

200734038 A

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

カビ毒を含む食品の安全性に関する研究

平成19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20(2008)年3月

目次

I. 総括研究報告書

カビ毒を含む食品の安全性に関する研究 ----- 3

小西 良子

II. 分担研究報告書

食品のカビ毒汚染実態に関する研究 -----19

小西 良子

分析法のバリデーション等に関する研究 (I) -----55

田中 敏嗣

分析法のバリデーション等に関する研究 (II) -----61

田中 敏嗣

分析法のバリデーション等に関する研究 (III) -----65

田中 敏嗣

カビ毒の消長に関する研究 -----71

杉山 圭一

日本人の小麦摂取によるニバレノール暴露量の推定 -----83

佐藤 敏彦

新生児へのフモニシン暴露の薬物代謝機能に及ぼす影響 -----95

熊谷 進

実験動物を用いたニバレノール誘発 IgA 腎症モデルの作出 -----105

熊谷 進

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----119

I. 総括研究報告書

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)

カビ毒を含む食品の安全性に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長

要旨

本年度の研究事業は、1) わが国に流通している食品中のフモニシン B1、B2、B3 (FB1, FB2, FB3)、オクラトキシン A (OTA) および国産小麦粉のデオキシニバレノール (DON) とニバレノール (NIV) の汚染実態調査、2) 実態調査および規格基準に対応した分析法、すなわち DON、NIV 同時分析法、ELISA 法による迅速分析法および品質管理に適用できる簡便、迅速分析法の妥当性評価の検討 3) 市販食品を用いてのカビ毒の加工工程における減衰レベルの推定およびカビ毒と食品成分の複合体の毒性評価を可能とするバイオアッセイ系の構築 4) 日本人の小麦摂取による NIV 曝露量の推定、5) 新生時期に投与された FB1 の成熟後における薬物代謝活性への影響および HIGA マウスの IgA 腎症病態進行に対する NIV の影響 の5つの項目について行い、基準値策定のための基礎的データを収集した。

汚染実態調査では、FB1, FB2, FB3 は市販食品 16 食品目 223 試料、OTA は市販食品 20 食品目 398 試料、DON および NIV は国産小麦粉 79 試料を測定した。FB1、B2、B3 は、市販の、コーンスナック、コーングリッツ、ポップコーンおよび コーンフレークから、OTA は、パスタ、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、ライ麦粉、小麦粉、オートミール、ココア、チョコレートとインスタントコーヒーから高い頻度で汚染が認められた。これらは、上記のカビ毒汚染における寄与度の高い食品であると考えられた。国産小麦粉は、全試料の 80%以上 DON および NIV が検出限界 (2 ng/g) 以上検出された。さらに DON と NIV には 0.97 以上の相関が認められた。

今年度の実態調査に用いるための高感度分析法のバリデーションするため複数機関による妥当性試験を行った。さらに、ELISA 法による迅速分析法および品質管理に適用できる簡便、迅速分析法の開発を目的に基礎的検討した。その結果精度管理された方法として LC 及び LC/MS で測定する方法が推奨された。また、DON、NIV の高感度認識モノクローナル抗体が得られ、ELISA 法による迅速同時分析の確立が示唆され、抗原抗体反応を用いた Surface plasmon resonance による DON、NIV 分析法の確立の可能性が確認できた。

市販食品を用いてのカビ毒の加工工程における減衰レベルの推定に関しては、本年度は小麦中の ON と NIV について、国産小麦粉を原料で製造された食パンとその原料である小麦粉を製造元より購入し、パンの製造工程を経た DON および NIV 各々の残存率を算出し、その消長レベルを検討した。その結果、食パン可食部グラムあたり DON は約 $67.3 \pm 19.4\%$ 、NIV は約 $51.2 \pm 10.6\%$ が製造過程に減衰すると推定された。また加工工程中に生ずると予想されるカビ毒と食品成分の複合体の毒性評価を可能とするバイオアッセイ系の構築を試み、マウスマクロファージ様細胞を用いたエンドトキシン誘導性 IFN- β レポーター活性による測定法が応用可能であることが示唆された。

次に、国産小麦のみの実態調査結果を基に、わが国で消費される小麦粉が全て国産小麦粉であると仮定した場合、小麦摂取による NIV 曝露量の推定を、モンテカルロ法によるコンピュータシミュレーションを用いて行った。その結果、DON による規制 (1.1 ppm) の下で、NIV の規制値を 4 つのシナリオ (規制なし、1.0, 0.5, 0.2 ppm) でシミュレーションした場合、1 歳～6 歳までの群で体重 1 kg あたりの

一日曝露量がもっとも高くなり、99パーセンタイル値は、順に、0.84, 0.84, 0.82, 0.60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日となった。7歳以上の群では、規制の有無にかかわらず99パーセンタイル値は、いずれも0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日以下であった。今回のシミュレーションからは、1歳～6歳の群において0.5ppm以上の規制値では99パーセンタイル値がEUの食品科学委員会(SCF)で、暫定的な一日耐容摂取量(t-TDI)として定めた0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日を超える結果となった。しかし現時点では、国産小麦粉の流通量は消費量の約1割に留まっている。

毒性評価に関しては、乳幼児や特定疾患患者などのハイリスクグループへの毒性を動物モデルの構築も含めて検討した。その結果新生時期のFB1投与により、新生児のFB1暴露の薬物代謝機能におよぼす影響が成熟後まで残ることが示された。実験的IgA腎症モデルの作出をNIVを用いて検討した結果、NIVはHIGAマウスにおける血清IgA値を有意に上昇させることが確認され、NIVによるIgA腎症の治療・予防研究におけるこれらの動物モデルの有用性が示唆された。これらの知見は、ハイリスクグループを対象にした基準値策定が必要であるかどうかの判断の情報として重要な知見となる。

分担研究者：

小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所
熊谷 進 東京大学大学院
田中 敏嗣 神戸市環境保健研究所
杉山 圭一 国立医薬品食品衛生研究所
佐藤 敏彦 北里大学医学部

協力研究者

渋谷 淳 (東京農工大学大学院共生科学技術
研究部)
望月直樹 (アサヒビール株式会社)、
細井理恵子、宮下隆 (キューピー株式会社)、
門田智之、伊藤勇二 (キリンホールディングス
株式会社)
滝埜昌彦 (アジレントテクノロジー株式会
社)、
田中宏輝 (サントリー株式会社)、
河本章文、柳田詠美、壽容子、高橋正紀((社)
全日本検数協会)、
杉浦義紹 (神戸市環境保健研究所)
斎藤 史朗 (東京大学)

A. 研究目的

2001年に開催されたWHO/FAO 食品添加物・

汚染物合同専門家会議(JECFA)により、アフラトキシンM、オクラトキシンA(OTA)、フモニシン(FB)、デオキシニバレノール(DON)、T-2HT-2トキシン等のリスク評価が行なわれ、アフラトキシンM1を除いて一日耐容摂取量が設定された。

近年国際的にカビ毒に対する取り組みが行われていることを受けて、わが国においても基準値策定を視野に入れた科学的根拠の蓄積が必要となってきた。われわれは、平成16年度から18年度までの厚生労働科学研究事業において、トータルアフラトキシン、OTA、FBを対象に3年間通年実態調査を行った。その結果、トータルアフラトキシンの汚染実態は、非常に低いものであり、曝露量もすぐに健康被害を憂慮する値ではないことを明らかにしたが、これはアフラトキシンB1の規制が既に食品衛生法により行われていることに起因するものと考えられる。一方、OTAおよびFBについては、汚染濃度は低いものの、多くの食品から検出され、3年間で得られたデータだけでは、寄与度の高い食品が限定できず、正確な曝露評価ができないと判断された。そのため、さらに食品目数および試料数を増やし、通年で実態調査を続けることとなった。

平成16年度から18年度までの厚生労働科学

研究事業で行ったOTAの汚染実態調査からパスタ、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、ライ麦粉、小麦粉、オートミール、ココア、チョコレート、インスタントコーヒーが、FB汚染実態調査の結果から、コーンスナック、コーングリッツ、ポップコーン、コーンフレーク、大豆、ビールがそれぞれのカビ毒で頻度高く検出されたので、今年度はこれら食品についてさらに試料数を増やし各カビ毒の分析を行なった。FBに関しては最近報告のあったアスパラガス汚染も念頭に入れて調査を行った。

