

(様式 1-2)

調査研究 中間報告書

令和 5 年 6 月 8 日作成

研究者 (所属・氏名) : 保健衛生部 野田拓史

研究課題名 (継 続)	福井県産の米におけるマイコトキシン一斉分析法の確立および 汚染実態調査	コードNo. II B-2
共同研究者 (担当分野)	平井知里 (調整全般)	
研究期間	令和 4 年度から 6 年度まで (3 年間) (本報告対象期間 : 4 年度まで)	
研究目的 および 必要性	<p>マイコトキシンとはかびが産生する二次代謝物のうち、ヒトや動物に健康被害をもたらす有害な化学物質のことである。マイコトキシンは食品加工程度の加熱や環境の変化などでは分解されず、除去は困難であることから食品中に含まれ問題となる。</p> <p>福井県は「こしひかり」や「いちほまれ」の発祥の地であり、ブランド米の開発や生産などに力を入れているが、マイコトキシンの多くは米や麦などの穀類を汚染すると言われており、本県で生産される米にも同様の汚染が懸念される場所である。</p> <p>そこで本研究では、アフラトキシンなどの米を汚染する可能性のあるマイコトキシンについて、県内産の米の実態調査を実施し、汚染状況を明らかにすることを目的とする。得られた科学的データが有効活用されることにより、農林水産省が作成した「米のカビ汚染防止のための管理ガイドライン」に基づいた管理・指導がなされ、食品の安全・安心の確保やブランド力の向上に寄与できると期待される。</p>	
進捗状況	マイコトキシン一斉分析法を検討した。	
研究内容 および これまでの 成果	<p>①測定対象 アフラトキシン B1 (AFB1)、アフラトキシン B2 (AFB2)、アフラトキシン G1 (AFG1)、アフラトキシン G2 (AFG2)、オクラトキシン A (OTA)、オクラトキシン B (OTB)、ステリグマトシスチン (STC)、シトリニン、デオキシニバレノール (DON)、ニバレノール (NIV)、T-2 トキシン (T-2)、HT-2 トキシン (HT-2)、ジアセトキシシルペノール (DAS)、ゼアラレノン (ZEN)</p> <p>②LC/MS/MS の MS 条件の検討 インフュージョン測定により MRM トランジションを決定し、全ての化合物を正しく検出できることを確認した。</p> <p>③LC/MS/MS の HPLC 条件の検討 分析カラム、移動相、グラジエント条件を最適化した。決定した測定条件は下記のとおり。</p>	

装置 LC-MS/MS	Prominence 20A/3200Q TRAP (島津製作所/Sciex)
分析カラム	TSKgel ODS 100V(東ソー) 粒子径 5 μ m、2.0mm i.d.×150mm
移動相	A 液 5mM 酢酸アモニウム水溶液 B 液 5mM 酢酸アモニウム含有メタノール
グラジエント条件	B 液 10%(0min)→90%(10min) →90%(15min)
流速	0.2mL/min
カラム温度	40℃
注入量	10 μ L
MRM 条件	右表のとおり

MRM 条件

	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	OTB
イオン化	ESI(+)	同左	同左	同左	同左
定量イオン	313>285	315>287	329>243	331>313	370>205
確認イオン	313>241	315>259	329>200	331>115	370>103

	HT-2	T-2	DAS	ZEN	STC
イオン化	ESI(+)	同左	同左	同左	同左
定量イオン	442>263	484>305	385>308	319>283	325>281
確認イオン	442>215	484>185	385>230	319>187	325>310

	シトリン	DON	NIV	OTA
イオン化	ESI(-)	同左	同左	同左
定量イオン	249>205	295>265	371>281	402>358
確認イオン	249>175	355>265	311>281	402>167

④装置定量下限値および検量線の範囲・直線性の確認

0.5、1、2、5、10ng/mL の混合標準液をそれぞれ測定し検量線を作成した。全ての測定対象について、0.5ng/mL におけるピークの S/N 比が 10 以上であったことから装置定量下限値を 0.5ng/mL とした。また、作成した検量線の相関係数が 0.999 以上、真度が 80～120%であり、0.5～10ng/mL の範囲で良好に分析可能であることを確認した。

	0.5ng/mL の S/N 比	相関係数	真度
AFB1	167	0.9999	97～103%
AFB2	701	1.0000	95～103%
AFG1	831	0.9999	96～106%
AFG2	878	0.9999	85～109%
OTA	91.2	1.0000	100%
OTB	613	0.9999	96～105%
STC	276	0.9999	91～113%
シトリン	468	1.0000	99～101%
DON	15.6	1.0000	98～105%
NIV	34.3	0.9995	82～112%
T-2	642	0.9998	80～115%
HT-2	165	0.9999	82～111%
DAS	65.9	0.9996	90～117%
ZEN	10.5	0.9994	88～112%

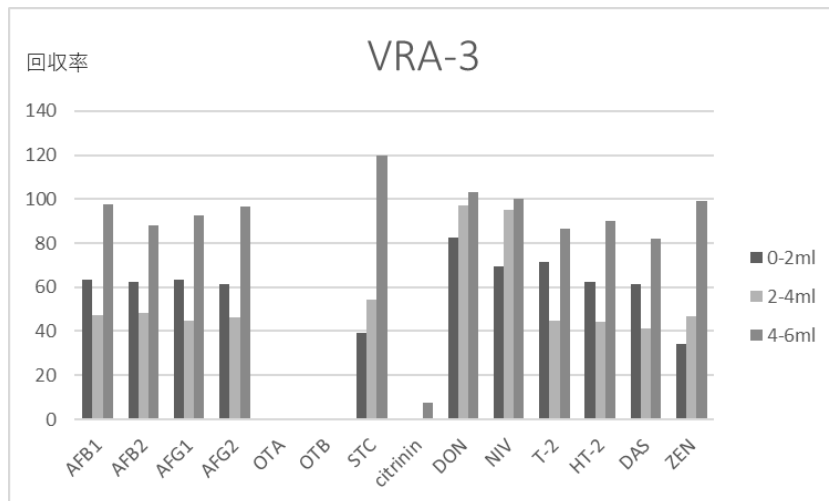
⑤前処理法の検討

マイコトキシンの分析にはイムノアフィニティカラムや多機能カラムが抽出液の精製に用いられるが、14 種のマイコトキシを一斉分析するためには多機能カラムの方が適当である。多機能カラムは各メーカーから様々販売されているが充填剤の内容や溶出パターンなどは示されていないことが多い。そこで、初期検討として、カラムに標準液を通過させた時に測定対象のマイ

コトキシシンの程度回収できるか調べた。

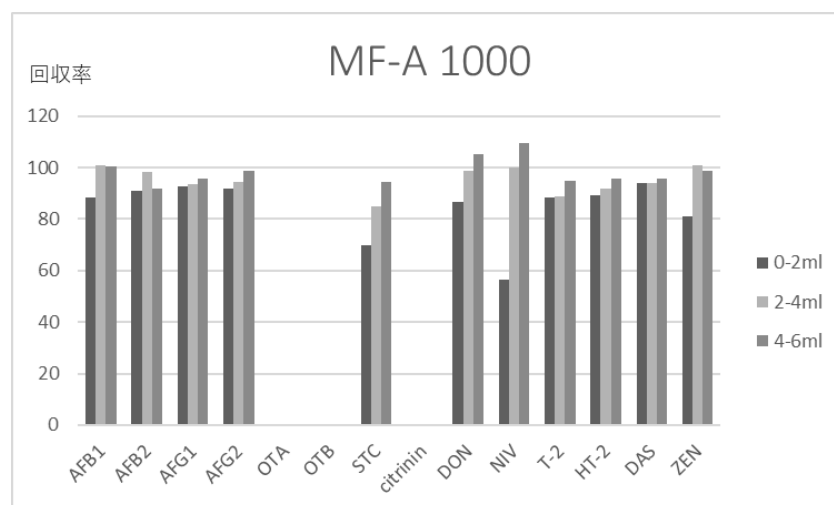
(1)VRA-3 (ジーエルサイエンス)

90%アセトニトリルで調製した標準液をカラムに負荷し、通過液を2mLごとに分取した。この通過液および標準液を窒素気流下で0.2mL程度まで濃縮し、移動相で1mLとしたものを測定した。標準液に対する各通過液のピーク面積の比により回収率を求めた。その結果、通過液0~4mLは全体的に回収率が低い傾向が見られたが、通過液4~6mLでは概ね良好な回収率であった。しかし、OTA、OTBおよびシトリニンがいずれの通過液においてもほとんど回収できなかった。



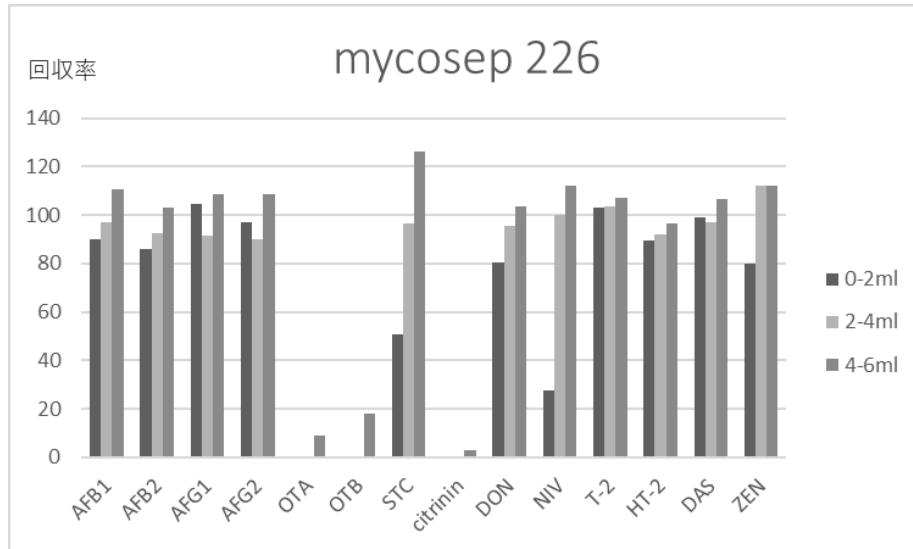
(2)MF-A 1000 (レゾナック)

90%アセトニトリルで調製した標準液をカラムに負荷し、通過液を2mLごとに分取した。この通過液および標準液を窒素気流下で0.2mL程度まで濃縮し、移動相で1mLとしたものを測定した。標準液に対する各通過液のピーク面積の比により回収率を求めた。その結果、通過液0~2mLは回収率が低いものも見られたが、通過液2~6mLでは概ね良好な回収率であった。しかし、OTA、OTBおよびシトリニンがいずれの通過液においてもほとんど回収できなかった。



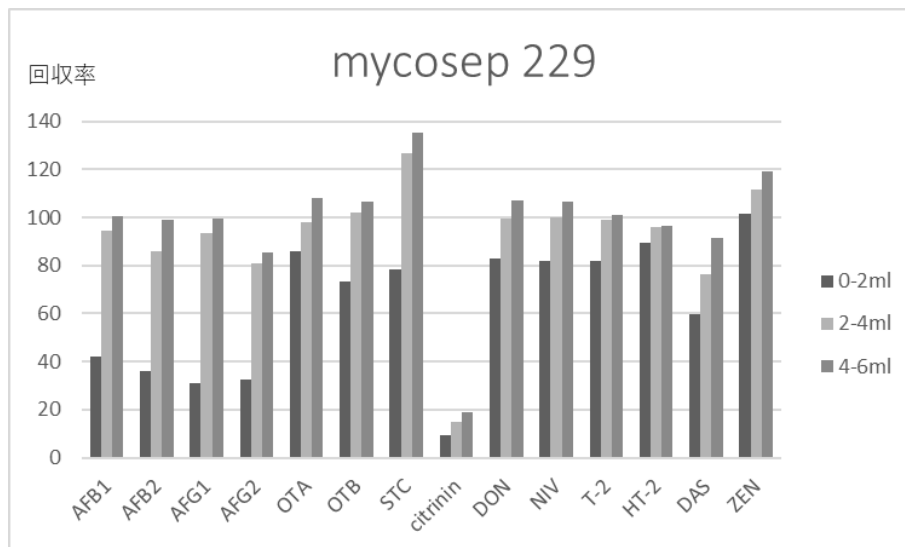
(3)mycosep 226 (Romer Labs)

