

かび毒分析の最近の動向 ～フザリウムかび毒の分析

State of the art in the analysis of Fusarium mycotoxins

中川 博之 Hiroyuki Nakagawa (Principal researcher)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品安全研究領域 食品化学ハザードユニット 上級研究員
National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Food Research Institute, Food Safety Division, Chemical Hazard Laboratory

キーワード ... フザリウム、LC-MS、モディファイドマイコトキシン

01 かび毒とは

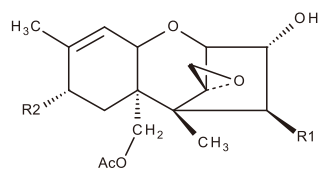
かび毒(マイコトキシン)とはかびの二次代謝産物(生命現象に直接関係のない生産物)の中で、ヒトや家畜に発がん性、変異原性、腎・肝障害性などの毒性を示す物質の総称である。ヒトや家畜がかびによって産生されたかび毒を含有した食物を摂取して起こる中毒をマイコトキシコーシスというが、その原因は化学物質であるかび毒であり、かびによる感染(真菌症、マイコシス)とは全く別のものである。一般にかびは加熱加工によって死滅するが、かび毒は熱に対して安定なものが多く食品中に残留するため、これらの汚染を受けた食品を摂取することにより被害が発生する。これまでに数多くのかび毒が発見・報告されているが、中毒事例があるのはそのうちのごく一部である¹⁾。主要なかび毒産生菌としてどのようなかびが存在し、その対策やかび毒分析法としてどのような技術があるかに関しては、各種文献を参照されたい^{1, 2)}。ここでは国内における汚染事例が多く、糖誘導体(マス

グドマイコトキシン、およびモディファイドマイコトキシン(後述))の発見により注目されているフザリウムかび毒の分析の最新情報について、筆者らが実施した研究を中心に紹介する。

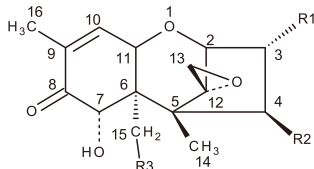
02 フザリウム属とかび毒

赤かび病は麦類やトウモロコシ等の主要作物の植物病原菌として知られるフザリウム属によって引き起こされる難防除病害である^{3, 4)}。温帯地域に位置するわが国では麦の生育期に降雨が多く、赤かび病が発生しやすい。フザリウム属は農作物の栽培中に圃場で感染し収量や品質低下を引き起こすが、その一部はかび毒を産生することが知られている。トリコテセン系かび毒と呼ばれる一連の化合物(構造によりタイプA、タイプBに分類される)(図1)やゼアラレノン(ZEN, 図2)がその代表例として知られている。中でもタイプBトリコテセン(C-8位にケトン基をもつ)の1つであるデオキシニバレノール(DON, 図1)は世界各地で汚染

タイプAトリコテセン



タイプBトリコテセン



	R ₁	R ₂		R ₁	R ₂	R ₃
T-2トキシシン(T-2)	OAc	COOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	ニバレノール(NIV)	OH	OH	OH
HT-2トキシシン(HT-2)	OH	COOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	デオキシニバレノール(DON)	OH	H	OH
ジアセトキシシルペノール(DAS)	OAc	H	フザレノン-X(FUX)	OH	OAc	OH
モノアセトキシシルペノール(MAS)	OH	H	3-アセチルデオキシニバレノール	OAc	H	OH
ネオソラニオール(NES)	OAc	OH	15-アセチルデオキシニバレノール	OH	H	OAc

図1 トリコテセン系かび毒

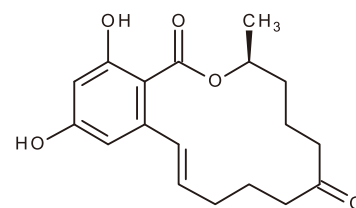


図2 ゼアラレノン(ZEN)

