

厚生労働科学研究（厚生労働科学特別研究事業）

分担研究報告

研究課題： わが国における玄米中のデオキシニバレノール及びニバレノール汚染の実態

分担研究者： 芳澤宅實（香川大学農学部 教授）

研究協力者： 田中敏嗣（神戸市環境保健研究所 部長）

研究要旨

平成 13 年と 14 年度国内産玄米 124 試料のうち、デオキシニバレノール（DON）汚染は 4 試料（4.6 - 40.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、平均 21.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）、ニバレノール（NIV）汚染は 15 試料（2.0 - 17.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、平均 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）に認められ、DON と NIV の同時汚染は 1 試料であった。今回の調査により DON や NIV による国内産米の汚染の事実が明らかとなった。検出された DON 及び NIV の玄米汚染濃度は極めて低いが、汚染濃度によっては精米後の白米に残存することが示された。また、DON 及び NIV の汚染に地域的な差異の可能性も示唆された。

A. 研究目的

昨年度の厚生科学特別研究事業¹⁾において、わが国で流通している小麦等のデオキシニバレノール（DON）汚染の実態調査を行なった結果、国内産小麦の一部に、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）²⁾で設定した暫定耐容摂取量（PMTDI、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日）を越える摂取量を招来すると推定されるレベルの汚染が認められた。このことを受けて、厚生労働省は小麦中の DON の暫定基準値（1,100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を定め、汚染小麦が市場に流通しないよう行政指導³⁾を行った。

一方、小麦と並んで消費量の多い米の汚染については、一部の国において DON 汚染²⁾が認められており、また、わが国における過去の赤カビ中毒事故例の中にも米を原因とする事例⁴⁾（参考資料 I 参照）があることから、DON 等の赤カビ毒による米の汚染が危惧される場所である。わが国の成人（体重 50kg）の 1 日当り米摂取量（国民栄養調査による）を 158.9 g として DON の PMTDI 値に相当する玄米中の DON レベルを仮に算出すると、0.315 mg/kg（315 ppb）となる。しかしながら、わが国における米の汚染データはほとんど見当たらない。米や小麦のような主食の汚染実態を究明することによって、人の暴露実態を包括的に把握し、健康リスクをより精確に明らかにすることが可能となる。そこで、本研究では昨年度の厚生科学特別研究で実施した小麦の DON 汚染調査に引き続いて、平成 13 年及び 14 年度産の国産玄米中の DON 及びニバレノール（NIV）の汚染実態を検討した。

[参考資料]

表. わが国における赤かび汚染食品が原因と考えられるヒトの食中毒事例

年	地域	原因食品	患者数
1946	東京	コムギ粉	60
1949	北海道	コムギ粉	86
1950	北海道	コムギ粉 (うどん、パン)	75
1951	北海道/十勝	コムギ粉 (うどん)	53
1954	東京	米飯	25
1955	東京/保谷	米飯	30
1955	高知、栃木、神奈川、茨城	米飯	4 家族
1955	静岡/磐田	はったい粉	5
1956	北海道/本別	コムギ粉 (うどん)	43
1956	北海道/本別	コムギ粉 (うどん)	60
1957	神奈川/相模原	米飯	6
1957	鹿児島	米飯	記録なし

B. 研究方法

1. 国内産玄米試料

平成 13 年度玄米を 21 道県から 24 試料、平成 14 年度産玄米については前年度の全国米生産量におおむね比例して 33 道府県から 100 試料を、各試料とも 2 kg 収集した。全国のブロック別の内訳を表 1 に示した。それぞれの玄米試料から 300 g を採り、サーモミックで粉砕して分析試料とした。

表 1. 玄米試料のブロック別集計

生産ブロック	分析試料数		合計
	平成 13 年	平成 14 年	
I	6	31	37
II	7	36	43
III	8	22	30
IV	3	11	14
合計	24	100	124

2. 機器

- (ア) 粉碎機：サーモミックス（フォアベルク日本）
- (イ) 精米機：中村式精米機ゆたか号（中村製作所）
- (ウ) 多機能固相抽出カートリッジ：MultiSep # 227（Romer社）
- (エ) ガスクロマトー質量分析計(GC-MS)：QP-5000（島津製作所）
- (オ) ECD 検出器付ガスクロマトグラフ(GC-ECD)：GC 5890 II（Hewlett Packard社）
- (カ) 液体クロマトー質量分析計(LC-MS)：Agilent 1000 LC, Agilent 1100MSD SL (Agilent社)

3. 試薬

- (ア) 抽出溶媒：アセトニトリル-水（85:15）
- (イ) トリメチルシリル(TMS)化試薬（TBT 試薬）：トリメチルクロロシラン + N,O-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド + 1-トリメチルシリルイミダゾール（2：3：3、v/v/v）

4. 標準物質溶液の調製

DON 標準溶液(0.1 mg/ml)と NIV 標準溶液(0.1 mg/ml)をそれぞれ希釈して 500 ng/ml とした。内標物質スシルペントリオール (SCP) の標準溶液(0.1 mg/ml)をエタノールで希釈して 500 ng/ml とした。

