

F. graminearum 0415接種小麦から

Zearalenone の分離

松 浦 康

カビの第2次代謝産物であるカビ毒（マイコトキシン）は抗生物質などと異なり、ヒトや動物に対して強い毒性を示す物質群である。

1948年にエジプトから輸入された米（いわゆる黄変米）から分離された *Penicillium islandicum* の生産する Cyclochlorotine と Luteoskyrin は肝がんをつくる¹⁾。また、*Aspergillus flavus* と *Aspergillus parasiticus* の生産する Aflatoxins は強力な発がん物質として知られる代表的なマイコトキシンである。^{2,3)}

植物病原菌である *Fusarium* 属（赤カビ）は広く自然界に分布しており、諸種の穀物に寄生して被害を与える。これら *Fusarium* 属のカビに汚染された穀物を摂取することによる人畜の病気、食中毒が知られている。1953年に全国的に赤カビ病が発生し、岡山地方でも麦類の50～60%が被害を受けた。この自然汚染病麦を投与した牛が運動失調、食欲減退、下痢等を起した⁴⁾。1965年に、北海道で悪心、嘔吐、下痢、頭痛、けいれんを伴う食中毒が発生し、その際、摂取した小麦から *Fusarium* 菌が検出された。⁵⁾ また、1970年に四国地方の麦類に赤カビ病が発生しており、諸岡らは汚染麦類中の毒性物質として Nivalenol, Deoxynivalenol などのセスキテルペン（トリコテセン）系マイコトキシンを単離した。^{6,7)} Zearalenone は *Fusarium* 属の生産するカビ毒であり、トリコテセン系マイコトキシンと共に重要なフザリウムトキシンである。1928年 McNutt らによって家畜のエストロゲン様中毒が報告されて以来、ヨーロッパ、アメリカ等で *Fusarium* 菌汚染飼料による家畜の子宮肥大、睾丸萎縮などの中毒症の原因物質として Zearalenone が報告されている。^{9,10)} また、この物質が突然変異性を有することを示唆する報告もあり、¹¹⁾ この物質が飼料をとおして家畜の体内に入り、さらに食肉、牛乳等に残留する可能性も考えられ、食品衛生上の重要な問題になっている。

Zearalenone 産生菌 (*F. graminearum*) が西日本地域の麦類に広く寄生していることは既に報告したが、¹²⁾ 我国におけるこの物質の衛生学的研究は少なく、更に詳細な検討を加える必要がある。著者は *F. graminearum* 接種小麦から Zearalenone の分離を試み、高収率で純品を得ることができたので、ここに報告する。

実 験 方 法

1. 菌株 1972年アメリカ・インディアナ州産の *Gibberella* 被害トウモロコシ (Dent Corn) より分離した *F. graminearum* 0415 (香川大学保存株) を用いた。菌株はポテト・デキストロース寒天 (日水, pH4.6) の斜面培地に保存した。

2. 培養法 小麦 1,100g を一夜水に浸漬したのち (水分含量約25%), 300mlの水を3回に分けて打ち水をしながら、40分間蒸煮した (水分含量約45%)。これを2ℓ容の三角フラスコ5個に分けて入れ、120℃、30分間滅菌した。これに *F. graminearum* の菌糸の滅菌生食浮遊液を滅菌駒込ピペットで接種して、Eugenio¹³⁾ の方法に準じて27～30℃に1週間、次いで15℃で2週間培養した。

3. 抽出・精製 カビ接種小麦はクロロホルム-メタノール (1:1, vol/vol) 約4ℓで磨砕抽出し、濾過した。残渣は再びクロロホルム-メタノール (1:1, vol/vol) で洗浄後、濾過した。

