

市販牛乳および中国と日本市販粉ミルクのアフラトキシンM₁汚染の汚染調査

李 一帆・川村 理

Occurrence of aflatoxin M₁ in commercial liquid milk and powdered milk from China and Japan

Li Yi-Fan and Osamu Kawamura

Abstract

Aflatoxin M₁ (AFM₁), which contaminated dairy products, was hepatocarcinogenic mycotoxins. Strict regulation values were set. We have established a method for analyzing AFM₁ in milk and powdered milk by performing clean-up with an anti-aflatoxin monoclonal antibody, named AFS.6, antibody-bound immunofinity column and quantifying by HPLC. Using this method, 31 samples of dairy milk in Kagawa and 17 samples of powdered milk in China and 7 samples of powdered milk in Kagawa were analyzed. In milk, AFM₁ above the detection limit was detected in 23 (74.2%) of 31 samples, with an average of 0.0069 µg/kg and a maximum contamination of 0.0161 µg/kg. Both AFM₁ contamination frequency and concentration were slightly lower than the 2008-09 survey results. In powdered milk, 0.065 and 0.053 µg/kg of AFM₁ were detected in 2 samples (11.8%) of powdered milk marketed in China. These contamination concentrations were below the Chinese regulation value, but beyond EU regulation. This results were compared with the 1994 survey results, the positive rate, positive mean and maximum contamination concentration were significantly reduced. AFM₁ was not detected in infant formula marketed in Kagawa Prefecture.

Key words : aflatoxin M₁, milk, powdered milk, China, immunoaffinity column

緒 言

アフラトキシンM₁ (aflatoxin M₁, AFM₁) は、アフラトキシンB₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) を摂取した哺乳動物の肝臓中で代謝され、乳汁中へ移行することが知られている (図1)。AFB₁は強力な肝発がん性物質として知られているが、AFM₁はAFB₁の1/10程度の発がん性があり、国際がん研究所 (International Agency for Research on Cancer, IARC) は、AFM₁をグループ2B (ヒトに対する発がん性が疑われる (Possibly Carcinogenic) 化学物質など) に分類している⁽¹⁾。乳製品は乳児の主要な食品であるため、これを汚染する発がん性のAFM₁の規制値は、マイコトキシンのかなで最も厳しい値が設定されている。日本、中国、アメリカやコーデックス委員会などでは0.5 µg/kg、EUでは乳製品で0.05 µg/kg、乳児用調製乳などで0.025 µg/kgが設定されている。

我々は2008-9年に香川県内の市販牛乳131検体のAFM₁の汚染調査をおこなった結果、すべての検体から平均

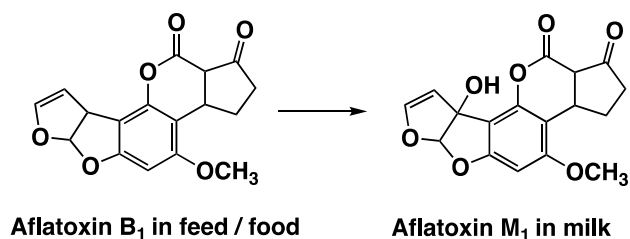


図1 アフラトキシンB₁とM₁の構造式

0.009 µg/kg (最大0.025 µg/kg) のAFM₁を検出した⁽²⁾が、最近の香川県内の市販牛乳の汚染実態は不明である。また、1994年に中国の粉ミルク26検体を収集しAFM₁を測定した結果、21検体が陽性で平均0.103 µg/kg (最大0.464 µg/kg) のAFM₁を検出した⁽³⁾。しかし、近年の中国の粉ミルク汚染実態は不明である。そこで、近年の乳製品のAFM₁汚染調査のために2019年1月-3月に香川県内で市販されていた牛乳および加工乳を31検体及び中国杭州周辺で2018年12月に市販されていた粉ミルク17検体とその

対象として2019年4月に香川県内で市販されていた粉ミルク7検体のAFM₁の汚染調査を我々が新たに樹立した抗アフラトキシン抗体AFS.6抗体⁽⁴⁾を結合させたイムノアフィニティーカラム-HPLC法で行った。

方 法

イムノアフィニティーカラム (immunoaffinity column, IAC) の作製

抗アフラトキシン抗体AFS.6抗体⁽⁴⁾生産ハイブリドーマをHybridoma-SFM培地 (Gibco) で大量培養した。培養上清中の抗体はプロテインGで精製した。マレイミド活性化ゲルであるアフィゲル10 (Bio-Rad) 1mLあたりの精製AFS.6抗体量が4 mgになるように結合させた。この抗体結合ゲルは0.1% NaN₃を含むダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 (以下PBS) に懸濁して4℃で保存した。ムロマックカラムS (室町化学工業 (株)) に抗体結合ゲル0.3 mLを詰め、IACを作製した。

