

千葉県内で購入した牛乳中のアフラトキシン M₁ 汚染実態調査

-平成 26~28 年度の検査成績-

中村和宏、原田利栄、渡邊さやか、鶴岡則子

A survey of aflatoxin M₁ contamination in milk purchased in Chiba prefecture

Kazuhiro NAKAMURA, Rie HARADA, Sayaka WATANABE, and Noriko TSURUOKA

要旨

アフラトキシン M₁ (AFM₁) はカビ毒のひとつであるアフラトキシン B₁ (AFB₁) の代謝産物であり、AFB₁ 汚染飼料を摂取した牛の乳中に認められる。我が国では最近まで AFM₁ の規制は実施されていなかったが、「乳に含まれるアフラトキシン M₁ の取扱いについて」(平成 27 年 7 月 23 日付け食安発 0723 第 1 号) において基準値が設定され、AFM₁ が 0.5 µg/kg を超えて検出される乳は、食品衛生法第 6 条第 2 号に違反するものとして取り扱うことになった。本研究では牛乳を対象とした AFM₁ 試験法の妥当性評価を行うとともに、この試験法を用いて千葉県内に流通する牛乳の汚染実態調査を行った。AFM₁ を 0.5 µg/kg または 0.05 µg/kg となるよう牛乳に添加して真度、併行精度および室内精度を評価したところ、2 濃度ともに良好な結果が得られた。この試験法を用いて平成 26~28 年度に千葉県内で購入した牛乳 (69 検体) について汚染実態調査を実施したところ、すべての検体において AFM₁ 濃度は 0.01 µg/kg 未満であった。

キーワード：アフラトキシン M₁、汚染実態調査、高速液体クロマトグラフィーKeywords : aflatoxin M₁、survey of aflatoxin M₁ contamination、high performance liquid chromatography

(平成 29 年 6 月 21 日受付 平成 29 年 7 月 13 日受理)

はじめに

アフラトキシン (AF) 類 (B₁、B₂、G₁、G₂ など) は、トウモロコシなどの食品に寄生する *Aspergillus* 属 (*Aspergillus flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius* など) により産生されるカビ毒である。これらの中で、AFB₁ は最も発がん性が高い。AFB₁ は経口摂取されると消化管で吸収され、肝臓でシトクロム P450 等により AFM₁ に代謝され^{1)、2)}、乳中に移行する。したがって AFM₁ は、AFB₁ 汚染飼料を摂取した牛の乳中に認められる。ラットやニジマスを用いた動物実験において、アフラトキシン M₁ には発がん性があることが証明されている^{3)、4)}。国際がん研究機関は AFM₁ をヒトに対する発がん性を有する可能性があるグループ 2B と評価している⁵⁾。

牛乳や乳製品を摂取することは AFM₁ 暴露の原因となる。消費者を保護するために、多くの国では AFM₁ について基準値が定められている。一方、我が国では最近まで AFM₁ について規制は実施されていなかった。平成 22 年 5 月に厚生労働省薬事・食品衛生審議会 (食品衛生分科会乳肉水産食品部会) において AFM₁ の食品健康影響評価を食品安全委員会に依頼することが決定し、委員会によるリスク評価が行われた。平成 27 年 7 月に AFM₁ の基準値が設定さ

れ、0.5 µg/kg を超えて検出される乳は、食品衛生法第 6 条第 2 号に違反するものとして取り扱うことになった (平成 28 年 1 月 23 日より適用)⁶⁾。

当所では AFM₁ 基準値設定への動きがあったことから、平成 26 年度から千葉県内に流通する市販牛乳中の AFM₁ 濃度を測定し、汚染状況の調査を行ってきた。今回、AFM₁ 試験法の妥当性評価結果およびこの試験法を用いて平成 26 年度から平成 28 年度に実施した市販牛乳中の AFM₁ 汚染実態調査結果について報告する。

実験方法

1. 試料

千葉県内で購入した牛乳 69 検体 (平成 26 年度 : 22 検体、平成 27 年度 : 24 検体、平成 28 年度 : 23 検体) を用いた。

2. 試薬および試液

アセトニトリルおよび超純水 (水) は LC/MS 用を用いた。標準液はアフラトキシン M₁ 標準液 (0.5 µg/mL アセトニトリル溶液、和光純薬工業株式会社製) をアセトニトリルで任意の濃度に希釈したものを用いた。イムノアフィニティーカラムは AFLAKING (株式会社 堀場製作所製) を使用した。

