

飼料および飼料原料中におけるカビ毒の
高感度一斉分析法の確立と
汚染実態調査への適用に関する研究

小木曾 基樹

目 次

要 旨	1
第 1 章 序 論	4
第 2 章 ニジマスの筋肉および肝臓中の 6 種のアフラトキシン類の高感度 分析法	9
1) 緒 言	10
2) 材料および方法	13
(1) アフラトキシン類標準品および標準溶液ならびに試薬および器具	13
① アフラトキシン類標準品および標準原液	13
② アフラトキシン類混合標準溶液	13
③ 試薬および器具	13
(2) 試験に供した検体	13
(3) アフラトキシン類分析に用いた装置	14
(4) アフラトキシン類分離分析の高速液体クロマトグラフ測定条件	14
(5) 試験溶液の調製	15
3) アフラトキシン類の分析結果	18
(1) アフラトキシン類分析のための高速液体クロマトグラフ測定条件の検 討	18
① アフラトキシン M ₁ およびアフラトキシコールの蛍光誘導体化の検討	18
② 高速液体クロマトグラフ移動相条件の検討	18
(2) 高速液体クロマトグラフ用バイアルへのアフラトキシン類の吸着およ び定容溶媒によるピーク形状の変化の検討	20
(3) アフラトキシン類分析の前処理に用いたイムノアフィニティカラムの 検討	25

① アフラトキシコールのイムノアフィニティカラムへの保持の確認	25
② イムノアフィニティカラム由来の妨害ピークの除去	25
(4) アフラトキシン類の検量線	27
(5) アフラトキシン類の添加回収試験ならびに定量下限および検出限界	28
4) 考 察	32
第3章 とうもろこし含有飼料および飼料原料を汚染するトリコテセン系 カビ毒7種類の系統分析法の開発および汚染実態調査	33
1) 緒 言	34
2) 材料および方法	37
(1) トリコテセン類標準品, 標準溶液および試薬	37
(2) 試験に供した検体	37
(3) トリコテセン類分析に用いた装置	38
(4) トリコテセン類分析用試験溶液の調製	41
3) 結 果	44
(1) デオキシニバレノールによる抽出時間の検討	44
(2) トリコテセン類分析のための高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) および高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) 測定条件の検討	45
(3) トリコテセン類分析用前処理カラムの回収率の確認	52
(4) トリコテセン類の検量線	54
(5) トリコテセン類の添加回収試験	57
(6) 本法によるとうもろこし加工副産物および配合飼料の測定結果	58
4) 考 察	61

第4章	とうもろこし含有飼料および飼料原料へのデオキシニバレノール 定量用免疫化学分析キットの応用	63
1)	緒言	64
2)	材料および方法	66
(1)	トリコテセン類標準品および試薬	66
(2)	試験に供試したキット	66
(3)	試験に供試した検体	66
(4)	高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) によるデオキシニバレ ノールの測定	66
(5)	サンプルの前処理および測定	67
(6)	デオキシニバレノールと他の6種のトリコテセン類の交差反応性の 確認	67
(7)	共通抽出手順によるキット測定の検証	67
3)	結果	68
(1)	高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) およびキットによる測 定値の比較	68
(2)	デオキシニバレノールの抽出溶媒および抽出時間の評価	70
(3)	デオキシニバレノール検出におけるアセチルデオキシニバレノールの 影響	72
(4)	とうもろこし加工副産物および配合飼料に対する各キットの適用性の 確認	76
①	デオキシニバレノール測定における各キットの真度	76
②	デオキシニバレノール測定における各キットの精度 (再現性)	77
4)	考察	81

第 5 章 総合考察	83
第 6 章 結 論	88
参考文献	90
謝 辞	97

要 旨

カビ毒はカビの代謝産物であることから、アフラトキシン類やデオキシニバレノール (DON) といった広く認知されているものだけではなく、同様の危害性が知られている類似の化学構造を持つ誘導体が複数存在する。これらの物質に関する汚染実態の調査報告は少なく、いまだに十分認知されていない複合汚染のリスクが危惧される。著者は、カビ毒として各国で規制値が設定され、リスク管理上特に重要視されているアフラトキシン類および DON について、飼料又は動物組織を対象として、類縁体を同時に測定できる分析法の開発や測定試料の適用拡大について研究を行った。さらに、開発した分析法により、DON の高濃度汚染が危惧されているとうもろこし加工副産物について、トリコテセン類の汚染実態を調査した。

アフラトキシン類は強い発がん性、急性毒性を有するカビ毒で、肝臓を標的とすることが知られており、食品の輸入検査において毎年多くの違反事例が発生している。このアフラトキシン類にはアフラトキシン (AF) B₁, B₂, G₁ および G₂ の 4 種類の主要な誘導体があり、国内では飼料、ペットフードが AFB₁ で、食品が 4 種のアフラトキシン類の総量で規制されている。日常的に規制値以下のアフラトキシン類に汚染された食品や飼料が流通していることから、アフラトキシン類の汚染リスクを正確に把握するためには、より高感度なアフラトキシン類の分析法が望まれる。そこで、アフラトキシン類に汚染された飼料を摂取した動物の組織などの検査への適用を想定し、主要誘導体である 4 種のアフラトキシン類だけでなく、AFB₁ の代謝産物として知られるアフラトキシン M₁ (AFM₁) およびアフラトキシコール (AFL) を加えた計 6 物質を測定対象とする高感度一斉分析法の構築を試みた。ニジマスの筋肉および肝臓についてこれらのアフラトキシン類の濃度をそれぞれ 0.05 µg/kg となるように添加し、開発した試験法により繰り返し試験を行った。その結果、添加回収率は筋肉、肝臓ともに 70% 以上となり、繰り返し試験の結果から算出した検出限界は、筋肉で 0.002~0.007 µg/kg、肝臓で 0.004~0.012 µg/kg と、高感度で精度、真度ともに良好な試験法を確立することができた。

Fusarium 属のカビにより産生され、トリコテセンと呼ばれる共通の化学構造

を有する DON とその類縁体は、吐き気、おう吐、胃腸障害、めまい、下痢、頭痛などの急性中毒症状を引き起こすことが知られている。これら一群のカビ毒は複合汚染のリスクが高いことから、本研究では FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) により暫定耐容一日摂取量(グループ TDI) が設定された DON, 3-アセチルデオキシニバレノール (3AcDON) および 15-アセチルデオキシニバレノール (15AcDON) を含むトリコテセン類の 7 種の系統分析法の開発を行った。近年、バイオエタノール生産の副産物で、飼料原料とされる Distiller's Dried Grains with Solubles (とうもろこし蒸留かす ; DDGS) において DON の高濃縮が問題となっていることを考慮し、試験対象をとうもろこし加工副産物およびそれらを配合した飼料とした。この分析法について、コーングルテンミールに 7 種のトリコテセン類の濃度をそれぞれ 0.5 mg/kg となるように添加し、7 回の繰り返し試験を行ったところ、いずれの物質も回収率が 70~120% の範囲に収まり、相対標準偏差が 10% 未満の良好な再現性が得られた。さらに、本法により、国内で入手した DDGS 27 検体、コーングルテンフィード 39 検体、コーングルテンミール 36 検体および配合飼料 30 検体についてモニタリング調査を行った結果、これらの検体の主要汚染物質は DON, 3AcDON および 15AcDON で、その汚染量は DON が最も高く、ついで 15AcDON, 3AcDON の順であることが明らかとなった。

つぎに、とうもろこし加工副産物が DON により高濃度に汚染されている現状を踏まえて、DON 定量用のイムノクロマトキット 2 製品およびエライザキット 3 製品のとうもろこし加工副産物への応用について検討した。各キットの手順に従い、とうもろこし加工副産物の測定を行ったところ、イムノクロマトキット 1 製品およびエライザキット 2 製品で明らかに不正確な値が得られた。この要因として、とうもろこし加工副産物は低分子の夾雑物の含有量が高いことや、それらの夾雑物の影響で抽出液が酸性に傾くことにより、抽出不足、抗原-抗体反応の競合、抗体の変性などが生じている可能性が推測された。そこで、抽出時間を延長する、抽出液を中和するなどの改良を施し、5 つのキットに共通の抽出方法を構築した。この改良抽出法を用いて、とうもろこし加工品に対する適用を検証するにあたり、先に収集したとうもろこし加工副産物および配合飼料を利用することにした。しかしながら、抗原-抗体反応を利用する各キッ

トは、DON と類似した構造を有する他のトリコテセン類を DON と誤認する可能性が考えられること、これらの検体の大半は DON のみならずそのアセチル誘導体などの他のトリコテセン類にも汚染されていることから、各キットについてトリコテセン 6 種類の DON に対する交差反応性を調べ、モニタリングにより得られたトリコテセン類の測定結果を考慮して、交差反応性の影響が可能な限り小さく見積もられる検体を選択し、各キットの適用性を検証した。真度については、コーングルテンミールを用いて DON の繰り返し 7 回の添加回収試験を行った結果、いずれのキットも回収率が 80~120% の範囲内であった。さらに、精度については、3 種類のとうもろこし加工副産物および配合飼料について、2 種類の濃度で繰り返し 7 回の測定を実施した結果、相対標準偏差 (RSD) の最大は 11.3% であった。以上の結果から、著者の開発した前処理法を行うことにより、市販の DON 検出キットをとうもろこし加工副産物に適用できることが確認された。

第 1 章

序 論

カビ毒は経口摂取により，人または家畜に害を与えるカビの二次代謝産物とされる^{1),2)}。Ichinohe は冷夏多雨の異常気象が赤カビ病と深く関わりがあることを指摘しており，圃場に残された稲切り株に着生したカビの胞子が飛散し，赤カビ病の発生源になるとも述べている³⁾。また，Sunaga は麦類の赤カビ病防除について，収穫後の適切な乾燥調製の実施に取り組むべきとしている⁴⁾。さらに，Tsuruta は貯蔵穀類のカビ毒被害は，穀類の水分活性と貯蔵温湿度が大きく影響することを報告しており⁵⁾，Teller らはとうもろこし粒に物理的損傷があると，保管されているサイレージのカビ毒汚染のリスクが高まると述べている⁶⁾。このように，栽培から移送・保管までの全工程で適切な管理が施されていないと，農産物にカビが増殖し，カビ毒を多量に産生してしまう。農林水産省では麦類のデオキシニバレノール・ニバレノール汚染低減のための指針により，生産から消費までの適切な管理（フードチェーンアプローチ）が重要としており，この管理体制を維持するためには常に汚染状況を把握することが必要で，そのための検査を推奨している⁷⁾。Tabata はリンゴのパツリン汚染について，外皮の損傷からパツリン産生菌が侵入し，その傷がわずかなものであっても高濃度の汚染を引き起こすことがあることを報告している⁸⁾。また，Yamamoto は食品の微生物汚染の分布が不均一であることは過去の食品中毒事件でも明らかであるとし，落花生やツリーナッツのサンプリング方法を検証している⁹⁾。このようにカビ毒は産生カビの汚染部位に偏在していることから，カビ毒の汚染実態を適切に把握するためには，ある程度まとまった数の検査を実施しなければならない。さらに，Yoshizawa は過去に国内で起こった赤カビ中毒事例が，デオキシニバレノールおよびニバレノール以外のカビ毒も関係していることを示唆しており¹⁰⁾，ある種のカビ毒が検出された検体は他のカビ毒にも汚染されている可能性が高いことから，近年では一度の分析により多くのカビ毒を測定することが要求される。

食品や飼料への汚染が懸念されるカビ毒のうち，アフラトキシン類は非常に発がん性が強い¹¹⁾ため，その汚染を低レベルに管理することが重要である。国内においてアフラトキシン類は，飼料ではアフラトキシン B₁ (AFB₁) について幼畜および乳用牛用で 0.01 mg/kg，その他の畜種用で 0.02 mg/kg を，食品では AFB₁ に加え B₂，G₁ および G₂ の 4 種類の総量で 10 µg/kg を超えて含有しては

ならないとされている。これら代表的な 4 種類に加えて、最も毒性・発がん性が強く、汚染濃度が高い AFB₁ の代謝産物のうち、Galvano らの調査で乳から最大 23.5 ng/L 検出されているアフラトキシン M₁ (AFM₁) は¹²⁾汚染リスクが憂慮されている。また、アフラトキシコール (AFL) は Toledo ら、Troxel らおよび Loveland らの研究で、魚類の AFB₁ の代謝産物として報告されていることから¹³⁾⁻¹⁵⁾、アフラトキシン類に汚染された飼料を給餌された畜水産物を通じてヒトが微量に摂取している懸念がある。アフラトキシンの類縁体は IRAC でグループ 1 (発がん性がある) または 2A (おそらく発がん性がある) と評価されており、遺伝毒性を有する発癌物質群であることから、無毒性量 (NOAEL) を設定できないとされる¹⁶⁾。そのためアフラトキシン類の毒性評価は、アフラトキシン類の推定摂取量を、食品の汚染量調査と摂取量調査の結果から算出しており、汚染量調査に用いられる分析法はできるだけ高感度であることが望ましい。さらに、近年では食品安全委員会において、食品中のアフラトキシン M₁ およびその汚染源である飼料中のアフラトキシン B₁ の評価が進められており、将来的には主要なアフラトキシン類 4 種だけでなく、代謝産物を含めてアフラトキシン類を網羅的に測定することができる試験法のニーズが高まるものと考えられる。

デオキシニバレノール (DON) は胃腸管上部の損傷、悪心、嘔吐下痢を伴った急性胃腸炎、白血球数の急激な減少、めまい、頭痛、動悸などの神経症状、皮膚の出血といった急性中毒症状を引き起こす麦類で特に懸念されるカビ毒であるが、Tanaka や Morozumi らの調査ではとうもろこしでの汚染も確認されている^{17),18)}。近年では、Kim らが 2008 年にとうもろこし胚芽の約 2 倍の高タンパク質の特性を有する Distiller's Dried Grains with Solubles (とうもろこし蒸留かす; DDGS) について報告しており¹⁹⁾、それ以降 DDGS が飼料に配合されるようになった。一方で Zhang らは、DDGS では原料のトウモロコシと比べ、DON が約 3 倍に濃縮していることを報告しており²⁰⁾、DDGS の普及とともに DDGS における DON の高濃度汚染が問題となっている。食品では FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) により DON の類縁体である 3-アセチルデオキシニバレノール (3AcDON) および 15-アセチルデオキシニバレノール (15AcDON) の毒性が DON にほぼ匹敵するとされ、DON ならびに 3 およ

び 15AcDON の含量で暫定耐容一日摂取量（グループ TDI）が設定された²¹⁾。DON と共通化学構造を有するトリコテセン類の一斉分析や汚染事態調査の報告は多数存在するものの、DDGS について DON の汚染調査を実施した研究は Zhang らの報告^{20),22)}があるだけで、DON のアセチル誘導体汚染を調査した研究や、コーングルテンミールおよびコーングルテンフィードといった DDGS 以外のとうもろこし加工副産物についてトリコテセン類の汚染量を調査した研究はなく、とうもろこし加工副産物のトリコテセン類汚染の実態把握は飼料における重要な課題の一つといえる。

DDGS のように DON の汚染リスクが高い検体では、汚染状況を把握するために必要とされる検査点数が多くなり、試験期間の短縮、分析コストの軽減が求められる。そのため、ガスクロマトグラフや高速液体クロマトグラフなどを用いた高精度の機器分析による検査だけではなく、分析キットによる簡易スクリーニング測定のニーズが増す。しかしながら、Lupo らが Neogen 社製の Veratox DON キットが小麦、とうもろこし、大麦および米に対して高い正確さおよび再現性を有することを報告している²³⁾ように、市販の DON 検出キットは主に小麦などの穀物や小麦粉のような簡易な加工品、配合飼料を対象としており、DDGS などのとうもろこし加工品に対する応用までは示されておらず、これらのキットが適用対象を穀類などの農産物や配合飼料などの簡易な加工品に限定していることが、広く用いられることへの妨げとなっている。さらに、これらのキットは市販品であるがゆえにそれぞれ仕様が異なり、複数のキットを対象とした研究は、5 種類のキット製品について総アフラトキシンの規格基準判定への適用を調査した Sugita らの研究²⁴⁾と、DON 検査用キット 4 製品について 10 種類のフザリウム毒素の DON との交差反応性を評価した Tangni らの研究²⁵⁾が報告されているだけで、DON 検出用市販キットのとうもろこし加工副産物へ適用については検証されていない。

著者はこれらのカビ毒に関する課題を鑑み、アフラトキシン類の高感度一斉分析法およびトリコテセン類の系統分析法の開発を試みた。さらに、このトリコテセン類の系統分析法により、DDGS、コーングルテンミール、コーングルテンフィードといったとうもろこし加工副産物およびこれらを配合した飼料について、これまで報告されていない DON のアセチル誘導体を含むトリコテセ

ン類の汚染実態を調査した。また、5種類の市販 DON 測定用キットについて、前処理法の改良を検討し、とうもろこし加工副産物およびそれらを配合した飼料に対する適用性を検証した。

第 2 章

ニジマスの筋肉および肝臓中の
6種のアフラトキシン類の高感度分析法

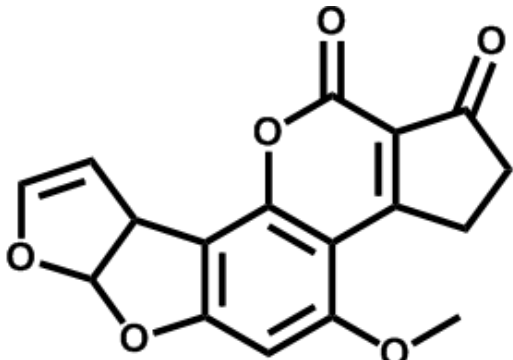
1) 緒言

Aspergillus 属の一部のカビが産生するアフラトキシン類は，IARC (International Agency for Research on Cancer) により，グループ 1 (発がん性がある) またはグループ 2A (恐らく発がん性がある) とされる自然界に存在する強力な発がん性物質群として知られているだけでなく，ケニヤでは 125 名以上のヒトの死亡が Lewis らにより報告される²⁶⁾ほどの強い急性毒性を有している。わが国では，食品についてアフラトキシン (AF) B₁，B₂，G₁ および G₂ の総量で 10 µg/kg を超えて含有してはならないとされているが，Utsumi は平成 21 年度 1 年間の輸入検査で，とうもろこしなどの 14 種類の農作物で 100 件以上のアフラトキシン類の違反があることを報告しており²⁷⁾，小西らは，落花生などの種実類，はと麦などの穀類，香辛料類などの国内流通品が基準値以下のアフラトキシン類に汚染されていると述べている²⁸⁾。このような背景からは，ヒトが日常的に規制値以下の低レベルでアフラトキシン類に汚染された農作物を摂取していると考えられ，さらに農作物と同様にアフラトキシン類に汚染した飼料が家畜に給与された結果，ヒトがアフラトキシン類に汚染された蓄水産物を間接的に摂取している可能性も示唆される。アフラトキシン類は遺伝毒性発がん物質であることから，無毒性量 (NOAEL) を設定できないとされており¹⁶⁾，規制値以下の低レベルでのアフラトキシン類の汚染実態を把握し，暴露マージンを詳細に調べるためには高感度分析が必要となり，その検出レベルは低いほど好ましい。さらに，アフラトキシン類の汚染実態を広範に調査するためには，分析法が一般の実験室で容易に実施できることも重要である。

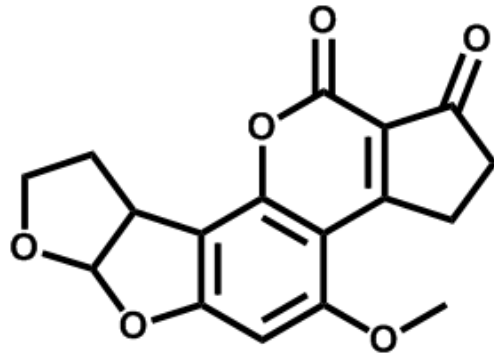
近年のアフラトキシン類の汚染調査では，Prado ら，Mushtaq らおよび Yazdanpanah らは高速液体クロマトグラフ-蛍光検出器 (HPLC-FL) を採用し²⁹⁾⁻³¹⁾，アフラトキシン類の汚染実態を報告している。一方，Spanjer らおよび Wang らは高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) により，オクラトキシン A，ゼアラレノン，デオキシニバレノール，フモニシンおよび T-2 トキシンといった他のカビ毒を同時に測定する一斉分析法による調査を実施している^{32),33)}。いずれの方法においても検出オーダーは低くとも 0.01 ppb までで報告されていることから，本研究では一般の実験室でも利用が可能で，ppt レベルの

アフラトキシン類を検出可能な分析法の確立を試みた。著者は試験溶液の精製前処理に抗原-抗体反応を利用した選択性の高いイムノアフィニティカラムを、検出に LC-MS よりも汎用性の高い HPLC-FL を採用している食品検査に用いられる公定法³⁴⁾を基に、アフラトキシン類の高感度一斉分析法の検討を行った。

