

# カビ汚染ピーナッツ除去装置によるカビ毒防除効果について

加瀬 信明, 矢崎 廣久, 久門 勝利, 福島 悦子, 高橋 治男

## Exclusive effect of Aflatoxin Contamination in Peanuts by Near Infrared Radiation Sorter.

Nobuaki KASE, Hirohisa YAZAKI, Katsutoshi KUMON  
Etsuko FUKUSHIMA and Haruo TAKAHASHI

### I. はじめに

*Aspergillus flavus*の代謝産物アフラトキシン (AF) は、その強力な発ガン性から種々のマイコトキシンの中でも特に重要視されており、わが国でも1971年に厚生省よりナッツ類及びその加工品をはじめとする食品に検出されてはならない旨の通達<sup>1)</sup>が示された。

本県においても、以前より製造・加工業の現場では、原料の段階でカビ毒過を未然に防止するため、紫外線や色彩選別機 (color sorter) を利用したカビ粒除去装置など種々の試みがなされているが、依然として人手による異物や虫食いなどの選別が主流であった。

しかし、外観は正常であっても、内部がカビ汚染されているものもあり、この場合色彩選別機や人手による選別は困難である。

こうした内部カビ汚染豆、穀類への対策として、最近、ケイ光や近赤外波長のスペクトルなどを利用し、コンピューター判別処理により汚染粒を排除する装置が開発されている。

著者らは昨年、近赤外透過方式による除去装置の試作機について、自然汚染粒の混在した輸入生落花生の選別試験を行い、その効果についてすでに発表した<sup>2)</sup>。今回、自然汚染された輸入生落花生を用いて、通常使用感度でのAF除去効果、並びに同一試料に対する選別頻度とAF除去効果などについて検討を行い若干の知見を得たので報告する。

### II. 実験方法

1. 材料：食品製造会社より入手したインド産AF自然汚染ピーナッツ (スバニッシュ種、一粒平均重量350mg、洗皮付) 3 kgを用いた。うち、2.7kgを選別試験に、残り0.3kgについてはAFの検出されない良粒だけを選別し、添加回収試験用試料とした。

#### 2. 試薬

薄層プレート：プレコート・シリカゲル キーセルゲル 60, 20×20cm, E. Merck社製

TLC展開溶媒：クロロホルム・ヘキサン (6+4) 及びジエチルエーテル・メタノール・水 (96+3+1)

AF抽出用溶媒：5%塩化ナトリウム水溶液・メタノール (1+1) 及びクロロホルム

TLC試料調製用溶媒：ベンゼン・アセトニトリル (95+5)

なお、溶媒は試薬特級品を蒸留精製したものをを用いた。

AF標準溶液：AF標準品 (Makor Chemicals社製) をTLC試料調製用溶媒に溶解し、AFB<sub>1</sub>の1 μl/ml溶液、並びにB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>及びG<sub>2</sub>をそれぞれ5 μl/ml含有する混合標準溶液を調製した。

#### 3. 機器

1) 薄層デンストメーター：島津二波長クロマトスキャナースCS-910ケイ光検出器付、島津製作所製

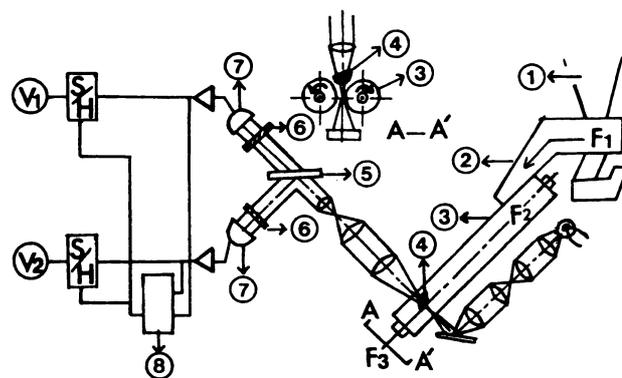
2) バイオミキサー：TP-18/10S 2型・Janke&Kunkel社製

3) カビ汚染ピーナッツ除去装置：ALSOMAC・Q-SORTER MODEL MK 6, 安西製作所製

#### 4. 選別試験による試料の調製

試験に用いたカビ汚染ピーナッツ除去装置の汚染豆排除原理は近赤外領域の透過スペクトル特性を利用したもので、正常豆と内部カビ豆とでは波長700nmおよび1100nm前後で透過度の差があることを用いているが、このカビ汚染ピーナッツ除去装置に、AF自然汚染ピーナッツ2.7kg (7,775粒) を排除率が各回ごとに1~3%となるよう感度を調整し、繰り返し選別を計10回行った。

計10回の選別で排除された粒群は、各々の群ごとに4粒を1検体として処理し、次に示す分析方法に従いAF含量の測定を行った。



- |           |              |
|-----------|--------------|
| ① ホッパー    | ⑤ ダイクロイックミラー |
| ② 振動フィーダー | ⑥ フィルター      |
| ③ ローラー    | ⑦ デテクター      |
| ④ 豆       | ⑧ パルス        |

図1 カビ粒除去装置の模式図

千葉県衛生研究所

(1994年11月15日受理)

5. 分析方法

AOACのCB-Method<sup>3)</sup>に準じて、図2のフローチャートに示したとおり4粒を1検体とし、クロロホルムおよび塩化ナトリウム-メタノール混液で液々分配による抽出を行った。そしてクロロホルム層を脱水、留去後、濃縮残渣をベンゼン・アセトニトリル(95+5)溶液を加えて500 $\mu$ lとし、TLC試料とした。

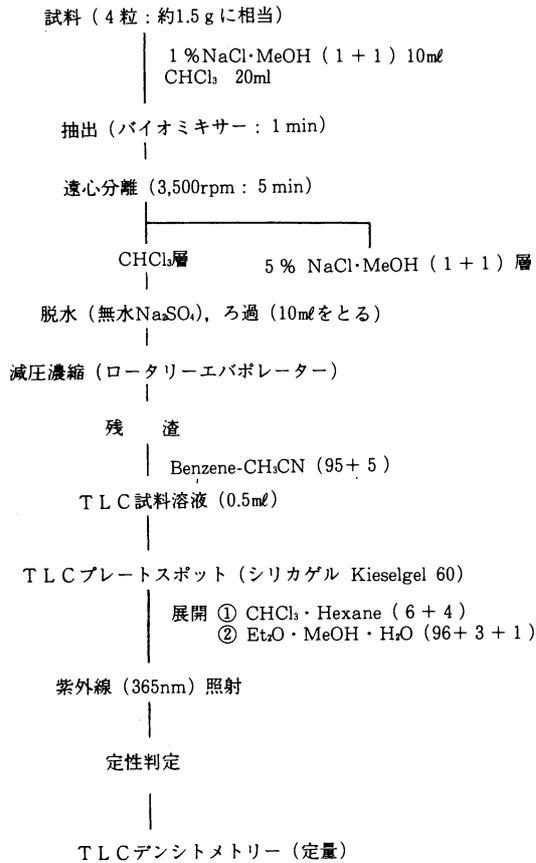


図2 落花生試料中のAFの分析方法

このうち50 $\mu$ lを薄層プレートにスポットし、クロロホルム・ヘキサン(6+4)で妨害油脂分等をプレート上部まで展開した後、ジエチルエーテル・メタノール・水(96+3+1)で展開し、AFB<sub>1</sub>標準溶液及びAF混合標準溶液のスポットと比較し定性を行った。

ここで、AF陽性と判定されたものは、薄層デンシトメトリーによりAF濃度測定を行い、定量値を求めた。

6. 添加回収試験

添加回収試験に用意したピーナッツ300gを粉碎し、12メッシュ(1.41%)のふるいを通し、AFが検出されないことを確認した後、AFB<sub>1</sub>濃度がそれぞれ3ng/g、10ng/g、30ng/gとなるよう添加した試料を調製し、図2の分析操作により回収率を求めた。

III. 結果および考察

1. ピーナッツ選別試験

今回使用した選別機の仕組みは図1に示したとおり、豆をホッパーに入れ、流すと振動フィーダーにより毎秒数十粒が整流され、ローラー上を流下していく。この間にセンサーからの近赤外光を当て、この透過光を集めディテクターで検出し、コンピューター演算により感度設定した透過基準値以外の豆をエジェクターで排除するものである。<sup>4)</sup>

この装置により、AF自然汚染ピーナッツ2.7kg(7,775粒)を10回にわたり選別を繰り返したときの各回の排除粒数及びAFの陽性率、検出された濃度範囲を表1に示した。第1回選別で279粒(重量比3.5%)、第2回選別で163粒(2.1%)が排除され、それ以降各回とも52~100粒(0.7~1.3%)の範囲で選別し、排除粒の合計は1,160粒(重量比で15.1%)となった。

AFが検出されたのは第1回から第3回排除粒群のみで、その検体あたりの陽性率はそれぞれ28.6%(20/70)、12.2%(5/41)、4.2%(1/24)と回を追うごとに検出割合の減少がみられた。また、検出されたAFはAFB<sub>1</sub>のみであった。

表1 カビ汚染ピーナッツ除去装置による選別とアフラトキシンの検出結果

選別	除去装置 排除粒数 (重量比%)	選別粒数	AFB <sub>1</sub> 検出量		
			陽性率	濃度(ng/g)	T-AFB <sub>1</sub> (ng)*
1回目	279 (3.5%)	7,775	20/70	1.0~1,440 (AV: 126.3)	3,514
2回目	163 (2.1%)	7,496	5/41	1.1~ 9.5 (AV: 3.1)	24.5
3回目	94 (1.3%)	7,333	1/24	1.6	2.4
4回目	96 (1.3%)	7,239	0/24	不検出**	-
5回目	94 (1.4%)	7,143	0/24	不検出	-
6回目	52 (0.7%)	7,049	0/13	不検出	-
7回目	99 (1.3%)	6,997	0/25	不検出	-
8回目	84 (1.1%)	6,898	0/21	不検出	-
9回目	100 (1.3%)	6,814	0/25	不検出	-
10回目	99 (1.3%)	6,714	0/25	不検出	-
排除群合計	1,160(15.2%)		26/292		
排除されな かった粒数	6,615 (2,295 g)		分析中		

\* 陽性となった検体のAFB<sub>1</sub>の総量

\*\* 定量限界: 1ng/g

表2 選別機排除粒群中のA F検出試料濃度\*

選 別	AFB <sub>1</sub> 濃度 (ng/g)						平均値(ng/g)
	1.0	1.1	1.1	1.2	1.3	1.3	
1回目	1.3	1.5	1.9	1.9	2.6	3.4	126.3
	3.6	8.0	9.5	33	34	288	
	691	1,440					
2回目	1.1	1.6	3.5	4.1	9.5		3.1
3回目	1.6						1.6

\* 定量限界：1 ng/g

検出されたA F濃度は表2のとおりであり、その濃度分布は図3に示すように、第1回排除群で1.0~1,440ng/gと低濃度粒から高濃度汚染粒まで幅広いレベルにわたったのに対し、第2回、第3回排除群では10ng/g以下であった。

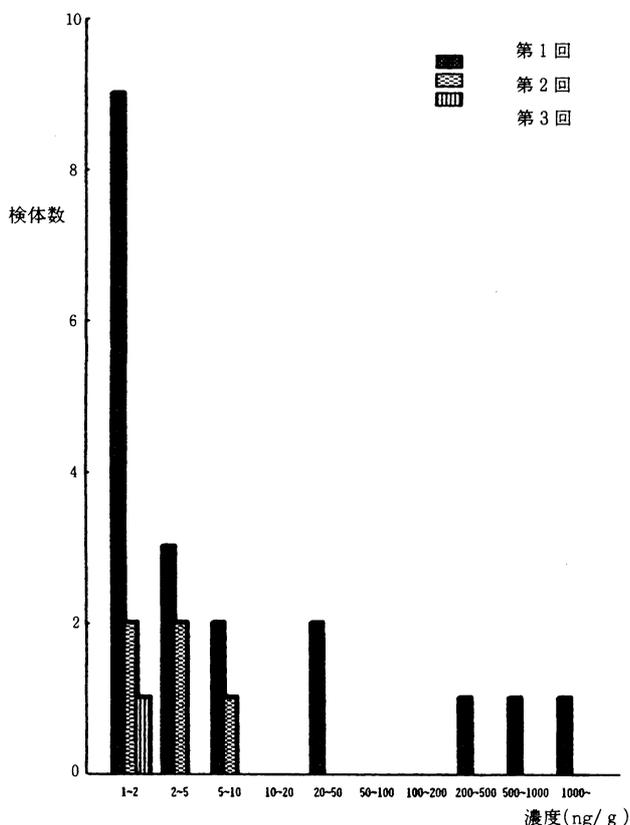


図3 排除粒群のA F濃度分布

また、排除粒中のA F量のうち99.3%までが第1回選別(全体の重量比の約3.5%)で除かれており、全試料中のA Fを完全に除くのに要した選別繰り返し回数は計3回で、その間の排除率は累計で全体の重量比の約6.8%であった。

2. 添加回収試験結果

著者らは前回の分析法<sup>9)</sup>において、高い回収率を確保したままピーナッツ検体の縮小に伴う最小試料量(粒数)の可能性について検討を行っているが、今回は4粒を試料単位としたので、その場合の回収率チェックも行った。

試験結果は表3に示したとおり4粒に相当する試料(1.5g)の3ng/g, 10ng/g, 及び30ng/gのAFB<sub>1</sub>添加濃度区における回収率は平均でそれぞれ80.8%, 79.2%, 76.7%であり、ほぼ満足する結果が得られた。

表3 ピーナッツによるA F添加回収試験結果

添 加 量	AFB <sub>1</sub> 添加濃度 (ng/g)		
	3	10	30
Na			
1	75.5	89.3	72.0
2	84.4	77.3	67.5
回 収 率	3	88.8	77.3
	4	75.5	78.6
	5	80.0	73.3
$\bar{x}$	80.8	79.2	76.7
$\delta$	5.17	5.37	7.77
cv	0.06	0.07	0.10

$\bar{x}$ : 平均回収率 (Average)

$\delta$ : 標準偏差 (Standard deviation)

cv: 変動係数 (Coefficient of variation)

3. 選別試験に用いたピーナッツのA F汚染粒率

今回用いた選別機の汚染粒排除効果を調べるにあたり、試料として用いたピーナッツの妥当性を検証するため、汚染粒分布に関する試算を行ってみた。

Whitakerら<sup>5),6),7)</sup>によれば、A F汚染調査のサンプリングにあたり、汚染粒率pの母集団からサブサンプルとしてn粒を取り出したとき、その中にk粒の汚染粒が入る確率Prは、二項分布法則に従うとしており、これは(1)式で表せる。

$$Pr\% = \frac{n!}{k!(n-k)!} p^k (1-p)^{n-k} \times 100 \quad (1)$$

山本ら<sup>8),9)</sup>は、それに基づいて粒状農産物のカビ毒調査サンプリングやデータ解析を統計学的に検討し、汚染粒率0.1%以上(通常0.1~0.5%)のときその適合性がよいことを示している。

今回の試験において、母集団である被選別粒から排除された粒群を4粒ごとにA F測定を行った結果は二項分布に従うとみなすと、A Fが検出されなかった検体は、表4のような算出結果となり、汚染粒率の推定が行える。

表4から、排除粒群の汚染粒率は2.5%、排除されなかった群を全て陰性と仮定すると、母集団である試料全体の汚染粒率は0.37%となる。

したがって、今回用いた試料は汚染粒率0.1~0.5%の範囲内にあり、自然汚染粒として典型的なA F濃度の出現率を示す妥当な豆群であったと結論される。

表4 試料に用いたピーナッツのA F汚染粒率の推定

	AFB <sub>1</sub> 不検出	p(汚染粒率)* (%)	汚染粒数推定値
第1回	0.714 (50/70)	8.07	22.5
第2回	0.878 (36/41)	3.19	5.2
第3回	0.958 (23/24)	1.05	1.0
第4~10回	1.0 (157/157)	0	0
排除粒群全体	0.910 (266/292)	2.48	28.7
試料全体**		0.37	28.7

\* 汚染粒率は次により算出した。

$$Pr\% = \frac{n!}{k!(n-k)!} p^k (1-p)^{n-k} \times 100$$

(Pr: k粒の汚染粒が入る確率, n: 1検体の粒数, p: 汚染粒率, k: 1検体あたりの汚染粒数)

\*\* 排除されなかった粒群からA Fが検出されないと仮定した。

#### 4. 選別機のA F除去効果について

今回の試験では、排除率3.5%の第1回選別で、陽性検体の83% (19/23), A F含量の99.3%までが排除され、3回の選別(排除率6.8%)で完全にA F排除を達成できた。

第2回、第3回の選別での排除粒の陽性数が少なかったため、第1回選別との有意性を論ずる検定は行なえなかったが、高濃度汚染粒は第1回選別で排除されているところをみると、本機はかなりの選別効果があると推察される。

近赤外域透過スペクトルの食品を初めとした非破壊検査の実用化は1970年代後半より進められてきたが<sup>10),11)</sup>、今回用いた選別機も選別粒の透過スペクトルから、正常豆と内部カビ豆を比較した場合700nm, 1100nmの波長で最も透過度の差が大きくなることを利用し非破壊的に豆の良否を判定している。

このことは、カビの着生及び代謝により基質である豆に何らかの変化が起り、700nm, 1100nm前後に吸収帯を持つ物質が生じていることを示すが、本機が原理的にどのような物質を除いているかさらに検討を要する面もあり、今後のカビ代謝物の同定が待たれるところである。

今回の結果から、試験に用いた近赤外透過方式の選別機は、高濃度A F汚染粒の排除も含め、通常よく遭遇するとされる汚染率0.1~0.5%程度の汚染粒に対して、ほぼ十分な選別効果が認められた。

生産加工現場において、汚染粒をより確実に除去しようとする場合、排除率の上昇に伴って生産者リスクの悪化は避けられないが、基本的に原料豆からのA F除去は複数回の選別により対応できると考えられる。

#### IV. ま と め

ナッツ類の製造・加工現場において、人手や色彩選別で対処できなかった内部カビ豆を排除するため開発された近赤外透過方式の除去装置の選別試験を行った。

インド産自然汚染小粒ピーナッツ2.7kgを用い、1~3%の排除率に感度設定し、10回の選別を行なったところ、各回ごとに0.7~3.5%、合わせて15.3%の豆が排除された。

排除粒は各回排除粒群ごとに無作為に抽出した4粒を1検体としたA Fの分析を行ったが、第1回排除群70検体中20検体(28.6%)、第2回排除群41検体中5検体(12.2%)、第3回排除群24検体中1検体(4.2%)からAFB<sub>1</sub>が検出され、4回目以降は全く検出されなかった。

検出されたA F濃度は1.0~1,440ng/gの範囲に及んだが、高濃度汚染粒は第1回排除群に限られ、2回目、3回目では10ng/g以下の低濃度群のみであった。

また、1回目3.5%の排除率でA F総量の99.3%が排除された。検査結果から試験に用いたピーナッツの汚染率はWhitakerらの統計式を用いて推定したところ0.37%となり、通常の抜き取り検査で遭遇する範囲の適切な試料であったことも確認された。

今回用いた近赤外方式による除去装置は、1回の選別で高濃度汚染粒を選択的に排除していることから、かなりの除去効果が認められた。生産加工現場での汚染粒のより確実な除去にあたっては、複数回の選別により対処できると考えられた。

#### V. 謝 辞

今回の調査にあたり、カビ汚染ピーナッツ除去装置を貸与頂いた株式会社安西製作所、ならびに自然汚染ピーナッツを提供して頂いた株式会社森永製菓に深謝いたします。

#### VI. 文 献

- 1) 厚生省環境衛生局食品衛生課長、「カビ毒(アフラトキシン)を含有する食品の取扱いについて」、環食第128号、昭和46年3月16日(通知)
- 2) 久門勝利、矢崎廣久、高橋治男、福島悦子:「穀物中のマイコトキシンの研究」、60、第30回全国衛生化学技術者協議会年会講演要旨、1993.
- 3) Official Method of Analysis (1990) 15th Ed. (secs. 968.22, 1188-1190), AOAC, Arlington, VA.
- 4) 大河原徳之、榑崎修一郎、平野進、木村宣夫、三ツ木幹夫、佐々木元、芝山明、「カビ汚染ピーナッツ除去装置の開発」日本食品衛生学会第64回学術講演会要旨、27、1992.
- 5) Whitaker, T. B., Weiser, E. H.: J. Amer. Oil Chem. Soc. 46, 377-379 (1968)
- 6) Whitaker, T. B., Dickens, J. W., Weiser, E. H.: *ibid.* 47, 501-504 (1970)
- 7) Whitaker, T. B., Dickens, J. W., Monroe, R. J., Weiser, E. H.: *ibid.* 49, 590-593 (1972)
- 8) 山本勝彦、坪内春夫、久田和夫、坂部美雄:「市販粒状落花生およびナッツ製品のアフラトキシン汚染調査のための小規模サンプリング計画について」、食衛誌、24、396-402、1983.
- 9) 山本勝彦:「粒状農産物のマイコトキシン検査におけるサンプリング法に関する統計学的考察」、食衛誌、32、487-497、1991.
- 10) 岩元睦夫、「近赤外分光法による食品成分の非破壊測定」、日本食品工業学会誌、27、464-471、1980.
- 11) 河野澄夫、「最新の近赤外分光法」、ぶんせき、1994年1月号、41-47、1994.