5. 試料溶液の調製

- (ア) 粉碎試料 50 g にアセトニトリル：水（85：15）200 ml を加え 30 分間振とうして抽出した。これを遠心チューブに移し、3000 rpm, 10 分間で遠心分離した。
- (イ) 上澄み液を多機能固相抽出カートリッジ (MultiSep #227) に負荷してクリーンアップした。最初の 3.0 ml は捨て、次に 4.0 ml, 2.0 ml, 2.0 ml を順次バイアルに採り、それぞれをブロックバス上で気流下で濃縮乾固した。
- (ウ) 抽出溶液 4.0 ml を乾固した残渣にメタノール 1.0 ml を加えて、2 分間超音波処理して溶解し試料溶液とした。
- (エ) ミクロチューブに SCP 溶液 40 μ l、試料液 500 μ l を移して、40 $^{\circ}$ C のブロックバス上で気流下で濃縮乾固した。
- (オ) これに TBT 試薬 25 μ l を加え、密栓して 50 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた。これにヘキサン 100 μ l とリン酸緩衝液 200 μ l を加え、ボルテックスで約 30 秒間攪拌してから、ヘキサン層を別のミクロチューブに採り、密栓してこれを分析試料溶液とした。

6. 定量

分析試料溶液 2.0 μ l を GC-MS に注入し、試料溶液から得られたクロマトグラムを標準品のピークと比較して定性した。また内標物質 (SCP) を用いたピーク面積法により作成した検量線 (図 1) を用いて定量した。また、TMS 誘導体を GC-ECD 分析、あるいは誘導体処理せずに LC-MS を用いた定量・確認についても検討した。

7. GC-MS 分析条件

カラム：DB-1（内径 0.25 mm×長さ 30 m、膜厚 0.25 μm、J&W Scientific）、キャリアーガス及び流量：He ガス 2.0 ml/min、カラム温度：120℃ (5 min) - 6.4℃/min - 280℃ (30 min)、注入口温度：280℃、インターフェース温度：250℃、注入方式：スプリットレス、選択イオン：DON (m/z 422, 407); NIV (m/z 379, 289); SCP (m/z 277, 212)

8. LC-MS 分析条件

[LC]：カラム：Zorbax Eclipse XDB C18（内径 3 mm×長さ 150 mm、粒径 5 μm）；移動相：A: メタノール；B: 10 mM 酢酸アンモニウム、10% A/B - (20 min) - 50% A/B；流速：0.5 ml/min；カラム槽温度：40℃；注入量：10 μl

[MS]：イオン化法：大気圧光イオン化負イオンモード、走査範囲：m/z 100-500、選択イオン：DON (m/z 355)；NIV (m/z 371)、噴霧ガス：N₂ (55 psi)、フラグメンター電圧：100 V、脱溶媒ガス：N₂ (7 L/min, 350℃)、気化温度：300℃

C. 結果

今回用いた抽出・クリーンアップ法は、麦類中の DON 及び NIV に適用する分析法³⁾を準用したものである。両トキシンを 5 μg/kg 及び 10 μg/kg 添加した時の回収結果（繰り返し 3 回）を表 2 に示した。DON に比べて NIV がやや低い回収率であったが、おおむね良好の結果であった。また、今回の分析条件での定量下限は、両トキシンとも 2.0 μg/kg であった。

表 2. 粉末玄米からのデオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) の添加回収結果

トキシン	添加濃度 (μg/kg)	繰り返し回数	回収率 (%)	標準偏差	変動係数 (%)
DON	5.0	3	104.3	7.1	6.8
	10.0	3	114.5	0.6	0.5
NIV	5.0	3	95.0	4.5	4.7
	10.0	3	81.3	10.5	12.9

平成 13 年度と 14 年度産の玄米のうち、汚染が認められた試料を取りまとめて表 3 に示した。合計 124 試料のうち、DON 汚染は 4 試料 (4.6 - 40.7 μg/kg、平均 21.8 μg/kg)、NIV 汚染は 15 試料 (2.0 - 17.4 μg/kg、平均 5.0 μg/kg) に認められ、DON と NIV の同時汚染は 1 試料 (78.1 μg/kg) であった。汚染試料の平均汚染濃度は DON 4.8 μg/kg、NIV 6.7 μg/kg、DON+NIV

9.0 µg/kg であり、加重平均汚染濃度はそれぞれ 0.7 µg/kg, 0.6 µg/kg, 1.3 µg/kg であった。

汚染が認められた玄米試料の代表的な GC-MS データを図 2 に示した。また、LC-MS を用いて DON 及び NIV を確認した結果を図 3 と図 4 に示した。

表 3. 玄米中のデオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV)

の汚染濃度 (平成13年及び14年国内産玄米合計124試料)				
生産年	試料番号	汚染濃度 (µg/kg)		
		DON	NIV	DON+NIV
平成13年	13-3	5.1	ND	5.1
	13-4	16.8	ND	16.8
	13-12	ND	2.4	2.4
	13-13	ND	2.0	2.0
平成14年	14-14	ND	5.4	5.4
	14-16	ND	5.7	5.7
	14-17	ND	4.0	4.0
	14-18	ND	6.7	6.7
	14-42	ND	5.4	5.4
	14-43	ND	5.6	5.6
	14-61	ND	3.5	3.5
	14-68	ND	2.7	2.7
	14-69	ND	2.3	2.3
	14-70	60.7	17.4	78.1
	14-82	ND	2.5	2.5
	14-86	ND	6.3	6.3
	14-88	ND	3.4	3.4
14-92	4.6	ND	4.6	
	平均	4.8	6.7	9.0
	加重平均	0.7	0.6	1.3

