

中国, インドネシアとベトナムの市販焙煎およびインスタントコーヒーの オクラトキシンAとB汚染調査

方 夏燕・ Dao Nhat Quang・ Arum Baasithu・ 川村 理

Occurrence of ochratoxin A and B in roasted and instant coffee from China, Indonesia and Vietnam

Fang Xia-Yan, Dao Nhat Quang, Arum Baasithu and Osamu Kawamura

Abstract

Roasted coffee and instant coffee sold in China, Indonesia and Vietnam were investigated for contamination with ochratoxins. In the case of roasted coffee, ochratoxin A (OTA) was detected in 3 samples (9.7%) of Chinese commercial products, and the average value of all samples was 0.024 $\mu\text{g}/\text{kg}$. OTA was detected in 1 sample (3.3%) of the Indonesian marketed product, and the mean value of all samples was 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In Vietnam, it was detected in 10 OTA samples (31.3%), with an average value of 0.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for all samples. None of the samples exceeded the OTA EU regulation value of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In the case of instant coffee, OTA was detected in 7 samples (36.8%) of Chinese commercial products, and the average value of all samples was 0.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$. OTA was detected in 11 samples (26.7%) of Indonesian marketed products, and the mean value of all samples was 0.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In Vietnam, OTA was detected in 14 samples (46.7%), with an average value of 0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for all samples. None of the samples exceeded the EU regulation value of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for OTA instant coffee. Based on the above, the level of contamination with ochratoxins commercially available in these countries was low and the risk was low. These results suggest that the contamination level of ochratoxin marketed in these countries is low and the risk is low.

Key words : ochratoxin A, ochratoxin B, China, Vietnam, Indonesia, roasted coffee, instant coffee

緒 言

オクラトキシンA (ochratoxin A, OTA) は, *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*や*Penicillium verrucosum*などのカビが産生するマイコトキシンで, 麦類を中心とした穀物やその加工品, コーヒー, ココア, ビール, ワインなどを汚染する腎毒性や腎発がん性を有する⁽¹⁾. また, オクラトキシンB (OTB) は, OTAの脱クロル体であり, OTAよりは毒性が弱いながら同様に肝臓・腎臓障害などの毒性を有している⁽²⁾. 我々は, OTAとOTBを同程度認識するモノクローナル抗体を作製⁽³⁾し, 日本国内市販のコーヒー製品やタイ市販の焙煎コーヒーとインスタントコーヒーおよびベトナム市販の焙煎コーヒーのOTAとOTBの汚染調査を行ってきた^(4,5). そこで, 中国, インドネシア, ベトナム市販の焙煎とインスタントコーヒーのオ

クラトキシンAおよびB汚染調査をイムノアフィニティーカラム (immunoaffinity column, IAC) -HPLC法で行った.

方 法

試薬類

オクラトキシンA (OTA) とオクラトキシンB (OTB) 標準液は, シグマ-アルドリッチ ジャパン合同会社から購入した. その他の試薬は富士フイルム和光純薬 (株) の特級を使用した.

2015年に中国国内市販焙煎コーヒー31検体, 杭州市とその周辺のスーパーマーケット等でインスタントコーヒー19検体を購入した. 2016年にインドネシアのジョグジャカルタ周辺と通信販売店から購入した焙煎コーヒー30検体とインスタントコーヒー30検体とベトナムの焙煎

コーヒー27検体とインスタントコーヒー30検体はハノイ近郊で購入し実験に用いた。

焙煎とインスタントコーヒー中のOTAとBの測定

川村らの方法⁽⁴⁾で行った。すなわち、粉碎し、微粉末にした焙煎コーヒー10 gを市販のコーヒーフィルターに取り、市販のコーヒーメーカーEUPA（ユーパ）TSK-191A（水容器一体型ドリップ式）を用いて蒸留水140 mLで抽出した。抽出液36 mLに5% NaHCO₃を4 mLを加えてpH 7.3に調整した。ガラス繊維ろ紙（ADVANTEC GA-55）でろ過した溶液をサンプル溶液とした。

