

食品中のアフラトキシンの成分規格の設定に係る審議経緯等

1. 経緯

我が国においては、昭和 46 年に食品衛生調査会等の意見により、食品中からアフラトキシンを検出してはならないこととされ¹⁾、現在、アフラトキシン B₁を検出した食品は、食品衛生法第 6 条第 2 号（有害・有毒物質を含む食品の販売等の禁止）に違反するものとして規制されている。

一方、国際的には、コーデックス委員会において、個別食品の総アフラトキシン（アフラトキシン B₁、B₂、G₁及び G₂の合算）に係る規格設定の動きがあり、これを受け、我が国においても平成 16 年度から厚生労働科学研究費等により食品中のアフラトキシンの汚染実態等について調査研究が行われてきたところである。

これらの状況を踏まえて当部会において審議した結果、コーデックス規格と同様に落花生及び木の実について総アフラトキシンの規格基準の設定を検討するとの結論が得られたことから、昨年 9 月、厚生労働省から食品安全委員会に対し食品中の総アフラトキシンに係る食品健康影響評価を依頼し、本年 3 月、その評価の結果が通知されたところであり、これを受けて、今般、厚生労働省から薬事・食品衛生審議会に対し、食品中のアフラトキシンに係る成分規格設定について諮問がなされた。

2. アフラトキシンの概要

アフラトキシンは、*Aspergillus flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*等が産生するかび毒であり、*A. flavus*はアフラトキシン B₁及び B₂を、*A. parasiticus*及び *A. nomius*はアフラトキシン B₁、B₂、G₁及び G₂を産生する。

アフラトキシンの毒性について、IARC（国際がん研究機関）はグループ 1（人に対して発がん性を示す）に分類している。

また、1997 年の JECFA（FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議）での評価において、許容摂取量は示されず、「摂取は合理的に達成可能な値にまで低減されるべき」とコメントされている。

3. 食品健康影響評価

食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 24 条第 1 項第 1 号の規定に基づき、平成 20 年 9 月 3 日付け厚生労働省発食安第 0903001 号により厚生労働

¹⁾ 昭和 46 年 3 月 16 日付け環食第 128 号：アフラトキシンが検出された食品は、食品衛生法第 4 条第 2 号（現第 6 条第 2 号）に違反するものとして取り扱う。

大臣より食品安全委員会委員長あてに意見を求めた食品中の総アフラトキシンに係る食品健康影響評価に対して、以下のとおりアフラトキシンの安全性が評価されている。

アフラトキシン B₁ (AFB₁) の遺伝毒性については、*in vitro* 及び *in vivo* ともに広範な試験が実施されており、そのほとんどにおいて陽性の結果が得られている。

発がん性については、ほとんどの動物種において肝臓が標的器官であり、肝細胞癌が最も多く認められた。

非発がん毒性については、実験動物において生殖パラメーターの異常、催奇形性、免疫毒性などが認められた。

人における疫学調査のほとんどにおいて AFB₁ 暴露と肝細胞癌との相関が指摘されている。これらの調査はアフラトキシンの暴露量が多く、かつ、HBV の罹患率が高い地域で実施されており、HBV 感染はリスク因子であることが示唆されている。

AFB₁ 以外のアフラトキシンについては、アフラトキシン G₁ では遺伝毒性及び発がん性が認められた。アフラトキシン B₂ 及び G₂ に関するデータは限られている。

IARC では、自然界で生じるアフラトキシン混合物はヒトに対して発がん性がある物質（グループ 1）と分類している。

上記のことから、総アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、発がんリスクによる評価が適切であると判断された。一方、非発がん影響に関しては、TDI を設定するための定量的評価に適用できる報告はなく、非発がん性を指標とした TDI を求めることは困難と判断された。発がんリスクについては、人の疫学調査の結果から、体重 1kg あたり 1 ng/日の用量で生涯にわたり AFB₁ に経口暴露した時の肝臓癌が生じるリスクとして、HBsAg 陽性者では 0.3 人/10 万人/年（不確実性の範囲 0.05～0.5 人/10 万人/年）、HBsAg 陰性者では 0.01 人/10 万人/年（不確実性の範囲 0.002～0.03 人/10 万人/年）となった。

