



マスコドマイコトキシンの概要と現状について

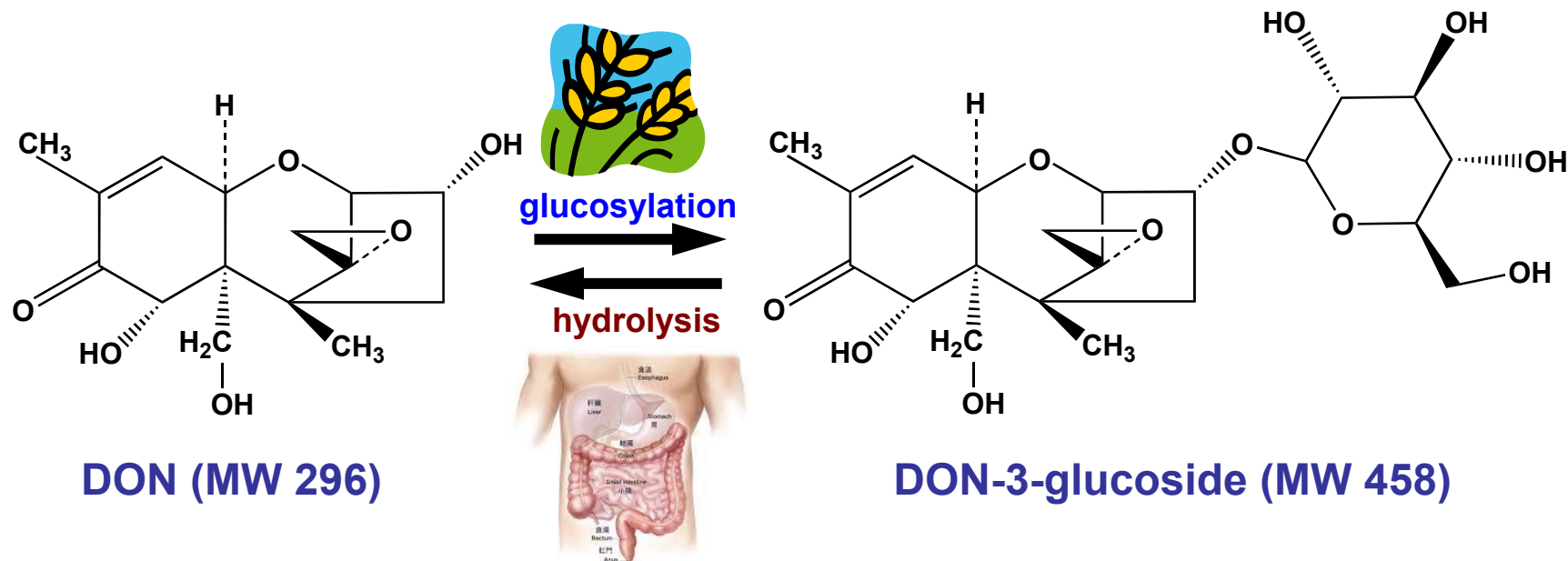
農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所
化学ハザードユニット

中川 博之

赤かび病菌(*Fusarium* 属)の感染は圃場で起こる(=植物病原菌)



Masked mycotoxins (Modified mycotoxins)



UDP-glucosyltransferase が生成に関与する(=減毒化機構)という報告あり。

分子量や物理化学的性質が変化している(多くの場合極性が高くなる)ため、従来法(**Free mycotoxin** 用の手法)では分析できないが、**加水分解により元のカビ毒を遊離する**。

→その存在量や毒性によっては、カビ毒リスク評価の妨げになる恐れがある。

2010年 **JECFA** は DON-3-glucoside をDON と ADONのグループ **PM-TDI (provisional maximal tolerable daily-intake)**に勘案することを情報量の不足を理由に見送った。

