

I. 総括研究報告

令和 6 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)

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

国内に流通する食用昆虫に含まれる有害元素及び農薬の汚染実態を把握するため、以下の検討を実施した。カドミウム、ヒ素及び鉛についてはマイクロ波分解/ICP-MS 法、水銀については加熱気化型水銀分析計による総水銀分析法の性能評価試験を実施した後、国内に流通する食用昆虫 63 検体の汚染実態調査を行った。その結果、カドミウムは 47 検体で定量限界 (0.01 ppm) 以上検出され、中央値 0.02 ppm、最大値 6.88 ppm (スジアカクマゼミの幼虫:乾燥品)、ヒ素は 59 検体で定量限界 (0.01 ppm) 以上検出され、中央値 0.07 ppm、最大値 17.45 ppm (カブトムシの成虫:乾燥品)、鉛は 57 検体で定量限界 (0.01 ppm) 以上検出され、中央値 0.05 ppm、最大値 13.56 ppm (黒アリの卵:乾燥品)、水銀は 56 検体で定量限界 (0.001 ppm) 以上検出され、中央値 0.004 ppm、最大値 0.963 ppm (カブトムシの成虫:乾燥品) となり、一部の検体で高値を示した。ヒ素及び水銀は、化学形態により毒性が異なるため、高値を示した検体については化学形態別分析が必要であると考えられた。また、昆虫表面に有害元素を含む土壌粒子等が付着している可能性も否定できないため、今後、有害元素の分布や洗浄を十分に行った場合の低減効果などについて調査が必要と考えられた。農薬については、昨年度確立した LC-MS/MS 及び GC-MS/MS を用いた一斉分析法の 0.005 ppm における妥当性を確認した。その結果、マトリックス検量線法で定量した場合、検討対象農薬 (285 化合物) の 9 割以上で妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。確立した分析法を用いて国内に流通する食用昆虫 50 検体の汚染実態調査を行った。その結果、9 検体から定量限界 (一部の農薬を除き 0.005 ppm) 以上の農薬 (延べ 20 農薬) が検出された。このうち、カイコ (さなぎ) 3 検体及び黒アリ (卵) 1 検体において 0.01 ppm を超える農薬 (延べ 6 農薬) が検出された。ただし、いずれの検体も乾燥品であり、原材料の水分含量や加工方法等が不明であったため、一律基準を超過しているか否かについては判定できなかった。

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

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、昨年度の調査結果を受けて、培養法、分子生物学的手法、質量分析法を用いて、引き続き分析法の改良を行い、さらに、真菌・細菌・マイコキシンについては、流通製品での汚染の実態調査を行った。真菌・細菌の分布実態については、31 昆虫食製品の調査を行った。その結果、今回供試した検体においては *Bacillus* 属が、非加熱製品では生菌の *Staphylococcus* 属菌および真菌が、比較的高頻度・高濃度で分布することが確認された。特に黄色ブドウ球菌やセレウス菌等の汚染リスクに留意する必要がある。また昆虫食製品の培養によらない迅速・簡便な細菌叢把握手法として、NGS 法が有用であることを確認した。マイコキシンの分析については、昨年度検討した分析法を改良後、35 製品の調査を行った結果、

2 製品からアフラトキシン B₁ が、4 製品からデオキシニバレノールが検出された。寄生虫の検出法については、リアルタイム PCR 法を用いて、ほとんどの昆虫食から赤痢アメーバおよびフォーラーネグレリアを低濃度でも検出することが可能であることを示した。しかし、今回、トキソプラズマ検出法については、トキソプラズマとその近縁原虫の DNA が陰性の昆虫食検体の入手が難しかったため、検討した検出法の評価が不可能であった。一方でフォーラーネグレリアおよびトキソプラズマまたはその近縁原虫の製品への混入が示唆された。乾燥状態または冷凍状態の昆虫食中でこれらの原虫が感染性を有したまま残存するか、または近縁原虫がヒトに健康影響を及ぼす種であるのかは不明であり、今後の原虫の分類や毒性に関する情報収集が必要である。昆虫食の喫食による真菌・細菌・寄生虫の汚染を原因とした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。

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漿との反応性、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。今年度は、昆虫食に含まれるタンパク質と甲殻類トロポミオシンの交差反応性やアレルギー患者血漿との反応性について検討した。その結果、解析対象とした 47 種類すべての昆虫食製品に甲殻類のトロポミオシン様タンパク質が含まれていることが明らかとなった。また、12 種類の昆虫食製品について患者血漿との反応性を検討したところ、含有される成分が甲殻類アレルギー患者の IgE 抗体と結合し、マスト細胞を活性化できることが示された。今後、甲殻類アレルギー患者血漿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、2024 年 7 月に発表されたシンガポールの昆虫規制の枠組みのほか、英国食品基準庁(FSA)の食用昆虫に関するリスクプロファイル、新規食品代替タンパク質中のアレルゲン検出方法に関するレビュー報告書等について調査を行い、安全性に関わる要点についてまとめた。

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 衛生微生物部・第三室長)

爲廣紀正(国立医薬品食品衛生研究所 生化学部・第三室長)

登田美桜(国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部・部長)

A. 研究目的

世界的な人口増加により、従来の畜産業および水産業のみでは、持続的かつ十分なタンパク質の供給が将来的に困難になると予測されている。こ

のような課題に対し、昆虫は代替タンパク源として注目を集めている。昆虫は一般に、タンパク質、ミネラル、ビタミン類等を豊富に含む。また、繁殖サイクルが短く、天候の影響を受けにくい、安定した大量生産が可能である。加えて、家畜と比較して温室効果ガス排出量および水使用量が大幅に少なく、飼料変換効率にも優れている。さらに、垂直農業を活用することで、限られた土地資源においても高密度な昆虫生産が可能となる。このような特性から、昆虫食は将来的な食料供給の安定化のみならず、環境負荷の軽減にも資すると期待されている。

一方で、昆虫食の安全性に関する科学的知見は依然として十分ではない。国際連合食糧農業機関 (FAO) の報告書「Looking at Edible Insects from a Food Safety Perspective」(2021 年) では、養殖および加工過程において適切な管理が実施されていない場合、有害化学物質および微生物による汚染リスクが生じる可能性が指摘されている。昆虫に与える飼料が有害化学物質によって汚染されている場合、飼料を介して有害化学物質が昆虫体内に蓄積するリスクが懸念されている。また、昆虫の養殖環境は微生物の増殖に適しているため、昆虫食製品に微生物が混入・増殖する可能性がある。さらに、甲殻類の主要アレルゲンタンパク質と昆虫由来タンパク質との交差反応性により、甲殻類アレルギー患者に対してアレルギー症状を引き起こす可能性も指摘されている。このような潜在的リスクに対する認識の高まりを背景として、欧州連合 (EU) をはじめとする諸外国では昆虫食の安全性評価および規制整備が進められている。一方、我が国においては国内に流通する製品の汚染実態や安全性に関する調査研究が限られており、科学的知見の蓄積が急務となっている。

以上の背景を踏まえ、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を総合的に評価するとともに、リスク管理策の検討に資する基礎データを提供することを目的とする。

課題 1 有害化学物質の分析法開発及び汚染実態調査

近年、持続可能な食料資源として注目されている食用昆虫については、飼料や飼育環境の特性に起因して、重金属、農薬、ダイオキシン類等の有害化学物質が体内に蓄積する可能性が指摘されている。特に、食品廃棄物や農業廃棄物を飼料として利用する場合、これらの汚染リスクが高まる可能性が懸念されている。しかしながら、国内に流通する食用昆虫に含まれる有害化学物質の汚染実態に関する知見は限られている。

本研究では、日本国内に流通する食用昆虫製品を対象に、有害元素、農薬及びダイオキシン類による汚染実態を明らかにすることを目的とする。昨年度は、食用昆虫に含まれる有害元素、農薬及びダイオキシン類の分析法を確立した。本年度は、確立した分析法の性能評価を行うとともに、国内流通製品における有害元素及び農薬の汚染実態調査を実施した。

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

コオロギやミルワームを中心とした昆虫食は、既に食品として認定された国も多く、世界的に昆虫食の流通量は増加している。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ト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、小麦と大麦でのオクラトキシン A (OTA) の基準値設定が了承された。そのため、昆虫食においてこれらマイコトキシンの汚染実態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、土壌や水を汚染することが知られる寄生虫の汚染を想定し、汚染実態調査を実施する。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、今年度は、昨年度の調査結果を受けて、培養法、分子生物学的手法、質量分析法を用いて、引き続き分析法の改良を行い、さらに、真菌・細菌・マイコトキシンについては、流通製品での汚染の実態調査を行った。

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、昆虫を喫食したことによるアナフィラキシー症例が国内で報告されており、海外でも同様のアナフィラキシー発症事例が認められている。したがって、昆虫食に対する需要の拡大は、国民の健康被害を生じる懸念があるため、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には、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。加えて、甲殻類の主要アレルゲンであるトロポミオシン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。先行研究では、昆虫を原料とする健康食品に甲殻類トロポミオシン特異的抗体と反応するタンパク質が含まれており、甲殻類アレルギーの患者が昆虫食を喫食するとアレルギー症状が誘発される可能性があることを報告している。そこで、本分担研究では、現在国内で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漿との反応性、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 6 年度は、令和 5 年度に引き続き公定検査法を用いて昆虫食 35 検体について昆虫食に含まれるタンパク質の甲殻類アレルギーにおける交差反応性を検証するとともに、いくつかの昆虫食製品について甲殻類アレルゲン患者血漿との反応性を検証した。

課題 4 諸外国の規制等の文献調査

2013 年に FAO が将来的な食料・飼料不足の問題の解決に昆虫の利用を推奨したことを受けて、代替タンパク質源の食品として昆虫の利用に関心が持たれるようになり、近年、国や地域レベルで多様な取組が行われている。我が国では一部の地域でイナゴや蜂の子など限られた昆虫が伝統的に食されてきた歴史があるが、近年、それ以外の食用昆虫の生産・販売について取り組む企業が登場している。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、食用昆虫のようなこれまで食経験のないものについては通常の商品とは異なる制度やガイドラインの策定が必要になる場合が多い。現在、我が国では食用昆虫に関する特別な規制制度はないが、食用昆虫の生産業がさらに拡大する場合には必要になる可能性もある。こうした状況を背景に、本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、アレルゲン性や飼料・加工による影響検討の進展に並行して随時更新する。今年度は、2024 年 7 月に発表されたシンガポールの昆虫規制の枠組みのほか、英国食品基準庁 (FSA) の食用昆虫に関するリスクプロファイル、新規食品代替タンパク質中のアレルゲン検出方法に関するレビュー報告書等について調査を行い、安全性に関わる要点についてまとめた。

