

はちみつのピロリジジナルカロイド類の含有実態調査結果

農林水産省顧問（大臣官房参事官）
消費・安全局畜水産安全管理課

1. 調査の目的

キク科のアザミ属やムラサキ科のエキウム属など、ミツバチが蜜源として好むことが知られている植物中にもピロリジジナルカロイド類を含むものがある。ミツバチがそのような植物の花から花蜜や花粉を集めてしまうことで、はちみつや花粉荷（ビーポーレン。ミツバチが作る花粉を団子状に丸めたもの。）などのミツバチ生産物が汚染されるとの報告がある。今般、国内で市販されているはちみつにおけるピロリジジナルカロイド類の含有実態を調査した。

2. 調査の概要

2.1. 調査対象

国内で市販されているはちみつを調査対象とした。

2.2. 調査点数

単花蜜及び百花蜜をそれぞれ 120 点調査した。調査点数等を表 1 に示した。

表 1 調査を行ったはちみつの種類

はちみつの種類	調査点数	蜜源となる植物	調査点数
単花蜜 ^注	120	①キク科（アザミ）及びムラサキ科（エキウム）	国産 23、海外産 6 国産 1、海外産 0 計 30
		②上記以外の植物	国産 60、海外産 30 計 90
百花蜜 ^注	120	③表示されていない	国産 90、海外産 30 計 120

注：単花蜜は蜜源となる特定の植物が明記されたはちみつ、百花蜜は蜜源となる特定の植物が明記されていないはちみつ（蜜源としてキク科、ムラサキ科の植物を含む可能性がある）を指す。

2.3. 調査試料の採取

百貨店、スーパーマーケット、専門店等の店舗及び通信販売により、採蜜地や採蜜国が偏らないよう 1 点あたり 50 g 以上のはちみつを購入した。

2.4. 分析法

ドイツ連邦リスク評価研究所 (BfR) が公表した分析法 (BfR-PA-Honey-1.0/2013)¹に基づき、液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて分離・測定した。この分析法は、BfR がドイツを中心に 9 カ国 21 検査機関の参加を得て、実験室間再現精度等を算出し、ピロリジジンアルカロイド類の定量法の妥当性を評価した際に用いられたものである。

2.4.1. 分析項目

BfR が公表した分析法にしたがい、標準試薬を入手可能な次の 17 種類のピロリジジンアルカロイド類を分析の対象とした。

- ・ インターメディン
- ・ エキミジン
- ・ セネシオニン
- ・ セネシオニン窒素酸化物
- ・ セネシフィリン
- ・ セネシフィリン窒素酸化物
- ・ センキルキン
- ・ トリコデスミン
- ・ モノクロタリン
- ・ モノクロタリン窒素酸化物
- ・ ヘリオトリン
- ・ ヘリオトリン窒素酸化物
- ・ ラシオカルピン
- ・ ラシオカルピン窒素酸化物
- ・ リコプサミン
- ・ レトロルシン
- ・ レトロルシン窒素酸化物

2.4.2. 試料の調製

購入したはちみつをよくかく拌し、10 g 量りとしたものを分析試料とした。

分析試料に硫酸溶液を加え、SPE カートリッジに負荷した後、アンモニアメタノール溶液で溶出したろ液を乾固し、メタノール・水混合溶液に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とした。

試料の調製手順を図 1 に示した。

¹ BfR. Determination of pyrrolizidine alkaloids(PA) in honey by SPE-LC-MS/MS Method Protocol (BfR-PA-Honey-1.0/2013)

