

第 10 章

DDGS におけるマイコトキシン

はじめに

あらゆる飼料原材料がそうであるように、ジステラーズ・グレインも、時として動物成績に悪影響を及ぼすほどの量のマイコトキシンを含有したり、カビの増殖やマイコトキシンの産生を引き起こすような条件下で製造・保管されていたりすることがある。

エタノールプラントに納入された穀物がマイコトキシンで汚染されていた場合には、DDGS にもマイコトキシンが存在する可能性がある。エタノール製造工程でも、DDGS 製造のための乾燥工程でもマイコトキシンが死滅することはない。実際のところ、トウモロコシにマイコトキシンが存在していた場合には、DDGS 中のマイコトキシン濃度は約 3 倍に増加する。しかしながら、米国のトウモロコシ生産主要地域のほとんどがトウモロコシのマイコトキシン産生につながる気候・気象条件におかれることがまれであるため、米国産 DDGS のマイコトキシン汚染リスクは非常に低い。しかも、エタノールプラントの大半では穀物品質がモニタリングされ、マイコトキシンに汚染されている穀物供給源を排除している。

トウモロコシおよび DDGS を汚染する可能性のあるマイコトキシン類

マイコトキシン類は動物、特に人間や家畜の健康、成長または生殖に悪影響を及ぼすカビの二次代謝物である。アフラトキシンB1、B2、G1およびG2を含むアフラトキシン類は、知られているマイコトキシン類の中で最も毒性が高く、発癌性があり、複数の *Aspergillus* 種から産生される。トウモロコシは生育期の干ばつ条件下または保管中の高水分、高湿度条件下でアフラトキシンを発生させやすい (Richard, 2000)。

Fusariumgraminearum は米国の穀物にデオキシニバレノールを産生させる主要なカビである (CAST, 2003)。デオキシニバレノール (時にDONまたはボミトキシンとも呼ばれる) はゼアラレノン等の他のマイコトキシンと共存することがある。*Fusariumgraminearum* は前年の生育期に汚染されて以降農地に残っている古い汚染残滓の中で生き残る。このカビがトウモロコシで増殖する上で、低温・湿潤が好条件となる。一般に、成熟したトウモロコシが水分含有率14%未満の状態では保管される場合には、保管がデオキシニバレノールの汚染源となるとは考えられていない (Richard, 2000)。

Fusariumverticillioides はフモニシンFB1、FB2およびFB3を産生する主要なカビである (Gelderblomら、1988)。トウモロコシはこのカビの影響を受ける代表的な穀物である。フモニシンの産生に必要とされる特定の条件については明らかになっていないが、干ばつのストレスを受けた後に暖かく湿った気候条件下で開花期を迎えることが鍵になると示唆される。事実上すべての種子に *Fusariumverticillioides* が存在し、成長期を通じてトウモロコシの茎や葉にも存在し、時には症状の

ないトウモロコシ粒にすら相当量が存在していることもある。このマイコトキシンが発見されたのはかなり最近のことで（1988）、その産生についても動物の健康や成績に及ぼす悪影響の可能性についても入手できる情報はわずかしかない（Richard、2000）。

*Fusariumsporotrichioides*はトリコテシンとして知られる菌類代謝物のひとつであるT-2トキシンの主要な産生菌である。湿度が上昇し、温度が6~24°CになるとT-2の産生が最も活発になる（CAST、2003）。

ゼアラレノンはエストロゲン系カビ代謝産物のひとつで、このマイコトキシンの主要な産生菌は*Fusariumgraminearum*である。この菌の増殖には湿気と低温が好条件となるが、これはデオキシニバレノールが好む条件と同じである。ゼアラレノンの産生を避けるためには、穀物および穀物併産物の水分含有率を14%未満に抑えることが重要である。

マイコトキシン試験

1960年代以降、マイコトキシンの毒性が人間の健康に及ぼす影響についての懸念が広がったため、食品および動物用飼料に含まれるマイコトキシンを検査するために多くの分析方法が開発された（Trucksess、2000）。これらの中でも、薄層クロマトグラフィー（TLC）、酵素免疫吸着測定法（ELISA）および免疫センサーを用いる方法が広く高速スクリーニングに用いられているが、蛍光検出（FD）を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）および質量分析検出法（MS）も確定および参照のための方法として利用されている（Krskaら、2008）。しかしながら、現場では迅速に実施することのできる経済的かつ精度の高いマイコトキシン測定法へのニーズがある。そこで、米国農務省穀物検定梱包貯蔵管理局（GIPSA）がDDGS用として使用を承認した検査キットを表1にまとめた。

(<http://www.gipsa.usda.gov/GIPSA/webapp?area=home&subject=lr&topic=hb>)

表 1. DDGS 用のマイコトキシン試験キット（GIPSA 承認）

ブランド名	製造業者	検査範囲	検査フォーマット	抽出法	クリーンアップ法
アフラトキシン					
VeratoxAflatoxin	Neogen Corporation	5–50 ppb	マクロタイタ・ウェルプレート・アッセイ	メタノール/水 (70+30)	ELISA 法
Ridascreen FAST SC	R-Biopharm	5–100 ppb	マクロタイタ・ウェルプレート・アッセイ	メタノール/水 (70+30)	ELISA 法
Aflatest	Vicam	5–100 ppb	イムノアフィニティ・カラム法	メタノール/水 (80+20)	アフィニティ・カラム法
FluroQuant® Afla IAC	Romer	5–100 ppb	蛍光光度分析法	メタノール/水 (80+20)	アフィニティ・カラム法
フモニシン					

AgraQuant Total Fumonisin 0.25/5.0	Romer	0.5–5 ppm	直接競合 ELISA 法	メタノール/水 (70+30)	ELISA 法
ゼアラレノン					
ROSA® Zearalenone	Charm Sciences, Inc.	50–1000 ppb	ラテラルフローストリップ法	メタノール/水 (70+30)	

Zhang ら、2009

こうした方法はマイコトキシンを個別に検出することを目的として設計されているので、扱いが容易であり、定量的感度が高いためサンプル処理能力も高い。GIPSAが承認したDDGSのマイコトキシン用の検査法は6種類ある（アフラトキシン用4種類、フモニシン用1種類およびゼアラレノン用1種類）。

DDGSのマイコトキシン汚染を調べる試験について検討する場合、承認を受けた分析手順を実施して正確な結果を得ることが何よりも重要である。動物用飼料中のマイコトキシンの存在およびその濃度を見極める場合の好ましい方法として、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法をあげることができる。HPLCおよび各種の検出器を用いることにより、動物用飼料のほとんどのマイコトキシンを分離・検出することができる（Krskaら、2008）。米国の主要なDDGS検査ラボで使用されている方法を表2にまとめた。これらの方法はそれぞれの検査ラボで妥当性が検証されており、最近ピアレビュー学術誌に掲載されたものである。

表 2. 動物用飼料中のマイコトキシン試験の方法

対象	試験	検出範囲	参考文献
アフラトキシン			
トウモロコシ、アーモンド、ブラジルナッツ、ピーナッツおよびピスタチオ	HPLC – FD	5 – 30 ppb	AOAC 994.08
デオキシニバレノール			
穀類および穀類製品	HPLC – UV	0.1 ppm (検出限界濃度)	MacDonald ら、 2005a
フモニシン			
トウモロコシおよびコーンフレーク	HPLC – FD	0.5 – 2 ppm	AOAC 2001.04
トウモロコシおよびトウモロコシ主体飼料	薄層クロマトグラフィー (TLC)	0.1 ppm (検出限界濃度)	Rottinghaus ら、 1992
T-2			
食品および飼料	薄層クロマトグラフィー (TLC)	0.1 ppm (検出限界濃度)	Romer、1986
ゼアラレノン			
トウモロコシ、小麦および飼料	マイクロタイタ・ウェルプレート・アッセイ	0.8 ppm (検出限界濃度)	AOAC 994.01
大麦粉、トウモロコシ	HPLC – FD	0.05 ppm (検出限界濃度)	MacDonald ら、

粉、小麦粉、ならびに ポレンタおよびトウモ ロコシ主体のベビーフ ード		2005b
アフラトキシン、デオキシニバレノール、フモニシン、T-2、ゼアラレノン		
	LC/MS/MS	
		アフラトキシン (1 – 100 ppb) ; デオキシニバレノール (1, 1000 ppb) フモニシン (16 – 3,200 ppb) T-2, (2 – 1,000 ppb) ゼアラレノン (20 – 1,000 ppb)
食品および飼料		Sulyok ら、2007

Zhang ら (2009) に基づく

動物飼料でのマイコトキシンの最大許容レベル

米国FDAは様々な種類の動物用飼料の原材料に含まれるアフラトキシン (表3)、デオキシニバレノール (表4) およびフモニシン (表5) の最大許容レベルを定めた。T-2トキシンおよびゼアラレノンについては、FDAは規制レベル、勧告レベルあるいは指導レベルを公表していない。

表 3. 完全飼料および飼料原材料に含まれるアフラトキシンを対象とした FDA の規制レベル¹

動物	禁止レベル (ppb)
仕上期肉牛 (飼養牛等)	300
仕上期豚 (> 100 ポンド)	200
繁殖用肉牛、繁殖用豚または成熟家禽	100
成長期動物、乳牛または用途不明の場合	20

¹ Zhang ら、2009.

表 4. 完全飼料および飼料原材料に含まれるデオキシニバレノールを対象とした FDA の規制レベル¹

動物	勧告レベル (ppm)
反芻を開始した肉牛および 4 月齢を超える飼養牛、ならびに当該原材料が飼料の 50%を超えないとする推奨事項が加えられた鶏	10
当該原材料が飼料の 40%を超えないとする推奨事項が加えられその他すべての動物	5
当該原材料が飼料の 20%を超えないとする推奨事項が加えられた豚	5

¹ Zhang ら 2009.

表 5. 完全飼料および飼料原材料に含まれるフモニシンを対象とした FDA の規制レベル¹

動物	推奨指導レベル (ppm)
食用家禽の飼料の場合は 50% を超えないこと	100
3 月齢を超える食用反芻胃動物および毛皮用として飼育されているミンクの場合は飼料の 50% を超えないこと	60
繁殖用の反芻胃動物、家禽およびミンクの場合は飼料の 50% を超えないこと	30
豚およびナマズの場合は飼料の 50% を超えないこと	20
その他すべての種類・分類の家畜および愛玩用動物の場合は飼料の 50% を超えないこと	10
ウマ科動物およびウサギの場合は 20% を超えないこと	5

¹ Zhang ら、2009.

米国産 DDGS 中のマイコトキシンの発生および濃度

Zhang ら (2009) はこれまでに発表された研究を対象とした広範な文献レビューを行い、DDGS サンプルに関する大規模な 3 種類のデータセットを選んでそのサンプルを評価し、米国の様々な供給源の DDGS のマイコトキシン汚染について、その程度および濃度を明らかにした。DDGS に含まれていないいずれのマイコトキシンについても、その濃度の大半がそれぞれの FDA 規制レベルの値を下回っていた。わずかな例外はデオキシニバレノールとフモニシンの濃度で、特定の感受性の高い動物種に適用される推奨レベルに一致するか、または若干上回っていた。こうした例でも発生率は試験対象サンプル全体の 10% 未満であり、動物用飼料にするために他の原材料とともに DDGS を配合すると有害濃度をはるかに下回ることとなった。

Caupert ら (2011) は複数の調査試験から得られた DDGS のマイコトキシン濃度についての追加的なデータを発表し、DDGS のマイコトキシン濃度はいずれも FDA がそれぞれのマイコトキシンに対して設けている規制を概ね下回ると結論付けた。デオキシニバレノールまたはフモニシンの濃度が敏感種の動物を対象とした推奨レベルと同じかやや上回った例がわずか 2、3 件認められたが、こうした例は試験対象サンプルの 10% にも満たない。DDGS を他の飼料原材料と混ぜ合わせて最終的な動物用飼料を調製した場合には、こうした濃度はどのような有害濃度も下回ることになる。

References

- AOAC 2001.6, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th Edition, Chapter 49, 32-33.
 AOAC 2001.04 *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th Edition.
 AOAC 2004 *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 21st Edition.
 AOAC 994.01, 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th Edition, Chapter 49, 56-59.
 AOAC 994.08, 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th Edition, Chapter 49, 26-27.

- Boyles, S. 2007. Distillers Grains with Solubles. OSU Extension Beef Team, BEEF Cattle Letter. 551.
- CAST. 2003. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report No. 139. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology
- Caupert, J., Y. Zhang, P. Imerman, J.J. Richard, and G.C. Shurson. 2011. Mycotoxin Occurrence in DDGS. In: Distiller's Grain – Production, Properties, and Utilization. Pp. 215-229. Published by Newgen Imaging Systems, Ltd.
- FDA websites:
Aflatoxin in feeds and feed ingredients: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fdaact.html#afla>
Fumonisin in feeds and feed ingredients: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu2.html>
Deoxynivalenol (DON) in feeds and feed ingredients: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/graingui.html>
- Gelderblom, W. C. A., A. K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, R. M. Horak, R. Vleggaar, and N. P. J. Kriek. 1988. Fumonisin: Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1806–1811.
- Krska R, G. Stubbings, R. Macarthur, C. Crews. 2008. Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 563-576.
- MacDonald, S.J., D. Chan, P. Brereton, A. Damant, and R. Wood. 2005a. Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. *J. AOAC International* 88 (4) : 1197-1204.
- MacDonald, S.J., S. Anderson, P. Brereton, R. Wood, and A. Damant. 2005b. Determination of zearalenone in barley, maize and wheat flour, polenta, and maize-based baby food by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. *J. AOAC International* 88 (6) : 1733-1740.
- Richard, J. 2000. Mycotoxins—An overview. Romer Labs' Guide to Mycotoxins. *Romer Labs Guide to Mycotoxins* Vol. 1.
- Romer, T.R. 1986. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. *J. Assoc of Official Analytical Chemists* 69 (4) , 699-703.
- Rottinghaus, G.E., Coatney, C.E. and Minor, H.C. 1992. A rapid, sensitive, thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 326-329.
- Sulyok M., R. Krska, R. and R. Schuhmacher. 2007. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 1505-1523.
- Trucksess, M.W. (2000) . Natural Toxins. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th Edition. Chapter 49, 1 – 2.
- University of Minnesota website: www.ddgs.umn.edu
- USDA GIPSA website: <http://www.gipsa.usda.gov/GIPSA/webapp?area=home&subject=lr&topic=hb>
- Zhang, Y., J. Caupert, J. Richard, P. Imerman and J. Shurson, 2009. Scientific Overview of Mycotoxins in DDGS. *J. Ag. Food Chemistry* (in press) .