

## 大麦加工品におけるフザリウムトキシンの汚染実態調査

酒井康行

Investigation of Fusarium toxin in Barley products

Yasuyuki SAKAI

## 1. はじめに

フザリウムトキシンは、フザリウム属のかびが産生するかび毒の総称である。ヒトや動物が摂取すると下痢、嘔吐等の消化器症状や免疫抑制等が引き起こされる<sup>1,2)</sup>。主な汚染食品は穀類であり、小麦については2002年に食品衛生法によりフザリウムトキシンの一種であるデオキシニバレノールに対して暫定的な規制値(小麦 1.1ppm)が設定された<sup>3)</sup>。一方、大麦については、これまでに同法による規制値は設定されていないが、2015年には国際規格であるコーデックス規格に追加され、また、実態調査でも比較的高濃度の汚染が確認されるなどリスク管理が必要な食品の一つとされている<sup>4,5)</sup>。

そこで、今回は大麦加工品におけるフザリウムトキシンの汚染実態を調査したので、その結果を報告する。なお、調査試料は県内流通品とし、大麦の生産地、加工所等は県内外問わず広く対象とした。

## 2. 実験方法

## 2.1 対象化合物

ニバレノール、デオキシニバレノール、フザレノン-X、15-アセチルデオキシニバレノール、3-アセチルデオキシニバレノール、ジアセトキシスシルペノール、HT-2 トキシン、T-2 トキシン、ゼアラレノン(以下、それぞれ「NIV」、「DON」、「FUX」、「15-AcDON」、「3-AcDON」、「DAS」、「HT-2」、「T-2」および「ZEN」という。)

## 2.2 試薬等

かび毒標準品：富士フィルム和光純薬(株)製またはMerck社製の標準物質を使用した。

かび毒混合標準液：各かび毒標準品を1.0mgずつ量り取り、アセトニトリルで正確に10mLとして100 $\mu$ g/mL単体標準液を調製した。次に、この単体標準液を1mLずつ正確に量り取り、アセトニトリルで正確に10mLとして10 $\mu$ g/mL混合標準液を調製し、使用した。

内部標準品：ベルカロール、ゼアララノン(以下、それぞれ「VEL」、「ZAN」という。)は富士フィルム和光純薬(株)製の内部標準物質を使用した。

混合内部標準液：各内部標準品を5.0mgずつ量り取り、アセトニトリルで正確に50mLとして、100 $\mu$ g/mL単体内部標準液を調製した。次に、この単体内部標準液を1mLずつ正確に量り取り、アセトニトリルで正確に10mLとして10 $\mu$ g/mL混合内部標準液を調製した。ただし、はったい粉には、100 $\mu$ g/mL VEL標準液を1mLから5mLに増量した混合内部標準液(VEL: 50 $\mu$ g/mL、ZAN: 10 $\mu$ g/mL)を調製し、使用した。

検量線用標準液：10 $\mu$ g/mL混合標準液をアセトニトリル:水(10:90)混液で適宜希釈し、0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 $\mu$ g/mLとし、さらに混合内部標準液

を0.2 $\mu$ g/mLとなるよう添加(ただし、はったい粉におけるVELは1 $\mu$ g/mL)したものを検量線用標準液とした。

使用溶媒等：アセトニトリル、メタノール、超純水、酢酸および酢酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬(株)製または関東化学(株)製の液体クロマトグラフ用、LC/MS用または残留農薬分析用を使用した。

## 2.3 機材等

多機能カラム: MultiSep226 (Romer)、ろ紙: 5A、150mm (アドバンテック東洋(株))、窒素吹き付け濃縮装置: Reacti-Vap Model 18780 (PIERCE)、フィルター: Millex LG、0.20 $\mu$ m、親水性 PTFE、4mm (Merck) を用いた。