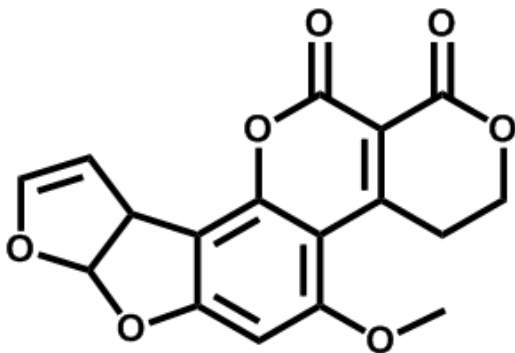
畜産物では Galvano らが AFB₁ の代謝産物の一つであるアフラトキシン M₁ (AFM₁) の乳での汚染を報告しており¹²⁾、現在 AFM₁ は食品安全委員会でリスク評価が進められている。一方、水産物では、AFB₁ の代謝に関する研究において、Toled らがメダカで、Troxel らがゼブラフィッシュで、いずれもアフラトキシコール (AFL) への変換を確認しており^{13),14)}、Loveland らのニジマスの研究では AFL だけでなく AFM₁ を代謝産物として報告している¹⁵⁾。そこで著者は、乳や乳製品または畜水産物において、低レベルでの汚染の可能性が考えられる AFM₁ および AFL を、一般に食品、飼料などの主要汚染カビ毒である AFB₁, B₂, G₁ および G₂ の 4 種類に加えて、測定対象とすることとした (Fig.1)。さらに、本試験法は AFB₁ の代謝産物を高感度に測定できることから、汚染実態調査の用途としてだけでなく、代謝産物の測定にも利用できることを確認するために、試験対象をニジマスの筋肉および肝臓とした。



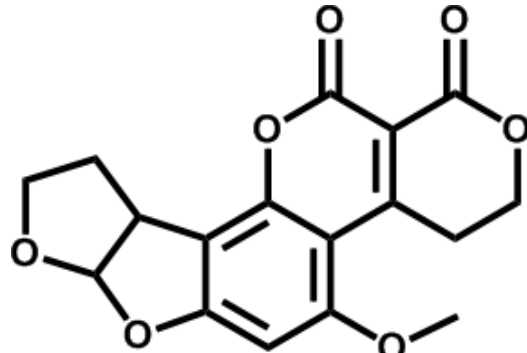
アフラトキシン B₁ (AFB₁)



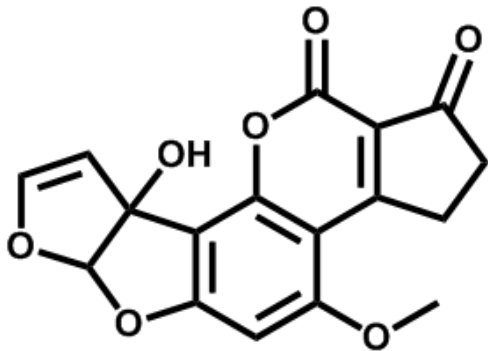
アフラトキシン B₂ (AFB₂)



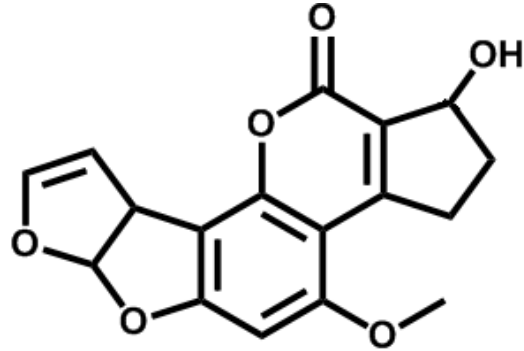
アフラトキシン G₁ (AFG₁)



アフラトキシン G₂ (AFG₂)



アフラトキシン M₁ (AFM₁)



アフラトキシコール (AFL)

Fig.1 測定対象物質

2) 材料および方法

(1) アフラトキシン類標準品および標準溶液ならびに試薬および器具

①アフラトキシン類標準品および標準原液

AFB₁, B₂, G₁, G₂および AFL は各標準品をそれぞれアセトニトリルに溶解し, 10 µg/mL のアセトニトリル溶液を調製し, 標準原液とした。AFM₁ は 10 µg/mL のアセトニトリル溶液の状態でも市販されているものを使用した。いずれも Sigma-Aldrich 社製のものをを用いた。

②アフラトキシン類混合標準溶液

各アフラトキシン類 10 µg/mL アセトニトリル溶液を混合, 希釈し, 40 µg/L のアセトニトリル-水 (1:1 v/v) 溶液を調製した。これを適宜アセトニトリル-水 (1:1 v/v) 溶液で希釈し, 0.04~2 µg/L のアフラトキシン類の混合標準溶液を調製した。

③試薬および器具

高速液体クロマトグラフ (HPLC) の移動相に用いたアセトニトリルおよびメタノールは HPLC 用, 抽出および精製に用いたアセトニトリルは残留農薬試験用を使用した。その他, ガラス繊維ろ紙は Whatman934AH (11cm, Whatman International Ltd.社製), イムノアフィニティカラム (IAC) は AFLAKING (堀場製作所(株)製), 合成樹脂 (ポリプロピレン) バイアルは GLサイエンス(株)製を使用した。また, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS 溶液) は Sigma-Aldrich 社製の Phosphate Buffered Saline Tablet 1錠を水 200 mL に加え, 溶解したものをを用いた。

(2) 試験に供試した検体

体重およそ 10~20 g の富士養鱒漁業協同組合から購入したニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の筋肉と肝臓を複数匹から採取し, それぞれ必要量をフードプロセッサーで磨細・混合して使用した。

(3) アフラトキシン類分析に用いた装置

高速液体クロマトグラフ（HPLC）は島津製作所（株）製 LC-20AD シリーズ，ポンプ，デガッサー，恒温槽，オートサンプラー，蛍光検出器（RF-10Ax1s）およびデータ処理装置から構成されるシステムを用いた。また，分析カラムと検出器間に AURA INDUSTRIES INC.社製のフォトケミカルリアクター；Photochemical Reactor for Enhanced Detection（PHRED）を装着した。

(4) アフラトキシン類分離分析の高速液体クロマトグラフ測定条件

分析カラム；TSK gel ODS-100V（東ソー（株）製，内径 4.6 mm，長さ 15 cm，粒子径 3 μ m），カラム温度；40 $^{\circ}$ C，移動相；水-メタノール-アセトニトリル（6:2:2 v/v），流量；0.7 mL/min，測定；蛍光励起波長 365 nm，蛍光測定波長 450 nm（AFB₁，B₂，G₁，G₂および M₁），蛍光励起波長 333 nm，蛍光測定波長 418 nm（AFL）；注入量；30 μ L

(5) 試験溶液の調製

あらかじめフードプロセッサーで均質化したニジマスの筋肉または肝臓をブレンダーカップにそれぞれ 10 g 量り取り、アセトニトリル-水 (9:1 v/v) 30 mL を加え、ワーリングブレンダーで 5 分間かくはん後、1,600 ×g で 5 分間遠心分離した。得られた上澄み液を脱脂綿でろ過した後、アセトニトリル-水 (9:1 v/v) で 50 mL に定容したものを抽出液とした。この抽出液 10 mL を分取し、PBS 溶液で 50 mL に定容後、ガラス繊維ろ紙 (Whatman934AH) でろ過した。ろ液 40 mL を、あらかじめ水 5 mL およびアセトニトリル 5 mL で洗浄し、水 10 mL および PBS 溶液 10 mL で置換したイムノアフィニティカラム (IAC) に負荷し、さらに PBS 溶液 10 mL、水 10 mL の順で洗浄した。注射筒でカラム内の水分を押し出し除去した後、アセトニトリル 3 mL により溶出した。得られた溶出液を窒素ガス気流下で濃縮乾固した後、残留物をアセトニトリル-水 (1:1 v/v) 1 mL を加えて超音波処理を行って溶解し、試験溶液とした (Fig.2)。得られた試験溶液を合成樹脂 (ポリプロピレン製) バイアルに充填し、HPLC 測定を実施した。

なお、この試験に用いた検量線より算出される定量下限は、以下の式により 0.025 µg/kg となる。

$$0.04 \mu\text{g/L} \times 1 \text{ mL} \times 50 \text{ mL} / 40 \text{ mL} \times 50 \text{ mL} / 10 \text{ mL} \times 1 / 10 \text{ g} = 0.025 \mu\text{g/kg}$$

検体 10 g

└ アセトニトリル-水 (9:1 v/v) 30 mL

ホモジナイズ抽出 5 分間

|

遠心分離 (1,600 ×g, 5 分間)

|

上澄み

|

綿栓ろ過

└ アセトニトリル-水 (9:1 v/v)

50 mL 定容

|

10 mL 分取

└ PBS 溶液

50 mL 定容

|

ろ過 (Whatman934AH)

|

ろ液 40 mL

|

イムノアフィニティカラム (AFLAKING)

コンディショニング ; 水 5 mL, アセトニトリル 5 mL, 水 10 mL

および PBS 溶液 10 mL

洗浄 ; PBS 溶液 10 mL, 水 10 mL

溶出 ; アセトニトリル 3 mL

溶出液

|

*

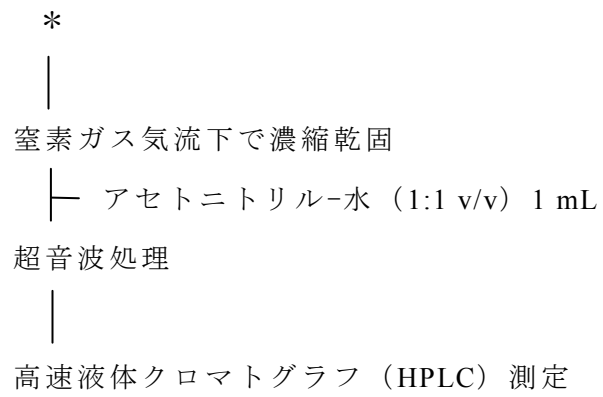


Fig.2 アフラトキシン類の高感度分析法の分析操作手順

3) アフラトキシン類の分析結果

(1) アフラトキシン類分析のための高速液体クロマトグラフ測定条件の検討

①アフラトキシン M₁ およびアフラトキシコールの蛍光誘導体化の検討

国内では、一般的に総アフラトキシンと呼ばれる AFB₁, B₂, G₁, G₂ を測定する際、AFB₁ および G₁ の検出感度を上げるため、トリフルオロ酢酸 (TFA) による蛍光誘導体化や PHRED によるポストカラム蛍光誘導体化が用いられている。そこで、これらの手法について AFM₁ および AFL の適用の可否を検証した。

公定法に従って TFA による誘導体化操作を行ったところ、AFL はピークが確認できなくなり、AFM₁ は反応が完全に進まず、ピークが 2 本に分かれた (Fig.3)。一方、PHRED による蛍光誘導体化では 6 種のアフラトキシン類全てが単一ピークとして検出されたため、本法では PHRED による誘導体化を選択した。

②高速液体クロマトグラフ移動相条件の検討

公定法の HPLC 条件では AFG₂ と M₁ が分離しないことから (Fig.4)、本法の測定対象である 6 種のアフラトキシン類が分離する条件を検討した。その結果、公定法の移動相であるメタノール-水 (4:6 v/v) を水-メタノール-アセトニトリル (6:2:2 v/v) に変更することにより、良好な分離が得られた。また、AFL の蛍光検出条件は、Kusssak らの報告に準じ、測定波長を蛍光励起波長 ; 333 nm, 蛍光測定波長 ; 418 nm とした³⁵⁾。

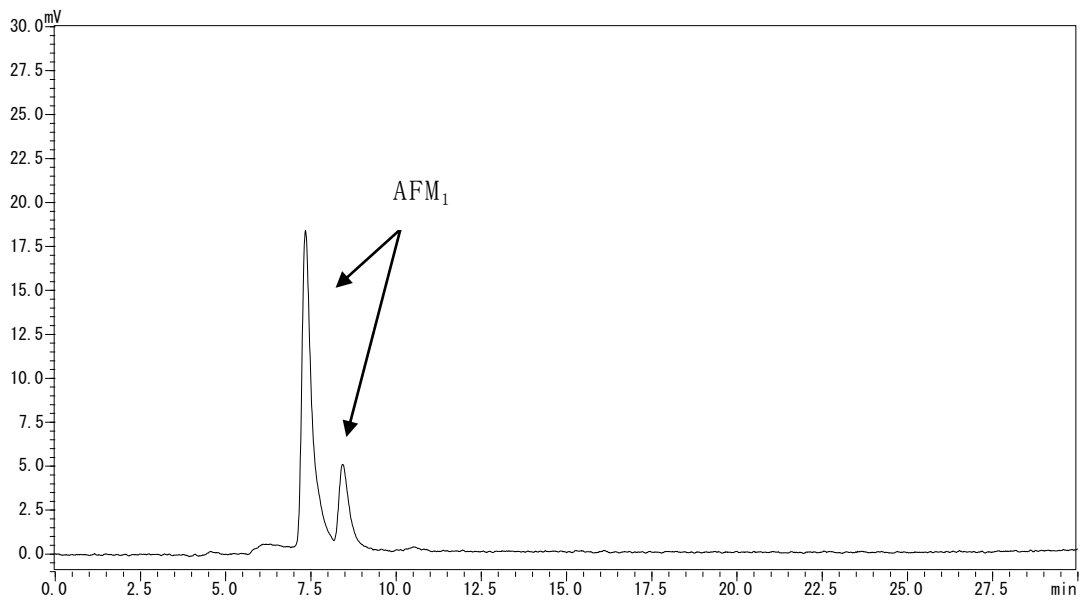


Fig.3 AFM₁ を公定法により TFA 誘導体化したものの
高速液体クロマトグラム

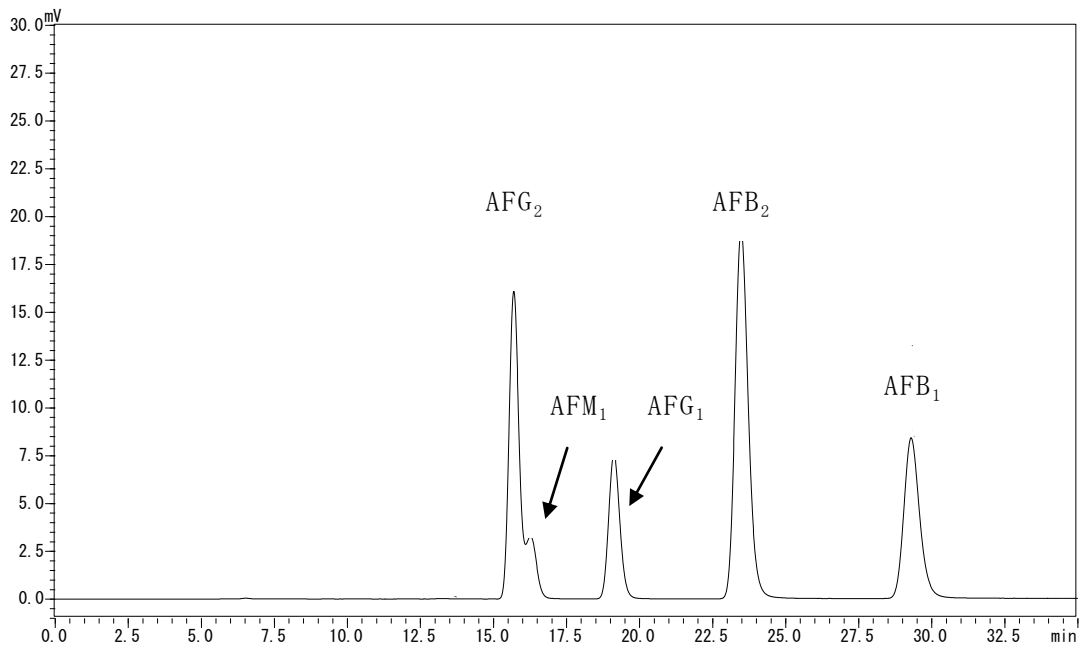
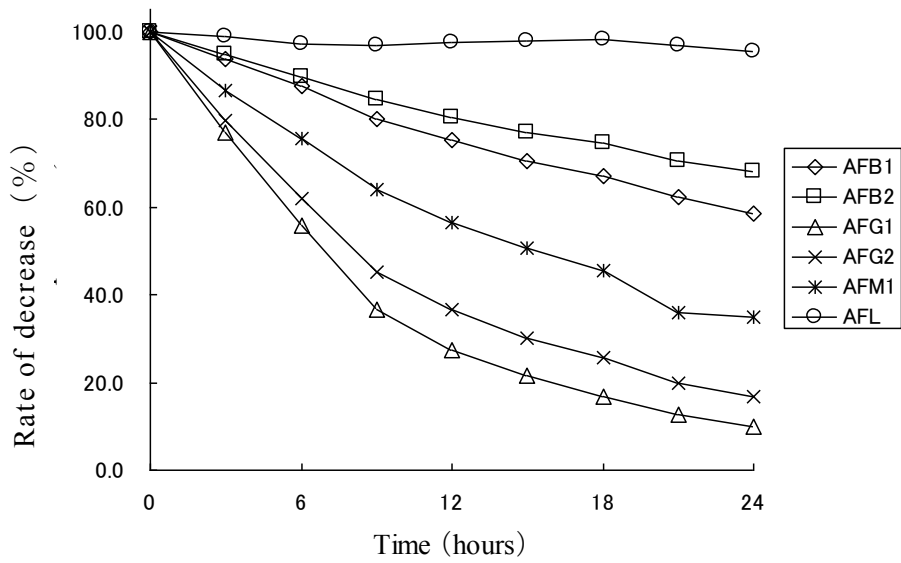


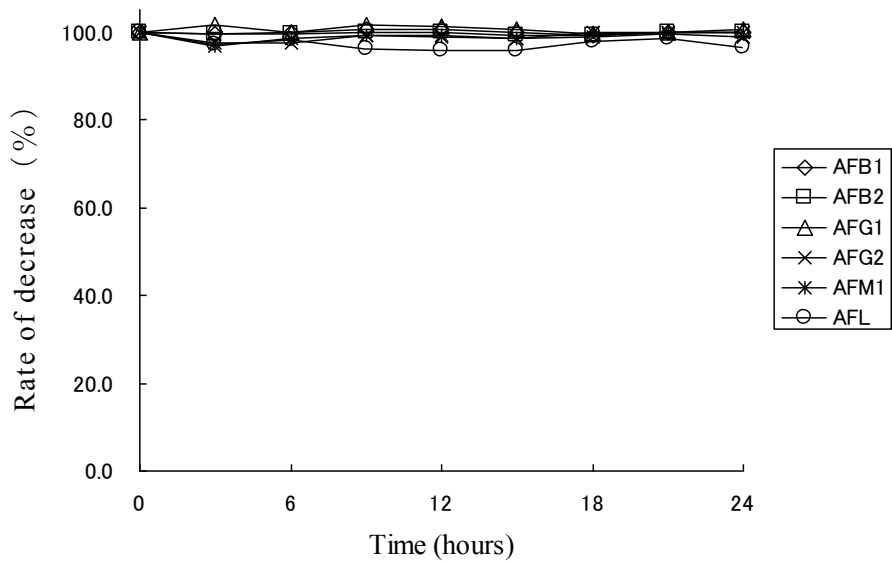
Fig.4 公定法による 5 種類のアフラトキシン標準溶液の
高速液体クロマトグラム

(2) 高速液体クロマトグラフ用バイアルへのアフラトキシン類の吸着および定容溶媒によるピーク形状の変化の検討

公定法に従い、イムノアフィニティカラム (IAC) の溶出液を乾固した後に溶解する溶媒の組成をアセトニトリル-水 (1:9 v/v) としたところ、低濃度域で検量線の直線性が悪く、時間の経過とともにアフラトキシン類の濃度が低下した。これはガラス器具への吸着に起因するものと推察されたことから、アセトニトリル-水 (1:9 v/v) で調製した約 0.02 µg/L のアフラトキシン類混合標準溶液を、一般的なガラスバイアル、公定法で推奨されているシリル化処理後 20%アセトニトリル水溶液であらかじめ洗浄したバイアルおよび合成樹脂 (ポリプロピレン製) バイアルにそれぞれ分注し、経時的に HPLC 測定を行い、減衰を確認した。その結果、AFL を除く 5 物質でガラスバイアル、シリル化バイアルともに検出値の減少が認められ、減少の程度はガラスバイアルが最も著しかった。一方、合成樹脂バイアルでは 6 物質ともに減少は認められず、安定した結果が得られたことから (Fig.5)、本法では合成樹脂 (ポリプロピレン製) バイアルを使用することとした。



(a) シラン処理を施したガラスバイアルを
20%アセトニトリル溶液で洗浄したもの



(b) 合成樹脂（ポリプロピレン製）バイアル

Fig.5 バイアルの材質の違いによるアフラトキシン類
(各 0.02 $\mu\text{g/L}$ 溶液) の検出値の変化

そこで、この合成樹脂バイアルを採用し HPLC 測定を行ったところ、標準溶液の注入再現性は改善されたが、AFB₁ を含有するニジマスの筋肉を測定した際に、最大 2 倍近くの注入変動が確認された。これは IAC の溶出液を乾固した後に溶解する溶媒中の水の割合が高いため、残留物中の AFB₁ が溶媒に完全に溶解していないことによるものと考えられた。

この溶媒中のアセトニトリルの割合を増やすと、残留物中のアフラトキシン類が溶解しやすくなることが期待される一方で、クロマトグラム上でのアフラトキシン類のピーク形状がブロードになることが予想されることから、溶媒中のアセトニトリルの割合と注入量の間関係を調べた。その結果、アセトニトリル-水 (1:9 v/v) から (3:7 v/v) では 100 μ L を注入してもピーク形状が良好であったが、アセトニトリル-水 (1:1 v/v) では 30 μ L まで、アセトニトリル-水 (9:1 v/v) では 10 μ L までの注入が可能であった (Table 1)。

水の割合が多いとアフラトキシン類が完全に溶解しない恐れがあるため、IAC の溶出液を乾固した後に溶解する溶媒の組成をアセトニトリル-水 (1:1 v/v)、注入量 30 μ L とし、ニジマスの筋肉を測定したところ、良好な再現性が得られるようになった (Fig.6)。

Table 1 定容溶媒の組成によるアフラトキシン類のピーク形状

定容溶媒の組成 (アセトニトリル-水)	注入量 (μL)	ピーク形状
6 : 4	10	幅広
5 : 5	50	幅広
	30	良好
3 : 7	100	良好
1 : 9	100	良好

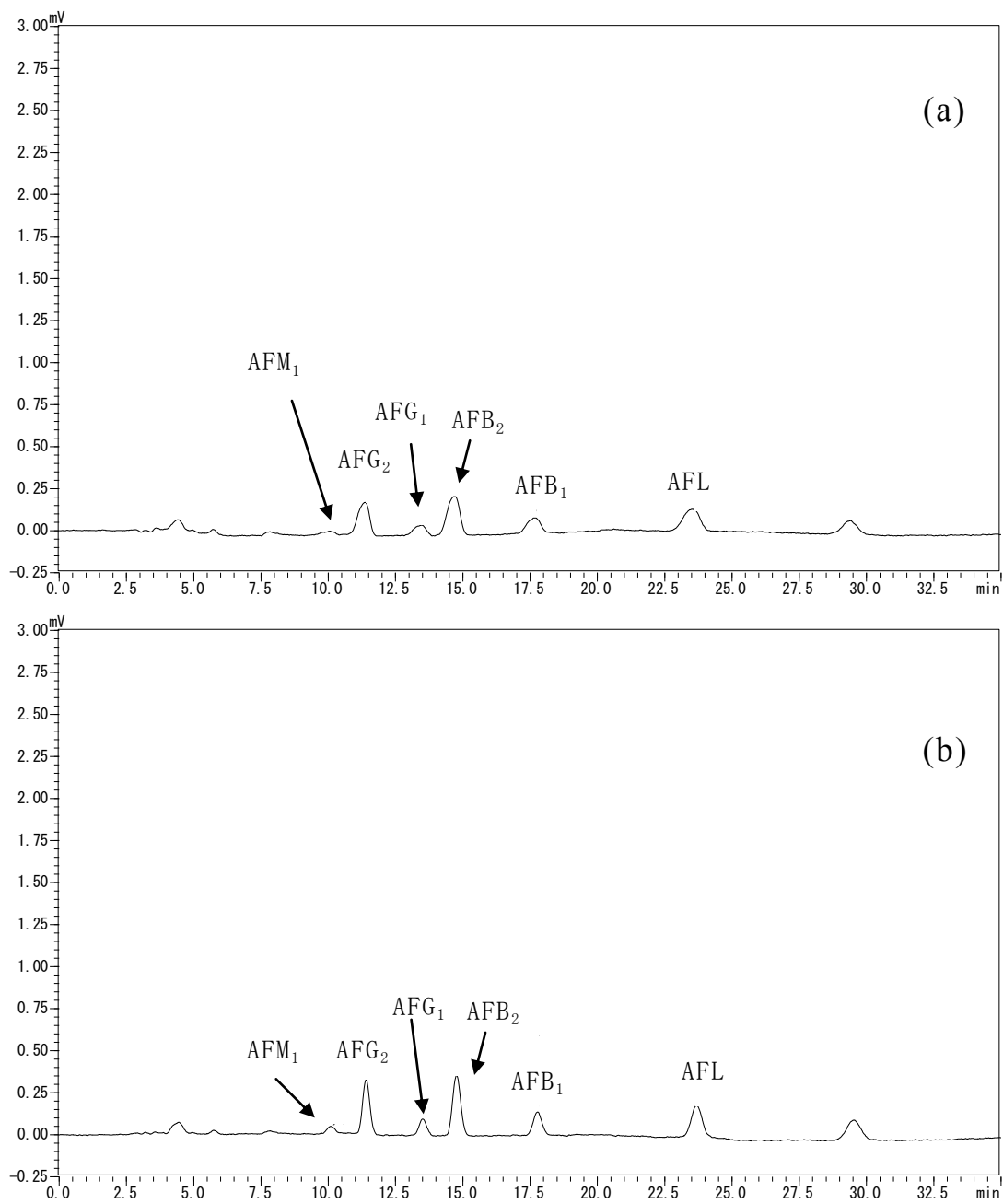


Fig.6 アフラトキシン類標準溶液 (0.02 $\mu\text{g/L}$, 30 μL) の
高速液体クロマトグラム例

(a) 定容溶媒組成 ; アセトニトリル-水 (7:3 v/v)

(b) 定容溶媒組成 ; アセトニトリル-水 (5:5 v/v)

(3) アフラトキシシン類分析の前処理に用いたイムノアフィニティカラムの検討

①アフラトキシコールのイムノアフィニティカラムへの保持の確認

一般にアフラトキシシン類の試験法では、公定法と同様に多機能カラムまたは IAC による精製法が用いられるが、著者は選択性の優れた IAC による精製法を採用し、市販品の中で耐溶媒性が高いといわれる Miyake らが開発した AFLAKING (堀場製作所(株)製)³⁶⁾を用いることにした。AFLAKING は今回の試験対象物質のうち AFL への適用が確認されていないため、IAC への添加回収試験を行った結果、アセトニトリル 3 mL により 100% 溶出され、他のアフラトキシシン類と同様に適用できることが確認された (Table 2)。

②イムノアフィニティカラム由来の妨害ピークの除去

本法は、一般の食品などの検査に比べて低濃度のアフラトキシシン類を分析対象としているため、通常分析法では問題にならないカラム由来の微量の溶出物の存在が無視できなかつた。カラムのブランク溶出液を測定したところ、AFB₁ の保持時間付近に痕跡程度のわずかなピークが確認された。IAC は測定対象物質を抗体により補足する。その後、有機溶媒を通液することにより、抗体を変性させて測定対象物質を溶出させるため、一般的に有機溶媒によるプレカラム洗浄は行われなかつた。しかしながら、川村は IAC が再利用できること報告しており³⁷⁾、このことから溶出操作後の変性した抗体の再使用が可能であると考えられた。そこで、あらかじめ IAC を使用前に溶出溶媒 (アセトニトリル) で洗浄することにより、妨害成分を溶出させることにした。すなわち、IAC を水 5 mL、アセトニトリル 5 mL の順に洗浄し、さらに水 10 mL および PBS 溶液 10 mL の順に置換する操作を加えた。その結果、問題のピークは消失した (Fig.7)。

Table 2 アフラトキシン類の IAC における回収率

	(%)					
測定対象物質	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFL
添加回収率	95	94	98	101	99	100

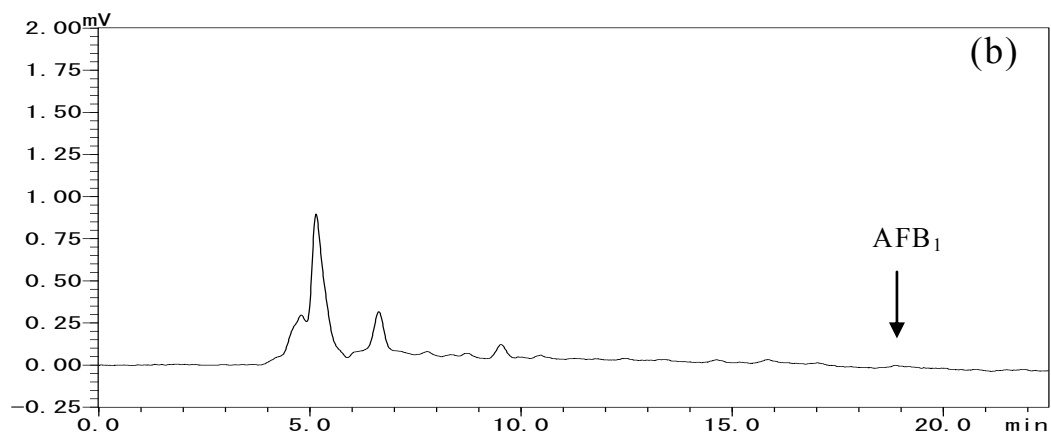
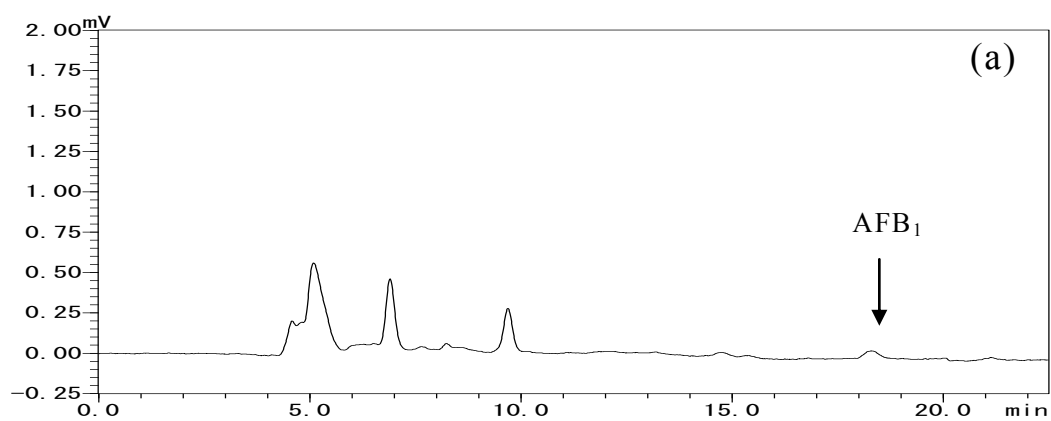


Fig.7 IAC の予備洗浄の有無によるクロマトグラムの違い

(a) 予備洗浄なし, (b) 予備洗浄実施

(4) アフラトキシン類の検量線

6種のアフラトキシン類は、いずれも 0.04~2 $\mu\text{g/L}$ の低濃度域から広範囲にわたって $r=0.9999$ 以上の良好な直線性が確認された (Fig.8)。

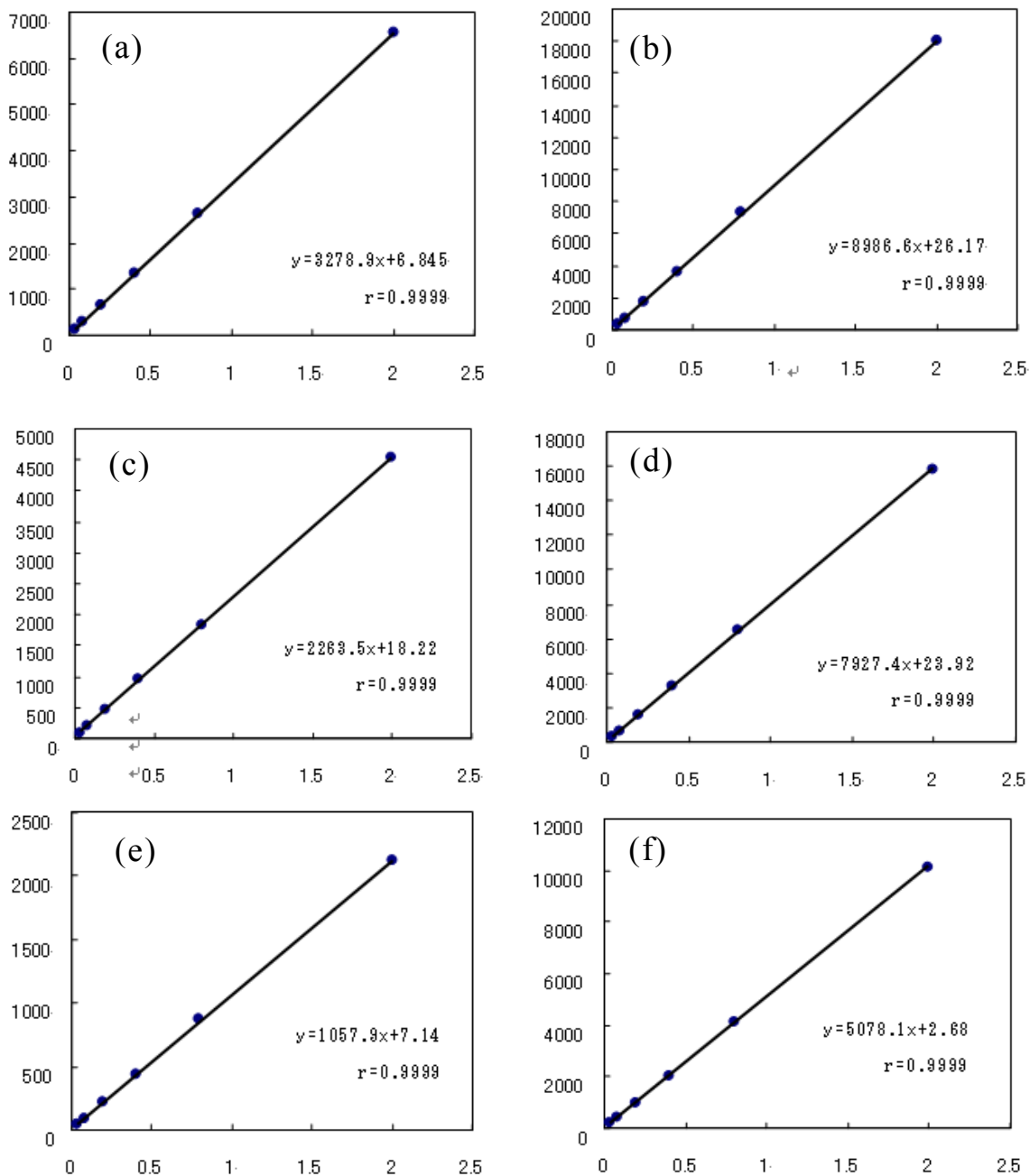


Fig.8 アフラトキシン類の検量線

(a) AFB₁, (b) AFB₂, (c) AFG₁, (d) AFG₂, (e) AFM₁, (f) AFL

(5) アフラトキシン類の添加回収試験ならびに定量下限および検出限界

あらかじめ各アフラトキシン類が含まれていないことを確認したニジマスの筋肉および肝臓にそれぞれのアフラトキシン類の濃度が $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ となるように添加し、併行 7 回で繰り返し試験を行った (Fig.9 および 10)。

添加回収率を Table 3 に示した。さらに、得られた測定結果の標準偏差から次式に従って、検出限界 (LOD) および定量下限 (LOQ) を算出した³⁸⁾。その結果を Table 4 に示した。

$$\text{LOD} ; 2 \times t (n-1, 0.05) \times \text{標準偏差} = 2 \times 1.943 \times \text{標準偏差}$$

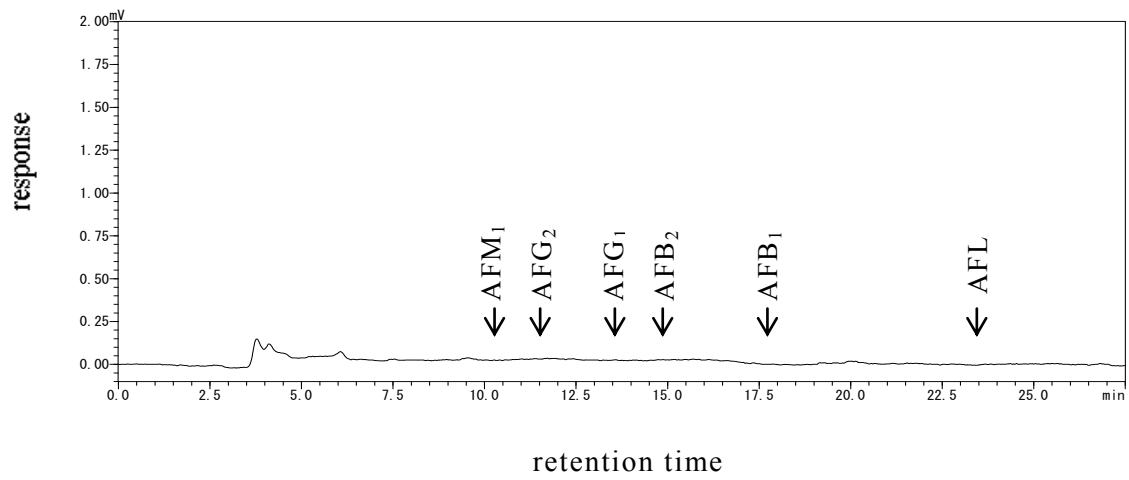
$$\text{LOQ} ; 10 \times \text{標準偏差}$$

$t (n-1, 0.05)$; 自由度 $n-1$ のときの危険率 (片側) 5% (繰り返し数 7 で試験を行っているので、本試験の自由度は 6 になる) の t -分布表の値 (1.943)

なお、本法において最も検出感度の劣る AFM_1 について、一般的に定量下限の指標となる S/N (シグナル/ノイズ比) = 10 となるのは約 $0.02 \mu\text{g}/\text{kg}$ 相当であり、Table 4 の $0.017 \mu\text{g}/\text{kg}$ とほぼ同などのレベルであることが確認された。

さらに、アフラトキシン類の濃度が $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ となるように添加し、繰り返し 3 回で添加回収試験を行った結果、これについても Table 5 に示すように良好な結果が得られた。

(a) 無添加区



(b) 添加区 (0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

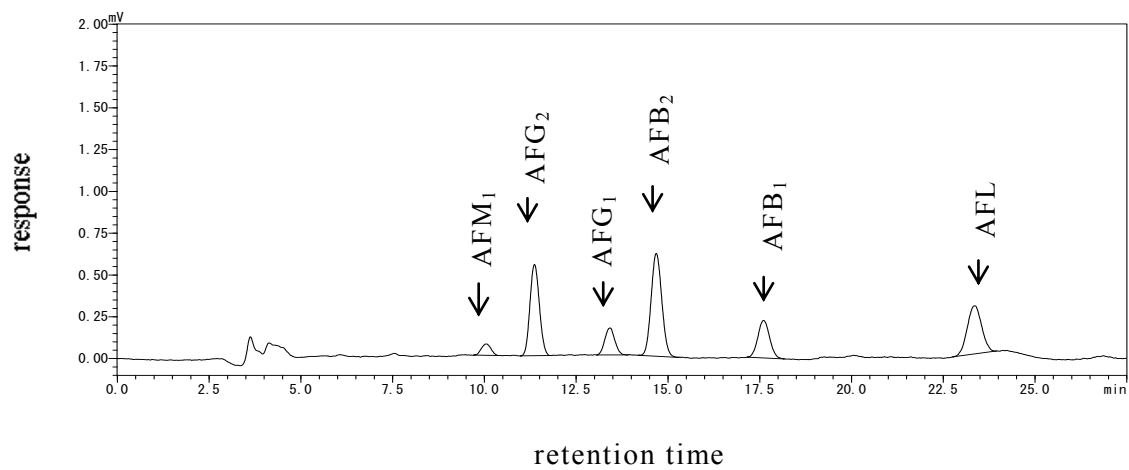
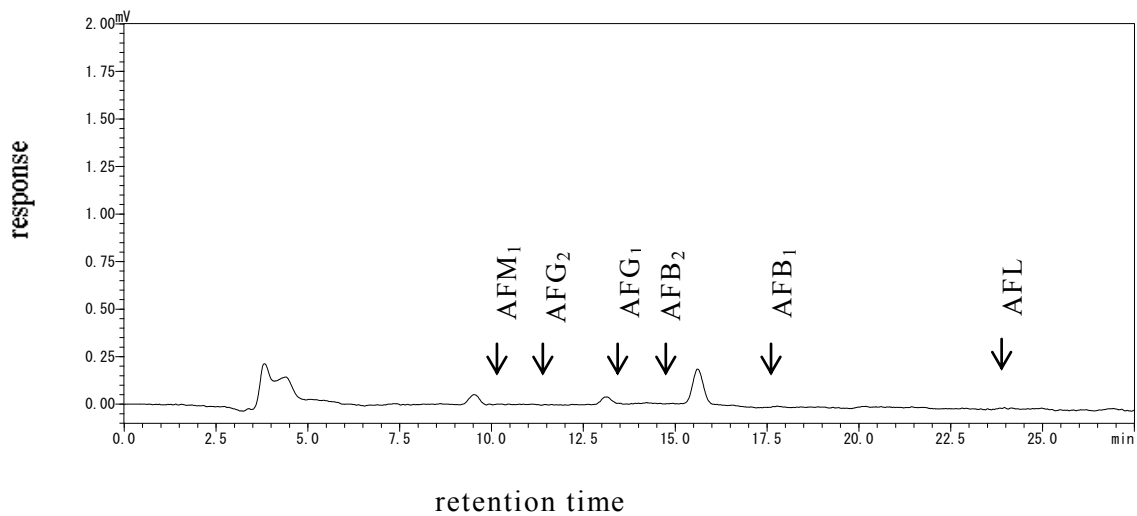


Fig.9 ニジマスの筋肉のクロマトグラム例

(c) 無添加区



(d) 添加区 (0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

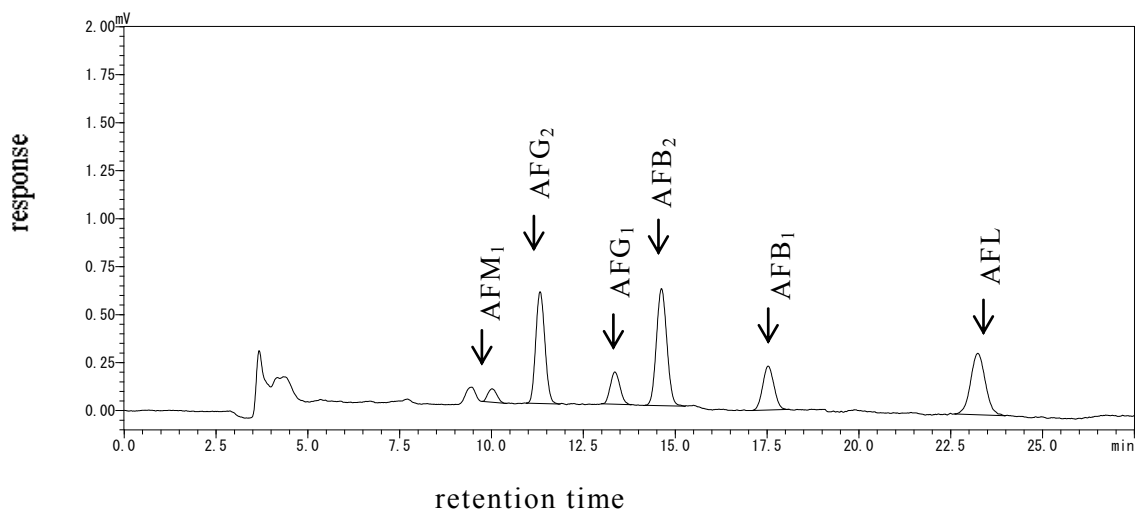


Fig.10 ニジマスの肝臓のクロマトグラム例

Table 3 ニジマスの筋肉および肝臓の添加回収率

(0.05 µg/kg 添加, n=7)

		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFL
筋肉	平均 (%)	81.0	82.3	76.6	82.4	73.2	71.4
	標準偏差 (%)	1.5	0.87	3.1	2.5	4.6	4.5
肝臓	平均 (%)	93.0	87.9	88.5	91.8	87.7	80.1
	標準偏差 (%)	6.2	5.5	4.8	3.2	4.6	2.0

Table 4 ニジマスの筋肉および肝臓の検出限界および定量下限

		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFL
筋肉	検出限界 (µg/kg)	0.003	0.002	0.005	0.004	0.007	0.006
	定量下限 (µg/kg)	0.007	0.004	0.012	0.011	0.017	0.017
肝臓	検出限界 (µg/kg)	0.012	0.010	0.009	0.006	0.008	0.004
	定量下限 (µg/kg)	0.029	0.024	0.022	0.015	0.021	0.008

Table 5 ニジマスの筋肉および肝臓の添加回収率

(0.5 µg/kg 添加, n=3)

		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFL
筋肉	平均 (%)	84.9	86.7	87.7	88.7	86.0	77.7
	標準偏差 (%)	0.49	0.42	0.93	0.36	0.44	0.77
肝臓	平均 (%)	98.3	97.5	101.6	98.3	96.7	83.7
	標準偏差 (%)	0.41	0.99	0.37	0.92	1.0	1.7

4) 考 察

著者は、ニジマスの筋肉および肝臓を検体として、AFB₁、B₂、G₁、G₂、M₁ および AFL の 6 種のアフラトキシン類について、検出限界 0.002~0.012 µg/kg で一斉に測定することができる試験法を確立した。本法は、近年報告されているアフラトキシン類を対象とした汚染調査の報告 (Prado ら, Mushtaq ら, Yazdanpanah ら, Spanjer らおよび Wang ら)²⁹⁾⁻³³⁾と比較して、より高感度にアフラトキシン類を検出可能であるというだけでなく、AFB₁の主要代謝産物である AFM₁ および AFL を同時に測定することを可能とした新たな試験法である。なお、Nomura らは AFB₁ を添加した飼料をニジマスに給餌し、経時的にニジマスの筋肉および肝臓中の AFB₁、AFM₁ および AFL の濃度を調べ、経口摂取による AFB₁ の主要代謝産物が AFL であり、一部が AFM₁ にも変換されていることを報告している³⁹⁾。この研究において、ニジマス組織中の各アフラトキシン類の含有濃度を著者の高感度分析法により測定していることから、本試験法のアフラトキシン類の代謝産物測定への適用はすでに実証されている。著者が開発した試験法はもともと食品を対象とする公定法であり、クロマトグラム上に検出される妨害成分が多く、高マトリックスであるがゆえに添加回収率も悪くなりがちな難サンプルである肝臓に適用できたことを考慮すると、食品、飼料などの微量汚染調査や、家畜や魚類を対象とした代謝産物研究など、様々な事案への活用が期待される。

さらに、アフラトキシン類を低レベルで測定する検討の過程において、著者はこれまで報告されていない水の割合が多い溶媒中でのアフラトキシン類のガラスへの吸着、イムノアフィニティカラムに由来するわずかな測定妨害成分の溶出、AFL のイムノアフィニティカラムへの保持を確認し、諸問題への対応策を示した。これらの知見は、アフラトキシン類の高感度検出に関する有用な情報を明らかにしたものと見える。

第 3 章

とうもろこし含有飼料および飼料原料を汚染する
トリコテセン系カビ毒 7 種類の系統分析法の開発および汚染実態調査

1) 緒言

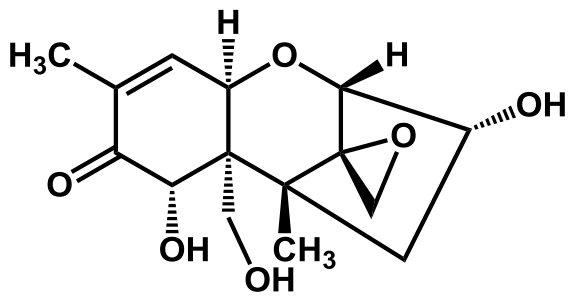
デオキシニバレノール (DON) は小麦などの穀類を汚染することが知られている *Fusarium* 属のカビが産生するカビ毒である。Tanaka や Morozumi らの調査によれば、DON の主要汚染作物は大麦、小麦、麦芽、えん麦、ライ麦、オーツ麦といった麦類であるが、とうもろこしにおいても少なくない数の汚染が確認されている^{17),18)}。Yoshizawa は吐き気、嘔吐、下痢、腹痛、めまい、発熱などの症状を伴う赤カビ中毒事例として、1940年代から1960年代の国内での麦類や米による中毒例や、1960年から1991年にかけての中国やインドにおける麦類やとうもろこしを原因とした大規模中毒例を報告している¹⁰⁾。また、Koiwa は乳牛のカビ毒中毒を疑う症例の中には赤カビ中毒に特徴的な症状である免疫能の低下や低体重が認められ、実際にカビ毒中毒が疑われた牛群に給餌された飼料の13%がDONの許容基準を超えていたと報告している⁴⁰⁾。このように赤カビ中毒は古くから認知され、被害事例が数多く報告されていることから、多くの国で食品や飼料に対してDONの規制がされている。

JECFA では2001年にDONの暫定耐容一日摂取量 (PMTDI) を1 µg/kg 体重/日とした。また、赤カビ汚染はDONと同様のトリコテセン共通骨格を有する3-アセチルデオキシニバレノール (3AcDON), 15-アセチルデオキシニバレノール (15AcDON), DON-3-グルコシド, T-2 トキシシン (T-2), HT-2 トキシシン (HT-2), ニバレノール (NIV), フザレノン-X (4-acetyl-nivalenol, FUX) などの他のフザリウムカビ毒の複合汚染を生じるリスクが高いことが知られており、JECFA では、2010年に主要なフザリウム類の汚染カビ毒をDON, 3AcDON および15AcDONとして、これらの暫定耐容一日摂取量 (グループTDI) を1 µg/kg 体重/日に設定した²¹⁾。

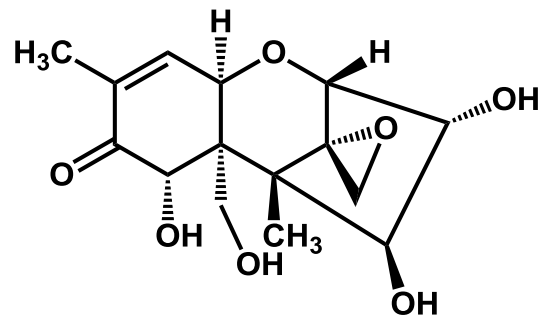
とうもろこしは飼料の主要原料であることから、食品のみならず飼料においても、DONの汚染は重要な危害リスクといえる。近年、石油の代替エネルギーとして注目されるバイオエタノールの生産が増加しており、このバイオエタノール製造時の副産物である Distiller's Dried Grains with Solubles (とうもろこし蒸留かす; DDGS) が飼料に配合されるようになった。Kim らは2008年にとうもろこし胚芽の約2倍の高タンパク質の特性を持つDDGSの存在について報告

しているが¹⁹⁾, その3年後には Zhang らが2つの工場で生産された DDGS とその原料のとうもろこしの DON 汚染量を比較し, DDGS では DON が約3倍程度濃縮していることを報告しており²⁰⁾, DDGS に代表されるとうもろこし加工副産物の普及に伴い, これらとうもろこし加工副産物の DON 汚染に対する懸念が増大している。しかしながら, これまでとうもろこし加工副産物のカビ毒汚染については, Zhang らが DDGS について DON, アフラトキシン, ゼアラレノンおよびフモニシンの汚染を調査した報告があるだけで^{20),22)}, コーンスターチ製造時の副産物であるコーングルテンフィードおよびコーングルテンミールについて, DON および複合汚染が危惧されるアセチル誘導体の汚染量を調査した報告はない。

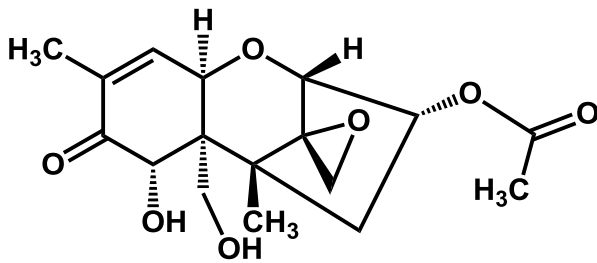
そこで, 著者は国内で入手した DDGS, コーングルテンフィードおよびコーングルテンミールの各種とうもろこし加工副産物ならびにこれらを配合した飼料について, DON およびそのアセチル誘導体である 3AcDON および 15AcDON ならびに T-2, HT-2, NIV および FUX の計7種のトリコテセン類 (Fig.11) の系統分析法の確立を試み, その確立した方法により収集試料のモニタリングを実施した。



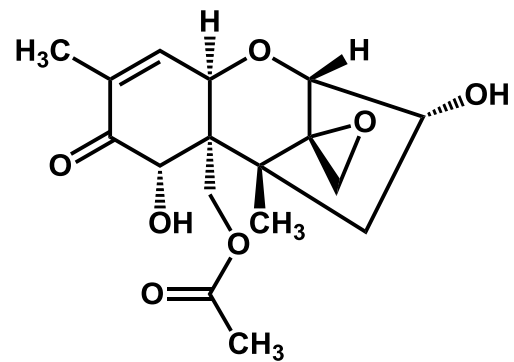
デオキシニバレノール (DON)



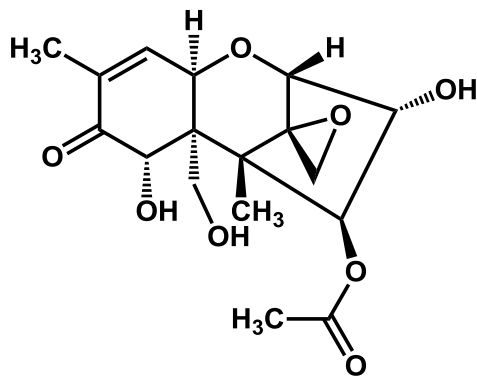
ニバレノール (NIV)



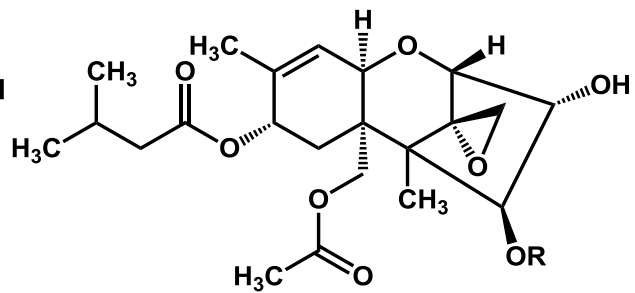
3-アセチルデオキシニバレノール
(3AcDON)



15-アセチルデオキシニバレノール
(15AcDON)



フザレノン-X (FUX)



R = COCH₃ ; T-2 トキシシン (T-2)
R = H ; HT-2 トキシシン (HT-2)

Fig.11 測定対象物質

2) 材料および方法

(1) トリコテセン類標準品，標準溶液および試薬

DON 標準品ならびに FUX, 3AcDON および 15AcDON の 100 µg/mL アセトニトリル溶液は和光純薬(株)社製，T-2 および HT-2 標準品は Sigma-Aldrich 社製，NIV 標準品は Biopure 社製を用いた。

アセトニトリルにより 3AcDON および 15AcDON の 100 µg/mL アセトニトリル溶液をそれぞれ 10 µg/mL に希釈した。これらを混合し，水-アセトニトリル-メタノール (18:1:1 v/v) により 1 µg/mL 混合溶液を調製した。これを適宜水-アセトニトリル-メタノール (18:1:1 v/v) により希釈し，0.005~0.5 µg/mL の検量線用の混合標準溶液を調製した。

DON 標準品は精秤後，アセトニトリルに溶解し，200 µg/mL 標準原液を調製した。これと同様に，T-2, HT-2 および NIV 標準品はメタノールに溶解し，100 µg/mL 標準原液を調製した。これらの標準原液および FUX の 100 µg/mL アセトニトリル溶液を混合し，水-アセトニトリル-メタノール (18:1:1 v/v) により希釈し，10 µg/mL 混合溶液を調製した。さらに，これを適宜水-アセトニトリル-メタノール (18:1:1 v/v) により希釈し，0.025~0.5 µg/mL の検量線用の混合標準溶液を調製した。

抽出に用いたアセトニトリル (残留農薬試験・PCB 試験用) および酢酸アンモニウム (特級) は関東化学工業(株)社製を用いた。その他の用途で使用したアセトニトリルおよびメタノールは和光純薬(株)社製の HPLC 用を使用した。28% アンモニア水 (特級) は小宗化学(株)社製，多機能カラム MultiSep 227 は Romer Labs (Union, MO, USA) 社製を用いた。

(2) 試験に供試した検体

著者は，2010年9月から2011年2月の間に国内で入手した DDGS 27 検体，コーングルテンフィード 39 検体，コーングルテンミール 36 検体，配合飼料 30 検体を試験に供した。

(3) トリコテセン類分析に用いた装置

3AcDON および 15AcDON の測定に用いた高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) はアジレントテクノロジー社製 1100 series LC system および AB サイエックス社製 API-4000 から構成されているものを用いた。また、その他のトリコテセン類 (DON, NIV, T-2, HT-2 および FUX) の測定に用いた高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) はアジレントテクノロジー社製 1100 series LC system および G1956B MSD から構成されているものを用いた。いずれも HPLC カラムは ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) を使用した。LC-MS/MS および LC-MS の操作条件を Table 6 ~9 に示した。

Table 6 LC-MS/MS測定条件

Column temperature	40°C
Flow rate	0.4 mL/min
Mobile phase	A = water, B = acetonitrile A:B (%) = 0 min (95:5) →15 min (5:95) →25 min
Injection volume	10 µL
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Vaporizer temperature	350°C
Nebulizer gas	N ₂ , 50 psig
Nebulizer current	-2 µA
Declustering potential	-65 V
Collision gas	N ₂

Table 7 MRM (Multiple reaction monitoring) 条件

Analyte	Precursor ion	Product ion	Collision energy	Polarity
3AcDON	<i>m/z</i> 337	<i>m/z</i> 307	-10 eV	negative
15AcDON	<i>m/z</i> 337	<i>m/z</i> 150	-30 eV	negative

Table 8 LC-MS 測定条件

Column temperature	40°C
Flow rate	0.5 mL/min
Mobile phase	A = 10 mM ammonium acetate, B = methanol A:B (%) = 0 min (80:20) → 15 min (0:100) → 20 min
Injection volume	5 µL
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Fragmenter Voltage	120 V for HT-2, 100 V for others
Nebulizer gas	N ₂ (55 psig)
Drying gas	N ₂ (7.0 L/min, 350°C)
Vcap Voltage	1500 V

Table 9 SIM (Selected ion monitoring) 条件

Analyte	Monitored ion (<i>m/z</i>)	Polarity	Corona needle current (µA)
DON	355	negative	15.0
NIV	371	negative	15.0
T-2	484	positive	4.0
HT-2	442	positive	4.0
FUX	355	positive	4.0
	413	negative	15.0

(4) トリコテセン類分析用試験溶液の調製

あらかじめ均一に調製した検体 25 g を遠沈管に量りとり，アセトニトリル-水 (21:4 v/v) 100 mL を加え，60 分間振とうした後，1,000 ×g で 5 分間遠心分離した。得られた上澄みを多機能カラム (MultiSep 227) により精製した。多機能カラムの溶出液のうち，最初の 1.5 mL を捨て，その後の 1.5~3 mL を 3AcDON および 15AcDON の分析に，3~6 mL の溶出液を他のトリコテセン類の測定に用いた (それぞれ「AcDON 画分」および「他のトリコテセン画分」という)。

AcDON 画分の 1 mL または他のトリコテセン画分の 2 mL を試験管に分取し，45 °C に加温し，窒素ガス下で乾固した。得られた残留物を，AcDON 画分は 0.5 mL，他のトリコテセン画分は 1 mL の水-アセトニトリル-メタノール (18:1:1 v/v) に溶解した。この試験溶液を AcDON 画分は LC-MS/MS，他のトリコテセン画分は LC-MS により測定した (Fig.12)。試験溶液中の各トリコテセン類濃度は，得られたピーク面積と検量線により算出した。また，試験溶液から得られた応答値が検量線範囲を超えた場合は，必要に応じて希釈を行った。

なお，本法の定量下限は，あらかじめ各物質について S/N (シグナル/ノイズ比) が 10 以上となる濃度を確認した上で，3AcDON, 15AcDON を 0.01 mg/kg，その他のトリコテセン類を 0.05 mg/kg に設定した。

検体 25 g

└ アセトニトリル-水 (21:4 v/v) 100 mL

振とう 60 分間

|

遠心分離 (1,000 × g, 5 分間)

|

上澄み

|

多機能カラム (Multi Sep 227)

|

溶出液

1.5~3 mL ; アセチルデオキシニバレノール画分 ^{a)}

3~6 mL ; その他のトリコテセン類画分 ^{b)}

a) アセチルデオキシニバレノール画分

溶出液 1 mL

|

濃縮乾固 (窒素ガス, 45°C)

|

残留物

└ 水-アセトニトリル-メタノール (18:1:1 v/v) 0.5 mL

高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) 測定

b) その他のトリコテセン類画分

溶出液 2 mL

|

濃縮乾固 (窒素ガス, 45°C)

|

残留物

|

├ 水-アセトニトリル-メタノール (18:1:1 v/v) 1 mL

高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) 測定

Fig.12 トリコテセン類系統分析法の分析操作手順

3) 結果

(1) デオキシニバレノールによる抽出時間の検討

DDGS はバイオエタノール製造時の副産物であるが，DDGS の生産には発酵工程が存在するため，低分子の有機化合物が多量に含まれ，抽出液の pH は酸性に傾く。このように，とうもろこし加工副産物は，一般的な穀類とは抽出液の液性や夾雑物量が異なるため，DON を指標とし，抽出時間による分析値の変化を調べた。