4. 我が国における食品からのアフラトキシン暴露状況

(1) 汚染実態及び暴露推計

平成 16～18 年度の厚生労働科学研究による調査の結果、我が国に流通する食品中の総アフラトキシンの汚染実態及び暴露推計は以下のとおりであった。

<平成 16～18 年度 国内流通食品のアフラトキシンの汚染実態調査結果>

品名	試料数				汚染 件数	検出検体の平均汚染濃度 (範囲) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)* ¹				
	H16 年度	H17 年度	H18 年度	合計		アフラトキシ B ₁	アフラトキシ B ₂	アフラトキシ G ₁	アフラトキシ G ₂	総アフラトキシ
落花生	60	60	30	150	1	4.88	0.31	20.9	1.90	28.0
チョコレート (初歩 チョコレートを含む)		40	24	64	34	0.27 (0.1~0.88)	0.13 (0.1~0.18)	0.13 (0.1~0.33)	0.1 (0.1)	0.33 (0.1~0.21)
ピスタチオ			5	5	1	0.38	—	—	—	0.38
はとむぎ			17	17	6	2.45 (0.29~9.0)	0.38 (0.1~0.58)	0.16 (0.1~0.30)	—	2.77 (0.31~9.71)
そば粉	12	10	6	28	2	0.53 (0.24~0.81)	0.17 (0.173)	—	—	0.61 (0.238~0.987)
香辛料			21	21	5	0.36 (0.1~1.0)	—	0.2 (0.2)	—	0.44 (0.1~1.0)
ココア			11	11	8	0.33 (0.17~0.60)	0.13 (0.1~0.15)	0.11 (0.1~0.11)	—	0.40 (0.17~0.85)
ピーナッツバター	21	20	21	62	21	0.86 (0.1~2.59)	0.25 (0.1~0.52)	0.37 (0.1~0.81)	0.2 (0.12~0.46)	1.18 (0.1~3.92)
アーモンド (製菓 材料含む)			24	24	6	0.37 (0.1~0.89)	0.14 (0.1~0.17)	0.1 (0.1~0.12)	—	0.43 (0.1~1.06)
コーンクリップ	10	10	10	30	2	0.2	—	—	—	0.21
ごま油	10	10	10	30	0	/				
米	53	30	10	93	0					
ポップコーン	10	10	10	30	0					
豆菓子		20	10	30	0					
コーンフレーク	20	15	15	50	0					
生トウモロコシ	10			10	0					
スイートコーン* ²	50	30	10	90	0					
そば麺	39	20	25	84	0					
せんべい			21	21	0					
ビール			20	20	0					
乾燥伊豆ク			5	5	0					
落花生粉	10			10	0					

*1: 定量限界 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ビールのみ 0.005 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

*2: 缶詰、冷凍食品等の加工品

汚染実態調査の結果、アフラトキシンが検出されたのは、落花生、チョコレート、ピスタチオ、はとむぎ、そば粉、香辛料、ココア、ピーナッツバター、アーモンド及びコーングリッツの 11 品目であり、胡麻油、米、ポップコーン、豆がし、コーンフレーク、生トウモロコシ、スイートコーン、そば、せんべい及びビールの 10 品目については不検出であった。また、

- ① 検出した食品のうち、はとむぎでアフラトキシン B₁ を 9 μg/kg を含んでいたもの以外は、概ね低濃度であった。
- ② 3 年間の測定期間中にアフラトキシンが検出された食品群の平均汚染濃度は、いずれの食品群も 1 μg/kg を超えなかった。
- ③ コーングリッツ、ピスタチオ、そば粉及び香辛料は、B グループ汚染が主流と考えられたが、それ以外は BG グループ汚染が多かった。
- ④ 落花生では、B グループよりも G グループのほうが汚染濃度の高い現象が見られた。

