

薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会

食品規格部会 議事次第

日時：平成21年 6 月 2 日 (火)
14時00分から16時00分
場所：中央合同庁舎5号館共用第8会議室

1. 開 会

2. 議 題

- (1) 食品中のアフラトキシンに係る成分規格の設定について
- (2) 清涼飲料水の規格基準の改正について
- (3) その他

3. 閉 会

<配布資料>

- 資料1-1：食品中のアフラトキシンの成分規格の設定に係る審議経緯等
- 資料1-2：食品健康影響評価の結果の通知について（平成21年3月19日府食第261号）
- 資料1-3：General Standard for Contaminants and Toxins in Foods(CODEX STAN 193-1995)（抜粋）
- 資料2-1：清涼飲料水の規格基準の改正について
- 資料2-2：飲用適の水（食品製造用水）の規定の取扱いについて（案）
- 資料2-3：ミネラルウォーター類の原水基準の取扱いについて（案）
- 資料2-4：清涼飲料水の規格基準と残留農薬等のポジティブリスト制度との整合について（案）
- 資料2-5：清涼飲料水の規格基準の概要図
- 資料2-6：飲料水等に係る汚染物質等基準値の比較（残留農薬を除く）

<参考資料>

- 参考資料1：食品中の汚染物質に係る規格基準設定の基本的考え方
- 参考資料2：かび毒に関する調査研究の進捗状況
- 参考資料3：清涼飲料水の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号抄）
- 参考資料4：残留農薬等のポジティブリスト制度の概要

食品中のアフラトキシンの成分規格の設定に係る審議経緯等

1. 経緯

我が国においては、昭和 46 年に食品衛生調査会等の意見により、食品中からアフラトキシンを検出してはならないこととされ¹⁾、現在、アフラトキシン B₁を検出した食品は、食品衛生法第 6 条第 2 号（有害・有毒物質を含む食品の販売等の禁止）に違反するものとして規制されている。

一方、国際的には、コーデックス委員会において、個別食品の総アフラトキシン（アフラトキシン B₁、B₂、G₁及び G₂の合算）に係る規格設定の動きがあり、これを受け、我が国においても平成 16 年度から厚生労働科学研究費等により食品中のアフラトキシンの汚染実態等について調査研究が行われてきたところである。

これらの状況を踏まえて当部会において審議した結果、コーデックス規格と同様に落花生及び木の実について総アフラトキシンの規格基準の設定を検討するとの結論が得られたことから、昨年 9 月、厚生労働省から食品安全委員会に対し食品中の総アフラトキシンに係る食品健康影響評価を依頼し、本年 3 月、その評価の結果が通知されたところであり、これを受けて、今般、厚生労働省から薬事・食品衛生審議会に対し、食品中のアフラトキシンに係る成分規格設定について諮問がなされた。

2. アフラトキシンの概要

アフラトキシンは、*Aspergillus flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*等が産生するかび毒であり、*A. flavus*はアフラトキシン B₁及び B₂を、*A. parasiticus*及び *A. nomius*はアフラトキシン B₁、B₂、G₁及び G₂を産生する。

アフラトキシンの毒性について、IARC（国際がん研究機関）はグループ 1（人に対して発がん性を示す）に分類している。

また、1997 年の JECFA（FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議）での評価において、許容摂取量は示されず、「摂取は合理的に達成可能な値にまで低減されるべき」とコメントされている。

3. 食品健康影響評価

食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 24 条第 1 項第 1 号の規定に基づき、平成 20 年 9 月 3 日付け厚生労働省発食安第 0903001 号により厚生労働

¹⁾ 昭和 46 年 3 月 16 日付け環食第 128 号：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（現第 6 条第 2 号）に違反するものとして取り扱う。

大臣より食品安全委員会委員長あてに意見を求めた食品中の総アフラトキシンに係る食品健康影響評価に対して、以下のとおりアフラトキシンの安全性が評価されている。

アフラトキシン B₁ (AFB₁) の遺伝毒性については、*in vitro* 及び *in vivo* ともに広範な試験が実施されており、そのほとんどにおいて陽性の結果が得られている。

発がん性については、ほとんどの動物種において肝臓が標的器官であり、肝細胞癌が最も多く認められた。

非発がん毒性については、実験動物において生殖パラメーターの異常、催奇形性、免疫毒性などが認められた。

人における疫学調査のほとんどにおいて AFB₁ 暴露と肝細胞癌との相関が指摘されている。これらの調査はアフラトキシンの暴露量が多く、かつ、HBV の罹患率が高い地域で実施されており、HBV 感染はリスク因子であることが示唆されている。

AFB₁ 以外のアフラトキシンについては、アフラトキシン G₁ では遺伝毒性及び発がん性が認められた。アフラトキシン B₂ 及び G₂ に関するデータは限られている。

IARC では、自然界で生じるアフラトキシン混合物はヒトに対して発がん性がある物質（グループ 1）と分類している。

上記のことから、総アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、発がんリスクによる評価が適切であると判断された。一方、非発がん影響に関しては、TDI を設定するための定量的評価に適用できる報告はなく、非発がん性を指標とした TDI を求めることは困難と判断された。発がんリスクについては、人の疫学調査の結果から、体重 1kg あたり 1 ng/日の用量で生涯にわたり AFB₁ に経口暴露した時の肝臓癌が生じるリスクとして、HBsAg 陽性者では 0.3 人/10 万人/年（不確実性の範囲 0.05～0.5 人/10 万人/年）、HBsAg 陰性者では 0.01 人/10 万人/年（不確実性の範囲 0.002～0.03 人/10 万人/年）となった。

4. 我が国における食品からのアフラトキシン暴露状況

(1) 汚染実態及び暴露推計

平成 16～18 年度の厚生労働科学研究による調査の結果、我が国に流通する食品中の総アフラトキシンの汚染実態及び暴露推計は以下のとおりであった。

<平成16～18年度 国内流通食品のアフラトキシンの汚染実態調査結果>

品名	試料数				汚染件数	検出検体の平均汚染濃度(範囲)($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^{*1}				
	H16年度	H17年度	H18年度	合計		アフラトキシン B ₁	アフラトキシン B ₂	アフラトキシン G ₁	アフラトキシン G ₂	総アフラトキシン
落花生	60	60	30	150	1	4.88	0.31	20.9	1.90	28.0
チョコレート(初歩チョコレートを含む)		40	24	64	34	0.27 (0.1~0.88)	0.13 (0.1~0.18)	0.13 (0.1~0.33)	0.1 (0.1)	0.33 (0.1~0.21)
ピスタチオ			5	5	1	0.38	—	—	—	0.38
はとむぎ			17	17	6	2.45 (0.29~9.0)	0.38 (0.1~0.58)	0.16 (0.1~0.30)	—	2.77 (0.31~9.71)
そば粉	12	10	6	28	2	0.53 (0.24~0.81)	0.17 (0.173)	—	—	0.61 (0.238~0.987)
香辛料			21	21	5	0.36 (0.1~1.0)	—	0.2 (0.2)	—	0.44 (0.1~1.0)
ココア			11	11	8	0.33 (0.17~0.60)	0.13 (0.1~0.15)	0.11 (0.1~0.11)	—	0.40 (0.17~0.85)
ピーナッツバター	21	20	21	62	21	0.86 (0.1~2.59)	0.25 (0.1~0.52)	0.37 (0.1~0.81)	0.2 (0.12~0.46)	1.18 (0.1~3.92)
アーモンド(製菓材料含む)			24	24	6	0.37 (0.1~0.89)	0.14 (0.1~0.17)	0.1 (0.1~0.12)	—	0.43 (0.1~1.06)
コーンフリッツ	10	10	10	30	2	0.2	—	—	—	0.21
ごま油	10	10	10	30	0	/				
米	53	30	10	93	0					
ポップコーン	10	10	10	30	0					
豆菓子		20	10	30	0					
コーンフレーク	20	15	15	50	0					
生トウモロコシ	10			10	0					
スイートコーン*2	50	30	10	90	0					
そば麺	39	20	25	84	0					
せんべい			21	21	0					
ビール			20	20	0					
乾燥伊豆ク			5	5	0					
落花生粉	10			10	0					

*1: 定量限界 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ビールのみ 0.005 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

*2: 缶詰、冷凍食品等の加工品

汚染実態調査の結果、アフラトキシンが検出されたのは、落花生、チョコレート、ピスタチオ、はとむぎ、そば粉、香辛料、ココア、ピーナッツバター、アーモンド及びコーングリッツの 11 品目であり、胡麻油、米、ポップコーン、豆がし、コーンフレーク、生トウモロコシ、スイートコーン、そば、せんべい及びビールの 10 品目については不検出であった。また、

- ① 検出した食品のうち、はとむぎでアフラトキシン B₁ を 9 μg/kg を含んでいたもの以外は、概ね低濃度であった。
- ② 3 年間の測定期間中にアフラトキシンが検出された食品群の平均汚染濃度は、いずれの食品群も 1 μg/kg を超えなかった。
- ③ コーングリッツ、ピスタチオ、そば粉及び香辛料は、B グループ汚染が主流と考えられたが、それ以外は BG グループ汚染が多かった。
- ④ 落花生では、B グループよりも G グループのほうが汚染濃度の高い現象が見られた。

上記の汚染実態調査結果に基づき、アフラトキシンを含有すると考えられる 11 品目の食品を対象として、

- ① アフラトキシン B₁ : 10 μg/kg
- ② アフラトキシン B₁ : 4 μg/kg 及び総アフラトキシン : 8 μg/kg
- ③ アフラトキシン B₁ : 10 μg/kg 及び総アフラトキシン : 15 μg/kg
- ④ アフラトキシン B₁ : 10 μg/kg 及び総アフラトキシン : 20 μg/kg

の 4 通りの基準値を設定するシナリオを想定してモンテカルロ・シミュレーションによる暴露量の推計を行った結果、アフラトキシン B₁ の一日推定暴露量の分布は以下のとおりであった。

<平成 16~18 年度汚染実態調査に基づくアフラトキシン B₁ の一日推定暴露量の分布>

シナリオ	シナリオ①		シナリオ②		シナリオ③		シナリオ④	
	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B
下限値以下の仮定*								
10 パーセントイル	0	0	0	0	0	0	0	0
50 パーセントイル	0	0	0	0	0	0	0	0
80 パーセントイル	0	0	0	0	0	0	0	0
90 パーセントイル	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
95 パーセントイル	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.004
97.5 パーセントイル	0.009	0.010	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009	0.010
99.0 パーセントイル	0.045	0.051	0.041	0.048	0.043	0.049	0.042	0.049
99.5 パーセントイル	0.305	0.307	0.259	0.261	0.283	0.285	0.285	0.286
99.9 パーセントイル	2.063	2.063	1.881	1.880	1.956	1.956	1.895	1.958

* 仮定 A : 検出下限未満の検体について、検出下限値である 0.1 μg/kg と仮定

仮定 B : 検出下限未満の検体について、検出下限値の 0.1 μg/kg と 0 μg/kg の間の一様分布と仮定

この結果、年齢構成比で重み付けした日本人全体のアフラトキシン B₁ の暴露量は、99.9 パーセンタイル値が、もっとも安全側をとったシナリオである「アフラトキシン B₁ のみ」の規制の場合で 2.06 ng/kg/day であり、もっとも少なめに見積もられる「アフラトキシン B₁ 4 μg/kg、総アフラトキシン 8 μg/kg」の規制の場合で 1.88 ng/kg/day であった。

(2) 食品健康影響評価

食品安全委員会の食品健康影響評価において、食品からのアフラトキシンの暴露について、以下のとおりまとめられている。

2004 年～2006 年に実施された汚染実態調査結果からアフラトキシンが含有されると思われる 11 品目を対象に確率論的手法を用いて暴露量の推定を行った結果では、AFB₁ に対して 10 μg/kg を検出限界として規制をしている現状においては、AFB₁ で 4 又は 10 μg/kg 及び総アフラトキシンで 8、15 又は 20 μg/kg の基準値を設定したとしても、AFB₁ 一日推定暴露量はほとんど変わらなかった。よって、落花生及び木の実（アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ）について、総アフラトキシンの規格基準を設定することによる食品からの暴露量に大きな影響はなく、様々な条件を前提とし不確実性を含んでいる推計ではあるが、現状の発がんリスクに及ぼす影響もほとんどないものと推察された。しかしながら、アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、食品からの総アフラトキシンの摂取は合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルにするべきである。汚染実態調査の結果、BG グループの汚染率が近年高くなる傾向が見られていることを考慮すると、落花生及び木の実について、発がんリスク及び実行可能性を踏まえ適切に総アフラトキシンの基準値を設定する必要がある。なお、アフラトキシンは自然汚染であり、BG 比率が一定しないと予想されることから、総アフラトキシンと AFB₁ の両者について規制を行うことが望ましい。

また、食品からの総アフラトキシンの摂取を合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルにするために、落花生及び木の実以外の主要な食品についても、汚染実態及び国際的な基準設定の動向等を踏まえ、総アフラトキシンの規格基準の必要性について検討を行うことが望ましいと考える。

5. 諸外国等における規制状況等

諸外国等における規制又はガイドライン値は以下のとおりである。

(1) コーデックス委員会 (CODEX STAN 193-1995, REV. 3-2007)

食 品	総アフラトキシンの 最大基準値 (μg/kg)
落花生 (加工用原料)	15
加工用木の実 ^{*1} (アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ)	15
直接消費用木の実 ^{*2} (アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ)	10

*1: 食品の原材料として使用され、若しくは加工され又は人の消費用に提供される前にアフラトキシンのレベルを低減可能な更なる加工/処理を行うことが意図されている木の実。アフラトキシンのレベルを低減可能な加工とは、殻剥き、湯通し後の色選別、比重及び色(傷)による選別をいう。ピスタチオ中のアフラトキシンは焙焼により低減するといういくつかの証拠があるが、他のナッツについての情報は無い²⁾。

*2: アフラトキシンのレベルを低減可能な更なる加工/処理を行うことが意図されていない木の実³⁾。

(2) 米国 (Compliance Policy Guide)

食 品	総アフラトキシンの 最大基準値 (μg/kg)
すべての食品	20
ブラジルナッツ	20
落花生及び加工品	20
ピスタチオ	20

(3) オーストラリア (Food Standards Code 1.4.1)

食 品	総アフラトキシンの 最大基準値 (μg/kg)
落花生	15
木の実	15

²⁾ **Treenuts destined for further processing** – nuts, which are intended to undergo an additional processing/treatment that has proven to reduce levels of aflatoxins before being used as an ingredient in foodstuffs, otherwise processed or offered for human consumption. Processes that have proven to reduce levels of aflatoxins are shelling, blanching followed by color sorting, and sorting by specific gravity and color (damage). There is some evidence that roasting reduces aflatoxins in pistachios but for other nuts the evidence is still to be supplied.

³⁾ **Ready-to-eat treenuts** – nuts, which are not intended to undergo an additional processing/treatment that has proven to reduce levels of aflatoxins.

(4) EU (COMMISSION REGULATION(EC) No 1881/2006)

食 品	最大基準値 (μg/kg)	
	アフラトキシン B ₁	総アフラトキシン
1. 落花生で、人が直接食べる又は食品の原材料として用いられる前に選別やその他の物理的処理が行われるもの	8.0	15.0
2. ナッツ類で、人が直接食べる又は食品の原材料として用いられる前に選別やその他の物理的処理が行われるもの	5.0	10.0
3. 落花生、ナッツ類及びそれらの加工品で、人が直接食べるもの又は食品の原材料として用いられるもの	2.0	4.0
4. 乾燥果実で、人が直接食べる又は食品の原材料として用いられる前に、選別やその他の物理的処理が行われるもの	5.0	10.0
5. 乾燥果実及びそれらの加工品で、人が直接食べるもの又は食品の原材料として用いられるもの	2.0	4.0
6. 穀類及びそれらの加工品（穀類の加工品を含む製品を含む）（7、9及び10の食品を除く）	2.0	4.0
7. トウモロコシで、人が直接食べる又は食品の原材料として用いられる前に、選別やその他の物理的処理が行われるもの	5.0	10.0
8. 以下の種類のスパイス類 唐辛子類（乾燥したものであって、チリ、粉唐辛子、カイエン及びパプリカを含む） コショウ類（白及び黒コショウを含む） ナツメグ ショウガ ターメリック	5.0	10.0
9. 穀類を原材料とする食品及び乳幼児用ベビーフード	0.10	
10. 乳幼児向け特殊医療目的の栄養食品	0.10	

6. 食品健康影響評価等を踏まえた対応案

厚生労働科学研究における暴露推計によると、すべての食品についてアフラトキシン B₁ を試験法の検出限界 (10ppb) で管理している現行の規制状況においては、アフラトキシン B₁ をより低いレベルで管理した場合も含め、総アフラトキシンによる規制の有無によって暴露量に顕著な差異は認められず、現状の発がんリスクに及ぼす影響もほとんどないものと考えられた。これは我が国に流通する食品において、運用している管理水準を超えてアフラトキシン B₁ を含有するものの割合が少ないためと考えられ、この結果は現行の規制が有効に機能していることを強く支持していると言える。

一方、食品安全委員会の食品健康影響評価によると、アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、食品からの総アフラトキシンの摂取は合理的に達成可能な範囲でできる限り低いレベルにするべきであるとされている。また、これまでの調査研究の結果、

- ① 落花生について、アフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ の複合汚染が増加していること
- ② 我が国で流通する落花生においてアフラトキシン B₁ より G₁ の汚染濃度が高い場合があること
- ③ 我が国は木の実の輸入国であること

等に鑑みると、落花生及び木の実（アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオ）について、コーデックス規格と同様に総アフラトキシンの規格基準を設定することは、アフラトキシン B₁ 以外のアフラトキシン類による発がん性も含めた健康被害を未然に防止する上で妥当であると考えられる。

以上を踏まえ、落花生、アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオについて、以下のとおり食品衛生法第 11 条第 1 項に基づく総アフラトキシンの成分規格を設定する。

併せて、食品中の総アフラトキシンの分析法を示す（別紙参照）。

<落花生及び木の実の総アフラトキシンに係る成分規格（案）>

食 品	総アフラトキシンの最大含有量 (μg/kg)
落花生（加工用）	15
アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオ（加工用）	15
アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオ（直接消費用）	10

なお、加工用とは、販売の用に供する前に、アフラトキシンの含有量を低減可能な製造又は加工等を行うことが意図されているものをいい、殻剥き、湯通し後の選別並びに比重及び色(傷)による選別がこの工程に該当する(ピスタチオについては焙焼を含む。)。また、直接消費用とは、上記の製造又は加工を行うことが意図されていないものをいう。

7. 検討事項

(1) 食品衛生法第6条第2号の規定の運用について

現在、アフラトキシン B₁を検出した食品は、食品衛生法第6条第2号の規定(有害・有毒物質を含む食品の販売等の禁止)に違反するものとして取り扱っており、その試験法の検出限界を10ppbとして運用している。

今般の総アフラトキシンに係る成分規格設定に伴い、当該規定の運用を見直す必要性はないか。

(2) その他主要な食品等の取扱いについて

米については、摂取量が最も多い食品であるものの、国内流通時及び輸入時の検査においてアフラトキシン類による汚染は認められていない。

また、そばやとうもろこし等については、我が国においてアフラトキシン類の汚染実態が確認されているが、アフラトキシン B₁以外のアフラトキシン類による顕著な汚染は認められていない。

今後、これらの食品について、総アフラトキシンに係る成分規格設定を検討する必要性はないか。

8. 今後の予定

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、落花生、アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオの総アフラトキシンに係る成分規格の設定について審議を行う。

(別紙) 落花生、アーモンド、ヘーゼルナッツ及びピスタチオ並びに
その加工品中の総アフラトキシン試験法

1. 分析対象物質

アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂

2. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ・質量分析計

3. 試薬、試液等¹⁾

次に示すもの以外は、食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）

第2 添加物の部 C 試薬・試液等の1. に掲げるものを用いること。

アフラトキシンB₁標準品 本品はアフラトキシンB₁ 98%以上を含む。

アフラトキシンB₂標準品 本品はアフラトキシンB₂ 98%以上を含む。

アフラトキシンG₁標準品 本品はアフラトキシンG₁ 98%以上を含む。

アフラトキシンG₂標準品 本品はアフラトキシンG₂ 98%以上を含む。

アセトニトリル 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

水 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

メタノール 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

多機能カラム 逆相樹脂、陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂を混合したものを
充てんしたもの（シリンジ型²⁾ 又は押し出し型³⁾）。

イムノアフィニティカラム アフラトキシン特異抗体を結合した単体を充てんした
もの⁴⁾。

ろ紙 Whatman No.5 又はその同等品。

ガラス繊維ろ紙 Whatman 934 AH 又はその同等品。

生理的リン酸緩衝液 (PBS) 塩化カリウム 0.20 g、リン酸一カリウム 0.20 g、リン
酸二ナトリウム（無水） 1.16 g（又はリン酸二ナトリウム 2.92 g）、塩化ナトリ
ウム 8.00 g を 900 mL の水に溶解し、0.1 mol/L 塩酸又は水酸化ナトリウムで pH
7.4 に調製し、1 L に定容する⁵⁾。

4. 試験溶液の調製

(1) 多機能カラム法

粉碎均一化した試料 50 g をブレンダー容器又は共栓付き三角フラスコ等に量り
採る。これにアセトニトリル及び水（9：1）混液 200 mL を加え、5 分間ブレ
ンド又は 30 分間振とうした後、ろ紙でろ過又は遠心分離する。ろ液 5 mL を多機能カ
ラムに静かに注入し、毎分 1.0 mL の流速で流出する。最初に溶出される流出液約
1 mL⁶⁾ を試験管に採る。

この溶液 0.5 mL をスクリーキャップ付きバイアル又は共栓付の試験管や遠心管等へ正確に量り採り、窒素気流又はエバポレータを用いて溶媒を除去する。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌する。室温、暗所で 15 分間放置した後、アセトニトリル及び水（1 : 9）混液 0.4 mL を加えたものを試験溶液⁷⁾とする。

(2) イムノアフィニティカラム法⁸⁾

粉碎均一化した試料 50 g をブレンダー容器又は共栓付き三角フラスコ等に量り採る。これにメタノール及び水（8 : 2）混液 200 mL を加え、5 分間ブレンド又は 30 分間振とうした後、ろ紙でろ過又は遠心分離する。ろ液 10.0 mL を正確に量り採り、PBS を加えて 50.0 mL とする⁹⁾。十分混合した後、ガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、ろ液 10.0 mL を正確に量り採り、イムノアフィニティカラムに注入する¹⁰⁾。全てのろ液を流出させたのち、カラムを PBS 10 mL 以上及び精製水 10 mL 以上で洗浄し¹¹⁾、加圧してカラム内の水分を完全に流出させる¹²⁾。アセトニトリル 5 mL を注入し溶出後¹³⁾、溶出液にアセトニトリルを加えて正確に 5.0 mL とし、十分混合する。

この溶液 2.5 mL をスクリーキャップ付きバイアル又は共栓付の試験管や遠心管等へ正確に量り採り、窒素気流を又はエバポレータを用いて溶媒を除去する¹⁴⁾。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌する。室温、暗所で 15 分間放置した後、アセトニトリル及び水（1 : 9）混液 0.4 mL を加えたものを試験溶液とする¹⁵⁾。

5. 検量線の作成

各アフラトキシン標準品の 0.5~16 mg/L を含むアセトニトリル及び水（1 : 9）混液の標準溶液を数点調製する。それぞれ高速液体クロマトグラフに 20 μ L を注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。

6. 定量試験

4 (1) 又は 4 (2) で得られた試験溶液を蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフに注入し、5 の検量線を用いて各アフラトキシンの含量を求める。

<測定条件>

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 4.6 mm、長さ 150 mm 又は 250 mm、
粒径 3 ~ 5 μ m¹⁶⁾

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル、メタノール及び水（1 : 3 : 6）混液

流速：1.0 mL/min

検出波長：励起波長 365 nm、蛍光波長 450 nm

注入量：20 μ L

7. 確認試験

6においてアフラトキシンが検出された場合、4 (1) 又は4 (2) で得られた試験溶液を高速液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、確認を行う。

<測定条件>

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.0 mm、長さ150 mm、粒径3～5 μm)

カラム温度：40°C

移動相：メタノール及び10 mmol/L 酢酸アンモニウム (62 : 38) 混液

流速：0.2 mL/min

注入量：5 μL

イオン化モード：ESI (+)

ドライガス流速・温度：10 L/min・350°C

ネプライザーガス圧力：345 kPa

フラグメンター電圧：100 V

モニターイオン (m/z) :

	Precorser	Target	Qualifier	CE1	CE2
AFG2	331	245	189	35	35
AFG1	329	243	200	30	30
AFB2	315	259	287	25	25
AFB1	313	241	213	45	45

<注解>

- 1) アフラトキシンは強力な発がん物質であるため、取扱いに注意すること。正確に秤量された市販品 (Sigma 社等から入手可能) を用いると便利である。また、標準溶液調製法として、AOAC 掲載の方法 (Mary W. Trucksess : Official Methods of Analysis of AOAC International (18thEdition) Chapter 49, p. 3-5, (2005)) が有用である。さらに、試験に用いた器具、前処理用カラム、検体等は、1% (v/v) 濃度の次亜塩素酸ナトリウムに2時間以上浸けた後、処理すること。
- 2) MultiSep #228 (Romer Labs 社製)、Autoprep MF-A (昭和電工(株)製) 等が使用可能である。コンディショニングを行わずそのまま用いる。使用するカラムによって溶出パターンが異なるので、標準溶液を用いて事前に溶出量を確認すること。また、使用する多機能カラムは、あらかじめアフラトキシンB₁の回収率が90%以上であることを確認すること (AOAC 掲載の方法 (Mary W. Trucksess: Official Methods of Analysis of AOAC International (18thEdition) Chapter 49, p. 26-27, (2005)) が有用である)。

- 3) MFA-1000 (昭和電工(株)製)、MycoSep #228 (Romer Labs 社製) 等が使用可能である。
- 4) AFLAKING ((株)堀場製作所製、対象：総アフラトキシン)、AflaTest WB (VICAM 社製、対象：総アフラトキシン)、EASI-EXTRACT アフラトキシン (R-BIOPHAM RHONE 社製、対象：総アフラトキシン)、AflaCLEAN (LC Tech 社製、対象：総アフラトキシン) 等が使用可能である。なお、使用前にカラム中のゲルに亀裂や気泡が生じていないことを確認し、亀裂や気泡が生じている場合には、カラム上部から注射器等で圧力を加えて除去すること。また、使用するイムノアフィニティーカラムは、あらかじめ使用条件下での総アフラトキシンの回収率がいずれも 80%以上であることを確認すること (AOAC 法 (Mary W. Trucksess : Official Methods of Analysis of AOAC International (18thEdition) Chapter 49, p. 31 (2005)) 等が有用である)。
- 5) Phosphate Buffered Saline Tablet (Sigma-Aldrich 社製) 等が使用可能である。また、イムノアフィニティーカラムによっては、PBS の代わりに精製水を使用可能なものもある。
- 6) 多機能カラム精製では、夾雑物はカラムに保持されて遅れて溶出し、アフラトキシンはカラムに保持せず常に一定の濃度で溶出されることから、初期溶出液 1.0 mL が最も精製度が高い。
- 7) 必要に応じて、遠心処理等で不溶物を除去後、試験溶液とする。
- 8) 本法は、加工食品等において多機能カラム法を用いた前処理では夾雑物や妨害物のため総アフラトキシンの定量が困難である場合に限り行うこと。
- 9) 試料抽出液を PBS で希釈すると沈殿が生じることがあり、これを直接イムノアフィニティーカラムに注入するとカラムが詰まることがあるため、その場合にはガラス繊維ろ紙によりろ過を行うこと。また、試料によっては Whatman 934 AH ろ過では沈殿を除去することができないことがあり、その場合には Whatman GF/F によるろ過が有効である。
- 10) イムノアフィニティーカラムの下部にストップコックを取り付け、これをバキュームマニホールド等に連結し、カラム内の溶液を全部流出させた後、カラム内に PBS を満たし全量を流出させ、カラムのコンディショニングを行う。その後、カラム容量の約半分の量の PBS を注入し、ストップコックを閉め、リザーバー (30.0 mL (Waters 社製) や注射器等が利用可能) とコネクターを用いて連結する。試料希釈ろ液を注入する際には、毎秒約 1 ~ 2 滴の速度で溶出するように調節する。
- 11) 洗浄する時にはストップコックで流速を調節する必要はない。また、洗浄液はカラム内をピペット等で満たし、その全量を排出させる操作を繰り返すことが有効である。着色したカラム内ゲルがなるべく脱色するように洗浄液量を調節する。

- 12) 注射器にリザーバーコネクターを取り付けたものを用意し、これをカラム上部に連結し空気を押し出すことによりカラム内水分を除去することが可能である。
- 13) アセトニトリル1 mL をカラムに注入し、自然落下で溶出させた後、5分間放置する。さらにアセトニトリル1 mL をカラムに注入し溶出させる。この操作をもう一度繰り返す。
- 14) 溶出液を蒸発乾固させる際にアフラトキシンがバイアルに吸着することがある。この場合、シラーン処理したバイアル (Supelco 社製等、使用前に20~30%アセトニトリル水等で洗浄し、乾燥させたもの) を用いることが望ましい。
- 15) トリフルオロ酢酸による蛍光誘導化 (TFA 法) のほかに、フォトケミカルリアクターによる蛍光誘導化法 (PR 法, Joshua, H. et al. : J. chromatogr A., 654, 247-254, 1993) やコブラセル法 (KC 法, Kok, W. T. et al. : J. Chromatogr., 367, 231-236, 1986, Papadopoulou-Bouraoui, A. et al. : J. AOAC Int., 85, 411-416, 2002) も応用可能である。PR 法はポストカラムで紫外線照射により生成する蛍光誘導体化合物を、KC 法はポストカラムで電気化学的に生ずるブロムにより生成するブロム誘導体化合物を測定する簡便な手法である。いずれもポストカラム反応であるため、高速液体クロマトグラフィーにおけるアフラトキシンの溶出順序が異なる (G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 の順)。PR 法及び KC 法の場合、トリフルオロ酢酸による反応を行わないため、標準溶液調製の際は、試験溶液 0.5 mL をスクリュウキャップ付バイアル又は共栓付の試験管や遠心管等に正確に量り採り、窒素気流又はエバポレータを用いて溶媒を除去後、アセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液 0.5 mL を正確に加えたものを試験溶液とする。なお、PR 法及び KC 法における高速液体クロマトグラフィーの測定条件の一例を以下に示す。

<PR 法>

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 150 又は 250 mm、粒径 3 ~ 5 μ m)、カラム温度 : 40°C、移動相 : メタノール及び水 (4 : 6) 混液、流量 : 0.7 mL/min、検出波長 : 励起波長 365 nm、測定波長 450 nm、PR 反応システム : 245 nm 低圧水銀灯 (15W) 照射システム、反応コイル : 内径 0.25 mm、長さ 15~20 m、注入量 : 20 μ L

<KC 法>

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 150 又は 250 mm、粒径 3 ~ 5 μ m)、カラム温度 : 40°C、移動相 : メタノール及び水 (4 : 6) 混液 (1L あたりに臭化カリウム 119 mg 及び 4 mol/L 硝酸 350 μ L を加える)、流量 : 1.0 mL/min、検出波長 : 励起波長 365 nm、測定波長 450 nm、KC 反応システム : コブラセル (R-Biopharm Rhône 社製)、電流 : 100 μ A、注入量 : 20 μ L

- 16) Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス社製)、Shodex Silica C18M 4E (昭和電工(株)製) 及び Cadenza CD-C18 CD006 (インタクト社製) 等が使用可能である。

府食第261号
平成21年3月19日

厚生労働大臣
舩添 要一 殿

食品安全委員会
委員長 見上 彪

食品健康影響評価の結果の通知について

平成20年9月3日付け厚生労働省発食安第0903001号をもって貴省から当委員会に意見を求められた総アフラトキシン（アフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂）に係る食品健康影響評価の結果は別添のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

かび毒評価書

総アフラトキシン

（アフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂）

2009年3月

食品安全委員会

目次

	頁
○食品安全委員会委員名簿	5
○食品安全委員会かび毒・自然毒等専門調査会専門委員名簿	5
○他の専門調査会に属する専門委員	5
要約	6
I. 背景	7
1. 経緯	7
2. 現行規制等	7
(1) 国内規制	7
(2) 諸外国等の規制またはガイドライン値	7
II. 評価対象物質の概要	9
1. 名称、分子式、分子量、構造式	9
(1) アフラトキシン B ₁ (AFB ₁)	9
① 化学名	9
② 分子式	9
③ 分子量	9
④ 構造式	9
(2) アフラトキシン B ₂ (AFB ₂)	9
① 化学名	9
② 分子式	9
③ 分子量	9
④ 構造式	9
(3) アフラトキシン G ₁ (AFG ₁)	9
① 化学名	9
② 分子式	10
③ 分子量	10
④ 構造式	10
(4) アフラトキシン G ₂ (AFG ₂)	10
① 化学名	10
② 分子式	10
③ 分子量	10
④ 構造式	10
2. 物理化学的特性	10
3. 産生生物	11
4. 発見の経緯	11

III. 安全性に係る知見の概要	12
1. 実験動物等における体内動態 (吸収、分布、代謝、排泄)	12
(1) 実験動物及び動物組織	12
① 吸収	12
② 分布	12
③ 代謝	12
④ 排泄	13
(2) ヒト組織	14
2. 実験動物等における毒性 (AFB ₁)	15
(1) 急性毒性	15
(2) 慢性毒性・発がん性	16
① 82 週間発がん性試験 (ラット、混餌投与)	16
② 104 週間発がん性試験 (ラット、混餌投与)	16
③ 生涯投与発がん性試験 (ラット、混餌投与)	17
④ 生涯投与発がん性試験 (ラット、混餌投与)	17
⑤ 88 週間発がん性試験 (ラット、混餌投与)	18
⑥ 82 週間発がん性試験 (ラット、強制経口投与)	18
⑦ 78 週間発がん性試験 (ラット、強制経口投与)	18
⑧ 86 週間発がん性試験 (ラット、強制経口投与)	18
⑨ 500 日間発がん性試験 (ラット、強制経口投与)	19
⑩ 104 週間発がん性試験 (ラット、強制経口投与)	19
⑪ 104 週間発がん性試験 (ラット、強制経口投与)	19
⑫ 66 週間発がん性試験 (ラット、強制経口投与)	20
⑬ 90 週間発がん性試験 (ラット、飲水投与)	20
⑭ 46 週間発がん性試験 (ラット、腹腔内投与)	20
⑮ 65 週間発がん性試験 (ラット、皮下投与)	20
⑯ 58 週間発がん性試験 (ラット、皮下投与)	20
⑰ 70 週間発がん性試験 (マウス、混餌投与)	21
⑱ 24 週間発がん性試験 (マウス、腹腔内投与)	21
⑲ 24 週間発がん性試験 (マウス、腹腔内投与)	21
⑳ 82 週間発がん性試験 (マウス、腹腔内投与)	21
㉑ 15 カ月間発がん性試験 (トランスジェニックマウス、腹腔内投与)	22
㉒ 78 週間発がん性試験 (ハムスター、強制経口投与)	22
㉓ 発がん性試験 (サル、腹腔内及び経口投与)	22
㉔ 172 週間発がん性試験 (ツバイ、混餌投与)	22
㉕ その他	23
(3) 生殖発生毒性	25
① 生殖毒性試験 (ラット、強制経口投与)	25

② 生殖毒性試験（ラット、強制経口投与）	25
③ 生殖毒性試験（ラット、腹腔内投与）	25
④ <i>in vitro</i> 生殖毒性試験（ラット）	25
⑤ 生殖毒性試験（マウス、混餌投与）	25
⑥ 生殖毒性試験（ウサギ、強制経口投与）	25
⑦ 生殖毒性試験（ミンク、混餌投与）	26
⑧ 発達神経毒性試験（ラット、皮下投与）	26
⑨ 発達神経毒性試験（ラット、腹腔内投与）	26
⑩ 発生毒性試験（ラット、皮下投与）	26
⑪ <i>in vitro</i> 発生毒性試験（ラット）	26
⑫ 発生毒性試験（マウス、腹腔内投与）	27
⑬ 発生毒性試験（マウス、強制経口投与）	27
⑭ 発生毒性試験（マウス、強制経口投与）	27
⑮ 発生毒性試験（ニワトリ）	27
(4) 遺伝毒性	27
① AFB1 の遺伝毒性試験	27
② AFB1 の遺伝毒性の活性への修飾因子に関する試験	28
③ AFB1 誘発腫瘍における癌原遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子に関する試験	28
(5) その他	29
① AFB1 の発がん性を修飾する因子	29
② 免疫毒性	30
3. ヒトにおける知見 (AFB1)	31
(1) 体内動態（吸収、分布、代謝、排泄）	31
(2) 急性毒性	32
(3) 発がん性	33
① 記述調査	33
② コホート調査	33
③ 症例対照調査	35
(4) 生殖発生毒性	35
(5) 遺伝毒性等	36
① 尿中及び組織中における DNA 付加体	36
② タンパク質付加体	37
③ DNA への結合の修飾因子	38
④ ヒト肝細胞癌における p53 腫瘍抑制遺伝子の突然変異	38
⑤ ヒト肝細胞癌におけるその他の遺伝的変化	38
(6) その他	39
4. AFB1 以外のアフラトキシンに関する知見	39
(1) アフラトキシン B ₂ (AFB2)	39

① 代謝	39
② 遺伝毒性	39
③ 発がん性	40
(2) アフラトキシン G ₁ (AFG1)	40
① 代謝	40
② 遺伝毒性	40
③ 発がん性	41
(3) アフラトキシン G ₂ (AFG2)	41
① 遺伝毒性	41
② 発がん性	42
5. 発がんリスクの推定 (AFB1)	42
(1) JECFA	43
(2) EFSA	44
6. 暴露状況	44
(1) 汚染実態	44
(2) 暴露量の推計 (AFB1)	48
IV. 食品健康影響評価	50
<別紙 1: 検査値等略称>	52
<別紙 2: 2004~2006 年度に実施されたアフラトキシン汚染実態調査結果>	53
<参照>	54
<参考資料>我が国におけるアフラトキシンの暴露量及び発がんリスクの試算	55

<審議の経緯>

- 2008年 9月 3日 厚生労働大臣より食品中の総アフラトキシンに係る食品健康影響評価について要請、関係書類の接受
- 2008年 9月 11日 第254回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2008年 10月 14日 第9回かび毒・自然毒等専門調査会
- 2008年 11月 17日 第10回かび毒・自然毒等専門調査会
- 2009年 2月 5日 第272回食品安全委員会（報告）
- 2009年 2月 5日 より 3月 6日 国民からの御意見・情報の募集
- 2009年 3月 16日 かび毒・自然毒等専門調査会座長より食品安全委員会委員長へ報告
- 2009年 3月 19日 第278回食品安全委員会（報告）
（同日付で厚生労働大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

見上 彪（委員長）
小泉直子（委員長代理）
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄
本間清一

<食品安全委員会かび毒・自然毒等専門調査会専門委員名簿>

佐竹元吉（座長）	塩見一雄
高鳥浩介（座長代理）	渋谷 淳
荒川 修	豊田正武
大島泰克	伏谷伸宏
河合賢一	矢部希見子
熊谷 進	山浦由郎
合田幸広	芳澤宅實
小西良子	

<他の専門調査会に属する専門委員>

広瀬明彦
本間正充
（2008年11月17日 第10回かび毒・自然毒等専門調査会）

要 約

総アフラトキシン（アフラトキシン B₁、B₂、G₁及びG₂）について、JECFA、EFSA及びIARCの資料等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績は、体内動態試験、急性毒性試験、慢性毒性・発がん性試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験、ヒトにおける疫学調査結果等である。

アフラトキシン B₁（AFB₁）の遺伝毒性については、*in vitro*及び*in vivo*ともに広範な試験が実施されており、そのほとんどにおいて陽性の結果が得られている。

発がん性については、ほとんどの動物種において肝臓が標的器官であり、肝細胞癌が最も多く認められた。

非発がん毒性については、実験動物において生殖パラメーターの異常、催奇形性、免疫毒性などが認められた。

人における疫学調査のほとんどにおいて AFB₁ 暴露と肝細胞癌との相関が指摘されている。これらの調査はアフラトキシンの暴露量が多く、かつ、HBV の罹患率が高い地域で実施されており、HBV 感染はリスク因子であることが示唆されている。

AFB₁ 以外のアフラトキシンについては、アフラトキシン G₁ では遺伝毒性及び発がん性が認められた。アフラトキシン B₂ 及び G₂ に関するデータは限られている。

IARC では、自然界で生じるアフラトキシン混合物はヒトに対して発がん性がある物質（グループ1）と分類している。

上記のことから、総アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、発がんリスクによる評価が適切であると判断された。一方、非発がん影響に関しては、TDIを設定するための定量的評価に適用できる報告はなく、非発がん性を指標としたTDIを求めることは困難と判断された。発がんリスクについては、人の疫学調査の結果から、体重1kgあたり1ng/日の用量で生涯にわたりAFB₁に経口暴露した時の肝臓癌が生じるリスクとして、HBsAg陽性者では0.3人/10万人/年（不確実性の範囲0.05～0.5人/10万人/年）、HBsAg陰性者では0.01人/10万人/年（不確実性の範囲0.002～0.03人/10万人/年）となった。

暴露量の推定結果から、AFB₁に対して10µg/kgを検出限界として規制をしている現状においては、落花生及び木の実（アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ）について、総アフラトキシンの規格基準を設定することによる食品からの暴露量に大きな影響はなく、現状の発がんリスクに及ぼす影響もほとんどないものと推察された。しかしながら、アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、食品からの総アフラトキシンの摂取は合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルにするべきである。汚染実態調査の結果、BGグループの汚染率が近年高くなる傾向が見られていることを考慮すると、落花生及び木の実について、発がんリスク及び実行可能性を踏まえ適切に総アフラトキシンの基準値を設定する必要がある。

1. 背景

1. 経緯

現在、我が国においては、アフラトキシン B₁ (AFB₁) を検出した食品は食品衛生法第 6 条第 2 号に違反するものとして規制されているところであるが、コーデックス委員会における木の実へのアフラトキシンの規格策定の動き等を受け、厚生労働省では平成 16 年度から厚生労働科学研究費等で食品中のアフラトキシンについて調査研究を行ってきた。

当該調査研究の結果を踏まえ、2008 年 7 月 8 日に厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において審議が行われた結果、

- ① 落花生について、AFB₁、アフラトキシン B₂ (AFB₂)、アフラトキシン G₁ (AFG₁) 及びアフラトキシン G₂ (AFG₂) の複合汚染が増加していること
- ② 我が国で流通する落花生において AFB₁ より AFG₁ の汚染濃度が高い場合があること
- ③ 我が国は、木の実の輸入国であること

等に鑑み、現在の規制に加えて、今後、落花生及び木の実（アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ）について、コーデックス規格と同様に総アフラトキシン (AFB₁、AFB₂、AFG₁ 及び AFG₂) の規格基準の設定を検討するとの結論が得られた。

この結論を受け、食品安全委員会は、厚生労働省より、食品安全基本法第 24 条第 1 項第 1 号の規定に基づき、食品中の総アフラトキシンに係る食品健康影響評価について意見を求められた。（参照 1）

2. 現行規制等

(1) 国内規制

全ての食品において、AFB₁ が不検出（昭和 46 年 3 月 16 日付環食第 128 号）（総アフラトキシンに関する規制なし）

(2) 諸外国等の規制またはガイドライン値

諸外国等における規制またはガイドライン値は表 1～4 に示すとおりである。

表 1 コーデックス委員会 (CODEX STAN 193-1995, REV. 3-2007)

食品	総アフラトキシンの最大基準値 (µg/kg)
落花生 (加工原料用)	15
直接消費用木の実 (アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ)	10
加工用木の実 (アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ)	15

表 2 米国 (Compliance Policy Guide)

食品	総アフラトキシンの最大基準値 (µg/kg)
全ての食品	20
ブラジルナッツ	20
落花生及び加工品	20
ピスタチオ	20

表 3 オーストラリア (Food Standards Code 1.4.1)

食品	総アフラトキシンの最大基準値 (µg/kg)
落花生	15
木の実	15

表 4 EU (COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006)

食品	最大基準値 (µg/kg)	
	AFB ₁	総アフラトキシン
1. 落花生であって、人が直接食べる、または食品の原材料として用いられる前に、選別やその他の物理的処理が行われるもの	8.0	15.0
2. ナッツ類であって、人が直接食べる、または食品の原材料として用いられる前に、選別やその他の物理的処理が行われるもの	5.0	10.0
3. 落花生、ナッツ類及びそれらの加工品で人が直接食べるもの、または食品の原材料として用いられるもの	2.0	4.0
4. 乾燥果実であって、人が直接食べる、または食品の原材料として用いられる前に、選別やその他の物理的処理が行われるもの	5.0	10.0
5. 乾燥果実及びそれらの加工品で人が直接食べるもの、または食品の原材料として用いられるもの	2.0	4.0
6. 穀類及びそれらの加工品（穀類の加工品を含む製品を含む）（7、9 及び 10 の食品を除く）	2.0	4.0
7. トウモロコシであって、人が直接食べる、または食品の原材料として用いられる前に、選別やその他の物理的処理が行われるもの	5.0	10.0
8. 以下の種類のスパイス類 唐辛子類（乾燥したものであって、チリ、粉唐辛子、カイエン、パブリカを含む） コショウ類（白及び黒コショウを含む） ナツメグ ショウガ ターメリック	5.0	10.0
9. 穀類を原材料とする食品及び乳幼児用ベビーフード	0.10	
10. 乳幼児向け特殊医療目的の栄養食品	0.10	

(参照 3)

II. 評価対象物質の概要

1. 名称、分子式、分子量、構造式

(1) アフラトキシン B₁ (AFB₁)

① 化学名

CAS (No. 1162-65-8)

和名：(6a*R*,9a*S*)-2,3,6a,9a-テトラヒドロ-4-メトキシシクロペンタ[d]フロ-
(3',2':4,5)フロ[2,3-*h*] [L]ベンゾピラン-1,11-ジオン(9CI)

英名：(6a*R*,9a*S*)-2,3,6a,9a-Tetrahydro-4-methoxycyclopenta[d]furo-
(3',2':4,5)furo[2,3-*h*] [L]benzopyran-1,11-dione (9CI)

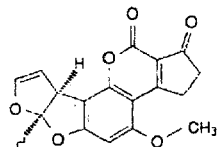
② 分子式

C₁₇H₁₂O₆

③ 分子量

312.3

④ 構造式



(2) アフラトキシン B₂ (AFB₂)

① 化学名

CAS (No. 7220-81-7)

和名：(6a*R*,9a*S*)-2,3,6a,8,9,9a-ヘキサヒドロ-4-メトキシシクロペンタ [d]-
フロ[3',2':4,5]フロ[2,3-*h*] [L]ベンゾピラン-1,11-ジオン(9CI)

英名：(6a*R*,9a*S*)-2,3,6a,8,9,9a-Hexahydro-4-methoxycyclopenta[d]-
furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*] [L]benzopyran-1,11-dione (9CI)

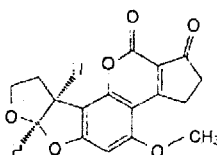
② 分子式

C₁₇H₁₄O₆

③ 分子量

314.3

④ 構造式



(3) アフラトキシン G₁ (AFG₁)

① 化学名

CAS (No. 1165-39-5)

和名：(7a*R*,10a*S*)-3,4,7a,10a-テトラヒドロ-5-メトキシ-1*H*,12*H*-フロ-
[3',2':4,5]フロ[2,3-*h*]ピラノ[3,4-*d*] [L]ベンゾピラン-1,12-ジオン(9CI)

英名：(7a*R*,10a*S*)-3,4,7a,10a-Tetrahydro-5-methoxy-1*H*,12*H*-furo-
[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*d*] [L]benzopyran-1,12-dione (9CI)

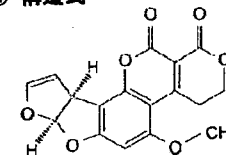
② 分子式

C₁₇H₁₂O₇

③ 分子量

328.3

④ 構造式



(4) アフラトキシン G₂ (AFG₂)

① 化学名

CAS (No. 7241-98-7)

和名：(7a*R*,10a*S*)-3,4,7a,9,10,10a-ヘキサヒドロ-5-メトキシ-1*H*,12*H*-フロ-
[3',2':4,5]フロ[2,3-*h*]ピラノ[3,4-*d*] [L]ベンゾピラン-1,12-ジオン(9CI)

英名：(7a*R*,10a*S*)-3,4,7a,9,10,10a-Hexahydro-5-methoxy-1*H*,12*H*-furo-
[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*d*] [L]benzopyran-1,12-dione (9CI)

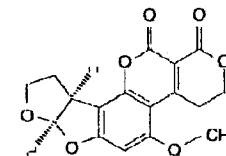
② 分子式

C₁₇H₁₄O₇

③ 分子量

330.3

④ 構造式



(参照13)

2. 物理化学的特性

物理的性状：無色から淡黄色の結晶。紫外線照射下で強い蛍光を発生し青色 (Blue) のものが B グループ、緑色 (Green) のものが G グループと命名された。AFB₁ 及び AFB₂ は青色、AFG₁ は緑色、AFG₂ は青緑色の蛍光を発生する。

融点：表 5 参照

吸収スペクトル：表 5 参照

溶解性：水にはわずかに溶解 (10~30 µg/mL)

非極性溶媒には不溶性

中程度の極性を有する有機溶媒 (クロロホルム等)、メタノール及びジメチルスルホキシドには易溶性

安定性：食品中のアフラトキシンは安定性が極めて高く、通常の加熱調理条件等

ではほとんど分解されない。純粋なアフラトキシンは酸素存在下での紫外線照射、強酸条件下 (pH 3 以下) や強アルカリ条件下 (pH 10 以上) 等の強い条件下では分解されるとされている。

反応性：アルカリ条件下では、ラクトン環が開くが、可逆的反応である (酸を加えると閉環する)。アルカリ条件下で加熱すると、ラクトン環が開いて、脱炭酸が起こり分解し、さらにメトキシル基が脱離して芳香環化する。

表5 アフラトキシンの融点及び紫外外部吸収

名称	融点 (°C)	紫外外部吸収 (エタノール)	
		λ_{max} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
AFB1	268~269 (分解)	223	25,600
		265	13,400
		362	21,800
AFB2	286~289 (分解)	265	11,700
		363	23,400
AFG1	244~246 (分解)	243	11,500
		257	9,900
		264	10,000
		362	16,100
AFG2	237~239 (分解)	265	9,700
		363	21,000

(参照9、13)

3. 産生生物

アフラトキシンは主に真菌類の不完全菌類に属するかびである *Aspergillus flavus* 及び *Aspergillus parasiticus* によって産生される二次代謝産物の毒素である。これらの菌は、土壌や食品など自然界に広く分布する。アフラトキシンを産生する主要な菌の種類及び産生するかび毒については表6に示されている。

表6 食品におけるアフラトキシンの産生に関連する主要な *Aspergillus* 属かびの種類

	かび毒の産生		主要な発生源	地理的分布
	AFB	AFG		
<i>A. flavus</i>	+	-	各種食品	温暖な地域
<i>A. parasiticus</i>	+	+	落花生	特定の地域
<i>A. nomius</i>	+	+	蜂	米国、タイ

AFB: アフラトキシン B グループ AFG: アフラトキシン G グループ

(参照13)

4. 発見の経緯

アフラトキシンは、1960年に英国で10万羽以上の七面鳥が死亡した中毒事件の原因物質として、飼料に使用されていたブラジル産ピーナッツミールから発見された。主な産生菌である *A. flavus* (アスペルギルス フラバス) の毒素 (毒: toxin) という意味から、アフラトキシン (Aflatoxin) と命名された。(参照9)

III. 安全性に係る知見の概要

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) (1998 及び 2008 年)、欧州食品安全機関 (EFSA) (2007 年)、国際がん研究機関 (IARC) (1993 及び 2002 年) の資料等を基に、安全性に関する主な科学的知見を整理した。(参照11, 12, 13, 14, 15)

検査値等略称は別紙1に示されている。

1. 実験動物等における体内動態 (吸収、分布、代謝、排泄)

(1) 実験動物及び動物組織

① 吸収

AFB1 は、ヒツジ及びラットでは消化管から吸収され、血液を介して輸送された。ラットでは、AFB1 の気管内注入後の吸収は経口投与よりも速やかであったが、体内分布及び排泄パターンには、投与経路の影響はみられなかった。

AFB1 をラット血漿と混和、または AFB1 をラットに腹腔内投与した結果、AFB1 は主要な輸送タンパク質であると考えられているアルブミンと非共有結合した。(参照12)

② 分布

静脈内投与後の AFB1 の挙動を動物種間で比較した結果、ラット及びサル (AFB1 の急性毒性に対して感受性が高い) では、マウス (感受性が低い) に比してアフラトキシンの分布容積は大きく、血漿及び肝臓中濃度が高く、血漿での消失半減期も長かった。

ラットに 20 µg の ¹⁴C-AFB1 を腹腔内投与した結果、乳汁中に主として AFB1 の水酸化体であるアフラトキシン M₁ (AFM1) (図1参照) が排泄された。AFM1 は、乳児ラットの肝臓及び肺にタンパク質及び RNA 等の高分子化合物と結合した形で存在したが、DNA との結合は検出されなかった。AFM1 は種々の哺乳動物 (ヒツジ、ヤギ、乳牛) において乳汁中に排泄されることが認められている。

ラットに 7 mg/kg 体重の ¹⁴C-AFB1 を腹腔内または経口投与した結果、投与30分後に肝臓で AFB1 及び AFM1 の濃縮が認められたが、24時間後にはいずれも痕跡量に減少した。マウスを用いた全身オートラジオグラフィによる体内分布試験では、AFB1 及び代謝物は鼻腺、網膜色素細胞、ハーダー腺色素中に濃縮された。ウシのメラニンを用いた *in vitro* の試験では、未変化の AFB1 と色素との可逆的結合が認められた。(参照12)

③ 代謝

生体内において AFB1 はミクロソーム系により、AFM1、アフラトキシン P₁ (AFP1)、アフラトキシン Q₁ (AFQ1) 及び活性代謝物と推定される AFB1-8,9-エポキシド等、種々の代謝物に代謝される (図1参照) が、動物種間でこれら代

謝物の量比にかなりのばらつきがある。

*in vitro*での肝ミクロソームによる主要代謝物は、マウスではAFP1であったが、ラットではAFQ1であった。サイトゾールの酵素によりアフラトキシコール(図1参照)が生成されたが、アフラトキシコールH₁及びM₁は、サイトゾールとミクロソームの酵素の組合わせで生成された。

*in vivo*においてAFB1の発がん性に対する感受性が低いマウスなどの動物種では、AFP1が多く生成され、血漿中のアフラトキシコール濃度は低かった。¹⁴C-AFB1を静脈内投与したラットでは、アフラトキシコールは投与50分後の血清中の主要代謝物として認められたが、マウス及びサル血清中では検出されなかった。

AFB1に暴露されたラットでは、AFB1のエポキシ化に続いてDNA付加体が形成された。

ラットにおいて、薬剤の投与によって肝臓サイトゾールのグルタチオン抱合化活性を増加させると、同活性に反比例して*in vivo*でのAFB1のDNA結合が減少することが認められた。また、AFB1主要代謝物は硫酸抱合化またはグルクロン酸抱合化を受けることも認められている。

代謝活性体であるAFB1エポキシドを含め、ミクロソームによるAFB1代謝物の生成は、シトクロムP450(CYP)の誘導によって影響を受けた。AFB1-8,9-ジヒドロジオールはAFB1-8,9-エポキシドの水酸化によって生成され、さらに中性pHでシッフ塩基反応によりタンパク結合性の化合物となった。*in vivo*では、血清アルブミンのリジンにシッフ塩基反応で結合したAFB1が認められる。(参照12)

④ 排泄

ラット、ヒツジ、ブタ及び乳牛では、尿中にAFM1が総投与放射能(TAR)の2~9%の割合で検出された。AFB1を腹腔内投与したアカゲザルでは、尿中にAFM1が2.3%TAR、抱合化されたAFP1がTARの20%以上の割合で検出された。抱合体は尿中代謝物の60%(グルクロン酸抱合体50%、硫酸抱合体10%)を占め、3%が非抱合体であった。

AFB1に暴露されたラットで形成されたAFB1-N7-グアニンは脱プリンによりDNAから放出され、暴露後24時間で大部分が用量依存的に尿中に排泄された。1mg/kg体重のAFB1を腹腔内投与したラットでは、肝臓中に存在したDNA付加体の30~40%が48時間で排泄された。

¹⁴C-AFB1を腹腔内投与したラットでは、AFB1の代謝物は尿中より糞中に多く排泄され、グルタチオン抱合体ではその大部分が胆汁を介して排泄された。

ラット腎組織においては、メルカプツール酸経路の酵素によるAFB1-グルタチオン抱合体の分解が*in vitro*で認められており、硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体と共に尿中に排泄されるAFB1-メルカプツール酸の濃度は、動物種の

AFB1に対する感受性に相関していた。(参照12)

(2) ヒト組織

ヒト肝ミクロソームによりAFB1は代謝活性化される。すなわち、付加体の水酸化によって生成されるAFB1-8,9-ジヒドロジオールが認められたことから、中間代謝物としてAFB1-8,9-エポキシドが生成されることが示された。ヒト肝ミクロソームによる代謝によってAFQ1(水溶性代謝物の70~90%)、AFB1-8,9-ジヒドロジオール(10~30%)及びAFM1(痕跡量)が生成された。ヒト肝サイトゾールでは、AFB1-グルタチオン抱合体生成の触媒能力は低かった。

しかし、 μ クラス1のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を有する24人の健康者から得られた肝サイトゾールは、このクラスの酵素を遺伝的に欠損している人の肝サイトゾールに比べ、AFB1のDNAへの結合をより強く阻害した。

タイにおける肝癌患者20人の肝組織を用いて、CYP分子種及びGST活性について検討した試験においては、CYP活性に個人差があり、CYP3A4で57倍、CYP2B6で56倍、CYP2A6で120倍の差異がみられた。肝ミクロソームによるAFB1のAFB1-8,9-エポキシドとAFQ1への代謝は、CYP3A3/4及びCYP2B6の濃度と関連していた。癌細胞では主要なCYPの減少がみられ、サイトゾールのGSTについては、 α 及び μ クラス¹の活性は低下し、 π クラス¹は増加していた。また、癌細胞ではGST活性は低下していた。肝ミクロソームでは、AFB1の8,9-エポキシドのグルタチオン抱合化は認められなかった。

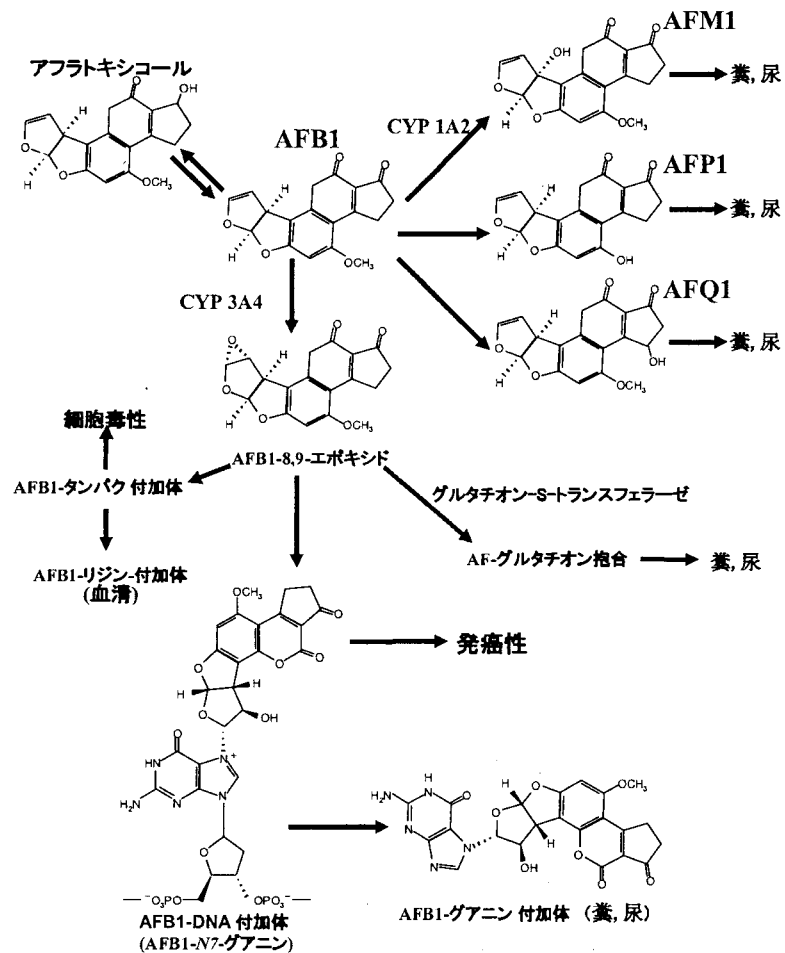
B型肝炎ウイルス(HBV)及びC型肝炎ウイルス(HCV)に感染した肝細胞では、CYP2A6、CYP3A4、CYP2B1濃度は増加したが、CYP1A2に影響はみられなかった。

ヒト気管支及び結腸の培養系においても、AFB1はDNA結合性の化合物に代謝され、代謝活性は結腸よりも気管支において高かった。形成された付加体はAFB1-N7-グアニン(8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxyafatoxin B₁)及びイミダゾールの開環したAFB1(8,9-dihydro-8-(N5-formyl-2',5',6'-triamino-4'-oxo-N5-pyrimidyl)-9-hydroxyafatoxin B₁)であった。(参照12、13)

以上より、ヒトや動物に摂取されたAFB1は水酸化体で代謝され、AFM1、AFP1、AFQ1等として、または抱合体に転換されて、尿中または糞中に排泄されることが示された。哺乳動物の場合は、乳中にもAFM1などが排泄される。また、肝臓の薬物代謝酵素であるCYPによる代謝を受けてDNA結合性のAFB1-8,9-エポキシドが生成され、DNA付加体が形成される。AFB1-N7-グアニンは脱プリンによりDNAから放出されて尿中に排泄される(図1参照)。

1: 化学物質の解毒作用等に関わるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)は、アミノ酸相同性の程度の違いから α 、 μ 、 π など数種類のクラスに分類される。

図1 AFB1の主な代謝経路



2. 実験動物等における毒性 (AFB1)

(1) 急性毒性

経口投与による半数致死量 (LD₅₀) は表 7 に示されている。

AFB1 はヒト及び実験動物で急性肝毒性を引き起こすことが認められている。

雄のウサギに AFB1 及び AFB2 の混合物が、総量として 0~10mg/kg 体重となるように 24 時間間隔で半量ずつ皮膚に局所投与され、初回投与 48 時間後の肝臓の所見が評価された。16 µg/kg 体重以上の投与では、いずれも肝障害が誘発さ

れ、グリコーゲンの減少がみられた。さらに、1,400 µg/kg 体重以上の場合には、10 匹中 8 例に肝細胞の脂肪変性を伴う小葉中間帯壊死、細胞質の硝子様好酸性変化が認められた。一方、50 µg/kg 体重未満の投与では肝臓に病変は認められなかった。(参照 2、9、12)

表 7 各種動物における AFB1 の LD₅₀

動物種	LD ₅₀ 値 (mg/kg 体重)
ラット (雄)	5.5~7.2
ラット (雌)	7.4~17.9
マウス	9.0
ウサギ	0.3-0.4
サル	2.2~7.8
ブタ	0.62~1.0
イヌ	0.5~1.0
ヒツジ	1.0~2.0
ニワトリ	6.5
ニジマス	0.8

(2) 慢性毒性・発がん性

① 82 週間発がん性試験 (ラット、混餌投与)

Fischer ラット (一群雌雄各 25 匹) に、AFB1 を 0、15、300、1,000 µg/kg 飼料の濃度で 52 週間または腫瘍発生時まで混餌投与 (基礎飼料: 半合成飼料) する発がん性試験が実施された。さらに一群 (雌雄各 25 匹) を設定し、AFB1 を 1,000 µg/kg 飼料の濃度で 14 週間混餌投与した後、15 週から試験終了まで対照飼料で飼育した。

肝細胞癌の発生頻度及び発生時期は表 8 に示されている。

15 µg/kg 飼料以上投与群の雌雄で肝細胞癌、肝細胞腺腫、肝前癌病変 (変異肝細胞巢) が認められた。また、15 µg/kg 飼料投与群の雄 1 例に、投与 68 週で結腸腺癌が認められた。1,000 µg/kg 飼料の 14 週間投与群の試験 82 週における肝細胞癌の発生頻度は、雄で 1/16、雌で 1/13 であった。(参照 12)

表 8 肝細胞癌の発生頻度及び発生時期

投与量 (µg/kg 飼料)	0	15	300	1,000	
雄	発生頻度	0/25	12/12	6/20	18/22
	発生時期 (週)	-	68	35~52	35~41
雌	発生頻度	0/25	13/13	11/11	4/4
	発生時期 (週)	-	80	60~70	64

② 104 週間発がん性試験 (ラット、混餌投与)

雄の Fischer ラットに、0、1、5、15、50、100 µg/kg 飼料の濃度で AFB1 を混餌投与 (基礎飼料: 半合成飼料) し、臨床症状の悪化が観察されるまで投与を継続する発がん性試験が実施された。

肝細胞癌及び過形成細胞巢の発生頻度及び発生時期は表 9 に示されている。

全投与群において、肝前癌病変（過形成細胞巣及び変異肝細胞巣）及び肝細胞癌の発生頻度が用量及び投与期間に依存して増加した。（参照12）

表9 肝細胞癌及び過形成細胞巣の発生頻度及び発生時期

投与量 (µg/kg 飼料)		0	1	5	15	50	100
過形成細胞巣	発生頻度	1/18	7/22	5/22	13/22	15/25	12/28
	発生時期 (週)	-	104	93	96	82	54
肝細胞癌	発生頻度	0/18	2/22	1/22	4/21	20/25	28/28
	発生時期 (週)	-	104	93	96	82	54

③ 生涯投与発がん性試験（ラット、混餌投与）

Wistar ラット（一群雄 16~26 匹）に、0、250、500 または 1,000 µg/kg 飼料の AFB1 を 147 日間混餌投与し、その後は死亡まで基礎飼料を摂取させる発がん性試験が実施された。

肝細胞癌及び腎細胞腫瘍の発生頻度及び平均発生時期は表 10 に示されている。

0、250、500 及び 1,000 µg/kg 飼料 投与群における 100 日以上生存率は、それぞれ 24/26、13/16、18/18 及び 14/17 であった。無処置群を除く全投与群で肝細胞癌及び腎細胞腫瘍が認められた。100 日以上生存した投与群の動物の肝臓には、過形成結節も観察された。また、腎細胞腫瘍では明細胞及び顆粒細胞を含む種々の細胞から構成される乳頭状、管状及び胞巣状の増殖巣を形成し、一部の腎臓では尿管管の好塩基性の過形成性尿管も観察された。（参照12）

表 10 肝細胞癌及び腎細胞腫瘍の発生頻度及び平均発生時期

投与量 (µg/kg 飼料)		0	250	500	1,000
肝細胞癌	発生頻度	0/24	8/13	13/18	12/14
	発生時期 (日)	-	742	622	611
腎細胞腫瘍	発生頻度	0/24	3/13	5/18	8/14
	発生時期 (日)	-	783	696	603

④ 生涯投与発がん性試験（ラット、混餌投与）

Porton ラット（一群雌雄各 6~36 匹）に、0、100 または 500 µg/kg 飼料の aflatoxin (AFB1 : 10,000 µg/kg 飼料、AFB2 : 200 µg/kg 飼料を含む飼料) を用いて調製を生生涯混餌投与、または雄ラットに 5,000 µg/kg 飼料の AFB1 を最初の 1~9 週間投与し、その後対照飼料を摂取させる発がん性試験が実施された。

生涯投与における肝細胞癌の発生頻度は表 11 に示されている。

雄ラットに 5,000 µg/kg 飼料の AFB1 を 1~9 週間投与した結果、肝細胞癌の発生頻度が投与期間に関連して増加した(1 週で 0/13、3 週で 3/20、6 週で 12/19、9 週で 6/6)。本試験では肝細胞癌のほかにも少数であるが腎臓（腎盂の移行上皮腫及び癌：5/53）、胃（腺胃癌：2/53）、肺及び唾液腺にも腫瘍が認められた。（参照12）

表 11 生涯投与における肝細胞癌発生頻度

投与量 (µg/kg 飼料)	0	100	500
雄	0/46	17/34	25/25
雌	0/34	5/30	26/33

⑤ 88 週間発がん性試験（ラット、混餌投与）

ラット（系統不明、一群雄 30 匹）に、0 または 1,000 µg/kg 飼料の AFB1 を 15 週間混餌投与後、16 週から 88 週まで対照飼料を摂取させる発がん性試験が実施された。

投与開始 16 週後で投与群の動物に空胞化した肝細胞巣が観察され、68 週後には肝細胞癌が認められた。88 週間における肝細胞癌の累積発生数は 40% に達した。（参照12）

⑥ 82 週間発がん性試験（ラット、強制経口投与）

Fischer ラット（一群雌雄各 30 匹）に、0 または 80 µg/ラット/日の AFB1 を溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて 5 日間強制経口投与、または 40 µg/ラット/日の AFB1 を 10 日間強制経口投与する発がん性試験が実施された。

80 µg/ラット/日投与群では、最終投与後 14 日間で投与群の雄全例が死亡した。雌の死亡率は試験 35 週で 11/30 であった。82 週まで生存した雌 16 匹中 2 例に肝細胞腺腫、3 例に肝前癌病変（変異肝細胞巣）が認められた。

40 µg/ラット/日投与群では、急性毒性による死亡はみられなかった。試験 35 週または 82 週まで生存した動物における肝細胞癌の発生率は、雄で 4/20、雌で 0/20、82 週での肝細胞腺腫の発生率は雄で 1/19、雌で 6/17 であり、雌雄に肝前癌病変（変異肝細胞巣）が認められた。

雄ラット（20~22 匹）に 5 mg/kg 体重 (LD₅₀ 値) の AFB1 を単回強制経口投与した結果、69 週まで生存した 5 匹中 1 例に肝細胞腺腫、3 例に肝前癌病変（変異肝細胞巣）が認められた。（参照12）

⑦ 78 週間発がん性試験（ラット、強制経口投与）

Fischer ラット（一群雄 10~20 匹）に、0、25、37.5 または 70 µg/ラット/日の AFB1 を 2~8 週間強制経口投与（4~5 回/週、溶媒：DMSO）する、発がん性試験が実施された。なお、各群の AFB1 の総投与用量は 0、500、630、1,000、1,500 µg/ラットであった。

肝細胞癌の発生頻度及び発生時期は表 12 に示されている。

全投与群において肝細胞癌が高頻度に認められ、肝前癌病変（過形成細胞巣及び変異肝細胞巣）も観察された。（参照12）

表 12 肝細胞癌の発生頻度及び発生時期

総投与量 (µg/ラット)	0	500	630	1,000	1,500
発生頻度	0/10	7/7	2/4	18/18	17/17
発生時期 (週)	-	74	75	42~58	42~46

⑧ 86 週間発がん性試験（ラット、強制経口投与）

Wistar ラット（一群雄 18~36 匹）に、0 または 50 µg/ラットの AFB1 を週 2

回4週間強制経口投与(溶媒:DMSO)した後、0または75 µg/ラットのAFB1を週2回10週間強制経口投与し、最長86週間飼育する発がん性試験が実施された。

投与開始44週以降、総投与量1,900 µgで70%の動物に肝細胞癌及び肝細胞・胆管細胞癌が誘発された。投与開始15週後から変異肝細胞巢(明細胞、好酸性細胞及び強好塩基性細胞のγ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)陽性巢)が認められ、時間と共にその数及びサイズが増大し、過形成性結節の形成が認められた。(参照12)

⑨ 500日間発がん性試験(ラット、強制経口投与)

Wistar ラット(一群雌雄各25匹)に、0、100 µg/ラット(雄)または75 µg/ラット(雌)のAFB1を週2回5週間強制経口投与(溶媒:DMSO)した後、0、20 µg/ラット(雄)または15 µg/ラット(雌)のAFB1を週2回10週間強制経口投与し、投与群の動物は最長486日間、対照群は最長500日間飼育する発がん性試験が実施された。

AFB1投与群の腫瘍発生頻度及び発生時期は表13に示されている。

AFB1投与群では、投与休止184日後からすべての動物に前癌性異状病変(増殖性)が認められ始め、386日以降には肝細胞癌の発生が認められた。肝細胞癌の多くが胆管細胞腺腫を伴っていた。AFB1によって誘発された肝細胞癌発生過程では、肝臓及び糞中のポルフィリン増加、肝臓のGGT濃度の上昇を伴った。(参照12)

表13 腫瘍発生頻度及び発生時期

	良性肝腫瘍		悪性肝腫瘍	
	発生時期(日)	発生頻度	発生時期(日)	発生頻度
雄	265	14/22	386	8/8
雌	295	10/26	417	5/8

⑩ 104週間発がん性試験(ラット、強制経口投与)

Wistar ラット(一群雌66~120匹)に、0または5,000 µg/kg体重のAFB1を単回強制経口投与(溶媒:オリーブオイル)する発がん性試験が実施された。

AFB1投与群では、投与数日後に29匹が死亡し、52~104週後までに8匹が死亡した。投与8週後には変異肝細胞巢(虎斑状細胞巢)が認められ、その数及びサイズは104週後まで増加した。投与78週後まで生存した動物の10/26に肝細胞腺腫(腫瘍性結節)の発生がみられた。(参照12)

⑪ 104週間発がん性試験(ラット、強制経口投与)

Wistar ラット(一群15~30匹)に、0または50 µg/ラットのAFB1を週2回4週間強制経口投与(溶媒:DMSO)した後、0または75 µg/ラットのAFB1を10週間投与する発がん性試験が実施された。

AFB1投与群では、投与開始22週後から前癌性肝細胞巢(明細胞、混合細胞、及び慢性好塩基性及び虎斑状細胞巢)が認められた。(参照12)

⑫ 66週間発がん性試験(ラット、強制経口投与)

Fischer ラット(一群雄56匹)に、0または25 µg/ラットのAFB1を週5回8週間強制経口投与(溶媒:DMSO)、もしくは0または70 µg/ラットのAFB1を2週間に9回強制経口投与する発がん性試験が実施された。

肝の腫瘍性結節と肝細胞癌の発生頻度及び発生時期は表14に示されている。

25 µg/ラットの8週間投与群では、前癌性肝細胞巢が最終投与2週後に観察されたのに対して、70 µg/ラットの2週間投与群で同所見が認められたのは6~14週後であった。(参照12)

表14 肝の腫瘍性結節と肝細胞癌の発生頻度及び発生時期

投与量(投与期間)	25 µg/ラット(8週間)		70 µg/ラット(2週間)	
	発生時期(週)	発生頻度	発生時期(週)	発生頻度
肝の腫瘍性結節	32	6/10	66	3/13
肝細胞癌	47	3/10	66	1/13

⑬ 90週間発がん性試験(ラット、飲水投与)

MRC ラット(一群雌雄各10~15匹)に、AFB1を0または20 µg/ラットの用量で10または20週間飲水投与(5日/週、遮光給水瓶使用)する発がん性試験が実施された。

AFB1投与群の試験90週における生存率は、10週間投与群で4/10(雄のみ)、20週間投与群で12/30(雌雄合計)であった。AFB1投与により肝細胞腫瘍が誘発され、その発生頻度は20週間投与群の雄で8/15、雌で11/15、10週間投与群の雄で3/10であった。投与群の動物の肝臓には過形成結節及び嚢胞腺腫も観察された。その他に、2例に腎細胞腫瘍が認められた。(参照12)

⑭ 46週間発がん性試験(ラット、腹腔内投与)

雄のFischer ラットに、0または32.5 µg/ラットのAFB1を週5回8週間腹腔内投与(総投与量:1,300 µg/ラット、溶媒:DMSO)した結果、投与群では46週で9匹中9例に肝細胞癌が認められた。(参照12)

⑮ 65週間発がん性試験(ラット、皮下投与)

雄ラット(系統不明6匹)に、0または20 µg/ラットのAFB1を週2回65週間皮下投与(溶媒:落花生油)した結果、投与群では18~37週で6匹中6例に皮下肉腫が認められた。(参照12)

⑯ 58週間発がん性試験(ラット、皮下投与)

雄のFischer ラットに、0または10 µg/ラットのAFB1を週2回20週間皮下

投与（溶媒：トリオクタノイン）した結果、投与群では58週で9匹中9例の投与部位の皮下に肉腫が認められた。（参照12）

⑬ 70 週間発がん性試験（マウス、混餌投与）

3系統（Swiss、C3H、C57BL）のマウスに、AFB1を1,000 µg/kg 飼料の濃度で70週間混餌投与した結果、発がん性は認められなかった。（参照12）

⑭ 24 週間発がん性試験（マウス、腹腔内投与）

A/He マウス（一群雌16匹）に、0または2,000 µg/kg 体重のAFB1を週3回4週間腹腔内投与（総平均投与量：5,600 µg/ラット、溶媒：DMSO）する発がん性試験が実施された。試験は投与開始24週後で終了した。

AFB1投与群において、肺腺腫が14匹中14例（平均5.6個/マウス）に認められた。溶媒対照群では15匹中4例（平均0.3個/マウス）に肺腺腫が認められた。（参照12）

⑮ 24 週間発がん性試験（マウス、腹腔内投与）

A/J マウス（投与群：一群雌雄各8匹、溶媒対照群：雌雄各16匹、無処置対照群：雄136匹、雌131匹）に、0、5,000、12,500または25,000 µg/kg 体重のAFB1を週1回6週間腹腔内投与（溶媒：DMSO）する発がん性試験が実施された。試験は投与開始24週後で終了した。

肺腺腫の発生頻度は表15に示されている。

AFB1投与群では、いずれの用量でも全例に肺腺腫が認められ、1匹当たりの肺腺腫の数には用量相関性がみられた。（参照12）

表15 肺腺腫の発生頻度

試験群		無処置対照	溶媒対照	5,000 µg/kg 体重	12,500 µg/kg 体重	25,000 µg/kg 体重
肺腺腫 (%)	雄	38	17	100	100	100
	雌	25	50	100	100	100
1匹当たりの 肺腺腫の数(平均)	雄	0.29-0.57		6.56	15.75	20.20
	雌			11.57	16.13	28.80

⑯ 82 週間発がん性試験（マウス、腹腔内投与）

(C57BL×C3H)F₁ マウス（新生児雌雄）に、0、250、1,000、2,000または6,000 µg/kg 体重のAFB1を、生後1~16日に単回、3日おきに3または5回腹腔内投与（総投与量：1,250、2,000、3,000または6,000 µg/kg 体重、溶媒：トリオクタノイン）する発がん性試験が実施された。試験52週及び82週で剖検を行った。

52週では、2,000 µg/kg 体重の単回投与群を除いたすべてのAFB1投与群で肝細胞癌の発生頻度増加（31/71）が認められた。82週では、総投与量1,250 µg/kg 体重を含む全投与群で肝細胞癌の発生頻度増加（82/105）が認められた。対照群（82週）における肝細胞癌の発生頻度は3/100であった。（参照12）

⑰ 15 カ月間発がん性試験（トランスジェニックマウス、腹腔内投与）

HBVの外膜タンパクの過剰発現を示すC57BL/6系統のトランスジェニックマウス（一群雌9~10匹）に、0または250 µg/kg 体重のAFB1を単回または隔月で5回、もしくは2,000 µg/kg 体重を週1回3週間腹腔内投与（溶媒：トリカブリン）する発がん性試験が実施された。

15カ月の試験終了時における生存動物数は各群で7~9匹であった。2,000 µg/kg 体重の3回投与群では、肝細胞癌が2例、肝細胞腺腫が10例認められた。肝細胞腺腫は250 µg/kg 体重の5回投与群で4例、250 µg/kg 体重の単回投与群で6例認められた。

非トランスジェニックマウスのAFB1投与群では肝細胞癌の発生はみられず、肝臓に非腫瘍性の結節が認められた。トランスジェニックマウスの対照群においても、肝臓に種々の大きさの結節が認められた。（参照12）

⑱ 78 週間発がん性試験（ハムスター、強制経口投与）

雄のシリアンハムスターに、AFB1を0または2,000 µg/kg 体重の用量で6週間（5日/週）強制経口投与（溶媒：DMSO-トリオクタノイン）する発がん性試験が実施された。一部の動物には、最終投与24時間後から0.1%フェノバルビタール（PB）を飲水投与した。

AFB1投与群では、試験46週まで生存した動物の33匹中9例に胆管癌が、21例に嚢胞性胆管腫が認められた。AFB1投与後PBを投与した群においても、同様の腫瘍の発生がみられた。

AFB1投与群の動物には、限局性胆管増生及び変異肝細胞巢も観察され、試験78週でと殺した動物の2例に肝細胞癌が認められた。（参照12）

⑳ 発がん性試験（サル、腹腔内及び経口投与）

アカゲザル、カニクイザル及びアフリカミドリザル（総数47匹）に、125~250 µg/kg 体重（腹腔内投与）または100~800 µg/kg 体重（経口投与）のAFB1を2カ月間以上投与（溶媒：DMSO）する発がん性試験が実施された。

総投与量99~1,354 mg（平均709 mg）、試験47~147カ月（平均114カ月）で、35匹中13例に腫瘍が発生した。13例の内訳は、肝細胞癌2例、肝血管肉腫3例、骨肉腫2例、胆嚢または胆管の腺癌6例、膵腺癌2例、未分化型膵腫瘍1例、膀胱乳頭癌1例であった。

総投与量0.35~1,368 mg（平均363 mg）、試験2~141カ月（平均55カ月）で、腫瘍がみられなかった動物22匹中15例に中毒性肝炎、肝硬変、過形成結節等の肝障害が認められた。（参照12）

㉑ 172 週間発がん性試験（ツバイ、混餌投与）

ツバイ（投与群：雄8匹、雌10匹；対照群：雄5匹、雌3匹）に、AFB1を

2,000 µg/kg 飼料の濃度で 172 週間混餌投与した結果、投与 74~172 週間（総投与量：24~66 mg）において、生存した雄 6 匹中 3 例に、雌 6 匹中 6 例に肝細胞癌が発生した。（参照12）

㊦ その他

a. 100 週間発がん性試験（ラット、強制経口投与）

Fischer ラット（一群雄 10~30 匹）に、0 または 25 µg/ラットの AFM1 または AFB1 を 8 週間（5 日/週）強制経口投与（溶媒：蒸留水）する発がん性試験が実施された。

AFM1 投与群では、96 週で 29 匹中 1 例（3%）にのみ肝細胞癌が認められ、100 週でと殺した残りの動物のうち 8 例（28%）に肝前癌病変（過形成細胞巣及び変異肝細胞巣）が認められた。AFB1 投与群では 47~53 週で 9 匹中 9 例に肝細胞癌が発生した（参照12、14）

b. 21 カ月間発がん性試験（ラット、混餌投与）

Fischer ラット（一群雄 42~63 匹）に、AFM1 を 0、0.5、5 または 50 µg/kg 飼料の濃度で、もしくは AFB1 を 50 µg/kg 飼料の濃度で混入した飼料を 21 カ月間摂取させる発がん性試験が実施された。

AFM1 及び AFB1 の 50 µg/kg 飼料 投与群では投与 16 カ月から肝腫瘍が発症した。肝腫瘍（直径 2 mm より大きい肝細胞癌及び腫瘍性結節の合計）の発生頻度は、AFM1 投与群では 16 カ月で 1/6、17 カ月で 0/6、19 カ月で 2/19、21 カ月で 6/18 であり、21 カ月に認められた 6 例の肝腫瘍のうち 2 例が肝細胞癌であった。AFB1 投与群では 16 及び 17 カ月にそれぞれ 9/9 及び 19/20 に肝腫瘍が発生し、すべてが肝細胞癌であった。（参照12）

c. 21 カ月間発がん性試験（ラット、混餌投与）

Fischer ラット（一群雄 42~62 匹）に、AFM1 を 0、0.5、5 または 50 µg/kg 飼料、もしくは AFB1 を 50 µg/kg 飼料の濃度で混入した飼料を 21 カ月間摂取させる発がん性試験が実施された。

AFM1 の 50 µg/kg 飼料投与群では、21 カ月で 2/18 に肝細胞癌が発症し、19~21 カ月でと殺した 37 匹中 6 例に腫瘍性結節が認められた。AFB1 投与群では 17 カ月で 19/20 に肝細胞癌が発生した。（参照12、14）

以上のように、ほとんどの動物種において肝臓が標的器官であり、肝細胞癌が最も多く認められた。その他に肺及び腎臓にも腫瘍が観察された。AFB1 の肝発がん性に対する感受性には動物種間で大きなばらつきがみられ、ラットで最も高いことが示された。ラットにおける混餌投与による発がん性試験概要は表 16 に示されている。TD₅₀²の比較から、発がん性に対する感受性は、Fischer ラットで最も高く、

雌より雄の方がやや高かった。（参照14）

表 16 ラットにおける AFB1 混餌投与による発がん性試験概要

動物種	投与量		投与期間	肝腫瘍発生頻度	TD ₅₀ (µg/kg 体重/日)
	µg/kg 飼料	µg/kg 体重/日			
Fischer ラット (雄)	0	0	80 週	0/25	
	15	0.75	68 週	12/12	
	300	15	35-52 週	6/20	
	1,000	50	35-41 週	18/22	
	1,000	50	2 週	1/16 (82 週後)	
Fischer ラット (雌)	0	0	80 週	0/25	
	15	0.75	80 週	13/13	
	300	15	60-70 週	11/11	
	1,000	50	64 週	4/4	
	1,000	50	2 週	1/13 (82 週後)	
Porton ラット (雄)	0	0	104 週	0/46	TD ₅₀ =3.52
	100	4	104 週	17/34	
	500	20	104 週	25/25	
Porton ラット (雌)	0	0	104 週	0/34	TD ₅₀ =12.5
	100	5	104 週	5/30	
	500	25	104 週	26/33	
Wistar ラット (雄)	0	0	147 日	0/24	
	250	12.5	147 日	8/13 (742 日後)	
	500	25	147 日	13/18 (622 日後)	
	1,000	50	147 日	12/14 (611 日後)	
CDR ラット (雄)	0	0	104 週	0/50	TD ₅₀ =4.19
		4	104 週	24/50	
Fischer ラット (雄)	0	0	104 週	0/16	TD ₅₀ =1.13
		0.8	104 週	5/13	
Fischer ラット (雌)	0	0	104 週	0/15	TD ₅₀ =9.93
		1	104 週	1/15	
Fischer ラット (雌)	0	0		0/18	TD ₅₀ =0.932
	1	0.04	104 週	2/22	
	5	0.2	93 週	1/22	
	15	0.6	96 週	4/21	
	50	2.0	82 週	20/25	
	100	4.0	54 週	28/28	
Fischer ラット (雄)		0		1/144	TD ₅₀ =49.9
		0.2		0/23	
		0.6		0/24	
		1.8		1/23	
Fischer ラット (雌)		0	104 週	0/144	TD ₅₀ =50.7
		0.25	104 週	0/24	
		0.75	104 週	0/24	
		2.25	104 週	1/24	

2: 標準期間（その動物種の標準的な寿命）にわたって慢性投与した場合に、腫瘍がその期間を通じて存在しない確率の死亡補正後の推定値が半分になる用量 (Tumorigenic dose rate 50)

(3) 生殖発生毒性

① 生殖毒性試験 (ラット、強制経口投与)

雌の Druckrey ラットに、7.5 mg/kg 体重/日の AFB1 を 14 日間強制経口投与した結果、卵巣及び子宮の小型化、胎児吸収率増加、発情周期の乱れ、ロードシス³⁾の抑制、妊娠率低下、同腹児数減少といった重篤な生殖障害を示唆する影響が認められた。投与後の血中濃度は 86.2 µg/L であった。(参照13)

② 生殖毒性試験 (ラット、強制経口投与)

雌の Druckrey ラットに、7.5 または 15 mg/kg 体重/日の AFB1 を 21 日間強制経口投与した結果、卵巣の卵母細胞及び大型卵胞数の用量依存的減少、血中ホルモン濃度及び生殖臓器重量減少が認められた。(参照13)

③ 生殖毒性試験 (ラット、腹腔内投与)

雄のラット (系統不明、16 匹) に、約 60 µg/kg 体重の AFB1 を腹腔内投与した結果、精巣の変性及び精子形成障害が認められた。(参照12)

④ *in vitro* 生殖毒性試験 (ラット)

アルビノラットの卵母細胞及び精巣上体精子を、2~16 µg/L の濃度の AFB1 で処理し、*in vitro* での授精能が検討された。その結果、平均受精卵数の減少及び精子運動性低下が認められた。(参照13)

⑤ 生殖毒性試験 (マウス、混餌投与)

ddy マウス (妊娠雌) に、0.8 ng/kg 体重/日の AFB1、4.8 ng/kg 体重/日の AFG1 または両者を混餌投与する条件で出産させ、児動物に 6 カ月齢まで母動物と同様の飼料を摂取させて生殖毒性試験が実施された。

AFB1 投与群では、児動物の肝臓における中性脂肪及び脂肪酸の蓄積、肝、腎における細胞毒性が認められた。AFG1 投与群では、肝臓における中性脂肪の蓄積、血清トリグリセリドの軽度増加、肝、腎における炎症及び壊死の増強、胆管増生が認められた。

AFG1 の投与量は AFB1 の 6 倍量であったが、肝、腎に対する影響は、AFG1 より AFB1 の方が強かった。(参照11)

⑥ 生殖毒性試験 (ウサギ、強制経口投与)

雄の成熟ウサギに、15 または 30 µg/kg 体重/日の AFB1 を隔日で 9 週間強制経口投与後、9 週間の回復期間が設定された。

体重増加抑制、精巣比重量、血清テストステロン濃度、射精量、精子濃度及び精子運動性の低下、奇形精子の増加が用量依存的に認められた。これらの影響は回復期間中も持続した。また、投与期間及び回復期間中を通じて、アスコルビン

酸 (20 mg/kg 体重/日) の同時投与によりこれらの影響は緩和された。(参照13)

⑦ 生殖毒性試験 (ミンク、混餌投与)

雌ミンクに、自然汚染トウモロコシから得られた総アフラトキシンを 5 または 10 µg/kg 飼料の濃度で 90 日間混餌投与し、生殖毒性試験が実施された。

10 µg/kg 飼料 投与群で出生時の児動物に低体重が認められ、3 週齢時には両投与群の児動物に低体重が認められた。また、10 µg/kg 飼料投与群では児動物の死亡率が上昇し、3 週齢時で 33% に達した。10 µg/kg 飼料投与群の乳汁試料の分析では、アフラトキシンの代謝物の濃度はかなり低かった。(参照13)

⑧ 発達神経毒性試験 (ラット、皮下投与)

Wistar ラットに、0.3 mg/kg 体重/日の AFB1 を妊娠 11~14 または 15~18 日に皮下投与した後出産させ、児動物の発達神経毒性試験が実施された。

妊娠、哺育期間を通じて、母動物の体重に影響はみられなかったが、出生児数の減少が認められた。児動物では、出生時の低体重、初期反応形成 (early response development) の遅延、協調運動障害、学習能力障害が認められた。妊娠 11~14 日投与群における影響の方が妊娠 15~18 日投与群より強かった。(参照13)

⑨ 発達神経毒性試験 (ラット、腹腔内投与)

Fischer ラット (一群雌 10 匹) の妊娠 8~10 日または 15~17 日に、2 mg/kg 体重の AFB1 を腹腔内投与した後出産させ、児動物の発達神経毒性試験が実施された。

妊娠 8~10 日投与群の児動物では、1 及び 2 カ月齢で肝臓トリグリセリドが増加した。いずれの投与群においても、1 カ月齢で自発運動量の減少が認められた。2~3 カ月齢で児動物の行動は正常となったが、脳に不可逆的な神経細胞変性が認められた。(参照12)

⑩ 発生毒性試験 (ラット、皮下投与)

ラット (一群雌 10 匹) の妊娠 8 または 16 日に、0.7、1.4、3.5、7.0 mg/kg 体重のアフラトキシン (AFB1 : AFB2 = 75 : 25) を皮下投与した結果、胎児に低体重、皮膚のしわ及び頭部の軽度腫大がみられた。奇形は認められなかった。(参照12)

⑪ *in vitro* 発生毒性試験 (ラット)

10 日齢のラット胚に 15 µM [4.7 mg] もしくはそれ以上の濃度の AFB1 で処理したところ、神経管欠損が誘発された。代謝活性化系存在下では、異常形態発生の誘発能に影響はみられなかったが、胚死亡率が上昇した。(参照12)

3: 哺乳類の雌の発情期において、触覚的刺激に対して脊柱を背屈させる反射のこと。

⑫ 発生毒性試験（マウス、腹腔内投与）

ICR マウス（一群雌 8～12 匹）の妊娠 6～13 日間の任意の 2 日間に、16 または 32 mg/kg 体重の AFB1 を腹腔内投与する発生毒性試験が実施された。

32 mg/kg 体重投与群において、母動物に死亡、体重増加抑制、腎重量増加が、胎児に低体重、外表奇形（口蓋裂、眼瞼開裂）、骨格奇形（波状肋骨、長管骨湾曲）が認められた。（参照 12）

⑬ 発生毒性試験（マウス、強制経口投与）

NMRI マウス（一群雌 19～36 匹）の妊娠 12～13 日に、0、15、45、90 mg/kg 体重の AFB1 を腹腔内投与、または 45 mg/kg 体重の AFB1 を強制経口投与する発生毒性試験が実施された。

腹腔内投与では、45 mg/kg 体重以上投与群の胎児に発達遅延、口蓋裂（4.1～5.6%）及び横隔膜の奇形（18%）が認められた。経口投与群では横隔膜の奇形（13%）が認められた。また、90 mg/kg 体重の AFG1 を腹腔内投与した結果、横隔膜の奇形（14.7%）及び腎奇形（5.5%）が認められた。（参照 12）

⑭ 発生毒性試験（マウス、強制経口投与）

CBA マウス（一群雌 7～8 匹）の妊娠 8 または 9 日に、4 mg/kg 体重の AFB1 を強制経口投与する発生毒性試験が実施された。

妊娠 8 日投与群では、胎児 61 匹中 7 例に奇形が認められた（外脳症 4 例、眼瞼開裂 3 例、小腸脱 2 例）が、妊娠 9 日投与群の胎児 51 匹には奇形はみられなかった。（参照 12）

⑮ 発生毒性試験（ニワトリ）

ニワトリの発育卵に AFB1 を投与した結果、胚死亡、胚重量及び体長の減少が認められたが、異常胚の有意な増加はみられなかった。（参照 13）

（4）遺伝毒性

① AFB1 の遺伝毒性試験

AFB1 の遺伝毒性については、*in vitro* 及び *in vivo* ともに広範な試験が実施されており、そのほとんどにおいて陽性の結果が得られている。

細菌において遺伝子突然変異、DNA 損傷、DNA との共有結合、真菌類において遺伝子突然変異、遺伝子変換、有糸分裂組換え、ショウジョウバエにおいて伴性劣勢致死、体細胞突然変異及び組換えが誘発された。また、ニワトリおよび魚類細胞の DNA との共有結合が *in vitro* で観察された。他の培養細胞を用いた *in vitro* 試験では、げっ歯類細胞において細胞形質転換、染色体異常、姉妹染色分体交換（SCE）、遺伝子突然変異、不定期 DNA 合成（UDS）、DNA 鎖切断が、ヒト細胞において染色体異常、小核形成、遺伝子突然変異、SCE、UDS、DNA

との共有結合が誘発された。*in vivo* 試験では、げっ歯類動物において染色体異常、小核形成、SCE、UDS、DNA 鎖切断及び DNA との共有結合が誘発された。また、アカゲザルにおいて骨髄での染色体異常の誘発が観察された。（参照 12）

最近の報告では、AFB1 は点突然変異だけでなく、組換え反応を誘発することが酵母と哺乳類細胞を用いた試験系で報告された。特にヒトリンパ芽球細胞において組換えを介して LOH（ヘテロ結合体の消失）型突然変異を誘発した。*in vivo* 試験においては遺伝子突然変異の誘発が報告された。ラットにおいては脾臓リンパ球でのヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）遺伝子突然変異が誘発された。また、BigBlue® トランスジェニックマウスでは肝臓での *lacI* 遺伝子突然変異は誘発されなかったが、BigBlue® トランスジェニックラットにおいてはマウスへの投与量の 10 分の 1 の用量で、肝臓に強い突然変異の誘発が観察された。また、遺伝子解析の結果からそのほとんどが G から T への転換であった。（参照 13）

② AFB1 の遺伝毒性の活性への修飾因子に関する試験

マウスにおいて、酢酸レチニル（ビタミン A）補助食の摂取により AFB1 による SCE の誘発が低下した。チャイニーズハムスターでは、亜セレン酸ナトリウムを 2 mg/L の濃度で 14 日間飲水投与、マウスではアスコルビン酸を 10 mg/kg 体重の用量で 6 及び 12 週間投与した結果、骨髄細胞における染色体異常の誘発率は低下した。

その他にも、AFB1 の遺伝毒性の活性は、ビタミン A、フェノール化合物（没食子酸、クロロゲン酸、コーヒー酸、ドーパミン、オイゲノール、*p*-ヒドロキシ安息香酸）、植物フラボノイド（ケンペロール、モリン、フィセチン、ピオカニン A、ルチン）、アリキシン及び *p*-アセチルゲンポシドのような種々の食品成分によって抑制されることが認められている。（参照 12）

③ AFB1 誘発腫瘍における癌原遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子に関する試験

雄の CF1 マウスに 6 µg/kg 体重の AFB1 を単回腹腔内投与した試験において、24 週以降に発生した 8 例の肝腫瘍のうち 1 例に *c-Ha-ras* 癌原遺伝子のコドン 61 における CAA から CTA への転換が、2 例に CAA から AAA への転換が認められた。

雄の Fischer ラットに AFB1 を 1 mg/kg 飼料、AFG1 を 0.3 mg/kg 飼料の濃度で混餌投与することで誘発された肝細胞腫瘍から採取した DNA 及び、その肝細胞腫瘍由来の 2 つの細胞株から調製した DNA を、NIH3T3 マウス細胞株に遺伝子導入し、免疫不全ヌードマウスに対する移植による選別とそれに引き続く *in vitro* のフォーカス・アッセイで導入細胞の選別を行った。その結果、1/7 で

Ha-ras、1/7でKi-ras、5/7でN-ras 癌原遺伝子の活性化が見出されたが、突然変異（コドン 12 における G から A への転移）は Ki-ras の 1 例にのみ認められた。

雄の Fischer ラットに 25 µg の AFB1 を 8 週間（5 日/週）腹腔内投与した試験において、投与 1~2 年後に発生した 8 例の肝細胞癌のうち 3 例に c-Ki-ras 癌原遺伝子のコドン 12 における突然変異が認められ、1 例は GGT から TGT への転換、2 例は GGT から GAT への転移が認められた。

AFB1 を投与したアカゲザル及びカニクイザル（各 4 匹）に発生した、肝細胞癌 4 例（2 例はカニクイザル）、胆管癌 1 例、紡錘細胞癌 1 例、血管内皮細胞肉腫 1 例、骨肉腫 1 例において、p53 遺伝子のエクソン 5、7、8 ではコドン 249 の突然変異は認められず、肝細胞癌 1 例でコドン 175 における G から T への転換が認められた。（参照 12）

(5) その他

① AFB1 の発がん性を修飾する因子

a. カロリー制限食

雄の Fischer ラットにカロリー制限（自由摂取させた対照群の 60%）された飼料を 6 週間摂取させた結果、肝または腎細胞における AFB1 の核 DNA への結合量減少及び AFB1 誘発性の肝細胞障害の減少が認められた。AFB1 の反復投与によって肝及び腎細胞の DNA 合成は抑制されたが、DNA 合成率はカロリー制限食群よりも対照群の方が高かった。AFB1 投与 3 日後には対照群のレベルに回復した。腎細胞におけるフローサイトメトリーでの細胞周期解析では、カロリー制限食群及び対照群の S 期の細胞集団に有意な差は認められなかった。AFB1 投与により細胞増殖は平均で 33% 阻害されたが、投与 3 日後には腎細胞で回復がみられた。細胞増殖率は、カロリー制限食群に比して対照群でわずかに高かった。肝臓及び腎臓における AFB1 誘発性の DNA 合成には、カロリー制限食群で遅延がみられた。（参照 11）

b. 低タンパク食

Fischer ラットに 0.3 mg/kg 体重/日の AFB1 を 15 日間投与後、6、14 または 22% のカゼイン（タンパク質量：5.2、12.2 または 19.1%）を含む飼料を 6、12、40、58 または 100 週間摂取させ、肝腫瘍と GGT 陽性肝細胞癌の発生について検討された。

肝細胞癌（12 週）及び肝腫瘍（40、58 及び 100 週）は、タンパク質の摂取量に依存して発生が増加した。低タンパク食群では、肝細胞癌及び肝腫瘍の発生率、腫瘍の大きさ、動物あたりの腫瘍の数は減少し、腫瘍出現までの時間は増加した。

肝臓以外の腫瘍発生率も、最低量のタンパク質を含む飼料を与えた動物では低かった。58 及び 100 週では、肝細胞癌発生の指標（細胞癌の数、肝体積に占める百分比）と腫瘍発生頻度に高い相関関係がみられた（ $r = 0.90-1.00$ ）。腫瘍及び肝細胞癌は、エネルギー摂取が比較的多い場合でも、低タンパク食によって抑制されることが認められた。

ヒトの原発性肝癌は主に HBV 感染を伴うことが示唆されており、血漿コレステロール濃度を上昇させて、癌の成長を促進する栄養的要因（例、動物性タンパク質）と結び付けられている。この仮説を検証するため、HBV トランスジェニックマウスを用いて、腫瘍の進行に対する食餌中の動物性タンパク質の影響について検討された。

50-4 HBV トランスジェニックマウスの F₂ 児動物（雄）に、6、14 または 22% のカゼインを含む飼料を摂取させた結果、通常量のタンパク質（22%）摂取群では、3 カ月で S-導入遺伝子の遺伝子産物である HBsAg 濃度の増加が認められた。これに対して、中量及び低量のカゼイン制限群の HBsAg は、それぞれ 42 及び 72% 抑制され、有意な用量反応関係が示された。血清グルタミン酸-ビルビン酸トランスアミナーゼの活性には、タンパク質量の影響はみられなかった。以上の結果から、これらの実験動物においてカゼイン制限飼料は S-導入遺伝子発現を制御することが示唆された。（参照 11）

c. 脂肪・炭水化物

Fischer ラットに、低脂肪・高炭水化物飼料、等カロリー脂肪含有飼料、高カロリー脂肪含有飼料、または市販のげっ歯類用標準飼料を与え、AFB1 の外因性 DNA への結合、肝の GST、CYP2B1 及び 1A1 の活性に対する影響について検討された。

ミクロソームを介した AFB1 の外因性 DNA への結合は、標準飼料または低脂肪・高炭水化物飼料群で有意に低下し、低脂肪・高炭水化物飼料が AFB1 のミクロソーム媒介のエポキシ化を抑制する可能性があることが示唆された。肝の GST 活性には群間で差はみられなかった。高脂肪飼料群では標準飼料または高炭水化物飼料よりも CYP1A1 及び 2B1 活性が増加し、AFB1 の解毒作用が増大することが示唆された。（参照 11）

② 免疫毒性

離乳したラット（系統不明）に、60、300 または 600 µg/kg 体重の AFB1 を隔日で 4 週間混餌投与し、免疫抑制について検討された。細胞性免疫については、遅延型過敏症反応分析法により、体液性免疫についてはプラーク形成法により測定された。また、T 及び B 細胞に対してリンパ増殖反応の分析も行われた。

成長中のラットでは、300 µg/kg 体重以上投与群で細胞性免疫の抑制が認めら

れた。成長中の宿主に対する AFB1 の持続的な低用量暴露が、感染症と腫瘍化に対する感受性を高める可能性がある」と結論された。

Fischer ラット (雄) 及び Swiss マウス (雌) に、エアロゾルによる鼻部吸入または気管内滴下のいずれかにより AFB1 を投与し、免疫抑制効果について検討された。

吸入投与では、推定用量 16.8 µg/kg 体重で肺胞マクロファージ食作用が抑制され、この作用は 2 週間持続した。気管内滴下では、吸入投与による摂取量より 1 桁少ない用量で、用量依存的な肺胞マクロファージ食作用の抑制が認められた。気管内滴下投与では、肺胞マクロファージからの腫瘍壊死因子-α の放出が抑制され、全身の先天性及び後天性の免疫防御が阻害されたが、これらはそれぞれ腹腔マクロファージ食作用と脾臓の抗体産生の一次応答の抑制によって示されている。以上より、AFB1 の経気道暴露は、肺及び全身の宿主防御機構を抑制したと結論された。(参照11)

3. ヒトにおける知見 (AFB1)

(1) 体内動態 (吸収、分布、代謝、排泄)

体内に摂取された AFB1 は、ヒトにおいても他の動物種と同様に CYP により AFB1-8,9-エポキシドに代謝され、AFB1-DNA 付加体を形成することで、発がん性を示すとされている。AFB1-8,9-エポキシドは半減期は短いが高い反応性を有し、グアニンの N7 位に結合し DNA 付加体を形成する。AFB1 の代謝活性化の程度には個人差がみられ、子供と成人とで異なる。

ヒトにおける AFB1 の代謝は、主に CYP1A2 や CYP3A4 などの CYP によって行われる。CYP3A4 により AFB1-エキソ-エポキシド及び AFQ1 が生成され、CYP1A2 によって少量の AFB1-エキソ-エポキシド、多量の AFB1-エンド-エポキシド及び AFM1 が生成される。AFM1 及び AFQ1 は尿中に排泄される。AFB1-N7-グアニン付加体は、AFB1-エキソ-8,9-エポキシドによって形成され、付加体の 98%超を占める。CYP3A5 は主として AFB1 をエキソ-エポキシドに代謝し、AFQ1 の生成は少ない。肝臓の CYP3A5 発現には個人差があり、アフリカ系アメリカ人の 40%には発現がみられない。CYP3A5 発現の差は AFB1 に対する感受性に影響を与える可能性がある。CYP3A5 についてはプロモーター部位の多型が検出されているが、感受性と遺伝子多型との関係については明らかでない。

胎児の肝臓における主要な CYP は CYP3A7 (P450 HFLa) であり、この酵素は AFB1 を 8,9-エポキシドに代謝活性化する。このことは、ガンビアにおいて、AFB1 を摂取した母親から生まれた新生児の臍帯血から AFB1-アルブミン付加体が検出されたことと合致する。

ヒトではエキソ-、エンド-エポキシドの解毒経路がいくつかある。一つは GST による抱合化である。また、水酸化により 8,9-ジヒドロジオールが生成され、塩

基による開環を受けてジアルデヒドフェノラートイオンとなる。AFB1 及び AFG1 から生成されたジアルデヒドは、リジンなどの第一級アミン基とシッフ塩基を形成し、アルブミン付加体などのタンパク質付加体となる。さらに、タンパク質付加体は AFB1 アルデヒドリダクターゼによる代謝を受けてジアルコールが生成される。この酵素はラットにおいても認められている。

住血吸虫治療薬であるオルチプラズ (Oltipraz) は、ラットで AFB1 誘発肝臓の発生を抑制することが認められている。中国の健康者 234 人に対してオルチプラズ 500 mg を毎週、または 125 mg を毎日投与した結果、500 mg 投与群では尿中の AFM1 量が 51%減少し、125 mg 投与群では AFM1 排泄量に変化はみられず、アフラトキシン-メルカプツール酸の排泄量が増加した。したがって、高用量のオルチプラズは AFB1 の代謝活性を抑制するが、低用量では AFB1-8,9-エポキシドのグルタチオン抱合を増加させると結論された。(参照13)

(2) 急性毒性

ヒトのアフラトキシン中毒に関する報告は少ないが、2004 年にケニアで発生した大規模なアフラトキシン中毒では、中毒患者 317 人中 125 例が死亡した。中毒発生地域で販売されたトウモロコシ製品 55%が、ケニアの規制基準である 20 µg/kg よりも高濃度のアフラトキシンを含んでおり、35%ではアフラトキシン濃度が 100 µg/kg 以上、7%では 1,000 µg/kg 以上であった。中毒患者数の最多地域におけるアフラトキシン濃度 (平均 52.91 µg/kg) は、患者数の少ない地域における濃度 (平均 7.52 µg/kg) に比して有意に高かった。急性アフラトキシン中毒患者を対象とした症例対照調査から、過去の報告値の最高値 (0.25 ng/mg アルブミン) を上回る濃度の AFB1-リジン付加体がリスク因子であるとされた。(参照14)

アフラトキシン摂取の結果起こりうる急性肝毒性は、成人よりも子供の方が深刻である。嘔吐、発作、黄疸などの症状に加え、肝機能障害や血清肝酵素の上昇が認められる。

1992 年に報告された、南アフリカにおける調査では、タンパク質エネルギー欠乏症の子供がアフラトキシンに暴露された場合、対照群に比して血清中のアフラトキシン濃度が高かった。しかし対照群の子供では尿中のアフラトキシン濃度が高かった。アフラトキシンに暴露されたタンパク質エネルギー欠乏症の子供では、ヘモグロビンの低下、水腫回復の遅延、感染症の増加、入院期間の延長が認められた。また、アフラトキシンに暴露された子供ではマラリア感染が増加した。(参照13)

(3) 発がん性

1960年代初頭から、主にサハラアフリカとアジアを対象に、アフラトキシンの摂取と肝癌のリスクに関係について疫学調査が進められ、1980年代には高リスク地域で症例対照研究が実施され、1980年代半ばにはコホート研究が行われるようになった。IARCでは、ヒト及び実験動物におけるAFB₁の発がん性について、十分な証拠があるとしている。また、総合評価として、自然界で生じるアフラトキシン混合物はヒトに対して発がん性がある物質（グループ1）と分類している。

① 記述調査

原発性肝細胞癌の発生が多い台湾の8地域で横断的研究が実施され1993年に報告された。成人250人を対象に聞き取り調査を行うと共に、尿及び血液試料を採取し、血清中のHBsAbの検出、尿中のAFB₁、AFG₁及び代謝物（AFM₁、AFP₁等）の測定が行われた結果、アフラトキシン摂取量と肝細胞癌の発生との関連性は認められたが、喫煙やアルコール等他の190項目については関係が排除された。

スーダンの2地域について、1995年にアフラトキシン汚染落花生と肝細胞癌発生の関係が調査された。肝細胞癌の発生率は中央部よりも西部で高いとされた。両地域で市販されているピーナッツバターを試料とし、落花生製品の保存状態とAFB₁濃度の関連を調査した結果、多湿である西部地方の試料中AFB₁濃度は、中央部をはるかに上回り、消費量も多いことが明らかになった。（参照13）

② コホート調査

原発性肝細胞癌の発生率が世界で最も高い地域の一つである中国の広西チワン自治区南部で1982年7月から1983年6月に25～64歳の男性7,917人を対象に原発性肝細胞癌の発生におけるHBVとAFB₁の関与について調査が実施された。30,188人年の観察の結果、149例の死亡が認められ、76例は原発性肝細胞癌が原因であった。HBsAg陽性率はコホート全体では23%であったが、死亡例では91%（76例中69例）であった。また、AFB₁暴露量を推定するために1978～1984年に主要な食品を定期的にサンプリングし、AFB₁汚染の検査が実施された。各集団における推定AFB₁暴露量と原発性肝細胞癌の死亡率をプロットしたところ、ほぼ完全な線形の正の相関関係が認められた。（参照11、14）

上海の45～64歳の男性を対象として、1986～1992年に実施された調査では、18,244人中364例の癌発症があり、55例が原発性肝癌であった。アフラトキシンバイオマーカーとして尿中のAFB₁代謝物（AFP₁、AFM₁、AFB₁-N7-グアニン付加体）が測定され、HBsAgの有無が検査された。肝癌患者50人中32例、

対照群267人中31例でHBsAg陽性が認められた。バイオマーカーは多くの症例で検出され、AFB₁-N7-グアニン付加体が検出された患者では最も発がんリスクが高かった。リスク因子がバイオマーカー単独の場合の相対リスクは3.4、HBsAg陽性単独では7.3、両者がリスク因子である場合は59であった。

台湾のボンブー諸島では肝細胞癌の発症率が高いとされている。1991年5月から1992年6月にスクリーニングが実施され、30～65歳の男性4,691人及び女性1,796人を対象に前向きコホート調査が実施された。その結果、1993年までに33人が肝細胞癌と診断され、2例ではHBsAg陰性であった。血液試料については、血清マーカーとしてHBsAg、抗HCV抗体、AFB₁-アルブミン付加体の分析が行われた。ロジスティック回帰分析の結果、AFB₁-アルブミン付加体の存在と肝細胞癌との比（OR）は3.2、他の共変量（HBsAg、抗HCV抗体、家族の肝癌及び肝硬変の病歴）を含めた場合にはORは5.5に上昇した。HBsAg陽性の場合には最もリスクが高くなり、ORは129であった。この集団のアフラトキシンの主な汚染源は落花生であると推定された。

台湾の7つの町の25,618人の男性を対象に、1991～1995年に実施された調査では、56例に肝細胞癌の発症が認められた。血清中のHBsAg、α-フェトプロテイン、抗HCV抗体、AFB₁-アルブミン付加体等及び尿中のAFB₁代謝物を測定し、ロジスティック回帰分析が行われた結果、HBsAg陽性患者においてバイオマーカーが大きな影響を与えることが示された。

台湾のHBsAg陽性患者79人を対象に、1991～1997年に実施された調査では、AFB₁-アルブミン付加体と肝細胞癌との間に有意な関連性が認められた。GSTM1及びGSTT1欠失遺伝子型は、肝細胞癌のリスクの低下に関連しており、GSTT1遺伝子型とAFB₁-アルブミン付加体の間には統計学的に有意な相互作用が認められた。

台湾の30～65歳の男性、HBsAg陽性4,841人、陰性2,501人を対象に、1988～1992年に実施された調査では、50例に肝細胞癌の発症が認められ、1例（抗HCV抗体陽性）を除きHBsAg陽性であった。尿中のアフラトキシン代謝物の分析では、AFM₁はすべての患者で検出され、AFP₁は81%、AFB₁-N7-グアニン付加体は43%、AFB₁は12%、AFG₁は12%の患者で検出された。アフラトキシンを含むと考えられる食品の摂取量と尿中AFM₁濃度との間には有意な相関関係が認められた。AFM₁、AFP₁、AFB₁、AFG₁、AFB₁-N7-グアニン付加体の5種類のバイオマーカーのうち、AFG₁を除く4種類のバイオマーカーが肝細胞癌のリスクの増加と関連していた。

中国における HBsAg キャリアの男性を対象に、1987～1997 年に実施された調査では、肝細胞癌を発症した患者の AFB1-アルブミン付加体濃度が有意に高かった。

中国における慢性 B 型肝炎の男性患者 145 人を対象に、1981～1982 及び 1987～1998 年に実施された調査では、22 例に肝細胞癌の発症が認められた。抗 HCV 抗体陽性及び家族に肝細胞癌の病歴がある場合、発がんリスクが増加した。また、尿中 AFM1 濃度が高い患者で肝細胞癌の相対リスクが増加した。(参照13)

③ 症例対照調査

ナイジェリアの肝細胞癌患者 22 人及び対照 22 人を対象に、1998 年に原発性肝細胞癌における HBV 及びアフラトキシンとの関係について調査された。患者 16 例及び対照 8 例に HBsAg が検出された。血中のアフラトキシン (B₁、B₂、M₁、M₂、G₁、G₂) 及びアフラトキシコールの分析の結果、肝細胞癌患者の 5 例 (23%)、対照の 1 例にアフラトキシン濃度の増加が認められ、この差は有意なものであった。

スーダンの肝細胞癌患者 150 人、及び対照 205 人を対象に、1996 年から 1998 年にかけて肝細胞癌の病因におけるアフラトキシン汚染ピーナッツバター摂取量と GSTM1 遺伝子型との関係について調査された。癌患者ではピーナッツバターの摂取量が多く、肝細胞癌発生リスクとピーナッツバター摂取量には明らかな用量反応関係が認められた。スーダン西部ではピーナッツバター摂取量によるリスクの増加がみられたが、スーダン中央部ではみられなかった。GSTM1 遺伝子型は肝細胞癌発生のリスク因子ではなかった。ピーナッツバター摂取による過剰リスクは GSTM1 欠失遺伝子型の患者に限定されていた。(参照13)

(4) 生殖発生毒性

タイにおいて、アフラトキシンの胎盤通過と胎児への蓄積について検討された。1987 年に採取された臍帯血清の 35 試料中 17 例 (48%) で 0.064～13.6 nmol/mL (平均 3.1 nmol/mL) のアフラトキシンが検出されたのに対して、出産直後の母体血清では 35 試料中 2 例 (6%) で平均 0.62 nmol/mL のアフラトキシンが検出されたにすぎなかった。このことから、アフラトキシンは胎盤を通過し、胎児-胎盤系に蓄積されることが示された。

ベニンとトーゴにおいて、アフラトキシン暴露と子供の成長の関係について調査され 2002 年に報告された。480 人 (1～5 歳) の子供を対象に検査した結果、血中のアフラトキシン-アルブミン付加体の平均濃度は、授乳期の子供に比べて離乳した子供で高かった。アフラトキシン-アルブミン付加体の血中濃度と WHO のデータによる発育状態の指標 (身長年齢比及び体重年齢比) との関係は負の関係

にあった。これらのデータから、東アフリカにおいてアフラトキシンは子供の成長を阻害することが示唆された。

ナイジェリアにおける新生児黄疸とアフラトキシンとの関係について検討するために、1989 年 4 月～1991 年 4 月に新生児の黄疸患者 327 人と非黄疸患者 60 人から血液が採取された。アフラトキシンは黄疸患者の 24.7%、非黄疸患者の 16.6% に検出された。データの分析の結果、新生児黄疸のリスクファクターは、グルコース-6-ホスファターゼデヒドロゲナーゼ欠乏と血清中アフラトキシンであることが示唆された。

胎盤及び臍帯血におけるイミダゾール環の開環した AFB1 の DNA 付加体の測定結果から、AFB1 は胎盤を通過し、代謝物は子供に移行する可能性が示唆された。

ナイジェリアにおける男性不妊症患者及び正常者各 50 人の精液を検査結果が 1994 年に報告され、不妊症患者の試料の 40%、正常者の 8% に AFB1 が検出された。不妊症患者の精液中の AFB1 濃度は正常者より有意に高く、異常精子の割合 (50%) も正常者 (10～15%) より高かった。(参照13)

(5) 遺伝毒性等

① 尿中及び組織中における DNA 付加体

AFB1 のグアニン付加体の尿中排泄量について、中国広西チワン族自治区の 25～64 歳の男性 30 人及び女性 12 人を対象に、それぞれ 1985 年 9 月及び 10 月に 1 週間ずつモニターされた。AFB1 の平均摂取量及び総摂取量は男性でそれぞれ 48.4 µg/日及び 276.8 µg、女性で 77.4 µg/日及び 542.6 µg であった。1 日当たりの AFB1 の摂取量と AFB1-N7-グアニンの尿中排泄量の線形回帰分析では、相関係数 (r) は 0.26 で、有意な相関はみられなかった。前日からの比較では r=0.65 であり、曜日変動を平滑化した 7 日間の総摂取量と総排泄量の比較では r=0.80 であった。

ガンビアにおいて、年齢、性別及び HBsAg の有無で区分けした 15～56 歳の男女各 10 人を対象に、アフラトキシンの摂取量と AFB1 の代謝物及び AFB1-N7-グアニンの尿中排泄量が 1988 年 10 月に 1 週間モニターされた。また、HBV の保菌の有無についても検査された。総アフラトキシンの平均摂取量は男性で 8.2 µg、女性で 15.7 µg であった。アフラトキシンの尿中排泄量と 1 日当たりの AFB1 の摂取量の線形回帰分析では、r=0.65 であった。尿中代謝物としては AFG1 が優位を占めていた。他に AFP1、AFQ1 及び AFB1-N7-グアニン付加体が認められた。AFB1-N7-グアニンの総量と AFB1 の総摂取量との比較では、r=0.82 であった。HBsAg 陽性及び陰性者間で、AFB1-N7-グアニンの尿中排泄

量に差はみられなかった。

ヒト肝組織中における AFB1-N7-グアニンについて、台湾の肝細胞癌患者 9 人を対象に調査され 1991 年に報告された。酵素免疫測定法 (ELISA) による試験では、腫瘍 DNA の 7 試料及び隣接する正常組織 DNA 試料の 8 例中 2 例に抗体抑制が認められた。さらに、肝細胞癌患者 27 人を対象とした免疫蛍光染色法による試験では、腫瘍の 8 例 (30%) 及び非腫瘍肝組織の 7 例 (26%) に陽性シグナルが認められ、これらの試料の一部では ELISA でも陽性結果が得られた。ヒト組織中の AFB1-グアニン付加体については、同様の結果が旧チェコスロバキア (1988 年) 及び米国 (1989 年) において報告されている。

DNA 修復酵素である XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1) と AFB1-DNA 付加体との関係について、台湾の産院における胎盤 DNA 試料を用いて検討され、1999 年に報告された。コドン 399 (Arg) のホモ接合型に比して、399 (Glu) を対立遺伝子に持つ場合は AFB1-DNA 付加体の検出されるリスクが 2~3 倍高かった。しかし、遺伝子多型と AFB1-DNA 付加体濃度の三分位値の関連について検討された結果、399 (Glu) 対立遺伝子と AFB1-DNA 付加体濃度との直接的な関連はなく、修復経路の飽和状態を反映していることが示唆された。(参照 12、13)

② タンパク質付加体

ガンビアにおいて、環境による影響及び年齢、性別並びに HBV の保因等の宿主要因との関連を調べるために、181 人の HBV キャリアを含む 357 人の血中 AFB1-アルブミン付加体濃度が調査され、2000 年に報告された。GSTM1、GSTT1、GSTP1 及びエポキシドヒドロゲナーゼ遺伝子型との関係について検討された結果、GSTM1 欠失遺伝子型のみが AFB1-アルブミン付加体の増加と関連しており、この影響は HBV 非感染者に限定されたものであった。尿中コルチゾル代謝物の割合による評価では、CYP3A4 表現型と付加体濃度との関連性はみられなかった。AFB1-アルブミン付加体濃度に影響を与える主要因は、居住地域 (都会より地方で高い) 及び採血時の季節 (雨季より乾季で高い) であった。中国における調査では、AFB1-アルブミン付加体濃度と GSTM1 遺伝子型との関連性はみられなかった。

中国の患者を対象に、血清 AFB1-アルブミン付加体濃度によって AFB1 暴露量を高用量と低用量に分類し、リンパ球における HPRT 突然変異の発生頻度が比較された結果が 1999 年に報告された。高用量暴露群で HPRT 突然変異の増加が認められた (OR: 19)。ガンビアにおける調査では、AFB1-アルブミン付加体と染色体異常及び DNA 損傷との関連性は認められなかった。(参照 13)

③ DNA への結合の修飾因子

種々の酸化防止剤や食餌因子等、AFB1 の DNA への結合を修飾する種々の因子が特定されている。in vitro 試験では、レチノイド、インドール-3-カルビノール、アリキシンが、in vivo 試験では、ブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、エトキシキン、ジチオールチオン、オルチプラズ及び 1,2-ジチオール-3-チオンが AFB1 の DNA への結合を減少させることが認められた。

肝臓のグルタチオン濃度の低下は、AFB1 の DNA への共有結合を増加させ、グルタチオンが欠乏した場合には、AFB1 の DNA への共有結合が 30 倍になることが認められた。大部分の試験において、AFB1 の DNA 結合は種々の酵素系の活性変化に伴って修飾されたが、防御作用は抱合酵素、特に GST の誘導と強く連動していた。(参照 12)

④ ヒト肝細胞癌における p53 腫瘍抑制遺伝子の突然変異

様々なヒト腫瘍において、p53 腫瘍抑制遺伝子の突然変異 (主としてミスセンス突然変異) が高頻度に認められている。アフラトキシン暴露のリスクが高いと考えられている地域に住む肝細胞癌患者では、p53 遺伝子のエクソン 7 のコドン 249 の第 3 ヌクレオチドに高頻度で突然変異が認められた。高濃度暴露地域 (中国、モザンビーク、ベトナム及びインド) の腫瘍患者 101 人中 40 例で、p53 遺伝子のエクソン 7 のコドン 249 における G から T への転換 (AGG (Arg) から AGT (Ser)) が認められた。これに対して、低濃度暴露地域 (台湾、オーストリア、日本、南アフリカ、ドイツ、スペイン、イタリア、トルコ、イスラエル、サウジアラビア、英国、米国) の肝細胞癌患者においてこの突然変異が認められたのは 205 人中 1 例であった。低濃度暴露地域である東京における進行性肝細胞癌患者では、22 人中 7 例に 8 種類の異なる突然変異が認められ、そのうち 6 例はコドン 249 以外での塩基置換、2 例は欠失であった。初期肝細胞癌 21 例では突然変異は認められなかった。低濃度暴露地域である英国の肝細胞癌患者では、19 人中 2 例に p53 遺伝子の突然変異が認められたが、コドン 249 での変異ではなかった。

HBV と p53 遺伝子のコドン 249 の突然変異との関連性については明らかでない。モザンビークの HBsAg 陽性患者 7 人中 4 例、HBsAg 陰性患者 8 人中 4 例で p53 遺伝子のコドン 249 の突然変異が認められ、陰性患者 1 例では p53 遺伝子のコドン 157 の突然変異が認められた。オーストリア及び英国の肝細胞癌患者では、HBV 感染の有無にかかわらず p53 遺伝子の突然変異は認められなかった。(参照 12)

⑤ ヒト肝細胞癌におけるその他の遺伝的变化

AFB1 暴露が p53 遺伝子の突然変異のみではなく、他の遺伝子の変化も誘発し

ている可能性があることが示唆されている。1994年に報告された中国での調査では、p53遺伝子のコドン249の突然変異は北京に比して啓東（Qidong）で多く検出されたが、啓東ではLOHのパターンにも差がみられた。啓東では、第4染色体（4p11-q21）、染色体16q22.1及び16q22-24におけるLOHがそれぞれ28、90及び58%の症例に検出されたが、北京では認められなかった。

中国の上海（HBV陽性）並びに香港（HBV陽性）、日本（HCV陽性）及び米国（HBV陰性）の肝癌患者の治癒的切除により得られた肝細胞癌試料では、上海の試料に染色体4q、8p、16q及び5pにおける欠失を主とする変異が認められた。（参照13）

(6) その他

ガンビアの小児及びガーナ人を対象とした試験から、AFB1の食品からの摂取によって細胞性免疫が障害され、感染症に対する宿主抵抗性が低下する可能性が示唆された。

アフラトキシンの慢性暴露は、動物の栄養状態に大きく影響するが、ヒトにおいては、ベナン及びトーゴの5歳未満の小児（小児の99%でAFB1-アルブミン付加体濃度が5~1,064 pg/mgアルブミン）におけるアフラトキシン暴露と発育不全及び低体重の程度との用量反応関係が報告されている。（参照14）

4. AFB1以外のアフラトキシニンに関する知見

(1) アフラトキシニン B₂ (AFB₂)

① 代謝

ラットに1 mg/kg体重のAFB₂を腹腔内投与した結果、AFB₂はAFB₁に転換され、次いで肝臓において代謝活性化されてAFB₁-N7-グアニン付加体が形成された。ラット由来の代謝活性化系を用いた*in vitro*の試験では、DNAへの結合は減少し全体の代謝活性が低下し、アフラトキニコールの生成が増加した。（参照12）

このようにAFB₂が代謝系酵素によってAFB₁に変換される可能性を報告した論文があることから、関連文献調査を行った結果、アヒル肝臓のポストミトコンドリア上澄液においてAFB₂からAFB₁への変換が確認されたが、マウス及びヒトの上澄液、さらにラットにおける上澄液でもそのような変換は検出されなかったとする報告があった。これらのことから、動物種によりAFB₂からAFB₁への変換は起こるが、ヒトにおいて変換が起こる可能性は低いと考えられる。（参照7）

② 遺伝毒性

細菌で遺伝子突然変異及びDNA損傷が誘発されたが、アカパンカビでは代謝

活性化系非存在下で遺伝子突然変異は誘発されず、出芽酵母においても遺伝子変換及び有糸分裂組換えは認められなかった。げっ歯類の細胞では、シリアンハムスター胚細胞で細胞形質転換、チャイニーズハムスター細胞でSCE、ラット肝細胞でUDSが誘発され、シリアンハムスター細胞では*in vitro*で細胞間情報伝達が抑制された。ヒト線維芽細胞を用いた*in vitro*のUDS試験では陰性であった。*in vivo*では、ラット肝細胞のDNAとの共有結合が認められた。（参照11、12）

③ 発がん性

MRCラット（対照群：雄30匹、投与群：雄10匹）に、0または20 µg/ラットのAFB₂を10週間（5日/週）飲水投与（遮光給水瓶使用）した結果、試験90週における生存率は対照群で26/30、投与群で8/10、試験100週では投与群の動物は全例が死亡した。投与群の動物には過形成性の肝内小結節が認められたが、肝細胞癌または腎細胞腫瘍の発生はみられなかった。

Fischerラット（一群雄10匹）に、0、50または100 µg/ラットのAFB₂を10週間（5日/週）強制経口投与（溶媒：DMSO）し、試験62~78週でと殺した結果、78週で投与群の動物に肝前癌病変（過形成巣）発生頻度の増加（対照群：0/10、50 µg群：6/9、100 µg群：5/7）が認められたが、肝細胞癌の発生はみられなかった。

雄のFischerラットに、0または300 µg/ラットのAFB₂を週2回20週間皮下投与（溶媒：トリオクタノイン）した試験では、試験78または86週まで生存した20匹に腫瘍は認められなかった。

雄のFischerラットに、0または3,750 µg/ラットのAFB₂を週5回8週間腹腔内投与（総投与量：150 mg/ラット、溶媒：DMSO）した結果、試験57~59週において、投与群の9匹中2例に肝細胞癌が認められた。

IARCでは、実験動物におけるAFB₂の発がん性について限定的な証拠があるとしている。（参照12）

(2) アフラトキシニン G₁ (AFG₁)

① 代謝

ヒト肝ミクロソームによりAFG₁は代謝活性化され、AFG₁-N7-グアニン付加体が形成された。代謝活性化の割合はAFB₁の1/3~1/2であった。（参照12）

② 遺伝毒性

細菌で遺伝子突然変異及びDNA損傷、アカパンカビで遺伝子突然変異が誘発

されたが、出芽酵母では遺伝子突然変異及び遺伝子変換は認められなかった。*in vitro*の試験では、ヒト線維芽細胞及びラット肝細胞でUDS、チャイニーズハムスター細胞で染色体異常及びSCEが誘発された。*in vivo*では、チャイニーズハムスター及びマウスの骨髄細胞で染色体異常が誘発され、ラットで腎及び肝細胞DNAとの結合が認められている。(参照11、12)

③ 発がん性

MRCラット(一群雄10~15匹、雌15匹)に、0、20または60 µg/ラットのAFG1を10週間(5日/週)(低用量群のみ)または20週間(低用量及び高用量)飲水投与(遮光給水瓶使用)し、動物の状態悪化または死亡が認められるまで観察された。生存率及び腫瘍発生頻度は表17に示されている。

AFG1投与群では雌雄で肝細胞癌、雄で腎細胞腫瘍の発生頻度が用量依存的に増加した。また、投与群の動物では他の臓器にも種々の腫瘍が認められた。

表17 生存率及び腫瘍発生頻度

投与量 (µg/ラット)	0		20		60	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
生存率	26/30 (90週)		17/30 (20週)		9/28 (20週)	
肝細胞癌	0/15	0/15	2/15	1/15	9/11	12/15
腎細胞腫瘍	0/15	0/15	5/15	0/15	6/11	0/15

Fischerラット(一群雄30匹)に、0、50または100 µg/ラットのAFG1を週4回2.5~8週間強制経口投与(総投与量:0、700、1,400、2,000 µg/ラット; 溶媒: DMSO)し、68週まで観察された。

総投与量1,400及び2,000 µg/ラット投与群では、肝細胞癌がそれぞれ3/5(68週)及び18/18(45~64週)の頻度で認められた。試験4~20週にと殺された全投与群の動物の大部分に肝前癌病変(過形成巣及び変異肝細胞巣)が観察された。また、AFG1投与群では68週までに26匹中4例に腎腺癌が認められた。

ラット(雄6匹)に、20 µgのAFG1を週2回65週間皮下投与(溶媒: 落花生油)した結果、30~50週で6匹中4例に皮下的肉腫が認められた。

IARCでは、実験動物におけるAFG1の発がん性について十分な証拠があるとしている。(参照12)

(3) アフラトキシン G₂ (AFG₂)

① 遺伝毒性

細菌を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化系存在下で一試験の一菌株に陽性の結果が認められたが、それ以外の試験では陰性であり、DNA損傷も認められなかった。げっ歯類の培養細胞及び真菌類では、遺伝子突然変異は誘発されなかった。チャイニーズハムスター細胞でSCEが、ラット及びシリアンハムス

ター肝細胞では*in vitro*でUDSが誘発されたが、ヒト線維芽細胞では*in vitro*でUDSの誘発はみられなかった。(参照11、12)

② 発がん性

哺乳動物を用いた発がん性試験は実施されていない。ニジマスに20 µg/kg 餌料の濃度でAFG₂を16カ月間混餌投与した試験において、肝細胞癌の発生は認められなかった。

IARCでは、実験動物におけるAFG₂の発がん性について証拠が不十分であるとしている。(参照12)

5. 発がんリスクの推定 (AFB₁)

実験動物を用いた試験では、ほとんどの動物種において肝臓が主要標的臓器であったが、AFB₁による発がんに対する感受性には動物間でかなりのばらつきがみられた。混餌投与の場合、肝腫瘍を誘発するAFB₁の有効量(飼料中濃度)は、魚類及び鳥類で10~30 µg/kg 飼料、ラットで15~1,000 µg/kg 飼料、ツパイで2,000 µg/kg 飼料であったが、マウスでは系統による変動が大きく、150,000 µg/kg まで肝腫瘍を誘発しない系統もあった。リスザルでは2,000 µg/kg 飼料の13カ月間投与で肝腫瘍を発生したのに対して、アカゲザル、アフリカミドリザル、カニクイザルに平均摂取量99~1,225 mg/頭で28~179カ月投与した場合の肝腫瘍発生率は低かった(7~20%)。

遺伝毒性については広範な試験が実施されており、そのほとんどにおいて陽性の結果が得られている。AFB₁は最も強力な変異原性物質の一つとみなされており、その活性代謝物がDNAと容易に反応しDNA付加体を形成し、この付加体またはその分解生成物が変異を引き起こすことで、細胞を造腫瘍性にすることが示唆されている。

代謝に関するデータから、AFB₁は生体内で多数のCYP分子種によりDNA結合性の化合物に変換されることが示された。CYP分子種活性の差は、遺伝的多型または発現環境の変化によるため、AFB₁に対するヒト感受性に対して重要な寄与因子の可能性があると考えられている。代謝に影響を与える他のリスク因子として、HBV及びHCV感染、肝吸虫、飲酒、喫煙、経口避妊薬の長期使用、栄養状態等が指摘されている。

疫学研究のほとんどが、AFB₁暴露と肝臓との相関を指摘しているが、AFB₁暴露は検出可能な独立したリスクではないとし、HBV感染などの他のリスク因子の存在下でのみAFB₁暴露はリスクとなることを示唆しているものもある。原発性肝臓リスクには多くの要因が影響を及ぼしているが、特に注目されているのがHBVの保因である。AFB₁の肝臓誘発能は、HBV同時感染者において有意に増大すると考えられている。ほとんどの疫学データは、HBsAg陽性患者とAFB₁汚染率の高い地域から得たものであるため、AFB₁汚染もHBV有病率も低い地域にお

けるこれらのリスク因子の関係については不明である。(参照11)

なお、肝臓癌の発生に関しては、これらの影響に加えて、HCV、ミクロシスチン、アルコール、喫煙等の関与を示唆する報告がある。

JECFA (1998年) 及び EFSA (2007年) では発がんリスクを以下のように推定している。

(1) JECFA

JECFA (1998年) では、表18に示す研究結果に基づき、体重1kgあたり1ng/日の用量で生涯にわたり AFB1 に経口暴露した時の HBV 感染を考慮した発がんリスクの推定を行っている。その結果、HBsAg 陽性者では0.3人/10万人/年(不確実性の範囲0.05~0.5人/10万人/年)、HBsAg 陰性者では0.01人/10万人/年(不確実性の範囲0.002~0.03人/10万人/年)となった。

なお、本リスク計算に用いられている中国の疫学調査は、極めて高い暴露量によるものであると共に、低用量暴露群でも約10%という高い発がん率を示すものであったことや、HBsAg 陽性率が高い集団でアフラトキシン暴露量の情報も極めて限られた調査に基づいて用いて行われたという不確実性を含んでいる。(参照10)

表18 疫学データに基づく人の肝臓癌のリスクの推定
(AFB1の暴露量を1ng/kg/日とした場合)

文献	HBsAgの有無	10万人当たりの発生率 ^(a)
Croy & Crouch (1991)*	-	0.036 (0.079)
	+	0.50 (0.77)
Wu-Williams et al. (1992)* 乗法線形モデル (バックグラウンド2.8/100,000) 加法線形モデル	-	0.0037 (0.006)
	+	0.094 (0.19)
	-	0.031 (0.06)
	+	0.43 (0.64)
Hosenyi (1992)*	-	0.0018 (0.0032)
	+	0.046 (0.08)
Bowers et al. (1993)*	-	0.013
	+	0.328
Qian et al. (1994)** (バックグラウンド3.4/100,000)	-	0.011
	+	0.11
Wang et al. (1996)*** (バックグラウンド3.4/100,000)	-	0.0082
	+	0.37

注：括弧内は高い方の95%信頼限界を表す。

*：中国チワン族自治区南部で実施された同一のデータ(1989)を用いた推計。

：上海で実施 *：台湾で実施

※：JECFA Monograph Food Additives Series 40 (1998)p50 Table 4より引用

また、JECFA (2008年) において、その後公表された疫学調査などの毒理学的評価に関連する調査結果は、従来の評価結果を変えるものではないとされている。(参照15)

(2) EFSA

EFSA では、動物実験及び疫学調査の結果から、用量反応をベンチマーク用量(BMD)モデルにより推定している。BMDの計算に用いた動物実験の結果は表19に、疫学調査の結果は表20に示されている。

<EFSA (2007) におけるベンチマークドーズ法による計算結果>

ラット	BMDL10	170 ng/kg 体重/日
ヒト	BMDL10	870 ng/kg 体重/日
	BMDL1	78 ng/kg 体重/日

(参照14)

表19 AFB1を混餌投与した雄のFischerラットにおける肝細胞癌の発生頻度

AFB1の用量	投与期間(週)	投与期間で調整した用量	肝細胞癌の発生頻度
0	104	0	0/18
0.04	104	0.040	2/22
0.2	93	0.179	1/22
0.6	96	0.554	4/21
2.0	82	1.58	20/25
4.0	54	2.1	28/28

表20 肝臓癌の発生率が高い国における疫学調査結果

国名	地域	AFB1摂取量 (ng/kg 体重/日)	肝臓癌発生率 (年間100万人当たり)
ケニア	Highland	4.2	14
	Midland	6.8	43
	Lowland	12.4	58
スワジランド	High veldt	14.3	35
	Middle veldt	40.0	85
	Lebombo	32.9	89
	Low veldt	127.1	184
トランスカイ	Four districts	16.5	91
モザンビーク	Manhica-Mangud	20.3	121
	Massinga	38.6	93
	Inhambane	77.7	218
	Inharrime	86.9	178
	Morrumbene	87.7	291
	Homoine-Maxixe Zavala	131.4 183.7	479 288
中国	広西チワン族自治区A	11.7	1,754
	広西チワン族自治区B	90.0	1,822
	広西チワン族自治区C	704.5	2,855
	広西チワン族自治区D	2,027.4	6,135

6. 暴露状況

(1) 汚染実態

アフラトキシンの汚染は、トウモロコシ、落花生、豆類、香辛料、木の実類に

特に高頻度で認められてきたが、大豆、小麦、米などの穀類にも低頻度ながら汚染が認められている。わが国においても、市販食品の汚染実態調査によって、米製品、トウモロコシ、ゴマ製品、落花生類、香辛料にアフラトキシン汚染が既に報告されている。これら既報の汚染実態をふまえ、汚染の可能性が考えられる食品について、3年間通年（2004～2006年度）で調査が行われた。

結果は別紙2に示されている。

わが国に流通している市販のそば類、生トウモロコシ、スイートコーン（缶詰や冷凍食品など加工されたもの）、コーンフレーク、ポップコーン、米、ごま油、豆菓子、せんべい、乾燥イチジク、ビール及び粉落花生からは定量限界以上のアフラトキシンは検出されなかった。一方、落花生、ピーナッツバター、アーモンド、ピスタチオ、そば粉、コーングリッツ、はと麦、香辛料、ココア、チョコレートからは、定量限界以上のアフラトキシンが検出された。はと麦の一試料で総アフラトキシンが9.71 µg/kg (AFB1: 9.0 µg/kg) 検出されたが、他のはと麦試料では概ねその濃度は低レベルであった。総アフラトキシンとしての最高濃度の汚染は、落花生の一試料における28.0 µg/kg (AFB1: 4.88 µg/kg、AFG1: 20.9 µg/kg) であった。この二試料を除き、3年間で測定した試料数を用いて求めた平均汚染濃度は、いずれの汚染食品目においても2 µg/kgを超えることはなかった。

検出された食品におけるAFB1、AFB2、AFG1及びAFG2の割合については、コーングリッツ、ピスタチオ、そば粉、香辛料ではBグループ（AFB1又はAFB2のみが検出されるもの）が主流と考えられたが、その他の食品目ではBGグループ（Bグループに加えて、AFG1又はAFG2が検出されるもの）が多く、特に落花生では、BよりGグループの汚染濃度の方が高かった。

個々のAFB1と総アフラトキシンとの濃度の関係について、ピーナッツバターの例で見てみると、大部分の試料でAFB1の占める割合が最も高く、総アフラトキシンとの比は1:2（AFB1:総アフラトキシン）程度であった。（参照4、5、6、7）

2007年度に市販ナッツ類（落花生、アーモンド、くるみ、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ）における総アフラトキシンの汚染実態について調査が行われた。

結果は表21に示されている。

我が国に流通している落花生、アーモンド、ピスタチオの一部から総アフラトキシンが検出されたが、検出濃度は極めて低いレベルであった。検出されたアフラトキシンの種類については、落花生では、AFB1とAFG1が同等のレベルであった。アーモンドではBGグループの汚染が認められたが、ピスタチオではBグループが主流と考えられた。

また、落花生は、AFB1の汚染が多く検出されることから輸入時に命令検査の対象とされている。そこで、輸入落花生中の各アフラトキシンの割合について、

任意の1検査機関での1972～1989年までのデータと2002～2006年までのデータでの比較検討が行われた。

輸入落花生の検査検体数については、1972～1989年では米国からの小粒落花生が主流であったが、2002～2006年では中国からの大粒落花生が主流となっている。

各輸入国からの落花生におけるアフラトキシン検出率は、収穫される年により変動があるが、全体的に輸入量の1%程度に検出限界以上のアフラトキシンが検出されている。BグループとBGグループの汚染比率についても年ごとに異なっているが、全体的にはBGグループの汚染率が年々高くなる傾向が見られた（図2）。

アフラトキシン汚染輸入落花生における各アフラトキシン濃度の比率については、表22、23及び図3-1～3-3に示されている。中国からの大粒落花生においてはAFB1よりAFG1の汚染が高い傾向が認められた。また、小粒落花生については、各国とも1972～1989年と比較して、2002～2006年ではAFG1の比率が高くなる傾向が見られた。（参照8、10）

表21 ナッツ類における総アフラトキシンの汚染実態調査結果

品名	検体数	汚染件数	平均汚染濃度 ^{注)} (範囲) (µg/kg)			
			AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
落花生	192	1	0.2	—	0.2	—
アーモンド	36	24	0.04 (痕跡-0.09)	0.01 (痕跡-0.02)	0.03 (0.02-0.03)	0.01 (痕跡-0.01)
くるみ	8	0	—	—	—	—
ヘーゼルナッツ	7	0	—	—	—	—
ピスタチオ	9	2	0.51(0.3-0.71)	0.06	—	—

検出限界：落花生0.1-0.5 µg/kg、アーモンド0.01 µg/kg、それ以外0.04 µg/kg
注) 痕跡については、0.01 µg/kgとして平均汚染濃度を算出した。

図2 命令検査となった落花生におけるアフラトキシンBGグループの汚染頻度の推移

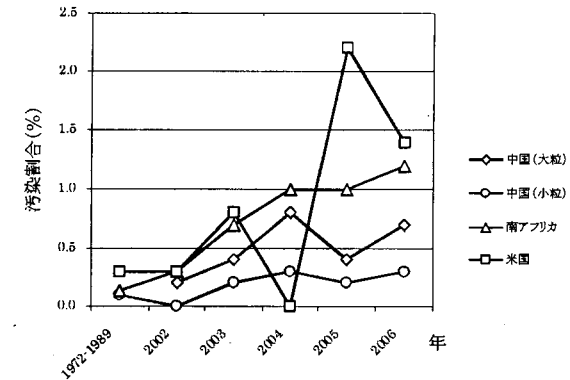


表 22 命令検査となった落花生におけるアフラトキシン検出数及び検出割合

	年	サンプル数	アフラトキシン検出数及び検出割合 (%)	
			B グループ*	BG グループ**
中国 (大粒)	2002	1,328	1 (0.1)	2 (0.2)
	2003	1,814	8 (0.4)	7 (0.4)
	2004	1,683	17 (1)	14 (0.8)
	2005	1,428	9 (0.6)	5 (0.4)
	2006	1,645	15 (0.9)	12 (0.7)
中国 (小粒)	2002	386	2 (0.5)	0 (0)
	2003	550	2 (0.4)	1 (0.2)
	2004	621	1 (0.2)	2 (0.3)
	2005	590	2 (0.3)	1 (0.2)
	2006	576	2 (0.3)	2 (0.3)
南アフリカ	2002	378	6 (1.6)	1 (0.3)
	2003	449	6 (1.3)	3 (0.7)
	2004	207	1 (0.5)	2 (1)
	2005	298	4 (1.3)	3 (1)
	2006	252	2 (0.8)	3 (1.2)
米国	2002	298	5 (1.7)	1 (0.3)
	2003	262	16 (6.2)	2 (0.8)
	2004	170	1 (0.6)	0 (0)
	2005	137	3 (2.2)	3 (2.2)
	2006	138	6 (4.3)	2 (1.4)

* : AFB1 又は AFB2 の両方もしくはどちらか一方が検出されたもの。
 ** : B グループに加え、AFG1 又は AFG2 の両方もしくはどちらか一方が検出されたもの。(B グループのみが検出されたものは含まない。)

表 23 アフラトキシンが検出された中国からの輸入大粒落花生の各アフラトキシンの比率

年	各アフラトキシンの比率 (%)			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
2002	15.6	0.0	69.1	15.3
2003	14.1	3.1	66.8	16.0
2004	18.5	2.5	63.9	15.1
2005	39.3	6.2	41.5	13.0
2006	16.4	2.8	65.7	15.1

図 3-1 アフラトキシンが検出された中国からの輸入小粒落花生の各アフラトキシンの比率

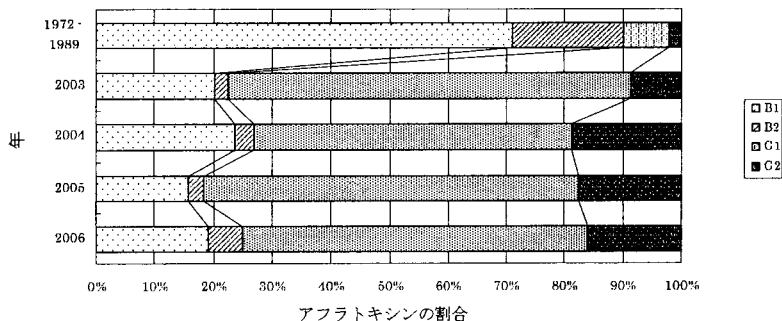


図 3-2 アフラトキシンが検出されたアメリカからの輸入小粒落花生の各アフラトキシンの比率

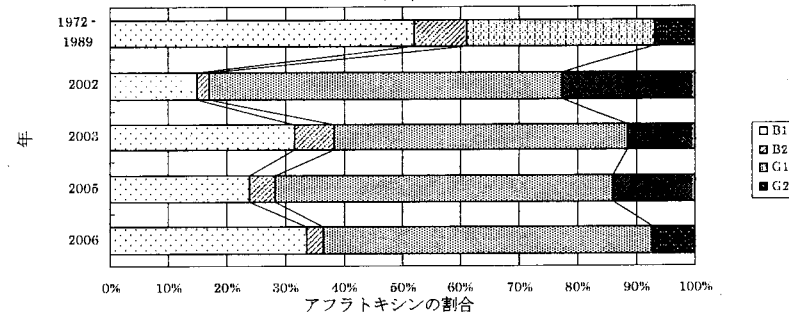
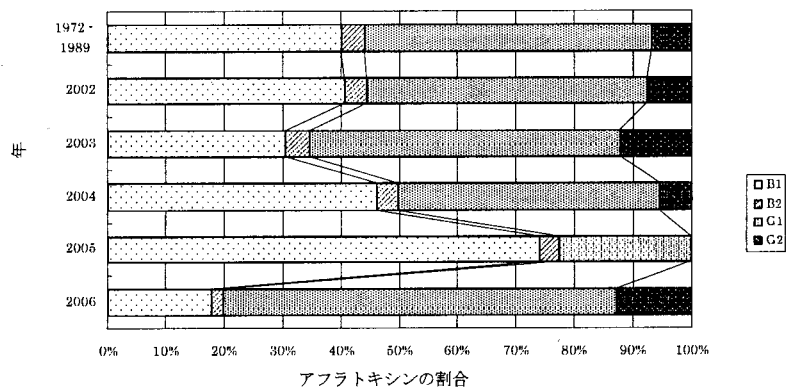


図 3-3 アフラトキシンが検出された南アフリカからの輸入小粒落花生の各アフラトキシンの比率



(2) 暴露量の推計 (AFB1)

2005 年度の「食品摂取頻度・摂取割合調査」による食品別の摂取量及び先に示した 2004～2006 年度の 3 年間の汚染実態調査結果からアフラトキシンが含有されると思われる 11 品目 (落花生、ピーナッツバター、チョコレート、ココア、ピスタチオ、白こしょう、レッドペッパー、アーモンド、はと麦、そば粉、そば種) を組合わせて、下記の 4 つの基準値を設定するシナリオを想定しモンテカルロ・シミュレーションの手法を用いて暴露量の推定を行った。

シナリオ a : 現状 (AFB1 のみ 10 µg/kg)
 シナリオ b : AFB1 : 4 µg/kg 及び総アフラトキシン : 8 µg/kg
 シナリオ c : AFB1 : 10 µg/kg 及び総アフラトキシン : 15 µg/kg
 シナリオ d : AFB1 : 10 µg/kg 及び総アフラトキシン : 20 µg/kg

結果は表 24 に示されている。

シナリオ a (現状) では 99.9 パーセンタイル値が 2.06 ng/kg 体重/日であり、最も少なめに見積もられるシナリオ b でも 99.9 パーセンタイル値は 1.88 ng/kg 体重/日であった。1 ng/kg 体重/日を超える割合はいずれのシナリオにおいても 0.2%程度となった。(参照7)

表 24 AFB1 一日推定暴露量の分布

	シナリオ a		シナリオ b		シナリオ c		シナリオ d	
	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B
下限値以下の仮定 ^(a)								
10 パーセンタイル	0	0	0	0	0	0	0	0
50 パーセンタイル	0	0	0	0	0	0	0	0
80 パーセンタイル	0	0	0	0	0	0	0	0
90 パーセンタイル	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
95 パーセンタイル	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.004
97.5 パーセンタイル	0.009	0.010	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009	0.010
99.0 パーセンタイル	0.045	0.051	0.041	0.048	0.043	0.049	0.042	0.049
99.5 パーセンタイル	0.305	0.307	0.259	0.261	0.283	0.285	0.285	0.286
99.9 パーセンタイル	2.063	2.063	1.881	1.880	1.956	1.956	1.895	1.958

注) 仮定 A : 検出下限未満の検体について、検出下限値である 0.1 µg/kg と仮定
 仮定 B : 検出下限未満の検体について、検出下限値の 0.1 µg/kg と 0 µg/kg の間
 の一様分布と仮定

IV. 食品健康影響評価

参照に挙げた資料を用いて総アフラトキシンの食品健康影響評価を実施した。

経口投与された AFB1 は生体内で水酸化体で代謝され、AFM1、AFP1、AFQ1 として、または抱合体に転換されて尿中または糞中に排泄される。哺乳動物では、乳中にも AFM1 などが排泄される。また、AFB1 は CYP 分子種により反応性の高い化合物である AFB1-8,9-エポキシドに変換され、DNA 付加体が形成される。この付加体またはその代謝物が変異を引き起こして細胞を造腫瘍性にする事が示唆されている。AFB1-8,9-エポキシドは主として GST による抱合化を受けて排泄される。

AFB1 の遺伝毒性については、*in vitro* 及び *in vivo* ともに広範な試験が実施されており、そのほとんどにおいて陽性の結果が得られている。

AFB1 の実験動物を用いた試験では、ほとんどの動物種において肝臓が標的器官であり、肝細胞癌が最も多く認められた。その他に肺及び腎臓などにも腫瘍が観察された。AFB1 の肝発がん性に対する感受性には動物種間で大きなばらつきがみられ、ラットで最も感受性が高かった。一方、非発がん毒性については、実験動物において生殖パラメーターの異常、催奇形性、免疫毒性などが認められた。

人における疫学調査のほとんどにおいて AFB1 暴露と肝細胞癌との相関が指摘されている。これらの調査はアフラトキシンの暴露量が多く、かつ、HBV の罹患率が高い地域で実施されており、HBV 感染はリスク因子であることが示唆されている。

AFB1 以外のアフラトキシンについては、AFG1 ではヒト肝ミクロソームにより代謝活性化されて DNA 付加体が形成され、遺伝毒性も認められた。代謝活性化の割合は AFB1 の 1/3~1/2 であった。雌雄ラットで肝細胞癌が、雄ラットで腎細胞腫瘍が誘発された。AFB2 と AFG2 に関するデータは限られている。AFB2 は、げっ歯類の細胞を用いた遺伝毒性試験では陽性結果が得られた。発がん性についてはラットの一試験で肝細胞癌が認められた。また、ラット体内で AFB1 に転換され、肝臓で代謝活性化を受けて DNA 付加体が形成されるとの報告がある。AFG2 では、遺伝毒性試験の一部で陽性結果が得られたが、ヒト培養細胞を用いた系では陰性であった。哺乳動物を用いた発がん性試験は実施されていないが、ニジマスを用いた試験で発がん性は認められなかった。

IARC では、実験動物における発がん性について、AFB1 及び AFG1 は十分な証拠がある、AFB2 は限定的な証拠がある、AFG2 は証拠が不十分であるとしている。また、AFB1 及び自然界で生じるアフラトキシン混合物はヒトにおいて発がん性を示す十分な証拠があるとしており、総合評価として、自然界で生じるアフラトキシン混合物はヒトに対して発がん性がある物質 (グループ 1) と分類している。

なお、評価の参考に供した 2008 年の JECFA の報告書の後に公表された関連文献についても調査を行ったが、これらの評価結果に変更を加えるべき根拠となる知見は確認されなかった。

上記のことから、総アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、発がんリスクによる評価が適切であると判断された。一方、非発がん影響に関しては、TDI（耐容一日摂取量）を設定するための定量的評価に適用できる報告はなく、非発がん性を指標としたTDIを求めることは困難と判断された。

発がんリスクについては、人の疫学調査の結果から、体重1kgあたり1ng/日の用量で生涯にわたりAFB1に経口暴露した時の肝臓癌が生じるリスクとして、HBsAg陽性者では0.3人/10万人/年（不確実性の範囲0.05～0.5人/10万人/年）、HBsAg陰性者では0.01人/10万人/年（不確実性の範囲0.002～0.03人/10万人/年）となった。なお、このリスク計算結果には、使用された中国の疫学調査結果が極めて高い暴露量によるものであると共に、低用量暴露群でも約10%という高い発がん率を示すものであったことや、HBsAg陽性率が高い集団でアフラトキシン暴露量の情報も極めて限られた調査に基づいて用いて行われたという不確実性を含んでいることに留意すべきである。

2004年～2006年に実施された汚染実態調査結果からアフラトキシンが含有されると思われる11品目を対象に確率論的手法を用いて暴露量の推定を行った結果では、AFB1に対して10μg/kgを検出限界として規制をしている現状においては、AFB1で4又は10μg/kg及び総アフラトキシンで8、15又は20μg/kgの基準値を設定したとしても、AFB1一日推定暴露量はほとんど変わらなかった。よって、落花生及び木の実（アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ）について、総アフラトキシンの規格基準を設定することによる食品からの暴露量に大きな影響はなく、様々な条件を前提とし不確実性を含んでいる推計ではあるが、現状の発がんリスクに及ぼす影響もほとんどないものと推察された。しかしながら、アフラトキシンは遺伝毒性が関与すると判断される発がん物質であり、食品からの総アフラトキシンの摂取は合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルにするべきである。汚染実態調査の結果、BGグループの汚染率が近年高くなる傾向が見られていることを考慮すると、落花生及び木の実について、発がんリスク及び実行可能性を踏まえ適切に総アフラトキシンの基準値を設定する必要がある。なお、アフラトキシンは自然汚染であり、BG比率が一定しないと予想されることから、総アフラトキシンとAFB1の両者について規制を行うことが望ましい。

また、食品からの総アフラトキシンの摂取を合理的に達成可能な範囲で出来る限り低いレベルにするために、落花生及び木の実以外の主要な食品についても、汚染実態及び国際的な基準設定の動向等を踏まえ、総アフラトキシンの規格基準の必要性について検討を行うことが望ましいと考える。

<別紙1：検査値等略称>

略称	名称
AFB1	アフラトキシン B ₁
AFB2	アフラトキシン B ₂
AFG1	アフラトキシン G ₁
AFG2	アフラトキシン G ₂
AFM1	アフラトキシン M ₁
AFP1	アフラトキシン P ₁
AFQ1	アフラトキシン Q ₁
BMD	ベンチマーク用量
CYP	シトクロム P450
DMSO	ジメチルスルホキシド
ELISA	酵素免疫測定法
GGT	γ-グルタミルトランスフェラーゼ(=γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(γ-GTP))
GST	グルタチオン-Sトランスフェラーゼ
HBsAg	B型肝炎ウイルス表面抗原
HBV	B型肝炎ウイルス
HCV	C型肝炎ウイルス
HPRT	ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ
LD ₅₀	半数致死量
LOH	ヘテロ接合体の消失
OR	オッズ比
PB	フェノバルビタール(ナトリウム)
SCE	姉妹染色分体交換
TAR	総投与放射能
TDI	耐容一日摂取量
UDS	不定期DNA合成

<別紙2：2004～2006年度に実施されたアフラトキシン汚染実態調査結果>

品名	試料数			汚染件数	検出機体の平均汚染濃度 (範囲) (µg/kg)					
	2004年度	2005年度	2006年度		合計	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Total
落花生	60	60	30	150	1	4.88	0.31	20.9	1.90	28.0
チョコレート(赤イボチョコレートを含む)		40	24	64	34	0.27(0.1~0.88)	0.13(0.1~0.18)	0.13(0.1~0.33)	0.1(0.1)	0.33(0.1~0.21)
ピーナツ			5	5	1	0.38	-	-	-	0.38
はと麦			17	17	6	2.45(0.29~9.0)	0.38(0.1~0.58)	0.16(0.1~0.30)	-	2.77(0.31~9.71)
そば粉	12	10	6	28	2	0.53(0.24~0.81)	0.17(0.173)	-	-	0.61(0.238~0.987)
香辛料			21	21	5	0.36(0.1~1.0)	-	0.2(0.2)	-	0.44(0.1~1.0)
ココア			11	11	8	0.33(0.17~0.60)	0.13(0.1~0.15)	0.11(0.1~0.11)	-	0.40(0.17~0.85)
ピーナツバター	21	20	21	62	21	0.86(0.1~2.59)	0.25(0.1~0.52)	0.37(0.1~0.81)	0.2(0.12~0.46)	1.18(0.1~3.92)
薬材(含む)			24	24	6	0.37(0.1~0.89)	0.14(0.1~0.17)	0.1(0.1~0.12)	-	0.43(0.1~1.06)
コーンフレーク	10	10	10	30	2	0.2	-	-	-	0.21
ごま油	10	10	10	30	0					
米	53	30	10	93	0					
ポテトチップス	10	10	10	30	0					
豆菓子			20	20	0					
コーンフレーク	20	15	15	50	0					
生チョコレート	10			10	0					
アイスクリーム*	50	30	10	90	0					
そば麺	39	20	25	84	0					
せんべい			21	21	0					
ビール			20	20	0					
乾燥(炒)ケシ			5	5	0					
粉落花生	10			10	0					

定量限界：0.1 µg/kg (ピーナツのみ0.005 µg/kg)

*：缶詰、冷凍食品等の加工品

<参照>

- 1 第9回かび毒・自然毒等専門調査会資料1：食品健康影響評価について（平成20年9月3日付け厚生労働省発食安第0903001号）
- 2 第9回かび毒・自然毒等専門調査会資料2：アフラトキシンに関するリスクプロファイル
- 3 第9回かび毒・自然毒等専門調査会資料3：コーデックス委員会及び各国のアフラトキシン規制状況
- 4 第9回かび毒・自然毒等専門調査会資料4：平成16年度厚生労働科学研究報告書（アフラトキシン関係抜粋）
- 5 第9回かび毒・自然毒等専門調査会資料5：平成17年度厚生労働科学研究報告書（アフラトキシン関係抜粋）
- 6 第9回かび毒・自然毒等専門調査会資料6：平成18年度厚生労働科学研究報告書（アフラトキシン関係抜粋）
- 7 第9回かび毒・自然毒等専門調査会資料7：平成16年度～18年度厚生労働科学研究報告書（アフラトキシン関係抜粋）
- 8 第9回かび毒・自然毒等専門調査会資料8：平成19年度食品・添加物等規格基準に関する試験検査等の実施について（規格基準関係） 食品中のかび毒に係る汚染実態調査（ピーナツトータルアフラトキシン実態調査）
- 9 宇田川 俊一，中里 光男，田端 節子，細貝 祐太郎，松本 昌雄：食品安全性セミナー〈5〉マイコトキシン，中央法規，東京，2002；79
- 10 岡野 清志，富田 常義，久米田 裕子，松丸 恵子，一戸 正勝：輸入落花生におけるアフラトキシンBG群汚染とその原因菌類としてのAspergillus section Flaviについて。マイコトキシン2008；58(2)：107-114
- 11 JECFA Monograph Food Additives Series 40 (1998)
- 12 IARC Monograph vol.56 (1993)
- 13 IARC Monograph vol.82 (2002)
- 14 EFSA Opinion Of The Scientific Panel On Contaminants In The Food Chain On A Request From The Commission Related To The Potential Increase Of Consumer Health Risk By A Possible Increase Of The Existing Maximum Levels For Aflatoxins In Almonds, Hazelnuts And Pistachios And Derived Products (2007)
- 15 JECFA Monograph Food Additives Series 59 (2008)

<参考資料>

我が国におけるアフラトキシンの暴露量及び発がんリスクの試算

1. 我が国でのアフラトキシンの暴露量の推定

(1) モンテカルロ法による日本人のアフラトキシンB₁ (AFB₁) 暴露量の推定結果
(平成18年度厚生労働科学研究報告書)

<規制値のシナリオ>

シナリオ a: 現状 (AFB₁のみ 10 μg/kg)
シナリオ b: AFB₁: 4 μg/kg及び総アフラトキシンの8 μg/kg
シナリオ c: AFB₁: 10 μg/kg及び総アフラトキシンの15 μg/kg
シナリオ d: AFB₁: 10 μg/kg及び総アフラトキシンの20 μg/kg

(ng/kg体重/日)

下限値以下の仮定 ^{注1)}	シナリオ a		シナリオ b		シナリオ c		シナリオ d	
	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B
10パーセンタイル	0	0	0	0	0	0	0	0
50パーセンタイル	0	0	0	0	0	0	0	0
80パーセンタイル	0	0	0	0	0	0	0	0
90パーセンタイル	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
95パーセンタイル	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.004
97.5パーセンタイル	0.009	0.010	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009	0.010
99.0パーセンタイル	0.045	0.051	0.041	0.048	0.043	0.049	0.042	0.049
99.5パーセンタイル	0.305	0.307	0.259	0.261	0.283	0.285	0.285	0.286
99.9パーセンタイル	2.063	2.063	1.881	1.880	1.956	1.956	1.895	1.958

仮定 A: 検出下限未満の検体について、検出下限値である0.1 ppbと仮定

仮定 B: 検出下限未満の検体について、検出下限値の0.1 ppbと0 ppbの間の一様分布と仮定

(2) 総アフラトキシンの日推定暴露量の推定

<前提>

総アフラトキシンの量をAFB₁の2倍と仮定^{注1)}し、(1)のAFB₁暴露量の推定結果を2倍したものを総アフラトキシンの日推定暴露量と推定

(ng/kg体重/日)

下限値以下の仮定	シナリオ a		シナリオ b		シナリオ c		シナリオ d	
	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B
90パーセンタイル	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
95パーセンタイル	0.006	0.008	0.006	0.006	0.006	0.008	0.006	0.008
99.0パーセンタイル	0.090	0.102	0.082	0.096	0.086	0.098	0.084	0.098

2. 我が国でのアフラトキシンの摂取による肝臓癌の発生リスク

(1) JECFAの推定結果に基づく試算

<前提>

・ AFB₁の発がんリスク HBsAg陽性の場合 0.3人/10万人/年
HBsAg陰性の場合 0.01人/10万人/年
・ 日本人の全人口を1億2771万人^{注2)}、B型肝炎キャリアーを140万人^{注3)}と推定

① AFB₁摂取による肝臓癌の発生リスク

(発がん/10万人/年)

下限値以下の仮定	シナリオ a		シナリオ b		シナリオ c		シナリオ d	
	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B
90パーセンタイル	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
95パーセンタイル	0.00004	0.00005	0.00004	0.00004	0.00004	0.00005	0.00004	0.00005
99.0パーセンタイル	0.00059	0.00067	0.00054	0.00063	0.00057	0.00065	0.00055	0.00065

② 総アフラトキシンの摂取による肝臓癌の発生リスク

<前提>

・ 総アフラトキシンの発がんリスクをAFB₁と同等と仮定^{注1)}

(発がん/10万人/年)

下限値以下の仮定	シナリオ a		シナリオ b		シナリオ c		シナリオ d	
	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B
90パーセンタイル	0.00003	0.00003	0.00003	0.00003	0.00003	0.00003	0.00003	0.00003
95パーセンタイル	0.00008	0.00011	0.00008	0.00008	0.00008	0.00011	0.00008	0.00011
99.0パーセンタイル	0.00119	0.00134	0.00108	0.00127	0.00113	0.00129	0.00111	0.00129

(2) EFSAの推定結果に基づく暴露マージン (MOE) の試算

<前提>

・ ラット BMDL10 170ng/kg体重/日
ヒト BMDL10 870ng/kg体重/日
BMDL1 78ng/kg体重/日
・ 暴露マージン(MOE) = ベンチマーク用量(BMD) ÷ 暴露量

① AFB₁暴露量とベンチマーク用量の間の暴露マージン (MOE)

下限値以下の仮定		シナリオ a		シナリオ b		シナリオ c		シナリオ d	
		仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B
90パーセンタイル	ラット BMDL10	170000	170000	170000	170000	170000	170000	170000	170000
	ヒト BMDL10	870000	870000	870000	870000	870000	870000	870000	870000
	ヒト BMDL1	78000	78000	78000	78000	78000	78000	78000	78000
	BMDL10	56667	42500	56667	56667	56667	42500	56667	42500
95パーセンタイル	ラット BMDL10	290000	217500	290000	290000	290000	217500	290000	217500
	ヒト BMDL10	290000	217500	290000	290000	290000	217500	290000	217500
	ヒト BMDL1	26000	19500	26000	26000	26000	19500	26000	19500
	BMDL10	3778	3333	4146	3542	3953	3469	4048	3469
99.0パーセンタイル	ラット BMDL10	19333	17059	21220	18125	20233	17755	20714	17755
	ヒト BMDL10	19333	17059	21220	18125	20233	17755	20714	17755
	ヒト BMDL1	1733	1529	1902	1625	1814	1592	1857	1592
	BMDL10	1733	1529	1902	1625	1814	1592	1857	1592

② 総アフラトキシンの暴露量とベンチマーク用量の間の暴露マージン (MOE)

<前提>

・ 総アフラトキシンの発がんリスクをAFB₁と同等と仮定^{注1)}

下限値以下の仮定		シナリオ a		シナリオ b		シナリオ c		シナリオ d	
		仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B
90パーセンタイル	ラット BMDL10	85000	85000	85000	85000	85000	85000	85000	85000
	ヒト BMDL10	435000	435000	435000	435000	435000	435000	435000	435000
	ヒト BMDL1	39000	39000	39000	39000	39000	39000	39000	39000
	BMDL10	28333	21250	28333	28333	28333	21250	28333	21250
95パーセンタイル	ラット BMDL10	145000	108750	145000	145000	145000	108750	145000	108750
	ヒト BMDL10	145000	108750	145000	145000	145000	108750	145000	108750
	ヒト BMDL1	13000	9750	13000	13000	13000	9750	13000	9750
	BMDL10	1889	1667	2073	1771	1977	1735	2024	1735
99.0パーセンタイル	ラット BMDL10	9667	8529	10610	9063	10116	8878	10357	8878
	ヒト BMDL10	9667	8529	10610	9063	10116	8878	10357	8878
	ヒト BMDL1	867	765	951	813	907	796	929	796
	BMDL10	867	765	951	813	907	796	929	796

注1) EFSA, Opinion Of The Scientific Panel On Contaminants In The Food Chain On A Request From The Commission Related To The Potential Increase Of Consumer Health Risk By A Possible Increase Of The Existing Maximum Levels For Aflatoxins In Almonds, Hazelnuts And Pistachios And Derived Products (2007) より

注2) 総務省統計局人口推計月報 (平成20年10月) より

注3) 厚生労働省健康局疾病対策課肝炎対策推進室ホームページより

General Standard for Contaminants and Toxins in Foods

(CODEX STAN 193-1995) (抜粋)

資料 1 - 3

AFLATOXINS, TOTAL

Reference to JECFA: 31 (1987), 46 (1996), 49 (1997), 68 (2007)
 Toxicological guidance: Carcinogenic potency estimates for aflatoxins B, G, M (1997, Intake should be reduced to levels as low as reasonably possible.)
 Residue definition: Aflatoxins total (B1 + B2 + G1 + G2)
 Synonyms: Abbreviations, AFB, AFG, with numbers, to designate specific compounds
 Related Code of Practice: Code of Practice for the Prevention and Reduction of Aflatoxin Contamination in Peanuts (CAC/RCP 55-2004)
 Code of Practice for the Prevention and Reduction of Aflatoxin Contamination in Tree Nuts (CAC/RCP 59-2005)
 Code of Practice for the Reduction of Aflatoxin B1 in Raw Materials and Supplemental Feedingstuffs for Milk Producing Animals (CAC/RCP 45-1997)
 Code of Practice for the Prevention and Reduction of Aflatoxin Contamination in Dried Figs (CAC/RCP 65-2008)

Commodity/Product Code	Name	Level ug/kg	Suffix	Type	Reference	Notes/Remarks for Codex Alimentarius
SO 0697	Peanut	15		ML		The ML applies to peanuts intended for further processing. For sampling plan, see Annex 1 below.
TN 0660	Almonds	15		ML		The ML applies to almonds intended for further processing. For sampling plan, see Annex 2 below.
TN 0666	Hazelnuts	15		ML		The ML applies to hazelnuts intended for further processing. For sampling plan, see Annex 2 below.
TN 0675	Pistachios	15		ML		The ML applies to pistachios intended for further processing. For sampling plan, see Annex 2 below.
TN 0660	Almonds	10		ML		The ML applies to almonds "ready-to-eat". For sampling plan, see Annex 2.
TN 0666	Hazelnuts	10		ML		The ML applies to hazelnuts "ready-to-eat". For sampling plan, see Annex 2.
TN 0675	Pistachios	10		ML		The ML applies to pistachios "ready-to-eat". For sampling plan, see Annex 2.

Aflatoxins are a group of highly toxic mycotoxins produced by fungi of the genus *Aspergillus*. The four main aflatoxins found in contaminated plant products are B1, B2, G1 and G2 and are a group of structurally related difuranocoumarin derivatives that usually occur together in varying ratios, AFB1 usually being the most important one. These compounds pose a substantial hazard to human and animal health. IARC (1992) classified aflatoxin B1 in Group 1 (human carcinogen) and AFM in Group 2B (probable human carcinogen). The liver is the primary target organ.

Annex I

SAMPLING PLAN FOR TOTAL AFLATOXINS IN PEANUTS INTENDED FOR FURTHER PROCESSING

INTRODUCTION

1. The sampling plan calls for a single 20 kg laboratory sample of shelled peanuts (27 kg of unshelled peanuts) to be taken from a peanut lot (sub-lot) and tested against a maximum level of 15 micrograms per kilogram ($\mu\text{g}/\text{kg}$) total aflatoxins.

CODEX STAN 193-1995
Schedule I

22

2. This sampling plan has been designed for enforcement and controls concerning total aflatoxins in bulk consignments of peanuts traded in the export market. To assist member countries in implementing the Codex sampling plan, sample selection methods, sample preparation methods and analytical methods required to quantify aflatoxin in bulk peanut lots are described in this document.

A. Definitions

- Lot:** an identifiable quantity of a food commodity delivered at one time and determined by the official to have common characteristics, such as origin, variety, type of packing, packer, consignor or markings.
- Sublot:** designated part of a large lot in order to apply the sampling method on that designated part. Each sublot must be physically separate and identifiable.
- Sampling plan:** is defined by an aflatoxin test procedure and an accept/reject limit. An aflatoxin test procedure consists of three steps: sample selection, sample preparation and aflatoxin quantification. The accept/reject limit is a tolerance usually equal to the Codex maximum limit.
- Incremental sample:** a quantity of material taken from a single random place in the lot or sublot.
- Aggregate sample:** the combined total of all the incremental samples taken from the lot or sublot. The aggregate sample has to be at least as large as the 20 kg laboratory sample.
- Laboratory sample:** smallest quantity of peanuts comminuted in a mill. The laboratory sample may be a portion of or the entire aggregate sample. If the aggregate sample is larger than 20 kg, a 20 kg laboratory sample should be removed in a random manner from the aggregate sample. The sample should be finely ground and mixed thoroughly using a process that approaches as complete a homogenisation as possible.
- Test portion:** portion of the comminuted laboratory sample. The entire 20 kg laboratory sample should be comminuted in a mill. A portion of the comminuted 20 kg sample is randomly removed for the extraction of the aflatoxin for chemical analysis. Based upon grinder capacity, the 20 kg aggregate sample can be divided into several equal sized samples, if all results are averaged.

B. Sampling

Material to be Sampled

3. Each lot which is to be examined must be sampled separately. Large lots should be subdivided into sublots to be sampled separately. The subdivision can be done following provisions laid down in Table 1 below.
4. Taking into account that the weight of the lot is not always an exact multiple of the weight of the sublots, the weight of the sublot may exceed the mentioned weight by a maximum of 20%.

Table 1: Subdivision of Large Lots into Sublots for Sampling

Commodity	Lot weight - tonne (T)	Weight or number of sublots	Number of incremental samples	Laboratory Sample Weight (kg)
Peanuts	≥ 500	100 tonnes	100	20
	>100 and <500	5 sublots	100	20
	≥ 25 and ≤ 100	25 tonnes	100	20
	>15 and ≤ 25	-1 sublot	100	20

Number of Incremental Samples for Lots of Less than 15 Tonnes

5. The number of incremental samples to be taken depends on the weight of the lot, with a minimum of 10 and a maximum of 100. The figures in the following Table 2 may be used to determine the number of incremental samples to be taken. It is necessary that the total sample weight of 20 kg is achieved.

Table 2: Number of Incremental Samples to be Taken Depending on the Weight of the Lot

Lot weight tonnes – (T)	N° of incremental samples
T ≤ 1	10
1 < T ≤ 5	40
5 < T ≤ 10	60
10 < T < 15	80

Incremental Sample Selection

6. Procedures used to take incremental samples from a peanut lot are extremely important. Every individual peanut in the lot should have an equal chance of being chosen. Biases will be introduced by the sample selection methods if equipment and procedures used to select the incremental samples prohibit or reduce the chances of any item in the lot from being chosen.

7. Since there is no way to know if the contaminated peanut kernels are uniformly dispersed through out the lot, it is essential that the aggregate sample be the accumulation of many small portions or increments of the product selected from different locations throughout the lot. If the aggregate sample is larger than desired, it should be blended and subdivided until the desired laboratory sample size is achieved.

Static Lots

8. A static lot can be defined as a large mass of peanuts contained either in a single large container such as a wagon, truck, or railcar or in many small containers such as sacks or boxes and the peanuts are stationary at the time a sample is selected. Selecting a truly random sample from a static lot can be difficult because the container may not allow access to all peanuts.

9. Taking a aggregate sample from a static lot usually requires the use of probing devices to select product from the lot. The probing devices used should be specially designed for the type of container. The probe should (1) be long enough to reach all product, (2) not restrict any item in the lot from being selected, and (3) not alter the items in the lot. As mentioned above, the aggregate sample should be a composite from many small increments of product taken from many different locations throughout the lot.

10. For lots traded in individual packages, the sampling frequency (SF), or number of packages that incremental samples are taken from, is a function of the lot weight (LT), incremental sample weight (IS), aggregate sample weight (AS) and the individual packing weight (IP), as follows :

Equation 1 : $SF = (LT \times IS) / (AS \times IP)$. The sampling frequency (SF) is the number of packages sampled. All weights should be in the same mass units such as kg.

Dynamic Lots

11. True random sampling can be more nearly achieved when selecting an aggregate sample from a moving stream of peanuts as the lot is transferred, for example, by a conveyor belt from one location to another. When sampling from a moving stream, take small increments of product from the entire length of the moving stream; composite the peanuts to obtain an aggregate sample; if the aggregate sample is larger than the required laboratory sample, then blend and subdivide the aggregate sample to obtain the desired size laboratory sample.

12. Automatic sampling equipment such as cross-cut samplers are commercially available with timers that automatically pass a diverter cup through the moving stream at predetermined and uniform intervals. When automatic equipment is not available, a person can be assigned to manually pass a cup through the stream at periodic intervals to collect incremental samples. Whether using automatic or manual methods, small increments of peanuts should be collected and composited at frequent and uniform intervals throughout the entire time peanuts flow past the sampling point.

13. Cross-cut samplers should be installed in the following manner: (1) the plane of the opening of the diverter cup should be perpendicular to the direction of flow; (2) the diverter cup should pass through the entire cross sectional area of the stream; and (3) the opening of the diverter cup should be wide enough to accept all items of interest in the lot. As a general rule, the width of the diverter cup opening should be about three times the largest dimensions of the items in the lot.

14. The size of the aggregate sample (S) in kg, taken from a lot by a cross cut sampler is :

Equation 2 : $S = (D \times LT) / (T \times V)$. D is the width of the diverter cup opening (in cm), LT is the lot size (in kg), T is interval or time between cup movement through the stream (in seconds), and V is cup velocity (in cm/sec).

15. If the mass flow rate of the moving stream, MR (kg/sec), is known, then the sampling frequency (SF), or number of cuts made by the automatic sampler cup is :

Equation 3 : $SF = (S \times V) / (D \times MR)$.

16. Equation 2 can also be used to compute other terms of interest such as the time between cuts (T). For example, the required time (T) between cuts of the diverter cup to obtain a 20 kg aggregate sample from a 30,000 kg lot where the diverter cup width is 5.08 cm (2 inches), and the cup velocity through the stream 30 cm/sec. Solving for T in Equation 2,

$T = (5.08 \text{ cm} \times 30,000 \text{ kg}) / (20 \text{ kg} \times 30 \text{ cm/sec}) = 254 \text{ sec}$

17. If the lot is moving at 500 kg per minute, the entire lot will pass through the sampler in 60 minutes and only 14 cuts (14 incremental samples) will be made by the cup through the lot. This may be considered too infrequent, in that too much product passes through the sampler between the time the cup cuts through the stream.

Weight of the Incremental Sample

18. The weight of the incremental sample should be approximately 200 grams or greater, depending on the total number of increments, to obtain an aggregate sample of 20kg.

Packaging and transmission of samples

19. Each laboratory sample shall be placed in a clean, inert container offering adequate protection from contamination and against damage in transit. All necessary precautions shall be taken to avoid any change in composition of the laboratory sample which might arise during transportation or storage.

Sealing and labelling of samples

20. Each laboratory sample taken for official use shall be sealed at the place of sampling and identified. A record must be kept of each sampling, permitting each lot to be identified unambiguously and giving the date and place of sampling together with any additional information likely to be of assistance to the analyst.

C. Sample Preparation

Precautions

21. Daylight should be excluded as much as possible during the procedure, since aflatoxin gradually breaks down under the influence of ultra-violet light.

Homogenisation – Grinding

22. As the distribution of aflatoxin is extremely non-homogeneous, samples should be prepared - and especially homogenised - with extreme care. All laboratory sample obtained from aggregate sample is to be used for the homogenisation/grinding of the sample.

23. The sample should be finely ground and mixed thoroughly using a process that approaches as complete a homogenisation as possible.

24. The use of a hammer mill with a #14 screen (3.1 mm diameter hole in the screen) has been proven to represent a compromise in terms of cost and precision. A better homogenisation (finer grind – slurry) can be obtained by more sophisticated equipment, resulting in a lower sample preparation variance.

Test portion

25. A minimum test portion size of 100 g taken from the laboratory sample.

D. Analytical Methods

Background

26. A criteria-based approach, whereby a set of performance criteria is established with which the analytical method used should comply, is appropriate. The criteria-based approach has the advantage that, by avoiding setting down specific details of the method used, developments in methodology can be exploited without having to reconsider or modify the specified method. The performance criteria established for methods should include all the parameters that need to be addressed by each laboratory such as the detection limit, repeatability coefficient of variation, reproducibility coefficient of variation, and the percent recovery necessary for various statutory limits. Utilising this approach, laboratories would be free to use the analytical method most appropriate for their facilities. Analytical methods that are accepted by chemists internationally (such as AOAC) may be used. These methods are regularly monitored and improved depending upon technology.

Performance Criteria for Methods of Analysis

Table 3: Specific Requirements with which Methods of Analysis Should Comply

Criterion	Concentration Range	Recommended Value	Maximum Permitted Value
Blanks	All	Negligible	-
Recovery-Aflatoxins Total	1 - 15 µg/kg	70 to 110 %	
	> 15 µg/kg	80 to 110 %	
Precision RSD _R	All	As derived from Horwitz Equation	2 x value derived from Horwitz Equation
Precision RSD _T may be calculated as 0.66 times Precision RSD _R at the concentration of interest			

- The detection limits of the methods used are not stated as the precision values are given at the concentrations of interest;
- The precision values are calculated from the Horwitz equation, i.e.:

$$RSD_R = 2^{-(1-0.5\log C)}$$

where:

- * RSD_R is the relative standard deviation calculated from results generated under reproducibility conditions $[(s_R / \bar{x}) \times 100]$
- * C is the concentration ratio (i.e. 1 = 100g/100g, 0.001 = 1,000 mg/kg)

27. This is a generalised precision equation which has been found to be independent of analyte and matrix but solely dependent on concentration for most routine methods of analysis.

Annex 2

SAMPLING PLANS FOR AFLATOXIN CONTAMINATION IN READY-TO-EAT TREENUTS AND TREENUTS DESTINED FOR FURTHER PROCESSING: ALMONDS, HAZELNUTS AND PISTACHIOS

DEFINITION

Lot - an identifiable quantity of a food commodity delivered at one time and determined by the official to have common characteristics, such as origin, variety, type of packing, packer, consignor, or markings.

Sublot - designated part of a larger lot in order to apply the sampling method on that designated part. Each sublot must be physically separate and identifiable.

Sampling plan - is defined by an aflatoxin test procedure and an accept/reject limit. An aflatoxin test procedure consists of three steps: sample selection, sample preparation and aflatoxin quantification. The accept/reject limit is a tolerance usually equal to the Codex maximum level.

Incremental sample - the quantity of material taken from a single random place in the lot or sublot.

Aggregate sample - the combined total of all the incremental samples that is taken from the lot or sublot. The aggregate sample has to be at least as large as the laboratory sample or samples combined.

Laboratory sample - the smallest quantity of tree nuts comminuted in a mill. The laboratory sample may be a portion of or the entire aggregate sample. If the aggregate sample is larger than the laboratory sample(s), the laboratory sample(s) should be removed in a random manner from the aggregate sample.

Test portion - a portion of the comminuted laboratory sample. The entire laboratory sample should be comminuted in a mill. A portion of the comminuted laboratory sample is randomly removed for the extraction of the aflatoxin for chemical analysis.

Ready-to-eat treenuts - nuts, which are not intended to undergo an additional processing/treatment that has proven to reduce levels of aflatoxins.

Treenuts destined for further processing - nuts, which are intended to undergo an additional processing/treatment that has proven to reduce levels of aflatoxins before being used as an ingredient in foodstuffs, otherwise processed or offered for human consumption. Processes that have proven to reduce levels of aflatoxins are shelling, blanching followed by color sorting, and sorting by specific gravity and color (damage). There is some evidence that roasting reduces aflatoxins in pistachios but for other nuts the evidence is still to be supplied.

Operating Characteristic (OC) Curve - a plot of the probability of a accepting a lot versus lot concentration when using a specific sampling plan design. The OC curve provides an estimate of good lots rejected (exporter's risk) and bad lots accepted (importer's risk) by a specific aflatoxin sampling plan design.

SAMPLING PLAN DESIGN CONSIDERATIONS

1. Importers may commercially classify treenuts as either "ready-to-eat" (RTE) or "destined for further processing" (DFP). As a result, maximum levels and sampling plans are proposed for both commercial types of treenuts. Maximum levels need to be defined for treenuts destined for further processing and ready-to-eat treenuts before a final decision can be made about a sampling plan design.
2. Treenuts can be marketed either as inshell or shelled nuts. For example, pistachios are predominately marketed as inshell nuts while almonds are predominately marketed as shelled nuts.
3. Sampling statistics, shown in Annex I, are based upon the uncertainty and aflatoxin distribution among laboratory samples of shelled nuts. Because the shelled nut count per kg is different for each of the three treenuts, the laboratory sample size is expressed in number of nuts for statistical purposes. However, the shelled nut count per kg for each treenut, shown in Annex I, can be used to convert laboratory sample size from number of nuts to mass and vice versa.
4. Uncertainty estimates associated with sampling, sample preparation, and analysis, shown in Annex I, and the negative binomial distribution² are used to calculate operating characteristic (OC) curves that describe the performance of the proposed aflatoxin-sampling plans (Annex II).

² Whitaker, T., Dickens, J., Monroe, R., and Wiser, E. 1972. Comparison of the negative binomial distribution of aflatoxin in shelled peanuts to the negative binomial distribution. *J. American Oil Chemists' Society*, 49:590-593.

5. In Annex I, the analytical variance reflects a reproducibility relative standard deviation of 22%, which is suggested by Thompson and is based upon Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) data³. A relative standard deviation of 22% is considered by FAPAS as an appropriate measure of the best agreement that can be reliably obtained between laboratories. An analytical uncertainty of 22% is larger than the within laboratory variation measured in the sampling studies for the three treenuts. The within laboratory analytical uncertainty for each treenut can be found at the website <http://www5.bac.nesu.edu.usda/www/ResearchAct/Docs/treenutg.html>.
6. The issue of correcting the analytical test result for recovery is not addressed in this document. However, Table 2 specifies several performance criteria for analytical methods including suggestions for the range of acceptable recovery rates.

AFLATOXIN TEST PROCEDURE AND MAXIMUM LEVELS

7. An aflatoxin-sampling plan is defined by an aflatoxin test procedure and a maximum level. A value for the proposed maximum level and the aflatoxin test procedure are given below in this section.
8. The maximum levels for total aflatoxins in treenuts (almonds, hazelnuts, and pistachios) "ready-to-eat" and "destined for further processing" are 10 and 15 ng/g, respectively.
9. Choice of the number and size of the laboratory sample is a compromise between minimizing risks (false positives and false negatives) and costs related to sampling and restricting trade. For simplicity, it is recommended that the proposed aflatoxin sampling plans use a 20 kg aggregate sample for all three treenuts.
10. The two sampling plans (RTE and DFP) have been designed for enforcement and controls concerning total aflatoxins in bulk consignments (lots) of treenuts traded in the export market.

Treenuts destined for further processing

Maximum level - 15 ng/g total aflatoxins

Number of laboratory samples - 1

Laboratory sample size - 20 kg

Almonds - shelled nuts

Hazelnuts - shelled nuts

Pistachios - inshell nuts (equivalent to about 10kg shelled nuts that is calculated on the basis of the actual edible portion in the sample)

Sample preparation - dry grind with vertical cutter mixer type mill and a 50 g test portion

Analytical method - performance based (see Table 2)

Decision rule - If the aflatoxin test result is less than or equal to 15 ng/g total aflatoxins, then accept the lot. Otherwise, reject the lot.

The operating characteristic curve describing the performance of the sampling plan for the three treenuts destined for further processing is shown in Annex II.

Ready-to-eat treenuts

Maximum level - 10 ng/g total aflatoxins

Number of laboratory samples - 2

Laboratory sample size - 10 kg

Almonds - shelled nuts

Hazelnuts - shelled nuts

Pistachios - inshell nuts (equivalent to about 5 kg shelled nuts per test sample that is calculated on the basis of the actual edible portion in the sample)

Sample preparation - dry grind with vertical cutter mixer type mill and a 50 g test portion

Analytical method - performance based (see Table 2)

Decision rule - If the aflatoxin test result is less than or equal to 10 ng/g total aflatoxin in both test samples, then accept the lot. Otherwise, reject the lot.

³ Thompson, M. 2000. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *J. Royal Society of Chemistry*, 125:385-386.

The operating characteristic curve describing the performance of the sampling plan for the three ready-to-eat treenuts is shown in Annex II.

- To assist member countries implement these two Codex sampling plans, sample selection methods, sample preparation methods, and analytical methods required to quantify aflatoxin in laboratory samples taken from bulk treenut lots are described in the following sections.

SAMPLE SELECTION

Material to be sampled

- Each lot, which is to be examined for aflatoxin, must be sampled separately. Lots larger than 25 tonnes should be subdivided into sublots to be sampled separately. If a lot is greater than 25 tonnes, the number of sublots is equal to the lot weight in tonnes divided by 25 tonnes. It is recommended that a lot or a subplot should not exceed 25 tonnes. The minimum lot weight should be 500 kg.
- Taking into account that the weight of the lot is not always an exact multiple of 25 tonne sublots, the weight of the subplot may exceed the mentioned weight by a maximum of 25%.
- Samples should be taken from the same lot, i.e. they should have the same batch code or at the very least the same best before date. Any changes which would affect the mycotoxin content, the analytical determination or make the aggregate samples collected unrepresentative should be avoided. For example do not open packaging in adverse weather conditions or expose samples to excessive moisture or sunlight. Avoid cross-contamination from other potentially contaminated consignments nearby.
- In most cases any truck or container will have to be unloaded to allow representative sampling to be carried out.

Incremental Sample Selection

- Procedures used to take incremental samples from a treenut lot are extremely important. Every individual nut in the lot should have an equal chance of being chosen. Biases will be introduced by sample selection methods if equipment and procedures used to select the incremental samples prohibit or reduce the chances of any item in the lot from being chosen.
- Since there is no way to know if the contaminated treenut kernels are uniformly dispersed throughout the lot, it is essential that the aggregate sample be the accumulation of many small incremental samples of product selected from different locations throughout the lot. If the aggregate sample is larger than desired, it should be blended and subdivided until the desired laboratory sample size is achieved.

Number of Incremental Samples for Lots of varying weight

- The number and size of the laboratory sample(s) will not vary with lot (subplot) size. However, the number and size of the incremental samples will vary with lot (subplot) size.
- The number of incremental samples to be taken from a lot (subplot) depends on the weight of the lot. Table 1 shall be used to determine the number of incremental samples to be taken from lots or sublots of various sizes below 25 tonnes. The number of incremental samples varies from a minimum of 10 and to a maximum of 100.

Table 1. Number and size of incremental samples composited for an aggregate sample of 20 kg^a as a function of lot (or subplot) weight.

Lot or Sublot Weight ^b (T in Tonnes)	Minimum Number of Incremental Samples	Minimum Incremental Sample Size ^c (g)	Minimum Aggregate Sample Size (kg)
T<1	10	2000	20
1≤T<5	25	800	20
5≤T<10	50	400	20
10≤T<15	75	267	20
15≤T	100	200	20

a/ Minimum aggregate sample size = laboratory sample size of 20 kg

b/ 1 Tonne = 1000 kg
c/ Minimum incremental sample size = laboratory sample size (20 kg)/minimum number of incremental samples,

i.e. for 0.5<T< 1 tonne, 2000 g = 20000/10

Weight of the Incremental Sample

- The suggested minimum weight of the incremental sample should be approximately 200 grams for lots of 25 metric tonnes (25,000 kg). The number and/or size of incremental samples will have to be larger than that suggested in Table 1 for lots sizes below 25,000 kg in order to obtain an aggregate sample greater than or equal to the 20 kg laboratory sample.

Static Lots

- A static lot can be defined as a large mass of treenuts contained either in a large single container such as a wagon, truck or railcar or in many small containers such as sacks or boxes and the nuts are stationary at the time a sample is selected. Selecting a truly random sample from a static lot can be difficult because all containers in the lot or subplot may not be accessible.
- Taking incremental samples from a static lot usually requires the use of probing devices to select product from the lot. The probing devices should be specifically designed for the commodity and type of container. The probe should (1) be long enough to reach all products, (2) not restrict any item in the lot from being selected, and (3) not alter the items in the lot. As mentioned above, the aggregate sample should be a composite from many small incremental samples of product taken from many different locations throughout the lot.
- For lots traded in individual packages, the sampling frequency (SF), or number of packages that incremental samples are taken from, is a function of the lot weight (LT), incremental sample weight (IS), aggregate sample weight (AS) and the individual packing weight (IP), as follows:

Equation 1: $SF=(LT \times IS)/(AS \times IP)$.

- The sampling frequency (SF) is the number of packages sampled. All weights should be in the same mass units such as kg.

Dynamic Lots

- Representative aggregate samples can be more easily produced when selecting incremental samples from a moving stream of treenuts as the lot is transferred from one location to another. When sampling from a moving stream, take small incremental samples of product from the entire length of the moving stream; composite the incremental samples to obtain an aggregate sample; if the aggregate sample is larger than the required laboratory sample(s), then blend and subdivide the aggregate sample to obtain the desired size laboratory sample(s).
- Automatic sampling equipment such as a cross-cut sampler is commercially available with timers that automatically pass a diverter cup through the moving stream at predetermined and uniform intervals. When automatic sampling equipment is not available, a person can be assigned to manually pass a cup through the stream at periodic intervals to collect incremental samples. Whether using automatic or manual methods, incremental samples should be collected and composited at frequent and uniform intervals throughout the entire time the nuts flow past the sampling point.
- Cross-cut samplers should be installed in the following manner: (1) the plane of the opening of the diverter cup should be perpendicular to the direction of the flow; (2) the diverter cup should pass through the entire cross sectional area of the stream; and (3) the opening of the diverter cup should be wide enough to accept all items of interest in the lot. As a general rule, the width of the diverter cup opening should be about two to three times the largest dimensions of items in the lot.
- The size of the aggregate sample (S) in kg, taken from a lot by a cross cut sampler is:

Equation 2: $S=(D \times LT) / (T \times V)$,

where D is the width of the diverter cup opening (cm), LT is the lot size (kg), T is interval or time between cup movement through the stream (seconds), and V is cup velocity (cm/sec).

- If the mass flow rate of the moving stream, MR (kg/sec), is known, then the sampling frequency (SF), or number of cuts made by the automatic sampler cup can be computed from Equation 3 as a function of S, V, D, and MR.

Equation 3: $SF = (S \times V) / (D \times MR)$.

30. Equations 2 and 3 can also be used to compute other terms of interest such as the time between cuts (T). For example, the time (T) required between cuts of the diverter cup to obtain a 20 kg aggregate sample from a 20,000 kg lot where the diverter cup width is 5.0 cm and the cup velocity through the stream 30 cm/sec. Solving for T in Equation 2,

$$T = (5.0 \text{ cm} \times 20,000 \text{ kg}) / (20 \text{ kg} \times 30 \text{ cm/sec}) = 250 \text{ sec.}$$

31. If the lot is moving at 500 kg per minute, the entire lot will pass through the sampler in 40 minutes (2400 sec) and only 9.6 cuts (9 incremental samples) will be made by the cup through the lot (Equation 3). This may be considered too infrequent, in that too much product (2,083.3 kg) passes through the sampler between the time the cup cuts through the stream.

Packaging and Transportation of Samples

32. Each laboratory sample shall be placed in a clean, inert container offering adequate protection from contamination, sunlight, and against damage in transit. All necessary precautions shall be taken to avoid any change in composition of the laboratory sample, which might arise during transportation or storage. Samples should be stored in a cool dark place.

Sealing and Labelling of Samples

33. Each laboratory sample taken for official use shall be sealed at the place of sampling and identified. A record must be kept of each sampling, permitting each lot to be identified unambiguously and giving the date and place of sampling together with any additional information likely to be of assistance to the analyst.

SAMPLE PREPARATION

Precautions

34. Sunlight should be excluded as much as possible during sample preparation, since aflatoxin gradually breaks down under the influence of ultra-violet light. Also, environmental temperature and relative humidity should be controlled and not favor mold growth and aflatoxin formation.

Homogenization - Grinding

35. As the distribution of aflatoxin is extremely non-homogeneous, laboratory samples should be homogenized by grinding the entire laboratory sample received by the laboratory. Homogenization is a procedure that reduces particle size and disperses the contaminated particles evenly throughout the comminuted laboratory sample.

36. The laboratory sample should be finely ground and mixed thoroughly using a process that approaches as complete homogenization as possible. Complete homogenization implies that particle size is extremely small and the variability associated with sample preparation (Annex I) approaches zero. After grinding, the grinder should be cleaned to prevent aflatoxin cross-contamination.

37. The use of vertical cutter mixer type grinders that mix and comminute the laboratory sample into a paste represent a compromise in terms of cost and fineness of grind or particle size reduction⁴. A better homogenization (finer grind), such as a liquid slurry, can be obtained by more sophisticated equipment and should provide the lowest sample preparation variance⁵.

Test portion

38. The suggested weight of the test portion taken from the comminuted laboratory sample should be approximately 50 grams. If the laboratory sample is prepared using a liquid slurry, the slurry should contain 50 g of nut mass.

39. Procedures for selecting the 50 g test portion from the comminuted laboratory sample should be a random process. If mixing occurred during or after the comminution process, the 50 g test portion can be selected from any location throughout the comminuted laboratory sample. Otherwise, the 50 g test portion should be the accumulation of several small portions selected throughout the laboratory sample.

40. It is suggested that three test portions be selected from each comminuted laboratory sample. The three test portions will be used for enforcement, appeal, and confirmation if needed.

⁴ Ozay, G., Seyhan, F., Yilmaz, A., Whitaker, T., Slate, A., and Giesbrecht, F. 2006. Sampling hazelnuts for aflatoxin: Uncertainty associated with sampling, sample preparation, and analysis. J. Association Official Analytical Chemists, Int., 89:1004-1011.

⁵ Spanjer, M., Scholten, J., Kastrop, S., Jorissen, U., Schatzki, T., Toyofuku, N. 2006. Sample comminution for mycotoxin analysis: Dry milling or slurry mixing?, Food Additives and Contaminants, 23:73-83.

ANALYTICAL METHODS

Background

41. A criteria-based approach, whereby a set of performance criteria is established with which the analytical method used should comply, is appropriate. The criteria-based approach has the advantage that, by avoiding setting down specific details of the method used, developments in methodology can be exploited without having to reconsider or modify the specific method. The performance criteria established for methods should include all the parameters that need to be addressed by each laboratory such as the detection limit, repeatability coefficient of variation (within lab), reproducibility coefficient of variation (among lab), and the percent recovery necessary for various statutory limits. Analytical methods that are accepted by chemists internationally (such as AOAC) may be used. These methods are regularly monitored and improved depending upon technology.

Performance Criteria for Methods of Analysis

42. A list of criteria and performance levels are shown in Table 2. Utilizing this approach, laboratories would be free to use the analytical method most appropriate for their facilities.

Table 2: Specific Requirements with which Methods of Analysis Should Comply

Criterion	Concentration Range (ng/g)	Recommended Value	Maximum Permitted Value
Blanks	All	Negligible	n/a
Recovery	1 to 15	70 to 110%	n/a
	>15	80 to 110%	n/a
Precision or Relative Standard Deviation RSD _R (Reproducibility)	1 to 120	Equation 4 by Thompson	2 x value derived from Equation 4
	>120	Equation 5 by Horwitz	2 x value derived from Equation 5
Precision or Relative Standard Deviation RSD _r (Repeatability)	1 to 120	Calculated as 0.66 times Precision RSD _R	n/a
	>120	Calculated as 0.66 times Precision RSD _r	n/a

n/a = not applicable

43. The detection limits of the methods used are not stated. Only the precision values are given at the concentrations of interest. The precision values are calculated from equations 4 and 5 developed by Thompson² and Horwitz and Albert⁶, respectively.

Equation 4: $RSD_R = 22.0$ (for $C \leq 120 \text{ ng/g}$ or $c \leq 120 \times 10^{-9}$)

Equation 5: $RSD_R = 2^{(1-0.5 \log c)}$ (for $C > 120 \text{ ng/g}$ or $c > 120 \times 10^{-9}$)

where:

- RSD_R = the relative standard deviation calculated from results generated under reproducibility conditions
- RSD_r = the relative standard deviation calculated from results generated under repeatability conditions = 0.66RSD_R
- c = the aflatoxin concentration ratio (i.e. 1 = 100g/100g, 0.001 = 1,000 mg/kg)
- C = aflatoxin concentration or mass of aflatoxin to mass of tree nuts (i.e. ng/g)

⁶ Horwitz, W. and Albert, R. 2006. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. J. Association of Official Analytical Chemists, Int., 89:1095-1109.

- 44. Equations 4 and 5 are generalized precision equations, which have been found to be independent of analyte and matrix but solely dependent on concentration for most routine methods of analysis.
- 45. Results should be reported on the edible portion of the sample.

Annex I

Uncertainty, as measured by the variance, associated with sampling, sample preparation, and analytical steps of the aflatoxin test procedure used to estimate aflatoxin in almonds, hazelnuts, and pistachios.

Sampling data for almonds, hazelnuts, and pistachios were supplied by the United States, Turkey, and Iran, respectively.

Variance estimates and the negative binomial distribution¹ were used to compute operating characteristic curves for each treenut in Annex II. Sampling, sample preparation, and analytical variances associated with testing almonds, hazelnuts, and pistachios are shown in Table 1 below.

Because of the computational complexities associated with use of the negative binomial distribution to compute operational characteristic (OC) curves for various sampling plan designs, the effect of various laboratory sample sizes, various numbers of laboratory samples, and various maximum levels on the performance (OC curves) of sampling plan designs is provided at the website address http://www.5.bae.ncsu.edu/usda/www/ResearchAct/Does_treenutwa.html.

Table 1. Variances^a associated with the aflatoxin test procedure for each treenut.

Test Procedure	Almonds	Hazelnuts	Pistachios
Sampling ^{b,c}	$S_s^2 = (7,730/ns)5.759C^{1.561}$	$S_s^2 = (10,000/ns)4.291C^{1.609}$	$S_s^2 = 8,000/ns)7.913C^{1.475}$
Sample Prep ^d	$S_{sp}^2 = (100/nss)0.170C^{1.646}$	$S_{sp}^2 = (50/nss)0.021C^{1.545}$	$S_{sp}^2 = (25/nss)2.334C^{1.522}$
Analytical ^e	$S_u^2 = (1/na)0.0484C^{2.0}$	$S_u^2 = (1/na)0.0484C^{2.0}$	$S_u^2 = (1/na)0.0484C^{2.0}$
Total variance	$S_s^2 + S_{sp}^2 + S_u^2$	$S_s^2 + S_{sp}^2 + S_u^2$	$S_s^2 + S_{sp}^2 + S_u^2$

a/ Variance = S^2 (s, sp, and a denote sampling, sample preparation, and analytical steps, respectively, of aflatoxin test procedure)

b/ ns = laboratory sample size in number of shelled nuts, nss = test portion size in grams, na = number of aliquots quantified by HPLC, and C = aflatoxin concentration in ng/g total aflatoxin.

c/ Shelled nut count/kg for almonds, hazelnuts, and pistachios is 773, 1000, and 1600, respectively.

d/ Sample preparation for almonds, hazelnuts, and pistachios reflect Hobart, Robot Coupe, and Marjaan Khatman type mills, respectively. Laboratory samples were dry ground into a paste for each treenut.

e/ Analytical variances reflect FAPAS recommendation for upper limit of analytical reproducibility uncertainty. A relative standard deviation of 22% is considered by Thompson³ (based upon FAPAS data) as an appropriate measure of the best agreement that can be obtained between laboratories. An analytical uncertainty of 22% is larger than the within laboratory uncertainty measured in the sampling studies for the three treenuts.

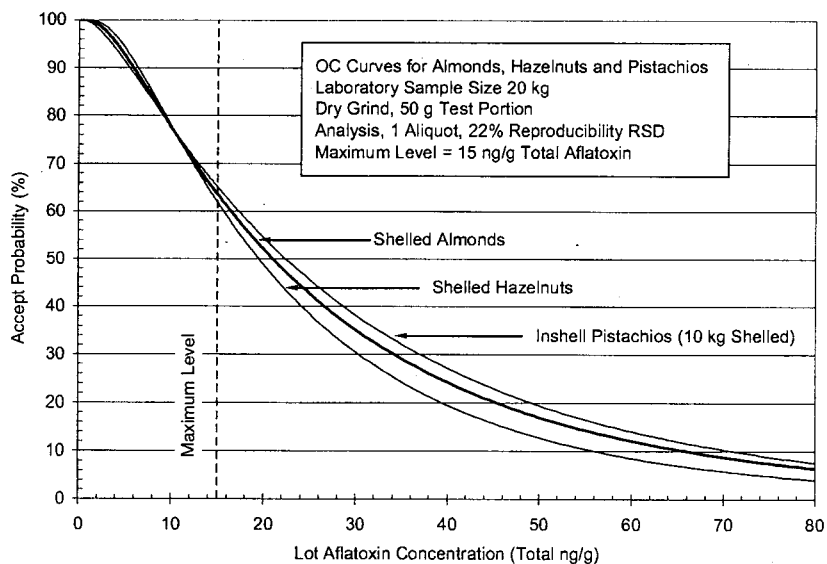
- 7 -

Annex II

Operating Characteristic Curves describing the performance of draft aflatoxin sampling plans for almonds, hazelnuts, and pistachios.

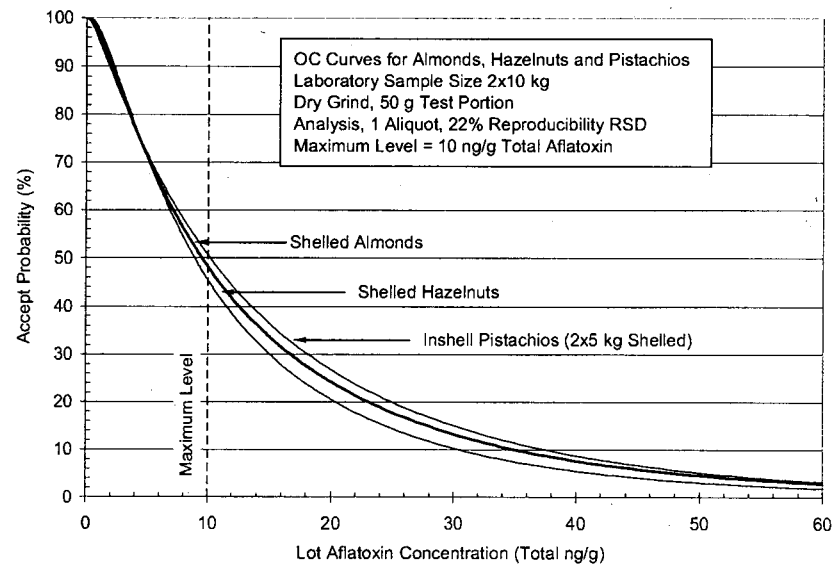
Treenuts Destined for Further Processing

Operating Characteristic curve describing the performance of the aflatoxin sampling plan for almonds, hazelnuts, and pistachios destined for further processing using a single laboratory sample of 20 kg and a maximum level of 15 ng/g for total aflatoxins. The operating characteristic curve reflects uncertainty associated with a 20 kg laboratory sample of shelled nuts for almonds and hazelnuts and a 20 kg laboratory sample of inshell nuts (about 10kg shelled nuts) for pistachios, dry grind with a vertical cutter mixer type mill, 50 g test portion, and quantification of aflatoxin in the test portion by HPLC.



Ready-to-Eats Treenuts

Operating Characteristic curve describing the performance of the aflatoxin sampling plan for ready-to-eat almonds, hazelnuts, and pistachios using two laboratory samples of 10 kg each and a maximum level of 10 ng/g for total aflatoxins, dry grind with a vertical cutter mixer type mill, 50 g test portion, and quantification of aflatoxin in the test portion by HPLC.



清涼飲料水の規格基準の改正について

1. 経緯及び現状

コーデックス委員会におけるナチュラルミネラルウォーター等の規格の設定及び我が国の水道法の水質基準改正の動きを受け、平成 14 年 10 月 3 日及び同年 11 月 12 日の食品規格部会において、清涼飲料水に係る規格基準の改正について審議が行われた結果、以下の結論が取りまとめられた。

- ① ミネラルウォーター類については、製品の基準とする
- ② ミネラルウォーター類については、無殺菌・無除菌製品と殺菌等の処理済み製品に分類して検討する
- ③ 化学物質等に係る規格基準については、水道法の水質基準の改正後、項目及び基準値を検討する
- ④ 食品製造用水（飲用適の水）については、用途等の整理を行った上で検討する
- ⑤ 微生物に係る規格基準については、コーデックス規格との整合性及びカビ等の検討が必要である

なお、平成 15 年 7 月 1 日に食品安全委員会が設立されたことから、同日付けで清涼飲料水の規格基準の改正に係る食品健康影響評価を依頼し（化学物質 48 項目、農薬 93 項目）、これまでに 35 物質（化学物質 24 項目、農薬 11 項目）について評価結果を受理している（平成 21 年 6 月現在）。

（参考）平成 15 年 5 月 30 日：水道法水質基準改正（平成 16 年 4 月 1 日施行）
2004 年（平成 16 年）：WHO 飲料水水質ガイドライン改正

2. 当面の検討課題

- (1) 飲用適の水（食品製造用水）の取扱いの整理
- (2) ミネラルウォーター類の原水基準の取扱いの整理
- (3) 残留農薬等のポジティブリスト制度との整合
- (4) 化学物質（農薬を除く）の基準値選定方針の決定

飲用適の水（食品製造用水）の規定の取扱いについて（案）

1. 経緯及び現状

昭和 37 年 12 月、食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の「ガラスびん（紙栓をつけたものを除く。）または金属製容器包装に収められる清涼飲料水の製造基準」において、次のとおり「飲用適の水」が定義された。

「炭酸を含有するものにあつては、その原水は、水道法（昭和 32 年法律第 177 号）による水道水により供給される水または 5 分間以上煮沸し、もしくは細菌ろ過した水であつて、水道法第 4 条に規定する水質基準に適合するもの（以下「飲用適の水」という。）」

以降、平成 4 年の水道法水質基準の改正に伴い、平成 5 年 11 月の食品衛生調査会において食品の製造等に用いられる水の規格に係る検討が行われ、「清涼飲料水の製造基準」において、次のとおり「飲用適の水」の定義が改正された。

「原水は、飲用適の水（水道法（昭和 32 年法律第 177 号）第 3 条第 2 項に規定する水道事業の用に供する水道、同条第 6 項に規定する専用水道若しくは同条第 7 項に規定する簡易専用水道により供給される水又は次の表の第 1 欄に掲げる事項につき同表の第 3 欄に掲げる方法によって行う検査において、同表の第 2 欄に掲げる基準に適合する水をいう。以下同じ。）でなければならない。」

なお、当該規定は、他の個別食品の規格基準等においても準用されている（別紙参照）。

2. 対処方針

今般、清涼飲料水の規格基準の見直しを行うに当たり、まずは法令上の整理を行うため、清涼飲料水の製造基準における「飲用適の水」の定義を、食品一般の製造、加工及び調理基準において規定する。

また、「飲用適の水」の規定内容については、清涼飲料水の規格基準の見直しの後、改めて検討を行う。

＜参考＞ 食品、添加物等の規格基準改正案

新	旧
<p>B 食品一般の製造，加工及び調理基準 1～4 (略) 5 魚介類を生食用に調理する場合は，飲用適の水(水道法(昭和32年法律第177号)第3条第2項に規定する水道事業の用に供する水道，同条第6項に規定する専用水道若しくは同条第7項に規定する簡易専用水道により供給される水又は次の表の第1欄に掲げる事項につき同表の第3欄に掲げる方法によって行う検査において，同表の第2欄に掲げる基準に適合する水をいう。以下同じ。)で十分に洗浄し，製品を汚染するおそれのあるものを除去しなければならない。(表：省略)</p>	<p>B 食品一般の製造，加工及び調理基準 1～4 (略) 5 魚介類を生食用に調理する場合は，飲用適の水(第1食品の部D各条の項の○清涼飲料水の2清涼飲料水の製造基準の2.に規定するものをいう。)で十分に洗浄し，製品を汚染するおそれのあるものを除去しなければならない。</p>
<p>D 各条 ○ 清涼飲料水 1 清涼飲料水の成分規格(略) 2 清涼飲料水の製造基準 (1) ミネラルウォーター類，冷凍果実飲料(果実の搾汁又は果実の搾汁を濃縮したものを冷凍したものであって，原料用果汁以外のものをいう。以下同じ。)及び原料用果汁以外の清涼飲料水 1. (略) 2. 原水は，飲用適の水でなければならない。</p>	<p>D 各条 ○ 清涼飲料水 1 清涼飲料水の成分規格(略) 2 清涼飲料水の製造基準 (1) ミネラルウォーター類，冷凍果実飲料(果実の搾汁又は果実の搾汁を濃縮したものを冷凍したものであって，原料用果汁以外のものをいう。以下同じ。)及び原料用果汁以外の清涼飲料水 1. (略) 2. 原水は，飲用適の水(水道法(昭和32年法律第177号)第3条第2項に規定する水道事業の用に供する水道，同条第6項に規定する専用水道若しくは同条第7項に規定する簡易専用水道により供給される水又は次の表の第1欄に掲げる事項につき同表の第3欄に掲げる方法によって行う検査において，同表の第2欄に掲げる基準に適合する水をいう。以下同じ。)でなければならない。(表：省略)</p>

(別紙) 食品衛生法において「飲用適の水」が準用されている規定

<食品、添加物等の規格基準(抜粋)>

第1 食品

B 食品一般の製造、加工及び調理基準

- 5 魚介類を生食用に調理する場合は、飲用適の水(第1 食品の部D 各条の項の○ 清涼飲料水の2 清涼飲料水の製造基準の2. に規定するものをいう。)で十分に洗浄し、製品を汚染するおそれのあるものを除去しなければならない。

D 各条

○ 清涼飲料水

2 清涼飲料水の製造基準

- (1) ミネラルウォーター類、冷凍果実飲料(果汁の搾汁又は果実の搾汁を濃縮したものを冷凍したものであって、原料用果汁以外のものをいう。以下同じ。)及び原料用果汁以外の清涼飲料水
2. 原水は、飲用適の水(水道法(昭和32年法律第177号)第3条第2項に規定する水道事業の用に供する水道、同条第6項に規定する専用水道若しくは同条第7項に規定する簡易専用水道により供給される水又は次の表の第1欄に掲げる事項につき同表の第3欄に掲げる方法によって行う検査において、同表の第2欄に掲げる基準に適合する水をいう。以下同じ。)でなければならない。
- 4 コップ販売式自動販売機及び運搬器具又は容器包装に充てんされた原液を用いて自動的に清涼飲料水の調理を行う器具(以下「清涼飲料水全自動調理機」という。)により調理される清涼飲料水の調理基準
- (1)・・・。また、調理に用いる水は、飲用適の水でなければならない。

○ 氷雪

2 氷雪の製造基準

氷雪の製造に使用する原水は、飲用適の水でなければならない。

○ 氷菓

2 氷菓の製造基準及び保存基準

- (1) 氷菓の原水は、飲用適の水でなければならない。
- (3) 氷結管から氷菓を抜きとる場合に、その外部を加温するために使用する水は、飲用適の流水でなければならない。

○ 食鳥卵

2 食鳥卵(鶏の液卵に限る。)の製造基準

(2) 個別基準

1. 殺菌液卵

d 原料卵を洗浄する場合は、汚卵と区別して、割卵の直前に飲用適の流水で行わなければならない。

2. 未殺菌液卵

d 原料卵を洗浄する場合は、汚卵と区別して、割卵の直前に飲用適の流水で行わなければならない。

○ 食肉製品

2 食肉製品の製造基準

(1) 一般基準

2. 製造に使用する冷凍原料食肉の解凍は、衛生的な場所で行わなければならない。この場合において、水を用いるときは、飲用適の流水で行わなければならない。

(2) 個別基準

2. 非加熱食肉製品

a ④ ロ 塩漬けした食肉の塩抜きを行う場合には、5℃以下の飲用適の水を用いて、換水しながら行わなければならない。

⑤ ロ 塩漬けした食肉の表面を洗浄する場合には、飲用適の冷水を用いて、換水しながら行わなければならない。

b ⑤ 塩漬けした食肉の塩抜きを行う場合には、5℃以下の飲用適の水を用いて、換水しながら行わなければならない。

3. 特定加熱食肉製品

e 塩漬けした食肉の塩抜きを行う場合には、5℃以下の飲用適の水を用いて、換水しながら行わなければならない。

h . . .

なお、冷却に水を用いるときは、飲用適の流水で行わなければならない。

4. 加熱食肉製品

b 加熱殺菌後の冷却は、衛生的な場所において十分行わなければならない。この場合において、水を用いるときは、飲用適の流水で行わなければならない。

○ 鯨肉製品

2 鯨肉製品の製造基準

(2) 製造に使用する冷凍原料鯨肉の解凍は、衛生的な場所で行わなければならない。この場合において、水を用いるときは、飲用適の流水で行わなければならない。

(7) 加熱殺菌後の冷却は、衛生的な場所において十分行わなければならない。この場合において、水を用いるときは、飲用適の流水で行わなければならない。

- 魚肉ねり製品
 - 2 魚肉ねり製品の製造基準
 - (9) 加熱殺菌後の放冷は、衛生的な場所において十分に行わなければならない。この場合において、水を用いるときは、飲用適の流水で行うか、又は遊離残留塩素 1.0ppm 以上を含む水で絶えず換水をしながらいなければならない。

- ゆでだこ
 - 2 ゆでだこの加工基準
 - (2) 加工に使用する水は、飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水を使用しなければならない。
 - (3) たこは、ゆでた後、速やかに飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水で十分冷却しなければならない。

- ゆでがに
 - 2 ゆでがにの加工基準
 - (2) 加工に使用する水は、飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水を使用しなければならない。
 - (4) 加熱後は、速やかに飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水で十分冷却しなければならない。・・・。

- 生食用鮮魚介類
 - 2 生食用鮮魚介類の加工基準
 - (1) 加工に使用する水は、飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水を使用しなければならない。
 - (3) 原料用鮮魚介類が凍結されたものである場合は、その解凍は、衛生的な場所で行うか、又は清潔な水槽中で飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水を用い、十分に換水しながら行わなければならない。
 - (4) 原料用鮮魚介類は、飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水で十分に洗浄し、製品を汚染するおそれのあるものを除去しなければならない。

- 生食用かき
 - 2 生食用かきの加工基準
 - (5) むき身作業に使用する水は、飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水を使用しなければならない。
 - (8) むき身は、飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水で十分洗浄しなければならない。

○ 豆腐

1 豆腐の製造基準

(8) 豆腐を製造する場合に使用する水は、飲用適の水でなければならない。

2 豆腐の保存基準

(1) 豆腐は、冷蔵するか、又は十分に洗浄し、かつ、殺菌した水槽内において、飲用適の冷水で絶えず換水をしながらか保存しなければならない。・・・。

○ 冷凍食品

2 冷凍食品（生食用冷凍鮮魚介類に限る。）の加工基準

(2) 加工に使用する水は、飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水を使用しなければならない。

(3) 原料用鮮魚介類が凍結されたものである場合は、その解凍は、衛生的な場所で行うか、又は清潔な水槽中で飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水を用い、かつ、十分に換水しながら行わなければならない。

(4) 原料用鮮魚介類は、飲用適の水、殺菌した海水又は飲用適の水を使用した人工海水で十分に洗浄し、製品を汚染するおそれのあるものを除去しなければならない。

○ 容器包装詰加圧加熱殺菌食品

2 容器包装詰加圧加熱殺菌食品の製造基準

(7) 加圧加熱殺菌後の冷却に水を用いるときは、飲用適の流水で行うか、又は遊離残留塩素を1.0ppm以上含む水で絶えず換水をしながらか行わなければならない。

第2 添加物

E 製造基準

添加物一般

2.・・・、添加物の製剤は、・・・及び食品（いずれも法第7条第1項に基づき規格が定められているものにあつては、その規格に合うもの、及び水にあつては飲用適の水に限る。）以外のものを用いて製造してはならない。

第5 洗浄剤

B 洗浄剤の使用基準

3 野菜もしくは果実または飲食器は、洗浄剤を使用して洗浄した後飲用適の水ですすがなければならない。・・・。

<乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（抜粋）>

別表

二 乳等の成分規格並びに製造、調理及び保存の方法の基準

(三) 乳製品の成分規格並びに製造及び保存の方法の基準

(6) アイスクリーム

2 製造の方法の基準

a アイスクリームの原水は、飲用適の水であること。

c 氷結管からアイスクリームを抜きとる場合に、その外部を温めるため使用する水は、飲用適の流水であること。

(7) アイスミルク

2 製造の方法の基準

アイスクリームの例によること。

(8) ラクトアイス

2 製造の方法の基準

アイスクリームの例によること。

(23) 発酵乳

2 製造の方法の基準

a 発酵乳の原水は、飲用適の水であること。

(24) 乳酸菌飲料（無脂乳固形分 3.0%以上のもの）

2 製造の方法の基準

a 乳酸菌飲料の原液の製造に使用する原水は、飲用適の水であること。

(四) 乳等を主要原料とする食品の成分規格並びに製造及び保存の方法の基準

(1) 乳酸菌飲料（無脂乳固形分 3.0%未満のもの）

2 製造の方法の基準

乳酸菌飲料（無脂乳固形分 3.0%以上のもの）の例によること。

ミネラルウォーター類の原水基準の取扱いについて（案）

1. 経緯及び現状

ミネラルウォーター類については、食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）において、「水のみを原料とする清涼飲料水」として定義され、清涼飲料水としての成分規格（性状 2 項目、微生物 3 項目*¹、化学物質 4 項目*²）に加え、製造基準としての原水基準（微生物 2 項目、化学物質 16 項目）が設定されている。

しかしながら、一般的にミネラルウォーター類は、その製造において殺菌又は除菌以外の処理を行わないものがほとんどであり、また、一部の清涼飲料水には、原水にミネラルウォーター類が使用されているものもある。また、コーデックス委員会においては、ナチュラルミネラルウォーター（鉱水のみを原材料とする水）やボトルドウォーター（水道水等を原材料とする水）について製品としての規格設定が行われており、成分規格と原水基準の双方による現行の規制は、必ずしも実態に即していないものと考えられる。

なお、現行のミネラルウォーター類の原水基準は、平成 6 年 12 月にコーデックス委員会のヨーロッパ地域食品規格に準拠して見直しが行われ、その際に、原水の汚染防止を目的として、通知により以下のとおり泉源の衛生管理に関する指標が示されている（平成 6 年 12 月 26 日付け衛食第 214 号）。

「原水は、汚染を防止するため、泉源地及び採水地点の環境保全を含め、その衛生確保には十分配慮するよう必要に応じ指導されたい。環境汚染の指標として、界面活性剤、フェノール類、農薬、PCB 類、鉱油、多環芳香族炭化水素が挙げられる。これらが検出された場合には、汚染の原因を解明し、検出されないもののみをミネラルウォーター類の原水として使用するよう指導されたい。」

*1：うち 2 項目については未殺菌・未除菌のミネラルウォーター類が対象

*2：農薬についてはポジティブリスト制度による規制

2. 対処方針

- (1) ミネラルウォーター類の原水基準を廃止し、成分規格に統一する。なお、成分規格は、暫定的に現行のミネラルウォーター類の原水基準を準用することとする。
- (2) 清涼飲料水の原水基準に、「飲用適の水」に加えて「ミネラルウォーター類」を規定するとともに、原水とは「清涼飲料水の製造時に用いる原料水」をいい、地下水等の泉源を指すものではないことを明確化する。
- (3) 通知による泉源の衛生管理指標の適用を、清涼飲料水の原水全般に拡大する。

<参考>ミネラルウォーター類の成分規格案（農薬を除く）（単位：mg/l）

項目	新成分規格	現行原水基準	現行成分規格
混濁*1	認めない	—	認めない
沈殿物*1	認めない	—	認めない
一般細菌*2	100 以下	100 以下	—
大腸菌群	不検出	不検出	不検出
腸球菌*3	不検出	—	不検出
緑膿菌*3	不検出	—	不検出
カドミウム	0.01/不検出	0.01	不検出
水銀	0.0005	0.0005	—
セレン	0.01	0.01	—
鉛	0.1/不検出	0.1	不検出
バリウム	1	1	—
ヒ素	0.05/不検出	0.05	不検出
六価クロム	0.05	0.05	—
シアン	0.01	0.01	—
硝酸性窒素及び 亜硝酸性窒素	10	10	—
フッ素	2	2	—
ホウ素	30 (ホウ酸)	30 (ホウ酸)	—
亜鉛	5	5	—
銅	1	1	—
マンガン	2	2	—
有機物等	12 (過マンガン酸カリウム消費量)	12 (過マンガン酸カリウム消費量)	—
硫化物	0.05 (硫化水素)	0.05 (硫化水素)	—
スズ	150 (ppm)	—	150 (ppm)

*1：原材料として用いられる植物若しくは動物の組織成分、着香若しくは着色の目的に使用される添加物又は一般に人の健康を損なうおそれがないと認められる死滅し微生物（製品の原材料に混入することがやむを得ないものに限る。）に起因するものを除く。

*2：1ml の検水で形成される集落数。

*3：容器包装内の二酸化炭素圧力が 20℃で 98kPa 未満であって、かつ、殺菌又は除菌を行わないものに限る。

清涼飲料水の規格基準と残留農薬等の ポジティブリスト制度との整合について（案）

1. 経緯及び現状

平成 15 年の食品衛生法改正に基づき、食品中に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品（農薬等）について、一定の量を超えて農薬等が残留する食品の販売等を原則禁止する制度（以下「ポジティブリスト制度」という。）が、平成 18 年 5 月 29 日から施行された。

ポジティブリスト制度はすべての食品を対象としており、現在、清涼飲料水については以下①～④の規格基準が設定されているほか、⑤のとおり運用されている。

- ① 清涼飲料水を含むすべての食品に対して、毒性（発がん性等）の観点から 19 農薬等について「不検出」基準を設定
- ② ミネラルウォーター類に対して、WHO 飲料水水質ガイドラインに基づき、33 農薬について基準値を設定
- ③ 一部の清涼飲料水に対して、コーデックス規格の加工食品の分類に基づき、1～3 農薬について基準値を設定
- ④ ①～③以外の農薬等については、一律基準（0.01ppm）を適用
- ⑤ 清涼飲料水の原水については、ポジティブリスト制度の規制対象から除外

なお、⑤の運用については、清涼飲料水の原水が食品衛生法以外の法規制を受ける場合があること等から、清涼飲料水の規格基準の改正を検討する際に整理されることを前提に、従前の取扱いを継続しているものである。

一方、清涼飲料水中の農薬については、別途、平成 15 年 7 月 1 日付けで食品安全委員会に農薬 93 項目の食品健康影響評価を依頼し、現在までに 11 項目の評価結果を受理している（別紙参照）。

2. 対処方針

- (1) 清涼飲料水の残留農薬に係る規制については、引き続き、ポジティブリスト制度に基づき設定された規格基準によることとする。
- (2) 清涼飲料水の原水の残留農薬に係る規制については、原水として使用する水が遵守すべき法規制に従うこととする。
- (3) 食品安全委員会に対して清涼飲料水の規格基準の改正に係る食品健康影響評価を依頼した農薬 93 項目については、評価依頼内容の見直しを行う。

(別紙) 清涼飲料水の規格基準改正に係る食品健康影響評価を依頼した農薬

評価結果	項目	ミネラルウォーター類 残留基準(ppm)
	1,2-ジブプロモ-3-クロプロパノール	0.001
	1,2-ジブプロモエタン	0.0004
	1,2-ジクロプロパノール	0.04
	1,3-ジクロプロパノール(D-D)	0.02
	2,4-D	0.03
	2,4-DB	0.09
	2,4,5-T	不検出
	DDT 及び代謝物	0.001
	EPN	
	MCPA	0.002
	アシュラム	
	アセフェート	
○	アジキストロピリン	
	アトラジン	0.002
	アラクロール	0.02
	アルジカルブ	0.01
	アルトリン/テイルトリン	0.00003
	イソフェホス	
○	イソプロカルブ(MIPC)	
	イソプロロン	0.009
	イプロジオン	
	イノクタジン酢酸塩	
	エスプロカルブ	
	エチイフェホス(EDDP)	
	エトフェンプロックス	
	エントスルファン	
	エントリン	0.0006
○	カフェンストール	
	カルバリル(NAC)	
○	カルブロバミド	
	カルボフラン	0.007
	キャプタン	
	グリホサート	
	クロルピリン	0.0002
○	クロルピリホス	0.03
	クロタロニル(TPN)	
	クロトルロン	0.03
	シアナジン	0.0006
	ジクロン(DCMU)	
	ジクロルボス(DDVP)	
	ジクロプロロップ	0.1
	ジクワット	
	ジメトエート	0.006
	シメトリン	
	シマジン(CAT)	0.002
	タイアジン	
○	タイムロン	

評価結果	項目	ミネラルウォーター類 残留基準(ppm)
	ダラホソ	
	チウラム	
	チオンカルブ	
	チオファネートメチル	
	テニクロール	
	テルブチラジン	0.007
	トリクロピル	
	トリクロホスメチル	
	トリクロホソ(DEP)	
	トリシクラール	
	トリフルラリン	0.02
○	ハロスルフロメチル	
	ピフェノックス	
	ピリブチカルブ	
○	ピリブロキシフェン	0.3
	フェントロチオン(MEP)	
	フェノプロップ	0.009
	フェンチオン(MPP)	
	フェントエート(PAP)	
	ブタミホス	
○	ブプロフェジン	
	フラザスルフロ	
○	フルトラニル	
	ブレチラクロール	
	ブロシミドン	
	ブロピコナゾール	
	ブロピサミド	
	ヘキサクロロベンゼン	
	ベノミル	
	ベンシクロ	
	ベンスルフロメチル	
	ベンタクロロフェノール	0.009
	ベンタジン	
	ペンテイメタリン	0.02
	ホセチル	
	マラソン(マラチオン)	
	メコプロップ(MCPP)	0.01
	メソミル	
	メタラキシル	
	メチダチオン(DMTP)	
	メトキシクロ	0.02
	メトラクロ	0.01
○	メフェナセト	
	メプロニル	
	モリネート	0.006
	リンデン	0.002

* 残留基準値はWHO飲料水水質ガイドラインに準拠

清涼飲料水の規格基準の概要図

【泉源】	【原水基準】	【成分規格】	現行規制
衛生管理指標（通知） ミネラルウォーター類	<ul style="list-style-type: none"> 水道水 (50) or その他 (18) 農薬ポジティブリスト適用除外 (水道水質基準に農薬管理目標値あり)	<ul style="list-style-type: none"> 性状 (2) 微生物 (1+2*) 化学物質 (4) * 未殺菌(除菌)のみ + 農薬等(ポジティブリスト) 	<ul style="list-style-type: none"> 基準値 (33)* 不検出 (19) 一律基準 * 基準値はWHO飲料水水質ガイドライン準拠 (原水への遡及なし)
—	<ul style="list-style-type: none"> 水道水 (50) or その他 (26) 農薬ポジティブリスト適用除外 (水道水質基準に農薬管理目標値あり)	<ul style="list-style-type: none"> 性状 (2) 微生物 (1) 化学物質 (4) カビ毒 (1)* * りんごジュースのみ + 農薬等(ポジティブリスト) 	<ul style="list-style-type: none"> 基準値* 不検出 (19) 一律基準 * 一部ジュースの個別規格あり (その他は原料農産物への遡及あり、原水への遡及なし)



【泉源】	【原水基準】	【成分規格】	改正後のイメージ
衛生管理指標（通知）	ミネラルウォーター類	(設定せず) <ul style="list-style-type: none"> 性状 (2) 微生物 (1+2*+1**) 化学物質 (4+13**) * 未殺菌(除菌)のみ ** 現行原水基準を準用 + 農薬等(ポジティブリスト) 	<ul style="list-style-type: none"> 基準値 (33)* 不検出 (19) 一律基準 * 基準値はWHO飲料水水質ガイドラインに準拠 (原水への遡及なし)
	その他清涼飲料水	<ul style="list-style-type: none"> 水道水 (50) or その他 (26) or ミネラルウォーター類 (23) 農薬ポジティブリスト適用除外 (水道水質基準に農薬管理目標値あり、ミネラルウォーター類に農薬等基準値あり)	<ul style="list-style-type: none"> 性状 (2) 微生物 (1) 化学物質 (4) カビ毒 (1)* * りんごジュースのみ + 農薬等(ポジティブリスト)

飲料水等に係る汚染物質等基準値の比較(残留農薬を除く)

(単位 mg/L)

評価 依頼	項目	区分	水道法		食品衛生法				CODEX ナチュラルミネラル ウォーター規格	WHO 飲料水ガイド ライン(第3版)	備考	
			水道水		ミネラルウォーター類		清涼飲料水					
			水質基準	水質管理目標	原水基準	成分規格	原水基準	成分規格				
◎	鉛	無機物	0.01		0.01	不検出		0.01	不検出	0.003	0.003	
○	水銀	無機物	0.0005		0.0005			0.0005		0.001	0.006	総水銀
○	セレン	無機物	0.01		0.01			0.01		0.01	0.01	
○	鉛	無機物	0.01		0.05	不検出		0.1	不検出	0.01	0.01	
○	ヒ素	無機物	0.01		0.05	不検出		0.05	不検出	0.01(総ヒ素)	0.01	
○	六価クロム	無機物	0.05		0.05			0.05		0.05(総クロム)	0.05	総クロム
○	シアン	無機物	0.01		0.01			0.01		0.07	0.07	
○	硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素	無機物	10		10			10		硝酸:50 亜硝酸:0.02	硝酸:50 亜硝酸:3(慢性0.2)	(急性)
○	フッ素	無機物	0.8		2			0.8		表示規制有り	1.5	
○	ホウ素	無機物	1.0		30(ホウ酸)					5	5	
◎	四塩化炭素	有機物	0.002								0.004	
◎	1,4-ジオキサン	有機物	0.05								0.05	
◎	シス-1,2-ジクロロエチレン及びトランス-1,2-ジクロロエチレン	有機物	0.04								0.05	和(シス+トランス)
◎	ジクロロメタン	有機物	0.02								0.02	
◎	テトラクロロエチレン	有機物	0.01								0.04	
◎	トリクロロエチレン	有機物	0.03								0.02	
◎	ベンゼン	有機物	0.01								0.01	
◎	塩素酸	消毒剤	0.6								0.7	
○	クロロ酢酸	消毒副生成物	0.02								0.02	
○	クロロホルム	消毒副生成物	0.06								0.3	
○	ジクロロ酢酸	消毒副生成物	0.04								0.05	
○	ジフロクロロメタン	消毒副生成物	0.1								0.1	
◎	臭素酸	消毒副生成物	0.01								0.01	
○	総トリハロメタン	消毒副生成物	0.1									
○	トリクロロ酢酸	消毒副生成物	0.2								0.2	
○	ブロモクロロメタン	消毒副生成物	0.03								0.06	
○	ブromoホルム	消毒副生成物	0.09								0.1	
◎	ホルムアルデヒド	消毒副生成物	0.08								-	
	亜鉛	無機物	1.0		5			1				
	アルミニウム	無機物	0.2	0.1								
	鉄	無機物	0.3					0.3				
◎	銅	無機物	1.0		1			1.0		1	2	
	ナトリウム	無機物	200									
○	マンガン	無機物	0.05	0.01	2			0.3		0.4	0.4	
	塩素イオン	無機物	200					200				
	カルシウム・マグネシウム等(硬度)	無機物	300	10以上100以下				300				
	蒸発残留物	無機物	500	30以上200以下				500				
	陰イオン界面活性剤	有機物	0.2					0.5				
	シエスミン	有機物	0.00001									
	2-メチルイソボルネオール	有機物	0.00001									
	非イオン界面活性剤	有機物	0.02									
	フェノール類	有機物	0.005					0.005				
	有機物(TOC)	有機物	3									
	pH値	性状	5.8以上8.6以下	7.5程度				5.8以上8.6以下				
	味	性状	異常でないこと					異常でないこと				
	臭気	性状	異常でないこと					異常でないこと				
	色度	性状	5度以下					5度以下				
	濁度	性状	2度以下	1度以下				2度以下				
○	アンチモン	無機物	0.015							0.005	0.02	
○	ウラン	無機物	0.002								0.015	
○	ニッケル	無機物	0.01							0.02	0.07	
○	亜硝酸態窒素	無機物	0.05							0.02	亜硝酸:3(慢性0.2)	
◎	1,2-ジクロロエタン	有機物	0.004								0.03	
◎	1,1,2-トリクロロエタン	有機物	0.006								-	
◎	トルエン	有機物	0.2								0.7	
○	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	有機物	0.1								0.008	
◎	亜塩素酸	消毒剤	0.6								0.7	
◎	二酸化塩素	消毒剤	0.6								-	
◎	ジクロロアセトニトリル	消毒副生成物	0.01								0.02	
◎	抱水コロイド	消毒副生成物	0.02								-	
◎	残留塩素	消毒剤	1								5	
	遊離炭酸	有機物	20									
◎	1,1,1-トリクロロエタン	有機物	0.3								-	
◎	メチルセブチルエーテル	有機物	0.02								-	
	有機物等(KMnO ₄)	有機物	3	12				10				
	臭気強度(TON)	性状	3以下									
	腐食性(ランゲリア指数)	性状	-1以上極力0									
	従属栄養細菌	微生物	2,000 CFU/ml									
◎	1,1-ジクロロエチレン	有機物	0.1								-	
	混濁	性状										原材料等に由来するものを除く
	沈殿物	性状										原材料等に由来するものを除く
	スズ	無機物										
	一般細菌	微生物	100 CFU/ml		100 CFU/ml			100 CFU/ml		不検出(病原性)		
	大腸菌群	微生物	不検出(大腸菌)		不検出			不検出		不検出	不検出	
	腸球菌	微生物								不検出		未殺菌・未除菌のもの
	緑膿菌	微生物								不検出		未殺菌・未除菌のもの
	有機リン	有機物						0.1				
○	バリウム	無機物			1					0.7	0.7	
	硫化物(H ₂ S)	無機物			0.05							

◎ 食品安全委員会から評価結果を受理した項目

食品中の汚染物質に係る規格基準設定の基本的考え方

第1 趣旨

現在、食品中の汚染物質低減対策については、国内に流通する食品（国産品、輸入品の別を問わない）中の汚染物質の汚染実態及び暴露状況等に鑑み、必要に応じ食品衛生法第11条に基づき、食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号。以下「規格基準」という。）が設定されているところであるが、規格基準の設定が直ちに必要でない汚染物質であっても、食品の安全性確保対策を推進するには、食品からの汚染物質の暴露を可能な限り低減することが有効であると考えられる。

については、食品中の汚染物質について、我が国における規格基準の設定に係る基本的な考え方を定めるとともに、規格基準が定められていない汚染物質の低減対策について整理することにより、より一層の食品の安全性の確保を図るものとする。

第2 基本方針

我が国の食品中の汚染物質の規格基準の設定にあたっては、コーデックス規格が定められている食品については、我が国でも規格基準の設定を検討することとし、コーデックス規格を採用する。その際、国内に流通する食品中の汚染物質の汚染実態及び国民の食品摂取量等を踏まえ検討を行うが、それを採用することが困難である場合等は、以下の取り扱いとする。

- 我が国の食料生産の実態等からコーデックス規格を採用することが困難な場合は、関係者に対し汚染物質の低減対策に係る技術開発の推進等について要請を行うとともに、必要に応じて、関係者と連携し、**ALARA**の原則*に基づく適切な基準値又はガイドライン値等の設定を行うこととする。

* 「合理的に達成可能な範囲でできる限り低くする（ALARAの原則：As low as reasonably achievable）」との考え方。コーデックス委員会の食品汚染物質部会（CCCF）において、食品中の汚染物質の最大基準値設定の際に用いられている。

- 一 国内に流通する食品中の汚染物質の汚染実態及び国民の食品摂取量等を踏まえると直ちに規格基準の設定が必要でないと判断される場合は、将来にわたって、適宜見直しの検討を行うこととする。

なお、コーデックスにおいて規格基準が定められていない場合においても、汚染物質の暴露に寄与の高い食品や、我が国に特有の汚染実態が見られる汚染物質については、その都度、規格基準の設定を検討することとする。

第3 規格基準の設定について、今後、検討を行う汚染物質の例

- (1) カドミウム
- (2) トータルアフラトキシン
- (3) アフラトキシンM1
- (4) 鉛
- (5) その他（健康被害の発生等により、緊急的に規格基準の設定が必要な汚染物質は、優先的に検討する）

第4 自主的な取組みの推進

厚生労働省は、我が国で食品中の汚染物質に係る各規格基準が策定されるまでの間、食品等事業者が、コーデックス委員会の食品中の汚染物質及び毒素の一般規格（**CODEX GENERAL STANDARD FOR CONTAMINANTS AND TOXINS IN FOODS : CODEX STAN 193-1995**）に定められている最大基準値（我が国で基準値が定められているものは除く。）を準拠するよう努めること等により、食品中の汚染物質の低減対策に努めるよう、推進することとする。

Codex における食品中の汚染物質低減及び基準値作成の考え方 (食品中の汚染物質及び毒素に関する Codex 一般規格 (GSCTF) 前文より抜粋)

1. 一般原則

食品中の汚染物質濃度は、合理的に達成可能な範囲で出来る限り低くなければならない。汚染を防止又は低減するために以下が有効。

- (1) 環境汚染対策等の汚染源対策
- (2) 生産・貯蔵・加工等における適切な技術の適用
- (3) 食品中の汚染物質等を除去するための適切な手法を適用

2. 規格の検討のために必要な情報

- － 毒性情報
- － 統計的に有意な実態調査データ
- － 食品の消費量データ
- － 汚染工程、製造・生産法、汚染の管理のための経済的な事項に関する情報
- － リスク評価、リスク管理の選択肢等に関する情報

3 基準値作成の規準

- (1) 重要な健康リスクがあり、貿易問題があるもののみに設定
- (2) 汚染物質等の摂取寄与が大きな食品に対してのみ設定
- (3) **ALARA** の原則に従って設定
- (4) 主たる生産国を含む複数の地域からの実態調査結果に基づいて設定

かび毒に関する調査研究の進捗状況

1 アフラトキシン M1* (AFM1)

(1) 調査研究の状況

- ① 平成 13 年度
 - ・国産牛乳の汚染実態調査
(2001 年の JECFA による毒性評価結果を受けて)
- ② 平成 15 年度
 - ・国産生乳の汚染実態調査
(飼料中のアフラトキシン B1 汚染の汚染頻度増加を受けて、飼料中のアフラトキシン B1 汚染が与える影響を考察)
- ③ 平成 19 年度
 - ・チーズ、バター中の AFM1 の分析法の確立および加工品への AFM1 の移行に関する文献調査
- ④ 平成 20 年度
 - ・輸入乳製品の汚染実態調査
 - ・モデル製品での加工品への AFM1 移行調査 (生乳→チーズ)

(2) 今後の予定

平成 20 年度の調査結果が取りまとめ次第、乳及び乳製品中の AFM1 について、食品規格部会、乳肉水産食品部会での審議を経て、食品安全委員会へ食品健康影響評価依頼を行う予定。

2 デオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV)

(1) 調査研究の状況

- ① 平成 16~18 年
 - ・実験動物を用いた NIV の毒性実験 (ラットの 90 日間反復投与毒性試験)
 - ・小麦摂取による DON の暴露量推定
 - ② 平成 19~21 年度
 - ・国産小麦中の DON/NIV の共汚染実態調査と加工による減衰に関する研究
 - ・トリコテセン系マイコトキシンの毒性評価の生物学的アプローチに関する研究 (DON/NIV の複合毒性に関する研究)
 - ・実験動物を用いた NIV 誘発 IgA 腎症モデルによる NIV の毒性影響及び評価・予防に関する研究
 - ・国産小麦摂取による NIV の暴露量推定
- 等

*アフラトキシン B1 の代謝物

(2) 今後の予定

調査研究結果がとりまとめ次第、小麦等の DON 及び NIV について、食品規格部会での審議を経て、食品安全委員会へ食品健康影響評価依頼を行う予定。

3 オクラトキシン A

(1) 調査研究の状況

① 平成 16～18 年度

- ・ 毒性評価資料の収集
- ・ 汚染実態調査（基礎調査）

② 平成 19～21 年度

- ・ 汚染実態調査（詳細調査）
- ・ 発がん性機序の動物実験系による解析など、毒性に関する研究
- ・ 暴露評価

等

(2) 今後の予定

調査研究結果が取りまとめ次第、今後の対応について検討を行う予定。

4 フモニシン

(1) 調査研究の状況

① 平成 16～18 年度

- ・ 毒性評価資料の収集
- ・ 汚染実態調査（基礎調査）

② 平成 19～21 年度

- ・ 汚染実態調査（詳細調査）
- ・ 新生児ラットへのフモニシン暴露の薬物代謝機能に及ぼす影響など、毒性に関する研究
- ・ 暴露評価

等

(2) 今後の予定

調査研究結果が取りまとめ次第、今後の対応について検討を行う予定。

清涼飲料水の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号 抄)

○ 食品、添加物等の規格基準

第 1 食品

A～C (略)

D 各条

○ 清涼飲料水

1 清涼飲料水の成分規格

- (1) 混濁（原材料として用いられる植物若しくは動物の組織成分、着香若しくは着色の目的に使用される添加物又は一般に人の健康を損なうおそれがないと認められる死滅した微生物（製品の原材料に混入することがやむを得ないものに限る。）に起因する混濁を除く。）したものであってはならない。
- (2) 沈殿物（原材料として用いられる植物若しくは動物の組織成分、着香若しくは着色の目的に使用される添加物又は一般に人の健康を損なうおそれがないと認められる死滅した微生物（製品の原材料に混入することがやむを得ないものに限る。）に起因する混濁を除く。）又は固形の異物（原材料として用いられる植物たる固形物でその容量百分率が 30%以下であるものを除く。）のあるものであってはならない。
- (3) ヒ素、鉛及びカドミウムを検出するものであってはならない。また、スズの含有量は、150.0ppm を超えるものであってはならない。
試験法（略）
- (4) 大腸菌群が陰性でなければならない。
試験法（略）
- (5) ミネラルウォーター類（水のみを原料とする清涼飲料水をいう。以下同じ。）のうち、容器包装内の二酸化炭素圧力が 20℃で 98kPa 未満であって、かつ、殺菌又は除菌を行わないものにあつては、腸球菌及び緑膿菌が陰性でなければならない。
試験法（略）
- (6) りんごの搾汁及び搾汁された果汁のみを原料とするものにあつては、パツリンの含有量が 0.050ppm を超えるものであってはならない。
試験法（略）

2 清涼飲料水の製造基準

- (1) ミネラルウォーター類、冷凍果実飲料（果実の搾汁又は果実の搾汁を濃縮したものを冷凍したものであって、原料用果汁以外のものをいう。以下同じ。）及び原料用果汁以外の清涼飲料水
 1. 製造に使用する果実、野菜等の原料は、鮮度その他の品質が良好なものであり、かつ、必要に応じて十分洗浄したものでなければならない。
 2. 原水は飲用適の水（水道法第 3 条第 2 項に規定する水道事業の用に供する水道、同条第 6 項に規定する専用水道若しくは同条第 7 項に規定する簡易専用水道により供給される水又は次の表の第 1 欄に掲げる事項につ

き同表の第3欄に掲げる方法によって行う検査において、同表の第2項に掲げる基準に適合する水をいう。以下同じ。) でなければならない。

第1欄	第2欄	第3欄
一般細菌	1 ml の検水で形成される集落数が 100 以下であること。	標準寒天培地法
大腸菌群	検出されないこと。	乳糖ブイヨン—プリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地法
カドミウム	0.01mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光光度法又は誘導結合プラズマ発光分光分析法 (以下「ICP法」という。)
水銀	0.0005mg/L 以下であること。	還元気化—原子吸光光度法
鉛	0.1mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光光度法又は ICP法
ヒ素	0.05mg/L 以下であること。	水素化物発生—原子吸光光度法又はフレイムレス—原子吸光光度法
六価クロム	0.05mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光光度法又は ICP法
シアン	0.01mg/L 以下であること。	吸光光度法
硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素	10mg/L 以下であること。	イオンクロマトグラフ法又は吸光光度法
フッ素	0.8mg/L 以下であること。	イオンクロマトグラフ法又は吸光光度法
有機リン	0.1mg/L 以下であること。	吸光光度法
亜鉛	1.0mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光光度法又は ICP法
鉄	0.3mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光光度法、ICP法又は吸光光度法
銅	1.0mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光光度法又は ICP法
マンガン	0.3mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光光度法又は ICP法
塩素イオン	200mg/L 以下であること。	イオンクロマトグラフ法又は滴定法
カルシウム、マグネシウム等 (硬度)	300mg/L 以下であること。	滴定法
蒸発残留物	500mg/L 以下であること。	重量法
陰イオン界面活性剤	0.5mg/L 以下であること。	吸光光度法
フェノール類	フェノールとして 0.005mg/L 以下であること。	吸光光度法

有機物等（過マンガン酸カリウム消費量）	10mg/L以下であること。	滴定法
pH値	5.8以上8.6以下であること。	ガラス電極法又は比色法
味	異常でないこと。	官能法
臭気	異常でないこと。	官能法
色度	5度以下であること。	比色法又は透過光測定法
濁度	2度以下であること。	比濁法、透過光測定法又は積分球式光電光度法

3. 製造に使用する器具及び容器包装は、適当な方法で洗浄し、かつ、殺菌したものでなければならない。ただし、未使用の容器包装であって、かつ、殺菌され、又は殺菌効果を有する製造方法で製造され、使用されるまで汚染されるおそれのないように取り扱われたものにあつては、この限りでない。
 4. 清涼飲料水は、容器包装に充てんし、密栓若しくは密封した後殺菌するか、又は自動温度計をつけた殺菌機等で殺菌したもの若しくはろ過器等で除菌したものを自動的に容器包装に充てんした後、密栓若しくは密封しなければならない。この場合の殺菌又は除菌は、次の方法で行わなければならない。ただし、容器包装内の二酸化炭素分圧が20℃で98kPa以上であつて、かつ、植物又は動物の組織成分を含有しないものにあつては、殺菌及び除菌を要しない。
 - a pH4.0未満のもの殺菌にあつては、その中心部の温度を65℃で10分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法で行うこと。
 - b pH4.0以上のもの（pH4.6以上で、かつ、水分活性が0.94を超えるものを除く。）の殺菌にあつては、その中心部の温度を85°で30分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法で行うこと。
 - c pH4.6以上で、かつ、水分活性が0.94を超えるものの殺菌にあつては、原材料等に由来して当該食品中に存在し、かつ、発育し得る微生物を死滅させるのに十分な効力を有する方法又はbに定める方法で行うこと。
 - d 除菌にあつては、原材料等に由来して当該食品中に存在し、かつ、発育し得る微生物を除去するのに十分な効力を有する方法で行うこと。
 5. 4. の殺菌に係る殺菌温度及び殺菌時間の記録又は4. の除菌に係る記録は6月間保存しなければならない。
 6. 紙栓により打栓する場合は、打栓機械により行わなければならない。
- (2) ミネラルウォーター類
1. 原水は水道法第3条第2項に規定する水道事業の用に供する水道、同条第6項に規定する専用水道若しくは同条第7項に規定する簡易専用水道により供給される水又は次の表の第1欄に掲げる事項につき同表の第3欄に掲げる方法によって行う検査において、同表の第2項に掲げる基準に適合する水でなければならない。

第1欄	第2欄	第3欄
一般細菌	1 ml の検水で形成される集落数が 100 以下であること。	標準寒天培地法
大腸菌群	検出されないこと。	乳糖ブイヨン—ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地法
カドミウム	0.01mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光度法又は ICP 法
水銀	0.0005mg/L 以下であること。	還元気化—原子吸光度法
セレン	0.01mg/L 以下であること。	水素化物発生—原子吸光度法又はフレイムレス—原子吸光度法
鉛	0.1mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光度法又は ICP 法
バリウム	1mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光度法又は ICP 法
ヒ素	0.05mg/L 以下であること。	水素化物発生—原子吸光度法又はフレイムレス—原子吸光度法
六価クロム	0.05mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光度法又は ICP 法
シアン	0.01mg/L 以下であること。	吸光光度法
硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素	10mg/L 以下であること。	イオンクロマトグラフ法又は吸光光度法
フッ素	2mg/L 以下であること。	イオンクロマトグラフ法又は吸光光度法
ホウ素	ホウ酸として 30mg/L 以下であること。	ICP 法又は吸光光度法
亜鉛	5mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光度法又は ICP 法
銅	1mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光度法又は ICP 法
マンガン	2mg/L 以下であること。	フレイムレス—原子吸光度法又は ICP 法
有機物等	過マンガン酸カリウム消費量として 12mg/L 以下であること。	滴定法
硫化物	硫化水素として 0.05mg/L 以下であること。	吸光光度法

2. 製造に使用する器具及び容器包装は、適当な方法で洗浄し、かつ、殺菌したものでなければならない。ただし、未使用の容器包装であって、かつ、殺菌され、又は殺菌効果を有する製造方法で製造され、使用される

まで汚染されるおそれのないように取り扱われたものにあつては、この限りでない。

3. ミネラルウォーター類は、容器包装に充てんし、密栓若しくは密封した後殺菌するか、又は自動温度計をつけた殺菌機等で殺菌したもの若しくはろ過器等で除菌したものを自動的に容器包装に充てんした後、密栓若しくは密封しなければならない。この場合の殺菌又は除菌は、その中心部の温度を 85℃で 30 分間加熱する方法その他の原水等に由来して当該食品中に存在し、かつ、発育し得る微生物を死滅させ、又は除去するのに十分な効力を有する方法で行わなければならない。ただし、容器包装内の二酸化炭素分圧が 20℃で 98kPa 以上のもの又は次の基準に適合するものにあつては、殺菌及び除菌を要しない。

- a 原水は、鉱水のみとし、泉源から直接採水したものを自動的に容器包装に充てんした後、密栓又は密封しなければならない。

- b 原水は、病原微生物に汚染されたもの又は当該原水が病原微生物に汚染されたことを疑わせるような生物若しくは物質を含むものであつてはならない。

- c 原水は、芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌、腸球菌及び緑膿菌が陰性であり、かつ、1 ml 当たりの細菌数が 5 以下でなければならない。

測定法（略）

- d 原水には、沈殿、ろ過、曝気又は二酸化炭素の注入若しくは脱気以外の操作を施してはならない。

- e 採水から容器包装詰めまでを行う施設及び設備は、原水を汚染するおそれのないよう清潔かつ衛生的に保持されたものでなければならない。

- f 採水から容器包装詰めまでの作業は、清潔かつ衛生的に行わなければならない。

- g 容器包装詰め直後の製品は 1 ml 当たりの細菌数が 20 以下でなければならない。

測定法（略）

4. 3. の殺菌に係る殺菌温度及び殺菌時間の記録若しくは除菌に係る記録又は 3. の c 及び g に係る記録は、6 月間保存しなければならない。

(3) 冷凍果実飲料

1. 原料用果実は、傷果、腐敗果、病害果等でない健全なものを用いなければならない。

2. 原料用果実は、水、洗浄剤等に浸して果皮の付着物を膨潤させ、ブラッシングその他の適当な方法で洗浄し、十分に水洗した後、次亜塩素酸ナトリウム液その他の適当な殺菌剤を用いて殺菌し、十分に水洗しなければならない。

3. 殺菌した原料用果実は、汚染しないように衛生的に取り扱わなければならない。

4. 搾汁及び搾汁された果汁の加工は、衛生的に行わなければならない。

5. 製造に使用する器具及び容器包装は、適当な方法で洗浄し、かつ、殺菌したものでなければならない。ただし、未使用の容器包装であつて、か

つ、殺菌され、又は殺菌効果を有する製造方法で製造され、使用されるまでに汚染されるおそれのないように取り扱われたものにあつては、この限りでない。

6. 搾汁された果汁（密閉型全自動搾汁機により搾汁されたものを除く。）の殺菌又は除菌は、次の方法で行わなければならない。
 - a pH4.0 未満のもの殺菌にあつては、その中心部の温度を 65℃で 10 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法で行うこと。
 - b pH4.0 以上のもの殺菌にあつては、その中心部の温度を 85℃で 30 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法で行うこと。
 - c 除菌にあつては、原材料等に由来して当該食品中に存在し、かつ、発育し得る微生物を除去するのに十分な効力を有する方法で行うこと。
7. 6. の殺菌に係る殺菌温度及び殺菌時間の記録又は 6. の除菌に係る記録は 6 月間保存しなければならない。
8. 搾汁された果汁は、自動的に容器包装に充てんし、密封しなければならない。
9. 化学的合成品たる添加物（酸化防止剤を除く。）を使用してはならない。

(4) 原料用果汁

1. 製造に使用する果実は、鮮度その他の品質が良好なものであり、かつ、必要に応じて十分洗浄したものでなければならない。
2. 搾汁及び搾汁された果汁の加工は、衛生的に行わなければならない。

3 清涼飲料水の保存基準

- (1) 紙栓をつけたガラス瓶に収められたものは、10℃以下で保存しなければならない。
- (2) ミネラルウォーター類、冷凍果実飲料及び原料用果汁以外の清涼飲料水のうち、pH4.6 以上で、かつ、水分活性が 0.94 を超えるものであつて、発育し得る微生物を死滅させるのに十分な効力を有する方法で殺菌していないものにあつては、10℃以下で保存しなければならない。
- (3) 冷凍果実飲料及び冷凍した原料用果汁は、-15℃以下で保存しなければならない。
- (4) 原料用果汁は、清潔で衛生的な容器包装に収めて保存しなければならない。

4 (略)

残留農薬等のポジティブリスト制度の概要

残留農薬等のポジティブリスト制度とは？

基準が設定されていない農薬等が
一定量を超えて残留する食品の販売
等を原則禁止する制度

※「食品衛生法等の一部を改正する法律」

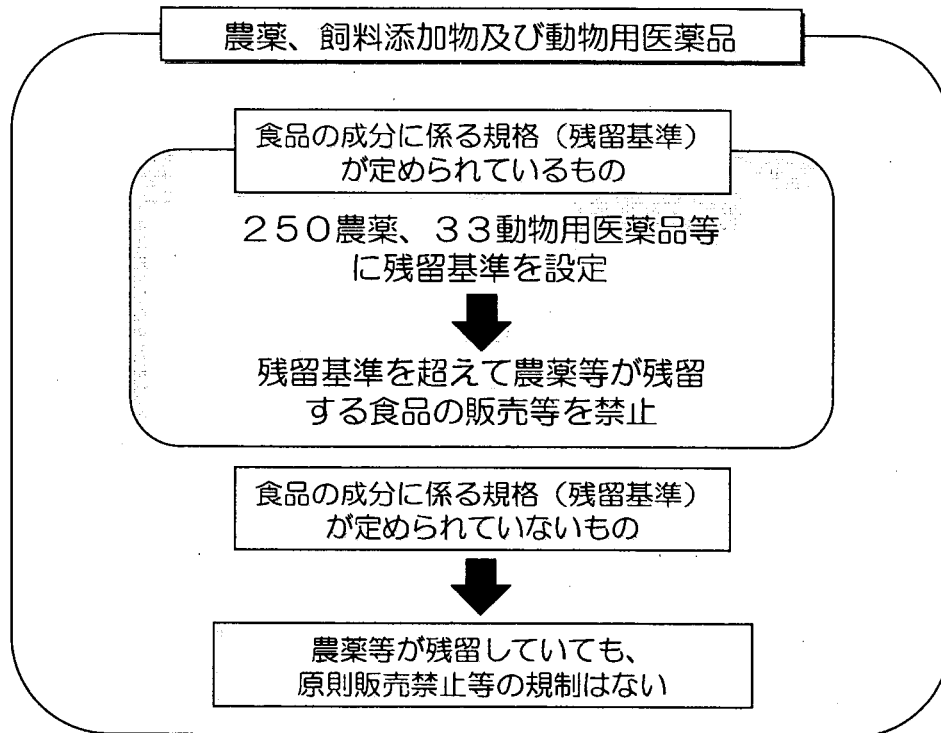
(平成15年法律第55号、平成15年5月30日公布)

規制の対象は？

- 規制対象物質
 - 農薬
 - 動物用医薬品
 - 飼料添加物
- 規制対象食品
 - 加工食品を含む全ての食品

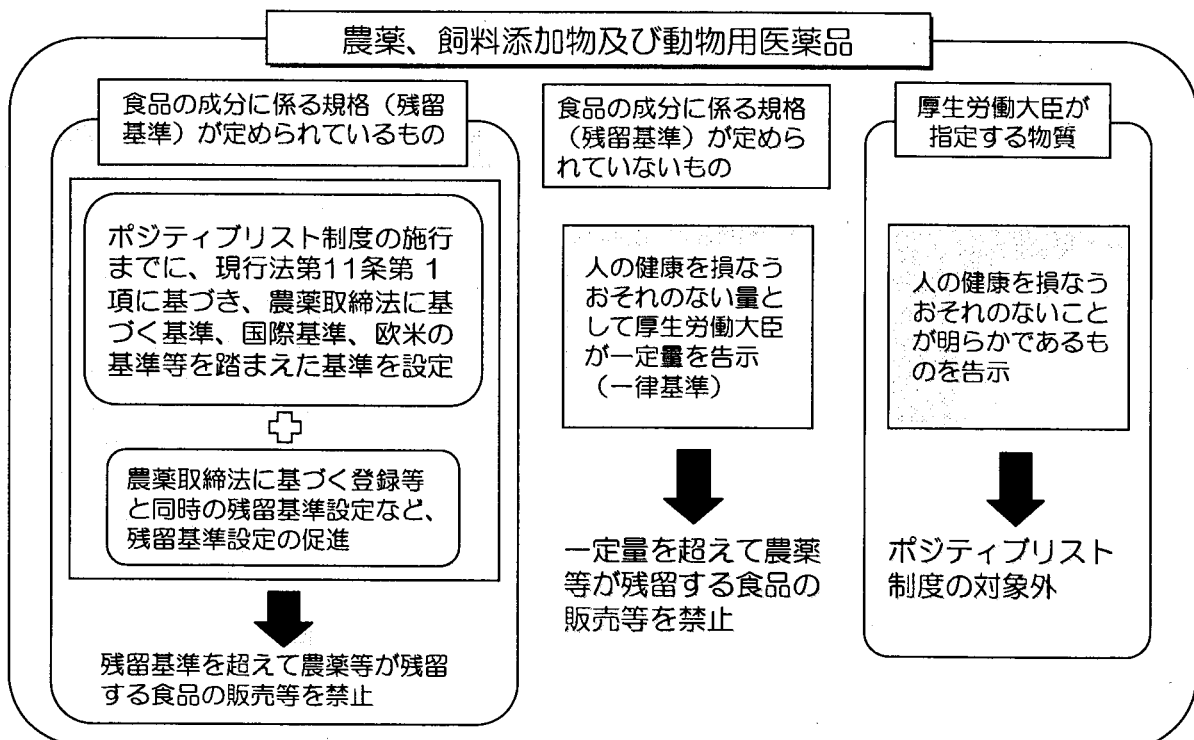
食品に残留する農薬等へのポジティブリスト制度の導入①

【従来の規制】



食品に残留する農薬等へのポジティブリスト制度の導入②

【ポジティブリスト制度の導入後】（平成18年5月29日施行）



一定量（いわゆる一律基準）とは？

人の健康を損なうおそれのない量として
一定の量を定めて規制する考え方

一定量として0.01 ppmを設定



一律基準

※ 「平成17年厚生労働省告示第497号」

食品衛生法第11条第3項の規定により人の健康を損なうおそれがない量として厚生労働大臣が定める量は、0.01 ppmとする。

加工食品の取扱い

- コーデックス基準が設定されている加工食品は、新たに残留基準を設定する。
- 残留基準が設定されていない加工食品のうち、残留基準に適合した原材料を用いて製造又は加工されたものは、原則として、販売等を可能とする。
- 乾燥等の加工を行った食品の監視指導では、水分含量をもとに試算した値により原材料での違反の蓋然性を推定するなど、効率的な手法を用いる。