が発生することから、多くの国で基準値が設定されている²⁾。わが国では2002年に小麦中のDONについて 1.1mg/kgの暫定基準値が設定された⁵⁾。アジア諸国では、DONとともにもう1つのタイプBトリコセンであるニバレノール(NIV, 図1)の汚染が多く報告されている²⁾。このような背景からわが国では2008年に麦類におけるDON, NIV汚染低減のための指針が策定されている⁶⁾。ZENに関してはわが国では食品における基準値は設定されていないが、家畜飼料については1mg/kgの暫定許容値が農林水産省により設定されている⁷⁾。

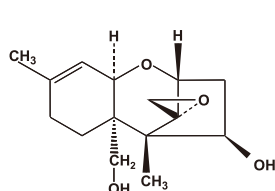
03

麦汚染主要フザリウムかび毒一斉分析法の開発と妥当性確認

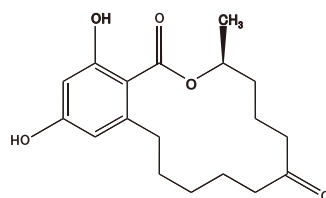
農林水産省では国産麦についてDON、NIV(平成14年度から)およびZEN(平成17年度から)の汚染実態調査を実施しているが、当初はこれら3種のかび毒を一斉分析可能な分析手法がなかった。また、FAO/WHO合同食品添加物専門家会議(JECFA)では2001年にT-2トキシシン(T-2)およびHT-2トキシシン(HT-2)(図1)についてグループの暫定最大耐容一日摂取量(PMTDI)を0.06 μ g/kg体重と設定していたため⁸⁾、国内でも汚染調査の是非が議論されていた。そこで筆者らは、麦を汚染する主要フザリウムかび毒であるDON、NIV、T-2、HT-2、ZENの5種について、高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)法による一斉分析法の開発を行った⁹⁾。LC-MS/MS法によるかび毒分析においては、農作物や食品から溶媒による抽

出操作を行う際の抽出効率のばらつきや、イオンソース部における夾雑成分によるイオン化への影響(マトリックス効果)がしばしば問題視される²⁾。本手法ではトリコセン系かび毒(DON、NIV、T-2、HT-2)にはベルカロール(VEL)、ZENにはゼアララノン(ZAN)(VEL、ZANの構造をそれぞれ図3に示す)を内部標準物質として使用することで、これらの変動要因の影響を低減できていると考えられる。内部標準物質となる化合物は構造や物理化学的挙動が目的化合物と類似していることが望ましい。最も有効な内部標準物質は安定同位体標識したそれぞれのかび毒試薬であるが、そのような安定同位体標識試薬はとても高価である。そこで本手法では分析法にかかるコスト面も考慮して内部標準物質としてVEL、ZANを使用した。

分析手順の概要は以下のとおりである⁹⁾。各種かび毒を添加した麦粉末試料(小麦、大麦)に内部標準物質を添加し、12時間以上(他者による報告では、かび毒試薬添加後から抽出実施までのインターバルを30-60分程度の短時間に設定しているケースが多い。添加したかび毒を十分に農作物試料に吸着させるためには、このインターバルを長く設定すべきであると筆者は考えている)冷暗所で保存した後にアセトニトリル/水混合液を用いて酢酸存在条件下で抽出した。遠心分離後、得られた上清をC₁₈カラムおよび多機能カラムに順次通して精製を行い、得られた試験溶液について溶媒交換を行った後、LC-MS/MSにより分析を行った。結果の一例として、DON(40 μ g/kg)、NIV(40 μ g/kg)、ZEN(8 μ g/kg)、T-2(8 μ g/kg)、HT-2(8 μ g/kg)を添加した小麦粉末を分析した際のLC-MS/MSクロマトグラムを示す(図4)。



ベルカロール (VEL)



ゼアララノン (ZAN)

