

酒類の安全性に関する調査（第2報）

—デオキシニバレノールの分析—

向井 伸彦・木曾 邦明

Analysis of Deoxynivalenol in Beer and Happoshu

Nobuhiko MUKAI and Kuniaki KISO

緒 言

デオキシニバレノール（DON）は、穀物の病気の一種である赤かび病の原因となっている赤かび病菌（フザリウム属）が生産するかび毒物質である。

ヒトに対する影響として、吐き気、嘔吐、胃腸の不調、めまい、下痢、頭痛等の急性症状を引き起こすことが知られている。なお、DON は国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer: IARC）による発がん性分類においては現在掲名されていない。

DON のリスク評価に関して、平成13年2月にスイス・ジュネーブにて開催されたFAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（Joint Expert Committee on Food Additives: JECFA）の第56回会議¹⁾において議論された。

我が国では従来、農産物検査の食用の麦への赤かび粒の混入限度を1%としていたが、国際的な動向を踏まえ、厚生労働省は平成14年5月21日に小麦に含まれるDONについて暫定的な基準値を1.1ppmと設定した。この暫定的な基準値は、食品衛生法に基づく規制値ではないが、市場に流通する小麦の安全性を確保するためのものである。なお、大麦については、現在暫定的な基準値は定められていない。

農林水産省では、小麦の暫定的な基準値が定められたのを踏まえ、国内産麦に対するDON含

有量の実態調査を報告している。平成15年5月9日付プレスリリース「麦類のかび毒の実態調査結果について」によると、国内産小麦199試料のうち暫定的な基準値を超えるものが6点あった。また、平成16年4月27日付プレスリリース「平成15年度産麦類のかび毒実態調査の結果について」によると、国内産小麦213試料について暫定的な基準値を超えるDONは検出されなかったと報告されている。

ビールや発泡酒の製造においては、麦芽や麦を原料として使用するが、DONに汚染された原料を使用した場合、製品ビール・発泡酒中のDON濃度が高くなる可能性がある。ここで、ビール中のDON含有量については、海外ではいくつか報告がみられる。Schothorstら²⁾は水素炎イオン化検出器を用いたキャピラリーガスクロマトグラフ法による測定を行い、オランダ市場の51試料中3試料において26~41 $\mu\text{g/l}$ の範囲で検出された（定量限界25 $\mu\text{g/l}$ ）ことを報告している。また、Niessenら³⁾は酵素免疫測定（ELISA）法による分析を行い、23試料を測定したところいずれも検出限界（50 $\mu\text{g/l}$ ）以下であることを報告している。さらに、Papadopoulou-Bouraouiら⁴⁾はELISA法によりヨーロッパ市場の313試料を測定したところ、87%からDONが検出され、検出された試料の分析値は4.0~56.7ng/mlの範囲内にあり、検出された試料の平均値は13.5ng/mlであったこと、そしてELISA法の測定値はGC-

MS の測定値より高くなる傾向にあったが、両測定値には相関があったことを報告している。一方、国内での報告は少なく実態はわからない。そこで今回、国内で販売されているビール、発泡酒中に含まれる DON 含有量の実態を調査することとした。

試 料

液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) 分析用試料は、平成16年7月に東広島市内および広島市内の酒類販売店より買い上げた、国産ビール (淡色) 11点、国産発泡酒 (淡色) 5点の合計16点とした。

ELISA分析用試料は、平成16年6月に東広島市内および広島市内の酒類販売店より買い上げた、国産ビール (淡色) 11点、外国産ビール (淡色) 7点 (ドイツ産2点、フランス産、オランダ産、オーストラリア産、メキシコ産、中国産が各1点)、

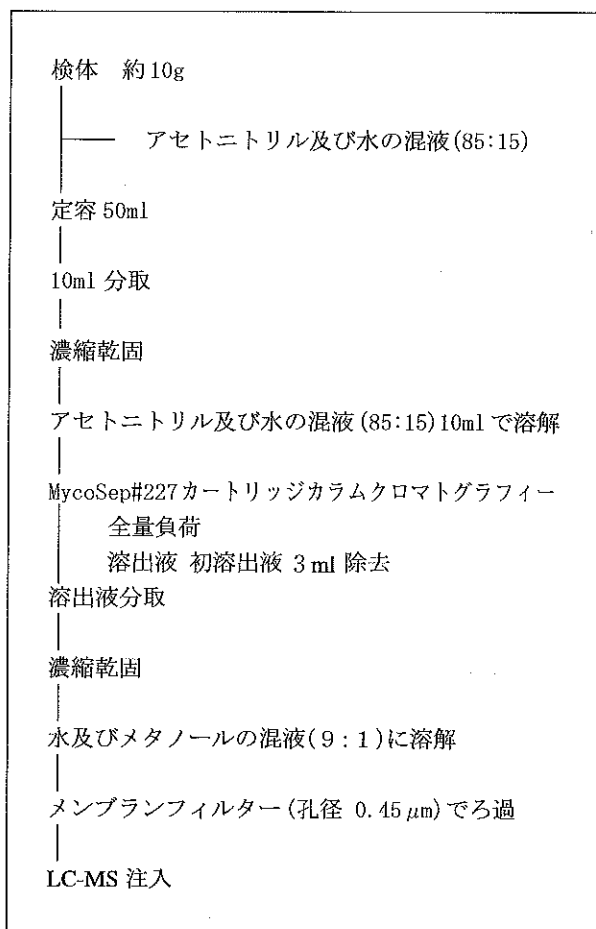


図1 デオキシニバレノール (DON) 分析法フローシート

国産発泡酒 (淡色) 6点の合計24点とした。各試料につき同一ロット4本 (添加回収試験の際は6本) を購入した。

分 析 方 法

LC-MSによる分析は、財団法人日本食品分析センター大阪支所に依頼して実施した。DON 分析のフローシートを図1に、液体クロマトグラフ質量分析計の操作条件を図2に示す。なお、検出限界は 0.05mg/kg (0.05ppm) であった。

ELISAによる分析は、市販のキット (ドイツR-Biopharm社製RIDASCREEN DON) を用いた。本キットによる分析の検出限界は 3.7 μg/kg (3.7ppb) である。あらかじめ試料ビール及び発泡酒をピーカーあるいは三角フラスコに入れ、超音波処理により脱気したものを検体として用いた。分析操作はキットの説明書に従った。吸光度の測定は、マルチプレート対応波長連続型分光光度計ヴィエント (大日本製薬株式会社) を使用し、データ処理用ソフトウェアとして KcJunior を用いた。なお、各試料4本 (添加回収試験の際は6本) を別々に測定し平均値を求めた。

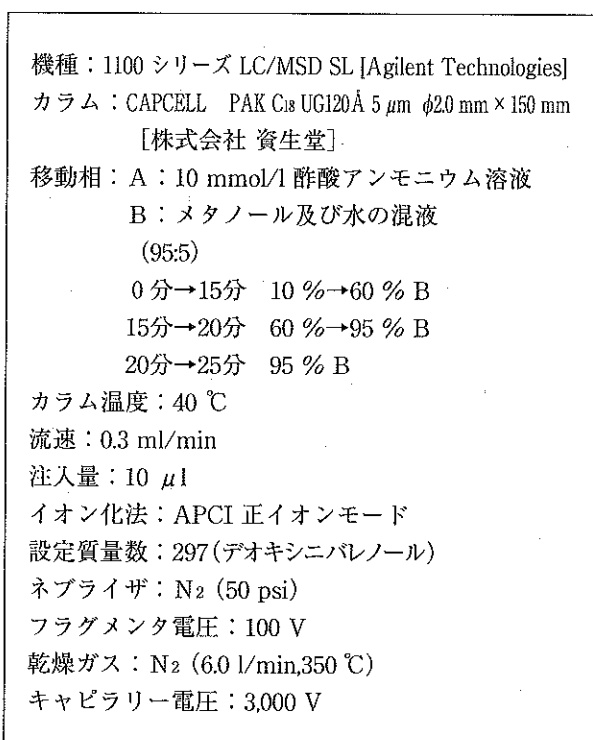


図2 液体クロマトグラフ質量分析計操作条件

表1 ELISA分析でのDON添加回収試験結果

検体	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%) (平均値 n=6)	標準偏差	変動係数 (%)
ビール	5	106.4	13.5	12.7
	20	85.7	16.9	19.7
発泡酒	5	96.7	12.9	13.3
	20	84.6	18.0	21.3

(注) 添加回収試験に用いた検体中のDON含有量 (ELISA法による分析値の平均値) は、ビール: $8.4\mu\text{g}/\text{kg}$ 、発泡酒: $9.7\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

表2 ELISA法によるDON分析結果

分析値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	点数	累積点数	累積点数比率 (%)
$4 \leq X < 10$	8	8	33
$10 \leq X < 20$	13	21	88
$20 \leq X < 30$	2	23	96
$30 \leq X < 40$	0	23	96
$40 \leq X < 50$	1	24	100
合計	24		

X: 分析値。

平均値: $14.9\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大値: $44.9\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最小値: $5.5\mu\text{g}/\text{kg}$

添加回収試験では、キットに添付してある DON 標準溶液 ($100\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)) を用いて、 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び $20\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度となるように検体 (ビール及び発泡酒 (各1点)) に添加したものをを用いた。

分析結果

LC-MSによる分析において、市販ビール・発泡酒16点中の DON 含有量は、いずれの試料も検出限界 ($0.05\text{mg}/\text{kg}$) 未満であった。

ELISAによる分析に際して、はじめに添加回収試験を行った。結果を表1に示す。回収率の平均値は $84.6\sim 106.4\%$ の範囲にあったが、変動係数が $12.7\sim 21.3\%$ の範囲にあり、各測定における回収率のばらつきがやや大きいものと考えられた。

次に、各試料を測定した結果を表2に示す。試料24点の平均値は $14.9\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、最大値は $44.9\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最小値は $5.5\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。また、試料の 88% (21点) は、 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。

考 察

国内産及び外国産の市販ビール・発泡酒を買い上げ、DONの実態を調べた。LC-MSによる分析では、いずれも検出限界未満であった。また、ELISAによる分析では、 $5.5\sim 44.9\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲であったが、試料の 88% は $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。

ELISA分析は操作が簡便で、多数の検体を迅速に分析できる点で有効である。小西ら⁵⁾は市販ELISAキットによる玄麦中のDON分析を行い、日本の暫定的な基準値である $1.1\mu\text{g}/\text{g}$ (1.1ppm) 付近では、HPLC-UVによる測定値とおおむね合致することから、ELISAキットがスクリーニング法として有効であることを報告している。ただし、低濃度のDON汚染小麦では変動係数が大きくなる傾向があることを述べている。また、Papadopoulou-Bouraouiら⁴⁾はヨーロッパ市場のビール313試料中のDONを市販のELISAキットにより測定し、 87% からDON

ま と め

が検出され、検出された試料の分析値は 4.0～56.7ng/ml の範囲内にあり、検出された試料の平均値は 13.5ng/ml であったことを報告している。また、検出された試料の分析値の分布をみると 86% の試料が 20ng/ml 未満であった。そのため、今回の ELISA キットによる分析値は、分析値の分布や平均値が Papadopoulou-Bouraoui らによる報告と類似していた。ここで、Papadopoulou-Bouraoui らは ELISA 法の測定値は GC-MS の測定値より高くなる傾向にあったが両測定値には相関がみられたと報告している。使用したキットが同一であることから、ELISA キットによる今回の分析値も、実際の含有量よりも過大評価している可能性がある。ELISA 法において分析値が高くなってしまふ原因としては、試料中のアルコール濃度の影響や類似化合物による交差反応などが考えられる。なお、麦中の DON 含有量は年により変動することも知られているので、含有量については注意が必要である。

FAO/WHO 合同専門家会議報告によると¹⁾、DON の総摂取量は、アフリカにおける 0.77 μ g/kg 体重/day から、中東における 2.477 μ g/kg 体重/day の範囲であると見積もられている。マウスの 2 年間にわたる投与試験において、最も低い用量である 0.1mg/kg 体重/day において、わずかな体重減少がみられるものの、生物学的には微々たるものであることから、無影響量 (NOEL) として 0.1mg/kg 体重/day が設定されている。また、ヒトが一生涯にわたり摂取しても健康に対する有害な影響が現れないと判断される一日当たりの摂取量を耐容一日摂取量 (TDI) として示すが、ここで安全係数を 100 として 1 μ g/kg 体重/day (ただし暫定値, PMTDI) と設定されている。なお、DON 摂取量については、食品について広く考慮することが必要である。

DON の規制等の国際的動向については、引き続き注意を払う必要がある。

かび毒物質の一種であるデオキシニバレノール (DON) のビール・発泡酒中での含有量の実態を調査した。LC-MS による分析では、国産ビール (淡色) 11 点及び国産発泡酒 (淡色) 7 点の合計 16 点を試料として用いたが、いずれの試料も検出限界 (0.05mg/kg) 未満であった。ELISA キットによる分析では、国産ビール (淡色) 11 点、外国産ビール (淡色) 7 点、国産発泡酒 (淡色) 6 点の合計 24 点を試料として用いた。分析値は 5.5～44.9 μ g/kg の範囲にあり、平均値は 14.9 μ g/kg であったが、試料の 88% は 20 μ g/kg 未満であった。

食品中の DON に関して、今後とも行政機関の動向や、研究動向等に注意を払う必要がある。

文 献

- 1) WHO Technical Report Series 906 [EVALUATION OF CERTAIN MYCOTOXINS IN FOOD], 第 56 回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議報告：
http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_906.pdf
- 2) R. C. Schothorst *et al.* : Determination of trichothecenes in beer by capillary gas chromatography with flame ionization detection, *Food Chemistry*, **82**, 475-479 (2003)
- 3) L. Niessen *et al.* : Zur Problematik von Mykotoxinen in der Brauerei, *Brauwelt*, **36**, 1510-1528 (1991)
- 4) Papadopoulou-Bouraoui *et al.* : Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay, *Food Additives and Contaminations*, **21**, 607-617 (2004)
- 5) 小西ら : 市販 ELISA キットによる玄麦中デオキシニバレノールの迅速簡易スクリーニング法の評価, *食品衛生学雑誌*, **45** (3), 156-160 (2004)