

## インドネシア・ジョグジャカルタの鶏飼料のアフラトキシン類とオクラトキシンAの汚染調査

Lucia Sinta Triosanti・川村 理

### Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in Chicken Feeds from Yogyakarta, Indonesia

Lucia Sinta Triosanti and Osamu Kawamura

#### Abstract

Natural co-occurrence of aflatoxins (AFs) and ochratoxin A (OTA) in 50 of layer feed and 50 of broiler feeds in Yogyakarta, Indonesia was investigated by immunoaffinity column-HPLC method. As the results, it was confirmed that AFs were contaminated with 83% and OTA with 91%, and were frequently contaminated with these mycotoxins. AFs were detected from 45 (90%) of 50 layer feeds. The average of total AFs was 21.4 µg/kg, and the maximum was 46.3 µg/kg. Twenty-four layer feeds (48%) exceeded the EU regulation. However, only 2 layer feeds (4%) exceeded the Indonesian regulation. AFs were detected in 38 (78%) of 50 broiler feeds, and the average of total AFs was 10.5 µg/kg, with a maximum of 33.5 µg/kg. Two broiler feeds (4%) exceeded the EU regulation. OTA was detected in 48 (96%) of layer feeds (average was 2.6 µg/kg, maximum was 65.2 µg/kg) and 43 (86%) of broiler feeds (average was 0.9 µg/kg, maximum was 3.3 µg/kg). No samples exceeded the EU regulation. This is the first report of OTA contamination of chicken feed in Indonesia. From these results, chicken feeds in Yogyakarta, Indonesia were frequently contaminated with AFs and OTA, but these was not so dangerous level. It is considered necessary to continuously monitor AFs and OTA contamination in the future.

Key words : aflatoxins, ochratoxin A, layer feed, broiler feed, Yogyakarta, Indonesia, immunoaffinity column

#### 緒 言

インドネシアの人口の約87%がイスラム教徒であり、豚肉が摂取できないので、鶏肉と鶏卵がインドネシアにおいて重要な蛋白源である。一方、インドネシアは赤道直下に位置し、高温多湿でカビが繁殖しやすい気象の地域であるので、鶏飼料やその原料でカビが繁殖し、アフラトキシン類 (aflatoxins, AFs)<sup>(1)</sup> などのマイコトキシン汚染があることが報告されている<sup>(2-3)</sup>。AFsは、*Aspergillus flavus* や *A. parasiticus* などによって生産される、強い毒性と発がん性を有する食品衛生上最も重要なマイコトキシンである<sup>(1)</sup>。図1に示したAFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>とAFG<sub>2</sub>が主要なAFsである。これらが飼料に混入した場合、乳製品や食肉に移行し、畜産物を汚染することが知られている<sup>(4)</sup>。また、AFs飼料汚染により、成長抑止や鶏卵生産性の低下などの経時的損失についても知られている。インドネシアの鶏飼料のAFs汚染の報告はある

が、腎毒性や腎発がん性を有し、穀物やその加工品などを汚染するオクラトキシンA (ochratoxin A, OTA, 図1)<sup>(5)</sup>の報告はない。そこで、インドネシア・ジョグジャカルタの鶏飼料 (採卵鶏用50検体とブロイラー用50検体) のアフラトキシン類とオクラトキシンAとの同時汚染についてイムノアフィニティーカラム (immunoaffinity column, IAC) - HPLC法で調査した。

#### 方 法

##### 試験試料

2016年にインドネシア・ジョグジャカルタで使用されていた採卵鶏用飼料 (Starter 15検体, Grower15検体, Producer 20検体) 50検体とブロイラー用飼料 (Starter 15検体, Grower15検体, Producer 20検体) 50検体をそれぞれ収集し、微粉末に粉碎し、分析まで-18℃で保存し