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

有害元素の実態調査ではインターネットを介し

て購入した国内流通製品 63 検体(昨年度用いた検体を含む)を用いた。農薬の実態調査ではインターネットを介して購入した国内流通製品 50 検体(昨年度用いた検体を含む)を用いた。

[2] 試料調製

パウダー状の製品はよく混合後、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 (Verder Scientific 製) 及び GM300 (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] 有害元素分析

I. カドミウム、ヒ素及び鉛

カドミウム (Cd)、ヒ素 (As) 及び鉛 (Pb) の分析は以下のように行った。なお、内部標準元素にはインジウム (In) 及びタリウム (Tl) を用いた。

1. 試薬及び試液

超純水は、Milli Q Element A10 (Merck 製) により製造したもの(比抵抗 18.2 MΩ・cm)を使用した。硝酸 (1.42、Ultrapur-100)、過酸化水素水 (Ultrapure) は関東化学製を用いた。

混合標準溶液は SPEX CertiPrep 社製 XSTC-622 (10 mg/L) を使用した。インジウム (In) 及びタリウム (Tl) の標準原液はシグマアルドリッチ製 Trace CERT ICP 用を用いた。

インジウム (In) 及びタリウム (Tl) 混合内部標準溶液は、インジウム及びタリウムの濃度がそれぞれ 10 及び 0.5 µg/L になるように、各標準原液から適量分取し、硝酸 20 mL を加えた後、水で 200 mL に定容したものを用いた。

2. 装置

マイクロ波試料前処理装置は ETHOS One 及び

ETHOS-TC(いずれも Milestone 製)を使用した。
ICP-MS 装置は iCAP Q(Thermo Fisher Scientific 社製)を使用した。

3. 分析法

分解条件①: 分析用試料 0.5 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。これを、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)製分解容器に入れ、マイクロ波試料前処理装置により分解した。加熱は以下のように行った。
70°Cまで2分間で昇温後、50°Cまで1分間で降温し、その後200°Cまで20分間で昇温して200°Cで10分間保持した(総分解時間: 33分間)

分解条件②: 分解条件①では分解が不十分であった試料について、次のように行った。分析用試料 0.5 g を石英製分解容器に量り採り、硝酸 7 mL を加えた。これを、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)製分解容器に入れ、マイクロ波試料前処理装置により分解した。分解は以下の加熱を2回繰り返した。70°Cまで2分間で昇温後、50°Cまで1分間で降温し、その後240°Cまで20分間で昇温して240°Cで10分間保持した(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 を用いて測定した。なお、分解容器を開封して希釈する作業は HEPA (High Efficiency Particulate Air) フィルターを搭載したクリーンブース[集塵効率(0.3 µm 粒子): 99.97%以上]内で行った。

ICP-MS の測定条件は以下の通りである。なお、ICP-MS 測定に係る非金属製の容器・器具は約 5 mol/L の硝酸に1日以上浸漬させた後、超純水でよくすすぎ、HEPA フィルター搭載のクリーンブース内で乾燥させたものを用いた。

スプレーチャンバー: サイクロン型

コリジョンガス: ヘリウム(99.9999%)、4.9

mL/min

測定モード: KED (Kinetic Energy

Discrimination: 運動エネルギー弁別) モード

積分時間(s): 0.1 (Cd、Pb、Tl) 0.3 (As、In)

チャンネル数: 1

スペース(u): 0.1

掃引数(回): 10

繰り返し回数: 3 回

分析対象元素の測定質量電荷比 ^{75}As 、 ^{111}Cd 、 ^{208}Pb

内部標準元素の測定質量電荷比 ^{115}In (Cd、As)、 ^{205}Tl (Pb)

4. 性能評価

添加濃度 0.01 ppm で分析法の性能を評価した。ヒ素及び鉛はイエバエ(さなぎ: 冷凍品)、カドミウムはオオスズメバチ(さなぎ: 冷凍品)を用いた。無添加試料及び添加試料を1日2併行、5日間分析し、各性能パラメータを求めた。なお、用いた試料に各元素が含まれていたため(定量限界未滿)、無添加試料から得られた測定値の平均値を、対応する各添加試料から得られた測定値から差し引き、測定結果を算出した。

II. 水銀

1. 試薬及び試液

硝酸(1.42, Ultrapur-100)及びL-システインはナカライテクス製を用いた。超純水は Milli Q Element A10 (Merck 製)により製造したもの(比抵抗 18.2 MΩ·cm)を使用した。原子吸光分析用 1000 mg/L 水銀標準原液は関東化学製のものを用いた。

100 mg/L L-システイン溶液は、L-システイン 100 mg を量り採り、水 800 mL 及び硝酸 2 mL を加え溶解後、水で 1000 mL に定容して調製した。

2. 分析法

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 ppm 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 ppm 以上の測定には高濃度用の吸光セルを用いた。試料は 150°C で 1 分乾燥後、250°C で 10 分間加熱し、さらに 800°C で 2 分間加熱した。検量線用標準溶液は 150°C で 1 分乾燥後、800°C 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 時間以上浸漬した後、水でよくすすぎ、使用する直前に 750°C で 3 時間加熱した。冷却後、加熱気化型水銀分析計により 850°C で 4 分間再加熱したものを使用した。

検量線用標準溶液は、水銀標準原液を 100 mg/L L-システイン溶液で適宜希釈して調製した。各検量線用標準溶液中の水銀量は、検体の濃度に応じて 0.025~5 ng、0.5~30 ng、10~70 ng、50~150 ng の 5~10 点とした。

3. 性能評価

添加濃度 0.001 及び 1 ppm で分析法の性能を評価した。無添加試料及び添加試料を 1 日 2 併行、5 日間分析し、各性能パラメータを求めた。添加濃度 0.001 ppm ではイエバエ(幼虫:冷凍品)、添加濃度 1 ppm ではカイコ(幼虫:冷凍品)を用いた。なお、用いた試料に水銀が含まれていたため、無添加試料から得られた測定値の平均値を、対応する個々の添加試料から得られた測定値から差し引いて測定結果を算出した。

III. 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. 試薬及び試液

アセトニトリル、アセトン及びヘキサンは関東化学製の残留農薬試験用、LC-MS/MS 測定に使用した水及びメタノールは関東化学製の LC/MS 用を用いた。試験溶液調製用の水は超高純度蒸留水精製装置 NZJ-2DSYW(藤原製作所製)で蒸留したものをを用いた。ろ紙はアドバンテック製の定量ろ紙 No.5A、ケイソウ土は富士フイルム和光純薬製のセライト 545 を用いた。酢酸アンモニウムは富士フイルム和光純薬製の特級を用いた。固相ミニカラムは InertSep AL-N/VRA-PR(400 mg/1600 mg)、InertSep VRA-PR(1600 mg) 及び InertSep K-solute(20 mL)(いずれもジーエルサイエンス製)を用いた。

2. 装置及び測定条件

2-1. LC-MS/MS

LC-MS/MS 装置は、Nexera X3(島津製作所製)及び Triple Quad 7500(Sciex 製)を使用し、以下の条件で測定した。

カラム InertSustain C18(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 2 µm、ジーエルサイエンス製); カラム温度 40°C; 注入量 2 µL; 移動相 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(A 液)及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液(B 液); 流速 0.3 mL/min; グラジエント条件 0 分(A:B=98:2)→10 分(A:B=5:95)→15 分(A:B=5:95)→15.1 分(A:B=1:99)→20 分(A:B=1:99)→20.1 分(A:B=98:2); イオン化法 ESI(+)及び ESI(-); イオンスプレー電圧 2500 V; ヒーター温度 350°C; カーテンガス 窒素、35 psi; ネブライザーガス ドライエアー、70 psi; ターボガス ドライエアー、70 psi; コリジョンガス 窒素、7; 測定モード 選択反応モニタリング(SRM)

2-2. GC-MS/MS

GC-MS/MS 装置は、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) を使用し、以下の条件で測定した。

カラム DB-5ms (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m; Agilent Technologies 製); ガードカラム Rxi ガードカラム (フューズドシリカチューブ、内径 0.25 mm、長さ 2 m; Restek 製); カラム温度 50°C (1 min) – 25°C/min – 125°C (0 min) – 10°C/min – 300°C (10 min); キャリヤーガス 窒素; キャリヤーガス流量 1.5 mL/min; 注入方式 パルスドスプリットレス; 注入量 2 μ L; 注入口温度 260°C; トランスファーライン温度 300°C; イオン源温度 150°C; イオン化モード 大気圧化学イオン化 (APCI) 法 ポジティブモード; コロナ電流 2 μ A; コーンガス流量 270 L/h; AUX (auxiliary) ガス流量 300 L/h; メイクアップガス流量 300 mL/min; コリジョンガス アルゴン; 測定モード SRM

3. 試験溶液の調製

3-1. 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 Polytron PT 10-35 GT (Kinematica 製) 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。

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。

3-2. 多孔性ケイソウ土カラム精製

抽出液 8 mL (乾燥試料は試料 0.4 g 相当、冷凍試料は 0.8 g 相当) を採り、エタノール 5 mL を加えた。これをエバポレーターで 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 (InertSep K-solute Plus、5 mL 保持用、GL サイエンス製) 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。

3-3. ミニカラム精製

1) LC-MS/MS 対象農薬

InertSep VRA-PR (1600 mg、GL サイエンス製) 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 3-2 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、GL サイエンス製) 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 3-2 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. 定量

