神奈川県衛生研究所研究報告　No. 42 (2012)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いた穀類加工品中のフザリウム属カビ毒の分析

甲斐茂美，小菅教仁，脇ますみ，岸　弘子

Analysis of *Fusarium* mycotoxins in grain products using liquid chromatography / tandem mass spectrometry

Shigemi KAI, Norihito KOSUGE,
Masumi WAKI and Hiroko KISHI

緒　言

フザリウム属のカビは圃場菌類と呼ばれ，農作物の栽培中に植物組織内に侵入し，繁殖する植物病原菌であり，土壌菌類として世界中に広く分布している．フザリウム属のカビが産生するカビ毒には，トリコテセン類，ゼアラレノン(ZEN)，フモニシン等がある．トリコテセン類はトリコテセン骨格と呼ばれる共通構造を有するカビ毒であり，100種類以上の化合物があり，中毒症の原因となるニバレノール(NIV)，デオキシニバレノール(DON)，T－2トキシン(T－2)，HT－2トキシン(HT－2)等が含まれる．トリコテセン類の毒性は主に消化器系障害及び免疫機構抑制であり，種々の動物に対して嘔吐，悪心，めまい，下痢，出血，皮膚炎症，造血機能低下等の急性中毒を引き起こすことが知られている．トリコテセン骨格を持たないZENは強いエストロゲン活性を有し，家畜に対する女性ホルモン作用が特徴的であり，家畜に対する健康被害が問題となっている．フモニシンは比較的最近発見され，ブタの肺水腫，ウマの白質脳症の原因物質とされている．現在までにフモニシンA，B，C及びP群が報告されている．これらのフザリウム属カビ毒は世界中に広く分布することから，ムギ類やトウモロコシなどの重要穀類を汚染しヒトや家畜の健康被害の原因となることが懸念される[1-3]．

食品に対する規制値は，日本では小麦のDONについて1.1mg/kg　(1100ng/g)という暫定基準が設定されているのみである[4]．著者らは高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いたDONの分析法について報告した[5]．しかし，検査体制は規制のある小麦に限られており，また穀類への共汚染が懸念されるフザリウム属カビ毒については対応が出来ていない．

そこで今回，フザリウム属カビ毒のうち，DONと類似した骨格を有するトリコテセン類と，主な汚染食品が共通しているZENについての同時分析法を検討した．さらに，穀類を加工した市販食品について未規制カビ毒の汚染調査を実施したので報告する．

神奈川県衛生研究所　理化学部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

方　法

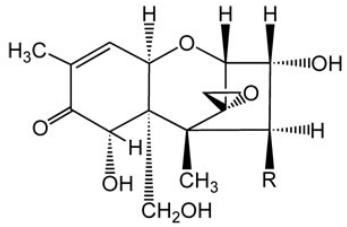
1．試料及び試薬

試料は神奈川県内の小売店及びインターネットで購入した小麦粉，コーングリッツ等の穀類粉類を分析対象とした．

NIV，DON，T－2，HT－2，ZEN標準品は和光純薬工業製を用いた(図１)．その他の試薬は和光純薬工業製残留農薬分析用及びLC-MS用を用いた．多機能クリーンアップカラムはRomer社製MultiSep 226 AflaZon+を用いた．

ニバレノール（NIV）
分子量：312.3
分子式：$C_{15}H_{20}O_7$

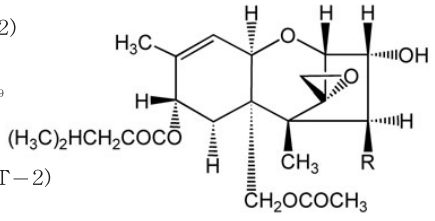
デオキシニバレノール(DON)
分子量：296.3
分子式：$C_{15}H_{20}O_6$



NIV　：R=OH
DON　：R=H

T－2トキシン(T－2)
分子量：466.5
分子式：$C_{24}H_{34}O_9$

HT－2トキシン(HT－2)
分子量：424.5
分子式：$C_{22}H_{32}O_8$



T－2　：R=$OCOCH_3$
HT－2　：R=OH

ゼアラレノン(ZEN)
分子量：318.2
分子式：$C_{18}H_{22}O_5$

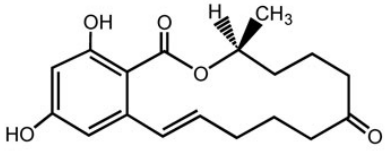


図１　フザリウム属カビ毒の構造式

２．装置及び分析条件

HPLC条件：

装置：Prominenceシリーズ(島津製作所製)

カラム：ODS－4(2.1mm i.d.×150mm，3μm，ジーエルサイエンス社製)

カラム温度：40℃

流速：0.2ml/分

移動相：A；10mM酢酸アンモニウム

B；メタノール

グラジエント条件；直線グラジエント

A(95%)→12分→A(0%)(8分保持)

注入量：10μl

MS/MS条件：

装置：3200Qtrap(エービー・サイエックス社製)

イオン化法：エレクトロスプレー(ESI)

イオンスプレー電圧：5kV，－4.2kV

イオンスプレー温度：400℃

ネブライザーガス圧：70psi

イオンスプレーガス圧：80psi

化合物ごとのその他の条件は表1に示した．

表１　LC/MS/MSの測定条件

化合物	極性	定量イオン			確認イオン		
		MRM Trace (*m/z*)	DP (V)	CE (V)	MRM Trace (*m/z*)	DP (V)	CE (V)
NIV	－	371→281	−15	−18	311→281	−25	−12
DON	－	355→265	−15	−16	295→265	−30	−14
T-2	＋	484→305	16	19	484→215	16	25
HT-2	＋	442→263	11	19	442→215	11	19
ZEN	＋	319→187	21	23	319→283	21	17

DP：デクラスタリングポテンシャル(Declustering　Potential)
CE：コリジョンエネルギー(Collision　Energy)

3.　試験溶液の調製

試料25.0gを正確に採り，アセトニトリル－水(85：15)100mlを加えた後，30分間振とう抽出した．3000rpm，10分間遠心分離し，得られた上澄み液を抽出溶液とした．抽出溶液をMultiSep226AflaZon+に負荷した．初流4mlを捨て，次の分画3mlを採り，その2mlを正確に分取した．窒素気流下で溶媒を除去した後，残留物をメタノール－水(1：9)1mlを正確に加えて溶解した．13000rpmで5分間遠心分離した後，上澄み液を試験溶液とした．

結果と考察

1.　LC/MS/MS測定条件について

高感度な測定による定量，確認のためマルチプルリアクションモニタリング(MRM)モードによる分析条件について検討した．イオン化法をESIとし，インフュージョン法によりイオン化条件を検討したところ，NIV及びDONはネガティブモードで酢酸付加体からの脱プロトンイオン$[M+CH_3COO]^-$(NIV　*m/z*371，DON　*m/z*355)，脱プロトンイオン$[M-H]^-$(NIV　*m/z*311，DON　*m/z*295)を，HT－2及びT－2はポジティブモードでアンモニウム付加イオン$[M+NH_4]^+$(T－2　*m/z*484，HT－2　*m/z*442)，ZENはポジティブモードでプロトン付加イオン$[M+H]^+$（*m/z*319）を高感度に検出した．さらに，これらのイオンをプリカーサイオンとして選択し，MS/MSのパラメーターの最適化を行った．この結果から，プロダクトイオンには表1に示した定量イオン，確認イオンを選択した．また，最適化によって得られた各化合物ごとの分析条件を表１に示した．

HPLCに用いるカラムはODSカラムについて検討し，ピーク形状，各物質の分離が優れていたジーエルサイエンス社製ODS－4を用いた．移動相に加える添加剤については，既報[5]に従い酢酸アンモニウムを選択した．移動相に用いる有機溶媒についてメタノール及びアセトニトリルについて検討し，各化合物に対しより安定で高感度の分析が可能であったメタノールを選択した．

各化合物の混合標準溶液1，5，10，25，50，100及び250ng/mlをメタノール－水(1：9)で調製し，表１に示した分析条件で測定して，定量イオンを用いて検量線を作成した．その結果，NIVは5～100ng/ml，DONは5～250ng/ml，HT－2は1～250ng/ml，T－2，ZENでは1～100ng/mlの範囲で良好な直線性(r>0.999)が得られた．なお，表1に示した確認イオンにおいても，同様の濃度範囲で良好な直線性(r>0.999)が得られた．

また，各標準溶液のMRMモードの定量イオンのクロマトグラムの一例を図2に示した．

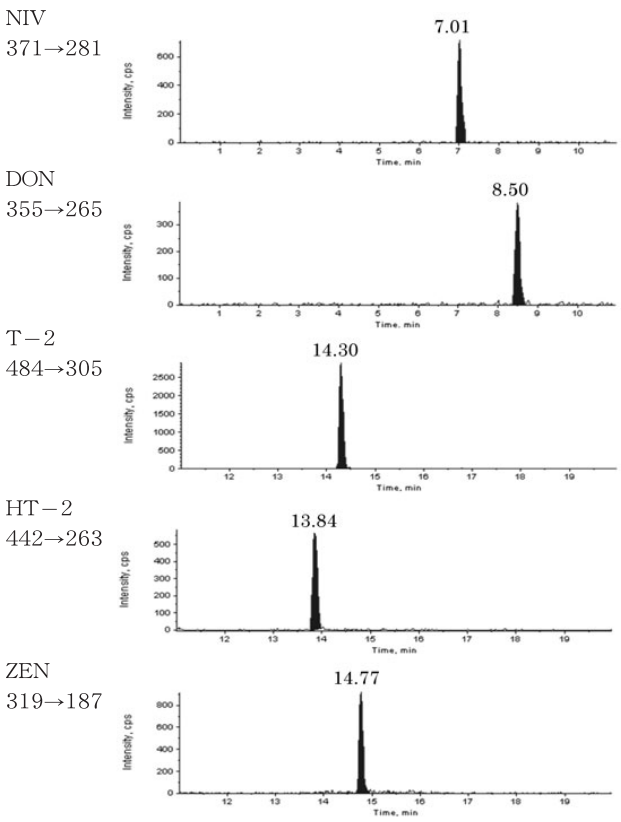


図2　カビ毒標準溶液のLC/MS/MSのクロマトグラム
(MRMモード)
NIV，DON：25ng/ml　　T－2，HT－2，ZEN：5ng/ml

2．試験溶液の調製について

MultiSep226AflaZon+から各化合物が流出する挙動を確認するため，各標準液を小麦粉の抽出液で50ng/mlになるように希釈したものをMultiSep226AflaZon+に負荷し，その流出液を1mlごとに分画し，各分画における回収率を求めた．結果を図3に示した．

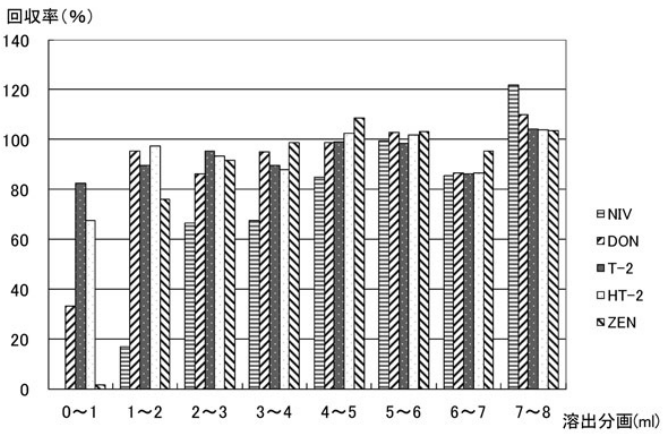


図3　各カビ毒のMultiSep 226 AflaZon+からの溶出挙動

DON，HT－2は1～2ml分画，T－2，ZENは2～3ml分画，NIVは4～5ml分画以降で回収率が常に80%以上を示し，カラムからの溶出が安定することが分かった．このことから各化合物を一斉分析するため，MultiSep226 AflaZon+からの抽出液は初めの流出液4mlを捨て，その後の3mlから2mlを正確に分取することとした．

3．添加回収試験

小麦粉にNIV及びDONは20ng/g，T－2，HT－2，ZENは5ng/gになるように添加した試料に対し，本法に従って試行回数5回の分析を行い，回収率及び変動係数を求めた．結果を表2に示した．今回分析対象としたフザリウム属カビ毒については分析法の妥当性を評価する基準は示されていないため，カビ毒のアフラトキシン試験法の評価基準（回収率70～110%，併行精度(変動係数)20%以下）と比較したところ，回収率でNIV及びHT－2がわずかに評価基準を満たさなかったが，他は評価基準を満たしており，概ね良好な結果が得られた．

また，小麦粉抽出液で調製したマトリックス標準溶液を用いて得られたクロマトグラムからS/N=10となる濃度を求め，結果を表2に示した．この結果から，本試験法を用いた試料中の定量限界（S/N≧10）は，NIV及びDONは15ng/g，T－2，HT－2及びZENは5ng/gとした．

