

輸入生落花生 (Raw Shelled Peanuts) のアフラトキシン検査について

前 田 協 一

K. MAEDA: Aflatoxin inspection of imported raw shelled peanuts in Japan

マイコトキシン

第17号 別刷

Reprint from
Proceeding of the Japanese Association
of Mycotoxicology

No. 17

June 1983

IV. 輸入生落花生 (Raw Shelled Peanuts) のアフラトキシン検査について

前田 協一*

K. MAEDA: Aflatoxin inspection of imported raw shelled peanuts in Japan

自然汚染に起因した、食品中に存在するマイコトキシンの検査は「人類の健康で快適な食生活の維持」と「健全な食糧資源の確保と活用」の両面から、正当に評価し得るもの、すなわち consumer risk と producer risk を共に最少限に止めた検査法でなければならない。

日本で、アフラトキシンが食品衛生上の問題として、行政的に取り上げられたのは 1971 年 2 月 23 日付「カビ毒 (アフラトキシン) を含有する食品の取扱いについて」の表題で通達された環食第 90 号¹⁹⁾ (厚生省環境衛生局食品衛生課長通知) からである。翌 3 月 16 日、同じ表題で通達された環食第 128 号²⁰⁾ の別紙 (1) に、公定法として「ピーナッツおよびピーナッツ製品中のアフラトキシン B₁ の試験法」が記載され、「この試験において、アフラトキシン B₁ を検出してはならない」と規定し、「アフラトキシンが検出された食品は、食品衛生法第 4 条第 2 号に違反するものとして取扱う」ことが明記されている。世に言う環食第 128 号法である。この検査法は現在でも広く食品中のアフラトキシン検査に適用されている。ちなみに、環食第 128 号法で検出されてはならないと規定しているアフラトキシン B₁ は、同法の手順にしたがえば、10.0 ppb 以上に相当しよう。

なお、サンプリングについては 1971 年 3 月 18 日付「輸入落花生に対するアフラトキシンの検査について」の表題で通牒された環食第 132 号で、輸入落花生の精密検査のためのサンプリングとして「種類別、銘柄別、等級別、産地別等によってできるだけ細分し得るロット毎に併付けし、併の両側面および上面からそれぞれ 30 袋を 1 カ所に偏しないように抽出し (合計 90 袋) 各袋から 1 刺しづつ試料を採取し、合計 1 kg の検体として試験機関に送付する」、またピーナッツバターに対するサンプリングとして「1 つのロットから 1 缶 (函) を抽出し、100 g を試験機関に送付する、もし容器包装が小型 (130 g 前後) の場合は 1 個を採取し試験機関に送付する」こととしている。また 1981 年 9 月 12 日付「輸入ナッツ類等に対するアフラトキシンの検査要領について」の表題で通牒された環食第 202 号²¹⁾ の別添に、輸入ナッツ類のサンプリングとして、ロットの大きさに対応した試料の採取量が規定されている。

1960 年、turkey X 病に端を発したアフラトキシンの衝激波が地球上を駆け巡ってから、すでに 20 余年の歳月が流れ、この間に発表されたアフラトキシンに関する各分野の研究報告は枚挙に暇がない。アフラトキシンの化学分析法についても例外ではなく、Sargeant ら^{1),2)} が、カビ汚染ピーナッツミールからアフラトキシンをメタノール抽出し、ペーパークロマトグラフィーで検出していろいろ、多くの研究者によって対象食品別に検討され、報告された。

しかし、生落花生のアフラトキシン汚染は粒単位のため、1 粒当りの汚染量や汚染粒の混在率が産地や年次で異なる。従ってこれらの試料の化学分析値から、母集団 (ロット) の汚染をどのように推定し、評価したら良いのか、またそのための最適な検査法はいかにある可きかが、検査に関与する者にとっては重大な問題であり、関心事でもある。

* (財)マイコトキシン検査協会 (〒231 横浜市中区山下町 92)

Mycotoxin Research Association (92, Yamashita-cho, Naka-ku, Yokohama 231)

母集団 (Lot) のアフラトキシン汚染を推定するための試料の採取から化学分析値の解析と評価を含む検査法については, Robertson ら³⁾, Cucullu ら⁴⁾, Tiemstra ら⁵⁾, Whitaker ら⁶⁻¹³⁾, Velasco ら¹⁴⁾, Dickens ら¹⁵⁾, Fuller ら¹⁶⁾ など, 限られた研究者達によって報告されているが, その数は少ない. そこで, 前田ら (1972)¹⁷⁾ は Whitaker ら⁹⁾ の指摘する subsampling 以降の検査に介入する誤差を検討するため, アフラトキシン汚染粒の混在率が 0.8% 以上の生落花生試料 (50 g 中に汚染粒が 1 粒ないしそれ以上存在する) を用いて, 環食第 128 号法で分析を行なった. その結果, 得られた分析値の変動率が 72.8% と高いため, 直接分析した個々の subsample の化学分析値が正しくても, 個々の subsample の集合体である sample の汚染を常に正確に表していると断言できないことを指摘した.

今回, Workshop に参加する機会が与えられたので, その後の研究成果を含めた誤差要因の分析結果を要約し, さらにその背景となる生落花生のアフラトキシン汚染の特異性, すなわち, 1 粒当りの汚染量と汚染粒の混在率を輸入小粒生落花生について推定した結果の要約と, 過去 10 年間の輸入時における生落花生のアフラトキシン検査実績を併せ披露し, 関係各位の御参考に供したい.

1. 輸入生落花生のアフラトキシン検査実績

マイコトキシン検査協会は, 日本および世界のアフラトキシンによる食品衛生上の社会問題を背

Table 1. Aflatoxin examination for imported Virginia type raw shelled peanuts in Japan, 1972-1981

Exporting countries	Aflatoxin B ₁			Number of received samples representing each Lot
	Number of detected		Number of not detected	
	10.0 ppb and over	Less than 10.0 ppb		
1 U. S. A.	1 (0.07%)	6 (0.44%)	1362 (99.48%)	1369 (52.4%)
2 China	0	3 (0.3%)	956 (99.7%)	959 (36.7%)
3 Australia	0	0	237	237 (9.1%)
4 Unidentified	0	3 (7.5%)	37 (92.5%)	40 (1.5%)
5 Egypt	0	0	7	7 (0.3%)
Total	1 (0.04%)	12 (0.46%)	2599 (99.50%)	2612

Table 2. Aflatoxin examination for imported Virginia type raw shelled peanuts in Japan

Years	Aflatoxin B ₁			Number of received samples representing each Lot
	Number of detected		Number of not detected	
	10.0 ppb and over	Less than 10.0 ppb		
1972	0	1 (2.7%)	36 (97.3%)	37
1973	1 (0.4%)	3 (1.1%)	261 (98.5%)	265
1974	0	0	264	264
1975	0	0	227	227
1976	0	0	294	294
1977	0	0	390	390
1978	0	2 (0.8%)	261 (99.2%)	263
1979	0	0	227	227
1980	0	0	309	309
1981	0	6 (1.8%)	330 (98.2%)	336
Total	1 (0.04%)	12 (0.46%)	2599 (99.50%)	2612

景に、1972年2月、財団法人として設立され、同年9月より輸入の生落花生と落花生製品を対象に、環食第128号法に基づく検査業務を開始した。最近では輸入のトウモロコシや香辛料、さらに1981年9月14日付環食第204号²²⁾に基づくナッツ類など、アフラトキシン汚染が憂慮される各種の食品についても検査を実施している。

ここでは、当協会ですべてに検査した対象食品のおよそ50%を占める輸入生落花生を取り上げ、1972年より1981年に至る10年間のアフラトキシン検査成績をまとめた。

輸入生落花生は Virginia type の大粒種と、Spanish type の小粒種に大別される。これらの生落花生からアフラトキシン B₁ が検出された（検出限界 0.1 ppb）割合を検出率、そのうち日本のガイドラインに照合して、10.0 ppb 以上検出された割合を陽性率で表わした。Table 1 はアメリカを含む4カ国から輸入された大粒種の国別検査成績であり、Table 2 はその年次別結果である。大粒種は過去10年間に検査した2612検体のうち、0.5%にアフラトキシンが検出された。しかし、

Table 3. Aflatoxin examination for imported Spanish-Valencia type raw shelled peanuts in Japan, 1972-1981

Exporting countries	Aflatoxin B ₁			Number of received samples representing each Lot
	Number of detected		Number of not detected	
	10.0 ppb and over	Less than 10.0 ppb		
1 U. S. A.	17 (0.53%)	21 (0.65%)	3195 (98.82%)	3233 (34.35%)
2 South Africa	0	4 (0.26%)	1530 (99.74%)	1534 (16.30%)
3 Sudan	22 (2.18%)	136 (13.47%)	852 (84.36%)	1010 (10.73%)
4 Indonesia	31 (4.29%)	30 (4.16%)	661 (91.55%)	722 (7.67%)
5 China	2 (0.28%)	7 (0.99%)	695 (96.26%)	704 (7.48%)
6 India	11 (2.50%)	18 (4.09%)	411 (93.41%)	440 (4.67%)
7 Argentina	5 (1.38%)	4 (1.10%)	353 (97.51%)	362 (3.85%)
8 Mozambique	1 (0.31%)	1 (0.31%)	323 (99.38%)	325 (3.45%)
9 Brazil	41 (13.53%)	59 (19.47%)	203 (67.00%)	303 (3.22%)
10 Unidentified	2 (0.83%)	5 (2.07%)	234 (97.10%)	241 (2.56%)
11 Paraguay	14 (6.76%)	14 (6.76%)	179 (86.47%)	207 (2.20%)
12 Formosa	1 (0.85%)	0	116 (99.15%)	117 (1.24%)
13 Thailand	6 (9.84%)	8 (13.11%)	47 (77.05%)	61 (0.65%)
14 Australia	0	0	53 (100%)	53 (0.56%)
15 Zimbabwe	2 (4.88%)	0	39 (95.12%)	41 (0.44%)
16 Philippines	2 (14.29%)	3 (21.43%)	9 (64.28%)	14 (0.15%)
17 Hong Kong	2 (15.38%)	0	11 (84.62%)	13 (0.14%)
18 Ethiopia	0	0	8 (100%)	8 (0.08%)
19 Viet Nam	1 (14.29%)	0	6 (85.71%)	7 (0.07%)
20 Malaysia	2 (50.00%)	0	2 (50.00%)	4 (0.04%)
21 Nigeria	0	0	3 (100%)	3 (0.03%)
22 Colombia	0	0	2 (100%)	2 (0.02%)
23 Southeast Africa	0	0	2 (100%)	2 (0.02%)
24 Cameroon	1 (100%)	0	0	1 (0.01%)
25 Mauritius	0	0	1 (100%)	1 (0.01%)
26 Namibia	0	0	1 (100%)	1 (0.01%)
27 Senegal	0	0	1 (100%)	1 (0.01%)
28 Tanzania	0	0	1 (100%)	1 (0.01%)
29 Venezuela	1(100%)	0	0	1 (0.01%)
Total	164 (1.74%)	310 (3.29%)	8938 (94.97%)	9412

Table 4. Aflatoxin examination for imported Spanish-Valencia type raw shelled peanuts in Japan

Years	Aflatoxin B ₁			Number of received samples representing each Lot
	Number of detected		Number of not detected	
	10.0 ppb and over	Less than 10.0 ppb		
1972	2 (1.14%)	2 (1.14%)	172 (97.92%)	176
1973	11 (1.12%)	20 (2.04%)	947 (96.84%)	980
1974	15 (2.40%)	16 (2.55%)	595 (95.05%)	626
1975	15 (1.99%)	24 (3.19%)	713 (94.81%)	752
1976	8 (0.71%)	11 (0.98%)	1103 (98.31%)	1122
1977	10 (0.93%)	9 (0.83%)	1060 (98.24%)	1079
1978	34 (3.76%)	59 (6.52%)	812 (89.72%)	905
1979	21 (1.73%)	63 (5.20%)	1128 (93.07%)	1212
1980	19 (1.44%)	18 (1.37%)	1278 (97.19%)	1315
1981	29 (2.33%)	88 (7.07%)	1128 (90.60%)	1245
Total	164 (1.74%)	310 (3.29%)	8938 (94.97%)	9412

陽性として不合格となったものは 0.04% に過ぎなかった。これに対して、小粒種の輸入検査検体数は 9412 件で、そのうち 5.0% にアフラトキシンが検出され、陽性として不合格となったものが 1.7% あった。Table 3 はアメリカを含む 28 カ国より輸入された小粒種の国別検査成績である。過去 10 年間に少なくとも 100 件以上の輸入実績があって、しかもアフラトキシン汚染が最も高かった国はブラジルで、アフラトキシン検出率 33.0% のうち陽性率 13.5%、最も低かった国は南アフリカで、アフラトキシン検出率 0.3% のうち陽性率 0% であった。これを年次別にまとめたのが Table 4 である。アフラトキシン汚染が最も高かった年は 1978 年で、アフラトキシン検出率 10.3% のうち陽性率 3.8%、最も低かった年は 1976 年で、アフラトキシン検出率 1.7% のうち陽性率は 0.7% であった。

以上の結果、年次別、国別に汚染度の異なりを認めたが、輸入生落花生のアフラトキシン汚染問題は小粒種よりも大粒種に注目すべきことが判明した。年次による差違はその年々の気象条件が落花生の栽培時や収穫時に大きく作用し、国別による差異は産地の立地条件、アフラトキシン産生菌の多少、栽培—収穫—保存に至る落花生の管理状態、アフラトキシンに対する問題意識などが原因するものと考えられる。そして、これらが複雑に絡み合った結果が Table 1~4 に表現されているのである。

2. 検査に介入する誤差の要因分析

食品中のアフラトキシンは自然汚染物質であって、粉碎またはバターなどの加工手段を加えて均一化したものでない限り、汚染は粒単位であり、1 粒当りの汚染量や汚染粒の混在率が異なり、不均一局所性である。したがって、食品中のアフラトキシンを検査する場合、試料の採取方法や調製方法がロットの値に大きく影響することは検査に従事する者の常に体験するところである。Whitaker⁹⁾ は検査に介入する誤差を、1) sampling error, 2) subsampling error, 3) analysis error に大別し、このうち sampling error が最も大きいことを指摘して、負の二項分布の理論に基づくサンプリング方法を提案した。

筆者ら¹⁸⁾ は検査に持ち込まれた試料が「母集団を代表している」との前提に立って、Whitaker らの指摘する subsampling error の問題を取り上げ、化学分析値の変動係数を物指として、検査に介入する誤差の要因分析を行なった。すなわち、アフラトキシン汚染粒の混在率が 0.08% 以上の生落花生試料 (500 g 中に汚染粒が 1 粒ないしそれ以上存在する) を用いて環食第 128 号法で分

析した場合、試料をあらかじめ Dickens Subsampling Mill を改良した遠藤式粉碎機(生落花生粉碎後の粒度分布は 10 メッシュ全通が $86.8 \pm 2.5\%$) で粉碎調製してから分析に供し、得られた分析値の変動率は 19.9% であった。これに対して、試料を粒状のまま分析に供して得られた分析値の変動率は 269.6% であった。この値が他の分析誤差要因の変動率、すなわち、機械誤差(0.7%)、スポット誤差(3.4%)、抽出誤差(6.1%) に比較して、いかに大きな数字であるかは一目瞭然である。さらにこの値を検査に介入する誤差要因の占有率から見ると、実に 97.7% に相当する。このことから、Whitaker らの言う subsampling 以降の誤差の大半は試料の調製方法にあると断言できる。

3. 輸入小粒生落花生の 1 粒当りのアフラトキシン汚染量と汚染粒の混在率

前項で subsampling 以降のアフラトキシン検査に介入する誤差要因の大半は試料の調製方法にあることを指摘した。この背景には、生落花生のアフラトキシン汚染がアフラトキシン産生菌の関与した自然汚染であるが故の特異性を持っていることに起因している。この特異性は、とりもなおさず、生落花生のアフラトキシン汚染が粒を単位とし、1 粒当りの汚染量や汚染粒の混在率が産地や年次によってロット毎に大きく異なることに由来する。

Cucullu ら⁴⁾ は正常な落花生の試料から選出した 20 粒について、肉眼的に観察した糸状菌汚染の結果と、それぞれ半粒ごとに分析したアフラトキシン B_1 の含有率を対比し、20 検体中 12 検体に、最低 300 ppb から最高 1,100,000 ppb のアフラトキシン B_1 が検出されたと報告している。これを半粒中のアフラトキシン B_1 量(ng)に換算すると、最低 87 ng から 252, 432, 742, 754, 768, 9,450, 20,000, 22,800, 70,000, 152,000, そして最高 209,000 ng が含まれていたことになる。

筆者らは 1972—1977 会計年度に検査した 62 万粒、および反復実験に用いた 15 万粒の輸入小粒生落花生について、50 g (平均 125 粒) を 1 単位として、1 粒当りのアフラトキシン汚染量と汚染粒の混在率を推定した。これらの結果を要約すると、汚染を受けた輸入小粒生落花生の 1 粒当りのアフラトキシン B_1 量は、検出限界値の 5 ng から最大 403,000 ng と大幅に分散していた。これを国別最大値で比較すると、南アフリカ産が 199 ng で最も少なく、中国産の 633 ng、モザンビーク産の 740 ng、スーダン産の 23,400 ng、インド産の 24,200 ng、アメリカ産の 54,900 ng、ブラジル産の 84,000 ng と続き、インドネシア産に最大値の 403,000 ng が含まれているものと推定された。これらの値が Cucullu らの報告している半粒中のアフラトキシン B_1 量と比較して懸離れた値でないことは注目に値する。

つぎに、アフラトキシン汚染粒の混在率を、日本のガイドラインに照合して 10.0 ppb 以上、すなわち、1 粒当り 500 ng 以上含まれているものと、500 ng 未満含まれているものとに分けて、その 95% 信頼区間を推定した。その結果を要約すると、1 粒当り 500 ng 以上のアフラトキシン B_1 を含む汚染粒の混在率は 0.0073~0.0138%、500 ng 未満の混在率は 0.0112~0.0169% であった。これらを国別にみると明らかに相違が認められ、前者で混在率の最も高い産地国はインドネシアの 0.0155~0.0378%、最も低い産地国は南アフリカの 0% であった。後者で混在率の最も高い産地国はスーダンの 0.0218~0.0499%、ブラジルの 0.0150~0.0717%、最も低い産地国は南アフリカの 0~0.0042% であった。ちなみに、輸入検査件数の最も多いアメリカ産についてみると、前者は 0.0014~0.0075%、後者は 0.0011~0.0067% であった。

4. む す び

Workshop のテーマである「アフラトキシン分析をめぐる諸問題」について、筆者らが 1972 年

より実施して来た輸入生落花生のアフラトキシン検査実績と未発表の実験結果を基に一粒当りの汚染量と汚染粒の混在率から誤差要因の分析を行い、私見を述べた。すなわち、生落花生のアフラトキシン汚染はサンプルサイズと1粒当りの汚染量と汚染粒の混在率との関係から捕え、評価しなければならないと考える。そのためには、ロットを代表するものとして採取された試料中のアフラトキシン汚染に関する情報を遺漏なく収集して、検査に反映させることが必要である。その手段として、試料を少なくとも10メッシュないしはそれよりも細かく粉碎し、均一化することが不可欠条件である。ただし、この場合の試料の粉碎量は、環食第128号法の検出限界値から推して、500gないし1,000g、または多くても1,500gが限度と考えられる。なお試料を粉碎均一化することによって得られた分析値が、現状のガイドラインに照合して潜在化する問題が新たに提起される。この問題を解明するには、単に検査法からのみ論ずるのではなく、現在個々のアフラトキシンについて解明されている化学物質としての毒性評価を、日常の食生活の場に位置付け、食品中のアフラトキシン群にスポットライトを当てることによって、食品のアフラトキシンによる自然汚染の実態、すなわち、先に述べた1粒当りの汚染量や汚染粒の混在率などから、日本人のアフラトキシンによる現実的な被曝の実態を推定し、これらを踏まえた有機的な毒性の総括的再評価に基づいて検討すべきものとする。

常日頃、有益な御助言をいただいている国立衛生試験所の倉田浩博士、関連の調査研究に当って御指導をいただいた国立予防衛生研究所の粟飯原景昭博士、調査研究に御協力を得た(財)マイコトキシン検査協会の岡野清志、梶川三千子の両氏、および課題の発表に御配慮をいただいた遠藤正敏事務局長に深謝いたします。また、披露した研究の一部は昭和56年度厚生省がん研究助成金による計画研究56-35であることを付記し、関係各位に深謝いたします。

引用文献

- 1) Sargeant, K., O'Kelly, J., Carnaghan, R. B. A., Allcroft, R.: Vet. Record 73, 1219 (1961).
- 2) Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., Carnaghan, R. B. A.: Nature 192, 1096 (1961).
- 3) Robertson, J. A., J. R., Lee, L. S., Cucullu, A. F., Goldblatt, L. A.: J. Amer. Oil Chem. Soc., 42, 467 (1965).
- 4) Cucullu, A. F., Lee, L. S., Mayne, R. Y., Goldblatt, L. A.: *ibid.*, 43, 89 (1966).
- 5) Tiemstra, P. J.: *ibid.*, 46, 667 (1969).
- 6) Whitaker, T. B., Wisner, E. H.: *ibid.*, 46, 377 (1969).
- 7) Whitaker, T. B., Dickens, J. W., Wisner, E. H.: *ibid.*, 47, 501 (1970).
- 8) Whitaker, T. B., Dickens, J. W., Monroe, R. J., Wisner, E. H.: JAOCS 49, 590 (1972).
- 9) Whitaker, T. B., Dickens, J. W., Monroe, R. J.: *ibid.*, 51, 214 (1974).
- 10) Whitaker, T. B., Whitten, M. E., Monroe, R. J.: *ibid.*, 53, 502 (1976).
- 11) Whitaker, T. B., Dickens, J. W., Wisner, E. H.: *ibid.*, 53, 545 (1976).
- 12) Whitaker, T. B., Whitten, M. E.: *ibid.*, 54, 436 (1977).
- 13) Whitaker, T. B., Dickens, J. W., Monroe, R. J.: *ibid.*, 56, 789 (1979).
- 14) Velasco, J., Whitaker, T. B., Whitten, M. E.: *ibid.*, 52, 191 (1975).
- 15) Dickens, J. W.: *ibid.*, 54, 225A (1977).
- 16) Fuller, G., Spooncer, W. W., King, A. D., JR., Schada, J., Mackey, B.: *ibid.*, 54, 231A (1977).
- 17) 前田協一, 岡野清志, 金子洋子: 第2回マイコトキシン研究会 (1972).
- 18) 前田協一, 岡野清志, 梶川三千子: 未発表.
- 19) 環食第90号: 食品衛生研究 21, 453 (1971).
- 20) 環食第128号: 食品衛生研究 21, 564 (1971).
- 21) 環食第202号: 食品衛生研究 31, 913 (1981).
- 22) 環食第204号: 食品衛生研究 31, 915 (1981).