DON 及び NIV による汚染状況をブロック別にまとめ、平成 13 年度を表 4 に、また平成 14 年度を表 5 に示した。DON 汚染は両年度ともブロック I (北東日本) の玄米 (37 試料中 4 試料) から認められた。また、NIV 汚染については、ブロック I が 37 試料中 9 試料 (2.3 - 17.7 µg/kg)、ブロック II (東部日本) が 43 試料中 5 試料 (2.0 - 3.4 µg/kg)、ブロック III (西部日本) が 30 試料中 1 試料 (6.7 µg/kg) であり、ブロック IV (西南日本、14 試料) からは検出されなかった。

今回の玄米試料を用いて、精米 (9 分搗き) によるトキシンの減衰の程度を検討した (表 6)。DON と NIV のいずれにおいても、低濃度汚染 (4.6-6.7 µg/kg) 玄米では、精米後の白米からはトキシンは検出下限 (2 µg/kg) 以下に減少した。これに対して米糠中のトキシン濃度は、玄米汚染濃度の 5-9 倍に増加した。また、今回の調査で最も高濃度で検出された玄米 (試料番号 70) では、精白米から玄米汚染量の約 40% の残存が認められ、米糠には約 60% のトキシンが移行した。(図 5 に GC-MS 分析結果を比較して示した。) さらに DON

または **NIV** が不検出であった多くの玄米では、精米後の米糠でもトキシンが検出されなかったが、試料番号 **42** に示されるように玄米では検出されなかった **DON** が米糠から **10 µg/kg** 検出された事例も認められた (図6)。すなわち、今回の検出下限をさらに低くすることにより、玄米のトキシン汚染頻度はさらに高くなる可能性が示唆された。

表 4. 平成13年度産玄米のデオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) による汚染
(ブロック別集計)

ブロック	試料数	DON汚染		NIV汚染		(DON+NIV)汚染	
		汚染試料数	汚染濃度 µg/kg	汚染試料数	汚染濃度 µg/kg	汚染試料数	汚染濃度 µg/kg
I	6	2 (33.3%)	5.1-16.8	0		2 (33.3%)	5.1-16.8
II	7	0		2 (28.6%)	2.0-2.4	2 (28.6%)	2.0-2.4
III	8	0		0		0	
IV	3	0		0		0	
合計	24	2 (8.3%)	5.1-16.8	2 (8.3%)	2.0-2.4	4 (16.7%)	2.0-16.8

表 5. 平成14年度産玄米のデオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) による汚染
(ブロック別集計)

ブロック	試料数	DON汚染		NIV汚染		(DON+NIV)汚染	
		汚染試料数	汚染濃度 µg/kg	汚染試料数	汚染濃度 µg/kg	汚染試料数	汚染濃度 µg/kg
I	31	2 (6.5%)	4.6-60.7	9 (29.0%)	2.3-17.4	10 (32.3%)	2.3-78.1
II	36	0		3 (8.3%)	2.5-3.4	3 (8.3%)	2.5-3.4
III	22	0		1	6.7	1	6.7

				(4.5%)		(4.5%)	
IV	11	0		0		0	
合計	100	2 (2%)	4.6-60.7	13 (13%)	2.3-17.4	14 (14%)	2.3-78.1

表 6. 玄米中のデオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) の精米後の分布

試料 番号	精米 画分	重量 (g)	DON濃度		NIV濃度	
			µg/kg	分布 (%)	µg/kg	分布 (%)
12	玄米	1000.0	ND		ND	
	白米	908.1	ND		ND	
	米糠	91.9	ND		ND	
14	玄米	1000.0	ND		5.4	
	白米	919.0	ND		ND	
	米糠	81.0	ND		27.3	
16	玄米	1000.0	ND		5.7	
	白米	927.5	ND		ND	
	米糠	72.5	ND		41.7	
18	玄米	1000.0	ND		6.7	
	白米	900.2	ND		ND	
	米糠	99.8	ND		47.9	
31	玄米	1000.0	ND		ND	
	白米	912.8	ND		ND	
	米糠	87.2	ND		ND	
42	玄米	1000.0	ND		5.4	
	白米	917.6	ND		ND	
	米糠	82.4	10.0		47.0	
43	玄米	1000.0	ND		5.6	
	白米	911.0	ND		ND	
	米糠	89.0	ND		35.0	
70	玄米	1000.0	60.7		17.4	
	白米	923.4	25.1	36.0	8.3	44.3
	米糠	76.6	538.9	64.0	127.2	55.7
86	玄米	1000.0	ND		6.3	
	白米	920.6	ND		ND	
	米糠	79.4	ND		43.8	
92	玄米	1000.0	4.6		ND	
	白米	912.3	ND		ND	
	米糠	87.7	24.2		ND	

