

## 乳幼児用乳製品のアフラトキシンM<sub>1</sub>汚染調査

中島 正博・小山 なつみ\*・鈴木 ひかり\*\*・野口 千尋\*\*\*・濱口 温茄\*\*\*\*

### Survey of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Liquid and Powdered Infant Formulae

Masahiro NAKAJIMA, Natsumi KOYAMA, Hikari SUZUKI,  
Chihiro NOGUCHI and Nodoka HAMAGUCHI

#### 抄 録

国内で入手した乳児用液状乳30検体（国産23検体，輸入7検体）および乳幼児用粉乳15検体（国産9検体，輸入6検体）についてアフラトキシンM<sub>1</sub>（AFM<sub>1</sub>）汚染調査を行った。汚染調査に用いたAFM<sub>1</sub>試験法は、イムノアフィニティカラム精製-蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ法であり、妥当性評価試験によりその妥当性が確認された。本試験法の検出限界値および定量下限値は、それぞれ0.0004 μg/kgおよび0.001 μg/kgであった。今回調査した国産・輸入乳幼児用乳製品のすべてにおいてAFM<sub>1</sub>は検出されなかった。市販牛乳7検体についてもAFM<sub>1</sub>汚染調査を行ったところ、すべての検体からAFM<sub>1</sub>は検出されたことから、乳幼児用乳製品の原料となる牛乳はAFM<sub>1</sub>により汚染されていると考えられるが、本乳製品においては原料としての牛乳の使用量が少ないためにAFM<sub>1</sub>の検出に至らなかったと思われる。しかし、乳中のAFM<sub>1</sub>汚染は年・季節による違いが報告されていることから、今後も乳幼児製品中のAFM<sub>1</sub>汚染調査の継続が必要である。

キーワード：アフラトキシンM<sub>1</sub> aflatoxin M<sub>1</sub>, 乳幼児用液状乳 liquid infant formula, 乳幼児用粉乳 powdered infant formula, イムノアフィニティカラム immunoaffinity column, 高速液体クロマトグラフ high performance liquid chromatograph

#### 緒 言

アフラトキシン（AF）は、*Aspergillus flavus*や*A. parasiticus*などのカビが産生するカビ毒で、食品衛生上重要なAFはAFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>およびG<sub>2</sub>の4種である。これらの中でAFB<sub>1</sub>は遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質で、動物実験の結果、ほとんどの動物種に肝臓を標的器官としたがんが認められている<sup>1)</sup>。現在、わが国においては、総AF（AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>およびG<sub>2</sub>の総和）を10 μg/kgを超えて検出する食品は食品衛生法第6条第2号違反となる<sup>2)</sup>。

AFM<sub>1</sub>は、AFB<sub>1</sub>水酸化誘導体で、AFB<sub>1</sub>に汚染された飼料を摂取した動物の乳に検出されるAFB<sub>1</sub>の代謝産物である。AFM<sub>1</sub>は動物実験により、AFB<sub>1</sub>と同様に肝臓を主な標的器官として毒性や発がん性を示すことが報告されている。また、ラットを用いた発がん試験の結果、

\* 医療法人参方善さくら会, \*\* 株) マツモトキヨシ, \*\*\* 武田薬品工業(株) 光工場, \*\*\*\* 中部薬品(株) V-drug

AFM<sub>1</sub>の発がん性はAFB<sub>1</sub>の発がん性の2～10%であったことが報告されている。体重1 kg当たり1 ngのAFM<sub>1</sub>を生涯にわたり経口摂取した場合の発がん率は、AFM<sub>1</sub>とAFB<sub>1</sub>の発がんメカニズムが同等であること、及びラットにおけるAFM<sub>1</sub>の発がん性がAFB<sub>1</sub>の約1/10であることに基づき、B型肝炎ウイルス抗原 (HBsAg) 陰性者では10万人当たり1年間で0.001人、HBsAg陽性者では0.03人と推定されている<sup>3)</sup>。

