調査・資料

各種市販食品中のオクラトキシン A, B および
シトリニンの汚染実態調査

(平成 19 年 3 月 7 日受理)

田端 節子* 飯田 憲司 木村 圭介 岩崎由美子
中里 光男 鎌田 国広 広門 雅子Investigation of Ochratoxin A, B and Citrinin Contamination in
Various Commercial FoodsSetsuko TABATA*, Kenji IIDA, Keisuke KIMURA, Yumiko IWASAKI, Mitsuo NAKAZATO,
Kunihiro KAMATA and Masako HIROKADOTokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-24-1 Hyakunin-cho,
Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan; * Corresponding author

Ochratoxin A (OTA), ochratoxin B (OTB) and citrinin (CIT) in commercial foods were simultaneously determined and confirmed with high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The samples examined were made up of cereal, fruit, coffee, and cacao products. The limits of quantification ($S/N \geq 10$) of OTA, OTB and CIT were $0.1 \mu\text{g/kg}$ or less. Aflatoxins (AF), deoxynivalenol (DON) and fumonisins were also surveyed. Of 157 samples examined, 44 were contaminated with OTA at levels of 0.11 to $4.0 \mu\text{g/kg}$. At least 2 positive samples were labeled as domestics. In most positive samples, the OTA level was low, less than $1 \mu\text{g/kg}$. The highest incidence of OTA was observed in cacao powder (10/12), followed by instant coffee (5/7), cocoa (5/8) and raisin (6/13). OTB was found in fruit and cacao products containing relatively high levels of OTA. Co-occurrence of OTA, CIT and DON was found in cereal products, and co-occurrence of OTA and AF was found in cacao products. Approximately 30% of naturally contaminated OTA in roasted coffee bean moved into the extract solution when brewed with paper filter.

(Received March 7, 2007)

Key words: オクラトキシン A ochratoxin A; オクラトキシン B ochratoxin B; シトリニン citrinin; アフラトキシン aflatoxin; デオキシニバレノール deoxynivalenol; フモニシン fumonisin; レーズン raisin; カカオ cacao; コーヒー coffee; 複合汚染 co-contamination

緒 言

オクラトキシン (OT) は, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum*, *A. carbonarius* などにより産生されるカビ毒で, 腎毒性を有する。同族体は 10 種類以上知られているが, その毒性および食品汚染状況などから最も重要なものはオクラトキシン A (OTA) であり, 次いでオクラトキシン B (OTB) である。OTA は, イヌ, ブタに対して LD_{50} がそれぞれ 0.2 および $1.0 \mu\text{g/kg} \cdot \text{bw}$ と強い急性毒性を示し¹⁾, 発がん性については WHO の国際がん研究機関 (IARC) においてグループ 2B (ヒトに発がん性を示す可能性がある) に分類されている²⁾。わが国では OT に対して規制値は設定されていないが, EU で種々の食品

中の OTA に対して $0.5 \sim 10 \mu\text{g/kg}$ の規制値が設定されている³⁾ほか, ブラジル, エジプトなど多くの国で規制が行われている⁴⁾。

シトリニン (CIT) は, *P. citrinum* など主に *Penicillium* 属のカビによって産生されるカビ毒で, 毒性は OTA ほど強くはないが, 腎毒性を有する¹⁾。同じ試料から OT とともに検出される複合汚染が報告されており¹⁾, また, OTA の発がん性を増強するとの報告もある¹⁾。

著者らは, 食品中の OTA, OTB および CIT の汚染調査を高速液体クロマトグラフ (HPLC)-蛍光検出器 (FL) を使用する分析法を用いて継続して行ってきた。これまでは, 検出された際の確認法の感度が低かったため, HPLC-FL で $1 \mu\text{g/kg}$ 未満のピークが認められても結果の表現は“不検出”としてきた。しかし, 高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) による測定法を検

