

フザリウムトキシナー斉分析法の検討

酒井康行・小西伊久江

Study of Simultaneous Analysis Method for Fusarium Toxin

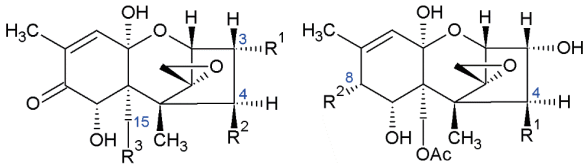
Yasuyuki SAKAI, Ikue KONISHI

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。デオキシニバレノール、ニバレノール
等のトリコテセン系やゼアラレノンが広く知られている。
ヒトや動物が摂取すると、下痢、嘔吐等の消化器症状
や免疫抑制等を起こす^{1,2)}。

これまでの調査によって、汚染食品は小麦、大麦、トウ
モロコシ等の穀類およびその加工品に多く、その汚染濃度
は、かびの生息分布・天候等が影響するため地域性があり、
わが国では、かびの生息域に該当し、かつ、汚染食品とな
る小麦、大麦の収穫期がちょうど梅雨の時期と重なること
から、比較的高濃度の汚染が報告されている^{3,4)}。平成 14
年には、食品衛生法に基づきデオキシニバレノールの暫定
的基準 1.1ppm (小麦) が設定された⁵⁾。また、平成 19 年
には、「麦類のデオキシニバレノール・ニバレノール汚染
低減のための指針」が農林水産省から発出されたことによ
り、麦類の生産段階(栽培・乾燥調製・貯蔵)における低
減化対策が推進され、汚染濃度は徐々に減少しているが、
完全にコントロールされるまでには至っていない(図 1)
6,7)。

新たに、トリコテセン系の A タイプやアセチル化体・配
糖体等の類縁化合物(図 2)の汚染も明らかとなった⁸⁾。
一部の化合物については、食品安全委員会または
FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)で既に
健康影響が評価され、平成 27 年には国際規格である
Codex 規格で、アセチル化体を含めたデオキシニバレノール
の基準値が設定された(表 1)。フザリウムトキシンの



B-type	R1	R2	R3	A-type	R1	R2
デオキシニバレノール	OH	H	OH	T-2 トキシン	OAc	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
3-アセチルデオキシニバレノール	OAc	H	OH	HT-2 トキシン	OH	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
15-アセチルデオキシニバレノール	OH	H	OAc	ジアセトキシニバレノール	OAc	H
ニバレノール	OH	OH	OH			
フザリオン-X	OH	OAc	OH			

図 2 代表的なトリコテセン系かび毒
(構造式は ChemSketch で作成)

基準値設定に向けた検討は、今後ますます進むと予想され
る。

本県は六条大麦の収穫量日本一を誇る大産地であり、県
内産穀類等を対象とした汚染実態調査を実施することに
した。今回は、LC-MS/MS を用いたフザリウムトキシナー
斉分析法の検討を行った。検討対象は、MS 条件(イオ
ン化、MRM トランジション)および HPLC 条件(分析カ
ラム、移動相等)であり、各項目について最適化した後、
定量限界および検量線の範囲・直線性について評価したの
で、その結果を報告する。

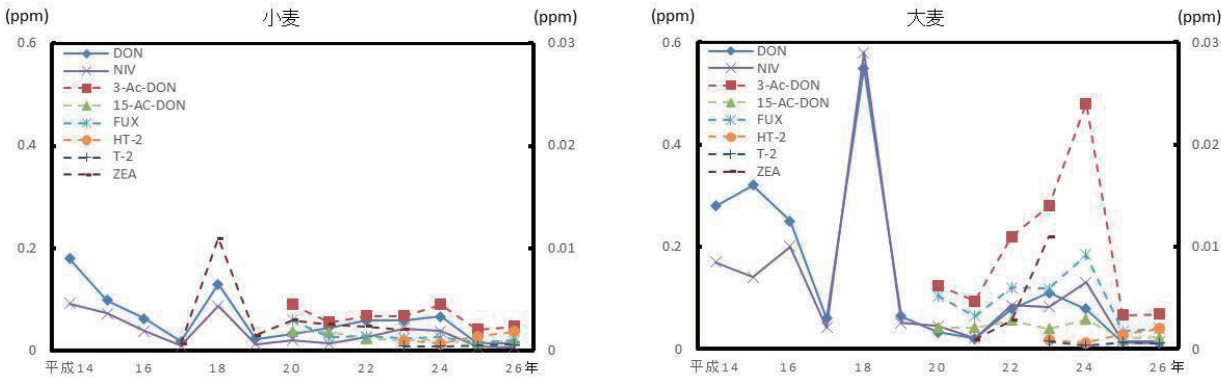


図 1 小麦および大麦におけるフザリウムトキシンの汚染濃度推移

[DON、NIV、3-AcDON、15-AcDON、FUX、HT-2、T-2、ZEN はそれぞれデオキシニバレノール、ニバレノール、3-アセチルデオキシニバレノール、
15-アセチルデオキシニバレノール、フザリオン-X、HT-2 トキシン、T-2 トキシン、ゼアラレノンの略。DON および NIV は第 1 軸、その他のフザリウムトキシンは第
2 軸を使用。図は、農林水産省の汚染実態調査結果を基に作成。]

表1 主なトリコテセン系かび毒のリスク評価とリスク管理の状況

化合物名	リスク評価		リスク管理	
	国内（食安委）	国際（JECFA）	国内（厚労省）	国際（Codex）
デオキシニパレノール	1 μ g/kg 重/日	1 μ g/kg 重/日	1.1 mg/kg （小麦）	2.0 mg/kg（小麦、大麦、トウモロコシ） 1.0 mg/kg（ワウ、ミル、セリナ、フレク） 0.2 mg/kg（乳児用食品）
3-アセチルデオキシニパレノール	—		—	
15-アセチルデオキシニパレノール	—		—	
ニパレノール	0.4 μ g/kg 重/日	—	—	—
フザレノン-X	—	—	—	—
T-2 トキシン	—	0.06 μ g/kg 重/日	—	—
HT-2 トキシン	—		—	—
ジアセトキシシルペノール	—		—	—

2. 実験方法

2. 1 測定対象

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

2. 2 試薬等

2. 2. 1 標準物質および使用溶媒等

かび毒標準品：A,B-トリコテセン、ゼアラレノン混合標準液（各 10 μ g/mL アセトニトリル溶液、和光純薬工業）、3-AcDON 標準品（和光純薬工業）および 15-AcDON 標準品（和光純薬工業）を用いた。

かび毒混合標準溶液：A,B-トリコテセン、ゼアラレノン混合標準液および 15-AcDON 標準品をアセトニトリルで 10 μ g/mL になるよう希釈した標準溶液を 500 μ L ずつ 1.5mL バイアルに採り、40℃以下で溶媒除去した。残留物に、10mM 酢酸アンモニウム水溶液：メタノール(9:1) 混液 500 μ L を加えて調製した。

内部標準品：ベルカロール標準品（和光純薬工業）およびゼアラレノン標準品（和光純薬工業）を用いた（以下、それぞれ「VEL」および「ZAN」という。）。

内部混合標準溶液：各内部標準品をアセトニトリルで 10 μ g/mL になるよう希釈した。

使用溶媒等：アセトニトリル、メタノール、超純水およびギ酸は LC/MS 用を用いた。酢酸アンモニウムは液体クロマトグラフ用（和光純薬工業）を用いた。メーカーを特

に記載していないものは、和光純薬工業または関東化学のものを使用した。

2. 2. 2 評価用標準溶液の調製

かび毒混合標準溶液（各 10 μ g/mL）および内部混合標準溶液（各 10 μ g/mL）を 10mM 酢酸アンモニウム水溶液：メタノール(9:1)混液で希釈した。

2. 2. 3 検量線用標準溶液の調製

かび毒混合標準溶液（各 10 μ g/mL）を 10mM 酢酸アンモニウム水溶液：メタノール(9:1)混液で適宜希釈し、各 1、2、5、10、20、50、100、200ng/mL の標準溶液を調製した。内部標準法で定量する場合は、別途、内部混合標準溶液（各 10 μ g/mL）を 100ng/mL となるよう添加した。

2. 3 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（島津製作所/Sciex）、カラム：L-column2 ODS メタルフリー 粒子径 3 μ m、2.0mm i.d. $\times$ 150mm（化学物質評価研究機構）、Kinetex PFP 粒子径 2.6 μ m、2.1mm i.d. $\times$ 150mm（Phenomenex）、CAPCELL CORE ADME 粒子径 2.7 μ m、2.1mm i.d. $\times$ 150mm（資生堂）（以下、それぞれ「ODS カラム」、「PFP カラム」、「ADME カラム」と言う。）、移動相：A 液 10mM 酢酸アンモニウム水溶液、B 液メタノール、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℃、注入量：5 μ L、MRM 条件：表 2 のとおり。

上記条件で、標準溶液を LC-MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法または内部標準法により定量した。内部標準物質には、トリコテセン系かび毒は VEL を、ZEN には ZAN を割り当てた。

表2 MRM トランジション

	DON	NIV	3-AcDON	15-AcDON	同左	FUX	HT-2	T-2	DAS	VEL	ZEN	ZAN
イ化法	ESI(-)	同左	ESI(+)	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左
定量イ	371>281	355>295	339>231	356>321	339>261	372>355	442>263	484>305	384>307	284>267	319>187	321>303
確認イ	371>311	355>265	339>203	356>137	339>137	372>247	442>215	484>185	384>247	284>249	319>283	321>189

2. 4 試験法の開発

フザリウムトキシシンには、小麦中の「デオキシニバレノール試験法」を除いて告示または通知で示された、いわゆる公定法が存在しない。そのため、ジェネリックアプローチ⁹⁾による試験法の開発に取り組んだ。ジェネリックメソッドは、準公定法として扱われる食品衛生検査指針やカビ毒試験法評価委員会¹⁰⁾で示された試験法等を参考にして、図3のとおり設定した^{1,10)}。

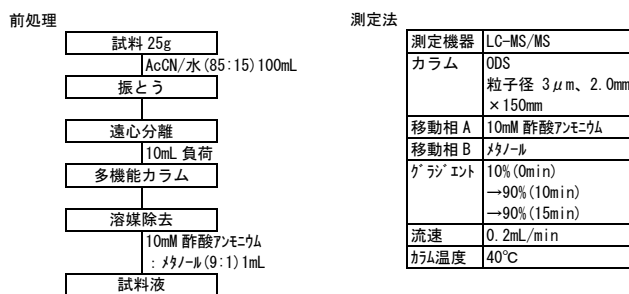


図3 設定したジェネリックメソッド

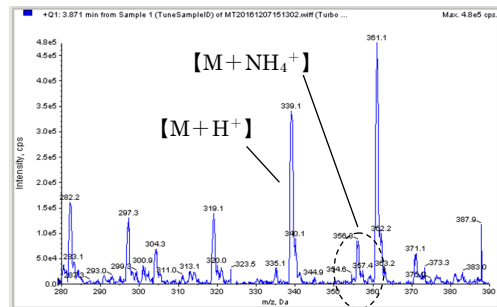
設定したメソッドから、LC-MS/MS の MS 条件、分析カラム、移動相、グラジエント条件の順に検討した。

3. 結果および考察

3. 1 MS 条件の検討

評価用標準溶液をインフュージョン法で MS 部へ直接導入し、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) のポジティブとネガティブの両モードでスキャン測定することにより、プリカーサーイオンを選定した。ただし、3-AcDON と 15-AcDON については、同定が困難であったことから、単体標準溶液を用いて再測定した。

3-AcDON



15-AcDON

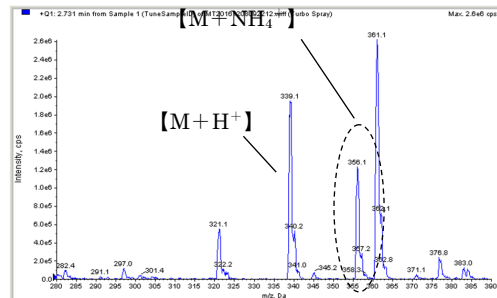


図4 3-AcDON および 15-AcDON のインフュージョン法による SCAN 測定

プリカーサーイオンは、DON および NIV はネガティブモードで酢酸イオン付加体を選定した。FUX、HT-2、T-2、

DAS および VEL はポジティブモードでアンモニア付加体とし、3-AcDON、ZEN および ZAN はプロトン付加体、15-AcDON はアンモニア付加体とプロトン付加体の両方とした。15-AcDON を 2 種類とした理由は、プロトン付加体 (m/z 339) は強度は高いが、3-AcDON と同じプリカーサーイオンのため、選択性が得られない可能性があったためである。そこで、3-AcDON と 15-AcDON の強度に明らかな有意差があるアンモニア付加体 (m/z 356) を追加した (図4)。

次に、解析ソフト (Analyst) の最適化ツールを用いてプロダクトイオンおよび MS パラメータ (コリジョンエネルギーおよび電圧等) の最適化を行い、MS 条件を決定した。原則として、化合物ごとに定量用と確認用に 2 チャンネルを設定したが、15-AcDON については 4 チャンネルを設定した。なお、その後の検討により、15-AcDON にはアンモニア付加体が適当であると判明した。これについては次項で詳述する。

3. 2 分析カラムの検討

ジェネリックメソッドと決定した MS 条件を用いて、評価用標準溶液を測定した。その結果を図5に示す。

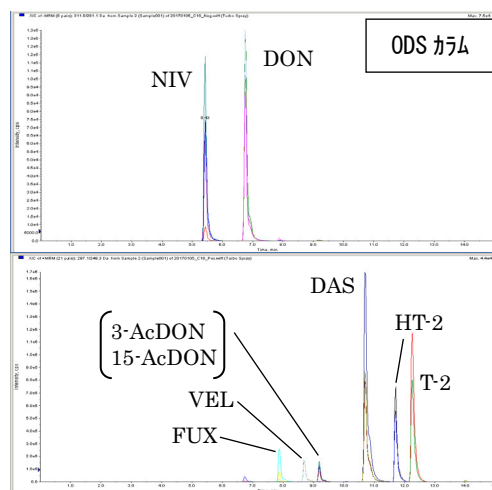


図5 ODS カラムを用いた評価用標準溶液の測定 (上段 ESI(-) 下段 ESI(+), 以下同じ)

概ね良好なクロマトグラムが得られたが、位置異性体である 3-AcDON と 15-AcDON を分離することができなかった。そこで、既報^{8,11,12)}を参考にして、官能基に含まれるフッ素原子の静電的相互作用による分離を目的とした PFP カラムと、カゴ状のアルキル基の表面極性による分離を目的とした ADME カラムを用いて、3-AcDON と 15-AcDON の分離を試みた (図6)。

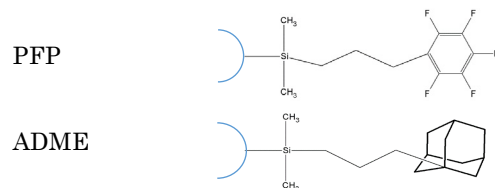


図6 検討した分析カラム

結果を図 7 に示す。いずれの分析カラムも 3-AcDON と 15-AcDON を分離することができ、その他の化合物のクロマトグラムも良好であった。したがって、両カラムとも使用可能と考えられたが、PFP カラムは装置の耐圧上限付近まで圧力が上昇してしまったことから、装置への影響を考慮して ADME カラムを採用することにした。

また、分析カラムによって 3-AcDON と 15-AcDON の分離が可能となったことにより、15-AcDON の MRM トランジションについては、プロトン付加体をプリカーサーイオンとする定量用 339>261、確認用 339>137 でも、アンモニア付加体をプリカーサーイオンとする定量用 356>321、確認用 356>137 でも検出可能であることがわかった(図 8)。ただし、後者は 3-AcDON をほぼ検出せず、15-AcDON を選択的に検出できるため、356>321、356>137 を用いることにした。

なお、3-AcDON の定量用 339>231、確認用 339>203 については、15-AcDON を検出してしまいが、分析カラムで分離することができ、かつ、他に有効なトランジションを見つけ出せなかったため、そのまま採用した。

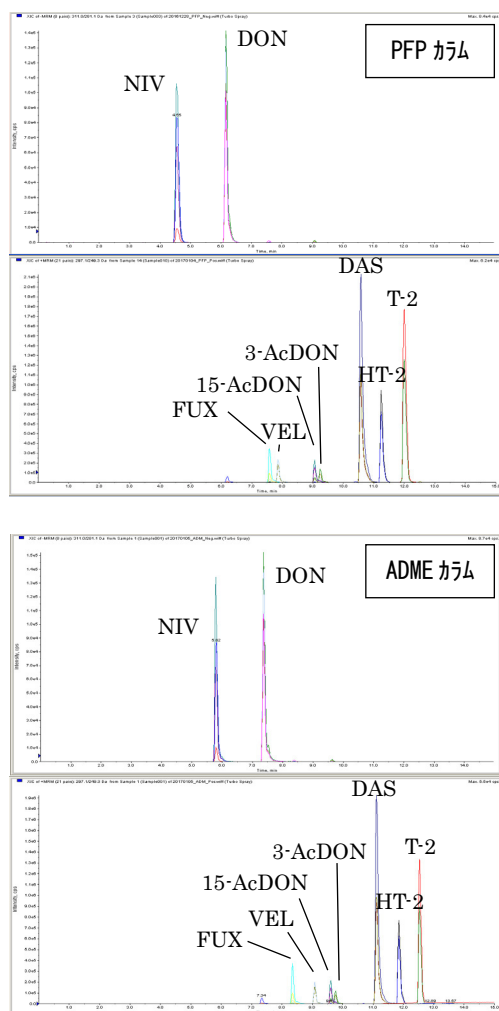


図 7 PFP カラムおよび ADME カラムを用いた評価用標準溶液の測定

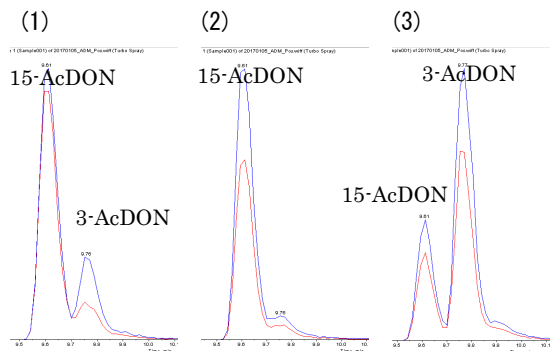


図 8 3-AcDON と 15-AcDON の MRM 測定

- | | |
|------------------|-----------------------|
| (1) 15-AcDON 測定用 | 定量 339>261、確認 339>137 |
| (2) 同上 | 定量 356>321、確認 356>137 |
| (3) 3-AcDON 測定用 | 定量 339>231、確認 339>203 |

3. 3 移動相の検討

移動相 B 液に用いる有機溶媒を検討した。メタノールからアセトニトリルに換えて、評価用標準溶液を測定したところ、3-AcDON と 15-AcDON のピークの近接は解消されたが、各化合物の感度は最大で 1/10 程度まで減少した(図 9)。フザリウムトキシンには微量分析が求められるので、移動相 B 液はメタノールのままとした。

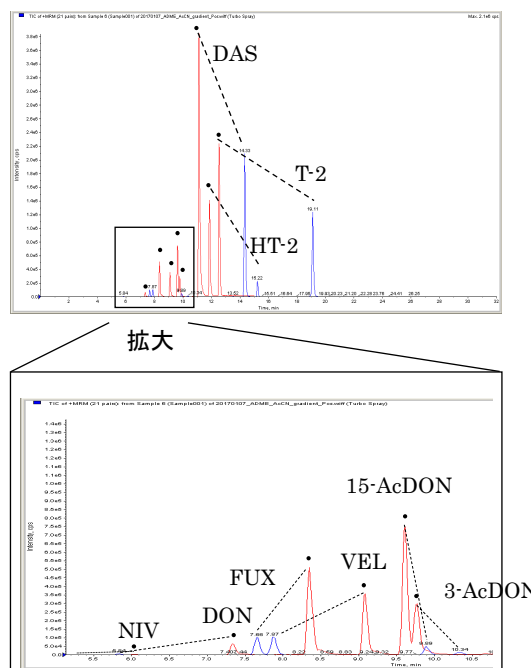


図 9 移動相に用いる有機溶媒（メタノール、アセトニトリル）の違いによる測定強度の差

- 〔 ピーク上部の●印はメタノールの結果を示した。
メタノールとアセトニトリルの結果を破線で繋いだ。 〕

次に、移動相 A 液に用いる酢酸アンモニウム水溶液の pH と塩濃度を検討した。pH 検討用として、pH 調整していない通常の 10mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH6.5、実測値) と、それぞれ 0.01%、0.1% になるよう乙酸を加えた 10mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH4.9、pH3.4) を調製した。また、塩濃度検討用として、塩濃度が 0、1、5、10、20mM の酢酸アンモニウム水溶液を調製した。これらを移動相 A 液に用いて、評価用標準溶液を測定した。

その結果、pH が低下するにつれて、ポジティブモードで測定する化合物の感度は上昇し、逆に、ネガティブモードで測定する化合物の感度は減少することがわかった (図 10)。これは pH の変化に伴って、イオン化効率が変化するためと考えられた。全体では、ネガティブモードで測定する DON および NIV の感度が低かったため、pH 調整はしないことにした。

酢酸アンモニウム水溶液の塩濃度については、明らかな有意差を確認できなかった。しかしながら、アンモニア付加体をプリカーサーイオンに選択していることに加えて、上述の結果からフザリウムトキシシンの感度は pH に依存することがわかったため、酢酸アンモニウムが持つ緩衝能に期待して 10mM のままとした。

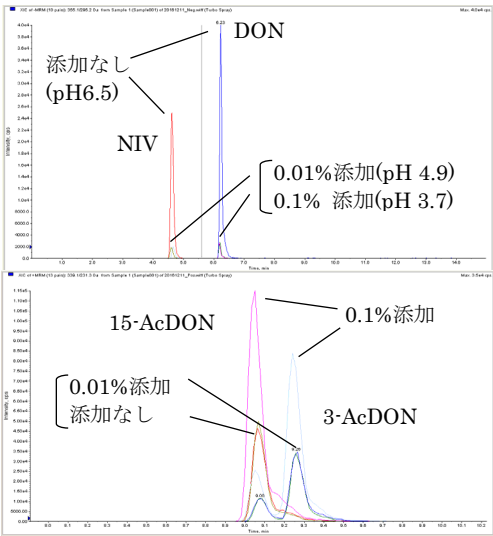


図 10 緩衝液 (pH) の違いによる測定強度の差

3. 4 グラジエント条件の検討

3-AcDON と 15-AcDON をさらに分離することを目的として、グラジエント条件を検討した。評価用標準溶液を既存メソッドである B 液：10%(0min)→90%(10min)→90%(15min)から、初期濃度 (5%、10%)、溶出時間 (90%(10min)・90%(15min)、90%(20min)、90%(30min))、終了濃度 (70%、80%、90%) を順に換えて測定し、その挙動を確認した。

結果的に、3-AcDON と 15-AcDON の分離という点では、初期濃度や終了濃度を変えても大きな効果は得られず、溶出時間を長くすることが最も有効な手段であることがわかった (図 11)。一方で、溶出時間を長くすれば、分析時間も長くなる。今回の調査では、多検体を処理する予定のため、完全分離の目安となる分離度 1.5 を満たした最短条件 B 液：10%(0min)→90%(15min)→90%(20min)を採用した。

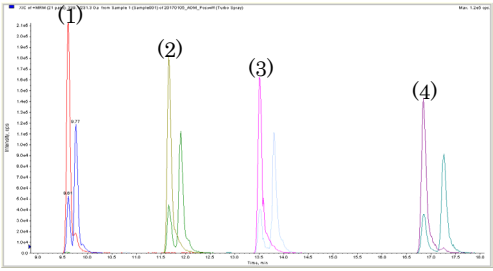


図 11 グラジエント条件 (溶出時間) の違いによる 3-AcDON と 15-AcDON の分離の差

- (1) 10%(0min)→90%(10min)→90%(15min)
- (2) 10%(0min)→90%(15min)→90%(20min)
- (3) 10%(0min)→90%(20min)→90%(25min)
- (4) 10%(0min)→90%(30min)→90%(35min)

3. 5 定量限界および検量線の範囲・直線性

最適化した条件を用いて、かび毒混合標準溶液 (各 1ng/mL 10mM 酢酸アンモニウム水溶液：メタノール(9:1)混液) をそれぞれ併行測定 (n=6) し、得られたピーク面積から標準偏差 (σ) を算出した。その値に 3 と 10 を乗じた値から、検出限界および定量限界を推定した (表 3)。この結果から、A・トリコテセン系である T-2、HT-2、DAS の定量限界を 1ng/mL、B・トリコテセン系である DON、NIV、3-AcDON、15-AcDON、FUX、VEL と ZEN、ZAN の定量限界を 10ng/mL とした。なお、定量限界と同濃度のかび毒混合標準溶液を併行測定 (n=6) したところ、各々の相対標準偏差は 10RSD%以下であった。

次に、検量線の範囲および直線性を確認した。定量限界を 1ng/mL と定めた化合物については 1・200ng/mL の範囲で、また、定量限界を 10ng/mL と定めた化合物については 10・200ng/mL の範囲でかび毒混合標準溶液を測定し、絶対検量線法および内部標準法で検量線を作成した。

結果、どちらも全ての化合物で相関係数 0.997 以上の良好な検量線となり、それぞれの真度もほぼ 90・110%以内に収まったので、両法とも使用可能と判断した。どちらの定量法を用いるかは、今後、実試料の測定を行ったうえで判断したい。

4. まとめ

LC-MS/MS を用いたフザリウムトキシシン一斉分析法の検討を行った。検討対象は、MS 条件、分析カラム、移動相、グラジエント条件とした。位置異性体である 3-AcDON と 15-AcDON については、ODS カラムでは分離できなかったが、ADME カラムまたは PFP カラムを用いることで分離することができた。また、15-AcDON のプリカーサーイオンをアンモニア付加体に変更することで、選択的に検出することがわかった。

表 3 各化合物の定量限界

	DON	NIV	3-AcDON	15-AcDON	FUX	HT-2	T-2	DAS	VEL	ZEN	ZAN
検出限界 (3σ) 推定	2.49	2.47	0.74	0.91	0.42	0.41	0.29	0.20	3.01	0.78	0.45
定量限界 (10σ) 推定	8.29	8.25	2.47	3.04	1.39	1.36	0.96	0.66	10.1	2.59	1.51
定量限界 決定	10	10	10	10	10	1	1	1	10	10	10

単位は ng/mL

確立した分析法の性能評価を行った。DON、NIV、3-AcDON、15-AcDON、FUX、VEL、ZEN、ZAN の定量限界は 10ng/mL であり、10-200ng/mL の範囲で定量可能であった。HT-2、T-2、DAS の定量限界は 1ng/mL であり、1-20ng/mL の範囲で定量可能であった。

今後は、前処理法の検討を行い、試験法の妥当性を確認したうえで、県内産穀類等の汚染実態調査を実施する予定である。

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) 芳澤宅實：厚生労働科学研究費補助金厚生労働特別研究事業 平成 13 年度研究報告書(主任研究者 熊谷進)「食品中のかび毒のリスクアセスメントに関する研究」, 98-113(2001)
- 4) 熊谷進：厚生労働科学研究費補助金厚生労働特別研究事業 平成 14 年度研究報告書(主任研究者 熊谷進)「小麦等のデオキシニバレノールに係る規格基準設定のための緊急調査研究」, 6-9(2002)
- 5) 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)
- 6) 平成 20 年 12 月 17 日付け 20 消安第 8915 号 20 生産第 5731 号 農林水産省消費・安全局長 生産局長連名通知「麦類のデオキシニバレノール・ニバレノール汚染低減のための指針の策定・普及について」
- 7) http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/result.html (2017.6.25 閲覧)
- 8) 中川博之：高速液体クロマトグラフィー質量分析法によるフザリウムトキシン分析に関する最新の知見,JSM Mycotoxins, 64(1), 55-62(2014)
- 9) 社団法人日本分析化学会液体クロマトグラフィー研究懇談会:液クロ文の巻 誰にも聞けなかった HPLC Q&A, 84-85, 株式会社筑波出版会, 東京(2006)
- 10) <http://www.nihs.go.jp/dmb/4th/sample3.html>(2017.6.25 閲覧)
- 11) 田村昌義 他：ペンタフルオロフェニルカラムを用いたトリコセシン系カビ毒の LC-MS/MS 高感度一斉分析法,食品衛生学雑誌, 55(1), 19-24(2014)
- 12) 木村圭介 他：LC-MS/MS によるフザリウムトキシンの一斉分析法,東京都健康安全研究センター年報, 65, 95-101(2014)