4-1. 溶媒標準溶液を用いた絶対検量線法

0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125 及び 0.0015 µg/mL 濃度の溶媒標準溶液 (LC-MS/MS 用はメタノール、GC-MS/MS 用はアセトン/ヘキサン(1:1))を LC-MS/MS または GC-MS/MS に注入し、検量線を作成した。各試験溶液を LC-MS/MS または GC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により濃度を求めた。

4-2. マトリックス検量線法

ブランク試験溶液 100 µL を採り、窒素気流下で溶媒を除去後、0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125 及び 0.0015 µg/mL 濃度の溶媒標準溶液 (LC-MS/MS 用はメタノール、GC-MS/MS 用はアセトン/ヘキサン(1:1))100 µL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。これらの溶液を LC-MS/MS または GC-MS/MS に注入し、検量線を作成した。各試験溶液を LC-MS/MS または GC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により濃度を求めた。

4-3. 標準添加法

「3. 試験溶液の調製」で得られた溶液を用いて、標準添加法用の試験溶液(無添加試験溶液、添加試験溶液 4 点)を調製した。作成した無添加試験溶液及び添加試験溶液を GC-MS/MS または LC-MS/MS に注入し、添加濃度を横軸、ピーク面積を縦軸として、回帰線を作成した。無添加試験溶液から得られたピーク面積に相当する濃度は、回帰線と横軸との交点から算出した。

5. 妥当性評価

ヨーロツパイエコオロギ(乾燥品)を用いて、添加濃度 0.005 ppm で確立した分析法の妥当性を評価した。「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)に従い、1 日 2 併行、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを求めた。定量は溶媒標準溶液を用いた絶対検量線法とマトリックス検量線法で行った。

6. 実態調査

確立した分析法を用いて国内に流通する食用昆虫 50 検体を分析した。定量は溶媒標準溶液を用いた絶対検量線法で行い、定量限界の 1/4 以上の濃度が検出された農薬については標準添加法を用いて定量値を算出した。

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) 供試検体

国内に流通する昆虫食を対象とした。オケラ 1 製品、コオロギ 12 製品、ワーム 2 製品、カイコ 3 製品、ハエ 2 製品、バッタ 3 製品、カメムシ 1 製品、ハチ 5 製品、アリ 1 製品、セミ 1 製品の合計 31 製品を市場で購入し収集した。そのうち 20 製品は加熱乾燥、10 製品は非加熱冷凍、1 製品は缶詰であった。これらは真菌・細菌培養検出法およびマイコトキシン分析に供試した。また、これらの供試検体とは別に、アリ 1 製品、コオロギ 2 製品、カイコ 2 製品、ワーム 2 製品、ハチ 1 製品の合計 8 製品を市場で購入して収集し、次世代シーケンスによるアンプリコンシーケンス解析での網羅的な細菌叢解析(NGS 法)および寄生虫のリアルタイム検出法開発に供試した。

(2) 真菌・細菌の検出

昨年度の調査結果を参照し、流通昆虫食から検出された細菌叢の中で、食中毒菌として重要性が高く、かつ検出される可能性が高い細菌群を選択し、*Stachylococcus* 属菌(黄色ブドウ球菌を含む)

および *Bacillus* 属菌(セレウス菌を含む)の汚染実態を調査した。

① 培養法による汚染菌の分離

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。*Bacillus* 属菌については、芽胞形成菌のため、栄養体を死滅させ芽胞体のみの菌数を測定するため、試験原液をストマッカー袋に入れ 75 °C で 30 分間加熱した液の 2 種類を区別して、菌分離実験に供した。試験原液は PBS ×1 を用いて 10 倍段階希釈した後、検出対照菌の種類に応じた選択培地に塗抹した。真菌検出の目的で Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol (DRBC) 寒天培地および Dichloran-Glycerol (DG-18) 寒天培地、*Stachylococcus* 属菌検出の目的で Baird-Parker 寒天培地、*Bacillus* 属菌検出の目的で NaCl Glycine Kim and Goepfert (NGKG) 寒天培地、計 4 種類の平板培地 1 枚ずつに 100 μL 塗抹した。DRBC 培地および DG18 培地は 25 °C で 7 日間の好気培養を行った。Baird-Parker 寒天培地は 37 °C で 2 日間の好気培養を行った。NGKG 寒天培地は、非加熱試験原液と加熱試験原液それぞれを塗抹後、32 °C で 1 日間の好気培養を行った。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。

② 分離株の分類・同定

真菌の分類については、DRBC 培地および DG18 培地上に形成されたコロニーの形態学的指標によって分類した。コロニーを目視および実体顕微鏡にて観察し、糸状菌と酵母に区別して計測した。さらに、糸状菌についてはその中でも分析対

象マイコトキシン 7 種 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、DON、OTA およびゼアラレノン (ZEN)) それぞれの産生菌が含まれる *Aspergillus* section *Flavi*、*Aspergillus* section *Circumdati* および *Fusarium* 属菌のいずれかであることを判定した。

細菌の分類については、NGKG 寒天培地に生育したコロニーのうち *Bacillus* 属菌以外のコロニーも生育している可能性を考慮し、最大 20 株を無作為に選び、グラム染色後に顕微鏡観察で桿菌のみを *Bacillus* 属菌と判断し、その割合を培地全体の生菌数に掛け合わせることで、*Bacillus* 属菌の cfu を算出した。同様に、Baird-Parker 寒天培地に生育したコロニーのうち、*Staphylococcus* 属菌以外のコロニーも生育している可能性を考慮し、最大 20 株を無作為に選び、グラム染色後に顕微鏡観察で球菌のみを *Staphylococcus* 属菌と判断し、その割合を培地全体の生菌数に掛け合わせることで、*Staphylococcus* 属菌の cfu を算出した。

③ アンプリコンシーケンス解析による網羅的細菌叢解析

B-(1)-①で上述の試験原液の 10 mL を遠沈管に入れ、9000 rpm で 10 分間遠心分離し、得られた沈殿物から Takara NucleoSpin Soil を用いて DNA 抽出を行った。この DNA を鋳型として細菌 16S rDNA V3V4 領域を標的としたアンプリコンライブラリ作製を行った。1stPCR では、プライマーセットは、1st_PCR_V3V4f_MIX(341f) :
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-CCTACGGGNGGCWGCAG および
1st_PCR_V3V4r_MIX(805r) :
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-GACTACHVGGGTATCTAATCC を、PCR 酵素は Tks Gflex DNA Polymerase を用いた。得られた PCR 産物を AMPureBeads で精製

後、Nextera XT index kit を用いて Illumina 社シーケンサー用のインデックスおよびアダプター配列を付加し、Miseq でシーケンスを行った。得られたリードについて、アダプター除去後、リード内の全塩基が Q 値 10 以上となるようにトリムおよびフィルタし、リード配列を得た。そこからパイプライン Qiime2 上で DADA2 を用いてリードの代表配列を取得した。これら配列に対して blast によって細菌属のアサインメントを行い、その結果を昆虫製品検体ごとに集計して、各細菌属の存在比率を算出した。

(3) 質量分析法によるマイコトキシンの検出

2023 年度には、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、AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、DON、OTA および ZEN、以上 7 種のマイコトキシンの一斉分析法の性能評価を実施した。今年度は、その分析法を用いて市販の昆虫食 35 検体中のマイコトキシンの分析を行った。また、一部のマイコトキシンの回収率を向上させるために、抽出溶媒の組成を変更したため、添加回収試験を今年度も実施した。

① 7 種のマイコトキシンの検出法

破碎した検体 6 g を 50 mL 容のプラスチックチューブに量りとり、アセトニトリル-水 (80:20) 30 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。1,710 g で 10 分間遠心分離した後、上清 5 mL を回収し、PBS 35 mL を加えて混合し、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した。2%の酢酸を含むメタノール 3 mL による溶出液を回収し、窒素気流により乾固後、1%の酢酸を含む 30%アセトニトリル水溶液 1 mL に溶解した。LC-MS/MS により計 7 種のマイコトキシンを定量した。

<LC-MS/MS の測定条件>

HPLC (LC-20A シリーズ、島津製作所)

カラム: InertSustain Swift C18 HP

(GL Sciences 社製)

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度: 40 °C

移動相: A 0.1%ギ酸水溶液

B 0.1%ギ酸含有アセトニトリル

分離条件: 0 分 A:B = 90:10

6 分 A:B = 10:90

9.5 分まで保持

流速: 0.2 mL/分

注入量: 5 μL

MS (Triple Quad 4500 システム、ABSciex)

イオン化: ESI positive

モニタリングイオン:

AFB₁ 313 [M+H]⁺ > 241, 213

AFB₂ 315 [M+H]⁺ > 287, 259

AFG₁ 329 [M+H]⁺ > 243, 200

AFG₂ 331 [M+H]⁺ > 313, 189

DON 297 [M+H]⁺ > 249, 203

OTA 404 [M+H]⁺ > 239, 102

ゼアラレノン (ZEN)

319 [M+H]⁺ > 283, 187

④ 添加回収試験

アフラトキシン 4 種 (各 500 μg/L)、DON (100 mg/L)、ZEN (10 mg/L) の 6 種のマイコトキシン混合アセトニトリル溶液を 30 μL ずつ添加回収試験用の検体に添加した。OTA ストック溶液 (100 mg/L、トルエン-酢酸 98:2) 100 μL とアセトニトリル 900 μL を混ぜ、10 mg/L 溶液を調製した。50 μL を 1.5 mL チューブに採り、遠心濃縮器で乾燥後、1 mL のアセトニトリルに溶かし、オクラトキシン A 添加溶液 (500 μg/L) を調製した。添加回収試験用の検体

に、60 μ L ずつ添加した。30 分間放置し、溶媒を揮発させた後に①に記載の方法で精製を行った。

⑤ DON 汚染の確認試験

破碎した検体 2.5 g を 50 mL 容のプラスチックチューブに量りとり、蒸留水 20 mL を加え、30 分間振盪攪拌した。1,710 g で 10 分間遠心分離後、上清 10 mL を回収し、PBS 20 mL を加えて希釈し、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液 12 mL をイムノアフィニティーカラム (DON-NIV WB、VICAM 社製) に添加し、PBS 10 mL により洗浄後、さらに、精製水 10 mL で洗浄した。メタノール 0.5 mL とアセトニトリル 1.5 mL による溶出液を回収し、窒素気流により乾固した。残渣を 500 μ L のアセトニトリル水 (1:9) に溶解し、試験溶液とした。DON の定量は、①に記載の方法で行った。