抽出液は合わせて約500mlに減圧濃縮した。生じた沈殿は汙別し、汙液は更に濃縮してシロップ状物質を得た。

4. シリカゲルカラムクロマトグラフィー

充填剤：キーゼルゲル60（70～230メッシュ、メルク社製）

1) 1回目カラムクロマトグラフィー：内径5cm×長さ20cmカラム（乾式充填、無水硫酸ナトリウムを2cm重層）。

溶媒：n-ヘキサン（500ml）、クロロホルム（500ml）、ベンゼン-アセトン（9：1，vol/vol，700ml）。

2) 2回目カラムクロマトグラフィー：内径2cm×長さ90cmカラム（湿式充填、無水硫酸ナトリウム3cm重層）

溶媒：クロロホルム-メタノール（97：3，vol/vol）。

分画：5ml/tube

5. 薄層クロマトグラフィー キーゼルゲルG F₂₅₄（厚さ0.25mm，メルク社製）の薄層板を用いた。展開溶媒系はベンゼン-アセトン（9：1，vol/vol）、ベンゼン-酢酸（9：1，vol/vol）、クロロホルム-メタノール（97：3，vol/vol）の3種を使用した。検出は紫外線照射および20%硫酸を噴霧後、120℃に加熱発色した。

6. ガスクロマトグラフィー 試料はTMS-HT試薬（東京化成）でTMS誘導体として分析した。装置および分析条件は次のとおりである。装置：日立 063型ガスクロマトグラフ（水素炎イオン化検出器付）。カラム：3%Silicone OV-17 on Chromosorb W，3mm×1mステンレスカラム。カラム温度270℃。キャリアーガス：N₂ガス、流量1.6kg/cm³。

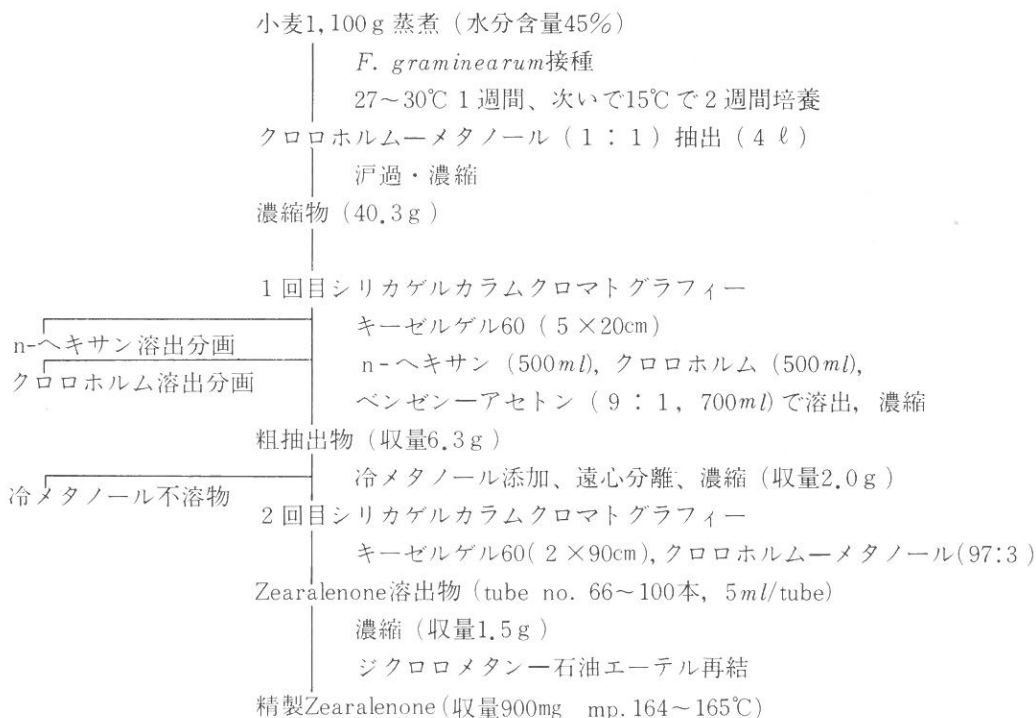


図1 *Fusarium* 接種小麦より Zearalenone の抽出・精製法

7. 紫外線吸収スペクトル 試料をスペクトル分析用メタノール（和光純薬）に溶かして測定した。装置：Hitachi Spectrophotometer 124.

8. マスペクトルの測定 直接導入法によりマスペクトルの分析をした。装置：JEOL-JMS-07 型質量分析計。分析条件：チェンバー温度 320℃、イオン化電流 300 μ A、イオン化電圧75eV.