IACの性能確認

AFS.6抗体はカビが生産する主要なアフラトキシンであるAFB₁, AFB₂, AFG₁とAFG₂と結合できることは確認してあるが、AFM₁との反応性は不明確であった。そこで、AFM₁標準液 (富士フィルム和光純薬 (株)) をPBSで0.020, 0.010と0.005 ng/mLに希釈し、IACに負荷して回収できるかの確認を行った。まず、作成したIACに10 mLのPBSを流し、平衡化を行った。次に、10 mLのPBSで希釈したAFM₁標準液を負荷した。次に、PBSで5 mL、次いで蒸留水で5 mLでカラムを洗浄した。最後に2 mLのメタノールとアセトニトリルの1:1の混合液を加え、AFM₁をポリプロピレン製チューブに溶出させた。この溶出液に2 mLの蒸留水を加え希釈した。この希釈液の50 µLを以下の条件でHPLC分析した。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, 粒子径 2.2 µm) を用い、移動相には、水:アセトニトリル:メタノール (70:15:15, v/v/v) を使用し、流速は0.4 mL/min, カラム温度は50℃, 励起波長360 nm, 蛍光波長430 nmで行った。

牛乳中のAFM₁の分析

牛乳を20 mLを50 mLの遠心チューブに入れ、200 rpmで30分の振とうした後、3,000 rpmで20分の遠心を行った。分離した上層の脂肪層を取り除いた後、この溶液を

ガラス繊維ろ紙 (ADVANTEC GA55) ろ過後、さらにガラス繊維ろ紙 (ADVANTEC GA200) でろ過した。このろ過液10 mLをIACでクリーンアップし、HPLC分析を行った。

粉ミルク中のAFM₁の分析

Soontornjanagitらの方法⁽⁵⁾に準じ、一部改良し抽出した。すなわち、2.5 gの粉ミルクに1gの塩化ナトリウムと50℃に加温した16.5 mLの蒸留水を加え、30分間200 rpmで振とうした。3,000 rpmで20分の遠心し、上層の脂肪層を取り除き、沈殿を含まない中間層 (上清) をガラス繊維ろ紙GA-55ろ過後、さらにGA-200でろ過した。このろ過液10 mLをIACに負荷し、IACでクリーンアップし、HPLC分析を行った。

結果および考察

IACの性能確認

AFS.6抗体結合IACがAFM₁を保持できるかについて実験を行った結果、AFM₁濃度0.02, 0.01と0.005 ng/mL添加PBSでの回収率±SD (n=3) はそれぞれ、95.3±0.7%, 98.2±0.3%と99.5±0.1%と良好であり、AFS.6抗体結合IACがAFM₁の分析にも利用できることを確認した。

添加回収実験

牛乳と粉ミルクでの添加回収実験の結果を表1に示した。牛乳では、100.9~104.9%と回収率は良好でバラツキも少なかった。粉ミルクでは、85.6~93.9%で回収率は概ね良好でバラツキも少なかった。分析の妥当性を確認できたので、牛乳と粉ミルクの分析を行った。

市販牛乳中のAFM₁汚染調査

香川県内で市販されていた牛乳中のAFM₁汚染調査をおこなった結果を表2に示した。検出限界 (S/N>3) は0.002 µg/kg, 定量限界 (S/N>10) は0.006 µg/kgであった。表2で検出限界以上で定量限界以下の場合はTr (痕跡) と表示した。31検体中23検体 (74.2%) から検出限界以上のAFM₁が検出され、全検体平均値は0.0069 µg/kg, 最

表1 AFM₁の添加回収実験の結果

検体	AFM ₁ 添加濃度 (µg/kg)	回収率±SD (%)
牛乳	0.05	100.9±0.6
	0.5	104.9±0.8
粉ミルク	0.1	93.9±2.3
	0.5	85.6±0.2

大汚染値は0.0161 µg/kgであった。なお、全検体平均値は検出限界以下は0 µg/kg、検出限界以上で定量限界以下の場合はその中間値0.04 µg/kgとして計算した。最も厳しいEUの乳児用食品の規制値0.025 µg/kgを上回る検体なかった。

以前、2008-9年に香川県内で市販されていた牛乳131検体中のAFM₁の分析を行った結果、すべての検体が陽性（100%）で平均0.0089 µg/kg、最大汚染値は0.025 µg/kgであった。この結果と比較すると、陽性率、平均濃度と最大汚染濃度ともに若干低下していた。乳牛用飼料中