⑥ AFB₁ 汚染の確認試験

破碎した検体 5 g を 50 mL 容のプラスチックチューブに量りとり、アセトニトリル水 (80:20) 20 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。1,710 g で 10 分間遠心分離した後、上清 5 mL を回収し、PBS 20 mL を加えて混合し、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液 10 mL をイムノアフィニティーカラム (アフラキング、堀場製作所社製) に添加後、自然落下で通液した。PBS 10 mL により洗浄後、さらに精製水 10 mL で洗浄した。シリンジで残存する水分を除去後、アセトニトリル 3 mL による溶出液を回収し、窒素気流により乾固した。残渣を 1% のギ酸を含む 50% アセトニトリル水溶液 1 mL に溶解し、試験溶液とした。AFB₁ の定量は、①に記載の方法で行った。

(4) リアルタイム PCR 法による寄生虫検出

ヒト危害性の原虫類の汚染を想定し、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。今年度は赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、トキ

ソプラズマ (*Toxoplasma gondii*)、フォーラーネグレリア (*Naegleria fowleri*) に対する検査方法を対象とした。

① リアルタイム PCR 検出法

赤痢アメーバ、トキソプラズマ、フォーラーネグレリアの検出に使用した PCR プライマーは既報を参考し、検出条件、試薬等を最適化した。いずれの方法もネステッド PCR で、反応 1 の反応液を用いて反応 2 を行なった。

② DNA 添加回収試験

粉碎し均一にした昆虫食検体 170 mg に QIAamp DNA mini kit 付属の Buffer ATL 1.26 mL および Proteinase K 140 μ L を加え、検体懸濁液とした。その後、チューブを 56°C、2 時間加熱し、検体を溶解し、1,000 rpm、5 分間の遠心処理を行い、上精を回収した。上精を 200 μ L ずつ分注し、既知の濃度の陽性コントロール DNA を添加した。その後、QIAamp DNA mini kit の説明書に従い DNA を抽出した。抽出した DNA 溶液 5 μ L を用い、各寄生虫 DNA を検出した。検出結果から、昆虫食検体を用いた場合の各検出法の検出感度を求めた。陽性コントロール DNA は各寄生虫の DNA 抽出液で、長崎大学熱帯医学研究所から分与いただいた。

課題 3 昆虫食のアレルゲン性に関する検討

検体

国内で市販されている昆虫食製品 47 種類 (昨年度入手した 12 種類、今年度入手した 35 種類) を検体として使用した。検体からのタンパク質抽出は、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、加熱抽出法 (100°C、30 分) とした。

甲殻類 ELISA キットによる検討

本年度に入手した昆虫食製品 35 種類を対象とした。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、各キットにおける反応性を検討した。

ウェスタンブロット法による検討

昨年度入手した昆虫食製品のうち、4 種類(カイコ、ミルワーム、ヨーロップパイエコオロギ、ワタリバタ)及びエビの計 5 検体を対象とした。検体抽出液に含まれるタンパク質を電気泳動によって分離し、メンブレンに転写した。甲殻類アレルギー患者血漿(IgE)を用いて抗体反応を行い、反応するタンパク質を検出した。

EXiLE (IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression) 法による検討

昨年度に入手した昆虫食製品 12 種類を対象とした。ヒト高親和性 IgE 受容体を発現させたラット培養マスト細胞を甲殻類アレルギー患者血漿(IgE)で一晩感作した後、昆虫食で刺激した。昆虫食の刺激による IgE の架橋を介したマスト細胞の活性化を、レポータ遺伝子により検出した。抗原刺激時の応答が無刺激時の 2 倍を超えた場合にマスト細胞の活性化がみられたと判断した。

課題 4 諸外国の規制等の文献調査

諸外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。また、PubMed の文献検索により、食用昆虫の安全性確保の取り組みに参考になりそうな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. 性能評価

① カドミウム、鉛及びヒ素

昨年度は、0.1 ppm におけるマイクロ波分解/ICP-MS 法の性能評価を実施した。本年度は、より低濃度での性能を評価するため、各元素の濃度が低い検体(ヒ素及び鉛はイエバエ(さなぎ:冷凍品)、カドミウムはオオスズメバチ(さなぎ:冷凍品))を用い、0.01 ppm において 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を実施した。その結果、いずれの元素においても真度は 97~118%、併行精度及び室内精度は 6%未満であった。これらの結果から、本分析法は 0.01 ppm までの分析において十分な精確さを有しており、実態調査に適用可能な分析法であると判断された。

② 水銀

昨年度は、0.005 ppm 及び 0.2 ppm において、加熱気化型水銀分析計を用いた総水銀分析法の性能評価を実施した。本年度の調査検体について事前分析を行った結果、水銀濃度は 0.001 ppm 未満から 1 ppm の範囲であった。そのため、0.001 ppm 及び 1 ppm において分析法の性能評価を実施した。1 ppm における性能評価は、昨年度と同様にカイコ(幼虫:冷凍品)を用いて行った。一方、0.001 ppm の性能評価には、事前分析において水銀濃度が低かったイエバエ(幼虫:冷凍品)を使用した。その結果、いずれの濃度においても真度は 92~104%、併行精度及び室内精度はそれぞれ 3%未満及び 4%未満であった。これらの結果から、本分析法は 0.001~1 ppm の範囲において十分な精確さを有し、実態調査に適用可能な分析法であると考えられた。

2. 実態調査

性能評価を実施した分析法を用いて、国内で流通する食用昆虫 63 検体に含まれるカドミウム、ヒ素、鉛及び水銀濃度を分析した。

① カドミウム濃度

カドミウムについては、スジアカクマゼミ(幼虫:乾燥品)で最大値 6.88 ppm、次いで黒アリ(卵:乾燥品)で 1.20 ppm が検出され、一部の検体では高濃度のカドミウムが含まれていることが確認された。スジアカクマゼミ及び黒アリはいずれも乾燥品であるため、濃縮されたものと考えられる。セミのカドミウム蓄積に関する報告はないが、鉛等の重金属は体内に蓄積することが知られている。本調査では、餌や飼育(生育)環境等の情報は入手できなかったが、セミの幼虫は一般に地中で植物の根から樹液を吸って生育することから、植物を介してカドミウムを摂取し、体内に蓄積した可能性が考えられた。また、アリは土壌や餌に含まれる金属を蓄積しやすいことが知られており、黒アリの高濃度検出も同様の要因によると考えられる。ただし、スジアカクマゼミ、黒アリともに、昆虫表面に高濃度のカドミウムを含む土壌粒子等が付着している可能性も否定できないため、今後、カドミウムの分布や洗浄を十分に行った場合の低減効果などについて調査が必要と考えられた。

我が国では、玄米及び精米に対して「カドミウムとして 0.4 ppm」の基準値(平成 22 年 4 月 8 日 食安発 0408 第 2 号)が設定されている。また、CODEX では種々の食品に対して 0.05~2 ppm(ナチュラルミネラルウォーターは 0.003 ppm)、EU では 0.01~3 ppm の基準値が設定されている。本調査で最も高濃度検出されたスジアカクマゼミ(幼虫:乾燥品、1 匹当たりの平均重量 1.37 g)は、これらの基準値を超過していた。食品安全委員会では、

カドミウムの耐容週間摂取量を 7 µg/kg 体重/週と設定しており、体重 55 kg の成人が 1 日 6 匹摂取すると、この耐容週間摂取量に達する計算となる。なお、韓国では一部の昆虫が食用昆虫として認定されており、食用昆虫中のカドミウムに対して(乾燥重量で)0.1 ppm の基準値が設定されている。本調査では 7 検体で 0.1 ppm を超過していた。

② ヒ素濃度

ヒ素については、我が国では農産物に対して 1.0~3.5 ppm の基準値が設定されている。また、CODEX では食塩や食用油脂等に対して総ヒ素として 0.1~0.5 ppm(ナチュラルミネラルウォーターは 0.01 ppm)、EU では食塩に対して総ヒ素として 0.5 ppm の基準値が設定されている。本調査では、15 検体が 0.5 ppm を超えていた。特に、カブトムシ(成虫:乾燥品)で 17.45 ppm 及び 16.85 ppm、コガネムシ(成虫:乾燥品)で 3.28 ppm 及び 1.86 ppm、黒アリ(卵:乾燥品)で 5.45 ppm となり、高濃度検出された。カブトムシ、コガネムシ、黒アリはいずれも乾燥品であるため、濃縮されたものと考えられる。カブトムシ及びコガネムシと同じ甲虫目に属するキクイムシはヒ素を蓄積することが報告されており⁴⁾、カブトムシ及びコガネムシも同様に、餌や土壌等の環境中のヒ素を取り込み、蓄積したものと考えられた。また、黒アリについても、土壌や餌に含まれるヒ素を取り込み、体内に蓄積した可能性が考えられた。ただし、カブトムシ、コガネムシ、黒アリのいずれも、昆虫表面に高濃度のヒ素を含む土壌粒子等が付着している可能性が否定できないため、今後、ヒ素の分布や洗浄を十分に行った場合の低減効果などについて調査が必要と考えられた。

コオロギでは、海外産(タイまたはベトナム産:いずれも乾燥品)が<LOQ~0.13 ppm であったのに対し、国産(冷凍品及び乾燥品)は 0.17~1.32

ppm であり、国産の方がヒ素濃度が高い傾向が見られた。コオロギは養殖されたものと考えられ、検出されたヒ素は飼料由来と推察される。このため、国産の方がヒ素濃度の高い飼料を与えた可能性が示唆された。

ヒ素は化学形態により毒性が異なり、一般に、無機ヒ素化合物の方が有機ヒ素化合物(アルセノベタイン等)よりも毒性が高いとされている。また、韓国では食用昆虫に含まれる無機ヒ素化合物に対して(乾燥重量で)0.1 ppm の基準値が設定されている。このため、本調査でヒ素濃度が高値を示した検体については、化学形態別分析が必要であると考えられる。食品安全委員会によると、平均的な日本人の食事における総ヒ素の推定一日摂取量は 199 µg/日である。本調査で最大値を示したカブトムシ(成虫:乾燥品、1 匹当たりの平均重量 1.21 g)は 1 日 10 匹摂取すると、この推定一日摂取量に達する計算となった。