* 連絡先

東京都健康安全研究センター: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

討し、OT および CIT を $0.1 \mu\text{g/kg}$ まで分析することが可能となった⁵⁾。そこで、都内で市販されていた各種食品について OT および CIT の低レベルまでの汚染実態調査を行った。また、一部の試料についてはアフラトキシン (AF)、デオキシニバレノール (DON)、およびフモニシン (FM) についても調査を行ったので、その結果も併せて報告する。

実験方法

1. 供試試料および調査対象カビ毒

平成 17 年度に東京都内の小売店で販売されていた穀類加工品 37 試料、果実加工品 55 試料、カカオ加工品 20 試料、コーヒー加工品 45 試料、合計 157 試料について調査を行った。

OTA は全試料について、OTB は焙煎およびインスタントコーヒー、コーヒー飲料以外の試料について調査を行った。CIT は穀類および果実加工品と生コーヒー豆計 102 試料、AF は穀類およびカカオ加工品合計 57 試料、デオキシニバレノール (DON) は穀類加工品のうち小麦を含むもの 18 試料、フモニシン (FM) はトウモロコシ加工品 3 試料について調査を行った。

2. 試 薬

標準品: OTA, OTB, CIT, AF, FM および DON は、SIGMA 社製を用いた。

Bond elute C18 カートリッジ: 500 mg, VARIAN 社製は、メタノール、水および 3% 炭酸水素ナトリウム水溶液各 2 mL で 2 回コンディショニングした後、使用した。

Bond Elute DEA カートリッジ: 500 mg, VARIAN 社製は、水、次いでアセトニトリル各 10 mL でプレコンディショニングした後、使用した。

その他の試薬: 市販の特級品または HPLC グレードを使用した。

3. 装 置

粉碎器: ダンシングアジテーター ((株)広沢鉄工所製) または遠心粉碎器 (ロータースピードミル, フリッチェ社製) を用いた。

ホモジナイザー: HF93 (エスエムテター(株)製) を用いた。

HPLC: LC-10ATVP シリーズ ((株)島津製作所製) またはガリバー 1500 シリーズ (日本分光(株)製) を使用した。

LC/MS/MS および LC/MS: HPLC は alliance2695 (Waters 社製), MS 検出器は Quattro Ultima Pt (Waters 社製) を用いた。

デンシトメーター: CS-9000 ((株)島津製作所製) を使用した。

4. OT および CIT 分析法

1) 穀類, 果実加工品, 生コーヒー豆

著者らの方法⁵⁾に従い, HPLC-FL で定量を行い, LC/

MS/MS で確認を行った。回収率は 87~104%, 定量下限 ($S/N \geq 10$) は $0.1 \mu\text{g/kg}$ 以下であった。

2) 焙煎コーヒー, インスタントコーヒー, コーヒー飲料

AOAC 991.44 の方法⁶⁾に準じて試験溶液を作製した。すなわち, 粉碎した試料 50 g に 0.1 mol/L リン酸水溶液 25 mL を加え, クロロホルム 200 mL で抽出した。クロロホルム層 100 mL を採り, 3% 炭酸水素ナトリウム水溶液 10 mL で抽出し, その 5 mL を Bond Elute C18 カートリッジに負荷した。 0.1 mol/L リン酸 2 mL および水 2 mL で洗浄後, 酢酸エチル-メタノール-酢酸 (95:5:0.5) 8 mL で溶出した。溶出液に水 2 mL を加えてかくはん後, 酢酸エチル層を採り, 水層から酢酸エチル 1 mL で 2 回抽出し, 酢酸エチル層を合わせて減圧乾固した。アセトニトリル-水 (4:6) 混液 0.5 mL に溶解し, これを試験溶液とし, 著者らの方法⁵⁾に従って, OTA について HPLC および LC/MS/MS で測定を行った。回収率は, 86~96% であった。