のAFB₁汚染が以前より若干改善されている可能性が示唆された。

中国の市販粉ミルク中のAFM₁汚染調査

中国浙江省で市販されていた粉ミルクと対象として香川県内で市販されていた粉ミルク中のAFM₁汚染調査をおこなった結果を表3に示した。検出限界（S/N>3）は

表3 中国及び日本で市販されていた粉ミルク中のAFM₁汚染

中国で市販されていた粉ミルク		日本で市販されていた粉ミルク	
検体番号	AFM ₁ 濃度 (µg/kg)	検体番号	AFM ₁ 濃度 (µg/kg)
CPM-01	ND	JPM-1	ND
CPM-02	0.065	JPM-2	ND
CPM-03	ND	JPM-3	ND
CPM-04	ND	JPM-4	ND
CPM-05	ND	JPM-5	ND
CPM-06	0.053	JPM-6	ND
CPM-07	ND	JPM-7	ND
CPM-08	ND		
CPM-09	ND		
CPM-10	ND		
CPM-11	ND		
CPM-12	ND		
CPM-13	ND		
CPM-14	ND		
CPM-15	ND		
CPM-16	ND		
CPM-17	ND		
陽性検体平均値		0.059	-
全検体平均値*		0.007	-

ND: 検出限界以下 (<0.002 µg/kg)
*全検体平均値はNDを0µg/kgとして計算した。

表2 市販牛乳（日本）中のAFM₁の汚染

検体番号	AFM ₁ 濃度 (µg/kg)	検体番号	AFM ₁ 濃度 (µg/kg)
NG-01	0.0105	NG-17	Tr
NG-02	Tr	NG-18	Tr
NG-03	Tr	NG-19	0.0086
NG-04	Tr	NG-20	Tr
NG-05	Tr	NG-21	Tr
NG-06	ND	NG-22	0.0157
NG-07	Tr	NG-23	Tr
NG-08	Tr	NG-24	0.0102
NG-09	ND	NG-25	0.0108
NG-10	Tr	NG-26	0.0099
NG-11	0.0161	NG-27	0.0109
NG-12	ND	NG-28	Tr
NG-13	ND	NG-29	ND
NG-14	0.0098	NG-30	ND
NG-15	Tr	NG-31	ND
NG-16	ND	全検体平均値*	0.0069

ND: 検出限界以下 (<0.002 µg/kg)
Tr: 痕跡 = 検出限界以上定量限界以下 (0.002~0.006 µg/kg)
*全検体平均値は、NDは0µg/kg、Trは 0.04 µg/kgとして計算した。