③ 鉛濃度

鉛については、我が国では農産物に対して 1.0 ～5.0 ppm の基準値が設定されている。また、CODEX では種々の食品に対して 0.01～1 ppm、EU では 0.01～3 ppm の基準値が設定されている。本調査で最も高濃度検出された黒アリ(卵:乾燥品)は 13.56 ppm となり、これらの基準値を超過していた。本製品は乾燥品であるため、濃縮されたものと考えられる。黒アリは土壌や餌に含まれる鉛を取り込み、体内に蓄積した可能性のほか、高濃度の鉛を含む土壌粒子等が昆虫表面に付着している可能性が考えられるため、今後、鉛の分布や洗浄を十分に行った場合の低減効果などについても調査が必要と考えられた。韓国では食用昆虫に対して(乾燥重量で)0.1 ppm(カブトムシの幼虫とシラホシハナムグリの幼虫は 0.3 ppm)の基準値が設定

されている。本調査では 13 検体で 0.1 ppm を超過していた。

食品安全委員会の報告によると、平均的な日本人の食事における鉛の推定一日摂取量は 8.88 µg/日である。本調査で最大値を示した黒アリ(卵:乾燥品)を 1 週間に 1 製品(5 g)摂取すると、この推定一日摂取量に達する計算となった。

④ 水銀濃度

水銀については、我が国では魚介類に対して暫定的規制値「総水銀として 0.4 ppm」(昭和 48 年厚生省環乳第 99 号)が設定されている。また、EU では総水銀として 0.1～1 ppm の基準値が設定されている。本調査では、1 ppm を超える検体はなかったが、我が国の魚介類の暫定的規制値(0.4 ppm)を上回るものが 4 検体(カブトムシ 2 検体、コガネムシ 2 検体)あった。最も高濃度検出されたのはカブトムシ(成虫:乾燥品)の 0.963 ppm であった。

コオロギについて、海外産(タイまたはベトナム産:いずれも乾燥品)と国産(冷凍品及び乾燥品)の総水銀濃度を比較すると、海外産は<LOQ～0.045 ppm であったのに対し、国産は 0.023～0.180 ppm となり、ヒ素と同様に、国産の方が濃度が高い傾向が見られた。この結果から、国産の方が与えた飼料に含まれる総水銀濃度が高かった可能性が示唆された。

水銀もヒ素と同様に、化学形態により毒性が異なる。メチル水銀は魚介類に多く含まれ、特に妊娠中の女性が過剰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。このため、水銀についても化学形態別分析を行う必要があると考えられた。JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議)では、水銀の暫定耐容週間摂取量を(総水銀として)4 µg/kg 体重/週と設定している。本調査で最大値を示したカブトムシ(成虫:乾燥品、1

匹当たりの平均重量 1.21 g) では、体重 55 kg の成人が 1 日 27 匹摂取すると、この耐容週間摂取量に達する計算となった。

⑤ 生育段階による濃度差

ツムギアリの成虫(冷凍品)と卵(缶詰)、カイコの成虫(冷凍品)とさなぎ(冷凍品)、スズメバチの成虫(冷凍品)とさなぎ(冷凍品)に含まれる各元素の濃度を比較した結果、生育段階による大きな差異は認められなかった。ただし、サンプル数が少ないため、統計的な比較は困難であり、今後の調査が必要である。

以上の結果より、一部の食用昆虫製品において高濃度の有害元素が含まれていることが明らかとなった。ヒ素及び水銀は化学形態により毒性が異なるため、今後、化学形態別分析を行う必要があると考えられた。

[2] 農薬

1. 妥当性評価

昨年度、LC-MS/MS 及び GC-MS/MS を用いた農薬一斉分析法を開発し、0.01 ppm における妥当性を確認した。本年度は、確立した分析法の妥当性をより低濃度で評価するため、0.005 ppm において 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を実施した。試料には昨年度と同様に、ヨーロッパエコオロギ(乾燥品)を用いた。定量は、溶媒標準溶液により作成した絶対検量線法とマトリックス検量線法(マトリックス標準溶液により作成した絶対検量線法)で行った。

(1) 選択性

GC-MS/MS 対象農薬である esprocarb では 0.005 ppm に相当するピーク面積の 1/3 程度の妨害ピークが検出されたが、その他の農薬については選択性に問題はなかった。

(2) 真度、併行精度及び室内精度

マトリックス検量線法を用いた場合、添加濃度 0.005 ppm において妥当性評価ガイドラインの真度の目標値(70~120%)を満たした農薬は、GC-MS/MS 対象農薬で 141 化合物中 131 化合物(93%)、LC-MS/MS 対象農薬で 144 化合物中 137 化合物(95%)であった。一方、溶媒標準溶液により作成した絶対検量線を用いて定量した場合は、GC-MS/MS 対象農薬 126 化合物(89%)、LC-MS/MS 対象農薬 115 化合物(80%)で添加濃度 0.005 ppm において真度の目標値を満たした。併行精度及び室内精度は、真度の目標値を満たしたすべての農薬において目標値(併行精度 RSD 25%未満、室内精度 RSD 30%未満)を満たした。

一部の農薬ではマトリックス標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比が 0.80~1.20 の範囲を超えた。マトリックス検量線法では真度の目標値を満たしたが、溶媒標準溶液により作成した絶対検量線では目標値を満たさなかった農薬は測定におけるマトリックスの影響が原因と考えられた。しかしながら、多くの農薬ではマトリックスの影響は比較的小さく、本分析法は高い精製効果を有する分析法であると考えられた。

以上の結果から、一部のミニカラム等からの回収率が低い農薬やマトリックスの影響が大きい農薬を除き、開発した分析法は、いずれの検量線を用いた場合でも精確に定量できることが示された。

なお、マトリックス検量線法において真度が 70% 未満となった化合物のうち、acephate は InertSep VRA-PR 精製、bromopropylate、dimethylvinphos (E)、edifenphos 及び pyraclofos は InertSep AL-N/VRA-PR 精製、hexachlorobenzene はケイソウ土カラム精製、clofencet 及び propamocarb はケイソウ土カラム及び InertSep VRA-PR 精製における損失が、真度が低い主な原因と考えられた。

2. 実態調査

確立した分析法を用いて、国内で流通する食用昆虫 50 検体を分析した。前述のように、ヨーロッパイエコオロギ(乾燥品)を用いた妥当性評価試験では、一部の農薬を除き、マトリックスの測定への影響は小さかった。しかしながら、昆虫の種類や加工の程度によってはマトリックスの影響を大きく受ける可能性がある。このため、本調査では溶媒標準溶液を用いて作成した絶対検量線法と標準添加法の両方で定量を行った。その結果、いずれの方法を用いた場合も、50 検体中 9 検体(18%)から定量限界(一部の農薬を除き 0.005 ppm)以上の農薬(延べ 20 農薬)が検出された。検出された 20 農薬のうち 17 農薬については、標準添加法で得られた分析値に対する溶媒標準溶液を用いた絶対検量線法での分析値の比が 0.80~1.20 の範囲に収まっており、大部分の農薬ではマトリックスの影響が比較的小さいことが示された。しかし、カイコ(さなぎ)中の Ametryn 及び Chlorfenapyr では 1.22~1.38 の範囲にあり、マトリックスの影響がやや大きいことが確認された。これらの結果を踏まえると、実態調査では溶媒標準溶液を用いた絶対検量線法で暫定的な定量値を求め、農薬が検出された場合には、標準添加法を用いてマトリックスの影響を補正した正確な分析値を求めるのがよいと考えられた。

現在、我が国では食用昆虫に対する農薬の基準値は設定されていないため、原材料に対して一律基準(0.01 ppm)が適用される。本調査ではカイコ(さなぎ)3 検体及び黒アリ(卵)1 検体において 0.01 ppm を超える農薬が延べ 6 農薬検出された。しかし、これらはいずれも乾燥品であり、原材料の水分含量や加工方法等の情報を入手できなかったため、一律基準を超過しているか否かは判断で

きなかった。なお、黒アリは養殖であるか天然であるかは不明であったが、カイコは養殖と考えられ、検出された農薬は飼料(桑葉)由来と考えられた。

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

C-1. 研究結果

(1) 真菌・細菌の検出

①培養法による汚染菌の検出

真菌・細菌では昆虫食 31 製品から培養試験を行い、17 製品(検出率 54.8%)から *Bacillus* 属菌を検出し、最高濃度は栄養体では 24-017 コガタスズメバチで 5.8 log cfu/g、芽胞体で 24-009 イエバエの 4.2 log cfu/g であった。8 製品(検出率 25.8%)から *Staphylococcus* 属菌を検出し、最高濃度は 24-017 コガタスズメバチで 6.5 log cfu/g であった。8 製品(検出率 25.8%)から真菌を検出し、糸状菌と酵母の合計の最高濃度は 24-021 オオスズメバチで 6.8 log cfu/g であった。さらに、昆虫食製品を、非加熱冷凍製品と加熱乾燥製品とに分類し、それぞれの群での傾向を比較したところ、*Bacillus* 属菌では非加熱冷凍製品で 14 中 8 製品(57.1%)、加熱乾燥製品で 16 中 9 製品(56.3%)から検出された。*Staphylococcus* 属菌では非加熱冷凍製品で 14 中 6 製品(42.9%)、加熱乾燥製品で 16 中 2 製品(12.5%)から検出された。真菌では非加熱冷凍製品で 14 中 7 製品(50.0%)、加熱乾燥製品で 16 中 1 製品(6.3%)から検出された。したがって、*Bacillus* 属菌でのみ、加熱乾燥製品と非加熱冷凍製品で生菌の検出率が同等の傾向が見られた。