日本における市販牛乳中AFM<sub>1</sub>汚染実態調査は、2001年度に厚生労働科学研究として実施され、市販牛乳208検体中207検体からAFM<sub>1</sub>が検出され、その平均濃度は0.009 µg/kg、濃度範囲は0.001～0.029 µg/kgであったことが報告されている<sup>4)</sup>。2010年度には、乳幼児用調製粉乳のAFM<sub>1</sub>汚染実態調査が行われ、108検体中36検体からAFM<sub>1</sub>が検出され、その平均濃度は0.002 µg/kg (粉末乳14 gを100 mLに溶解した調乳について)であったことが報告されている<sup>5)</sup>。これらの結果を受け、乳中AFM<sub>1</sub>が0.5 µg/kgを超える場合、食品衛生法第6条第2号に違反するものとして取り扱われることとなったが、乳幼児用乳製品はこの対象となっていない<sup>6)</sup>。

乳児用液状乳は、湯に溶かすことなく哺乳瓶への移し替えのみでそのまま乳児に与えられることが特徴で、常温保存も可能であることから、外出時の持ち運びや常備品として重宝されている製品である。そのため、近年では、災害時における乳児用液状乳の需要が高まり、日本では、2019年3月より販売が開始された。この乳児用液状乳は、育児先進国である北欧ではすでに広く普及しており、粉乳と液状乳の販売量の割合はスウェーデンではほぼ等しく、フィンランドでは液状乳が9割以上となっている<sup>7)</sup>。今後、日本においても、乳児用液状乳が広く普及することを考慮すると、粉乳と共に液状乳の安全確保における研究が必要である。

食品安全委員会は「乳中のAFM<sub>1</sub>の汚染は、合理的に達成可能な範囲でできる限り低いレベルに抑えるべきである。特に、乳幼児の単位体重当たりの乳摂取量が他の年齢層に比べて多いことに留意する必要がある。」と報告しており<sup>3)</sup>、乳幼児用乳製品のAFM<sub>1</sub>汚染調査は急務である。そこで我々は、日本国内で販売されている国産・輸入乳幼児用乳製品 (粉乳および液状乳) を入手し、それらのAFM<sub>1</sub>汚染実態調査を行ったので報告する。なお、我が国における乳幼児用液状乳におけるAFM<sub>1</sub>汚染調査は初めてである。

## 方 法

### 1. 試料

乳幼児用乳製品は、令和2年2月から10月に薬局、小売店、インターネットで購入した国産32検体 (液状乳23検体、粉乳9検体)、輸入13検体 (液状乳7検体、粉乳6検体) を試料とし、試験溶液調製時まで常温で保管した。牛乳7検体は令和2年4月に名古屋市内の小売店で購入し、試験溶液調製時まで冷蔵庫で保管した。

### 2. 試薬

AFM<sub>1</sub>標準品は、Supelco製のAflatoxin M<sub>1</sub> solution 10 µg/mLを用いた。AFM<sub>1</sub>標準品をアセトニトリルでAFM<sub>1</sub>濃度を1 µg/mLとなるように希釈し、保存用AFM<sub>1</sub>標準溶液とした。随時、保存用AFM<sub>1</sub>標準用溶液をアセトニトリルで20 ng/mLとなるように希釈し、希釈AFM<sub>1</sub>標準溶液を調製した。これらの標準溶液は褐色高気密瓶 (関東化学 (株)) に移し、冷凍庫内にて保存した。アセトニトリル (HPLC用)、酢酸アンモニウム (特級)、ヘキササン (特

級)は関東化学(株)製を用いた。酢酸(特級)、トリフルオロ酢酸(TFA, 特級)は、富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)は、Sigma-Aldrich製のPhosphate Buffered Saline Tablet 1錠を水200 mLに溶解したものをを用いた。水はミリQ(ミリポア製)で製造された超純水を用いた。0.2 mol/L酢酸アンモニウム緩衝液(pH5.0)は、酢酸アンモニウム7.7 gを水で500 mLに定容し、これに酢酸5.7 mLを500 mLに定容した水溶液240 mLを加え調製した。

### 3. 器材

イムノアフィニティカラム(IAC)は、堀場製作所製のAFLAKINGを用いた。ガラス繊維ろ紙はGEライフサイエンス(株)製Whatman 934-AH( $\phi=15$  cm)を用いた。バキュームマニールールドは、Supelco製のVISIPREP™DLを用いた。バイアルは、Supelco製Silanized Amber Screw Top Vial(4 mL容量)を使用前に20%アセトニトリル水溶液で洗浄し、乾燥させたものをを用いた。

