碎及び混合することとした。なお、検体量が 300 g 以下の場合は GM200 のみで試料調製を行うこととした。

[2] 分析法の検討

I. 有害元素(カドミウム、鉛及びヒ素)

1. 性能評価

マイクロ波分解/ICP-MS 法の昆虫食試料への適用性を検討した。23-009 を添加回収試験用の試料として用い、カドミウム、鉛及びヒ素の各元素について添加濃度 0.1 mg/kg で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行い、性能を評価した。その結果、真度 97～105%、併行精度及び室内精度 6% 未満となったことから、本分析法は十分な精確さをもって分析を行うことが可能であり、実態調査に用いることが妥当と考えられた。

2. 昆虫食試料の分析

マイクロ波分解/ICP-MS 法を用いて 23-001～23-007 及び 23-009 のカドミウム、鉛及びヒ素濃度を分析した。

カドミウム濃度は 0.01～0.14 mg/kg となり、最も高い値を示したのは 23-002 (ミルワーム) であった。我が国では、玄米及び精米に基準値「カドミウムとして 0.4 mg/kg」(平成 22 年 4 月 8 日、食安発 0408 第 2 号) が設定されているが、いずれの試料も玄米及び精米の基準値を下回っていた。

鉛濃度は 0.01～0.19 mg/kg となり、最も高い値を示したのは、23-007 (コガタスズメバチ) であった。コガタスズメバチは主に昆虫を餌とするため、捕食した昆虫に由来するものと推測された。我が国では農産物に 1～5 mg/kg の基準値が設定されているが、いずれの試料もこれらの基準値を下回っていた。

総ヒ素濃度は 0.02～1.32 mg/kg となり、23-001 (カイコ) 及び 23-004 (ヨーロッパイエコオロギ) ではそれぞれ 0.86 mg/kg 及び 1.32 mg/kg であった。一般に、食品に含まれるアルセノベタイン等の有機ヒ素化合物よりも無機ヒ素化合物の方が毒性が高いとされているため、23-001 及び 23-004 の無機ヒ素濃度を分析した。その結果、23-004 では定量限界 (0.1 mg/kg) 未満となり、大部分が有機ヒ素であることが示された。一方、23-001 は 0.5 mg/kg となり、無機ヒ素濃度が高かった。23-001 は乾燥試料であることから、乾燥工程で原材料に含まれていたヒ素が濃縮されたものと考えられた。我が国では食品中の無機ヒ素に基準値は設定されていないが、CODEX では玄米及び精米に対してそれぞれ 0.35 mg/kg 及び 0.2 mg/kg の基準値が設定されており、23-001 はこれらより高い値であった。しかし、カイコの摂取量は玄米や精米と比べて圧倒的に少ない

と考えられることから、早急な対策を講じる必要はないと考えられる。

II. 有害元素(水銀)

1. 性能評価

加熱気化型水銀分析計による総水銀分析法の昆虫食試料への適用性を検討した。23-005 を添加回収試験用の試料として選択し、添加濃度 0.005 及び 0.2 mg/kg で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行って分析法の性能を評価した。その結果、真度 97~104%、併行精度<3%、室内精度<4%となった。本分析法は十分な精確さをもって分析を行うことが可能であり、実態調査に用いることが妥当と考えられた。

2. 昆虫食試料の分析

試料 23-001~23-007 及び 23-009 の総水銀を分析した。その結果、23-004 は 0.18 mg/kg であったが、その他の試料は 0.015 mg/kg 未満であった。いずれの試料も、魚介類に設定されている暫定的規制値「総水銀として 0.4 mg/kg」(昭和 48 年厚生省環乳第九九号)を下回っていることが確認された。水銀のうち、メチル水銀は魚介類に多く含まれ、妊娠中の女性が多く摂取すると胎児の脳神経系に影響を与えることが知られているため、23-004 のメチル水銀濃度を分析した。その結果、0.08 mg/kg となり、魚介類に設定されている暫定的規制値「メチル水銀(水銀として)0.3 mg/kg」(昭和 48 年厚生省環乳第九九号)を下回っていることが確認された。当該試料が他の試料と比較し、総水銀濃度が高値となった原因を明らかにするためには昆虫に与えた飼料についての情報が必要であるが、飼料についての情報は今回得られなかった。

III. 農薬

1. 分析法の検討

抽出方法、脱脂方法及びミニカラムによる精製

方法を検討し、アセトンで抽出後、多孔性ケイソウ土カラムで脱脂し、3 種の充填剤(ODS、PSA 及び SAX)を混合したミニカラム(GC-MS/MS 法はアルミナが積層されたミニカラム)で精製して LC-MS/MS または GC-MS/MS で測定する方法を確立した。

2. 妥当性評価

試料 23-003 を用いて添加濃度 0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の妥当性評価試験を行った。その結果、LC-MS/MS 対象農薬では 144 化合物中 135 化合物、GC-MS/MS 対象農薬では 141 化合物中 134 化合物で「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(妥当性評価ガイドライン)の真度、精度及び選択性の目標値を満たした。

3. 昆虫食試料の分析

試料 23-001~23-007 及び 23-009 を分析した結果、23-001 において ametryn (0.05 mg/kg) 及び chlorofenapyr (0.04 mg/kg) が 0.01 mg/kg 以上検出された。昆虫食には農薬の基準値は設定されていないため、(原材料に)一律基準 0.01 mg/kg が適用される。しかし、23-001 は乾燥品であり、原材料の水分含量の情報がないため、一律基準を超過しているか否かは不明である。

IV. ダイオキシン類

1. 前処理法の検討

昆虫食試料の前処理方法として、ダイオキシン類測定方法ガイドラインに準じて当所で従来から実施している試験溶液調製方法(従来法)の適用性を検討した。従来法を昆虫食試料に適用した場合、アルカリ分解やヘキサン抽出操作において、昆虫の外骨格などの不溶物が操作の妨げになることが懸念されたため、従来法を昆虫食試料に適用する際の操作性を確認した。

各試料を水酸化カリウム水溶液で 16 時間分解した。その結果、液面に一部昆虫の外骨格の不溶物が浮いているものの、水酸化カリウム溶液の用量と処理時間は問題ないことが確認された。なお、昆虫の外骨格はダイオキシン類を含む可能性が低いと、アルカリ分解時に不溶でも、昆虫食中のダイオキシン類の濃度調査に影響を及ぼさないと考えられた。一方で、ヘキサンで抽出した際には、微細化されたパウダー状の試料であるヨーロッパイエコオロギにおいて、ヘキサン層と水層の境界が見えにくくなることが認められた。そこで、細心の注意を払い、水層を除去した後、塩化ナトリウム水溶液での洗浄時に少量の硫酸を加えたところ、エマルションが消えてヘキサン層と水層を明確に分離することができた。また、3 種類の昆虫食試料とも、ヘキサン抽出の過程において、不溶物が分液ロートの活栓に詰まりやすいことが認められたものの、操作全体に大きな支障がないことを確認した。以上の検討から、従来法は昆虫食試料に対しても適用可能と考えられた。

2. 従来法適用時の添加回収試験

2-1. 添加回収試験用試料の選定

添加回収試験に用いる昆虫食試料を選定するため、3 種類の昆虫食試料中のダイオキシン類濃度（バックグラウンド）を測定した。その結果、各異性体の濃度範囲は、シルクワームサナギで 0.023～16 pg/g、ミルワームで 0.017～5.0 pg/g、ヨーロッパイエコオロギで 0.014～106 pg/g であった。総ダイオキシン濃度は、シルクワームサナギで 42 pg/g、ミルワームで 11 pg/g、ヨーロッパイエコオロギで 270 pg/g であり、この 3 種類の昆虫食試料の中ではミルワームの総ダイオキシン濃度が最も低いことが確認された。本検討から、添加回収試験にはダイ

オキシン類のバックグラウンド濃度が最も低かったミルワーム試料を用いることとした。

2-2. 添加回収試験

昆虫食試料に対する従来法の妥当性を検証するため、添加回収試験を実施した。ダイオキシン類の各異性体の添加濃度は、バックグラウンドの 5～10 倍程度となるようにダイオキシン類測定方法ガイドラインの目標検出下限濃度の 10 倍とした（ただし、一部の異性体ではバックグラウンド濃度の 5 倍未満となっている。）。その結果、各異性体の平均添加回収率は 84.1%～111.9%、RSD は 1.9%～13.3% の範囲であった。農林水産省が策定した「分析法の妥当性確認に関するガイドライン」により、分析対象物質の濃度が 0.001 mg/kg 以下の場合には、食品中に含まれる化学物質の分析に求められる回収率は 40%～120%と定められている。従来法を用いた添加回収試験で得られた回収率はその範囲内にあり、昆虫食試料のダイオキシン類分析法として従来法が適用可能であることが確認された。

課題 2 微生物・マイコキシンの汚染実態調査及びリスク評価

[1] 結果

1. 微生物培養法

各昆虫食製品の cfu を算出した結果、一般細菌数はミルワームで最も多く 1.2×10^8 cfu/g、ツムギアリで非検出であった。昆虫食では、製品毎に生菌数に大きな差があり、真菌よりも細菌の生菌数が高い傾向にあることが示された。

PGY 培地、PCA 培地、VRBG 培地およびチオグリコレート寒天培地で分離した細菌 242 株の同定を行った。今回の調査では 5 製品から食中毒と関連のある大腸菌群が検出された。また、

Staphylococcus 属菌は PCA 培地および PGY 培地で検出された細菌全体の 36.4%を占めており、*Bacillus* 属菌は PCA 培地および PGY 培地で検出された細菌全体の 10.0%を占めていた。PGY 培地で検出された個々の検体における細菌叢では、ヨーロッパエコオロギ1製品で *Bacillus* 属菌が、カイコ1製品で *Staphylococcus* 属菌が 100%を占めており高率に検出された。一部の製品からは、16S rDNA 塩基配列の相同性を指標とした範囲で *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) および *Bacillus cereus* (セレウス菌) と推定される菌株が単離された。大腸菌群は、PCA 培地および PGY 培地で検出された細菌全体の 13.2%を占めていたが、多くは食中毒事例の無い大腸菌群の属であった。しかし中には食中毒事例のある大腸菌群として、16S rDNA 部分塩基配列の相同性検索結果に基づく範囲で *Cronobacter sakazakii*、*Enterobacter cloacae* および *Escherichia coli* と推定される菌株が検出された。食中毒事例のあるこれらの種の細菌類を含めた大腸菌群は、健康なヒトや動物の腸管内や土壌等環境中に広く分布することが知られ、通常、農作物や畜産物から検出されることもあり、これらの食品と同等の結果であると言える。

DG-18 培地および DRBC 培地で単離した真菌 78 株の rDNA 部分塩基配列に基づいた同定を行った。今回検出された酵母は単離された真菌全体の 72%を占めた。また、マイコトキシン産生菌種を含む *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属 および *Fusarium* 属はミルワームやコガタスズメバチから計 4 株検出された。これらの分離株を種レベルまで同定した結果、*Aspergillus chevalieri*、*Fusarium oxysporum*、*Penicillium spinulosum* および *Penicillium olsowii* と同定され、これらは毒性の強いマイコトキシン産生性は知られていない菌種で

あることを把握した。

2. 質量分析法によるマイコトキシン検出法

食用昆虫 8 検体と精米について、アフラトキシン 4 種:それぞれ 2.5 µg/kg、DON:500 µg/kg、OTA:5 µg/kg、ZEN:50 µg/kg となるよう標準品を添加した試料から、マイコトキシンの抽出を行った。抽出液をイムノアフィニティーカラムで精製後、LC-MS/MS により 7 種のマイコトキシンを一斉に定量し、回収率を算出した。食用昆虫 8 試料における AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、DON、OTA および ZEN の回収率は、それぞれ 39~60%、41~58%、26~57%、23~54%、72~103%、48~78%および 47~78%の範囲内であった。

3. リアルタイム PCR 法による寄生虫検出法

多くの検体で、クリプトスポリジウム、ジアルジアともに検出限界は 2×10^2 copy/25 mg 検体であった。23-003 および 23-007 のクリプトスポリジウムの検出限界は 2×10^3 copy/25 mg 検体であった。23-004 のクリプトスポリジウムの検出感度は 2×10^4 copy/25 mg 検体であった。

[2] 考察

真菌および細菌の検出結果については、昆虫食製品毎に生菌数には大きな違いがあること、また真菌よりも細菌の生菌数が高い傾向にあることが示された。さらに、真菌では酵母、細菌では大腸菌群、*Bacillus* 属菌および *Staphylococcus* 属菌が多く分布していたことが明らかとなった。これらには食中毒の原因となり得る菌種も含まれるが、環境中に普遍的に存在する微生物であり、他の食品からも検出される事例は多いことから、それらと比べて特段昆虫食で注意が必要という状況ではなく、昆虫食の喫食による細菌性食中毒防止のために、他の食品同様に、養殖や加工、保存、調理等の各工程の衛生管理の重要性が示唆

された。次年度以降は、食中毒関連菌として、真菌では *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属および *Fusarium* 属菌、細菌では大腸菌群、*Bacillus* 属菌および *Staphylococcus* 属菌に着目し、汚染実態調査を実施する予定である。

マイコトキシンの検出法については、Codex の Procedural Manual における回収率のクライテリアは、分析対象の濃度が 10 µg/kg で 60～115%、100 µg/kg～10 mg/kg で 80～110%とされている。アフラトキシン 4 種と OTA については 10 µg/kg のクライテリアを参考にすると、アフラトキシン 4 種では 8 試料全てで、OTA では 3 試料で回収率下限を下回った。DON と ZEN については 100 µg/kg～10 mg/kg のクライテリアを参考にすると、DON では 2 試料で、ZEN では 8 試料全てで回収率の下限を下回った。一方で、精米においては 7 種のマイコキシンの回収率はクライテリアの範囲内に収まった。今回精製に用いたイムノアフィニティーカラムの適用は、穀類、ナッツ、飼料となっている。食用昆虫には一般的な穀類や飼料とは異なる夾雑物質が含まれており、それらがマイコトキシンと抗体の結合を阻害した可能性などが考えられた。定量限界値については、各マイコキシンの規制値又は基準値{総アフラトキシン:10 µg/kg、DON:1 mg/kg、OTA (Codex 規格):5 µg/kg}と比較すると十分に小さいことから、回収率が 20～60%であったとしても法律上問題となるレベルのマイコトキシンが混入しているかどうかは判断できる。これらのことから、今回開発した分析法は、アフラトキシン類や ZEN について十分な回収率が得られなかったが、DON と OTA については比較的良好であると言え、7 種のマイコトキシを一斉に検出可能である利点を活かした食用昆虫におけるマイコキシンのスクリーニングには利用できると考えられた。次年度以降

はこの一斉分析法を用い、食用昆虫におけるマイコキシンの汚染実態調査する予定である。

寄生虫の検出法については、今回は、市販キットを用い昆虫食中のクリプトスポリジウムとジアルジア DNA の検出を試みた。両キットとも水中の寄生虫の検出用であったが、昆虫食のように非常に多くの夾雑物を含む検体からも、寄生虫 DNA を高感度に検出することができた。クリプトスポリジウムは、検出限界 2×10^2 コピー/25 mg～ 2×10^4 コピー/25 mg で検出することができた。ジアルジアは、 2×10^2 コピー/25 mg～ 2×10^3 コピー/25 mg で検出することができた。クリプトスポリジウム1オーシストのコピー数は約 18,000 であり、ジアルジアのシスト1個あたりのコピー数は約 1,600 であると考えられている。これらのことから、今回の方法では理論上、クリプトスポリジウムは検体 25 mg あたり 0.01～1.3 個(1 g あたり 0.4～52 個)のオーシストを検出することができると考えられた。ジアルジアは、検体 25 mg あたり 0.13 個～1.25 個(1 g あたり 5.2 個～52 個)のシストを検出することができると考えられた。次年度以降は、サンプリングプランを作成し、本検査法を用いて、昆虫食中のクリプトスポリジウムとジアルジアの汚染状況を調査したい。また、本研究で対象とした他の寄生虫の検査法を確立する予定である。

課題 3 昆虫食のアレルゲン性に関する検討

[1] 結果

甲殻類アレルゲンと昆虫アレルゲンとの間には交差反応性が見られることが知られている。また、わが国の食品表示制度における「アレルゲンを含む食品の表示」では、甲殻類であるえび及びかにが義務表示品目に指定されており、その表示を検証するためのスクリーニング検査法として 2 種類の ELISA キット(S キット及び M キット)が指定されて

いる。これら 2 種類の ELISA キットでは、甲殻類の主要アレルゲンであるトロポミオシンに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体が使用されている。従って、これらの甲殻類 ELISA キットに対して反応性を示す昆虫食製品は、甲殻類アレルギー患者のトロポミオシンに対する IgE 抗体に結合しアレルギー症状を誘発する可能性が考えられる。そこで、これらの甲殻類 ELISA キットに対する各検体の反応性を検討した。その際、昆虫が含有するプロテアーゼによるタンパク質分解の可能性を考慮し、検体からのタンパク質抽出に関しては、キット取扱説明書に記載されている通常の方法(室温で一晩(12 時間以上)振とう)に加えて、プロテアーゼ阻害剤を添加する方法、及び、加熱抽出法(100℃、30 分)も合わせて検討した。加熱抽出法は、プロテアーゼを多く含有する非加熱のえび・かにを検体とする際に推奨されている方法である。

S キットでは全ての検体で反応が見られた。一方 M キットでは S キットと比較して反応性が低かった。検体からのタンパク質抽出に関してプロテアーゼ阻害剤の効果は特に見られなかった。一方、加熱抽出の場合、他の抽出方法と比較して大きな測定値が得られた。

そこで、検体からのタンパク質抽出方法として加熱抽出法を採用し、ELISA キットにおける測定結果の再現性について検討した。その結果、SD の大きな検体もあったが、S キット、M キットともに測定結果の再現性が確認された。検体の種類や加工工程における加熱／非加熱との相関は特に見られなかった。

[2] 考察

本研究では、甲殻類アレルゲンと昆虫アレルゲンの交差反応性の 1 つの指標として、甲殻類の主要アレルゲンであるトロポミオシンに対する抗体を

用いた ELISA キットにおける昆虫食検体の反応性について検討した。12 種類の市販の昆虫食製品について検討したところ、どの検体においても甲殻類 ELISA キットにおける反応性が確認されたことから、これらの製品が甲殻類アレルギー患者においてアレルギー症状を誘発する可能性があることが示された。

使用した 2 種類の ELISA キットを比較したところ、S キットの方が M キットよりも大きな測定値が得られた。これは、筆者らが以前報告した、甲殻類 ELISA キットにおける蜂の子及び蟻を原材料とする健康食品の反応性の検討結果と同様であり、2 種類の ELISA キットで使用されている抗体の特性の違いによるものと考えられる。

検体からのタンパク質抽出において、プロテアーゼ阻害剤の効果は特に見られなかったことから、今回使用した検体に関してはプロテアーゼの影響を特に考慮する必要はないと考えられた。一方、加熱抽出を行った場合に甲殻類 ELISA キットでの測定値が最も大きかった。トロポミオシンは線維状のアクチン結合タンパク質であり、2 本の α ヘリックスからなるコイルドコイル構造をとっている。これまでに、加熱によって、 α ヘリックスがほどける、溶解性が増大する等の報告があることから、加熱抽出ではトロポミオシンの溶解性の増大が ELISA 測定値の増大につながったのではないかと考えられる。

今後は、甲殻類アレルギー患者血清を使用してウェスタンブロッティングやヒト化培養マスト細胞活性化試験等を実施し、昆虫食によりアレルギー症状が誘発される可能性について検討を進めるとともに、加熱等の加工によるアレルゲン性の変化についても解析を行う予定である。

課題 4 諸外国の規制等の文献調査

1) 資料 1 に最近の世界各国の食品安全担当

機関やリスク評価担当機関による昆虫食関連の発表についてまとめた。

EU の他に韓国で制度の整備が進んでいる。これらの国はもともと昆虫食だけではなく、新規食品についての制度をもっていたため、そこに昆虫が加わった形になっている。

2) 資料 2 と 3 は昆虫食の販売にあたって、リスク評価機関やリスク管理機関がどのような情報を検討したのかの概要を評価書と書籍から抜き出したものである。基本的には HACCP の考え方に則って、考えられるハザードをできるだけ網羅し、それを実際の製品との関係で検討している。未知の部分が多いため、リストアップされている、昆虫に存在する可能性のある微生物等は膨大な数になる。検査の結果不検出になる、というデータが蓄積されていけば検査項目は将来減らせるかもしれないが現時点では網羅的に確認していくしかないと思われる。参考までに資料 4 として昆虫ビジネス研究開発プラットフォーム

(iBPF) によるコオロギ生産ガイドラインのチェックリストを掲載した。これは HP の説明によると「食品又は飼料の原料として利用することを想定したコオロギの生産過程における安全性を確保し、もって、食品又は飼料としてのコオロギに対する消費者の信頼を築くことを目的として作成」したもので、「生産者自らが、生産工程で想定される危害要因

(生産物等の散逸、有害化学物質による汚染、病害虫の発生、異物の混入等) について、管理すべき項目を決定し、管理方法を定めた上でこれを実践・記録し、更にこれを点検・評価して改善点を見出し、逐次生産の改善に活用する上での有用な基準を提供する」ためのものとのことである (https://www.knsk-osaka.jp/ibpf/guideline/cricket_guideline.html)。

ただし資料 2 と 3 に比べると明らかなように、具体的なハザードの可能性がある物質や項目およびその管理目標などの記述はなく実用性には疑問がある。厚生労働省が小規模事業者のための参考として提供している

「HACCP の考え方を取り入れた衛生管理のための手引書

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000179028_00003.html」の数々では製品ごとに管理すべきハザードとその管理方法、目標となる指標のチェック表や逸脱があった場合の対処法などを記載しており、実際に現場で使うことを想定していてどのレベルの安全性を目指しているのかは明らかである。

3) 昆虫食の安全性に関する文献として以下を今後要検討と同定した。①及び②は中国における昆虫食の安全性評価に関するもので、1)において中国の情報はカバーしていないことから参考になる可能性がある。ただし引用文献の多くが中国語で記載された中国国内文献であるため今年度は要検討に留まる。③は国内でのアレルギー症例で、昆虫に感作されている自覚がなくコオロギせんべいを初めて食べてアレルギー反応を経験したもので、昆虫食がより広まればこのような事例も増加すると予想されるため、注視していく必要があるだろう。

①A review on edible insects in China: Nutritional supply, environmental benefits, and potential applications, Xueying Lin et al., Curr. Res. Food Sci., 7, 100596 (2023).

②Toxicological characteristics of edible insects in China: A historical review, Yu Gao et al., Food Chem. Toxicol., 119, 237-251 (2018).

③食用コオロギ摂取によりアレルギー症状を呈した幼児例, 蓑島宗夫, 徳永舞, 小池由美, 伊藤靖典, アレルギー, 72(10) 1258-1262 (2023)

D. 結論

課題 1 有害化学物質の分析法開発及び汚染実態調査

昆虫食に含まれる有害化学物質の汚染実態調査に向けて、有害元素、ダイオキシン類及び農薬の分析法を検討した。

有害元素の分析法として、マイクロ波分解/ICP-MS 法を用いたカドミウム、鉛及びヒ素分析法及び加熱気化型水銀分析計を用いた総水銀分析法の昆虫食への適用性を検討した。分析法の性能を評価したところ、いずれも良好な結果が得られ、実態調査のための分析法として妥当であることが示された。

昆虫食を対象とした新規農薬分析法として、LC-MS/MS 及び GC-MS/MS を用いた農薬一斉分析法を開発した。妥当性評価試験を行ったところ、285 化合物中 269 化合物で妥当性評価ガイドラインの目標値を満たし、一部の農薬を除き、実態調査のための分析法として妥当と考えられた。

ダイオキシン類分析法として、従来から当所で使用している分析法(従来法)の昆虫食に対する適用性を検討した。その結果、前処理の操作性に大きな問題はないことが確認された。添加回収試験においても良好な結果が得られたことから、従来法は昆虫食のダイオキシン類分析法として適用可能であることが示された。

来年度以降は、本年度確立した分析法を用いて国内に流通する昆虫食の汚染実態調査を行う予定である。

課題 2 微生物・マイコキシンの汚染実態調査及びリスク評価

今回の調査では、昆虫食製品からは動物の腸内や土壌等環境中に広く存在する細菌群および酵母群が多く分布したことが示されたが、それらは他の食品からも検出される事例は多いことから、特段昆虫食で注意が必要という状況ではなく、他の食品同様に、一部の食中毒菌の汚染リスクに留意し、昆虫食の喫食による食中毒を防ぐため、養殖や加工、保存、調理等の各工程の衛生管理が重要であることが示唆された。また、昆虫食分析に適用するため、日本において規制が行われているマイコキシン分析法としてイムノアフィニティーカラムによる精製法と LC-MS/MS による検出法を組み合わせた 7 種のマイコキシンの一斉分析法の性能評価を行った結果、本法は一斉に検出可能である利点を活かし、食用昆虫におけるマイコキシンのスクリーニングには利用できると考えられた。さらに、市販キットを用いて、昆虫食からクリプトスポリジウムとジアルジア検出法の性能評価を行った結果、本法は昆虫食からこれらの原虫を低濃度でも検出することが可能であった。次年度は、本研究で確立した試験法を用いて、昆虫食製品から微生物およびマイコキシンの汚染実態調査を実施する予定である。