②アンプリコンシーケンス解析による網羅的細菌叢解析

今年度、昆虫食 6 製品のアンプリコンシーケンス解析を実施した。NGS 法では、供試した 6 検体

中 4 検体で、全検出細菌のうち約 30%~50%を *Lactococcus* 属(乳酸菌)・エンテロバクター科に属する細菌群(動物の腸内細菌)が占めていたことを確認した。*Streptococcus* 属(ツムギアリ・カイコ)、*Bacillus* 属(ツムギアリとコガタススメバチを除くサンプル)、*Acinetobacter* 属(全サンプル)など、食中毒原因菌種を含む属が多く含まれていた。また、得られた結果は、昨年度実施した、同一検体の培養法による菌叢解析結果と比較した。細菌の属の数は、NGS 法では培養法よりも多く認識でき、難培養性の菌や死滅菌などの培養法では検出できなかった食中毒菌の分布が確認できた。ただし NGS 法で得られた結果は定量的なデータではないことに留意する必要がある。NGS 法では、培養法で生菌が非検出となった昆虫食製品 23-001、23-002 および 23-009 でも菌が検出でき、それぞれ *Streptococcus* 属菌、*Pediococcus* 属菌、*Entomoplasma* 属菌が占有的に分布していたことが明らかとなった。培養法で生菌が検出できていた 23-003、23-006 および 23-007 については、培養法で占有的に分布していたことを把握していた、それぞれ *Bacillus* 属菌、*Lactococcus* 属菌および *Staphylococcus* 属菌も、比較的高比率で検出され、培養法と矛盾はなかった。なお *Staphylococcus* 属菌については上述の属の細菌よりは低比率であったものの、今回検出された全リードのうち 23-006 では 1.3%、23-007 では 3.2%の比率で、検出できた。

(2) 質量分析法によるマイコトキシン検出

食用昆虫 8 検体について、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 31.7~65.9%、47.1~58.2%、42.5~62.2%、49.4~65.6%、93.1~123.3%、46.8~75.3%および 53.5~103.9%の範囲内であった。この分析法を用いて、食用昆虫 35 検体を分析した結果、検体 24-028(タイ産のカイコの蛹)および 24-040(タイ産のカイコ成虫)から AFB₁ がそれぞれ 0.6 および 0.2 µg/kg 検出された。また、検体 24-002、005、026 及び 027(いずれもタイ産のコオロギ)から DON が 7~19 µg/kg の濃度範囲で検出された。なお、様々な食用昆虫を分析した結果、バックグラウンドのシグナルが認められた検体が存在したため、各マイコトキシンの検出限界値は、それらシグナルの影響を無視できる濃度に設定した。また、AFB₁ 又は DON が検出された検体について、確認のためにそれぞれのマイコトキシン精製のイムノアフィニティーカラムを用いた分析を行った。その結果、いずれの検体においても 7 種のマイコトキシン同時分析法による定量値とほぼ同等の定量値が得られた。

(3) リアルタイム PCR 法による寄生虫検出法

DNA 添加回収試験を実施した結果をところ、赤痢アメーバを検出する場合、検体 1g あたり 0.3~33.3 ng DNA 以上の検出感度であった。一方、フォーラーネグレリアでは、23-001、23-003 および 23-006 は添加した DNA を検出することができたが、それ以外の 3 検体では、DNA 非添加の陰性コントロール検体でも陽性となり、添加した DNA の回収効率を評価できなかった。この際増幅した PCR 産物が真にフォーラーネグレリアの DNA 由来であるのか、または非特異的増幅による擬陽性であるのかを判断するため、PCR 産物のシーケンスを行い、NCBI のデータベース登録配列に対して BLAST

検索を実施したところ、フォーラーネグレリアの登録配列と一致した。トキソプラズマでも、全検体同様の結果となったため、PCR 増副産物のシーケンスを行ったところ、原虫アピコンプレックス門に分類される未同定生物の登録配列と一致した。

C-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。細菌では、*Bacillus* 属菌および *Staphylococcus* 属菌の生菌が多く分布していたことが明らかとなった。特に *Bacillus* 属菌については、加熱乾燥製品からも高頻度・高濃度で生菌が検出された。セレウス菌を含む *Bacillus* 属菌は芽胞体を形成し耐熱性があるため、加工後の製品にも残存しやすい可能性が考えられた。これらは環境中に普遍的に存在し、食中毒の原因となるセレウス菌や黄色ブドウ球菌も含まれる。昆虫食の喫食による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。今回、非加熱冷凍製品と加熱乾燥製品両方で製品の入手が可能だった昆虫種はコオロギのみで、製品数が少なかったため、昆虫の種類別に微生物の検出率を比較することはできなかったが、非加熱冷凍製品の中ではハチ類で比較的真菌の検出濃度・頻度が高い傾向が見られたことから、昆虫種類でも微生物の検出傾向が異なる可能性があると考えられた。今後は、非加熱冷凍製品と加熱加工製品、昆虫種類のどちらがより微生物汚染のリスクに影響を及ぼすかを詳細に評価するため、同一の昆虫種類においてサンプルの加工程度を変えた検体群を入手し、比較検討する必要がある。さらに、従来の培養法と NGS 法によって得た細菌叢解析結果を比較したところ、

NGS 法の結果が培養法の結果と矛盾せず、また培養法では菌非検出であった製品からも、菌叢把握が可能であったことが示された。このことから、昆虫食製品の培養によらない迅速・簡便な細菌叢把握手法として、NGS 法が有用であることを確認した。来年度以降は、生化学性状・遺伝子塩基配列を指標としてこれら分離株の同定を実施し食中毒菌として重要なセレウス菌・黄色ブドウ球菌の存在を確認すること、またそれらの毒素産生性を確認し、より詳細に昆虫食製品のリスクを評価する予定である。

マイコトキシンの検出については、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とすると、一部の検体において回収率の下限を下回った。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とすると、DON では 1 試料で回収率の上限を上回り、ZEN では 8 試料中 4 試料で回収率の下限を下回った。添加回収試験に用いた試料は昨年度と異なるが、抽出溶媒の組成を変更することにより、DON と ZEN で回収率が改善する傾向が認められた。この分析法を用い、食用昆虫におけるマイコトキシンの汚染実態を調べた結果、2 検体から AFB₁、4 検体から DON が検出された。AFB₁ の検出濃度については、全食品に対して設定されている規制値(4 種のアフラトキシンの総和 10 µg/kg)を下回っていた。また、DON の検出濃度については、小麦に設定されている基準値(1.0 mg/kg)を大きく下回っていたことから、これらマイコトキシンが検出された昆虫食製品を摂取したとしても、直ちに健康に影響が生じることはないと考えられた。昆虫食にマイコトキシン

汚染が生じるメカニズムは不明であるが、昆虫の飼育に用いられた餌に混入していたマイコトキシンが昆虫に残存したことや、飼育中の昆虫にかびが感染してマイコトキシンを昆虫内に産生したこと等が考えられる。来年度も汚染調査を行い、昆虫食において汚染が生じているマイコトキシンを明らかにする。

赤痢アメーバに関しては、検体 23-004(ヨーロツパイエコオロギ)の検出感度が悪かったが、食品からの原虫の検出を考えた場合、それ以外の検体に関しては十分な感度を有していると考えられた。フォーラーネグレリアおよびトキソプラズマに関しては、DNA 非添加の陰性コントロール検体でも陽性となった検体が有り、添加したDNAの回収効率を評価できなかった。このことについて考察するため、PCR 増幅産物のシーケンスを行い配列解析したところ、フォーラーネグレリア、およびトキソプラズマを含むアピコンプレックス門原虫の登録配列と一致した。今回は 110 bp の遺伝子塩基配列を解析したに留まったため、配列の種特異性が十分でなく、増幅した DNA が厳密なフォーラーネグレリアやトキソプラズマ由来であったかの判断はできないと考えるが、少なくとも、フォーラーネグレリアやトキソプラズマ、またはPCRプライマーを設計したrRNA 遺伝子塩基配列 110 bp 上は違いを認識できないこれら原虫との近縁種が、実際に昆虫食製品に混入していた可能性が高いと考えられた。フォーラーネグレリアおよびトキソプラズマの確からしい検出法を構築するには、これらの原虫の分類に関する情報を収集し、プライマー設計を工夫するなど、方法のさらなる改良が必要と考えられた。今回、昆虫食から検出されたフォーラーネグレリアまたはトキソプラズマとその近縁種が、乾燥状態、あるいは冷凍状態の昆虫食中で感染性を有したまま残存するか、

あるいは関連原虫がヒトに健康影響を及ぼす種であるのかは不明であるが、昆虫食には他にも未知の原虫が含まれていると予想され、昆虫食の取り扱いの際には、細心の注意を払い、喫食する際には十分な加熱を行うことが必要であると考えられた。来年度は、これまで構築したリアルタイムPCR 検査法を用いての昆虫食製品中の汚染実態調査を行う予定である。

課題3 昆虫食のアレルゲン性に関する検討

C-1. 結果

日本国内において通信販売等で入手可能な市販の昆虫食製品 47 種類を検体として使用した。検体は、カイコ、ミルワーム、コオロギ、ハチ、アリ、バッタ、ワーム、オケラ、ハエ、カメムシ、タガメ、及びセミを原料とし、本来の形状のままの冷凍品や乾燥品、あるいはパウダー状の製品、また、加熱された製品あるいは非加熱の製品等、多様な試料となるよう選択した。

検体となる市販の製品に抗甲殻類トロポミオシン抗体と反応するタンパク成分が含まれているかについて、昨年度に解析した昆虫食 12 製品に引き続き、今年度の本事業で収集した昆虫食 35 製品を対象に調査を行った。35 検体の測定結果(定量値はエビタンパク質を標準として算出された値であり、昆虫トロポミオシンの定量値ではない)のうち、M キットでは 31 種類の検体で反応が見られ、S キットでは 35 種類全ての検体で反応が認められた。したがって、解析したすべての昆虫食製品において抗甲殻類トロポミオシン抗体が反応する成分が検出された。

