神奈川県衛生研究所研究報告　No. 51（2021）
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

神奈川県内に流通する国産農産物及び農産物加工品のアフラトキシン汚染実態調査

福光徹[1]，安田健一[2]

Investigation of aflatoxin contamination in domestic agricultural products and processed agricultural products retailed in Kanagawa prefecture

Toru FUKUMITSU and Kenichi YASUDA

緒言

アフラトキシンは，主に熱帯，亜熱帯地域に生息する*Aspergillus*属のカビのうち，特定の菌種が産生するカビ毒であり，強い発がん性を有する[1]．そのため，食品中のアフラトキシンについては世界各国で厳しく規制されており，日本では平成23年10月１日以降，アフラトキシンの規制がアフラトキシンB_1から総アフラトキシン（アフラトキシンB_1，B_2，G_1及びG_2の総和）に変更され，10 μg/kgを超えて検出された食品は食品衛生法違反として取り扱われることとなった[2]．

アフラトキシン産生菌は，1970年代の調査では，南西諸島以南を除き日本国内の土壌からはほとんど検出されなかったことから[3]，農産物へのアフラトキシン汚染もほとんど認められないと考えられていた．しかし，1990年代以降，関東，中部地方の土壌からも産生菌が分離されたとの報告がなされた[4-6]．また，2011年には宮崎県産の米からアフラトキシンが検出されていることから，平均気温の上昇に伴い汚染地域の拡大が懸念される．そこで，神奈川県内に流通する国産農産物及び農産物加工品におけるアフラトキシンについて分析法を検討し，汚染実態調査を実施したので報告する．

１神奈川県衛生研究所　理化学部
〒253-0087茅ヶ崎市下町屋1-3-1
２神奈川県健康医療局生活衛生部生活衛生課

方法

１．試料

神奈川県内で市販されている国産農産物及び農産物加工品38検体を用いた．原料原産地が都道府県名まで明確であること，加工品の場合は加工度が低く，単一原材料であることを条件とした．粉末，ペースト及び液体状の検体並びに砂糖類については未処理で，その他の形態の検体についてはフードミル又はフードプロセッサーにより粉砕又は細切均一化して使用した．

２．分析対象

アフラトキシンB_1，B_2，G_1及びG_2の４種とした．

３．試薬

アフラトキシン標準溶液は，Merck社（Sigma-Aldlich）製のJapanese Aflatoxin Mixture（各アフラトキシンの25 μg/mLアセトニトリル溶液）をメタノール - 水（１：１）混液で希釈して調製した．メタノール（試料抽出用）及びアセトニトリルは関東化学（株）製の残留農薬試験・PCB試験用（300倍濃縮），メタノール（標準溶液及び試験溶液調製用）は同社製のLC/MS用，ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（以下，ポリソルベート20）は富士フイルム和光純薬（株）製の化学用，酢酸アンモニウムはMerck社製のLC/MS用を用いた．イムノアフィニティカラムは，Romer社製のAflaStar Rを用いた．PBSはMerck社（Sigma-Aldlich）製のタブレットを水に溶かして用いた．水は，Merck社製Milli-Q Integral 5で精製した超純水を使用した．ガラス繊維ろ紙は東洋濾紙（株）製のGA-100（直径125 mm），ろ過用フィルターはMerck社製のマイレクス-LG（孔径0.20 μm，直径13 mm，親水性，PTFE）を用いた．

４．装置及び測定条件

LC-MS/MSはWaters社製Aquity UPLC I-class PLUS（LC）及びXevo TQ-XS（MS）を用いた．ホモジナイザーは日本精機（株）製バイオミキサーBM-2，振とう機はタイテック（株）製SR-2s，遠心分離機は久保田商事（株）製S700FRを用いた．LC-MS/MS測定条件を表１及び表２に示した．

