

東京都におけるカビ毒に関する調査研究

田端 節子^a

東京都では、我が国で初めてのカビ毒への規制としてアフラトキシンB₁に対する規制値が設定されて以来、継続してカビ毒に関する調査研究を行ってきた。まず、アフラトキシン、パツリン、オクラトキシン、シトリニンについて、定量と確認を含んだ回収率、感度、精度、選択性の良好な分析法を開発した。次に、これらの方法を用いて、国内のカビ毒汚染調査を行った。その結果、国内に流通するソバ、ハトムギ、白コショウ、唐辛子等にアフラトキシン汚染があることを初めて明らかにした。また、市販リンゴジュース、国産リンゴから初めてパツリンを検出し、国内でパツリンの自然汚染が起きていることを明らかにした。本稿では、これまでに東京都が行ってきたカビ毒に関する調査研究について述べる。

キーワード: カビ毒, 分析法, 汚染実態調査, アフラトキシン, パツリン, オクラトキシン, シトリニン, デオキシニバレノール, フモニシン, TLC, HPLC, GC-MS, LC-MS/MS

はじめに

カビは、その生育過程で様々な化学物質を産生する。その中には、ペニシリンのように抗生物質として医薬品に使用され、ヒトにとって大変有益なものもあるが、家畜やヒトに毒性を有し、障害を与えるものもある。カビが産生する化学物質のなかで、ヒトや動物に対して有害なものは、カビ毒（マイコトキシン）と呼ばれ、100以上の種類があることが知られている。カビ毒を産生したカビそのものは、加熱等により死滅してしまうが、カビ毒は、熱に対して安

定なものが多く、加熱後の食品中にも残存する。したがって、カビが検出されない食品から高濃度のカビ毒が検出されることも珍しくない。また、種々の調理加工によってもほとんど減少しないため、食品中のカビ毒検査を行って、高濃度のカビ毒を含む食品を排除して食の安全性を確保する必要がある。

カビ毒の中で、毒性が強く、実際に食品を汚染している主要なものを表1に示した。アフラトキシンは、カビ毒が注目されるきっかけとなったカビ毒であり、標的臓器は肝

表1. 主要なカビ毒

カビ毒	産生菌	主な毒性	主な汚染食品	世界の主な規制値 (µg/kg)
アフラトキシン	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i>	肝臓障害 (強い発ガン性)	ナッツ類, 穀類, 香辛料, 豆類等	4~20 (総 AF) 2~5 (AFB ₁)
パツリン	<i>Penicillium expansum</i>	臓器出血 (詳細不明)	リンゴ	50
オクラトキシン	<i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> <i>P. verrucosum</i>	腎臓障害	穀類, コーヒー豆, ブドウ加工品等	5 (OTA)
シトリニン	<i>P. citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i> <i>Monascus purpureus</i>	腎臓障害	穀類	2000
トリコテセン系カビ毒 (DON, NIV, T-2等)	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F. sporotrichioides</i> 等	消化器, 免疫系 障害	穀類	750~1000 (DON) 15~200 (T-2+HT-2)
ゼアラレノン	<i>F. graminearum</i> 等	女性ホルモン様 作用	穀類, 豆類等	200~1000
フモニシン	<i>F. verticillioides</i> 等	肝臓, 腎臓障害	トウモロコシ	1000

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

臓であり、発がん性が非常に強い。2004年にケニアでトウモロコシを汚染したAFが原因と考えられる中毒事件が発生し、100人以上の人が死亡している¹⁾。オクラトキシンとシトリニンの標的臓器は腎臓である。トリコテセン系カビ毒は、急性毒性では消化器に、慢性毒性では免疫系に障害を与え、日本を含め、世界で中毒事件が起きている。ゼアラレノン²⁾は、他のカビ毒とは異なる特徴的な毒性として女性ホルモン様作用を有し、家畜等で不妊等の被害が出ている。このように、それぞれのカビ毒により、産生するカビ、毒性、汚染する食品が異なっており、それに応じて世界各国で規制値が設定されている。

東京都では、これらのカビ毒について、1970年代から継続して検査及び調査研究を行ってきた²⁻³²⁾。その過程で、分析法が不十分であった場合には分析法の開発を行いながら検査を行い、汚染実態を明らかにしてきた。本稿では、東京都がこれまでに行ってきた各種カビ毒についての分析法の開発と汚染実態調査を中心にカビ毒に関する研究結果について述べる。

アフラトキシン

アフラトキシン（以下AFと略す）には、10種類以上の同族体があるが、食品からよく検出されるものは、AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂及びAFM₁である。それらの構造を図1に示した。その中でもAFB₁が最も毒性が強く、食品からの検出量も通常最も高い。ラットを0.015 µg/gのAFB₁を含んだ飼料で飼育した結果、全てのラットに肝がんが発生したことが報告されており、AFは、天然物質中で最強の発がん性物質のひとつと考えられている³³⁾。国際がん研究機構（以下IARCと略す）は、AFの発がん性を Group 1（ヒトに対して発がん性がある）に分類している。また、広範囲の動物への経口投与によるLD₅₀は10 mg/kg以下であり、

急性毒性も非常に強い³³⁾。このため、多くの国でAFB₁単独、または総AF（AFB₁、AFB₂、AFG₁及びAFG₂の総和）に対する規制値が設けられている³⁴⁾。我が国では、1971年にAFB₁単独規制が設定された³⁵⁾後、2011年に総AFとして全食品に対して10 µg/kgを超えてはならないという規制値へと改訂された³⁶⁾。

1. AF分析法の開発¹⁾

1971年に我が国で初めてのカビ毒に対する規制としてAFB₁に対する規制が設定され、その際に公定法（厚生省通知環食128号；以下環食128号と略す）が示された³⁵⁾。この公定法の操作は、以下の通りであった。試料50 gに1%塩化ナトリウム溶液-メタノール（45：55）混液250 mL及びn-ヘキサン200 mLを加えてホモジナイズして抽出し、メタノール-水層50 mLを分液ロートにとり、クロロホルム50 mLで2回抽出し、クロロホルム層を合わせて50 mLに濃縮する。これをシリカゲルカラム（充てん量；10 g）に負荷し、n-ヘキサン150 mL、次いでジエチルエーテル150 mLでカラムを洗浄後、メタノール-クロロホルム（3：97）混液200 mLで溶出する。溶出液の溶媒を留去し、0.5 mLのベンゼン-アセトニトリル（98：2）に溶解し、薄層クロマトグラフィー（以下TLCと略す）により、AFを検出する。この方法では、精製にシリカゲルカラムを使用しており、シリカゲルに対するAFの吸着が弱いため、カラムに負荷している段階でAFの一部がカラムから溶出してしまい、回収率を低下させていた。さらに、シリカゲルカラムでは精製が不十分なため、香辛料等の夾雑成分が多い試料では、TLC、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（以下HPLC-FLと略す）とも、測定が不可能な場合が多かった。その他に、抽出と精製に使用する有機溶媒の量も1検体あたり約1000 mLと、非常に多量であった。

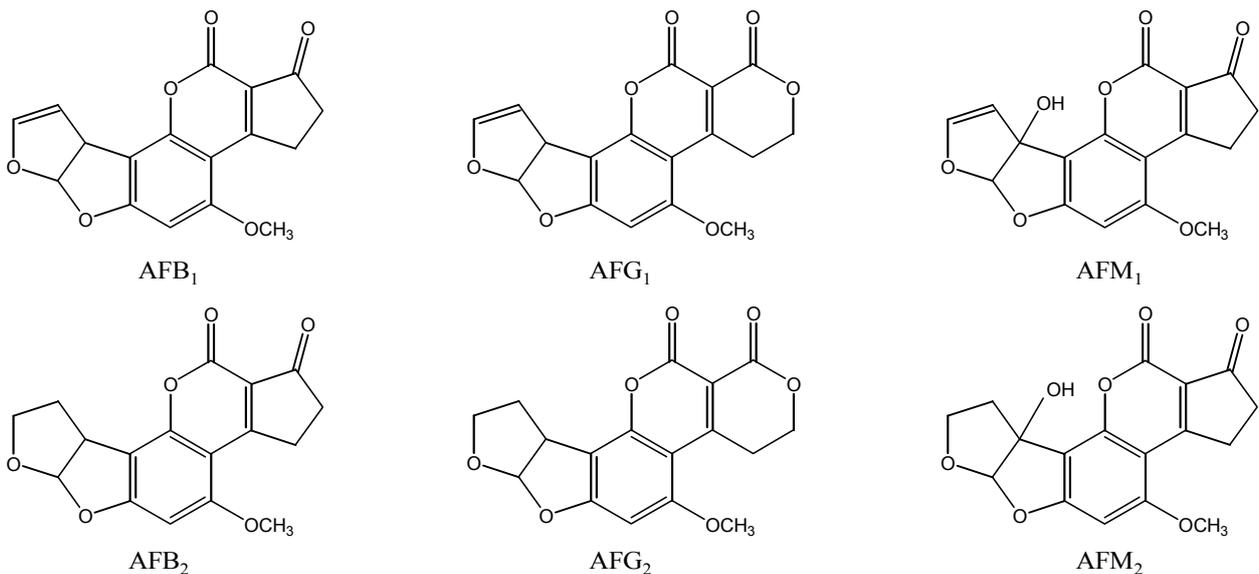


図1. 主要なアフラトキシンの構造式



図2. アフラトキシン分析法

そこで、多種類の食品のAF分析に適用でき、回収率及び精製効果の優れた迅速な分析法の開発を行った。抽出溶媒にはクロロホルムを選択し、精製にフロリジルカラムを使用することで、目標を達成することができた。分析法のフローシートを図2に示した。よく粉砕した試料20.0 gに水10 mL (チーズ等では2~5 mL, 特に乾燥した試料では20 mL) を加えて湿潤させた後、クロロホルム100 mLを加えて振とう抽出し、ろ過した。ろ液50 mLを無水硫酸ナトリウムで十分に脱水した後、フロリジルカラム (充てん量; 0.7 g) に負荷し、少量のクロロホルムでカラム壁をすすぎ、チーズ等の試料では、ヘキサン-クロロホルム混液 (1:1) 20 mLで洗浄した。次いで、クロロホルム-メタノール (9:1) 混液20 mLでカラムを洗浄し、アセトン-水 (99:1) 混液40 mLでAFを溶出した。溶出液の溶媒を乾固し、一定量のクロロホルムに溶解した、そこから一定量 (試料1.0 g相当) をとり、トリフルオロ酢酸 (以下TFAと略す) またはフォトケミカルリアクター (以下PCRと略す) による誘導体化によるHPLC-FLや二次元展開TLCにより定性、定量及び確認を必要に応じて行った。カビ毒は、毒性が強いため、検出結果の取り扱いには慎重な対応が求められる。そこで、AFを検出した場合には、規制値を超えていなくても、常に、定量を行った測定法とは別の測定法により確認試験を行った。近年は、確認にLC-MS/MSも使用できるようになった。このように各種の測定法による確認が可能なたため正確な結果を出すことができ、使用する試薬類も安価であるため、分析法の作成後30年近くとなる現在でも、

本法により検査を行っている。

本分析法の特徴は、精製にフロリジルカラムを使用することである。フロリジルに対するAFの吸着が強いため、抽出液を負荷し、クロロホルム-メタノール (9:1) 混液で洗浄する際に、AFはカラムに保持したまま、多くの夾雑物質をカラムから溶出させることができ、香辛料等も効率よく精製することはできた。しかし、溶出する段階では、AFの吸着力の強さが難点となった。アセトンやメタノール等の溶出力の強い溶媒を流下させても、AFの溶出率は、最大で70%であった。種々検討した結果、アセトンに水を1%加えた混液を流下させたところ、40 mLでAFをほぼ完全に溶出することができた。

本法を用いて、種実類 (3種類)、穀類 (3種類)、香辛料 (2種類)、豆類 (1種類)、乾燥果実 (1種類) の合計10種類の食品について厚生労働省から示された妥当性評価を行ったところ、選択性、真度、精度の全てにおいて評価基準に適合した。定量限界は、各AFとも0.1 μg/kgであった。使用する有機溶媒量も1試料あたり、200 mL以下となり、使用量を1/5に減少させることができた。本分析法は、準公定法と言われている食品衛生検査指針³⁷⁾に掲載されている。

AFに自然汚染された試料を用いて本法と環食128号で分析を行ったところ、結果に大きな差が認められた。この原因を検討したところ、環食128号では、シリカゲルカラムでの回収率の低下の他に、試料からのAFの抽出に問題があることが分かった。1%塩化ナトリウム溶液-メタノール (45:55) 混液とヘキサンを用いた環食128号の抽出条件では、自然汚染試料からのAFの抽出率が悪く、特に香辛料では、実際の50%程度しか抽出されていない場合もあることがわかった。なお、AF公定法は、2002年にアセトニトリル-水 (9:1) 混液により抽出し、多機能カラム (以下MFCと略す) で精製する多機能カラム法に改訂され³⁸⁾、現在は、多機能カラムか、イムノアフィニティーカラム (以下IACと略す) 法を使用することとなっている³⁹⁾。