課題 3 昆虫食のアレルゲン性に関する検討

甲殻類の主要アレルゲンはトロポミオシンであり、昆虫類トロポミオシンと交差反応することから、昆虫食は甲殻類アレルギー患者にアレルギー症状を誘発する可能性がある。そこで、甲殻類トロポミオシンを特異的に認識する抗体を用い、国内で流通している昆虫食に含まれるタンパク質の中に抗体が認識するタンパク質が存在するかを検証した。

甲殻類トロポミオシン特異的抗体を構成試薬とする甲殻類 ELISA キットを用い実施したところ、12 種類の市販昆虫食製品すべてから、トロポミオシン抗体が反応するタンパク質が検出され、評価した昆虫食にはトロポミオシン様タンパク質が含まれていることが示唆された。また、非加熱の製品に比べ、加熱加工処理による抗原性の低下は認められなかったほか、昆虫タンパク質を抽出する際、加熱抽出法を採用することで昆虫トロポミオシンを感度よく検出できる傾向が観察された。本研究により得られた昆虫食の交差反応性に関する検討結果は、甲殻類アレルギー患者の健康被害の防止につながる知見となると考えられる。今後、臨床学的にアレルゲンが与える影響について、さらなる科学的根拠を集積することが必要である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 志田(齊藤)静夏:残留農薬検査における課題と展望－検査部位の国際整合化、試料調製法及び抽出法－、第 21 回食品安全フォーラム(令和 5 年 12 月 8 日、東京)
- 2) 廣田珠実、渡辺麻衣子、清水公德、工藤由起子、志田(齊藤)静夏:国内流通昆虫食における微生物分布実態調査、日本マイコトキシン学会第 90 回学術講演会(令和 6 年 1 月 10 日、東京)
- 3) 安達玲子、爲廣紀正、甲斐明美、吉田健介、亀山浩、柴田識人、近藤一成:「特定原材料くるみに対する特異的定量及び定性検査法の妥当性評

価」、日本食品衛生学会第 119 回学術講演会(令和 5 年 10 月 12-13 日、東京)

4) 畝山智香子:新規食品の安全性確保、日本食品科学工学会 70 周年記念シンポジウム(令和 5 年 8 月 24 日、京都)

5) 畝山智香子:ほんとうの食の安全を考える－最適な品質管理のための基礎－、食品品質保持研究会(令和 5 年 12 月 19 日、東京)

6) 畝山智香子:新規食品の安全性確保、日本分析化学会 表示・起源分析技術研究懇談会フードテック(ゲノム編集、培養肉、昆虫食、微細藻類)の最新動向について(令和 5 年 12 月 22 日、東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 本研究で用いた昆虫食

No.	昆虫	原産国	パウダー/姿	乾燥/冷凍	加熱の有無
23-001	カイコ(さなぎ、まゆ無し)	タイ	姿	乾燥	加熱
23-002	ミルワーム	タイ	姿	乾燥	加熱
23-003	ヨーロッパイエコオロギ	タイ	パウダー	乾燥	加熱
23-004	ヨーロッパイエコオロギ	日本	姿	冷凍	非加熱
23-005	カイコ(幼虫)	日本	姿	冷凍	非加熱
23-006	ジャイアントミルワーム	日本	姿	冷凍	非加熱
23-007	コガタスズメバチ	日本	姿	冷凍	非加熱
23-008	ツムギアリ	タイ	姿	乾燥	加熱
23-009	ツムギアリ	タイ	姿	冷凍	非加熱
23-010	キイロスズメバチ(幼虫)	日本	姿	冷凍	非加熱
23-011	ワタリバッタ	タイ	パウダー	乾燥	加熱
23-012	スパースローテッド・グラスホッパー (ノドバッタ)	タイ	姿	冷凍	非加熱
in02	ミルワーム	タイ	姿	冷凍	非加熱
in03	フタホシコオロギ	タイ	姿	冷凍	非加熱
in04	カイコ(幼虫)	日本	姿	冷凍	非加熱
in05	モンクロシャチホコ	日本	姿	冷凍	非加熱