3) カカオ加工品

AOAC 991.44 の方法⁶⁾と同様の抽出を行い, クロロホルム抽出液 100 mL を 2% 炭酸水素ナトリウム水溶液 100 および 50 mL で抽出した。抽出液を合わせ塩酸で pH 2 以下に調整後, 酢酸エチル 50 mL で 2 回抽出した。抽出液を合わせて溶媒を留去し, アセトニトリル-1% リン酸水溶液 (99:1) 5 mL に溶解し, Bond Elute DEA カートリッジに負荷した。アセトニトリル-アセトン (1:1) 混液 10 mL およびメタノール-水 (4:1) 混液-酢酸 (99:1) 10 mL で洗浄後, アセトニトリル-水 (4:1) 混液-トリフルオロ酢酸 (99:1) 10 mL で溶出した。溶出液の溶媒を減圧乾固し, アセトニトリル-水 (4:6) 混液 1 mL に溶解して, これを試験溶液とし, 著者らの方法⁵⁾に従って, OTA および OTB について HPLC および LC/MS/MS で測定を行った。回収率は 87~104% であった。

5. その他のカビ毒分析法

AF: 食品衛生検査指針・理化学編・「マイコトキシン・アフラトキシン B₁, B₂, G₁, G₂・フロリジルカラム法」⁷⁾ に準じて, 定量および確認を行い, 穀類およびカカオ加工品について調査を行った。定量下限は $0.1 \mu\text{g/kg}$ である。

DON: 厚生労働省通知職安発第 0717001 号⁸⁾に従い, 麦類加工品のみについて調査を行った。定量は HPLC-UV で行い, 検出された試料については, LC/MS で確認を行った。定量下限は, 0.1 mg/kg である。

FM: AOAC 995.15⁹⁾に従い, トウモロコシ加工品のみについて調査を行った。定量は蛍光誘導体化して HPLC で行い, 検出された試料については, LC/MS で確認を行った。定量限界は, 0.01 mg/kg である。

6. コーヒー豆中 OTA の抽出液への移行試験

OTA が検出された焙煎コーヒー豆を使用し, 製品に記載されている方法に従い, コーヒー豆 25 g に 95℃ の湯を加えてペーパードリッップ方式で抽出し, 抽出液 375 mL

を採り、OTA の測定を行った。

結果および考察

1. 穀類加工品のカビ毒汚染

穀類加工品では、全試料について OTA, OTB, CIT, AF の調査を行った。また、麦類加工品については DON, トウモロコシ加工品については FM の調査も併せて行った (Table 1)。

今回調査した試料では、小麦とソバの加工品から OTA が検出された。

小麦加工品では、調査した 12 試料中 6 試料から OTA が 0.12~0.30 $\mu\text{g/kg}$ 検出された。原産国が明記されている試料は少なく、原産国不明のものが多く、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 $\mu\text{g/kg}$ 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 試料中 2 試料から OTA が 0.12 および 0.45 $\mu\text{g/kg}$ 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り、このうちの少なくとも 1 試料は、100% 国産の表示であった。

今回調査した大麦、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、OT 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 $\mu\text{g/kg}$ 検出された。

ハト麦加工品 2 試料中 1 試料から、AFB₁ が 1.1 $\mu\text{g/kg}$ 、AFB₂ が 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 検出された。

DON は、調査した麦類を含む加工品 25 試料中、小麦加工品 3 試料およびその他の穀類加工品（小麦と大麦を含むクラッカー）1 試料の合計 4 試料から 0.15~1.1 mg/kg 検出された。

今回の調査では、トウモロコシ加工品からは OT および CIT は検出されなかったが、FM は 3 試料中 2 試料から FMB₁ が 0.04 および 0.05 mg/kg、FMB₂ が 0.01 mg/kg