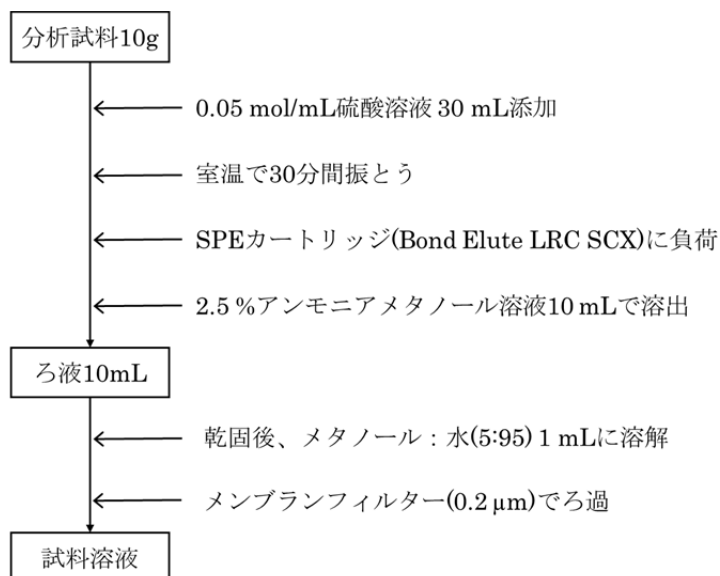


図 1 試料の調製手順

2.4.3. LC-MS/MS の条件

LC-MS/MS の条件を表 2、各分析種の設定質量数を表 3 に示す。

表 2 LC-MS/MS の設定条件

機種	Acquity UPLC (Waters)																					
カラム	InertSustainC18 (GL Sciences)																					
カラム温度	40°C																					
移動相	<p>移動相 A : 315 mg のギ酸アンモニウムを 5 mL の水で溶解し、1 mL のギ酸を添加後、水で 1 L に定容したもの</p> <p>移動相 B : 315 mg のギ酸アンモニウムを 5 mL の水で溶解し、1 mL のギ酸を添加後、メタノールで 1 L に定容したもの</p> <p>グラジエント条件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>(min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>6.5</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>0.1</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>1.4</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	(min)	A (%)	B (%)	0	95	5	0.5	95	5	6.5	50	50	0.5	20	80	0.1	0	100	1.4	0	100
(min)	A (%)	B (%)																				
0	95	5																				
0.5	95	5																				
6.5	50	50																				
0.5	20	80																				
0.1	0	100																				
1.4	0	100																				
流速	0.3 mL/min																					
MS/MS	<p>イオン化法 : ESI 正イオンモード</p> <p>コロナ電流 : 3 μA</p>																					

イオン源温度：150°C プローブ温度：500°C コーンガス流量：窒素 50 L/h デゾルベーションガス流量：窒素 1000 L/h コリジョンガス流量：アルゴン 0.2 mL/min
--

表3 各分析種の設定質量数

分析種	プレカ ーサー イオン (m/z)	プロダク トイオン (m/z)	分析種	プレカ ーサー イオン (m/z)	プロダク トイオン (m/z)
インターメディ ン	300	138	モノクロタリン 窒素酸化物	342	137
	300	156		342	118
エキミジン	398	120	ヘリオトリン	314	138
	398	220		314	156
セネシオニン	336	138	ヘリオトリン窒 素酸化物	330	138
	336	120		330	172
セネシオニン窒 素酸化物	352	118	ラシオカルピン	412	120
	352	136		412	336
セネシフィリン	334	120	ラシオカルピン 窒素酸化物	428	254
	334	138		428	136
セネシフィリン 窒素酸化物	350	118	リコプサミン	300	156
	350	136		300	138
センキルキン	366	150	レトロルシン	352	120
	366	168		352	138
トリコデスミン	354	120	レトロルシン窒 素酸化物	368	118
	354	222		368	136
モノクロタリン	326	120			
	326	237			

2.4.4. 検出限界及び定量限界

1 ng/mL の各分析種の標準試薬を注入し、S/N=3 に相当する濃度を検出限界 (LOD)、S/N=10 に相当する濃度を定量限界 (LOQ) とした。調査を行った各分析種の LOD 及び LOQ を表 4 に示す。

表 4 調査を行った分析種の LOD 及び LOQ

分析種	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
インターメディン	0.06	0.17
エキミジン	0.03	0.09
セネシオニン	0.12	0.40
セネシオニン窒素酸化物	0.08	0.26
セネシフィリン	0.08	0.26
セネシフィリン窒素酸化物	0.11	0.35
センキルキン	0.03	0.09
トリコデスミン	0.19	0.61
モノクロタリン	0.15	0.50
モノクロタリン窒素酸化物	0.10	0.33
ヘリオトリン	0.03	0.08
ヘリオトリン窒素酸化物	0.08	0.24
ラシオカルピン	0.02	0.06
ラシオカルピン窒素酸化物	0.03	0.08
リコプサミン	0.04	0.14
レトロルシン	0.10	0.32
レトロルシン窒素酸化物	0.07	0.23

2.4.5. 検量線

調査を行ったピロリジジナルカロイド類の標準試薬ごとに調製した 7 種類の濃度の溶液を用いて作成した検量線は、いずれも相関係数が 0.995 以上を示した。

2.4.6. 添加回収率

各分析種を 0.3 µg/kg、LOQ 及び 5 µg/kg の添加濃度でそれぞれ 3 回添加し、平均添加回収率及び併行相対標準偏差 (RSDr) を求めた。各分析種の平均添加回収率は 83%～115%の範囲であり、許容できる範囲であった。

各分析種の平均添加回収率及び RSDr を表 5 に示す。

表 5 各分析種の平均添加回収率

分析種	添加濃度					
	0.3 µg/kg		LOQ		5 µg/kg	
	平均添加回収率 (%)	RSDr (%)	平均添加回収率 (%)	RSDr (%)	平均添加回収率 (%)	RSDr (%)
インターメディン	89	14	83	3.6	114	4.0
エキミジン	107	6.2	98	3.8	100	2.9
セネシオニン	108	3.7	102	6.1	111	1.2
セネシオニン窒素酸化物	92	3.1	104	4.1	91	5.4
セネシフィリン	89	7.8	89	7.8	106	5.1
セネシフィリン窒素酸化物	85	9.9	86	5.7	83	4.2
センキルキン	102	4.6	107	2.1	98	3.7
トリコデスミン	110	6.1	102	11	112	4.4
モノクロタリン	98	9.9	107	4.9	106	9.7
モノクロタリン窒素酸化物	96	9.9	95	4.1	96	5.8
ヘリオトリン	101	8.4	87	6.7	108	1.9
ヘリオトリン窒素酸化物	92	10	94	6.3	108	2.2
ラシオカルピン	108	2.1	97	5.9	100	4.1
ラシオカルピン窒素酸化物	107	3.3	105	3.5	94	1.5
リコプサミン	95	5.2	86	2.3	115	4.6
レトロルシン	108	9.9	91	4.6	110	1.1
レトロルシン窒素酸化物	92	7.8	93	4.1	94	5.1

2.4.7. 室内再現精度

分析種ごとに2種類の添加濃度（LOQ 付近及び 5 µg/kg）の標準液をあらかじめ調製し、同一試料の繰り返し精度試験（n=7）を、異なる3日で各日1回ずつ実施し、各濃度における室内再現相対標準偏差（RSDi）を算出した。

各分析種の RSDi はいずれも 20%以下であり、許容できる範囲であった。

分析種ごとの RSDi を表 6 に示す。

表 6 各分析種の室内再現精度

分析種	添加濃度 (µg/kg)	RSDi (%)	添加濃度 (µg/kg)	RSDi (%)
インターメディン	0.2	13	5	8.3
エキミジン	0.1	11	5	5.4
セネシオニン	0.4	9.6	5	7.0
セネシオニン窒素酸化物	0.3	8.9	5	12
セネシフィリン	0.3	14	5	5.8
セネシフィリン窒素酸化物	0.4	12	5	10
センキルキン	0.1	6.5	5	4.9
トリコデスミン	0.7	15	5	5.9
モノクロタリン	0.5	5.3	5	12
モノクロタリン窒素酸化物	0.4	6.0	5	8.7
ヘリオトリン	0.1	17	5	6.8
ヘリオトリン窒素酸化物	0.3	8.5	5	7.1
ラシオカルピン	0.1	11	5	5.4
ラシオカルピン窒素酸化物	0.1	4.5	5	7.4
リコプサミン	0.2	15	5	10
レトロルシン	0.4	9.5	5	10
レトロルシン窒素酸化物	0.3	12	5	11