### 4. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-FL)は、島津製作所製Prominenceシリーズを用い、測定条件は表1に示した。

試験管攪拌機は、LMS Co. LTD製MIXER UZUSIO VTX-3000Lを用いた。

アルミブロックヒーターはTAITEC製Dry ThermoUnit DTU-1CNを用いた。

表1. HPLC測定条件

カラム	: Shim-pack GWS C18, 5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm (島津製作所)
移動相	: アセトニトリル-0.2 mol/L酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) - 水 (25 : 5 : 70)
流速	: 1 mL/min
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
蛍光検出器	: 励起波長 350 nm, 蛍光波長 450 nm
注入量	: 20 $\mu$ L

### 5. 試験方法

#### (1) 試験溶液の調製方法

バキュームマニールールドにストップコックで接続したIAC内の溶液を全量流出させた後、IAC内にPBSを満たし全量を流出させ、IACのコンディショニングを行った。その後、IAC内にPBSを満たし、約半分のPBSを流出させた後、ストップコックを閉め、リザーバーをIACに連結した。

液状乳および牛乳は、ガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液20.0 gを正確に量り採り試料溶液とした。粉乳は、試料5.0 gをビーカーに正確に量り採り、約50 $^{\circ}$ Cに加温した水を約30 mL加え、ガラス棒にてよく攪はんし、約20分間超音波処理を行い溶解後、水で50 mLに定容し、よく混合

した。その後、ガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液20.0 mL (粉乳2.0 g 相当) を正確に測り、試料溶液とした。試料溶液20.0 g (粉乳は20.0 mL) をリザーバーに移し、1～2滴/秒の流速で通液し、流出液は廃棄した。リザーバーを外し、IACを水で満たし排出させる操作を5回繰り返し、IACを洗浄後、洗浄液を廃棄した。リザーバーアダプターを取り付けた注射器を用いてIAC上部から通気し、IACのゲル内の水を排出させた。次いでIACをバキュームマニホールドから取り外しバイアル上にセットした。アセトニトリル1 mLをIAC内に添加し、自然落下で流出させた後、5分間放置した。再度アセトニトリル1 mLをIAC内に添加し、自然落下で流出させた。連続して同様な操作をもう一度行った (計3 mLの溶出)。リザーバーアダプターを取り付けた注射器を用いてIAC上部から通気し、IACのゲル内のアセトニトリルをバイアル内に排出させた。45℃に調整したアルミブロックヒーターにバイアルを移し、穏やかな窒素気流下でアセトニトリルを除去し、乾固させた。このバイアルにアセトニトリル-水 (1 : 4) 溶液1.0 mLを加え、試験管攪拌機を用いてよく混合し、試験溶液とした。試験溶液20  $\mu$ LをHPLCに注入し、AFM<sub>1</sub>を検出・定量した。

#### (2) AFM<sub>1</sub> 確認試験

AFM<sub>1</sub>の確認は中島ら<sup>8)</sup>の方法に従って行った。すなわち、試験溶液500  $\mu$ Lを新しいバイアルに移し、窒素気流下で溶媒を蒸発乾固させた。これにヘキササン200  $\mu$ LおよびTFA 50  $\mu$ Lを加え、密栓後よく混合し、45℃で20分間加温した。その後、窒素気流下で溶媒を蒸発乾固させ、アセトニトリル-水 (1 : 4) 溶液0.5 mLを加え、試験管攪拌機を用いてよく混合し、試験溶液とした。

#### (3) AFM<sub>1</sub> 試験法の妥当性評価試験

AFM<sub>1</sub>が不検出であることをあらかじめ確認した液状乳を試料とした。AFM<sub>1</sub>添加濃度を0.05  $\mu$ g/kg, 0.005  $\mu$ g/kgの2濃度とし、1日2併行分析を5日間実施した。一元配置分散分析により、真度、併行精度および室内精度を算出した。総アフラトキシンの通知試験法<sup>9)</sup>では各性能パラメーターの目標値として、真度 (%) 70～110, 併行精度 (%) 20 $\geq$ , 室内精度 (%) 30 $\geq$ が示されており、この目標値を参考に本試験法の妥当性評価を行った。

