

フィリピンの市販ニワトリ飼料中アフラトキシン汚染調査

Jessica Mae Hernandez Tanzo・川村 理

Occurrence of aflatoxins contamination in commercial chicken feed in the Philippines

Jessica Mae Hernandez Tanzo and Osamu Kawamura

Abstract

Forty-four feeds for broiler and 42 feeds for layer, which were commercially available in Luzon, Philippines, were collected, and the aflatoxins (AFs) contamination was investigated by the immunoaffinity column-HPLC method. AFs were detected in 40 (90%) of 44 broiler feeds. The average \pm SD of AFB₁ was 1.04 ± 1.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the maximum was 8.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average \pm SD of total AFs was 1.20 ± 1.71 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with a maximum of 9.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$. AFs were detected in 40 (98%) out of 42 layer feeds. The average \pm SD of AFB₁ was 1.63 ± 0.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with a maximum of 12.72 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average \pm SD of total AFs was 1.72 ± 2.85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with a maximum of 13.79 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No samples exceeded the regulatory limits (total AFs, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) set by the Philippines, but one sample exceeded the EU regulatory limit (AFB₁, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). As a result of comparison with the contamination of AFs feeds for chicken in Yogyakarta, Indonesia, the contamination frequency was almost the same, but the contamination concentration was 1/6 to 1/18 lower in the Philippine feeds than feeds in Indonesia.

Key words : aflatoxins, broiler feeds, layer feeds, Philippines, immunoaffinity column-HPLC method, Indonesia

緒 言

フィリピンは熱帯海洋性気候で、高温多湿であり、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) などのマイコトキシン汚染が起きやすい地域である。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⁽¹⁾。図1に示したAFB₁、

AFB₂、AFG₁とAFG₂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⁽²⁾。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⁽³⁾。鶏飼料のAFsの規制値は、EUでは、 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (AFB₁)、フィリピンでは、 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (総AFs, AFB₁, AFB₂, AFG₁とAFG₂の合計量) などが設定されている。しかし、フィリピンでの鶏飼料のAFs汚染の報告はほとんどない。そこで、フィリピン養鶏の中心的地域

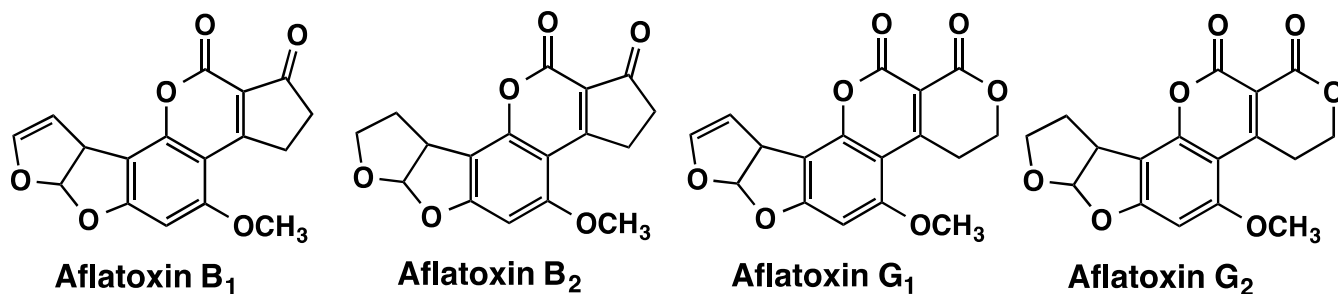


図1 アフラトキシン類の構造式

であるルソン島で市販されていたブロイラー用飼料44検体と採卵鶏用飼料42検体の合計86検体を収集し、イムノアフィニティーカラム-HPLC法でアフラトキシン分析を行った。

方 法

試験試料

2018年にフィリピン・ルソン島で市販されていたブロイラー用飼料（えつけ用14検体，前期用15検体，成鶏用20検体）44検体と採卵鶏用飼料（えつけ用13検体，前期用13検体，成鶏用20検体）42検体をそれぞれ収集し，微粉末に粉碎し，分析まで-18℃で保存した。

試薬類

AF類標準品は，アフラトキシン混合標準液（ B_1 ， B_2 ， G_1 ， G_2 各25 $\mu\text{g/mL}$ 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。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

Triosantiらの方法⁽⁴⁾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。ろ紙（Advantec No.5C）でろ過後，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の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，20 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-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×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℃，波長は365 nm（励起），465 nm（蛍光）で行った。

結果および考察

ブロイラー用飼料のアフラトキシン汚染

フィリピン・ルソン島で市販されていたブロイラー用飼料44検体のAFsの汚染調査の結果を表1に示した。44検体中40検体（90%）からAFsが検出された。AFB₁の平均±SDは1.04±1.64 $\mu\text{g/kg}$ ，最大値は8.05 $\mu\text{g/kg}$ であった。総AF（AFB₁， B_2 ， G_1 と G_2 の合計値）の平均±SDは1.20±1.71 $\mu\text{g/kg}$ ，最大値は9.19 $\mu\text{g/kg}$ であった。フィリピンとEUの規制値を超えている検体はなかった。陽性検体（の代表的なクロマトグラムを図2に示した）。

また，えつけ用，前期用と仕上げ用飼料のAFB₁のそれぞれの平均±SDと最大値は，1.31±1.67と5.97 $\mu\text{g/kg}$ ，0.67±0.48と8.05 $\mu\text{g/kg}$ と0.44±0.31と1.41 $\mu\text{g/kg}$ であった。また，総AFのそれぞれの陽性率，平均±SDと最大値は，86%，1.45±1.77と6.89 $\mu\text{g/kg}$ ，93%，1.49±2.24と9.19 $\mu\text{g/kg}$ と93%，0.66±0.45と1.69 $\mu\text{g/kg}$ であった。えつけ用，前期用と仕上げ用飼料でのAFB₁とAFsの汚染頻度と濃度に有意な差は認められなかった。

Triosanti・川村らの報告⁽⁴⁾では，インドネア・ジョグジャカルタのブロイラー用飼料50検体を分析した結果，40検体（90%）からAFsが検出され，平均±SDは19.6±4.5 $\mu\text{g/kg}$ ，最大値は63.0 $\mu\text{g/kg}$ であり，総AFの平均±SDは21.4±17.3 $\mu\text{g/kg}$ ，最大値は74.5 $\mu\text{g/kg}$ であった。これらの結果と比較して，フィリピン・ルソン島で市販されていたブロイラー用飼料のAFs汚染頻度はほぼ変わらないが，AFB₁と総AFsと平均汚染濃度でそれぞれ約1/15と1/18と低かった。

表1 ブロイラー用飼料のアフラトキシン汚染

種類	検体数	陽性 (%)	AFB ₁ ($\mu\text{g/kg}$)		総AF ($B_1+B_2+G_1+G_2$) ($\mu\text{g/kg}$)	
			平均±SD	範囲	平均±SD	範囲
えつけ用	14	12 (86%)	1.31±1.67	0.24-5.97	1.45±1.77	0.16-6.89
前期用	15	14 (93%)	0.67±0.48	0.27-8.05	1.49±2.24	0.36-9.19
仕上げ用	15	14 (93%)	0.44±0.31	0.23-1.41	0.66±0.45	0.16-1.69
合計	44	40 (90%)	1.04±1.64	0.23-8.05	1.20±1.71	0.16-9.19

