

令和元年6月11日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08205

研究課題名(和文)カビ毒配糖体の存在実態の解明とリスク評価

研究課題名(英文)Elucidation of the existence of mycotoxin glycosides and risk assessment

研究代表者

川口 里恵(伊藤里恵)(Kawaguchi-Ito, Rie)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90398892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カビ毒であるデオキシニバレノール(DON)およびその配糖体であるDON-3-グルコシド(D3G)の同時分析法を構築し、さらに実試料としてビールの分析を行い汚染実態を解明した。その後、その定量値をもとにした曝露量評価を行った。構築した分析法でビールを測定した結果、DON、D3Gともに高頻度で検出され、その検出濃度は最大でDON：70.3 ng/mL、D3G：203.9 ng/mLであった。最も高濃度に検出されたビールを用いて、ヒト曝露量を試算したところ、DONのみでは耐容一日摂取量(TDI)を超えることはなかったが、配糖体を含めた曝露量評価ではTDIを超えることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビール中のデオキシニバレノール(DON)およびその配糖体(D3G)の分析法を構築し、実試料での測定を行ったところ、DONおよびD3Gが高頻度で検出されることが明らかとなった。実試料の定量値を用いて行った曝露量評価では、従来のDON単独での曝露量評価では、その曝露量を過小評価していることを明らかにしており、今後、カビ毒の曝露量を試算する場合には、配糖体からの曝露も勘案する必要があると示した。このことはこれまでのカビ毒単独での曝露量評価に警鐘を鳴らすものであり、学術的にも社会的にも大きな意義を持つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, simultaneous determination of deoxynivalenol (DON) and DON-3-glucoside (D3G) was developed to clarify the mycotoxin contamination in beer. As a result of determination of beer, DON and D3G were detected at high frequency, and the maximum detected concentration of DON and D3G were 70.0 and 203.9 ng/mL, respectively. Based on the quantitative value, human exposure was estimated and the risk was assessed. When humans drank the most polluted beer, DON alone did not exceed tolerable daily intake (TDI), but including D3G exposure exceeded TDI.

研究分野：分析化学

キーワード：カビ毒 カビ毒配糖体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2015年に環太平洋経済連携協定(TPP)が大筋合意に至り、このTPP協定により今後、更に輸入食品が増加することが確実視されていた。輸入食品は、輸送や保管の際に管理状態が不十分であると、カビが発生し、カビ毒汚染の原因となる。輸入食品の安全性を確保するためには、カビ毒汚染などのリスクを科学的に評価しなければならない。

これまでカビ毒の汚染実態の解明やリスク評価を目的として食品中のカビ毒測定が行われているが、従来のカビ毒の測定法では検出できない“隠れたカビ毒(カビ毒配糖体)”が発見されてきた。カビ毒配糖体は、ヒトが摂取すると体内で加水分解されて、カビ毒を遊離する。しかしながら、食品中では配糖体として存在するため、従来の分析法では検出できない。そこで、カビ毒汚染やリスクの評価には、カビ毒のみならずカビ毒配糖体も含めたリスク管理が必要であると考へた。

2. 研究の目的

従来よりカビ毒の曝露量評価において、食品中のカビ毒を理化学的な分析装置を用いて分析し、その定量値を指標として、食品の摂取量を勘案することで曝露量の評価を行ってきた。しかしながらカビ毒配糖体は、カビ毒に糖が結合した配糖体構造を取っており、カビ毒を標準品とした一般的な分析法では検出されない。さらに、食品は脂肪分や色素など非常に複雑なマトリックスを有しており、微量に存在すると考えられるカビ毒を精度良く高感度に検出するには、適切な前処理法が必要となる。また、カビ毒の低い規制値や極微量での汚染を想定し、高感度・高精度な分析法が要求されると考へ、測定には液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いることにした。構築した分析法を使って食品中に残留するカビ毒およびカビ毒配糖体の同時分析を実施し、汚染実態の解明および定量値を用いてリスク評価を実施することにした。

すなわち、本研究では(1)カビ毒分析における食品の前処理法の検討、(2)LC-MS/MSを用いたカビ毒およびカビ毒配糖体の同時分析法の構築、(3)カビ毒の汚染実態の解明、(4)カビ毒配糖体の汚染を含めたカビ毒のリスク評価の4つの課題に取り組むことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)カビ毒分析における食品の前処理法の検討

食品試料の前処理法の検討として、ピーナッツやチーズなどの固形食品、めんつゆやビールなどの液状食品について、前処理法を構築した。ビール試料においてカビ毒配糖体が検出され、リスク評価まで実施したため、ビールに関する前処理および分析法を中心に報告する。

ビール中カビ毒の分析における前処理法

ビールの分析に関して、ビール中で汚染が報告されているデオキシニバレノール(DON)、3-アセチルDON(3A-DON)、15-アセチルDON(15A-DON)、ニバレノール(NV)およびT-2 toxin(T-2)を測定対象とした際には、前処理として、脱気したビールに内標準物質、ハーフロスーパーセル、アセトニトリルを加え、十分に振とうした後に減圧ろ過、濃縮乾固を行った。その後、アセトニトリル/水混液で再溶解してカビ毒分析用多機能カラムであるMycosep® #227に通塔した。夾雑物質を多機能カラムに保持させ、溶出してきたカビ毒を減圧乾固後、アセトニトリル/水混液で再溶解したものを試料溶液とした。

ビール中カビ毒およびカビ毒配糖体の分析における前処理

カビ毒とカビ毒配糖体の同時分析として、DONおよびDON-3-グルコシドを測定対象とした。脱気したビールをHLBカートリッジを用いたSPEに適用した。HLBカートリッジをメタノールおよび水でコンディショニングし、試料を負荷した後、精製水で洗浄した。1回目の溶出は、アセトニトリル1 mLを、2回目の溶出はアセトニトリル/濃アンモニア水=98:2、1 mLで行い、それぞれ窒素乾固して、再溶解し、LC-MS/MSの測定に供した。

(2)LC-MS/MSを用いたカビ毒およびカビ毒配糖体の同時分析法の構築

HPLCにはAgilent社製のHPLCシステム1100Seriesを、MSにはABSciex社製のAPI4000を用いた。LCの移動相は、A:メタノールおよびB:1.25 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用い、A%=30%[0~2.5 min] 60%[2.51~3.5 min] 90%[3.51~6.5 min] 30%[6.51~20.0 min]のグラジエント溶出で、流速を0.150 mL/minに設定した。分析カラムにはL-column2 ODS(150×2.1 mm i.d., 3 μm)を用い、カラム温度30℃に設定した。また、試料注入量は10 μLとした。MS/MSの測定では、イオン化にエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を採用し、DON、DON-3-グルコシドともにポジティブイオンモードを適用した。測定モードには、多重反応モニタリング(MRM)を選択し、モニタリングDON:m/z 355/265、DON-3-グルコシド:m/z 457/59、457/247を設定した。MSのパラメータとして、イオンスプレー電圧は4000 V、イオン源温度550度、イオン源ガス圧1は40 psi、イオン源ガス圧2は80 psi、カーテンガスは30 psi、コリジョンガス圧5 psiに設定した。

(3)分析法のバリデーションデータおよび精度管理

標準溶液を用いて、シグナルノイズ比(S/N=)3となる濃度を検出限界(LOD)、S/N=10となる濃度を定量下限値とした。精度管理を目的に、添加回収試験を実施した。ビールに低濃

度添加として 5 ng/mL、高濃度添加として 50 ng/mL となるように標準物質を添加し、構築した前処理を行ったのち、LC-MS/MS 測定に供した。測定は 1 日 2 検体 5 日間測定し、一元配置分散分析による統計処理にて真度（回収率）、併行精度、室内精度を求めた。

4. 研究成果

(1) カビ毒分析における食品の前処理法の検討

ビールの前処理に SPE を用いるにあたり、SPE カートリッジの検討を行った。Oasis MCX, MAX, WCX, WAX, HLB を検討した。それぞれのコンディショニングや洗浄溶媒は、図 1 に示すとおりである。標準品を添加したビールを各 SPE カートリッジで前処理し、窒素乾固および再溶解後に LC-MS/MS 測定に供した。その結果、イオン交換系 SPE カートリッジで最も高い回収率が得られたが、クロマトグラム上で良好なピーク形状が得られなかった。そこで、89%以上の回収率が得られ、さらに操作性も高い、HLB カートリッジを採用することとした。