ELISAの交差反応や食品加工調理過程におけるDON の増減に 関与している可能性がある。

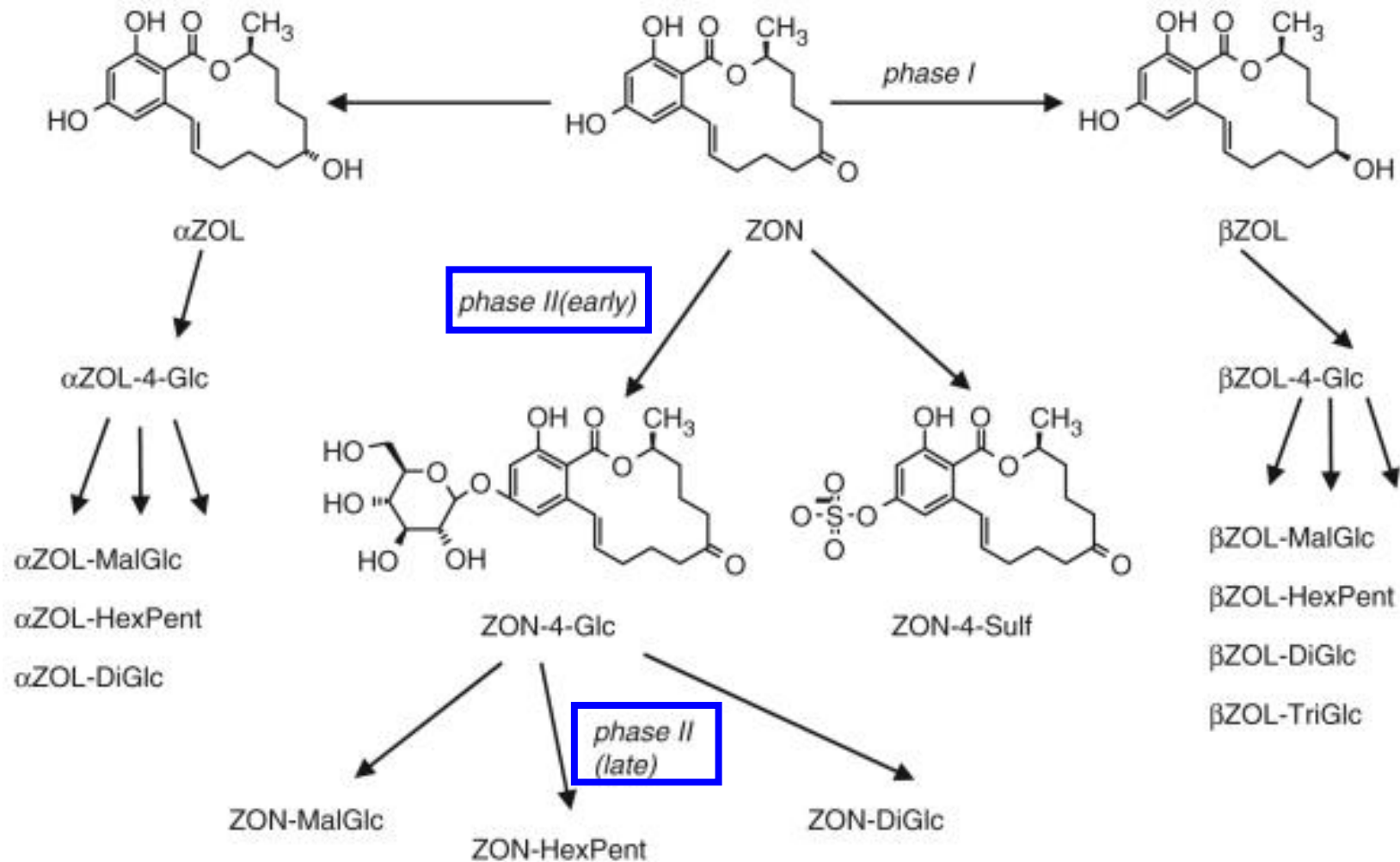


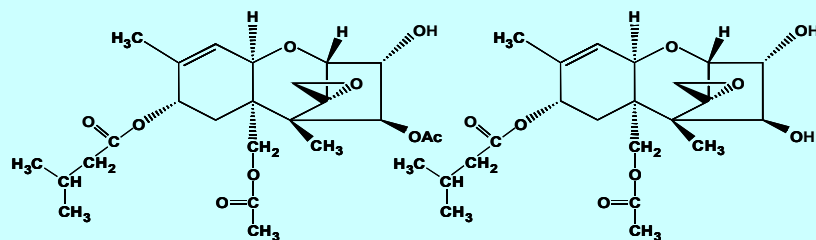
Fig. Proposed biotransformation pathway of zearalenone in *Arabidopsis thaliana*, covering both phase I and II metabolism.

phase I: conversion, transformation
 phase II: conjugation (= masking)
 phase III: compartmentation

Berthiller F et al., Food Addit. Contam. 23(11), 1194–1200 (2006)
 を改変

*Fusarium*属が産生する麦汚染かび毒(主要なもの)

タイプAトリコテセン

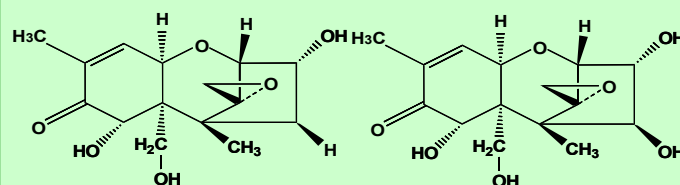


T-2トキシシン(T-2)

HT-2トキシシン(HT-2)

国内での汚染発生の頻度が高い

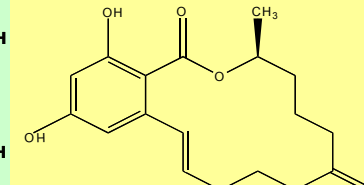
タイプBトリコテセン



デオキシニバレノール(DON)

ニバレノール(NIV)

DON暫定基準値: 1.1 mg/kg
(小麦)



ゼアラレノン(ZEN)

ZEN基準値: 1 mg/kg
(家畜に供される飼料)

DON/NIV汚染低減のための指針
(H20年12月; 農水省)

2001年JECFAのリスク評価でT-2 トキシシンまたは HT-2 トキシシン(単独または合量)

のPMTDI (暫定最大耐容一日摂取量)は 0.06 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日

2011年EFSAで同 TDI (耐容一日摂取量) 100 ng/kg 体重/日 が設定

2010年食品安全委員会によるNIVの評価ではTDI 0.4 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日

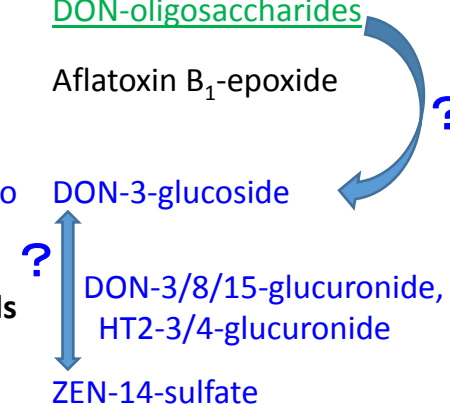
(DONはTDI 1 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日)

Q. DON, ZEN以外のカビ毒にも masked mycotoxins は存在するのではないか？

呼び名について: ここでは、phase-2 で修飾されたカビ毒を masked mycotoxins とする。

表: 最近提案された modified mycotoxins に関する階層的な定義

1st level	2nd level	3rd level	4th level	Example
Free mycotoxins				DON, Aflatoxin B ₁ , 3-acetyl-DON, 15-acetyl-DON
Matrix-associated mycotoxins	Complexes, physically dissolved or trapped			Hidden fumonisins
	Covalently bound			Fumonisin bound to starch, OTA- and <u>DON-oligosaccharides</u>
Modified mycotoxins	Biologically modified	Functionalised (phase 1-metabolites)		Aflatoxin B ₁ -epoxide
		Conjugated (phase 2-metabolites)	Conjugated by plants (= masked according to ILSI*, 2011)	DON-3-glucoside
			Conjugated by animals	DON-3/8/15-glucuronide, HT2-3/4-glucuronide
			Conjugated by fungi	ZEN-14-sulfate
	Chemically modified	Differently modified		Deepoxy-DON (=DOM-1)
		Thermally formed		norDON A-C, N-carboxy-methyl-FB ₁ , 14-(R)-OTA
		Non-thermally formed		DON-sulfonate, norDON A-C (under alkaline conditions)