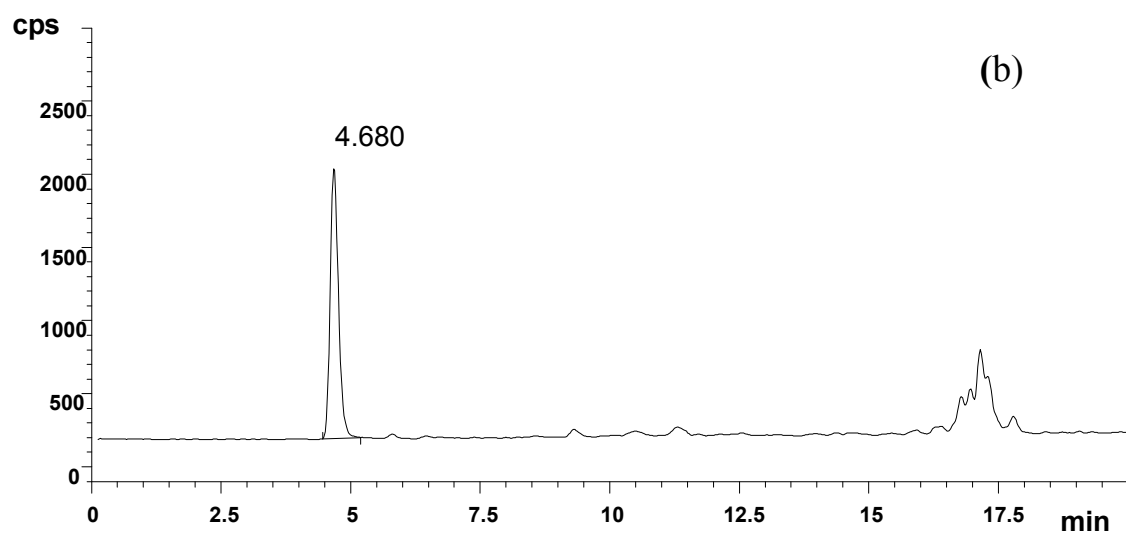
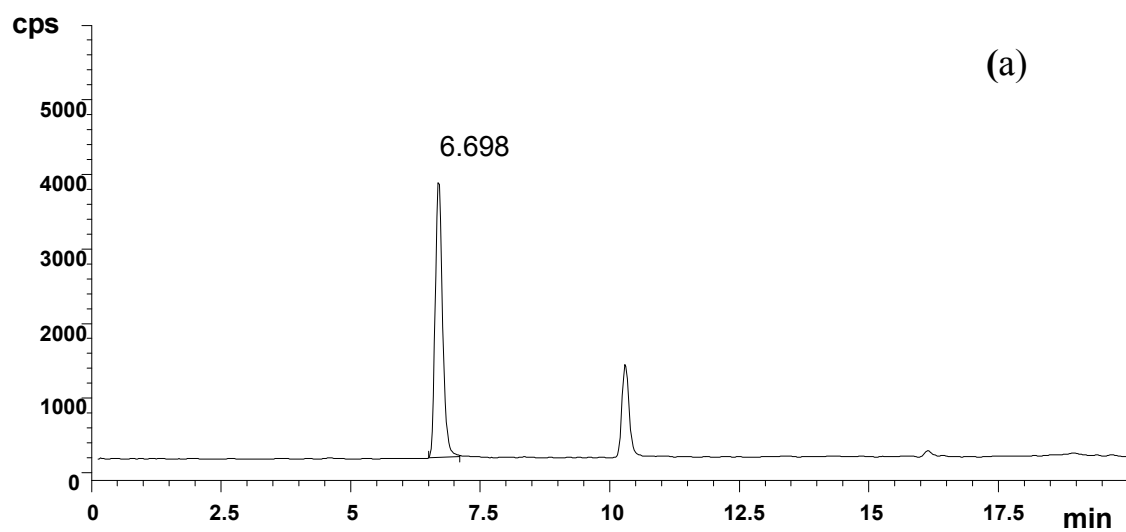
コーングルテンフィード，コーングルテンミール，DDGS および配合飼料について，100mL のアセトニトリル-水 (21:4 v/v) を加え，30，60 および 90 分間振とう抽出を行った後，それぞれの抽出液について DON 濃度を調べた。その結果，30 分間で大半の DON は抽出され，60 分以降 DON の濃度は増加しなかったことから，抽出時間は 60 分間が適すると判断し，以降の実験を行った (Table 10)。

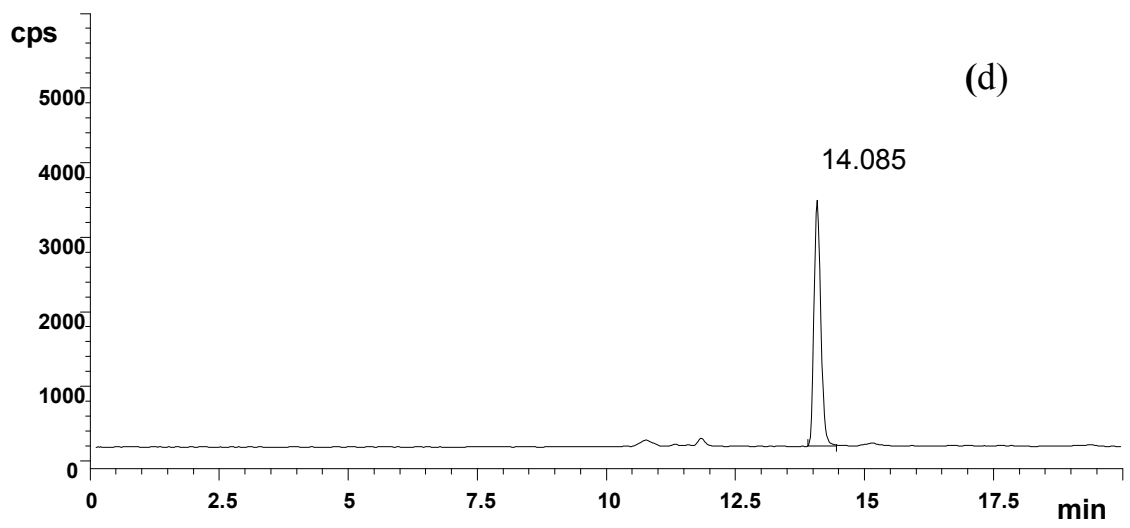
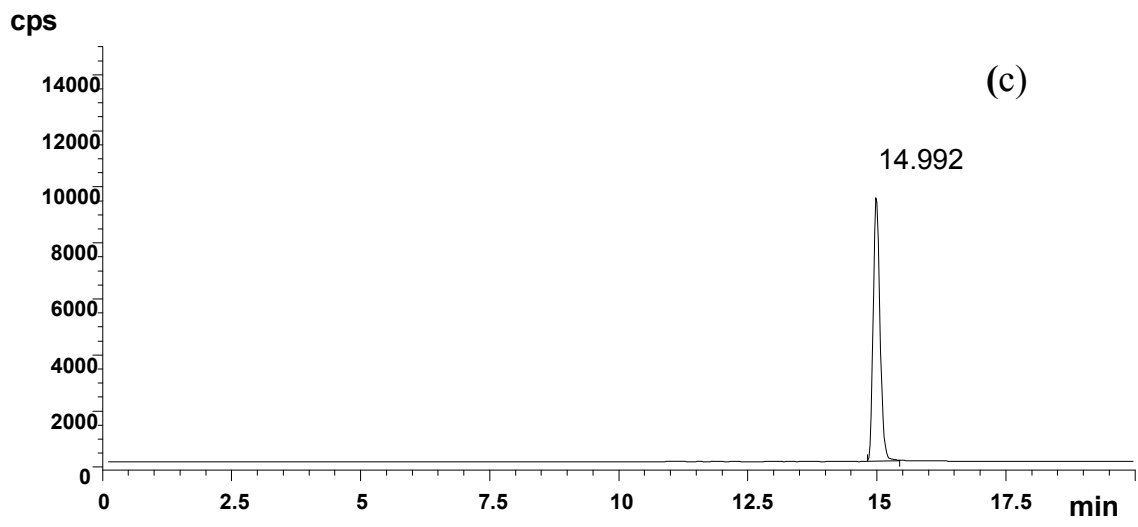
Table 10 抽出時間による DON 濃度

抽出時間 (min)	DON 濃度 (mg/kg)			
	コーングル テンフィード	コーングル テンミール	DDGS	配合飼料
30	3.9	0.64	2.9	0.46
60	4.1	0.65	2.9	0.47
90	4.2	0.65	2.9	0.47

(2) トリコテセン類分析のための高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) および高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) 測定条件の検討

LC-MS の測定条件は飼料分析法・解説 2009⁴¹⁾ (日本科学飼料協会, p.231~235, 2010) 収載の「トリコテセン類の液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法 (分析対象成分 DON, NIV および T-2)」に準じた。メタノール/酢酸アンモニウム溶液の移動相により, DON, NIV および T-2 の測定が可能であった。さらに, HT-2 はアンモニア付加イオン, FUX は水素または酢酸付加イオンを選択することにより, 両物質ともに良好な検出を実現することができた (Fig.13)。





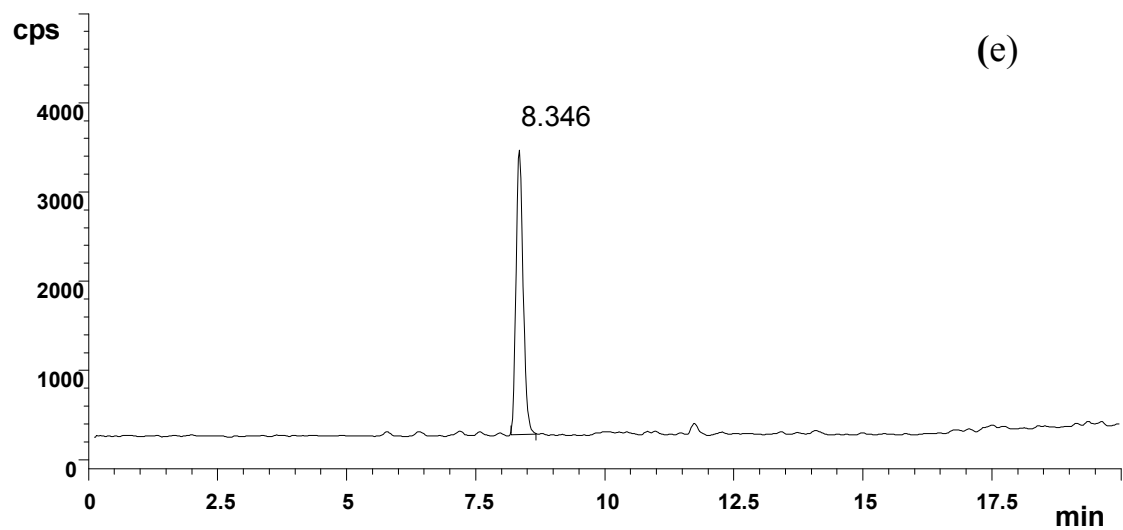


Fig.13 コーングルテンミールの SIM (Selected ion monitoring) クロマトグラム

(a) DON, (b) NIV, (c) T-2, (d) HT-2 , (e) FUX (各 0.5 mg/kg 添加)

しかしながら、3AcDON と 15AcDON は分子量が等しく、LC-MS 測定では、いずれからも水素付加 (m/z 339)、アンモニウム付加 (m/z 356) および酢酸付加 (m/z 397) イオンが検出され、 m/z にもとづく区別が困難なであった。さらに、両者の保持時間も近接していることから、他のトリコテセン類と同様の条件では両者のピークを分離できなかつた。移動相の有機溶媒をメタノールからアセトニトリルに変更したところ、3AcDON と 15AcDON の分離が改善された。また、移動相に酢酸アンモニウムを添加しない系では 15AcDON の感度が上昇することが確認された。さらに、LC-MS/MS を用いて、 m/z 337 のイオンから生成する両者に特徴的なプロダクトイオン (3AcDON; m/z 337>307, 15AcDON; m/z 337>150) を選択することにより、お互いにほとんど影響を与えない良好な分離を確立することができた (Fig.14 および 15)。

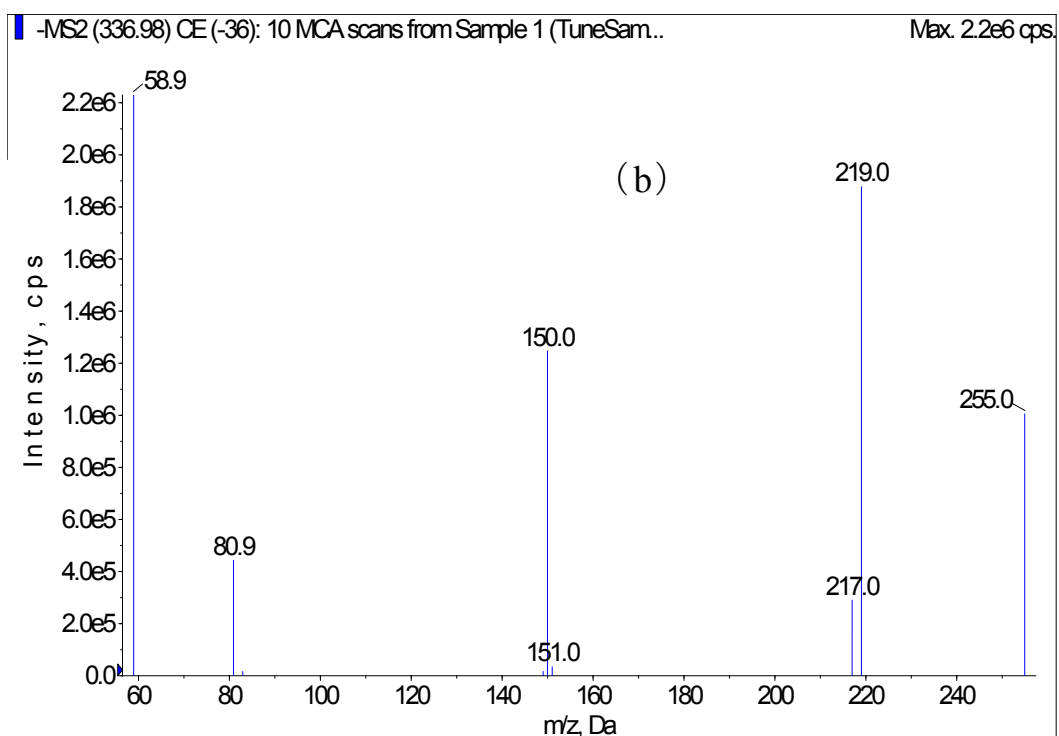
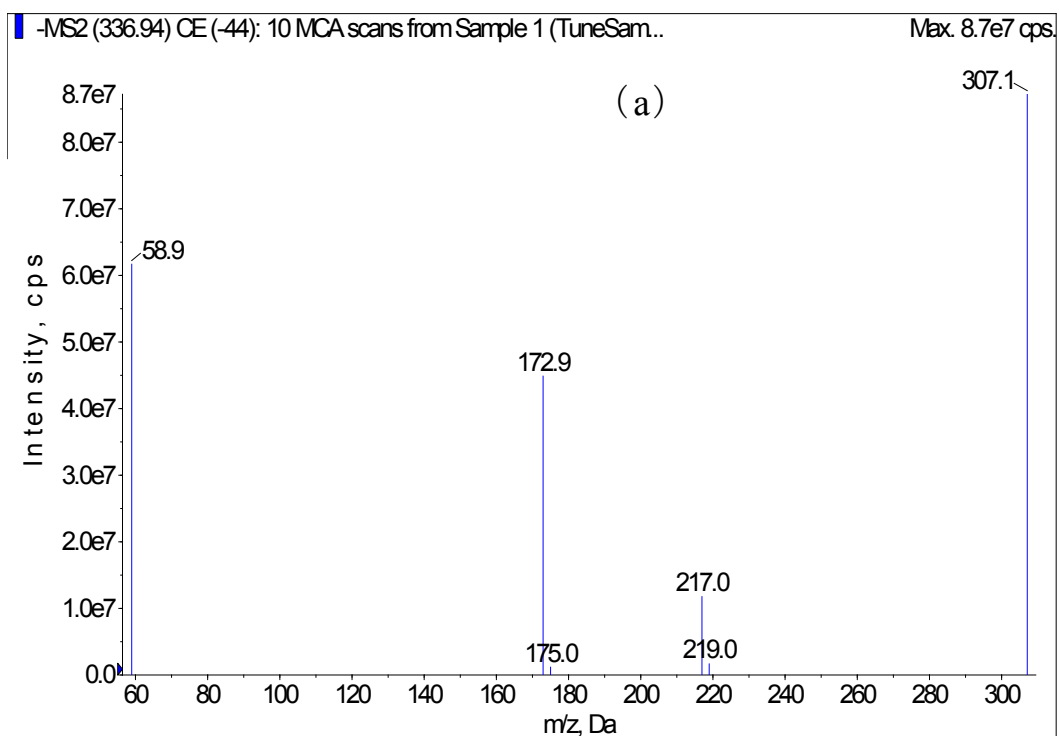


Fig.14 m/z 337 のプロダクトイオンキャンスペクトル

(a) 3AcDON, (b)15AcDON (各 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

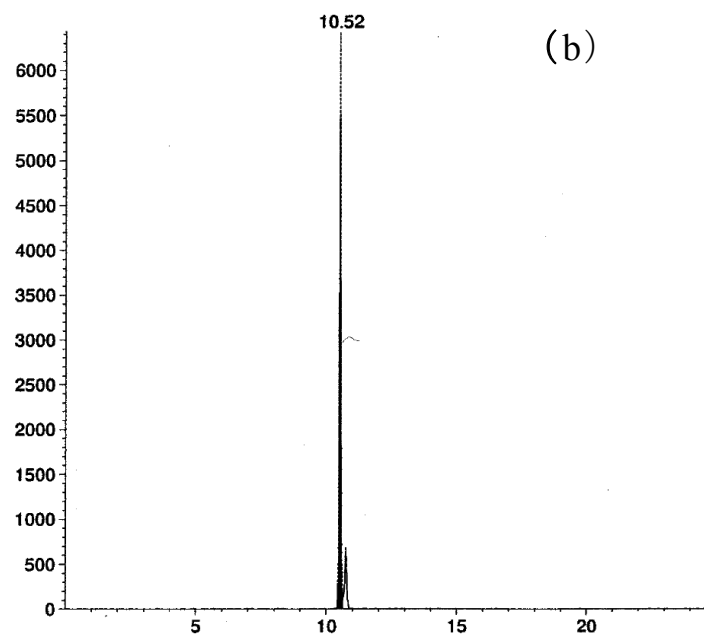
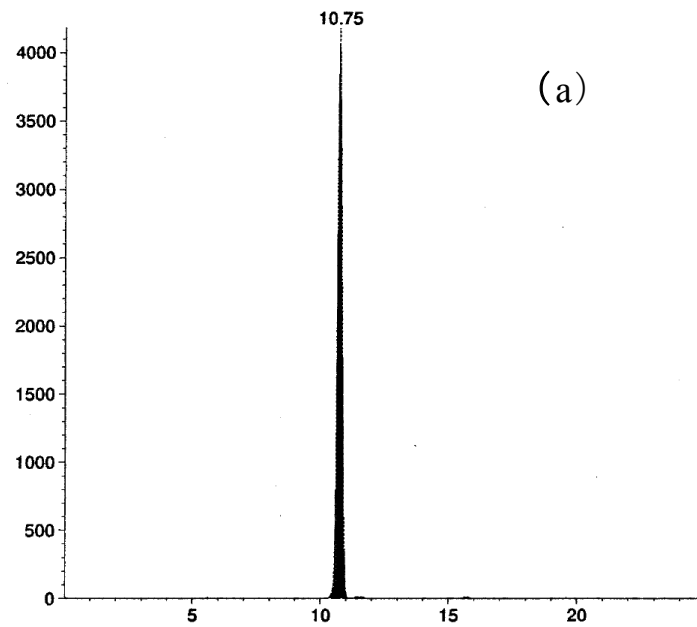


Fig.15 コーングルテンミールの SRM (Selected reaction monitoring)

クロマトグラム

(a) 3AcDON, (b) 15AcDON (0.5 mg/kg 添加)

(3) トリコテセン類分析用前処理カラムの回収率の確認

トリコテセン類の分析について、Sulyok らや Beltrán らは抽出液を直接 LC-MS/MS により測定するシンプルな分析法を報告しているが^{42),43)}、本研究の試験対象である DDGS は低分子の有機化合物を多量に含むため、LC-MS 測定における妨害ピークの未分離、イオン化阻害の恐れが考えられた。そこで著者は飼料分析法に準じて⁴¹⁾、抽出液を多機能カラム (MultiSep 227) により精製する手法を選択した。

各トリコテセン 0.25 µg/mL のアセトニトリル-水 (21:4 v/v) 溶液を MultiSep 227 多機能カラムに注入し、1 mL 毎にフラクションを分画し、そのうちの各 0.5 mL を分取した。この溶液を 45 °C に加温し、窒素ガス下で乾固した後、残留物を水-アセトニトリル-メタノール (18:1:1 v/v) 0.5 mL に溶解した。これらの溶液を DON のアセチル誘導体は LC-MS/MS、他のトリコテセン類は LC-MS により測定し、回収率を確認した (Table 11)。

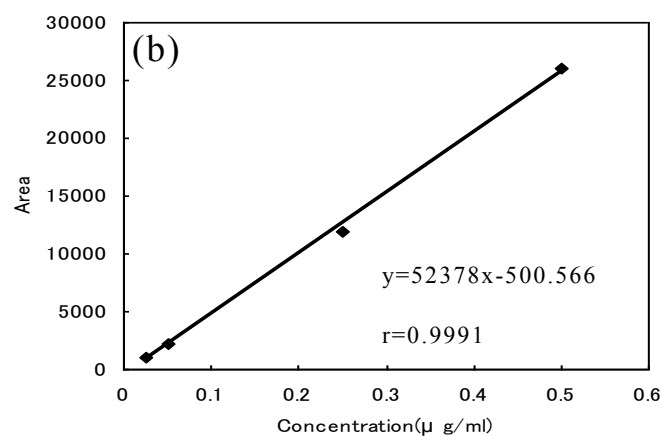
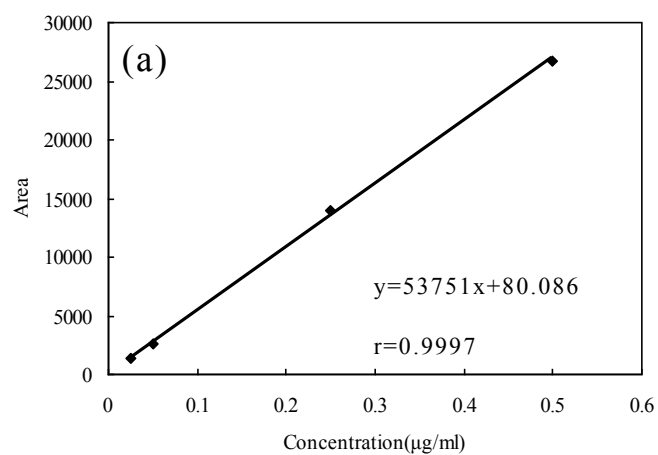
多機能カラムは測定妨害成分を充填剤で補足し、目的物質は素通しされるため、理論上では、これらのトリコテセン類の溶出液の回収率は 100% となる。しかしながら、実際には NIV が遅れて溶出している事象が確認された。これは NIV が他のトリコテセン類よりも、構造中に極性基である水酸基を多く持ったためと考えられた。そこで DON のアセチル誘導体やその他のトリコテセン類を分別測定するため、多機能カラムの溶出液を 1.5~3 mL と 3~6 mL までの 2 つのフラクションに分別し、前者を LC-MS/MS による DON のアセチル誘導体の測定に、後者を LC-MS による他のトリコテセン類の分析に用いることにした。

