

精白米におけるカビ毒一斉分析の検討

衛生化学部
○木下和昭 富山裕規 高山清子
黒木麻衣 落合克紀

1

カビ毒とは

カビの代謝産物のうち、ヒトや動物に対して有害な作用を示す化学物質の総称

カビが付着 → 増殖、カビ毒産生 → 加熱 → カビが死滅してもカビ毒は残存

熱に安定なものが多く、加工・調理で分解されにくい

2

カビ毒の種類と毒性

カビ毒	主な汚染食品	毒性
アフラトキシンB1, B2, G1, G2	ナッツ類、トウモロコシ、米、麦、香辛料	肝がん、肝障害、免疫毒性
アフラトキシンM1	牛乳、チーズ	腎障害、腎がん、免疫毒性、催奇形性
オクラトキシンA	トウモロコシ、麦、ナッツ類、ワイン、コーヒー豆	腎障害、腎がん、免疫毒性、IgA腎症
トリコテセン系 デオキシニバレノール ニバレノール, T-2, HT-2	麦、米、トウモロコシ	消化器系障害、免疫毒性、IgA腎症
パツリン	リンゴ、リンゴ加工品	消化器出血

2011年 県内の生産米から基準値の7倍のアフラトキシン検出 (国産米として初のアフラトキシン汚染事例)

3

モディファイドマイコトキシン(修飾体)

カビ毒に糖などが結合したものの総称

デオキシニバレノール (DON) → デオキシニバレノール-3-グルコシド (DON-3-Glc)

性状が異なるため、元のカビ毒を対象とした方法では分析することができない

4

修飾体の問題点

異物代謝により修飾体が生成 (植物細胞内) → 加水分解により、元のカビ毒として吸収 (腸内)

植物細胞内: カビ毒 → 異物代謝 → 修飾体

腸内: 修飾体 → 腸内細菌による加水分解 → カビ毒

修飾体の見逃しは **カビ毒の過小評価** になり得る

5

研究目的

県内のカビ毒汚染実態は？

- 温暖で湿度の高い気候
- 国産米初のアフラトキシン汚染事例
- 修飾体という新たなハザード

調査の必要性は高い

目的
多種カビ毒を対象に精白米中のカビ毒含有量を調査

6

測定対象カビ毒

<p>主要カビ毒</p>	<p>アフラトキシン類 (AFB1, B2, G1, G2) オクストラキシンA (OTA) デオキシニバレノール類 (DON, 3-AcDON, 15-AcDON) ニバレノール (NIV)、フザレンX (FusX) ネオソラニオール (NEO) T-2トキシン、HT-2トキシン ゼアラレニン類 (ZEN, α-ZEL, β-ZEL) パツリン (PAT) フモニシン類 (FB1, B2, B3) ジアセトキシシシルベノール (DAS)</p>
<p>その他のカビ毒 (情報が不足しているカビ毒)</p>	<p>エンニアチン類 (ENN A, B) ビューベリシン (BEA) ステリグマトシステン (STC) アルテルナリアトキシン (AOH, AME) デオキシニバレノール-3-グルコシド (DON-3-Glc) ゼアラレニン-14-グルコシド (ZEN-14-Glc) ゼアラレニン-4-サルフェート (ZEN-4-S)</p>

合計 30種類

7

方法

1

抽出・精製方法の検討

- 抽出方法の比較
振とう抽出
QuEChERS
- 精製方法の比較
水で希釈
精製カラム

2

分析方法の確立

- 妥当性評価試験
(分析法の性能評価)
真度 (回収率)
精度

3

含有量調査

- 精白米12検体
- カビ毒30種類

8

精白米からの抽出法の検討

■ 方法1：振とう抽出 ※ 抽出溶媒: アセトニトリル/水/酢酸 (79/20/1)

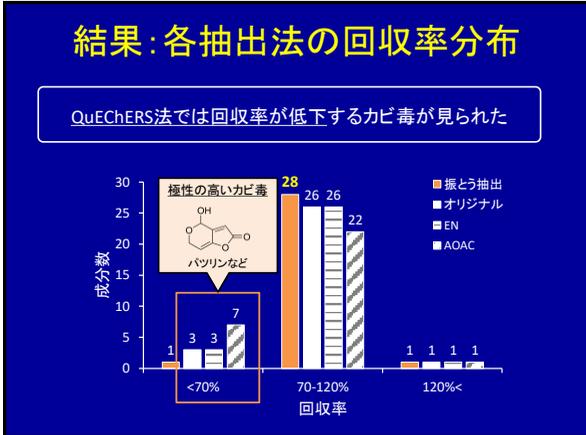
抽出溶媒※ 20 mL → 振とう 60分 → 遠心分離

■ 方法2：QuEChERS法 (オリジナル法、AOAC法、EN法)

1%酢酸 10 mL, アセトニトリル 10 mL → QuEChERS塩 → 遠心分離 → アセトニトリル層を分析

振とう 60分 → 振とう 5分

9



10

考察: 塩析による回収率の低下

◇ QuEChERS法では塩析により有機溶媒と水が分離する

有機溶媒と水の混合溶媒

有機溶媒に溶けやすい物質 (赤い多角形)
 水に溶けやすい物質 (青い丸)

有機溶媒層

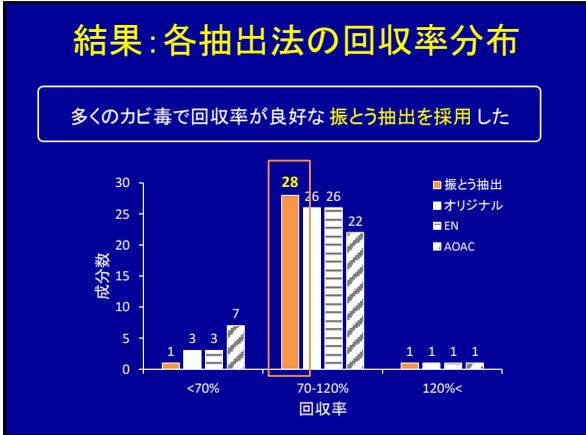
水層

塩析

極性の高いカビ毒

大部分が水層へ移動してしまう

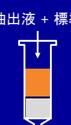
11



12

精製カラムの検討

BL抽出液 + 標準液



通液



通過液を回収



分析

精製カラムの種類

- 1 カラムなし(水で希釈)
- 2 Oasis PRiME HLB
- 3 EMR-Lipid
- 4 Bond Elut Mycotoxin
- 5 InertSep VRA-3

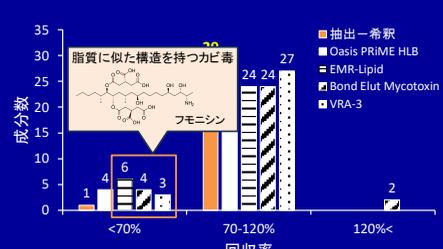
評価方法

- 各カラム5併行で実施
- 回収率により評価
- 評価基準：70%～120%
(農業等の試験の妥当性評価ガイドラインを参考)

13

結果：各精製カラムの回収率分布

精製カラムでは一部のカビ毒が回収できない



成分数

回収率

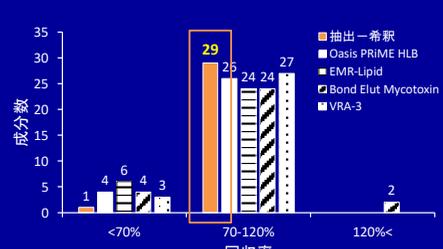
- 抽出-希釈
- Oasis PRiME HLB
- EMR-Lipid
- Bond Elut Mycotoxin
- VRA-3

脂質に似た構造を持つカビ毒
アマトキシン

14

結果：各精製カラムの回収率分布

精製カラムを使用しない 希釈法を採用した



成分数

回収率

- 抽出-希釈
- Oasis PRiME HLB
- EMR-Lipid
- Bond Elut Mycotoxin
- VRA-3

15

妥当性評価試験

振とう抽出
(60分間)



遠心分離



2.5倍希釈
(超純水)



LC-MS/MS
測定



実施方法

- 3名、2併行の2日間で実施
- 添加濃度
 - ① 定量下限
 - ② 定量下限 × 10

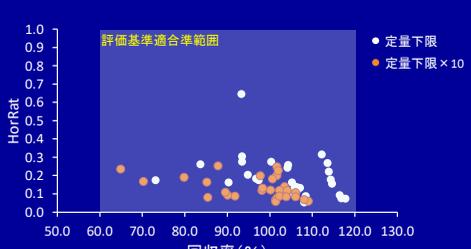
評価基準

- CODEXガイドライン
- 真度：80-110% (添加濃度 ≤ 100 µg/kg)
60-115% (≤ 10 µg/kg)
40-120% (≤ 1 µg/kg)
- 精度：HorRat値 ≤ 2

16

妥当性評価試験の結果

すべてのカビ毒で評価基準を満たした



HorRat

回収率 (%)

- 定量下限
- 定量下限 × 10

評価基準適合範囲

17

収去検体の分析結果

低濃度のカビ毒が複数種検出された

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
ビューベリシン	0.57	0.56	0.53	0.65	0.57	0.54
ステリグマトシステン	0.5 >	0.5 >		0.5 >	0.5 >	
	試料7	試料8	試料9	試料10	試料11	試料12
アルテルナリオールメチルエーテル	0.5 >	0.5 >	0.5 >	0.5 >	0.5 >	0.5 >
β-ゼアラレノール				2 >		
ビューベリシン			0.5 >	0.5 >	0.5 >	
ニバレノール				10 >		
ゼアラレノン				10 >		
ゼアラレノン-4-サルフェート				1 >		

※ 定量下限値未満の測定値については各カビ毒の「定量下限値 >」、不検出は空欄で示した(単位: µg/kg)

18

検出したカビ毒の主な産生菌

カビ毒	産生菌
ニバレノール	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. lunulosporum</i>
ゼアラレノン	<i>Fusarium Sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. Equiseti</i>
ビューベリシン	<i>Fusarium proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. oxysporum</i>
ステリグマトシステン	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. flavus</i>
アルテルナリオールメチルエーテル	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. dauci</i> , <i>A. cucumerina</i> , <i>A. solani</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. citri</i>

Jyoti S., et al. *Food Sci Nutr.* 8, 2183-2204 (2020)
Christiane. G. -D., et al. *J.Agric. Food Chem.* 65, 7052-7070 (2017)

フザリウム属のカビにより複数種のカビ毒汚染が起きた可能性がある

19

収去検体の分析結果

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
ビューベリシン	0.57	0.56	0.53	0.65	0.57	0.54
ステリグマトシステン	0.5 >	0.5 >		0.5 >	0.5 >	

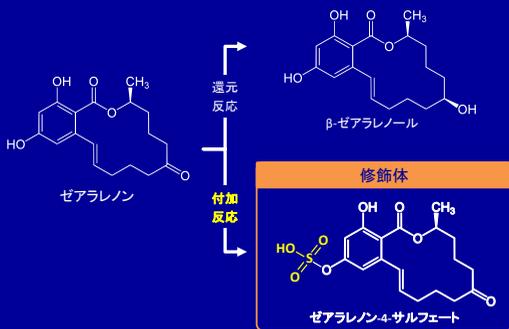
	試料7	試料8	試料9	試料10	試料11	試料12
アルテルナリオールメチルエーテル	0.5 >	0.5 >	0.5 >	0.5 >	0.5 >	0.5 >

カビ毒	試料10
β-ゼアラレノール	2 >
生物により代謝されたカビ毒	10 >
ゼアラレノン-4-サルフェート	1 >

※ 定量下限値未満の測定値については各カビ毒の「定量下限値 >」、不検出は空欄で示した(単位: μg/kg)

20

生物による異物代謝



21

まとめと今後の展望

まとめ

- 希釈法を用いることで30種のカビ毒一斉分析が可能
- 精白米でも低濃度のカビ毒複合汚染がおきていた

今後の展望

- 検体数を増やし、詳細な汚染実態を調査
- 対象食品を拡大し、食品にあわせて分析法を改善

22