## 2.4 装置および測定条件

装置：液体クロマトグラフ質量分析計 Prominence 20A/3200Q TRAP (株島津製作所/AB Sciex)、カラム: CAPCELL CORE ADME 粒子径 2.7 $\mu$ m、2.1mm i.d.×150mm (株大阪ソーダ)、移動相: A 液 5mM 酢酸アンモニウム水溶液、B 液 5mM 酢酸アンモニウム含有メタノール、グラジエント条件: B 液 10%(0min)→90%(15min)→90%(20min)、流速: 0.2mL/min、カラム温度: 40°C、注入量: 5 $\mu$ L、MRM 条件: 表1のとおり。

上記条件で、検量線用標準液および検液を LC-MS/MS に注入し、得られた対象化合物のピーク面積から NIV および DON を定量した(絶対検量線法)。また、同様に操作して得られた内部標準物質のピーク面積に対する対象化合物のピーク面積比により、NIV および DON を除く対象化合物を定量した(内部標準法)。なお、FUX、15-AcDON、3-AcDON、DAS、HT-2、T-2 には VEL を、ZEN には ZAN を割り当てた。

最終検液における定量限界は、NIV、DON、FUX、15-AcDON、3-AcDON は 0.01  $\mu$ g/mL、その他の化合物は 0.001 $\mu$ g/mL とした。

表1 各化合物のMRMトランジション

化合物名	ESI Negative (-)	
	NIV	DON
定量値	355>295	371>281
確認値	355>265	371>311

化合物名	ESI Positive (+)				
	FUX	15-AcDON	3-AcDON	DAS	HT-2
定量値	372>355	356>321	339>231	384>307	442>263
確認値	372>247	356>137	339>203	384>229	442>215

化合物名	ESI Positive (+)			
	T-2	VEL	ZEN	ZAN
定量値	484>305	284>267	319>187	321>303
確認値	484>185	284>249	319>283	321>189

## 2.5 試験法

既報に準じて、図1に従い操作した<sup>6)</sup>。ただし、麦みそについては、図2も併せて操作した。

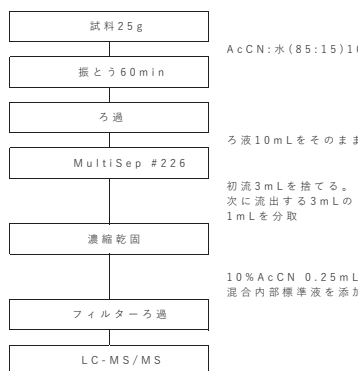


図1 前処理法 (全般)

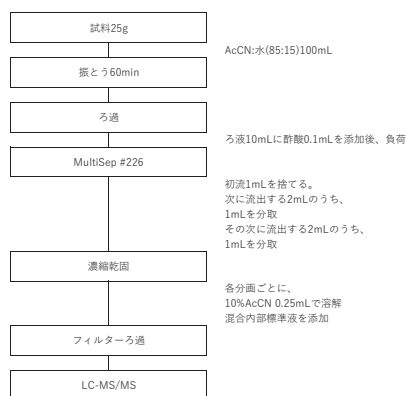


図2 前処理法 (麦みそ)

## 2.6 試験法の性能評価

平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 115001 号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」に準じて、検査者 1 名が添加試料を 1 日 2 併行、5 日間繰り返し測定した。添加試料は、予め対象化合物に汚染されていないことを確認した試料 (炊飯用大麦、麦茶 (煎り麦)、麦みそ、はったい粉) に試料中濃度 0.1 µg/mL または 0.01 µg/mL となるよう混合標準液を添加した試料を用いた。麦茶 (煎り麦) については、製品に記載されていたレシピに従って煮出したものを試料とした。得られた測定値から各パラメータを算出し、同ガイドラインにおける目標値: 添加濃度 100 µg/mL における真度 70-120%、併行精度 15% 未満、室内精度 20% 未満、添加濃度 10 µg/mL における真度 70-120%、併行精度 25% 未満、室内精度 35% 未満と比較した。

## 2.7 汚染実態調査

平成 31 年 1 月に県内の小売店 (スーパーマーケット、農産物直売所等) から試買した大麦加工品 39 品を対象とした。内訳は、麦ごはん 1 品、炊飯用大麦 (押麦、丸麦、もち麦等) 8 品、炊飯用雑穀 3 品、麦茶 (煎り麦) 5 品、麦茶 (容器入り飲料) 7 品、麦みそ 5 品、はったい粉 4 品、めん類 3 品、菓子 2 品、酒類 1 品とした。麦茶 (煎り麦) は製品に記載されたレシピに従って煮出したものを試料とした。

## 3. 結果および考察

### 3.1 試験法の性能評価

結果は表 2 のとおり。併行精度および室内精度については、全ての試料で目標を達成することができたが、真度については、麦茶 (煎り麦) で 84-152%、麦みそで 49-191%、はったい粉で 65-158% となった。特に、麦みそについては、その他の試料に比べて著しく結果が悪く、さらに主要汚染物質である NIV、DON の真度も不良となったため、多機

表 2 妥当性の確認 (高濃度、低濃度)

高濃度 (100 µg/mL)	NIV	DON	FUX	15-AcDON	3-AcDON	DAS	HT-2	T-2	ZEN
炊飯用大麦	真度 89	96	91	106	106	114	88	70	107
	併行精度 (%) 1.5	1.7	6.4	5.0	6.9	8.4	5.7	7.5	5.1
	室内精度 (%) 6.1	4.2	7.5	5.2	7.1	9.1	6.6	8.0	5.2
麦茶 (煎り麦)	真度 101	101	94	108	110	152	109	95	121
	併行精度 (%) 1.7	1.5	3.7	3.3	3.5	4.9	5.6	3.9	2.2
	室内精度 (%) 4.5	3.1	8.7	7.6	7.1	9.9	5.6	10.3	9.4
麦みそ	真度 49	97	124	141	120	191	111	89	126
	併行精度 (%) 4.3	3.6	4.2	3.2	3.8	5.0	4.7	3.1	3.7
	室内精度 (%) 15.9	7.5	4.5	4.9	5.3	9.4	6.5	13.2	10.5
はったい粉	真度 72	86	74	74	78	91	98	85	130
	併行精度 (%) 4.0	7.7	9.6	11.4	10.1	10.8	10.3	10.7	1.3
	室内精度 (%) 6.7	8.1	10.7	12.5	10.4	12.4	13.6	11.5	10.7
低濃度 (10 µg/mL)	NIV	DON	FUX	15-AcDON	3-AcDON	DAS	HT-2	T-2	ZEN
炊飯用大麦	真度 98	103	95	105	108	111	92	73	105
	併行精度 (%) 6.6	7.0	6.6	4.3	4.5	5.3	5.4	9.3	3.2
	室内精度 (%) 7.4	8.9	8.4	9.0	8.9	6.3	7.2	10.7	5.0
麦茶 (煎り麦)	真度 103	107	89	94	103	136	106	84	115
	併行精度 (%) 8.3	9.9	9.1	11.1	8.4	8.9	10.5	9.3	7.5
	室内精度 (%) 9.5	10.5	13.2	12.5	12.8	14.8	13.1	16.1	10.8
麦みそ	真度 67	122	113	120	112	150	105	80	116
	併行精度 (%) 5.2	8.5	3.7	3.0	5.5	3.4	2.9	4.2	13.4
	室内精度 (%) 11.9	8.9	6.5	4.7	5.9	5.4	4.4	14.3	14.3
はったい粉	真度 82	106	68	65	75	76	89	74	158
	併行精度 (%) 14.0	5.2	4.6	8.1	6.7	8.1	7.2	6.4	3.4
	室内精度 (%) 15.4	12.0	6.1	10.1	11.4	11.6	9.3	8.5	24.2

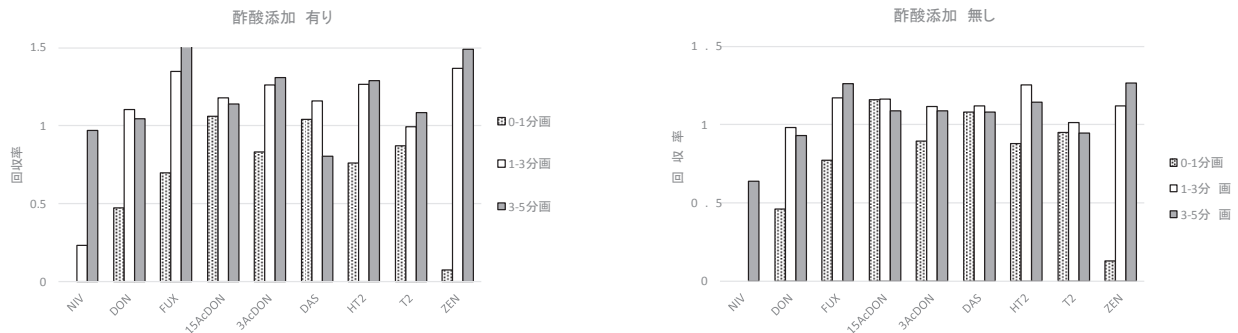


図3 麦みそ抽出液における酢酸添加と分画域

表3 妥当性の再確認（麦みそ）

麦みそ	試験法	(10 $\mu$ g/mL)	NIV	DON	FUX	15-AcDON	3-AcDON	DAS	HT-2	T-2	ZEA
高濃度 (100 $\mu$ g/mL)	変更前	真度	49	97	124	141	120	191	111	89	126
		併行精度 (%)	4.3	3.6	4.2	3.2	3.8	5.0	4.7	3.1	3.7
		室内精度 (%)	15.9	7.5	4.5	4.9	5.3	9.4	6.5	13.2	10.5
	変更後	真度	93	102	122	107	109	108	120	90	144
		併行精度 (%)	8.0	6.6	5.5	7.1	5.4	5.3	6.2	5.6	11.0
		室内精度 (%)	8.2	6.9	5.8	7.6	6.3	7.1	7.3	12.1	12.4
低濃度 (10 $\mu$ g/mL)	変更前	真度	67	122	113	120	112	150	105	80	116
		併行精度 (%)	5.2	8.5	3.7	3.0	5.5	3.4	2.9	4.2	13.4
		室内精度 (%)	11.9	8.9	6.5	4.7	5.9	5.4	4.4	14.3	14.3
	変更後	真度	104	89	117	101	99	125	96	86	102
		併行精度 (%)	9.2	8.2	5.5	5.5	5.3	4.9	7.4	3.6	15.3
		室内精度 (%)	9.9	14.1	6.2	5.5	5.6	7.0	8.9	14.5	17.0

能カラムに負荷する抽出液における酢酸の添加の有無、多機能カラム流出液の分画域について再度、検討した。その結果、麦みそは他の試料と比べて流出が遅く、NIVを定量的に流出させるためには、酢酸を添加し、さらに初流から3mL以降を分取する必要があることがわかった(図3)。一方で、NIV以外の化合物では、第1分画(初流0mLから初流1mLまで)の回収率は低いが、それ以降に分取した第2分画(初流1mLから初流3mLまで)、第3分画(初流3mLから初流5mLまで)では、ほぼ同等の回収率が得られたが、分画域が遅くなるにつれて検液に試料由来と思われる着色が強くなった。そこで、NIVについては第3分画を採取し、それ以外の化合物については第2分画を採取するよう変更した(図2)。変更後、添加試料を繰り返し測定した結果を表3に示す。変更前と同様、併行精度および室内精度についてはいずれも目標値を満たした。真度については、変更前に比べてかなり改善されたが、目標値を超える化合物もあった。

以上の結果について、ガイドラインで定める目標値を僅かに超えたが、試験法の精度は良好であり、真度も一定の

範囲(65%~158%)に収まったことから、実態調査に供する試験法としては十分に満足すべき性能であると判断し、実態調査に移った。

### 3.2 汚染実態調査

試買した試料を図1または図2に従って操作した結果を表4に示す。炊飯用大麦については、NIVが4検体から0.01-0.03ppm、DONが1検体から0.04ppm検出され、うち1検体はNIVとDONの複合汚染が確認された。はったい粉は、NIVが3検体から0.11-0.18ppm、DONが3検体から0.03-0.04ppm、FUXが2検体から0.02ppm検出され、うち2検体はNIV、DONおよびFUXの複合汚染、うち1検体はNIVとDONの複合汚染であった。この他、麦みそからDONが0.03ppm、菓子類からZENが0.005ppm、酒類からDONが0.02ppm検出された。NIVが検出された試料には、いずれも国内産大麦を使用しているとの表示がなされていた。NIV汚染が報告されている国は非常に少なく、わが国はその一つとされている<sup>7)</sup>。また、はったい粉については、今回調査した試料の中では比較的

表4 試買試料の測定結果

品名	試料数	測定結果 (ppm)								左記 以外
		NIV		DON		FUX		ZEN		
		検出数	濃度	検出数	濃度	検出数	濃度	検出数	濃度	
麦ごはん	1	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND	全てND
炊飯用大麦	8	4	0.01-0.03	1	0.04	0	ND	0	ND	全てND
炊飯用雑穀	3	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND	全てND
麦茶(煎り麦)	5	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND	全てND
麦茶(容器入り飲料)	7	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND	全てND
麦みそ	5	0	ND	1	0.03	0	ND	0	ND	全てND
はったい粉	4	3	0.11-0.18	3	0.03-0.04	2	0.02	0	ND	全てND
めん類	3	0	ND	1	0.01	0	ND	0	ND	全てND
菓子類	2	0	ND	0	ND	0	ND	1	0.005	全てND
酒類	1	0	ND	1	0.02	0	ND	0	ND	全てND

表 5 試買試料の実測値と推測値の比較

品名	化合物名	実測値 (ppm)	A: 原麦濃度の 平均値 (ppm)	B: 換算係数	A×B: 推測値 (ppm)
炊飯用大麦	DON	0.04	0.096	1	0.096
炊飯用大麦	NIV	0.01-0.03	0.073	1	0.073
麦みそ	DON	0.03	0.096	0.15	0.014
はったい粉	DON	0.03-0.04	0.096	1.1	0.106
はったい粉	NIV	0.11-0.18	0.073	1.1	0.080
はったい粉	FUX	0.02	0.0023	1.1	0.003
めん類	DON	0.01	0.096	0.87	0.009
菓子類	ZEN	0.005	0.0033	なし	-
酒類	DON	0.02	0.096	なし	-

※原麦濃度の平均値には、有害化学物質含有実態調査における H14~H27 の平均値 (LB: lower bound) の値を使用

汚染濃度が高かった。その理由の一つとして、外皮を剥かずに加工されることが考えられた。麦茶についても、同様に加工されるが、麦茶は通常、水やお湯で煎じて飲用されるため、今回の調査では麦茶（煎り麦）を製品レシピに応じて 10g から 25g まで量り採って、1L の精製水に漬けたものを試料としており、対象化合物の濃度が低くなったことで検出できなかったものと推測される。

次に、先行調査と値の比較を行った。麦みそ、めん類および酒類における DON については、農林水産省において過去に調査が行われており、ほぼ同等の結果であった。その他の試料については、筆者が調べた限りデータを見出すことができなかった。そこで、大麦原麦の濃度に換算係数を乗じて算出される推測値と比較したところ、いくつかを除いて同等の値となることがわかった<sup>8)</sup>。推測値の算出には、大麦原麦の過去平均濃度を用いたが、原料とした大麦原麦を直接測定することができれば、さらに精度が高まるものと考えられた。