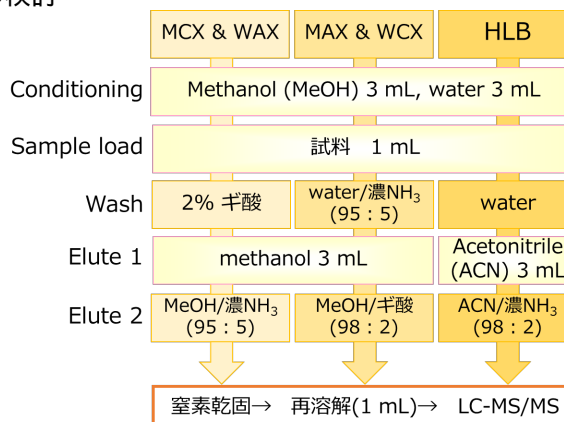


図 1 SPE カートリッジの検討とその条件

さらに、溶出溶媒を窒素乾固した後に、再溶解を行ったところ、再溶解溶媒に含有される有機溶媒組成によって、クロマトグラム上のピーク強度が変化することが明らかとなった。そのため、再溶解溶媒の検討を行った。有機溶媒組成の異なる標準溶液を調製し、DON および DON-3-グルコシドのピーク強度を比較したところ、標準溶液中のアセトニトリルの割合が少なくなるにつれて、ピーク強度が大きくなり、ピーク形状も改善したことから、再溶解の溶媒には精製水を用いることにした。

(2) LC-MS/MS 分析法のバリデーションデータおよび精度管理

標準溶液を用いて検量線を作成した。表 1 に示す通り、DON および DON-3-グルコシドの LOD は 0.39 ng/mL および 1.5 ng/mL であり、LOQ は 1.5 ng/mL および 3.1 ng/mL であった。検量線は LOQ から 100 ng/mL の濃度範囲で、相関係数 0.999 以上の良好な直線性を有していた。さらに、精度管理として、5 ng/mL（低濃度）添加試料および 10 ng/mL（高濃度）添加試料を前処理後に LC-MS/MS で測定した。その結果を表 2 に示す。DON および DON-3-グルコシドにおいて、回収率が 89%以上であり、併行精度および室内精度が 10.1%以下と十分な精度を有していた。

表 1 本分析法のバリデーション

	LOD* (ng/mL)	LOQ* (ng/mL)	Linear range (ng/mL)	Correlation coefficient (r)
DON	0.39	1.5	1.5 - 100	0.9999
DON-3-グルコシド	1.5	3.1	3.1 - 100	0.9995

*LOD (Limit of detection): S/N=3, LOQ (Limit of quantification): S/N>10

表 2 本分析法の精度管理

	添加濃度 (ng/mL)	回収率(%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
DON	5	89	5.4	5.9
	50	89	3.7	5.3
DON-3-グルコシド	5	103	10.1	10.1
	50	111	7.3	8.0

(n= 2 times x 5 days)

(3) カビ毒の汚染実態の解明

ビール中のトリコテセン系カビ毒の一斉分析

ビール中のトリコテセン系カビ毒の一斉分析（DON, 3A-DON, 15A-DON, NV, T-2）では、27 개국 71 種類のビールについて、測定を行った。都内で購入が可能な日本製ビール 13 検体、ベルギー製ビール 8 検体、アメリカおよびスコットランド製ビール各 5 検体、イタリア、オランダ、ドイツ製ビール各 4 検体、イギリス、スペイン製ビール各 3 検体、その他 22 検体を選定した。各ビール試料を前処理後に LC-MS/MS で分析した。その結果、DON の検出率が最も高く、71 検体中 56 検体から 2.1 ng/mL ~ 156 ng/mL の濃度範囲で検出され、検出濃度の中央値は 6.8 ng/mL であった。

先行研究において、同一ビールをトリメチルシリル誘導体化後に GC/MS で測定しており、GC/MS の定量値と本分析法の定量値を比較し、定量値のクロスチェックを行った（図 2）。横軸に LC-MS/MS の定量値、縦軸に GC/MS の定量値をプロットしたところ、近似式は $y = 0.946x + 3.05$ となり、相関係数 (r) も 0.750 と良好な相関関係が確認できたことから、本分析法の妥当性が示された。

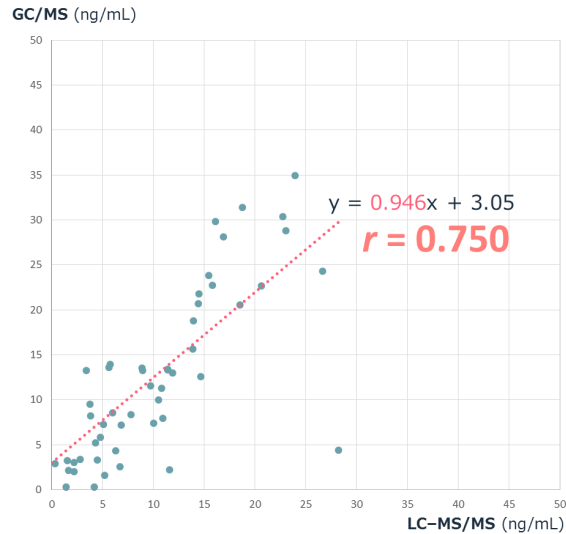


図 2 LC-MS/MS 法と GC/MS 法の相関性

ビール中のカビ毒およびカビ毒配糖体の同時分析

表 3 カビ毒およびカビ毒配糖体の汚染実態

Sample ID	Place of Production	Concentration (ng/mL)	
		DON	DON-3-グルコシド
1	U.S.A.	n.d.*	15.8
2	Italy	32.1	131.1
3	Italy	31.1	6.1
4	Belgium	43.6	32.9
5	Belgium	n.d.	n.d.
6	Netherlands	6.7	4.7
7	Germany	70.3	146.3
8	Austria	26.5	52.7
9	Czech	32.9	203.9

* n.d. : not determined (below the LOQ)

ビール中のカビ毒およびカビ毒配糖体の同時分析では、国内外のビール 9 検体を選定し、DON および DON-3-グルコシドの汚染実態を解明した。その結果、DON は 9 検体中 7 検体から検出され、DON-3-グルコシドは、9 検体中 8 検体から検出された。DON の検出率は 78%、DON-3-グルコシドの検出率は 89%であった。検出濃度範囲は、DON が定量下限値 ~ 70.3 ng/mL であり、DON-3-グルコシドが定量下限値 ~ 203.9 ng/mL であった（表 3）。DON および DON-3-グルコシドの検出濃度に相関性は認められず、DON の汚染レベルが低くても DON-3-グルコシドの汚染レベルが高いこともあることが分かった。と同様に、同一検体をトリメチルシリル誘導体化後に GC/MS で測定した先行研究と定量値の比較を行ったところ、その近似式は $y = 0.812x + 0.203$ であり、相関係数は 0.991 であったことから、本分析法の妥当性が示された。

(4) カビ毒配糖体の汚染を含めたカビ毒のリスク評価

本研究で測定したビール中のカビ毒の定量値を用いて、リスク評価を行った。厚生労働省が実施している国民健康・栄養調査の結果より、男性の平均ビール摂取量は 113.3 g/day と報告されている。これは成人男性（20 歳以上）の平均値であることから、ビール趣向のある成人男性では、その摂取量は、より大きな値になると考えられた。また、成人男性の平均体重は、67 kg として曝露量を試算した。

ビール中のトリコセセン系カビ毒の一斉分析法におけるリスク評価

本研究で分析したビール（DON の最高検出濃度：156 ng/mL）では食品安全委員会の定める DON の耐容一日摂取量（TDI）である 1 μg/kg/day を超える検体はなく、71 検体すべてにおいて、基準値内の曝露量であった。