上記の汚染実態調査結果に基づき、アフラトキシンを含有すると考えられる 11 品目の食品を対象として、

- ① アフラトキシン B₁ : 10 μg/kg
- ② アフラトキシン B₁ : 4 μg/kg 及び総アフラトキシン : 8 μg/kg
- ③ アフラトキシン B₁ : 10 μg/kg 及び総アフラトキシン : 15 μg/kg
- ④ アフラトキシン B₁ : 10 μg/kg 及び総アフラトキシン : 20 μg/kg

の 4 通りの基準値を設定するシナリオを想定してモンテカルロ・シミュレーションによる暴露量の推計を行った結果、アフラトキシン B₁ の一日推定暴露量の分布は以下のとおりであった。

<平成 16~18 年度汚染実態調査に基づくアフラトキシン B₁ の一日推定暴露量の分布>

シナリオ	シナリオ①		シナリオ②		シナリオ③		シナリオ④	
	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B
下限値以下の仮定*								
10 パーセントイル	0	0	0	0	0	0	0	0
50 パーセントイル	0	0	0	0	0	0	0	0
80 パーセントイル	0	0	0	0	0	0	0	0
90 パーセントイル	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
95 パーセントイル	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.004
97.5 パーセントイル	0.009	0.010	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009	0.010
99.0 パーセントイル	0.045	0.051	0.041	0.048	0.043	0.049	0.042	0.049
99.5 パーセントイル	0.305	0.307	0.259	0.261	0.283	0.285	0.285	0.286
99.9 パーセントイル	2.063	2.063	1.881	1.880	1.956	1.956	1.895	1.958

* 仮定 A : 検出下限未満の検体について、検出下限値である 0.1 μg/kg と仮定

仮定 B : 検出下限未満の検体について、検出下限値の 0.1 μg/kg と 0 μg/kg の間の一様分布と仮定

この結果、年齢構成比で重み付けした日本人全体のアフラトキシン B₁ の暴露量は、99.9 パーセンタイル値が、もっとも安全側をとったシナリオである「アフラトキシン B₁ のみ」の規制の場合で 2.06 ng/kg/day であり、もっとも少なめに見積もられる「アフラトキシン B₁ 4 μg/kg、総アフラトキシン 8 μg/kg」の規制の場合で 1.88 ng/kg/day であった。

(2) 食品健康影響評価

食品安全委員会の食品健康影響評価において、食品からのアフラトキシンの暴露について、以下のとおりまとめられている。

2004 年～2006 年に実施された汚染実態調査結果からアフラトキシンが含有されると思われる 11 品目を対象に確率論的手法を用いて暴露量の推定を行った結果では、AFB₁ に対して 10 μg/kg を検出限界として規制をしている現状においては、AFB₁ で 4 又は 10 μg/kg 及び総アフラトキシンで 8、15 又は 20 μg/kg の基準値を設定したとしても、AFB₁ 一日推定暴露量はほとんど変わらなかった。よって、落花生及び木の実（アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ）について、総アフラトキシンの規格基準を設定することによる食品からの暴露量に大きな影響はなく、様々な条件を前提とし不確実性を含んでいる推計ではあるが、現状の発がんリスクに及ぼす影響もほとんどないものと推察された。しかしながら、アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、食品からの総アフラトキシンの摂取は合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルにするべきである。汚染実態調査の結果、BG グループの汚染率が近年高くなる傾向が見られていることを考慮すると、落花生及び木の実について、発がんリスク及び実行可能性を踏まえ適切に総アフラトキシンの基準値を設定する必要がある。なお、アフラトキシンは自然汚染であり、BG 比率が一定しないと予想されることから、総アフラトキシンと AFB₁ の両者について規制を行うことが望ましい。

また、食品からの総アフラトキシンの摂取を合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルにするために、落花生及び木の実以外の主要な食品についても、汚染実態及び国際的な基準設定の動向等を踏まえ、総アフラトキシンの規格基準の必要性について検討を行うことが望ましいと考える。

5. 諸外国等における規制状況等

諸外国等における規制又はガイドライン値は以下のとおりである。

(1) コーデックス委員会 (CODEX STAN 193-1995, REV. 3-2007)

食 品	総アフラトキシンの 最大基準値 (μg/kg)
落花生 (加工用原料)	15
加工用木の実 ^{*1} (アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ)	15
直接消費用木の実 ^{*2} (アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ)	10

*1: 食品の原材料として使用され、若しくは加工され又は人の消費用に提供される前にアフラトキシンのレベルを低減可能な更なる加工/処理を行うことが意図されている木の実。アフラトキシンのレベルを低減可能な加工とは、殻剥き、湯通し後の色選別、比重及び色(傷)による選別をいう。ピスタチオ中のアフラトキシンは焙焼により低減するといういくつかの証拠があるが、他のナッツについての情報は無い²⁾。

*2: アフラトキシンのレベルを低減可能な更なる加工/処理を行うことが意図されていない木の実³⁾。

(2) 米国 (Compliance Policy Guide)

食 品	総アフラトキシンの 最大基準値 (μg/kg)
すべての食品	20
ブラジルナッツ	20
落花生及び加工品	20
ピスタチオ	20

(3) オーストラリア (Food Standards Code 1.4.1)

食 品	総アフラトキシンの 最大基準値 (μg/kg)
落花生	15
木の実	15

²⁾ **Treenuts destined for further processing** – nuts, which are intended to undergo an additional processing/treatment that has proven to reduce levels of aflatoxins before being used as an ingredient in foodstuffs, otherwise processed or offered for human consumption. Processes that have proven to reduce levels of aflatoxins are shelling, blanching followed by color sorting, and sorting by specific gravity and color (damage). There is some evidence that roasting reduces aflatoxins in pistachios but for other nuts the evidence is still to be supplied.

³⁾ **Ready-to-eat treenuts** – nuts, which are not intended to undergo an additional processing/treatment that has proven to reduce levels of aflatoxins.

(4) EU (COMMISSION REGULATION(EC) No 1881/2006)

食 品	最大基準値 (μg/kg)	
	アフラトキシン B ₁	総アフラトキシン
1. 落花生で、人が直接食べる又は食品の原材料として用いられる前に選別やその他の物理的処理が行われるもの	8.0	15.0
2. ナッツ類で、人が直接食べる又は食品の原材料として用いられる前に選別やその他の物理的処理が行われるもの	5.0	10.0
3. 落花生、ナッツ類及びそれらの加工品で、人が直接食べるもの又は食品の原材料として用いられるもの	2.0	4.0
4. 乾燥果実で、人が直接食べる又は食品の原材料として用いられる前に、選別やその他の物理的処理が行われるもの	5.0	10.0
5. 乾燥果実及びそれらの加工品で、人が直接食べるもの又は食品の原材料として用いられるもの	2.0	4.0
6. 穀類及びそれらの加工品（穀類の加工品を含む製品を含む）（7、9及び10の食品を除く）	2.0	4.0
7. トウモロコシで、人が直接食べる又は食品の原材料として用いられる前に、選別やその他の物理的処理が行われるもの	5.0	10.0
8. 以下の種類のスパイス類 唐辛子類（乾燥したものであって、チリ、粉唐辛子、カイエン及びパプリカを含む） コショウ類（白及び黒コショウを含む） ナツメグ ショウガ ターメリック	5.0	10.0
9. 穀類を原材料とする食品及び乳幼児用ベビーフード	0.10	
10. 乳幼児向け特殊医療目的の栄養食品	0.10	

6. 食品健康影響評価等を踏まえた対応案

厚生労働科学研究における暴露推計によると、すべての食品についてアフラトキシン B₁ を試験法の検出限界 (10ppb) で管理している現行の規制状況においては、アフラトキシン B₁ をより低いレベルで管理した場合も含め、総アフラトキシンによる規制の有無によって暴露量に顕著な差異は認められず、現状の発がんリスクに及ぼす影響もほとんどないものと考えられた。これは我が国に流通する食品において、運用している管理水準を超えてアフラトキシン B₁ を含有するものの割合が少ないためと考えられ、この結果は現行の規制が有効に機能していることを強く支持していると言える。

一方、食品安全委員会の食品健康影響評価によると、アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、食品からの総アフラトキシンの摂取は合理的に達成可能な範囲でできる限り低いレベルにするべきであるとされている。また、これまでの調査研究の結果、

- ① 落花生について、アフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ の複合汚染が増加していること
- ② 我が国で流通する落花生においてアフラトキシン B₁ より G₁ の汚染濃度が高い場合があること
- ③ 我が国は木の実の輸入国であること

等に鑑みると、落花生及び木の実（アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオ）について、コーデックス規格と同様に総アフラトキシンの規格基準を設定することは、アフラトキシン B₁ 以外のアフラトキシン類による発がん性も含めた健康被害を未然に防止する上で妥当であると考えられる。

以上を踏まえ、落花生、アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオについて、以下のとおり食品衛生法第 11 条第 1 項に基づく総アフラトキシンの成分規格を設定する。

併せて、食品中の総アフラトキシンの分析法を示す（別紙参照）。

<落花生及び木の実の総アフラトキシンに係る成分規格（案）>

食 品	総アフラトキシンの最大含有量 (μg/kg)
落花生（加工用）	15
アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオ（加工用）	15
アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオ（直接消費用）	10

なお、加工用とは、販売の用に供する前に、アフラトキシンの含有量を低減可能な製造又は加工等を行うことが意図されているものをいい、殻剥き、湯通し後の選別並びに比重及び色(傷)による選別がこの工程に該当する(ピスタチオについては焙焼を含む。)。また、直接消費用とは、上記の製造又は加工を行うことが意図されていないものをいう。

7. 検討事項

(1) 食品衛生法第6条第2号の規定の運用について

現在、アフラトキシン B₁を検出した食品は、食品衛生法第6条第2号の規定(有害・有毒物質を含む食品の販売等の禁止)に違反するものとして取り扱っており、その試験法の検出限界を10ppbとして運用している。

今般の総アフラトキシンに係る成分規格設定に伴い、当該規定の運用を見直す必要性はないか。

(2) その他主要な食品等の取扱いについて

米については、摂取量が最も多い食品であるものの、国内流通時及び輸入時の検査においてアフラトキシン類による汚染は認められていない。

また、そばやとうもろこし等については、我が国においてアフラトキシン類の汚染実態が確認されているが、アフラトキシン B₁以外のアフラトキシン類による顕著な汚染は認められていない。

今後、これらの食品について、総アフラトキシンに係る成分規格設定を検討する必要性はないか。

8. 今後の予定

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、落花生、アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオの総アフラトキシンに係る成分規格の設定について審議を行う。

(別紙) 落花生、アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオ並びに
その加工品中の総アフラトキシン試験法

1. 分析対象物質

アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂

2. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ・質量分析計

3. 試薬、試液等¹⁾

次に示すもの以外は、食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）

第2 添加物の部 C 試薬・試液等の1. に掲げるものを用いること。

アフラトキシンB₁標準品 本品はアフラトキシンB₁ 98%以上を含む。

アフラトキシンB₂標準品 本品はアフラトキシンB₂ 98%以上を含む。

アフラトキシンG₁標準品 本品はアフラトキシンG₁ 98%以上を含む。

アフラトキシンG₂標準品 本品はアフラトキシンG₂ 98%以上を含む。

アセトニトリル 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

水 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

メタノール 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

多機能カラム 逆相樹脂、陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂を混合したものを
充てんしたもの（シリンジ型²⁾ 又は押し出し型³⁾）。