1%酢酸含有 84%アセトニトリルで調製した標準液をカラムに負荷し、通過液を 2mL ごと分取した。この通過液および標準液を窒素気流下で 0.2mL 程度まで濃縮し、移動相で 1mL としたものを測定した。標準液に対する各通過液のピーク面積の比により回収率を求めた。その結果、通過液 0~2mL は回収率が低いものが見られたが、通過液 2~6mL では概ね良好な回収率であった。しかし、OTA、OTB およびシトリニンがいずれの通過液においてもほとんど回収できなかった。



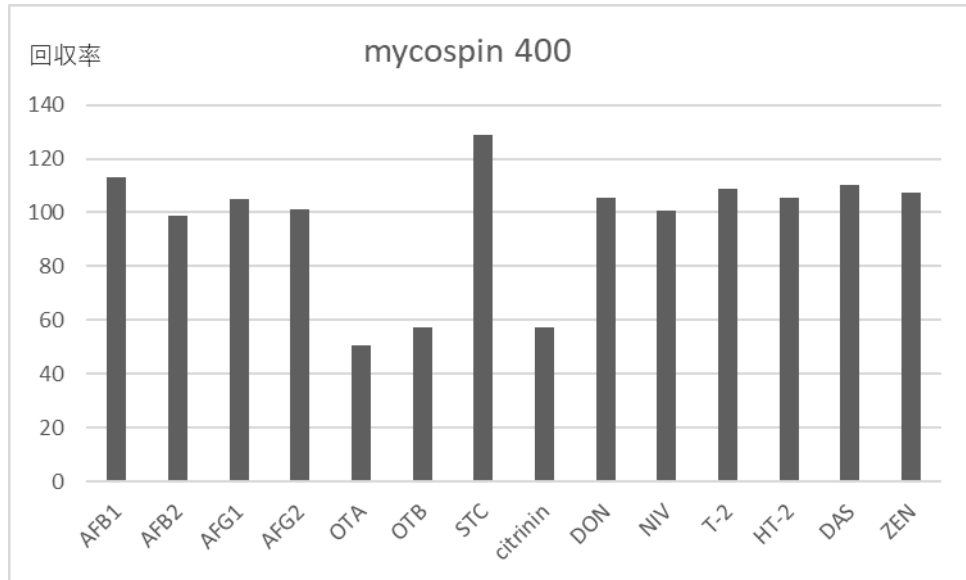
(4)mycosep 229 (Romer Labs)

1%酢酸含有 84%アセトニトリルで調製した標準液をカラムに負荷し、通過液を 2mL ごと分取した。この通過液および標準液を窒素気流下で 0.2mL 程度まで濃縮し、移動相で 1mL としたものを測定した。標準液に対する各通過液のピーク面積の比により回収率を求めた。その結果、通過液 0~2mL は回収率が低いものが見られたが、通過液 2~6mL では概ね良好な回収率であった。しかし、シトリニンのみ回収率が僅かであった。



(5)mycospin 400 (Romer Labs)

1%酢酸含有 84%アセトニトリルで調製した標準液をカラムに負荷し通過液を得た。通過液および標準液 0.5mL を窒素気流下で 0.1mL 程度まで濃縮し、移動相で 0.5mL としたものを測定した。標準液に対する通過液のピーク面積の比により回収率を求めた。その結果、概ね良好な回収率であったが、OTA、OTB およびシトリニン は 50%程度 の回収率であった。



5 種の多機能カラムについて検討した結果、OTA、OTB およびシトリニンを溶出させることが難しいことが分かった。5 種の多機能カラムの内、mycosep 229 ではシトリニンを回収することはできなかったが、OTA および OTB を良好に回収することができた。また、mycospin 400 では OTA、OTB およびシトリニンを 50%程度は回収することができた。

研究の特色

[独創性や新規性等]

アフラトキシンを含む複数のマイコトキシンの一斉分析法の検討を行い、試験法の性能評価を行うこと。

県内産の米について初めて詳細な実態調査を行うこと。

期待される成果

1. 県民生活や産業社会への波及効果

県内産の米の汚染実態の解明、食品の安全確保とブランド力向上

2. 業務遂行のレベルアップへの寄与等

かび毒検査体制の整備、分析技術の習得