しかしながら、ビール摂取の多い成人男性では、夏季に 2~4 L のビールを摂取することは決して珍しいことではなく、仮にビールを 4 L 摂取したと想定すると体重辺りの一日摂取量は 9.31 μg/kg/day となり、基準値を 9 倍以上超える値となることが明らかとなった。

ビール中のカビ毒およびカビ毒配糖体の同時分析におけるリスク評価

本研究で分析したビール（DON および DON-3-グルコシド）を摂取した際の、曝露量評価として、ビール摂取量 113.3 g/day を用いて試算した場合、DON のみの曝露量では、食品安全委員会の定める TDI を超えるビール試料は認められなかった。そこで、表 3 のサンプル ID #9

について、曝露量評価を行った。DON-3-グルコシドのビール中での検出濃度 203.9 ng/mL を DON 濃度に換算すると 132.5 ng/mL となり、DON との合計検出濃度は、DON 165.4 ng/mL に相当する。この検出量を用いて、体重 67 kg の成人男性が中ジョッキ 1 杯 (500 mL) のビールを飲んだと想定し、曝露量を試算した。その結果、DON のみでの曝露量 (0.25 µg/kg/day) では、TDI を越えなかったものの、DON および DON-3-グルコシドの合計曝露量は、1.23 µg/kg/day となり、TDI を超える曝露量となった。

本研究において、DON のみでの評価では TDI 以下の曝露量であったにもかかわらず、配糖体を含めた評価では TDI を超える検体があったことから、従来のカビ毒単独での汚染実態の解明では、曝露量を正確に把握できておらず過小評価している実態が明らかとなった。今後はカビ毒のみでなく、カビ毒配糖体を含めた汚染実態の解明やリスク管理がなされるべきであると分かった。本法は、カビ毒およびカビ毒配糖体の高感度、高精度な同時分析法として、今後の食品衛生の分野において利用できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

伊藤里恵、岡紗也子、糸久正洋、佐々木星藍、斉藤貢一：固相分散抽出 LC-MS/MS 法を用いたチーズ中シクロピアゾン酸の分析法の開発．日食化誌，査読有，25 (2018) 33-38．

DOI: https://doi.org/10.18891/jjfc.25.1_33

〔学会発表〕(計 5 件)

1. ビール中に残留するデオキシニバレノールおよびデオキシニバレノール-3-グルコシドの同時分析法の構築．伊藤里恵、吉田仁美、伊藤聡望、桑原麻里奈、斉藤貢一、日本薬学会第 139 年会 (千葉、2019)
2. LC-MS/MS によるビール中のトリコテセン系マイコトキシンの残留分析法の構築．伊藤聡望、高橋拓海、伊藤里恵、斉藤貢一、日本薬学会第 139 年会 (千葉、2019)
3. 固相抽出-LC-MS/MS 法による食品中アフラトキシンおよびシクロピアゾン酸の同時分析．伊藤里恵、小澤昂生、伊藤聡望、斉藤貢一、日本薬学会第 138 年会 (石川、2018)
4. 固相分散抽出-LC-MS/MS 法を用いたチーズ試料中シクロピアゾン酸の分析．岡紗也子、伊藤里恵、斉藤貢一、日本薬学会第 138 年会 (石川、2018)
5. ピーナッツ中シクロピアゾン酸の分析における前処理法の検討．伊藤里恵、佐々木星藍、岸 穂乃可、糸久正洋、岡紗也子、斉藤貢一、日本薬学会第 137 年会 (宮城、2017)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 斉藤 貢一
ローマ字氏名： Koichi Saito
所属研究機関名： 星薬科大学
部局名： 薬学部
職名： 教授
研究者番号 (8 桁)： 40386347

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 佐々木 星藍	ローマ字氏名： Seira Sasaki
研究協力者氏名： 岡 紗也子	ローマ字氏名： Sayako Oka
研究協力者氏名： 小澤 昂生	ローマ字氏名： Kouki Ozawa
研究協力者氏名： 伊藤 聡望	ローマ字氏名： Satomi Ito
研究協力者氏名： 吉田 仁美	ローマ字氏名： Hitomi Yoshida

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。