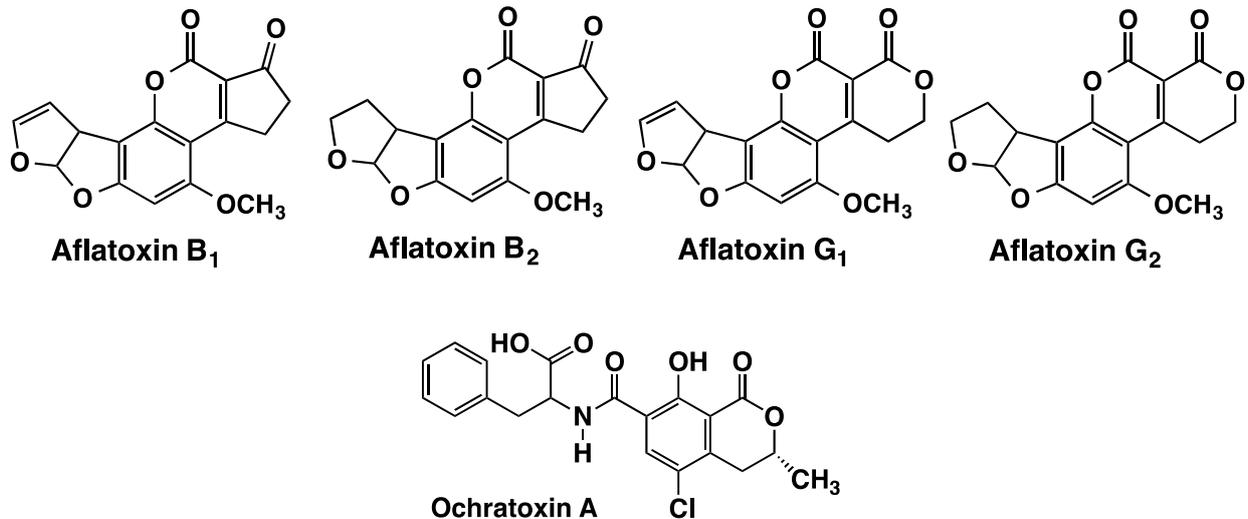


図1 アフラトキシン類とオクラトキシンAの構造式

た。

#### 試薬類

AF類標準品は、アフラトキシン混合標準液 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 各25 µg/mlアセトニトリル溶液, 富士フィルム和光純薬(株)) を適宜希釈して用いた。OTAとOTB標準液は、10 µg/mlアセトニトリル溶液 (Sigma-Aldrich) を適宜希釈して用いた。HPLC移動相には、HPLC用メタノールとアセトニトリル (富士フィルム和光純薬(株)) を用いた。他の試薬は富士フィルム和光純薬(株)の特級試薬を用いた。

#### アフラトキシン類の分析

Kikuchiらの方法<sup>6)</sup>に準拠して行った。すなわち、粉碎試料10 gに2 gのNaClと50 mLのメタノール：水 (7:3, v/v) 加え、30分間振とう抽出を行った。ろ過 (Advantec No.5C) 後、蒸留水で3倍希釈し、ガラス繊維ろ紙 (Advantec GA-55) でろ過した。このろ液10 mLをAFS.6抗体 (抗AFモノクローナル抗体) 結合ゲルを0.3 mL詰めたIAC負荷した。カラムはダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 5 mLで洗浄後、さらに5 mLの蒸留水で洗浄した。AFsは、2 mLのメタノールで溶出した。溶出液は2 mLの蒸留水で希釈後、10 µLを注入し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-10AVP), 送液ユニット (LC-20AD), オートインジェクター (SIL-20AHT), カラムオープン (CTO-10A), 蛍光検出器 (RF-20AXS) とカラム (Shim-pack XR-ODS, 3.0 mm×100 mm) を用い、移動相には、水：アセトニトリル：メタノール (60:30:

10, v/v/v) を使用し、流速は0.5 mL/min, カラム温度は50°C, 波長は365 nm (励起), 465 nm (蛍光) で行った。

#### オクラトキシンAの分析

Mhlongo<sup>7)</sup>らの方法で行った。粉碎試料10 gに2 gのNaClと50 mLのメタノール：1%炭酸水素ナトリウム水溶液 (7+3, v/v) 加え、30分間振とう抽出を行った。ろ過 (Advantec No.5C) 後、蒸留水で3倍希釈し、ガラス繊維ろ紙 (Advantec GA-55) でろ過した。このろ液10 mLをOTB.2抗体 (抗OTAモノクローナル抗体) 結合ゲルを0.3 mL詰めたIAC負荷した。カラムは10 mLのPBSで洗浄後、OTAは、3 mLのメタノールで溶出した。溶出液は減圧乾固、10 µLを注入しHPLCで分析した。HPLCはアフラトキシン類の分析を同じものを使用し、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、流速は0.5 mL/min, カラム温度は50°C, 波長は335 nm (励起), 465 nm (蛍光) で行った。

#### 添加回収実験

粉碎試料にAF類とOTAが0.5と2.5 µg/kgになるようにAFまたはOTA標準液を添加し、上記の方法で抽出、IACでのクリーンアップ後、HPLCで定量した。

