

カビ毒の分析法

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	田端, 節子
巻/号	53巻3号
掲載ページ	p. 129-138
発行年月	2012年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



カビ毒の分析法

田端節子*

Analytical Methods for Mycotoxins

Setsuko TABATA

Tokyo metropolitan Institute of Public Health:
3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

Key words: カビ毒 mycotoxin; 分析法 analytical method; 固相抽出 solid extraction; イムノアフィニティーカラム immunoaffinity column; 多機能カラム multifunctional column; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 LC-MS/MS; ガスクロマトグラフィー質量分析法 GC-MS

はじめに

カビが産生する化学物質のうちで、ヒトや動物に対して毒性を有するものはカビ毒と呼ばれている。1961年に英国で100万羽以上の七面鳥が死亡した中毒事件 (Turkey X-disease) の原因物質として、飼料に使用されたピーナツミールから *Aspergillus flavus* によって産生されたアフラトキシン (AF) が発見され、種々の研究の結果、AFが非常に強い急性毒性および発がん性を有することが分かり、食品衛生上の注目を集めた。これを契機にして、ほかのカビ毒についても精力的に研究が行われ、分析法も作成されていった。当初は、試料から抽出後、液-液分配、カラムクロマトグラフィー等によって精製した後、薄層クロマトグラフィー (TLC) で判定するものがほとんどであった。AFのように強い蛍光を有するものは良いが、そのままでは検出困難な物質は、その化学的特性からそれぞれに適した発色試薬を噴霧するなど、さまざまな工夫が行われた。TLC上のスポットの蛍光強度や紫外および可視光の吸収強度を定量的に測定できるデンシトメーターが開発され、定量が可能となった。当時の分析法は原始的に見えるかもしれない。しかし、目的とするカビ毒の構造式から分子量や官能基などの化学的な性質を知り、精製法の原理を熟知し、それぞれのカビ毒に適した抽出法、精製法、検出法を考えられないと分析法は作成できない時代であり、当時の分析法開発は、たいへんな困難を伴うが、発想や創意工夫の醍醐味があったと考えられる。

近年、高感度の液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) が、検出器が汚れにくくなり、メンテナンスも簡単になったため、高価ではあるがルーチン分析用に

普及してきた。それに従い、残留農薬や動物用医薬品などで、抽出後簡単な精製を行い、後は希釈することにより試料成分による影響を少なくして定量するという分析が可能となり、カビ毒の分析も、この流れに乗りつつある。

カビ毒分析法に関する報告は数多く出されているが、信頼性が高く基本的な分析法を調べるには、Analytical Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL の Chapter 49, Natural Toxins¹⁾ が推奨される。そこには、主要なカビ毒の分析法のうち評価済みの分析法が多数収載されており、信頼性の高い分析法として世界的に知られている。また、この本は、分析法の進歩が速いため頻繁に更新されているが、古い分析法も削除されず、そのまま掲載されるか、過去にさかのぼれるようになっているため、たいへん有用である。日本語で書かれた書籍としては、食品衛生検査指針の理化学編²⁾ に日本での公定法を含め、種々のカビ毒の分析法が解説付きで紹介されている。

本稿では、2011年10月1日から新たな規制が施行となったAFを中心に、わが国で規制値が設定されているパツリン、暫定的規制値が設定されているデオキシニバレノールなど、主要なカビ毒について、性質、規制値などをからめて分析法について述べる。

1. 主要なカビ毒の概要

現在、カビ毒の種類は、300種類以上知られているが、食品衛生上重要な主要なカビ毒はその一部である。主要なカビ毒の産生菌、毒性、汚染食品、規制値を表1に示した。

主要なカビ毒については、種々の毒性評価が行われ、FAO/WHOの Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) により、耐容摂取量が示されている。その数値を基に、食品の摂取量などを考慮して毎日摂取しても健康に影響のないレベルを規制値として設定するのが理

* 連絡先 Setsuko_Tabata@member.metro.tokyo.jp
東京都健康安全研究センター：〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

表1. 主要なカビ毒の概要

カビ毒	産生菌	主な毒性	主な汚染食品	世界の主な規制値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
アフラトキシン	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i>	肝臓障害 (強い発がん性)	ナッツ類, 穀類, 香辛料, 豆類など	4~20 (総AF)
パツリン	<i>Penicillium expansum</i>		リンゴ	50
トリコセシ系カビ毒 (DON, NIV, T-2など)	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F. sporotrichioides</i> など	消化器, 免疫系障害	穀類	750~1,000 (DON)
ゼアラレノン	<i>F. graminearum</i> など	女性ホルモン様作用	穀類, 豆類など	200~1,000
フモニシン	<i>F. verticillioides</i> など	肝臓, 腎臓障害	トウモロコシ	1,000
オクラトキシン	<i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. verrucosum</i>	腎臓障害	穀類, コーヒー豆, ブドウ加工品など	5 (OTA)

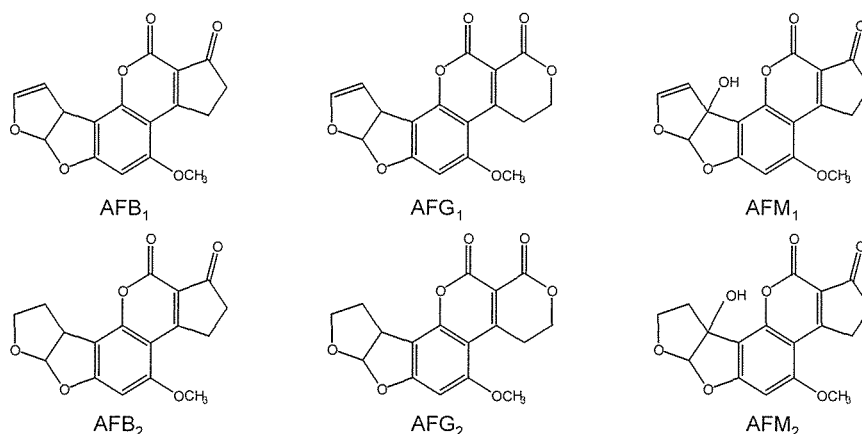
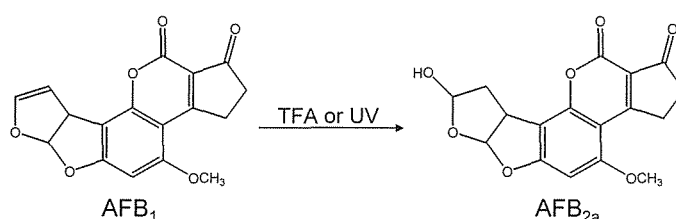


図1. 主要なアフラトキシンの構造式

図2. AFB₁からAFB_{2a}への変換

想である。しかし、AFのように毒性に閾値がなく、無毒性量、許容摂取量が定められない場合は、根拠をもって規制する値を決定することが難しい。

規制値の値はカビ毒の分析法を作成する際、必要な検出感度を決定するために重要である。規制値が正確に測定できることは無論のことであるが、その1/10まで測定できることが望ましいとされている。

2. アフラトキシン

AFは、カビ毒のなかでも毒性が最も強く、ナッツ類、穀類、香辛料などの多くの種類の食品から検出されるため、食品衛生上最も重要なカビ毒である。AFB₁は天然物質中で最も強い発がん性物質の1つであり、WHOの国際

がん研究機関 (IARC) による評価では、AFはグループ1 (ヒトに対して発がん性がある) に分類されている。そのため、低い濃度まで測定できる感度を有し、幅広い食品に適用できる分析法が必要である。

2.1 化学的性質

AFには、10種類以上の同属体が知られているが、食品衛生上重要で世界各国で規制が行われているものはAFB₁、B₂、G₁、G₂およびM₁ (図1) である。AFB₁、G₁およびM₁には、末端のフラン環に二重結合があるが、AFB₂、G₁、およびM₂は単結合であり、この部分の構造の違いが化学反応や毒性などに大きな影響を与えている。

AFは、アセトニトリル、メタノールおよびクロロホルム等の極性および中極性有機溶媒に可溶であるが、ヘキサ

ン等の非極性溶媒には不溶、水には難溶である。ただし、メタノール中では不安定な場合があるため、メタノール溶液で保存しないようにとされている¹⁾。AFは、アルカリ条件下では加水分解によるラクトン環の解裂が起こり、水溶性物質へと変化するが、可逆反応であるため弱酸性に戻すことにより元のAFに戻る。強酸性条件下では、末端のフラン環に二重結合を有するAFB₁、G₁およびM₁には水酸基が付加し、それぞれAFB_{2a}、G_{2a}およびM_{2a}に変換される(図2)。

ほとんどのAFは紫外線照射下で非常に強い青色または緑色の蛍光を発する。

2.2 規制値

AFは、毒性が非常に強いいため、世界中の多くの国で規制が行われており、わが国で2000年以前から規制のあった唯一のカビ毒である。規制対象をAFB₁のみとする国とAFB₁、B₂、G₁およびG₂の総和(総AF)とする国、両者を併用する国がある。2003年現在でAFB₁のみに対する規制値を設定している国は少なくとも61か国あり、ほとんどの国がレベルを2 µg/kgまたは5 µg/kgに設定している。また、総AFに対して規制値を設定している国は少なくとも76か国あり、そのレベルは4 µg/kgが最も多く次いで20 µg/kgである³⁾。わが国では1971年にAFB₁に対して、数値の記載はないが実質上10 µg/kgを上限とする規制が設定された。近年、規制値について厚生労働省等で検討が行われ、国際的に総AFで規制を行っている国が多いことや、汚染調査の結果、AFG₁がAFB₁より高い値で検出される例があったことなどから、全食品に対して総AFで10 µg/kg以下とする規制が2011年10月1日から施行された。それまでのAFB₁単独規制と同じ数値が総AFに設定され、規制は厳しくなった。

総AFの計算方法は、1 µg/kg以上検出された各AFの分析値を小数第2位まで求め、その小数第2位を四捨五入して得られた値を合算し、さらに小数第1位を四捨五入して総AFの値とするとされている。

2.3 サンプリング

今回のAF規制の改定では、サンプリング法も大幅に改定された。一般にカビ毒はカビが生育している部分に産生されるため、汚染は均一ではなく、かなり偏在している。AFは偏在が特に顕著であるため、高濃度汚染ロットの汚染粒の存在率が数%と報告されている。したがって、少量の試料しか採取しない場合、採取する部分によって汚染粒の含有割合が異なり、分析結果は採取部分により大きく変動する。分析法の真度、精度および選択性等がどんなに優れていても、サンプリングが適切でないと、得られた分析値はロット全体の真の値と大きく異なる場合がある。

わが国の公定法におけるサンプリング法は、分析法に先立ち2011年3月31日に食安発0331第5号で厚生労働省から通知された。今回の改訂通知法では、精密度を高めるため、分析に10,000粒を使用することとしている。食品1粒の重さが0.1 gを超えるものについては内容量が4.5 kg

以上の場合、1検体当たりの試料の採取量を5 kgとし、ロットの大きさによりロットから1~3検体分析を行い、そのうちの1検体でも規制値を超える場合は違反となる。違反処理の際に相手国との交渉は容易となると考えられるが、これまでより採取する試料量が格段に多くなり処理が煩雑になった。

2.4 抽出

AFの抽出溶媒には、アセトニトリル-水混液、メタノール-水混液、クロロホルム(水で湿潤後)などが使用される^{1), 2)}。水との混合比率にもよるが、メタノール-水混液は、特に香辛料において抽出率が低い場合がある。

2.5 精製

2.5.1 シリカゲルカラム

AFの精製には、まず、ナッツ類や穀類の精製に適したシリカゲルカラムが使用された¹⁾。1971年にわが国で初めて通知されたAF公定法もシリカゲルカラムを採用していた。10 gのシリカゲルで10 g相当の試料を精製できる。しかし、比較的極性の低いクロロホルムで負荷してもシリカゲルに対するAFの吸着が弱く、十分な洗浄ができないため、香辛料などの夾雑物質の多い試料では測定困難なものが多い。

2.5.2 フロリジルカラム

フロリジルカラムでは、クロロホルムで負荷した場合、AFが強く吸着し、洗浄が十分に行えるため、高い精製効果が得られ、香辛料も分析可能である。0.7 gのフロリジルで試料10 g相当が精製でき²⁾、精製後は一定量のクロロホルムに溶解し冷蔵庫に保存すると1週間以上安定である。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やTLCなどで測定する際、通常試料1 g相当の試験溶液を使用する。1回の精製操作で、誘導体化処理および未処理でのHPLC用試験溶液に、また、各種条件下でのTLC用の塗布液に適用できるなど、最大で9通りの測定を行うことが可能であり、検出された際の確認や、夾雑物質等のため1種類の測定方法では結果が明確でない場合などに便利である。性能は優れているが、塩素系有機溶媒であるクロロホルムを使用するという欠点がある。

2.5.3 イムノアフィニティーカラム

AFB₁を化学修飾して大きな分子にしたものを動物に投与してAFに反応する抗体を作製させ、その抗体をゲルに固定化してカラムに充填したイムノアフィニティーカラム(IAC)が開発され、現在広く使用されている^{4)~6)}。試料抽出液中のAFをカラム中の抗体に抗原-抗体反応により結合させ、水または緩衝液でカラムを洗浄後、有機溶媒を流してタンパク質である抗体を変性させ、AFの結合を解くことにより溶出する。通常の試料抽出液は40%以上の有機溶媒を含むが、IACを使用する際は、負荷時に抗体を変性させないため、負荷前に試料抽出液を水または緩衝液で希釈し、メタノール濃度を20%以下にする必要がある。1本のIACで精製できる量は固体試料の場合、試料1 g相当が普通である。市販されているAF分析用のIACは、通

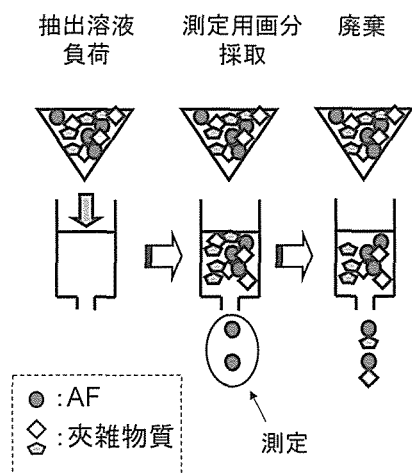


図3. 多機能カラムによる精製

常AFB₁, B₂, G₁, G₂およびM₁のすべてに適用できる。液状食品である牛乳は、IACに最も適した試料である。抽出の必要がなく、加温およびろ過程度の簡単な処理後、カラムに直接負荷することができる。試料を20 g負荷することも可能で、牛乳中の微量のAFM₁を測定する際に適した精製法である⁸⁾。

IACは、最近少し価格を下げたメーカーもあるが、高価である。また、使用有効期間が1年ほどしかないこと、ロットや試料により回収率が変動するなどの短所もある。しかし、IACで精製した試験溶液はHPLCのクロマトグラムに夾雑ピークが非常に少ないという長所がある。そのため、HPLCでの分析が容易であり、暴露量調査のような低レベルのAFを測定するのに適している。

2.5.4 多機能カラム

精製に要する時間が非常に短いカラムとして、逆相やイオン交換樹脂等を混合した多機能カラム (multifunctional column; MFC) が開発された。このMFCは、通常の固相抽出カラムとは異なった使い方をすることが多い。通常の固相抽出では、あらかじめコンディショニングを行ったカラムに一定量の試料抽出液を負荷するが、MFCでは、プレコンディショニングを行わず、乾燥したカラムに試料抽出溶液を通過させ続ける。AFがカラムに保持されないように高濃度のアセトニトリル溶液が使用され、AFは保持されずにカラムを通過する。他方、夾雑物質はいったんカラムに保持された後、少し遅れて溶出されるため、夾雑物質が溶出される前の初流1~2 mLだけを一定量採取し、測定に使用する¹⁾ (図3)。AFの場合は、初流のできるだけ少量を採取すると夾雑物質の影響が少ない。この使用方法では、カラム前後の溶液中のAF濃度は変わらないとして定量計算を行う。

MFCで精製可能な量は、試料0.5~1 g相当であるが、他の精製法と比較して精製に要する時間が圧倒的に短い。価格がIACと同様に高価であること、香辛料等では精製が不十分であることが多いためHPLCのクロマトグラムに夾雑ピークが多いことが短所であるが、IACより有効期間が

長く、回収率が良い試料が多いという長所がある。ナッツ類と穀類では、夾雑ピークが比較的少なく、規制対象がAFB₁のみであったときには、定量下限を1 μg/kgとすれば測定に問題がない試料が多かった。このような特徴から、MFCは、輸入時の検査のように短時間で規制値を超えるAFが含まれているかどうかを検査する際に適している。

2.6 測定

2.6.1 HPLC

AFは、非常に強い蛍光を発するため、蛍光検出器で感度良く検出できる。現在は蛍光検出器付きHPLC (HPLC-FL) での測定が最も広く行われている。AF測定に通常使用される逆相HPLCの溶離溶媒中では、AFB₁およびG₁の蛍光は消光(クエンチング)し、蛍光強度が著しく減弱して測定が困難になる。そのため、強酸であるトリフルオロ酢酸(TFA)でHPLC測定前に処理するか、または、HPLCのカラムと検出器の間にフォトケミカルリアクターを接続し、紫外線を照射することにより、AFB₁およびG₁をそれぞれAFB_{2a}およびG_{2a}に変換して(図2)消光しない強い蛍光を保持させて測定する⁹⁾。

AFB₁とG₁の変換がHPLCの分析カラムの前に行われるか後に行われるかにより溶出順序が異なる。TFAによる誘導体化後HPLCに注入した場合は、AFG_{2a}(G₁)、AFB_{2a}(B₁)、G₂、B₂の順で溶出されるが、カラム分離後の処理では、AFB₁とG₁はそのままの形で分析カラム(C18カラム)により分離されるため、溶出順序はAFG_{2a}(AFG₁)、B₂、AFB_{2a}(AFB₁)となる。

2.6.2 LC-MS/MS

わが国のAF公定法で確認法としてLC-MS/MSが採用されている。選択性が高いため、精製不十分な試験溶液でも、クロマトグラムには妨害ピークがほとんどない場合が多い。しかし、試料成分による影響(マトリックス効果)によりイオン化の抑制や促進が起き、定量値が信頼できない場合もある。例えば、真の回収率は60%であっても、イオン化促進によりピークが大きくなり、見かけの回収率が80%と出る場合もある。したがって、回収率が一見良好に見えても注意を要する。通常の添加回収試験で回収率が良好な場合でも、無添加試料から作製した試験溶液に既知濃度の標準品を添加して測定を行い、正しい値が得られるかを確認する必要がある。正確な定量値を得るため、また機器の保守のためにLC-MS/MSで測定する場合も、試料の精製は必要である。

2.6.3 TLC

LC-MS/MSが使用できない検査機関等では、TLCでAFの確認を行うことができる^{1), 2)}。TLCでは異なった2種類の展開溶媒を使用する2次元展開を行うことにより、HPLCで夾雑ピークと分離できない場合でも、AFと夾雑ピークを分離できる場合が多い。デンストメーターを使用すれば定量も可能である。ただし、IACやフロリジルカラムで精製した試験溶液は測定可能であるが、MFCで精製した試験溶液は、油分が多く、薄層板へのスポットが困難

な試料が多い。AFの場合は、1スポット当たり0.1 ngのAFを確認することができ、HPLC-FLと感度は、ほぼ同等である。

2.6.4 免疫学的手法

マイクロウェルにコートした抗AF抗体を使用するELISAキットがスクリーニング用に市販されている。抗原-抗体反応は特異性が高いが、測定にかかわるその他の部分で食品成分の影響を受けるため、食品によっては擬陽性、擬陰性など、正しい結果が出ない場合もあり、多様な食品に適用することは難しい。しかし、トウモロコシなどに試料を限定すれば、スクリーニング試験として有用である。新たに開発されたイムノクロマトグラフ法¹⁰⁾はELISAより食品成分の影響を受けにくくなっている。厚生労働省から、2011年8月16日付けの食安監発0816第6号の通知により、トウモロコシ中の総AFの陰性を判定する試験法として簡易測定法の使用が認められている。

2.7 公定法

2011年8月16日に厚生労働省から食安監発0816第1号で通知された分析法は、抽出溶媒量などの変更はあるが、以前の通知法とほぼ同様で、精製法にMFCまたはIACを使用し、定量はHPLC-FL、確認はLC-MS/MSで行うこととなっている。HPLC-FLの感度としては0.1 µg/kgまで定量することは十分可能であるが、総AFの算出を1 µg/kg以上のAFとしているのは、公定法であるMFCで精製した場合の夾雑ピークを考慮してのことである。規制対象のAFが、AFB₁のみから総AFとなったため、分析が困難となる試料が増加した。4種類のAFを測定することとなったため、MFC精製後HPLCで測定した場合、夾雑ピークがいずれかのAFの測定を妨害するケースが多くなったためである。

MFCで測定困難な場合はIAC精製を行うこととなっているが、IACの精製では試料により回収率が70%以下となる場合があり、現時点では広範囲の試料に適した条件が確立されていない。良好な回収率を得るために、試料により抽出溶媒や精製法等を検討する必要がある。通知の最後には妥当性評価の方法が示されており、通知法以外の方法も妥当性評価を行い、良好な結果が得られれば使用できるとされている。

現在の公定法で分析が困難な食品については、今後、個々の分析機関で改善された分析法が集約され、信頼できる機関で性能が確認された後、各分析機関で情報が共有できるシステムが構築されると有用であると考えられる。

3. パツリン

パツリンは、主にリンゴおよびその加工品から検出されるカビ毒で、*Penicillium*属および*Aspergillus*属の多くの種類のカビが産生できるが、自然汚染に関与しているのは*P. expansum*であると考えられている。幅広い動物に毒性を示し、JECFAが示している耐容摂取量は、0.4 µg/kg (bw)/dayであるが、毒性の作用機序等は明確になってい

ない。

3.1 化学的性質および規制値

パツリンは、2環構造の低分子量のカビ毒で(図4)、ヘキサン、石油エーテル以外のほとんどの溶媒に可溶である。ラクトン環を有するため、アルカリ性では不安定である。紫外外部吸収(276 nmに極大)がある。

多くの国で、主にリンゴおよびその加工品について規制値が設定されており、その値はほとんどが50 µg/kgである。わが国でのパツリンの規制は、2003年11月26日厚生労働省告示第369号により清涼飲料水の成分規格として定められた。対象はリンゴジュースおよび原料用リンゴ果汁であり、規制値は0.050 ppm (50 µg/kg)である。したがって、分析法は、リンゴジュース等の果実加工品に適用できる必要があり、定量下限値は5 µg/kg程度が望ましい。

3.2 分析法

抽出には酢酸エチルが使用されることが多い。抽出後、液-液分配による炭酸ナトリウム溶液による洗浄¹⁾、または、固相抽出により精製を行い¹¹⁾、測定には紫外吸収検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-UV)¹⁾やGC-MS^{11), 12)}、LC-MS/MS¹³⁾を使用する。

わが国の公定法(告示法)は、リンゴ果汁中のパツリン分析法として世界的に広く使用されているAOAC Official Method 995.10¹⁾に準拠している。液-液分配法で、酢酸エチルで抽出し、炭酸ナトリウム溶液による洗浄後、HPLC-UVで測定する。パツリンはアルカリ条件下で不安定であるため、炭酸ナトリウム溶液による洗浄は手早く行う必要がある。HPLCによる測定の際、パツリンの近傍には5-ヒドロキシメチルフルフラール以外にも夾雑物質のピークが現れる場合があり、それらとパツリンを分離できるカラムを選択する必要がある。本分析法の定量下限は試料当たりで10~20 µg/kgである。UV検出器は選択性が高くないため、パツリンが検出された際には、他の検出器で確認を行うことが望ましく、公定法では、LC-MSまたはGC-MSを確認に使用することとなっている。

4. デオキシニバレノール

デオキシニバレノール(DON)は、トリコテセン系カビ毒と呼ばれるカビ毒の1つである。トリコテセンカビ毒は、*Fusarium*属の数種類のカビによって産生され、DONのほかにニバレノール(NIV)、T-2トキシンなどがあり、麦やトウモロコシなどの穀類からしばしば検出される。JECFAが報告しているDONの一日耐容摂取量(PMT-

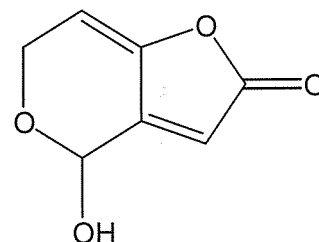


図4. パツリンの構造式

DI) は1 µg/kg (bw)/dayである。

4.1 化学的性質および規制値

トリコテセン系カビ毒は、共通構造として4環構造のトリコテセン骨格を持つが、その構造によりタイプ分けされており、食品衛生上重要なカビ毒は、タイプAとC-8位にカルボニル基があるタイプBに含まれている(図5)。このほかに、DONの2つのアセチル体や、摂取後体内でDONとなる可能性があるとするDON-グルコシドなども分析対象となってきている¹⁴⁾。タイプAのカビ毒は、アセトン、アセトニトリル、クロロホルム、ジエチルエーテル、酢酸エチルに可溶であり、タイプBのカビ毒は、エタノール、メタノール、酢酸エチル、水、クロロホルムに可溶である。

DONに対して多くの国で規制値が設定されている。世界的には750 µg/kgに設定している国が多い³⁾が、わが国では暫定的基準値として1.1 ppmと設定されている。AFやパツリンの規制値と比較すると1~2桁高い値である。したがって、DONに関しては50~100 µg/kg程度を測定できる感度があれば、健康被害を防ぐための分析法としては十分である。しかし、T-2トキシン等は強い毒性を有するため、低濃度まで測定する必要がある。

4.2 分析法

DON, NIVをはじめとして、T-2トキシン、HT-2トキシン等の数種のトリコテセン系カビ毒をアセトニトリル-水混液で抽出し、フロリジルなどで精製後、シリル化してGC-MSで測定する分析法がよく使用されてきた^{1), 2)}。近年、複数のトリコテセン系カビ毒の同時測定は、誘導体化が不要なLC-MS/MSで行われることが多くなった。また、複数のトリコテセン系カビ毒をMFCで精製し、LC-MS/MSで測定する報告も多い¹⁵⁾。

わが国のDONの公定法(2003年7月17日付け食安発

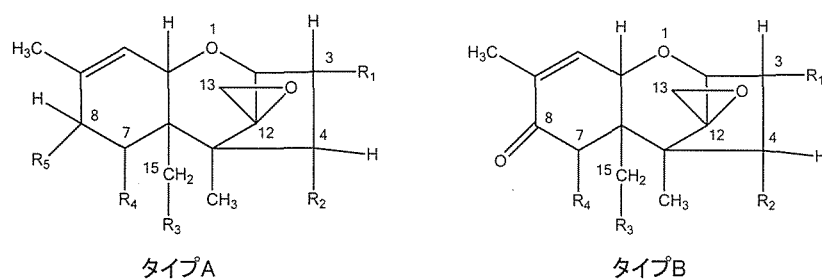
第0717001号)では、試料にアセトニトリル-水(85:15)混液を加えて抽出し、逆相およびイオン交換樹脂に活性炭を加えたAF用とは異なった充填剤が入ったMFCで精製を行う。AFでは試料負荷後の初流を採取するが、DONでは負荷直後はDONの一部がカラムに吸着し回収率が低下するため、始めの一定量を廃棄した後の画分を採取する。最適な画分はカラムによって異なるため、あらかじめ確認しておく必要がある。採取した画分の溶媒を留去した後、HPLCに使用する移動相で溶解してHPLC-UVで測定する。NIVも同時に抽出、精製されるが、MFCから溶出される最適画分はDONと少しずれている。また、HPLCでの測定では測定波長が220 nmとUVのなかでも特に選択性が低い波長であるため、早く溶出されるNIVの付近には夾雑ピークが多く、測定が困難な場合が多い。試料が小麦や小麦粉の場合、DONの溶出位置付近には夾雑ピークは少なく、分析可能な試料が多い。しかし、選択性の低い検出法であるため、DONが検出された際には、LC-MS/MSで確認を行うことが望ましい。

5. ゼアラレノン

致死的な急性毒性は弱い、強い女性ホルモン様作用を有するカビ毒である。動物の体内等で代謝されるが、代謝産物である α -および β -ゼアラレノールと α -および β -ゼアララノール(図6)にも女性ホルモン様作用がある。JECFAは、ゼアラレノンの耐容摂取量を0.2 µg/kg/dayとしている。汚染食品は、おもに穀類であるが、豆類からも検出されることもある。

5.1 化学的性質および規制値

ゼアラレノンは、トリコテセン系カビ毒と同様の*Fusarium*属の菌によって産生されるが、構造は異なり、マクロライド環を構造に有するカビ毒である(図6)。アセ



タイプ	カビ毒	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
A	T-2トキシン	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	HT-2トキシン	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	ジアセトキシシルペノール	OH	OAc	OAc	H	H
	ネオソラニオール	OH	OAc	OAc	H	OH
B	デオキシニバレノール	OH	H	OH	OH	
	ニバレノール	OH	OH	OH	OH	
	フザレノン-X	OH	OAc	OH	OH	

図5. 主なトリコテセン系カビ毒の構造式

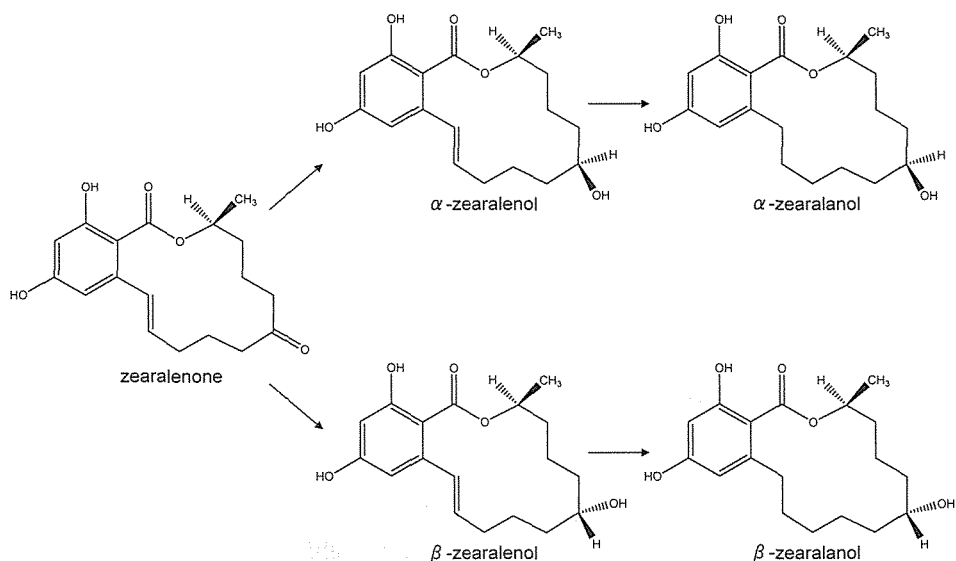


図6. ゼアラレノンとその代謝産物

トン、エタノール、メタノール、ジクロロメタン、アセトニトリルなどに可溶である。256 nmの紫外線照射下で緑青色の蛍光を発する。

わが国では規制値は設定されていないが、フランス、イタリア、ロシアなどの16か国（2003年現在）でトウモロコシ等の穀類に対して規制が行われており、上限値を200または1,000 μg/kgに設定している国が多い³⁾。

5.2 分析法

紫外線照射下で蛍光を発するため、蛍光検出器で検出できる。初期には、試料に水を加えた後、クロロホルムで抽出し、液-液分配で精製後TLCやHPLC-FLで測定された¹⁾。

その後、トリコテセン系カビ毒との同時分析法として、アセトニトリル-水混液などで抽出し、ヘキサンによる脱脂を含む液-液分配やフロリジルカラムなどで精製後シリル化し、GCやGC-MSで測定されるようになった²⁾。

ゼアラレノン分析用にもIACが市販され、分析に使用されている^{16), 17)}。このIACに使用されている抗体は通常ゼアラレノンの4つの代謝産物にも反応するため、ゼアラレノン関係の5種類をHPLCやGC-MS, LC-MS/MSで同時に分析することが可能である。

ゼアラレノンをトリコテセン系カビ毒と同時にアセトニトリル-水混液などで抽出後MFCにより精製し、LC-MS/MSで測定する報告もある¹⁵⁾。

6. フモニシン

主要なカビ毒のほとんどが1970年代までに発見されたのに対し、カビ毒の中では比較的新しく1988年に発見された。Fusarium属のカビによって産生される。数種類の同属体があるが、その中で主なものは、フモニシンB₁, B₂, およびB₃である。JECFAは、1日当たりの暫定許容最大摂取量をフモニシンB₁, B₂, およびB₃の単独あるいは合計で2 μg/kg/dayとしている。IARCはフモニシンB₁の発がん性を、グループ2B（ヒトに対して発がんの可能性があ

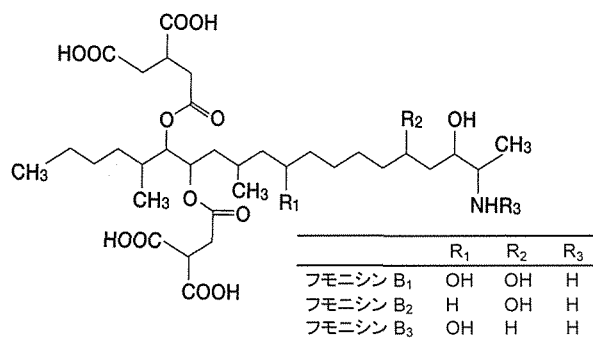


図7. 主要なフモニシンの構造式

る)に分類している。

フモニシンの汚染報告は、ほとんどがトウモロコシに関するものであり、高頻度に検出されている。

6.1 化学的性質および規制値

フモニシンは長い炭化水素鎖とアミノ基およびカルボキシ基を有する構造（図7）で、分子量は700以上とカビ毒の中では大きな分子である。水、アセトニトリル-水混液およびメタノールに易溶である。しかし、メタノール中では不安定であり、モノメチルおよびジメチルエステルが生成する。また、光や食品加工に使われる温度に対しては安定である。

フモニシンについては、数か国でトウモロコシに対して200~3,000 μg/kgの規制値が設定されている。国によって規制の対象は異なっており、フモニシンB₁のみの国、フモニシンB₁とB₂の和の国、さらにB₃も含めた総量に対して規制を行っている国もある³⁾。

6.2 分析法

標準品はメタノール中では不安定であるため、アセトニトリル-水（1:1）混液に溶解し、冷蔵庫中で保管すると安定である。

フモニシンの分析には、AOAC Official Methods of Analysis 995.15¹⁾が世界的に広く用いられており、フモ

ニシン B₁, B₂の同時分析が行われている。粉碎した試料にメタノール-水 (3:1) 混液を加えて抽出し、構造にカルボン酸を有することを利用して陰イオン交換能のある固相抽出法で精製する。そのままではHPLCでの検出が困難であるため、構造にアミノ基があることを利用して、オルトフタルアルデヒド (OPA) 等で蛍光誘導体化し、HPLC-FLで分析する。誘導体化は、HPLC注入前に行う方法と注入後にポストカラムで行う方法がある。前者では、フモニシンのOPA誘導体が極めて不安定であるため、誘導体化試薬を加えた後2分以内にHPLCに注入する必要がある。OPAを加えた後マニュアルでHPLCに注入することになる。HPLCのオートサンプラーにプログラムを設定して自動的に誘導体化および注入を行うと、作業効率が非常によくなる。後者では反応液をポンプで送液し、HPLCの分析カラムで分離した後に反応させる。多数の試料を分析するのに適するが、装置および試薬に費用がかかる。なお、この分析法は、コーングリッツなどの加工度の低いトウモロコシには適用できるが、他の食品やトウモロコシであってもスナックなどの加工品では、回収率が低い場合が多い。

検出された場合の確認法としては、LC-MS/MS以外には有効な方法がない。フモニシンのLC-MS/MS測定においては、機種によっては定量に影響を与えるキャリアオーバーが起きる場合があるので、フロントHPLCのオートサンプラーの機種の選択やニードル洗浄の条件設定に注意を要する。

7. オクラトキシン

腎毒性を有するカビ毒で、数種類ある同属体のうちで代表的なものはオクラトキシン (OT) Aであり、食品からの検出例があるのは、OTAとOTBである。主な産生菌とされていた *A. ochraceus* が、実は、*A. westerdijkiae* または *A. steynii* であったことが近年明らかとなった。発がん性が認められており、IARCではOTAをグループ2B (ヒトに対して発がんの可能性があると分類している。JECFAは、OTAの1週間当たりの暫定許容摂取量を100 ng/kg (bw)/weekとしている。麦類やトウモロコシなどの穀類をはじめ、コーヒー、カカオ、果実 (ブドウなど) と広い範囲の食品から検出される。

7.1 化学的性質および規制値

OTは、フェニルアラニンがイソクマリン骨格に結合した構造であり、カルボン酸を有している。OTAの塩素が水素に置換したものがOTBである (図8)。アセトニトリル、酢酸エチル、クロロホルムなどの有機溶媒および希アルカリ水に可溶である。オクラトキシンは、紫外線照射下で青色または緑色の蛍光を発する。

わが国では規制値は設定されていないが、30か国以上の国で、主に穀類を対象としてOTAの規制値が設定されており、値を5 µg/kgに設定している国が多い³⁾。EUなどでは穀類のほかにコーヒーおよびその加工品、ブドウ加工