図3 ベルカロール(VEL)とゼアララノン(ZAN)の構造

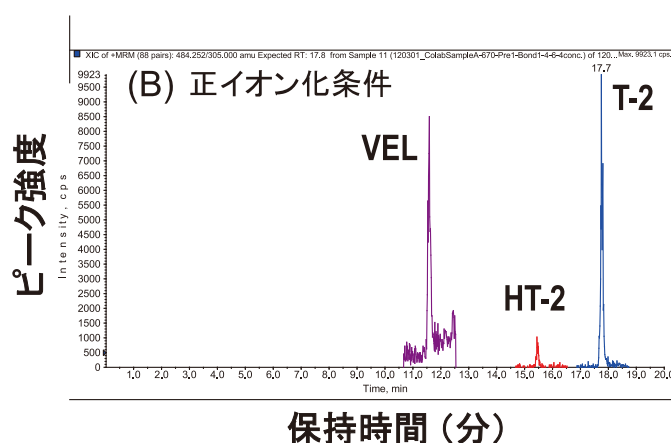
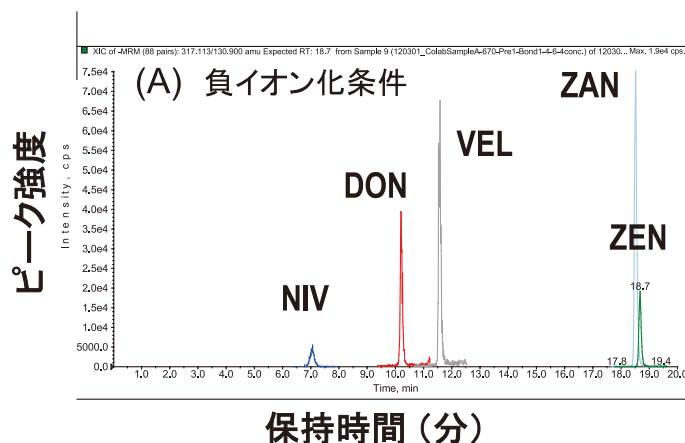


図4 かび毒添加小麦粉末を分析した際のLC-MS/MSクロマトグラム

DON、NIV、ZENは負イオン化条件、T-2、HT-2は正イオン化条件でそれぞれ良好に検出されている。いずれのかび毒も試験溶液の注入後20分以内にピークが確認され、LCカラムの平衡化時間も含めると1分析当たり30分程度で連続分析が可能であった。

開発した分析手法について、AOACインターナショナルの「試験室間共同試験のガイドライン」¹⁰⁾を参照して室間共同試験による妥当性確認を実施した⁹⁾。12機関に本分析手法を提供し、かび毒添加麦(小麦・大麦)を用いた添加回収試験を行った。外れ値検定を行った後の有効なデータから、併行相対標準偏差(RSD_i)と室間再現相対標準偏差(RSD_R)を算出し、その値からHorRat(Horwitz ratio)値を評価した(HorRat <2であれば、分析値の室間再現精度は許容範囲内とみなされる)。その結果、小麦および大麦に含まれる40~1,000 μ g/kgの濃度レベルのDON分析において本手法の妥当性が確認された。同様な手順により、小麦および大麦に含まれるNIV(40~1,000 μ g/kgの濃度レベル)、ZEN(8~1,000 μ g/kgの濃度レベル)、T-2(8~200 μ g/kgの濃度レベル)、HT-2(8~200 μ g/kgの濃度レベル)のそれぞれの分析について本手法の妥当性が確認された。さらに、自然汚染試料として配付したT-2含有小麦試料(メーカーによる付与値111.2 μ g/kg)についてもHorRat <2が確認された。したがって、本手法はかび毒添加試料だけではなく自然汚染試料の分析にも有効であることが確認された⁹⁾。

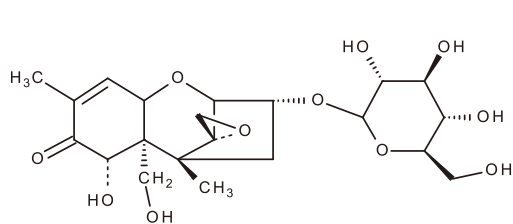
LC-MS/MS法によるかび毒一斉分析については多くの手法が報告されているが、主要フザリウムかび毒5種(DON、NIV、T-2、HT-2、ZEN)を一斉分析可能で、室間共同試験によるフルバリデーションレベル(有効試験室数8以上)で妥当性確認がなされた分析手法は本手法が国内外を通じて最初の例である⁹⁾。内部標準物質による補正を取り入れており、大麦も分析対象にできることから、国産麦におけるフザリウムかび毒汚染を把握する上でも実用的な手法であるといえる。本分析手法は農林水産省による国内麦かび毒汚染のサーベイランスにも採用されており、調査結果は報告書として公開されている¹¹⁾。

04 新規かび毒誘導体の探索

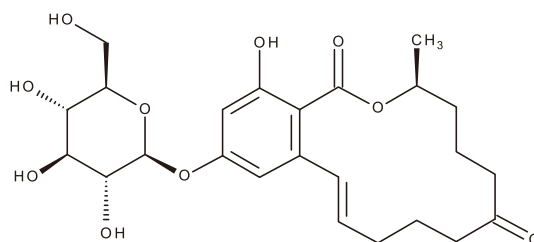
フザリウム属のような植物病原菌がDONのようなかび毒を産

生する理由の一つとして、感染時に植物体内(穀類等)への菌糸の侵入をより容易にするためであることが挙げられる¹²⁾。一方、植物は外来異物の減毒機構として配糖化やマロニル化等の修飾反応をして液胞の中に蓄積することが知られている。かび毒のような生体外異物は植物体内においてはPhase I, II, IIIの3段階の代謝機構により減毒化されるといわれており¹³⁾、これらのPhase IIの段階(conjugation)で産生される誘導体(主に配糖体)はマスキドマイコトキシンと呼ばれている¹⁴⁾。マスキドマイコトキシンは分子量や物理化学的性質が元の化合物とは異なるため従来の分析法では検出できないが、腸内細菌等によって加水分解されてかび毒を遊離するため¹⁴⁾、潜在ハザードとして注目されている。

フザリウム属は複数種のかび毒を産生する(図1,2)が、代表的なマスキドマイコトキシンとしてはDONおよびZEN由来のDON-3-グルコシド(DONGlc)やZEN-14-グルコシド(ZENGLc)(図5)が知られている。フザリウム属が植物(農作物)に感染するような状況下では、DONやZEN以外のかび毒に関しても減毒化(配糖化)される可能性があるかと予想された。そこで筆者らは新規マスキドマイコキシンの探索を試みた。本研究を実施する際に課題となったのが分析試料の入手であった。分析試料としては「フザリウム属が植物(栽培中のもの)に感染し比較的高濃度でかび毒汚染が起こる条件」で調製された農作物が望ましいと考えられた。農研機構ではフザリウム属を感染させた麦類を栽培可能な実験圃場を有しており、当時農林水産省リスク管理型委託プロジェクトの研究でDONおよびNIVによる高濃度汚染を受けた麦を栽培していたため、この玄麦を分析試料とした。入手した玄麦を粉碎した分析試料の抽出物(水/アセトニトリル/酢酸混合溶液で粉末試料を抽出し、遠心分離により得られた溶液を精製用カラムに通して夾雑物質を除去したもの)について、高速液体クロマトグラフィー・高分解能質量分析(LC-HRMS)法による分析を行った。その結果、新規マスキドマイコトキシンとしてNIV-グルコシド(NIVGLc)、さらにNIVの前駆体であるフザレノン-X(FUX, 図1)の配糖体であるFUX-グルコシド(FUXGLc)を検出した(図6)¹⁵⁾。DON、NIV、FUXはいずれもタイプBトリコテセンであったことから、次に筆者らはタイプAトリコテセン(図1参照)由来のマスキドマイコキシンの探索を試みた¹⁶⁾。分析試料として、代表的なタイプAトリコテセンであるT-2とHT-2を高濃度含有する精度管理用自然汚染トウモロコシ粉末試料を米国から購入した。入手したトウモロコシ粉末試料について上記と同様な手法を用いて

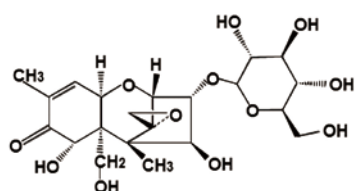
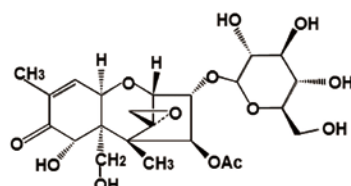
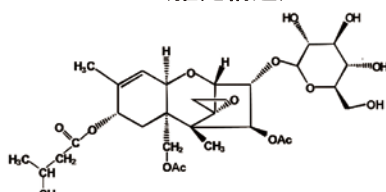


