

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小西 良子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成17（2005）年3月

総括研究報告書

食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究

小西 良子

厚生労働科学研究費補助金

(食品の安全性高度化推進研究事業)

平成16年度総括研究報告書

食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究

主任研究者 小西良子 国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部 第4室室長

研究要旨：食品に汚染するカビ毒は、低分子で比較的安定な化合物のため、食品衛生上大きな問題であるため、国際的な取り組みがなされている。コーデックスなどで国際的に基準値設定が推奨されているカビ毒はトータルアフラトキシン (TAF: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2)、アフラトキシン M1, パツリン、オクラトキシン A (OTA), トータルフモニシン (FB: B1, B2, B3)、ゼアラレノンなど数多く存在するが、我が国で基準値が設定されているのはパツリンだけである。本研究では我が国でまだ基準値が設定されていないにもかかわらず国際的に対応が急がれているカビ毒を対象に、基準値設定の根拠となる科学的基礎データを取得することを目的としている。本年度の成果は以下の通りである。① TAF, OTA, FB の3種類のカビ毒を対象とした汚染実態調査を行い、ピーナッツ加工品からより AF が検出された。OTA は、米からは検出されなかったが、レーズン、ワイン、ビール、生コーヒー豆、煤煎コーヒー、そば粉、ライ麦、小麦粉、オートミールの一部から検出された。FB は、スイートコーン、ポップコーン、コーングリッツの多くより検出された。② TAF の毒性評価に関する文献調査および我が国での汚染事例の検討をおこなった結果、AFB1, AFB2, AFG1 および AFG2 を総合的に規制対象とすることは、健康被害を未然に防ぐために妥当であると思われた。我が国のナッツ類の汚染事例では AFB1, AFB2 のみ汚染しているケースが9割を占めることから基準値を設定する場合には AFB1 の規制との組み合わせが必要であると思われた。また、わが国の国産小麦で汚染が問題になっているニバレノール (NIV) の慢性毒性試験の予備試験として、ラットに NIV を 25 ないし 100 ppm の割合で 14 日間混餌投与した。その結果従来報告されている様な免疫系ないし腎臓の変化が認められなかったことより、最高用量を 200 ないし 300 ppm にして、予備試験を再試す必要があると考えられた。③ モンテカルロ・シミュレーション法による日本人のナッツ類からの AFB1 曝露量の推定を行った結果、日本人のナッツ類からの AFB1 の曝露量は諸外国と比較し低く、また、規制値を設けた場合でも大きな影響は及ぼさないものと思われた。しかしナッツ類の摂取には一部の多量摂取群の存在の可能性が考えられるので、これらについては新たなモデルを用いて推定を行う必要性があると考えられた。

ZORBAX Eclipse XDB-C18) による分析に供した。

② AF の毒性評価は、1993年と2002年 IARC Monograph および1998年 JECFA Monograph に加えて、1993年以降に発表された毒性に関する文献と、AFB₂、AFG₂の代謝に関する文献および遺伝毒性に関する文献について調査した。我が国の汚染事例は、いままで報告された汚染事例に関する文献調査とともに、2000年以降、ピーナッツ、アーモンドおよびピスタチオを対象に行われた輸入時検査の結果から、TAF における AFB₁ の割合を検討した。

NIV は当研究所衛生微生物部にて精製した。産生菌として *Fusarium kyushuense* (Fn-2B) を用い、培養後、フザレノン X 画分を集め、アンモニウム存在下で NIV に転換し再結晶化させた。動物は、5週齢の雄性 F344 ラット (日本チャールズリバー) を用い、NIV を 0, 25, 100 ppm の割合で基礎飼料 (CRF-1:オリエンタル酵母) に混じり、14日間投与を行った。週に一度の割合で、体重と摂取量を測定した。投与終了時にエーテル麻酔下で採血を行い、脱血後、動物を屠殺し、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、精巣、小腸を採取し、小腸以外の臓器については重量を測定した。胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、副腎は 10% 緩衝ホルマリンに浸漬固定し、小腸はホルマリン注入後、同様に浸漬固定した。精巣に関しては、ブアルミン固定を行った。ホルマリン固定組織は3日後に、ブアン固定組織は翌日に切り出しを行い、定法に従って切片を製作し、エオジン染色切片を製作し、病理組織学的に検索を行った。また、採取した全血を用いて塗抹標本を製作し、白血球百分率を求めた。統計学的解析は、体重、臓

器重量については各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不当分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合、その多重比較は Dunnett の方法で無処置群と NIV 各群の間で有意差検定を行った。病変の発生頻度は、無処置対照群との間で Fisher の直接確率法により検定を行い、病変の強度については、同様の比較を Mann-Whitney's U-test により行った。

③ モンテカルロ法を用いた AF 曝露評価

今回の調査においては、対象食品としてピーナッツとアーモンドの2つであった。含有量データはピーナッツでは2000年の個別の検査データ2981件、アーモンドでは2000年から2003年までの検査データ計54件を用いた。摂取量データは国民栄養調査における各年齢層別の1日、体重1Kgあたりの摂取量 (g) のデータを用いた。AFB₁ 曝露量分布の推計は、Crystal Ball 2000 日本語版 ((株) 構造計画研究所) を用いて、モンテカルロ法により実施した。想定規制値場として全く規制をかける場合、10ppb 以上のものの流通を禁止する場合、15ppb 以上のものの流通を禁止する場合、20ppb 以上のものの流通を禁止する場合の4つのシナリオを作成した。年齢層は、1日の体重1Kgあたりの AFB₁ の摂取量をシミュレーションした。全年齢、1~6歳、7~14歳、15~19歳、20歳以上の5群に区分した。

C. 研究結果

① TAF は、235試料のうち、市販の殻付きピーナッツ、ピーナッツ、粉ピーナッツ、コーングリッツ、ポップコーン、スイートコーン、コーンフレーク、生トローコロシ、ゴマ

油、米、ソバからは検出されなかつたが、ピーナツツバから20試料のうち10試料から3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満の濃度が検出された。

OTAは、米からは検出されなかつたが、レーズン、ワイン、ビール、生コーヒ、豆、煤煎、コーヒ、そば粉、ライ麦、小麦粉、オートミールの一部から検出され、その濃度は大部分が1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。

FBは、押麦、コーンスープ、生トモロコシ、ソバからは検出されなかつたが、スイートコーン、ポップコーン、コーングリッツの多くより、数十 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下、一試料から100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上のFB1が検出された。

②AFの毒性は、急性毒性、生殖毒性、免疫毒性、遺伝毒性から評価されているが、IARCが評価しているように、発ガン性が最も重要な健康被害である。そのメカニズムに関しては、AFB1で詳細に研究されているが、AFのジヒドロフラン環の2, 3の二重結合が発ガン性に関与しており、二重結合の部分がチトクロームP450により8, 9エポキシド化し、DNAや細胞内タンパクに特異的に結合し、遺伝子変異を引き起こすことによりガン化が引き起こされるにはAFB1よりは弱い発ガン性が認められている。一方、エポキシド化からグルタチオンSトランスフェラーゼの作用を受けた場合を形成し、AFB1は解毒される。すなわちこのエポキシドからのDNAへの結合変換との解毒へのパラメーターとなつていく。大きなファクターとなつていく。マウスなどの動物種ではAFB1の原発性ガン原性に抵抗性があるが、これはラットのどのAFB1に対して感受性の高い動物に比べて3倍から5倍グルタチオンSトランス

フェラーゼ活性が高いからだといわれている。ヒトはラットやマウスに比べて8, 9エポキシド複合体に対するグルタチオンSトランスフェラーゼ活性は低いので、AFに対する解毒能力は低いことが考えられる。

AFB1の他、同様に二重結合を有するAFG1, AFM1, AFQ1, AFP1およびアフラトキシコールはAFB1ほど活性が強いが発ガン性を有する。

二重結合をもたないAFB2およびAFG2の発ガン性についての信頼性の高い報告はないが、アヒルにおいてはAFB2が代謝によってAFB1になることが報告されており、AFB2およびAFG2が発ガン性を示す場合には、何らかの代謝を受けAFB1あるいはAFG1に変換するプロセスが重要であると考えられる。いままでの報告では、ヒト細胞を用いた*in vitro*の実験からはこのような変換が起こる可能性は示されていないが、AFB2およびAFG2の急性毒性は、実験動物や培養細胞を用いた実験から、それぞれAFB1の20%および10%であることが明らかになっており、遺伝毒性はなくても基準値を設定する場合にはAFB2およびAFG2も考慮に入れるべきであろう。

我が国での汚染実情に関する報告から、AF産生菌には、B1, B2のみ産生するBグループとB1, B2, G1, G2の4種類を産生するBGグループの2つのタイプがある。

1972年から1991年にかけて行われたピーナツツ汚染に関する研究では、輸出国によりその汚染割合が異なることを明らかにしている。アメリカ地域からではBグループが82%であり、BGグループが18%であった。一方アフリカ、アジア地域からはそれぞれBグループが97%および98%を占め、BGグループが3%

毒性，1年間の慢性毒性，2年間の発がん性試験，及びラットを用いた15日ないし30日間反復投与試験がある。しかし、ラットを用いた30日間反復投与試験以外は、投与に用いたNIVは純品ではなく、培養物そのものを給仕していたため、その結果の信頼性には国際的評価において疑問がもたれている。本実験において純度95%以上のNIVを用いることによって、国際的評価に耐えうる毒性実験を行うものである。また、NIVはマウスでは長期投与によりIgA腎症を誘発することが知られており、血清IgAレベルへの影響も考慮すべき点である。本研究で用いた混餌投与による最高用量(100 ppm)は、体重を200 g、1日当たりの摂餌量を15 gとして換算した場合、7.5 mg/kg/日の投与量で、用量としては既報告例より3倍以上高い濃度であったものの、14日間の投与で標的と考えられる臓器・組織に明らかた毒性影響を認めていなかった。これらの結果を踏まえ、NIVによる毒性発現を捉えるためには、投与濃度を高く設定して14日間投与試験を再度実施する必要があり、その結果、13週間亜慢性毒性試験の実施を考慮すべきであると考えられた。また、今回NIV投与に関連して新たに見出された、セリトリン細胞の空胞変性や、精細管中の精上皮細胞の部分脱落など、精巣変化は、かなり微弱であり、同様に、追試による確認が必要であると考えられた。

③ これまでの知見によれば、AFB1を継続的に1ng/kg/day摂取した場合の肝臓がん発生率はB型肝炎抗原陽性者において3件/100万人・年、同じく陰性者で0.1件とされている。今回のシミュレーション結果ではピーナッツ、アーモンド摂取により1ng/kg/day

以上摂取するものは大きく見積もって全体の0.1~2%であり、両者の摂取による肝臓がんの過剰発生のほとんど見込まれないという結果になった。しかしながら、用いたデータの代表性の問題、実際の分布の仮定の問題、食品摂取の相関の問題等、データの信頼性をより改善し、また、その他の食品からの曝露も併せて再計算することが必要と思われる。

E. 結論

AF, OTA, FBを対象に行った実態調査の結果、AFはピーナッツバターの一部より、OTAはレーズン、ワイン、ビール、生コーヒー豆、煤煎コーヒー、そば粉、ライ麦、小麦粉、オートミールの一部から、FBはスイートコーン、ポップコーン、コーングリッツの多くより検出された。今後は、今回検出された品目は検体数を増やして実態調査を進めていき、検出されなかった品目もモニタリングしていく必要がある。TAFの毒性評価から、多くの国で採用しているTAFとしての規制は発がん性以外の健康被害を未然に防ぐ意味で妥当であると思われる。しかし、我が国の汚染事例では、TAF中のAFB1の占める割合が非常に高いという事実から考えて、TAFとAFB1との2重規制が推奨される。

ラットを用いたNIVの慢性毒性予備試験では、100 ppmを最高用量とした14日間混餌投与の結果精巣以外にNIVによる毒性を示唆する変化は認められず、より高用量の反復投与による再試験が必要であると考えられた。

我が国でのナッツ類からのAFの暴露評価をモンテカルロ法により推定した結果、AFB1に対して10 ppbの規制を行っている現状では、ピーナッツ、アーモンド摂取により1ng/kg/day以上摂取するもの

は大きく見積もっても全体の
0.1～2%であり、両者の摂取
による肝がんの過剰発生の危
険性はほとんどないと言える。
今後は用いたデータの代表性
の問題、実際の分布の仮定
の問題、食品摂取の相関の
問題等、データの信頼性の改
善、その他の食品からの曝
露量の再試算が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugita-Konishi, Y.

The

mechanism of Aflatoxins
carcinogenesis and the current
occurrence of Aflatoxin B1
contamination of nuts in Japan.
Mycotoxins, in press

2. 学会発表

小西良子「アフラトキシン
ーその発ガン性と汚染実態」
マイコトキシン研究会学術講
演会、2005年1月

H. 知的財産権の出願登録状況

なし

分 担 研 究 報 告 書

アフラトキシンの毒性評価

小西 良子

厚生労働科学研究費補助金

(食品の安全性高度化推進研究事業)

分担研究報告書

アフラトキシンの毒性評価

分担研究者 小西良子 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部

第4室室長

協力研究者 奥山恵美 城西国際大学薬学部 教授

協力研究者 杉浦義紹 神戸市環境衛生研究所 副部長

要旨：アフラトキシンは、アスペルギルス属の産生する発がん性を有するカビ毒であり、食品衛生上問題となることから多くの国で基準値を設けている。我が国では、現在アフラトキシン B1 に対して食品衛生法 6 条 2 項により規制を行っているが、早急にリスク評価に基づいた基準値を設定する必要がある。

コーデックス規格や諸外国では基準値設定としてトータルアフラトキシン（アフラトキシン B1, B2, G1, G2）を用いる統括的な規制が主流となっているが、我が国に適した基準を策定するにあたり、トータルアフラトキシンの毒性評価と我が国での汚染事例の実情を文献調査を中心に検討した。

A. 研究目的

アフラトキシンは、高温多湿の地域に生息しているカビの産生するカビ毒であり、ヒトや動物の健康被害を引き起こす。穀類、香辛料、種子類、豆類などが多く、我が国においては輸入ピーナッツ、ビスケット、アーモンド、小麦、辛料などから頻度が高く検出される。現在、我が国では食品衛生法第 6 条 2 項にはアフラトキシン B1 に対しては規制値が設定されているが、我が国は輸入品に依り、我が国のリスク評価に基づいて基準値を設定する必要がある。コーデックス規格や諸外国では、アフラトキシン

の規制を、アフラトキシン B1 (AFB1)、B2 (AFB2)、G1 (AFG1)、G2 (AFG2) の合計であるトータルアフラトキシンを対象とする方法で設けるのが主流となっている。EU は、トータルアフラトキシンの規制と AFB1 の規制の組み合わせの方法を採用している。

このような背景から、我が国の実情にあつた基準値策定を行うためには、毒性や汚染の実情に関する基礎的な研究が必要である。本研究では 1993 年および 2002 年に開かれた国際研究機関 (IARC) の評価および 1998 年に開かれた FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) の評価の後に発表された文献を基に、毒性および汚染の実態の調査を行った。

する場合には AFB2 および AFG2 も考慮に入れるべきである。規格シフトは、AFB1 による健康被害を防止するため、我が国の基準値として AFB1 の 10 ppb とし、AFB2、AFG1、AFG2 の基準値は AFB1 の 10 倍の 100 ppb とする。この場合、規格シフトによる健康被害を防止するため、AFB1 の基準値を 10 ppb とし、AFB2、AFG1、AFG2 の基準値を 100 ppb とする。この場合、規格シフトによる健康被害を防止するため、AFB1 の基準値を 10 ppb とし、AFB2、AFG1、AFG2 の基準値を 100 ppb とする。この場合、規格シフトによる健康被害を防止するため、AFB1 の基準値を 10 ppb とし、AFB2、AFG1、AFG2 の基準値を 100 ppb とする。

国は、我が国が近き汚染物質の割合が 9割に達していること、また、AFB1 の割合が 4割に達していること、および AFB2 の割合が 1割に達していること、等を踏まえ、AFB1 の割合を 8割に引き下げ、AFB2 の割合を 2割に引き下げ、AFG1、AFG2 の割合を 1割に引き下げることとする。この場合、規格シフトによる健康被害を防止するため、AFB1 の基準値を 10 ppb とし、AFB2、AFG1、AFG2 の基準値を 100 ppb とする。

E. まとめ

1993年、2002年 IARC Monograph および 1998年 JECFA Monograph に加えて、最近の文献調査結果を加えて、トータルアフラトキシン (AFB1、AFB2、AFG1、AFG2) の毒性評価をした。トータルアフラトキシンの内を AFB1、AFG1 はエポキシドを形成し、DNA 結合活性があるため、発ガン性がある。一方、AFB2 および AFG2 は、ガンを生じないが、急性毒性は強い。また、AFG1 は、代謝により AFB1 に変換する可能性がある。トータルアフラトキシンのうち、AFB1 が 80% を占め、AFG1 が 10% を占め、AFB2、AFG2 が 10% を占める。この結果、AFB1 の割合を 8割に引き下げ、AFG1 の割合を 1割に引き下げ、AFB2、AFG2 の割合を 1割に引き下げることを目指す。この場合、規格シフトによる健康被害を防止するため、AFB1 の基準値を 10 ppb とし、AFB2、AFG1、AFG2 の基準値を 100 ppb とする。

圧倒的に情報量が不足しており、より正確な判断を行うためにはさらに研究調査を続ける必要がある。

参考文献

- 1) B.A.Carnaghan, et al., Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 1101 (1963)
- 2) Wogan, G.N., et al., Structure-activity relationship in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer research*, 31, 1936 (1971)
- 3) K.Terao, and K.Ohtsubo, *Mycotoxins and animal foods*, Chapter 21, pp455 (1986)
- 4) 伊藤嘉典ら、「輸入剥き実生落花生のアフラトキシン

汚染調査 (1972-1991)」
Mycotoxins(2001)51,13

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugita-Konishi, Y. The mechanism of Aflatoxins carcinogenesis and the current occurrence of Aflatoxin B1 contamination of nuts in Japan. *Mycotoxins*, in press

2. 学会発表

小西良子「アフラトキシン—その発ガン性と汚染実態」マイコトキシン研究会学術講演会、2005年1月

H. 知的財産権の出願登録状況
なし

Table 1. 輸入ピーナッツ、ピスタチオ、アーモンドにおけるAFB1,B2,G1,G2汚染割合

		Bグループ(%)	BGグループ(%)	備考
ピーナッツ (1975-1991)	大粒	85-97	3-15	Itoh,Y, et al., Mycotoxins, 51, 19-24 (2001)
	小粒	91	9	
ピーナッツ (2000)	大粒	89	11	
	小粒	91	9	
ピスタチオ	(2000-2003)	100	0	
アーモンド	(2000-2003)	85	15	

1993 年 IARC Monograph 要旨

World Health Organization

International Agency for Research on Cancer

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans

Some naturally occurring substances: Food items and constituents, Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins

Vol. 56, 1993

要旨と評価

1. 曝露

アフラトキシンは、主に高温多湿な気候の地域に偏在している2種類の *Aspergillus* 属が産生する比較的安定な毒素である。作物が、アフラトキシン B1 (AFB1) か AFB1 とアフラトキシン G1 (AFG1) の混合したものに汚染されているかは、*Aspergillus* 属の地理的な分布に依存している。というのも *Aspergillus flavus* はおもに AFB1, AFB2 を産生し世界中に分布しているが、*Aspergillus parasiticus* は AFB1, AFB2, AFG1 と AFG2 を産生し、アメリカ、アフリカに広く分布している。アフラトキシン M1 はおもに母乳を含むミルクの消費を通して曝露するが、世界の限局した地域では生まれる前から子宮を通してアフラトキシンに曝露されていることがバイオモニタリングの研究から明らかになっている。

2. ヒトにおける発ガン性データ

アフラトキシンを含むダストに曝露された少数のオランダの油圧関係の労働者の集団例では、肝ガンによる死者が増加することが示された。しかし、同時に死に至らない肝臓がんも観察された。中国での集団例では摂取する食品がアフラトキシンに多く汚染されている村では肝臓がんでの死亡例が非常に多いことが見出された。オランダの輸入飼料工場の労働者でアフラトキシン汚染飼料を10年以上取り扱っていた人たちは同じ工場の他の仕事をしていた労働者に比べて肝臓ガンが多いことが報告されている。中国において、尿中にアフラトキシン代謝物を含む人々はB型肝炎抗原陽性の補正をした後でも肝臓ガンにかかるリスクが著しく高くなることが示された。リスクの増加は、特にそれらの人々の中でアフラトキシニン-グアニンアダクトの排出量に伴って増えたが、摂取する食物や尿に含まれるアフラトキシン量との相関はなかった。

アフラトキシンの曝露評価を行う試みにおこなわれた3つの病院で行われた症例対象研究のうち、1つは(フィリピンで行われたものであるが)アフラトキシンの摂取量が多かったヒトと少なかったヒトとの間では肝臓ガンへのリスクに有意な差が見られた。しかし他の2つは(1つは香港でもうひとつはタイ)相関性を裏付ける結果は得られなかった。