### 結果および考察

#### 添加回収実験

アフラトキシン類とOTAの鶏飼料へ添加回収実験の結果を表1に示した。アフラトキシン類の回収率は85.9~94.5%であり、SDもAFG<sub>1</sub>が11.8と14.6%でややおき

表1 アフラトキシン類とオクラトキシンAの鶏飼料へ添加回収実験の結果

Spiked AFs ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery $\pm$ SD (%) (n = 5)				Spiked OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery $\pm$ SD (%) (n=3)	
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>		OTA	
2.5	92.4 $\pm$ 4.6	94.5 $\pm$ 5.1	94.2 $\pm$ 11.8	93.1 $\pm$ 6.3	2.5	84.0 $\pm$ 4.0	
5	87.6 $\pm$ 5.7	90.2 $\pm$ 4.7	85.9 $\pm$ 14.6	88.6 $\pm$ 5.8	5	83.8 $\pm$ 2.9	

表2 ジョグジャカルタの鶏飼料のアフラトキシン汚染

飼料		検体数	陽性数	陽性率 (%)	AFB <sub>1</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		総AFs ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
					平均 $\pm$ SD	範囲	平均 $\pm$ SD	範囲
					産卵鶏用	Starter	15	14
	Grower	15	14	93.3%	20.7 $\pm$ 21.9	3.9–63.0	23.1 $\pm$ 25.3	0.1–74.5
	Producer	20	17	85.0%	15.4 $\pm$ 9.8	4.1–34.1	17.1 $\pm$ 13.3	0.0–37.5
	合計	50	45	90.0%	19.6 $\pm$ 14.5	0.8–63.0	21.4 $\pm$ 17.3	0.0–74.5
ブロイラー用	Starter	15	15	100.0%	12.4 $\pm$ 7.3	6.9–30.7	13.7 $\pm$ 8.2	7.5–33.5
	Grower	15	5	33.3%	8.3 $\pm$ 3.6	1.7–11.1	9.0 $\pm$ 3.8	1.9–12.5
	Producer	20	19	95.0%	8.7 $\pm$ 7.3	2.3–31.9	9.3 $\pm$ 8.1	0.4–33.0
	合計	50	38	76.0%	9.7 $\pm$ 6.5	1.7–31.9	10.5 $\pm$ 7.3	0.4–33.5

かったが、他は4～6%台であり概ね良好であった。OTAの場合も回収率は約84%であり、SDも2.9と4.0%で良好な結果であった。

#### ジョグジャカルタの鶏飼料のアフラトキシン汚染

ジョグジャカルタの鶏飼料のアフラトキシン汚染結果を表2に示した。産卵鶏用飼料の50検体中45検体(90%)からAFsが牽出された。AFB<sub>1</sub>の平均値は19.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、最高値は63.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。総AFs (AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>とG<sub>2</sub>の合計量)の平均値は21.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、最高値は46.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。EUの鶏用飼料中の総AFsの規制値は20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、24検体(48%)が基準超過であった。また、インドネシアの鶏用飼料中の総AFsの規制値は50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、基準超過は2検体(4%)であった。Starter, Grower, Producer間での有意な差は認められなかった。

ブロイラー用飼料の50検体中38検体(78%)からAFsが検出された。AFB<sub>1</sub>の平均値は9.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、最高値は31.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。総AFsの平均値は10.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、最高値は33.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。全体的に卵鶏用飼料より汚染率と濃度は低かったが統計的に優位差は無かった。ただし、ブロイラー用Grower飼料の汚染率は33.3%と他の何れの群より有意に低かった。しかし、この理由是不明確であり、今後の継続的モニタリングが必要であると考えられた。StarterとProducer間での有意な差は認められなかった。EUの鶏用飼料中の基準超過した検体は2検体(4%)あったが、インドネシアの規制値を超え

た検体はなかった。

Martindahら(2015)の報告<sup>(3)</sup>では、インドネシア・ボゴールでの卵鶏用飼料の91%からAFsが平均3.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大82.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ が検出され、ブロイラー用飼料では、83%からAFsが平均7.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大39.44  $\mu\text{g}/\text{kg}$ が検出された。我々の結果と比較すると卵鶏用飼料の平均値が我々の約1/4であるが、概ね大きな差は無かった。