(注) ND : 不検出 (2ng/g 以下)

D. 考察

今回の全国調査により、DON 及び NIV による国産米 (玄米) の汚染がはじめて明らかとなった。これらのトキシンの検出頻度は **14.5% (18/124)** であり、国産麦類のそれ¹⁾と比較すると低い結果であったが、国産玄米のフザリウムトキシンの汚染の潜在的な可能性を示すものとして認識する必要があると考えられる。

DON 及び NIV の汚染濃度については、汚染試料の平均濃度が **10 µg/kg** 以下であり、加重平均値は **1.3 µg/kg** と極めて低いレベルであった。この結果は、外国で報告されている米の DON 汚染濃度 (4カ国、試料数合計 **203**、加重平均濃度 **150 µg/kg**)²⁾と比較しても格段に低いことを示している。

しかしながら汚染玄米を精米した場合、玄米中の DON 及び NIV 約 **40%**は精白米に残存することが示された。また、米糠には残りの約 **60%**が移行し、濃度は玄米の **5 - 9 倍**に濃縮されることから、米糠の利活用の際に安全性の面から考慮すべきであろう。これらの点に関しては、今回は限られた試料について検討したものであり、今後より詳細に検討する必要がある。

今回の汚染結果をもとに日本人の米からの DON と NIV の摂取量を計算すると、以下のようになる。成人 (体重 **50kg**) の米1日摂取量 **158.9 g** とし、DON あるいは DON+NIV の汚染濃度 (加重平均それぞれ **0.7 µg/kg**, **1.3 µg/kg**) から求めた成人1人当りの暴露量は DON が **122 ng**、DON+NIV が **226 ng** となり、体重 **1kg** 当りのトキシン摂取量はそれぞれ DON **2.44 ng** 及び DON+NIV **4.52 ng** となる。これらの値は DON では PMTDI の **0.22%**、DON+NIV (NIV が DON と同等の毒性であると仮定して) では **0.41%**に相当する。さらに、今回認められた最大汚染濃度をもとに計算しても、PMTDI の **25%**程度である。これらの評価結果から見て、今回認められた玄米の汚染レベルでは、人の健康に直ちに影響を及ぼすものではないと判断できる。

今回の調査結果をブロック別に見ると、DON 汚染はブロック I に、また NIV 汚染は主にブロック I と II に認められ、地域によっては約 **30%**の汚染頻度であった。米の汚染に関し地域的差異の可能性が示唆されることから、今後継続して実態を調査することが必要と考えられる。

[文献]

- 1) 平成 13 年度厚生科学特別研究報告書 (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」
- 2) WHO: Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additive Series 47. World Health Organization, Geneva, 2001.

- 3) 厚生労働省 食発第 0521001 号、小麦中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 14 年 5 月 21 日)
- 4) **Yoshizawa, T.: Red-mold disease and natural occurrence in Japan. In Trichothecenes – chemical, biological and toxicological aspects (ed. Y. Ueno). pp. 195-209, Elsevier. Amsterdam. 1983.**

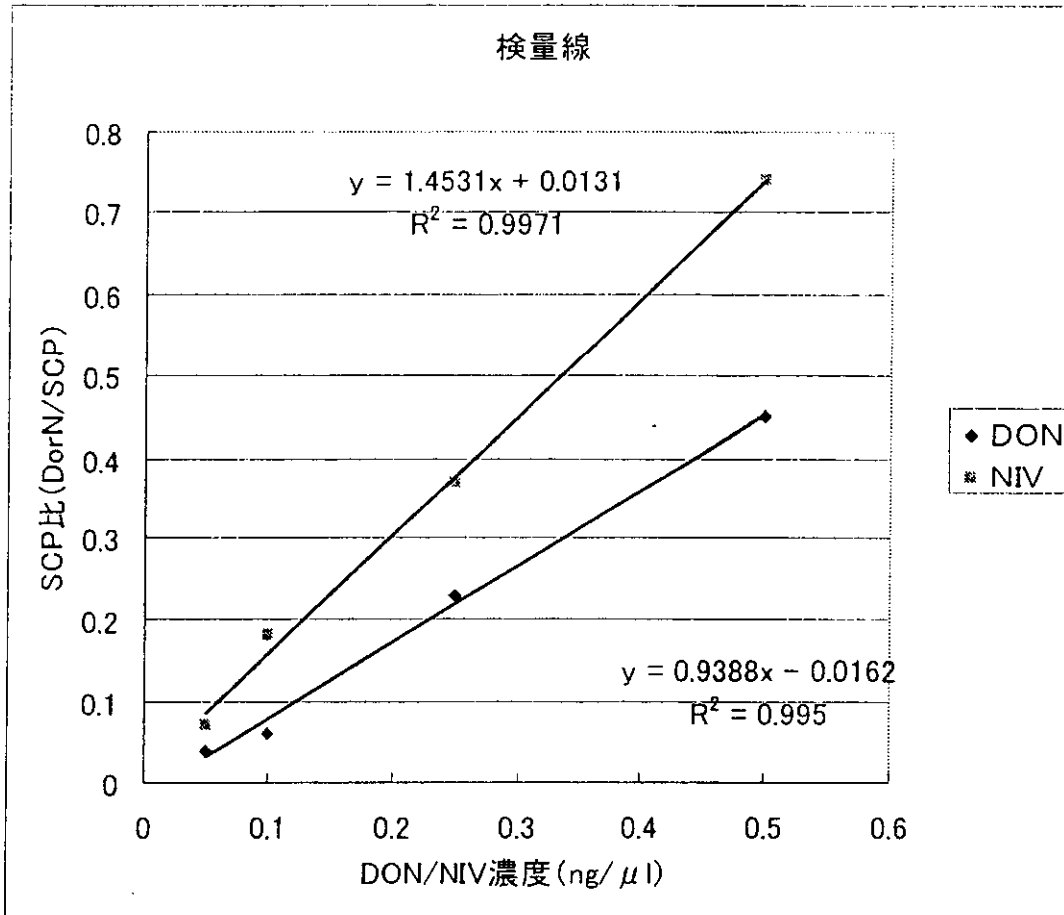
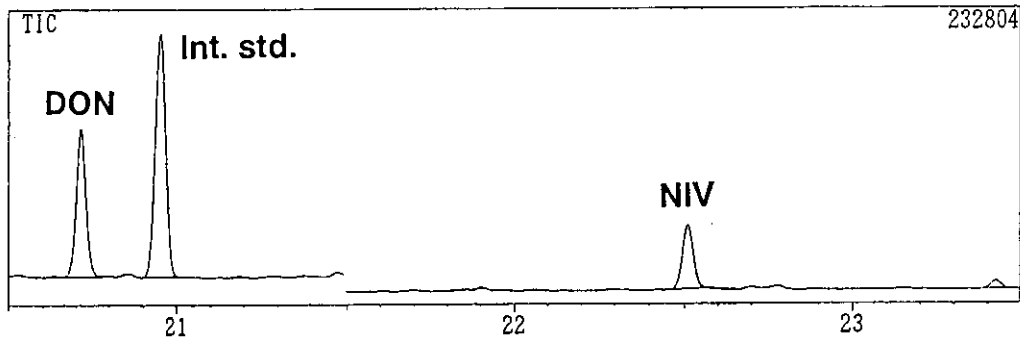
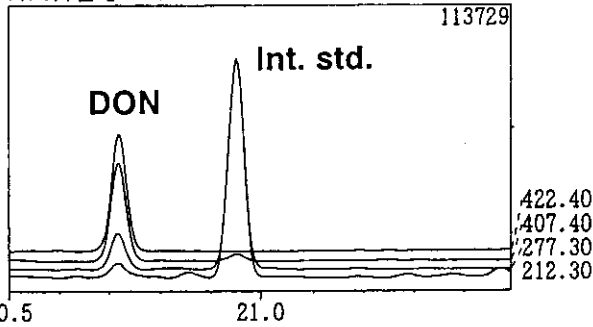


図 1. デオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) の検量線
TMS誘導体をGC-MS (SIM) で分析 (選択イオンは本文に記載)
内標物質としてスシルペントリオール (SCP) を使用

データファイル名 : DONNIVO2.D80 03/02/11 13:48:41
 サンプル名 : H14.70 SCP 0.4ng / 2μl inj①
 メソッドファイル名 : TRIC2001.MET

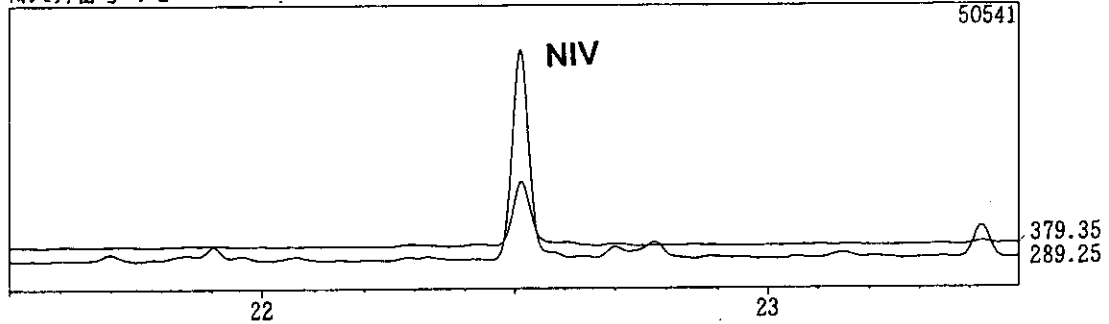


インレット番号 : 1



20.5 21.0

インレット番号 : 2



*** CLASS-5000 *** レポート番号 : 1 データファイル名 : DONNIVO2.D80 03/02/11 13:48:41
 サンプル名 : H14.70 SCP 0.4ng / 2μl inj①
 オペレータ名 : tomita
 メソッドファイル名 : TRIC2001.MET

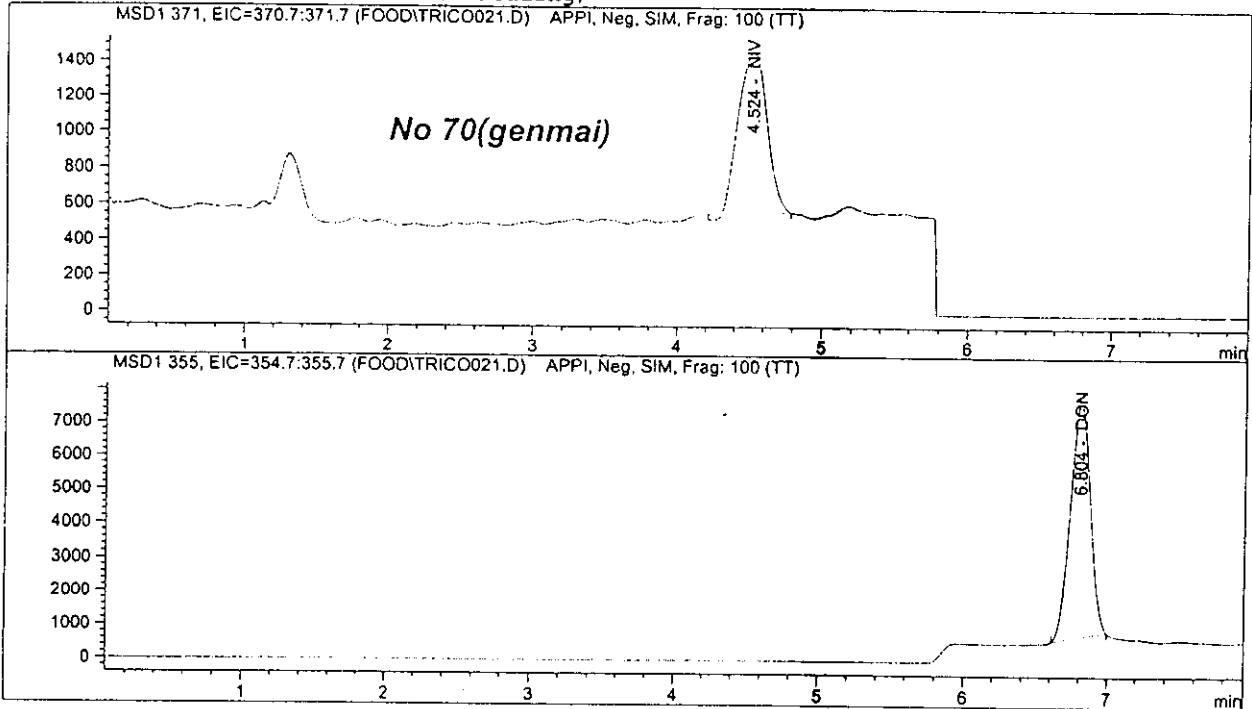
PKNO	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Height	A/H(sec)	MK	%Total	Name
1	20.717	20.663	20.777	243348	115784	2.102		31.07	
2	20.952	20.897	21.010	424657	192329	2.208		54.22	
3	22.511	22.460	22.570	115162	50967	2.260		14.70	
合計				783166				100.00	

図 2. デオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) に汚染した玄米試料 (H14-70) の GC-MS (SIM) クロマトグラム
 Int. std.: 内標物質 (SCP)

```

=====
Injection Date : 4/8/2003 4:49:15 PM      Seq. Line : 10
Sample Name    : 70                        Location  : Vial 10
Acq. Operator  :                           Inj      : 1
                                           Inj Volume: 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\TRICO.M
Last changed  : 4/8/2003 4:47:30 PM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\TRI.M
Last changed  : 4/9/2003 9:13:13 AM
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 4/9/2003 9:00:02 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: MSD1 371, EIC=370.7:371.7

RetTime [min]	Type	Area	Amt/Area	Amount [ppb]	Grp	Name
4.524	BBA	1.28207e4	1.57844e-3	20.23685		NIV

Totals : 20.23685

Signal 2: MSD1 355, EIC=354.7:355.7

RetTime [min]	Type	Area	Amt/Area	Amount [ppb]	Grp	Name
6.804	BBA	6.78355e4	1.09354e-3	74.18097		DON

Totals : 74.18097

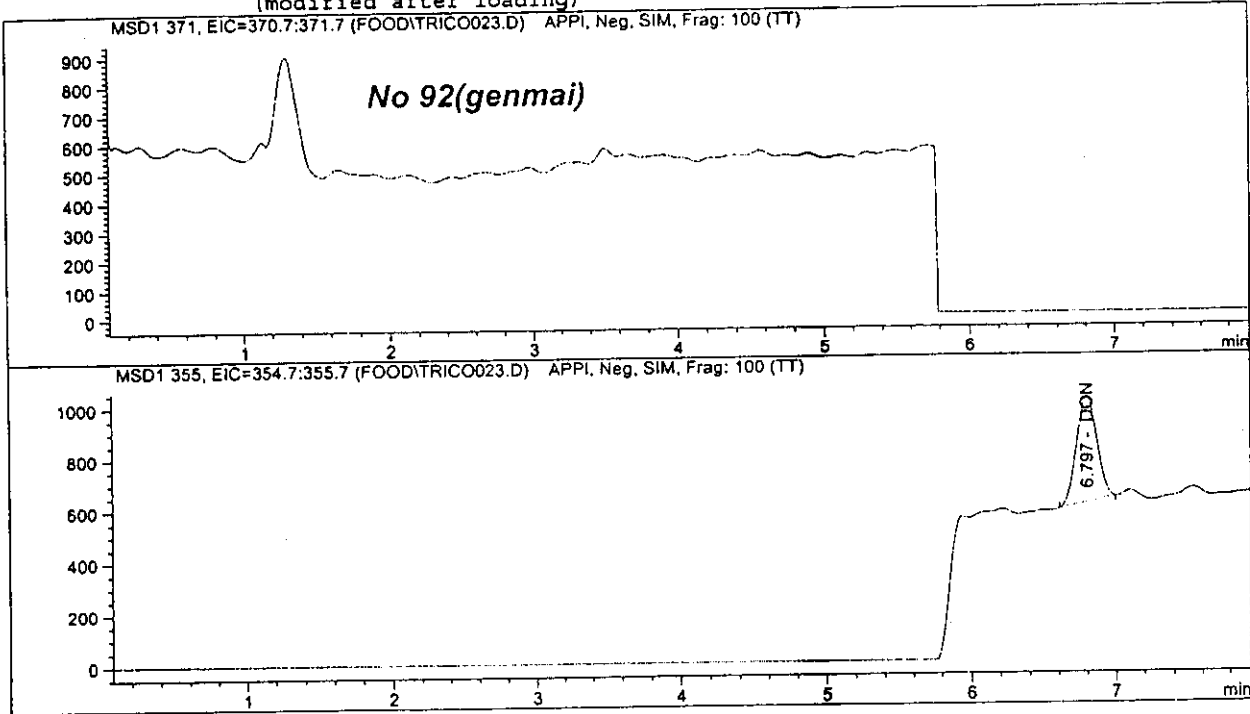
図3. デオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) に汚染した玄米試料 (H14-70) の LC-MS(SIM)クロマトグラム