*ILSI: International Life Science Institute

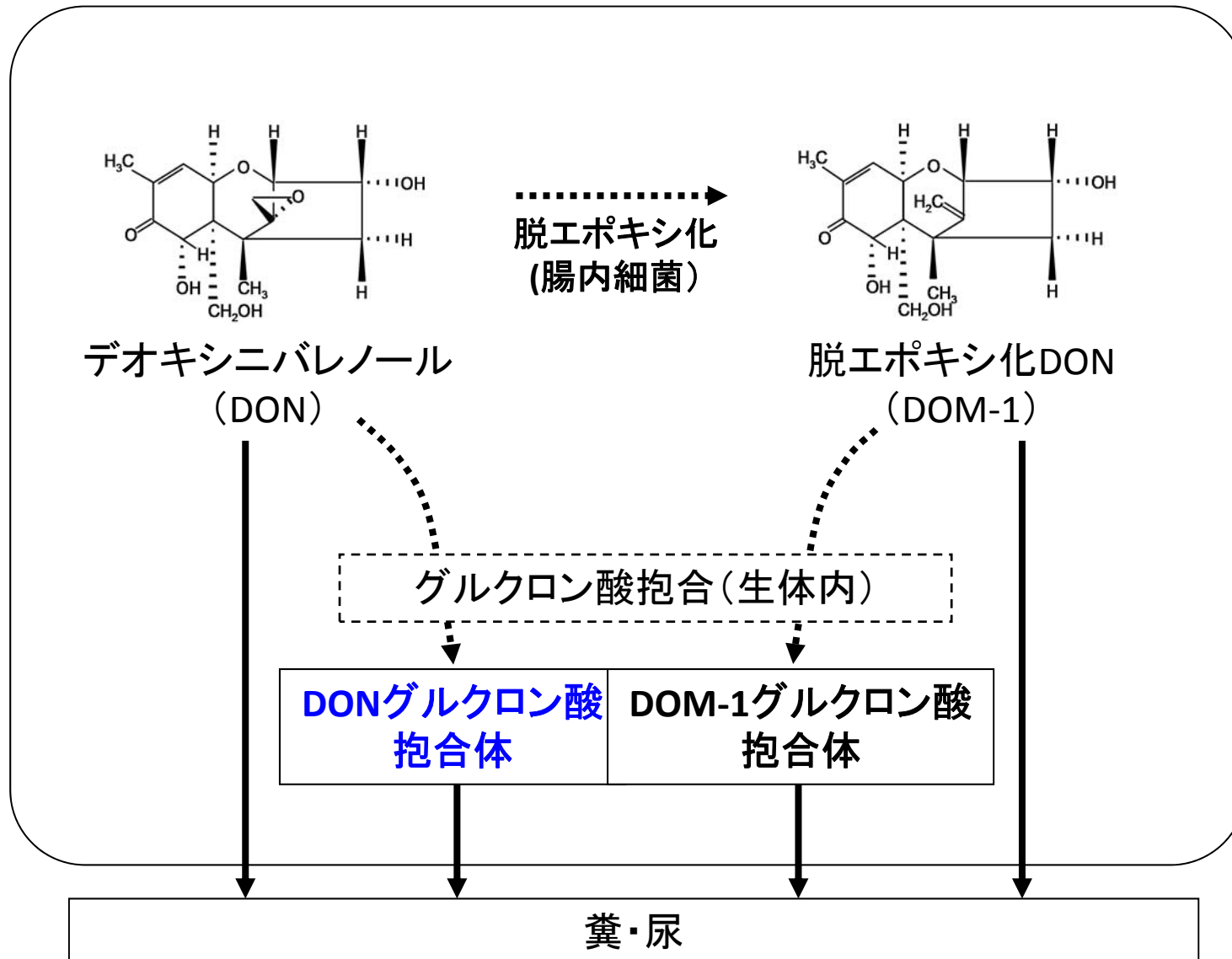
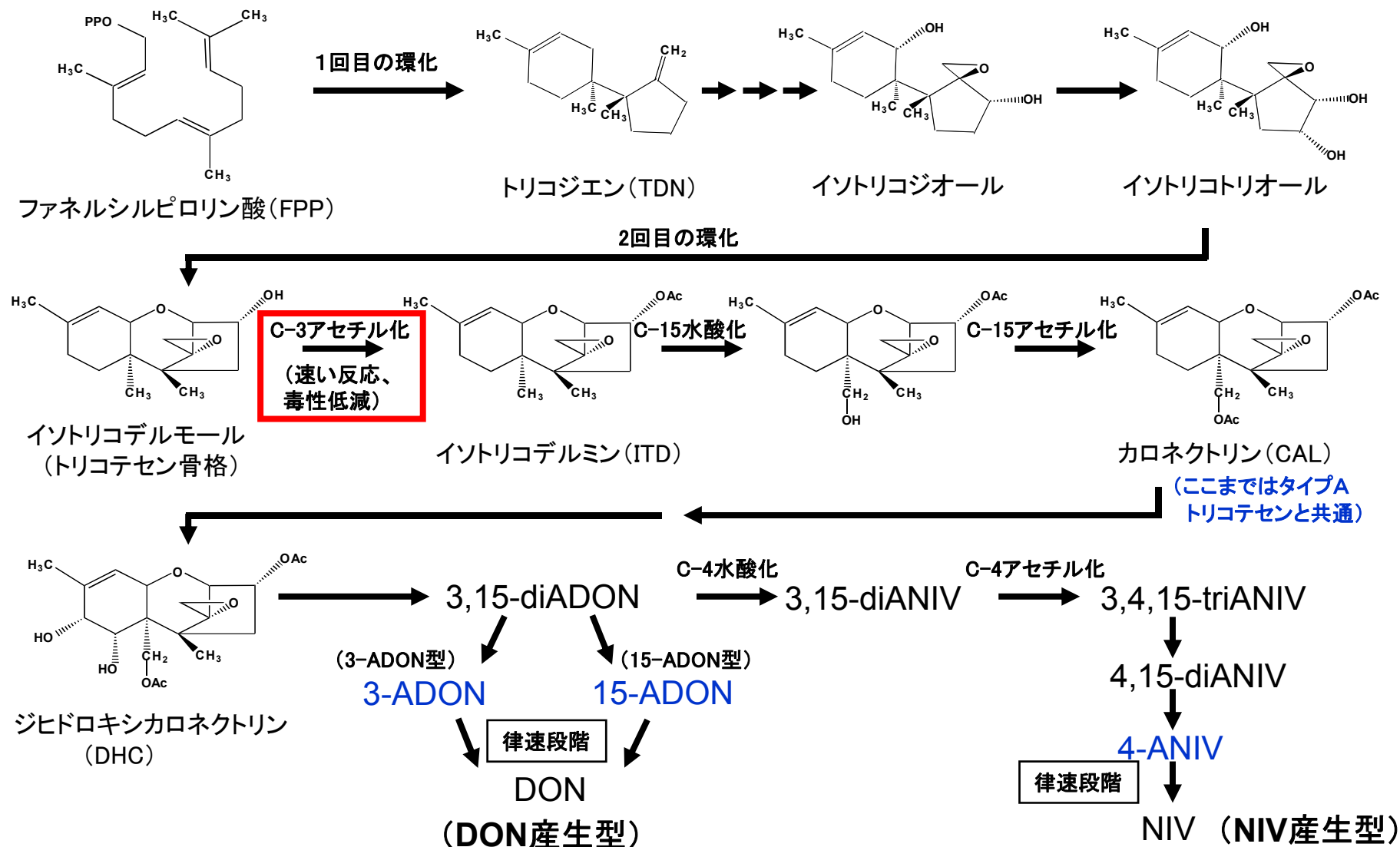