DON-3-グルコシド(DONGlc)

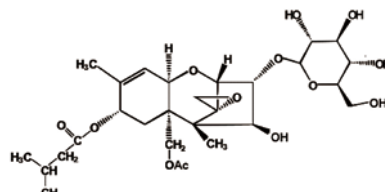
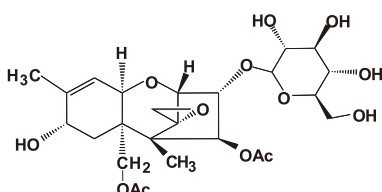
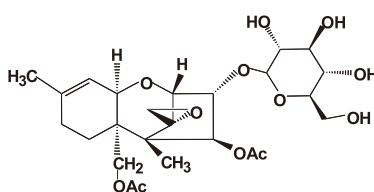
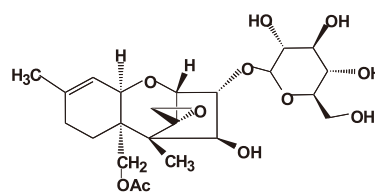
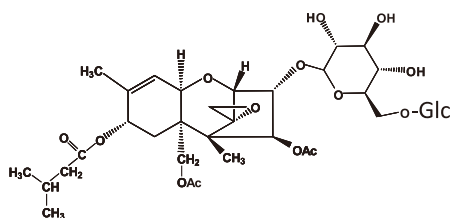
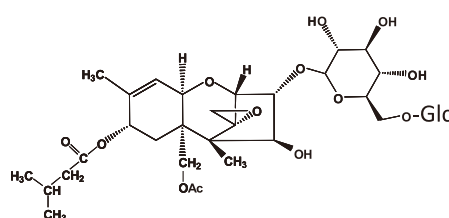


ZEN-14-グルコシド(ZENGLc)

図5 代表的なマスキドマイコトキシン

ニバレノール-グルコシド (NIVGlc)
(推定構造)フザレノン-X-グルコシド (FUXGlc)
(推定構造)

T-2トキシシン-グルコシド (T2Glc)

HT-2トキシシン-グルコシド (HT2Glc)
(推定構造)ネオソラニオール-グルコシド
(NESGlc) (推定構造)ジアセトキシシルペノール-グルコシド
(DASGlc)モノアセトキシシルペノール-グルコシド
(MASGlc) (推定構造)図6 筆者らが検出したマスクドマイコトキシン(モノ-グルコシド)¹⁵⁻¹⁸⁾T-2トキシシン-ジグルコシド (T2GlcGlc)
(推定構造)HT-2トキシシン-ジグルコシド (HT2GlcGlc)
(推定構造)図7 筆者らが検出したマスクドマイコトキシン(ジ-グルコシド)¹⁸⁾

分析を行ったところ、T-2-グルコシド(T2Glc)とHT-2-グルコシド(HT2Glc)がそれぞれ検出された(図6)¹⁶⁾。同トウモロコシ粉末試料においては、さらに別のタイプアトリコテセンであるネオソラニオール(NES, 図1)、ジアセトキシシルペノール(DAS, 図1)、モノアセトキシシルペノール(MAS, 図1)についてもグルコシドを検出した(図6)^{17, 18)}。これらの発見により、マスクドマイコトキシンがDONやZENのような特定のかび毒に対してのみではなく、他のトリコテセン系かび毒についても広く存在することが明らかにされた。T2Glc、HT2Glcについて筆者らはさらにグルコースが付加したT-2-ジグルコシド(T2GlcGlc)とHT-2-ジグルコシド(HT2GlcGlc)も検出した(図7)¹⁸⁾。