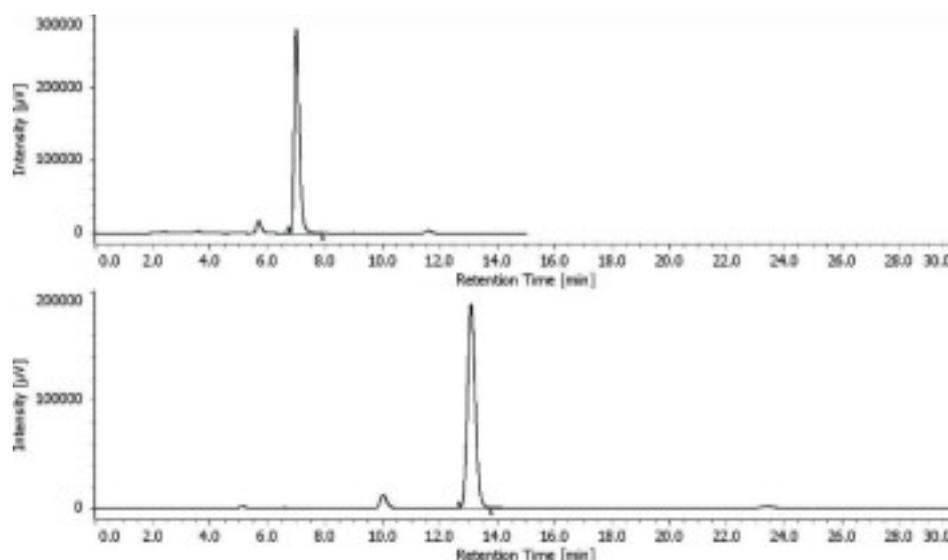


図-1 AFM₁標準液（10 ng/mL）のクロマトグラム
上段：コアシェル型カラム、下段：全多孔性型カラム

PBS は Phosphate Buffered Saline Tablet (Sigma-Aldrich 社製) を水に溶解して調製したものを用いた。

3. 試料および標準液の調製

試料の調製は国立医薬品食品衛生研究所ホームページ⁷⁾に公開されている方法に準じて、以下のように実施した。試料を 37℃ に温めて、均一になるように攪拌後、5 分間超音波をかけた。この試料を遠心分離 (2,000×g、10 分間、25℃) した後、ガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を採取した。ろ液 20.0 g を PBS でコンディショニングしたイムノアフィニティーカラムに負荷した。カラム内を水 15 mL で洗浄後、カラムにアセトニトリル 3 mL を注入し、溶出液を採取した。得られた溶出液を窒素気流で乾固した。その残渣をアセトニトリル：水 (2 : 8) 1.0 mL で溶解した。これを PTFE フィルター (0.2 μL) でろ過し、ポリプロピレン製バイアルに入れたものを高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用試験溶液とした。

標準液は窒素気流で乾固し、その残渣をアセトニトリル：水 (2 : 8) 1.0 mL で溶解した。これを PTFE フィルター (0.2 μL) でろ過し、ポリプロピレン製バイアルに入れたものを HPLC 用標準液とした。

4. 装置および測定条件

HPLC はポンプ：PU-1580、デガッサー：DG-2080-53、低圧グラジエントユニット：LG-2080-02、オートインジェクター：AS-2055 Plus、カラムオープン：CO-1565、蛍光検出器：FP-920、システムコントローラー：LC-NET II/ADC (すべて日本分光株式会社製) を使用した。分析カラムは全多孔性カラム：Inertsil ODS-3 (長さ 250 mm、内径 4.6 mm、粒子径 5 μm、ジューエルサイエンス株式会社

製) およびコアシェル型カラム：Kinetex C18 (長さ 250 mm、内径 4.6 mm、粒子径 5 μm、Phenomenex 社製) を用いた。移動相はアセトニトリル：水 (25 : 75)、注入量 100 μL、流速 1.0 mL/min、カラム温度 40℃ とした。蛍光検出は励起波長：365 nm、蛍光波長：435 nm で行った。定量下限値は 0.01 μg/kg とした。

5. 妥当性評価

添加回収試験用検体は、前述した方法により得られたろ液 20.0 g に AFM₁ 濃度が 0.05 および 0.5 μg/kg となるよう標準液を添加して 30 分放置したものとした。これをイムノアフィニティーカラムで精製し HPLC 用試験溶液を調製した。妥当性評価の枝分かれ実験は、実施者 1 名が、同一の添加試料を 1 日 2 回、5 日間分析で行った。評価項目は真度、併行精度および室内精度とした。各項目の目標値は総 AF 試験法の妥当性評価方法⁸⁾を参考に、それぞれ 70~110% (真度)、≤20% (併行精度)、≤30% (室内精度) とした。