次に、昆虫食製品に甲殻類アレルギー患者のIgE 抗体が反応するタンパク質が含まれているかをウエスタンブロット法にて解析した。カイコ、ミルワ

ーム、ヨーロッパエコオロギ、ワタリバツタを原料とする4種類の昆虫食及びエビ抽出タンパク質を検体としたウェスタンブロッティングにおいて、甲殻類アレルギー患者2名と健常者の血漿(IgE抗体)を用いて抗体反応を行ったところ、健常者のIgE抗体が反応するタンパク質は認められなかった。一方、甲殻類アレルギー患者のIgE抗体は、エビだけではなく昆虫食に対して反応を示した。よって、今回検討した昆虫食製品に甲殻類アレルギー患者のIgE抗体が反応するアレルゲンが含まれていることが示された。

さらに、昨年度に入手した昆虫食12種類を対象として、昆虫食が甲殻類アレルギー患者のIgEを介してマスト細胞の活性化を引き起こすかをEXiLE法にて検討した。甲殻類アレルギー患者2名と健常者の血漿(IgE抗体)を用いてマスト細胞を受動感作させ、昆虫食で刺激を行ったところ、健常人のIgE抗体ではマスト細胞の活性化はみられなかった。一方、甲殻類アレルギー患者のIgE抗体ではすべての昆虫食においてマスト細胞の活性化が認められた。よって、今回検討した昆虫食12製品に含まれる成分は、甲殻類アレルギー患者のIgE抗体と結合し、マスト細胞を活性化することが示された。続いて、昆虫食によりEXiLE反応を誘発する濃度について、エビと比較した。抗原刺激時の応答が無刺激時の2倍となる抗原濃度を比較したところ、昆虫食はエビの10倍から1000倍のタンパク質濃度が必要であることが明らかとなった。よって、12種類の昆虫食製品が有するマスト細胞を活性化させる力価はエビの1/10から1/1000であることが示唆された。

C-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。35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。昨年度に検討した昆虫食12種類においても同様に甲殻類ELISAキットにおける反応性が確認されていたことから、本研究で検討に用いた47製品の昆虫食すべてにおいて甲殻類トロポミオシン抗体が反応するトロポミオシン様タンパク質が含まれることが示された。

甲殻類アレルゲン患者血漿との反応性の検討として、ウェスタンブロット法とEXiLE法による検討を行った。ウェスタンブロット法では昆虫食に含まれるタンパク質が甲殻類アレルギー患者のIgE抗体と特異的に反応することが確認され、昆虫食には35-38kDのトロポミオシン以外にも、高分子量タンパク質等が甲殻類アレルギー患者のIgE抗体と反応するアレルゲンとして含まれていることが認められた。また、EXiLE法の解析において、昆虫食に含まれる成分は甲殻類アレルギー患者のIgE抗体と結合してマスト細胞の活性化を引き起こしたことから、甲殻類アレルギー患者が昆虫食によりアレルギー症状を誘発する可能性が示唆された。

今後は、EXiLE法による試験対象品数を増やし、アレルギー患者血漿との反応性に関する知見を集積するとともに、ヒト化マウスにおけるアレルギー誘発試験等を実施し、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さらに検討を進める。また、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. シンガポールの規制

2024 年 7 月 9 日、シンガポール食品庁 (Singapore Food Agency:SFA) が、食用及び飼料用の昆虫に関する規制の枠組みを発表した。本枠組みの一環として、昆虫を輸入、養殖、あるいは加工してヒト食用または動物の飼料にすることを意図する企業が遵守すべきガイドラインも示されている。本ガイドラインは、特定の昆虫を食用として摂取することを許可している国や地域 (欧州連合、オーストラリア、ニュージーランド、韓国、タイ等) を参考に、徹底した科学的レビューを経て作成された。ガイドライン策定の主旨は次の 3 点である。

- ・ 対象の昆虫種について、ヒトが食用とした歴史があるかどうか評価されなければならない。
- ・ 昆虫や昆虫製品の養殖や加工において、汚染物質が混入してはならない。
- ・ 最終製品は消費しても安全でなければならない。

ガイドラインの詳細を別添 1 (分担研究報告書: 課題 4 参照) にまとめた。これは、我が国において将来的に食用・飼料用の昆虫に関する規制制度を検討する場合に参考になる。原則として、食用・飼料用ともに、野生種は使用しないこと、生産及び収穫後の工程においてハザードと管理措置を特定するための危害分析重要管理点 (HACCP)/ 食品安全マネジメントシステム (FSMS) 計画の策定・実施が求められている点に留意すべきである。

その後シンガポールでは、2025 年 1 月 8 日に複数の食品関連の法律を統合した食品安全及び安全保障法案 (Food Safety and Security Bill: FSSB) が可決された。FSSB において、「insect-like species」は次の通り定義されている。シンガポールでは既に一部の昆虫種 (catalogued insect-like species: 現在 16 種) が食用として認可されているが、それ以外の昆虫を食用として上市するには、安全

性の評価と事前認可が必要となる。

* Food Safety and Security Bill (FSSB)

<https://www.parliament.gov.sg/docs/default-source/bills-introduced/food-safety-and-security-bill-49-202410500c06-cf20-4f7c-80e0-f6bb39002e9a.pdf>

(一部抜粋)

- ▶ “insect-like species” means a form of animal life within the biological classification Insecta, Arachnida, Myriapoda or Clitellata, and includes an insect-like species at a particular stage of its development
- ▶ “catalogued insect-like species” means an insect-like species which is declared a catalogued insect-like species under section 13(2)
- ▶ 13(2) The Agency may, with the approval of the Minister, by order in the Gazette, declare an edible insect-like species as a catalogued insect-like species where the Agency is satisfied that the insect-like species, where made available for consumption by the general public, is not food of higher regulatory concern.

2. 英国の食用昆虫に関するリスクプロファイル

英国では、食用昆虫は新規食品制度のもと規制されている。英国食品基準庁 (Food Standards Agency: FSA) が、2015 年に欧州食品安全機関 (EFSA) が発表した食用昆虫のリスクプロファイルを出発点として、2015 年から 2020 年の間に科学文献で特定された関連情報を用いて更新することを目的とした技術報告書を発表した。レビューの対象には、EFSA リスクプロファイル (2015) と ACNFP (Advisory Committee on Novel Foods and Processes) により過去に特定された、ヒト消費用とし

て商用生産される可能性の高い昆虫 18 種を選択している。リスクは、アレルゲン性、ウイルス/細菌/寄生虫感染の可能性、有毒物質、AMR 細菌を対象にした。技術報告書の対象となった、ヒト消費用として商用生産される可能性の高い昆虫 18 種と、レビューにより特定された微生物ハザード、毒性的ハザード(重金属、カビ毒、農薬)、アレルゲン性、組成の変動の要点を別添 2(分担研究報告書:課題 4 参照)に抜粋した。

また、技術報告書の付属文書として、様々な未加工食用昆虫の収穫時に測定された微生物レベル(Table A)、様々な加工食用昆虫の微生物レベル(Table B)、昆虫の組成変動(Table C)、本報告の文献レビューで確認された昆虫種別の主なハザード(Table D)が示されている。これらのデータは、今後、食用昆虫の検査を行う上で有用な参考データとなるだろう。

* Technical Report Risk Profile on Edible Insects

Last updated: 3 October 2022

<https://www.food.gov.uk/research/risk-profile-on-edible-insects>

(付属文書)

- Table A : Microbial levels for different unprocessed edible insects
- Table B : Microbial levels for different processed edible insects
- Table C : Composition variability for insects
- Table D : Key hazards identified in this literature review by insect species

3. 英国における飼料用昆虫の飼育に関する廃棄物の安全性評価

英国 FSA が、現在は許可されていない 4 種類の飼料基質を用いたモデル昆虫飼育システム(black soldier fly)における、化学的・微生物的データを

得るための委託研究の報告書を発表した。試験対象とした基質は、スーパーマーケットの動物副産物を含む余剰品(スーパーマーケット由来)、食品加工の動物副産物を含む余剰品(製造所由来)、動物副産物を含む接客業の厨房廃棄物(ケータリング由来)、鶏糞(家禽の糞尿由来)である。これら基質をアメリカミズアブ(black soldier fly larvae)の飼育に利用し、飼料基質、幼虫、糞のサンプルを採取して、化学汚染物質と微生物汚染(金属、動物用医薬品、農薬、カビ毒、PAH、硝酸塩/亜硝酸塩、PFAS、天然毒素、微生物、ウイルス RNA)の分析を行った結果を報告している。既に許可されている飼料基質を使用している英国の昆虫生産者から得たサンプルも対照として含まれている。

食用昆虫の安全性は、飼料基質に大きく依存する。そのため本報告は、循環型経済の観点から、将来的に飼料基質に利用される可能性がある廃棄物による食用昆虫への影響を知る上で貴重な報告である。

* Fera Science 社報告書

<https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/Supply%20of%20data%20requirement%20to%20assess%20the%20safety%20of%20currently%20non-permitted%20waste%20streams%20to%20be%20used%20for%20rearing%20insects%20for%20feed.pdf>

4. 英国におけるアレルゲン検出方法のレビュー

英国 FSA が、新規食品代替タンパク質中のアレルゲン検出方法のレビューを実施した。新規食品代替タンパク質の一つとして食用昆虫が対象となっており、報告書に記された要点は下記の通り。詳細については別添 3(分担研究報告書:課題 4 参照)にまとめた。

食用昆虫の安全性を考えるうえで、アレルゲン性は最大の課題と言っても過言ではない。食用昆虫のアレルゲンに特化した検査法が未開発の中で、交差反応しやすい他のアレルゲンについての既存検査法を踏まえた現状の課題がまとめられている有用な報告である。

要点

- ・ 食用昆虫のアレルゲン性や、甲殻類と共有する汎アレルゲンとの交差反応性を知るためには、臨床試験や症例研究などヒト経口暴露に関するより多くのデータが必要である。
- ・ アレルゲンではないが、昆虫や甲殻類の炭水化物であるキチンはヒトの免疫反応に影響を及ぼすため、理解を深める必要がある。
- ・ 甲殻類 ELISA 検査キットは、最終製品中の昆虫タンパク質を検出できるが、定量への信頼性が得られない。そのため ELISA キットにおいて十分な感度で昆虫アレルゲンを検出できるようにするためには、甲殻類 ELISA キットを適用するのではなく、昆虫に特異的な新しい ELISA キットを開発する必要がある。
- ・ グルテンおよび大豆 ELISA キットは、昆虫タンパク質製品中の飼料由来アレルゲンの検出に適用できる。
- ・ 昆虫用の飼料に由来して、昆虫の腸管に存在する未消化のアレルゲン、又は昆虫の体に付着したアレルゲンが、昆虫最終製品で検出されることが実証された。そのため消費者へのリスクの管理について早急に検討すべきである。

5. EFSA による昆虫の新規食品評価

欧州食品安全機関(EFSA)は、EU の新規食品制度(認可制)のもと食用昆虫に関するリスク評価を実施している。令和 6 年度に発表された 3 件の

評価報告を別添 4(分担研究報告書:課題 4 参照)にまとめた。

本課題の令和 5 年度報告書において、2021 年に EFSA が発表したヨーロッパエコオロギの評価で検討された情報をまとめた。別添 4(分担研究報告書:課題 4 参照)に示した通り、EFSA は令和 6 年度に発表された評価でもヨーロッパエコオロギを対象にしているが、各評価対象の製造方法や組成が異なっていることから、別の食品(つまり同等品ではない新規のもの)と判断されて個々に評価が実施されている。評価項目については令和 5 年度とほぼ同様である。このように、原料とする昆虫種が同じであっても、飼料基質や製造工程、組成などが同等と見なされなければ、個々に安全性を確認することが重要かつ必要であることがわかる。

6. 文献

1) Addressing the safety of new food sources and production systems

Compr Rev Food Sci Food Saf. 2024;23:e13341.
(オープンアクセス)

doi: 10.1111/1541-4337.13341.

本文献は、シンガポールと国連食糧農業機関(FAO)による「新しい食料源と生産システム」に関する報告であり、食用昆虫に関する微生物的ハザード、化学的ハザード、物理的ハザードがまとめられており参考になる。各ハザードについて以下に要約した。

微生物的ハザード

- ・ 汚染された飼料基質が使用されたり、昆虫が野生から収穫されたりするような不衛生な条件下では、食用昆虫種に関連する微生物的リスクが高まる可能性がある。Garofalo らのシステムティックレビューによると、食用昆虫の微生物

物 叢 に は 、 *Bacillus*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Cronobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Yersinia* が含まれる可能性がある。これらは既知の病原性細菌種に関連する属である。

- ・ 寄生虫については、ミールワームから *Toxoplasma gondii*、ミールワーム、コオロギ、イナゴから *Cryptosporidium* spp.、*Isospora* spp.、*Cestoda* (サナダムシ) が確認された報告がある。

化学的ハザード

- ・ カビ毒、重金属(ヒ素、カドミウム、鉛)のほか、有機リン系難燃剤、ポリ塩化ビフェニル、有機塩素系殺虫剤を含む POPs を蓄積する可能性がある。
- ・ 植物由来の基質で飼育された昆虫は、農薬を蓄積する可能性がある。脂溶性の農薬はより高濃度に吸収され、脂溶性の低い農薬はより容易に排泄される。
- ・ 甲殻類やイエダニに存在するアレルゲンであるトロポミオシンとアルギニンキナーゼに起因する様々な昆虫種に対する食物アレルギーはよく特徴づけられている。
- ・ 新規 (de novo) 感作のリスクを伴う、特性が明確にされていない昆虫タンパク質も存在する可能性がある。

物理的ハザード

- ・ 昆虫を丸ごと食べた場合には、脚、殻、剛毛などの小さな体の部分が窒息のハザードとなる可能性がある。粉末状に加工された昆虫は、そのような物理的ハザードはありそうにない。

2) Analysis of Microbiological and Chemical Hazards in Edible Insects Available to Canadian

Consumers

Beata M Kolakowski, Krystyna Johaniuk, Helen Zhang, Etsuko Yamamoto

Food Prot. 2021 Sep 1;84(9):1575-1581. (オープンアクセス)

doi: 10.4315/JFP-21-099.

本文献は、カナダ CFIA が実施した食用昆虫に関する予備検査の結果。検査対象は、*Salmonella* spp.と *Escherichia coli*、農薬、重金属。

3) An analysis of emerging food safety and fraud risks of novel insect proteins within complex supply chains

A Traynor, D Thorburn Burns, D Wu, N Karoonuthaisiri, A Petchkongkaew, C T Elliott
NPJ Sci Food. 2024 Jan 20;8(1):7. (オープンアクセス)

doi: 10.1038/s41538-023-00241-y.

本文献は、EU における食用昆虫及びその製品のサプライチェーンの解明と、食品安全及び不正行為に関わるポイントをまとめている。安全性については飼料基質、不正行為については新しい加工技術が懸念事項になると報告している。

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

本研究では国内に流通する食用昆虫を対象に有害化学物質(有害元素及び農薬)の汚染実態を調査した。

[1]有害元素

カドミウム、ヒ素及び鉛についてはマイクロ波分解/ICP-MS 法、水銀については加熱気化型水銀分析計による総水銀分析法について性能評価試験を実施した後、国内に流通する食用昆虫 63 検

体の汚染実態調査を行った。その結果、最大値はカドミウム 6.88 ppm、鉛 13.56 ppm、ヒ素 17.45 ppm、水銀 0.963 ppm となり、一部の検体で高値を示した。ヒ素及び水銀は化学形態により毒性が異なることが知られていることから、今後、本調査でヒ素及び水銀が高濃度で検出された検体について化学形態別分析を行う予定である。

[2]農薬

昨年度確立した LC-MS/MS 及び GC-MS/MS を用いた農薬一斉分析法について、0.005 ppm において妥当性を確認した後、食用昆虫 50 検体の汚染実態調査を行った。その結果、9 検体から定量限界（一部の農薬を除き 0.005 ppm）以上の農薬（延べ 20 農薬）が検出された。このうち、4 検体において 0.01 ppm を超える農薬（延べ 6 農薬）が検出された。ただし、いずれの検体も乾燥品であり、原材料の水分含量や加工方法が不明であったため、一律基準を超過しているか否かについては判断できなかった。

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

今回の調査では、31 昆虫食製品の調査を行った。その結果、これらにおいて *Bacillus* 属が、一部の非加熱製品からは生菌の *Staphylococcus* 属菌および真菌が、比較的高頻度・高濃度で分布したことが確認された。黄色ブドウ球菌やセレウス菌等の汚染リスクに留意する必要がある。また昆虫食製品の培養によらない迅速・簡便な細菌叢把握手法として、NGS 法が有用であることを確認した。来年度は、実際に昆虫食製品から分離された黄色ブドウ球菌およびセレウス菌株における毒素産生性について評価する予定である。また、マイコトキシンの分析については、昨年度検討した分析法を改良

後、35 製品の調査を行った。その結果、2 製品から AFB₁ が、4 製品から DON が検出され、昆虫食においてマイコトキシン汚染が生じている実態が明らかとなった。来年度も調査を継続し、食用昆虫を汚染するマイコトキシンを明らかにする。さらに、寄生虫の検出法については、リアルタイム PCR 法を用いて、ほとんどの昆虫食から赤痢アメーバおよびフォーラーネグレリアを低濃度でも検出することが可能であることを示した。しかし、今回、トキソプラズマ検出法については、トキソプラズマとその近縁原虫の DNA が陰性の昆虫食検体の入手が難しかったため、検討した検出法の評価が不可能であった。今回検出されたフォーラーネグレリアおよびトキソプラズマまたはその近縁原虫が、乾燥状態、あるいは冷凍状態の昆虫食中で感染性を有したまま残存するか、あるいは近縁原虫がヒトに健康影響を及ぼす種であるのかは不明であるが、昆虫食には他にも未知の原虫が含まれていると予想され、さらなる種の確認実験およびヒトへの毒性に関する情報収集が必要である。来年度は、これまで構築したリアルタイム PCR 検査法を用いての昆虫食製品中の汚染実態調査を行う予定である。

昆虫食の喫食による真菌・細菌・寄生虫の汚染を原因とした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。

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（トロポミオシン）は昆虫類トロポミオシンと相同性が高いことから、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。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と甲殻類トロポミオシ

ンの反応性を検討したところ、すべての昆虫食製品において甲殻類トロポミオシンとの交差反応性があることが確認された。また、甲殻類アレルギー患者由来 IgE 抗体の昆虫食に対する反応性の検討では、昆虫食成分は甲殻類アレルギー患者の IgE 抗体と結合し、*in vitro* でマスト細胞の活性化を引き起こすことが示された。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やヒト IgE 抗体との反応性に関する検討結果は、甲殻類アレルギー患者の昆虫食による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

1) 登田美桜. 諸外国の新規食品制度について. *ファルマシア*, 60(10), 926-930 (2024)

2. 学会発表

1) Shizuka Saito-Shida, Maki Saito, Tomoaki Tsutsumi : Multi-residue methods for pesticides in edible insects by LC-MS/MS and GC-MS/MS, 15th European Pesticide Residue Workshop (令和 6 年 9 月 24 日, スイス・チューリッヒ)

2) 志田(齊藤)静夏, 齋藤真希, 小林奈穂, 張本雅恵, 鈴木美成, 堤智昭: 食用昆虫に含まれる水銀, カドミウム, 鉛及びヒ素分析の検討, 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会(令和 6 年 11 月 7 日, 愛知)

3) 張天齐, 高附巧, 鍋師裕美, 志田(齊藤)静夏, 堤智昭: 食用昆虫に含まれるダイオキシン類の分

析法の検討, 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会(令和 6 年 11 月 7 日, 愛知)

4) 志田(齊藤)静夏, 齋藤真希, 小林奈穂, 堤智昭: 食用昆虫に含まれる農薬の一斉分析法の開発及び実態調査, 第 41 回農薬環境科学・第 47 回農薬残留分析合同研究会(令和 6 年 11 月 11 日, 徳島)

5) 田口千恵, 爲廣紀正, 吉田真由美, 尾上愛, 志田(齊藤)静夏, 安達玲子, 柴田識人: 甲殻類アレルギー患者において昆虫食が I 型アレルギー症状を誘発する可能性の検討, 第 31 回日本未病学会学術総会(令和 6 年 11 月 2-3 日, 石川)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし