

平成 30～令和元年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

（※研究全体の期間（初年度及び2年目以降）について記載する。）

研究課題名 (研究項目名)	フモニシンのモディファイド化合物のリスク評価に関する研究 (課題番号：1808) (2 健康影響発現メカニズムの解明 (1) 微生物・かび毒等による健康影響発現に関する研究)
主任研究者	研究者名：吉成 知也 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成 30 年度～令和元年度（2年間）

2 研究目的

フモニシン類は、フザリウム属のカビが生産するマイコトキシンで、世界中のトウモロコシやその加工品から検出される。ウマの白質脳軟化症やブタの肺水腫はフモニシンが混入した飼料を摂取することが原因と考えられており、また、ヒトにおいては胎児の神経管閉鎖障害との関連性が疑われている。フモニシンによるヒトや家畜の健康への影響は世界的に重要事項と認識されており、FAO/WHO 合同食品添加物 専門家会議 (JECFA) や欧州連合 (EU) により設置された欧州食品安全機関 (EFSA)、さらに日本の内閣府に設置された食品安全委員会においてリスク評価が行われてきた。一方、近年モディファイドマイコトキシンと呼ばれる新たな化合物群の存在が明らかになってきた。モディファイドマイコトキシンとは、マイコトキシンの化学的修飾体の総称であり、植物がカビに感染した際の生体防御の結果として生産される配糖体や、マイコトキシンが混入した農作物を加熱加工する過程で生成される脂肪酸エステル体や加水分解物など多種多様なものの存在が報告されている。モディファイドマイコトキシン自体の毒性はもとの化合物よりも低下している例が多いものの、胃酸や腸内細菌による代謝によって修飾がはずされて元の化合物が体内で生じるという報告もあり、毒性はもとの化合物と同等とみなす方針が世界的な流れとなっている。フモニシン類にも複数のモディファイド化合物の存在が知られているものの、それらの科学的情報は少なく、ヒトの健康への影響を評価できる状況ではない。そこで、本研究においてはフモニシンのモディファイド化合物を調製し、食品中の汚染実態調査ならびに代謝に関する試験を行い、フモニシン類のリスク評価にモディファイド化合物を考慮する必要性の有無を判断するための情報の取得を目的とする。

3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
食品中の総フモニシンに関	総フモニシン量の定量法の開発	吉成知也（国立医薬品食品衛生研究所）

する研究	食品中の総フモニシン量の汚染調査	吉成知也（国立医薬品食品衛生研究所）
	トウモロコシ加工品に含まれるモディファイドフモニシンのプロファイル解析	吉成知也（国立医薬品食品衛生研究所）
水溶型モディファイドフモニシンに関する研究	水溶型モディファイドフモニシンの調製	渡辺麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所）
	水溶型モディファイドフモニシンの汚染調査	渡辺麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所）
	マトリクス結合型フモニシンの代謝試験	渡辺麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所）

4 倫理面への配慮について 特になし

II 研究内容及び成果等

(1) 研究項目名：食品中の総フモニシンに関する研究

1) 個別課題名：総フモニシン量の定量法の開発（研究担当者名：吉成知也（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所））

<研究内容・方法>

食品中のフモニシンにはもとのフモニシン（遊離型）とモディファイド化合物が存在し、さらにモディファイド化合物はでんぷんやタンパク質などの高分子化合物と結合した不溶型と、糖などの低分子化合物が共有結合した水溶型の2種類に分類される。モディファイド化合物がどの程度存在するかを調べるために、総フモニシン量（遊離型フモニシンとモディファイドフモニシンの総和）を測定する分析法の開発を行った。遊離型フモニシン、不溶型モディファイドフモニシンと一部の水溶性モディファイドフモニシンはアルカリ加水分解処理によって分解され、加水分解フモニシンとなる。つまり、食品からの抽出物のアルカリ加水分解物中の加水分解フモニシン量を測定し、もとの遊離型フモニシン量を差し引くことにより、モディファイド化合物の量を推定することができる。加水分解フモニシンの定量は、既報のものを改良した以下の方法で行った。破碎した検体 2.5 g を蒸留水 12.5 mL に懸濁し、さらに 4 mol/L の水酸化カリウム水溶液 12.5 mL を加え、1 時間振盪した。振盪後のサンプルにアセトニトリル 20 mL を加え、激しく攪拌した。遠心分離後、上清を回収した。このアセトニトリルによる抽出操作を合計 3 回行い、まとめて乾固した。乾固物を 50%アセトニトリル水溶液 5 mL に溶解して回収後、さらに同水溶液で 10 倍希釈し、LC-MS/MS を用いて加水分解フモニシン B₁、B₂ 及び B₃ を定量した。分析法の性能を調べるために、コーンフラワー、コーンフレーク、コーンスナック、コーンスープ及び精米にフモニシン B₁~B₃ 標準品を 50 又は 500 µg/kg の濃度になるよう添加し、回収率を求めた。

トウモロコシ加工品中の遊離型フモニシンについては、以下の方法で精製を行った。破碎した検体 5.0 g に 75%メタノール水溶液 25 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。

遠心分離 (3000 rpm、5 分間) 後、上清を回収した。コーンスナックについては、残渣に 75%メタノール水溶液を 25 mL 加え、30 分間再び振盪抽出を行った。遠心分離後、上清を回収し、一回目の抽出液と合わせた。メタノール 8 mL と 75%メタノール水溶液 8 mL で平衡化した陰イオン交換カートリッジに抽出液 10 mL を添加した。コーンフラワーとコーンスナックでは Bond Elut LRC SAX 500 mg cartridge (Agilent Technologies 社製) を、コーンフレークとコーンスープでは InertSep LSC SAX 500 mg (GL サイエンス社製) を用いた。75%メタノール水溶液 8 mL とメタノール 8 mL でカラムを洗浄後、1%酢酸を含むメタノール 14 mL で溶出した。溶出液を窒素気流で乾固後、残渣を 50%アセトニトリル水溶液 2 mL に溶解し、試験溶液とした。精米については、破碎した検体 5.0 g にメタノール-精製水-酢酸 (75 : 25 : 1) の混液 25 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。遠心分離後、上清を回収した。上清 4 mL と 1.25%アンモニア水 6 mL を混合した。メタノール 5 mL と 30%メタノール 5 mL で平衡化した InertSep MA-1 500 mg (GL サイエンス社製) に希釈した上清を添加し、メタノール 5 mL で 2 回洗浄後、2%ギ酸を含むメタノール 5 mL で溶出した。溶出液を窒素気流で乾固後、残渣を 50%アセトニトリル水溶液 0.8 mL に溶解し、試験溶液とした。試験溶液中の FB₁、FB₂ 及び FB₃ を LC-MS/MS で定量した。分析法の性能を調べるために、コーンフラワー、コーンフレーク、コーンスナック、コーンスープ及び精米にフモニシン B₁~B₃ 標準品を 50 又は 500 µg/kg の濃度になるよう添加し、回収率を求めた。

<結果及び考察>

アルカリ処理による加水分解フモニシンの分析法の結果を表 1 に示した。2 種の濃度で添加した 3 種のフモニシンについて、5 種の食品群における回収率は 75~111%の範囲に収まり、標準偏差は 7.1%以下であった。Codex 委員会が公表している分析法のガイドラインにおいては、添加濃度 100 µg/kg から 10 mg/kg における回収率の許容範囲は 80~110%、10 µg/kg では 60~115%とされている。コーンフレークの 500 µg/kg 添加の結果を除き、今回の結果は Codex 委員会のガイドラインを満たしていた。以上より、アルカリ処理した検体から加水分解フモニシン類をアセトニトリルで抽出する方法は、総フモニシンの分析に有用と考えられたため、実態調査に用いることとした。

表 1 トウモロコシ加工品と精米における加水分解フモニシンの添加回収試験の結果

分析対象	添加濃度 (µg/kg)	コーン フラワー	コーン フレーク	コーン スナック	コーン スープ	精米
HFB ₁	50	101.4 ± 3.4	85.2 ± 6.6	96.4 ± 6.0	84.5 ± 4.9	86.4 ± 3.7
	500	96.2 ± 1.9	87.1 ± 2.0	93.0 ± 4.8	84.3 ± 5.0	89.9 ± 1.8
HFB ₂	50	105.2 ± 4.8	92.3 ± 7.3	90.6 ± 4.7	90.5 ± 3.9	91.0 ± 4.9
	500	102.9 ± 3.4	89.8 ± 3.0	93.0 ± 5.8	89.1 ± 5.3	90.6 ± 1.2
HFB ₃	50	110.9 ± 7.1	79.0 ± 4.6	90.0 ± 2.1	87.8 ± 4.7	82.3 ± 5.9
	500	103.8 ± 4.6	75.3 ± 1.9	93.3 ± 3.9	85.9 ± 4.1	81.9 ± 2.1

平均値% ± 標準偏差 (n=6)

遊離型フモニシンの添加回収試験の結果を表 2 に示した。2 種の濃度で添加した 3 種の

フモニシンについて、4種のトウモロコシ加工品における回収率は83～101%の範囲に収まり、Codexのガイドラインを満たしていた。標準偏差は8.5%以下であった。精米の回収率は105～114%の範囲に収まり、Codexのガイドラインを概ね満たしていた。標準偏差は3.2%以下であった。以上より、陰イオン交換カートリッジを用いてフモニシンを精製する方法は、遊離型フモニシンの分析に有用と考えられたため、実態調査に用いることとした。

表2 トウモロコシ加工品と精米における遊離型フモニシンの添加回収試験の結果

分析対象	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	コーン フラワー	コーン フレーク	コーン スナック	コーン スープ	精米
FB ₁	50	85.7 ± 8.5	99.1 ± 3.0	96.9 ± 6.3	89.2 ± 1.5	110.5 ± 2.2
	500	84.4 ± 1.5	93.3 ± 0.9	86.1 ± 1.4	86.7 ± 3.0	106.9 ± 0.1
FB ₂	50	88.8 ± 0.5	100.8 ± 4.7	85.2 ± 2.7	89.1 ± 1.4	113.3 ± 3.2
	500	83.7 ± 1.0	95.8 ± 1.5	83.9 ± 1.4	88.6 ± 3.7	108.5 ± 1.0
FB ₃	50	89.5 ± 3.1	100.7 ± 2.5	88.1 ± 2.9	89.2 ± 3.2	105.9 ± 1.9
	500	85.3 ± 1.3	98.2 ± 3.4	84.6 ± 2.4	89.5 ± 1.7	108.0 ± 2.1

平均値% ± 標準偏差 (n=3)

2) 個別課題名：食品中の総フモニシン量の汚染調査（研究担当者名：吉成知也（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所））

<研究内容・方法>

性能を確認した分析法を用いて、日本国内に流通するトウモロコシ加工品と米に含まれる遊離型と全フモニシン量を定量した。2年間で合計206検体（コーンフラワー44検体、コーンスナック66検体、コーンフレーク34検体、コーンスープ22検体及び米40検体）を収集した。

2年間で得た汚染調査の結果を用い、モディファイドフモニシンも考慮したフモニシンのばく露量推定を行った。摂取量は、2005～2007年に実施された食品摂取量・摂取頻度調査の結果におけるコーンスナックとコーンフレークのデータを用いた。年齢層は1～6歳（1620人）、7～14歳（3419人）、15～19歳（2542人）、20歳以上（32814人）の4層に分類した。フモニシンの汚染濃度の分布に適合するモデルが存在しなかったため、汚染濃度のヒストグラムからカスタム分布を作成し、Crystal Ball（株）構造計画研究所）を用いてモンテカルロシミュレーション法を用いたばく露量の推定を行った。試行回数は100000とした。

<結果及び考察>

汚染調査の結果を表3に示す。コーンフラワー、コーンフレーク及びコーンスナックについては全検体からフモニシンが検出され、コーンスープでは陽性率は40.9%であった。遊離型フモニシン濃度の平均値に対する全フモニシン濃度の平均値の割合は、コーンフレークで最も高く4.7倍、次いでコーンスナックの2.8倍、コーンフラワーの2.1倍であり、遊離型フモニシンよりもモディファイドフモニシンの量が多いことが明らかになった。一方、コーンスープにおいては1.2倍とほとんど差は認められなかった。コーン

スナックの結果において、遊離型フモニシン量については EU における最大基準値 (FB₁ と FB₂ の合算値 800 µg/kg) を超える検体は認められなかったが、全フモニシン量では 800 µg/kg を超える検体が 4 件認められた。米については、いずれの検体においてもフモニシンは検出されなかった。

表 3 トウモロコシ加工品中の遊離型及び全フモニシンの調査結果 (2018~2019 年)

検体	陽性数/ 調査数 (%)	平均値			最大値	
		遊離型 フモニシン (µg/kg)	全フモニシン (µg/kg)	遊離型に対する 全フモニシンの比	遊離型 フモニシン (µg/kg)	全フモニシン (µg/kg)
コーンフラワー	44/44 (100)	221	455	2.1	1000	3355
コーンスープ	9/22 (40.9)	26	31	1.2	258	301
コーンフレーク	34/34 (100)	10	49	4.7	45	198
コーンスナック	66/66 (100)	60	167	2.8	748	1850

フモニシン量は B₁、B₂ 及び B₃ の和を示した。

表 4 コーンフレークとコーンスナックの結果を用いたフモニシンのばく露量推定

年齢		%タイル値						平均値
		50	70	90	95	98	99	
1~6	遊離フモニシン	0	0	0	7	22	58	4
	全フモニシン	0	0	0	25	88	228	12
7~14	遊離フモニシン	0	0	0	2	13	33	2
	全フモニシン	0	0	0	6	44	117	5
15~19	遊離フモニシン	0	0	0	0	5	19	1
	全フモニシン	0	0	0	0	18	70	3
20~	遊離フモニシン	0	0	0	0	0	0	0.2
	全フモニシン	0	0	0	0	0	0	0.7

単位は ng/kg 体重/日

ばく露量推定の結果を表 4 に示す。50~90%タイル値については、いずれの年齢層においても 0 ng/kg 体重/日であった。遊離型フモニシンのばく露量は 1~6 歳の年齢層で最も高かったが、99%タイル値においても 58 ng/kg 体重/日であり、食品安全委員会が提唱したフモニシンの TDI (2 µg/kg 体重/日) を大きく下回っていた。全フモニシン量を用いて推定した場合、98%タイル値及び 99%タイル値は遊離型フモニシン量を用いた場合の 3~4 倍に増加した。しかし、1~6 歳の年齢層の 99%タイル値においてもばく露量は 228 ng/kg 体重/日であり、TDI を大きく下回っていた。日本人のトウモロコシ加工品の摂

取量は少ないため、モディファイドフモニシンを考慮し、ばく露量が3~4倍に増加してもTDIを上回らなかったが、トウモロコシ加工品を主食とする地域においては、モディファイドフモニシンを考慮するとばく露量は非常に大きくなると考えられる。モディファイドフモニシンをばく露量に考慮する必要があるかどうかを明らかにするために、モディファイドフモニシンの性状を明らかにするための試験を引き続き実施した。

3) 個別課題名：トウモロコシ加工品に含まれるモディファイドフモニシンの性状の解析（研究担当者名：吉成知也（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所））

<研究内容・方法>

汚染調査の結果で認められた全フモニシンと遊離型フモニシン量の差分にあたるフモニシンの性状を明らかにするために、75%メタノール水溶液で遊離型フモニシンを抽出した後に残る残渣をアルカリ処理し、マトリクスに結合しているフモニシンの量を測定した。破碎した検体 2.5 g に 75%メタノール水溶液 12.5 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。遠心分離（3000 rpm、5 分間）後、上清を捨てた。残渣に再び 75%メタノール水溶液 12.5 mL を加え、懸濁した。遠心分離（3000 rpm、5 分間）後、上清を捨てた。残渣を減圧したデシケーター内に置き、1 時間乾燥した。残渣を 1) で述べた方法でアルカリ処理し、生成した加水分解フモニシンを定量した。

5倍量の75%メタノール水溶液では抽出できない遊離型フモニシンを抽出するために、以下の方法を用いた。破碎したコーンスナック 5 g に精製水 50 mL を加え懸濁した。懸濁液にメタノール 150 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。抽出液を遠心分離（3000 rpm、5 分間）後、上清 2 ml を回収し、精製水 8 mL を混合した。アセトニトリル 2 mL と精製水 2 mL で前処理した ISOLUTE Myco 60 mg（Biotage 社製）に希釈した抽出液を全量添加し、精製水 3 mL と 10%アセトニトリル水溶液 3 mL で洗浄後、シリンジを用いてカラム内の水分を除去した。0.1%ギ酸を含むアセトニトリル 2 mL でカラムを洗浄後、シリンジを用いてカラム内の溶媒を除去した。0.1%ギ酸を含むメタノール 2 mL をカラムに加え、溶出液を回収した。溶出液を窒素気流で乾固後、残渣を 50%アセトニトリル水溶液 0.5 mL に溶解し、試験溶液とした。試験溶液中の FB₁、FB₂ 及び FB₃ を LC-MS/MS で定量した。分析法の性能を調べるために、コーンスナックにフモニシン B₁~B₃ 標準品を 200 又は 1000 µg/kg の濃度になるよう添加し、回収率を求めた。

<結果及び考察>

コーンフレーク 5 検体及びコーンスナック 3 検体における遊離型フモニシン、全フモニシン、全フモニシンから遊離型フモニシンの量を差し引いたモディファイドフモニシンの推定値、マトリクス結合型フモニシン量及び推定モディファイドフモニシン量に対するマトリクス結合型フモニシンの割合を表 5 に示した。コーンフレークにおいては推定モディファイドフモニシン量の 56~68%がマトリクスに結合し、残渣に存在していることが明らかになった。一方、コーンスナックにおいては、残渣に存在するマトリクス結合型フモニシンの推定モディファイドフモニシン量に対する割合は 83~98%であり、大部分を占めていた。

表5 トウモロコシ加工品8検体における遊離型フモニシン、全フモニシン及びマトリクス結合型フモニシン量の比較

検体	遊離型フモニシン (A) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	全フモニシン (B) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	モディファイド フモニシンの推定量 (C=B-A) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	マトリクス結合型 フモニシン (D) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	D/C \times 100 (%)
コーンフレーク1	10	34	23	16	68
コーンフレーク2	13	34	21	14	68
コーンフレーク3	28	106	79	44	56
コーンフレーク4	37	147	110	79	72
コーンフレーク5	43	143	100	61	61
コーンスナック1	237	536	300	248	83
コーンスナック2	332	1014	682	644	94
コーンスナック3	647	1377	730	714	98

分担研究者による消化酵素を用いたマトリクス結合フモニシンの溶出試験の過程において、40倍量の75%メタノール水溶液を抽出に用いると、5倍量の75%メタノール水溶液では溶出できなかったマトリクス結合型フモニシンが溶出されることが判明した。そこで、コーンスナックに含まれる遊離型フモニシン量をより正確に定量するための分析法の開発を行った。コーンスナックに10倍量の精製水を加えて膨潤させた後、30倍量のメタノールを加えてフモニシンを抽出した。精製にはSAXカートリッジよりも短時間で簡便にフモニシンが精製可能な固相カートリッジを用いた。本分析法を以下、改良法と記載する。FB₁、FB₂及びFB₃がそれぞれ200又は1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度になるよう標準品を添加した検体を用いて添加回収試験を行った結果を表6に示した。FB₁、FB₂及びFB₃の回収率は95~105%の範囲に収まり、Codexのガイドラインを満たしていた。標準偏差は4.3%以下であった。

表6 コーンスナックにおける改良法による遊離型フモニシンの添加回収試験の結果

測定対象	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%、平均値 \pm 標準偏差)
FB ₁	200	104.9 \pm 1.8
	1000	99.6 \pm 3.2
FB ₂	200	101.1 \pm 4.3
	1000	96.8 \pm 0.9
FB ₃	200	101.5 \pm 1.9
	1000	95.6 \pm 2.7

改良法を用いたコーンスナック中のフモニシン量の定量結果については、「個別課題名：水溶型モディファイドフモニシンの汚染調査」でまとめて示した。

(2) 研究項目名：水溶性モディファイドフモニシンに関する研究

1) 個別課題名：水溶性モディファイドフモニシンの調製（研究担当者名：渡辺麻衣子
（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所））

<研究内容・方法>

フモニシンのモディファイド化合物は市販されていないため、分析に用いる標準品を化学合成により調製した。国立医薬品食品衛生研究所に保管されている真菌ライブラリーからフモニシンを生産する可能性のある *Fusarium* 属カビ合計 165 株を選択し、液体培地で培養し、フモニシン産生能を調べた。試験した株のうち、安定かつ大量のフモニシン生産が認められた *Fusarium fujikuroi* IMF50102 株をフモニシン大量調製用に用いることとした。IMF50102 株をフモニシン誘導液体培地 1.2 L に植菌し、10 日間 25°C で静置培養した。培養液をろ過後、メタノール 20 mL と蒸留水 20 mL で前処理した HF Mega BE-C18 5 g カートリッジ (Agilent Technologies 社製) にろ液 20 mL を添加し、蒸留水、10%アセトニトリル水溶液、20%アセトニトリル水溶液それぞれ 20 mL で洗浄後、2%アンモニア水を含む 50%アセトニトリル水溶液 20 mL で溶出した。溶出画分をまとめ、エバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した (収量 333 mg)。メタノール 40 mL と 75%メタノール水溶液 40 mL で前処理した InertSep SAX カートリッジ (GLサイエンス社製) に凍結乾燥物 80 mg を添加し、75%メタノール水溶液 40 mL とメタノール 40 mL で洗浄後、1%酢酸を含むメタノール 120 mL で溶出した。溶出液をまとめ、エバポレーターで濃縮した。濃縮液を水に懸濁後、等量の酢酸エチルを加え、液々分配を行った。フモニシンが含まれる水層を回収し、HPLC によりフモニシンを分取した。収量は FB₁ 151 mg、FB₂ 65 mg、FB₃ 81 mg であった。この操作を合計 4 回行い、誘導體調製に十分な量を得た。

加水分解フモニシンの調製：3 種のフモニシンそれぞれ 10 mg を 2 mol/L 水酸化カリウム水溶液 3 mL に溶解し、室温で 3 時間アルカリ処理をした。アセトニトリル 3 mL による抽出操作を 3 回行った。抽出液をまとめ、窒素気流により乾固し、HFB₁、HFB₂ 及び HFB₃ を得た。

グルコース配糖体、*N*-(1-deoxy-D-fructos-1-yl) fumonisin B₁ (NDF-FB₁) の調製：

FB₁ 48 mg と D-グルコース 420 mg を *N,N*-ジメチルホルムアミド 15 mL に溶かし、64°C で 36 時間インキュベートした。反応液に精製水 135 mL を加えて希釈後、メタノール 20 mL と精製水 20 mL で平衡化した InertSep C18 FF 5 g カートリッジ (GLサイエンス社製) に添加した。精製水 20 mL と 10%アセトニトリル水溶液 20 mL でカラムを洗浄後、50%アセトニトリル水溶液 20 mL で溶出した。溶出液を濃縮後、HPLC により目的の化合物を分取精製した。

ラクトース配糖体の調製：FB₁ 55 mg と β-ラクトース 840 mg を *N,N*-ジメチルホルムアミド 24 mL に溶かし、64°C で 48 時間インキュベートした。反応液に精製水 216 mL を加えて希釈後、メタノール 20 mL と精製水 20 mL で平衡化した InertSep C18 FF 5 g カートリッジに添加した。精製水 20 mL と 10%アセトニトリル水溶液 20 mL でカラムを洗浄後、50%アセトニトリル水溶液 20 mL で溶出した。溶出液を濃縮後、HPLC により目的の化合物を分取精製した。

2) 個別課題名：水溶性モディファイドフモニシンの汚染調査（研究担当者名：渡辺麻

衣子（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

<研究内容・方法>

コーンフラワーとコーンフレーク中のグルコース配糖体とラクトース配糖体については、上述の遊離型フモニシンの分析法と同様の陰イオン交換カートリッジを用いる方法で精製を行った。コーンスナックについては、破碎した検体 5 g に精製水 50 mL を加え懸濁後、メタノール 150 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。得られた抽出液を遊離型フモニシンの分析法と同様の陰イオン交換カートリッジを用いる方法で精製し、窒素乾固後の残渣は 0.5 mL の 50%アセトニトリル水溶液に溶解した。分析法の性能を調べるために、各配糖体の濃度が 10 又は 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度になるよう添加し、回収率を求めた。

コーンフレークとコーンスナック中の加水分解フモニシンについては、以下の方法で精製を行った。破碎した検体 5 g に精製水 50 mL を加え懸濁した。懸濁液にメタノール 150 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。抽出液を遠心分離（3000 rpm、5 分間）後、上清 2 mL を回収し、1 mol/L 塩酸 8 mL を混合した。コーンフレークについては、メタノール 2 mL と精製水 2 mL で前処理した InertSep C18-C FF 500 mg カートリッジ（GL サイエンス社製）に希釈した抽出液を全量添加し、25%メタノール水溶液 2 mL、50%メタノール水溶液 2 mL とメタノール 2 mL でカラムを洗浄後、5%酢酸を含むメタノール 2 mL をカラムに加え、溶出液を回収した。溶出液を窒素気流で乾固後、残渣を 50%アセトニトリル水溶液 0.5 mL に溶解し、試験溶液とした。コーンスナックについては、メタノール 2 mL と精製水 2 mL で前処理した Sep-Pak Vac C18 200 mg カートリッジ（Waters 社製）に希釈した抽出液を全量添加し、25%メタノール水溶液 2 mL と 50%メタノール水溶液 2 mL でカラムを洗浄後、5%酢酸を含むメタノール 2 mL をカラムに加え、溶出液を濃縮管に回収した。溶出液を窒素気流で 250 μL 程度まで濃縮後、90%アセトニトリル水溶液で 0.5 mL にメスアップし、試験溶液とした。試験溶液中の HFB₁、HFB₂ 及び HFB₃ を LC-MS/MS で定量した。分析法の性能を調べるために、検体に加水分解フモニシン B₁～B₃ 標準品を 10 又は 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度になるよう添加し、回収率を求めた。

<結果及び考察>

陰イオン交換カートリッジを用いて 2 種のフモニシン配糖体の精製を行う分析法の添加回収試験の結果を表 7 に示した。コーンフラワーにおける 2 種の配糖体の回収率の平均値は 86～99%の範囲に収まり、Codex のガイドラインを満たしていた。標準偏差は 6.3% 以下であった。コーンフレークではグルコース配糖体を 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加した際の回収率の平均値が Codex のガイドラインの上限（115%）を少し上回ったが、その他の結果はガイドラインを満たしていた。コーンスナックでは 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加時の 2 種の配糖体の回収率は 104～108%、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加時では 101～103%の範囲に収まり、Codex のガイドラインを満たしていた。標準偏差は 5.8%以下であった。C18 カートリッジを用いた精製法も検討したが、良好な結果は得られなかったため、陰イオン交換カートリッジを用いることとした。

表7 トウモロコシ加工品中のFB₁配糖体の添加回収試験の結果

分析対象	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%、平均値 \pm 標準偏差)		
		コーンフラワー	コーンフレーク	コーンスナック
フモニシンB ₁	10	98.1 \pm 3.2	116.6 \pm 5.1	104.4 \pm 2.8
グルコース配糖体	100	94.0 \pm 1.6	108.8 \pm 3.6	102.9 \pm 1.5
フモニシンB ₁	10	86.6 \pm 6.3	100.3 \pm 6.3	107.6 \pm 5.8
ラクトース配糖体	100	89.9 \pm 2.7	102.2 \pm 3.9	101.4 \pm 5.2

コーンフラワーとコーンフレークに含まれるフモニシン配糖体を定量した結果を表8に示した。コーンフラワーにおいては、グルコース配糖体は86.4%の検体で検出されたが、平均濃度は5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でFB₁の平均濃度161 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の3.1%であり、FB₁より汚染レベルは低かった。コーンフレークにおいては、グルコース配糖体は88.2%の検体で検出された。コーンフレークにおけるFB₁の平均濃度は8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、コーンフラワーと比較して約20分の1であったが、グルコース配糖体の平均濃度はコーンフラワーとコーンフレークで大きな差は認められなかった。コーンスナックについては、フモニシン汚染量が特に高かった8検体について調査を行い、その結果を表9に示した。FB₁に対するグルコース配糖体の濃度は1.3~4.1%で、配糖体の汚染レベルはFB₁より低かった。ラクトース配糖体はいずれの検体からも検出されなかった。これらの結果より、フモニシンのグルコースやラクトース配糖体は、コーンフレークやコーンスナックの生産過程で生じる量は少なく、原料のコーンフラワーに含まれているグルコース配糖体が残存することが明らかになった。汚染濃度を考慮すると、グルコース配糖体の健康へのリスクはFB₁よりも非常に低いと考えられる。

表8 コーンフラワーとコーンスナック中のフモニシンB₁配糖体の調査結果

測定対象	コーンフラワー 44検体			コーンフレーク 34検体		
	陽性率 (%)	平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	陽性率 (%)	平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
FB ₁	100	161	721	100	8	36
FB ₁ グルコース配糖体	86.4	5	19	88.2	3	17
FB ₁ ラクトース配糖体	0.0	-	-	0.0	-	-

表9 コーンスナックにおけるフモニシン B₁ 配糖体の調査結果

検体	FB ₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	FB ₁ -グルコース配糖体 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	配糖体の割合 (%)
コーンスナック-1	53	1	1.9
コーンスナック-2	76	2	2.2
コーンスナック-3	80	1	1.8
コーンスナック-4	83	1	1.3
コーンスナック-5	101	2	1.9
コーンスナック-6	389	16	4.1
コーンスナック-7	574	16	2.8
コーンスナック-8	815	30	3.7

検体に含まれる遊離型の加水分解フモニシンの分析法の性能を添加回収試験によって評価した結果を表10に示した。コーンフレーク及びコーンスナックにおける3種の加水分解フモニシンの回収率の平均値はそれぞれ100~107%及び89~100%の範囲に収まり、Codexのガイドラインを満たしていた。標準偏差はそれぞれ6.1%及び3.9%以下であった。以上の結果より、この分析法を検体中の遊離型の加水分解フモニシンの定量に用いることとした。

表10 コーンフレークとコーンスナックにおける加水分解フモニシンの添加回収試験の結果

測定対象	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%、平均値 \pm 標準偏差)	
		コーンフレーク	コーンスナック
HFB ₁	10	106.7 \pm 3.9	92.2 \pm 2.8
	100	106.8 \pm 3.6	99.4 \pm 3.8
HFB ₂	10	100.6 \pm 2.1	89.2 \pm 3.9
	100	100.9 \pm 1.2	95.4 \pm 3.0
HFB ₃	10	100.0 \pm 3.5	89.2 \pm 2.4
	100	100.8 \pm 6.1	95.5 \pm 2.5