```

=====
Injection Date : 4/8/2003 5:24:16 PM      Seq. Line : 12
Sample Name    : 92                        Location  : Vial 12
Acq. Operator  :                           Inj      : 1
                                           Inj Volume: 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\TRICO.M
Last changed  : 4/8/2003 5:22:38 PM
                (modified after loading)

Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\TRI.M
Last changed   : 4/9/2003 9:13:13 AM
                (modified after loading)
=====
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 4/9/2003 9:00:02 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: MSD1 371, EIC=370.7:371.7

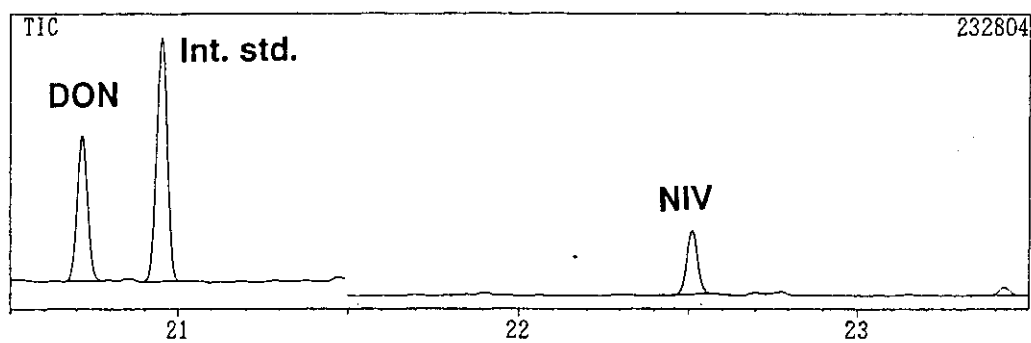
RetTime [min]	Type	Area	Amt/Area	Amount [ppb]	Grp	Name
4.516						NIV
Totals :				0.00000		

Signal 2: MSD1 355, EIC=354.7:355.7

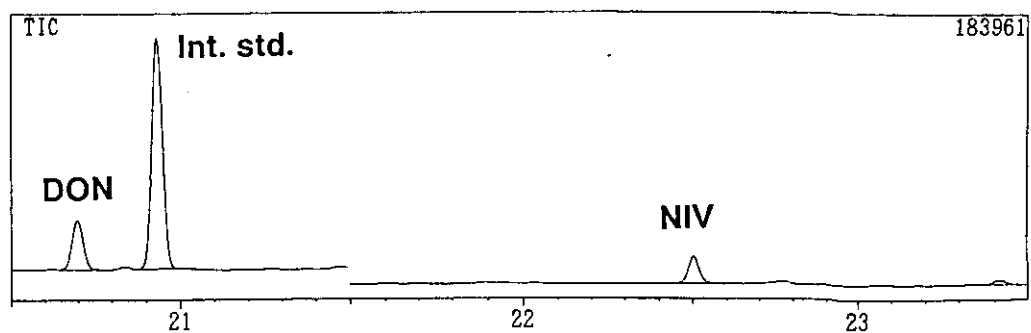
RetTime [min]	Type	Area	Amt/Area	Amount [ppb]	Grp	Name
6.797	BBA	4083.43994	1.21570e-3	4.96423		DON
Totals :				4.96423		