4．市販食品汚染調査

本法を用いて神奈川県内の小売店及びインターネットで購入した麦類，トウモロコシ等穀類の加工品20検体について汚染調査を実施した．結果を表3に示した．検体の内訳はコーングリッツ等トウモロコシ加工品5検体，小麦粉，ライ麦粉等麦類を原料とする加工粉類10検体，オートミール類5検体であった．DONがトウモロコシ加工品1検体及び麦加工粉製品8検体から検出され，検出値は15～180ng/gであった．また，T－2は2検体，HT－2は3検体が麦加工粉製品から検出されたがいずれも20ng/g未満であった．我が国におけるDONの暫定基準値は小麦に対し1.1mg/kg（1100ng/g）であり[4]，我が国では未規制だが，ヨーロッパ等の食品に対するT－2の規制値は100ppb（100ng/g）であることから[3]，今回検出されたカビ毒の値は食品の安全性に対し問題のない量であると考えられた．

表２　添加回収試験結果及び定量限界

	NIV	DON	T－2	HT－2	ZEN
回収率（%）	67.8	80.2	90.5	115.4	75.1
変動係数（%）	18.1	13.3	1.9	7.0	12.8
S/N=10(ng/ml)	6.25	3.89	2.28	0.63	1.25

回収率及び変動係数；
試行回数　n=5
添加量　NIV，DON：20ng/g　T－2，HT－2，ZEN：5ng/g

表３　汚染調査結果

品名	検査結果　(ng/g)				
	NIV	DON	T-2	HT-2	ZEN
コーングリッツ	ND	ND	ND	ND	ND
コーングリッツ	ND	ND	ND	ND	ND
コーンミール	ND	ND	ND	ND	ND
コーンフラワー	ND	17	ND	ND	ND
コーンフラワー	ND	ND	ND	ND	ND
小麦粉	ND	ND	ND	ND	ND
小麦粉	ND	42	ND	ND	ND
全粒粉	ND	99	ND	ND	ND
全粒粉	ND	49	ND	ND	ND
ライ麦粉	ND	16	ND	ND	ND
ライ麦粉	ND	ND	ND	ND	ND
グラハム粉	ND	110	ND	ND	ND
グラハム粉	ND	87	ND	ND	ND
ブラン	ND	180	ND	7	ND
小麦胚芽	ND	25	ND	ND	ND
オートミール	ND	15	17	18	ND
オートミール	ND	ND	19	6	ND
オートミール	ND	ND	13	ND	ND
オートミール	ND	40	ND	ND	ND
オートミール	ND	ND	ND	ND	ND

ND：定量限界値未満
定量限界値：NIV，DON；15ng/g　　T－2，HT－2，ZEN；5ng/g

まとめ

主に穀類への汚染が懸念されるフザリウム属カビ毒について，同時分析法を検討し，穀類を加工した市販食品についてNIV，DON，HT－2，T－2，ZENの汚染調査を実施した．

アセトニトリル－水(85：15)で抽出後，精製にMultiSep226AflaZon+を用い，LC/MS/MSによる同時分析法を構築した．本法による各カビ毒の回収率は67.8％～115.4%，変動係数は20%以内，定量限界値は試料中濃度でNIV及びDONは15ng/g，T－2，HT－2及び

ZENは5ng/gであった．

本法を用いた市販穀類加工品の汚染調査により，DONがトウモロコシ加工品1検体及び麦加工粉製品8検体，T－2が麦加工粉製品2検体，HT－2が麦加工粉製品3検体から検出された．今回検出されたカビ毒の値は食品の安全性に対し問題のない量であると考えられた．

カビ毒の食品汚染に対する対策は，海外では規制があるものの，我が国ではまだ残留基準値が定められておらず，食品への汚染が懸念されるカビ毒が数多く存在している．今後とも，このような未規制カビ毒に対して流通食品のモニタリング調査を進めていきたいと考える．

謝　辞

本研究は平成23年度神奈川県保健福祉局生活衛生部食品衛生課食品科学検査事業の一環として実施した．ご協力いただいた食品衛生課の皆様に深謝いたします．

（平成24年８月１日受理）

文　献

１）田端節子：食品分析インフォメーションVol.11，食品衛生研究，**55**，41-47（2005）

２）田中敏嗣，芳澤宅實：カビ毒による中毒例と研究のあゆみ，FFIジャーナル，**211**，997-1003（2006）

３）小西良子：カビ毒の毒性と作用機序および最近の知見，FFIジャーナル，**211**，1004-1009（2006）

４）厚生労働省医薬局食品局食品安全部長通知：デオキシニバレノールの試験法について，平成15年7月17日付食安発第0717001号（2003）

５）甲斐茂美，赤星猛，藤巻照久：高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いた穀類中のカビ毒，デオキシニバレノールの分析，神奈川衛研報告，**37**，28-30（2007）