

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と  
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

カビ毒産生菌の生態学的研究

研究分担者 作田庄平 東京大学大学院農学生命科学研究科  
研究協力者 吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

国産大豆、国産小豆あるいは外国産小麦より研究分担者(渡辺麻衣子)が分離した *Fusarium* 属菌の代謝産物を分析する方法の検討を行った。それぞれのカビを液体培地で静置培養し、得られた培養液上清の酢酸エチル抽出物を分析サンプルとした。4種のカビ毒(T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ネオソラニオールおよびジアセトキシシルペノール)が良好に分析できる LC-TOF/MS の分析条件を用いて、11種のカビについて代謝産物を調べた。その結果、11種合計で580の代謝産物が検出され、また、標準品とした4種のカビ毒の生産性については、T-2 トキシン生産菌が1株、ジアセトキシシルペノール生産株が4株であったことより、本分析法は、次年度以降で行う多くの菌株についての代謝産物の分析に有効であると考えられた。

A. 研究目的

過去の研究から、輸入コムギ、国産小豆等において、フザリウムトキシンの一種であるゼアラレノン、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの高濃度・高頻度の汚染が確認されている。しかし、これらのフザリウムトキシンの原因菌については、明らかにされていない。また、原因菌は、菌種によって、これらのフザリウムトキシンと同時に、これまで国内流通食品において汚染状況が知られていなかった複数のマイコトキシンを産生する可能性が高いことも考えられる。そこで、国内流通食品における、これら複数のフザリウムトキシンによる汚染のリスクを明らかにするために、研究分担者の渡辺麻衣子が国産および輸入食品から分離した *Fusarium* 属菌について、それら菌株の生産す

るマイコトキシンを同定することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. カビの培養

渡辺が国産小豆、国産大豆あるいは外国産小麦から単離した11種のカビ(表1)について、以下の組成の液体培地 100 mL を入れた 300 mL 容三角フラスコで7日間、25℃で静置培養を行った。

培地組成(1L当り)

硝酸ナトリウム	2.0 g
リン酸水素二カリウム	1.0 g
塩化カリウム	0.5 g
硫酸マグネシウム	0.5 g

酵母エキス 2.5 g  
ポリペプトン 5.0 g  
スクロース 50 g

キャピラリー電圧：3500 V  
検出範囲： $m/z$  70 ~ 950  
イオンモード：positive

## 2. 抽出液の調製

ろ過により菌体を除去した培養液 500  $\mu$ L に対して酢酸エチル 500  $\mu$ L を加え、激しく攪拌後、遠心分離 (12000 g, 5 分) を行った。上清の酢酸エチル層を回収し、同様の操作をもう一度繰り返して抽出を行った。2 回の酢酸エチル抽出液を合わせて、窒素気流下乾固した。乾固物に 100  $\mu$ L のアセトニトリルを加えて超音波処理によって懸濁後、900  $\mu$ L の蒸留水を加えてよく混ぜた。遠心分離 (12000 g, 5 分) 後、上清を MS 分析に用いた。

## 3. LC-TOF/MS による分析

抽出液に含まれる代謝物を以下の条件で検出した。

### HPLC

機種種：Agilent 1200 series  
カラム：InertSustain C18  
150 mm  $\times$  2.1 mm i.d., 3  $\mu$ m  
カラム温度：40  $^{\circ}$ C  
移動相：A 10 mM 酢酸アンモニウム  
B アセトニトリル  
分離条件：0 分 A : B = 90 : 10  
40 分 A : B = 18 : 82  
流速：0.2 mL/分  
注入量：2  $\mu$ L

### MS

機種種：Agilent 6530 Q-TOF  
イオンソース：ESI Agilent Jet Stream  
ガス温度：325 $^{\circ}$ C, drying gas  
ガス流量：10 L/分  
ネブライザー圧力：30 psi

## C. 研究結果

### 1. 標準品の測定

上述の分析法が既知のカビ毒を検出できるかどうかを調べるために、4 種のカビ毒標準品を測定した。T-2 トキシンと HT-2 トキシンの混合液のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を図 1 に、ネオソラニオール (NES) とジアセトキシシルペノール (DAS) の混合液の TIC を図 2 に示した。T-2 トキシンは保持時間 28.4 分に  $m/z$  484.2546  $[M+NH_4]^+$ 、HT-2 トキシンは保持時間 23.6 分に  $m/z$  442.2440  $[M+NH_4]^+$  が検出され、NES は保持時間 13.0 分に  $m/z$  400.1967  $[M+NH_4]^+$ 、DAS は保持時間 21.6 分に  $m/z$  384.2021  $[M+NH_4]^+$  が検出された。

### 2. カビの代謝物の測定

カビ無添加の培地と 11 種のカビの培養液の酢酸エチル抽出物を LC-TOF/MS で分析した (0006 株についての分析例を図 3 に示した)。イオンカウントが 10000 以上のものを選択し、カビ無添加の培地で検出された化合物を除いた結果、580 種の化合物が検出された。その一部を表 2 に示した。標準品と保持時間が一致することからリスト中の推定分子量  $C_{24}H_{37}NO_9$  の化合物は T-2 トキシン、 $C_{19}H_{29}NO_7$  の化合物は DAS と考えられた。つまり 0020 株が T-2 トキシン生産菌、0011、0016、0018 及び 0019 株が DAS 生産菌であった。

## D. 考察

多くの *Fusarium* 属菌それぞれの株が生産する代謝産物を特徴付けるためには、サンプルの調製が簡便であることと、1 回の分析で多数の化合物の存在を推定できることが重要となる。

今年度検討した LC-TOF/MS による分析は、少量の培養液の酢酸エチル抽出物を用いて行うためサンプル調製に手間がかからず、また、数百の代謝産物を区別して分析することが可能である。従って、今回は4種の標準品についての生産性が示されたが、他の標準品や TIC において特徴的な化合物について今後調べて行くことにより、それぞれの菌株のマイコトキシン生産性についての情報を得ることが可能になったと考えられる。

#### E. 結論

国産大豆、国産小豆等から分離された *Fusarium* 属菌の代謝産物を、簡便かつ多種に渡り分析する方法を確立した。

#### F. 研究業績

【学会、論文発表】

なし

表 1 培養液を調製したカビの由来と同定結果

株番号	由来	産地	生産年	同定結果
0006	小豆	山形県	2012	不明
0010	小豆	熊本県	2012	不明
0011	小豆	熊本県	2012	<i>Fusarium semitectum</i>
0013	小豆	熊本県	2012	<i>Fusarium semitectum</i>
0014	大豆	茨城県	2011	不明
0015	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0016	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0017	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0018	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0019	大豆	茨城県	2011	不明
0020	小麦	アメリカ (24-FW54)	2012	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (形態観察のみ)

表 2 検出された化合物のリストの一部

推定分子式	分子質量	保持時間 (分)	株番号									
			0006	0010	0011	0013	0014	0015	0016	0017	0018	0019
イオンカウント												
C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	141.0424	2.9			1618509			1034790	440053	852836	1746376	2259217
C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	234.1623	20.2	1905641					119604	389306	214155		309677
C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	314.1386	21.2		24171478								2505805
C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	330.1335	17.7		46644168								25343652
C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>	373.2260	32.9			4861740				1513450	2965083	855850	1012209
C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>7</sub>	383.1953	21.6			1259118				305922		397341	4674189
C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NO	413.1694	17.6			1668987				367909	114025	695786	495151
C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>9</sub>	483.2473	28.5										304752

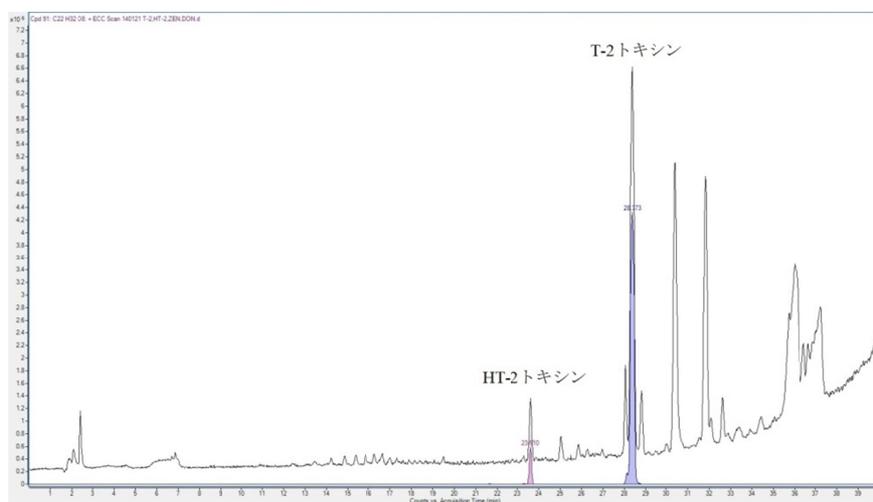


図1 T-2 トキシンと HT-2 トキシンの TIC

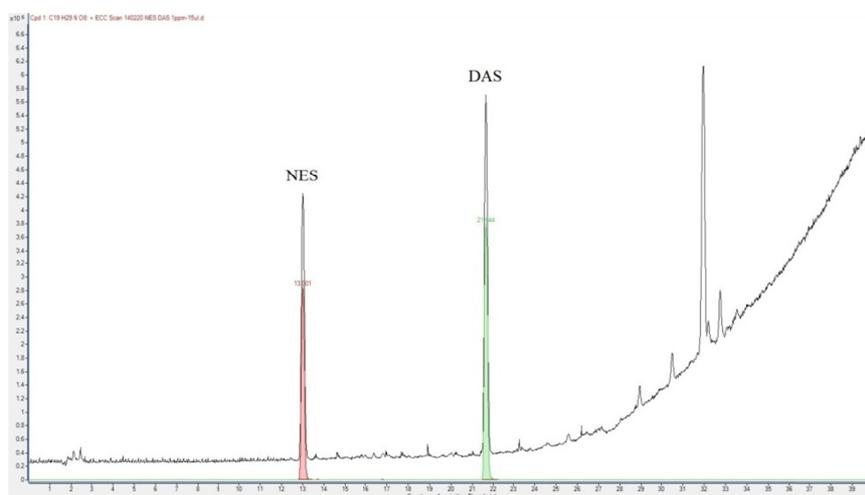


図2 ネオソラニオール (NES) とジアセトキシルペノール (DAS) の TIC

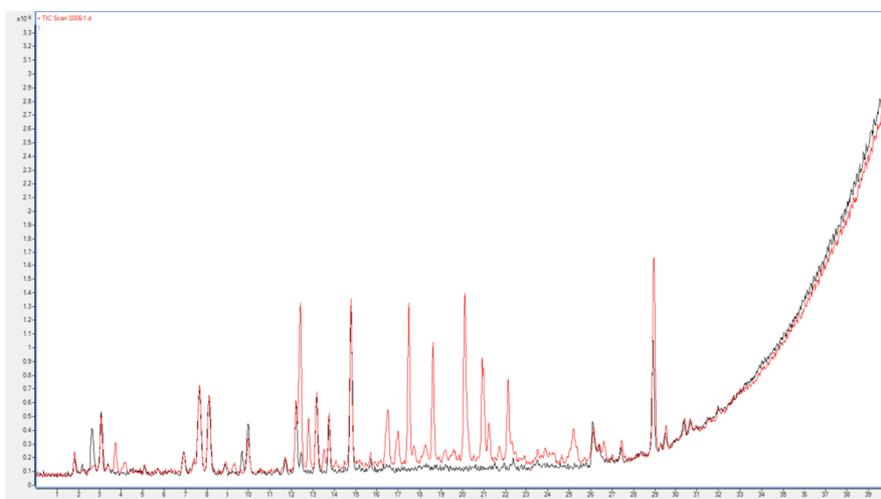


図3 0006 株培養液抽出物の TIC (抽出物の TIC (赤) と培地の TIC (青) を重ねて表示)