イムノアフィニティカラム アフラトキシン特異抗体を結合した単体を充てんした
もの⁴⁾。

ろ紙 Whatman No.5 又はその同等品。

ガラス繊維ろ紙 Whatman 934 AH 又はその同等品。

生理的リン酸緩衝液 (PBS) 塩化カリウム 0.20 g、リン酸一カリウム 0.20 g、リン
酸二ナトリウム（無水） 1.16 g（又はリン酸二ナトリウム 2.92 g）、塩化ナトリ
ウム 8.00 g を 900 mL の水に溶解し、0.1 mol/L 塩酸又は水酸化ナトリウムで pH
7.4 に調製し、1 L に定容する⁵⁾。

4. 試験溶液の調製

(1) 多機能カラム法

粉碎均一化した試料 50 g をブレンダー容器又は共栓付き三角フラスコ等に量り
採る。これにアセトニトリル及び水（9：1）混液 200 mL を加え、5 分間ブレ
ンド又は 30 分間振とうした後、ろ紙でろ過又は遠心分離する。ろ液 5 mL を多機能カ
ラムに静かに注入し、毎分 1.0 mL の流速で流出する。最初に溶出される流出液約
1 mL⁶⁾ を試験管に採る。

この溶液 0.5 mL をスクリーキャップ付きバイアル又は共栓付の試験管や遠心管等へ正確に量り採り、窒素気流又はエバポレータを用いて溶媒を除去する。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌する。室温、暗所で 15 分間放置した後、アセトニトリル及び水（1 : 9）混液 0.4 mL を加えたものを試験溶液⁷⁾とする。

(2) イムノアフィニティカラム法⁸⁾

粉碎均一化した試料 50 g をブレンダー容器又は共栓付き三角フラスコ等に量り採る。これにメタノール及び水（8 : 2）混液 200 mL を加え、5 分間ブレンド又は 30 分間振とうした後、ろ紙でろ過又は遠心分離する。ろ液 10.0 mL を正確に量り採り、PBS を加えて 50.0 mL とする⁹⁾。十分混合した後、ガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、ろ液 10.0 mL を正確に量り採り、イムノアフィニティカラムに注入する¹⁰⁾。全てのろ液を流出させたのち、カラムを PBS 10 mL 以上及び精製水 10 mL 以上で洗浄し¹¹⁾、加圧してカラム内の水分を完全に流出させる¹²⁾。アセトニトリル 5 mL を注入し溶出後¹³⁾、溶出液にアセトニトリルを加えて正確に 5.0 mL とし、十分混合する。

この溶液 2.5 mL をスクリーキャップ付きバイアル又は共栓付の試験管や遠心管等へ正確に量り採り、窒素気流を又はエバポレータを用いて溶媒を除去する¹⁴⁾。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌する。室温、暗所で 15 分間放置した後、アセトニトリル及び水（1 : 9）混液 0.4 mL を加えたものを試験溶液とする¹⁵⁾。

5. 検量線の作成

各アフラトキシン標準品の 0.5~16 mg/L を含むアセトニトリル及び水（1 : 9）混液の標準溶液を数点調製する。それぞれ高速液体クロマトグラフに 20 μ L を注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。

6. 定量試験

4 (1) 又は 4 (2) で得られた試験溶液を蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフに注入し、5 の検量線を用いて各アフラトキシンの含量を求める。

<測定条件>

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 4.6 mm、長さ 150 mm 又は 250 mm、
粒径 3 ~ 5 μ m¹⁶⁾

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル、メタノール及び水（1 : 3 : 6）混液

流速：1.0 mL/min

検出波長：励起波長 365 nm、蛍光波長 450 nm

注入量：20 μ L

7. 確認試験

6においてアフラトキシンが検出された場合、4 (1) 又は4 (2) で得られた試験溶液を高速液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、確認を行う。