#### (4) 検出限界値および定量下限値の算出

AFM<sub>1</sub>が不検出であることをあらかじめ確認した液状乳を試料とし、AFM<sub>1</sub>添加濃度を、0.005  $\mu$ g/kgとして7回繰り返し測定し、得られた測定結果の標準偏差から次式に従って、検出限界値 (LOD) および定量下限値 (LOQ) を算出した。

$$\text{LOD} : 2 \times t (n-1, 0.05) \times \text{標準偏差}$$

$$t (n-1, 0.05); \text{自由度 } n-1 \text{ のときの危険率 } 5 \% \text{ (片側) の } t \text{ 値 (1.9432)}$$

$$\text{LOQ} : 10 \times \text{標準偏差}$$

#### (5) 検量線

室温に戻した希釈AFM<sub>1</sub>標準溶液5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ Lをそれぞれバイアルに採り、45℃に調整したアルミブロックヒーターを用いて窒素気流下で蒸発乾固させた。残留物にアセトニトリル-水 (1 : 4) 溶液1.0 mLを加え、試験管攪拌機を用いてよく混合し、検量線用標準溶液とした (各AFM<sub>1</sub>濃度 : 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 ng/mL)。これらの検量線用標準溶液20  $\mu$ LをHPLC-FLに注入し、得られたピーク面積より検量線を作成した。

## 結果および考察

## 1. 検量線

AFM<sub>1</sub>の検量線は、0.1 ng/mL～2.0 ng/mLの範囲で $r^2 = 0.999$ 以上の良好な直線性が認められた(図1)。

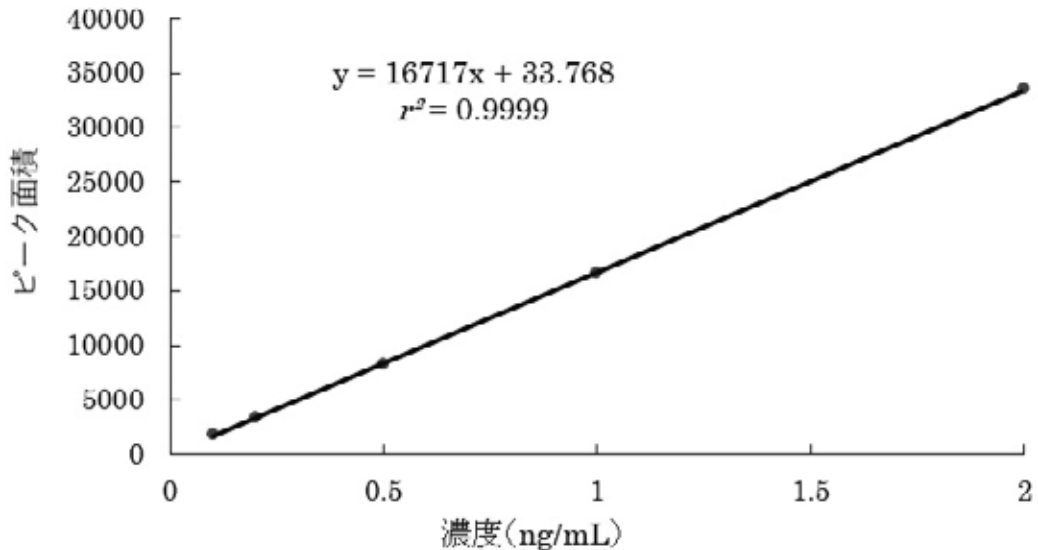


図1. AFM<sub>1</sub>の検量線

## 2. 検出限界値 (LOD) および定量下限値 (LOQ)

AFM<sub>1</sub>試験法のLODおよびLOQは、それぞれ0.0004 μg/kgおよび0.001 μg/kgであり、乳中のAFM<sub>1</sub>汚染調査用の試験法として十分な感度を有していることが判明した。

