

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	野村 昌代
論文題目	Studies on the development of analytical methods for quantification of mycotoxins in feed and pet foods (飼料及びペットフード中のかび毒の定量法の開発に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>かび毒は、かびによって産生される有害な化合物群であり、人間のみならず動物の肝臓、腎臓やその他の臓器を傷つけて発癌性や催奇形性を有し、死に至らせる場合もある。日本では、飼料及びペットフードの原料の大部分を輸入に依存しており、飼料及びペットフードの安全性を確保するには、かび毒に汚染された原料や飼料、ペットフード製品を排除する必要がある、原料中や製品中のかび毒を迅速かつ正確に検出するための定量分析法の開発が必須である。また、分析法が開発された後、ある試験室内で検証された結果が他の試験室の結果と異なる場合があり、分析法の再現性を確認するために、試験室間共同試験を実施することも要求される。特に、ペットフードは脂質やタンパク質の含有量が高いため、とうもろこしや穀物の分析法は適用できない可能性がある。本論文では、これまで公定法がなく、汚染状況を把握することができないために農水省から分析法開発の強い要望があったペットフード中のフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ (FBs) やゼアラレノン (ZEA) の分析法の開発を報告している。また、トリコテセン系かび毒については、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) がデオキシニバレノール (DON)、3-アセチルデオキシニバレノール (3-AcDON)、15-アセチルデオキシニバレノール (15-AcDON) を同一グループとし、デオキシニバレノール-3-グルコシド (D3G) を含めることを検討し、暫定最大耐容一日摂取量の T-2 トキシン (T-2) 及び HT-2 トキシン (HT-2) にジアセトキシシルペノール (DAS) を追加している。そのため、飼料の公定法がなかった T-2、HT-2、DAS、DON、3-AcDON、15-AcDON、D3G の同時定量のための分析法を開発したことをとりまとめている。</p> <p>第一章では、試験室間共同試験の妥当性の確認まで実施しているペットフード中の FBs を定量する有効な方法がなかったため、その定量法を開発したことを報告している。ペットフードは脂質やタンパク質含量が高いため、飼料中の FBs を定量する公定法で使用されている陰イオン交換カートリッジを用いた精製法は、添加回収試験における FBs の回収率が低かったために適用できなかった。抽出液、抽出回数及び精製カラム等の条件検討を詳細に行った結果、ペットフード用飼料中の FBs を含水アセトニトリルで抽出し、Multi Sep211 Fum (Romer Labs 製) で精製後、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いて定量する方法を開発した。添加回収試験での FB₁ の平均回収率は 93.3~107%の範囲であり、その繰返し精度 (RSD_r) は相対標準偏差として 7.9%以下であった。FB₂ と FB₃ の平均回収率はそれぞれ 87.3~102%と 90.8~102%、また、RSD は 8.6%以下と 8.6%以下であった。試験室間共同試験では FB₁ の平均回収率、RSD_r、室間再現精度 (相対標準偏差) (RSD_R) 及び RSD_R と計算式から求めた予想室間再現精度 (相対標準偏差) の予測値の比である HorRat は、それぞれ 92.9~98.9%、2.6~4.6%、6.8~10%及び 0.41~0.54 であり、ペットフード中の FBs を定量できる信頼性の高い分析法であると考えられた。</p> <p>第二章では、ドライ製品のペットフードにおいて ZEA が高頻度に検出されたとの報告があるが、試験室間共同試験の検証まで至っている有効な測定法はなかったため、その手法の開発を報告している。添加回収試験において試料中の含水量が回収率に影響することが示唆されたことから、試料量、抽出溶媒量及び抽出回数に着目し</p>			

た。一方、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）でアイソクラティック溶出を用いた場合、ZEA を測定する際にイオン化抑制の影響を受けやすいことから、内部標準物質として類似化合物のゼアララノンを用いるのが一般的であった。しかし、ゼアララノンの自然汚染の可能性があるため、本分析法は絶対検量線により定量する必要がある。開発した分析法では、グラジエント溶出することによって感度及び SN 比が改善され、結果として、絶対検量線法での定量を可能とした。さらに、分析法の妥当性を確認する一環として、22 種類のペットフードにおける ZEA の定量を妨害する物質の有無の検討を行い、ZEA の定量を妨げるピークの有無を分析したところ、猫用ウェット製品において妨害ピークが認められたが、HPLC 用カラムを L-column 2 ODS（化学物質評価研究機構製）に指定することにより定量が可能となった。本法で ZEA の添加回収試験を実施したところ、平均回収率は約 90.8~108%であり、RSD_r は 8.0%以下であった。試験室間共同試験では、ZEA の平均回収率、RSD_r、RSD_R 及び HorRat は、それぞれ 99.0~102%、2.2~3.0%、5.6~6.6%及び 0.33~0.36 であった。最終的に、ペットフードに含まれる ZEA の迅速かつ簡便な定量法が開発された。

第三章では、トリコテセン系かび毒の中でも毒性の強い A 型及び D3G を含めた B 型トリコテセン系かび毒の飼料中の汚染状況を把握するための同時定量法を開発したことを報告している。近年、従来の分析法では検出されない新たな毒性物質として、既知のかび毒の配糖体が注視されており、JECFA によるかび毒評価の結果、modified mycotoxin と呼ばれる D3G をはじめ、DON、3-AcDON、15-AcDON、HT-2、T-2 及び DAS の同時定量法が必要となった。LC-MS/MS のイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化法（ESI）を使用した分析法では、特に油かす類での回収率が正確には求められなかった。そのため、本分析法では、大気圧化学イオン化法（APCI）を用いてイオン化阻害等の影響を低減し、また、リン脂質除去ミニカラム HybridSPE-Phospholipid（Sigma-Aldrich 製）を用いてイオン化促進の問題点を改善している。飼料に各かび毒の混合標準液を添加し、本法により得られた選択反応検出クロマトグラムでは、10 種類のトリコテセン系かび毒のピークは各々分離した。添加回収試験の平均回収率は 70.6~119%、その RSD_r は 17%以下であり、油かす類の分析でも回収率が十分であることが示された。また、試験室間共同試験では、DON の平均回収率、RSD_r、RSD_R 及び HorRat は、それぞれ 97.2~103%、3.4~6.5%、8.5~13%及び 0.42~0.70 であった。D3G の各値は、78.2~96.7%、3.5~6.4%、13~22%及び 0.59~1.0 であり、NIV においては 89.9~99.9%、3.9~5.6%、5.6~9.4%及び 0.25~0.43、その他のかび毒においては 93.8~116%、3.1~9.8%、4.3~14%及び 0.19~0.65 となり、より精度の高い定量法を確立した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400~1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500~2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

かび毒は、かびによって産生される有害な化合物群であり、人間のみならず動物の肝臓、腎臓やその他の臓器を傷つけて発癌性や催奇形性を促し、死に至らせる場合もある。日本では、飼料及びペットフードの原料の大部分を輸入に依存しており、輸出国におけるかび毒の制御が困難な場合が多い。家畜の餌である飼料は、家畜にとって安全であるだけでなく、飼料を摂取した家畜から生産される畜産物が人にとって安全である必要がある。また、犬や猫は動物愛護の観点からも、愛がん動物用飼料の安全を確保する必要がある。そのために、飼料及びペットフードの安全性を確保するためのかび毒の迅速かつ高感度な定量分析法の開発が必須である。

本論文では、*Fusarium* 属菌が産生するかび毒について飼料及びペットフード中の定量分析法の開発に関する一連の研究をまとめている。評価すべき主要な点は以下のように要約される。

1. 他の分析法では定量が困難な脂質及びタンパク質含量の高いペットフード中のフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ について、LC-MS を用いた迅速な定量分析法を開発し、試験室間共同試験により本分析法の妥当性を検証した。
2. ペットフード中のゼアラレノンの定量において、他の一般的な分析法で内部標準として使用されているゼアララノンを用いることなく、妨害ピークを除去した新たな手法を開発し、試験室間共同試験により分析法の妥当性を検証した。
3. 飼料中のトリコテセン系かび毒 10 成分の定量法において、抽出操作の反復及びリン脂質除去ミニカラムを併用することにより、抽出効率の向上とイオン化促進の問題点を改善した。LC-MS/MS のイオン化法として ESI 法の代わりに APCI 法を用いることにより、イオン化抑制等の影響を低減した方法を開発し、試験室間共同試験により分析法の妥当性を検証した。

以上のように、本論文は、*Fusarium* 属菌が産生するかび毒として重要なフモニシン B₁、B₂、B₃、ゼアラレノン及びトリコテセン系かび毒の飼料及びペットフード中の定量分析法を開発したものであり、本定量法は「飼料分析基準」および「愛玩動物用飼料等の検査法」に公定法として収載されていることから、農産製造学、食品分析学及び食環境学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 4 年 7 月 21 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）