検出された。

2. 果実加工品のカビ毒汚染

果実加工品では、ブドウおよびカシスの加工品について OTA, OTB, および CIT の調査を行った (Table 2)。

ブドウ加工品では、レーズンの OTA 検出率が高く、13 試料中 6 試料と半数近くの試料から検出され、検出量は 0.14~0.70 $\mu\text{g/kg}$ であった。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 $\mu\text{g/kg}$ 検出された。OTA が 4.0 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ 検出されたブドウ酢（イタリアより輸入）では、OTB もそれぞれ 1.8 および 0.29 $\mu\text{g/kg}$ 検出され、OTA 量が多いと OTB も検出される傾向が認められた。

EU では、ブドウ加工品については、レーズンには 10 $\mu\text{g/kg}$ 、ワインおよびブドウ果汁ベース飲料には 2 $\mu\text{g/kg}$ の基準値を設定している³⁾。今回、OTA が 4.0 $\mu\text{g/kg}$ 検出された試料は飲料ではないが、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 $\mu\text{g/kg}$ の OTA が検出された。

今回調査した果実加工品からは CIT は検出されなかった。

3. カカオ加工品のカビ毒汚染

カカオ加工品では、カカオパウダーと調整ココアについて OTA と OTB のほかに AF の調査を行った (Table 2)。

カカオ加工品の OTA 検出率は高く、20 試料中 15 試料（検出率 75%）から 0.11~0.67 $\mu\text{g/kg}$ の OTA が検出された。そのうちの 3 試料からは 0.10~0.17 $\mu\text{g/kg}$ の OTB も検出された。AF はカカオパウダー 12 試料中 5 試料から検出された。そのうち 4 試料は、AFB₁ のみが検出されたが、1 試料は AFB₁ のほか、B₂ と G₁ も検出された。

Table 1. Ochratoxins and other mycotoxins in cereal products

Sample	No. of sample	Ochratoxins			CIT		AF		DON		FM	
		No. of positive	Range ($\mu\text{g/kg}$)		No. of positive	Range ($\mu\text{g/kg}$)	No. of positive	Range ($\mu\text{g/kg}$)	No. of positive	Range (mg/kg)	No. of positive	Range (mg/kg)
			OTA	OTB								
Wheat	12	6	0.12–0.30	<0.1	1	0.19	0	<0.1	3	0.15–1.1	—	
Barley	3	0	<0.1	<0.1	0	<0.1	0	<0.1	0	<0.1	—	
Oat	3	0	<0.1	<0.1	0	<0.1	0	<0.1	0	<0.1	—	
Rye	1	0	<0.1	<0.1	0	<0.1	0	<0.1	0	<0.1	—	
Coix seed	2	0	<0.1	<0.1	0	<0.1	1	B ₁ : 1.1, B ₂ : 0.1	—		—	
Rice	5	0	<0.1	<0.1	0	<0.1	0	<0.1	—		—	
Buckwheat	2	2	0.12, 0.45	<0.1	2	0.55, 0.62	0	<0.1	—		—	
Corn	3	0	<0.1	<0.1	0	<0.1	0	<0.1	—		2	B ₁ : 0.05, 0.04 B ₂ : 0.01,
Others*	6	0	<0.1	<0.1	0	<0.1	0	<0.1	1	0.17	—	