図4 デオキシニバレノール (DON) に汚染した玄米試料 (H14-92) のLC-MS(SIM) クロマトグラム

H14.70 玄米



H14.70 精白米



H14.70 米糠

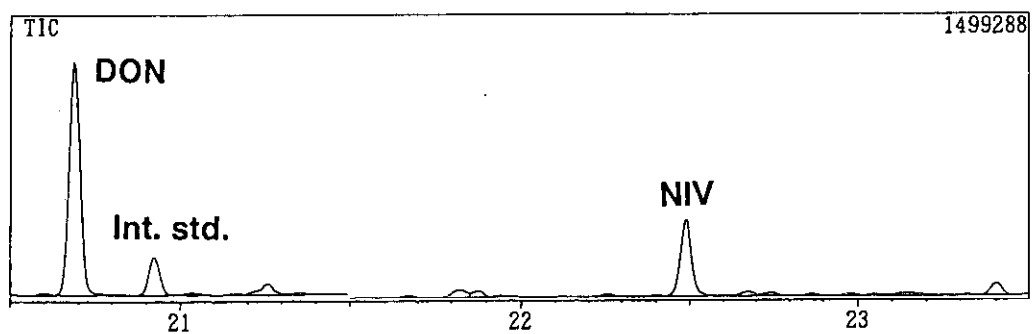
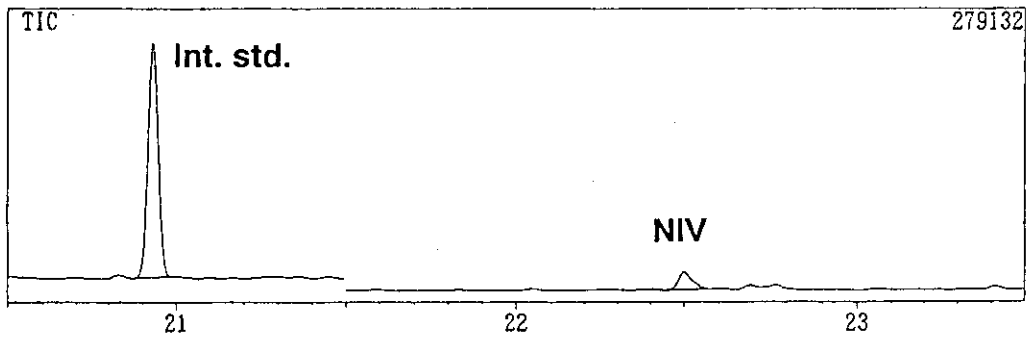


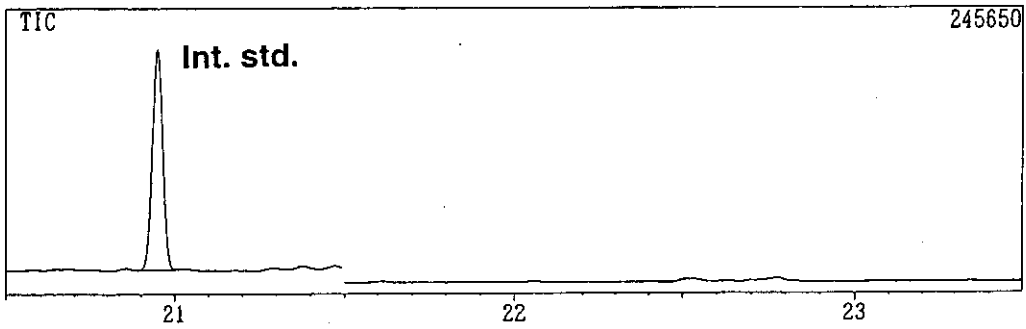
図 5. 玄米、精白米及び米糠中のデオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) の GC-MS (SIM) クロマトグラム

玄米試料 H14-70 を 9 分搗きに精米, Int. std.: 内標物質 (SCP)

H14.42 玄米



H14.42 精白米



H14.42 米糠

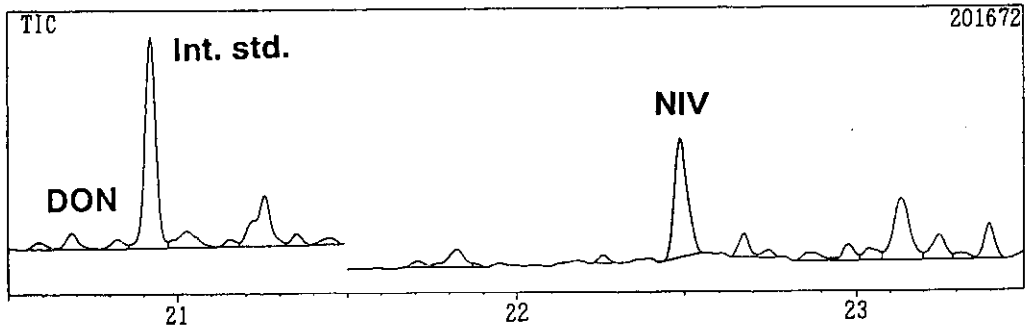


図 6. 玄米試料 H14-42 (NIV 汚染) を 9 分搗き精米した後の精白米 (不検出) 及び米糠 (DON, NIV 検出) の GC-MS (SIM) クロマトグラム
Int. std.: 内標物質 (SCP)