５．試験溶液の調製

平成23年８月16日付け厚生労働省通知[7]（以下，通知）のイムノアフィニティカラムを用いた試験法に準じた方法により実施した（図１）．試料の形態や性質を考慮し，４種類（A～D）の抽出法を用いた．

６．検量線

標準溶液をメタノール - 水（１：１）混液で希釈して0.005，0.01，0.025，0.05，0.1，0.25，0.5及び1 ng/mLの検量線用混合標準溶液を調製し，絶対検量線法に

表１　LC-MS/MS測定条件

LC	
カラム	AQUITY UPLC BEH C18（Waters社） 2.1 mmI.D.×50 mm，粒子径1.7 μm
ガードカラム	AQUITY UPLC BEH C18 VanGuard Pre-column（Waters社） 2.1 mmI.D.×5 mm，粒子径1.7 μm
カラム温度	40℃
移動相	10 mM酢酸アンモニウム水溶液 - 10 mM酢酸アンモニウムメタノール溶液 （65：35）混液
流量	0.35 mL/min
注入量	3 μL
MS/MS	
キャピラリー電圧	0.6 kV
イオン源温度	150℃
脱溶媒ガス温度	500℃
コーンガス流量	150 L/hr
脱溶媒ガス流量	1,000 L/hr
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化， ポジティブモード（ESI＋）
分析モード	選択反応モニタリング（SRM）

表２　保持時間及びMS/MS条件

分析対象	保持時間（分）	Precursor ion（*m/z*）	Product ion（*m/z*）	
			定量	確認
アフラトキシンB_1	3.2	313.2	285.1	241.3
アフラトキシンB_2	2.5	315.2	287.3	259.3
アフラトキシンG_1	2.0	329.2	243.2	200.0
アフラトキシンG_2	1.6	331.2	245.2	189.2

より定量を実施した．

７．妥当性評価及び添加回収試験

本調査の検体の種類は多岐にわたるため，代表的な食品試料として米を選択し，通知に準じた妥当性評価を実施した．試料への添加濃度は各アフラトキシン1 μg/kgとし，１回５併行の添加回収試験により併行精度（RSD，目標値：20%以下）を，異なる５日における各１併行の添加回収試験により室内精度（RSD，目標値：30%以下）を評価した．合計10試行の結果をもとに，真度（回収率，目標値：70～110%）を評価した．また，添加濃度に相当する標準溶液0.5ppbと比較し，選択性（目標値：試料の妨害ピーク面積が標準溶液のピーク面積の1/10以下）を評価した．米以外の試料については，妥当性評価と同濃度で添加回収試験を実施し，回収率のみ確認した．

８．マトリックスの影響の確認

LC-MS/MS測定におけるマトリックス（試料由来成分）によるイオン化効率の影響は，マトリックスを含まない溶媒標準溶液0.5ppbに対するマトリックス添加標準溶液0.5ppbの面積比から算出した．

結果及び考察

１．分析法の検討

通知では試料50.0 gを用いるが，操作の簡便化のため，本調査では10.0 g又は5.0 gとし，抽出液量も変更して抽出法Aを構築した．また，多様な形態や性質の試料に対応するため，抽出法Aを基本として抽出法B，C及びDも構築した（図１）．

抽出法Aは粉末及びペースト状の試料に適用し，抽出法Aでは抽出が不十分と考えられる試料（細切しても粉末又はペースト状とならない野菜類等）には抽出法Bを適用した．ただし，きくいもについては，粉末状であったが，抽出液の添加により膨潤して小塊となり，抽出法Aでは試料全体に抽出液を浸透させることが困難であったことから，抽出法Bを採用した．なお，通知には「５分間ホモジナイズ又は30分間振とう」と記載されているが，抽出液の揮散が懸念されるため，抽出法Bのホモジナイズは１分間とし，その後30分間の振とうを追加した．酢以外の砂糖類には抽出法Cを適用した．これらは抽出液に溶解し，抽出液が２層に分離したことから，分取操作は困難と判断し，抽出液に溶解後，全量を８％（w/v）ポリソルベート20水溶液で希釈，定容した．液体試料（ジュース及び酢）には抽出法Dを適用した．液体試料は抽出液による抽出の必要がないと判断し，試料に直接８％（w/v）ポリソルベート20水溶液を添加し，定容した．