#### ジョグジャカルタの鶏飼料のオクラトキシンA汚染

ジョグジャカルタの鶏飼料のOTA汚染の結果を表3に示した。産卵鶏用飼料では、48検体(96%)からOTAが検出された。平均値は2.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、最高値は65.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。ブロイラー用飼料では、43検体(86%)からOTAが検出された。平均値は0.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、最高値は3.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。何れ群間においても有意差は認められなかった。また、EUの鶏用飼料中の基準超過した検体はなかった。この報告は、インドネシアの鶏飼料OTA汚染の初めての報告である。

また、OTA汚染とAFs汚染との関連性について検討した。全検体でのOTA汚染濃度(y軸)とAFs汚染濃度(x軸)の近似直線は $y = 0.046x + 1.311$ ,  $R^2 = 0.0065$ であり、OTA汚染が特に高かった65.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 汚染検体を除いた場合(図2)も $y = 0.0203x + 0.7866$ ,  $R^2 = 0.0487$ でほとんど相関性は認められなかった。

以上の結果から、インドネシア・ジョグジャカルタの鶏飼料は、AFsに83%、OTAに91%に汚染されており、

表3 ジョグジャカルタの鶏飼料のオクラトキシンA汚染

飼料	検体数	陽性数	陽性率 (%)	OTA (μg/kg)		
				平均 ± SD	範囲	
産卵鶏用	Starter	15	15	100.0%	1.7 ± 1.1	0.5 - 4.9
	Grower	15	15	100.0%	0.9 ± 0.9	0.4 - 4.4
	Producer	20	18	90.0%	5.3 ± 15.1	0.4 - 65.2
	合計	50	48	96.0%	2.9 ± 9.3	0.4 - 65.2
ブロイラー用	Starter	15	11	73.3%	1.0 ± 1.2	0.3 - 4.5
	Grower	15	15	100.0%	0.6 ± 0.1	0.4 - 0.9
	Producer	20	17	85.0%	1.1 ± 0.7	0.4 - 3.3
	合計	50	43	86.0%	0.9 ± 0.8	0.3 - 3.3

