

精白米及び玄米のカビ毒一斉分析法の検討および含有実態調査

木下和昭¹⁾ 高山清子 富山裕規²⁾

Simultaneous Determination of multi-mycotoxins in rice by LC-MS/MS

Kishita Kazuaki, Takayama Kiyoko, Tomiyama Yuki

要旨

カビ毒の食品汚染は穀物を中心に様々な農作物で報告されており、複数種のカビ毒による複合汚染も頻繁に確認されている。そのため、多種カビ毒を対象とした一斉分析は、食品の安全性確保における汚染実態の把握や、毒性評価へつなげる基礎データの提供という点で有用な分析手法である。本県では過去に県内生産米から高濃度のアフラトキシンが検出されているが、その他カビ毒を含めた詳細な含有実態は明らかとなっていない。そこで、県内に流通する米のカビ毒含有実態を把握することを目的として、高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた一斉分析法の検討とカビ毒含有実態調査を行った。その結果、精白米では InertSep VRA-3 と Bond Elut Mycotoxin の併用、玄米では EMR-Lipid と MycoSpin 400 の併用がマトリックス効果の軽減と十分な回収率が得られる分析法として最適であった。また、含有実態調査の結果、精白米 43 試料中 17 試料から、玄米 11 試料中 9 試料からカビ毒が検出され、複合汚染も確認された。新興カビ毒であるアルテルナリオールメチルエーテルとビューベリシンの検出頻度が高く、モディファイドマイコトキシンであるゼアラレノン-14-サルフェートも検出された。これらの結果から、県内の生産米でも複合汚染が起こりうることや、検出されやすいカビ毒の特定等詳細な知見を得ることができた。

キーワード：カビ毒，モディファイドマイコトキシン，新興カビ毒，一斉分析，LC-MS/MS
含有実態調査

はじめに

カビ毒はカビの代謝産物のうち、ヒトや動物に有害な作用を示す物質の総称であり、これまでに数百種類のカビ毒が確認されているが、食品衛生上問題となるカビ毒は限られる。その中でも *Aspergillus* 属の一部のカビが産生するアフラトキシンは強い発がん性を有することが知られており、国内では全ての食品を対象に総アフラトキシンとして 10 µg/kg の基準値が設定されている。2011 年には本県で生産された米から基準値の 7 倍のアフラトキシンが検出され、国産米として初の汚染事例となった。この事例は、県内及び国内においても高濃度のカビ毒汚染が生じるリスクが

あることを示唆するものである。

また、近年では従来のカビ毒に加え、新興カビ毒や、食品加工や生体内異物代謝により生成されるモディファイドマイコトキシンのリスクが注目されている¹⁻³⁾。新興カビ毒にはエンニアチン (Enniatins) やビューベリシン (Beauvericin) などが含まれ、毒性や食品汚染の実態が十分に把握されていない⁴⁾。モディファイドマイコトキシンは、主に植物や微生物による代謝反応で生成するカビ毒であり、摂取後に消化管内で活性型に変換される可能性があるため、従来のリスク評価に新たな課題をもたらしている⁵⁾。

加えて、近年の研究では単一食品中に複数のカビ毒が同時に汚染 (複合汚染) することが明らか

になっている^{6,7)}。複合汚染は、相加的または相乗的な毒性作用を引き起こす可能性があることから、カビ毒の一斉分析は毒性評価へのデータ提供という点において有用である。一方で、国内生産米における複合汚染の実態については、近年ほとんど調査が行われておらず、食の安全管理の観点からもカビ毒に関する包括的な情報が必要である。

カビ毒の一斉分析については、穀類を中心に dilute and shoot 法⁸⁾や、QuEChERS 法^{9, 10)}、SPE カラム精製^{11, 12)}などによる LC-MS/MS 分析が多数報告されており、当研究所においても米試料で dilute and shoot 法が様々な極性のカビ毒を対象とした一斉分析に適用可能であることを確認した。

しかしながら、これら一斉分析法の多くはマトリックス効果への対応として、マトリックス検量線を用いた定量が採用されているが、マトリックスの性質は試料ごとに異なる可能性があるため、再現性や適用範囲という点で一斉分析法に課題が残るのが現状である。

また、複合汚染に関する研究は対象穀類や測定項目に限られており、国産米に関する報告では包括的な実態調査は限定的である。加えて、新興カビ毒やモディファイドマイコトキシンを含む汚染状況についての情報が必要とされていることから、国産米のカビ毒リスクを正確に把握する上で知見のギャップが存在している。

食物におけるカビやカビ毒の汚染リスクは気候変動の影響を大きく受けると予測されており^{13, 14)}、九州南部に位置し、夏には高温多湿な気候となる本県においてカビ毒の汚染実態の把握の必要性は高いと考えられる。そこで、県内の食品安全性の確保をより一層推進するとともに、カビ毒の汚染実態の把握に資する基礎データの提供を目的として、(1) 米を対象とした多種カビ毒の LC-MS/MS による一斉分析法の検討・最適化、(2) 県内に流通する精白米及び玄米の包括的なカビ毒汚染実態調査を実施した。

今回、モディファイドマイコトキシンや新興カビ毒を含むカビ毒 27 種類について、LC-MS/MS を用いた一斉分析法と県内流通米の汚染実態について一定の知見を得たので報告する。

対象と方法

1 分析対象成分

農林水産省が優先的にリスク管理を進めているカビ毒及び国内での汚染実態に関する情報が不足しているカビ毒の計 27 成分 (表 1) を分析対象とした。

表 1 分析対象カビ毒と主な汚染食品

カビ毒	主な汚染食品例
Aflatoxin (AF) B1, B2, G1, G2	穀類, ナッツ類
トリコテセン系カビ毒	
Deoxynivalenol (DON)	
3-Acetyldeoxynivalenol (3-AcDON)	
15-Acetyldeoxynivalenol (15-AcDON)	
Deoxynivalenol-3-glucoside (DON-3-Glc)	
Nivalenol (NIV),	穀類
Fusarenon-X (FUS-X)	
T-2 toxin	
HT-2 toxin	
Neosolaniol (NEO)	
Diacetoxyscirpenol (DAS)	
ゼアラレノン類	
Zearalenone (ZEN)	
Zearalenone-14-glucoside (ZEN-14-Glc)	穀類
Zearalenone-14-sulfate (ZEN-14-S)	
α -Zearalenole (α -ZEL)	
β -Zearalenole (β -ZEL)	
Ochratoxin A (OTA)	穀類, コーヒー豆
Patulin (PAT)	リンゴ加工品
Sterigmatocystin (STC)	穀類
Enniatin (ENN) A, B	穀類
Beauvericin (BEA)	穀類
アルテルナリア毒素	
Alternariol (AOH)	穀類, 果実, 野菜
Alternariol-methyl-ether (AME)	

2 試薬等

1) 標準品

15-アセチルデオキシニバレノール (15-AcDON), 3-アセチルデオキシニバレノール (3-AcDON), フザレノン X (FUS-X), ネオソラニオール (NEO) 及びニバレノール (NIV) は関東化学(株)から購入した。ビューベリシン (BEA) 及びゼアラレノン-4-サルフェート (ZEN-14-S と同義) はコスモ・バイオ(株)から、エンニアチン A (ENN A) 及びエンニアチン B (ENN B) はシグマアルドリッチから購入した。その他の標準品はすべて富士フィルム和光純薬(株)から購入したものを使用した。

2) 標準溶液

各標準品を秤量後、アセトニトリル又はメタノールに溶解して標準原液を作成した。使用する溶媒は Kiseleva らの報告¹⁵⁾を参考に選択した。さらに標準原液を用いて、調製溶媒や濃度等から6グループの中間混合標準液を調製した。使用時に中間混合標準液を混合・希釈したものを試験に用いた。標準溶液はすべて-20°C以下で保存した。

3) その他の試薬等

アセトニトリル (HPLC 用, LC/MS 用), 酢酸 (試薬特級, LC/MS 用), メタノール (LC/MS 用), 2-プロパノール (LC/MS 用) は富士フィルム和光純薬㈱から購入した。精製用カラムは Oasis HLB, Oasis PRiME HLB (ウォーターズ社), InertSep VRA-3 (ジーエルサイエンス社), MultiSep 226, MultiSep 228, MultiSep 229,

MycoSpin 400 (レゾナック社), ISOLUTE ENV+, ISOLUTE Myco (バイオタージ社), Bond Elut Mycotoxin, EMR-Lipid (アジレント・テクノロジー社) を用いた。

4) 装置

振とう器は NR-30 (タイテック社), 遠心分離機は 6200 (久保田商事社) を用いた。LC-MS/MS は ACQUITY PREMIER/Xevo TQ-XS (ウォーターズ社) を用いた。

3 LC-MS/MS 分析条件

分析カラムには ACQUITY UPLC BEH C18 column with VanGuard FIT (1.7 μm, 2.1×100 mm, ウォーターズ社) を用いた。移動相は (A) 1 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1%酢酸水溶液, (B) 0.1%酢酸メタノールを用いた。グラジ

表 2 分析対象カビ毒の MRM 条件

Analyte	Polarity	Cone voltage (V)	Precursor ion (m/z)	Quantifier		Qualifier	
				Collision energy (eV)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Product ion (m/z)
15-AcDON	+	2	356.2	14	137.1	16	261.0
3-AcDON	-	16	397.1	14	307.1	12	173.0
AFB1	+	12	313.2	22	284.9	38	241.1
AFB2	+	10	315.2	26	287.1	30	259.1
AFG1*	+	74	329.1	26	243.0	38	199.9
AFG2	+	10	331.2	30	245.0	42	189.1
α-ZEL	-	50	319.1	26	174.1	32	159.8
AOH*	+	32	259.0	28	244.0	42	127.9
AME	-	46	271.0	24	255.9	40	182.9
β-ZEL	-	50	319.1	26	174.1	32	159.8
BEA	+	100	784.5	64	134.0	26	244.1
DON	+	4	297.1	10	249.1	10	231.1
DON-3-Glc	+	14	476.3	14	297.2	22	249.1
DAS	+	36	384.3	10	307.1	12	247.1
ENN A	+	72	699.5	28	210.1	30	228.1
ENN B	+	82	640.6	64	86.1	28	196.1
FUS-X	+	14	355.2	12	247.0	16	229.1
HT-2	+	18	442.3	12	215.1	8	245.1
NEO	+	22	400.2	12	305.1	16	215.1
NIV	-	28	371.1	28	281.1		
		42	311.0			10	281.1
OTA	+	40	404.1	24	239.0	34	221.0
PAT	-	2	153.0	12	80.9	14	53.0
STC	+	70	325.1	30	310.0	60	115.0
T-2	+	30	484.3	14	305.2	20	185.1
ZEN	-	44	317.1	26	175.0	30	130.9
ZEN-14-Glc	+	18	498.2	12	319.1	20	301.1
ZEN-14-S	-	24	397.1	24	317.1	42	130.9

※玄米試料の分析時は、AFG1 と AOH のみ定量イオンと定性イオンを入れ替えて測定

エント条件は (B) % : 2% (0–1 min) – 50% (8.5 min) – 100% (12.5–16.5 min) – 2% (16.6–19 min) とし、カラム温度は 40°C、注入量は 5 µL、流速は 0.3 mL/min とした。ニードル洗浄液は水/メタノール/アセトニトリル/2-プロパノール/DMSO (11/20/30/30/9, v/v/v/v/v) 混液に 0.5% 濃度となるようにギ酸を添加したものをを用いた。MS 条件は、エレクトロスプレーイオン化法、キャピラリー電圧 0.6 kV、脱溶媒温度 450°C、脱溶媒ガス流量 900 L/hr とした。分析対象カビ毒の測定イオンを表 2 に示す。ただし、AFG1 と AOH は玄米試料測定時のみ定量イオンと定性イオンを入れ替えて測定した。

なお、キャリアオーバー対策として Waters の ケーススタディを参考に、流速 0.3 mL/min で以下の洗浄メソッドを使用した。

1) 洗浄メソッド 1

移動相は (A) 0.1% ギ酸水溶液、(B) 0.1% ギ酸メタノール、グラジエント条件は (B) % : 50% (0 min) – 100% (3.75 min) – 50% (6.5 min) とし、ニードル洗浄液を 10 µL 注入。

2) 洗浄メソッド 2

移動相は (A) 1 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1% 酢酸水溶液、(B) 0.1% 酢酸メタノール、グラジエント条件は (B) % : 2% (0–2 min) とし、抽出溶媒を 10 µL 注入。

4 精製カラムの比較 (精白米)

試料はミルサーを用いて粉碎し、425 µm のふるいに通して均一化したものをを用いた。試料 5.0 g を正確に 50 mL 遠沈管に採取し、抽出溶媒 (アセトニトリル/水/酢酸 (79/20/1, v/v/v)) 20 mL を加えて 200 rpm で 60 分間振とう抽出した。4,500 rpm で 5 分間遠心分離した後の抽出液を精製カラムの比較に用いた。精製カラムはパススルー型カラムとして MultiSep 226, MultiSep 228, MultiSep 229 及び InertSep VRA-3 を、保持型カラムとして Oasis HLB, Oasis PRiME HLB, ISOLUTE Myco 及び ISOLUTE ENV+ を用いた。

1) パススルー型カラム

ア) 回収率の確認

抽出液にカビ毒混合標準液を添加し、精製カラム負荷して通過液の 0–2 mL 及び 2–4 mL 画分を回収した。各通過液を超純水で 2.5 倍希釈し、

0.2 µm フィルターでろ過したものを試験溶液とした。

イ) マトリックス効果の確認

ブランク抽出液を精製カラムに負荷し、通過液の 0–2 mL 及び 2–4 mL 画分を回収した。各通過液にカビ毒混合標準液を添加し、超純水で 2.5 倍希釈して 0.2 µm フィルターでろ過したものを試験溶液とした。また、抽出溶媒を水で 2.5 倍希釈したものにカビ毒混合標準液を添加した溶媒標準溶液を調製し、以下の式によりマトリックス効果 (ME) を算出した。

$$ME(\%) = \left(\frac{\text{マトリックス添加標準溶液の面積平均}}{\text{溶媒標準溶液の面積平均}} - 1 \right) \times 100$$

評価は SANTE/11312/2021 に従い、±20% を参考基準とした。

2) 保持型カラムの回収率確認

抽出液にカビ毒混合標準液を添加し、精製カラムに負荷してカラムを洗浄後に溶出した。溶出液を 0.2 µm フィルターでろ過したものを試験溶液とした。各カラムの精製は以下により行った。

ア) Oasis HLB, Oasis PRiME HLB

抽出液 2 mL を水で 16 倍希釈したものを負荷し、5 mL の水でカラムを洗浄した。シリンジでカラムを乾燥させ、5 mL のアセトニトリル/メタノール(9/1, v/v) で溶出した。溶出液 0.5 mL を窒素乾固し、0.5 mL の 0.1% 酢酸含有 20% メタノールで再溶解した。

イ) ISOLUTE Myco

抽出液を水で 16 倍希釈したものを 8 mL 負荷し、水 2.5 mL で 2 回洗浄した。シリンジでカラムを乾燥させ、0.1% ギ酸アセトニトリル 2 mL と 0.1% ギ酸メタノール 2 mL で順次溶出し、溶出液をアセトニトリルで 5 mL に定容した。定溶液 1 mL を窒素乾固し、0.25 mL の 0.1% 酢酸含有 20% メタノールで再溶解した。