ムロマックカラムSに抗体結合ゲルを0.3 mL充填し、ダルベッコのリン酸緩衝生理食水（PBS）10 mLで平衡化を行い、サンプル溶液を10 mL負荷させた。PBS 10 mLでゲルを洗浄後、メタノール3 mLで溶出し、通気させて溶出液を完全にカラムから除去させて試験管に分取した。溶出液は減圧乾固した後、40%アセトニトリル0.5 mLで再溶解し、HPLC分析を行った。HPLCはいずれも（株）島津製作所のシステムコントローラー（SCL-10A_{VP}）、送液ユニット（LC-20AD）、オートインジェクター（SIL-20A_{HT}）、カラムオープン（CTO-10A）、蛍光検出器（RF-20A_{XS}）とカラム（Shim-pack XR-ODS, 3.0 mm i.d.×100 mm）を用い、移動相には、アセトニトリル：水：酢酸（40：58：2, v/v/v）を使用し、注入量は75 µL、流速は0.5 mL/min、カラム温度は50℃、波長は335 nm（励起）、465 nm（蛍光）で行った。

インスタントコーヒー5 gに約80 mLの1% NaHCO₃を加え溶解後、超音波を15分間かけた後、30分間攪拌した。1% NaHCO₃を加え100 mLにメスアップした。混和後、3,000 rpmで15分間遠心し、上清を等量のPBSで希釈した後、ガラス繊維ろ紙（ADVANTEC AG-55）でろ過し、サンプル溶液とした。以下は、焙煎コーヒーと同様に操作した。

結果および考察

焙煎コーヒー

中国で市販されていた焙煎コーヒーでは31検体の3検体（9.7%）でOTAが検出された。検出限界以下の検体を検出限界の1/2（0.008 µg/kg）として計算した全検体平均値は0.024 µg/kgであった。OTBは2検体（6.4%）で検出され、は全検体平均値は0.017 µg/kgであった（表1）。インドネシア市販の焙煎コーヒー32検体を分析した結果、OTAは1検体（3.3%）から検出され、全検体検体平均値は0.06 µg/kgであった。OTBは2検体（6.7%）から検出され、全検体検体平均値は0.06 µg/kgであった

（表1）。ベトナムで市販されていた焙煎コーヒーの分析の結果、OTAの10検体（31.3%）から検出され、全検体の平均値は0.09 µg/kgであった。OTBは15検体（46.9%）から検出され、全検体平均値は0.09 µg/kgであった。ベトナムで市販されていた焙煎コーヒーの汚染頻度は高かったが統計的有意差はなかった。OTAのEU規制値の5 µg/kgを超えている検体はなかった。以上のことから、これらの国で市販されていた焙煎コーヒーのOTsの汚染は低レベルでリスクはかなり低いと考えられた。

インスタントコーヒー

中国で市販されていたインスタントコーヒーでは19検体の7検体（36.8%）でOTAが検出された。全検体平均値は0.53 µg/kgであった。OTBは検出されなかった（表2）。インドネシア市販のインスタントコーヒー30検体を分析した結果、OTAは11検体（26.7%）から検出され、全検体検体平均値は0.12 µg/kgであった。OTBは2検体（6.7%）から検出され、全検体検体平均値は0.06 µg/kgであった（表2）。ベトナムで市販されていた焙煎コーヒーの分析の結果、OTAの14検体（46.7%）から検出され、全検体平均値は0.45 µg/kgであった。OTBは12検体（40.0%）から検出され、全検体平均値は0.14 µg/kgであった。ベトナムで市販されていたインスタントコーヒーのOTA汚染頻度は高かった。OTAに関しては統計的有意差はなかった。また、OTAのインスタントコーヒーのEU規制値の10 µg/kgを超えている検体はなかった。以上のことから、これらの国で市販されていたインスタントコーヒーのOTsの汚染は低レベルでリスクは低いと考えられた。

摘 要

中国、インドネシア、ベトナム市販の焙煎およびインスタントコーヒーのオクラトキシン類の汚染調査を行った。焙煎コーヒーの場合、中国市販品の3検体（9.7%）でオクラトキシンA（OTA）OTAが検出され、全検体平均値は0.024 µg/kgであった。インドネシア市販品ではOTAは1検体（3.3%）から検出され、全検体検体平均値は0.06 µg/kgであった。ベトナムの市販品ではOTAの10検体（31.3%）から検出され、全検体の平均値は0.09 µg/kgであった。OTAのEU規制値の5 µg/kgを超えている検体はなかった。インスタントコーヒーの場合、中国市販品の7検体（36.8%）でOTAが検出され、全検体平均値は0.53 µg/kgであった。インドネシア市販品は、OTAは11検体（26.7%）から検出され、全検体検体平均値は0.12 µg/kgであった。ベトナム市販品では、OTAの