図 DONの主な生体内における変換・代謝の概要

毒性は？ 1つの根拠: DON, NIVの生合成経路

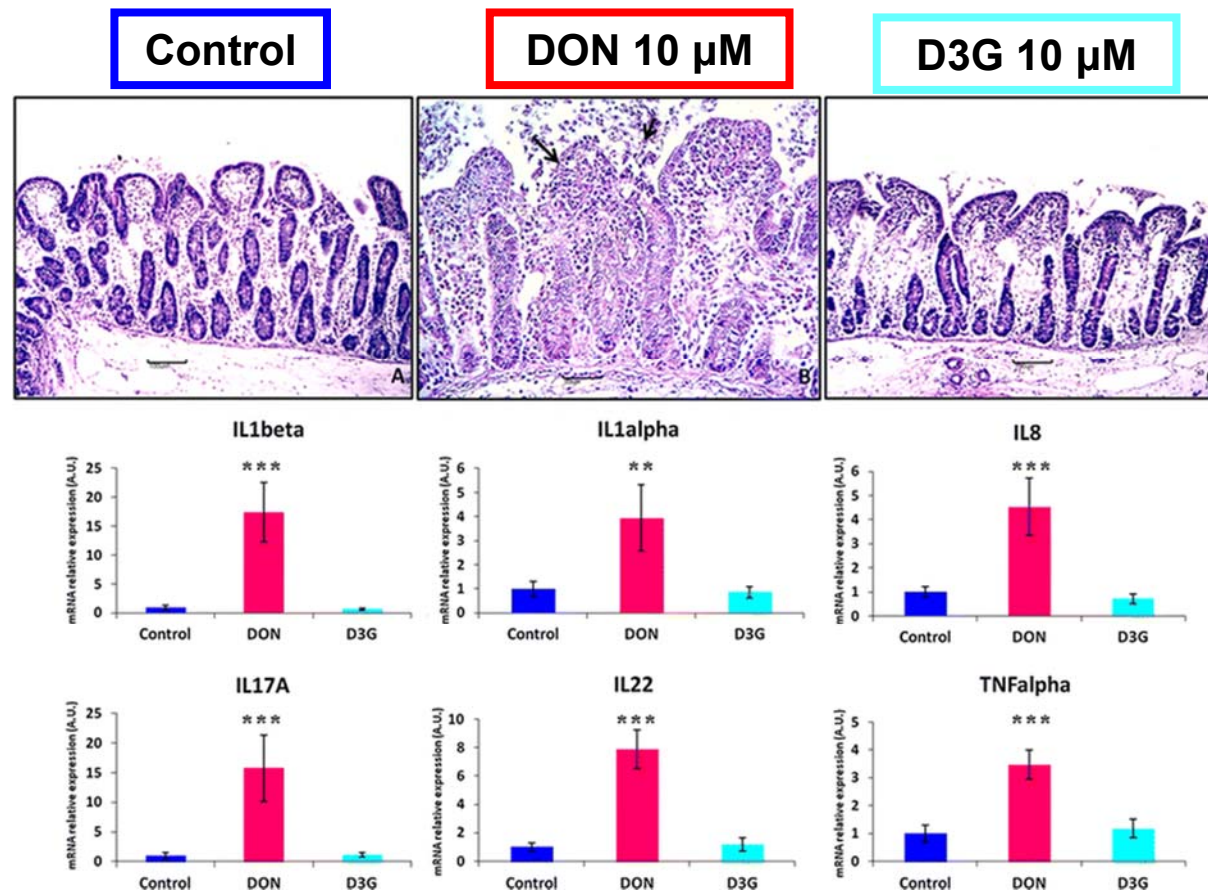


Fusarium 属菌は自ら産生するカビ毒になぜ耐えられるのか？

→ **C-3位のmasking (アセチル化)** で毒性を制御(低減)しているのでは 8

腸組織に対するDON, D3G処理の影響

Pierron A et al., Arch. Toxicol. (published on line: 24 September 2015) 1-10
DOI 10.1007/s00204-015-1592-8



D3G 処理は形態観察で影響見られず(コントロールと同程度)

定量PCRによる炎症誘発マーカーmRNAの発現もDONよりも明らかに低い(コントロールと同程度)



D3G はDONよりも毒性が低い

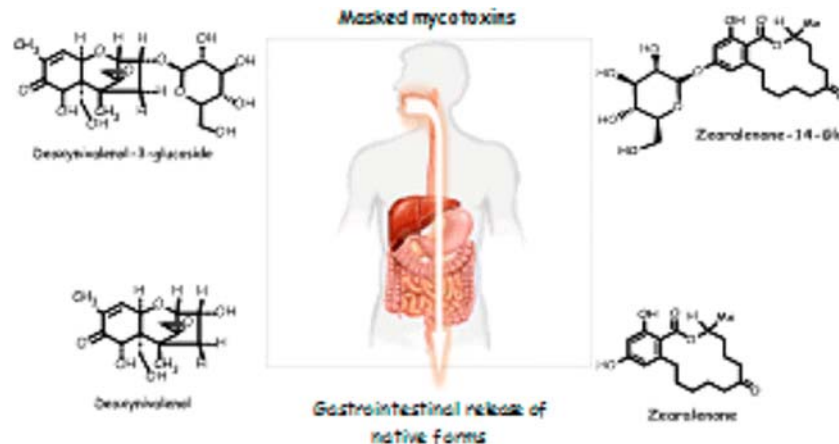
Fig. Effects of DON and D3G on intestinal explants

Morphology (*upper panels*) and inflammation (*lower panels*) *Upper panels* Jejunal explants were exposed for 4 h to diluent (3a), 10 μ M DON (3b) or 10 μ M D3G (3c) and stained with hematoxylin and eosin. *Arrowheads* indicate necrosis of apical enterocytes and cellular debris. *Bar* 100 μ m (3a and 3c), 50 μ m (3b). *Lower panels* Jejunal explants were exposed for 4 h to diluent or 10 μ M toxins, and relative expression of mRNA encoding for pro-inflammatory cytokines was measured by RT-qPCR. Data are normalized to diluent and expressed, in arbitrary unit, as mean $\pm$ SEM of explants from 6 animals, ** p < 0.01; *** p < 0.001

生体内における挙動

Masked Mycotoxins Are Efficiently Hydrolyzed by Human Colonic Microbiota Releasing Their Aglycones

Dall'Erta A et al., Chem. Res. Toxicol. 26 (3), 305–312 (2013)



唾液、消化液(胃)、十二指腸液、を模したjuice を調製し、D3G, Z14G, Z14Sを処理
その後、さらに腸内菌(ボランティア3人から採取)による嫌気発酵条件下で30分、24時間
処理し、経時的にLC-MS/MS分析



D3G, Z14G, Z14Sとも消化条件(唾液、消化液、十二指腸液)では変化せず。
嫌気発酵24時間後、D3G の90%がDON、Z14G/Z14S の40%がZENとして検出された。

Masked mycotoxins (D3G, Z14G, Z14S) は腸内菌により加水分解され、カビ毒を遊離する。

<関連研究>

○5人のボランティアから腸内菌を採取し、嫌気条件下処理(1-7日, D3G→DON確認)

: Gratz SW et al. Appl Environ Microbiol. 79, 1821–1825 (2013)

○豚に投与(D3G, DON): Nagl V et al. Toxicol. Lett. 229, 190–197 (2014)

○ラットに投与(D3G, DON): Nagl V et al. Toxicol. Lett. 213, 367–373 (2012)

これまで存在が報告されている **masked mycotoxins**

(“Masked mycotoxins: A review” Mol. Nutr. Food Res. 57, 165–186 (2013)他、参照)

ZEN: ZEN14G, ZEN14S, α -ZEL14G, β -ZEL14G, ZEN16G (2014),
ZEN-malonylglucosides, ZEN-dihexosides, ZEN-pentosylhexosides,
ZEL-malonylglucosides, ZEL-dihexosides, ZEL-pentosylhexosides,
ZEN-14glucuronide