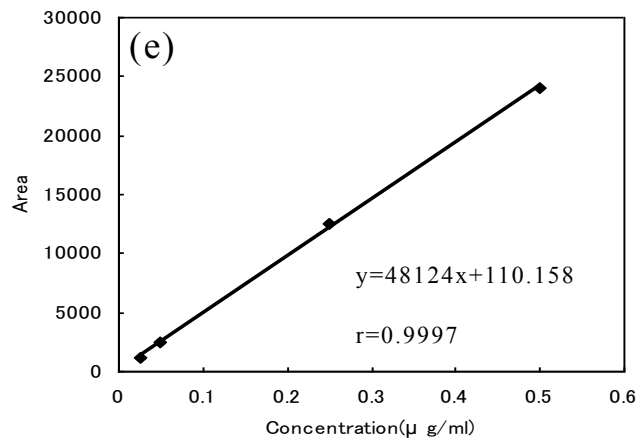
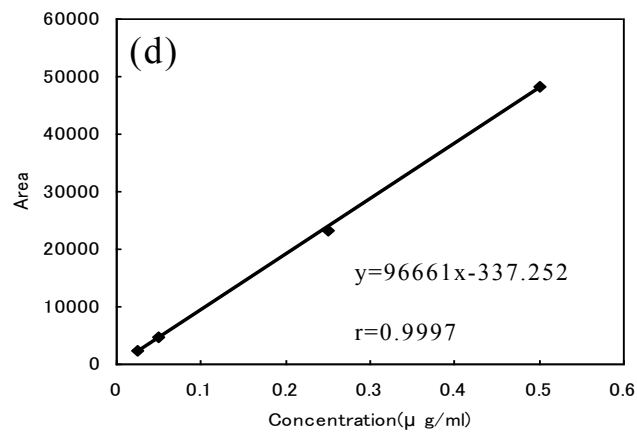
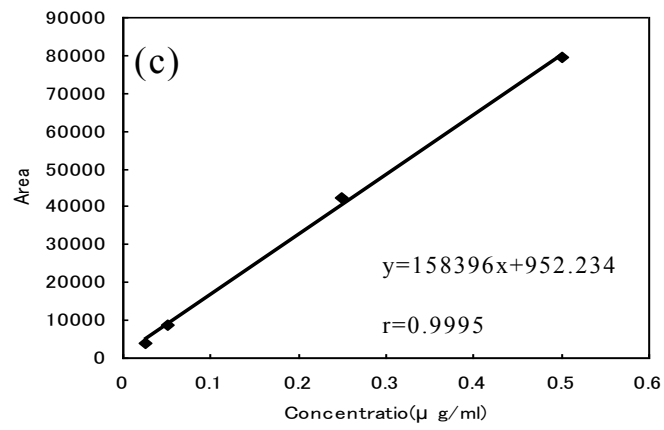
Table 11 多機能カラムによるアフラトキシン類の添加回収率

溶出画分 (mL)	添加回収率 (%)						
	DON	NIV	T-2	HT-2	FUX	3AcDON	15AcDON
0-1	37	4	64	57	56	34	71
1-2	85	37	100	97	98	71	107
2-3	100	80	99	93	99	84	111
3-4	99	94	99	95	99	97	95
4-5	92	98	102	99	103	86	75
5-6	104	102	112	104	110	106	105
6-7	104	104	106	104	107	91	94

(4) トリコテセン類の検量線

DONのアセチル誘導体は0.005~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、他のトリコテセン類は0.025~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で検量線を作成した。全ての検量線の相関係数は0.999以上の良好な直線性を示した (Fig.16)。





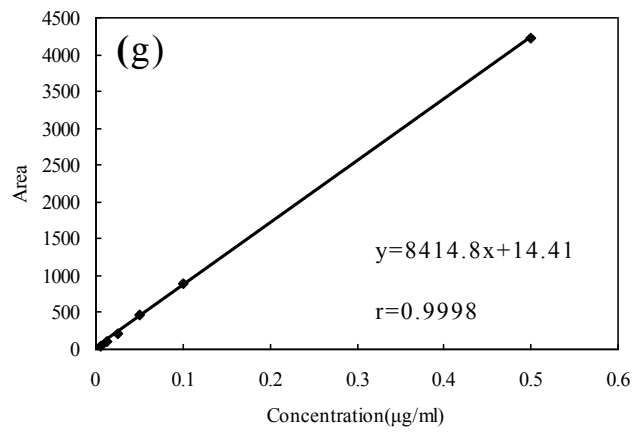
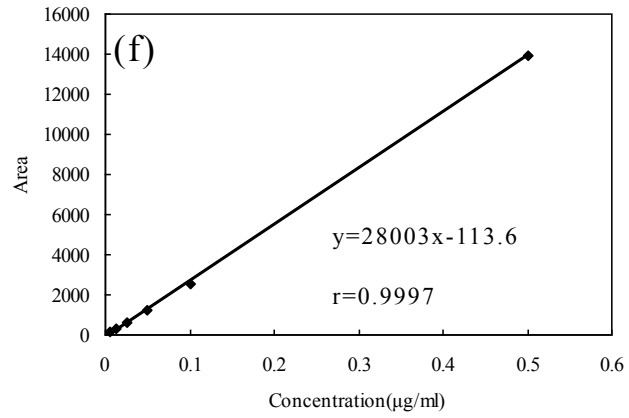


Fig.16 LC-MS による各トリコテセン類の検量線例

(a)DON, (b)NIV, (c)T-2, (d)HT-2, (e)FUX, (f)3AcDON, (g)15AcDON

(5) トリコテセン類の添加回収試験

トリコテセン類に汚染されていないコーングルテンミールを選び、0.5 mg/kg となるように DON を添加して 7 回の繰り返し試験を実施した。その結果、得られた回収率は全て 70~115% の範囲内に収まり、相対標準偏差 (RSD%) は 10% 未満となり、本試験は良好な回収率と再現性を有していることが示された (Table 12)。

Table 12 コーングルテンミールの添加回収率 (0.5 mg/kg, n=7)

	DON	NIV	T-2	HT-2	FUX	3AcDON	15AcDON
平均 (%)	95.9	76.6	111.4	115.0	101.8	109.0	95.2
標準偏差	1.6	2.6	1.8	3.2	3.3	9.3	8.2
相対標準偏差 (%)	1.7	3.3	1.7	2.8	3.2	8.5	8.6

(6) 本法によるとうもろこし加工副産物および配合飼料の測定結果

著者が開発した方法で、DDGS 27 検体、コーングルテンフィード 39 検体、コーングルテンミール 36 検体、配合飼料 30 検体を測定した結果、主要汚染カビ毒は DON, 3AcDON および 15AcDON であった (Table 13~16)。27 検体全ての DDGS で DON が 0.12~6.2 mg/kg の範囲で検出され、3AcDON および 15AcDON も 26 検体でそれぞれ 0.02~0.12 mg/kg, 0.10~2.1 mg/kg の範囲で検出された。さらに、全てのコーングルテンフィードで DON (0.73~12 mg/kg) および 15AcDON (0.04~1.6 mg/kg) が検出された。一方、3AcDON は 39 検体のうちの 27 検体で 0.01~0.04 mg/kg と、低いレベルの汚染であった。コーングルテンミールは他のとうもろこし加工副産物よりもトリコテセン類の汚染頻度が低く、DON は 36 検体のうち 24 検体で (0.05~0.64 mg/kg), 15AcDON は 36 検体中 20 検体で (0.01~0.18 mg/kg) 検出され、3AcDON は全ての検体から検出されなかった。また、全ての配合飼料から DON が 0.15~1.2 mg/kg の範囲で検出され、15AcDON も一つを除いて全てから 0.03~0.29 mg/kg の範囲で検出された。しかしながら、3AcDON は 1 検体から 0.01 mg/kg 検出されたのみであった。

全体的に 3AcDON が検出された検体からは、さらに多量の 15AcDON が、15AcDON が検出された検体からは、さらに多量の DON が検出される傾向が確認された。

そのほかにはコーングルテンフィード 3 検体から NIV が 2.2~7.5 mg/kg 検出された。さらにコーングルテンミール 2 検体から T-2 が 0.05 および 0.06 mg/kg, DDGS 1 検体およびコーングルテンフィード 6 検体から HT-2 が 0.06~0.11 mg/kg 検出された。

Table 13 DDGS のトリコテセン類汚染濃度

測定対象物質	検出数	検出濃度範囲 (mg/kg)	検出値の平均 (mg/kg)
DON	27	0.12-6.2	3.29
NIV	0	—	—
T-2	0	—	—
HT-2	1	0.09	0.09
FUX	0	—	—
3AcDON	26	0.02~0.12	0.06
15AcDON	26	0.10~2.1	0.78

Table 14 コーングルテンフィードのトリコテセン類汚染濃度

測定対象物質	検出数	検出濃度範囲 (mg/kg)	検出値の平均 (mg/kg)
DON	39	0.73~12	2.83
NIV	3	2.2~7.5	4.36
T-2	0	—	—
HT-2	6	0.06~0.11	0.08
FUX	0	—	—
3AcDON	27	0.01~0.04	0.01
15AcDON	39	0.04~1.6	0.58

Table 15 コーングルテンミールのトリコテセン類汚染濃度

測定対象物質	検出数	検出濃度範囲 (mg/kg)	検出値の平均 (mg/kg)
DON	24	0.05~0.64	0.23
NIV	0	—	—
T-2	2	0.05, 0.06	0.05
HT-2	0	—	—
FUX	0	—	—
3AcDON	0	—	—
15AcDON	20	0.01~0.18	0.04

Table 16 配合飼料のトリコテセン類汚染濃度

測定対象物質	検出数	検出濃度範囲 (mg/kg)	検出値の平均 (mg/kg)
DON	30	0.15~1.2	0.49
NIV	0	—	—
T-2	0	—	—
HT-2	0	—	—
FUX	0	—	—
3AcDON	1	0.01	0.01
15AcDON	29	0.03~0.29	0.11

4) 考 察

著者は、とうもろこし加工副産物を対象とした LC-MS および LC-MS/MS による 7 種のトリコテセン類 (DON, 3AcDON, 15AcDON, T-2, HT-2, NIV および FUX) の系統分析法を確立した。これまでトリコテセン類の一斉分析や汚染調査の報告例は多数あるものの、とうもろこし加工副産物については Zhang らが DDGS の DON 汚染量を調査した一連の研究があるのみで^{20),22)}、アセチル誘導体を含み、かつ DDGS のみならずコーングルテンフィードやコーングルテンミールを対象とした調査は報告されていないことから、トリコテセン類の飼料汚染を調査するための有用な分析法を確立することができたといえる。

さらに、この開発した方法により DDGS 27 検体、コーングルテンフィード 39 検体、コーングルテンミール 36 検体、とうもろこし加工副産物を含む配合飼料 30 検体についてモニタリング調査を行った。Zhang らの報告では、2009 年 8 月から 2011 年 1 月までの計 8 回、8 箇所の工場で生産された DDGS について調査を行い、DON が 0.3~12.3 mg/kg の範囲で検出されている²⁰⁾。一方、著者は、Zhang らとほぼ同時期の 2010 年 9 月から 2011 年 2 月の間に国内で収集した DDGS について調査を実施し、Zhang らの報告²⁰⁾とほぼ同レベルの 0.12~6.2 mg/kg の結果を得た。さらに本研究では、DDGS のみならずコーングルテンフィード、コーングルテンミールおよび配合飼料について、DON を含む 7 種のトリコテセン類の汚染実態を示した。結果として、とうもろこし由来の飼料原料やそれらを含む配合飼料が広くトリコテセン類に汚染されており、その主要汚染物質は DON とそのアセチル誘導体であること、その汚染量の傾向が DON > 15AcDON > 3AcDON であることを確認した。

国内において、飼料の DON の基準値は、生後 3 か月以上の牛用配合飼料が 4 mg/kg、その他の蓄種用の配合飼料が 1 mg/kg と設定されているが、著者が収集した配合飼料 30 検体では、2 検体がわずかに 1 mg/kg を上回っていたのみであった。DDGS などの飼料原料の DON 濃度が最大 12 mg/kg と DON の基準値を大きく超えるものであったことを考慮すると、配合飼料にこれらのとうもろこし加工副産物を加える際には、あらかじめ原料中の DON の含量を把握した上で、飼料製品が規制値を超えないように配合する必要があると考えられた。また、JECFA では DON の PMTDI を、毒性が DON とほぼ匹敵する 3 および

15AcDON との暫定耐容一日摂取量 (グループ TDI) として設定している²¹⁾が、著者が利用した飼料中には DON に対してアセチル誘導体が数%~50%以上含まれており、それぞれの飼料について 3AcDON および 15AcDON の含量を DON の含量と合算したところ、1 mg/kg を超えるものが 6 検体となったことから、飼料においても DON だけでなく、そのアセチル誘導体を含めたリスク管理の必要性が示唆された。

本研究により得られたとうもろこし加工副産物のモニタリング結果は、これまで明らかにされていない DON のアセチル誘導体汚染やその汚染傾向が示されており、トリコテセン類の暴露リスク評価や汚染機構解明に関しての活用が見込まれる。

第 4 章

とうもろこし含有飼料および飼料原料への
デオキシニバレノール定量用免疫化学分析キットの応用

1) 緒言

Ichinohe は小麦の出稲から成熟期の冷夏多雨の異常気象が赤カビ病と深く関わりがあることを指摘しており、圃場に残された稲切り株に着生したカビの胞子が飛散し、赤カビ病の発生源になるとも述べている³⁾。また、Sunaga は麦類の赤カビ病防除について、収穫後の適切な乾燥調整の実施について取り組むべきとしている⁴⁾。このように赤カビ病汚染は農作物の生育時の気候だけでなく、圃場の管理、収穫後の調製から保管までの様々な要因に汚染濃度が左右されることから、継続的な監視が必要となる。そのため、近年ではデオキシニバレノール (DON) の高濃度汚染が憂慮されるところこし加工副産物およびそれらを配合した飼料に対する迅速なモニタリング検査の重要性が高まっている。Kolossova がイムノクロマトキットの試験操作にかかる時間を 10 分以内と述べているように⁴⁴⁾、マイコトキシン測定用のキットは、操作が簡便で、短時間で結果が確認できる上に、ガスクロマトグラフ (GC)、高速液体クロマトグラフ (HPLC) または高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) といった高価な分析機器を必要としないことから、厚生労働省では厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知平成 23 年食安監発 0816 第 7 号 (2011) “トウモロコシ中の総アフラトキシンの試験法について”により、とうもろこしの輸入検査にキットが利用できることを通知し⁴⁵⁾、農林水産省では麦類のデオキシニバレノール・ニバレノール汚染低減のための指針 (2012) の中で、麦類の試し刈りや荷受け時に、キットにより DON 濃度を確認することで、効果的な選別や乾燥調製の実施が可能になると推奨している⁷⁾。このようにマイコトキシン測定用のキットは、実験室を離れた現場で広く利用されるようになっている。Lupo らは、Neogen 社製の Veratox DON キットが小麦、とうもろこし、大麦および米に対して良好な正確さおよび再現性を有することを報告している²³⁾が、この報告に示されているように、市販の DON 検出キットは主に小麦などの穀類や小麦粉のような簡易な加工品、配合飼料を対象としており、Distiller's Dried Grains with Solubles (とうもろこし蒸留かす; DDGS) などのとうもろこし加工副産物に対する適用は保障されていない。適用対象が限られていることが、キットの汎用性の妨げになっていることは明らかで、これらのキットがとうもろこし加工副

産物にも応用が可能となれば、GC や HPLC などの高価な分析機器を保有していない圃場や飼料工場などでもさらに活用が進むものと考えられる。そこで著者は、市販の 2 種類のイムノクロマトキット ("Immno-1"および"Immno-2") および 3 種類のエライザキット ("ELISA-1", "ELISA-2"および"ELISA-3") について、とうもろこし加工副産物に対する DON の定量への応用を検証することにした。

これらの定量キットは、メーカー毎に抽出時間などの前処理操作がそれぞれ異なっている。さらに、利便性を目的としているため、抽出時間が最長で 3 分間といずれのキットも短い、アセトニトリルなどの有機溶媒に溶解しやすい DON は十分に抽出されない恐れが考えられた。また、DDGS は発酵試料であるため、抽出溶媒が酸性に傾くことから、DON 抗体が失活するリスクも想定された。そこで著者は、抽出時間の延長、抽出溶媒の中和などを検証し、各キット共通の抽出手順の構築を試みた。

Ruprich らは、R-Biopharm 社製の RIDASCREEN DON キットが DON-3-グルコシドと高い交差反応性を有することを報告しており⁴⁶⁾、Tangni らは DON 検査用キット 4 製品について、10 種類のフザリウム毒素の DON との交差反応性を調査し、各毒素の交差反応性は全てのキットで 3-アセチルデオキシニバレノール (3AcDON) が、一部のキットで 15-アセチルデオキシニバレノール (15AcDON) およびフザレノン-X (4-acetyl-nivalenol, FUX) が高いと評価している²⁵⁾。このように、抗原-抗体反応に基づくカビ毒用検査キットは、各キットが採用している抗体に応じて抗原と類似した構造を誤認し、カビ毒ごとに異なった割合で偽陽性を示すことが知られているが、とうもろこし加工副産物および配合飼料は DON のみならずそのアセチル誘導体などにも汚染されていることから、DON 検出キットによるとうもろこし加工副産物の測定は過定量となる可能性が考えられる。そこで著者は、第 3 章で収集したとうもろこし加工副産物および配合飼料について、各トリコテセン類の含有濃度と各キットの交差反応性から DON の定量値への影響を算出し、トリコテセン類の含有量が低い検体を用いて各キットの適用性を検証した。

2) 材料および方法

(1) トリコテセン類標準品および試薬

エライザ測定に使用する標準溶液は各キットに付属しているものを使用した。一方、後述のキットの交差反応性を確認するための標準溶液は、以下のとおり調製した。DONの標準品ならびにFUXおよび15AcDONの100 µg/mLアセトニトリル溶液は和光純薬株式会社製、T-2トキシシン(T-2)およびHT-2トキシシン(HT-2)の標準品はシグマ・アルドリッチ製、ニバレノール(NIV)の標準品および3AcDONの100 µg/mLアセトニトリル溶液はBiopure社製を用いた。DONの標準品を精秤後、アセトニトリルに溶解し200 µg/mLの標準原液を調製した。NIV、T-2およびHT-2標準品は同様にして、100 µg/mL標準原液をメタノールにより調製した。これらのアセトニトリルまたはメタノール溶液をそれぞれ10 µg/mLに希釈し、この希釈液1 mLを窒素気流下で乾固した後、水50 mLに溶解し、各0.2 µg/mL水溶液を調製した。また、アセトニトリル、メタノール(HPLC用)および水酸化カリウムは和光純薬株式会社製を用いた。

(2) 試験に供試したキット

市販されている2種類のイムノクロマトキット("Immno-1"および"Immno-2")および3種類のエライザキット("ELISA-1", "ELISA-2"および"ELISA-3")を使用した。

(3) 試験に供試した検体

第3章の研究で収集したDDGS, コーングルテンフィード, コーングルテンミールおよび配合飼料を使用した。

(4) 高速液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)によるデオキシニバレノールの測定

検体中のDON濃度の測定は、第3章で実施した試験法によった。具体的には、検体から水とアセトニトリルの混液を用いてDONを抽出し、得られた抽出液を多機能カラムMultiSep 227 (Romer Labs, USA)を通した後、LC-MSにより測定した。

(5) サンプルの前処理および測定

あらかじめ均質化した検体 10 g を三角フラスコに量りとり、水 50 mL を加え 20 分間激しく振とうした。その後、抽出液を 6,000 ×g で 5 分間遠心分離し、得られた上澄み液を 30% 水酸化カリウム溶液により中和した。この液について、それぞれのキットの手順に従い測定を行った。

(6) デオキシニバレノールと他の 6 種のトリコテセン類の交差反応性の確認

キット測定における DON 抗体の他の 6 種のトリコテセン類との交差反応性は、これら 7 種のトリコテセン類の 0.2 μg/ml 水溶液を 5 種類の各キットで測定することにより評価した。

得られた結果について、DON 含量に対するそのアセチル誘導体 (AcDONs) の影響 (%) を以下の計算式により算出した。

DON 含量に対する AcDONs の影響 (%) = [(検体中の 3AcDON の濃度 × 3AcDON の交差反応性 + 検体中の 15AcDON の濃度 × 15AcDON の交差反応性) / 検体中の DON の濃度] × 100

(7) 共通抽出手順によるキット測定の検証

本研究では、真度と精度 (再現性) によりキットを検証した。

真度はトリコテセン類が含まれていないコーングルテンミールに DON を 4 mg/kg となるよう添加したものについて、各キットで 7 回の繰り返し分析を行った。精度については 1 mg/kg (国内における食品や飼料の DON の基準値相当) および 4 mg/kg (キット測定における定量上限付近) の濃度になるよう調製した DDGS, コーングルテンミール, コーングルテンフィード, 配合飼料について 7 回の繰り返し分析を行った。

3) 結 果

(1) 高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) およびキットによる測定値の比較

とうもろこし加工副産物は低分子化合物を多く含み、抽出液は酸性を示すため、キットの抗体を不活化し、抗原-抗体反応を阻害する恐れがある。また、測定対象物質である DON そのものも低分子の化学物質であるため、一般的に DON 抗原との間で夾雑物質との競合反応が生じる事態も考えられる。これらのケースは、結果として実際の DON の含有量よりも高い測定値を示すことになる。一方、本研究に供したキットの手順では、抽出時間が 30 秒から 3 分間であるが、いずれも短時間のため DON を十分に抽出できず、低い結果を示す可能性も考えられた。

そこで著者は、DDGS、コーングルテンフィード、コーングルテンミールおよび配合飼料について、各キットの操作手順に従い試験した DON の測定値と、LC-MS により分析した DON の測定値を比較した。その結果、Immuno-2、ELISA-1 および ELISA-2 の各キットにおいて、得られた測定値と機器分析値との比が 70~120%の範囲から外れた (Table 17)。そのため、次に抽出条件を検討することとした。

Table 17 キットと LC-MS による測定値の比較

検体	キットの測定値に対する LC-MS の測定値の比 (%)				
	Immuno-1	Immuno-2	ELISA-1	ELISA-2	ELISA-3
コーングルテン フィード	83	127	137	65	104
コーングルテン ミール	71	112	42	93	81
DDGS	92	175	97	93	99
配合飼料	81	148	77	141	80

(2) デオキシニバレノールの抽出溶媒および抽出時間の評価

供試したキットの中には抽出液が低 pH の場合、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウム溶液による中和や、抽出溶媒として水の代わりに 1%炭酸水素ナトリウム溶液の使用を推奨しているものがある。そこで、コーングルテンミールについて、水または 1%炭酸水素ナトリウム溶液で抽出を行い、それぞれの抽出液について LC-MS により DON 濃度を測定した。その結果、水と 1%の炭酸水素ナトリウム溶液の抽出による DON 濃度の明確な差は確認されなかった (Table 18)。

しかしながら、炭酸水素ナトリウム溶液による抽出液は濁り、この濁りは遠心分離やろ過により取り除くことができなかった。そのため著者は、抽出溶媒として水を選択し、抽出液を $6000 \times g$ で遠心分離した後、30%水酸化カリウム溶液で中和することにした。この中和操作は、パスツールピペットにより 30%水酸化カリウム溶液を 2, 3 滴添加するだけのものであり、操作の簡便性を考慮して選択した。

さらに、振とう時間を 1, 3, 5, 10, 20, 30 および 60 分とし、各抽出液を多機能カラム (MultiSep 227) により精製した液を LC-MS で測定することにより、DON の抽出量の変化を調べた (Table 19)。その結果、各キットで定められている 30 秒から 3 分間の振とう時間では抽出が十分ではないことが判明した。また、最も DON の抽出効率が悪いコーングルテンミールにおいて、20 分の抽出時間で LC-MS の測定値に対して 80%以上の値が得られ、その後はほとんど増加しなかったことから、抽出時間は 20 分とした。

Table 18 2種類 of 抽出溶媒の比較

抽出溶媒	DON 濃度 (mg/kg)
水	0.49
1%炭酸水素ナトリウム溶液	0.50

Table 19 抽出時間による DON 濃度

抽出時間 (min)	キットの測定値に対する LC-MS の測定値の比 (%)			
	配合飼料	DDGS	コーングルテンフィード	コーングルテンミール
1	80	86	90	29
3	95	96	95	49
5	89	100	97	75
10	95	103	97	75
20	91	110	95	81
30	82	93	95	87
60	91	93	90	83

(3) デオキシニバレノール検出におけるアセチルデオキシニバレノールの影響

抗原-抗体反応を用いるキットでは、目的物質と類似した構造の物質を目的物質と誤認してしまうリスクが知られている。第3章において検査対象とされたとうもろこし加工副産物の大半には複数のトリコテセン類が含まれており、特に15AcDONを多量に含有していた。そこで、各キットについて、DONおよびその他の6種のトリコテセン類の0.2 µg/ml水溶液を測定し、交差反応性を調査した。

Table 20に示したように、全てのキットで3AcDONについて95~225%の高い交差反応性が確認された。また、2種類のキット(Immuno-2およびELISA-2)では、15AcDONの交差反応性も確認された。残りの4種類のカビ毒に関しては交差反応性が認められない、あるいは交差反応性がわずかに確認されたのみであった。

Table 20 各キットの交差反応性

測定対象 物質	各トリコテセン類の DON としての検出値 (%)				
	Immuno-1	Immuno-2	ELISA-1	ELISA-2	ELISA-3
DON	115	105	120	110	105
NIV	<5	<5	<5	<5	<5
T-2	<5	<5	<5	<5	<5
HT-2	<5	10	<5	<5	<5
FUX	<5	<5	<5	<5	<5
3AcDON	125	95	200	225	130
15AcDON	<5	40	<5	15	<5

次に、各キットを用いてとうもろこし加工副産物および配合飼料中の DON を測定する際に、他の 6 種のトリコテセン類が DON 測定値に与える影響を、収集したとうもろこし加工副産物および配合飼料のモニタリング結果と各キットの交差反応性から、DON 含量に対する AcDON の影響 (%) として計算した (Table 21)。この影響は、15AcDON と交差反応性が認められないキット (Immuno-1 ならびに ELISA-1 および 3) ではいずれも 10% 以下であったが、15AcDON と交差反応性を有するキット (特に Immuno-2) では最大 25% と算出された。以上の結果を考慮して、キットの検証に用いる検体は、DON の測定値に影響を与えないものを選択した。

Table 21 各検体における DON 含量に対する

AcDONs の交差反応性と含有濃度から算出した各キット測定による見かけ上の DON 濃度の割合

検体	検体数	検出値 (mg/kg) (検出数)			DON 含量に対する AcDON の影響 (%)				
		DON	3AcDON	15AcDON	Immuno-1	Immuno-2	ELISA-1	ELISA-2	ELISA-3
DDGS	27	0.12-6.2(27)	0.02-0.12(26)	0.10-2.1(26)	0.6-5.3	5.5-15.4	1.9-8.5	5.1-12.8	0.6-5.5
コーングルテン フィード	39	0.73-12(39)	0.01-0.03(27)	0.12-1.6(39)	0.3-1.1	2.2-14.0	0.5-1.7	0.8-6.6	0.4-1.1
コーングルテン ミール	36	0.06-0.64(24)	-	0.01-0.18(20)	-	2.2-25.0	-	0.8-9.4	-
配合飼料	30	0.15-1.2(30)	0.01(1)	0.03-0.29(29)	1.3	5.6-15.6	2.1	2.1-6.8	1.3

- : 検出せずまたは交差反応性なし.

(4) どうもろこし加工副産物および配合飼料に対する各キットの適用性の確認

①デオキシニバレノール測定における各キットの真度

真度については 7 回併行で測定した結果から、平均回収率、標準偏差、相対標準偏差 (RSD) を算出した (Table 22)。その結果、全てのキットの回収率は 80~120% の範囲に収まり、各キットの測定値は正確であることが示された。

なお、本測定に用いた検体は前章で収集した試料を使用した。これらの試料は、数点のコーングルテンミールを除き、全てトリコテセン類に汚染されていたことから、本測定ではトリコテセン類を含まないコーングルテンミール (AcDON は 0.01 mg/kg 未満、他のトリコテセン類は 0.05 mg/kg 未満) を選んで試験に用いた。

Table 22 DON の添加回収率 (コーングルテンミール)

	Immuno-1	Immuno-2	ELISA-1	ELISA-2	ELISA-3
平均 (%)	112.9	91.8	90.7	94.6	95.7
範囲 (%)	105-118	83-100	83-103	88-100	88-105
標準偏差	5.5	6.1	7.6	3.9	6.1
相対標準偏差 (%)	4.9	6.6	8.4	4.2	6.3

②デオキシニバレノール測定における各キットの精度（再現性）

精度（再現性）は、個々のキットについて7回の併行測定で得られた結果から算出したRSDにより評価した。

その結果、イムノクロマトキットのRSDは2.6～10.7%（Immuno-1）および2.9～10.4%（Immuno-2）、エライザキットは3.1～11.3%（ELISA-1）、1.3～8.4%（ELISA-2）および5.5～9.2%（ELISA-3）であった（Table 23～27）。これらの結果から、改良抽出法の導入により、各キットはいずれも良好な精度（再現性）を示したと判断された。しかしながら、Immuno-1のDDGSの0.97 mg/kg濃度区では、設定値の70%未満の結果を示し、精度の点で問題が認められた。

検体は設定濃度付近、または可能な限り低レベルでDONのみが含まれているものを選択し、後者を用いる場合は設定濃度付近の濃度になるようにDONを添加して試験に使用した。また、この際にはDONのみならず他の6種のトリコテセン類の含有量を考慮して、交差反応性による影響の最も少ないと考えられる検体を選択した。なお、一つの検体では一連の測定を行うのに十分な量が入手できなかったため、キットにより使用した検体が異なっていることから、設定濃度が各キットで異なっている。

Table 23 Immuno-1 キットの再現性 (n=7)

設定濃度 (mg/kg)	コーングルテン フィード		コーングル テンミール		DDGS		配合飼料	
	1.2	4.5	1.0	4.0	0.97	4.3	0.97	4.5
1	0.64	3.9	0.95	4.6	0.30	3.8	0.66	4.4
2	0.70	4.1	0.90	4.2	0.29	3.8	0.72	4.3
3	0.73	3.7	0.90	4.2	0.24	4.0	0.64	4.3
4	0.67	3.4	0.93	4.7	0.34	3.9	0.67	4.4
5	0.68	3.5	0.92	4.6	0.30	4.2	0.74	4.3
6	0.71	3.3	0.89	4.7	0.27	4.0	0.72	4.6
7	0.74	3.4	0.86	4.6	0.28	3.8	0.73	4.5
平均	0.70	3.61	0.91	4.51	0.29	3.93	0.70	4.40
標準偏差	0.04	0.30	0.03	0.22	0.03	0.15	0.04	0.12
相対標準偏差 (%)	5.0	8.2	3.2	4.9	10.7	3.8	5.7	2.6

Table 24 Immuno-2 キットの再現性 (n=7)

設定濃度 (mg/kg)	コーングルテン フィード		コーングル テンミール		DDGS		配合飼料	
	1.2	4.5	1.0	4.0	0.97	4.3	0.97	4.5
1	1.4	4.9	1.2	3.3	0.93	5.2	0.95	4.3
2	1.5	5.1	1.0	3.9	1.2	5.1	1.1	4.3
3	1.3	5.2	1.1	3.6	0.97	5.2	0.92	4.7
4	1.5	5.5	1.0	3.8	1.1	5.2	0.97	4.3
5	1.5	5.0	1.1	4.0	1.0	5.1	0.95	4.0
6	1.4	5.0	1.0	3.6	1.0	4.8	1.0	4.4
7	1.3	5.0	1.0	3.5	1.2	5.2	0.95	4.1
平均	1.41	5.10	1.06	3.67	1.06	5.11	0.98	4.30
標準偏差	0.09	0.20	0.08	0.24	0.11	0.15	0.06	0.22
相対標準偏差 (%)	6.4	3.9	7.4	6.6	10.4	2.9	6.1	5.2

Table 25 ELISA-1 キットの再現性 (n=7)

設定濃度 (mg/kg)	コーングルテンフィード		コーングルテンミール		DDGS		配合飼料	
	1.2	4.5	1.0	4.0	0.97	4.2	1.1	4.5
1	1.4	4.4	1.2	3.9	1.2	4.5	1.3	4.5
2	1.4	4.1	1.1	3.5	1.1	4.4	1.1	4.4
3	1.3	4.2	1.0	3.8	1.2	4.5	1.3	4.7
4	1.3	4.1	1.0	4.1	1.1	5.3	1.1	4.5
5	1.3	4.4	1.1	3.4	1.1	4.4	1.0	4.5
6	1.4	4.1	1.1	3.4	1.1	4.3	1.1	4.8
7	1.2	4.5	0.99	3.3	1.1	4.6	0.99	4.5
平均	1.33	4.26	1.07	3.63	1.13	4.57	1.13	4.56
標準偏差	0.08	0.17	0.08	0.30	0.05	0.34	0.13	0.14
相対標準偏差 (%)	5.7	4.0	7.2	8.4	4.3	7.3	11.3	3.1

Table 26 ELISA-2 キットの再現性 (n=7)

設定濃度 (mg/kg)	コーングルテンフィード		コーングルテンミール		DDGS		配合飼料	
	1.2	4.5	1.0	4.0	0.97	4.6	1.1	4.5
1	1.3	4.1	1.0	3.8	0.92	3.8	1.3	4.0
2	1.3	4.0	0.97	3.8	0.98	4.0	1.2	4.5
3	1.2	3.8	1.0	4.0	0.98	4.2	1.3	4.9
4	1.2	4.3	1.0	3.8	0.98	4.4	1.3	4.5
5	1.1	4.3	0.98	3.9	1.0	4.4	1.3	4.5
6	1.2	4.5	0.98	3.7	0.96	4.3	1.2	4.9
7	1.2	3.5	0.98	3.5	1.0	4.4	1.4	4.5
平均	1.21	4.07	0.99	3.79	0.97	4.21	1.29	4.54
標準偏差	0.07	0.34	0.01	0.16	0.03	0.23	0.07	0.30
相対標準偏差 (%)	5.7	8.4	1.3	4.2	2.8	5.6	5.4	6.7

Table 27 ELISA-3 キットの再現性 (n=7)

設定濃度 (mg/kg)	コーングルテンフィード		コーングルテンミール		DDGS		配合飼料	
	1.2	4.5	1.0	4.0	0.97	4.2	1.1	4.5
1	1.3	4.1	1.0	3.8	0.92	3.8	1.3	4.0
2	1.3	4.0	0.97	3.8	0.98	4.0	1.2	4.5
3	1.2	3.8	1.0	4.0	0.98	4.2	1.3	4.9
4	1.2	4.3	1.0	3.8	0.98	4.4	1.3	4.5
5	1.1	4.3	0.98	3.9	1.0	4.4	1.3	4.5
6	1.2	4.5	0.98	3.7	0.96	4.3	1.2	4.9
7	1.2	3.5	0.98	3.5	1.0	4.4	1.4	4.5
平均	1.21	4.07	0.99	3.79	0.97	4.21	1.29	4.54
標準偏差	0.07	0.34	0.01	0.16	0.03	0.23	0.07	0.30
相対標準偏差 (%)	5.7	8.4	1.3	4.2	2.8	5.6	5.4	6.7

4) 考 察

著者は、市販の2種類のイムノクロマトキットと3種類のエライザキットについて、とうもろこし加工副産物への適用性を評価した。キットが定めるマニュアルに従いこれらの検体を測定したところ、3種類のキットで一部の検体における機器分析値との比が70~120%の範囲から大きく外れ、明らかに不正確な値が導かれた。この原因としては、抽出時間が短いため抽出が不十分であること、抗原-抗体反応が阻害されていることなどが考えられた。そこで、キットの抽出操作について、抽出時間を長くする、抽出液を中和・遠心分離するといった改良を施した共通手順を構築した。この改良手順に従い、コーングルテンミールについて添加回収試験を行ったところ、全てのキットで回収率が80~120%の範囲に収まった。さらに、各とうもろこし副産物を対象とした繰り返し試験では測定値の相対標準偏差が最大で11.3%となり、機器分析値と関連した結果が得られた。SugitaらはアフラトキシンB₁検出キットの妥当性試験の研究において、繰り返し再現性が23.3%以下でスクリーニング法として妥当であると評価しており²⁴⁾、厚生労働省通知〔“とうもろこし中の総アフラトキシンの試験法について”平成23年食安監発第0816第7号(2011)〕でも併行精度25%未満のキットをとうもろこし中の総アフラトキシンの陰性判定に使用が可能としている⁴⁵⁾。したがって、本研究に供した各キットは、著者の抽出法改良手順を導入することにより、精度(回収率)および真度(繰り返し性)ともに良好な結果を示し、メーカーが分析対象としていないとうもろこし加工副産物に適用可能であることが明らかとなった。これらのキットは市販品であるがゆえに各社適用試料が限定されており、抽出手順の改良によるキットの適用試料拡大に関する取り組みは、試験室を離れた農作物の圃場や飼料工場などの現場での各キットのさらなる活用を促進するこれまでに類のない新たな研究といえる。

なお、精度の確認において、イムノクロマトキットのうちの 하나가、DDGSの0.97 mg/kg設定区でDONの濃度を過小に評価したことから、イムノクロマトテストキットは、特定のサンプルと濃度帯により偏った結果を提供するかもしれないことが示唆された。また、著者が収集したほとんどのとうもろこし加工副産物が複数のトリコテセン類に汚染されていたことから、定量キットによ

る DON の測定は、交差反応性により実際の DON 汚染量よりも高い分析値を示すことが予想された。そこで、著者は 5 種類のキットについて、それぞれのトリコテセン類に対する交差反応性と各検体のトリコテセン類濃度から、DON の測定値に与える影響を算出した。その結果、DON を過定量する割合は、最大でイムノクロマトキットが 25.0%、エライザキットが 12.8% と計算され、いずれのキットでも DON と 15AcDON 間に交差反応性を有するキットが、結果に与える影響が大きいという傾向を示した。したがって、とうもろこし加工副産物に DON 検出キットを用いる場合は、あらかじめ複数の濃度帯で正確性を検証すること、15AcDON に交差反応性を示すキットを利用する場合は 15AcDON による過定量に配慮することが必要と考えられた。

第 5 章

総合考察

世界各国で食品，飼料などについて広く規制されており，我が国においても食品安全委員会で評価が実施されているアフラトキシン類¹⁶⁾およびDON⁴⁷⁾は，カビ毒の検査ニーズの大半を占める主要カビ毒といえる。著者は，この2種類のカビ毒群について試験法の観点から一連の研究を行った。

アフラトキシンの類縁体はIRACでグループ1（発がん性がある）または2A（おそらく発がん性がある）と評価されており，遺伝毒性を有する発癌物質群であることから，無毒性量（NOAEL）を設定できないため，Sugitaは各食品の汚染実態調査の結果および摂取量調査から暴露マージンを算出して総アフラトキシンのリスク評価を行っている⁴⁸⁾。そのため，汚染量を低い濃度まで確認できるほど，リスク評価の精度が向上することになる。著者は，農作物の主要汚染物質であるAFB₁，B₂，G₁およびG₂と，最も毒性の強いB₁の代謝産物のうち，Galvanoらが乳中で最大23.5 ng/L検出したと報告しているAFM₁¹²⁾およびToledoら，TroxelらおよびLovelandらがメダカ，ゼブラフィッシュ，ニジマスといった魚類のAFB₁の代謝産物として報告しているAFL¹³⁾⁻¹⁵⁾を測定対象物質とした。結果としてAFB₁およびその主要代謝産物の高感度分析法となることから，本法が臓器中の代謝産物の測定にも適用できることを確認するため，検体をアフラトキシン類に対して感受性が高いニジマスの筋肉および肝臓とした。近年のアフラトキシン類の汚染調査では，他のカビ毒も同時に測定するLC-MSによる一斉分析法と，測定対象をアフラトキシンB₁，B₂，G₁およびG₂の4物質に限定したHPLC法が使い分けられている。一斉分析法ではWangらがアフラトキシン類4種，オクラトキシンA，DON，ゼアラレノン，フモニシンB₁およびT-2の同時分析法をアフラトキシン類のLOD（検出限界）0.01 ng/gで³³⁾，Spanjerらがアフラトキシン類4種，オクラトキシンA，DON，ゼアラレノンほか35種類ものカビ毒のスクリーニング法をアフラトキシン類のLOQ（定量下限）を1 ng/gとして報告している³²⁾。一方，HPLC法ではPradoらが緑茶やセンナなど8種類の乾燥抽出物についてアフラトキシン類のLOQを1.0 ng/gと²⁹⁾，Mushtaqらが125種類の調理済み食品についてアフラトキシン類のLODを0.01~0.02 ng/gと³⁰⁾，Yazdanpanahらが米，パン，コーンスナック，小麦粉および落花生についてアフラトキシン類のLODを0.01 ng/gと³¹⁾それぞれ報告している。いずれの報告においてもアフラトキシン類の測定対象はAFB₁，B₂，