14検体（46.7%）から検出され、全検体平均値は0.45 µg/kgであった。OTAのインスタントコーヒーのEU規制値の10 µg/kgを超えている検体はなかった。以上のこと

から、これらの国で市販されていたオクラトキシン類の汚染は低レベルでリスクは低いと考えられた。

表1 中国、インドネシア、ベトナム市販の焙煎コーヒーの分析結果

中国			インドネシア			ベトナム		
検体番号	OTA (µg/mL)	OTB (µg/mL)	検体番号	OTA (µg/mL)	OTB (µg/mL)	検体番号	OTA (µg/mL)	OTB (µg/mL)
15CRC01	ND	ND	IRC1601	0.21	0.33	VRC16001	0.20	0.14
15CRC02	ND	ND	IRC1602	ND	ND	VRC16002	ND	ND
15CRC03	ND	ND	IRC1603	ND	ND	VRC16003	0.20	ND
15CRC04	ND	ND	IRC1604	ND	ND	VRC16004	0.17	ND
15CRC05	ND	ND	IRC1605	ND	0.19	VRC16005	ND	ND
15CRC06	ND	ND	IRC1606	ND	ND	VRC16006	0.19	0.13
15CRC07	ND	ND	IRC1607	ND	ND	VRC16007	ND	ND
15CRC08	ND	ND	IRC1608	ND	ND	VRC16008	ND	ND
15CRC09	ND	ND	IRC1609	ND	ND	VRC16009	ND	0.12
15CRC10	ND	ND	IRC1610	ND	ND	VRC16010	0.19	0.18
15CRC11	0.12	ND	IRC1611	ND	ND	VRC16011	ND	0.14
15CRC12	ND	ND	IRC1612	ND	ND	VRC16012	0.19	0.15
15CRC13	ND	ND	IRC1613	ND	ND	VRC16013	0.18	ND
15CRC14	ND	ND	IRC1614	ND	ND	VRC16014	0.22	0.20
15CRC15	ND	ND	IRC1615	ND	ND	VRC16015	0.17	ND
15CRC16	ND	ND	IRC1616	ND	ND	VRC16016	0.19	0.15
15CRC17	ND	0.20	IRC1617	ND	ND	VRC16017	ND	0.11
15CRC18	ND	ND	IRC1618	ND	ND	VRC16018	ND	ND
15CRC19	0.14	ND	IRC1619	ND	ND	VRC16019	ND	ND
15CRC20	ND	ND	IRC1620	ND	ND	VRC16020	ND	ND
15CRC21	ND	ND	IRC1621	ND	ND	VRC16021	ND	0.09
15CRC22	ND	ND	IRC1622	ND	ND	VRC16022	ND	0.12
15CRC23	ND	ND	IRC1623	ND	ND	VRC16023	ND	0.15
15CRC24	ND	ND	IRC1624	ND	ND	VRC16024	ND	0.14
15CRC25	ND	ND	IRC1625	ND	ND	VRC16025	ND	ND
15CRC26	ND	ND	IRC1626	ND	ND	VRC16026	ND	ND
15CRC27	ND	ND	IRC1627	ND	ND	VRC16027	ND	ND
15CRC28	ND	ND	IRC1628	ND	ND	VRC16028	ND	ND
15CRC29	ND	ND	IRC1629	ND	ND	VRC16029	ND	ND
15CRC30	0.28	0.09	IRC1630	ND	ND	VRC16030	ND	ND
15CRC31	ND	ND				VRC16031	ND	0.16
						VRC16032	ND	0.18
陽性数	3	2		1	2		10	15
陽性率	9.7%	6.4%		3.3%	6.7%		31.3%	46.9%
陽性検体平均	0.18	0.14		0.21	0.26		0.19	0.14
全検体平均	0.02	0.02		0.06	0.06		0.09	0.09