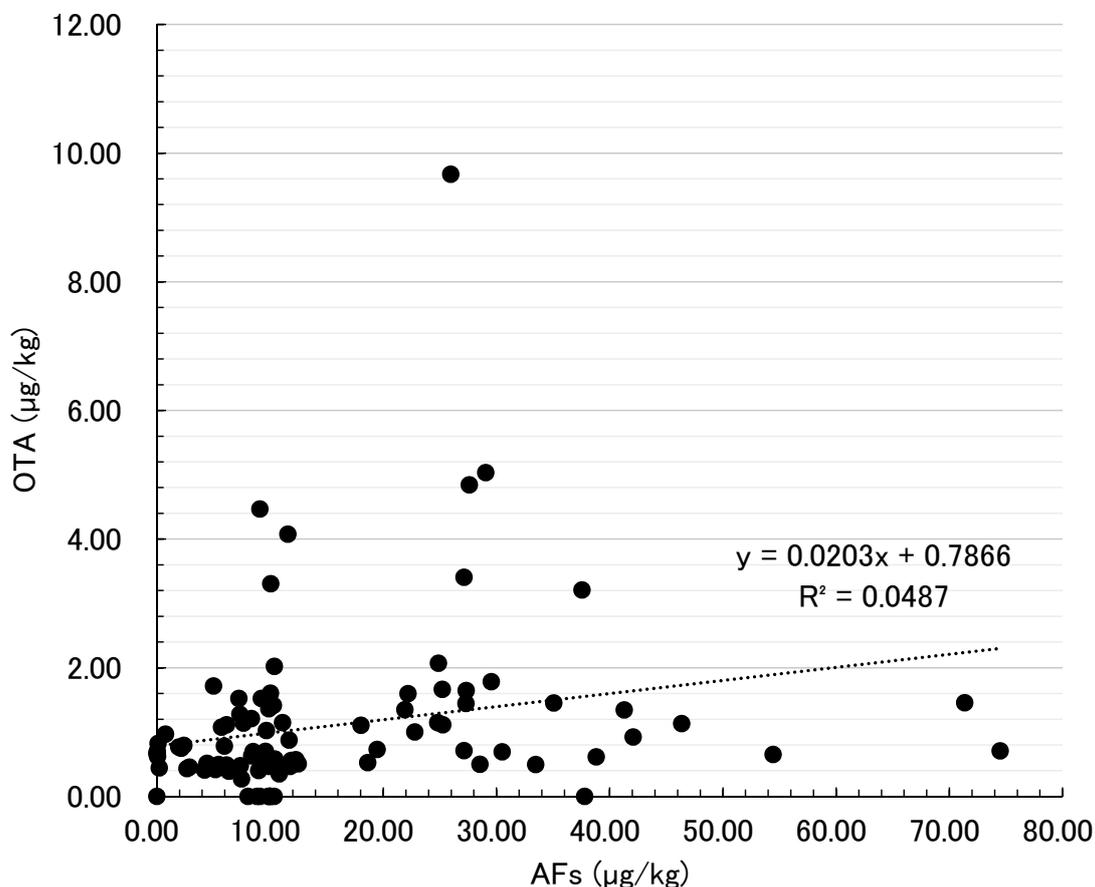


図2 AFsとOTA汚染濃度の相関性  
OTA汚染が特に高かった65.2 μg/kg汚染検体を除いた結果

高頻度にマイコトキシンに汚染されていることを確認した。これらの飼料で、OTAのEU基準超過している検体はなく、ブロイラー用飼料では2検体（4%）がEU基準超過であった。しかし、産卵鶏用飼料の48%がEUの基準値を超過していた。産卵鶏用飼料の2検体（4%）がインドネシアの基準値を超過していた。すなわち、インドネシア・ジョグジャカルタの鶏飼料は高頻度にマイコト

キシン汚染しているが、直ちに危険なレベルであるとは考えにくい。今後、継続的なAFs汚染のモニタリングが必要と考えられた。

#### 摘 要

インドネシア・ジョグジャカルタの鶏飼料（採卵鶏用

50検体とブロイラー用50検体)のAFsとOTAとの同時汚染についてイムノアフィニティーカラム-HPLC法で調査した。その結果、AFsに83%、OTAに91%に汚染されており、高頻度にマイコトキシンに汚染されていることを確認した。産卵鶏用飼料の50検体中45検体(90%)からAFsが検出され総AFsの平均値は21.4 µg/kgであり、最高値は46.3 µg/kgであった。24検体(48%)がEUの基準超過であった。ブロイラー用飼料の50検体中38検体(78%)からAFsが検出され、総AFsの平均値は10.5 µg/kgであり、最高値は33.5 µg/kgであった。EUの鶏用飼料中の基準超過した検体は2検体(4%)あった。しかし、インド

ネシアの基準値を超過していたのは産卵鶏用飼料の2検体(4%)だけであった。OTAは、産卵鶏用飼料で48検体(96%)から検出(平均値2.6 µg/kg, 最高値65.2 µg/kg)され、ブロイラー用飼料で43検体(86%)で検出(平均値0.9 µg/kg, 最高値3.3 µg/kg)された。EUの鶏用飼料中の基準超過した検体はなかった。これはインドネシアの鶏飼料OTA汚染の初めての報告である。以上の結果から、インドネシア・ジョグジャカルタの鶏飼料は高頻度にマイコトキシン汚染しているが、直ちに危険なレベルであるとは考えにくい。今後、継続的なAFs汚染のモニタリングが必要と考えられた。

## 引用文献

- (1) Benkerroum, N: Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17, 423 (2020).
- (2) Bahri, S., Maryam, R., & Widiastuti, R.: Aflatoxin contamination in feeds and feed ingredients from Lampung and East Java provinces. *Indonesian Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 10, 236-241 (2005).
- (3) Martindah, A., Maryam, R., Wahyuwardani, S., & Widiyanti, P.M.: Preliminary epidemiological study of Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination on poultry feeds. *Prosiding Seminar Nasioal Teknologi Peternakan dan Veteriner*, 525-531 (2015).
- (4) 食品安全委員会 かび毒・自然毒等専門調査会：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>. 23-39 (2013年7月).
- (5) 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 (1), 31-35 (2016).
- (6) Bagatin Artur Kikuchi, Elisabete Hiromi Hashimoto, Elisa Yoko Hirooka, 川村理：ブラジルのトウモロコシ及び鶏用飼料のアフラトキシン汚染調査とそのリスク評価, *香川大学農学部学術報告* 68, 25-31 (2016).
- (7) Xolani Nkosikhona Mhlongo, 川村理：イムノアフィニティーカラム-HPLC法を用いた南アフリカ市販食品のアフラトキシンとオクラトキシンの汚染調査, *香川大学農学部学術報告* 70, 7-13 (2018).