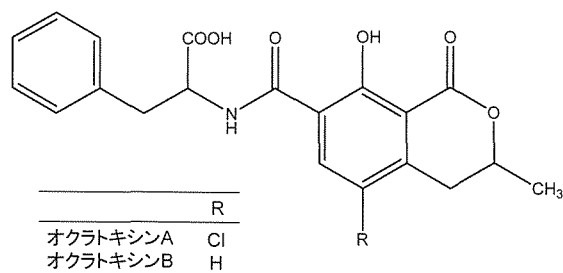


図8. オクラトキシンの構造式

品などに対して、OTAの規制値を2~10 µg/kgに設定している。したがって、分析法の定量下限は0.2~1 µg/kg程度は必要と考えられる。

7.2 分析法

7.2.1 抽出

アセトニトリル-水混液または酸性条件下で酢酸エチル等の有機溶媒で抽出する。乾燥試料の場合、抽出前に試料に水を添加するか、抽出溶媒に10%以上の水を含有させる必要がある。抽出時に水が少ない場合、添加回収試験ではOTAが試料表面に付着しているため良好な回収率が得られるが、実際の自然汚染試料からの抽出は難しい。

7.2.2 精製

構造にカルボキシ基を有することを利用して、pHを変化させた液-液分配¹⁸⁾ または陰イオン交換能を有する固相抽出カラム²⁾ を使用して精製できる。また、OTAの抗体を用いたIACも市販されており、よく使用されている^{7), 19), 20)}。IACの中にはOTAのほかにOTBにも反応して同時に精製することが可能なものもある。また、化学的性質 (イソクマリン骨格とカルボン酸を有し、紫外線照射下で蛍光を発する)、毒性 (腎毒性)、産生菌 (*P. verrucosum*)、汚染食品 (穀類) とOTと共通点の多いカビ毒であるシトリニンとOTA、OTBの3種類のカビ毒を液-液分配で精製する方法もある¹⁸⁾。

7.2.3 測定

OTAは強い蛍光を発するため、測定には、HPLC-FLがよく使用される。HPLC-FLにおけるOTAおよびOTBの感度は良好で、試料あたりで0.1 µg/kgまで定量可能な分析法が多い。LC-MSではHPLCほどの感度が得られないが、LC-MS/MSでは、HPLC-FLと同等の感度で測定することができる。

近年は、IACで精製を行い、HPLC-FLで測定する分析法が広く用いられている。IACで精製した場合、HPLC-FLのクロマトグラム上の夾雑ピークは通常少ない。しかし、試料が焙煎コーヒー豆等の場合は、IACに非特異的吸着した物質が溶出されたものと考えられる夾雑ピークが測定を妨害する場合がある。その場合には、抽出溶媒、IACの洗浄法、HPLC条件等を工夫する必要がある。

8. 多成分一斉分析法

近年、LC-MS/MSの普及に伴い、複数の種類のカビ毒

を一斉に分析する方法が多数報告されている。

多くの報告の中には、抽出液を精製なしにLC-MS/MSに注入する方法もある。この方法は、迅速ではあるが、試料成分の影響によるイオン化の抑制や促進により、正確な定量値が得られない可能性が大きくなる。また、多数の試料を繰り返し注入していると試料中のマトリックスにより分析カラムの劣化やイオン化部等の汚れが進行することが懸念される。

8.1 IACによる方法

複数のカビ毒の抗体を結合させたIACが市販されている。蛍光を発するカビ毒である4種のAFとOTAの抗体を使用し、HPLC-FLで分析する方法が報告されている²¹⁾。このIACは、非常に高価であるが、LC-MS/MSがなくても複数のカビ毒を同時に分析できるという利点がある。

8.2 MFCによる方法

アセトニトリル-水混液などで抽出し、MFCなどで簡単に精製した後LC-MS/MSで測定する報告も多い^{22), 23)}。化学的性質が異なる複数のカビ毒を同じ方法で抽出と精製を行うため、回収率や感度などが各カビ毒の個別分析法より劣る場合が多いが、短時間で多種類のカビ毒をスクリーニングできるという利点がある。今後、さらに検討が進み、回収率等が個別分析法に劣らない多成分一斉分析法が開発されることが期待される。また、多成分のスクリーニング法を使用することにより、原因不明の中毒事件等の発生時に、カビ毒が原因か否かの結果を迅速に得ることが可能と考えられる。

8.3 内部標準物質

回収率が低い場合や変動が大きい場合に、それを改善するために内部標準物質を使用している報告もある²³⁾。目的物質の安定同位体を使用する場合は、内部標準物質と目的物質は同じ挙動をすると考えられるが、少しでも構造が違う物質を内部標準物質として使用する場合には、目的物質と同じ挙動をすることを確認しておく必要がある。多成分一斉分析に限らないが、挙動が違う物質を内部標準物質として補正を行うと見かけの回収率は高くなる場合もあるが、定量結果はさらに信頼性のないものになる。また、絶対回収率として50%以上あることも信頼性のある結果を得るために必要である。市販されているカビ毒の安定同位体の種類が増加してきているが、これらは非常に高価な場合が多いので、日常的に分析に使用するには経済的な負担が大きい。種々の検討を行って、抽出、精製法を改善し、内部標準物質を使用しなくても良好な分析値が得られる分析法が構築されることが期待される。

9. 分析法の評価

9.1 妥当性評価

近年、分析法の信頼性を保証するために、妥当性評価が行われている。国内外の種々の機関からそれぞれの目的に即した評価基準が示されており、分析法を客観的に評価する上で拠所となる。しかし、注意すべき点がある。妥当性

評価では、真度、精度が数値として表され、その数値が良いほうが優れた分析法だと評価されがちであるが、そうではない場合もある。操作工程が少ない分析法は、誤差が出る箇所が少ないため精度が良い結果となることが多く、夾雑物質を除くために作業工程を増やすことは、ばらつきを大きくし回収率を低下させる、すなわち精度と真度を低下させる要因となる。この結果、選択性が劣っていても操作工程の少ない分析法のほうが、選択性を向上させるために工程を増やした試験法より良い真度と精度を得る可能性が高い。選択性も妥当性評価の重要な因子とされており、測定を妨害するピークの面積値（または高さ）が定量下限値の1/10または1/3未満であれば良いとされているが、試料が異なるとそれ以上となる場合もある。したがって、総合的に評価して、使用する分析法を選択する必要があると考える。

9.2 外部評価

検査機関の検査技能を検証するための手段として外部評価が行われている。カビ毒については、国内では正式には実施されていないが、英国のFood Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS)では、AF、パツリン、OTAなどの外部精度管理を実施している。外部精度管理においては、分析法は各検査機関で行っているものを使用することになっており、Zスコアなどで評価されている。全参加機関が同じ分析法で分析している場合は、正しい評価が行えるが、分析法が異なる場合には、Zスコアだけでは評価できない場合もあると考えられる。Zスコアの基準となる真値の推定値は、多数の検査機関が行っている分析法での平均値に近いものとなるが、それが真値だとは限らない。他の機関より回収率が高い分析法で行った場合は測定値が平均値より高い値に外れる可能性がある。一方、選択性に優れた分析法は、ほかの分析法では測定対象物質と分離できずに測定値に加算されている夾雑物質が除かれた結果、低い値に外れる可能性がある。したがって、Zスコアによる評価では、より良い分析法を開発した結果、全体の平均値から外れ、高いZスコアになってしまう場合が考えられる。回収率で補正する対策も考えられているが、このような場合には、Zスコアだけで評価することは困難であり、なぜ外れているかまで検証しないと正当な評価は難しいと考えられる。

おわりに

どんなに優れた分析法であっても、1つの測定結果だけで結果を判断するのは危険である。また、カビ毒は毒性が強いため、規制値以下でも検出されると影響が大きい場合がある。したがって、カビ毒が検出された場合には、定量で使用したものと分離または検出のモードが異なる方法で確認することが望ましいと考える。

カビ毒に限らないが、完全な分析法というものはなく、機器や精製法などの進歩に従って、新たな方法が次々に開発されていく。分析法開発の際には、目的物質の性質によ

り抽出および精製法を選択し、毒性に基づく規制値や分析の目的により必要な検出感度を決定し、汚染のある食品を知って添加回収試験を行う食品を選ぶことが基本である。また、分析法を選択する際には、目的により、必要な感度、選択性、所要時間、経費等を考慮する必要がある。今後、食品衛生上重要なカビ毒に対して正確な結果が迅速に得られるように、分析法がさらに進歩していくことが期待される。

文 献

- 1) Trucksess, M. W. ed. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 18th Edition, Revision 4, Chapter 49, Gaithersburg, MD United States of America, AOAC INTERNATIONAL, 2011. (ISBN 0-935584-82-X).
- 2) 食品衛生検査指針 理化学編 2005, 東京, 日本食品衛生協会, 2005, p. 547-621 (ISBN 9784889250039)
- 3) FAO. "Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003", FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 81, Rome Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. (ISSN 0254-4725)
- 4) Lupo, A., Quain, A., Fitzsimmons, A., Allan, A. Validation study of immunoaffinity column chromatography coupled with solution fluorometry or HPLC for the detection of aflatoxin in peanuts and corn. *J. AOAC Int.*, **94**, 572-588 (2011)
- 5) Brera, C., Debegnach, F., Minardi, V., Pannunzi, E., De Santis, B., Miraglia, M. J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin B₁ in corn samples: interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **90**, 765-772 (2007).
- 6) Mably, M., Mankotia, M., Cavlovic, P., Tam, J., Wong, L., Pantazopoulos, P., Calway, P., Scott, P. M. Survey of aflatoxins in beer sold in Canada. *Food Addit. Contam.*, **22**, 1252-1257 (2005).
- 7) Sugita-Konishi, Y., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S., Kumagai, S. Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan. *J. Food Prot.*, **69**, 1365-1370 (2006).
- 8) Nakajima, M., Tabata, S., Akiyama, H., Itoh, Y., Tanaka, T., Sunagawa, H., Tyonan, T., Yoshizawa, T., Kumagai, S. Occurrence of aflatoxin M₁ in domestic milk in Japan during the winter season. *Food Addit. Contam.*, **21**, 472-478 (2004).
- 9) Walkling, A. E., Wilson, D. Liquid chromatographic analysis of aflatoxin using post-column photochemical derivatization: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **89**, 678-692 (2006).
- 10) Anfossi, L., D'Arco, G., Calderara, M., Baggiani, C., Giovannoli, C., Giraudi, G. Development of a quantitative lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxins in maize. *Food Addit. Contam. Part A*, **28**, 226-234 (2011).
- 11) Tabata, S., Iida, K., Suzuki, J., Kimura, K., Ibe, A., Saito, K. Quantification and Confirmation Method of Patulin in Apple Juice by GC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **45**, 245-249 (2004).
- 12) Marks, H. S. Rapid gas chromatography/mass spectrometry determination and confirmation of patulin in apple juice. *J. AOAC Int.*, **90**, 879-883 (2007).
- 13) Desmarchelier, A., Mujahid, C., Racault, L., Perring, L., Lancova, K. Analysis of patulin in pear- and apple-based foodstuffs by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 7659-7665 (2011).
- 14) Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., Krska, R. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3421-3425 (2005).
- 15) Biselli, S., Hummert, C. Development of a multicomponent method for *Fusarium* toxins using LC-MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. *Food Addit. Contam.*, **22**, 752-760 (2005).
- 16) Campbell, H. M., Armstrong, J. F. Determination of zearalenone in cereal grains, animal feed, and feed ingredients using immunoaffinity column chromatography and liquid chromatography: interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **90**, 1610-1622 (2007).
- 17) Arranz, I., Mischke, C., Stroka, J., Sizoo, E., van Egmond, H., Neugebauer, M. Liquid chromatographic method for the quantification of zearalenone in baby food and animal feed: interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **90**, 1598-1609 (2007).
- 18) Tabata, S., Iida, K., Kimura, K., Iwasaki, Y., Nakazato, M., Kamata, K., Hirokado, M. Simultaneous Determination of Ochratoxin A, B and Citrinin in Foods by HPLC-FL and LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **49**, 100-105 (2008).
- 19) Turcotte, A. M., Scott, P. M. Ochratoxin A in cocoa and chocolate sampled in Canada. *Food Addit. Contam. Part A*, **28**, 762-766 (2011).
- 20) Czerwiecki, L., Wilczyńska, G., Kwiecień, A. Ochratoxin A: an improvement clean-up and HPLC method used to investigate wine and grape juice on the Polish market. *Food Addit. Contam.*, **22**, 158-162 (2005).
- 21) Rahmani, A., Jinap, S., Soleimany, F. Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in cereals using HPLC-FLD. *Food Addit. Contam. Part A*, **27**, 1683-1693 (2010).
- 22) Tamura, M., Uyama, A., Mochizuki, N. Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Sci.*, **27**, 629-635 (2011).
- 23) Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H., Wang, Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1143**, 48-64 (2007).