DON: DON3G, DON3S, DON15S (2014),
DON-3diglucoside, DON-3triglucoside, DON-3tetraglucoside
DON-3glucuronide, DON-GSH conjugate
3ADON-7glucuronide/ 3ADON-15glucuronide/ 15ADON-3glucuronide (2012)
15ADONG

NIV: NIVG, 4ANIVG (=FUXG) (2011)

T2: T2G (2011), T2-diglucoside (2013)

HT2: HT2G (HT2-3G/HT2-4G) (2011), HT2-diglucoside (HT2-3diG/HT2-4diG) (2012)

MAS (monoacetoxyscirpenol): MASG (1985, 2013)

DAS (diacetoxyscirpenol) : DASG (2013)

NES (neosoraniol) : NESG (2013)

OTA: hydroxyl-OTA-4glucoside (1996)

Destruxin: Glucosyl-hydroxyl-destruxin B

Masked mycotoxins 発見のきっかけと歴史(日本防菌防黴学会誌 43, 369-374 (2015)参照)

1983-85年 *Fusarium*属に感染させたトウモロコシや小麦で栽培後期にDONの濃度が急激に下がる現象を報告(=植物体内で代謝?)
イースト発酵後のドーナツでDON濃度が増加(=DON誘導体が酵母で分解?)

1980-2000年より前

微生物や植物細胞を培養し、カビ毒を代謝(分解)させていた
代謝物解析をする過程でglucoside や sulfate を発見)

1985年 滅菌トウモロコシで*Fusarium*を培養、**MAS- α -glucoside**を単離・構造決定

1990年 Gareis ら豚腸内で**ZEN14G→ZEN**を確認、“**masked mycotoxin**”の名を使用

2002年 ZEN14Gによる小麦の自然汚染の報告

2005年 DON3Gによる小麦の自然汚染の報告

2009年 DON-oligoglucosideの報告(国際学会)

2011年 NIVG, FUXGの発見

2011-13年 T2G, HT2G, di-glucosides, DASG, NESG の発見

(fumonisin の場合)

カビ毒を添加した農作物試料を加熱した後分析すると、著しく回収率が低下。

→ hidden fumonisins, bound-fumonisin の発見につながった。

(両者とも、Rychlik M らによるmasked mycotoxins の定義からは外れる)。

→ アルカリ処理により加水分解し、hydrolyzed fumonisins (HFBs)として分析する方法が提案された。

※ 側鎖の-COOH基が修飾された分子種はHFBに変換して分析できるが

fumonisin 主鎖の-NH₂基が修飾された分子には本手法は適用できない。



<http://informahealthcare.com/ijf>
ISSN: 0963-7486 (print), 1465-3478 (electronic)

Int J Food Sci Nutr, 2015; 66(1): 98–103
© 2014 Informa UK Ltd. DOI: 10.3109/09637486.2014.979316

informa
healthcare

IN VITRO AND ANIMAL STUDIES

bound-fumonisin (NDfrc-FB₁)は胃腸消化条件下で
約41%分解された

Hydrolysed fumonisin B₁ and N-(deoxy-D-fructos-1-yl)-fumonisin B₁: stability and catabolic fate under simulated human gastrointestinal conditions

Martina Cirlini¹, Irene Hahn², Elisabeth Varga², Margherita Dall'Asta¹, Claudia Falavigna¹, Luca Calani¹, Franz Berthiller², Daniele Del Rio¹, and Chiara Dall'Asta¹

¹LS9 Bioactives&Health, Interlaboratory Group, Department of Food Science, University of Parma, Parma, Italy and ²Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Metabolism and Center for Analytical Chemistry, University of Natural Resources and Life Sciences, Tulln, Austria

Abstract

Food processing may induce thermal degradation of fumonisins in corn via Maillard-type reactions, or alkaline hydrolysis via loss of the two tricarballic acid moieties. In the former case, N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-fumonisin B₁ (NDF) can be formed, while the latter derivative is called hydrolysed fumonisin B₁ (HFB₁). The aim of this study was to deepen the knowledge about the gastrointestinal stability of HFB₁ and NDF in humans. Due to the lack of standard, NDF was chemically synthesised and cleaned up in high purity to be used for further experiments. While NDF is already partially cleaved (about 41%) during simulated digestion, it remained rather stable towards human colon microflora. In contrast to this, HFB₁ is partially metabolised by the colon microflora to unknown compounds after 24 h of fermentation, as seen by a loss of about 22%. Concluding, the cleavage of NDF during digestion as well as the likely metabolism of HFB₁ emphasise the need for animal trials to ascertain their toxicity *in vivo*.

Keywords

Bioavailability, food processing, fumonisins, gut microflora, mycotoxins

History

Received 27 June 2014

Revised 20 September 2014

Accepted 7 October 2014

Published online 28 November 2014

どのような分析法があるか

1) 液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)

高分解能LC-MS (Orbitrap MS, TOFMS) : 試薬標品が無い化合物も検出可能
精密質量を指標にするので選択性が高い。

四重極型LC-MS(/MS) : 原則的に試薬標品が入手できる化合物に有効(検出感度高い)

2) 間接的方法

加水分解処理後、従来法で分析する(加水分解時に増えた分が masked 体に相当)
適切な加水分解法(酸処理、アルカリ処理、酵素処理、等)があれば有効。
加水分解が不完全になる可能性や、他の誘導体から元のカビ毒が生じる可能性に注意。

3) 抗体法(ELISA等)

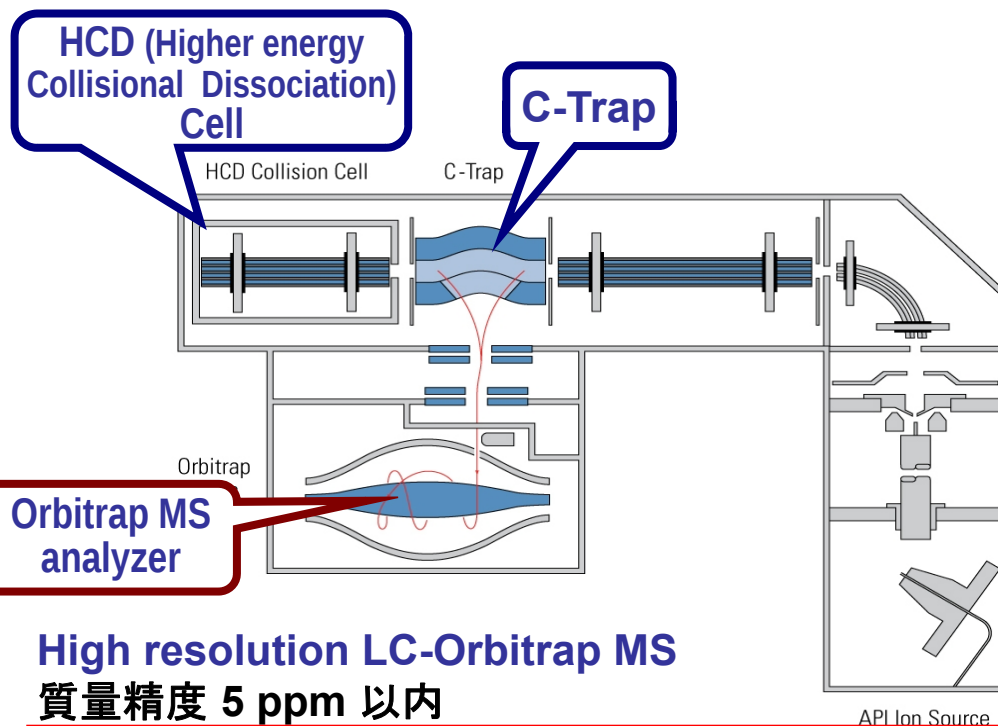
適切な抗体があれば有効であるが、交差反応に注意する(T2G抗体はT2にも結合)
供給メーカーによって抗体の選択性が異なる場合もある。