* Containing two or more kinds of cereals and/or other materials

—: not tested

Table 2. Ochratoxins and other mycotoxins in fruit, coffee and cacao products

Sample	No. of sample	Ochratoxins			CIT		AF	
		No. of positive	Range ($\mu\text{g/kg}$)		No. of positive	Range ($\mu\text{g/kg}$)	No. of positive	Range ($\mu\text{g/kg}$)
			OTA	OTB				
Fruit products								
Grape products								
Raisin	13	6	0.14–0.70	<0.1	0	<0.1	—	
Juice	11	1	0.11	<0.1	0	<0.1	—	
Wine	14	1	0.15	<0.1	0	<0.1	—	
Vinegar	6	1	0.80	0.29	0	<0.1	—	
Others* ¹	3	1	4.0	1.8	0	<0.1		
Cassis products								
Dry cassis	1	1	0.38	<0.1	0	<0.1	—	
Liquor	6	0	<0.1	<0.1	0	<0.1	—	
Other* ²	1	0	<0.1	<0.1	0	<0.1	—	
Cassis products								
Cacao powder	12	10	0.25, 0.67	0.10–0.17	—		5	B ₁ : 0.2–0.6, B ₂ : 0.1, G ₁ : 0.2
Cocoa	8	5	0.11–0.35	0.10	—		0	<0.1
Coffee products								
Raw coffee	10	2	0.51, 0.81	0.10	0	<0.1	—	
Roasted coffee	23	3	0.25–0.43	—	—		—	
Instant coffee	7	5	0.16–1.1	—	—		—	
Coffee drink	5	0	<0.1	—	—		—	

*¹ Grape soaked in syrup, puree and liquor*² Mixed fruit product

—: not tested

4. コーヒーのカビ毒汚染

生コーヒー豆以外の試料では OTB と CIT の回収率が低かったため、生コーヒー豆については OTA、OTB と CIT、その他の加工品については OTA について調査を行った (Table 2)。生コーヒー豆では 10 試料中 2 試料から 0.51 および 0.81 $\mu\text{g/kg}$ 、焙煎コーヒー豆では 23 試料中 3 試料

から 0.25～0.43 $\mu\text{g/kg}$ 、インスタントコーヒーでは 7 試料中 5 試料から 0.16～1.1 $\mu\text{g/kg}$ の OTA が検出された。コーヒー飲料 5 試料からは OTA は検出されなかった。

5. コーヒー浸出液への OTA の移行

OTA が検出された焙煎コーヒー豆を使用して、製品に記載されていた方法に従って、ペーパードリップで抽出し

Table 3. Extraction of OTA in roasted coffee bean by paper drip $n=3$

Sample	Concentration in bean ($\mu\text{g/kg}$) (mean $\pm$ S.D.)	Amount in bean (ng/25 g) (mean $\pm$ S.D.)	Amount in extract (ng) (mean $\pm$ S.D.)	Rate of extraction (%) (mean)
No. 1	0.43 $\pm$ 0.05	10.75 $\pm$ 1.15	3.44 $\pm$ 0.93	32.0
No. 2	0.28 $\pm$ 0.05	6.92 $\pm$ 1.26	2.55 $\pm$ 0.71	36.8

Table 4. Co-occurrence of mycotoxins

Sample	No. of sample	OTA ($\mu\text{g/kg}$)	OTB ($\mu\text{g/kg}$)	CIT ($\mu\text{g/kg}$)	AFB ₁ ($\mu\text{g/kg}$)	DON (mg/kg)
Wheat flour	12	0.30	<0.1	0.19	<0.1	0.15
		0.15	<0.1	<0.1	<0.1	0.25
Buckwheat flour	2	0.45	<0.1	0.55	<0.1	—
		0.12	<0.1	0.62	<0.1	—
Cacao powder	12	0.67	<0.1	—	0.2	—
		0.56	<0.1	—	0.2	—
		0.52	0.17	—	0.6	—
		0.34	0.10	—	0.4	—
		0.28	<0.1	—	0.3	—

—: not tested

た結果、コーヒー豆に含まれていた OTA の約 30% が浸出液に移行した (Table 3)。坪内らは、生コーヒー豆に OTA 産生菌を接種、培養して OTA 汚染させたコーヒー豆を使用して、実験室的に焙煎、抽出を行い、ほぼ全量の OTA が抽出液に移行したと報告している¹⁰⁾。今回の結果との相違の原因は、焙煎や浸出の条件により浸出液への移行率が違う¹¹⁾こと、使用した豆の OTA 汚染が培養と自然汚染で異なっていることが考えられる。