ウ) ISOLUTE ENV+

抽出液 2 mL を水で 16 倍希釈したものを負荷し、5 mL の水でカラムを洗浄した。シリンジでカラムを乾燥させ、5 mL のアセトニトリル/メタノール(1/1, v/v) で溶出した。溶出液 0.5 mL を窒素乾固し、0.5 mL の 0.1% 酢酸含有 20% メタノールで再溶解した。

5 精製法の検討 (玄米)

試料 5.0 g を正確に 50 mL 遠沈管に採取し、抽出溶媒 20 mL を加えて 200 rpm で 60 分間振とう抽出した。4,500 rpm で 5 分間遠心分離した後の抽出液を EMR-Lipid に負荷し、初流 2 mL を回収した。精製法の比較として、さらに、MycoSpin 400 に流出液 750 μ L を加え、1 分間ボルテックスした後に 10,000 rpm で 1 分間遠心分離した上清を回収した。EMR-Lipid 負荷液、EMR-Lipid + MycoSpin 400 上清液をそれぞれ超純水で 2.5 倍希釈したものを試験溶液とし、回収率及びマトリックス効果を比較した。

6 添加回収試験

1) 精白米

試料 5.0 g を正確に 50 mL 遠沈管に採取し、抽出溶媒 20 mL を加えて 200 rpm で 60 分間振とう抽出した。4,500 rpm で 5 分間遠心分離した後の抽出液を、VRA-3 の下に Bond Elut Mycotoxin を連結した精製カラムに負荷した。初流 4 mL を廃棄し、続く 2 mL を回収後に超純水で 2.5 倍希釈し、0.2 μ m フィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2) 玄米

抽出操作は精白米と同様に行い、遠心分離後に EMR-Lipid に抽出液を負荷し、初流 2 mL を回収した。回収した溶液を MycoSpin 400 に 750 μ L 添加し、1 分間ボルテックスした後に 10,000 rpm で 1 分間遠心分離した。上清を超純水で 2.5 倍希釈し、0.2 μ m フィルターでろ過したものを試験溶液とした。

各試料の添加濃度は表 3 に示す 2 濃度とし、5 併行で試験を行い、真度及び併行精度を評価した。回収率の評価基準は Codex のマニュアル¹⁶⁾を参考にした。

なお、上述 4、5 の回収率やマトリックス効果の確認試験については、高濃度で実施した。

7 定量下限 (LOQ) 及び検出下限 (LOD)

精白米及び玄米のブランク抽出液に、検量線の最低濃度となるように標準液を添加したものを 5 併行で測定した。得られた測定結果の S/N 比の平均から、S/N 比が 10 となる濃度を算出して LOQ とし、LOQ の 0.3 倍を LOD とした。

8 含有量調査

調査試料 (精白米、玄米) は県内のスーパー、米穀専門店及び直売所で購入した精白米 43 試料、玄米 11 試料を用いた。試料の生産地の内訳は、精白米が県北部 9 試料、県中部 6 試料、県西部 15 試料、県南部 1 試料、不明 (宮崎県内) 5 試料、県外 7 試料であり、玄米は県中部 3 試料、県西部 1 試料、不明 (宮崎県内) 1 試料、県外 5 試料、不明 (国産) 1 試料であった。

LOQ 以上の濃度が定量された場合に検出ありとした。

表 3 各カビ毒の添加濃度

	添加濃度 (μ g/kg)	
	低濃度	高濃度
15-AcDON	10	100
3-AcDON	10	100
AFB1	0.25	2.5
AFB2	0.25	2.5
AFG1	0.25	2.5
AFG2	0.25	2.5
α -ZEL	2	20
AOH	5	50
AME	0.5	5
β -ZEL	2	20
BEA	0.5	5
DON	10	100
DON-3-Glc	5	50
DAS	10	100
ENNA	0.5	5
ENNB	0.5	5
FUS-X	10	100
HT-2	10	100
NEO	5	50
NIV	10	100
OTA	0.5	5
PAT	5	50
STC	0.5	5
T-2	10	100
ZEN	10	100
ZEN-14-Glc	1	10
ZEN-14-S	1	10

結果

1 精製カラムの比較

本研究では高極性から低極性のカビ毒を対象としていることから、先行研究^{8, 17, 18)}を参考にアセト

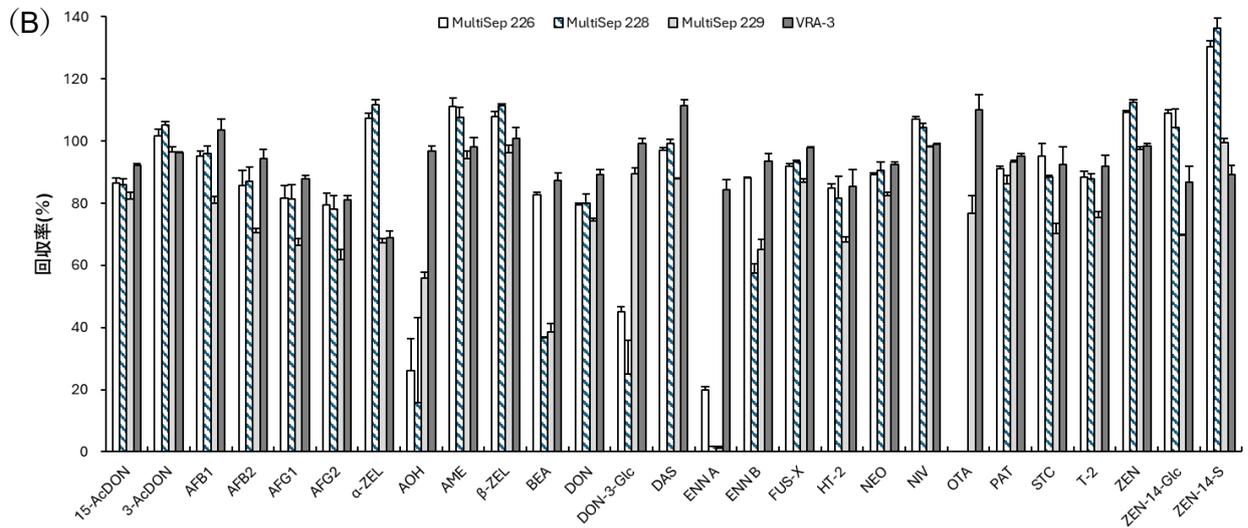
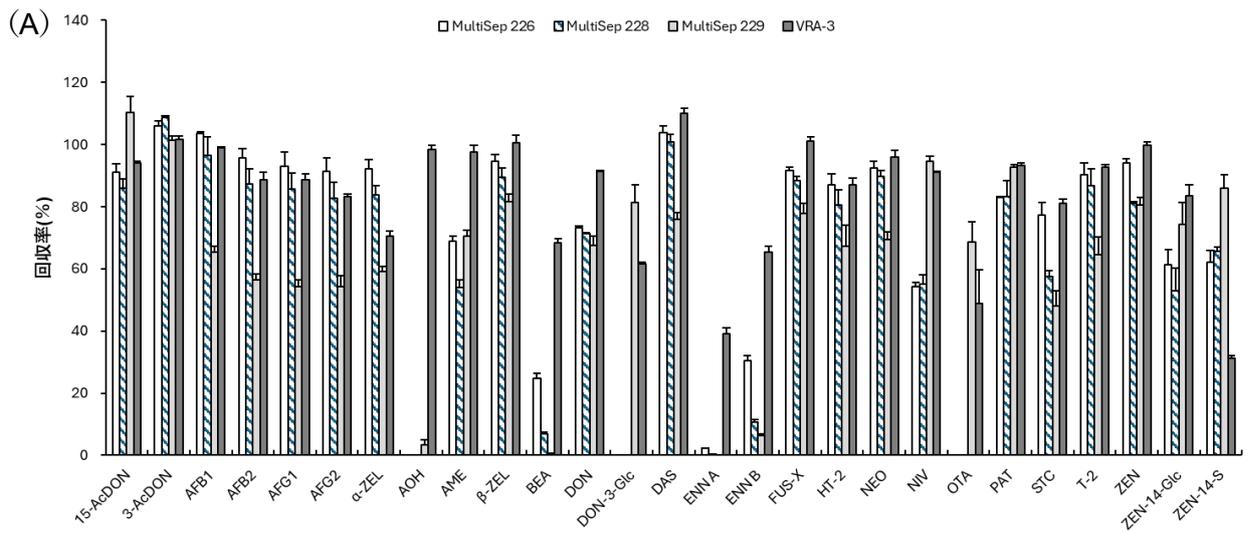


図1 各精製カラムの回収率 (A) 0-2 mL 画分, (B) 2-4 mL 画分 (平均値 \pm SD (n=3))

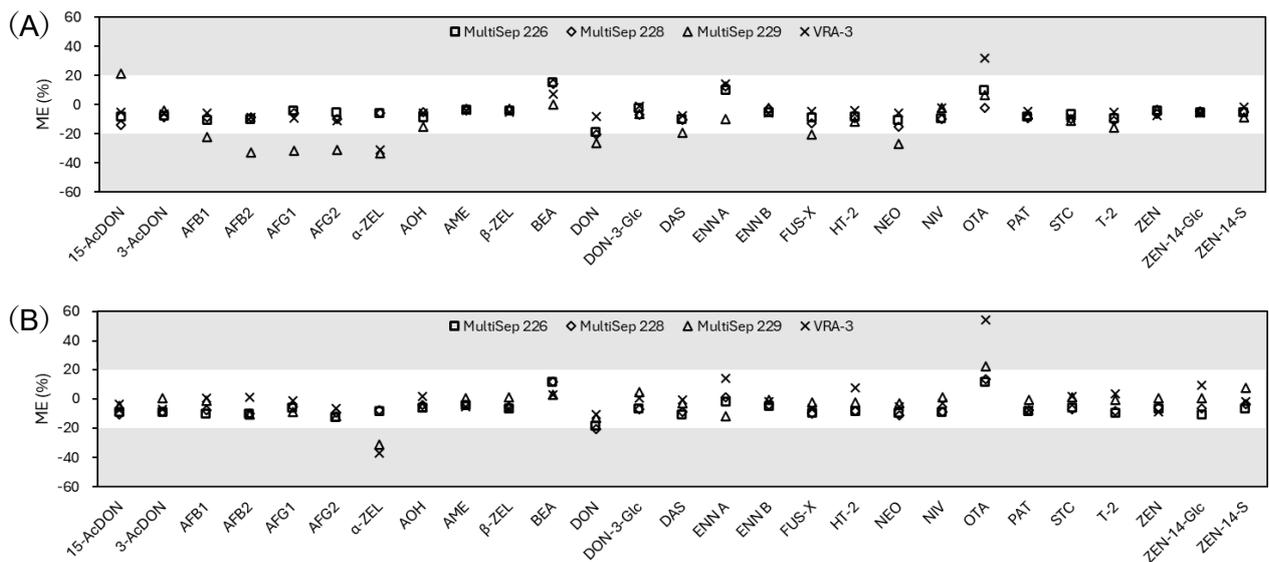


図2 各精製カラム通過液のマトリックス効果 (A) 0-2 mL 画分, (B) 2-4 mL 画分

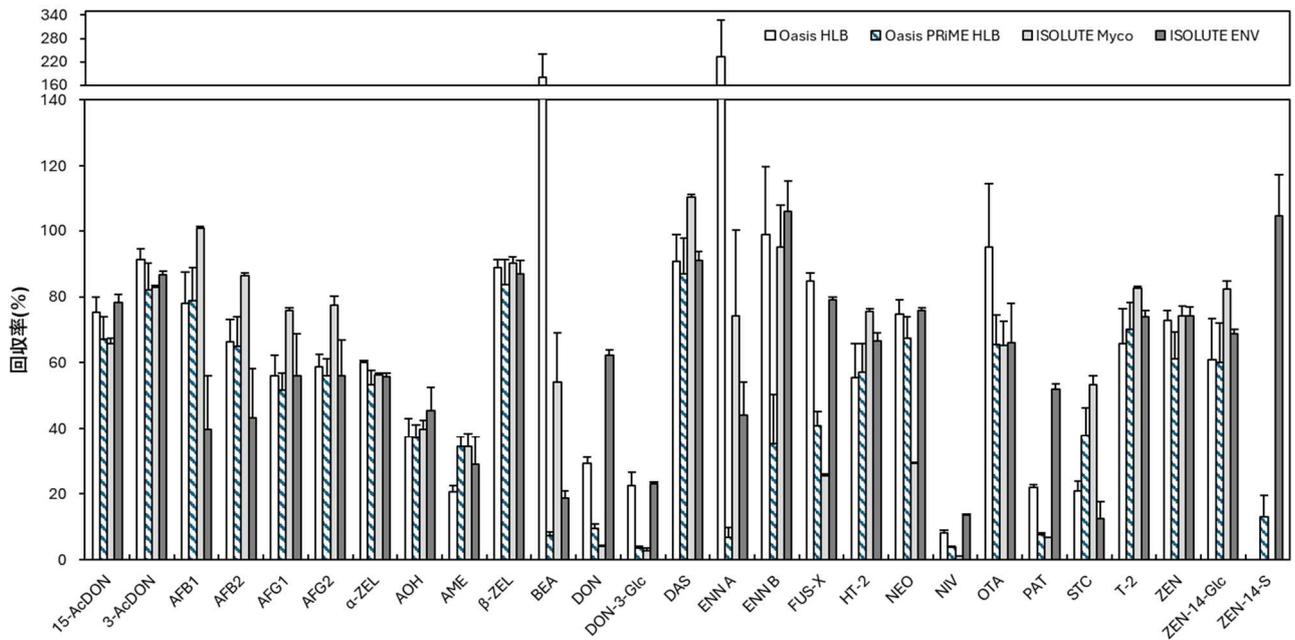


図3 各保持型精製カラムの回収率 (平均値±SD (n=3))

ニトリル/水/酢酸 (79/20/1, v/v/v) を選択した。パススルー型カラムとして検討した MultiSep 226 では、AOH, DON-3-Glc, ENN A 及び OTA の回収率が低く、OTA は 0% であった。MultiSep 228 は AOH, BEA, DON-3-Glc, ENN A 及び OTA が低回収率であり、OTA は MultiSep 226 と同じく 0% であった。MultiSep 229 は BEA 及び ENN A で低回収率となった。VRA-3 の 2-4 mL 画分が最も回収率が良好であり、 α -ZEL のみ 68.8% であった (図 1)。

マトリックス効果を確認したところ、MultiSep 226 及び 228 は概ね $\pm 20\%$ の範囲内にあり、DON のみ -20% であった。MultiSep 229 は 2-4 mL 画分でマトリックス効果が弱いものの、 α -ZEL 及び OTA で $\pm 20\%$ の範囲を外れた。VRA-3 は α -ZEL 及び OTA のみ $\pm 20\%$ の範囲外であった (図 2)。

一方、保持型カラムではほとんどの項目で回収率が 50% 程度であった (図 3)。よって、一斉分

析法としてはパススルー型カラムが適していると判断し、最も回収率が良好であった VRA-3 を採用することとした。

VRA-3 では α -ZEL 及び OTA でマトリックス効果が確認されたため、穀類のマトリックス除去に用いられる Bond Elut Mycotoxin の追加精製に

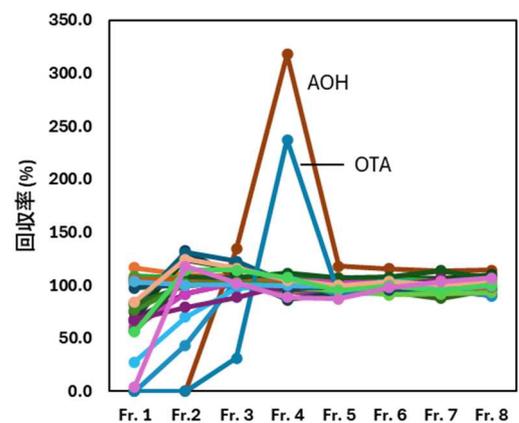


図4 VRA-3 及び Bond Elut Mycotoxin 連結時の回収率 (n=1)

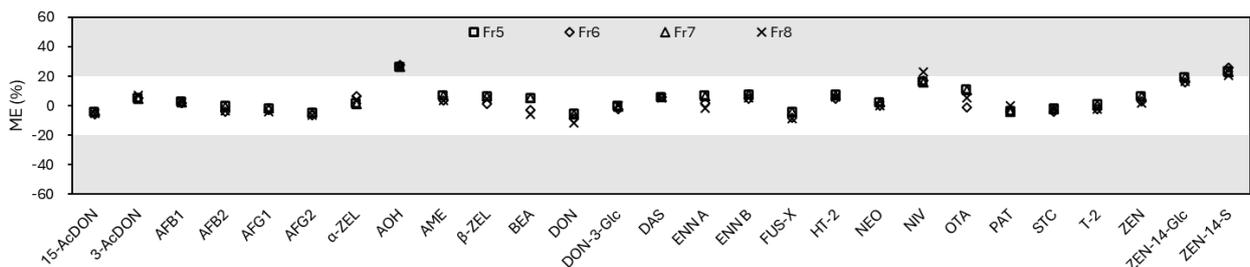


図5 VRA-3 及び Bond Elut Mycotoxin 連結時の各フラクションにおけるマトリックス効果

より軽減できるか検討した。VRA-3の下に Bond Elut Mycotoxin を連結したカラムを用いて、1 mL ずつ通過液を回収して回収率を確認したところ、フラクション (Fr.) 5 の画分以降から良好な回収率が得られた (図 4)。Fr.5 から Fr.8 までのマトリックス効果を確認したところ、 α -ZEL 及び OTA は改善されたが、AOH と ZEN-14-S でわずかに 20% を超過した (図 5)。しかし、回収率がおおむね良好であったことから、含有量調査の分析法としては使用できると判断し、VRA-3 と Bond Elut Mycotoxin の併用を精製法として採用し、Fr. 5-6 の 2 mL を試験に用いることとした。

2 精白米試料における添加回収試験

表 4 に精白米試料の添加回収試験結果を示す。低濃度では回収率 80.3–117.3%，高濃度では回収率 73.3–107.7% であり、併行精度はすべて 20% 以下であった。検量線の直線性はすべて良好であり、算出された LOQ は 0.25–2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。なお、ブランク試料を測定して選択性を確認したところ、定量を妨害するピークは見られな

かった。

3 玄米試料における添加回収試験およびマトリックス効果の確認

精白米と同様の分析法を試したところ、超純水で希釈した際に強く白濁したため精製不足が懸念された。玄米では精白米よりも脂質等の含有量が増えることから、脂質除去を目的に使用される EMR-Lipid とカビ毒一斉分析に使用される MycoSpin 400 が適用可能か検討した。

EMR-Lipid のみの精製法と EMR-Lipid 及び MycoSpin 400 併用時を比較した添加回収試験とマトリックス効果を表 5 及び図 6 に示す。EMR-Lipid の低濃度では α -ZEL, BEA, ENNA, ENN B, NEO, OTA が低回収率となり、高濃度では α -ZEL, BEA, ENNA, ENN B が低回収率であった。EMR Lipid と MycoSpin 400 併用時は、低濃度では α -ZEL, DON-3-Glc, OTA が、高濃度では α -ZEL, DON-3-Glc が低回収率となり、MycoSpin 400 を使用すると DON-3-Glc の回収率が著しく

表 4 精白米試料における添加回収試験結果

	低濃度			高濃度			R^2	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	評価基準 (%)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	評価基準 (%)	回収率 (%)	併行精度 (%)			
15-AcDON	60–115	101.8	4.6	80–110	106.3	3.2	0.999	1.0	0.3
3-AcDON	60–115	98.8	6.1	80–110	100.8	2.0	1.000	1.0	0.3
AFB1	40–120	103.7	1.2	60–115	99.4	2.7	1.000	0.1	0.03
AFB2	40–120	100.2	0.8	60–115	99.0	1.7	1.000	0.1	0.03
AFG1	40–120	96.6	2.0	60–115	96.8	2.6	1.000	0.1	0.03
AFG2	40–120	100.3	5.6	60–115	97.5	1.4	1.000	0.1	0.03
α -ZEL	60–115	101.9	6.8	80–110	92.5	5.0	1.000	0.5	0.15
AOH	60–115	107.2	8.3	80–110	106.5	3.9	1.000	1.0	0.3
AME	40–120	116.7	2.0	60–115	91.6	2.4	1.000	0.1	0.03
β -ZEL	60–115	109.9	3.4	80–110	99.0	2.5	1.000	0.5	0.15
BEA	40–120	98.0	5.8	60–115	73.3	7.1	1.000	0.25	0.08
DON	60–115	80.4	8.9	80–110	101.1	3.0	0.999	2.0	0.6
DON-3-Glc	60–115	88.0	12.3	80–110	94.5	2.1	1.000	2.0	0.6
DAS	60–115	101.3	0.8	80–110	104.2	2.3	1.000	0.1	0.3
ENNA	40–120	89.7	5.0	60–115	79.7	2.9	0.999	0.1	0.3
ENNB	40–120	97.8	2.3	60–115	97.4	2.0	1.000	0.1	0.3
FUS-X	60–115	93.0	9.8	80–110	101.2	3.0	1.000	2.0	0.6
HT-2	60–115	110.2	2.4	80–110	101.5	2.5	1.000	1.0	0.3
NEO	60–115	93.5	2.3	80–110	101.2	2.3	1.000	0.5	0.15
NIV	60–115	105.5	4.1	80–110	91.6	4.1	1.000	2.0	0.6
OTA	40–120	90.5	8.1	60–115	107.7	6.0	1.000	0.5	0.15
PAT	60–115	89.5	5.9	80–110	90.5	2.0	1.000	5.0	1.5
STC	40–120	114.2	2.8	60–115	101.8	1.9	1.000	0.1	0.03
T-2	60–115	101.6	1.6	80–110	94.0	6.4	1.000	1.0	0.3
ZEN	60–115	117.3	2.3	80–110	105.2	3.5	1.000	1.0	0.3
ZEN-14-Glc	40–120	103.9	9.0	60–115	102.3	3.0	1.000	0.5	0.15
ZEN-14-S	40–120	80.3	3.4	60–115	79.3	3.3	1.000	0.5	0.15

表5 玄米試料における添加回収試験結果

	低濃度					高濃度					R ²
	評価基準 (%)	EMR-Lipid		EMR-Lipid + MycoSpin 400		評価基準 (%)	EMR-Lipid		EMR-Lipid + MycoSpin 400		
		回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	回収率 (%)	併行精度 (%)		回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	回収率 (%)	併行精度 (%)	
15-AcDON	60-115	63.5	3.4	75.0	3.8	80-110	77.5	4.1	86.2	1.6	1.000
3-AcDON	60-115	75.5	4.8	100.3	5.0	80-110	82.6	1.7	104.6	2.0	1.000
AFB1	40-120	78.1	3.5	87.1	2.4	60-115	80.4	1.7	87.2	2.6	1.000
AFB2	40-120	85.3	3.7	92.2	4.0	60-115	78.5	2.3	85.7	1.6	1.000
AFG1	40-120	76.8	9.4	75.9	5.6	60-115	77.4	3.6	78.1	1.6	1.000
AFG2	40-120	76.5	10.2	80.6	4.0	60-115	72.3	2.3	75.4	2.6	1.000
α-ZEL	60-115	40.6	32.2	49.7	30.4	80-110	42.3	9.8	56.1	6.1	0.999
AOH	60-115	93.5	8.0	86.1	6.1	80-110	87.8	2.3	77.6	30.5	1.000
AME	40-120	78.9	5.2	82.7	6.5	60-115	80.6	1.6	79.0	13.8	1.000
β-ZEL	60-115	81.9	17.3	108.6	12.2	80-110	79.0	1.9	90.3	5.5	1.000
BEA	40-120	27.4	3.2	87.5	6.8	60-115	11.4	5.2	65.8	20.4	1.000
DON	60-115	65.7	6.5	75.3	4.1	80-110	83.0	2.2	88.4	1.7	1.000
DON-3-Glc	60-115	89.5	12.9	19.1	37.9	80-110	71.2	5.5	39.0	5.2	1.000
DAS	60-115	78.7	0.9	87.8	2.0	80-110	92.5	2.3	96.7	1.4	0.999
ENN A	40-120	31.4	2.4	76.0	1.7	60-115	16.0	4.2	57.8	7.9	0.999
ENN B	40-120	42.3	2.1	76.2	3.3	60-115	47.0	3.6	77.2	3.5	0.999
FUS-X	60-115	69.2	6.3	76.0	3.9	80-110	81.4	1.4	87.9	2.5	1.000
HT-2	60-115	90.1	4.7	106.4	4.3	80-110	91.2	1.9	98.3	1.7	1.000
NEO	60-115	53.8	3.0	70.9	1.0	80-110	76.7	3.3	86.8	1.0	0.999
NIV	60-115	62.2	4.7	85.2	8.5	80-110	81.0	1.5	87.1	1.9	1.000
OTA	40-120	43.3	29.9	30.4	43.5	60-115	85.0	2.1	61.6	9.8	1.000
PAT	60-115	106.5	2.7	108.9	3.3	80-110	88.0	2.0	100.7	0.5	1.000
STC	40-120	75.8	2.9	86.2	3.9	60-115	67.1	2.0	73.3	3.4	1.000
T-2	60-115	74.2	1.6	82.5	9.4	80-110	82.6	1.1	88.3	5.3	1.000
ZEN	60-115	68.1	4.9	83.1	3.4	80-110	82.9	2.2	97.1	1.8	1.000
ZEN-14-Glc	40-120	97.4	6.8	109.8	7.5	60-115	90.4	3.3	97.2	2.9	1.000
ZEN-14-S	40-120	92.2	3.0	105.6	3.6	60-115	101.6	1.4	106.5	4.5	1.000

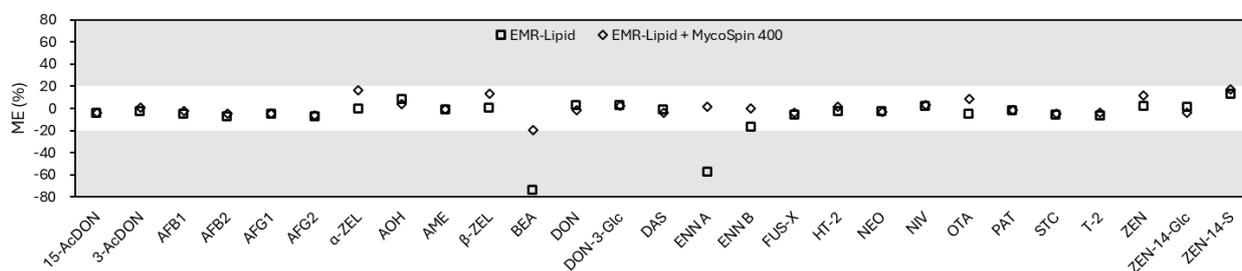


図6 玄米試料における各精製法のマトリックス効果

低くなった。併行精度は低回収率の項目を除いておおむね良好であったが、EMR-Lipid + MycoSpin 400 併用時の高濃度で AOH が 1 試料低回収率となり (回収率:①99.7%, ②80.1%, ③75.9%, ④38.9%, ⑤93.3%), 併行精度が 30.5% となった。

マトリックス効果に関しては、EMR-Lipid では BEA と ENN A で強いイオン化抑制が確認された。一方で EMR-Lipid + MycoSpin 400 併用時は、すべてのカビ毒で強いマトリックス効果は見られなかった。そのため、回収率及びマトリックス効果の結果から EMR-Lipid + MycoSpin 400 を併用した精製法を採用した。なお、算出された LOQ は 0.25-5.0 µg/kg であり (表 6), 選択性も問題はなかった。

4 含有実態調査

表 7 に LOQ 以上の濃度で検出されたカビ毒を示す。複数試料から検出されたカビ毒は、精白米では AME, BEA, DAS, ZEN 及び ZEN-14-S, 玄米では AME, BEA, DAS, STC, ZEN 及び ZEN-14-S であった。高頻度で検出されたカビ毒は、精白米では BEA が 32.6% (14/43 試料) から、玄米では AME, BEA, STC が 54.5% (6/11 試料) から検出された。検出濃度は精白米と玄米ともに、ZEN が最も高く、精白米では 3.44-33.67 µg/kg (平均 18.55 µg/kg), 玄米では 10.42-287.34 µg/kg (平均 148.88 µg/kg) であった。ZEN が検出された試料では、ZEN の硫酸抱合体である ZEN-14-S も検出された。

表 6 玄米分析法の推定 LOQ 及び LOD

	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
15-AcDON	1.0	0.3
3-AcDON	1.0	0.3
AFB1	0.1	0.03
AFB2	0.1	0.03
AFG1	0.1	0.03
AFG2	0.1	0.03
α -ZEL	1.0	0.30
AOH	2.5	0.75
AME	0.1	0.03
β -ZEL	1.0	0.3
BEA	0.25	0.08
DON	2.0	0.6
DON-3-Glc	2.0	0.6
DAS	0.1	0.3
ENNA	0.1	0.3
ENNB	0.1	0.3
FusX	2.0	0.6
HT-2	1.0	0.3
NEO	0.5	0.15
NIV	5.0	1.5
OTA	0.5	0.15
PAT	5.0	1.5
STC	0.1	0.03
T-2	1.0	0.3
ZEN	2.0	0.6
ZEN-14-Glc	0.5	0.15
ZEN-14-S	0.5	0.15

1 試料あたりのカビ毒複合汚染に関しては、精白米で 2 種類 (7%, 3/43 試料), 3 種類 (2.3%, 1/43 試料), 7 種類 (2.3%, 1/43 試料) のカビ毒が検出され、玄米では 2 種類 (9.1%, 1/11 試料), 3 種類 (27.3%, 3/11 試料), 5 種類 (9.1%, 1/11 試料), 11 種類 (9.1%, 1/11 試料) と複数のカビ毒が検出された試料があった (図 7)。検出されたカビ毒の組み合わせは図 8 に示す。

考察

1 分析方法の検討及び添加回収試験

含有実態調査を実施するにあたり、マトリックス検量線を使用しない多種カビ毒の一斉分析法を検討した。InertSep GC と VRA-3 の併用による水産飼料の複雑なマトリックスの除去が報告されているが¹⁹⁾、グラファイトカーボンを使用す

ると AF 類や ZEN が低回収率となったため、その他のカラムで検討を進めた。その結果、精白米では VRA-3 と Bond Elut Mycotoxin の組み合わせにより、27 種類のカビ毒で良好な回収率が得られた。算出 LOQ も 0.25–2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、米を対象とした先行研究²⁰⁻²²⁾と比較しても包括的かつ高感度な分析法であると考えられる。ただし、AOH と ZEN-14-S でマトリックス効果が見られたという点においては検討の余地がある。

一方、玄米では超純水希釈時に著しく白濁することがあり、精製不足が疑われたため、脂質/マトリックスの除去に使用される EMR-Lipid をベースとして検討した。EMR-Lipid のみでは BEA や ENNA が低回収率となったが、MycoSpin 400 で追加精製することで回収率が改善した。BEA と ENNA は EMR-Lipid のみでは強いイオン化抑制が確認されたことから、低回収率の原因はマトリックス効果によるものと考えられた。MycoSpin 400 による追加精製は、マトリックス効果を改善できたが、DON-3-Glc の回収率が極めて低くなり、吸着等による損失が疑われた。

よって、EMR-Lipid のみの分析法と MycoSpin 400 による追加精製法の 2 種の分析法を用いることで相補的に多くのカビ毒を分析できると考えられるが、 α -ZEL や低濃度の OTA などはいずれも低回収率であるため更なる検討が必要である。

2 含有実態調査

実試料の含有実態調査では、精白米からは BEA、玄米からは AME、BEA、STC が最も検出頻度が高く、玄米では DAS の検出頻度も高かった。AME、BEA は新興カビ毒に該当し、本県の米にも含まれていることが明らかとなった。濃度は 0.12–44.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、BEA については国立医薬品食品衛生研究所による調査 (2019–2021 年)²³⁾の 8.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (米・玄米の最大値) より高い値となった。他国での調査や他の穀物^{1, 23)}と比べても低濃度であったが、正確な実態把握のためにも継続的な調査が必要であると考えられる。AME に関しては、穀物での調査¹⁾と比較すると低濃度であった。

ZEN が検出された試料からは、モディファイドマイコトキシンである ZEN-14-S が検出されたが、

配糖体である ZEN-14-Glc は検出されなかった。一方で、DON が検出された玄米では DON-3-Glc が検出された。米ぬかを対象とした調査では 60% の試料から ZEN-14-Glc が検出されたとの報告²⁴⁾があるが、本調査では配糖体は検出されず一致する結果とはならなかった。ZEN-14-S は植物だけでなく、*Fusarium* 属や *Aspergillus* 属菌によっ

ても ZEN から変換されることが知られているが^{25, 26)}、今回の調査で検出された ZEN-14-S が稲由来なのか環境中の菌由来なのかは判断できない。

しかしながら、ZEN-14-S も酸や酵素により容易に ZEN に変換されるため^{3, 26)}、本県の米においては ZEN-14-S による汚染も起こりうるという実態の把握は重要な知見になったと考えられる。

表 7 調査試料中のカビ毒含有量

	精白米 (n=43)			玄米 (n=11)		
	検出濃度範囲 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	検出濃度平均 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	陽性率 (%)	検出濃度範囲 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	検出濃度平均 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	陽性率 (%)
15-AcDON	-	-	-	-	-	-
3-AcDON	-	-	-	-	-	-
AFB1	-	-	-	-	-	-
AFB2	-	-	-	-	-	-
AFG1	-	-	-	-	-	-
AFG2	-	-	-	-	-	-
α -ZEL	-	-	-	-	-	-
AOH	-	-	-	-	-	-
AME	0.12 - 0.17	0.15	9.3	0.16 - 1.33	0.59	54.5
β -ZEL	0.59	0.59	2.3	14.16	14.16	9.1
BEA	0.26 - 8.21	1.89	32.6	0.72 - 44.54	14.18	54.5
DON	-	-	-	69.50	69.50	9.1
DON-3-Glc	-	-	-	4.30	4.30 (8.63)	9.1
DAS	0.21 - 1.01	0.62	4.7	0.58 - 7.33	2.88	27.3
ENN A	-	-	-	-	-	-
ENN B	-	-	-	-	-	-
FUSX	-	-	-	35.49	35.49	9.1
HT-2	-	-	-	-	-	-
NEO	-	-	-	-	-	-
NIV	12.57	12.57	2.3	11.99	11.99	9.1
OTA	2.77	2.77	2.3	-	-	-
PAT	-	-	-	-	-	-
STC	0.13	0.13	2.3	0.17 - 1.06	0.40	54.5
T-2	-	-	-	-	-	-
ZEN	3.44 - 33.67	18.55	4.7	10.42 - 287.34	148.88	18.2
ZEN-14-Glc	-	-	-	-	-	-
ZEN-14-S	0.38 - 1.55	0.96	4.7	1.34 - 149.6	75.47	18.2

※ DON-3-Glcの括弧書きはEMR-Lipid精製のみの結果を意味する

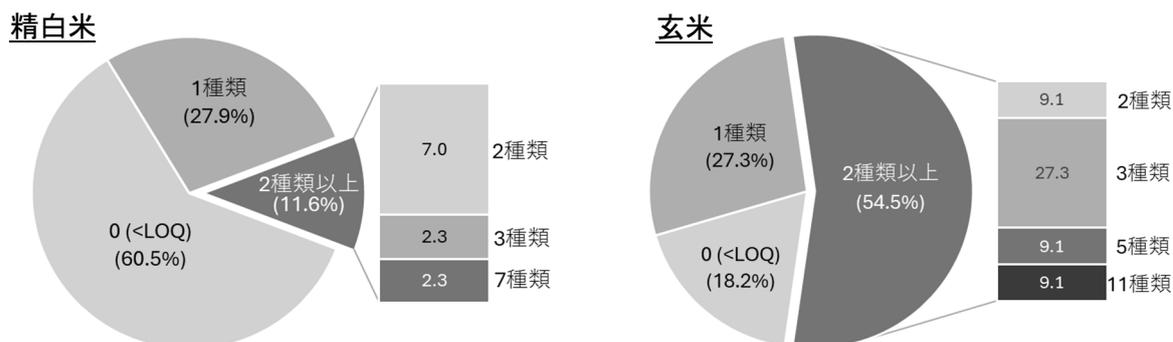


図 7 1 試料中から検出されたカビ毒項目数

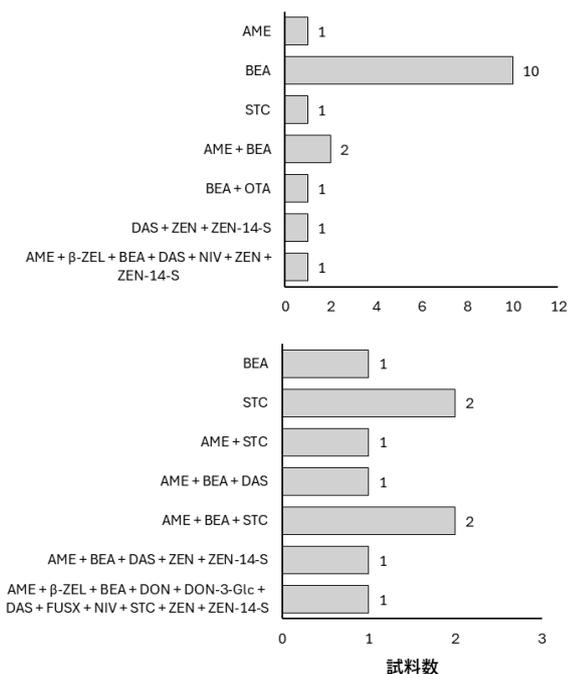


図 8 検出カビ毒項目別の試料数

また、DON-3-Glc が検出されたため、EMR-lipid 精製のみとの結果と比較したところ、4.30 μg/kg (EMR-Lipid + MycoSpin 400) と 8.63 μg/kg (EMR-Lipid) と約 2 倍の結果となった (表 7) . 添加回収試験の結果 (表 5) では、EMR-lipid 精製の回収率が良好であることから、試料濃度は 8.63 μg/kg の方がより実態に近いと考えられる。