主流はやはりLC-MS

新規化合物の探索や試薬標品がない化合物の検出は高分解能LC-MSが使用されるが
最近是有機合成や微生物変換、UDP-glucosyltransferase の反応、等により標品を
自前で合成してLC-MS/MSで定量分析を行うケースも増えてきている。

Screening by high-resolution LC-Orbitrap MS

(Instrument name: Exactive)



- Resolution
 - 100,000 @1Hz
 - 10,000 @10Hz
- Mass accuracy
 - <2 ppm (internal calib.)
 - <5 ppm (external calib.)
- Mass range
 - 50 - 4000 m/z

High resolution LC-Orbitrap MS

質量精度 5 ppm 以内

(ex. MW 500 ± 0.0025)

→ 試薬が入手できない化合物でも

精密質量(組成式)に基づいた探索が可能



Conventional LC-MS/MS

特定の検出イオン (Q1/Q3)に基づいた検出
チューニングのための目的化合物の試薬が必要

Why high resolution by Orbitrap ?

no limit for the flight distance

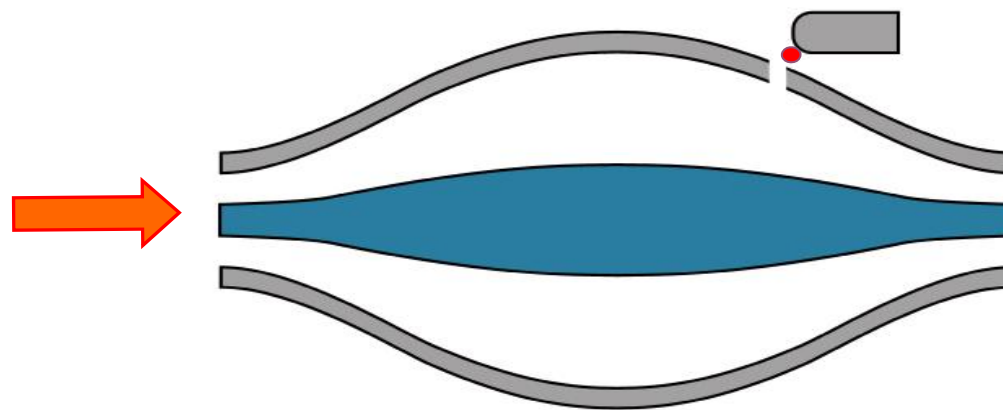
Electrodynamic Squeezing



A.A. Makarov, *Anal. Chem.*, 72, 1156-1162 (2000).
A.A. Makarov, *US Pat.* 5,886,346, (1999).

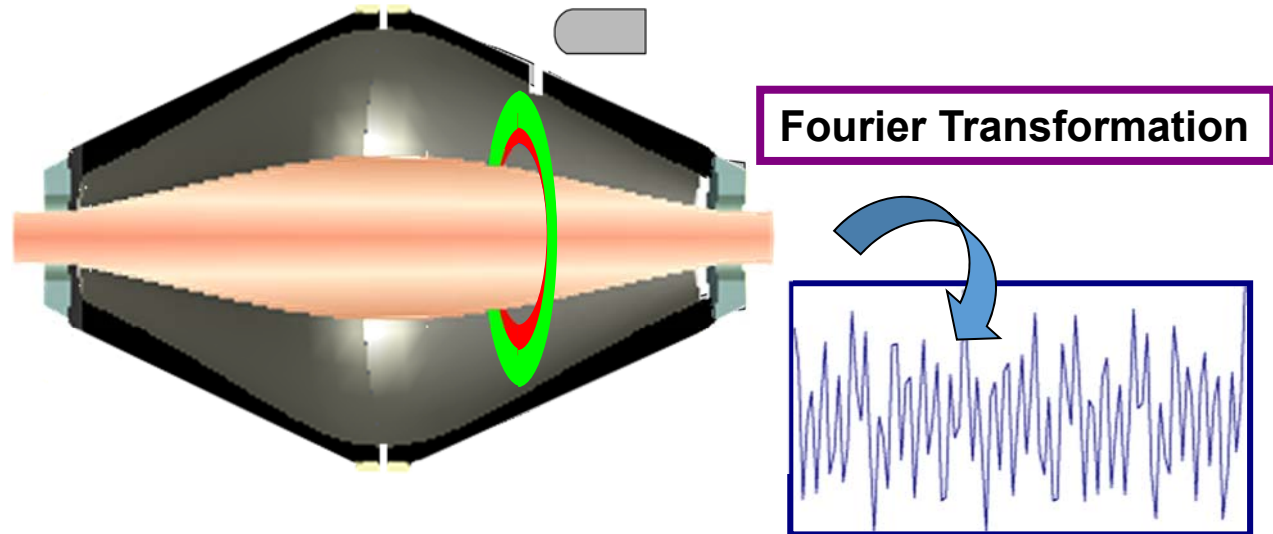


“Fast” Injection



Principle of Orbitrap

Ions movement (depending on m/z) induce electronic current.
From the induced current, frequencies are determined by Fourier Transformation.