2.4.8. 精度管理

2.4.8.1. 内部精度管理

厚生労働省の「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成9年4月1日付け衛食第117号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に準拠して実施し、適正に運用されていることを確認した。

2.4.8.2. 外部精度管理

過去3年以内に国際的に認知されている FAPAS 等の外部精度管理機関において、はちみつの分析技能試験（定量試験が試験項目に含まれているものであり、LC-MS/MS により分析しているもの）に参加し、満足な結果（Zスコア $\leq |2|$ ）が得られていることを確認した。

3. 分析の結果

17種類のピロリジジンアルカロイド類をそれぞれ定量し、その合計濃度をはちみつの総ピロリジジンアルカロイド類濃度とした。ただし、Lower bound (LB) は、LOQ未満の分析種の濃度を0として総ピロリジジンアルカロイド濃度を計算、Upper Bound (UB) は、LOD未満の分析種の濃度をLODと同値、LOD以上LOQ未満の分析種をLOQと同値として計算した。

はちみつの17種類の総ピロリジジンアルカロイド類の分析結果を表7に、相対度数分布を図2に示した。

調査を行ったはちみつのほとんどにおいて、各ピロリジジンアルカロイド類は定量限界付近かそれ以下の濃度の含有であった。

今回の調査結果の中央値（4.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）は、調査対象としているピロリジジンアルカロイド類が異なるため、単純に比較はできないものの、欧州で市販されているはちみつのピロリジジンアルカロイド類濃度の調査結果²（調査点数1,116点、中央値28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）と比較しても大幅に低い値であった。

² EFSA. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed (EFSA Journal 2011;9(11): 2406)

表7 はちみつ中の総ピロリジジナルカロイド類（17種類）の合計

分析種	試料数	LOQ 未満 の割合		平均値 (µg/kg)	中央値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)
全体の合計	240	55%	LB	8.0	0.0	444
			UB	12.1	4.2	446
アザミ及び エキウムの 蜂蜜	国産	17%	LB	4.6	1.2	32
			UB	8.5	5.1	36
	海外産	0%	LB	89	41	313
			UB	93	44	317
合計	30	13%	LB	22	2.0	313
			UB	25	5.6	317
上記以外の 単花蜜	国産	75%	LB	1.9	0.0	48
			UB	6.0	4.2	52
	海外産	30%	LB	4.4	0.5	39
			UB	8.4	4.4	42
合計	90	60%	LB	2.8	0.0	48
			UB	6.8	4.2	52
百花蜜	国産	69%	LB	6.2	0.0	444
			UB	10	4.2	446
	海外産	37%	LB	16	0.3	210
			UB	20	4.4	214
合計	120	81%	LB	8.6	0.0	444
			UB	13	4.2	446
EU ^注	1,116	8%	LB	20	12	267
			UB	36	28	278

注： EUの実態調査では、以下の17種の総ピロリジジナルカロイド類濃度を測定。なお、下線を引いたものは今回の我が国の実態調査と共通する分析種。

- ・アセチルエキミジン
- ・アセチルエキミジン窒素酸化物
- ・アセチルエキウミン窒素酸化物
- ・エキウミン
- ・エキウミン窒素酸化物
- ・エキウプラティン
- ・エキウプラティン窒素酸化物
- ・エキブルガリン
- ・エキブルガリン窒素酸化物
- ・エキミジン
- ・エキミジン窒素酸化物
- ・セネシフィリン
- ・セネシフィリン窒素酸化物
- ・センキルキン
- ・ヘリオトリン
- ・リコプサミン
- ・レトロールシン

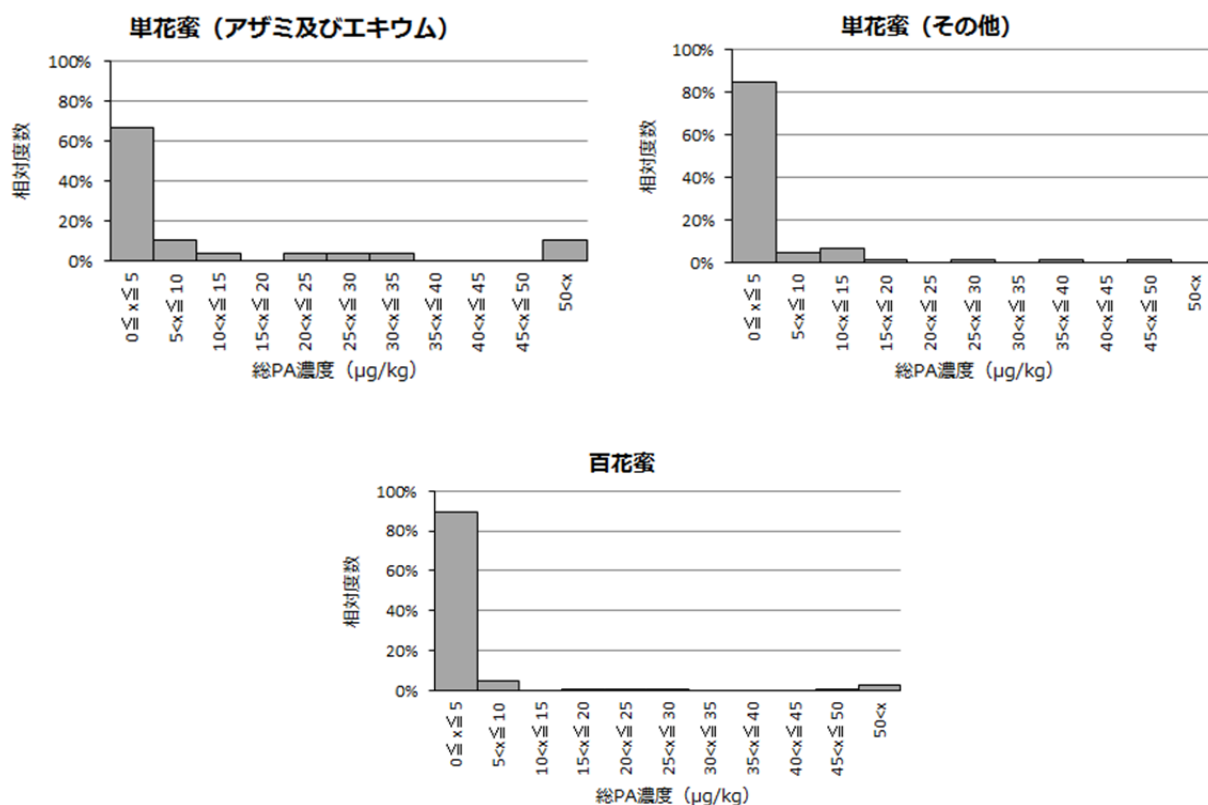


図2 はちみつ中の総ピロリジジナルカロイド類濃度の相対度数分布

4. 予備的な健康リスクの推定結果

今回実施した実態調査では、国内で販売されているはちみつ中の総ピロリジジナルカロイド類（17種類の合計）の濃度は、ほとんどが LOQ 付近か LOQ 未満であった。一部のはちみつでは、総ピロリジジナルカロイド類の濃度が欧州の実態調査における最大値（278 µg/kg）よりも高いものがあった。このため、今回の実態調査における総ピロリジジナルカロイド類の最大値（446 µg/kg）を示したはちみつのみを摂取した場合の経口摂取量を予備的に推定した（表8）。