複合汚染に着目すると、精白米では試料の 11%、玄米では 54% の試料が 2 種類以上のカビ毒に汚染されていた。特に精白米と玄米でそれぞれ 7 種類、11 種類の複合汚染が起きていた試料があり、複合汚染の種類が多い試料は検出濃度も高い傾向があった。

含有量調査の結果、本県においては、AME、BEA のような新興カビ毒、ZEN とその硫酸抱合体である ZEN-14-S、DAS や NIV などのトリコテセン系カビ毒、AF 類の前駆体である STC が精白米及び玄米から検出されやすいカビ毒であることが明らかとなった。

3 研究の限界

本研究では、精白米及び玄米を対象としたカビ毒一斉分析法の検討と実試料の含有実態調査により、本県での汚染実態に関する知見を得ることができた。しかし、本研究の内容には以下の限界が挙げられる。

(1) 分析方法の妥当性及び品種別の適用可能性

九州で主に生産される米はヒノヒカリであることから、本研究における分析法の検討はヒノヒカリを用いて実施した。そのため、コシヒカリやひとめぼれ等の別の品種で同等の回収率や精製効果が得られるかは不明である。

また、添加回収試験では日間変動について評価していないため、今後は分析法の妥当性や別品種への適用可能性についての検討が必要である。

(2) サンプルングの偏り及び年次変動

含有実態調査の試料数が精白米 43 試料、玄米 11 試料と少ないため、この結果が本県の状況を正確に反映したものとは考えにくい。とりわけ、栽培方法等による影響は大きいと予想されるため、より試料数を増やした調査が必要である。

また、カビ毒の汚染濃度は気候に強く影響を受け年次変動が大きいことが知られている。本調査の米試料は多くが 2024 年産であるため、詳細な汚染実態の把握には継続的な調査が必要である。

まとめ

精白米では VRA-3 と Bond Elut Mycotoxin を併用することで、モディファイドマイコトキシン及び新興カビ毒を含む 27 種のカビ毒一斉分析が可能となった。玄米においては、EMR-Lipid と MycoSpin 400 の併用によりマトリックス効果を軽減することができたが、α-ZEL、OTA や DON-3-Glc など一部のカビ毒で回収率が低いため検討の余地がある。

県内の精白米及び玄米では、AME、BEA、STC の検出頻度が高かった。また、ZEN-14-S や DON-3-Glc が検出されたこと、頻度や濃度は低いものの複合汚染も確認されたことから、モディファイドマイコトキシン等を対象とした一斉分析法の重要性を示唆する結果となった。

今後は、他品種での分析法の適用可能性の確認や、年次変動の程度など詳細な汚染実態に関する情報が求められる。

文献

- 1) Fraeyman, S., Croubels, S., Devreese, M., Antonissen, G. Emerging Fusarium and

- Alternaria* Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics. *Toxins* 2017; 9(7): 228.
- 2) Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C. et al. Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition Food Research* 2013; 57(1): 165-86.
 - 3) Kovač, M., Šubarić, D., Bulaić, M. et al. Yesterday masked, today modified; what do mycotoxins bring next? *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 2018; 69(3): 196-214.
 - 4) Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V., Berthiller, F. Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2017; 65(33): 7052-7070.
 - 5) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). 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.
 - 6) Palumbo, R., Crisci, A., Venâncio, A. et al. Occurrence and Co-Occurrence of Mycotoxins in Cereal-Based Feed and Food. *Microorganisms* 2020; 8(1): 74.
 - 7) Crudo, F., Varga, E., Aichinger, G. et al. Co-Occurrence and Combinatory Effects of *Alternaria* Mycotoxins and Other Xenobiotics of Food Origin: Current Scenario and Future Perspectives. *Toxins* 2019; 11(11): 640.
 - 8) Sulyok, M., Stadler, D., Steiner, D., Krska, R. Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2020; 412(11): 2607-2620.
 - 9) Pantano, L., La Scala, L., Olibrio, F. et al. QuEChERS LC-MS/MS Screening Method for Mycotoxin Detection in Cereal Products and Spices. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2021; 18(7): 3774.
 - 10) Rodríguez-Cañás, I., González-Jartín, J. M., Alvariño, R. et al. Detection of mycotoxins in cheese using an optimized analytical method based on a QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS quantification. *Food Chemistry* 2023; 408: 135182.
 - 11) Nakhjavan, B., Sami Ahmed, N., Khosravi-fard, M. Development of an Improved Method of Sample Extraction and Quantitation of Multi-Mycotoxin in Feed by LC-MS/MS. *Toxins* 2020; 12(7): 462.
 - 12) Yang, Y., He, Z., Mu, L. et al. Simultaneous Determination of 23 Mycotoxins in Broiler Tissues by Solid Phase Extraction UHPLC-Q/Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry. *Separations* 2021; 8(12): 236.
 - 13) Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J. et al. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports* 2016; 6: 24328.
 - 14) Jung, J. -Y., Kim, J. -H., Baek, M. et al. Adapting to the projected epidemics of *Fusarium* head blight of wheat in Korea under climate change scenarios. *Frontiers in Plant Science* 2022; 13: 104052.
 - 15) Kiselevva, M., Chalyy, Z., Sedova, I. et al. Stability of Mycotoxins in Individual Stock and Multi-Analyte Standard Solutions. *Toxins* 2020; 12(2): 94.
 - 16) Codex Alimentarius Commission. "General Criteria for the Selection of Single-Laboratory Validated Methods of Analysis". *Procedural Manual*, 27th edition 2019, p.77.
 - 17) Malachová, A., Sulyok, M., Beltrán, E. et al. Optimization and validation of a quantitative liquidchromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of Chromatography A* 2014; 1362: 145-156.

- 18) Sulyok, M., Suman, M., Krska, R. Quantification of 700 mycotoxins and other secondary metabolites of fungi and plants in grain products. *NPJ Science of Food* 2024; 8(1): 49.
- 19) 佐野勇気, 高橋洋武, 橋田 規 他. 水産飼料中のトリコテセン系カビ毒一斉分析法の開発. *日本水産学会誌* 2021; 87(6): 679-684.
- 20) Majeed, S., De Boevre, M., De Saeger, S. et al. Multiple Mycotoxins in Rice: Occurrence and Health Risk Assessment in Children and Adults of Punjab, Pakistan. *Toxins* 2018; 10(2): 77.
- 21) Troestch, J., Reyes, S., Vega, A. Determination of Mycotoxin Contamination Levels in Rice and Dietary Exposure Assessment. *Journal of Toxicology* 2022: 3596768.
- 22) Santos, A. R., Carreiró, F., Freitas, A. et al. Mycotoxins Contamination in Rice: Analytical Methods, Occurrence and Detoxification Strategies. *Toxins* 2022; 14(9): 647.
- 23) 吉成知也 他. 令和元～3 (2019～2021)年度厚生労働科学研究報告書「日本国内流通食品に検出される新興カビ毒の安全性確保に関する研究」
- 24) Siri-anusornsak, W., Kolawole, O., Mahakarnchanakul, W. et al. The Occurrence and Co-Occurrence of Regulated, Emerging, and Masked Mycotoxins in Rice Bran and Maize from Southeast Asia. *Toxins* 2022; 14(8): 567.
- 25) Borzekowski, A., Drewitz, T., Keller, J. et al. Biosynthesis and Characterization of Zearalenone-14-Sulfate, Zearalenone-14-Glucoside and Zearalenone-16-Glucoside Using Common Fungal Strains. *Toxins* 2018; 10(3): 104.
- 26) Plasencia, J., Mirocha, C. J. Isolation and Characterization of Zearalenone Sulfate Produced by *Fusarium* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57(1): 146-150.