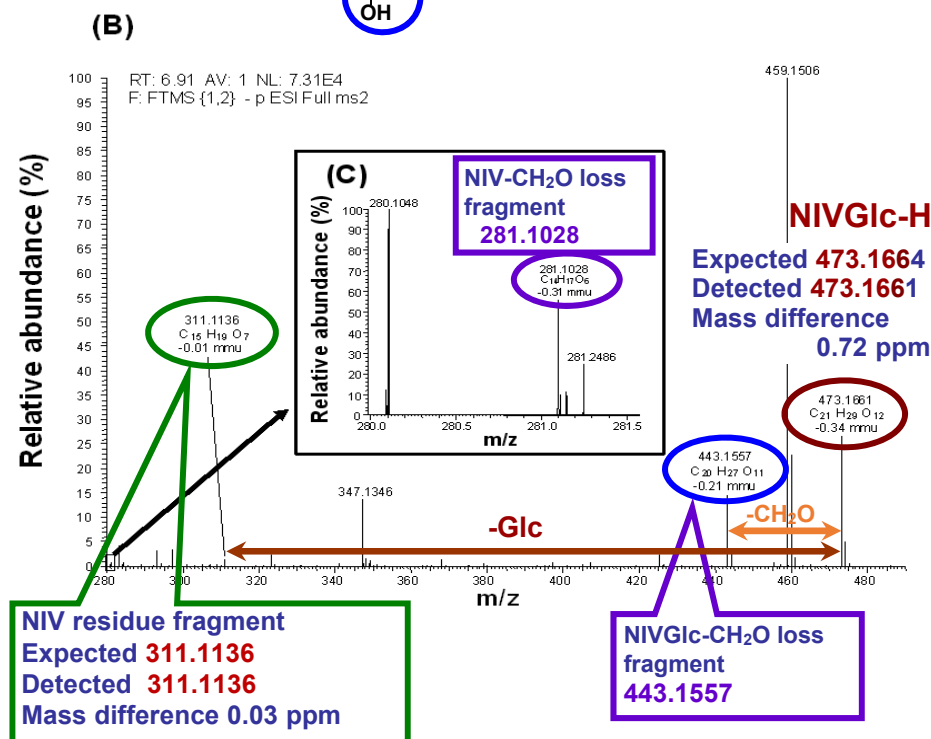
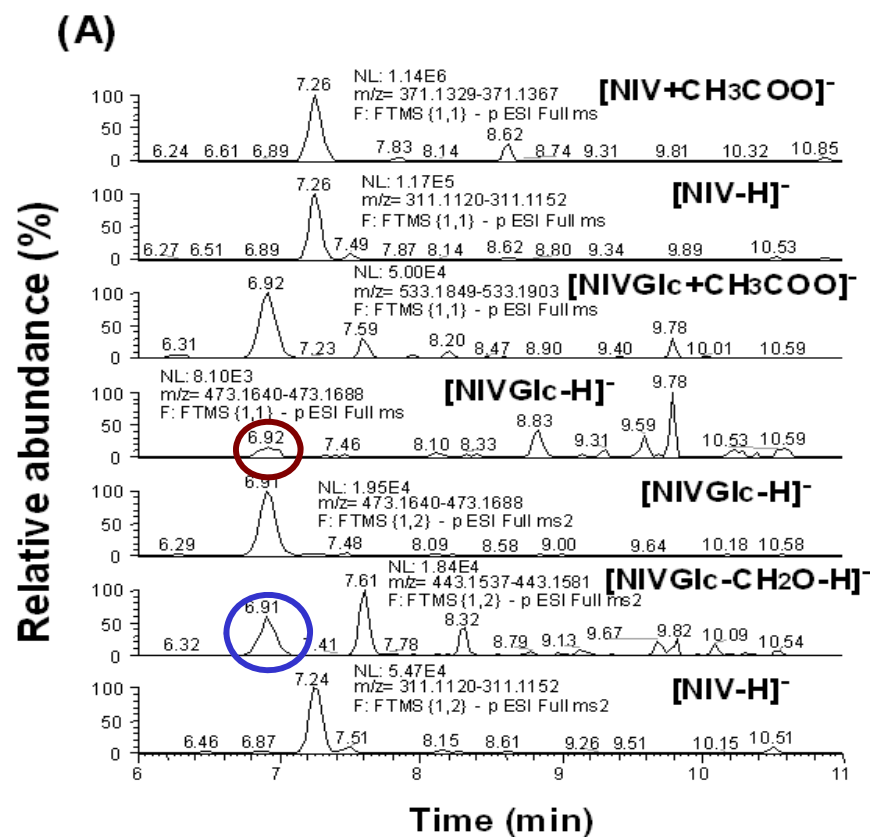
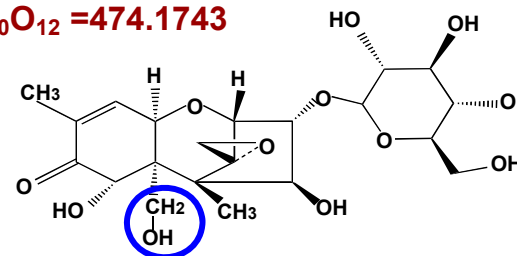


$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

Frequency $\rightarrow m/z$ value is determined

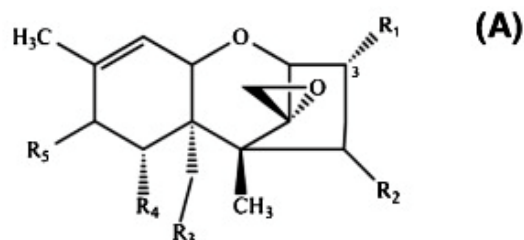
Detection of NIV-glucoside by LC-Orbitrap MS

NIVGlc: $C_{21}H_{30}O_{12}$ = 474.1743



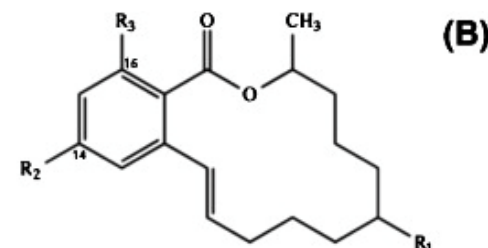
A compound detected at 6.9 min was confirmed as NIV-Glc.

Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method



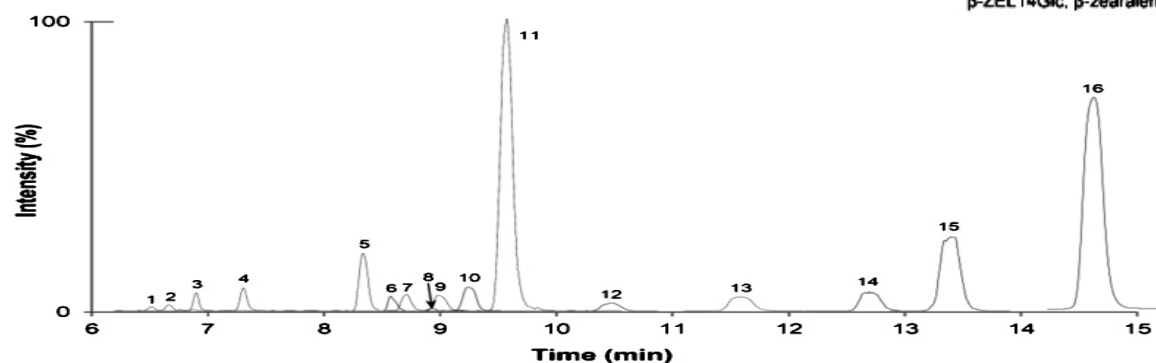
Analyte	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
HT2	OH	OH	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT2-3-Glc	OC ₆ H ₁₁ O ₅	OH	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T2	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
3Ac-DON	OCOCH ₃	H	OH	OH	=O
DON	OH	H	OH	OH	=O
DON3Glc	OC ₆ H ₁₁ O ₅	H	OH	OH	=O
NIV	OH	OH	OH	OH	=O
NIV3Glc	OC ₆ H ₁₁ O ₅	OH	OH	OH	=O

Abbreviations: HT2, HT-2 toxin; HT2-3-Glc, HT-2-3-glucoside; T2, T-2 toxin; 3Ac-DON, 3-acetyl-deoxynivalenol; DON, deoxynivalenol; DON3Glc, deoxynivalenol-3-glucoside; NIV, nivalenol; NIV3Glc, nivalenol-3-glucoside.



Analyte	R ₁	R ₂	R ₃
ZEN	=O	OH	OH
ZEN14Glc	=O	OC ₆ H ₁₁ O ₅	OH
ZEN14Sulf	=O	OSO ₃ ⁻	OH
ZEN16Glc	=O	OH	OC ₆ H ₁₁ O ₅
α-ZEL	OH (α)	OH	OH
α-ZEL14Glc	OH (α)	OC ₆ H ₁₁ O ₅	OH
β-ZEL	OH (β)	OH	OH
β-ZEL14Glc	OH (β)	OC ₆ H ₁₁ O ₅	OH

Abbreviations: ZEN, zearalenone; ZEN14Glc, zearalenone-14-glucoside; ZEN14Sulf, zearalenone-14-sulphate; ZEN16Glc, zearalenone-16-glucoside; α-ZEL, α-zearalenol; α-ZEL14Glc, α-zearalenol-14-glucoside; β-ZEL, β-zearalenol; β-ZEL14Glc, β-zearalenol-14-glucoside.

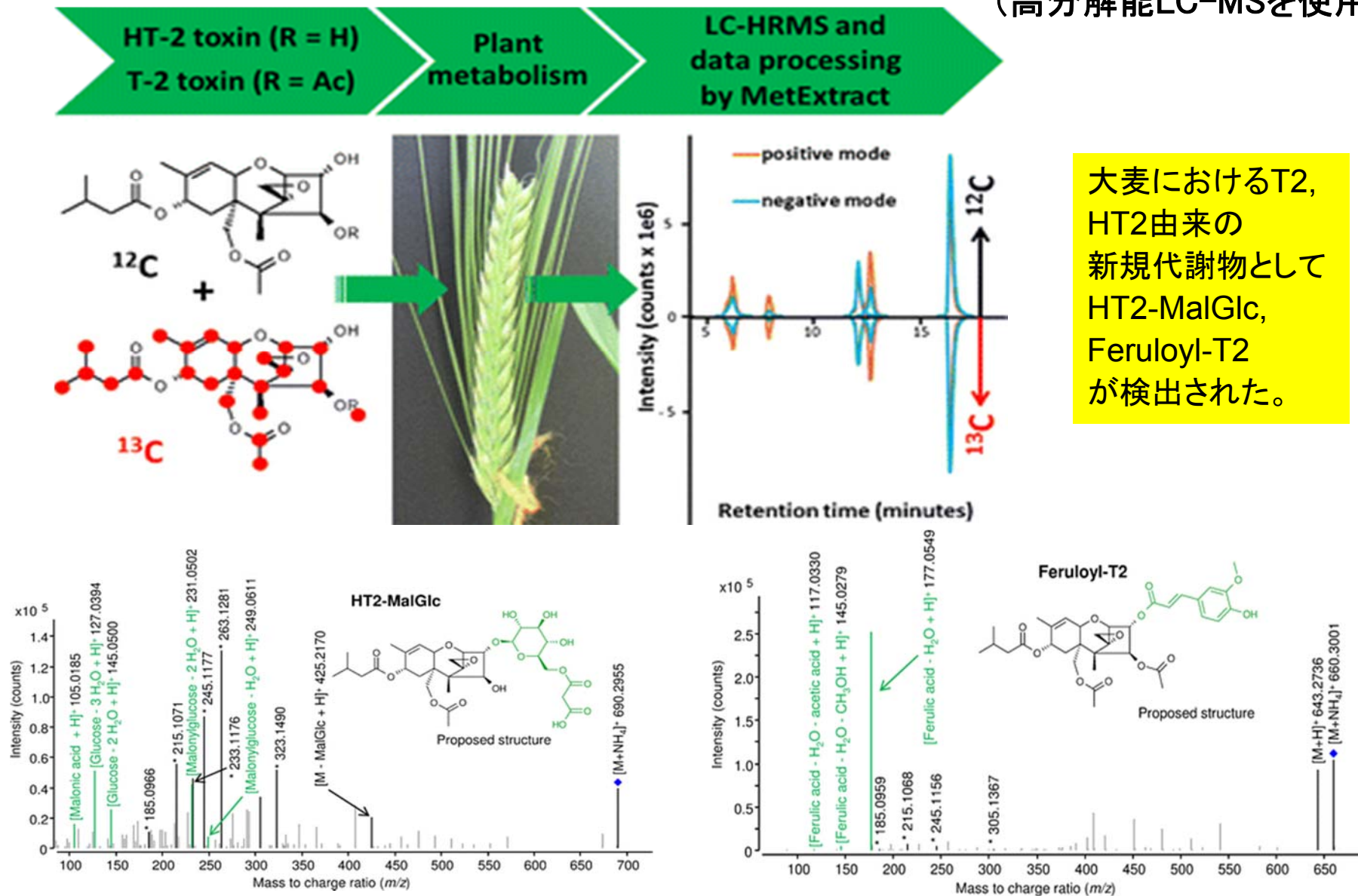


試薬標品が供給される
化合物は
LC-MS/MSによる定量
分析が可能になる。

Fig. 各種カビ毒を添加した小麦試料分析時のLC-MS/MSクロマトグラム

1 NIV3Glc; 2 NIV; 3 DON3Glc; 4 DON; 5 β-ZEL14Glc; 6 ZEN16Glc; 7 α-ZEL14Glc; 8 HT2-3-Glc; 9 3Ac-DON; 10 ZEN14Glc; 11 ZEN14Sulf; 12 HT2; 13 β-ZEL; 14 α-ZEL; 15 T2; 16 ZEN

トリコテセンと ^{13}C -トリコテセンを塗布し、 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ mass shift を指標として化合物を探索
(高分解能LC-MSを使用)



現在の課題と海外の動き

- 1) 存在量に関するデータの取得(サーベイランス)の継続
PMTDIに勘案すべきか否かの判断につながる
EFSAは2013年にT2G、HT2Gの存在量データを募集
簡易分析法の提供
- 2) 動態に関するデータの取得
生体内挙動
加工調理段階(製粉、パン製造、ビール製造、等)での挙動
- 3) 毒性に関するデータが不足
単独での毒性
複合毒性
sulfate と glucoside、 α -/ β -体の違い、結合糖による違い(発表者の私見)
植物にはtype A よりもtype B の方が毒性が強い(トリコテセン)

試薬標品の供給が重要

- UDP-Glucosyltransferaseによる合成(NIVG, HT2G)
- 酵母使用(T2G)
- 有機化学合成(ZEN16S、T2S、alternariol-sulfate、alternariol-glucoside
alternariol-methylether-sulfate、alternariol-methylether-glucoside)