2. AFの汚染実態調査^{14,16,20,22)}

開発した方法を用いて行ったAF汚染実態調査結果を表2に示した。

1) 種実類

種実類では、ピーナッツ、ピスタチオナッツ、ブラジルナッツ、ゴマ等からAFが検出され、ピーナッツでは459試料中3試料、ピスタチオナッツでは481試料中4試料、ブラジルナッツでは8試料中1試料から、規制値を超えるAFが検出された。ピーナッツで、AFが検出された試料は、ピーナッツバター、粉ピーナッツ等、全粒の形を残さないものが多かった。ピスタチオナッツで、規制値を超えるAFが検出されたもののほとんど全てがイラン産であった。

2) 穀類

穀類では、ハト麦、トウモロコシ、ソバからAFが検出され、ハト麦では212試料中1試料から規制値を超えるAF

が検出された。このハト麦は、いわゆる健康食品として販売されていたものであった。ソバからは、規制値を超えるAFは検出されなかったが、小袋に入れて「そば粉」として市販されているものから検出された。ハト麦及びソバについては、我が国で初めてのAF検出例であった。

3) 豆類

豆類でAFが検出されたのは、バター豆と呼ばれるシアンを含んだ輸入雑豆で、餡の製造のみに使用が制限されているものである。916試料中4試料から規制値を超えるAFが検出された。

4) 香辛料

香辛料では、白コショウ、唐辛子、パプリカ、ナツメグからAFが検出された。白コショウから高濃度のAFは検出

されなかったが、検出率が高いものがあった。その一方で、黒コショウからは、AFは検出されなかった。これは、白コショウは完熟した実を使用すること、皮を除く際に水につけるが、その水が大変不衛生であること等が原因と考えられた。唐辛子からも81試料中3試料から規制を超えるAFが検出された。パプリカは、規制値を超えた検体はなかったが、50%を超える非常に高い検出率であった。ナツメグは、検出率、検出量とも非常に高く、規制を超えるAFが検出された検体も多かった。

規制値を超えるAFが検出された食品は、食品衛生法違反として行政処分されるとともに、結果は厚生省（検出当時）にも報告され、それに基づいて輸入時の全ロットを検査する命令が出された。

表2. アフラトキシン汚染実態調査結果 1982-1996年

種実類	試料	試料数	検出数	違反 試料数*1	AF検出量 (µg/kg)				
					B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	
種実類	ピーナッツ	459	35	3	0.4-21.7	0.1-5.3	0.3-22.1	ND*2	
	ピスタチオナッツ	481	9	4	0.8-1382	0.1-260	306	ND	
	カシューナッツ	212	0						
	アーモンド	151	0						
	ブラジルナッツ	8	1	1	10.2	0.8	3.2	ND	
	クルミ	71	0						
	マカダミアナッツ	20	0						
	ミックスナッツ	17	0						
	ゴマ	47	5		0.6-2.4	0.2-0.5	ND	ND	
	その他	141	0						
穀類	米	170	1		0.5	ND	ND	ND	
	小麦	352	0						
	大麦	276	0						
	えん麦	39	0						
	ライ麦	21	0						
	ハト麦	212	48	1	0.1-14.9	0.1-1.8	0.3-0.7	ND	
	トウモロコシ	474	4		0.1-0.4	ND	ND	ND	
	ソバ	252	23		0.1-8.8	0.1-0.9	0.2-0.8	ND	
	混合粉	81	0						
	砂糖	31	12		1.0-1.5	0.1-0.2	ND	ND	
	その他	78	1		0.4	ND	ND	ND	
	豆類	大豆	113	0					
		製餡原料豆	916	14	4	0.1-254	0.4-8.5	ND	ND
コーヒー豆		77	0						
その他		100	0						
香辛料	黒コショウ	120	0						
	白コショウ	220	21		0.1-2.3	0.1-0.3	ND	ND	
	唐辛子	81	31	3	0.2-27.7	0.1-1.2	0.1-2.1	0.1-0.2	
	パプリカ	44	26		0.2-6.5	0.1-0.3	ND	ND	
	ナツメグ	257	155	17	0.2-60.3	0.1-6.5	0.1-15.8	0.1-0.4	
	メース	56	0						
	タイム	25	0						
	シナモン	18	0						
	ローレル	23	0						
	クローブ	18	0						
	ホップ	52	0						
	生姜	22	0						
	混合スパイス	161	28		0.2-1.9	ND	ND	ND	
	その他	189	0						

*1: 10 µg/kg を超える AFB₁を検出

*2: 0.1µg/kg 未満

5) 乳製品

乳製品では、ナチュラルチーズからAFM₁が0.1~1.2 µg/kg 検出された。検査したナチュラルチーズのほとんどは輸入品であった。検出率が30%を超えた年もあったが、近年、ナチュラルチーズからAFM₁はほとんど検出されていない。チーズから検出されるAFM₁は、チーズに生育しているカビが産生したものではなく、飼料中に含まれていたAFB₁が、牛に摂取された後、牛の体内で代謝されて生成し、乳中に排泄されたものである。ナチュラルチーズからAFM₁が検出されなくなった原因は、主な原産国であるヨーロッパで飼料中のAFに対する規制が強化されたためと考えられた。

6) 近年のAF汚染状況

ここには、1982~1996年の汚染調査結果を示したが、その後、ナツメグの汚染は、改善されてきている。これは、ナツメグに汚染があることが判明し、輸入時の検査が厳しくなったこと、輸入業者等がAF汚染のない良質のものを選ぶようになったためと考えられる。

3. AFの制御に関する研究

1) 調理加工による消長¹⁵⁾

AF汚染実態調査の結果、種々の食品がAFに汚染されていることが分かった。これらを摂取する前の調理でAFが減少すれば、AFによる健康影響は少なくなる。そこで、AFが調理加工によりどのような挙動をとるかについて検討を行った。その結果、AF標準品のみでは、「煮る」ことにより、AFの大幅な減少が見られたが、食品を用いて行った実験では、食品中のAFは、表3に示したとおり、「焼く」、「煮る」、いずれの調理加工でもほとんど減少しなかった。このことから、食品中に含有されているAFは、調理加工では減少せず、ほとんどそのままの量を摂取してしまうことが分かった。

2) 食品添加物による処理

次に、食品添加物を使用した化学的な処理でAFを減少させることができるか否かについて検討を行った。その結果、いくつかの食品添加物によりAFを減少させることができた¹⁷⁾が、AFが減少した際には食品の変質が激しく、食品としての価値がなくなっているものが多かった。

食品添加物のうち、亜硫酸水素ナトリウムは、コーンスターチを製造する工程で使用される条件でAFを減少させることができた。減少したAFB₁は、の構造をNMR等で解析した結果、AFB₁の末端フラン環の2重結合にスルホン酸基が負荷した物質に変換されていた。この物質を、鶏胚法及びAmes試験により毒性評価を行ったところ、AFB₁よりもはるかに毒性が弱くなっていることが確認された。この処理をAF添加及びAF自然汚染のトウモロコシに適用した場合の減少率は、それぞれ80%及び25%であった²¹⁾。

3) 食用油の精製工程での除去¹²⁾

トウモロコシ等は、食用油の原料ともなっている。食用油の原料がAFに汚染されていた場合、搾油後の粗精油にAFが移行することが考えられる。食用油の製造過程で、粗精油は、脱酸、脱色及び脱臭の各工程を経る。そこで、原料油にAF汚染があった場合に、食用油の精製工程でAFがどのような挙動をとるか調査した。油の脱酸工程では、油に含まれる遊離脂肪酸に対して過剰量のアルカリ水溶液を添加して攪はん後、水層を除き、中性になるまで水洗を繰り返す。AFは、アルカリ条件下ではラクトン環が開裂し、水溶性物質となることが知られている³³⁾。この過程で、アルカリによりAFが水溶性物質へと変化し、水洗を繰り返すことにより、AFが水層に移行して除去され、最終製品には、AFは、ほとんど残存しないことが分かった。この例は、食品としての価値を損ねないまま、AFに汚染された食品からAFをほぼ完全に除去することができた数少ない例である。

表3. 調理加工によるAFの挙動

メニュー	加熱		AF汚染食品	AF 残存率 (%)			
	温度 (°C)	時間 (分)		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
チキンオープン焼き	150	20	白コショウ (添加)	87	87	105	103
			(自然汚染)	113	-	106	-
ゆでそば	100	15	そば (添加)	84	85	84	81
			(自然汚染)	84	75	50	-
かゆ	100	30	ハトムギ (添加)	94	100	71	83
コンソメスープ	100	60	白コショウ (添加)	79	72	72	75
			(自然汚染)	102	-	103	-
ミートソース	100	120	ナツメグ (添加)	60	80	67	76
			(自然汚染)	90	102	-	-

パツリン

パツリン（図3）は、欧米を中心とした諸外国では1995年以前からリンゴに汚染があることが多数報告されていた。これらの国では規制値も設定されており、その値は、ほとんどの国で50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。しかし、我が国ではパツリンは関心を持たれておらず、汚染調査は、ほとんど行われていない状態であった。そこで、我が国におけるパツリンの汚染実態を明らかにするため、分析法を作成し、汚染実態調査を行うこととした。

1. パツリン分析法の開発²³⁾

まず、AOAC Official Methods of Analysisに収載されているAOAC Official Method 995.10⁴⁰⁾について検討を行った。この方法は、液-液分配法で、リンゴ

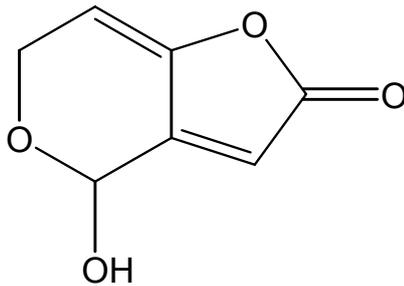


図3. パツリンの構造式

ジュースからパツリンを酢酸エチルで振とう抽出し、炭酸ナトリウム溶液による洗浄後、溶媒を減圧留去し、希酢酸溶液に溶解して紫外外部吸収検出器付き高速液体クロマトグラフ（以下HPLC-UVと略す）で測定する。この方法で分析を行った場合、5~7倍に濃縮されている原料果汁を希釈せずに分析を行うと、リンゴジュースに含まれる夾雑物質である5-ヒドロキシメチルフルフラール等の巨大なピークがパツリンの近傍に溶出し、測定が困難な場合があった。そのため、精製方法の検討を行った。また、UV検出器は選択性があまり高くないこともあり、パツリンが検出された際の確認方法が必要であった。当時はまだ、イオン化部等が汚れにくく検査業務に使用可能なLC-MS/MSが普及していなかったため、GC-MSを用いて検討を行った。その結果、夾雑ピークが少なく感度の良い定量と、マススペクトルによる確実性の高い確認が可能な分析法を確立することができた。分析法のフローシートを図4に示した。リンゴジュース50.0 gを分液ロートに採り、塩化ナトリウム10 gを加えて酢酸エチル100 mLで2回振とう抽出した。溶媒を減圧乾固した後、酢酸エチルで5 mLに定容した。その中から2 mLを採り、ヘキサン18 mLを加えて混合し、生じた不溶物を孔径0.25 μm のメンブランフィルターでろ過した。ろ液及びフィルターの洗浄液を予め酢酸エチル次いでヘキサン各5 mLでコンディショニングしたシリカゲルとフロリジルを連結した固相抽出カラムに負荷した。カラムを酢酸エチル-ヘキサン（1:4）混液10 mLで洗浄した後、酢酸エチル10 mLでパツリンを溶出した。溶媒を留去した後、2.5%N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide（以下BSTFAと略す）酢酸エチル溶液0.5 mLを加えてよく混和し、室温で1時間放置してシリル化後GC/MSで測定した。定量

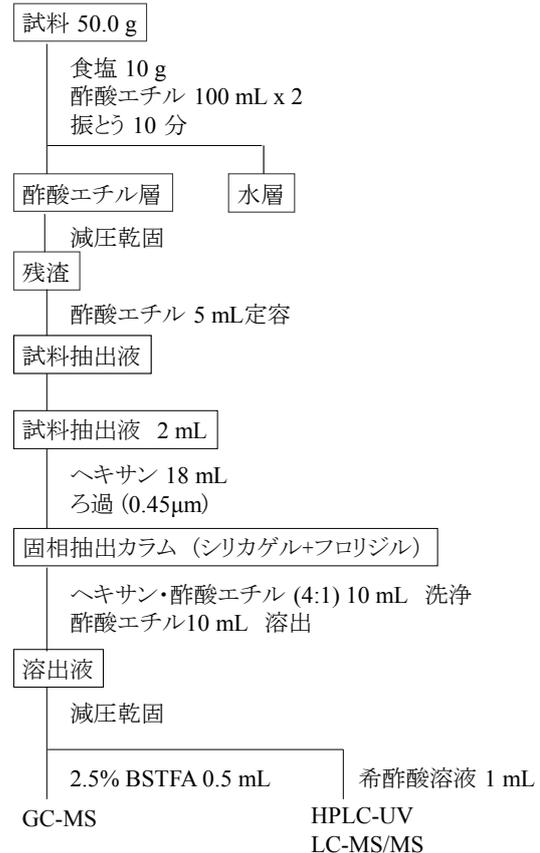


図4. パツリン分析法

は、 m/z 216を定量イオンとし、 m/z 183及び170を参照イオンとしたSIMモードで行い、確認は、SCANモードで得られたマススペクトルを試料と標準溶液で比較することにより行った。定量は1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも可能であったが、マススペクトルによる確認が5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の濃度が必要であったため、検査結果は、確認が可能な5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上のパツリンが検出された際に「検出する」とすることとした。固相抽出カラムからの溶出液を溶媒留去後、希酢酸溶液（pH4）に溶解した試験溶液は、HPLC-UVで測定しても夾雑ピークの少ない良好なクロマトグラムが得られ、LC-MS/MSとともに良好な測定結果が得られた。

本法を用いて、透明リンゴ果汁、混濁リンゴ果汁、透明濃縮リンゴ果汁、混濁濃縮リンゴ果汁、粉末リンゴ清涼飲料水、リンゴピューレ、リンゴ裏ごしの合計7種類の食品について厚生労働省から示された妥当性評価を行ったところ、選択性、真度、精度の全てにおいて評価基準に適合した。なお、本分析法は、パツリンの基準値が設定された際の実験法として公定法⁴¹⁾に記載されている。

2. パツリンの汚染実態調査

1) リンゴジュースのパツリン汚染調査

作成した分析法を用いて、初め（1996年）に数検体の濃縮リンゴ果汁について検査を行ったところ、そのほとんどからパツリンが検出され、中には、100%果汁に希釈した濃度でも諸外国の規制値を超えるものがあつた。次に、市

販リンゴ果汁について約40検体の調査を行ったところ、約4割の検体からパツリンが検出され、高いものでは40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を超えるものもあった。このことから、我が国に流通するリンゴ果汁にもパツリン汚染があることが初めて明らかとなった。これらの分析結果を学会で発表したところ、厚生労働省、農林水産省も注目した。また、同時期にCODEX委員会でパツリンの基準値が採択されたこともあり、厚生労働省は、2003年12月にリンゴ搾汁中のパツリンに0.050 ppm (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の規制値を設定することを決定し⁴⁾、2004年6月から清涼飲料水の成分規格として施行となった。その際に、本汚染調査データは、参考資料として使用された。その後もリンゴ果汁中のパツリン汚染調査を継続して行ったところ、最大で100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 近い高濃度のパツリンを検出した輸入果汁もあったが、規制値が施行された後は、パツリンの検出率、検出量ともに低下する傾向が認められ、規制値を設定した効果があったと考えられた。

また、パツリンの汚染実態のデータをもとに、パツリンによる健康影響のリスクを評価したが、我が国で流通しているリンゴジュース中のパツリン含有量では、健康被害は発生しないと考えられた。

2) 国内でのパツリンの自然汚染に関する検討

リンゴのパツリン汚染が国内で起きているか否かを調べるため、農林水産省に協力して国産リンゴについて菌とパツリン汚染の調査を行った。リンゴジュースの製造工場から原料である損傷したリンゴを200個以上収集して菌とパツリンの分析を行った。その結果、パツリン産生能のある *Penicillium* 属菌が高頻度で検出され、一部の試料から ppm (mg/kg) オーダーの高濃度のパツリンが検出された。この結果から、我が国でもパツリンの自然汚染が起きていることが判明した。また、リンゴの保存期間が長くなるほど、汚染率、検出量ともに高くなる傾向が見られた。これは、パツリン産生菌が、0°C程度の低温でもパツリン産生が可能であるため、保存中に産生量が増えたためと考えられた。

このことから、リンゴはあまり長期間保存せず、早めに加工してしまうほうが良いことが示唆された。

3) リンゴ以外の果実加工品のパツリン汚染

パツリン汚染報告は、ほとんどがリンゴに関するものであり、その他の果実については不明であった。そこで、リ

ンゴ以外の果実およびその加工品のパツリン汚染について調査を行った。まず、リンゴ果汁用に作成した分析法が他の果実加工品にも適用できるかどうかを調べたところ、ブドウ、モモ、洋ナシ、ブルーベリー、プルーン及びオレンジの果汁と干しブドウについては、リンゴ果汁と同様に分析できることが分かった。この分析法を用いてリンゴ以外の果実加工品14種類について合計150以上の試料について分析したところ、ブドウとブルーベリー加工品からパツリンが検出された。また、国内のブドウ産地で1か月ほど保存されていたブドウからもパツリンが検出されたことから、リンゴ以外の果実にもパツリン汚染があり、国内でブドウに自然汚染が起きていることが分かった。

オクラトキシン及びシトリニン

オクラトキシン (図5) にも数種類の同族体があるが、食品汚染報告があるのは、オクラトキシンA (以下OTAと略す) とオクラトキシンB (以下OTBと略す) である。我が国では規制値は設定されていないが、EU等では、種々の食品に規制値が設定されている。シトリニン (以下CITと略す) は、化学構造 (図6)、毒性、産生菌、汚染食品にオクラトキシンと共通する部分がある。このため、東京都では、これら3種のカビ毒を同時に分析する方法を用いて汚染調査を行ってきた。

1. 分析法の開発²⁸⁾

東京都では、OTA、OTB及びCITを同時に分析する中里らの方法¹⁸⁾で分析を行ってきたが、回収率が十分でなかった。また、検出された際の確認のための測定方法の感度が悪く、十分定量できていても確認できないために、「検出しない」という結果とすることが多かった。そこで、精製方法等を改良して回収率を向上させるとともに、確認方法としてLC-MS/MSを使用する方法を開発した。その概略は以下のとおりである。よく粉砕した試料50.0 gをブレンダーカップに採取し、20%塩化ナトリウム溶液20 mL及びリン酸1 mLを加え、酢酸エチル200 mLで5分間ホモジナイズして抽出し、ろ過した。ろ液100 mLを分液ロートにとり、20%塩化ナトリウム溶液50 mLで洗浄した後、2%炭酸水素ナトリウム溶液100 mL次いで50 mLで抽出した。水層を塩酸でpH2以下になるように調整した後、酢酸エチ

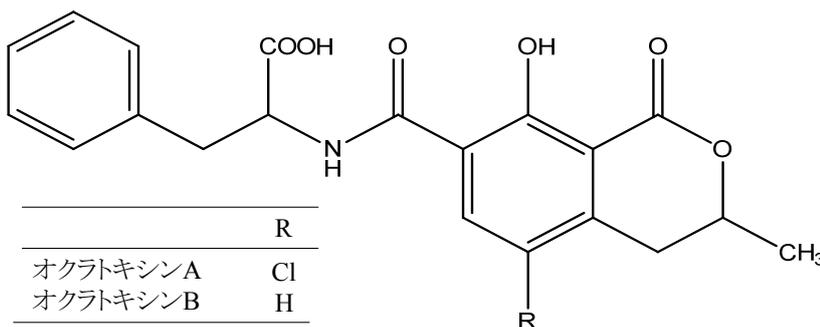


図5. オクラトキシンの構造式

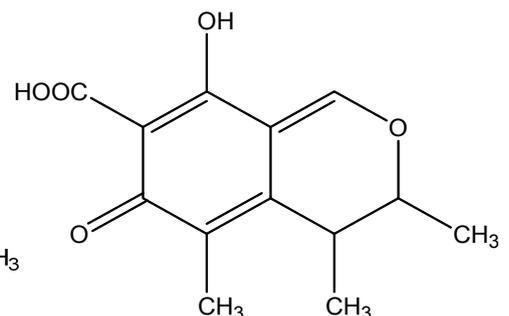


図6. シトリニンの構造式

ル（またはクロロホルム）50 mLで2回抽出した。有機溶媒層を合わせて減圧乾固し、残渣にアセトニトリル-水（4：6）混液1 mLを加えて溶解し、孔径0.45 μmのメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とし、HPLC-FLで定量し、検出されたものはLC-MS/MSで確認した。LC-MS/MSでは、移動相にはアセトニトリル-1%ギ酸水溶液（4:6）混液を、イオン化法はESIポジティブモードを選択した。添加回収試験の結果、OTAとOTBでは平均回収率87～111%、変動係数0.9～10.7%、CITでは、平均回収率70～82%、変動係数16%以下と良好であった。試料当たりの定量下限（S/N≥10）は、3種のカビ毒とも0.1 μg/kg以下であった。この分析法の確立により、定量、確認共に0.1 μg/kgまで可能となり、これまで、定量はできていても確認ができなかったため「検出しない」としていた1 μg/kg以下のカビ毒を含む試料の結果を「検出する」として出すことが可能となった。

2. 汚染実態調査^{25,29)}

1) 定量下限値1 μg/kgでの結果

定量下限値が1 μg/kgであった際に検査した結果（表4）では、小麦、ライ麦、ソバ、コーヒーからオクラトキシンが検出されたが、検出率は低かった。しかし、ライ麦からOTAが28 μg/kg、OTBが9 μg/kg、CITが2 μg/kgと非常に高い値で、しかも同じ試料から検出された。オクラトキシンとCITの複合汚染について、それまでにこれらのカビ毒が検出された食品を比較すると、ライ麦とソバで複合汚染が多い傾向が認められた。これらが栽培されている地域の気候条件を考えると、それらの汚染が、オクラトキシンとCITの両方を産生する*P. verrucosum*によるものである可能性が示唆された。

2) 定量下限値0.1 μg/kgでの結果

定量下限値が0.1 μg/kgで行った調査（表4）では、検出率がそれまでより高くなった。検出量を見ると、1 μg/kg以上検出されたものは1試料しかなく、その他は全て1 μg/kg以下の汚染であることから、定量下限値が低くなったことが、検出率が高くなった原因と考えられた。

穀類では、小麦とソバの加工品からOTAが検出された。小麦では、12試料中6試料からOTAが0.12～0.30 μg/kg検出された。検出された試料の中で、100%国産であると表示された小麦粉2試料中1試料から0.15 μg/kgのOTAが検出され、国内でもOTA汚染が起きていることが示唆された。そば加工品では、2試料からOTAが0.12及び0.45 μg/kg検出された。これらは、そば粉として市販されていたものであるが、このうちの1試料には100%国産そばの表示があった。大麦、エン麦、ライ麦、ハト麦、コメおよびトウモロコシの加工品からは、オクラトキシンは検出されなかった。CITは、小麦加工品12試料中1試料およびソバ2試料中2試料から0.19～0.62 μg/kg検出された。

果実加工品からもオクラトキシンが検出されたが、シトリニンは検出されなかった。ブドウ加工品では、干しブドウのOTA検出率が高く、13試料中6試料と検査した試料の半数近くから検出され、検出量は0.14～0.70 μg/kgであった。OTAが検出された試料はアメリカとトルコから輸入されたものであった。ワインでは14試料中1試料、ブドウジュースでは11試料中1試料からOTAがそれぞれ0.11および0.15 μg/kg検出された。OTAが4.0 μg/kg検出された試料はブドウピューレの一種であり、イタリアから輸入されたものであった。この試料とOTAが0.8 μg/kg検出されたビネガー（イタリアより輸入）では、OTBもそれぞれ1.8および0.29 μg/kg検出された。EUでは、ブドウ加工品については、レーズンには10 μg/kg、ワイン及びブドウ果汁ベース飲料に

表4. オクラトキシン及びシトリニンの汚染調査結果

1997-2004年

試料	OTA		OTB		CIT	
	検出率	検出量(μg/kg)	検出率	検出量(μg/kg)	検出率	検出量(μg/kg)
小麦	2/57	1.1, 2.0	0/57	< 1 ^{*2}	0/57	< 1
大麦	0/112	< 1	0/112	< 1	0/112	< 1
エン麦	0/11	< 1	0/11	< 1	0/11	< 1
ライ麦	1/1	28	1/1	9	1/1	26
ハト麦	0/12	< 1	0/12	< 1	5/12	4.6～12
ソバ	3/54	1.3～2.4	0/54	< 1	0/54	< 1
米	0/16	< 1	0/16	< 1	0/16	< 1
トウモロコシ	0/45	< 1	0/45	< 1	0/45	< 1
コーヒー	1/19	4.8	0/19	< 1	0/5	< 1
製餡原料豆	0/47	< 1	0/47	< 1	0/47	< 1
乾燥果実	0/4	< 1	0/4	< 1	0/4	< 1
その他	0/8	< 1	0/8	< 1	0/8	< 1
合計	7/386		1/386		6/372	

は2 µg/kgの基準値を設定している。ブドウ加工品でEUでの基準値を超える可能性があることが示された。カシス加工品では、トルコから輸入された乾燥カシスから、0.38 µg/kgのOTAが検出された。