結果と考察

1. AFM₁ 試験法の検討

はじめに AFM₁ 測定に用いる HPLC カラムの検討を行った。全多孔性カラムおよびコアシェル型カラムで標準液を測定したところ、いずれのカラムで分析してもピーク形状は良好であった。AFM₁ のピークは全多孔性カラムでは 13.1 分に、コアシェル型カラムでは 7.0 分に認められた (図-1)。標準液 (10 ng/mL) を繰り返し分析 (n = 5) して保持時間およびピーク面積の再現性を評価したところ、2 つのカ

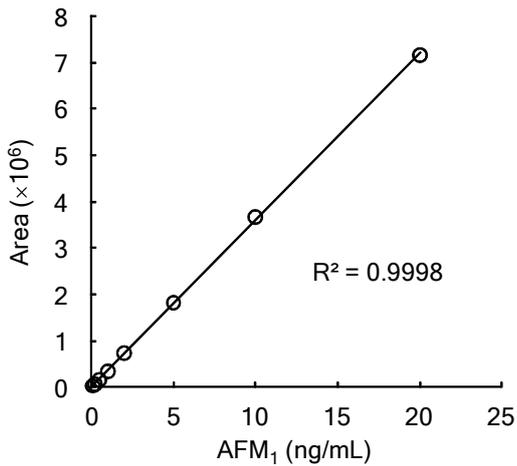


図-2 検量線

ラムともに良好な結果が得られた。両カラムともに AFM₁ 分析に十分な性能を有していたが、コアシェル型カラムを用いることで分析時間を短縮できることから、以降の検討はこのカラムを用いて実施した。

次に検量線の直線性の確認を行った (図-2)。検量線 (8 点、濃度範囲 0.1~20 ng/mL) の決定係数は 0.999 以上となり、良好な直線性が得られた。

牛乳試料のクロマトグラムを図-3 に示した。精製にイムノアフィニティーカラムを用いることにより AFM₁ を特異的に捕捉し、その他の成分を取り除くことができるため、AFM₁ の溶出時間付近に夾雑

ピークは認められず、精製度の高い HPLC 用試験溶液を得ることができた。2 種類の添加濃度 (0.05 および 0.5 μg/kg) で試験法の妥当性を評価したところ、2 濃度の添加濃度についてすべての評価項目の目標値を満たし、良好な結果が得られた (表-1)。

2. 千葉県内で購入した牛乳中の AFM₁ 汚染実態調査

本検討で妥当性を確認した試験法を用いて、平成 26~28 年度に千葉県内で購入した牛乳 69 検体の AFM₁ 汚染実態調査を実施した。この結果、いずれの年度もすべての検体において AFM₁ 濃度は 0.01 μg/kg 未満となり、我が国の基準値である 0.5 μg/kg を超える検体は認められなかった。また、我が国の基準値よりもさらに厳しい EU の基準値 (0.05 μg/kg) を超える検体も認められず、県内に流通する牛乳に AFM₁ 汚染は認められなかった。これまでに国内において実施された AFM₁ 汚染実態調査では、Nakajima ら⁹⁾ が 2001 年度に市販牛乳 208 検体、Sugiyama ら¹⁰⁾ が 2004 年度に生乳 299 検体を対象に試験をしている。これらの調査においても EU の基準値 (0.05 μg/kg) を超える検体は認められていない。今回我々が実施した調査結果は、過去の報告と同様の結果であった。

農林水産省は乳などの畜産物の AFM₁ 汚染防止を図る観点から、乳用牛用配合飼料中の AFB₁ について指導基準 (0.01 mg/kg) を、飼料用とうもろこし中の AFB₁ について管理基準 (0.02 mg/kg) を設定している¹¹⁾。また、独立行政法人農林水産消費安全技術センターにより、配合飼料中 AFB₁ のモニタリング