２．妥当性評価及び添加回収試験

添加回収試験及びマトリックスの影響の結果を表３に示した．米を用いた妥当性評価の結果は，真度105.2～111.4%，併行精度3.6%以下，室内精度7.4%以下，選択性は目標値内であった．アフラトキシンB_1における真度のみ110%を超え，目標値外となったが，農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン[8]における目標値上限の120%以下であった．また，本調査は食品衛生法への適合判定を目的としないことから，本分析法は適用可能と考えられた．なお，米の他にも回収率が110%を超えた試料が複数認められた．原因の１つとしてマトリックスの影響が考えられるが，最大でも+11.3%であり，影響を考慮する必要がないとされる±20%の範囲内[9]であった．また，いずれも回収率120%以下であり，分析結果に影響は及ぼさないと考えられた．

えごま（粒）（白えごま種子）については抽出法Aで検討したところ，回収率が低値となったため，より抽出効率が高いと考えられる抽出法Bを用いた．抽出法Bの方が回収率の改善が認められたものの，アフラトキシン

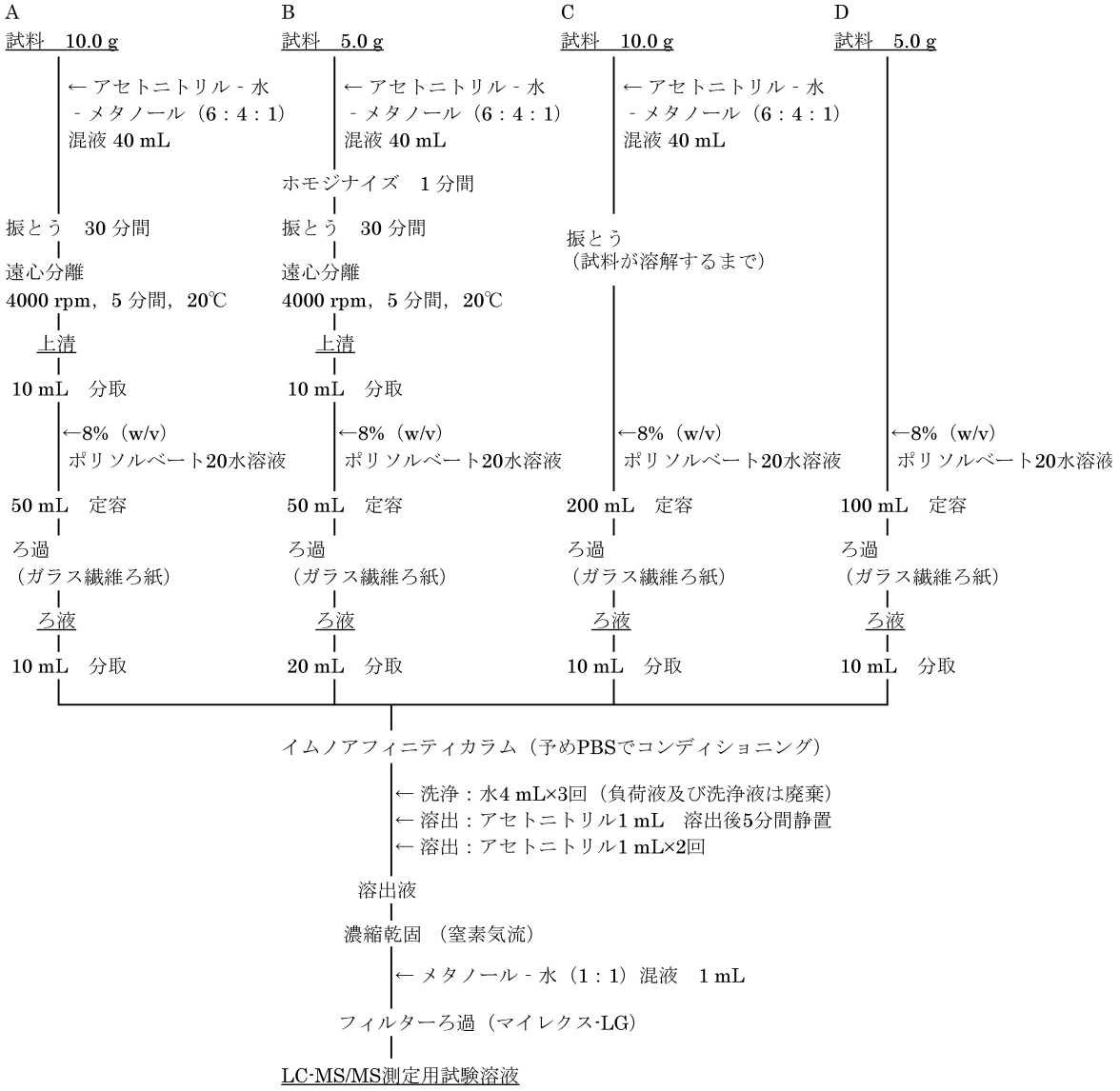

図１　試験溶液の調製方法

A：粉末，ペースト状の試料（B～D以外の試料）
B：えごま粒，野菜類（大根，きくいも，さつまいも，生姜）
C：抽出液に溶解する試料（酢以外の砂糖類）
D：液体試料（ジュース，酢）

G_1及びG_2は70%未満であった．一方，えごま（粉末）は抽出法Aで回収率70%以上であった．えごま（粉末）は，搾油後の脱脂えごまを粉末に加工した製品であり，未処理であるえごま（粒）とは成分が異なる．そのため，抽出時の挙動が異なり，回収率に違いが認められたと考えられた．

検量線はいずれも$r^2 \geqq 0.999$を満たす良好な直線性を示した．なお，汚染実態を詳細に把握するため，できる限り低濃度まで定量結果を算出することとした．各アフラトキシンにおいて標準溶液0.01ppb（試料中濃度0.02 μg/kg相当）におけるS/N比が10以上を満たしたことから，定量下限値は0.02 μg/kgとした．

３．汚染実態調査

汚染実態調査結果を表４に示した．38検体中８検体からアフラトキシンが検出されたが，総アフラトキシンとしてはいずれも規制値の1/10未満であった．

検出検体が多かったのは砂糖類であり，７検体中４検体（黒糖２検体，黒糖蜜及びざらめ糖）から検出された．このうち，黒糖蜜は総アフラトキシンとして0.96 μg/kgと比較的検出量が多かった．本調査検体の砂糖類はいずれもサトウキビが原料であった．鹿児島県の調査では，黒糖から比較的高率にアフラトキシンが検出され，その

表 3　アフラトキシン添加回収試験結果

分類[*1]	試料[*2]	抽出法[*3]	試行数（n数）	回収率[*5]（%）				マトリックスの影響[*6]（%）			
				AFB_1[*4]	AFB_2[*4]	AFG_1[*4]	AFG_2[*4]	AFB_1[*4]	AFB_2[*4]	AFG_1[*4]	AFG_2[*4]
穀類	米	A	10	111.4	109.5	105.2	106.0	1.6	0.2	1.1	–0.4
	大麦	A	1	119.7	117.5	119.0	115.2	8.4	8.2	6.0	6.2
	そば	A	2	113.5	111.3	113.0	111.2	6.5	4.6	2.2	1.3
	あわ，きび	A	2	115.5	112.4	114.7	112.5	6.0	3.7	2.8	1.5
	とうもろこし	A	1	105.1	106.0	85.2	92.4	5.1	3.9	1.9	–0.6
砂糖類	砂糖，黒糖	C	2	110.8	105.9	101.1	99.6	8.1	6.8	6.5	5.1
	さとうきび酢	D	1	107.7	104.0	105.3	105.4	9.8	6.7	7.3	3.8
種実類	ごま	A	3	94.9	94.9	79.2	83.5	2.7	1.8	0.1	–0.1
	ピーナッツ	A	2	92.7	92.4	81.2	84.1	7.6	6.6	5.8	3.2
	えごま（粉末）	A	2	76.5	74.4	78.6	80.1	1.2	–0.3	–0.2	–0.5
	えごま（粒）	A	2	71.1	76.2	32.1	44.7	7.0	4.9	4.3	2.7
		B	1	90.0	93.2	39.1	53.2	–0.9	–3.4	–1.3	–1.3
豆類	大豆	A	2	101.2	98.6	103.1	101.8	–0.4	0.1	–1.2	–3.2
	おから	A	1	99.4	98.5	70.3	72.6	6.5	3.8	0.8	0.8
野菜類	大根	B	2	113.4	108.2	107.7	104.0	2.3	–0.6	1.8	2.5
	れんこん	A	1	119.2	115.5	118.8	114.6	11.1	11.3	9.5	7.6
	きくいも	B	1	117.0	116.1	106.8	104.5	5.3	3.4	1.7	0.9
	さつまいも	B	1	109.5	109.1	99.0	97.6	7.5	7.1	4.8	4.6
	生姜	B	1	99.4	99.1	82.1	87.1	5.0	3.8	2.6	2.8
果実類	ぶどうジュース	D	1	116.4	107.5	110.1	106.6	7.7	6.0	5.6	3.9

[*1] 加工品を含む
[*2] 粉末，ペースト及び液体状以外の検体（粒状など）は，粉砕又は細切均一化して試料とした（砂糖類を除く）
[*3] 図１参照
[*4] AFB_1，AFB_2，AFG_1，AFG_2：アフラトキシンB_1，B_2，G_1，G_2
[*5] 試料への添加濃度：1 μg/kg
[*6] マトリックスの影響 ＝ （(マトリックス添加標準溶液0.5ppb面積値－ブランク試料面積値）／溶媒標準溶液0.5ppb面積値－1）×100

表 4　国産農産物及び農産物加工品のアフラトキシン汚染実態調査結果

分類[*1]	検体[*2]	原産地	検体数	検出数	抽出法[*3]	検出量（μg/kg）				
						AFB_1[*4]	AFB_2[*4]	AFG_1[*4]	AFG_2[*4]	TAF[*5]
穀類	米（粉末）	神奈川県/島根県	2	0	A					
	大麦（粒/粉末）	鹿児島県	2	0	A					
	そば（粒/粉末）	長野県/宮崎県	2	1	A	0.06				0.06
	あわ，きび（粒）	岩手県/長崎県	2	0	A					
	とうもろこし（粒）	神奈川県	1	0	A					
砂糖類	砂糖，黒糖（粉末/蜜等）	鹿児島県/沖縄県	6	4	C	0.05				0.05
						0.06				0.06
						0.10				0.10
						0.91	0.05			0.96
	さとうきび酢	鹿児島県	1	0	D					
種実類	ごま（粒）	京都府/神奈川県/宮崎県/鹿児島県	4	2	A	0.10	0.02			0.12
						0.11	0.03			0.14
	ピーナッツ（粒/ペースト）	千葉県/神奈川県	3	1	A	0.02				0.02
	えごま（粒[*6]/粉末）	宮城県/神奈川県	2	0	A/B					
豆類	大豆（粒/粉末）	愛知県/京都府	3	0	A					
	おから（乾燥）	島根県	1	0	A					
野菜類	大根（乾燥）	宮崎県	2	0	B					
	れんこん（粉末）	山口県/熊本県	2	0	A					
	きくいも（粉末）	熊本県/宮崎県	2	0	B					
	さつまいも（乾燥）	群馬県	1	0	B					
	生姜	神奈川県	1	0	B					
果実類	ぶどうジュース	福島県	1	0	D					