<測定条件>

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.0 mm、長さ150 mm、粒径3～5 μm)

カラム温度：40°C

移動相：メタノール及び10 mmol/L 酢酸アンモニウム (62 : 38) 混液

流速：0.2 mL/min

注入量：5 μL

イオン化モード：ESI (+)

ドライガス流速・温度：10 L/min・350°C

ネプライザーガス圧力：345 kPa

フラグメンター電圧：100 V

モニターイオン (m/z) :

	Precorser	Target	Qualifier	CE1	CE2
AFG2	331	245	189	35	35
AFG1	329	243	200	30	30
AFB2	315	259	287	25	25
AFB1	313	241	213	45	45

<注解>

- 1) アフラトキシンは強力な発がん物質であるため、取扱いに注意すること。正確に秤量された市販品 (Sigma 社等から入手可能) を用いると便利である。また、標準溶液調製法として、AOAC 掲載の方法 (Mary W. Trucksess : Official Methods of Analysis of AOAC International (18thEdition) Chapter 49, p. 3-5, (2005)) が有用である。さらに、試験に用いた器具、前処理用カラム、検体等は、1% (v/v) 濃度の次亜塩素酸ナトリウムに2時間以上浸けた後、処理すること。
- 2) MultiSep #228 (Romer Labs 社製)、Autoprep MF-A (昭和電工(株)製) 等が使用可能である。コンディショニングを行わずそのまま用いる。使用するカラムによって溶出パターンが異なるので、標準溶液を用いて事前に溶出量を確認すること。また、使用する多機能カラムは、あらかじめアフラトキシンB₁の回収率が90%以上であることを確認すること (AOAC 掲載の方法 (Mary W. Trucksess: Official Methods of Analysis of AOAC International (18thEdition) Chapter 49, p. 26-27, (2005)) が有用である)。

- 3) MFA-1000 (昭和電工(株)製)、MycoSep #228 (Romer Labs 社製) 等が使用可能である。
- 4) AFLAKING ((株)堀場製作所製、対象：総アフラトキシン)、AflaTest WB (VICAM 社製、対象：総アフラトキシン)、EASI-EXTRACT アフラトキシン (R-BIOPHAM RHONE 社製、対象：総アフラトキシン)、AflaCLEAN (LC Tech 社製、対象：総アフラトキシン) 等が使用可能である。なお、使用前にカラム中のゲルに亀裂や気泡が生じていないことを確認し、亀裂や気泡が生じている場合には、カラム上部から注射器等で圧力を加えて除去すること。また、使用するイムノアフィニティーカラムは、あらかじめ使用条件下での総アフラトキシンの回収率がいずれも 80%以上であることを確認すること (AOAC 法 (Mary W. Trucksess : Official Methods of Analysis of AOAC International (18thEdition) Chapter 49, p. 31 (2005)) 等が有用である)。
- 5) Phosphate Buffered Saline Tablet (Sigma-Aldrich 社製) 等が使用可能である。また、イムノアフィニティーカラムによっては、PBS の代わりに精製水を使用可能なものもある。
- 6) 多機能カラム精製では、夾雑物はカラムに保持されて遅れて溶出し、アフラトキシンはカラムに保持せず常に一定の濃度で溶出されることから、初期溶出液 1.0 mL が最も精製度が高い。
- 7) 必要に応じて、遠心処理等で不溶物を除去後、試験溶液とする。
- 8) 本法は、加工食品等において多機能カラム法を用いた前処理では夾雑物や妨害物のため総アフラトキシンの定量が困難である場合に限り行うこと。
- 9) 試料抽出液を PBS で希釈すると沈殿が生じることがあり、これを直接イムノアフィニティーカラムに注入するとカラムが詰まることがあるため、その場合にはガラス繊維ろ紙によりろ過を行うこと。また、試料によっては Whatman 934 AH ろ過では沈殿を除去することができないことがあり、その場合には Whatman GF/F によるろ過が有効である。
- 10) イムノアフィニティーカラムの下部にストップコックを取り付け、これをバキュームマニホールド等に連結し、カラム内の溶液を全部流出させた後、カラム内に PBS を満たし全量を流出させ、カラムのコンディショニングを行う。その後、カラム容量の約半分の量の PBS を注入し、ストップコックを閉め、リザーバー (30.0 mL (Waters 社製) や注射器等が利用可能) とコネクターを用いて連結する。試料希釈液を注入する際には、毎秒約 1 ~ 2 滴の速度で溶出するように調節する。
- 11) 洗浄する時にはストップコックで流速を調節する必要はない。また、洗浄液はカラム内をピペット等で満たし、その全量を排出させる操作を繰り返すことが有効である。着色したカラム内ゲルがなるべく脱色するように洗浄液量を調節する。

- 12) 注射器にリザーバーコネクターを取り付けたものを用意し、これをカラム上部に連結し空気を押し出すことによりカラム内水分を除去することが可能である。
- 13) アセトニトリル1 mL をカラムに注入し、自然落下で溶出させた後、5分間放置する。さらにアセトニトリル1 mL をカラムに注入し溶出させる。この操作をもう一度繰り返す。
- 14) 溶出液を蒸発乾固させる際にアフラトキシンがバイアルに吸着することがある。この場合、シラーン処理したバイアル (Supelco 社製等、使用前に20~30%アセトニトリル水等で洗浄し、乾燥させたもの) を用いることが望ましい。
- 15) トリフルオロ酢酸による蛍光誘導化 (TFA 法) のほかに、フォトケミカルリアクターによる蛍光誘導化法 (PR 法, Joshua, H. et al. : J. chromatogr A., 654, 247-254, 1993) やコブラセル法 (KC 法, Kok, W. T. et al. : J. Chromatogr., 367, 231-236, 1986, Papadopoulou-Bouraoui, A. et al. : J. AOAC Int., 85, 411-416, 2002) も応用可能である。PR 法はポストカラムで紫外線照射により生成する蛍光誘導体化合物を、KC 法はポストカラムで電気化学的に生ずるブロムにより生成するブロム誘導体化合物を測定する簡便な手法である。いずれもポストカラム反応であるため、高速液体クロマトグラフィーにおけるアフラトキシンの溶出順序が異なる (G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 の順)。PR 法及び KC 法の場合、トリフルオロ酢酸による反応を行わないため、標準溶液調製の際は、試験溶液 0.5 mL をスクリュウキャップ付バイアル又は共栓付の試験管や遠心管等に正確に量り採り、窒素気流又はエバポレータを用いて溶媒を除去後、アセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液 0.5 mL を正確に加えたものを試験溶液とする。なお、PR 法及び KC 法における高速液体クロマトグラフィーの測定条件の一例を以下に示す。

<PR 法>

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 150 又は 250 mm、粒径 3~5 μ m)、カラム温度 : 40°C、移動相 : メタノール及び水 (4 : 6) 混液、流量 : 0.7 mL/min、検出波長 : 励起波長 365 nm、測定波長 450 nm、PR 反応システム : 245 nm 低圧水銀灯 (15W) 照射システム、反応コイル : 内径 0.25 mm、長さ 15~20 m、注入量 : 20 μ L

<KC 法>

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 150 又は 250 mm、粒径 3~5 μ m)、カラム温度 : 40°C、移動相 : メタノール及び水 (4 : 6) 混液 (1L あたりに臭化カリウム 119 mg 及び 4 mol/L 硝酸 350 μ L を加える)、流量 : 1.0 mL/min、検出波長 : 励起波長 365 nm、測定波長 450 nm、KC 反応システム : コブラセル (R-Biopharm Rhône 社製)、電流 : 100 μ A、注入量 : 20 μ L

- 16) Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス社製)、Shodex Silica C18M 4E (昭和電工(株)製) 及び Cadenza CD-C18 CD006 (インタクト社製) 等が使用可能である。