検出限界：<0.05 $\mu\text{g/kg}$

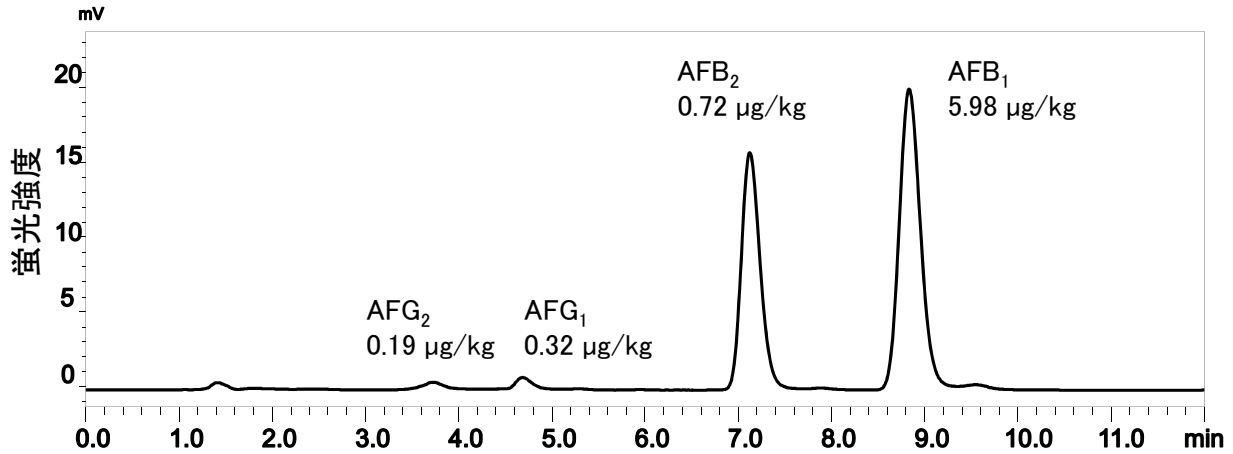


図2 陽性検体（ブロイラー用飼料）の代表的なクロマトグラム

表2 採卵鶏用飼料のアフラトキシン汚染

種類	検体数	陽性 (%)	AFB ₁ (µg/kg)		総AF (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂) (µg/kg)	
			平均±SD	範囲	平均±SD	範囲
えつけ用	13	13 (100%)	2.47±0.21	0.21- 9.48	2.69±3.17	0.20-10.53
前期用	13	12 (92%)	0.68±0.17	0.17- 2.86	0.88±0.86	0.16- 3.27
成鶏用	15	15 (100%)	1.67±0.18	0.18-12.72	1.74±3.32	0.16-13.79
合計	42	40 (98%)	1.63±0.17	0.17-12.72	1.79±2.85	0.16-13.79

検出限界：<0.05 µg/kg

表3 フィリピンとインドネシアの鶏飼料のアフラトキシン汚染の比較

国	種類	検体数	陽性 (%)	AFB ₁ (µg/kg)		総AF (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂) (µg/kg)	
				平均±SD	範囲	平均±SD	範囲
フィリピン	ブロイラー用	44	40 (90%)	1.0±1.6	0.2- 8.1	1.2±1.7	0.2- 9.2
	採卵鶏用	42	40 (98%)	1.6±0.2	0.2-12.7	1.8±2.9	0.2-13.8
インドネシア ^(文献4)	ブロイラー用	50	45 (90%)	19.6±14.5	0.8-63.0	21.4±17.3	0.1-74.5
	採卵鶏用	50	38 (76%)	9.7±6.5	1.7-31.9	10.±7.3	0.4-33.5

採卵鶏用飼料のアフラトキシン汚染

フィリピン・ルソン島で市販されていた採卵鶏用飼料42検体のAFsの汚染調査の結果を表2に示した。42検体中40検体(98%)からAFsが検出された。AFB₁の平均±SDは1.63±0.17 µg/kg、最大値は12.72 µg/kgであった。総AFの平均±SDは1.72±2.85 µg/kg、最大値は13.79 µg/kgであった。フィリピンと規制値を超えている検体はなかったが、1検体がEUの規制値(AFB₁, 10 µg/kg)を超えていた。

