
研究報告 リンゴ及びブドウジュース中のパツリン分析

Analysis of Patulin in apple and grape juice

大道公秀

Kimihide OHMACHI

リンゴ及びブドウジュース中のパツリン分析

Analysis of Patulin in apple and grape juice

大道公秀

東京医療保健大学 医療保健学部 医療栄養学科

Kimihide OHMACHI

Division of Medical Nutrition, Faculty of Healthcare, Tokyo Healthcare University

要 旨：リンゴ及びブドウに産生するリスクのあるマイコトキシンのパツリンについて、国内流通品におけるリスク把握のために、市販リンゴジュース及びブドウジュースを対象としてパツリン汚染実態について、分析を行った。市販リンゴジュース及びブドウジュースのそれぞれ20試料を固相抽出により前処理を行い、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析を行った。確認試験として誘導体試薬による誘導体化後、ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）法により定性確認も行った。分析の結果、パツリンの検出は認められず（＜0.01 ppm）、対象としたジュースについては、汚染率は低い可能性が示唆された。しかし他の市販ジュース内のパツリン産生リスクについても、分析法の改善も含め、さらなる検討が必要と考える。

キーワード：パツリン、リンゴジュース、ブドウジュース

Keywords：patulin, apple juice, grape juice

1. はじめに

マイコトキシン（カビ毒、真菌毒）は、カビの二次代謝産物として産生される毒の総称である。マイコトキシンは、熱に対して安定なものが多く、加熱処理（種々の調理加工処理を含む）後も残存する。パツリンは、マイコトキシンの一種であり、リンゴ腐敗菌 *Penicillium expansum* や *Aspergillus* 属等のカビにより産生される毒である。

パツリンの動物に対する毒性としては、大量投与すると胃、腸、肝臓、肺などに充血、出血、壊死などの病変が認められている^{1),2)}。国際がん研究機関(IARC)は、グループ3（人に対する発がん性については、分類できないもの）としており³⁾、発癌性については今のところ低いとされている²⁾。FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）は、毒性データから暫定最大1日耐容摂取量(PMTDI)を0.4 μg/g/kg体重/日と報告している⁴⁾。なお、現在までにパツリンのヒト中毒例や疫学的報告はない¹⁾が、パツリンが原因と疑われている牛の中毒例⁵⁾はある。生体内の毒性機序としては、パツリンが生体内タンパク質のSH基と結合する

ことでたんぱく質の変性を起こし毒性を発現する⁶⁾とされる。

さて、何らかの損傷を受け、生食用として流通できないリンゴは、果汁等の加工原料として利用されることがある⁷⁾。リンゴは損傷部にパツリン産生菌が侵入、増殖したときにパツリンを産生することが知られている。そのためリンゴジュースや果汁にパツリンが産生されている可能性がある。幼児・子供では体重に対してはリンゴジュース摂取の割合が大人よりも大きく、幼児・子供への健康被害が懸念される。そこで我が国では健康被害を未然に防ぐ観点により、2003年（平成15年）にリンゴジュース中のパツリンについて、CODEX基準値⁸⁾と同じく、0.050 ppmの基準値が設けられた^{9),10)}。

リンゴジュースにおける既存のパツリン検出報告例を表1にまとめた。農林水産省（2006年）が平成17年度国産原料用リンゴ果汁249試料について調べた報告がある。基準値を超えるものはなかったが定量限界0.010 ppmを超えるものが3試料あり、最高値は0.021 ppmである¹¹⁾。地方衛生研究所でも流通品での汚染実態調査がなされている。赤木ら（2003年）の報

表1 リンゴジュースに含まれるパツリン検出の報告例

報告者 (報告年)	分析対象	検出濃度	検出率
農林水産省 ¹¹⁾ (2006年)	平成17年度国産原料用リンゴ果汁 249試料	3試料が0.010 ppm以上 (最高 0.021 ppm)	1.2% (>0.010 ppm)
赤木ら ¹²⁾ (2003年)	福岡市内流通 市販リンゴジュース 16試料	10試料が0.001 ppm以上 0.003 ~ 0.011ppm	56% (>0.001 ppm)
青柳ら ¹³⁾ (2008年)	北海道内流通 100%リンゴジュース 12試料	4試料が0.001 ppm以上 0.003~0.024 ppm	33% (>0.001 ppm)
月岡ら ¹⁴⁾ (2009年)	長野県県内流通 リンゴジュース 36試料	8試料が0.001 ppm以上 0.002~0.005 ppm	22% (>0.001 ppm)
中山ら ¹⁵⁾ (2011年)	大阪府内流通 リンゴジュース 75試料	2試料が0.001 ppm以上 0.005, 0.006 ppm	2.7% (>0.001 ppm)

告¹²⁾では、福岡市内の市販リンゴジュース16試料について調査したところ国産のストレート飲料6試料からは検出されなかった(<0.001 ppm)が、濃縮還元(9試料)と炭酸飲料1試料について、0.003~0.011 ppmの範囲で検出され、検出率も56%と高い。青柳ら(2008年)の報告¹³⁾では、北海道内流通の100%リンゴジュース12試料中4試料から0.003~0.024 ppmの範囲で検出を報告している。月岡ら(2009年)の報告¹⁴⁾では、長野内流通36試料中、8試料において0.002~0.005 ppmの検出例がある。また、中山ら(2011年)の報告¹⁵⁾では、大阪府内小売店より平成18年から22年の間に収去されたリンゴジュース75試料が調べられ、すべてが基準値以下であったが、うち2試料は0.005 ppm、0.006 ppmの濃度で検出されている。

リンゴ以外の果物の汚染についての報告では、ブドウのパツリン汚染に関する報告がある^{7),16)}。我が国では行政検査にて基準値の設定があるリンゴジュースの検査が中心となっているため、ブドウ加工品についての報告^{14),16)}は限られている。田端ら(2007年)の報告¹⁶⁾では、ブドウジュース、レーズン等市販ブドウ加工品75試料について調査したところ、国産果汁100%と表示された4試料からパツリンが0.005~0.018 ppm検出されている。月岡ら(2009年)¹⁴⁾の報告では長野県内流通のブドウジュース13試料についてパツリンは検出されなかった(<0.001 ppm)と報告がある。

さて、近年マイコトキシン分析に係る研究では、マイコトキシンの配糖体など誘導代謝物に関する研究が注目されている¹⁷⁾。マイコトキシンは植物自身の解毒

作用などによって代謝・配糖化される^{17),18)}。これらは、特にグルコシド体が良く知られているが、マスクドマイコトキシン(masked mycotoxin)と呼ばれている。このマスクドマイコトキシンは通常の分析法では検出されない¹⁸⁾。そのため、それらを見逃すことでマイコトキシンリスクの過小評価につながる¹⁷⁾。またマスクドマイコトキシンはヒトが摂取するとき、腸内細菌等による生体内酵素のはたらきで分解され「もとの」マイコトキシンとして毒性を発現する^{17),18)}ため、マスクドマイコトキシンはリスク評価の上では重要なファクターとして扱うべきである。すでにデオキシニバレノールなどのフザリウム毒素の配糖体は天然に存在していることが知られている^{17),19),20)}。パツリンについては、配糖体の存在は知られていない。パツリンに配糖体があった場合には、リスクを過小評価することになる。したがって、本研究にてパツリンでは検出された場合には配糖体の存在の有無についても検討したいと考えた。

本研究では、上述の背景を受け、パツリン汚染の報告例が多く、基準値の設定があるリンゴジュースと、基準値の設定がないこともあり、あまり着目されず分析例も少ないブドウジュースを取り上げ、パツリンの汚染実態に関する状況について知見を得ることを目的に、筆者が指導する本学医療栄養学科卒業研究^{21),22)}においてパツリン分析を実施した。既存の研究報告の整理と合わせ、若干の知見を得たため報告したい。

2. 実験方法

a) 試料

- ・リンゴジュース 20 試料

インターネット通販より 3 試料、東京都内量販店より 17 試料を 2013 年初夏に購入して試料とした。合計 20 試料のうち 18 試料の原産地は海外産もしくは海外と国産のブレンド品であった。

- ・ブドウジュース 20 試料（ブドウを購入し、搾汁してジュースとした 5 試料を含む）

世田谷区内の小売店で販売されていた市販ブドウジュース 15 試料とブドウ 5 試料を 2014 年初夏に購入して試料とした。市販ブドウジュース 15 試料の原料はすべて海外産もしくは海外産を含むものであった。またブドウ 5 試料では 2 試料が海外産で、3 試料は国産であった。ブドウ（5 試料）はミキサーで搾汁しジュースにして試料とし、購入した市販ブドウジュースと共に試験に供した。

b) 試薬及び標準品

アセトニトリル（関東化学）及び蒸留水（和光純薬）は高速液体グラフ（HPLC）用、酢酸エチル（和光純薬）は残留農薬・PCB 試験用グレードを用いた。

パツリン標準溶液は、標準品（和光純薬）を適宜希釈して用いた。

誘導体化試薬の 5%BSTFA 溶液は N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (GL サイエンス) を酢酸エチルに溶解し 5 v/v% 溶液を作成した。

c) 装置及び測定条件

- ・HPLC 条件

機器：日立ハイテクノロジー ELITE LaChrom シリーズ

カラム：Inertsil ODS-3 (3.0 × 50 mm, 2 μm:GL サイエンス) 及び、PEGASIL ODS SP100 (4.6 × 250 mm,

5 μm: センシユー科学) を用いた。

移動相：4% アセトニトリル含有蒸留水

流速：0.5 ml/min (Inertsil ODS-3), 1.0 ml/min (PEGASIL ODS SP100)

カラム温度：30℃

注入量：20 μl

UV：276 nm (センシユー科学 DDC-5200)

- ・ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) 条件
機器：島津製作所 QP2010 シリーズ

GC カラム：DB-5MS (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm)

カラム温度：80℃ (2 min) -10℃/min- 260℃ (15 min)

注入口温度：250℃

キャリアガス：He

MS 条件：イオン源温度：200℃

モニターイオン (*m/z*)：183, 226 (SIM 分析)

d) 試料溶液の調製方法及び分析操作

操作は、広島市の分析例²³⁾に従い、MultiSep 228 AflaPat カラム (Romer Labs 製) を用いた固相抽出による前処理後、HPLC に供した (分析フロー：図 1)。

パツリンはガスクロマトグラフィー (GC) もしくはガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) での分析はできないが、パツリンを誘導体化させることで、GC もしくは GC/MS 分析も可能となる¹⁴⁾。そこで同定の判断が難しかった試料について、確認試験として、トリメチルシリル化剤である BSTFA により誘導体化反応を行い、反応後速やかに GC/MS により定性を行った。なお BSTFA によるトリメチルシリル化反応の反応率は常に 100% とは限らない。反応精度・最適反応条件については本研究では検討不十分である。さらに、¹³C でラベル化されているサロゲート体を用いた内部標準法による定量を試みていないことから、ここでは GC/MS を確認試験としての定性確認のみに利用した。



図 1 分析方法のフローチャート

表 2 リンゴジュース・ブドウジュース中のパツリン分析の結果

調査実施年	分析対象	結果
2013 年調査 ²¹⁾	リンゴジュース 20 試料	検出せず (<0.01 ppm)
2014 年調査 ²²⁾	ブドウジュース 20 試料	検出せず (<0.01 ppm)

3. 結果と考察

今回の分析対象のすべてで定量限界 (0.01 ppm) を超えて検出したものはなかった (表2)。

・リンゴジュース

過年度には、既存の報告¹¹⁻¹⁵⁾ (表1) のように検出例がある。今回の調査の範囲では検出が認められなかったことは、近年、製造技術、保存技術、生成防除の向上によりリンゴジュースの品質確保が進んでいると考えられることでもある。

既報¹¹⁻¹⁵⁾ では地方都市流通品の検出率が高いことから、地方と都市部流通品でパツリン濃度に有意な差があるのか、今後さらなる検討が必要と考えている。

我が国のリンゴは、諸外国に比べて高級品が栽培、流通している状況下であり、*Penicillium expansum* を主とする病害発生が認められる果実が加工品用に利用される可能性は極めて低い²⁴⁾ とする指摘がある。一方で、我が国で使用される国内流通リンゴ果汁の77.3%が輸入品である²⁵⁾。今回試料に供したリンゴジュースは、原産地を問わず、市販リンゴジュースを20試料購入したが、購入後に、原産地を各販売企業に電話にて問い合わせたところ、18試料の原産地が海外産もしくは海外と国産のブレンドであり海外産の割合は高かった (2.実験方法 a試料の項参照)。このように実際に流通しているリンゴジュースの多くが原産地は海外産であることから、実際に市場に流通しているジュースを試料として分析することは重要である。

さて、本研究では、検討を行わなかったが、懸濁したリンゴジュース中ではパツリンはアミノ酸やたんぱく質と結合し、「結合型パツリン (bound patulin)」として存在することも報告されている²⁶⁾。そのため通常の分析法ではパツリンとして検出されず、パツリンのリスクを過小評価してしまう可能性がある。今後、リスク把握のためにも「結合型パツリン」の汚染実態、生成メカニズムそして「結合型パツリン」を含む総パツリン分析法の開発など、「結合型パツリン」に係る知見が必要であり、検討してきたいと考えている。

・ブドウジュース

調査した範囲においては、ブドウジュースにおいて食品衛生上の問題があるとは考えにくい結果となった。

田端らの報告¹⁶⁾ にもあるように、ブドウ及び加工品への汚染率は低い可能性がある。

なお試料に供した市販ブドウジュース (15試料) は、販売業者に電話で問い合わせたところ、すべてが海外

産であった (2. 実験方法 a試料の項参照) が、我が国流通のブドウ果汁は98.6%が輸入品の現状にあり、リンゴジュースよりもその割合は高い²⁵⁾。海外での汚染状況についての情報を収集する必要がある。

・配糖体

今回の分析ではパツリンの検出がなかったため、配糖体の有無は明らかにできなかった。マイコトキシンには、植物体内あるいは加工調理において他の化合物に変換されるものがある。これらについて、リスクを正しく評価できているのかどうかを網羅的に検討していくことが、食品衛生上、重要になってくる。マスクドマイコトキシンの分析は、精密質量分析の手法を活用し網羅的に未知成分の探索を行う「ノンターゲット分析」²⁷⁾ など、分析手法の高度化と開発が必要とされる。パツリンの配糖体に関しては、まだ報告がない。パツリンについてもフザリウム毒素同様に配糖体が存在すると仮定すると、リスク評価の上で注意が必要である。今後、配糖体の有無及び生成する可能性も検討したい。

・パツリン分析における分析化学上の課題

分析操作において、パツリンは乾燥に不安定²⁸⁾ なため、前処理における乾固でのロスの可能性も無視してはいけないと思われる。試料中におけるpHによる影響やカラム精製時におけるロスも知られている²⁸⁾。これらからパツリンの検出を見逃している可能性も否定できない。したがって今後は、前処理方法の検討・開発や、¹³Cでラベル化したサロゲート体を用いた内部標準法によりロスを補う手法も検討したい。使用機器としては、HPLCでは0.01 ppmを下回る定量限界を得ることは難しかった。LC-MSやGC-MSと比較して、HPLC法では定量限界が高くなる欠点がある。機器の選択も含め、より精度を高めるため分析法の改善を今後取り組んでいきたいと考えている。

4. おわりに

国産リンゴジュースにおいては、これまで食品衛生法に基づく基準値を超過した例は報告されていない。しかし海外産では基準値を超えた例²⁹⁾ もあり、健康被害未然防止の観点からも継続的な監視は必要であろう。

我が国ではパツリンの基準値はリンゴジュースにのみ設定されており、基準の対象外となるジャム・缶詰、ベビーフードなどのリンゴ加工品やブドウなどその他の果実と加工品については報告例が少ない。幼児、子

供が摂取することが多い食品については、リンゴジュースに加えて、監視と適切なリスク評価が必要とも思われる。また、本研究では取り上げなかったが、「結合型パツリン」²⁶⁾についても検討が必要である。加えて、今後マスクドマイコトキシンに関する知見も集められる必要がある。

マイコトキシンなど自然状態から産生する自然毒への対策は、残留農薬、動物用医薬品、食品添加物といった人工化合物と違って、我々の管理の及ばない部分も多い。したがって自然毒の脅威は低く見積もってはいけない。近年、地球温暖化の指摘もあるが、気候変動により、今後、マイコトキシンのリスクが高まる可能性もある。引き続きマイコトキシンのリスクについて着目していきたいと考えている。また、あわせて分析法の改善も検討する必要がある。

5. 謝辞

本稿をまとめるにあたり、パツリン分析に協力いただいた平成25(2013)年度卒業研究生の、乳井雅美さん(HM010076)、村田裕介さん(HM010099)及び、平成26(2014)年度卒業研究生の植松香織さん(HM011021)、駒崎三佳さん(HM011048)、網島友莉乃さん(HM011074)に衷心より御礼申し上げます。

6. 引用文献

- 1) 小西良子, 田端節子. パツリン. 於: 日本食品衛生学会編. 食品安全の事典. 東京: 朝倉書店 2009; 248
- 2) 高鳥浩介. カビ毒. 小児科臨床 2012; 65 (増刊号): 1409-1418.
- 3) International Agency for Research on Cancer (IARC). Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals on Humans 1986; 40: 83-98
- 4) WHO/FAO Joint Expert Committee of Food Additives and Contaminants (JECFA). WHO Technical Report Series 859. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants 1995: 36
- 5) 大久保薫. 飼料を中心としたカビの中毒について. 日本獣医師会雑誌 1969; 22: 453-468
- 6) Ralph Flege, Manfred Metzler. The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and α -amino groups. Chemico-Biological Interactions 1999; 123: 85-103
- 7) 田端節子. 国内で起きるカビ毒汚染の実態と制御—パツリンを中心として. マイコトキシン 2008; 58 (2): 129-135
- 8) CODEX Alimentarius Commission. CODEX general standard for contaminants and toxins in food and feed (CODEX STAN 193-1995) 1995: 30
- 9) 厚生労働省. 厚生労働省告示第369号. 2003 (平成15年11月26日)
- 10) 横田栄一. リンゴジュースおよび原料用りんご果汁に含まれるパツリンに関する規格基準の設定. 食品衛生研究 2004; 54 (3): 7-10
- 11) 農林水産省. 平成17年度国産原料用りんご果汁のパツリン含有実態調査の結果について. 農林水産省プレスリリース. 平成18(2006)年6月5日
- 12) 赤木浩一, 畑野和広. LC/MS/MSによるりんごジュース中のパツリンの残留分析, 福岡市保健環境研究所報 2003; 29: 145-147
- 13) 青柳光敏, 久保亜希子, 新山和人. リンゴジュースのパツリン汚染実態調査. 北海道衛生研究所所報 2008; 58: 35-36
- 14) 月岡忠, 宮沢衣鶴, 白石崇. GC/MSによるパツリンの分析法の検討と実態調査. 長野県環境保全研究所研究報告 2009; 5: 33-37
- 15) 中山裕紀子, 中辻直人, 高取悟 他. リンゴジュース中のパツリンの検査結果—平成18~22年—. 大阪府立公衆衛生研究所報 2011; 49: 11-14
- 16) 田端節子, 岩崎由美子, 飯田憲司 他. ブドウ加工品のパツリン汚染. 日本食品衛生学会第94回学術講演会要旨集 2007; 67
- 17) 中川博之. 高速液体クロマトグラフィー質量分析法によるフザリウムトキシン分析に関する最新の知見. マイコトキシン 2014; 64 (1): 55-62
- 18) 久城真代. 医食住のマイコトキシン マイコトキシンの基礎 食品分野のマイコトキシン. 防菌防黴 2012; 40 (6): 373-380
- 19) Brigitte Poppenberger, Franz Berthiller, Doris Lucyshyn *et al.* Detoxification of the Fusarium Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from Arabidopsis thaliana. The Journal of Biological Chemistry 2003; 278 (48): 47905-47914
- 20) Hiroyuki Nakagawa, Kimihide Ohmichi, Shigeru Sakamoto *et al.* Detection of a new Fusarium masked mycotoxin in wheat grain by high-resolution LC-Orbitrap MS. Food Additives and Contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment 2011; 10: 1447-56

- 21) 乳井雅美, 村田裕介. リンゴジュース中のパツリン汚染調査及び食品分析においてビスフェノールAを誤定量する可能性. 東京医療保健大学医療保健学部医療栄養学科2013年度卒業論文
- 22) 植松香織, 駒崎三佳, 網島友莉乃. ぶどうジュース中のパツリン汚染調査. 東京医療保健大学医療保健学部医療栄養学科2014年度卒業論文
- 23) 広島市衛生研究所生活科学部. リンゴジュース中のパツリン分析法の検討. 広島市衛研年報 2008; 27: 56-57
- 24) 一戸正勝. リンゴの貯蔵病害とパツリン生産菌. マイコトキシン 2004; 54: 95-100
- 25) 消費者庁. 「果実飲料の流通状況について」. 消費者委員会食品表示部会配布資料1-4. 平成22(2010)年7月21日
- 26) Katleen Baert, Bruno De Meulenaer, Chitundu Kasase *et al.* Free and bound patulin in cloudy apple juice. Food Chemistry 2007; 100: 1278-1282
- 27) 大道公秀, 坂本茂, 中野辰彦. 電場型フーリエ変換質量分析計を用いた食品分析. フードケミカル 2010; 26(11): 59-63
- 28) 小木曾基樹. 医食住のマイコトキシン マイコトキシンの分析法 食品分野 パツリン. 防菌防黴 2012; 40(11): 699-704
- 29) 厚生労働省. 「平成26年度輸入食品等モニタリング計画」の実施について(ルーマニア産りんごジュース及び原料用りんご果汁のパツリン). 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室長通知(食安輸発1001第1号). 平成26(2014)年10月1日