## 3. 妥当性評価試験結果

AFM<sub>1</sub>試験法の妥当性を評価するため、食品中に残留する農薬等に関する試験法のガイドライン<sup>10)</sup>に従い、1日2併行5日間実施する枝分かれ試験を、国産液状乳を代表的な試料として実施した。AFM<sub>1</sub>を0.05 μg/kgおよび0.005 μg/kgの2濃度を添加し、得られた測定値から、それぞれの真度(回収率)は91.5%および108.6%、併行精度は2.5%および10.3%、室内精度は3.4%および7.6%と推定された(表2)。これらの推定値が通知試験法で示されている真度、併行精度および室内精度の目標値を満たしたことから、AFM<sub>1</sub>試験法の妥当性が確認された。

表2. 妥当性評価試験結果

添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目			
0.05	90.9	90.6	93.8	93.1	90.3	91.5	2.5	3.4
	92.3	84.0	93.4	94.4	92.3			
0.005	118.5	117.4	115.0	103.0	100.8	108.6	10.3	7.6
	104.5	99.8	96.0	117.0	114.1			

#### 4. 市販牛乳および乳幼児用乳製品のAFM<sub>1</sub>汚染調査結果

妥当性を確認した試験法により汚染調査を実施した。乳幼児用乳製品の原料として牛乳が使用されている。そこで、令和2年4月時点で名古屋市内に流通していた牛乳中のAFM<sub>1</sub>濃度を調査したところ、7検体中7検体すべてからAFM<sub>1</sub>が検出され、その含有量は0.002~0.003  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、規制値0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった(表3)。これらの汚染濃度は、以前の報告とほぼ同様であり、本調査時においても牛乳がAFM<sub>1</sub>に汚染されていることが推定された。なお、市販牛乳中AFM<sub>1</sub>のクロマトグラムを図2に示した。

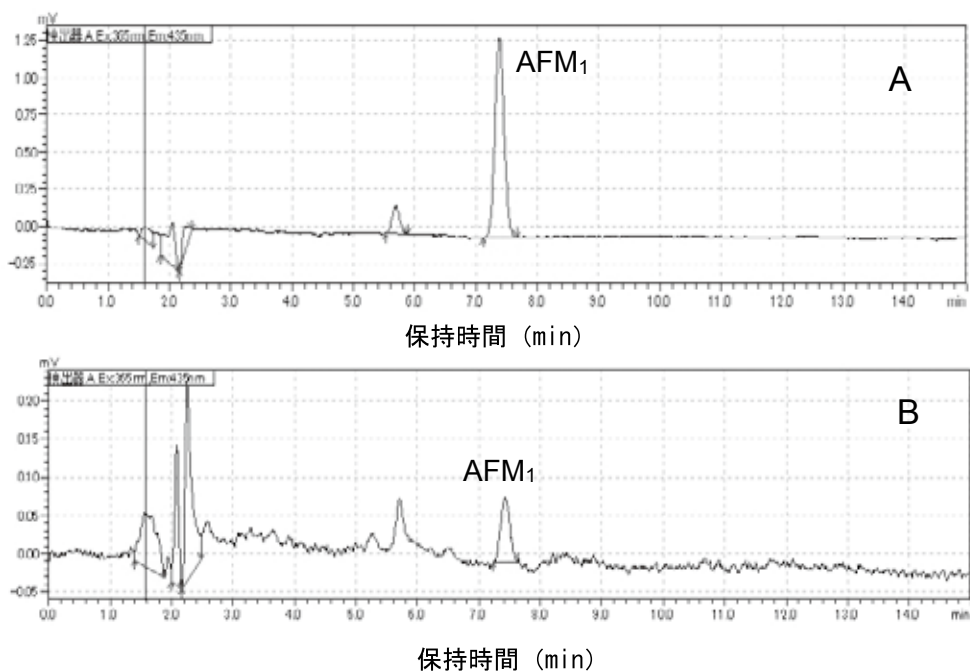


図2. AFM<sub>1</sub>のクロマトグラム

A : 標準溶液 (1 ng/mL), B : 市販牛乳中AFM<sub>1</sub> (0.002  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

表3. 市販牛乳中AFM<sub>1</sub>濃度

試料 No.	AFM <sub>1</sub> 濃度 (μg/kg) *
1	0.002
2	0.003
3	0.002
4	0.003
5	0.003
6	0.003
7	0.002

\* LOQ : 0.001 μg/kg

表4. 乳児用乳製品中AFM<sub>1</sub>汚染調査結果

		検査試料数	AFM <sub>1</sub> 検出数
国産	液状乳	23	0*
	粉乳	9	0
輸入	液状乳	7	0
	粉乳	6	0
合計		45	0

\* LOQ : 0.001 μg/kg 以上

次に、国産・輸入乳幼児用乳製品について汚染調査を実施したところ、国産32検体および輸入13検体、全ての液状乳、粉乳からAFM<sub>1</sub>は検出されなかった（表4）。原料として使用される牛乳においてはAFM<sub>1</sub>が検出されたが、今回調査した全ての乳製品からAFM<sub>1</sub>が検出されなかった原因として、原料としての牛乳の使用量が少ないために、本試験法での検出限界未満であったと考えられる。

今回の調査では、乳幼児用乳製品からはAFM<sub>1</sub>は検出されずその安全性が確認されたが、乳中のAFM<sub>1</sub>汚染は、年・季節による違いが報告されており、今後も乳幼児用乳製品の中のAFM<sub>1</sub>汚染調査の継続が必要である。

なお、今回の調査において輸入液状乳3検体からAFM<sub>1</sub>の保持時間に近いピークが検出された（図3矢印）。そこで、中島らの方法を用いてAFM<sub>1</sub>の確認を行った。すなわち、試料溶液をTFA処理後、AFM<sub>1</sub>ピークの消失とAFM<sub>2a</sub>（AFM<sub>1</sub>ヘミアセタール体）ピークの出現（図4-B）によりAFM<sub>1</sub>の確認を行った。その結果、TFA処理により、AFM<sub>1</sub>と思われるピークは消失せず、AFM<sub>2a</sub>のピークは出現しなかった（図4-C）。したがって、AFM<sub>1</sub>と思われるピークはAFM<sub>1</sub>でないことが判明した。精製能力の高いIAC法において、このような疑似ピークが出現することは珍しく、輸入液状乳中にはIAC内の抗AFM<sub>1</sub>抗体に結合し、かつAFM<sub>1</sub>の保持時間と近い化学物質が存在していると考えられた。このような化学物質を同定するためには、精密質量を測定することが可能なLC-MS/MS等を用いた分析が必要である。

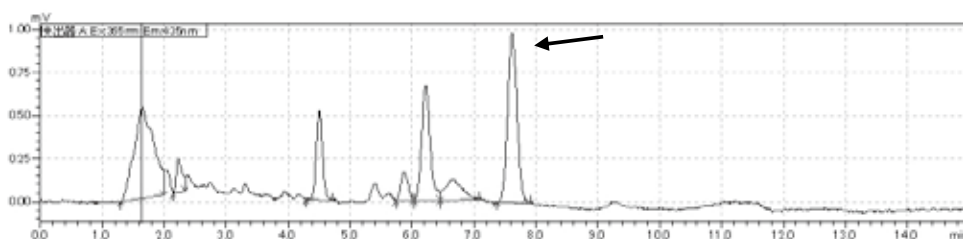


図3. 輸入液状乳のクロマトグラム

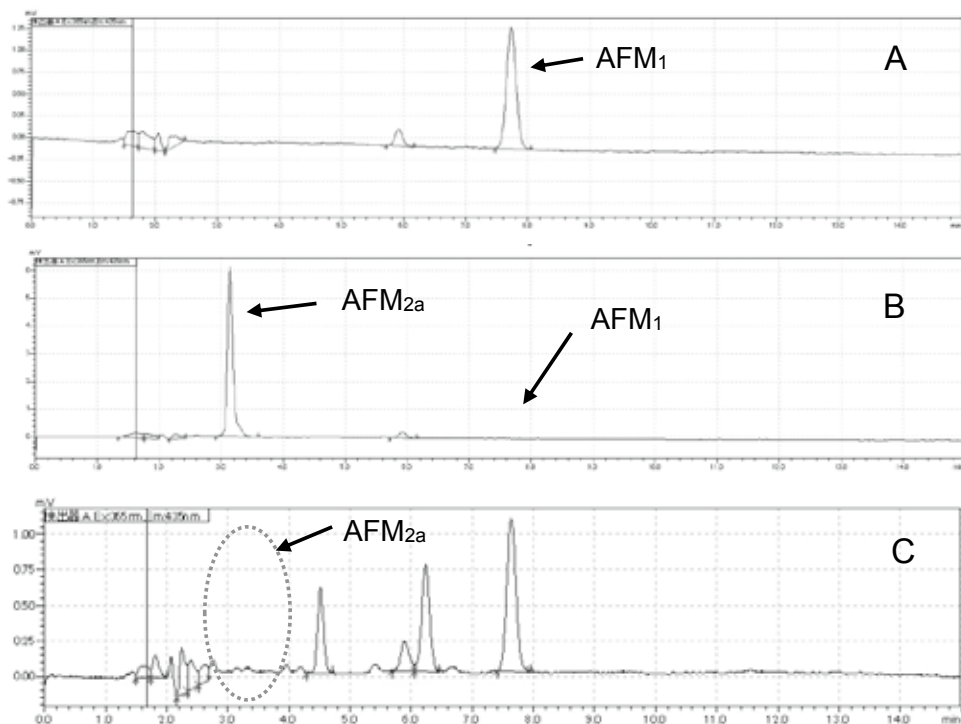


図4. AFM<sub>1</sub>のTFAによる確認  
 A : AFM<sub>1</sub>標準溶液 (1 ng/ml)  
 B : AFM<sub>1</sub>のTFA処理によるAFM<sub>1</sub>ピークの消失とAFM<sub>2a</sub>ピークの生成  
 C : 輸入液状乳中AFM<sub>1</sub>疑似ピークの確認

## 謝 辞

本研究は、「名古屋女子大学平成31年度教育・基盤研究助成費」により実施したものである。

## 引用文献

- 1) かび毒評価書, 総アフラトキシン (アフラトキシンB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>およびG<sub>2</sub>), 食品安全委員会 (2009)
- 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”, 食安発0331第5号 (2011)
- 3) かび毒評価書, 乳中のアフラトキシンM<sub>1</sub>及び飼料中のアフラトキシンB<sub>1</sub>, 食品安全委員会 (2013)
- 4) Nakajima, M., Tabata, S., Akiyama, H., Itoh, Y., Tanaka, T., Sunagawa, H., Tyonan, T., Yoshizawa, T. and S. Kumagai, S.: Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in domestic milk in Japan during the winter season. Food Addit. Contam., 21, 472-478 (2004)
- 5) 小西良子: 食品中のカビ毒に係る試験検査-アフラトキシンM<sub>1</sub>-, 平成22年度食品・添加物等規格基準に関する試験検査等 (2010)
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“乳に含まれるアフラトキシンM<sub>1</sub>の取扱いについて”, 食安発0723第1号 (2015)
- 7) 日本初の液体ミルクについてもっと知りたい! 製品開発を進めるGlico 研究員にインタビュー, <https://www.glico.com/jp/health/contents/ekitaimilk/> (2021年7月現在)



- 8) Nakajima, M., Taniguchi, M. : Methods of analysis for aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products. JSM Mycotoxins, **64**, 167-176 (2014)
- 9) 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”, 食安発0816第2号 (2011)
- 10) 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”, 食安発1224第1号 (2010)

## Abstract

A total of 45 samples of domestic and imported liquid and powdered infant formulae were analyzed for aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>). Each sample was cleaned up by using an immunoaffinity column, and AFM<sub>1</sub> was determined by high-performance liquid chromatograph with fluorescence detection. The limit of detection and quantitation of the method were 0.0004 µg/kg and 0.001 µg/kg, respectively. For the infant formula sample spiked at 0.05 and 0.005 µg/kg levels, recoveries were 91.5 and 108.6%, respectively. The repeatability relative standard deviations were 2.5% and 10.3%, respectively. The reproducibility relative standard deviations were 3.4% and 7.6%, respectively. No AFM<sub>1</sub> was detected in all samples, however, the additional surveys over the long term will be required, because the AFM<sub>1</sub> level in milk varies from season to season and year to year.