表11にフモニシン汚染量が特に高かったコーンスナック8検体におけるSAX法(5倍量の75%メタノール水溶液で抽出し、陰イオン交換カートリッジで精製する分析法)と改良法で遊離型フモニシンを測定した結果、加水分解フモニシンの定量値及び全フモニシン量を示した。改良法で遊離型フモニシンを分析すると定量値はSAX法で分析した際の2~4.5倍となった。検体の40倍量の75%メタノール水溶液を抽出に用いることで、5倍量の75%メタノール水溶液では抽出できなかったマトリクス結合型フモニシンが溶出したと考えられる。改良法で抽出されたフモニシンは、マトリクスが体内で消化された際には溶出し、フモニシンとして毒性を発揮する新たなリスク因子であると考えられ

る。コーンスナック 8 検体のうち、7 検体から加水分解フモニシンが検出された。フモニシンに対する濃度比は 0~47%と検体によりバラつきが認められた。

表 11 コーンスナックにおけるフモニシンと加水分解フモニシンの定量結果

検体	SAX法	改良法	加水分解フモニシン (フモニシン換算) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	全フモニシン ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	フモニシン ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
コーンスナック-1	19	83	31	129
コーンスナック-2	32	103	48	166
コーンスナック-3	42	138	17	159
コーンスナック-4	70	152	ND	162
コーンスナック-5	74	133	1	168
コーンスナック-6	226	481	36	577
コーンスナック-7	267	853	85	1040
コーンスナック-8	602	1255	94	1511

図 1 にコーンスナック 8 検体における全フモニシンの内訳を示した。遊離型フモニシンの割合は 61~94%、加水分解フモニシンも合わせると 80~98%となり、コーンスナックにおいては遊離型フモニシンと加水分解フモニシンが主に含まれることが明らかになった。

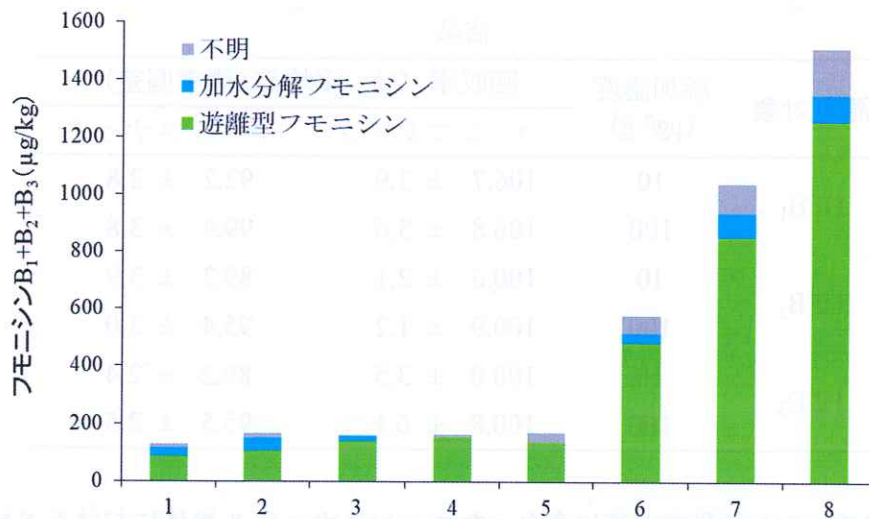


図 1 コーンスナックにおける全フモニシンの内訳

表 12 にフモニシン汚染量が高かったコーンフレーク 5 検体における SAX 法(5 倍量の 75%メタノール水溶液で抽出し、陰イオン交換カートリッジで精製する分析法)と改良法で遊離型フモニシンを測定した結果、加水分解フモニシンの定量値、改良法で抽出後の残渣に含まれるフモニシン量及び全フモニシン量を示した。改良法で遊離型フモニシンを分析すると定量値は SAX 法で分析した際の 1.2~2.1 倍となり、コーンスナックより

も増加率は低かった。コーンフレーク 5 検体のうち、4 検体から加水分解フモニシンが検出された。遊離型フモニシンに対する濃度比は 0~17%であり、コーンスナックよりもフモニシンに対する割合は低かった。改良法で抽出後の残渣にフモニシンが残存しており、改良法でも抽出できない形態のマトリクス結合型フモニシンが存在することがわかった。

表 12 コーンフレークにおけるフモニシンと加水分解フモニシンの定量結果

検体	SAX法	改良法	加水分解フモニシン (フモニシン換算) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	改良法で抽出後の残渣 に含まれるフモニシン ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	全フモニシン ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	フモニシン	($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
コーンフレーク-1	13	16	ND	4	34
コーンフレーク-2	10	22	4	6	34
コーンフレーク-3	28	37	5	28	106
コーンフレーク-4	43	65	3	36	143
コーンフレーク-5	37	55	5	29	147

図 2 にコーンフレーク 5 検体における全フモニシンの内訳を示した。遊離型フモニシンの割合は 35~65%、加水分解フモニシンも合わせると 40~76%であった。マトリクス結合型フモニシンが 10~26%存在し、残りの形態が不明なフモニシンが 8~42%含まれていることが明らかになった。

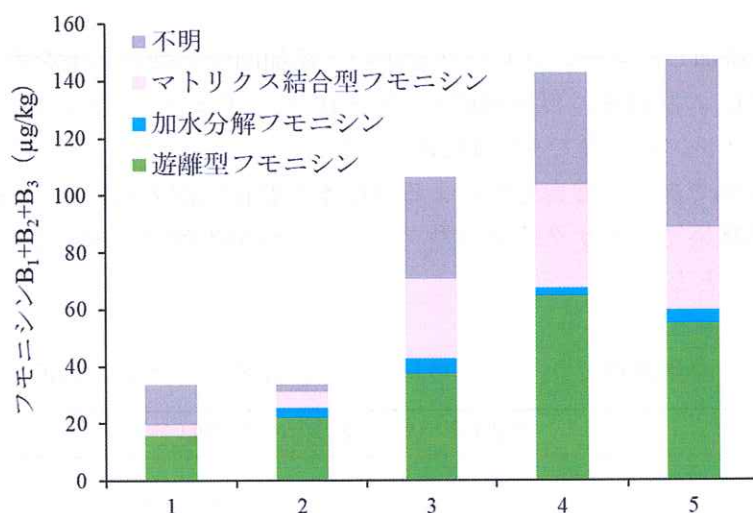


図 2 コーンフレークにおける全フモニシンの内訳

3) 個別課題名：マトリクス結合型フモニシンの代謝試験（研究担当者名：渡辺麻衣子（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所））

<研究内容・方法>

これまでの結果より、コーンスナックに含まれるモディファイドフモニシンの性状はほとんど明らかになった。一方、コーンフレークに含まれるモディファイドフモニシン

については、マトリクス結合型が全フモニシンの 25%程度存在することが明らかになった。そこで、コーンフレーク中のマトリクス結合型フモニシンが体内でフモニシンとして溶出する可能性があるかどうか、消化酵素を用いた *in vitro* の試験系で確認した。

検体 2.5 g を 50 mL チューブに量り入れ、25 mL の精製水で懸濁した。 α -アミラーゼ (from *Bacillus* sp. Type II-A、シグマアルドリッチ社製) の懸濁液 (10 mg/mL 水溶液) を 80 μ L を加え、37°C、1000 rpm で 30 分間振盪した。懸濁液に 6 mol/L 塩酸を 417 μ L 加えて pH を 2.0 に調整後、ペプシン (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) 25 mg を加え、37°C、1000 rpm で 30 分間振盪した。炭酸水素ナトリウム水溶液 (80 mg/mL) 2.5 mL を加えて中和後、パンクレアチン (東京化成工業社製) 150 mg を加え、37°C、1000 rpm で 30 分間振盪した。各酵素処理後の懸濁液を共栓付きの三角フラスコに全量移し、メタノール 75 mL を加えて 30 分振盪した。抽出液の一部を 50 mL チューブに移し、3000 rpm で 10 分間遠心した。上清 2 mL を回収し、精製水 8 mL で希釈した。アセトニトリル 2 mL と精製水 2 mL で前処理した ISOLUTE Myco (60 mg) カートリッジ (Biotage 社製) に希釈液を全量添加し、精製水 3 mL と 10%アセトニトリル水溶液 3 mL で洗浄した。シリンジでカラム内の溶媒を除去後、0.1%ギ酸を含むアセトニトリル 2 mL で洗浄した。シリンジでカラム内の溶媒を除去後、0.1%ギ酸を含むメタノール 2 mL で溶出した。溶出液を窒素気流で乾固後、50%アセトニトリル水溶液 0.5 mL で残渣を溶解した。溶解液中の FB₁、FB₂ 及び FB₃ を LC-MS/MS で定量した。酵素処理によるフモニシンの減衰の有無を確認するために、各フモニシンの濃度が 200 μ g/kg の濃度になるよう添加した検体を用いて、回収率を求めた。

<結果及び考察>

フモニシンを添加したコーンフレークを用いた添加回収試験の結果を表 13 に示した。FB₁、FB₂ 及び FB₃ の回収率は無処理群で 104~109%、アミラーゼ処理群で 97~102%、アミラーゼとペプシン処理群で 98~111%、アミラーゼ、ペプシン及びパンクレアチン処理群で 101~107%であり、酵素処理による回収率の変化は認められなかった。よって、この *in vitro* の試験系でマトリクス結合型フモニシンが消化酵素処理によって溶出するかどうかを調べることにした。

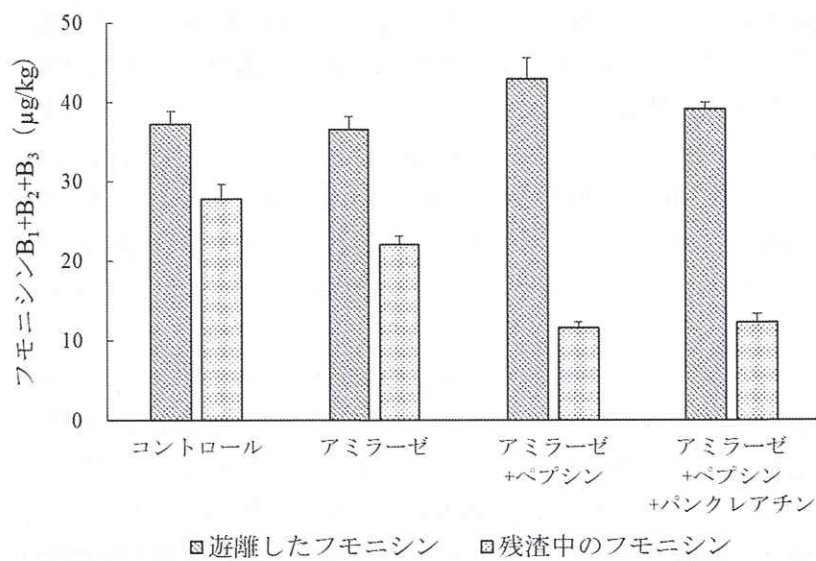
表 13 酵素処理したコーンフレークにおけるフモニシンの回収率

測定対象	回収率 (%、平均値 \pm 標準偏差)			
	無処理	アミラーゼ	アミラーゼ +ペプシン	アミラーゼ +ペプシン +パンクレアチン
FB ₁	108.0 \pm 2.3	101.9 \pm 0.1	110.4 \pm 4.2	106.7 \pm 1.1
FB ₂	108.9 \pm 0.2	100.6 \pm 2.4	104.5 \pm 2.1	105.0 \pm 2.1
FB ₃	104.9 \pm 2.5	97.7 \pm 1.8	98.6 \pm 4.7	101.2 \pm 1.2

コーンフレーク 2 検体を用いて各酵素消化の段階で溶出したフモニシンと残渣に残っ

ているマトリクス結合型フモニシンをアルカリ処理して加水分解フモニシンとして定量した。結果を図3に示した。抽出溶媒中に遊離したフモニシン量は2種のコーンフレーク検体において酵素処理を行ってもほとんど増加しなかった。一方で、残渣中のフモニシンはアミラーゼ処理によって約20%、アミラーゼ処理とペプシン処理によって約60%減少した。パンクレアチン処理による量の変化は認められなかった。マトリクス結合型フモニシンが消化酵素処理によって溶出したのにもかかわらず、遊離型フモニシンの量は増加しなかったことから、コーンフレークのマトリクスには水溶性のモディファイドフモニシンが含まれていると推定されるが、その化学構造は不明である。

A)



B)

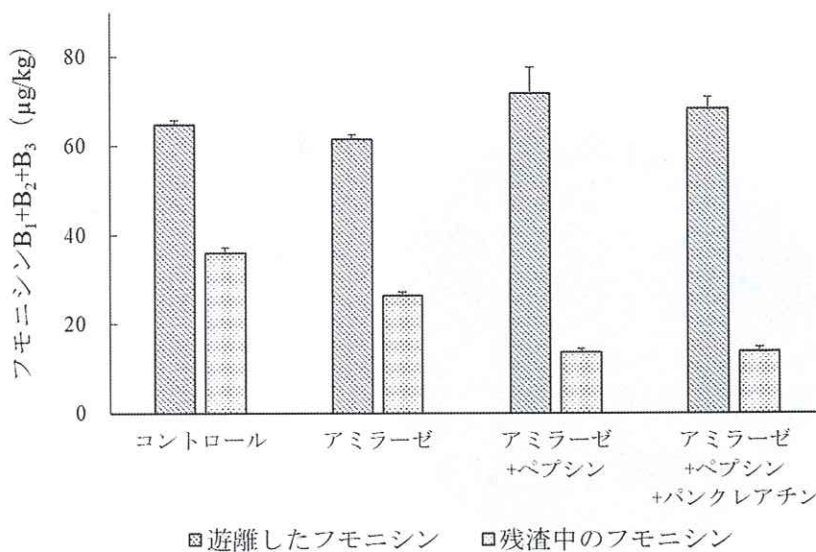


図3 コーンフレークを消化酵素処理した時の溶出したフモニシンと残渣に残ったフモニシンの定量

(2) 研究全体の成果、考察及び結論

本研究は、日本人の健康に対するモディファイドフモニシンのリスク評価を行うための情報を得ることを目的とした。まず、食品に含まれるモディファイドフモニシンの量を推定するため、アルカリ処理法により全フモニシン量を測定する方法を開発し、分析法の性能評価を行った。性能が確認された分析法を用い、2年間で合計206検体（コーンフラワー44検体、コーンスナック66検体、コーンフレーク34検体、コーンスープ22検体及び米40検体）の汚染調査を行った。その結果、トウモロコシ加工品においては遊離型フモニシンよりもモディファイドフモニシンの方が多く混入していることが明らかになった。

2年間で得た汚染調査の結果を用い、モディファイドフモニシンも考慮したフモニシンのばく露量推定を行った。遊離型フモニシンのばく露量は1～6歳の年齢層で最も高かったが、99%タイル値においても58 ng/kg 体重/日であり、食品安全委員会が提唱したフモニシンのTDI (2 µg/kg 体重/日) を大きく下回っていた。全フモニシン量を用いて推定した場合、98%タイル値及び99%タイル値は遊離型フモニシン量を用いた場合の3～4倍に増加した。しかし、1～6歳の年齢層の99%タイル値においてもばく露量は228 ng/kg 体重/日であり、TDI を大きく下回っていた。日本人のトウモロコシ加工品の摂取量は少ないため、モディファイドフモニシンを考慮し、ばく露量が3～4倍に増加してもTDIを上回らなかった。

次に、コーンフレークとコーンスナックに含まれるモディファイドフモニシンの性状を明らかにするために、水溶性モディファイドフモニシンの標準品の調製、分析法の開発、汚染調査を行った。その過程において、これまで厚生労働科学研究などで用いられてきた抽出法では検体中のフモニシンを抽出しきれていないことが明らかになった。そこで、マトリクスに結合したフモニシンも抽出可能な分析法を新規に開発し、モディファイドフモニシンの性状を解析した。全フモニシンを100%とした時のコーンスナックに含まれるそれぞれのフモニシンの割合を図4に示した。