これらのマスクドマイコトキシンはいずれも試薬標品が入手できない化合物であったため、検量線を用いた定量分析ができなかった。そこで、各試料中に共存するDONGlc/DONの割合を調べた(DONGlcとDONは試薬標品が市販されている)ところ、前者の汚染小麦試料では重量比で15%程度、後者の精度管理用自然汚染トウモロコシ粉末試料ではモル比で6%程度がグルコシル化されていることがわかった^{15, 16)}。各種トリコテセン系かび毒における構造の類似性から、NIV, FUX, T-2, HT-2, NES, DAS等についても同等程度の割合でグルコシル化が起きているのではないかと当時推定していたが、その後の研究によりタイプアトリコテセンの方がタイプBトリコテセンよりもグルコシル化



図8 フモニシンとその糖誘導体

される傾向が低いことが示唆された¹⁹⁾。

一方、トウモロコシ中のフモニシン(フザリウム属が産生する、トリコセシン系かび毒やZENとは異なる一群のかび毒)は熱処理等によりその一部が分子内のアミノ基を介してグルコースと共有結合することが報告されている(図8)。米国の研究者らによりフモニシンB₁(FB₁)由来のグルコース誘導体として、*N*-(1-Deoxy-**D**-fructos-1-yl) fumonisin B₁ (NDfrc-FB₁)が同定されている²⁰⁾。そこで筆者らはフモニシンB₂(FB₂)、フモニシンB₃(FB₃)について同様な誘導体があるかLC-HRMSによる探索を行い、NDfrc-FB₂、NDfrc-FB₃を新たに検出した(図8)²¹⁾。これらはフモニシンと糖が結合した化合物であるためマスコドマイコトキシンと混同されがちであるが、植物体内における減毒機構(conjugation)¹⁴⁾ではなく、化学的な反応で生成するものである。このため、本来の定義によれば区別されるべきである。このような経緯から最近ではマスコドマイコトキシンを含めたかび毒誘導体に対してモディファイド(modified:修飾された)マイコトキシンという名称を使うことが提案されている²²⁾。

欧州食品安全機関(EFSA)は2014年にかび毒のヒトへの暴露量を評価する際にはこれらの誘導体による暴露も勘案することが適切であるとしており、その根拠としてその多くが生体内で加水分解されて元のかび毒を遊離するためであるとしている²³⁾。DONやZENのグルコシドとサルフェート誘導体(DONGlc、ZENGLc、およびZENS)が、ヒトの大腸の細菌叢によって効果的に加水分解されたという報告もある²⁴⁾。今後モディファイドマイコトキシンがわが国でPMTDIへ算入されるか否かは不明であるが、食品安全委員会でも継続審議中である²⁵⁾、²⁶⁾。各種かび毒の適切なリスク評価に資することを目標として、今後もかび毒分析の研究に熱意をもって日々取り組みたいと考えている。

05

おわりに

ここで紹介したデータの一部は、農林水産省委託プロジェクト研究「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発」および「食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト」の一環として実施した研究の成果である。関係各位に深謝申し上げる。かび毒の配糖化は植物の減毒機構(conjugation)によって起こるものである。ヒトや動物の体内で異物が代謝や誘導化することにより減毒化されるように、植物が独自にこのような減毒機構を持っていることは学術的にも興味深い。かび毒減毒機構の詳細な知見を得ることで麦やトウモロコシの赤かび病抵抗性品種の選抜や育種にも利用できる可能性があることから、農業分野での応用も期待されると考えている。上記にも述べたが、危害要因物質の定量的な議論をする上でやはり試薬標品の供給がカギとなる。私の記憶が正しければ、関東化学にはRomer Labs社のかび毒試薬製品の国内販売ラインをいち早く整備して頂いた。この場を借りて心より御礼申し上げますと同時に、今後もかび毒研究分野へのご理解とご協力をお願いしたい。

参考文献

- 1) Food and agriculture organization of the United Nations (FAO) : FAO Food and nutrition papers 81: Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, Rome, FAO (2004): Available at: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.HTM> (参 照 2020-5-21).
- 2) 食品工業NEO 食品工業におけるカビ汚染対策, 食品工業編集部編, (光琳, 2010).
- 3) 中島 隆 Mycotoxins **55**(1),43-47 (2005).
- 4) 湊 啓子 北獣会誌 **56**(11),609-614 (2012).
- 5) 厚生労働省:「小麦中のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について」, 平成 14 年 5 月 21 日, 食発第 0521001 号 (2002) Available from: <https://www.ffcr.or.jp/tsuuchi/2002/05/ODA129A07813D14349256DF6000BC432.html> (参照 2020-5-21).
- 6) 農林水産省消費・安全局, 生産局:「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」, 平成 20 年 12 月 (2008) Available from: https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/kabidoku/pdf/sisin.pdf (参照 2020-5-21).
- 7) 農林水産省消費・安全局:「飼料中のゼアラレノンの暫定許容値の改正について」, 平成 22 年 10 月 6 日, 消安第 5365 号 (2010) Available from: http://www.famic.go.jp/ffis/feed/tuti/22_5365.html (参 照 2020-5-21).
- 8) T-2 and HT-2 in WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 47 Safety evaluation of certain mycotoxins in food, www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je06.htm (参照 2020-5-21).
- 9) Nakagawa H et al (2014): Harmonized collaborative validation of a simultaneous and multiple determination method for nivalenol, deoxynivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, and zearalenone in wheat and barley by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Techniques* 2014 S6, doi: 10.4172/2155-9872.S6-002
- 10) AOAC international (2005). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Official methods of analysis of AOAC international. 18 ed.
- 11) 食品の安全性に関するサーベイランス・モニタリングの結果【有害化学物質】, https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/result.html (参照 2020-5-21).
- 12) M. J. Boenisch, W. Schäfer, *BMC Plant Biology*, **11**, 110 (2011).
- 13) J. Coleman, M. Blake-Kalff, E. Davies, *Trends in Plant Science*, **2**(4), 144-151 (1997).
- 14) F. Berthiller, C. Crews, C. Dall'Asta, S. De Saeger, G. Haesaert, P. Karlovsky, I. P. Oswald, W. Seefelder, G. Speijers, J. Stroka, *Molecular Nutrition and Food Research*, **57**(1), 165-186 (2013).
- 15) H. Nakagawa, K. Ohmichi, S. Sakamoto, Y. Sago, M. Kushiro, H. Nagashima, M. Yoshida, T. Nakajima, *Food Additives and Contaminants Part A*, **28**(11), 1447-1456 (2011).
- 16) H. Nakagawa, S. Sakamoto, Y. Sago, M. Kushiro, H. Nagashima, *World Mycotoxin Journal*, **5**(3), 271-280 (2012).
- 17) H. Nakagawa, S. Sakamoto, Y. Sago, M. Kushiro, H. Nagashima, *Food Additives and Contaminants Part A*, **30**(8), 1407-1414 (2013).
- 18) H. Nakagawa, S. Sakamoto, Y. Sago, H. Nagashima, *Toxins*, **5**(3), 590-604 (2013).
- 19) H. Nakagawa, Y. Matsuo, S. McCormick, C. W. Lim, *Journal of AOAC International*, **101**(3), 658-666 (2018).
- 20) S. M. Poling, R. D. Plattner, D. Weisleder, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**(5), 1318-1324 (2002).
- 21) Y. Matsuo, K. Takahara, Y. Sago, M. Kushiro, H. Nagashima, H. Nakagawa, *Toxins*, **7**(9), 3700-3714 (2015).
- 22) M. Rychlik, H.-U. Humpf, D. Marko, S. Dänicke, A. Mally, F. Berthiller, H. Klaffke, N. Lorenz, *Mycotoxin Research*, **30**(4), 197-205 (2014).
- 23) EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA Journal* 2014;12(12): 3916, 107 pp. (2014). doi:10.2903/j.efsa.2014.3916
- 24) A. Dall'Erta, M. Cirilini, M. Dall'Asta, D. Del Rio, G. Galaverna, C. Dall'Asta. Masked mycotoxins are effectively hydrolyzed by human colonic microbiota releasing their aglycones. *Chemical Research in Toxicology*, **26**(3), 305-312 (2013).
- 25) <http://www.fsc.go.jp/fsciis/meetingMaterial/show/kai20190325ks1>
- 26) 小西良子 カビと生活 **12**(1),41-44 (2019).