カカオ加工品とインスタントコーヒーでは、オクラトキシンの検出率が50%以上と非常に高かった。また、OTAの検出量が高い試料からはOTBも検出された。

デオキシニバレノール

デオキシニバレノール（以下DONと略す）は、トリコテセン系カビ毒の一種であり、麦類やトウモロコシ等の穀類によく汚染が見られる。FAO/WHO合同食品添加物専門家会議（以下JECFAと略す）は、暫定最大許容摂取量（以下PMTDIと略す）を1 µg/kg・bw/dayとしている。我が国では2002年に小麦（玄麦）に対する暫定的な基準値として1.1 ppmが設定された⁴²⁾。

表5. オクラトキシシン及びシトリニンの汚染調査結果

2005年

試料	試料数	オクラトキシシン			シトリニン	
		検出数	検出量 (µg/kg)		検出数	検出量 (µg/kg)
			OTA	OTB		
穀類						
小麦	12	6	0.12-0.30	<0.1	1	0.19
大麦	3	0	<0.1	<0.1	0	<0.1
えん麦	3	0	<0.1	<0.1	0	<0.1
ライ麦	1	0	<0.1	<0.1	0	<0.1
ハト麦	2	0	<0.1	<0.1	0	<0.1
米	5	0	<0.1	<0.1	0	<0.1
ソバ	2	2	0.12, 0.45	<0.1	2	0.55, 0.62
トウモロコシ	3	0	<0.1	<0.1	0	<0.1
その他	6	0	<0.1	<0.1	0	<0.1
果実加工品						
ブドウ加工品						
干しブドウ	13	6	0.14-0.70	<0.1	0	<0.1
ジュース	11	1	0.11	<0.1	0	<0.1
ワイン	14	1	0.15	<0.1	0	<0.1
ピネガー	6	1	0.80	0.29	0	<0.1
その他	3	1	4.0	1.8	0	<0.1
カシス加工品						
干しカシス	1	1	0.38	<0.1	0	<0.1
リキュール	6	0	<0.1	<0.1	0	<0.1
その他	1	0	<0.1	<0.1	0	<0.1
カカオ加工品						
粉末カカオ	12	10	0.25-0.67	0.10-0.17	-	-
ココア	8	5	0.11-0.35	0.10	-	-
コーヒー加工品						
生コーヒー	10	2	0.51, 0.81	0.10	0	<0.1
焙煎コーヒー	23	3	0.25-0.43	-	-	-
即席コーヒー	7	5	0.16-1.1	-	-	-
コーヒー飲料	5	0	<0.1	-	-	-

- : 検査せず

公定法⁴³⁾に従って、小麦加工品について汚染調査を行った結果を表6に示した。なお、検出された試料については、LC-MS/MSにより確認を行った。小麦粉製品からDONが0.1~1.1 mg/kg検出され、最高濃度は、小麦(玄麦)に対する暫定的な基準値と同じであった。この小麦粉製品は、家庭で簡単な調理をして食べるものであったが、体重50 kgのヒトが1日に45.5 g摂取するとPMTDIに相当するDONを摂取することとなる。小麦(玄麦)に対する暫定的な基準値は、製品になる前の加工によりDONが50%に減衰すると考えて設定されているが、このようなそのまま食べる(ready to eat)食品に対しては、玄麦に対するものよりも低い値の基準値が設定されるべきと考えられる。

表6. デオキシニバレノール汚染調査結果
2003~2007年

試料	試料数	検出数	検出量(mg/kg)
小麦			
小麦粉	15	3	0.1-0.25
パスタ	10	0	ND
その他	3	2	0.17, 1.1
大麦	3	0	ND
エン麦	4	0	ND
ハト麦	2	0	ND
ライ麦	1	0	ND
麦類混合	6	0	ND
米			
玄米	27	0	ND
上新粉	1	0	ND
ビーフン	6	0	ND
合計	78	5	

ND:<0.1 mg/kg

フモニシン

フモニシン(以下FMと略す)も、フザリウム属のカビにより産生されるカビ毒であり、動物実験により肝臓、腎臓に対して発ガン性が有ることが確認されており、IARCは、発がん性をGroup 2B(ヒトに対して発がんの可能性はある)に分類している。また、JECFAの定めたPMTDIは、2 µg/kg・bw/day(FMB₁、B₂及びB₃の単独あるいは合計)である。我が国では基準値は設定されていないが、欧米で0.2~4 mg/kgの規制値が主にトウモロコシに対して設定されている。

世界的によく使用されているAOAC Official Methods of Analysis 995.15⁴⁴⁾でトウモロコシ加工品を分析した結果を表7に示した。なお、検出された試料については、LC-MS/MSにより確認を行った。コーングリッツ、コーンフラワーのほとんど全ての試料からFMが検出され、最高検出量は、FMB₁が1.7 mg/kg、FMB₂が0.45 mg/kgであった。この試料を体重50 kgの人が摂取した場合、FMB₁のみで計算すると58.8 g/日、FMB₁+FMB₂で計算すると46.5 g/日の

表7. フモニシン汚染調査結果 2003~2007年

試料	試料数	検出数	検出量 (mg/kg)	
			FMB ₁	FMB ₂
コーングリッツ	14	13	0.02-0.18	0.01-0.05
コーンフラワー	8	8	0.04-1.7	0.03-0.45
ポップコーン(穀粒)	27	16	0.01-0.55	0.01-0.03
スイートコーン	4	0	ND	ND
コーンシリアル	6	1	0.02	ND
コーンスナック	5	1	0.01	ND
コーンスターチ	1	0	ND	ND
ジャイアントコーン	3	0	ND	ND
合計	68	39		

ND:<0.01 mg/kg

摂取でPMTDIに相当することになる。これらは、摂取可能な量であるため、FMによる何らかの健康影響が起きる可能性がある。それを防ぐため、わが国でも規制値が設定されることが望まれる。

おわりに

東京都では、これまで、各種カビ毒について、分析法を作成し、汚染実態を明らかにしてきた。我が国で規制値が設定されているカビ毒は、現在のところ、総AF、パツリン、DON(暫定的)のみである。今年度、AFM₁に対する規制値が設定されることになったが、まだ、OTA、FM、ゼアラレノン等に対しては、動きがない。今後、これらに対しても規制値が設置されるよう、汚染実態調査を継続していく必要があると考える。また、現在のFM分析法は、コーングリッツ等の加工度の低いトウモロコシでは良好な回収率が得られるが、コーンスナックのような試料では回収率が悪い。これについては、改良した分析法を作成したので、今後、妥当性評価等を行って、分析可能な試料を広げていきたいと考える。

文 献

- 1) Lewis L, Onsongo M, Njapau H, et al.: *Environ Health Perspect.*, **113**, 1763-1767, 2005.
- 2) 木村康夫, 直井家寿太, 友松俊夫, 他: 東京都衛研年報, **22**, 87-94, 1970.
- 3) 直井家寿太, 風間栄治, 小川仁志, 他: 東京都衛研年報, **23**, 169-173, 1971.
- 4) 直井家寿太, 斎藤和夫, 風間栄治, 他: 東京都衛研年報, **23**, 175-182, 1972.
- 5) 直井家壽太, 西島基弘, 小川仁志, 他: 食品衛生学雑誌, **20**, 54-58, 1979.
- 6) 斎藤和夫, 西島基弘, 安田和男, 他: 食品衛生学雑誌, **21**, 472-475, 1980.
- 7) 中里光男, 冠政光, 中沢久美子, 他: 食品衛生学雑誌, **23**, 59-66, 1982.