ND：検出限界（0.016 µg/kg）未満

全ての平均値；NDは検出限界の1/2=0.008 µg/kgとして計算

表2 中国, インドネシア, ベトナム市販のインスタントコーヒーの分析結果

検体番号	中国		インドネシア			ベトナム		
	OTA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OTB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	検体番号	OTA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OTB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	検体番号	OTA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OTB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
15CIC01	ND	ND	IIC1601	0.11	ND	VIC16001	0.72	0.75
15CIC02	ND	ND	IIC1602	ND	ND	VIC16002	0.39	0.43
15CIC03	0.08	ND	IIC1603	ND	ND	VIC16003	0.30	0.33
15CIC04	0.15	ND	IIC1604	ND	ND	VIC16004	0.20	ND
15CIC05	0.24	ND	IIC1605	0.29	ND	VIC16005	0.20	ND
15CIC06	ND	ND	IIC1606	0.42	ND	VIC16006	ND	ND
15CIC07	ND	ND	IIC1607	0.31	0.10	VIC16007	ND	ND
15CIC08	ND	ND	IIC1608	0.22	ND	VIC16008	ND	ND
15CIC09	0.09	ND	IIC1609	0.20	ND	VIC16009	ND	ND
15CIC10	ND	ND	IIC1610	0.20	ND	VIC16010	ND	ND
15CIC11	ND	ND	IIC1611	0.29	ND	VIC16011	ND	ND
15CIC12	ND	ND	IIC1612	ND	ND	VIC16012	ND	ND
15CIC13	ND	ND	IIC1613	ND	ND	VIC16013	1.45	0.29
15CIC14	0.19	ND	IIC1614	ND	ND	VIC16014	ND	ND
15CIC15	0.16	ND	IIC1615	0.10	ND	VIC16015	ND	ND
15CIC16	0.13	ND	IIC1616	ND	ND	VIC16016	ND	ND
15CIC17	ND	ND	IIC1617	ND	ND	VIC16017	ND	ND
15CIC18	ND	ND	IIC1618	ND	ND	VIC16018	0.06	0.09
15CIC19	ND	ND	IIC1619	0.49	0.36	VIC16019	0.18	0.07
			IIC1620	ND	ND	VIC16020	1.22	0.25
			IIC1621	0.11	ND	VIC16021	0.17	ND
			IIC1622	ND	ND	VIC16022	ND	ND
			IIC1623	ND	ND	VIC16023	ND	ND
			IIC1624	ND	ND	VIC16024	0.49	0.19
			IIC1625	ND	ND	VIC16025	0.61	0.18
			IIC1626	ND	ND	VIC16026	0.24	0.18
			IIC1627	ND	ND	VIC16027	ND	ND
			IIC1628	ND	ND	VIC16028	ND	ND
			IIC1629	ND	ND	VIC16029	0.08	ND
			IIC1630	ND	ND	VIC16030	ND	ND
陽性数	7	0		11	2		14	12
陽性率	36.8%	-		36.7%	6.7%		46.7%	40.0%
陽性検体平均	1.03	-		0.25	0.23		0.45	0.14
全検体平均	0.53	-		0.12	0.06		0.24	0.13

ND: 検出限界 (0.016 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 未満

全ての平均値: NDは検出限界の1/2=0.008 $\mu\text{g}/\text{kg}$ として計算

引用文献

- (1) 本山聖子, 小山典子: オクラトキシンAのリスク評価, *JSM Mycotoxins* 66, 31-35 (2016).
- (2) Heussner, A.H., Dietrich, D.R., O'Brien, E.: *In vitro* investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. *Toxicol. In Vitro*, 20, 332-341 (2006).
- (3) 川村 理, 鈴木祐介: オクラトキシンBに対するモノクローナル抗体の作製, 香川大学農学部学術報告 65, 25-28 (2013).
- (4) 川村 理, 鈴木祐介, 佐々木絢子: イムノアフィニティーカラム-HPLC法による国内市販コーヒー製品のオクラトキシンAとBの汚染調査, 香川大学農学部学術報告, 67, 47-53 (2015).
- (5) Wongworapat, K., Mi Huynh Tu Ho, Soontornjanagit, M., Kawamura, O.: Occurrence of ochratoxin A and ochratoxin B in commercial coffee in Vietnam and Thailand. *JSM Mycotoxins*, 66, 1-6, (2016).