表8 ピロリジジナルカロイド類の推定経口摂取量

	消費量(g/日)			平均体重 (kg)	ピロリジジナルカロイド類の推定経口摂取量 (µg/kg 体重/日)
	平均	中央値の 1/2	99.7 パーセントイル値***		
短期間	6.6*	—	32.7	55.4*	0.263
長期間	0.77**	—	—	55.1**	0.0062
	6.6*	1.95	—	55.4*	0.016

* 平成 27 年国民健康・栄養調査

** 平成 22 年度食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務

*** 平均値に標準偏差の絶対値の 3 倍を加算したもの

○ 短期間の経口摂取量

欧州食品安全機関（EFSA）は、800～1,700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日のピロリジジナルカロイド類の摂取を2週間続けた女兒に肝静脈閉塞性疾患（肝障害の一種）が生じた症例があることを報告²している。これは、報告されている症例のうち最も低い摂取量である。

今回の短期間の経口摂取量の推定では、国民一人が一日に摂取する砂糖・甘味料類³のほぼ最大値に等しい約33 gをすべてはちみつから摂取した場合のピロリジジナルカロイド類の推定経口摂取量は0.263 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日であった。これは、EFSAの報告において肝障害が生じたとされる最も低い用量である800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日の0.033%程度に過ぎず、最も高い濃度が検出されたはちみつを大量に食べると仮定しても健康に悪影響が生じる可能性は低いと考えられる。

○ 長期間の経口摂取量

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会合（JECFA）は、ピロリジジナルカロイド類のリスク評価を実施し、長期の動物試験に基づいてリデリンのBMDL₁₀⁴を182 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日と設定している。

農水省が推定した長期間の経口摂取量である0.016 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日は、国民一人が一日に摂取する砂糖・甘味料類の半分を毎日のはちみつから摂取すると仮定しており、実際の摂取量よりも過大と考えられる。この推定値とJECFAが設定したBMDL₁₀から計算した暴露マージン（MOE）は11000であった。また、はちみつの平均消費量を使用した場合は、ピロリジジナルカロイド類の推定経口摂取量は0.0062 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日であり、MOEは29000であった。

JECFAでは、一般に、遺伝毒性がある物質についてはBMDL₁₀との比較でMOEが概ね10000未満であると低減対策を実施する必要性が高く、MOEが10000以上であればリスク管理措置を実施する優先度は低いと考えられている。

以上のことから、はちみつ由来のピロリジジナルカロイド類の平均経口摂取量から算出したMOEは10000より大きく、健康リスクが無視できる程度であると言える。

5. 今後の取組

我が国で市販されているはちみつにおけるピロリジジナルカロイド類の含有濃度は、ヒトの健康に悪影響を与えるリスクは無視できるレベルであり、現時点で注意喚起等の特

³ 厚生労働省. 平成27年度国民・健康栄養調査

⁴ BMDL₁₀は、最近の国際的なリスク評価において毒性評価で用いられている指標で、動物試験等に基づく統計学的な用量-反応モデルから推定した、集団の10%に有害作用が生じる可能性がある用量の95パーセント信頼下限値を指す。

⁵ 独立行政法人国立健康・栄養研究所. 平成22年度食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務報告書

段の措置は要さないと考えられる。

一方、はちみつについては、1歳未満の乳児のはちみつの摂取による乳児ボツリヌス症のリスクが高いことから、引き続き、1歳未満の乳児には、はちみつを与えないよう注意喚起が必要である⁶。

また、今回は分析用標準試薬が入手可能な17種類のピロリジジナルカロイド類を調査の対象としたが、これ以外のピロリジジナルカロイド類がはちみつに含まれる可能性もある。今後、海外の含有実態の調査結果等も踏まえ、入手可能な分析用標準試薬が増えた場合には、追加の調査についても検討する。

⁶厚生労働省. ハチミツを与えるのは1歳を過ぎてから
<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000161461.html>