また、えつけ用、前期用と仕上げ用飼料のAFB₁のそれぞれの平均±SDと最大値は、2.47±0.21と9.48 µg/kg、0.68±0.17と2.86 µg/kgと1.67±0.18と12.72 µg/kgであっ

た。また、総AFのそれぞれの陽性率、平均±SDと最大値は、100%、2.69±3.17と10.53 µg/kg、92%、0.88±0.86と3.27 µg/kgと100%、1.74±3.32と13.79 µg/kgであった。えつけ用、前期用と仕上げ用飼料でのAFB₁とAFsの汚染頻度と濃度に有意な差は認められなかった。

Triosanti・川村らの報告⁽⁴⁾では、インドネシア・ジョグジャカルタの採卵鶏用飼料50検体を分析した結果、38検体(76%)からAFsが検出され、平均±SDは9.7±6.5 µg/kg、最大値は31.9 µg/kgであり、総AFの平均±SDは10.5±7.3 µg/kg、最大値は33.5 µg/kgであった。これらの結果と比較して、フィリピン・ルソン島で市販されていたブロイラー用飼料のAFs汚染頻度はやや高いが、AFB₁

と総AFsと平均汚染濃度でそれぞれ約1/5.8と1/6と低かった(表3).

以上の結果から、フィリピン・ルソン島で市販されていたブロイラー用と採卵鶏用飼料から高頻度(86検体中80検体(93%))でAFsが検出された。しかし、平均汚染濃度は、 AFB_1 で平均1.0と1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、総AFで平均1.8と1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でインドネシア・ジョグジャカルタの鶏用飼料の1/6~1/18程度と低かった(表3)。また、フィリピンの鶏飼料の基準値を超えた検体もなかった。すなわち、フィリピン・ルソン島で市販されていた鶏用飼料は高頻度にAFsに汚染されているが、その濃度は低く問題となる汚染とは言えなかった。しかしながら、高頻度にAFs汚染があることから、今後も継続的な汚染調査が必要と考えられた。

摘 要

フィリピン・ルソン島で市販されていたブロイラー用飼料44検体と採卵鶏用飼料42検体を収集し、イムノアフィニティーカラム-HPLC法でアフラトキシン(AF)の汚染調査を行った。ブロイラー用飼料44検体中40検体(90%)からAFsが検出された。 AFB_1 の平均 \pm SDは $1.04 \pm 1.64 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大値は $8.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ であった。総AF(AFB_1 , B_2 , G_1 と G_2 の合計値)の平均 \pm SDは $1.20 \pm 1.71 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大値は $9.19 \mu\text{g}/\text{kg}$ であった。また、採卵鶏用飼料42検体中40検体(98%)からAFsが検出された。 AFB_1 の平均 \pm SDは $1.63 \pm 0.17 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大値は $12.72 \mu\text{g}/\text{kg}$ であった。総AFの平均 \pm SDは $1.72 \pm 2.85 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大値は $13.79 \mu\text{g}/\text{kg}$ であった。フィリピンの規制値を超えている検体はなかったが、1検体がEUの規制値(AFB_1 , $10 \mu\text{g}/\text{kg}$)を超えていた。インドネシア・ジョグジャカルタの鶏用飼料AFs汚染との比較を行った結果、汚染頻度はほぼ変わらなかったが、汚染濃度はフィリピン飼料の方が1/6~1/18も低かった。

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) 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_1 及び飼料中のアフラトキシン B_1 , 23-39, 2013年7月
- (3) Oliveira, C. A. F., Kobashigawa, E., Reis, T. A., Mestieri, L., Albuquerque, R., and Correa, B.: Aflatoxin B_1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Additives and Contaminants*, 2000, Vol.17, No.6, 459-462 (2000).
- (4) Lucia Sinta Triosanti, 川村 理: 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, 香川大学農学部学術報告 73, 23-27, (2021)