

厚生労働科学研究費補助金

(食品の安心・安全確保推進研究事業)

平成16年度-18年度 総合研究報告書

食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に 関する研究

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所 小西良子

分担研究者

東京大学大学院 農学生命科学研究科 熊谷 進

国立医薬品食品衛生研究所 病理部長 広瀬 雅雄

北里大学医学部 佐藤 敏彦

平成19(2007)年 3月

目次

- アフラトキシンの毒性評価とわが国の暴露評価・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
主任研究者 小西 良子

- × オクラトキシンAとフモニシンの毒性評価とわが国の汚染実態・・・・・・・・ 21
主任研究者 小西 良子

- × 実験動物を用いたニバレノールの毒性実験・・・・・・・・・・・・・・・・ 35
分担研究者 広瀬 雅雄

厚生労働科学研究費補助金研究事業

(食品の安心・安全確保推進研究事業)

総合研究報告書

食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究

I. アフラトキシンの毒性評価とわが国の暴露評価

主任研究者 小西良子 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 第4室室長

分担研究者

熊谷 進 東京大学大学院 農学生命科学研究科
広瀬 雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長
佐藤 敏彦 北里大学医学部

協力研究者

奥山恵美 城西国際大学薬学部 教授
杉浦義紹 神戸市環境衛生研究所 副部長
斉藤 史朗 東京大学

要旨：アフラトキシンは、アスペルギルス属の産生する発ガン性を有するカビ毒であり、食品衛生上問題となることから多くの国で基準値を設けている。我が国では、現在 AFB1 に対して食品衛生法 6 条 2 項により規制を行っているが、早急にリスク評価に基づいた基準値を設定する必要がある。コーデックス規格や諸外国では基準値設定としてトータルアフラトキシン（AFB1、B2、G1、G2）を用いる統括的な規制が主流となっているが、我が国に適した基準を策定するにあたり、その科学的根拠として、毒性評価および3年間通年で行った実態調査の結果を基にわが国での暴露評価を行った。

A. 研究目的

アフラトキシンは、熱帯地帯の地域に生息しているカビが産生するカビ毒であり、ヒトや動物に発ガンをはじめとする種々の健康被害を引き起こす。アフラトキシンの汚染は、従来より世界的に、トウモロコシ、香辛料、ナッツ類にとく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その汚染が報告されている(1-5)。我が国においてもこれまでに、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、ナッツ類、香辛料のアフラトキシン汚染が報告されている(6)。

我が国においては現在に至るまで約 40 年

間、AFB1 のみに対して食品衛生法第 6 条 2 項によって規制が行われてきたが、基準値としては設定されていない。コーデックス規格や主要諸外国では、アフラトキシンの規制を、AFB1 (AFB1)、B2 (AFB2)、G1 (AFG1)、G2 (AFG2) の合算であるトータルアフラトキシンを対象とする方法で設けるのが主流となっている。EU は、トータルアフラトキシンの規制と AFB1 の規制の組み合わせの方法を採用している。

輸入品依存割合の高い我が国としては、国際的動向と協調しながら、わが国の食品の安心・安全を確保するため、的確な対応をしていく必要がある。そのため我が国の規制について

も見直しが必要かどうかを判断するために、毒性や汚染の実情に関する科学的根拠となりうる調査研究を行なう必要がある。

本研究ではこれら科学的根拠を提起するため、アフラトキシンの毒性評価、3年間通じての汚染実態調査およびその結果を基にした暴露評価を行った。

B.研究方法

1. アフラトキシンの毒性評価

アフラトキシンの毒性は、1993 年と 2002 年 IARC Monograph および 1998 年 JECFA Monograph に加えて、1993 年以降に発表された毒性に関する文献と、AFB₂、AFG₂ の代謝に関する文献および遺伝毒性に関する文献について調査した。

2. 我が国における汚染事例の調査

過去の知見に照らしてアフラトキシンの汚染されやすいと考えられる食品を収集し、それら食品についてクリーンアップ方法を含め予め検討した分析法を用いて、分析を行なった。対象食品は1年毎に見直しを行い、汚染が検出された食品に関しては検体数を増やしてさらに調査を続け、最新の情報に基づいて、食品目を増やしていった。

試料：米は農林水産省から提供されたものを、その他の食品は全国各地のスーパーマーケット等で購入したものを、それぞれ分析試料とした。

アフラトキシンの分析：試料をミキサーまたは遠心粉碎器で粉碎し混合してから、塩化ナトリウムとメタノール-水 (8+2) を加え、振とう抽出した。ろ紙 (Whatman No.4) でろ過し、得られたろ液を PBS で希釈し、イムノアフィニティーカラム (VICAM 社、および r-biopharm 社) でクリーンアップを行なった。溶出液をトリフルオロ酢酸で処理してから、または処理せずに、HPLC (ODS カラム: 4.6mm i.d. × 250mm, 5mm, 移動相: アセトニトリル-メタノール-水 (1+3+6)、流速: 1ml、蛍光検出器: 励起波長 360nm、蛍光波長 450nm) による分析に供した。

なお、ごま油、ピーナッツ、ピーナッツバターについては、メタノール-水ではなくクロロホルムで抽出し、フロリジルカラム (ク

ロロホルム・メタノール (9:1) で洗浄、アセトン・水 (99:1) で溶出) でクリーンアップを行ない、溶出液をトリフルオロ酢酸で処理し HPLC で分析するとともに、処理せずにシリカゲル HPTLC (クロロホルム・アセトン (9:1)、エーテル・メタノール・水 (94:4.5:1.5)) で分析した。

3. アフラトキシンの暴露評価

(AFB₁ の暴露評価)

1) 対象食品: 今回検討した食品は、アフラトキシンが含有されると思われる以下の 11 品目とした。

- ・ ピーナッツ (乾ピーナッツ、炒りピーナッツ)
- ・ ピーナッツバター
- ・ チョコレート (ミルクチョコレート、ビュアチョコレート)
- ・ ココア (ミルクココア、ビュアココア)
- ・ ビスタチオ
- ・ 白こしょう
- ・ レッドペッパー
- ・ アーモンド (乾アーモンド、
アーモンドフライ)
- ・ はとむぎ
- ・ そば粉 (全層粉)
- ・ そば麺 (生そば、ゆでそば、干そば、
ゆで干そば)

2) 含有量のシミュレーションデータ

(1) 使用データ

今回のシミュレーションで使用した食品の含有量 (汚染量) 調査のサンプルは、ピーナッツ 150 サンプル、ピーナッツバター 62 サンプル、チョコレート類 42 サンプル、ビスタチオ 159 サンプル、白こしょう 5 サンプル、とうがらし 6 サンプル、アーモンド 15 サンプル、はとむぎ 17 サンプル、そば類 28 サンプルであった (それぞれの細目は表 1 のとおり)。検出下限は 0.1ng/g とした。

(2) 各食品のシミュレーション方法

各食品において、対象総サンプル数および検出されたサンプル数割合が異なるために、それぞれに応じたシミュレーション方法を用いた。すなわち、サンプル総数が少ないもの (白こしょう、とうがらし、アーモンド、はとむぎ、そば類) については、対数正規分

布を推定することができないので、サンプルに見られた検出値を、同じ割合で発生すると仮定した。

次に、総サンプル数は多いものの、検出されたサンプルの割合が少ないピーナッツについてはそもそも分布を想定することができないので、ランダムに150分の1の確率で観測された汚染量を発現させた。ピスタチオについても、そのままでは分布を推定することができないのだが、検出下限を上回る6つのサンプルについて、著しく高い汚染量が観察されたものが複数存在しており、そのほとんどが、規制シナリオで用いる規制値を大きく超えているので、規制値のシミュレーションをする際には、このままの値が均等な確率で発生するという仮定をしてしまうと、流通しているピスタチオの汚染量（AFB1の含有量）について過小評価をしてしまうことになるので、この6つのサンプルの平均と分散で対数正規分布を推定した。

ピーナッツバターとチョコレート類（カカオ含有食品）についてはサンプル総数も検出下限を超えたサンプル数も十分にあったため、対数正規分布を仮定し、シミュレーション用のデータセットを作成した。チョコレート類については、それに含まれているカカオがAFB1に汚染されているため、チョコレートやココアに含まれているカカオの単位量あたりでシミュレーションを行うことにした。

(3) 含有量検出下限以下の取り扱い

検出下限以下のサンプルの取り扱いについては検出下限以下のものについては、検出下限値である0.1ppbを全てあて（仮定A）と、検出下限値の0.1と0の間の一様分布をすると想定する（仮定B）の2つのシナリオを適用した。

3) 食品摂取量に関するシミュレーションデータ

食品摂取量に関するデータは平成17年度の「食品摂取頻度・摂取割合調査」の個票を用いた。これは、各人が原則的に連続3日間行った食物摂取についてのデータであるが、サンプル数を確保するために、同一人の異なる日のレコードはそれぞれ別の摂取サン

プルとして取り扱った。全体で17,827のサンプルが得られた。

食品摂取については、年齢層による摂取パターンに差が認められるので、以下の4つの年齢階層によりその摂取量を推定した。

- ・1歳から6歳
- ・7歳から14歳
- ・15歳から19歳
- ・20歳以上

しかし、食品によっては、そもそも摂取したことのある人が少ないもの、あるいはある年齢層においては摂取したことのある人が少ないものがあり、それぞれの場合につき、複数の年齢層を合わせて分布を推定する、あるいは他の年齢層の分布を流用する、もしくはサンプルを単純に3倍に増やして推定する方法を用いた。それぞれについて以下で詳しく説明するが、比較的摂取したことのある人が多かったチョコレート類とそれ以外に分けて述べることにする。カカオからのアフラトキシンの摂取量は、チョコレート類の摂取量から求めた。この推定の元データとなったのは、「カバーリングチョコ」「ミルクチョコ」「ピュアココア」「ミルクココア」の4品目である。全サンプル17827を適切な組み合わせによりグループに分けて推定を行なった。すなわち、1歳から6歳までは、「ドリンクチョコ」と「固形チョコ」、7歳から19歳までは「ドリンクチョコ」と「カバーリングチョコ」「ミルクチョコ」、20歳以上では、「カバーリングチョコ」「ミルクチョコ」「ピュアココア」「ミルクココア」のそれぞれの食品についての分布を推定し、それをもとに、カカオの摂取量合計を推定することとした。

4) カカオ含有量の仮定

4つの食品のカカオ含有量はそれぞれ

- ・カバーリングチョコレート：35%
 - ・ミルクチョコレート：30%
 - ・ピュアココア：100%
 - ・ミルクココア：30%
- とした。

チョコレート類以外の摂取

それぞれの食品の年齢層ごとの摂取者の割合は、摂取した者のサンプル数が少ない以下のもの

- ・1歳から6歳のアーモンド
 - ・15歳から19歳のピーナツバター
 - ・15歳から19歳のピーナツ
 - ・1歳から19歳のとうがらし
 - ・1歳から19歳のピスタチオ
- についてはそれぞれ適切な割合を用いた。

4. 規制値のシナリオ

今回のシミュレーションで用いた含有量に関するデータは AFB1 の他に B₁ 以外も含めたトータルアフラトキシンのデータもあり、食品によっては B₁ 以外の値が高いものがあった。従って、今回は、含有量による流通規制について、AFB1 とトータルアフラトキシンとの二つの基準を組み合わせた規制シナリオを想定した。すなわち、

シナリオ a : 現状 (AFB1 のみ 10 μ g/kg)

シナリオ b : AFB1 : 4 μ g/kg or

総アフラトキシン : 8 μ g/kg

シナリオ c : AFB1 : 10 μ g/kg or

総アフラトキシン : 15 μ g/kg

シナリオ d : AFB1 : 10 μ g/kg or

総アフラトキシン : 20 μ g/kg

従って、含有量のシミュレーションでは、AFB1 とトータルアフラトキシンの両方についての分布を発生させ、それらがシナリオの基準値のどちらかを超えた場合にはそれらを除外することとした。

5. 曝露量のシミュレーション

上記の含有量シミュレーションデータセットと摂取量シミュレーションデータセットを Crystal Ball 2000 日本語版 ((株) 構造計画研究所) を用いて、モンテカルロ法により年齢階層別および全人口でのシミュレーションをそれぞれ 1000 万回行った。後者は、日本人人口の各年齢層の総人口に占める割合 (0歳 : 0.9%, 1歳~6歳 : 5.4%, 7歳~14歳 : 7.5%, 15歳~19歳 : 5.1%, 20歳以上 : 81.1%) で各年齢層から曝露量サンプルを抽出することにより (年齢が1歳未満については、曝露量はゼロと仮定した) シミュレーションを行った。

その上で、各シナリオ (含有量の検出下限未満についての仮定 A と仮定 B、および規制

値についての4つ (現状 & 3つの規制方法) の仮定で、全部で8つのシナリオ) について、それぞれ、20%点、30%点、40%点、50%点、60%点、70%点、80%点、90%点、95%点、97.5%点、99%点、99.5%点、99.8%点、99.9%点の曝露量を推定した。

C. 研究結果

1. アフラトキシンの毒性

1) 急性毒性

LD₅₀ は、50g 体重のアヒルヒナに対して、経口投与でおこなった実験から AFB1 : 18.2 μ g, B2 : 84.8 μ g, G1 : 39.2 μ g, G2 : 172.5 μ g と算出された (7)。AFB2 および AFG の LD50 はアヒルでそれぞれ 1.76mg/kg, 2.83mg/kg であった。ラットでは 200mg/kg まで毒性は認められなかった (8)。AFB1 は LD₅₀ の半分以下の用量で急性の肝毒性を起こす。ヒト肝細胞に対する LD50 は AFB1 : 1ppm, G1 : 5ppm, G2 : 16ppm であった (9)。動物細胞や種々の動物実験を用いた毒性実験の結果から、G1、B2、G2 の毒性はそれぞれ B1 の 50%、20% および 10% である (9)。

2) 生殖毒性

妊娠マウスへの投与実験の結果、AFG1 では肝臓の中性脂肪の上昇が見られ、AFB1 では肝臓の中性脂肪と脂肪酸の蓄積および肝臓、腎臓での細胞毒性が認められた。

3) 遺伝毒性

アフラトキシンおよびその代謝物は、チトクローム p450 によって活性型求電子性中間体 (エポキシド) となり、DNA や細胞内たんぱく質と結合し (DNA アダクト、たんぱく質アダクト)、がん化を招来する。AFB1 の遺伝毒性およびがん化メカニズムは広く研究されているが、AFB1 は DNA に結合し、ガン抑制遺伝子である p53 のコドン 239 番目のグアニンをチミジンに変異させ、その機能を失わせる。ガン遺伝子である Ki-ras や c-myc, c-Ha-ras、14-3-3 β 遺伝子にも変異を起こし腫瘍細胞を異常増殖させる。これらの変異ががん化メカニズムのひとつだと考えられている。生成されるエポキシドがグルタチオン S-トランスフェラーゼの作用を受けグルタチオンと結合することで解毒され、DNA 損傷は起こらない。IARC のモノグラフにその代

謝系および変異に関して詳しく書かれているが、DNA に結合する活性および発がん性が最も強いのは AFB1 である。アフラトキシンの構造のなかで、ジヒドロフラン環の 2, 3 の二重結合が発がん性に関与しているため、この構造を有する AFG1、AFM1、AFQ1、アフラトキシコールも AFB1 より弱いが発がん性はある。2001 年に行われた JECFA での AFM1 に対する評価によれば、発ガンリスクは AFB1 の 10 分の 1 と推定された。しかし AFB2 と AFG2 の遺伝毒性に関しては動物実験の結果では DNA 損傷、姉妹染色体変換および細胞のトランスフォーメーションを起こすが、遺伝子変異は起こさない。また、真菌においては遺伝子変異も組み替えも起こさないが細菌に対しては遺伝子変異を起こすことが報告されている。しかしヒトに対する発がん性についての知見はない。ただし、AFB2 が代謝系酵素によって AFB1 に変換する可能性を報告した論文があるため、関連文献調査を行った。その結果、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、ラット、マウス、ヒトの上澄液ではそのような変換は検出されなかった。すなわち、動物種により AFB2 から AFB1 への変換は起こるが、ヒトにおいてのその危険性はきわめて少ないといえる。

4) 免疫毒性

ラットにおける実験結果から、低レベルの A F の継続的な曝露は成長期の宿主においての感染やガンに対する感受性を高めることが見出されている。

最近の報告では、アフラトキシン投与によってアレルギー発症に関係の深い Th2 タイプの T 細胞が増加する傾向があることが指摘されている。また、用量によって免疫抑制に働いたり亢進したりすることが見出されている。AFB1 はマクロファージの貪食能を低下させ、IL-2 分泌能を低下させるため、感染抵抗性への影響も懸念される。

5) グルコース輸送阻害

グルコース代謝に関係の深い Glyoxalase-1 活性は低レベルの AFB1 により抑制される。グルコースに対する耐性の変化が、アフラトキシンを介する肝臓の過酸化を誘引すると考えられている。

6) B 型肝炎ウイルスとアフラトキシン

肝炎ウイルスに感染することにより AFB1 の代謝活性が上昇し、AFB1-DNA アダクト形成ができたのち、その修復を肝炎ウイルス由来タンパクが阻害するため、p53 遺伝子上の変異が進み、相乗的にがん化を促進すると考えられている。

7) ヒトでの発がん性のリスク評価

1998 年の JECFA の評価によると、ヒトに対する AFB1 の原発性肝臓ガンへのリスクは、一日体重 1 kg あたり 1 ng の AFB1 を毎日摂取すると仮定した場合、肝炎ウイルスに感染していない健康なヒトでは 10 万人に 0.01 人が、B 型肝炎ウイルスに感染しているヒトでは 0.3 人が、AFB1 が原因で肝ガンになると推定している。

しかし、ヒトに対する疫学的研究はアフラトキシン摂取と相関性の高い適切なバイオマーカーがまだ検討の段階であることや、人種の違いや個体差により代謝系や解毒酵素の活性が大きく違うことなど検討を有する問題が多い。

2. 我が国での汚染実態調査結果

アフラトキシンは、20 食品目、875 試料を 3 年間通年で調査した。その結果をまとめたものが表 2 であるが、わが国に流通している市販の胡麻油、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、ビールからは検出限界以上のアフラトキシンは検出されなかった。ピーナッツ、チョコレート、ピスタチオ、はと麦、そば粉、香辛料、ココア、ピーナッツバター、アーモンド、コーングリッツからは、検出限界以上のアフラトキシンが検出され、はと麦では AFB1 が $9 \mu\text{g}/\text{kg}$ も含んでいるものもあったが、おおむねその濃度は低レベルであった。3 年間で測定した検体数を用いて平均汚染濃度を求めたが、いずれの汚染食品目からも $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ を超えるような汚染濃度は検出されなかった。このことは、散発的にアフラトキシンの汚染があることを示している。また、ピーナッツ、コーングリッツは、初年度、次年度は汚染が認められなかったが、最終年度に検出限界以上の汚染食品が検出された例から、長期間のモニタリ

ングの必要性が明確となった。

検出された食品における AFB1, B2, G1, G2 の割合を見て見ると、コーングリッツ、ピスタチオ、そば粉、香辛料は B グループが主流と考えられたが、そのほかの食品目では、BG グループが多かった。特にピーナッツでは、B グループより G グループのほうが汚染濃度が高いという現象が見られた。この傾向は、最近頻度を増しており、今後注意深くモニタリングしていく必要がある。

ピーナッツバターを例に個々のアフラトキシンとその総量との関係を示してみると、AFB1 が大部分の試料で最も高く、総量との間の比は 1:2 (AFB1:TAF) 程度であった。この数値は、2007 年に出版された欧州食品安全機構 (EFSA) からのフードチェーン中の汚染物質に関する委員会 (CONTAM パネル) の報告書では、トータルアフラトキシン量を AFB1 の二倍と推定しているため、現在の汚染実態と考えるには、妥当な数値であると考えられた。

3. 摂取量データのシミュレーション結果

表 3 に各食品および食品の組み合わせについての摂取量のデータを「対数正規分布する」と仮定した時の適合度を測定したものを示した。ここでは主に A-D (アンダーソン・ダーリング) 検定 (分布の端に重みをつけ、端の適合度を重視する検定方法であり、今回のように、分布の端で大きな摂取を行うサンプルに注目する場合により検定方法と思われる) の値に注目する。(この値は、小さい方が適合度が良く、1.5 以下だとまずまずの適合度とされている。

4. 推定曝露量分布

モンテカルロ シミュレーションを行った結果得られた曝露量分布を 4 つの規制方法、2 つの下限值以下の仮定別、計 8 通りについて表 4 に示す。

年齢構成比で重み付けした日本人全体の AFB1 の曝露量は、もっとも安全側をとったシナリオである「現状 (AFB1 のみ $10 \mu\text{g}/\text{kg}$)」の仮定 A の場合で 99.9 パーセンタイル値が $2.06 \text{ ng}/\text{kg}/\text{day}$ であり、もっとも少なめに見積もられる「AFB1 $4 \mu\text{g}/\text{kg}$, TAF 8

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 」の B で 99.9 パーセンタイル値は $1.88 \text{ ng}/\text{kg}/\text{day}$ であった。 $1 \text{ ng}/\text{kg}/\text{day}$ 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。

D. 考察

アフラトキシンの毒性は、急性毒性、生殖毒性、免疫毒性、遺伝毒性から評価されているが、IARC が評価しているように、発ガン性が最も重要な健康被害である。そのメカニズムに関しては、AFB1 で詳細に研究されているが、アフラトキシンのジヒドロフラン環の 2, 3 の二重結合が発ガン性に関与しており、二重結合の部分がチトクローム P450 により 8, 9 エポキシド化し、DNA や細胞内タンパクに特異的に結合し、遺伝子変異を起こすことによりガン化が引き起こされるには AFB1 よりも弱い発ガン性が認められている。一方、エポキシド化からグルタチオン S-トランスフェラーゼの作用を受けた場合には、グルタチオン抱合体を形成し、AFB1 は解毒される。すなわちこのエポキシドからの DNA への結合変換と解毒へのバランスがガン化の大きなファクターとなっている。マウスなどの動物種では AFB1 の原発性ガン原性に抵抗性があるが、これはラットなどの AFB1 に対して感受性の高い動物に比べて 3 倍から 5 倍グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性が高いからだといわれている。ヒトはラットやマウスに比べ 8, 9-エポキシド複合体に対するグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性は低いので、アフラトキシンに対する解毒能力は低いことが考えられる。

AFB1 の他、同様に二重結合を有する AFG1, AFM1, AFQ1, AFP1 およびアフラトキシコールは AFB1 ほど活性が強くないが発ガン性を有する。

二重結合をもたない AFB2 および AFG2 の発ガン性に関する信頼性の高い報告はなされていない。しかしアヒルにおいては AFB2 が代謝によって AFB1 になることが報告されており、AFB2 および AFG2 が発ガン性を示す場合には、何らかの代謝を受け AFB1 あるいは AFG1 に変換するプロセスが重要であると考えられる。いままでの報告では、ヒト細胞を用いた *in vitro* の実験からはこのような

変換が起こる可能性は示されていない。しかし AFB2 および AFG2 の急性毒性は、実験動物や培養細胞を用いた実験から、それぞれ AFB1 の 20% および 10% であることが明らかになっており、遺伝毒性はなくても基準値を設定する場合には AFB2 および AFG2 も考慮に入れるべきであろう。現時点ではアフラトキシンの発がん性リスクの推定には、AFB1 の汚染濃度が使われているが、コーデックス規格であるトータルアフラトキシンとして基準値を設定する方法は、AFB1 以外のアフラトキシン類による発ガン性をも含めた健康被害を未然に防止する目的では妥当であるといえる。

毒性評価の結果を基に基準値を設定するためには、現在わが国に流通している食品がどの程度アフラトキシンに汚染しているか、また、その食品を摂取することによりどの程度わが国の国民がアフラトキシンに暴露されているかを把握し、正確にわが国におけるアフラトキシンのリスクを評価する必要がある。そこで、平成 16 年度から平成 18 年度までアフラトキシンに汚染された報告のある食品目を中心に、20 食品目 875 検体を対象にアフラトキシン汚染を調査した。

その結果、ピーナッツ、チョコレート、ピスタチオ、はと麦、そば粉、香辛料、ココア、ピーナッツバター、アーモンド、コーングリッツに、定量限界値以上の濃度の汚染が認められた。特にピーナッツバターは、スーダンのアフラトキシン汚染地帯においては、ピーナッツバターが肝臓癌のリスク因子であることが見出されている(10)ことから、我が国におけるピーナッツバターの消費形態の調査を踏まえた対応が必要である。そば粉は汚染が認められたが、いまのところそば麵からは検出されていない。その他、香辛料、ココア、チョコレート、ホワイトチョコレート、ハトムギ、アーモンド、ピスタチオナッツ、ピーナッツ、コーングリッツにも汚染が認められたことから、今後これら食品もアフラトキシン汚染のリスク食品として対応する必要がある。

3 年間の実態調査結果と検出された食品の摂取量から、確率論的手法により、わが国のアフラトキシン暴露量の推定を行なった。また、基準値を設定すると仮定した場合、以下の 4

つのシナリオ

シナリオ a: 現状 (AFB1 のみ $10 \mu\text{g/kg}$)、

シナリオ b: AFB1: $4 \mu\text{g/kg}$ および総アフラトキシン: $8 \mu\text{g/kg}$ 、

シナリオ c: AFB1: $10 \mu\text{g/kg}$ および総アフラトキシン: $15 \mu\text{g/kg}$

シナリオ d: AFB1: $10 \mu\text{g/kg}$ および総アフラトキシン: $20 \mu\text{g/kg}$

を想定して、それぞれの暴露量の推定を試みた。もっとも安全側をとったシナリオでも 99.9 パーセンタイル値が 2.06ng/kg/day であり、もっとも少なめで 99.9 パーセンタイル値は 1.88ng/kg/day であった。 1ng/kg/day 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。

すなわち AFB1 に対して $10 \mu\text{g/kg}$ で規制している現状においては、今回の推定では規制の有無において顕著な差異は認められなかった。これは我が国に流通する食品においては AFB1 の含有量が、設定した規制値を超えるものの割合が少ないためと考えられる。この結果は現在行なっている規制が有効に機能していることを強く支持している。

今回の結果を、 1ng/kg/day の摂取で B 型肝炎ウイルス感染者において 0.3 人/10 万人/年の肝がんの発生リスクがあるとするという報告から評価すると、日本人においてアフラトキシン曝露による肝がん発生のリスクは十分小さいものと考えられる(表 5)。これまでの知見によれば、AFB1 を継続的に 1ng/kg/day 摂取した場合の肝臓がん発生率は B 型肝炎抗原陽性者において 3 件/100 万人・年、同じく陰性者で 0.1 件とされている。今回のシミュレーション結果ではピーナッツ、アーモンド摂取により 1ng/kg/day 以上摂取するものは大きく見積もっても全体の 0.1~2% であり、両者の摂取による肝がんの過剰発生はほとんど見込まれない、と思われる。

Codex は 2005 年に未加工アーモンド・ヘーゼルナッツ・ピスタチオの総アフラトキシン規制値 $15 \mu\text{g/kg}$ を提案した。2006 年 会合では Codex はこれら調理済みナッツについて $8 \mu\text{g/kg}$ / kg を提案しているがまだ最終決定はされていない。

これを受けて2007年6月にJECFAが開かれ、そのリスクに関して討議される予定になっているが、EFSAのフードチェーン中の汚染物質に関する委員会（CONTAMパネル）は、加工アーモンド・ヘーゼルナッツ・ピスタチオの最大規制値（トータルアフラトキシン： $4\mu\text{g}/\text{kg}$ 、B1： $2\mu\text{g}/\text{kg}$ ）と比較して、三種のナッツのこれまでより高い新しい規制値により消費者の健康リスクが高くなる可能性について科学的根拠の提供を諮問された。

CONTAMパネルの報告書によると（11）、各種食品中アフラトキシン濃度について約4万の分析結果を調査した結果、約75%の検体からは検出されず、検出された場合においては主にAFB1が大半を占めていた。しかし、トータルアフラトキシン量を想定するときにはAFB1の二倍と仮定した。三種のナッツのアフラトキシン最大規制値の4から8又は $10\mu\text{g}/\text{kg}$ への変更は、平均アフラトキシン暴露量を1%程度しか変化させなかった。このことからアーモンド・ヘーゼルナッツ・ピスタチオの最大規制値が増加することは全ての食品に由来する総量や発ガンリスクにはわずかな影響しか与えない。この評価にあたってCONTAMパネルは高レベル摂取者についても考慮している。

わが国ではアフラトキシン汚染食品の種類も汚染量も少なく、かつナッツの消費量は非常に少ないことから寄与率が小さく、Codexの提案に関して大きなリスクの変化はないものと考えられた。

E. まとめ

1993年、2002年IARC Monograph および1998年JECFA Monographに加えて、最近の文献調査結果を加えて、トータルアフラトキシン（AFB1、AFB2、AFG1、AFG2）の毒性評価をした。トータルアフラトキシンの内AFB1、AFG1はエポキシドを形成し、DNA結合活性を有するため、発ガン性がある。一方、AFB2およびAFG2は、発ガン性はヒトでは評価されていないが、急性毒性があることや、代謝によってAFB1やAFG1に変換する可能性が否定できないことから、トータルアフラトキシンとして、4種類のアフラトキシン化合物をす

べて規制対象にすることは、発ガン性以外の毒性を含めた健康被害を防止する目的から意味のあるものである。

わが国でのアフラトキシン汚染実態を3年間通年で調査した結果、ピーナッツ、チョコレート、ピスタチオ、はと麦、そば粉、香辛料、ココア、ピーナッツバター、アーモンド、コーングリッツに、定量限界値以上の濃度の汚染が認められたが、これらの濃度は低レベルであった。

日本人のAFB1曝露評価は、3年間通年で行った実態調査結果を基に、日常の食品摂取によるAFB1曝露量の推定評価として行った。推定には、その他にチョコレート、白こしょう、そば粉等、11の食品品目を対象とした。推定には、平成17年度「食品摂取頻度・摂取割合調査」による食品別の摂取量と、検疫および実態調査で得られた各食品中のAFB1含有量データを用いた。推計にはモンテカルロ・シミュレーションの手法を用い、規制値を幾つかのレベルで設定したシナリオ別にAFB1の摂取量を推定した。その結果、AFB1に対して $10\mu\text{g}/\text{kg}$ で規制をしている現状においては、年齢構成比で重み付けした日本人全体のAFB1の曝露量は、もっとも安全側をとったシナリオである「現状（AFB1のみ $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ）の場合で99.9パーセンタイル値が $2.06\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$ であり、もっとも少なめに見積もられる「 $4\mu\text{g}/\text{kg}$ 規制値（AFB1として）」で99.9パーセンタイル値は $1.88\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$ であった。 $1\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$ 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。

多くの食品においては、AFB1が汚染の大半を占めていたが、今年度ピーナッツからAFB1よりAFG1の濃度が高いものが検出された。全体的にみればAFB1優勢であるが、今後さらなる調査を続け、総アフラトキシンに占める各アフラトキシンの割合を注意深くモニタリングしていき、AFB1のみの現行の規制を継続していくべきかどうかを見直す必要がある。

F. 引用文献

- (1)JECFA (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins and food. WHO Food Additives Series 47.

- (2) Scudamore KA, Nawaz S, Hetmanski MT, Rainbird SC (1998) Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: III. Determination of mycotoxins in rice bran. *Food Addit. Contam.*, 15, 185-94.
- (3) Escobar A, Regueiro OS (2002) Determination of aflatoxin B1 in food and feedstuffs in Cuba (1990 through 1996) using an immunoenzymatic reagent kit (Aflacen). *J. Food Prote.*, 65, 219-21.
- (4) Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D (2004) Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80, 1106-22.
- (5) Park JW, Kim EK, Kim YB (2004) Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B1 through food consumption. *Food Add. Cont.*, 21, 70-5
- (6) Tabata S, Kamimura H, Ibe A, Hashimoto H, Iida M, Tamura Y, Nishima T (1993) Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokyo: 1986-1990. *J. AOAC Int.*, 76, 32-5.
- (7) B.A. Camagham, et al., Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 1101 (1963)
- (8) Wogan, G.N., et al., Structure-activity relationship in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer research*, 31, 1936 (1971)
- (9) K. Terao, and K. Ohtsubo, Mycotoxins and animal foods, Chapter 21, pp455 (1986)
- (10) Omer RE, Verhoef L, Van't Veer P, Idris MO, Kampman E, Bunschoten A, Kok FJ Peanut butter intake, GSTM1 genotype and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Sudan. *Cancer Causes Control*, 12, 23-32. (2001)
- (11) Opinion of the Scientific Panel CONTAM 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 1 March 2007

http://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam_opinions/ej446_aflatoxins.html

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugita-Konishi, Y., : The mechanism of the carcinogenic effect of aflatoxins and the occurrence of Aflatoxin in nuts in Japan. *Mycotoxins*, 55, 129-132 (2005)
- 2) Sugita-Konishi, Y., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Ito, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S. and Kumagai, S., : Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Fumonisin in Retailed Foods in Japan, *J. Food Protect.*, 69, 1365-1370 (2006)
- 3) Maragos, C. M., Busman, M., and Sugita-Konishi, Y., : Production and Characterization of a Monoclonal Antibody Cross-Reactive With the Mycotoxins Nivalenol and 4-Deoxynivalenol. *Food Additives Contamin.*, 23, 816-825 (2006)
- 4) Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Nakajima, M., Fujita, K., Norizuki, H., Mochizuki, M. and Takatori, K.: The Comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. *TALANTA*, 69, 650-655 (2006)
- 5) Park, B. J., Takatori, K., Sugita-Konishi, Y., Kim, I.K., Lee, M.H., Han, D.H., Chung, K.H., Hyun, S.O., and Park, J.C.: Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface and Coating Technology*, in press (2007)
- 6) 小西良子：実験動物を用いての毒性評価マイコトキシンス, 56-2, 105-115 (2006)
- 7) Y. Sugita-Konishi, A. Kubosaki, M. Aihara¹⁾, B. J. Park, T. Tanaka, Y. Suzuki, K. Takatori, M. Hirose, M. Shibutani, Nivalenol targets female reproductive system as well as hematopoietic and immune systems in rats after 90-day exposure through diet. *Food Addit. Contamin.* 2007, in press.

- 8) S. Kumagai, M. Nakajima, S. Tabata, E. Ishikuro, T. Tanaka, H. Norizuki, Y. Itoh, K. Aoyama, K. Fujita, S. Kai, T. Sato, S. Saito, N. Yoshiike, Y. Sugita-Konishi, Aflatoxin and ochratoxin A contamination in retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. Food Addit. Contamin. 2007, in press.
 - 9) Y. Sugita-Konishi, A. Kubosaki, M. Aihara, B. J. Park, T. Tanaka, Y. Suzuki, K. Takatori, M. Hirose, M. Shibutani Functional, biochemical and immunological effects of nivalenol after oral administration for 90-day in F344 rats. ISOMYCO'06 Bangkok, proceedings
 - 10) M. Takahashi, M. Shibutani, Y. Sugita-Konishi, M. Aihara, K. Inoue, G-H. Woo, H. Fujimoto, M. Hirose; A 90-day subchronic toxicity study of nivalenol, a trichothecene mycotoxin, in F344 rats. Food and Chemical Toxicology, submitted.
 - 11) A. Kubosaki, M. Aihara, B. J. Park, Y. Sugiura, M. Shibutani, M. Hirose, Y. Suzuki, K. Takatori, Y. Sugita-Konishi, Immunotoxicity of Nivalenol after Subchronic Dietary Exposure to Rats, Food and Chemical Toxicology, submitted.
2. 口頭発表
- 1) 小西良子「アフラトキシン—その発ガン性と汚染実態」マイコトキシン研究会学術講演会、2005年1月
 - 2) Y. Sugita-Konishi, S. Kumagai "Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Fumonisin in Retailed Foods in Japan," 40th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, Matsushima, Japan, Nov. (2005)
 - 3) A. Kubosaki, Y. Sugita-Konishi "Production of reactive oxygens species following Aflatoxins exposure in human hepatoma cell line" 40th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, Matsushima, Japan, Nov.
 - 4) 小西良子「実験動物を用いての毒性評価」マイコトキシン研究会学術講演会、2006年1月
 - 5) Y. Sugita-Konishi, A. Kubosaki, M. Aihara, B. J. Park, Y. Sugiura, M. Shibutani, M. Hirose, Y. Suzuki, K. Takatori, Society of Toxicology, 2007.3, Charlotte, NC., USA, (2006)
 - 6) Y. Sugita-Konishi, A. Kubosaki, M. Aihara, B. J. Park, T. Tanaka, Y. Suzuki, K. Takatori, M. Hirose, M. Shibutani Functional, biochemical and immunological effects of nivalenol after oral administration for 90-day in F344 rats. International Symposium on Mycotoxicology in Bangkok-New Strategies for Mycotoxin Research in Asia-ISMYCO Bangkok '06 (2006)
 - 7) Kumagai S, Nakajima M., Tabata S., Tanaka T., Norizuki H., Itoh Y., Sato T., Saito S., Yoshiike N., Takatori K., Sugita-Konishi Y. Surveillance of mycotoxin contamination in retail foods and exposure assessment based on it in Japan 10th International Symposium on Toxic Microorganisms, United State-Japan Cooperative Program on Development and Utilization of Natural resources, Wiley Center, FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition (2006)
 - 8) Y. Sugita-Konishi, A. Kubosaki, M. Aihara, B. J. Park, T. Tanaka, Y. Suzuki, K. Takatori, M. Hirose, M. Shibutani, Nivalenol targets female reproductive system as well as hematopoietic and immune systems in rats after 90-day exposure through diet. 10th International Symposium on Toxic Microorganisms, United State-Japan Cooperative Program on Development and Utilization of Natural resources, Wiley Center, FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2006)
 - 9) 中島正博、青山幸二、石黒瑛一、堤徹、法月廣子、大須賀裕美、藤田和弘、甲斐茂美、田端節子、杉浦義紹、田中敏嗣、田中宏輝、高橋正紀、伊藤嘉典、小西良子、熊谷進：日本に流通する食品中のアフラトキシン、オクラトキシン A およびフモニシン汚染実態調査（平成17年度）第92回日本食品衛生学会（2006.10）
 - 10) 田中敏嗣、小西良子、高鳥浩介、Chris M. Maragos、田中宏輝、高橋正紀、中島隆：デオキシニバレノールおよびニバレノール

ルを認識するモノクローナル抗体の開発
とその応用 第92回日本食品衛生学会
(2006.10)

- 11) 五十嵐奈津子, 伊佐川聡, 藤田和弘, 中
村宗知, 渡井正俊, 小西良子, 田端節子,
中島正博, 田中敏嗣, 木谷裕亮, 青山幸
二, 平岡久明, 牧野大作, 石黒瑛一, 法
月廣子, 滝澤和弘: 玄米中のオクラトキシ
ンA分析法の複数機関による評価 第92
回日本食品衛生学会 (2006)

- 12) 小西良子, 高鳥浩介, 佐藤敏彦, 斎藤史
朗, 吉池信男: 我が国に流通するチョコ
レート中のオクラトキシン A およびアフラ
トキシンの汚染実態と暴露評価 第92

回日本食品衛生学会 (2006)

- 13) 小西 良子: 本邦におけるオクラトキシ
ンA汚染の実態とその汚染カビ-

オーバービュー、第60回マイコトキシン研究
会学術講演会シンポジウム, (2006)

- 14) 松田 瑛奈, 朴奉柱, 葉袋 裕二, 芳賀
実、小西 良子: トリコテセン系マイコト
キシンのマクロファージへのサイトカイン
産生能, 日本農芸化学会 2006 年度大会
(2006)

H. 知的財産権の出願登録状況

なし

表1 食品別アフラトキシンB1含有割合

食品名	細目	全サンプル数	検出下限以上(%)
ピーナッツ	ピーナッツ乾	150	1(0.67)
	ピーナッツ煎		
ピーナッツバター	ピーナッツバター	62	23(37.1)
チョコレート類	カバーリングチョコ	42	26(61.9)
	ミルクチョコ		
	ピュアココア		
	ミルクココア		
ピスタチオ	ピスタチオ	159	6(3.77)
白こしょう	白こしょう	5	4(80.0)
とうがらし	レッドペッパー	6	1(16.7)
アーモンド	アーモンド乾	15	5(33.3)
	アーモンドフライ		
はとむぎ	はとむぎ	17	6(35.3)
そば	全層粉	28	2(7.14)
	生そば		
	ゆでそば		
	干しそば		
	ゆで干しそば		

表2 平成16年度から平成18年度までのアフラトキシン汚染実態調査結果

アフラトキシン 3年間 食品目 20 検体数 875

	年度			合計	汚染件数	平均汚染濃度(範囲、 $\mu\text{g/kg}$)				
	H16	H17	H18			B1	B2	G1	G2	Total Af
ピーナッツ	60	60	30	150	1	4.88	0.31	20.9	1.90	28.0
チョコ		41	23	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(0.1-1.21)
ピスタチオ			5	5	1	0.38(0.38)	-	-	-	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	11	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			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)
コーングリッツ	10	10	10	30	2	0.20(0.19-0.21)	-	-	-	0.20(0.19-0.21)
胡麻油	10	10	10	30	0					
こめ	53	30	10	93	0					
ポップコーン	10	10	10	30	0					
豆がし		20	20	40	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	50	30	10	90	0					
そば	39	20	25	84	0					
せんべい			20	20	0					
ビール			20	20	0					

表3-1 食品摂取人数

	年齢(人数)				
	1-6(788)	7-14(1359)	15-19(948)	20-(14732)	TOTAL(17827)
カバリーングチョコ	26	69	51	161	307
ミルクチョコ	65	125	94	697	981
ピュアココア	11	14	11	83	119
ミルクココア	70	85	36	346	537
チョコ総合	153	258	177	1222	1810
アーモンド	7	54	2	104	167
はとむぎ	0	0	0	42	42
ピーナッツバター	16	31	6	130	183
ピーナッツ	18	47	7	277	349
とうがらし	3	7	11	175	196
ピスタチオ	1	1	1	15	18
そば粉	28	40	16	768	852
そば麺	0	0	0	14	14
白こしよう	27	63	49	746	885

表3-2 食品摂取割合(%)

	年齢(人数)				
	1-6(788)	7-14(1359)	15-19(948)	20-(14732)	TOTAL(17827)
カバリーングチョコ	3.30	5.08	5.38	1.09	1.72
ミルクチョコ	8.25	9.20	9.92	4.73	5.50
ピュアココア	1.40	1.03	1.16	0.56	0.67
ミルクココア	8.88	6.25	3.80	2.35	3.01
チョコ総合	19.42	18.98	18.67	8.29	10.15
アーモンド	0.89	3.97	0.21	0.71	0.94
はとむぎ	0.00	0.00	0.00	0.29	0.24
ピーナッツバター	2.03	2.28	0.63	0.88	1.03
ピーナッツ	2.28	3.46	0.74	1.88	1.96
とうがらし	0.38	0.52	1.16	1.19	1.10
ピスタチオ	0.13	0.07	0.11	0.10	0.10
そば粉	3.55	2.94	1.69	5.21	4.78
そば麺	0.00	0.00	0.00	0.10	0.08
白こしよう	3.43	4.64	5.17	5.06	4.96

表4 アフラトキシンB1一日推定曝露量分布(全人口)

規制 下限値以下仮定	B1:10のみ		B1:10のみ		B1:4, total:8		B1:10, total:15		B1:10, total:20		(ng/kg・BW/day)	
	仮定A	仮定B	仮定A	仮定B	仮定A	仮定B	仮定A	仮定B	仮定A	仮定B	B1:10, total:20	仮定B
10μg-センタイル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50μg-センタイル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80μg-センタイル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90μg-センタイル	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
95μg-センタイル	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.003	0.004	0.004
97.5μg-センタイル	0.009	0.010	0.009	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.009	0.009	0.010	0.010
99.0μg-センタイル	0.045	0.051	0.041	0.048	0.043	0.043	0.043	0.049	0.042	0.042	0.049	0.049
99.5μg-センタイル	0.305	0.307	0.259	0.261	0.283	0.283	0.283	0.285	0.285	0.285	0.286	0.286
99.9μg-センタイル	2.063	2.063	1.881	1.880	1.956	1.956	1.956	1.956	1.859	1.859	1.958	1.958

Table 5. 我が国でのAFB1摂取による原発性肝臓ガンのリスク

規制値のシナリオ	ガン発症者/10万人/年							
	B1:10ng/g (現状)		B1:4 or total:8 ng/g		B1:10 or total:15ng/g		B1:10 or total:20	
	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B	仮定 A	仮定 B
LOQ以下の仮定								
99.0 パーセント マイル	0.00076	0.00086	0.00070	0.00081	0.00073	0.00083	0.00071	0.00083
99.9 パーセント マイル	0.03499	0.03499	0.03190	0.03188	0.03317	0.03317	0.03153	0.03321
全人口125,000,000 HVB キヤリアー→C HVC キヤリアー→3,000,000 (2.4%)								

毒性学的研究 <抜粋>

1. 急性毒性

他の review で述べられているのでここでは省略する。

2. 生殖毒性

● 妊娠マウスを用いて、AFG1 4.8 ng/kg bw/day および AFB1 0.8ng ng/kg bw/day を独立にまたは共に飼料に混ぜて与えた場合、子供マウスにおいて、AFG1 では肝臓の中性脂肪の上昇が見られ、AFB1 では肝臓の中性脂肪と脂肪酸の蓄積および肝臓、腎臓での細胞毒性が認められた。

3. 遺伝毒性

● AFB1 はDNAに結合し、p53 のコドン249番目のグアニンをチミジンに変異させる作用を持つ。この変異は p53 遺伝子特有の働きを阻害するのだが、一般にこのような毒性を異型接合性と呼んでいる。ヘテロジニアスな化学物質に対する代謝系を有する *Saccharomyces cerevisiae* 試験種を用いた実験結果から、活性化された AFB1 は DNA 組み換えを潜在的に誘引することが明らかになった。

● ラットは AFB1 原発性肝ガンに感受性が高く、マウスは低い。この種による感受性の違いを、AFB1-アルブミンアダクトの量により比較してみると、ラットでは染色体異常量と血中の AFB1-アルブミンアダクトに相関性があった。また、マウスよりラットの方が AFB1-アルブミンアダクトの量が高かった。

● AFB1-アルブミンアダクトの生成は、異なる種における AFB1 原発性肝ガンに対する感受性を反映している。尿中の AFB1-N7 グアニンアダクトも中国の集団例においては肝ガン発症の進行に関係するリスクと関係していた。

4. 免疫毒性

● ラットにおける実験結果から、低レベルのAFの継続的な曝露は成長期の宿主においての感染やガンに対する感受性を高めることが見出されている。

● 呼吸器からのAFの曝露も、肺の局所および全身の免疫防除機構を衰えさせる。

5. アフラトキシンの発がん性を修飾する因子

● 低カロリー食は AFB1 が誘引する DNA 合成を肝臓と腎臓において遅延させる。

● 低タンパク食は AFB1 が誘発する腫瘍が出現するために要する期間は長くなったが、腫瘍の大きさ、数などが減少した。

● 高脂肪食は高炭水化物食よりチトクローム 1A1 と 2B1 活性を高くする。このことは AFB1 の解毒を促進し、肝高分子タンパク質と結合する AFB1 の量を減らすことに役立つ。

● 今後の重要な問題として次のものが挙げられる。

- 1) アフラトキシンから生物活性を有するエポキシド代謝物への異なる代謝経路
- 2) エポキシドから生物活性体への変換活性と解毒活性へのバランス
- 3) AFB1 エポキシドと DNA との関係とガン化への変異
- 4) AFB1 エポキシドの細胞毒性と発ガン性に対する役割
- 5) 毒性発現における非エポキシドの重要性
- 6) マイコトキシンに関連性のない疾病の進行への寄与度
6. 核酸およびタンパクと結合したアフラトキシン残基
 - セリンの前処理は、用量依存性に AFB1-DNA 結合を阻害する。
 - ヒト、マウス、ラットで生成された AFB1-DNA アダクトは標的細胞で DNA 損傷をおこすが、ゲッシン類で得られた結果が、ヒトにおける AFB1-DNA アダクトの影響に関する結果が不完全であることからそのままヒトに外挿することは出来ない。
7. グルコース輸送
 - グルコース代謝に関係の深い Glyoxalase-1 活性は低レベルの AFB1 により抑制されるので、グルコースに対する耐性の変化が、肝臓の AF を介する過酸化を誘引すると考えられている。
8. コットンシード中のアンモニア処理アフラトキシンの影響
 - 大気圧を用いた試料中のアンモニウム処理は、飼料中の AFB1, AFM1 のミルクへの移行を減少させる。このことによって肝ガンへのリスクを減らすことが出来る。
9. ウッドチャック、アヒル、リス、ツバイにおける B 型肝炎ウイルスとアフラトキシン
 - 肝炎ウイルスに感染することにより AFB1 の代謝活性が上昇し、AFB1-DNA アダクト形成に影響がでるものと考えられていることから、AFB1 と B 型肝炎ウイルスは、相乗作用をもつ。
10. ヒトにおける情報
 - 10-1. アフラトキシン曝露のバイオマーカー
 - ゲッシン類では、血清中の AFB1-アルブミンアダクトは、肝で出来ている AFB1-DNA アダクトのマーカーであり、これらのパラメーターは少なくとも、AFB1 原発性肝ガンへの感受性に関係している。このマーカーは今後検討していかなければならない問題である。
 - 10-2. ヒト肝細胞ガンにおける p53 ガン抑制遺伝子の変異
 - p53 ガン抑制遺伝子上にいくつかの変異はアフラトキシン曝露の特異的マーカーとなるであろうという仮定は、肝ガン疫学的調査の分野の突破口となるかもしれない。特に p53 とアフラトキシンの関係の特異性を確かめることは、アフラトキシンが肝ガン発症の原発であるかどうかの評価や肝炎ウイルスとの相互作用の可能性を見定めることに役立つであろう。
 - 10-3. 原発性肝ガンの疫学的調査
 アフリカやアジアなど食物にアフラトキシンが相当含まれている地域における多くの疫

学的研究によってヒトにおいてアフラトキシン（トータルまたは AFB1）の潜在的な発ガン性が検討されている。アフラトキシンの曝露は B 型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスの可能性もある、の曝露によりリスクは高まる。この関係は、ガン性の潜在性に影響を及ぼしているだけでなく、アフラトキシンの代謝系、生化学的、薬理学的なプロセスにも影響を及ぼしている。他の多くの原発性肝ガンの多くの病原因子がアフラトキシン原発性肝ガンのリスクを背景とした疫学的研究の解釈を難しいものになっている。おそらく更なる進歩によって見出された生化学、薬理学的マーカーが正確な曝露評価を可能にするであろう。

アフラトキシン B 2, G 1, G 2 の毒性に関しては、1993 年に行われた IARC の評価後、新たな知見はない。

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
○	小西良子、 窪崎敦隆	実験動物を用いての毒性評価	Mycotoxins	56(2)	105-115	2006
○	Y.Konishi	The mechanism of the carcinogenic effect of aflatoxins and the occurrence of aflatoxin B1 in nuts in Japan	Mycotoxins	55(2)	129-132	2005
×	Y.Konishi, S.Kumagai	Toxicity of mycotoxins related with head blight diseases in wheat and establishment of provisional standard for tolerable level of DON in wheat	Mycotoxins	55(2)	49-53	2005
×	Y.Konishi, T.Tanaka, M.Nakajima, K.Fujita, H.Norizuki, N.Mochizuki, K.Takatori	The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans	Talanta	69	650-655	2006
×	B.J.Park, K.Takatori, Y.Konishi, I.Kim,M.Lee, D.Han,K.Chung, S.O.Hyun, J.Park	Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure	Surface & Coatings Technology	201	5733- 5737	2007

X	Y.Konishi, B.J.Park, K.Hattori, T.Tanaka, T.Chonan, K.Yoshikawa, S.Kumagai	Effect of Cooking Process on the Deoxynivalenol Content and Its Subsequent Cytotoxicity in Wheat Products	Biosci. Biotechnol. Biochem.	70(7)	1764- 1768	2006
O	Y.Konishi, M.Nakajima, S.Tabata, E.Ishikuro, T.Tanaka, H.Norizuki, Y.Itoh, K.Aoyama, K.Fujita, S.Kai, S.Kumagai	Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Fumonisin in Retail Foods in Japan	Journal Food Protection	69(6)	1365- 1370	2006
X	H.Tanaka, M.Takino, Y.Konishi, T.Tanaka	Development of a liquid Chromatography/time -of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs	Rapid Commun. Mass Spectrom.	20	1422- 1428	2006

研究成果の別刷

実験動物を用いての毒性評価

小西良子, 窪崎敦隆

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
(158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

要 旨

食品中に汚染するマイコトキシンは、大量に摂取した場合にあらわれる急性毒性よりも長期暴露による慢性的な健康被害が懸念されている。このような自然毒は食品汚染を完全に防御することが不可能であることから、各国で健康被害が懸念される食品を対象に基準値を設定している。しかし、各国での基準値の違いによる貿易摩擦を防止するために、国際的にもコーデックス規格を設けている。これらの基準値案は、FAO/WHO においての科学者の国際的集まりである JECFA などによって、問題となっているマイコトキシンを対象に毒性評価が行われている。本稿では、いままで JECFA で評価されたマイコトキシンを中心に実験動物を用いた毒性評価を紹介するものである。

キーワード：毒性試験，一日暫定耐容摂取量，基準値

(Received: April 10, 2006)

はじめに

マイコトキシンのような自然毒は、食品への混入を減らすことはできても完全に防ぐことは不可能である。そのため、これらの毒によって引き起こされる健康被害を明らかにし、「毒性の出現する用量」から「安全な用量」を推定することにより一日暫定耐容摂取量を設定し、それぞれの国の対象食品の消費量を考慮して基準値を設定することが、最も有効な防御策と思われる。

基準値を設定するためには他にも汚染実態の把握，毒性評価，公正なサンプリング方法およびバリデーションされた分析方法，経済的背景などを含む食糧供給への影響，規制を行うための体制の整備とそれに有する経済的負担などがあるが、本稿では毒性評価について述べる。

毒性試験

毒性評価は、FAO/WHO 合同食品添加物専門委員会 (JECFA) など、国際的に整合性の高い方法をもって行われている。健康被害が既にヒト疫学調査で示されている場合は、その結果が優先的に評価されるが、ほとんどの場合は動物を用いた毒性試験の結果をもとに評価される。現在行われている実験動物を用いた主な毒性影響試験は、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、生殖毒性試験、催奇形性試験などがあり、変異原性試験では微生物を用いた方法が使われることも多い。これらの試験は、OECD により確立された方法のように国際的に認められたガイドラインに従って行うことが望ましい。

単回投与毒性試験は、ラットやマウスに被検物質を1回強制的に投与し、投与された動物の50%が死亡する用量 (LD_{50}) を求めるものである。また、この試験によりどのような毒性が発現し、その標的器官がなんであるかまで把握することができる。

反復投与毒性試験には28日から3ヶ月までの短期毒性試験と、1から2年までの長期毒性試験がある。単回投与毒性試験の結果から得られた結果を参考に、実施する用量を決める。継続的に被検物質を餌等に混ぜて投与し、試験期間中から体重、死亡率、摂取量などを測定し、期間終了後各種生化学検査や、病理組織学的検査をおこなう。

生殖毒性試験は、ラットやウサギが対象となるが、被検物質の交配、着床、器官形成、胎児期、授乳期など生殖過程全般に対する影響を試験するものである。通常離乳した実験動物 (F0世代) に被検物質を継続的に投与し、その間に交配、出産をさせる。次の世代の動物 (F1世代) にも離乳後から被検物質を継続的に投与し、交配、出産をさせ、F2世代の新生児まで病理組織学影響をみる。

催奇形性試験は、被検物質が先天異常の原因になるかどうかをみる試験法である。妊娠6日から15日の間投与して、21日目に帝王切開し胎児の骨格検査や内臓検査を行う。

遺伝毒性 (変異原性試験) は、被検物質がDNAを損傷するかどうかを *in vitro* または *in vivo* でみる試験である。*In vitro* 試験ではサルモネラ等を用いて、野外株への復帰変異を検出するAmes試験またはほ乳動物培養細胞の染色体異常を検出する試験が行われる。*In vivo* 試験としては、ほ乳動物の骨髓赤血球中の染色分体断片を検査する小核試験が行われる。

発ガン性試験は、それまでの試験結果で発がん性を有する可能性が高い被検物質について行われる試験であり、ラットおよびマウス (場合によっては両方) を対象に1.5—2年間反復投与し、発現した腫瘍の頻度や発生個数を投与群と対照群で統計処理することで発がん性を判定する。化学物質の発ガン性を評価する国際機関としてIARCがあるが、ここでクラス分けされた評価を参考にすることが多い。

その他の毒性としては、免疫毒性 (易感染性や抗体産生能低下、遅延型反応等を含む) や体重減少、酵素阻害、タンパク質合成、核酸合成阻害等が挙げられる。

一日暫定耐容摂取量の設定

上記で述べた種々の毒性試験結果の中から、通常は慢性毒性試験 (長期毒性試験) から、最大無作用量 (NOEL) または最大無影響量 (NOAEL) を求めることが多い。もしNOEL, NOAELの設定が難しい場合は、最小無影響量 (LOAEL) を使用することもある。ここで設定された最大無作用量などに安全率を乗じて、一日暫定耐容摂取量 (PMTDI) として用いる。しかし、慢性毒性試験から得られたNOELまたはNOAELよりも、他の毒性試験で得られたNOELまたはNOAELの用量が低かった場合は、その値を参考に算出される。また、その被検物質が蓄積性があるのかないのかも毒性発現には重要な要素となるので、代謝、排泄のデータも加味される。参考までにJECFA^{1,7)} で評価された主要なマイコトキシンを対象に、IARC^{8,9)}、IPCS^{10,11)}、EU-SCF¹²⁾ などが公表している毒性試験結果について簡単にまとめたものを表1—7に記した。これらの表はいままで報告されている毒性試験結果の主要なもののピックアップしたものであり、網羅的なものではないことをご承知おきいただきたい。このような毒性試験がマイコトキシンで行われていることを知っていただければと幸いである。

これらの評価からJECFAにおいては、オクラトキシンAのPMTDIは14 ng/kg bw/dayとして

表 1. アフラトキシン

毒性評価	
(1) 排出及び代謝	
排出	経口摂取量の 0.9 % が乳中に 20 % が尿中に排泄.
代謝	(1) AFB ₁ は体内で代謝され AFM ₁ , AFP ₁ , AFQ ₁ , AFL に変換され, さらに AFL-M ₁ , AFL-H ₁ に変換される. (2) 肝臓でチトクロム P450 により AFB ₁ -8,9-epoxide を生成.
(2) 急性毒性	
1) LD ₅₀	0.3 mg/kg bw (AFB ₁ : 経口, ウサギ)
2) 標的器官/影響	肝臓
(3) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	25-200 ng (AFB ₁ : Ames 試験, サルモネラ)
ii) 標的器官/影響	N/A
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	1 ng/kg bw/day (B 型肝炎ウイルス感染者: 1 年間に 10 万人に 0.3 人)
ii) 標的器官/影響	肝臓/ガン発生
iii) IARC グループ	実験動物: Sufficient evidence (十分な証拠): アフラトキシンの混合物, AFB ₁ , AFG ₁ Limited evidence (限定的な証拠): AFB ₂ Inadequate evidence (不十分な証拠): AFG ₂ ヒト: group 1 (人に対して発がん性を示す): アフラトキシンの混合物
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	N/A
ii) 標的器官/影響	N/A
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	0.8 ng/kg bw/day (妊娠中, マウス)
ii) 標的器官/影響	肝臓/脂肪の沈着
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	300 µg/kg bw/day (4 週間, ラット)
ii) 標的器官/影響	細胞性免疫の低下

N/A: not available

表 2. オクラトキシン A

毒性評価	
(1) 吸収、分布、排出及び代謝	
経口摂取	経口摂取後、消化管から吸収
分布	経口摂取後 24 時間で脂肪・胃・小腸・肝臓・腎臓・脾臓・心臓・肺・睾丸・筋肉・脳に分布
排出	糞及び尿から排出
代謝	肝臓で水酸化によって (4R)-4-ヒドロキシオクラトキシン A に代謝され、さらにオクラトキシン α に分解される。摂取量のうち、6 % がオクラトキシン A として、1-1.5 % が (4R)-4-ヒドロキシオクラトキシン A として、25-27 % がオクラトキシン α として尿から排泄。
(2) 急性毒性	
LD ₅₀	感受性はイヌ・ブタが高く、マウス・ラットは低い 0.2 mg/kg bw (経口：イヌ) 1 mg/kg bw (経口：ブタ) 46-58 mg/kg bw (経口：マウス)
標的器官／影響	出血／繊維素血栓 (腎臓、脳、脾臓、心臓) 壊死 (肝臓、腎臓)
(3) 短期毒性研究	
短期毒性に関する最も低い濃度	NOEL = 0.008 mg/kg bw/day (経口、8-12 週齢、ブタ)
標的器官／影響	腎臓／酵素変化
(4) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	(1) 0.4 μ g/ml (肝臓初代培養細胞、マウス) (2) 290 μ g/kg bw/2 days (Gavage, 6-12 週間、ラット)
ii) 標的器官／影響	(1) 不定期 DNA 合成 (2) 腎臓、肝臓／DNA 損傷
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い NOAEL	NOEL = 21 μ g/kg bw/週 5 回 (2 年、ラット)
ii) 標的器官／影響	腎臓／腺腫・癌腫
iii) IARC グループ	実験動物：十分な証拠 (sufficient evidence) ヒト：グループ 2B (発ガン性を示す可能性がある)
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	1 mg/kg bw/day (妊娠 6 ~ 15 日、ラット)
ii) 標的器官／影響	胎児の成長抑制
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	1.2 mg/kg bw/day (妊娠 8 ~ 11 日、ラット)
ii) 標的器官／影響	胎児出血
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い NOAEL	(1) 0.29 mg/kg bw (経口、1 回／48 時間、6 週間、神経毒性) (2) LOEL = 40 μ g/kg bw/day (免疫毒性、マウス)
ii) 標的器官／影響	(1) 海馬 (脳)／組織損傷 (2) 胸腺／細胞数の低下

表 3. デオキシニバレノール

毒性評価	
(1) 排出及び代謝	
排出	尿または糞より排泄
代謝	体内で脱エポキシ体に代謝される
毒性学上重要な化合物	3-Acetyldeoxynivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol
(2) 急性毒性	
LD ₅₀	27 mg/kg bw (皮下, 10 日齢, アヒル) 46 mg/kg bw (経口, マウス)
標的器官/影響	皮膚/炎症, 拒食・嘔吐
(3) 短期毒性研究	
短期毒性に関する最も低い濃度	NOEL = 0.04 mg/kg bw/day (経口, ブタ)
標的器官/影響	摂食障害, 成長抑制
(4) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	0.06 mg/kg bw/day (経口, 8 週間, マウス)
ii) 標的器官/影響	染色体異常
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	観察されない
ii) 標的器官/影響	N/A
iii) IARC グループ	ヒト: group 3 (発ガン性について分類できない)
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	NOAEL = 0.375 mg/kg bw/day (経口, マウス)
ii) 標的器官/影響	胎児数の減少, 胎児の成長抑制
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	NOAEL = 0.5 mg/kg bw/day (経口, マウス)
ii) 標的器官/影響	小脳形成不全, 内臓異常, 骨格異常
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	(1) NOEL = 0.1 mg/kg bw/day (マウス) (2) NOAEL = 0.25 mg/kg bw/day (免疫毒性, マウス)
ii) 標的器官/影響	(1) 体重低下 (2) 易感染の上昇

表 4. パツリン

毒性評価	
(1) 分布, 排出及び代謝	
分布	投与 7 日後でも 2-3 % が軟組織 (脾臓, 腎臓, 肺, 肝臓) 又は血液中に留まる.
排出	24 時間以内に大部分が糞または尿中に排泄.
(2) 急性毒性	
LD ₅₀	29-48 mg/kg bw (経口, 雄マウス) 4-5.7 mg/kg bw (腹腔, マウス)
標的器官/影響	振戦
(3) 短期毒性研究	
短期毒性に関する最も低い濃度	0.1 mg/kg bw/day (腹腔, ラット)
標的器官/影響	肝臓・腎臓・小腸/ DNA, RNA 量の減少
(4) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	20 mg/kg bw/day (経口, ハムスター)
ii) 標的器官/影響	骨髄細胞/ 染色体異常
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	NOEL = 0.1 mg/kg bw/ 週 3 回
ii) 標的器官/影響	N/A
iii) IARC グループ	実験動物: inadequate evidence (不十分な証拠)
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	観察されない
ii) 標的器官/影響	N/A
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	1.5 mg/kg bw/day (経口, ラット)
ii) 標的器官/影響	胎児の体重低下・胚吸収
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	(1) 2 mg/kg bw (免疫毒性) (2) 1.6 mg/kg bw/day (腹腔, ラット) (神経毒性)
ii) 標的器官/影響	(1) 百日咳抗原に対する反応性の低下 (2) アセチルコリンエステラーゼと Na/K ATPase の阻害による てんかん及び運動障害

表 5. T-2 トキシン

毒性評価	
(1) 排出及び代謝	
排出	T-2 トキシン及びその代謝産物及びグルクロン酸抱合体は糞や尿中に排泄。
代謝	体内で脱アセチル化され、HT-2 トキシン、T-2 テトラオールに代謝。
(2) 急性毒性	
LD ₅₀	0.06 mg/kg bw (経口、ネコ)
標的器官／影響	体重減少、摂食障害、皮膚炎、下痢、胃・小腸・骨髄・脾臓・精巣・卵巣での出血および壊死
(3) 短期毒性研究	
短期毒性に関する最も低い濃度	LOAEL = 0.06 mg/kg bw/day (3 週間, 7 週齢ブタ)
標的器官／影響	白血球数・抗体量の減少、胸腺・脾臓の縮小
(4) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	(1) 0.1 µg/ml (ハムスター V79 細胞) (a) (2) 0.015 mg/kg bw/day (経口、マウス, 12 週間)
ii) 標的器官／影響	(1) 遺伝子変異 (2) 骨髄細胞／断片化・倍数化
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	慢性毒性試験
ii) 標的器官／影響	肺・肝臓／アデノーマの増加
iii) IARC グループ	実験動物：限定的な証拠 (limited evidence)
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	NOAEL = 0.45 mg/kg bw/day (2nd generation)
ii) 標的器官／影響	胎児の成長抑制
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	観察されない
ii) 標的器官／影響	N/A
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	LOAEL = 0.23 mg/kg bw/day 0.75 mg/kg bw/day (DNA/RNA 合成阻害) 0.75 mg/kg bw/day (蛋白質合成阻害, 腹腔, マウス) 10 mg/kg bw/day (アポトーシス, マウス) 29 µg/kg bw/day (白血球・赤血球数, ブタ)
ii) 標的器官／影響	肺腺腫, 肝腺腫, 前胃上皮過形成 骨髄, 脾臓, 胸腺 (蛋白質合成阻害)

表 6. フモニシン

毒性評価	
(1) 吸収、排出及び代謝	
経口摂取	経口投与後の吸収はほとんどない。
排出	フモニシンは短時間で排泄される。
(2) 急性毒性	
① LD ₅₀	致死性の急性毒性を有さない
② 標的器官／影響	N/A
(3) 短期毒性研究	
① 短期毒性に関する最も低い濃度	NOAEL = 1.8 mg/kg bw/day (FB1, マウス) NOAEL = 0.2 mg/kg bw/day (FB1, ラット) NOAEL = 0.2 mg/kg bw/day (FB1, ウマ) NOAEL < 4.5 mg/kg bw/day (FB1, ブタ)
② 標的器官／影響	肝臓、腎臓、脳 (白質脳症を発症 (12)、ウマ)、 肺 (肺水腫を発症 (13)、ブタ)
(4) 長期毒性研究	
① 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	証拠不十分
ii) 標的器官／影響	N/A
② 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	LOEL = 0.67 mg/kg bw/day (腎臓, 雄ラット) LOEL = 0.7 mg/kg bw/day (肝臓, 雌ラット)
ii) 標的器官／影響	雄 F344/N ラットに尿管腺癌が有為に増加 雌 B6C3F1 ラットに肝臓癌が有為に増加
iii) IARC グループ	実験動物：十分な証拠 (sufficient evidence) ヒト：group2B (人に対して発がん性を示す可能性がある)
③ 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	観察されない
ii) 標的器官／影響	N/A
④ 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	10 mg/kg body weight in LMBc mouse (22)
ii) 標的器官／影響	NTD (神経管閉鎖)
⑤ その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	N/A
ii) 標的器官／影響	N/A

表 7. ゼアラレノン

毒性評価	
(1) 吸収、排出及び代謝	
経口摂取	経口摂取後、80-85 %が吸収される。
排出	摂取後 72 時間以内に胆汁内に移行、22 %を糞中に排泄。
代謝	α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol,
(2) 急性毒性	
LD ₅₀	2-20 g/kg bw (経口, マウス)
標的器官/影響	腹炎
(3) 短期毒性研究	
短期毒性に関する最も低い NOAEL	NOEL = 40 μ g/kg bw/day (経口, ブタ) NOEL = 100 μ g/kg bw/day (経口, ラット)
標的器官/影響	生殖器官
(4) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い NOAEL	2 mg/kg bw/day (腹腔, マウス) DNA 付加体の形成
ii) 標的器官/影響	肝臓, 腎臓
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	N/A
ii) 標的器官/影響	N/A
iii) IARC グループ	実験動物: 限定的な証拠 (limited evidence) ヒト: group 3 (発ガン性について分類できない)
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	40 μ g/kg bw/day (経口, ブタ)
ii) 標的器官/影響	子宮重量増加, エストロゲン様効果
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	観察されない
ii) 標的器官/影響	N/A
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	1.5 mg/kg bw/day (経口, マウス) (免疫毒性)
ii) 標的器官/影響	リステリア感染時の増加菌数

いる。因に Health Canada¹³⁾では4 ng/kg bw/day, EUでは5 ng/kg bw/dayとしている。デオキシニバレノールのPMTDIは1 µg/kg bw/dayとしており、他の国もほぼ同値である。JECFAではパツリンは、0.1mg/kg bw/dayの用量を週3回投与した長期毒性（生殖毒性・発がん性）の結果からNOEL=43 µg/kg bw/dayと算出し、その値に安全率100を乗じて、PMTDIを0.4 µg/kg bw/dayとした。T-2トキシンは、ブタでのLOEL=29 µg/kg bw/dayをもとにして、安全率500を乗じ、PMTDIを60 ng/kg bw/dayと設定した。フモニシンは、ラット雄の短期毒性試験における腎毒性に関するNOEL=0.2 mg/kg bw/dayおよびラット雄の長期毒性試験における腎腫瘍に関するNOEL=0.67 mg/kg bw/dayから、安全率を100として、PMTDIを2 µg/kg bw/dayとした。ゼアラレノンのPMTDIはJECFAでは0.5 µg/kg bw/dayと設定しているが、EU¹⁴⁾では0.2 µg/kg bw/dayとしている。

今後の課題

アフラトキシンのように遺伝子毒性を呈する発ガン物質の場合にはしきい値がないものと考えられていることから、摂取量を出来るだけ低く抑えるべきであると認識されておりPTDIは設定されていない。しかし近年、食糧確保その他、社会的経済的な問題を考慮に入れ、数学的モデルに基づいて「ガンリスクが無視できる摂取量 (negligible cancer risk intake)」を推定し、基準値設定に用いる試みも始まっている¹⁵⁾。

参考文献

- 1) JECFA: "Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, Series 35", pp.363-376 (1996), World Health Organization, Geneva
- 2) JECFA: "Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, Series 35", pp.377-402 (1996), World Health Organization, Geneva
- 3) JECFA: "Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, Series 40", pp.359-468 (1998), World Health Organization, Geneva
- 4) JECFA: "Safety Evaluation of certain food additives and contaminants, Series 44", pp.393-482 (2000), World Health Organization, Geneva
- 5) JECFA: "Safety Evaluation of certain food additives and contaminants, Series 47", pp.419-556 (2001) World Health Organization, Geneva
- 6) JECFA: "Safety Evaluation of certain food additives and contaminants, Series 47", pp.103-280 (2001) World Health Organization, Geneva
- 7) JECFA: "Safety Evaluation of certain food additives and contaminants, Series 47", pp.281-416 (2001) World Health Organization, Geneva
- 8) IARC: "Mycotoxins, Endemic nephropathy and urine publication No.115" (1991)
- 9) IARC: "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol 56" (1993)
- 10) IPCS: "Environmental health criteria 105", pp.27-70 (1990), World Health Organization, Geneva
- 11) IPCS: "Environmental health criteria 219", pp.1-150 (1990), World Health Organization, Geneva
- 12) EU: (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.pdf),
- 13) Kuiper-Goodman T: Food Addit. Contam., 13 (suppl), 53-57 (1996)
- 14) EU: Opinion of the scientific committee on food on zearalenon

(http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf), 2000

- 15) Health Canada: "Human health risk assessment for priority substances, Canadian environment protection act, Minister of supply and services Canada, Canadian communication group, Ottawa, Ontario, Cat. No En-40-215/41E.36"

Toxicological study in experimental animal for hazard identification of mycotoxins

Yoshiko SUGITA-KONISHI and Atsutaka KUBOSAKI: National Institute of Health Sciences (Setagaya, Tokyo 158-8501 Japan)

As mycotoxins can never be completely removed from commodities, many countries have regulated their levels in food according to their known adverse health effect. For defining the regulation level, an assessment of the health risk is required. To understand the toxic properties of mycotoxins, it is necessary to perform short-term, sub-chronic, and chronic studies at various doses using experimental animals. Also needed are carcinogenic studies in vivo and in vitro using bacteria. From each adequately performed animal study, a threshold dose, such as the NOAEL or NOEL, is defined. The value is essential for the estimation of a provisional tolerable daily intake (PMTDI). I present toxicological data and information of mycotoxins that have been evaluated by JECFA.

Key words : mycotoxins, PMTDI, NOEL

The mechanism of the carcinogenic effect of aflatoxins and the occurrence of aflatoxin B₁ in nuts in Japan

Yoshiko SUGITA-KONISHI

Department of Microbiology, National Institute of Health Sciences
(1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

Key words : aflatoxins, carcinogenesis, mechanism, occurrence, peanuts, almond, pistachio

(Received: May 20, 2005)

Introduction

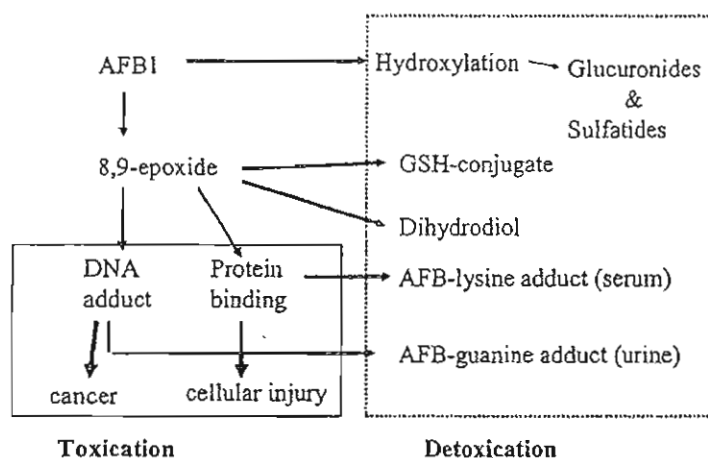
Aflatoxins (AF) are recognized as the strongest causative agent of liver cancer. AF are a group of closely related compounds with small differences in chemical composition. Aflatoxin B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) and G₂ (AFG₂) are frequently found in food. AFB₁ is the most potent and well studied among them. It is generally accepted that dietary exposure to AFB₁ is associated with an increased incidence of hepatocarcinogenesis. In this paper, the mechanism of the carcinogenic effect of AFB₁ is examined based on an evaluation by the International Agency for Research of Cancer (IARC) in 2002¹⁾. The occurrence of AFB₁ in nuts in Japan is also investigated.

The mechanism of carcinogenesis

Aflatoxins (AF) are metabolized in the liver upon ingestion and the metabolites possess carcinogenicity. There has been numerous studies on AFB₁. AFB₁ is processed through a number of competing pathways. These pathways have been well reviewed and are summarized in Fig. 1. In the primary stage, AFB₁ is converted into 8,9 epoxide or hydroxylated metabolites by cytochrome P 450 enzymes (CYP). Based on experiments in animals, CYP3A4 and CYP1A2 have been identified as major enzymes in the metabolism of AF. CYP3A4 mainly generates exo-8, 9 epoxide and CYP1A2 also generates exo-8, 9 epoxide but mainly endo-8, 9 epoxide and Aflatoxin M₁.

Most of the exo-8,9 epoxide binds to N7-guanine in DNA or protein and forms DNA-adducts or protein-adducts, leading to genetic changes necessary for malignant transformation and cellular toxicity. However, the remaining exo-8, 9 epoxide and endo-8, 9 epoxide are detoxified via a number of pathways, resulting in glutathione S-transferase conjugates and 8,9-dihydrodiol. Also, the dialdehydes from AFB₁ and AFG₁ form Schiff bases with primary amine groups, such as lysine.

DNA adducts are related to a high frequency of mutations affecting 249^{ser} of the p53 tumor suppressor gene (codon 249 G: C to T: A transversion), resulting in an inactivation of p53 function. As a dose-dependent relationship between 249^{ser} mutant in the p53 gene and the intake of AFB₁ has been observed, DNA adducts are used as a biological marker to estimate the risk of liver cancer

Fig. 1 Metabolites of AFB₁

caused by AF.

There is synergism between Hepatitis B Virus (HBV) infection and exposure to AF in hepatocarcinogenesis. As part of the background of viral infection, the AFB₁-DNA adduct could allow the fixation of G: C to T: A at 249^{ser} in the p53 gene, leading to an acceleration of the neoplastic process. In areas with a high prevalence of AFB₁ and HBV infection, this synergistic interaction has been observed significantly. This synergy is recognized as an important factor for cancer.

The differences in susceptibility to AF depend on various pathways, being the result of activation of the epoxide and the reaction of the epoxide with proteins and DNA. The pharmacokinetics of AF in humans are still not clear.

Several investigators have studied the carcinogenic potential of AF in vivo using laboratory animals and most of these studies have focused on AFB₁ and hepatocarcinogenesis. Based on such toxicological studies and on epidemiological studies in humans, JECFA estimated the incidence (cancers/year per 100,000 people) of liver cancer resulting from exposure to 1 ng/kg body weight per day of AFB₁. According to this, no-HBV carrier estimates for AFB₁ alone would have been 0.01 per 100,000 per year on average and the HBV-carrier estimates would have been 0.3 per 100,000 per year. Assuming a population with 1 % carriers of HBV, the estimated population potency for this population is $0.01 \times 99 \% + 0.3 \times 1 \% = 0.013$ cancers/year per 100,000 population per ng AFB₁. If the proportion of HBV carriers is 25 %, this yields an estimated population potency of $0.01 \times 75 \% + 0.3 \times 25 \% = 0.083$ cancers/year per 100,000 population per ng AFB₁. Finally, the estimated population risk for liver cancer depends on the intake of AFB₁.

Therefore, in order to reduce the potential risk for liver cancer, it is important to prevent exposure to AF. To minimize exposure, a variety of approaches exist, such as control through good agricultural practice (GAP), control through the HACCP program during processing, the setting of maximum limits of AF contamination in commodities and enforcement in international trade.

Contamination of nuts in Japan

The acceptable level of AFB₁ in commodities is 10 µg/kg in Japan. Table 1 shows the contravention

for AFB₁ contamination in imported commodities in the monitoring systems of quarantine in Japan. Contravention occurred in 32 of 5777 cases in 2003 and 43 of 7978 cases in 2004. The rate of contravention for nuts, spices and pigeon tear was more than 50 %, 22 % and 16 %, respectively, in the last 2 years. These results demonstrate that nuts are the main source of contamination in Japan. Focusing on nuts, 6.9 % (355 of 5117) of samples were contaminated with AFB₁ at 0.2~760 µg/kg and 2.8 % (145 of 5117) of samples has more than 10 µg/kg of AFB₁ in peanuts imported in 1999 ~ 2000²⁾. Itoh et al³⁾ reported that among raw shelled peanuts imported into Japan from 1972 to 1991, the concentration of AFB₁ exceeding 10 µg/kg was detected in 0.4 % of samples (24 lots of 5,595). Improvements in the method of sample preparation, which were introduced from 1999, would be one reason why the rate of detection of AFB₁ increased in 1999 ~ 2000 compared with 1972-1991.

The level of contamination in pistachio nuts imported from 2000 to 2003 is shown in Table 2. In 2000 ~ 2001, the percentage of positive cases was more than 40 %, but in 2002-2003, it was less than 8 %. Although in 2000 the rate of contravention was 2.9 %, this fell to 0.6 % after 2002. The maximum level of AFB₁ in 2000 was 643.5 µg/kg but in the last 2 years, the maximum level was 95.3 µg/kg. In the period from 1997 to 1998, the rate of contravention for AFB₁ in pistachio nuts was more than 30 % on inspection at ports⁴⁾, though 3 % of nuts purchased from local markets were found to contain more than 10 µg/kg of AFB₁⁵⁾. The ministry of Health, Labour and Welfare in Japan ordered the testing of all lots of pistachio nuts and requested that exporting countries provide good quality nut with less than 10 µg/kg of AFB₁. Strengthened monitoring for pistachio nuts and the request resulted in a decrease in the rate of contravention after 2002.

The level of contamination in almond nuts imported from 2000 to 2003 is listed in Table 3. The proportion of positive cases was in the range of 12~16 % and that exceeding 10 µg/kg was in the range of 0.05-0.17 %. Though no AFB₁ was detected in 151 samples of almond nuts in 1998, there are some contaminated cases with relatively low levels of AFB₁ in the late years.

With regard to AFB₁ in peanuts, almond nuts and pistachio nuts imported into Japan, relatively

Table 1. Contravention cases for AFB₁ in Japan from 2003 to 2004

year		2003	2004
number of monitoring		5777	7978
number of contravention		32	43
proportion of contravention	nuts	50 %	62 %
	spices	24 %	22 %
	pigeon tear	24 %	16 %

Table 2. Occurrence of AF contamination of almond nuts imported into Japan from 2000 to 2003

year	number of samples	number of positive samples	detection ratio (%)	0.2-10 µg/kg	> 10 µg/kg	contravention ratio (%)
2000	1291	13	1.01	12	1	0.08
2001	1943	16	0.82	16	0	0.00
2002	1694	15	0.89	12	3	0.18
2003	1778	12	0.67	12	1	0.06

Table 3. Occurrence of AF contamination of pistachio nuts imported into Japan from 2000 to 2003

year	number of samples	number of positive samples	detection ratio (%)	0.2-10 µg/kg	> 10 µg/kg	contravention ratio (%)
2000	877	68	7.75	42	26	2.96
2001	786	40	5.09	28	12	1.53
2002	310	5	1.61	3	2	0.65
2003	369	8	2.17	8	0	0.00

low incidences and low levels of AFB₁ have been found. Therefore, the current risk for liver cancer caused by AFB₁ seems to be very low. However, it is important to establish appropriate regulations and to enforce a monitoring program. At present, many countries regulate AF contamination in food as total AF. In Japan, the time for reconsideration of the regulation as total AF has come.

I would like to thank Mycotoxin Research Association, Nippon Kaiji Kentei Kyoukai and Japan Frozen Food Association for providing information on AF contamination in nuts imported into Japan.

References

- 1) IARC (2002) IARC monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to humans, Vol.82, Lyon, IARC Press, p171-300
- 2) Okano, K., Toyota, T., Chonan, M.: Mycotoxins, **53**, 25-28 (2003)
- 3) Itoh, Y., Maeda, K., Aibara, K.: Mycotoxins, **51**, 13-24 (2001)
- 4) Okano, K.: Mycotoxins, **51**, 83-86 (2001)
- 5) Tabata, S.: Mycotoxins, **51**, 87-93 (2001)

アフラトキシンの発ガンメカニズムとわが国におけるアフラトキシンの汚染事例

小西良子：国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部（158-8501 世田谷区上用賀 1-18-1）

アフラトキシンは、天然物中で最も発ガン性の強い化合物であるが、そのメカニズムについてはアフラトキシン B₁を用いて分子細胞学レベルまで研究されている。本報告では2002年に発刊したIARCのモノグラフに基づいてアフラトキシン B₁の発ガンメカニズムを中心に紹介した。また、わが国では現在アフラトキシン B₁に関しては規制を設けているが、この規制を超える違反例の状況を検疫所のモニタリングシステムの結果から紹介するとともに、最も違反例の多いナッツ類に焦点をあて、その輸入時検査での検出率からわが国のアフラトキシン汚染の現状について考察を行った。その結果、現在の状況ではナッツ類におけるアフラトキシンの検出頻度および濃度も低いことから、アフラトキシン汚染による肝臓がん発症リスクは極めて低水準であることが明らかとなったが、この水準を保つにはより一層のモニタリングの強化と適切な基準値設定が必要であると思われた。

キーワード：アフラトキシン，発ガン性，メカニズム，汚染事例，ピーナッツ，アーモンド，ピスタチオ

Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Fumonisin in Retail Foods in Japan

YOSHIKO SUGITA-KONISHI,^{1*} MASAHIRO NAKAJIMA,² SETSUKO TABATA,³ EIICHI ISHIKURO,⁴
TOSHITSUGU TANAKA,⁵ HIROKO NORIZUKI,⁶ YOSHINORI ITOH,¹ KOJI AOYAMA,⁴ KAZUHIRO FUJITA,⁷
SHIGEMI KAI,⁸ AND SUSUMU KUMAGAI⁹

¹National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; ²Nagoya City Public Health Research Institute, 1-11, Hagiya, Mizuho-ku, Nagoya 467-8615, Japan; ³Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan; ⁴Fertilizer and Feed Inspection Services, 1-2, Shintoshin, Chuo-ku, Saitama, 330-9733, Japan; ⁵Kobe Institute of Health, 4-6, Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046, Japan; ⁶Japan Grain Inspection Association, 2-17-3, Arai, Ichikawa-shi, Chiba 272-0144, Japan; ⁷Japan Food Research Laboratories, Nagoya Branch, 4-5-13, Otu, Naka-ku, Nagoya 460-0011, Japan; ⁸Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, 1-3-1, Shimomachiya, Chigasaki 253-0087, Japan; and ⁹University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8581, Japan

MS 05-504: Received 30 September 2005/Accepted 29 December 2005

ABSTRACT

We conducted a survey of aflatoxin B₁, B₂, G₁, and G₂, ochratoxin A, and fumonisin B₁, B₂, and B₃ contamination in various foods on the retail market in Japan in 2004 and 2005. The mycotoxins were analyzed by high-performance liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry, or high-performance thin-layer chromatography. Aflatoxins were detected in 10 of 21 peanut butter samples; the highest concentration of aflatoxin B₁ was 2.59 µg/kg. Aflatoxin contamination was not found in corn products, corn, peanuts, buckwheat flour, dried buckwheat noodles, rice, or sesame oil. Ochratoxin A was detected in oatmeal, wheat flour, rye, buckwheat flour, green coffee beans, roasted coffee beans, raisins, beer, and wine but not in rice or corn products. Ochratoxin A concentrations in contaminated samples were below 0.8 µg/kg. Fumonisin were detected in popcorn, frozen corn, corn flakes, and corn grits. The highest concentrations of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in these samples were 354.0, 94.0, and 64.0 µg/kg, respectively.

Mycotoxin contamination in agricultural products is a significant threat to human health and results in enormous economic losses from exclusion of contaminated products from food and feed chains. Among numerous mycotoxins, aflatoxins (AFs), ochratoxin A (OTA), and fumonisins are of high priority for control because of their frequent and worldwide distribution in agricultural products.

AFs are potent hepatotoxic and hepatocarcinogenic compounds produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. In Asia and Africa, human hepatic cancers and acute fatal diseases, including hepatic lesions, have been associated with consumption of foods heavily contaminated with these toxins (4, 12). Commodities frequently contaminated include peanuts, tree nuts, spices, corn, rice, cottonseed, dry fruits, and copra (6). OTA is produced by *Penicillium verrucosum* and various species of *Aspergillus* and is regarded as the causal agent of endemic nephropathy and urinary tract tumor in the Balkans (7). A variety of commodities are contaminated with OTA; relatively high levels of contamination have been found in corn, rye, and coffee (7). Fumonisin are produced by *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, and other *Fusarium* species. Fumonisin contamination in corn has been observed in many areas of the world (8), and an association between human esophageal cancer and high concentrations of fumonisin in corn has been reported in China and Africa (3, 19, 24).

Although contamination of food with these mycotoxins has been studied extensively in Europe and North America, relatively little information has come from Asia. In Japan, a survey of AF contamination has been conducted for a variety of foods (1, 10, 20, 21), but data on OTA and fumonisin contamination in local and imported foods are very limited (13, 18). In 2004 and 2005, we conducted a survey of AF, OTA, and fumonisin contamination in various foods collected from retail markets in Japan to evaluate the risk to the health of Japanese consumers.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. Rice and wheat samples were harvested in the 2004 fiscal year except for 2 samples of rice (2003 fiscal year) were supplied from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. All other samples were purchased in a random manner from local supermarkets and small retail shops in all parts of Japan from the summer of 2004 to winter of 2005. Samples were stored at 4°C until analysis.

Reagents. AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, and OTA standards were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mo.). Fumonisin B₁ (FB₁) and FB₂ were purchased from CALBIOCHEM (San Diego, Calif.), and FB₃ was from PROMEC Medical Research Council (Tygerberg, South Africa). Methanol and acetonitrile were high-performance liquid chromatography (HPLC) grade. Water was purified in a Milli-Q system (Millipore Co., Bedford, Mass.). All other reagents were of the highest analytical grade available.

* Author for correspondence. Tel: 81-3-3700-1141; Fax: 81-3-3700-9527; E-mail: ykonishi@nihs.go.jp.

Standard solutions. Original standard solutions of AFB₁, AFB₂, AFG₁, and AFG₂ were prepared in toluene-acetonitrile (9:1), and a standard solution of OTA was prepared in toluene-acetic acid (99:1). The concentration was determined according to the AOAC International method (23). An AF mixed stock solution (4 µg/ml for each toxin) and a OTA stock solution (1 µg/ml) was prepared by dilution with acetonitrile and toluene-acetic acid (99:1), respectively. A fumonisin mixed stock solution (20 µg/ml for each toxin) was prepared by dilution with acetonitrile-water (1:1).

Extraction and analysis of AFs. AFs in collected samples were analyzed at five independent laboratories. Twenty-five grams of finely ground sample (except for peanut butter and sesame seed oil) was extracted with 100 ml of methanol-water (8:2) and 5 g of sodium chloride by shaking for 30 min. The extract was filtered through no. 4 filter paper (Whatman, Clifton, N.J.). Ten milliliters of filtered solution was diluted to 50 ml with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and filtered through a Whatman 934AH glass microfiber filter. Twenty milliliters of filtered solution was loaded onto an AffaTest P column (Vicom, Watertown, Mass.) at a flow rate of 1 drop per s. After washing with PBS and then purified water, the column was dried by pushing air into the column with a syringe. AFs were eluted with acetonitrile into a silanized amber vial (4.0 ml, Supelco, Bellefonte, Pa.). The eluate was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen gas at 40°C. For trifluoroacetic acid (TFA) derivatization, the residue was treated with 0.1 ml of TFA for 15 min, and 0.9 ml of injection solvent (acetonitrile-water, 1:9) was added to the mixture. For photochemical reactor derivatization, the residue was dissolved in 1.0 ml of injection solvent and injected into the HPLC system, which consisted of an LC-10AD pump, a SIL-10A autoinjector (100-µl loop), a CTO-10AC column oven, an RF-10AXL fluorescence detector (excitation, 360 nm; emission, 450 nm), a DGU-3A degasser, a CBM-10A communication bus module, and a class LC-10 chromatography data system (Simadzu, Kyoto, Japan). The analytical column (4.6 mm by 250 mm by 5 µm; Inertsil ODS-3V, GL Sciences, Inc., Tokyo, Japan) was kept at 45°C with a mobile phase of acetonitrile-methanol-water (1:3:6) at a flow rate of 1.0 ml/min for TFA derivatization or with acetonitrile-methanol-water (2:3:5) at a flow rate of 0.7 ml/min for photochemical reactor derivatization. The photochemical reactor for enhanced detection consisted of a short-wave UV lamp and a knitted Teflon tube (0.25 mm by 20 m, Aura Industry Inc., New York) and was set between the analytical column and the detector. The calibration curve was prepared by plotting the peak height against the concentration of AF standards. Quantification of each AF in sample solution was performed by measuring the peak height at each retention time and comparing these curves with a relevant calibration curve.

For peanut butter and sesame seed oil samples, the method of Kamimura et al. (9) was used for analysis. A 10- or 20-g sample was extracted with 50 or 100 ml of chloroform. The extract was loaded on florisil columns, from which AFs were eluted with acetone-water (99:1). The eluate was evaporated to dryness under reduced pressure, and the residue was dissolved in 200 µl of chloroform. A 20-µl portion was evaporated to dryness and derivatized with TFA for quantitative analysis by HPLC as described above.

Extraction and analysis of OTA. OTA in collected samples was analyzed at five independent laboratories with a standardized analytical method. Each sample (except for raisins, beer, and wine) was thoroughly mixed and ground to a fine powder. Raisins were slurred with water (five parts raisins to four parts water, wt/wt) to form a homogenous paste. Beer was degassed in an ultrasonic bath for 30 min. Extraction solvents used in this survey were methanol-

water (8:2) and 5 g of sodium chloride for corn, corn products, rice, oatmeal, and buckwheat flour, acetonitrile-water (6:4) for wheat and rye flour, and methanol-1% sodium bicarbonate (7:3) for coffee and raisins. Twenty-five grams of sample (45 g of raisins paste) was extracted in 100 ml (80 ml for raisins paste) of extraction solvent by shaking for 30 min. The extract was filtered through Whatman no. 4 paper. Ten milliliters of filtered solution was diluted to 50 ml (100 ml for coffee) with PBS or with PBS plus 0.01% Tween 20 (PBS-Tween) for coffee and raisin samples and filtered through a Whatman 934AH glass microfiber filter. Twenty milliliters of filtrate (40 ml for coffee) was loaded onto an OchraTest column (Vicom) at a flow rate of 1 drop per s. The column was washed with PBS (PBS-Tween for coffee and raisin samples) and then with purified water. For beer and wine, 10 g of sample solution was diluted with 10 ml of 1% polyethylene glycol 8000 plus 5% sodium bicarbonate and filtered through a Whatman 934AH glass microfiber filter. Ten milliliters of filtrate was loaded onto the OchraTest column at a flow rate of 1 drop per s, and the column was washed with 2.5% sodium chloride plus 0.5% sodium bicarbonate followed by purified water. OTA was eluted into the Silanized amber vial with three washes (1 ml each time) of methanol-acetic acid (99:1). The eluate was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen gas at 40°C. The residue was dissolved in 1.0 ml of injection solvent (acetonitrile-water-acetic acid, 30:70:1) and injected into the HPLC system. The analytical column (4.6 by 250 mm by 5 µm; Inertsil ODS-3V, GL Sciences) was kept at 45°C with a mobile phase of acetonitrile-water-acetic acid (55:43:2) at a flow rate of 1.0 ml/min. Standard OTA solutions for HPLC or 100 µl of test sample solution were injected into the HPLC system. The calibration curve was prepared by plotting the peak height against the concentration of OTA standards. Quantification of OTA was performed with the same manner used for the AF analysis.

Extraction and analysis of fumonisins. A 20-g sample was weighed and extracted with 100 ml methanol-water (3:1) by shaking for 15 min. The extract was filtered with Whatman no. 4 filter paper and applied to Bond Elut LRC SAX cartridge (Varian, Palo Alto, Calif.). The cartridge was conditioned with methanol and then with methanol-water (3:1). The filtrate was applied to the cartridge at a flow rate of 1 or 2 drops per s. The cartridge was washed with methanol-water (3:1) and then methanol, and fumonisins were eluted with methanol-acetic acid (99:1). The eluate was evaporated at ca. 40°C and dried under a nitrogen stream. The residue was dissolved in 1 ml of acetonitrile-water (1:1), mixed well, and filtered with a membrane filter, and 5 µl was loaded onto a ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (inside diameter, 150 by 2.1 mm; Agilent, Palo Alto, Calif.) at 40°C for liquid chromatography-mass spectrometry analysis. The mobile phase was a binary gradient of solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (acetonitrile) programmed as follows: at 0 min, 25% B; at 5 min, 50% B; at 8 min, 50% B; at 10 min, 25% B. The flow rate was set at 0.2 ml/min. Electrospray ionization was used for ionization in the mass spectrometric analysis. The capillary voltage and fragmenter voltage were set to 3 kV and 220 V, respectively. The nebulizer gas and drying gas were both nitrogen. The mass spectrometer was used in the selected ion monitoring mode, detecting the positive ions [M + H]⁺ of FB₁ (*m/z* 722), FB₂, and FB₃ (*m/z* 706).

Confirmation of identity. The identities of AFB₁ and AFG₁ in the sample were confirmed by the method based on the quenching of their fluorescence in reversed-phase HPLC. AFB₁ and AFG₁ were detected as AFB_{2a} and AFG_{2a}, respectively, by pre-column derivatization with TFA or in-line postcolumn derivati-

TABLE 1. Recovery of total aflatoxins from each spiked individual matrix

Commodity	Spiked sample		Recovery (%) ^a			
	Concn (μg/kg)	n	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Raw corn	0.1	3	79.8 ± 0.7	80.3 ± 1.4	74.5 ± 1.0	74.6 ± 1.1
	5.0	3	83.7 ± 1.1	82.1 ± 1.2	76.0 ± 0.9	75.6 ± 1.3
Canned corn	0.1	2	65.0	72.0	64.5	70.5
	5.0	2	66.9	68.7	69.5	70.2
Rice	0.1	2	82.0	83.9	84.4	89.9
	5.0	2	83.7	87.8	82.3	87.1
Peanuts with shells	0.1	6	65.0 ± 10.8	85.0 ± 12.3	66.0 ± 16.2	85.0 ± 20.0
	5.0	6	80.0 ± 5.9	105.0 ± 5.9	102.5 ± 2.9	99.3 ± 1.5
Peanuts without shells	0.2	3	98.3 ± 4.8	113.7 ± 3.5	88.3 ± 3.3	91.8 ± 8.3
	5.0	3	94.4 ± 0.4	99.1 ± 1.8	98.5 ± 1.1	97.7 ± 0.3
Peanut flour	0.1	3	89.0 ± 0.8	90.2 ± 1.0	80.1 ± 1.5	82.2 ± 1.1
	5.0	3	89.3 ± 2.9	90.1 ± 2.1	77.8 ± 10.2	79.0 ± 7.7
Buckwheat flour	0.1	3	78.1 ± 1.3	78.6 ± 1.0	73.7 ± 4.1	82.7 ± 1.1
	5.0	3	68.7 ± 0.8	75.6 ± 0.3	74.0 ± 1.6	80.3 ± 0.8
Buckwheat dried noodles	0.1	3	72.8 ± 3.4	84.2 ± 0.6	77.6 ± 1.4	86.3 ± 0.5
	5.0	3	72.7 ± 0.4	79.8 ± 1.6	72.9 ± 2.1	79.4 ± 1.6
Popcorn grain	0.1	3	85.0 ± 4.0	77.3 ± 3.0	85.1 ± 3.0	82.6 ± 2.0
	5.0	2	67.6	72.8	84.8	84.7
Cornflakes	0.1	3	95.8 ± 2.0	82.3 ± 6.1	87.5 ± 5.0	85.1 ± 4.1
	5.0	2	78.8	75.4	77.9	79.3
Corn grits	0.1	3	88.1 ± 2.8	86.3 ± 3.0	88.7 ± 2.0	90.9 ± 2.0
	5.0	2	76.5	76.5	98.8	97.7
Peanut butter	0.2	3	98.3 ± 11.4	79.0 ± 6.7 ^b	84.2 ± 13.8 ^c	101.2 ± 6.2
	5.0	3	93.8 ± 3.1	93.5 ± 2.5 ^d	92.1 ± 3.1 ^e	92.3 ± 2.8
Sesame oil	0.2	2	90.6	102.8	76.7	98.0
	5.0	2	103.7	107.2	75.5	84.0

^a For $n \geq 3$, values are expressed as mean $\pm$ residual standard deviation. For $n = 2$, values are expressed as mean only.

^b Spiked dose was 0.1 μg/kg.

^c Spiked dose was 0.3 μg/kg.

^d Spiked dose was 2.5 μg/kg.

^e Spiked dose was 7.5 μg/kg.

zation of the photochemical reactor used in this survey. The disappearance of the AFB₁ or AFG₁ peaks by non-TFA derivatization confirmed the original presence of AFB₁ or AFG₁ in the sample. The decrease of peak height for AFB₁ or AFG₁ with the photochemical reactor UV lamp off confirmed the original presence of AFB₁ or AFG₁. For peanut butter and sesame oil, the positive sample detected by HPLC analysis was spotted onto a silica gel plate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for high-performance thin-layer chromatography.

The presence of OTA was confirmed by OTA-methyl ester formation as follows. The remaining purified sample solution or standard solution was evaporated to dryness, and 500 μl of boron trifluoride methanol complex solution was added to the residue. The mixture was heated at 60°C for 10 min and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in injection solvent and injected into the HPLC system. The identity of OTA in the sample was confirmed by the presence of an OTA-methyl ester peak at delayed retention time and the disappearance of the OTA peak.

RESULTS AND DISCUSSION

The recoveries of each standard mycotoxin spiked to the individual matrix are shown in Tables 1 through 3. The recoveries of AFs from the matrix were 65.0 to 103.7% for AFB₁, 68.7 to 113.7% for AFB₂, 64.5 to 102.5% for AFG₁, and 70.2 to 101.2% for AFG₂ (Table 1). The OTA recovery

was 60.4 to 107.9% (Table 2). The recoveries of fumonisins were 67.7 to 136.0% for FB₁, 70.5 to 133.0% for FB₂, and 70.3 to 136.0% for FB₃. The limit of quantification was calculated by the signal-to-noise ratio as more than 10:1.

AF contamination was detected in 10 of 21 peanut butter samples (Table 4). Six and 2 of the 10 positive samples were imported and domestic products, respectively, but the origin of the other two products was unknown. AFB₁, AFB₂, AFG₁, and AFG₂ were detected in four samples, AFB₁ and AFB₂ were detected in three samples, and only AFB₁ was detected in the other three samples. AF was not detected in corn, cornflakes, corn flour, corn grit, popcorn grains, canned or frozen corn, peanuts with shell, peanuts without shell, buckwheat flour, dried buckwheat noodle, rice, or sesame oil (Table 4). These results indicate that peanut butter sold in Japan is frequently contaminated with AFs.

OTA was detected in oatmeal, wheat flour, rye, buckwheat flour, green coffee beans, roasted coffee beans, raisins, beer, and wine but not in rice, cornflakes, corn grits, popcorn grain, or canned or frozen corn (Table 5). Frequent contamination was noted in raisins, beer, rye, and wine. All

TABLE 2. Recovery of ochratoxin A from each spiked individual matrix

Commodity	Spiked sample		OTA recovery (%) ^a
	Concn (μg/kg)	n	
Canned corn	0.1	5	100.0 ± 0.1
	0.5	7	100.0 ± 0.4
Rice	0.1	2	88.2
	5.0	2	82.8
Rye	0.1	2	86.1
	5.0	2	87.3
Wheat flour	0.1	2	104.6
	5.0	2	87.8
Oatmeal	0.1	3	90.0 ± 11.1
	5.0	3	89.2 ± 2.6
Buckwheat flour	0.2	3	101.3 ± 3.1
	5.0	3	91.2 ± 1.2
Popcorn grain	0.1	6	99.6 ± 9.6
	5.0	6	100.0 ± 0.3
Cornflakes	0.1	6	83.3 ± 8.6
	5.0	6	99.9 ± 0.4
Corn grits	0.1	6	100.0 ± 0.1
	5.0	6	100.1 ± 0.3
Raisins	0.1	3	96.7 ± 15.8
	5.0	3	89.5 ± 8.7
Wine	0.05	3	94.7 ± 4.9
	5.0	3	107.9 ± 2.3
Beer	0.01	3	98.4 ± 2.8
	0.5	3	97.5 ± 0.5
Green coffee beans	0.1	3	102.7 ± 19.4
	5.0	3	80.6 ± 3.4
Roasted coffee beans	0.1	3	78.3 ± 11.5
	5.0	3	60.4 ± 5.0

^a For $n \geq 3$, values are expressed as mean $\pm$ residual standard deviation. For $n = 2$, values are expressed as mean only.

TABLE 3. Recovery of fumonisins B₁, B₂, and B₃ from each spiked individual matrix

Commodity	Spiked sample concn (μg/kg)	Recovery (%) ^a		
		FB ₁	FB ₂	FB ₃
Raw corn	10	136.0	133.0	136.0
	1,000	82.1	81.1	85.7
Canned corn	10	103.6	98.9	94.5
	1,000	88.0	85.6	86.6
Buckwheat dried noodle	10	124.5	123.6	120.3
	1,000	82.8	84.1	96.4
Popcorn grain	10	117.0	103.0	101.0
	1,000	67.7	70.5	70.3
Cornflakes	10	112.9	79.1	71.9
	1,000	92.6	75.7	78.6
Corn soups	10	84.6	116.0	101.3
	1,000	122.3	90.3	96.0
Corn grits	1,000	70.7	71.4	73.3
Flattened barley	10	81.5	89.5	90.4
	1,000	77.9	72.7	73.9

^a Values are expressed as mean.

contaminated rye and raisin samples were from imported products, whereas contaminated beer, buckwheat flour, and wine samples were from both imported and domestic products. Concentrations of OTA in wine of more than 1 μg/kg have frequently been observed (7, 11), but the concentration in this study was less than 0.8 μg/kg.

Reports of OTA contamination in buckwheat are very limited. In a survey conducted in Germany in 1995 through 1998, only 3 of 14 buckwheat samples were contaminated at more than 0.01 μg/kg, with a maximum of 12.1 μg/kg (7). In our study, buckwheat flour was very frequently contaminated with OTA, although its concentration was lower than that reported in the German study, indicating the importance of broadening the survey of OTA contamination of domestic and imported buckwheat in Japan over succes-

TABLE 4. Natural aflatoxins in retail foods, 2004 and 2005

Commodity	No. of samples analyzed	No. of contaminated samples	Concn (μg/kg) in contaminated samples				
			Mean (range, no. of samples)				
			AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	LOQ ^a
Raw corn	10	0	—	—	—	—	0.1
Frozen or canned corn	50	0	—	—	—	—	0.1
Rice	53	0	—	—	—	—	0.1
Peanuts with shells	30	0	—	—	—	—	0.1
Peanuts without shells	30	0	—	—	—	—	0.1
Peanut flour	10	0	—	—	—	—	0.1
Buckwheat flour	12	0	—	—	—	—	0.1
Buckwheat dried noodle	39	0	—	—	—	—	0.1
Popcorn grain	10	0	—	—	—	—	0.1
Cornflakes	20	0	—	—	—	—	0.1
Corn grits	10	0	—	—	—	—	0.1
Peanut butter	21	10	1.07 (0.17–2.59, 10)	0.27 (0.16–0.52, 7)	0.40 (0.17–0.81, 4)	0.21 (0.12–0.46, 4)	0.1
Sesame oil	10	0	—	—	—	—	0.1

^a LOQ, limit of quantification.

TABLE 5. Natural ochratoxin A in retail food, 2004, and 2005

Commodity	No. of samples analyzed	No. of contaminated samples	Concn ($\mu\text{g/kg}$) in contaminated samples	LOQ ($\mu\text{g/kg}$) ^a
Frozen or canned corn	30	0	—	0.1
Rice	50	0	—	0.1
Rye	10	7	1.05 (0.28–2.59)	0.1
Wheat flour	50	24	0.20 (0.10–0.48)	0.1
Oatmeal	20	2	0.15 (0.13, 0.18)	0.1
Buckwheat flour	10	6	0.51 (0.16–1.79)	0.1
Popcorn grain	5	0	—	0.1
Cornflakes	20	0	—	0.1
Corn grits	5	0	—	0.1
Raisins	11	7	1.54 (0.18–12.5)	0.1
Wine	10	6	0.34 (0.07–0.72)	0.05
Beer	20	12	0.02 (0.01–0.05)	0.01
Raw coffee	11	2	0.45 (0.14–0.76)	0.1
Roasted coffee	9	3	0.22 (0.11–0.33)	0.1

^a LOQ, limit of quantification.

sive years. Concentrations of OTA in other positive samples were similar to or lower than those reported by many European and American researchers (2, 6, 11, 14, 16, 22).

Fumonisin were detected in popcorn, frozen corn, cornflakes, and corn grits but not in the other products (Table 6). Popcorn and corn grits were the foods most frequently contaminated food by fumonisins. The highest concentration among the corn products was found in popcorn, with maximums of 354.0 $\mu\text{g/kg}$ for FB₁, 94.0 $\mu\text{g/kg}$ for FB₂, and 64.0 $\mu\text{g/kg}$ for FB₃. However, concentrations in these samples were relatively low compared with those reported in other countries (8). All contaminated popcorn, frozen corn, and corn grit samples were from imported products, but contaminated cornflake samples were from both imported and domestic products. In a recent study, no contamination was found in domestic beer (18).

The origin of the materials used in the processed domestic products was unknown, but raw materials such as rice and raw corn were confirmed to be domestic products. AFs have been detected in imported rice in Japan (10) but have not been detected in domestic rice until recently (20), and the presence of these toxins was confirmed in this

study. AFs were found in peanut butter, with maximums of 2.59, 0.52, 0.81, and 0.46 $\mu\text{g/kg}$ for AFB₁, AFB₂, AFG₁, and AFG₂, respectively. Although AF concentrations found in peanut butter retailed in 1988 through 1992 in Japan (20) were lower than those noted in this study, it was concluded that some peanut butter products distributed in Japan may continuously be contaminated with low concentrations of AFs. In a survey in the Republic of Cyprus, 21 of 74 peanut butter samples were positive for AF, with a maximum AFB₁ concentration of 73 $\mu\text{g/kg}$ (5). Siame et al. (17) reported that in Botswana the average AF concentration in peanut butter was 23 $\mu\text{g/kg}$. In Sudan, heavy contamination of peanut butter with AFs has been regarded as a risk factor for hepatic cell cancer (15). Although risks to human health from such low concentrations of AFs in peanut butter as noted in this study may be very low, measures to reduce further AF contamination are needed.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a research grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan. We thank the Ministry of Agriculture, Forest and Fishery, Japan, for their help in collecting food samples.

TABLE 6. Natural fumonisins in retail foods, 2004 and 2005

Commodity	No. of samples analyzed	No. of contaminated samples	Concn ($\mu\text{g/kg}$) in samples			
			Mean (range, no. of samples)			LOQ ^a
			FB ₁	FB ₂	FB ₃	
Raw corn	18	0	—	—	—	10
Canned or frozen corn	51	2	26.4 (16.8–36.0, 2)	14.8 (14.8, 1)	—	10
Buckwheat dried noodle	30	0	—	—	—	2.0
Popcorn grain	15	15	57.2 (5.0–354.0, 15)	16.9 (2.0–94.0, 14)	12.8 (2.0–64.0, 11)	2.0
Cornflake	30	9	27 (13–59, 9)	—	—	10
Corn soups	29	0	—	—	—	10
Corn grits	10	10	51.1 (17.8–73.8, 10)	21.1 (17.9–29.1, 10)	13.1 (8.9–18.0, 10)	2.0
Flattened barley	20	0	—	—	—	10

^a LOQ, limit of quantification.

REFERENCES

- Adachi, Y., M. Hara, N. H. Kumazawa, K. Hirano, I. Ueno, and K. Egawa. 1991. Detection of aflatoxin B1 in imported food products into Japan by enzyme-linked immunosorbent assay and high performance liquid chromatography. *J. Vet. Med. Sci.* 53:49-52.
- Biffi, R., M. Munari, L. Dioguardi, C. Ballabio, A. Cattaneo, C. L. Galli, and P. Restani. 2004. Ochratoxin A in conventional and organic cereal derivatives: a survey of the Italian market 2001-02. *Food Addit. Contam.* 21:586-591.
- Chu, F. S., and G. Y. Li. 1994. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:847-852.
- International Agency for Research on Cancer. 1993. Aflatoxins. *IARC Monogr.* 56:245-395.
- Ioannou-Kakouri, E., M. Aletrari, E. Christou, A. Hadjioannou-Ralli, A. Koliou, and D. Akkelidou. 1999. Surveillance and control of aflatoxin B1, B2, G1, G2, and M1 in foodstuffs in the Republic of Cyprus: 1992-1996. *J. AOAC Int.* 82:883-892.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 1998. Safety evaluation of certain food additives and contaminants in food: aflatoxin, p. 359-469. In *Proceedings of the 49th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. World Health Organization, Geneva.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2001. Safety evaluation of certain food additives and contaminants in food: ochratoxin A, p. 281-415. In *Proceedings of the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. World Health Organization, Geneva.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2001. Safety evaluation of certain food additives and contaminants in food: fumonisins, p. 103-279. In *Proceedings of the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. World Health Organization, Geneva.
- Kamimura, H., M. Nishijima, K. Yasuda, H. Ushiyama, S. Tabata, and S. Matsumoto. 1995. Simple, rapid cleanup method for analysis of aflatoxins and comparison with various methods. *J. AOAC Int.* 68:458-461.
- Lipigomgson, S., A. Norhayati, and T. Yoshizawa. 2003. Limited survey for aflatoxin contamination of polished rice imported into Japan. *Mycotoxins* 53:95-101.
- Lombaert, G. A., P. Pellaers, G. Neumann, D. Kitchen, V. Huzel, R. Trelka, S. Kotello, and P. M. Scott. 2004. Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market. *Food Addit. Contam.* 21:578-585.
- Mutere, B. N., and G. Ogana. 2005. Aflatoxin levels in maize and maize products during the 2004 food poisoning outbreak in Eastern Province of Kenya. *East Afr. Med. J.* 82:275-279.
- Nakajima, M., H. Tsubouchi, and M. Miyabe. 1999. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 82:897-902.
- Ng, W., M. Mankotia, P. Pantazopoulos, R. J. Neil, and P. M. Scott. 2004. Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canada. *Food Addit. Contam.* 21:971-981.
- Omer, R. E., L. Verhoef, P. Van't Veer, M. O. Idris, A. M. Y. Kadar, E. Kampman, A. Bunschoten, and F. J. Kok. 2001. Peanut butter intake GSTM1 genotype and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Sudan. *Cancer Causes Control* 12:23-32.
- Rosa, C. A. R., C. E. Magnoli, M. E. Fraga, A. M. Dalcero, and D. M. N. Santana. 2004. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Addit. Contam.* 21:358-364.
- Siame, B. A., S. F. Mpuchane, B. A. Gashe, J. Allotey, and G. Tefera. 1998. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B1, and zearalenone in foods and feeds in Botswana. *J. Food Prot.* 61:1670-1673.
- Suga, K., N. Mochizuki, and H. Yamashita. 2004. Analysis of fumonisin B1 and B2 in beer and raw materials of beer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 45:255-258.
- Sydenham, E. W., P. G. Thiel, W. H. O. Marasas, G. S. Shepherd, D. J. Van Schalkwyk, and K. R. Koch. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.* 38:1900-1903.
- Tabata, S., H. Kamimura, A. Ide, H. Hashimoto, M. Iida, Y. Tamura, and T. Nishima. 1993. Aflatoxin contamination in foods and foodstuff in Tokyo: 1986-1990. *J. AOAC Int.* 76:32-35.
- Taguchi, S., S. Fukushima, T. Sumimoto, S. Yoshida, and T. Nishimune. 1995. Aflatoxins in foods collected in Osaka, Japan, from 1988 to 1992. *J. AOAC Int.* 78:325-327.
- Tangni, E. K., S. Ponchaut, M. Maudoux, R. Rozenberg, and Y. Larondelle. 2002. Ochratoxin A in domestic and imported beer in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Addit. Contam.* 19:1169-1179.
- Truckness, N. W. 2000. Natural toxins, p. 6. In *AOAC official methods of analysis*, 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- Yoshizawa, T., A. Yamashita, and Y. Luo. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1626-1629.