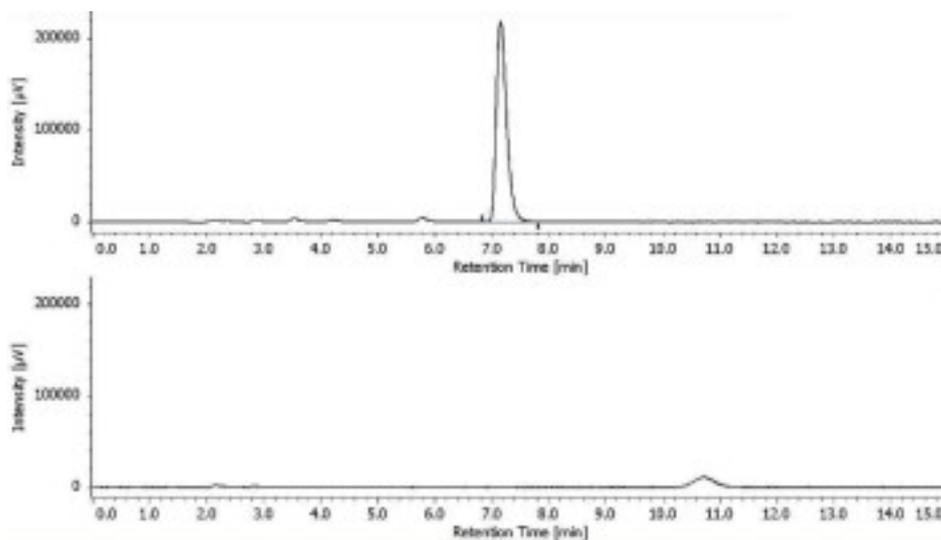


図-3 牛乳試料のクロマトグラム

上段：添加試料 (AFM₁ 0.5 μg/kg 添加)、下段：ブランク試料

表-1 妥当性評価結果

AFM ₁ 添加濃度	真度	併行精度	室内精度
0.05 µg/kg	84%	3.1%	3.7%
0.5 µg/kg	85%	3.1%	6.5%
目標値 ⁸⁾	70～110%	20%≧	30%≧

検査が実施されている。これまでのモニタリング検査では、配合飼料から基準を超える AFB₁ は検出されていない。本研究における汚染実態調査では我が国や EU の基準値を超えて AFM₁ を含有する牛乳は認められなかったが、これは飼料中の AFB₁ 低減対策の効果を反映したものと推察された。

まとめ

牛乳を対象とした AFM₁ 試験法の妥当性評価を実施し、真度、併行精度および室内精度の目標値を満たすことを確認した。この試験法を用いて千葉県内で購入した牛乳 69 検体（平成 26 年度：22 検体、平成 27 年度：24 検体、平成 28 年度：23 検体）を対象として汚染実態調査を実施したところ、すべての検体において AFM₁ 濃度は 0.01 µg/kg 未満であった。

引用文献

- 1) Faletto MB, Koser PL, Battula N, Townsend GK, Maccubbin AE, Gelboin HV, Gurtoo HL: Cytochrome P3-450 cDNA encodes aflatoxin B1-4-hydroxylase, *The Journal of biological chemistry*, 263, 12187-12189 (1988)
- 2) Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL: Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1, *Cancer research*, 54, 101-108 (1994)
- 3) Sinnhuber RO, Lee DJ, Wales JH, Landers MK, Keyl AC: Hepatic carcinogenesis of aflatoxin M1 in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and its enhancement by cyclopropene fatty acids, *Journal of the National Cancer Institute*, 53, 1285-1288 (1974)
- 4) Cullen JM, Ruebner BH, Hsieh LS, Hyde DM, Hsieh DP: Carcinogenicity of dietary aflatoxin M1 in male Fischer rats compared to aflatoxin B1, *Cancer research*, 47, 1913-1917 (1987)
- 5) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans : Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, 56, (1993)
- 6) 乳に含まれるアフラトキシン M1 の取扱いについて, 食安発 0723 第 1 号, 平成 27 年 7 月 23 日
- 7) <http://www.nihs.go.jp/dmb/kabi/M1protocol.pdf>
- 8) 総アフラトキシンの試験法について, 食安発 0816 第 1 号, 平成 23 年 8 月 16 日
- 9) Nakajima M, Tabata S, Akiyama H, Itoh Y, Tanaka T, Sunagawa H, Tyonan T, Yoshizawa T, Kumagai S: Occurrence of aflatoxin M1 in domestic milk in Japan during the winter season, *Food additives and contaminants*, 21, 472-478 (2004)
- 10) Sugiyama K, Hiraoka H, Sugita-Konishi Y: Aflatoxin M1 contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B1 in corn supplied to dairy cattle in Japan, *Shokuhin eiseigaku zasshi*, 49, 352-355 (2008)
- 11) 飼料の有害物質の指導基準の制定について, 63 畜 B 第 2050 号, 昭和 63 年 10 月 14 日