- 8) 井部明広, 西島基弘, 斉藤和夫, 他, 食品衛生学雑誌, **25**, 334-341, 1984.
- 9) 中里光男, 斉藤和夫, 菊地洋子, 他: 食品衛生学雑誌, **26**, 33-38, 1985.
- 10) 中里光男, 斉藤和夫, 菊地洋子, 他: 食品衛生学雑誌, **26**, 380-384, 1985.
- 11) Kamimura H., Nishijima M., Yasuda K., et al.: *J. of A.O.A.C.*, **68**, 458-461, 1985.
- 12) 上村尚, 西島基弘, 田端節子, 他: 食品衛生学雑誌, **27**, 59-63, 1986.
- 13) 上村尚, 西島基弘, 田端節子, 他: 食品衛生学雑誌, **28**, 322-329, 1987.
- 14) 田端節子, 上村尚, 田村行弘, 他: 食品衛生学雑誌, **28**, 395-401, 1987.
- 15) 田端節子, 上村尚, 田村行弘, 他: 食品衛生学雑誌, **33**, 150-156, 1992.
- 16) Tabata S., Kamimura H., Ibe A., et al.: *J. of AOAC International*, **76**, 32-35, 1993.
- 17) Tabata S., Kamimura H., Ibe A., et al.: *Journal of food protection*, **57**, 42-47, 1994.
- 18) 中里光男, 斉藤和夫, 石川ふさ子, 他: 東京都衛研年報, **47**, 100-104, 1996.
- 19) Tabata S., Kamimura H., Ibe A., et al.: *Japanese Journal of Food Microbiology*, **12**, 243-248, 1996.
- 20) Tabata S., Ibe A., Ozawa H., et al.: *Journal. of Food Hygienic Society of Japan*, **39**, 444-447, 1998.
- 21) Tabata S., Kamimura H., Nishijima M., et al.: *Journal of Food Hygienic Society of Japan*, **40**, 431-437, 1999.
- 22) 田端節子: マイコトキシン, **51**, 87-93, 2001.
- 23) Tabata S, Iida K, Suzuki J., et al.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. **45**, 245-249, 2004.
- 24) Nakajima M, Tabata S, Akiyama H., et al.: *Food Addit Contam.* **21**, 472-428, 2004.
- 25) 田端節子, 中里光男: マイコトキシン, **57**, 37-46, 2007.
- 26) 田端節子: マイコトキシン, **58**, 129-135, 2008.
- 27) 田端節子: ぶんせき (日本分析化学会) No.10, 551-557, 2008.
- 28) 田端節子, 飯田憲司, 木村圭介, 他: 食品衛生学雑誌, **49**, 100-105, 2008
- 29) 田端節子, 飯田憲司, 木村圭介, 他: 食品衛生学雑誌, **49**, 111-115, 2008.
- 30) 田端節子, 飯田憲司, 千葉隆司, 他: 東京都健康安全研究センター研究年報, **59**, 155-160, 2009.
- 31) Setsuko TABATA: *Mycotoxins*, **62**, 63-75, 2012.
- 32) 田端節子: 食品衛生学雑誌 **53**, 129-138, 2012.
- 33) 宇田川俊一, 田端節子, 中里光男: 食品安全性セミナー5 マイコトキシン, 74-75, 2002, 中央法規出版, 東京.
- 34) FAO: "Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003" FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 81, 2004, Food and Agriculture Organization of the United Nations, . Rome Italy.
- 35) 厚生省食品衛生課長: 環食第128号, カビ毒(アフラトキシン)を含有する食品の取扱いについて (通知), 1971.
- 36) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長: 食安発0331第5号, アフラトキシンを含有する食品の取り扱いについて (通知), 2011.
- 37) 食品衛生検査指針 理化学編 2005, .547-621, 2005, 日本食品衛生協会, 東京.
- 38) 厚生労働省医薬食品局食品保健部監視安全課: 食監発 第0326001号, カビ毒(アフラトキシン)を含有する食品の取り扱いについて (通知), 2002.
- 39) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長: 食安発0816第1号, 総アフラトキシンの試験法について (通知), 2011.
- 40) Trucksess, M.W.(ed.): Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th Edition, chapter 49, 76-78, AOAC INTERNATIONAL, 2011, Gaithersburg, MD United States of America.
- 41) 厚生労働大臣: 平成 15 年厚生労働省告示第 369 号, 2003.
- 42) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長: 食発第 0521001号, 小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設置について (通知), 2002.
- 43) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長: 食安発第 0717001号, デオキシニバレノールの試験法について (通知), 2003.
- 44) Trucksess, M.W.(ed.): Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th Edition, chapter 49, 56-58, AOAC INTERNATIONAL, 2011, Gaithersburg, MD United States of America.

Research on mycotoxins by the Tokyo Metropolitan GovernmentSetsuko TABATA^a

Research on mycotoxins has been carried out by the Tokyo Metropolitan Government since the establishment of the regulation for aflatoxin B₁, which was the first regulation for mycotoxin in Japan. Analytical methods were developed to determine mycotoxins, such as aflatoxins, patulin, ochratoxins, and citrinin. Each of these methods consists of identification and confirmation steps. The methods are reliable in terms of recovery, sensitivity, repeatability, and selectivity. They were used to study mycotoxin contamination in foods and foodstuffs and helped to find aflatoxin contaminated buckwheat, coix seed, white pepper and red pepper for the first time in Japan. In addition, patulin contamination that was not detected previously in Japan was found in apple juice. Our finding of patulin in domestic apples revealed the natural occurrence of patulin in Japan. This paper summarizes the Tokyo Metropolitan Government's findings on mycotoxins.

Keywords: mycotoxin, analytical method, contamination, aflatoxin, patulin, ochratoxin, citrinin, deoxynivalenol, fumonisin, TLC, HPLC, GC-MS, LC-MS/MS

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan