

焙煎コーヒー		原産国/加工地	HPLC	LC/MS
20検体	焙煎コーヒー	国産	0.12	
	焙煎コーヒー	国産	ND	ng/g
	焙煎コーヒー	国産	tr (0.097)	検出限界 0.005
	焙煎コーヒー	国産	tr (0.086)	定量限界 0.01
	焙煎コーヒー	国産	0.231	
	焙煎コーヒー	国産	ND	回収率 %
	焙煎コーヒー	国産	ND (0.047)	5 ng/g 99.30
	焙煎コーヒー	国産	ND (0.043)	
	焙煎コーヒー	国産	ND	
	焙煎コーヒー	国産	tr (0.068)	
	焙煎コーヒー	国産	ND (0.048)	
	焙煎コーヒー	国産	ND (0.032)	
	焙煎コーヒー	国産	1.695	
	焙煎コーヒー	国産	0.385	
	焙煎コーヒー	輸入	tr (0.095)	
	焙煎コーヒー	輸入	ND	
	焙煎コーヒー	輸入	2.745	
	焙煎コーヒー	輸入	ND (0.037)	
	焙煎コーヒー	国産	ND (0.038)	
	焙煎コーヒー	国産	ND	

インスタントコーヒー		原産国/加工地	HPLC	LC/MS
30検体	インスタントコーヒー	国産	0.182	ng/g
	インスタントコーヒー	国産	0.264	検出限界 0.05
	インスタントコーヒー	輸入	1.171	定量限界 0.1
	インスタントコーヒー	輸入	0.841	
	インスタントコーヒー	輸入	1.034	
	インスタントコーヒー	輸入	1.217	
	インスタントコーヒー	輸入	1.062	
	インスタントコーヒー	輸入	0.912	
	インスタントコーヒー	輸入	1.140	
	インスタントコーヒー	国産	0.194	
	インスタントコーヒー	国産	0.101	
	インスタントコーヒー	国産	0.431	
	インスタントコーヒー	国産	0.342	
	インスタントコーヒー	国産	0.112	
	インスタントコーヒー	国産	tr(0.068)	
	インスタントコーヒー	国産	0.392	
	インスタントコーヒー	国産	0.317	
	インスタントコーヒー	国産	0.172	
	インスタントコーヒー	国産	0.601	
	インスタントコーヒー	国産	1.213	
	インスタントコーヒー	国産	1.156	
	インスタントコーヒー	国産	tr(0.090)	
	インスタントコーヒー	国産	0.253	
	インスタントコーヒー	国産	0.323	
	インスタントコーヒー	国産	0.153	
	インスタントコーヒー	国産	1.657	
	インスタントコーヒー	国産	0.169	
	インスタントコーヒー	国産	0.713	
	インスタントコーヒー	国産	0.287	
	インスタントコーヒー	国産	0.277	

ココア		原産国/加工地	HPLC	LC/MS
17検体	ココア	輸入	0.70	
	ココア	輸入	0.45	
	ココア	輸入	0.33	ng/g
	ココア	輸入	0.38	検出限界 0.05
	ココア	輸入	0.43	定量限界 0.1
	ココア	輸入	-	
	ココア	輸入	1.15	
	ココア	輸入	0.16	
	ココア	輸入	0.58	
	ココア	輸入	2.50	
	ココア	輸入	0.40	
	ココア	輸入	3.25	
	ココア	輸入	0.85	
	ココア	輸入	0.60	
	ココア	輸入	2.10	
	ココア	輸入	0.95	
	ココア	輸入	0.23	

乾燥イチジク		原産国/加工地	HPLC	LC/MS
6検体	イチジク	輸入	ND	ng/g
	イチジク	輸入	ND	検出限界 0.05
	イチジク	輸入	ND	定量限界 0.1
	イチジク	輸入	ND	
	イチジク	輸入	ND	回収率 %
	イチジク	輸入	0.13	5 ng/g 99.30
	イチジク	輸入		



コーンスナック	フモニン		フモニン		フモニン	
	B1(FB1)	B2(B2)	B2(B2)	B3(B3)	B3(B3)	B3(B3)
コーンスナック	60	15	15	11	11	
コーンスナック	90	24	24	12	12	
コーンスナック	1673	597	597	281	281	
コーンスナック	40	15	15	7	7	
コーンスナック	35	7	7	5	5	
コーンスナック	18	3	3	N.D.	N.D.	
コーンスナック	77	28	28	11	11	
コーンスナック	94	27	27	13	13	
コーンスナック	522	117	117	96	96	
コーンスナック	101	20	20	16	16	
コーンスナック	86	23	23	12	12	
コーンスナック	89	12	12	12	12	
コーンスナック	75	18	18	12	12	
コーンスナック	75	10	10	9	9	
コーンスナック	105	25	25	13	13	
コーンスナック	218	51	51	35	35	
コーンスナック	6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
コーンスナック	48	7	7	6	6	
コーンスナック	56	12	12	9	9	
コーンスナック	63	15	15	7	7	
コーンスナック	29	7	7	5	5	
コーンスナック	134	30	30	23	23	
コーンスナック	52	9	9	7	7	
コーンスナック	135	43	43	13	13	
コーンスナック	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
コーンスナック	54	9	9	8	8	
コーンスナック	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
コーンスナック	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
コーンスナック	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
コーンスナック	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
コーンスナック	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
コーンスナック	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	2.0	2.0	2.0
検出限界	1.0	1.0	1.0
回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	71.9 $\pm$ 3.5	92.7 $\pm$ 1.6	87.0 $\pm$ 1.5
1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	75.1 $\pm$ 0.3	68.1 $\pm$ 0.6	68.1 $\pm$ 0.6

ビール	20検体	フェミニン		
		B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)
ビール	国産	11.0	N.D.	N.D.
ビール	国産	5.1	N.D.	N.D.
ビール	国産	N.D.	N.D.	N.D.
ビール	国産	3.0	N.D.	N.D.
ビール	国産	N.D.	N.D.	N.D.
ビール	国産	N.D.	N.D.	N.D.
発泡酒	国産	N.D.	N.D.	N.D.
発泡酒	国産	N.D.	N.D.	N.D.
発泡酒	国産	12.9	N.D.	N.D.
発泡酒	国産	N.D.	N.D.	N.D.
新ジャンル	国産	N.D.	N.D.	N.D.
新ジャンル	国産	N.D.	N.D.	N.D.
ビール	輸入	N.D.	N.D.	N.D.
ビール	輸入	N.D.	N.D.	N.D.
ビール	輸入	N.D.	N.D.	N.D.
ビール	輸入	N.D.	N.D.	N.D.
ビール	輸入	N.D.	N.D.	N.D.
ビール	輸入	N.D.	N.D.	N.D.
ビール	国産	N.D.	N.D.	N.D.

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	2.0	2.0	2.0
検出限界	1.0	1.0	1.0

回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	117.3 $\pm$ 4.7	100.3 $\pm$ 2.0	109.6 $\pm$ 6.4
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	107.3 $\pm$ 2.8	100.3 $\pm$ 2.0	108.1 $\pm$ 0.4

生とうもろこし	5検体	フェミニン		
		B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)
生とうもろこし	国産	N.D.	N.D.	N.D.
生とうもろこし	国産	N.D.	(0.7)	(0.9)
生とうもろこし	国産	N.D.	N.D.	N.D.

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	2.0	2.0	2.0
検出限界	0.6	0.6	0.6
回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100.0 $\pm$ 16.3	64.8 $\pm$ 13.2	109.6 $\pm$ 6.4

コーングリッツ及 びコーンフラ		フモニン B1(FB1)	フモニン B2(B2)	フモニン B3(B3)
8検体	コーングリッツ	不明	29.1	20.1
	コーングリッツ	不明	32.5	24.2
	コーングリッツ	輸入	590	358
	コーングリッツ	輸入	37.6	20.9
	コーングリッツ	輸入	13.3	6.8
	コーングリッツ	不明	40.9	22.8
	コーングリッツ	輸入	62.4	45.9
	コーングリッツ	不明	37.3	25.9

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	2.0	2.0	2.0
検出限界	0.6	0.6	0.6
回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	86.9 $\pm$ 8.5	78.0 $\pm$ 3.1	86.8 $\pm$ 7.2(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

コーンスターチ		フモニン B1(FB1)	フモニン B2(B2)	フモニン B3(B3)
10検体	コーンスターチ	< 0.6	(0.7)	< 0.6
	コーンスターチ	不明	(1.4)	< 0.6
	コーンスターチ	不明	(0.9)	< 0.6
	コーンスターチ	不明	(0.7)	< 0.6
	コーンスターチ	不明	< 0.6	< 0.6
	コーンスターチ	不明	(1.1)	< 0.6
	コーンスターチ	不明	(1.5)	(0.8)
	コーンスターチ	不明	(1.8)	< 0.6
	コーンスターチ	輸入	(1.1)	(0.7)
	コーンスターチ	輸入	(0.9)	< 0.6

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	2.0	2.0	2.0
検出限界	0.6	0.6	0.6
回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	99.3 $\pm$ 8.2	102.6 $\pm$ 12.9	82.7 $\pm$ 7.3

雑穀米	フモニン			フモニン			フモニン		
	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)
20検体									
雑穀米	ND	ND	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	ND	ND	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	ND	ND	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	ND	ND	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	ND	ND	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	ND	ND	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	(0.8)	ND	ND	中国、日本	ND	ND	中国、日本	ND	ND
雑穀米	6.5	-0.9	(0.6)	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	ND	ND	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	2.8	(0.8)	(1.0)	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	6.4	(1.1)	(1.0)	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	ND	ND	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	(1.2)	ND	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	5.4	(1.4)	(0.8)	一部中国	ND	ND	一部中国	ND	ND
雑穀米	ND	ND	ND	一部日本	ND	ND	一部日本	ND	ND
雑穀米	3.4	(1.2)	(0.9)	一部日本	ND	ND	一部日本	ND	ND
雑穀米	(1.1)	ND	ND	国産	ND	ND	国産	ND	ND
雑穀米	ND	ND	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND
雑穀米	(1.5)	(0.8)	ND	不明	ND	ND	不明	ND	ND

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	2.0	2.0	2.0
検出限界	0.6	0.6	0.6

回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	122.4 $\pm$ 4.8	94.3 $\pm$ 3.4	89.0 $\pm$ 2.9

SAXIに付加前にpHを6.0~6.5に調整。

スイートコーン	フモニン			フモニン			フモニン		
	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)
14検体									
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	不明	<0.6	<0.6	不明	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	不明	<0.6	<0.6	不明	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	国産	<0.6	<0.6	国産	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	国産	<0.6	<0.6	国産	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	国産	<0.6	<0.6	国産	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	不明	<0.6	<0.6	不明	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6
スイートコーン	<0.6	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6	輸入	<0.6	<0.6

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	2.0	2.0	2.0
検出限界	0.6	0.6	0.6

回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	105.5 $\pm$ 8.4	101.2 $\pm$ 4.7	87.9 $\pm$ 5.9

分析法変更点: 抽出液を10倍に希釈後、SAXIに付加。

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	10.0	10.0	10.0
検出限界	2.0	2.0	2.0
回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	109.4 $\pm$ 1.97	48.3 $\pm$ 2.14	105.8 $\pm$ 0.86

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	2.0	2.0	2.0
検出限界	1.0	1.0	1.0
回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	96.9 $\pm$ 8.39	149.1 $\pm$ 36.8	
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	76.2 $\pm$ 6.18	77.3 $\pm$ 5.07	75.2 $\pm$ 2.35(100 $\mu$ )

そば粉	フモニン			フモニン			フモニン		
	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)
5検体	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	国産								
	不明								
	不明								
	不明								
	不明								

ポップコーン	フモニン			フモニン			フモニン		
	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)	B1(FB1)	B2(B2)	B3(B3)
14検体	6.2	3.0	trace	31.4	3.8	5.4	193.1	62.2	24.4
	輸入			輸入			輸入		
	輸入			輸入			輸入		
	輸入			輸入			輸入		
	輸入			輸入			輸入		
	輸入			輸入			輸入		
	輸入			輸入			輸入		
	輸入			輸入			輸入		
	不明			不明			不明		
	輸入			輸入			輸入		
	輸入			輸入			輸入		
	輸入			輸入			輸入		
	輸入			輸入			輸入		
	輸入			輸入			輸入		



コーンブレーク	フモニン		フモニン	フモニン	
	B1(FB1)	B2(B2)		B3(B3)	B3(B3)
20検体					
コーンブレーク	6.8	(1.6)	不明	(1.3)	
コーンブレーク	(1.8)	<0.6	不明	<0.6	
コーンブレーク	2.9	(0.9)	不明	<0.6	
コーンブレーク	17.5	3.6	不明	3.0	
コーンブレーク	11.8	2.5	不明	2.5	
コーンブレーク	7.4	(1.4)	不明	(1.0)	
コーンブレーク	2.5	<0.6	輸入	<0.6	
コーンブレーク	6.8	(1.7)	輸入	(1.2)	
コーンブレーク	5.8	(1.3)	不明	(1.5)	
コーンブレーク	6.2	(1.1)	不明	(1.0)	
コーンブレーク	6.2	(1.3)	不明	(1.0)	
コーンブレーク	(1.3)	<0.6	不明	<0.6	
コーンブレーク	30.5	9.3	輸入	3.7	
コーンブレーク	8.7	2.2	不明	(1.0)	
コーンブレーク	4.0	(0.9)	不明	(0.8)	
コーンブレーク	2.1	<0.6	不明	<0.6	
コーンブレーク	2.5	<0.6	不明	<0.6	
コーンブレーク	3.6	(0.9)	不明	(0.7)	
コーンブレーク	9.2	2.1	不明	(1.7)	
コーンブレーク	2.5	<0.6	不明	(0.7)	

米	フモニン		フモニン	フモニン	
	B1(FB1)	B2(B2)		B3(B3)	B3(B3)
米	<6	<6	国産	<6	
米	<6	<6	国産	<6	
米	<6	<6	国産	<6	
米	<6	<6	国産	<6	
米	<6	<6	国産	<6	
米	<6	<6	国産	<6	
米	<6	<6	国産	<6	
米	<6	<6	国産	<6	
米	<6	<6	国産	<6	
米	<6	<6	国産	<6	

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	2.0	2.0	2.0
検出限界	0.6	0.6	0.6

回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	109.7 $\pm$ 38.9	93.4 $\pm$ 16.5	90.8 $\pm$ 14.9
40 $\mu\text{g}/\text{kg}$	86.8 $\pm$ 17.7	88.9 $\pm$ 18.4	87.5 $\pm$ 14.7

抽出液を10倍に希釈後、SAXIに付加。

( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	FB1	FB2	FB3
定量限界	20.0	20.0	20.0
検出限界	6.0	6.0	6.0

回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	81.1 $\pm$ 16.6	114.3 $\pm$ 9.4	118.9 $\pm$ 14.8

抽出溶媒をメタノール-0.1mol/L塩酸(3+1)に、抽出時間を1時間に変更。抽出液を直接LC-MSにより測定。

コーンスープ		フェニシン B1(FB1)	フェニシン B2(B2)	フェニシン B3(B3)
9検体	液体	不明	trace	ND
	液体	不明	ND	ND
	液体	輸入	ND	ND
	液体	輸入	ND	ND
	液体	不明	ND	ND
	液体	不明	ND	ND
	液体	不明	ND	ND
	液体	不明	trace	ND
	液体	不明	trace	ND
	液体	不明	trace	ND

コーンスープ		フェニシン B1(FB1)	フェニシン B2(B2)	フェニシン B3(B3)
10検体	粉末	不明	ND	ND
	粉末	不明	ND	ND
	粉末	7.3	ND	ND
	粉末	3.7	ND	ND
	粉末	12.9	ND	ND
	粉末	ND	ND	ND
	粉末	trace	ND	ND
	粉末	不明	trace	ND
	粉末	不明	trace	ND
	粉末	10.1	ND	ND

(ug/kg)	FB1	FB2	FB3
定量限界	3.0	3.0	3.0
検出限界	0.6	0.6	0.6

回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
5ng/g	120.3±11.51	110.0±1.19	89.4±1.15
100ng/g (B3:100ng /g)	92.5±1.49	90.7±1.35	87.4±1.32

(ug/kg)	FB1	FB2	FB3
定量限界	5.0	5.0	5.0
検出限界	1.2	1.2	1.2

回収率 (%)	FB1	FB2	FB3
10ng/g	111.1±10.82	99.3±2.29	97.9±0.73
100ng/g (B3:100ng /g)	111.8±0.84	89.5±1.16	76.3±3.57

※試料をα-アミラーゼ及びβ-マンナンターターゼで処理したのち、抽出操作を実施した



附表 3  
ニバレノールおよびデオキシニバレノール汚染実態結果

小麦粉	測定値(μg/kg)		
	ニバレノール(NIV)	デオキシニバレノール(DON)	
79検体	国産	12.5	51.3
	国産	9.6	27.1
	国産	17.3	6.4
	国産	3.6	17.4
	国産	4.7	14.0
	国産	10.9	30.0
	国産	15.3	61.4
	国産	3.0	13.6
	国産	3.7	4.1
	国産	11.8	21.0
	国産	15.9	31.6
	国産	3.5	33.0
	国産	3.0	11.6
	国産	-	22.1
	国産	2.7	27.3
	国産	3.3	7.0
	国産	2.7	6.5
	国産	-	5.2
	国産	6.9	28.3
	国産	9.0	34.4
	国産	62.3	101.7
	国産	2.8	113.2
	国産	7.0	7.9
	国産	21.0	23.6
	国産	32.7	208.2
	国産	-	23.6
	国産	12.4	83.2
	国産	3.6	2.8
	国産	3.4	17.6
	国産	4.3	14.8
	国産	3.0	11.6
	国産	32.8	65.0
	国産	14.8	50.2
	国産	15.0	49.4
	国産	200.1	496.9
	国産	12.6	44.9
	国産	36.7	134.2
	国産	57.0	633.4
	国産	32.7	74.9
	国産	144.4	182.8
	国産	236.1	250.0
	国産	N.D.	7.1
	国産	19.2	32.2
	国産	N.D.	8.6
	国産	127.9	174.2
	国産	88.4	150.7
	国産	99.3	134.7
	国産	28.8	52.7
	国産	40.9	19.1
	国産	31.4	9.9
	国産	5.1	N.D.
	国産	14.6	16.5
	国産	N.D.	10.5
	国産	N.D.	N.D.
	国産	N.D.	N.D.
	国産	5.5	14.3
	国産	5.2	40.8
	国産	N.D.	N.D.
	国産	10.5	10.9
	国産	Trace(8)	16
	国産	Trace(9)	122
	国産	33	330
	国産	24	157
	国産	48	77
	国産	-	-
	国産	-	16
	国産	-	Trace(6)
	国産	-	20
	国産	50	116
	国産	10	37
	国産	Trace(6)	173
	国産	20	20
	国産	21	27
	国産	12	Trace(9)
	国産	Trace(6)	63
	国産	-	-
	国産	-	31
	国産	12	101
	国産	10	59

(μg/kg)	NIV	DON
定量限界	5 (一部10.0)	5 (一部10.0)
検出限界	2 (一部5.0)	2 (一部5.0)

回収率 (%)	NIV	DON
10μg/kg	59.2±4.7	82.3±7.3
100μg/kg	77.2±1.5	91.9±2.8

分担研究報告書

カビ毒を含む食品の安全性に関する調査研究  
分析法のバリデーション等に関する研究（I）

研究分担者 田中 敏嗣 神戸市環境保健研究所

研究協力者 望月直樹（アサヒビール株式会社）、  
細井理恵子、宮下隆（キューピー株式会社）、  
門田智之、伊藤勇二（キリンホールディングス株式会社）  
滝埜昌彦（アジレントテクノロジー株式会社）、  
田中宏輝（サントリー株式会社）、  
河本章文、柳田詠美、壽容子、高橋正紀（(社)全日本検数協会）、  
杉浦義紹（神戸市環境保健研究所）

研究要旨 植物病原性がある *Fusarium graminearum*、*F. culmorum* などが産生するデオキシニバレノール(DON)及びニバレノール(NIV)は、単独あるいは同時汚染がしばしば報告され、継続的な汚染調査が求められるカビ毒であり、DON、NIV 同時分析法の確立が重要となる。本研究では規格基準に対応したバリデートされた分析法、ELISA 法による迅速分析法および品質管理に適用できる簡便、迅速分析法の構築を目的に検討した結果、精度管理された方法として LC 及び LC/MS で測定する方法が推奨された。また、DON、NIV の高感度認識モノクローナル抗体が得られ、ELISA 法による迅速同時分析の確立が示唆され、抗原抗体反応を用いた Surface plasmon resonance による DON、NIV 分析法の確立の可能性が確認できた。

A.研究目的

カビ毒は自然界に生息するカビによって産生され、しばしば農産物や食品を汚染し、ヒトおよび家畜等に健康被害を引き起こす。植物病原性がある *Fusarium graminearum*、*F. culmorum* などは主要な穀類に圃場で侵害し、デオキシニバレノール(DON)あるいはニバレノール(NIV)を産生することから汚染防除が極めて困難であり、また

その単独あるいは複合汚染がしばしば報告<sup>1)3)</sup>されており、継続的な汚染調査が必要となるカビ毒である。したがって、DON、NIV 同時分析法の確立が重要となる。

DON、NIV の化学性状は極性が高く難揮発性でかつ、蛍光はなく UV 吸収も弱い。特に DON の 4 位が OH 基の NIV は DON に比べ極性が高く、分析法の報告も少ない。測定法としては

HPLC 分析が有効であるが、ppb レベルの高感度分析には誘導体化し、GC/ECD、GC/MS による測定法や誘導体化を必要としない LC/MS、LC/MS/MS を用いた分析法の確立とそのバリデーションが必要となる。さらに、生産、製造等の各段階におけるモニタリングや品質管理に適応し、高性能な機器を必要としない ELISA などの簡易迅速分析法の開発も求められる。

本研究ではそれぞれの汚染調査の目的に適応した DON、NIV 同時分析法を確立するために次の 3 項目について検討した。

1. LC 及び LC/MS による小麦中の DON、NIV 同時分析法の検討：食品衛生における規格基準に対応したバリデートされた分析法の確立ため、試料量、抽出、精製の各段階の基礎的データを検討する共同試験を実施した。

2. DON 及び NIV を認識するモノクローナル抗体の開発とその応用：DON に比べ開発が遅れている NIV の抗体を作製し、ELISA 法による迅速分析法を検討した。

3. Surface plasmon resonance (SPR) を用いた DON、NIV 分析法の検討：DON、NIV は小麦、大麦、トウモロコシなどの穀類中の汚染があることから加工食品を製造する段階での品質管理に適用できる簡便、迅速な分析法の構築を目的に抗原抗体反応を用いた SPR による方法を検討した。

まず、項目 1 の小麦中の DON 及び NIV 同時試験法の検討について報告する。DON については平成 15 年（2003 年）厚生労働省通知食安発第 0717001 号により LC で測定し、LC/MS あるいは GC/MS で確認する小麦中の DON 試験法が示されている。また、著者らは本法の妥当性評価試験の結果も報告<sup>4)</sup>してきたが、NIV 測定への適応性は検討されていない。DON の 4 位に OH 基をもつ NIV は DON に比べ極性が高く、DON と異なる

化学性状を示すことから、測定値に影響を及ぼす項目について 3 機関の共同試験により小麦中の DON、NIV 同時分析法をバリデートするための条件を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 供試試料

自然汚染農産物に深在するカビ毒の特性を考慮し、DON および NIV の自然汚染小麦を用いた。これを粉砕し、1mm の篩を通したものを試料とした。

### 2. 精製カラム

2 種類の以下に示す市販の多機能カラムを比較検討した。

1) Autoprep MF-T1500（昭和電工社製）

2) MultiSep#227（Romer Labs. Inc. 社製）

### 3. 試験溶液の調製

試験溶液の調製手順として DON、NIV の測定値に影響を及ぼす項目として試験試料の採取量、抽出時間、精製カラムの種類を変えた 6 種類の試験法を作成した。その一例として図 1 に試験法 1-1 および 1-2 を示した。その概要は以下の通りである。

1) 試験法 1-1：試料 25g を 100ml の抽出液を加え、10 分間放置後 30 分間振とう抽出した試料溶液を多機能カラム Autoprep MF-T1500 で精製し、試験溶液を調製した。試験溶液は LC および LC/MS を用いて DON、NIV の濃度を測定した。

2) 試験法 1-2：試験法 1-1 と同様に操作し、多機能カラムによる精製は MultiSep#227 を用いた。

3) 試験法 2：試験法 1-1 と同様に操作し、抽出時間を 60 分とした。

4) 試験法 3-1：試料 50g を 200ml の抽出液を加え、試験法 1-1 と同様に操作した。

フロー図	手順、条件	注 解
試料調製	試料を粉碎する	1mm以下粉碎、調製 冷凍保存する
試料の秤量	25.0gを200ml三角フラスコに量り採る	試料は室温にもどす
抽 出	アセトニトリル・水 (85:15) 100mlを加える 10分間放置する 30分間振とう機で振とう抽出する	振とう器 (通常速度)  (例 : 300-350SPM)
遠心分離	上澄みを50ml遠沈管に移す 3000r. p. m. 5分間遠心分離をする	50ml遠沈管 または同等品を使用
抽 出 溶 液	遠心分離後の上清液を抽出溶液とする	
精 製	試験法1-1 : MF-T1500カラムを使用 試験法1-2 : MultiSep#227カラムを使用 抽出溶液適量を1mL/minの流速で流す	自然落下で可能 自然落下で可能 抽出溶液各10-20mLが必要
流出液の分取	①初めに流出する4mLは捨てる。 ②次に流出する4mLを分取する。 ③分取した溶液を別のバイアル2本に正確に 2.0mL (HPLC用) 及び1.0mL (LC/MS用) を分取 する	MF-T1500カラム, MultiSep#227 カラムそれぞれに実施する  (0.5g/1バイアル : LC用及び 0.25g/バイアル : LCMS用)
濃縮乾固	45°C以下、窒素気流で濃縮乾固	バイアルはそれぞれ LCおよびLCMS測定用
試験溶液	LC測定の場合 H <sub>2</sub> O-MeOH-CH <sub>3</sub> CN (90:5:5) 1.0mLで溶解 ボルテックスした後5分間ソニケート 孔径0.45 μmメンブランフィルターでろ過 LCに供する  LCMS測定の場合 (0.25g/バイアル) 10mM酢酸アンモニウム-MeOH (90:10) 等 移動相1.0mLで溶解 ボルテックスした後5分間ソニケート 孔径0.45 μmメンブランフィルターでろ過 LC/MS (MS) に供する	(0.5g/バイアル) (0.5g/mL)  (0.25g/バイアル)  (0.25g/mL)、測定感度により適 宜希釈する (内容を記載)

図 1 LC および LC/MS による DON、NIV 同時試験法 1-1 および試験法 1-2

5) 試験法 3-2: 試料 50g を 200ml の抽出液を加え、試験法 1-2 と同様に操作した。

6) 試験法 4: 試料 50g を 200ml の抽出液を加え、試験法 2 と同様に操作した。

#### 4. 測定法

##### 1) LC 測定条件

カラム: ODS (4.6mm i.d. × 250mm)

カラム温度: 40°C

移動相: アセトニトリル・水・メタノール  
(5:90:5)

検出器: UV220nm

##### 2) LC/MS/MS 測定条件

カラム: ODS (2.1mm i.d. × 150mm)

カラム温度: 40°C

移動相: A 液: 10mM 酢酸アンモニウム

B 液: メタノール (90:10)

イオン化: ESI-Negative

モニターイオン: DON: 355.1/295.1

NIV: 371.1/281.2

#### C. 研究結果および考察

6 種試験法で調製した試験溶液を LC および

LC/MS で測定した DON および NIV の値と試験法

1-2 を 100 としてその他の 5 種の試験法で得られた値と比較した数値を表 1 に示した。

精製に用いた 2 種類の多機能カラム、Autoprep MF-T1500 による試験法と MultiSep#227 による試験法 1-2、3-2 での測定値の比較は試験法 1-1、3-1 が低い値が認められ、MF-T1500 の吸着が強い可能性が示唆されたが回収率に影響を与えるものではなかった。試料量 25g (試験法 1-1、1-2) と 50g (試験法 3-1、3-2) を比較した場合、試験法 3-1 が DON、NIV とともに若干低い値を示したが、有意な差は認めなかった。また、抽出時間 30 分 (試験法 1-1、3-1) と 60 分 (試験法 2、4) をそれぞれ比較した値に違いは認められなかった。以上の結果からいずれの試験法も DON、NIV 同時分析法として採用可能であるが、カビ毒を扱う観点から、必要最小限の試料量および迅速性を考慮し、試験法 1-1 および 1-2 が推奨された。

また、本法の定量限界は LC 測定の場合 50ng/g、LC/MS 測定の場合 5ng/g であった。今後、本法を小麦およびパン等の小麦加工品の汚染実態調査に適用し、DON および NIV の人への暴露評価等を実施していく予定である。

表 1 6種試験法のLCおよびLC/MSによるDON、NIVの測定値と試験法1-2に対する測定値比

試験法	LCによる測定値 (ng/g)				LC/MSによる測定値 (ng/g)			
	DON		NIV		DON		NIV	
	実測値	対(1-2)	実測値	対(1-2)	実測値	対(1-2)	実測値	対(1-2)
1-1	1930	94.1	660	96.9	2261	96.9	740	100.8
1-2	2050	100.0	681	100.0	2333	100.0	734	100.0
2	1935	94.4	660	96.9	2177	93.3	684	93.2
3-1	1905	92.9	597	87.7	2242	96.1	678	92.4
3-2	2014	98.2	621	91.2	2343	100.4	695	94.7
4	1938	94.5	609	89.4	2254	96.6	671	91.4



D.文献

- 1) Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U.-S., Sugiura, Y., Ueno, Y.: *J. Agric. Food Chem.* **36**, 979-983 (1988)
- 2) Yoshizawa, T.: in *Mycotoxins and Animal Foods*, Smith, J.E. and Henderson R.S. eds., CRC Press, Inc., pp. 306-312 (1991)
- 3) *Environmental Health Criteria 105*, Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecens, Ergot, WHO, Geneva, (1990)
- 4) Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Tabaka, S., Nakajima, M., Nouno, M., Nakaie, Y., Chonan, T., Aoyagi, M., Kibune, N., Mizuno, K., Ishiguro, E., Kanamaru, N., Minamizawa, M., Aita, N., Kushiro, M., Tanaka, K., Takatori, K.: *Mycopathologia*, **161**, 239-243 (2006)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性・安心確保推進研究事業）  
分担研究報告書

カビ毒を含む食品の安全性に関する調査研究  
分析法のバリデーション等に関する研究（Ⅱ）

研究分担者 田中 敏嗣 神戸市環境保健研究所

研究協力者 田中宏輝 サントリー株式会社

研究要旨 植物病原性がある *Fusarium* 属菌は圃場で小麦等の主要穀類に寄生しトリコテセン系マイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) による単独あるいは同時汚染をまねく。このことから、DON、NIV は、継続的な汚染調査が求められるカビ毒であり、同時分析法の確立が重要となる。本研究では、ELISA 法による迅速な DON、NIV 同時分析法の確立を目的に検討した結果、DON、NIV の高感度認識モノクローナル抗体が得られ、ELISA 法による迅速同時分析の確立が示唆された。また ELISA 測定値と化学分析測定値との間に相関があることも示された。

#### A. 研究目的

麦類などの穀類は、しばしば *Fusarium* 菌の侵害を被る。特に、出穂期から収穫期の長雨、低温は深刻な病害の原因となる。*Fusarium* 菌が産生するカビ毒、デオキシニバレノール (DON)、ニバレノール (NIV) は穀類を汚染し、食品や飼料を通じてヒトや動物に健康被害を引き起こす。このことから、安全な食料の安定的供給及び人の健康影響を考える上でトキシンの汚染実態把握とその影響評価は、極めて重要な課題である。2002年、厚生労働省は、DON について小麦に対する暫定基準値 1,100 µg/kg を設定し、分析法も提示した。一方 DON と構造や毒性が類似した NIV は DON と同様に穀類汚染の報告があるが、規制値や分析法が示されていない。このような背景から、DON 及び NIV を穀類から効率良くかつ迅速に測

定できる分析法の開発が必要となっている。さらに生産、製造等の各段階におけるモニタリングや品質管理の現場では、高性能の機器を必要とせず、簡便、迅速に分析を行うことができる酵素免疫測定法 (ELISA 法) などの簡易迅速分析法の開発も求められている。

現在、マイコトキシン用 ELISA キットとしては、アフラトキシン用、オクラトキシン A 用及び DON 用等数種が市販されているが、NIV 単独あるいは DON、NIV を同時に測定する ELISA キットは開発されていない。

その理由として、NIV に関する汚染実態、毒性等の影響評価研究の遅れ及び NIV のみを認識する抗体作成の困難さが挙げられる。

そこで、本研究では、DON とともに NIV も認識するモノクローナル抗体を作製し、ELISA 法に

よる迅速同時分析の検討を目的とした。

## A. 研究方法

### 1. モノクローナル抗体の作製

NIV にグリシンをスペーサーとして結合させ、オボアルブミンとコンジュゲートを作製、抗原とし、Balb/c マウスメスに免疫した。抗体価は、抗原を作製した時と同様の方法で牛血清アルブミンを結合させ、コーティングタンパク質とし、測定した。

### 2. 競合的 ELISA 法の確立

NIV モノクローナル抗体をコーティングし、40、一昼夜反応させた後、PBS に 1%濃度に溶解したポリビニルアルコールでブロッキングを行った。別のプレートで DON、NIV 標準溶液または DON 及び NIV 添加玄麦水溶液と同量の DON・ホースラディッシュパーオキシダーゼ(DON-HRP)をよく混和した後、NIV モノクローナル抗体をコーティングしたプレートに移し、30 分間反応させた。発色は TMB を用いて行った。

## B. 研究結果及び考察

### 1. NIV モノクローナル抗体の性質

本研究で得られたモノクローナル抗体は、化学的処理等を必要とせず、直接 NIV を感度高く認識し、その IC<sub>50</sub> は、27.5 ng/mL であった。NIV 以外のトリコテセンマイコトキシンに対する IC<sub>50</sub> は、3-アセチル DON、DON、15-アセチル DON、及びフザレノン-X に対して、それぞれ 1.7、15.8、68.9 及び 1740 ng/mL であった。この結果から、本モノクローナル抗体は、3-アセチル DON を最も強く認識しているが、NIV に対しても高い親和性を有していることが明らかになった (図 1 ㉒)。また DON-HRP を用いた競合的 ELISA 法では、DON 及び NIV において、同程度の反応結果が得られた (図 2 ㉒)。

さらに本研究で得られた NIV 抗体の性質を比較、検討するため、以下のような IC<sub>50</sub> 値を示す DON 抗体を以後の実験において用いた。すなわち DON、3-アセチル DON 及び 15-アセチル DON に対して IC<sub>50</sub> 値がそれぞれ、18.2、2.88 及び 558 ng/mL、NIV 及びフザレノン-X に対しては、2000 ng/mL 以上の抗体である。これらの値からこの抗体は NIV を認識しないということが確認できる ㉒)。

### 2. DON 及び NIV 測定のための ELISA 法の確立

上記で得られたモノクローナル抗体を用いて、DON、NIV の検量線を作製した。DON、NIV に対してそれぞれ、0.02~5.0 mg/kg の濃度範囲で r<sup>2</sup>=0.980 以上の直線性が得られた。また玄麦を用いた添加回収試験では DON 及び NIV を単独で添加した場合と混合で添加した場合とで結果の比較を行った。さらに定量する際には、標準溶液のみ (Solvent STD) の場合の定量と、玄麦マトリクスを混合した標準溶液 (Matrix STD) での定量の場合とで結果を比較した。

その結果、DON、NIV それぞれを単独で玄麦に添加した場合、Solvent STD、Matrix STD いずれにおいても良好な回収率が得られた (表 1)。一方、DON、NIV を混合で添加した場合、DON 抗体をコーティングしたプレートで DON を定量し、NIV 抗体をコーティングしたプレートでの定量値からその DON 定量値を差し引いた値を NIV 定量値として求めたところ、良好な結果が得られた (表 2、図 3)。

次に DON、NIV 自然汚染小麦試料 (2 検体) を用いて定量を行い、さらに同様の試料を UV 検出器付き HPLC (LC/UV) 及び LC/MS においても定量を行った。

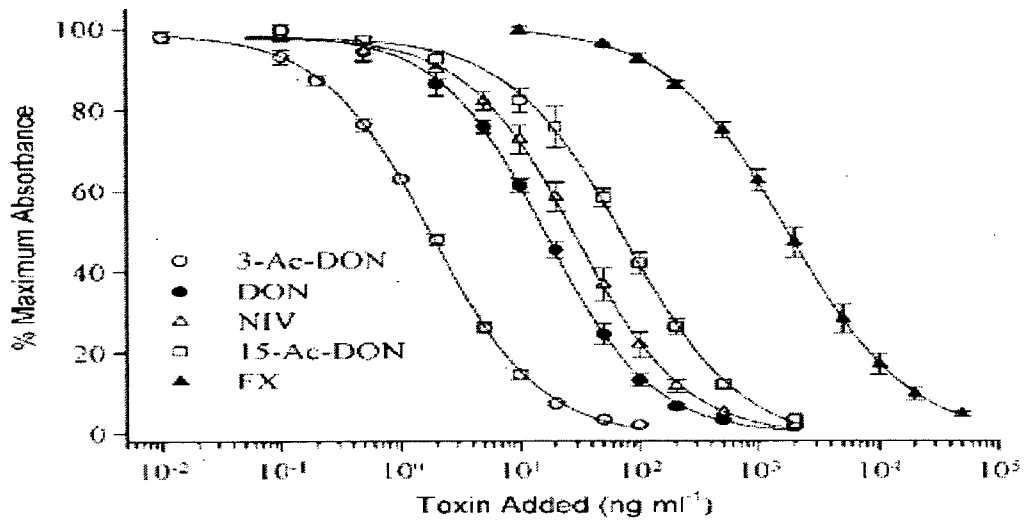


图 1 Response of 5 trichothecenes in the CI-ELISA with Mab 1-6.2.6. Curves are the fit of a logistic dose-response equation to 11 concentrations of toxin and a non-toxin control. Points shown represent the average  $\pm 1$  standard deviation of data from 4 to 8 replicate plates, with quadruplicate replicates at each concentration on each plate.

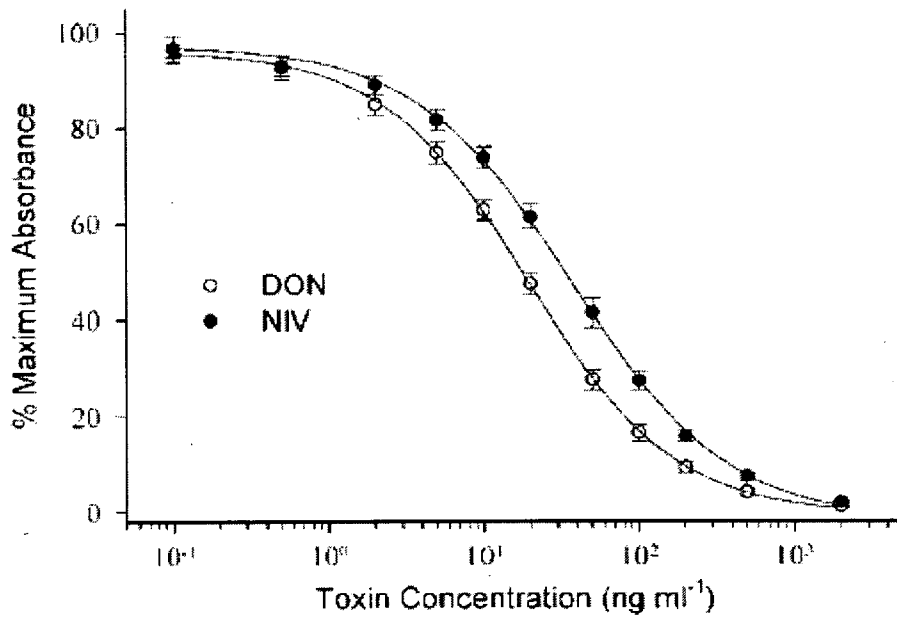


图 2 Response of the CD-ELISA with Mab 1-6.2.6. Curves are the fit of a logistic dose response equation to 11 concentrations of toxin and a non-toxin control. Points shown represent the average  $\pm 1$  standard deviation of data from 9 replicate plates, with quadruplicate replicates at each concentration on each plate.