G₁およびG₂の4種類で、検出限界は低くとも0.01 ng/g (ppb)である。著者は測定対象をAFB₁, B₂, G₁およびG₂に加えAFM₁およびAFLの6種類とし、食品の公定法をアレンジすることにより、一般の試験室でも容易に実施可能で、既報の汚染調査よりも高感度にアフラトキシン類を検出できる分析法を確立し、筋肉および肝臓で80%以上の良好な添加回収率を得た。

DONを含むトリコテセン類の系統分析については、古くはトリコテセン類の誘導体化物を、Kamimura, Valleら, Krskaらがガスクロマトグラフ-電子捕獲型検出器(GC-ECD)を用いる方法で⁴⁹⁾⁻⁵¹⁾, Schollenbergerら, Rodríguezらがガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)を用いる方法で報告している^{52),53)}。また、高速液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)が汎用化されるのにもない、近年ではSpanjerら, Tanakaら, Valleら, Aoyamaら, Chenら, Lindbladら, Uhligら, Wangらが、LC-MSによりトリコテセン類を他のカビ毒とともに測定する方法を報告している^{32),33),54)-59)}。Krskaらは、GC-ECDやGC-MSによる測定法は、試験室内の分析値の標準偏差が16%を越え、ばらつきが大きいと報告していることから⁵¹⁾, 著者は測定機器としてLC-MSを採用し、トリコテセン類の複合汚染が危惧される*Fusarium*属が産生するカビ毒のうち、DONならびにJECFAにより毒性がDONに匹敵すると評価されている3および15AcDONを含む共通のトリコテセン骨格を有するカビ毒7種類²¹⁾を測定対象とした。これらのトリコテセン類を最適条件で測定するため、飼料分析法⁴¹⁾を基にし、多機能カラムの溶出液を2つの画分に分け、一方をLC-MS/MSによる3AcDONおよび15AcDONの測定、他方をLC-MSによる他の5種のトリコテセン類の測定に用いることにより、3AcDONおよび15AcDONは0.01 mg/kg、他のトリコテセン類は0.05 mg/kgが十分に測定可能な試験法を構築することができた。DONが含まれていないコーングルテンミールを用いた添加回収試験において、トリコテセン類7種はいずれも良好な回収率(70~120%)と再現性(RSD 10%以内)が得られた。トリコテセン類の汚染調査に関する研究は多数あるものの、とうもろこし加工副産物を対象とした報告はZhangらがDDGS中のDON汚染を調査した一連の研究しかなく^{20),22)}, 測定対象物質にDONのアセチル誘導体を含み、DDGSのみならず、コーングルテンフィード、コーングルテンミールを測定対象とした報告は存在しないことから、本研究ではトリコ

テセン類の飼料汚染を調査するための有用な方法を確立したと評価できる。また、DDGS は発酵試料であるため、一般に DON や他のトリコテセン類の測定対象である小麦などの穀物や飼料などと比べて、低分子の有機化合物を多く含む難分析試料であり、これらの検体に十分適用できたことから、著者の試験法はとうもろこし加工副産物のみならず、様々な検体への適用が期待される。

さらに、著者は近年 DON の高濃度汚染が危惧されている飼料原料の DDGS、コーングルテンフィードおよびコーングルテンミールならびにそれらを配合した飼料計 131 検体についてトリコテセン類の汚染実態を調べた。その結果、これらの検体の主要汚染カビ毒は DON, 3AcDON および 15AcDON で、それらの汚染濃度はいずれも $DON > 15AcDON > 3AcDON$ の傾向を有することを明らかにした。先に述べたとおり、とうもろこし加工副産物について DON のアセチル誘導体を測定対象物質とし、コーングルテンフィード、コーングルテンミールを調査した例はなく、著者はとうもろこし加工副産物について、トリコテセン類の汚染実態に関する貴重なデータを得ることができた。

大半の検体が高濃度の DON に汚染されているとうもろこし加工副産物の管理には、圃場や飼料工場などの現場での検査、測定機会の増加、測定期間の短縮、試験コストの低減といった要求が生じることから、GC や HPLC などによる高精度の機器分析だけでなく、抗原-抗体反応を利用したキットによるスクリーニング測定を実施する機会が増えることになる。スクリーニング用といえども測定値が示されること、国内で市販されているキットはとうもろこし加工副産物に対する適用が保障されていないことから、5 種類の市販 DON 測定用定量キットについて、とうもろこし加工副産物への適用性の評価を目的として実験を行った。各キットのマニュアルに従い測定を行ったところ、3 種類のキットで機器分析値と大きく乖離するデータが得られた。そこで、その手順の抽出時間を延長し、得られた抽出液について遠心分離、中和操作を加えることにした。この改良抽出法により、各種とうもろこし副産物について性能評価を行ったところ、いずれのキットも精度・真度ともに良好な結果が得られた。これらの定量キットは、市販品であるがゆえに適用対象、抽出操作、交差反応性などが異なるため、複数のキットを対象とした研究報告例は少なく、5 種類のキット製品について、総アフラトシキンの判定への適用を調査した Sugita らの研究²⁴⁾

と、DON 検査用キット 4 製品について、10 種類のフザリウム毒素の DON との交差反応性を評価した Tangni らの報告しかない²⁵⁾。したがって、著者の抽出改良法を行うことにより、どのキットを使用しても抽出不足や抗体の変性を回避し、とうもろこし加工副産物に適用できるという新たな知見を得ることができたといえる。

Tangni らは 4 種類の DON 検出キットについて、10 種類のカビ毒の DON との交差反応性を調べ、DON と交差反応性を示すカビ毒はキットにより異なること、いずれのキットも 3AcDON との交差反応性が高いことを報告している²⁵⁾。このように免疫化学反応を利用したキットは、抗体によってそれぞれ異なるカビ毒を DON と誤認する恐れがあることから、各キットについて DON と複合汚染を生じる可能性が考えられる 6 種のトリコテセン類 (3AcDON, 15AcDON, T-2, HT-2, NIV および FUX) の交差反応性を調べた。さらに、収集したとうもろこし加工副産物および配合飼料について、モニタリングした各トリコテセン類の汚染量を考慮して、個々の検体およびキットの組み合わせによる過剰量の度合いを計算した。得られた結果から、交差反応性による DON 測定値に与える影響がほとんど認められない検体を選択し、改良抽出法による各キットの性能評価を行った。なお、他のトリコテセン類の汚染により、キットによる DON の測定値は最大で 25% の過剰量になると算出された。各検体中の汚染濃度と各キットの交差反応性から実際のサンプルのキット測定値に与える影響を示した著者の研究は、これまでに報告されていない貴重な知見といえる。

第 6 章

結 論

著者は、カビ毒のうち食品または飼料への汚染が最も憂慮されるアフラトキシン類およびトリコテセン類について、一斉または系統分析法を確立した。特にアフラトキシン類の分析法は、最も発がん性、急性毒性が強いアフラトキシン B₁ の主要代謝産物を含む高感度分析で、食品の公定法をアレンジしたものであることから、一般の試験室で比較的容易に実施が可能で、食品や飼料の汚染実態調査や動物試料の代謝産物研究など様々な用途に利用できるオールマイティな分析法としての活用が期待される。また、とうもろこし加工副産物がデオキシニバレノールにより高濃度に汚染されていることを踏まえ、とうもろこし加工副産物に適用が望まれる市販のデオキシニバレノール測定キットについて、抽出工程を改良することにより適用が拡大できることを検証した。さらに、とうもろこし加工副産物について7種のトリコテセン類の汚染実態を調査し、デオキシニバレノールおよびそのアセチル誘導体が主要汚染カビ毒であること、飼料中のアセチルデオキシニバレノール汚染に対する配慮が現状では十分でないことを明らかとした。

現在、食品安全委員会では、飼料中のアフラトキシン B₁ および食品中のアフラトキシン M₁ のリスク評価が進められており、アフラトキシン B₁ および M₁ を高感度に測定できる著者の試験法を活用する機会が増えることが想定される。また、食品安全委員会ですでに取りまとめられているデオキシニバレノールの評価では、DON の類縁体の汚染実態に関するデータが足りないことを課題の一つに挙げていることから⁴⁷⁾、本研究で得られたとうもろこし加工副産物におけるトリコテセン類の汚染データは、DON のリスク評価に関して有用な情報を提供するものといえる。

これら著者の主要カビ毒に関する分析手法および汚染実態に関する新たな知見は、食品や飼料などのカビ毒汚染の実態解明およびリスク管理に貢献するものと考えられた。

参考文献

- 1) Kamimura H. (1996) Contamination of mycotoxins in foods and removal of mycotoxins during food processing., *Mycotxins*, 43, 27-31.
- 2) Skladanka J., Adam V., Dolezal P., Nedelnik J., Kizek R., Linduskova H., Mejia J.E., Nawrath A. (2013) How do grass species, season and ensiling influence mycotoxin content in forage?, *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 10, 6084-95.
- 3) Ichinohe M. (2003) Relation of weather conditions to incidence of wheat scab and Fusarium-toxins., *Mycotoxins*, 53, 5-10.
- 4) Sunaga Y. (2011) 農林水産省におけるカビ毒のリスク管理, *Mycotoxins*, 61, 65-69
- 5) Tsuruta O. (1982) Mycotoxin in stored grains., *Mycotoxins*, 14, 10-13
- 6) Teller R.S., Schmidt R.J., Whitlow L.W., Kung L. Jr (2012) Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage., *J. Dairy Sci.*, 95, 1428-36.
- 7) 農林水産省 (2012) 麦類のデオキシニバレノール・ニバレノール汚染低減のための指針
- 8) Tabata S. (2008) Natural occurrence of mycotoxins in Japan –forced on putulin., *Mycotoxins*, 58, 129-135.
- 9) Yamamoto K. (2009) Aiming at improvement of the gap between the ideal and reality of the sampling size based on the evaluation of the aflatoxin inspection method of grainy farm products by OC-Curve., *Mycotoxins*, 59, 95-102.
- 10) Yoshizawa T. (2003) Human and animal intoxication episodes caused by trichothecene mycotoxins., *Mycotxins*, 53, 113-118.
- 11) IARC MONOGRAPHS VOLUME 82, IARC, Lyon, France, 171-300, 2002
- 12) Galvano F., Galofaro V., Ritieni A., Bognanno M., De Angelis A., Galvano G. (2001) Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy: second year of observation., *Food Addit. Contam.*, 18, 644-6.

- 13) Toledo C., Hendricks J., Loeland J., Wilcox J., Bailey G.S. (1987) Metabolism and DNA-binding in vivo of aflatoxin B₁ in medaka (*Orizias latipes*), *Comp. Biochem. Physiol.*, 87C, 275-281.
- 14) Troxel C.M., Reddy A.P., O'Neal P.E., Hendricks J.D., Bailey G.S. (1997) In vivo aflatoxin B₁ metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143, 213-220.
- 15) Loveland P.M., Coulombe R.A., Libbey L.M., Pawlowski N.E., Shinnhuber R.O., Nixon J.E., Bailey G.S. (1983) Identification and mutagenicity of aflatoxicol-M₁ produced by metabolism of aflatoxin B₁ and aflatoxicol by liver fractions from rainbow trout., *Food Chem. Toxic.*, 21, 557-562.
- 16) 食品安全委員会 (2009) かび毒評価書総アフラトキシン (アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂)
- 17) Tanaka T. (1987) Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in cereals and their decontamination after food processing., *Mycotoxins*, 26, 17-22.
- 18) Morozumi S. (1993) Contamination of fungi and mycotoxins in commercial foods., *Mycotoxins*, 37, 7-12.
- 19) Kim E.J., Amezcua C.M., Utterback P.L., Parsons C.M. (2008) Phosphorus bioavailability, true metabolizable energy, and amino acid digestibilities of high protein corn distillers dried grains and dehydrated corn germ., *Poult. Sci.*, 87, 700-5.
- 20) Zhang Y., Caupert J. (2012) Survey of mycotoxins in U.S. distiller's dried grains with solubles from 2009 to 2011., *J. Agric. Food Chem.*, 60, 539-43.
- 21) WHO (2010) Deoxynivalenol WHO Technical Report series No.959, Rome, Italy 37-48.
- 22) Zhang Y., Caupert J., Imerman P.M., Richard J.L., Shurson G.C. (2009) The occurrence and concentration of mycotoxins in U.S. distillers dried grains with solubles., *J. Agric. Food Chem.*, 57, 9828-37.

- 23) Lupo A., Roebuck C., Settimo K., Quain A., Kennedy J., Abouzied M. (2010) Validation study of a rapid ELISA for detection of deoxynivalenol in wheat, barley, malted barley, corn, oats, and rice., Performance Tested Method 090901., J. AOAC Int., 93, 600-10.
- 24) Sugita-Konishi Y., Niimi S., Sugiyama K. (2007) An inter-laboratory study to validate quantitative and qualitative immunoassay kits for screening test of aflatoxin B₁ in corn., Mycotoxins, 57, 75-80
- 25) Tangni E.K., Motte J.C., Callebaut A. Pussemier L. (2010) Cross-reactivity of antibodies in some commercial deoxynivalenol test kits against some fusariotoxins., J. Agric. Food Chem., 58, 12625-33.
- 26) Lewis L., Onsongo M., Njapau H., Schurz-Rogers H., Lubber G., Kieszak S., Nyamongo J., Backer L., Dahiye A.M., Misore A., DeCock K., Rubin C., Kenya Aflatoxicosis Investigation Group. (2005) Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya., Environ. Health Perspect., 113, 1763-1767.
- 27) Utsumi H. (2011) 食品中のアフラトキシンの規制について, Mycotoxins, 61, 59-64.
- 28) 小西良子 (2007) 厚生労働科学研究補助基金 食の安心・安全確保補助事業, 平成 16-18 年度総括研究報告書, 食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究
- 29) Prado G., Altoé A.F., Gomes T.C., Leal A.S., Morais V.A., Oliveira M.S., Ferreira M.B., Gomes M.B., Paschoal F.N., von S. Souza R., Silva D.A., Cruz Madeira J.E. (2012) Occurrence of aflatoxin B₁ in natural products., Braz. J. Microbiol., 43, 1428-36.
- 30) Mushtaq M, Sultana B., Anwar F., Khan M.Z., Ashrafuzzaman M. (2012) Occurrence of aflatoxins in selected processed foods from pakistan., Int. J. Mol. Sci., 13, 8324-37.

- 31) Yazdanpanah H., Zarghi A., Shafaati A.R., Foroutan S.M., Aboul-Fathi F., Khoddam A., Nazari F., Shaki F. (2013) Analysis of aflatoxin b₁ in Iranian foods using HPLC and a monolithic column and estimation of its dietary intake. *Iran J. Pharm. Res.*, 12, 83-9.
- 32) Spanjer M.C., Rensen P.M., Scholten J.M. (2008) LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction、with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs., *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 25, 472-489.
- 33) Wang Y., Xiao C., Guo J., Yuan Y., Wang J., Liu L., Yue T. (2013) Development and Application of a Method for the Analysis of 9 Mycotoxins in Maize by HPLC-MS/MS., *J. Food Sci.*, 78, 1752-6.
- 34) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知“カビ毒（アフラトキシン）を含有する食品の取り扱いについて”平成 20 年食安監発第 0728003 号（2008）別添「穀類，豆類，種実類および香辛料類中のアフラトキシン B₁ 試験法」
- 35) Kusssak C.A., Anderson B., Andersson K., Nilsson C.-A. (1998) Determination of aflatoxicol in human urine by immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography., *Chemosphere*, 36, 1841-1848.
- 36) Miyake S., Uchigashima M., Saigusa M., Yamashita H., Fujita K., Nakajima M., Nishizima M. (2009) Development of a novel immunoaffinity column for aflatoxin analysis using an organic solvent-tolerant monoclonal antibody., *J. Agric. Food Chem.*, 57, 8728-8734.
- 37) 川村理（2009）日本マイコトキシン学会 第 66 回学術講演会要旨集，オクラトキシン B に対するモノクローナル抗体の作製とこれを用いた IAC を用いた測定法の検討
- 38) Currie L.A. (1995) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995) ., *Pure. Appl. Chem.*, 67, 1699-1723.

- 39) Nomura H., Ogiso M., Yamashita M., Takaku H., Kimura A., Chikasou M., Nakamura Y., Fujii S., Watai M., Yamada H. (2011) Uptake by dietary exposure and elimination of aflatoxins in muscle and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)., *J. Agric. Food Chem.*, 59, 5150-8.
- 40) Koiwa M. (2004) Incidence of dairy cattle affected with mycotoxins., *Mycotxins*, 54, 107-112.
- 41) 飼料分析法・解説 2009 (2010) 日本科学飼料協会, 231-235
- 42) Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. (2007) A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples., *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 1505–1523.
- 43) Beltrán E., Ibáñez M., Sancho J.V., Hernández F. (2009) Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry., *Rapid Commun., Mass Spectrom.*, 23, 1801–1809.
- 44) Kolosova A.Y., De Saeger S., Sibanda L., Verheijen R., Van Peteghem C. (2007) Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of zearalenone and deoxynivalenol., *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 2103-7.
- 45) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知平成 23 年食安監発 0816 第 7 号 (2011) “トウモロコシ中の総アフラトキシンの試験法について”
- 46) Ruprich J., Ostrý V. (2008) Immunochemical methods in health risk assessment: cross reactivity of antibodies against mycotoxin deoxynivalenol with deoxynivalenol-3-glucoside., *Cent. Eur. J. Public Health.*, 16, 34-7.
- 47) 食品安全委員会 (2010) かび毒評価書デオキシニバレノール及びニバレノール
- 48) Sugita-Konishi Y. (2010) Exposure to aflatoxins in Japan: risk assessment for aflatoxin B₁., *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 27, 365-72.

- 49) Kamimura H. (1981) Simultaneous detection of several mycotoxins from *Fusarium* spores in cereals and foodstuffs., *Mycotoxins*, 13, 27-33.
- 50) Valle-Algarra F.M., Medina A., Gimeno-Adelantado J.V., Llorens A., Jiménez M., Mateo R. (2005) Comparative assessment of solid-phase extraction clean-up procedures, GC columns and perfluoroacylation reagents for determination of type B trichothecenes in wheat by GC-ECD., *Talanta*, 66, 194-201.
- 51) Krska R., Welzig E., Drs E., Josephs R.D., Schothorst R.C., Van Egmond H.P. , Pettersson H., Chan D., MacDonald S. (2006) Feasibility study for the production of certified calibrants for the determination of deoxynivalenol and other B-trichothecenes: intercomparison study., *J. AOAC Int.*, 89, 1573-80.
- 52) Schollenberger M., Müller H.M., Rühle M., Suchy S., Plank S., Drochner W. (2006) Natural occurrence of 16 fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany., *Mycopathologia*, 161, 43-52.
- 53) Rodríguez-Carrasco Y., Moltó J.C., Berrada H., Mañes J. (2013) A survey of trichothecenes, zearalenone and patulin in milled grain-based products using GC-MS/MS., *Food Chem.*, 146, 212-9.
- 54) Tanaka H., Takino M., Sugita-Konishi Y., Tanaka T., Toriba A., Hayakawa K. (2009) Determination of nivalenol and deoxynivalenol by liquid chromatography / atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 3119–3124.
- 55) Valle-Algarra F.M., Mateo E.M., Mateo R., Gimeno-Adelantado J.V., Jiménez M. (2011) Determination of type A and type B trichothecenes in paprika and chili pepper using LC-triple quadrupole-MS and GC-ECD., *Talanta*, 84, 1112-7.
- 56) Aoyama K., Akashi H., Mochizuki N., Ito Y., Miyashita T., Lee S., Ogiso M., Maeda M., Kai S., Tanaka H., Noriduki H., Hiraoka H., Tanaka T., Ishikuro E., Itoh Y., Nagayama T., Nakajima M., Naito S., Sugita-Konishi Y. (2012) Interlaboratory Study of LC-UV and LC-MS Methods for the Simultaneous Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol in Wheat., *J. Food Hyg. Soc.*, 53, 152-6.

- 57) Chen D., Cao X., Tao Y., Wu Q., Pan Y., Peng D., Liu Z., Huang L., Wang Y., Wang X., Yuan Z. (2013) Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ultrasound-assisted extraction and auto solid-phase clean-up method for the determination of Fusarium toxins in animal derived foods., *J. Chromatogr. A.*, 1311, 21-9.
- 58) Lindblad M., Gidlund A., Sulyok M., Börjesson T., Krska R., Olsen M., Fredlund E. (2013) Deoxynivalenol and other selected Fusarium toxins in Swedish wheat - Occurrence and correlation to specific Fusarium species., *Int. J. Food Microbiol.*, 167, 284-91.
- 59) Uhlig S., Eriksen G.S., Hofgaard I.S., Krska R., Beltrán E., Sulyok M. (2013) Faces of a changing climate: semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in norway., *Toxins (Basel)*, 5, 1682-97.

謝辞

推薦教員として、本論文の作成にあたり、終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して頂きました茨城大学農学部足立吉敷教授に深く感謝致します。

また、幾つもの課題、テーマに共に挑戦してくれたカビ毒分析チームの皆様、論文投稿時に多忙の中、英語論文の査読を快く引き受けて頂きました木船信行部長、学位論文への取りまとめの機会を勧めて頂きました石黒瑛一顧問に心から感謝致します。

最後に、入社以来二十数年、分析試験に関して様々な経験の場を提供して頂き、技術者としてだけでなく、ヒトとしても成長の機会を与えて下さった上に、本論文の取りまとめの機会を快く許して頂きました一般財団法人 日本食品分析センターの皆様に御礼申し上げます。