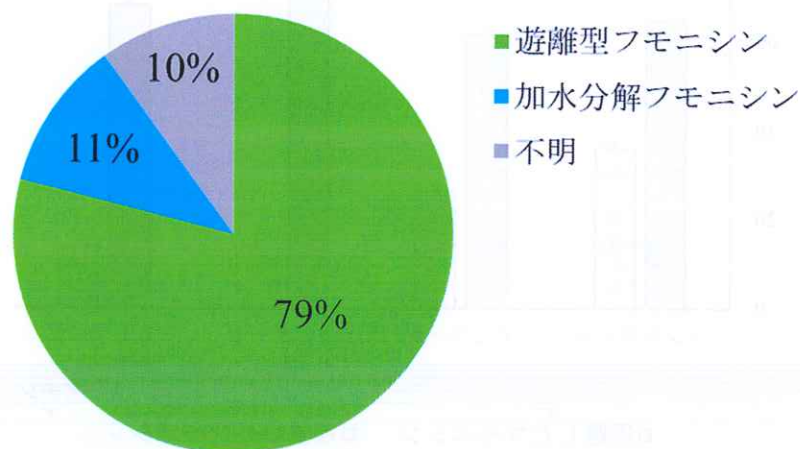


図4 コーンスナックに含まれるフモニシンの性状

コーンスナックを汚染するフモニシンとしては、遊離型が79%で大部分を占めており、モディファイドフモニシンとしては加水分解フモニシンが平均で11%含まれていた。加水分解フモニシンの毒性はフモニシンよりも低い、又は認められないという報告があることから、ヒトの健康へのリスクは低いと考えられる。よって、コーンスナックに含まれるヒトの健康にリスクのあるフモニシンは、遊離型フモニシンと不明なものを合わせて全フモニシンの89%と推定される。また、これらとは別にグルコース配糖体が遊離型フモニシン量の数%含まれる。グルコース配糖体やその分解物である*N*-カルボキシメチル体の毒性はもとのフモニシンより低いという報告があること、及び汚染濃度を考慮すると、コーンスナックに含まれるグルコース配糖体のヒトの健康へのリスクは遊離型フモニシンより非常に低いと考えられる。

全フモニシンを100%とした時のコーンフレークに含まれるそれぞれのフモニシンの割合を図5に示した。

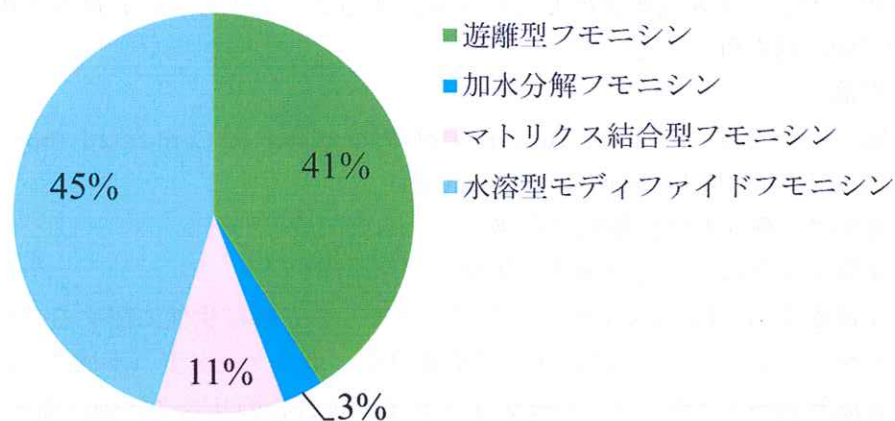


図5 コーンスナックに含まれるフモニシンの性状

遊離型フモニシンと加水分解フモニシンの含有率はいずれもコーンスナックよりも低く、それぞれ41%及び3%であった。また、*In vitro*での消化酵素処理を行っても溶出されないマトリクス結合型フモニシンが11%存在したが、生体内でも遊離せず、排出される可能性が高い。残りが化学構造の不明な水溶型モディファイドフモニシンと考えられた。アルカリ処理によって加水分解フモニシンに変換される水溶型モディファイドフモニシンとしては、部分的に加水分解されたフモニシンや、タンパク質やデンプンなどのマトリクスの一部がトリカルボン酸部位に共有結合したものなどが挙げられるが、コーンフレークに含まれる水溶型モディファイドフモニシンの詳細については不明である。ヒトの健康にリスクのあると考えられるフモニシンは、遊離型フモニシンと詳細不明な水溶型モディファイドフモニシンを合わせて86%と推定される。また、これらとは別にグルコース配糖体が遊離型フモニシン量の20~40%含まれていた。グルコース配糖体の毒性は遊離型フモニシンよりも低いと考えられているが、汚染量によってはリスク因子となる可能性があるため、コーンフレーク中のグルコース配糖体については汚染実態調査の情報を蓄積する必要があると考えられる。

以上の結果より、フモニシンが高頻度かつ高濃度で検出されるトウモロコシ加工品であるコーンスナックとコーンフレークにおいて、モディファイドフモニシンの混入実態が明らかになった。コーンスナックとコーンフレークからのフモニシンのばく露量について、全フモニシン量を用いた場合は遊離型フモニシン量を用いた場合の3~4倍に増加した。上述したようにコーンスナックとコーンフレーク中のリスクがあると考えられるフモニシンは全フモニシン中の89%及び86%と推定されることから、全フモニシン量のほとんどがリスク因子であり、モディファイドフモニシンも考慮に入れた日本人におけるフモニシンのばく露量はこれまで考えられていた量の3~4倍であると考えられる。

今後、本研究で開発した分析法を用い、調査結果を蓄積し、より正確なばく露量を算出することにより、日本人におけるフモニシンの真のリスク評価が行えると考ええる。

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。）

① 投稿中

題名：Analysis of Modified Forms of Fumonisin in Corn-based Products Retailed in Japan by an Alkaline Hydrolysis Method

雑誌名：◎日本食品衛生学会誌

2 本研究を基にした学会発表の実績

- ① 小池義浩ら「*Fusarium* 属菌におけるフモニシン類産生性に関する分類学的検討」日本マイコトキシン学会第82回学術講演会 ポスター発表（平成30年8月24日）
- ② 吉成知也ら「フモニシンのモディファイド化合物のリスク評価に関する研究」第114回日本食品衛生学会学術講演会 口頭発表（平成30年11月15日）
- ③ 小池義浩ら「アルカリ処理法によるトウモロコシ加工品中のモディファイドフモニシン量の推定に関する研究」日本マイコトキシン学会第84回学術講演会 口頭発表（2019年8月23日）
- ④ 吉成知也ら「トウモロコシ加工品中のモディファイドフモニシンの測定法に関する研究」第56回全国衛生化学技術協議会年会 ポスター発表（2019年12月6日）

3 特許及び特許出願の数と概要

なし

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

なし

Ⅳ 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
------	------	----------

<p>(1) 食品中の総フモニシンの汚染調査を行い、モディファイドフモニシンの含有量を明らかにし、さらにばく露量推定を行う。</p>	<p>5</p>	<p>2年間で206検体の調査を行い、遊離型フモニシンの汚染調査を行い、モディファイドフモニシンの含有量を明らかにし、さらにばく露量推定を行う。2年間で206検体の調査を行い、遊離型フモニシンの汚染調査を行い、モディファイドフモニシンの含有量を明らかにし、さらにばく露量推定を行う。2年間で206検体の調査を行い、遊離型フモニシンの汚染調査を行い、モディファイドフモニシンの含有量を明らかにし、さらにばく露量推定を行う。</p>
<p>(2) 食品中の水溶性モディファイド化合物の含有量を調べるために、調製した標準品を用いてモディファイド化合物の精製・定量法を開発する。</p>	<p>5</p>	<p>加水分解フモニシン、グルコース配糖体及びラクトース配糖体の3種類の水溶性モディファイドフモニシンの分析法の確立に成功した。確立した分析法を用い、それら水溶性モディファイドフモニシンの汚染量を明らかにした。さらに、生体内で溶出する可能性のあるマトリクス結合型フモニシンも定量可能な分析法を開発し、トウモロコシ加工品中の真のフモニシン汚染量を定量可能とした。</p>
<p>(3) 食品中に検出されたモディファイド化合物について、化学的安定性を調べることにより、生体内でもとのフモニシンに代謝されるか否かを調べる。</p>	<p>5</p>	<p>In vitroにおいて消化酵素でマトリクスを消化した際にマトリクス結合型フモニシンが溶出するかどうかを調べた系の構築に成功した。さらに、コーンフレーク中のマトリクス結合型フモニシンの動態を明らかにした。</p>