### 3. 3 健康影響評価

試料の測定値、摂取量および最大一日耐容摂取量から各々の化合物における健康影響を評価した。

今回の調査で最も濃度の高かった、はったい粉中の NIV (0.18ppm) では、NIV の暫定最大一日耐容摂取量が 0.4  $\mu$ g/kg 体重/日 (食品安全委員会) であることから、体重 50kg のヒトの許容量は 20 $\mu$ g/日となり、測定値 0.18ppm で除した約 111g/日が当該試料の許容量となる。この値は、平成 29 年国民健康・栄養調査 (その他の穀類 2.7g/日) または実際のレシピ (約 20g を水に溶かしてジュースとして飲む) から推測される摂取量に比べて十分に大きいことから、通常の食生活をおくる限り、はったい粉中の NIV が健康影響を及ぼす主たる要因となることはないと考えられた<sup>9)</sup>。その他の試料についても、同様な結果が得られた。

ただし、ここでのシミュレーションは、単一試料における単一化合物の評価結果に過ぎず、実際には、試算した試料以外の食品による暴露量を加算することはもちろん、かび毒同士の複合影響や調理過程における減衰等様々なファクターを勘案する必要がある。それらの結果に関しては厚生労働省や農林水産省等で試算したデータがあるため、そちらを参照いただきたい<sup>8,10,11)</sup>。

## 4. まとめ

残留農薬等の妥当性評価ガイドラインに準じて、大麦加工品におけるフザリウムトキシン一斉分析法の性能評価を実施したところ、真度は 65%~158%、併行精度は 1.5%~14.0%、室内精度は 3.1%~16.1%となり、ガイドライン

で定める目標値を僅かに超えたが、実態調査に供する試験法としては十分な性能であることを確認した。

大麦加工品 39 品を調査したところ、NIV は 7 検体から 0.01ppm-0.18ppm、DON は 7 検体から 0.01ppm-0.04ppm、FUX は 2 検体から 0.02ppm、ZEN は 1 検体から 0.005ppm 検出し、NIV、DON および FUX の複合汚染が確認された。これらの測定値、摂取量を基に試算したところ、最大耐容一日摂取量に比べて十分に小さく、大麦加工品が健康影響を及ぼす主たる要因となる可能性は低いと考えられた。

## 参考文献

- 1) 小西良子 他：食品衛生検査指針理化学編 2015 第 6 章 5.マイコトキシン,562-647,公益社団法人日本食品衛生協会,東京(2015)
- 2) 永山敏廣 他：衛生試験法・注解 2015 2.2 天然有毒物質試験法,287-305,金原出版株式会社,東京(2015)
- 3) 平成 14 年 5 月 21 日付け食発第 0521001 号 厚生労働省医薬局食品保健部長通知「小麦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 15 年 7 月 17 日一部改正)
- 4) Codex General Standard For Contaminants and Toxins in Food and Feed, CODEX STAN 193(2005)
- 5) 有害化学物質含有実態調査結果データ集,平成 27-28 年度,農林水産省(2018)
- 6) 酒井康行 他：福井県衛生環境研究センター年報,15,72-77(2016)
- 7) Pronk, M. E. J. et al.: Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3-and 15-acetyldeoxynivalenol; a review of six trichothecenes.(2002)
- 8) <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/170607.html>(2019.8.6 閲覧)
- 9) 平成 29 年国民健康・栄養調査,第 5 表の 1,穀類,その他の穀類・加工品,その他の穀類,厚生労働省(2017)
- 10) 佐藤敏彦：厚生労働科学研究費補助金厚生労働特別研究事業 平成 17 年度研究報告書 (主任研究者 小西良子)「モンテカルロ法による日本人の小麦摂取によるデオキシニバレノール (DON) 暴露量の推定」,189-197(2006)
- 11) 食品中の汚染物質等の一日摂取量調査,平成 17 年度食品等試験検査,厚生労働省(2006)