定量下限値：0.02 μg/kg　　空欄：定量下限値未満
[*1] 加工品を含む
[*2] 粉末，ペースト及び液体状以外の検体（粒状など）は，粉砕又は細切均一化した（砂糖類を除く）
[*3] 図１参照
[*4] AFB_1，AFB_2，AFG_1，AFG_2：アフラトキシンB_1，B_2，G_1，G_2
[*5] TAF：総アフラトキシン（AFB_1，AFB_2，AFG_1，AFG_2の総和）
[*6] 回収率を考慮しても定量下限値未満

汚染は原料サトウキビに由来することが推察されると報告している[10,11]．本調査での検出検体についても，同様に原料サトウキビに由来する可能性が考えられた．

砂糖類以外では，長野県産のそば粉，京都府及び宮崎県産のごま，千葉県産のピーナッツペーストから，ごく微量が検出された．アフラトキシン産生菌は，九州，沖縄地方だけでなく，関東，中部地方の土壌からも分離されていることから[4-6]，平均気温の上昇による産生菌の分布拡大に伴い，農産物への影響も拡大している可能性が考えられる．

まとめ

国産農産物及び農産物加工品について，アフラトキシンの分析法を検討し，汚染実態調査を行った．試料の形態や性質を考慮し，４種類の抽出法により分析を実施した．検出量は最大でも規制値の1/10未満であり，微量であったが，平均気温の上昇に伴いアフラトキシンが検出される食品の生産地域の拡大が示唆された．今後も引き続き，食品の汚染実態を調査，把握していく必要があると考える．

謝辞

本調査は令和２年度神奈川県健康医療局生活衛生部生活衛生課先行調査事業にて実施した．

本調査の企画調整，試料の選定等にご尽力くださいました神奈川県健康医療局生活衛生部生活衛生課の右田明日香氏，岩川未来氏及び内山勝博氏に深謝いたします．また，試料の分析等にご尽力くださいました神奈川県衛生研究所の桑原千雅子氏，林孝子氏，萩尾真人氏及び北出杏子氏に深謝いたします．

文献

１）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，細貝祐太郎，松本昌雄監修，pp.73-86，中央法規出版，東京（2002）

２）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて，平成23年３月31日，食安発0331第５号

３）Manabe, M. and Tsuruta, O.：Geographical distribution of aflatoxin-producing fungi inhabiting in Southeast Asia, JARQ, **12**, 224-227.（1978）

４）高橋孝則：土壌中のアフラトキシン産生菌の分布，マイコトキシン，**35**, 13-17.（1992）

５）伊藤陽子，後藤哲久：国内茶園から分離されたアスペルギルス・フラブス菌群，マイコトキシン，**40**, 52-55（1994）

６）斉藤道彦，岡崎博，田中健治，久城真代：茨城県および千葉県内の畑土壌における*Aspergillus flavus*および*A. parasiticus*の分布調査，食総研報，**72**, 77-81（2008）

７）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：総アフラトキシンの試験法について，平成23年８月16日，食安発0816第１号

８）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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の一部改正について，平成22年12月24日，食安発1224第1号

９）EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides : Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed., SANTE/12682/2019

10）岩屋あまね，下堂薗栄子，榎元清美，福司山郁恵，吉村浩三：食品中のアフラトキシン含有量調査，鹿児島県環境保健センター所報，**13**, 91-94（2012）

11）岩屋あまね，榎元清美，岩下幸二，早田理恵，早田真也，吉村浩三：県内産食品のカビ毒（アフラトキシン）汚染実態調査（第Ｉ報），鹿児島県環境保健センター所報，**14**, 41-44（2013）