6. カビ毒の複合汚染

OTA と他のカビ毒が同時に検出された試料を Table 4 に示した。

OTA が 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 検出された小麦粉からは、0.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の CIT と 0.15 mg/kg の DON が同時に検出された。この試料の原産国は、カナダとアメリカと表示されていた。また、国産の小麦粉 1 試料からは、0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の OTA と 0.25 mg/kg の DON が検出された。

ソバ粉でも OTA と CIT が同時に検出された。*P. verrucosum* は、OT と CIT の両方を産生し¹²⁾、気温の低い地域での自然汚染に関与するといわれていることから、これらの試料の汚染の原因菌である可能性が考えられた。

カカオパウダーでは、OTA と AF の複合汚染が 12 試料中 5 試料と高頻度で認められた。

ま と め

本調査により、わが国では、穀類、果実、コーヒー、カカオと広い範囲の加工食品に 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下の低レベルで OT や CIT の汚染があることが判明した。今回の調査では、157 試料中 44 試料と、調査した試料の 28% から OTA が検出されたが、そのうち 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上検出された試料は 3 試料のみで、他の 41 試料は 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下の低レベルの汚染であった。これまで行ってきた 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上を“検出”とする調査では、OT や CIT の検出率は低かったが、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ まで測定可能となったことにより、今後、低濃度までの詳細な汚染実態を明らかにすることができると考えられる。

今回検出されたレベルは、すべて EU で設定されている規制値より低く、人に対する健康被害はないものと考えられた。

また、OT は、CIT, DON および AF との複合汚染がかなりの頻度で起こっていることが判明した。このため、2 種類以上のカビ毒による毒性面への影響を考慮する必要がある

と考えられた。

OT が検出された試料の中には 100% 国産と表示されたものもあり、DON と同様、OT についても国産の農作物に対して注意を払う必要があると考えられた。

なお、本研究は、日本食品衛生学会第 92 回学術講演会 (2006 年 10 月、愛知) において発表した。

参 考 文 献

- 1) Hosogai, Y. and Matsumoto, M. ed. “Shokuhin Anzen-sei Semina 5, Mycotoxin”, Chuo Houki Syuppan, 2002, p. 114-118. (ISBN 4-8058-2125-6)
- 2) WHO: Food Technical Report Series 906, Evaluation of Certain Mycotoxins in Food, WHO, Geneva, 2002.
- 3) EU: COMMISSION REGULATION (EC), No 123/2005, Official Journal of the European Union, L25/3-5, 2005.
- 4) FAO: “FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 81, World-wide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003”, FAO, Roma, 2004.
- 5) Tabata, S., Iida, K., Kimura, K., Iwasaki, Y., Nakazato, M., Kamata, K., Hirokado, M. Simultaneous determination of ochratoxin A, B and citrinin in foods by HPLC-FL and LC/MS/MS. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **49**, 100-105 (2008).
- 6) Trucksess, M.W. ed. “AOAC Official Methods of Analysis of AOAC International 18th ed. 2005”, AOAC International, 2005, p. 62-64.
- 7) “食品衛生検査指針 理化学編 2005”, 日本食品衛生協会, 2005, p. 562-564.
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “デオキシニバレンール試験法について” 平成 15 年 7 月 17 日, 職安発第 0717001 号 (2003).
- 9) Trucksess, M. W. ed. “AOAC Official Methods of Analysis of AOAC International 18th ed. 2005”, AOAC International, 2005, p. 49-51.
- 10) Tsubouchi, H., Yamamoto, K., Hisada, K., Sakabe, Y., Udagawa, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. Mycopathologia, **97**, 111-115 (1987).
- 11) Pérez De Obanos, A., González-Peñas, E., López De Cerain, A. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. Food Addit. Contam., **22**, 463-471 (2005).
- 12) Pitt, J. I., Hocking, A. D. “Fungi and Food Spoilage”, Aspen Publishers Inc., 1999, p. 319-322. (ISBN 0-8342-1306-0)