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
<p>(1) 研究目標の達成度</p>	<p>5</p>	<p>目標としていたモディファイドフモニシンの汚染実態調査、ばく露量推定は完了し、水溶性モディファイドフモニシンの分析法の確立及びトウモロコシ加工品におけるモディファイドフモニシンの性状の解析に成功した。</p>
<p>(2) 研究成果の有用性</p>	<p>5</p>	<p>これまで情報がほとんど得られていなかったトウモロコシ加工品中のモディファイドフモニシンについて、含有量や性状を明らかにすることが出来た。本研究の結果は、モディファイドフモニシンを含めたフモニ</p>

		シンの日本人におけるリスク評価を今後実施する際に非常に有用な科学的情報となる。
--	--	---

総合コメント

研究は順調に完了し、モディファイドフモニシンの含有量や性状、体内での溶出の可能性など、モディファイドフモニシンの含めたフモニシンのリスク評価を行う際に必要な情報が得られた。モディファイドフモニシンについては、食品安全委員会のみならず、JECFA や EFSA といったリスク評価機関からも注目されており、本研究で得られた結果が今後幅広く活用されることが期待される。

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。

(別紙) 研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Study on the risk assessment for modified fumonisins
Research project number	1808
Research period	FY 2018 – 2019
Name of principal research investigator (PI)	Tomoya Yoshinari

Abstract/Summary

※ここに研究の概要を英文で記載する。(研究の目的、方法、結果及び考察を一連の文章で網羅的に記載すること。)

Fumonisins, which are secondary metabolites produced by some *Fusarium* species, are detected mainly in corn and corn-based products. Recently, the presence of modified forms of fumonisins in fumonisin-contaminated food products has been reported. In order to evaluate the health risk of modified forms of fumonisins to the Japanese population, we analyzed modified forms of fumonisins in corn-based products retailed in Japan. The modified and free forms of fumonisins in food samples were hydrolyzed by alkaline treatment. The resulting hydrolyzed fumonisins were quantified by LC-MS/MS, and total fumonisins (sum of modified and free forms) was calculated. A total of 206 samples of corn-based products were analyzed over two years. The relative ratios of mean total

fumonisin B₁ to mean free fumonisins in the cornflakes, corn snacks, corn flour and corn soup samples were 4.7, 2.8, 2.1 and 1.2, respectively. The average daily intake of fumonisins from cornflakes and corn snacks by the Japanese population was estimated at 1.1 to 3.9 ng/kg body weight/day when the results of free fumonisins were used for the estimate, but when the results of total fumonisins were used, average daily intake increased about threefold and was estimated at 3.3 to 12.5 ng/kg body weight/day. In order to clarify the property of modified fumonisins in corn snacks and cornflakes, analytical methods to determine fumonisin B₁-glucoside, hydrolyzed fumonisins and matrix-associated fumonisins were developed. Hydrolyzed fumonisins and fumonisin B₁-glucoside were detected in corn snacks and cornflakes, but their contamination levels were lower than free fumonisins. It was found that matrix-associated fumonisins in corn snacks and cornflakes eluted as free fumonisins and might exert toxicity in vivo. These results indicate that a risk assessment of fumonisins, including the modified forms of fumonisins, is necessary in order to evaluate the true risk of fumonisins to Japanese people.

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ). This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose. All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

1 . List of papers published on the basis of this research

① Under submission

Title : Analysis of Modified Forms of Fumonisin B₁ in Corn-based Products Retailed in Japan by an Alkaline Hydrolysis Method

Journal : Food Hygiene and Safety Science

2 . List of presentations based on this research

- ① Y. Koike et al. "Taxonomic study for productivity of fumonisins by *Fusarium* species" The 82nd meeting of Japanese Society of Mycotoxicology, poster presentation (August 24th, 2018)
- ② T. Yoshinari et al. "Study on the risk assessment for modified fumonisins" The 114th meeting of Japanese Society of Food Hygiene and Safety, oral presentation (November 15th, 2018)
- ③ Y. Koike et al. "Study on modified fumonisins in corn-based foods by an alkaline hydrolysis method" The 84th meeting of Japanese Society of Mycotoxicology, oral presentation (August 23rd, 2019)
- ④ T. Yoshinari et al. "Study on the analytical method for determination of modified fumonisins in corn-based foods" The 56th national conference of the technology of hygienic

chemistry, poster presentation (December, 6th, 2019)

3. The number and summary of patents and patent applications

Nothing

4. Others (awards, press releases, software and database construction)

Nothing

The report presents a study on the relationship between the amount of protein intake and the amount of protein synthesis in skeletal muscle. The study was conducted in a laboratory setting using a protocol that involved the measurement of protein synthesis and protein breakdown in skeletal muscle. The results of the study showed that the amount of protein synthesis in skeletal muscle is directly related to the amount of protein intake. The study also found that the amount of protein synthesis in skeletal muscle is not directly related to the amount of protein breakdown in skeletal muscle. The study was published in the Journal of Applied Physiology in 2019.

1. List of papers published on the basis of this research
① Under submission
Title: Analysis of Modified Types of Tumors in Corn-based Products Related in Japan by an Alkaline Hydrolysis Method
Journal: Food Hygiene and Safety Science

2. List of presentations based on this research
① 7. Kojima et al. "Research on the relationship of modified food-based foods." The 24th meeting of Japanese Society of Mycology, poster presentation (August 24th, 2019)

② T. Yoshida et al. "Study on the risk assessment for modified tumours." The 14th meeting of Japanese Society of Food Hygiene and Safety, oral presentation (November 14th, 2019)

③ Y. Kojima et al. "Study on modified tumours in corn-based foods by an alkaline hydrolysis method." The 24th meeting of Japanese Society of Mycology, oral presentation (August 24th, 2019)

④ T. Yoshida et al. "Study on the analytical method for determination of modified tumours in corn-based foods." The 24th meeting of Japanese Society of Mycology, poster presentation (August 24th, 2019)

【和文概要】

フザリウム属真菌によって生産される二次代謝産物であるフモニシンは、トウモロコシやその加工品から検出される。近年、フモニシン汚染が認められる食品中にそのモディファイド化合物も存在することが報告された。日本人の健康に対するモディファイドフモニシンのリスクを評価するために、日本に流通するトウモロコシ加工品に含まれるモディファイドフモニシンの解析を行った。アルカリ処理により、検体中の遊離型及びモディファイドフモニシンを加水分解フモニシンへと変換し、LC-MS/MSで定量することにより総フモニシン量を求めた。2年間で206検体の調査を行った結果、トウモロコシ加工品における総フモニシンの遊離型に対する割合は1.2～4.7倍であった。総フモニシン量を用いてコーンフレークとコーンスナックからの日本人におけるフモニシンの平均ばく露量を推定した結果、遊離型フモニシン量を用いた際の約3倍の3.3～12.5 ng/kg 体重/日となった。フモニシン配糖体、加水分解フモニシン及びマトリクス結合型フモニシンについて解析を行った結果、マトリクス結合型フモニシンが体内で遊離型フモニシンとして毒性を発揮する可能性が示された。これらの結果より、日本人の健康に対するフモニシンのリスクを評価するためには、モディファイドフモニシンも考慮に入れる必要性が示唆された。