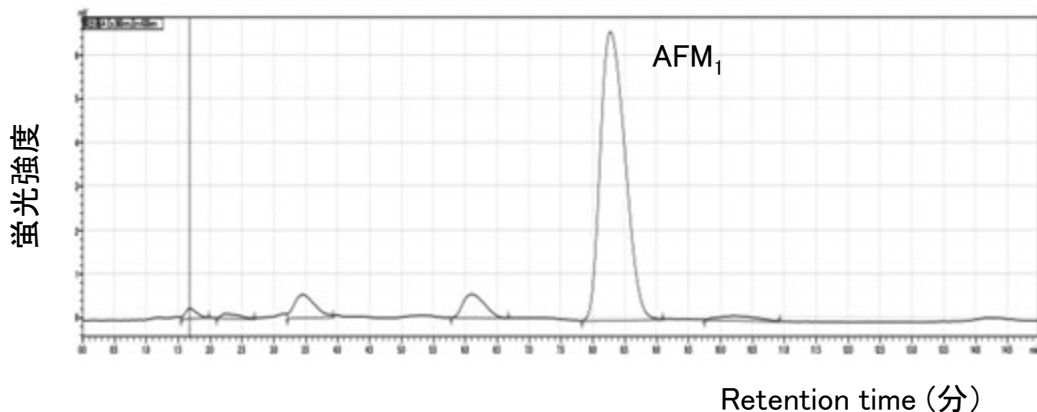


図2 牛乳AFM₁ 0.0161 µg/kg 汚染検体 (NG-11) のHPLCクロマトグラム

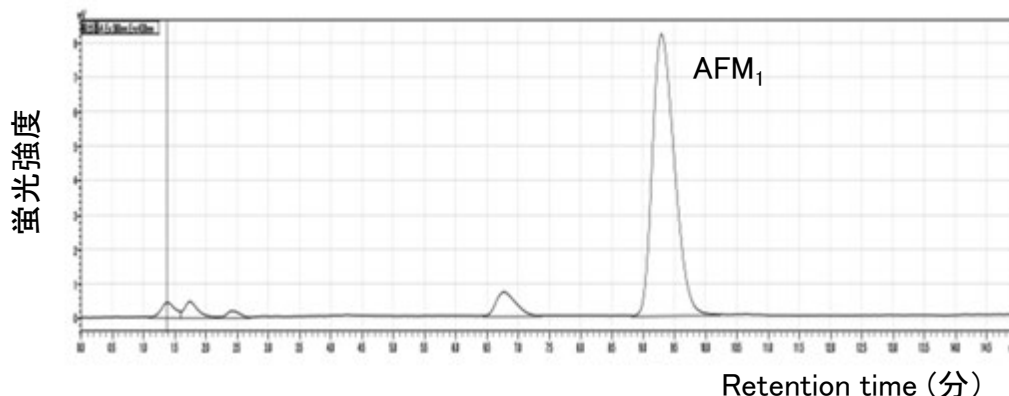


図3 粉ミルクAFM₁ 0.063 µg/kg 汚染検体 (CPM-02) のHPLCクロマトグラム

0.004 µg/kg, 定量限界 (S/N>10) は0.015 µg/kgであった。中国で市販されていた粉ミルク17検体中2検体 (11.8%) から0.065と0.053 µg/kgのAFM₁を検出した。陽性平均は0.053 µg/kg, 検出限界以下の検体濃度を0µg/kgとして計算した全検体平均値は, 0.007 µg/kgであった。陽性検体は中国の規制値0.5 µg/kgを超えていなかったが, EUの規制値0.05 µg/kgをやや上回る結果であった。なお, 香川県内で市販されていた乳児用粉ミルク7検体からはAFM₁は検出されなかった。

我々が1994年に行った中国の市販粉ミルクのAFM₁の汚染調査の結果では, 26検体中21検体 (81%) が陽性で, 平均0.103 µg/kg (最大汚染0.464 µg/kg) のAFM₁を検出した⁽³⁾。今回の結果と比較すると陽性率が大幅に低下しており, 陽性平均値が1/2に, 最大汚染濃度も1/7にそれぞれ低下しており, 約30年前より改善していた。

摘 要

アフラトキシンM₁ (AFM₁) は, 肝発がん性マイコト

キシンで乳製品を汚染することから最も厳しい規制値が設定されている。乳及び粉ミルク中のAFM₁の分析法を抗アフラトキシンモノクローナル抗体AFS.6抗体結合イムノアフィニティーカラムでクリーンアップを行いHPLCで定量する方法を確立した。本法を用いて, 香川県内の市販牛乳31検体と中国の市販粉ミルク17検体及び対象として香川県内の市販の乳児用粉ミルク7検体中のAFM₁を分析した。牛乳では, 31検体中23検体 (74.2%) から検出限界以上のAFM₁が検出され, 全検体平均値は0.0069 µg/kg, 最大汚染値は0.0161 µg/kgであった。2008-09年に行った汚染調査よりAFM₁の汚染レベルは若干低下していた。また, 中国で市販されていた粉ミルクでは, 2検体 (11.8%) から0.065と0.053 µg/kgのAFM₁を検出した。これらの汚染濃度は中国の基準値を下回っていたが, EUの規制値は超えていた。1994年の調査結果と比較して, 陽性率, 陽性平均値と最大汚染濃度ともに大幅に低下していた。なお, 香川県内で市販されていた乳児用粉ミルクからはAFM₁は検出されなかった。

引 用 文 献

- (1) International Agency for Research on Cancer (IARC) : Aflatoxins, In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 82, 171-300 (2002).
- (2) 川村理, 木山生: カクテルイムノアフィニティーカラム-HPLC法を用いた牛乳及び鶏卵中のアフラトキシン類同時分析法の検討, 香川大学農学部学術報告, 63, 61-66 (2011).
- (3) Kawamura, O., Wang, D. -S., Liang, Y. -X., Hasegawa, A., Saga, C., Visconti, A. and Ueno, Y.: Further survey of aflatoxin M₁ in milk powders by ELISA, Food and Agricultural Immunology, 6, 465-467 (1994)
- (4) Hojo, E. Matsuura, N., Kamiya, K., Yonekita, T., Morishita, N., Murakami, H., and Kawamura, O.: Development of a Rapid and Versatile Method of Enzyme-Linked Immunoassay Combined with Immunoaffinity Column for Aflatoxin Analysis, Journal of Food Protection, 82, 1472-1478, (2019).
- (5) Soontornjanagit, M., Kawamura, O.: Occurrence of aflatoxin M₁ in commercial powdered milk in Bangkok, Thailand. JSM Mycotoxins, 65, 75-79, (2015).