

200501028A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

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17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18（2006）年3月

## 目次

### I. 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----- 1

小西 良子

### II. 分担研究報告書

オクラトキシン A の毒性評価----- 13

小西 良子

食品のカビ毒汚染実態に関する研究----- 91

熊谷 進

実験動物を用いたニバレノールの毒性実験----- 157

広瀬 雅雄

ニバレノールの毒性影響と毒性学的同等性----- 177

窪崎 敦隆

モンテカルロ法による日本人の小麦摂取による

デオキシニバレノール(DON)曝露量の推定----- 189

佐藤敏彦

# 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  
(食品の安心・安全確保推進研究事業)

平成17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：カビ毒は、カビの2次代謝物のうちヒトや動物に有害な影響を及ぼすものをいう。カビ毒は慢性疾患を引き起こすことが懸念されており、一般的に熱に安定であることから、食品衛生上大きな問題となる。カビ毒産生菌は世界中に分布しているため、この防御や規制に対しては国際的な取り組みがなされている。すでにいくつかのカビ毒に関してコーデックスなどで国際的に基準値が設定されているが、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得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我が国に流通している食品中のトータルアフラトキシン、オクラトキシンA、フモニシンについてそれぞれ235検体、367検体、204検体を対象に汚染実態調査を行った。その結果アフラトキシンは、市販の殻付きピーナッツ、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、ゴマ油、米、豆菓子からは検出されなかったが、ピーナッツバターの一部より0.7・g/kg未満の濃度のAFB1が検出された。オクラトキシンAは、コーンフレーク等のとうもろこし製品、グレープジュース、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、そば麺、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・g/kg未満であった。フモニシンは、押麦、そば粉、そば麺、精白米からは検出されなかったが、ポップコーン、コーングリッツの多くより、数十・g/kg以下、一試料から185・g/kgのフモニシンB1が検出された。②オクラトキシンAの毒性評価に関する文献調査をおこなった。オクラトキシンAは腎毒性および発ガン性が主たる毒性であり、多くの国で汚染が起こっていること、半減期が極端に長いこと、などから健康被害を未然に防ぐために早急に基準値設定が必要であると思われた。コーデックス委員会でも近い将来基準値が設定される。③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)の慢性毒性試験では用量を再度検討した後、最高用量を100ppmとして、25及び6.25ppmの混餌用量で雌雄のラットを用いた90日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、雄の25ppm以上、雌の100ppmで体重増加が抑制され、雌雄の100ppmでは摂餌量も減少した。臓器重量は、雄の100ppmで精巣重量(絶対・相対)が増加し、胸腺絶対重量が減少した。雌でも、100ppmで胸腺重量(絶対・相対)が減少した。血液検査では、雄の100ppm、雌の6.25ppm以上で白血球が減少し、血小板の減少が雌雄の100ppm、赤血球の減少が雄の100ppm、ヘモグロビンの減少が雌の100ppmで認められた。また、雄では100ppmで白血球分画中でのリンパ球比率の減少、好中球比率の増加を認めた。以上、NIVのラットへの経口投与により、弱い貧血とともに白血球を標的とした毒性が示された。④モンテカルロ・シミュレーション法による日本人の小麦類からのDON曝露量の推定を行った結果、95パーセンタイル値では、一日当たり耐用摂取許容量である体重1kg当たり1 $\mu$ gを超える値は認められなかった。一方、99パーセンタイル値においては、乳幼児において、現行の基準値の2倍を超える曝露推定値を示した。仮想摂取量分布の不適合の影響による過大評価の可能性があるものの、より高い安全性を示すには、乳幼児に関しては更に検討を行った上で、何らかの特段の措置を実施する必要があるかもしれない。

## A. 研究目的

カビ毒はカビが産生する二次代謝物のうち、ヒトや動物に健康被害を引き起こすものをいう。カビ毒による健康被害とは、主に低用量を慢性的に摂取することによる発ガンや免疫毒性、腎毒性などである。さらに最近では新生児の形成不全や神経毒性なども引き起こすことが示唆されている。農産物のカビ毒汚染は自然気象の変化と密接に関係しているため、その防御は容易ではない。世界中のそれぞれの気候に順化したカビ毒産生菌が存在し、農産物を汚染する。そのため圃場や生産過程でのカビ毒汚染を減らすための行動規範が国際機関から出され始めているが、汚染ゼロにすることは不可能であるといわれている。

輸入食品への依存性が高い我が国においては汚染カビ毒についての正しい毒性を知り、汚染実態および暴露実態を常に把握することは食品衛生上急務である。また国際的な動向を常に把握し対応することが必要である。現在までにコーデックスなどで国際的に基準値が既に設定されているまたは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, トータルフモニシン(B1, B2, B3)、ゼアラレノンなど数多く存在する。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得ることを目的としている。そこで昨年について①主要カビ毒の汚染実態調査②主要カビ毒の毒性評価③実態調査を基にした確率論的手法を用いた暴露評価を行った。

①の実態調査は、昨年と同じく、トータルアフラトキシン(TAF: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2)、オクラトキシン A, およびトータルフモニシン(B1, B2, B3)の3つのカビ毒を対象に行った。②毒性評価は、オクラトキシン A を対象に、毒性学的な観点から基準値を設定する妥当性を検討した。さらに国産小麦で汚染が問題になっているにも関わらず、毒性学的な知見がないため国際的に評価されていないニバレノールの90日間短期毒性試験を行った。③では、過去3年間に得られた小麦のデオキシニバレノール汚染量の結果を基にモンテカルロ法によ

り我が国におけるデオキシニバレノールの暴露評価をいくつかの想定基準値に対してシナリオを作成し、推定を行った。

## B. 研究方法

### 1) 実態調査

#### (1) 試料

小麦粉は農林水産省から提供されたものを、その他の食品はスーパー等で購入したものを、それぞれ分析試料とした。

#### (2) 分析方法

##### a. アフラトキシンの分析

ごま油、ピーナッツ、ピーナッツバター、チョコレート以外は、塩化ナトリウムとメタノール水(8+2)抽出、イムノアフィニティーカラムでクリーンアップを行なった。溶出液をトリフルオロ酢酸で処理してから、または処理せずに、HPLCによる分析に供した。

なお、ごま油、ピーナッツ、ピーナッツバターについては、メタノール水ではなくクロロホルムで抽出し、クリーンアップを行った。

##### b. オクラトキシン A の分析

小麦粉・ライ麦粉についてはアセトニトリル水(6+4)で、コーン製品・米・オートミール・コーンフレーク・そば粉については塩化ナトリウムを加え、メタノール水(8+2)で、レーズン・生コーヒー豆についてはメタノール-1%炭酸水素ナトリウム、イムノアフィニティーカラムによるクリーンアップを行い、HPLCによる分析に供した。

##### c. フモニシンの分析

試料をメタノール水(3+1)を加え抽出し、得られたろ液をイオン交換カートリッジカラムでクリーンアップを行い LC/MS による分析に供した。

### 2) オクラトキシン A (OTA) の毒性評価

#### (1) OTA の毒性評価-2001 年までの報告

2001 年までのオクラトキシン A の毒性に関しては 2001 年 JECFA Monograph、内閣府食品安全委員会の平成 16 年度食品安全確保総合調査「食品等に係るカビ毒・自然毒のリスク評価に関する情報調査」を基に 2002 年から 2004 年までの文献を引用および 2004-2005 年の 1 年間に発表された毒性〔44 編〕および実態調査の報告〔50 編〕を収集し、その要旨をまとめ

た。

### 3) ニバレノールの毒性試験

ニバレノール (NIV) は当研究所衛生微生物部にて昨年精製されたものを使用した。

動物は、用量設定試験においては、5週齢の雄 F344 ラット (日本チャールズリバー) を用い、一群 8 匹ずつとして計 3 群に群分けし、それぞれの群について NIV を 0, 150, 300 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。実験期間中の体重、摂餌量及び解剖後の臓器重量、血液学的検査の結果をもとに 90 日間反復投与毒性試験の投与量を決定した。90 日間反復投与毒性試験においては、5週齢の雌雄 F344 ラットを用い、一群 10 匹ずつとして計 4 群にそれぞれ NIV を 0, 6.25, 25, 100 ppm の割合で基礎飼料に混じり、90 日間投与を行った。投与期間中、一般状態を観察し、週に一度の割合で、体重と摂餌量を測定した。

動物は全て、投与終了時にエーテル麻酔下で採血を行い、脱血後に屠殺した。用量設定試験 II では、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。90 日間反復投与毒性試験ではそれらの臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、眼球及びその付属器、下垂体、唾液腺、舌、気管、甲状腺、上皮小体、大動脈、食道、胃、大腸、膀胱、膀胱、前立腺、精嚢腺、凝固腺、精巣上体、卵巣、卵管、子宮、膈、乳腺、リンパ節 (頸部及び腸間膜)、胸骨、大腿骨、脊髄、坐骨神経、皮膚及び骨格筋を採取した。採取後、精巣を除く臓器は 10% 緩衝ホルマリン液にて固定し、精巣はプアン液にて固定を行った。用量設定試験 II, 90 日間反復投与毒性試験共に、全例の血液について赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量 (Hb), ヘマトクリット値 (Ht), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球血色素量 (MCH), 平均赤血球血色素濃度 (MCHC), 血小板数 (Plt), 白血球数 (WBC) の測定を行ったほか、桿状核好中球 (band-form neutrophils), 分葉核好中球 (segmented neutrophils), 好酸球 (eosinophiles), 好塩基球 (basophils), リンパ球 (lymphocytes), 単球 (monocytes) の分類を行い、網状赤血球 (reticulocytes) の数も求めた。また、90 日間反復投与毒性試験については、血清を分離後、凍結し、総蛋白 (TP),

アルブミン/グロブリン比 (A/G), アルブミン (Alb), 総ビリルビン (TB), 直接ビリルビン (DB), 間接ビリルビン (IB), グルコース (Glu), トリグリセライド (TG), 総コレステロール (TC), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (Cre), ナトリウム (Na), クロール (Cl), カリウム (K), カルシウム (Ca), 無機リン (IP), アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST), アラニントランスアミナーゼ (ALT) を測定した。

統計学的解析により検定を行い、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。

免疫毒性は、細胞表面マーカーを指標とした脾臓細胞サブセットに対する種々の標識抗体を用い FACS SCAN にて解析した。

脾臓細胞のナチュラルキラー活性の測定は、脾臓細胞の標的細胞としてナチュラルキラー活性に対して感受性のある Yac-1 細胞を用いた。蛍光標識をした Yac-1 細胞とエフェクター細胞である脾臓細胞をエフェクター細胞: 標的細胞比が 50:1, 25:1, 12:1 及び 6:1 になるように細胞と混合して 37°C/5% CO<sub>2</sub> PKH2 蛍光標識 Yac-1 細胞中の死細胞の数をフローサイトメトリーで測定した。

血清中イムノグロブリンのうち、IgG, IgM 及び IgA サブクラスの血清中量の測定を ELISA 法で行った。

統計処理には、Analysis of Variance (ANOVA) または Student' s *t*-test を用い、 $P < 0.05$  で統計学的に有為な差があると判断した。

### 4) 小麦中 DON の暴露評価

(1) 小麦の摂取量についてのシミュレーション

#### (a) 食品の分類

平成 14 年の国民栄養調査より小麦を含んだ 108 の食品の摂取量データを元に 5 つに分け、それぞれにつき摂取量のシミュレーションを行った。

#### (b) それぞれの平均小麦含有率

. 粉もの, . パン類, . 麺類, 中華, . 菓子類の平均小麦含有率はレシピなどにある重量比を利用して決定した。

#### (c) 食品摂取量分布の推定

粉ものから菓子類まで 5 つの食品分類に対して、年齢階層別 (1 歳から 6 歳, 7 歳から 14 歳, 15 歳から 19 歳, 20 歳以上の 4 層) に、摂

取量の分布の推定を行なった。分布推定にはソフトウエアとして構造計画研究所社製 Crystal Ball Pro Ver4.0 日本語版を利用した。

その多くで対数正規分布がフィットしたので、全て、分布は対数正規分布に従うと仮定した。その分布に従った 10,000,000 件の乱数を発生させて、シミュレーションを行った。

こうして得られたそれぞれの食品の摂取量に、(2)の小麦の平均含有率をかけ合わせて得られたものが、それぞれの食品を摂取することによる、精製小麦の摂取量ということになる。最後に、5種類の食品による精製小麦の摂取量を合算して、精製小麦の総摂取量を求めた。

(2) 小麦の DON 含有量についてのシミュレーション

#### (a) 使用データ

農林水産省が行った平成 14 年、15 年、16 年の 3 ヶ年における小麦中の DON 含有量に関するデータおよび厚生労働省が平成 15 年度に行った小麦粉の DON 含有量のデータを用いた。

#### (b) 検出下限未満の扱い

0.05ppm 未満のものは、検出下限未満とした(全体の 38%が検出下限未満であった)。検出下限未満の扱いについては、二通りの仮定を用いた。

(I) 検出下限未満については、全てのサンプルが検出下限の値=0.05ppm を取る(仮定 A)。

(I I) 検出下限未満については、0 から 0.05ppm の一様分布を取る(仮定 B)。

#### (c) 検出下限以上のサンプルの分布

これについては、適合する分布を調べ(Crystal Ball を使用)、次のような平均と分散を取るものと仮定した。

- ・分布の形状：対数正規分布
- ・平均の値：0.22 (ppm)
- ・分散の値：0.0529 (ppm)

#### (d) 規制についてのシナリオ

市場で流通する、食品原料となる小麦粉について、次の 3 つのシナリオを仮定した。

- ・規制なし
- ・0.55ppm 規制(精製した小麦では 1.1 ppm)
- ・1ppm 規制(精製した小麦では 2 ppm)

#### (e) シミュレーションの実際

上記の仮定とシナリオに基づき、6 つの条件

(2 x 3) それぞれで、10,000,000 サンプルを作成した。

#### (3) DON の曝露量推定

それぞれ 10,000,000 サンプルを用いて、摂取量についての 4 つの年齢階級と、含有量についての 6 つの条件を使って、全部で 24 のシミュレーションを行った。

### C. 研究結果

#### 1) 実態調査

今年度新たに追加した食品については、回収率を調べたが、その結果、70%を超える回収率が得られたことから、方法が妥当であった。

トータルアフラトキシンは、235 試料のうち、市販の殻付きピーナッツ、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、ゴマ油、米、豆菓子からは検出されなかったが、ピーナッツバター 20 試料のうち 5 試料から 0.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  未満の濃度が検出された。日本産のピーナッツバターの AFB1 から検出されたが、この原料ピーナッツの由来は不明である。そば粉については 10 試料中 4 試料から検出され、そば麵については 20 試料中 2 試料から検出された。いずれも、原材料の由来は不明であった。

オクラトキシン A は、コーンフレーク等のとうもろこし製品、グレープジュース、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、そば麵、ライ麦、小麦粉、オートミール、パスタ、チョコレート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。しかし、インスタントコーヒーについては 10 検体すべてに定量限界以上の汚染が認められ、最高 4.23  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の汚染が認められた。

フモニシンは、押麦、そば粉、そば麵、精白米からは検出されなかったが、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 185  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上のフモニシン B1 が検出された。また、その他とうもろこし製品にも汚染は認められた。今年度新たに調査した大豆については国産品に 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  未満のフモニシン B1 汚染が認められた。

#### 2) オクラトキシン A (OTA) の毒性評価

OTA の急性毒性はげっ歯類より犬、豚の方が感受性は高い。OTA のおもな標的臓器は腎臓である。組織学的には近位尿細管の萎縮と尿細管

バレノール暴露 25 及び 100 ppm 群において有為に低かった。さらに、脾臓 T 細胞のうち、ヘルパー T 細胞/細胞障害性 T 細胞 (CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup>) の比が、ニバレノール暴露 6.25 及び 25 ppm 群では有為な変化を見いだせなかったが、100 ppm 群において有為に高かった。加えて、ナチュラルキラー活性を担っているナチュラルキラー細胞やナチュラルキラー T 細胞などの細胞表面マーカーである NKR-P1A を指標に、NKR-P1A<sup>+</sup>細胞の比率をフローサイトメトリーで解析した結果、統計学的に有為な減少を観察した。

次に、Yac-1 細胞に対する脾臓細胞のナチュラルキラー活性を調べた結果、コントロール群と比較して有為に高い事を見いだした。血清中量の IgG、IgM 及び IgA サブクラス量を測定した結果、ニバレノール暴露によって IgM 量が統計学的に有為に上昇した。特に、ニバレノール暴露 100 ppm 群において約 26% 上昇したが IgA 量に変化は見いだせなかった。

#### 4) 小麦中 DON の暴露評価

##### (1) 年齢の影響

最大値は別として、年齢階級別では 1~6 歳でもっとも高い値を示し、7 歳以上ではほぼ同様の値であった。

##### (2) 異なるシナリオの影響

規制に関する 3 つのシナリオでは大きな差異を認めなかった。また、検出下限以下の取り扱いに関する 2 つのシナリオでも大きな差異は認めなかった。

##### (3) 推定曝露量

95 パーセンタイル値では、各シミュレーションにおいて 1 µg/kg を超える値は認められなかった。99 パーセンタイル値では、1~6 歳以下で 2~3 µg/kg となり、7 歳以上ではほぼ 1 µg/kg であった。

#### D. 考察

JECFA により推定されたアフラトキシン B1 の発がんリスク、フモニシンとオクラトキシン A の PMTDI の値から、市販食品において前年度から今年度に認められたこれらカビ毒の汚染濃度によって健康障害が直ちに引き起こされることは考え難いことから、現時点で緊急的な対応をとる必要はないと考えられる。しかし、カビ毒による汚染は、気候の影響を受けやすく年次変化が大きいことが知られていることか

ら、次年度も汚染実態調査を継続し、3 年間の調査結果と合わせて暴露評価を行なうことによって、基準値の設定を含めた我が国におけるカビ毒の規制に活用する。また、コーデックス等にもデータを提供することにリウム水溶液 (7+3) でチョコレートはアセトニトリル・水 (6:4) で抽出したのよってカビ毒に関する国際的取り組みに貢献する。

本研究では、既報の汚染実態と前年の成績を踏まえ、汚染の可能性が考えられる 12 種類の食品を取り上げて調査を行なった結果、ピーナッツバターのみで定量下限値以上の濃度の汚染が認められた。ただし、前年度に比し、汚染頻度と汚染濃度ともに低かった。しかし、スーダンのアフラトキシン汚染地帯において、ピーナッツバターが肝臓癌のリスク因子であることが報告されていることから、製造原料としてのピーナッツの情報を収集するとともに、さらに多数のピーナッツバターについて汚染実態調査を行い、また、我が国におけるピーナッツバターの消費形態の調査も並行して行なう必要がある。前年度は汚染が認められなかったそば粉とそば麺に低頻度ながら AFB1 が検出された。わが国のソバの消費量は諸外国に比べて比較的高いため今後これら食品もアフラトキシン汚染のリスク食品として注視しなければならず、今後、原材料の由来を含め精査する必要がある。

OTA は、小麦、大麦、燕麦、ライ麦、干しぶどう、ワイン、コーヒーに高濃度の汚染が比較的高頻度に認められてきた。その他に、米、香辛料、オリーブ、豆類、ココア、チョコレート、ひまわり種子、ゴマ種子、肉類、乳、ビール、ソバに汚染が認められており、最近の報告ではグレープジュースや冷凍ぶどうにも汚染が認められている。前年度同様に今回の調査では、米ととうもろこし製品、グレープジュース以外の食品のいずれからも、一部または全部に汚染が認められた。干しぶどうの汚染の濃度は前年同様に高く、最高値 8.8 µg/kg であり、そば粉の汚染濃度は比較的低くかったが、検出例が 50% をこえていること、摂取量が比較的多い食品であることから、注意が必要である。パスタも最近の食生活の変化に伴い、急速に消費が伸びてきた食品であるが、パスタの原料となるデュラム小麦はオクラトキシン A に汚染しや



皮質間質の繊維性変性、糸球体のヒアリン化が観察される。機能的には尿の濃縮機能の低下、尿中酵素、タンパク、糖などが増加する。豚ではその感受性ももっとも高く、0.2mg/kg(0.008 μg/kg bw/day)の投与で腎機能低下をもたらした。この値は現在の暫定週耐容摂取量の根拠ともなっている。

遺伝毒性および発ガン毒性については、もっとも重要でありまた未解明な点が多い毒性である。しかし、OTAが遺伝毒性を示すこと、マウスでは雄のみに腎臓ガンが引き起こされ、ラットの腎では非常に低容量でガン発症が観察されることは、実験的に明らかにされている。これらの結果を受けて1993年IARCはOTAの発ガン性を再評価し、グループ2B(ヒトに対して発ガン危険性の可能性がある)に分類した。

今のところOTAの生体内変換にはペルオキシダーゼ経路が関与していること、グルタチオンSトランスフェラーゼ活性(GST)およびチトクロームP450(おもにCYP2C11)のエポキシゲナーゼが関与していることなどから、①OTAの酸化還元サイクルによるOTAからキノンOTAへの変換が、活性酸素生成や脂質過酸化を引き起こす経路②OTAから直接チトクロームP450やGSTによってヒドロキノンOTAおよびその酸化物であるキノンOTAが形成される経路のどちらかからDNA切断やエキソサイクリックDNA付加体形成が起こるのではないかと仮説が考えられている。

OTAの主たる毒性は腎毒性であるが、その他に免疫毒性、催奇形性毒性、神経毒性、タンパク合成阻害、酵素活性阻害等が報告されている。しかし、腎毒性への感受性が最も高い。

バルカン諸国(ユーゴスラビア、ブルガリア、ルーマニア)の特定な地域では風土病といわれたバルカン腎症と血液中のOTA濃度との間には相関があることからOTA原因説が根強い。また、この腎症がよく起こる地域では尿道ガンも高い発症率で起こっていることからOTAとヒトの発ガンとの関係も示唆されているが、確証は得られていない。

OTAは腸管からはゆっくりと吸収され、血液を經由して主に腎臓に分布されるが、肝臓、筋肉、脂肪などにも低レベルが分布する。OTAの血液中の半減期は他のカビ毒とくらべると非常に長い。種間で大きな差があるが、マウスで

は、24~39時間であるのにラットでは55~110時間、豚では72~120時間、マッカッカーサルでは510時間、ヒト(ボランティア)では840時間に及ぶ。この性質はOTA摂取を評価するためのバイオマーカーとしても利用されており、食品中の汚染実態とともにヒトの血清中および乳中のOTA量も暴露評価のための重要な情報となる。

### 3) ニバレノールの毒性試験

90日間反復投与毒性試験の実験期間中の体重は、雄の25ppm以上で用量依存的に減少し、雌の100ppmでも減少した。個体当たりの摂餌量は、100ppmで雄の投与開始後4週目までと雌のほぼ全ての試験期間において減少した。また、雌雄共に100ppmにおいて軽度の軟便が観察された。摂餌量は、個体当たりでは雌雄とも100ppm群で若干減少したが、体重当たりに換算すると、雌では他の群と変わらなかったものの、雄では減少ではなくむしろ軽度の増加を示した。血液学的検査では、雄の25ppm以上でMCVが用量依存的に増加し、100ppmでMCHの増加及びWBC、RBC、Pltの減少が認められた。また、白血球分画では、100ppmでリンパ球比率が減少し、好中球比率が増加した。雌では、6.25ppm以上でWBCが用量依存的に減少し、100ppmでHb、Pltが減少した。血清生化学的検査では、雄の25ppm以上でTG、TC、Cre、ALTが減少し、100ppmでA/G、Alb、Clが増加、TP、Glu、K、ASTが減少した。雌では、25ppm以上でA/Gの増加、TP、TC、Cre、ASTの減少が認められた。臓器重量は、雄の25ppm以上で、脳、肺、心臓、腎臓、精巣の相対重量が用量依存的に増加し、肝臓の絶対重量が用量依存的に減少した。また、100ppmで、精巣の絶対重量及び脾臓、肺の相対重量が増加し、脳、胸腺、心臓、脾臓、腎臓の絶対重量が減少した。雌では、25ppm以上で肺、心臓、脾臓、腎臓の相対重量が用量依存的に増加し、100ppmで脳、肝臓の相対重量の増加、脳、胸腺、肝臓、腎臓の絶対重量及び胸腺の相対重量の減少が認められた。

NIVの免疫毒性を知る為、ニバレノール暴露後の脾臓中のT細胞及びB細胞の細胞比を細胞特異的表面マーカーであるCD3及びB220を指標にフローサイトメトリーで解析した。その結果、T細胞/B細胞(CD3<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>)の比が、ニ

すい小麦として知られている。今後も汚染実態を注意しなければならない。今年度新たに加えたインスタントコーヒーは、全例汚染されており、平均汚染源も生コーヒーや焙煎コーヒーよりも高いことから製造工程での濃縮や原料コーヒー豆の高濃度汚染の関与を究明する必要がある。

フモニシンはとうもろこしとその製品、小麦、米に汚染が認められてきた。本研究では前年度、ポップコーンとコーングリッツの全試料に、スイートコーンの一部にそれぞれ汚染があったが、今年度もポップコーンでは前年度同様測定した品目の中で最高値を示した。またコーングリッツにも、コーンスターチにも汚染が認められた。米については今年度も汚染が認められなかったが、今年度新たに加えた大豆には、国産にも拘らず汚染がみられたことから、今回も注視していく必要がある。

今後注目すべき品目としては、最近ビールの AFB1 汚染の実態が報告されたことから、次年度は東南アジア由来のビールを中心に調査を行なう必要があるであろう。また、鯉節の OTA 汚染がわが国で報告されていることから、調査が必要であろう。さらに OTA は食品だけではなく家畜の飼料からも移行し、腎臓、肝臓及び血液なども汚染しているため、畜産加工品に対する汚染実態の把握も必要となる。OTA は生体内では血清アルブミンと結合体を作り比較的長期間残存することから、ヒトの血液中の OTA 濃度を測定することによりその暴露状況が推察できる。食品やヒトの血液試料における OTA 汚染の研究から、わが国でも OTA の暴露が起こっていることが示されているが、最近はまだますます食生活のスタイルが欧米化してきていることから更に暴露がすすんでいることが考えられる。

OTA はほとんどの哺乳類に腎毒性を有し、げっ歯類に発がん性が証明され、催奇形性、免疫毒性および神経毒性を有するカビ毒である。さらにヒトへの影響として、パルカン腎症と尿管ガン、フランスおよび北アメリカにおける慢性間質腎炎の発症に関与する因子であると言われている。

OTA の毒性評価および規制に対する取り組みはヨーロッパ諸国および国際機関で行われている。

2004 年の CCFAC 部会においては OTA の最大基準値設定は小麦、大麦、ライ麦に限定することが合意されている。既に汚染実態調査および暴露評価を行っている EU では、ソバやコメを含む穀類その加工品、乾燥ブドウ、ワインおよびグレープジュースでは、基準値が設定されている。ベビーフードおよび幼児・子供用の穀物由来加工品と医療目的の幼児用食品などハイリスクグループに対して厳しい基準値を設定している。

昨年来からの予備実験の結果を踏まえ、本試験は 100 ppm を最高用量として実施することとした。90 日間反復投与の本試験では、100 ppm で雌雄共に投与 1 週間目から、雄の 25 ppm で投与 6 週目から体重増加の抑制が見られた。NIV 反復経口投与による体重増加の抑制については、雌雄の C57BL/6CrSlc マウスに投与した試験のいずれにおいても今回の本試験と同様に用量依存的な体重増加率の減少が観察されている。一方、ラットを用いた 15 日ないし 30 日間の 0.4 ないし体重当たり 2.0 mg/kg NIV を投与した反復試験では、投与群と対照群と間に体重の差はほとんど認められず、雄ラットに最高 12 ppm の混餌用量で 2 週ないし 4 週間投与した試験においても体重への影響は観察されなかった。今回の本試験での摂餌量から NIV 摂取量を計算すると、100 ppm 群の雄が 6.9 mg/kg/日、雌が 6.4 mg/kg/日であり、既報の 2.0 mg/kg NIV 反復投与試験より 3 倍以上高い投与濃度であったことから、体重増加抑制は投与用量の違いに起因していた。その原因としては、摂餌量の減少、消化管への毒性影響による栄養吸収障害が考えられる。今後、病理組織学的検査により消化管障害を示唆する所見の有無を検討する。

今回の本試験で、NIV100 ppm 投与により、雄の胸腺、脾臓の絶対重量、雌の胸腺の絶対・相対重量が減少を示したが、マウスを用いて 30 ppm の混餌用量で 12 週間、6 か月ないし 1 年間投与した試験においても同様に、胸腺、脾臓の絶対重量の減少が報告されている。NIV は免疫抑制作用を有するとの報告もなされており、今回の胸腺及び脾臓等の重量変化に関与していると考えられた。また、血液学的検査では、雌雄共に、用量依存的に WBC の減少が認められた。更に、雄では、100 ppm で白血球分画の

ンパ球比率が減少し、好中球比率が増加した。血清生化学的に 100 ppm の雌雄で A/G の明らかな増加を認められたにも関わらず、雄で若干の Alb の増加が認められたのみであったことから、雌雄ともにグロブリンが減少を示しているものと考えられた。同じ個体を用いた免疫毒性の測定では、T細胞が顕著に影響を受けていることが認められた。しかしナチュラルキラー細胞活性は濃度依存的に高まってきており、感染防御システムに何かしらのフィードバックが存在することが示唆された。トリコテセン系のまかじ毒を連続的あるいは長期間にわたり動物に投与することにより、骨髄の造血組織の破壊に由来する Plt, RBC 及びリンパ球の減少はよく知られているが、その他の所見として観察された雄の 100 ppm で精巢の絶対・相対重量の増加は、過去にない。今後、病理組織学的検査により精巢を標的とした病変の有無を検討する。

NIV の反復経口投与によるその他の器官への毒性影響として、マウスに IgA 腎症様の変化が起こることが報告されているが、今回の試験では IgA 亢進は認められなかった。これは動物種による違いであると思われる。

小麦中の DON 汚染量からの暴露量の推定では、95 パーセントイル値で見ると、規制のいずれのシナリオにおいても推定曝露量は大きな違いはなく、いずれもすぐに健康に影響を及ぼす量ではなかった。

しかし 99 パーセントイル値においては、1~6 歳の乳幼児において、規制の有無にかかわらず 2  $\mu$ g/kg 以上の推定値となった。このことは、即ち全乳幼児の 1% が現行の基準値の 2 倍以上の曝露を受けることを意味するものである。感受性をも含めて考えれば、他の年齢層より曝露量が多くなると考えられる乳幼児には特段の配慮が必要かもしれない。

## E. 結論

本研究から、アフラトキシンは、昨年同様ピーナッツバターの一部より AFB1 が検出された。OTA は、ほとんどが低レベルであったが、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、そば麺、ライ麦、小麦粉、オートミール、パスタ、インスタントコーヒーの一部から高頻度で検出された。フモニシンは、ポップコーン、コーングリッツからは高頻度でフモニシン B1 が検出された。

OTA の毒性としては、腎毒性および発がん性が最も危惧される毒性であった。特にブタで感受性が高いことが報告されており、ヒトに対する感受性も今後遺伝子レベルで解明されていかなければならない。現在は、発ガン性メカニズムなど不明な点も多いが、わが国でも汚染している食品が比較的多いこと、健康被害を未然に防ぐ観点からなるべく速やかに基準値を設定することが望ましい。

NIV の用量設定試験の結果をもとに、ラットを用いた NIV の 90 日混餌投与試験を 100 ppm を最高用量として実施した結果、体重増加抑制、免疫器官の重量減少が認められ、血液学的検査から、弱い貧血を伴った白血球を標的とした毒性が示された。今後、病理組織学的検査を行い、無毒性量の検討を実施する予定である。免疫毒性としては細胞障害性 T 細胞のニバレノールに対する高い感受性を観察した。又、高濃度のニバレノール暴露によってナチュラルキラー活性担当細胞への細胞毒性が観察される一方、低濃度では活性亢進が見られた。これは T 細胞数の減少に対する補完反応の可能性がある。過去の研究から、ニバレノールが IgA 産生異常を導くとの報告があるが、本研究では IgM 量のみ変化を観察した。本研究によって得られたこれらの知見は、人に対するニバレノールの免疫毒性を考える上で重要な知見を与えるものである。

現状の我が国の小麦中のデオキシニバレノール含有量および小麦摂取量から推定される曝露量は現行の基準値を維持していれば、ほとんどすべての人々に対し健康影響を与えるレベルではないと推測できるが、より高い安全性を考慮すれば乳幼児に対してはさらに検討を行い、現行以上の何らかの措置が必要になるかもしれない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Y. Sugita-Konsihi, et al., Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Fumonisin in Retailed Foods in Japan, J. Food Prot., in press (2006)

2) Y. Sugita-Konsihi, et al., Talanta, The Comparison of two clean-up

procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans, in press (2006)

2. 口頭発表

Y. Sugita-Konishi, S. Kumagai "Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Fumonisin in Retailed Foods in Japan," 40<sup>th</sup> Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, Matsushima, Japan, Nov. (2005)

2. 口頭発表

1) Y. Sugita-Konishi, S. Kumagai "Occurrence

of Aflatoxins, Ochratoxin A and Fumonisin in Retailed Foods in Japan," 40<sup>th</sup> Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, Matsushima, Japan, Nov. (2005)

2) A. Kubosaki, Y. Sugita-Konishi "Production of reactive oxygen species following Aflatoxin exposure in human hepatoma cell line" 40<sup>th</sup> Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, Matsushima, Japan, Nov.

3) 小西良子「実験動物を用いたの毒性評価」マイコトキシン研究会学術講演会、2006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

オクラトキシン A の毒性評価

小西 良子

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安心・安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

オクラトキシン A 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

研究要旨：オクラトキシン A (OTA) はアスペルギルス属およびペニシリウム属の数種のカビによって産生される腎毒性を有するカビ毒である。主に穀類やコーヒー豆、豆類、乾燥果実や加工品であるコーヒー、ワイン、ビール、グレープジュースに汚染している。家畜の飼料からも移行し、腎臓、肝臓及び血液なども汚染する。食品や人の血液試料におけるオクラトキシン A 汚染の研究から食品に頻度高く汚染していることが示されている。近年その発がん性がげっ歯類で観察され、国際癌研究機関での分類が見直され、グループ 2B に位置づけられた。CODEX 委員会は基準値設定を早急に行いたい方針だが、発ガンメカニズムが不明のため現在のところまだ決定されていない。本報告書では、2001 年に開かれた JECFA における評価および 2005 年までの文献を基に最近の毒性に関する知見をまとめた。

A. 研究目的

オクラトキシン A (OTA) は、温帯の寒冷地においてはペニシリウム属によって産生され、熱帯においてはアスペルギルス属によって産生される、いわば世界中の広い範囲で汚染が見られるカビ毒である。そのため、ヨーロッパ諸国、カナダ等では基準値が設定されている。また、JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会) や EU (ヨーロッパ連合) などでもリスクアセスメントが行われており、我が国でもその毒性評価および汚染実態の把握が急がれている。そこで、本報告では、2001 年 JECFA Monograph “Evaluation of Certain Mycotoxins in Food” およびそれ以降に発表された研究報告をまとめ、OTA の毒性に関して最新の知見を収集した。

B. 研究方法

(1) OTA の毒性評価-2001 年までの報告

2001 年までのオクラトキシン A の毒性に関しては 2001 年 JECFA Monograph に記載してあるので、本報告ではその要約を行った (別紙 1)。

(2) オクラトキシン A の毒性評価-2005 年までの報告

2002 年から 2004 年までに発表された OTA の毒性に関する報告は、すでに内閣府食品安全委員会

の平成 16 年度食品安全確保総合調査「食品等に係るカビ毒・自然毒のリスク評価に関する情報調査」において調査されていることから、その結果を引用した (別紙 2)。

さらに 2004-2005 年の 1 年間に発表された毒性および実態調査の報告を収集し、その要旨をまとめた (別紙 3)。

C. 研究結果

(1) オクラトキシン A の毒性

(1)-1. 急性毒性<sup>1</sup>

LD50 は、経口投与ではマウス 46-58mg/kg (体重当り) ラット 20-30 mg/kg、ラット新生児 3.9 mg/kg、犬 0.2 mg/kg、豚 1 mg/kg、鶏 3.3 mg/kg であり、腹腔投与ではマウス 22-40 mg/kg、ラット 13 mg/kg、静脈投与ではマウス 26-34 mg/kg、ラット 13 mg/kg であった。経口投与ではげっ歯類より犬、豚の方が感受性は高い。

(1)-2. 腎毒性<sup>1</sup>

OTA のおもな標的臓器は腎臓である。いままで実験に供されたほ乳類すべてにおいて腎毒性を示しており、組織学的には近位尿細管の萎縮と尿細管皮質間質の繊維性変性、糸球体のヒアリン化が観察される。機能的には尿の濃縮機能の低下、尿中酵素、タンパク、糖などが増加する。豚ではそ

の感受性ももっとも高く、0.2mg/kg(0.008 $\mu$ g/kg bw/day)の投与で腎機能低下をもたらした。この値は現在の暫定週耐容摂取量の根拠ともなっている。

#### (1)-3. 遺伝毒性および発ガン毒性<sup>1,2</sup>

OTAは通常の変異原性試験、すなわちエイムス試験などにおいては陰性であったが、マウス腹腔内投与による腎、肝、脾臓細胞における1本鎖DNA損傷試験や小核試験、不定期DNA合成試験、姉妹染色分体交換試験などの変法やbacteriaやNIH/3T3細胞でのgene mutations(エイムス変法)で陽性を示すことが報告され、OTAが遺伝毒性を示すことが明らかとなった。

OTAの発ガン性についてはマウスおよびラットにおいてすでに検証されている。ラットでは雌雄に、マウスでは雄のみに腎臓ガンが引き起こされる。ラットの腎では非常に低容量でガン発症が観察されており(70 $\mu$ g/kg bw)、腎発ガン性における最小作用量はマウスの1/63である。さらにマウスでは雌雄ともに肝臓ガンが引き起こされる。これらの結果を受けて1993年IARCはOTAの発ガン性を再評価し、グループ2B(ヒトに対して発ガン危険性の可能性がある)に分類した<sup>2</sup>。

しかし、OTAの発ガンメカニズムについての確証的な証拠はまだ明らかになっていない。一般的に遺伝毒性による発ガン物質の初期作用は、DNAと化学的にまたはその代謝物が共有結合すると考えられている。そのため、多くの研究者がOTAまたはOTAの代謝産物とDNA付加体の検出を試みている。32P-ポストラベリング法を用いた方法では、最長2年間OTAを投与した結果、腎、肝、脾臓においてOTA依存のDNA付加体が発見されているが、この方法は非特異的な方法であるため、DNA付加体にOTAあるいはその代謝物が含まれているかどうかは証明されていない。放射能標識したOTAを用いたラットの実験においても肝DNAおよび腎DNAからは放射能活性は検出されなかった。また、活性酸素のスキャベンジャーで前処理した場合にOTA付加体の生成抑制が観察されることから、直接OTAがDNAと付加体を形成するというよりもOTAが活性酸素種を発生させるような細胞毒性を誘発することにより付加体が形成されると考えられている。

OTAの発ガン性および遺伝毒性が発現するメカニズムは未だ不明な点が多く、更なる研究が急務とされるが、今のところ、OTAの生体内変換には

ペルオキシダーゼ経路が関与していること、グルタチオンSトランスフェラーゼ活性(GST)およびチトクロームP450(おもにCYP2C11)のエポキシゲナーゼが関与していることが示唆されている。すなわち、OTAの酸化還元サイクルによるOTAからキノンOTAへの変換が活性酸素生成や脂質過酸化を引き起こす経路と、OTAから直接チトクロームP450やGSTによってハイドロキノンOTAおよびその酸化物であるキノンOTAが形成される経路の両者からDNA切断やエキソサイクリックDNA付加体形成が起こるのではないかと仮説が考えられている<sup>3</sup>。

#### (1)-4. その他の毒性<sup>1</sup>

OTAの主たる毒性は腎毒性であるが、その他に免疫毒性、催奇形性毒性、神経毒性、タンパク合成阻害、酵素活性阻害等が報告されている。しかし、これらの毒性を発現するために要する用量は、腎毒性発現量の数倍から数十倍であるため、OTAの週耐容摂取量は腎毒性発現用量から算出されている。

#### (1)-5. ヒトへの影響<sup>1</sup>

バルカン諸国(ユーゴスラビア、ブルガリア、ルーマニア)の特定な地域では風土病的に腎疾患が多発し、この地方独特の疾患とみとめられ、バルカン腎症と呼ばれ、重篤な場合は死に至る。この疾患はデンマークで報告されたOTAが原因とされる豚の腎炎と酷似しており、この地方の人の食物や血清中のOTA濃度とバルカン腎症の高発生率の間には相関があることからOTA原因説が根強い。また、この腎症がよく起こる地域では尿道ガンも高い発症率で起こっていることからOTAとヒトの発ガンとの関係も示唆されているが、まだ疑いの余地はある。バルカン地方と同様に血液中に高濃度のOTAが検出される人々でも腎疾患を有さない人も多く存在するため、遺伝的な背景や他の原因であることも否定できない。

#### (1)-6. 体内動態および代謝<sup>1</sup>

OTAは腸管からはゆっくりと吸収され、血液を経由して主に腎臓に分布されるが、肝臓、筋肉、脂肪などにも低レベル分布する。乳への移行はラット、ウサギ及びヒトにおいて観察されるが反芻動物では第1胃内で細菌によって代謝されてしまうため、大量に与えたときしか移行しない。吸収後のOTAは門脈から肝臓に運ばれるがそのうち一部は胆汁と主に腸管に排出され、再び腸肝循環で肝臓に戻る。この経路によってOTAの血

中濃度は減少し、人への影響を抑えることができるが、急性腸炎の発症を高めることもある。肝臓から胆管への OTA の分泌は有機陰イオンポリペプチド輸送体によって行われている。血液中の OTA は血清タンパクと強く結合して循環する。このタンパク接合体は糸球体では濾過できず、尿細管から排泄される。ここで排泄されなかった一部の OTA はふたたびネフロンによって吸収され、腎組織中に蓄積される。タンパクに結合した OTA の安定性は高いため、OTA の血液中の半減期は他のカビ毒とくらべると非常に長い。種間で大きな差があるが、マウスでは、24~39 時間であるのにラットでは 55~110 時間、豚では 72~120 時間、マッカッカーサルでは 510 時間、ヒト（ボランティア）では 840 時間に及ぶ。この性質は OTA 摂取を評価するためのバイオマーカーとしても利用されており、食品中の汚染実態とともにヒトの血清中および乳中の OTA 量も暴露評価のための重要な情報となる。

## (2) 汚染実情に関する報告

### (2)-1. 食品汚染実態<sup>3,4</sup>

OTA の汚染実態報告は、1990 年 European Commission: EC (欧州委員会) が確立した SCOOP Task (Scientific co-operation task) 3.2.2 “Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States” により報告されている調査が、最も大規模なものである。1999 年に調査した結果を 2002 年に報告している。それによると、穀類ではライ麦 (53.2%) が最も汚染率が高く、ワイン、コーヒーおよびレーズン等の乾燥果実の汚染率も高く注目されている。ヨーロッパ以外の国では、韓国、ブラジル、日本の汚染実態が報告されているが、韓国での穀類の検出率は 12.5% と比較的 low だった。ブラジルではグレープジュースで 70.8-87.5% の高い検出率であった。本研究事業で行われている汚染我が国の汚染実態調査の結果では、ライ麦から 70%、レーズンから 63%、ビール、ワイン、そば粉から 60%、焙煎コーヒーから 33%、生コーヒーから 18%、小麦粉から 48%、オートミールから 10% が検出されているが、汚染濃度はレーズンを除いて比較的 low だった<sup>5</sup>。

### (2)-2. ヒトでの汚染実態<sup>3,4</sup>

生体内での半減期が長いことから血中の OTA 濃度は OTA の暴露を示すバイオマーカーとして利用されている。ドイツ、イタリア、ノルウエー、ス

ペイン、スウェーデン、イギリスの 6 カ国から提供された血清中の OTA の汚染データが 2002 年に SCOOP Task により報告されたが、これらの国においては 84.6-100% の汚染頻度であった。平均汚染濃度はスペインが一番高く 1.19  $\mu\text{g/L}$  であった。我が国の OTA 汚染レベルも 1992-1996 年に東京で調査されており、汚染濃度は低いが、184 人中 156 人に OTA 汚染が認められた。

## D. 考察

OTA はアスペルギルス属およびペニシリウム属の数種のカビによって産生されるカビ毒で、世界中の穀類やコーヒー豆、豆類、乾燥果実などに汚染している。また、熱に安定であることから加工品であるコーヒー、ワイン、ビール、グレープジュースにも高頻度で残存する。家畜の飼料からも移行し、腎臓、肝臓及び血液なども汚染しているため、畜産加工品に対する汚染実態の把握も必要となる。OTA は生体内では血清アルブミンと結合体を作り比較的長期間残存することから、ヒトの血液中の OTA 濃度を測定することによりその暴露状況が推察できる。食品やヒトの血液試料における OTA 汚染の研究から、OTA の暴露が世界中で頻度高く起こっていることが示された。

OTA はげっ歯類に発がん性があり、催奇形性、免疫毒性および神経毒性を有する腎毒性カビ毒である。さらにバルカン腎症と尿管ガンの発症に関与する因子であると言われている。また、フランスおよび北アメリカのデータから慢性間質性腎炎と OTA の高濃度暴露との相関が指摘されている。

OTA の毒性評価および規制に対しての取り組みはヨーロッパ諸国および国際機関で行われている。北欧の食品科学委員会 (Scientific Committee for Food, SCF) の 1994 年に発表されたオピニオンでは、OTA は腎毒性であり発ガン性がある因子の可能性が有ることおよび遺伝毒性を有していることが明言されている。遺伝毒性影響はタンパク合成機能低下などの間接的なメカニズムにより説明できるとしている。彼らは 1998 年に OTA の発がん性とモデルベースの係数から一日耐容摂取量として 5 ng bw/day を設定している。

JECFA は 1991 年に開かれた 37 回会議および 1995 年に開かれた 44 回会議において OTA の評価を行い、発がん性についても議論したが、豚における腎毒性を基礎として評価を行った。その結果 1991 年に、豚における NOAEL である 8  $\mu\text{g/kg}$



bw/dayに安全係数500を乗じて、週耐容摂取量112 ng/kg bw と設定したものであるが、1995年にJECFAは再評価して100 ng/kg bwと丸めた。

カナダ政府機関は暫定一日耐容摂取量を1.2-5.7 ng bw/dayとしている。

2001年に開かれたJECFAではCODEX委員会の要請を受けOTAの基準値を5 µg/kgまたは20 µg/kgとした場合の健康被害へ与える影響を評価したが、ヨーロッパアンタイプの食生活をしている場合95%タイルまでの人々にはその基準値の差は有意なものではないと結論付けた。それを受けて2003年に開かれたCODEX委員会総会では小麦、大麦およびライ麦およびその加工品に対してのOTAの最大基準値設定を討議したが、発ガン性のメカニズムに関する知見が乏しいと判断し、未だ結論に至っていない。今後の予定によると2006年までに各地域からデータ収集を行い、2007年にJECFAで暴露評価と毒性の再評価をすることになっている。2004年のCCFAC部会においてはOTAの最大基準値設定は小麦、大麦、ライ麦に限定することが合意されている。既に汚染実態調査および暴露評価を行っているEUでは、ソバやコメを含む穀類では5 µg/kg、穀類由来食品では3 µg/kg、乾燥ブドウでは10 µg/kg、ワインおよびグレープジュースでは2 µg/kgに基準値を設定した。ベビーフードおよび幼児・子供用の穀物由来加工品と医療目的の幼児用食品についても0.5 µg/kgとしている。

OTAの腎毒性および発ガン性は最も重要な毒性と考えられているが、そのメカニズムは未だ解明に至っていない。今後は遺伝毒性及び発ガン性の分子メカニズムの解明することさらにヒトの遺伝子多型との関連を解明することが急務となっている。

#### 参考文献

1) JECFA (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins and food. WHO Food Additives Series 47.

2) IARC: Some naturally occurring substances:

Some food items and constituents, 56. Lyon, IARC (1993)

3) 中島正博、「オクラトキシン A-その発ガン性と汚染実態」Mycotoxins, 55, 139-148(2005)

4) European Commission: Reports on tasks for scientific cooperation. Task 3.2.7, Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member states, Jan. 2002, Directorate General Health and Consumer Protection. Office for Official Publication of the European Communities, Luxembourg (2002)

5) Y. Sugita-Konsihi, et al., J. Food Prot., in press (2006)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Y. Sugita-Konsihi, et al., Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Fumonisin in Retailed Foods in Japan, J. Food Prot., in press (2006)

2) Y. Sugita-Konsihi, et al., The Comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans, Talanta, in press (2006)

##### 2. 口頭発表

1) Y. Sugita-Konishi, S. Kumagai "Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Fumonisin in Retailed Foods in Japan," 40<sup>th</sup> Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, Matsushima, Japan, Nov. (2005)

2) 小西良子「実験動物を用いたの毒性評価」マイコトキシン研究会学術講演会、2006年1月

#### H. 知的財産権の出願登録状況 なし

別紙 1

Evaluation of Certain Mycotoxins in Food JECFA 2002

(要約)

オクラトキシン A は 大きく分けて① *Penicillium verrucosum*, ② *Aspergillus chraceus* と③ *Aspergillus carbonarius* の 3 種の菌によって産生される。これらの 3 つのグループはその生態系や食料への影響や地理的な生息分布が異なる。*P. verrucosum* は 30℃以下で水分活性が 0.80 以上の場所に生息する。この種は低温域に限生しており、ヨーロッパやカナダの穀類を汚染するオクラトキシン A の原因菌となっている。穀類は家畜飼料として広く使われており、生体内においても比較的安定なカビ毒であるので、豚の腎臓や肝臓からも検出されている。この菌は熱帯地方や亜熱帯地方では汚染例がないので、これらの地域におけるオクラトキシン A の汚染はこの菌が原因ではない。*A. chraceus* は温暖な気候で増殖する菌で、水分活性が 0.80 以上の場所に生息する。この菌は広い範囲で貯蔵中の食料、穀物から検出される。しかし、この菌の本当の汚染種は穀類ではなく、おそらく乾燥中にコーヒー豆に感染してグリーンコーヒー豆のオクラトキシン A の汚染源となる。*A. carbonarius* は熱帯地方に生息し、完熟した果物、特に葡萄に感染する。この菌は黒い胞子を有することから太陽光に対して抵抗性があり、乾燥しても生き残っている。乾燥果実に汚染しているオクラトキシン A の原因はこの菌であることが多い。また、コーヒー豆のオクラトキシン A 汚染原因ともなっている。

オクラトキシン A は、最初 3 7 回委員会で評価され、豚で観察される腎機能の悪化に関するデータを基に週間耐容摂取量 (PTWI) が体重当たり 112 ng/kg と設定された。このときの LOEL は 0.008 mg/kg bw/day であったため、安全係数 500 を乗じて算出された。このとき、委員会は豚やヒトの腎疾病におけるオクラトキシン A の役割 (他のマイコトキシンも含むが) の解明や発ガンのメカニズムおよびオクラトキシン A 誘発腎疾患の阻害剤であるフェニールアラニンの役割などへの研究を行うべきであると提言した。さらに、4 4 回委員会において見直しが行われ、前回の評価以降に出された毒性試験結果や疫学的で一た、遺伝毒性および腎毒性などを総合的に判断した結果、週間耐容摂取量 (PTWI) を 100 ng/kg に丸めることとし、繰り返し毒性に関する研究を進めるように提案した。

この評価は 3 1 回コーデックス委員会食品添加物部会委員会の要請を受けて指揮されたものである。3 1 回コーデックス委員会食品添加物部会委員会は、穀類およびその加工品におけるオクラトキシン A の基準値を 5  $\mu$ g/kg と設定するか 20  $\mu$ g/kg と設定するかの結論のためのリスク評価を行うための委員会である。

この委員会は前回の評価の後に発表された新しい研究成果、すなわち吸収、分布 (実験動物の乳も含む)、代謝および排出に関する研究結果を、生化学的、遺伝毒性的、免疫毒性的、発生学的および腎毒性的な研究と同様に考慮に入れ、

評価した。疫学データや汚染実態、汚染食品の摂取量などは各国、各地方の摂取量を予測するのに用いられた。

### 吸収、分布、代謝および排出

オクラトキシン A は腸管からはゆっくりと吸収される。そして血液、主に腎臓に分布されるが、肝臓、筋肉、脂肪などにも低レベルが分布する。乳への移行はラット、ウサギ及びヒトにおいて観察されるが反芻動物ではルーメン内で代謝されてしまうため、非常に少量しか移行しない。全種における代謝産物としてはオクラトキシン  $\alpha$  が知られているが、これは他の代謝物と同様にオクラトキシン A より低毒性である。排泄はおもに尿と糞である。種によって異なっているが、これらのルート以外に腸肝循環によるオクラトキシン A の血液高分子物質への結合が比較的影響している。これらの因子はオクラトキシン A の血液中の半減期の決定に重要であり、種間で大きな差がある、すなわちマウスでは、24 時間から 39 時間であるのにラットでは 55-120 時間、豚では 72-120 時間、マッカッカーサルでは 510 時間、ヒト（ボランティア）では 840 時間に及ぶ。

### 毒性試験

オクラトキシン A は全哺乳類において腎毒性を示す。主な標的細胞は、近位尿細管であり、この部位には細胞障害性と発ガン性を示す。感受性は性差や種差によって違いがあることが明らかにされているが、豚が最も感受性が高く、続いてラット、マウスといわれている。発ガンを誘起する用量は腎毒性のそれよりも高い。委員会は、1989 年に米国で国家プロジェクトとして行われた発ガン性試験の結果を再検討し、雌雄ラットに見られた悪性の巨大核細胞の存在と腎腫瘍が侵入的であることに注目した。しかしながら生化学的な根拠とこれらの見解の有意性に関してはまだ明らかになっていない。

幾つかの遺伝毒性研究ではバクテリアや哺乳類の細胞において遺伝的変異が誘起されることが報告されているが多くはない。オクラトキシン A は哺乳類の細胞において *in vitro* で DNA の損傷、DNA の修復をあたえるがおよびクロモゾームの短縮化を起すが、マウスにおいて *in vivo* で DNA の損傷およびクロモゾームの短縮化をおこす。一般的に、DNA adduct は放射性元素を用いた実験手法によれば、オクラトキシン A を投与されたマウスやラットの腎に検出されるが、オクラトキシン A を含む adduct は示されていない。これらのことからオクラトキシン A が直接 DNA adduct の形成に関与しているのか、フリーラジカルを産生することによって作られるのははっきりしていない。いまのところ *in vivo* で