結果および考察

1. Zearalenoneの抽出・精製 *Fusarium* 接種小麦から得たクロロホルム-メタノール抽出物 (40.3 g) は多量の油脂を含んでいる。この抽出物を n-ヘキサンに溶かして1回目のカラムクロマトグラフィーをおこなった。n-ヘキサン、クロロホルム、ベンゼン-アセトンの順に溶出し、ベンゼン-アセトン分画を濃縮して粗抽出物 6.3 g を得た。含まれていた油脂の大部分は n-ヘキサンとクロロホルムで溶出することにより除去できた。この操作による Zearalenone の損失はほとんどなかった。

次に、粗抽出物を少量のクロロホルムに溶かし、冷メタノールを加えて、生じた沈殿は遠心分離により除去し、上清は濃縮してシロップ状物質 2.0 g を得た。ベンゼン-アセトン溶出分画中には、Zearalenone と共に薄層クロマトグラフィーで Zearalenone のすぐ下に位置する物質（未同定）が含まれており、この物質はクロマトグラフィーでは除去が困難であったが、その大部分は冷メタノール処理によって除去できた。

冷メタノール可溶分画を少量のクロロホルム-メタノール (97:3) に溶かし、2回目のカラムクロマトグラフィーをおこなった。同じ溶媒で溶出し、5 ml 分画として、66本から 100本の間をとって濃縮した（収量 1.5 g）これまでの過程で、残留していた油脂と冷メタノール難溶物質の一部が除去できた。

ここに得たシロップを少量のジクロロメタンに溶かし、石油エーテルを加えて放置すると、白色針状結晶が析出した。更に同じ溶媒から再結晶をおこなった。収量 900mg. Zearalenone の調製は現在、玄米を用いて行なわれているが、この場合、多量の油脂状物質が存在し、その除去が困難である。又、Zearalenone と分離困難な物質が存在している。小麦を基質とした場合、夾雑する油脂は比較的少なく、又、分離困難な物質の存在もなく、高収量で Zearalenone を分離することができた。

2. 分離した Zearalenone の諸性質

1) 白色針状結晶（ジクロロメタン-石油エーテル）

2) 融点：164~165℃（文献値¹⁴⁾ 164~165℃）

3) 紫外部極大吸収：	測定値(ϵ)	文献値(ϵ)
λ max. 236nm	(29,600)	236nm(29,700)
273nm	(14,600)	274nm(13,900)
314nm	(6,800)	316nm(6,020)

4) マスペクトル：マスペクトルの測定結果を図2に示した。分子イオンは $m/e 318(M^+)$ であり、文献記載のスペクトルとよく一致した。¹⁴⁾

5) 薄層クロマトグラフィー：3種の展開溶媒を使用した。いずれも単一のスポットを与えた。スポットは短波長紫外線照射により緑色蛍光地に青色のスポット、長波長紫外線照射により白地に水色の蛍光スポットを与えた。また、20%硫酸を噴霧し、120℃に加熱したとき最初黄色となり、次いで黄茶色から褐色になった。各種溶媒系による Rf 値を表1に示した。

6) ガスクロマトグラフィー：試料のトリメチルシリルエーテル誘導体のガスクロマトグラムを図3に示した。保持間は 2.8分であった。

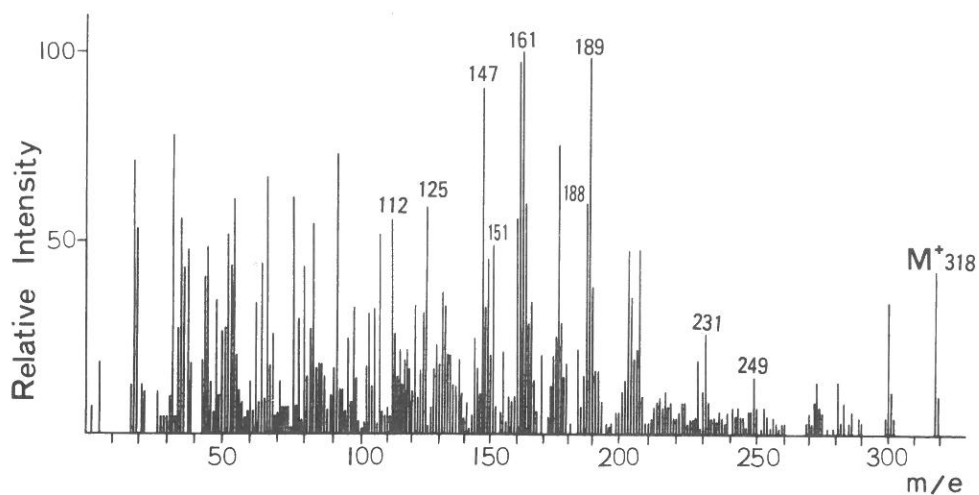


図2 *F. graminearum*接種小麦より分離した Zearalenone のマススペクトル

表1 *F. graminearum*接種小麦より分離した Zearalenone の薄層クロマトグラフィー

展 開 溶 媒 系	Rf 値
Benzene—Acetone(9 : 1)	0.51
Benzene—Acetic acid(9 : 1)	0.39
Chloroform—Methanol(97 : 3)	0.37

薄層板：Kieselgel GF₂₅₄ 0.25mm

検 出：紫外線照射および20%硫酸噴霧後120℃に加熱した。

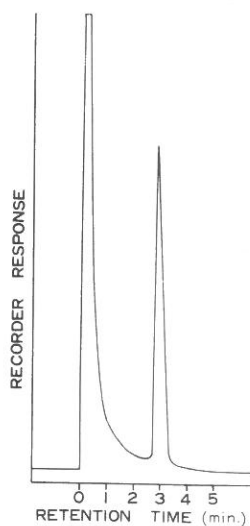


図3 *F. graminearum*接種小麦より分離したZearalenone (トリメチルシリルエーテル誘導体) のガスクロマトグラフィー

Column : 3% silicone OV-17 on chromosorb W, 3mm×1m. Column temp. : 270℃. Carrier gas : N₂, 1.6kg/cm². Detector : FID.

要 約

- 1) *F. graminearum*接種小麦よりZearalenoneを分離・調製した。
- 2) 小麦を基質とした場合、抽出物中に夾雑物が少なく、比較的簡単に、高収量で分離できた。

この研究をご指導下さいました香川大学農学部、諸岡信一先生、芳沢宅実先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) K. Uraguchi, M. Saito, Y. Noguchi, K. Takahashi, M. Enomoto and T. Tatsuno : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **10** 193 (1972)
- 2) L.A. Goltblatt : "Aflatoxin", Food Science and Technology (1969) Acad. press.
- 3) G.N. Wogan : Alimentary Mycotoxicosis, Food Science and Technology, A Series of Monograph, 395 (1956)
- 4) 西門義一：農本改良技術資料、**97** 107 (1958)
- 5) 小笠原和夫：食衛誌、**6** 81 (1965)
- 6) 諸岡信一、裏辻憲昭、芳沢宅実、山本弘幸：食衛誌、**13** 368 (1972)
- 7) T. Yoshizawa, N. Morooka : *Agr. Biol. Chem.*, **37** 2933 (1973)
- 8) S.H. McNutt, P. purevin, C. Murey : *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **73** 484 (1928)
- 9) G.H. Nelson, C.M. Christensen, C.J. Mirocha : *Proc. 70th Annual Meeting U.S. Livestock Sanitary Assoc.* p614 (1966)
- 10) C.M. Christensen, C.J. Mirocha, G.H. Nelson, J.F. Quast : *Appl. Microbiol.*, **23** 202 (1972)
- 11) Y. Ueno, K. Kubota : *Cancer Res.*, **36** 445 (1976)
- 12) 芳沢宅実、土屋幸夫、諸岡信一、松浦 康、木谷清美、一戸正勝、倉田 浩：日本食品衛生学会第33回学術講演会要旨集p21 (1977)
- 13) C.P. Eugenio, C.M. Christensen, C.J. Mirocha : *Phytopathology.*, **60** 1055 (1970)
- 14) W.H. Urry, H.L. Wehrmeister, E.B. Hogde, P.H. Hidy : *Tetrahedron Lett.*, **27** 3109 (1966)

昭和53年 3 月31日受理