また、わが国において汚染報告の多いNIVに関して、暴露評価を行うことを目的に今年度に限り、国産小麦粉を対象にNIVとDONの汚染実態調査を行った。

本研究で行う実態調査に用いる分析法はそのデーターの信頼性を左右するものであるため、その妥当性を確保することが極めて重要である。そこで、DON、NIV同時分析法、特に高感度分析法であるLC/MS/MSを用いた分析法の確立とそのバリデーションが必要となる。さらに、生産、製造等の各段階におけるモニタリングや品質管理に適応し、高性能な機器を必要としないELISAなどの簡易迅速分析法の開発も求められる。

本研究ではそれぞれの汚染調査の目的に適応したDON、NIV同時測定法を確立するために次の3項目

1. LC及びLC/MSによる小麦中のDON、NIV同時分析法の検討、
2. DON及びNIVを認識するモノクローナル抗体の開発とその応用、
3. Surface plasmon resonance (SPR)を用いたDON、NIV分析法の検討

を行った。とくに1の項目については、妥当性を検討するために複数機関での共同試験を行った。

分析法の妥当性評価と共に、直接摂取する加工品でどの程度カビ毒が消長するかについての正確なデータの把握は、カビ毒の暴露評価を行う場合、重要な知見の一つである。今年度は、地産地消の観点からわが国で収穫された小麦を原料としたパンの製造が増加しつつある状況を踏まえ、小麦を汚染するDONとNIVについて、わが国において生産されるパンの原料となる小麦粉中（国産小麦由来を含む）のDONおよびNIVと、その最終生産食品となる食パン中の含有量を調査した。得られたデータから、わが国における原料の小麦粉中に含まれるDONおよびNIVの食パン加工による消長レベルの算出を行った。また、近年新たな毒性として問題となっている食品の調理・加工処理工程に生成されるカビ毒—食品成分複合体の毒性を、測定・評価できるバイオアッセイ法の確立が喫緊であることから、DON/NIVで問題とされる免疫毒性をin vitro法で高感度に検出できる系を構築した。

次に、今年度得られたDON/NIVの実態調査のデータを基にして、NIVの暴露評価をモンテカルロ法で推定した。NIVの汚染は主に国産小麦粉に限局している現状から、今回のシュミレーションは、摂取する小麦加工品はすべて国産小麦粉を原料として製造したと仮定して行った。NIVについては2000年にEUの食品科学委員会(SCF)が定めた暫定的な耐容一日摂取量(t-TDI) 0.7 µg/kg体重/日をもとに評価した。さらにいくつかのNIVの基準値を設定した場合のシナリオについてシミュレーションを行った。DONについては、我が国で平成14年5月に施行された小麦のDONの暫定基準値(1.1ppm)が機能していることを前提に行った。

毒性評価は、胎児や新生児、特定疾患を持ついわゆるハイリスクグループに対するFBおよびNIVの毒性影響について検討を行った。とくに最近、妊娠マウスに投与したFBが胎児に神

経管欠損障害を引き起こすことが実験的に示され (Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol., 2005, 73, 487-97)、さらに、テキサス・メキシコ境界地域で多発した人の神経管欠損障害とFB摂取量との関係から、FB摂取が人の神経管欠損障害のリスクを高めることが提唱されている (Environ. Health Perspect., 2006, 114, 237-41)。しかし、胎児期や新生時期にFBに暴露された場合の、それによって引き起こされる成熟後の異常の有無についての知見はこれまでに見られない。今年度は、新生時期に投与されたFB1の成熟後における薬物代謝活性への影響を、とくにアフラトキシン (以下AF) 代謝関連酵素に着目し究明することを目的とした。また毒性評価の一部として、NIVの毒性リスクであるIgA腎症を対象として、その予防・治療を目的とした毒性評価手法を確立するため、NIV投与により実験的IgA腎症モデルを作出するとともに、IgA腎症の自然発症モデルであるHIGAマウスにNIVを投与し、その病態進行に対するNIVの影響を検討した。

B. 研究方法

1) わが国に流通している食品中のFB1, FB2, FB3, OTAおよび国産小麦粉のDONとNIVの汚染実態調査

OTAおよびFB汚染実態調査の試料とした食品は全国各地のスーパーマーケット等で購入したものであり、国産小麦粉およびその小麦粉で製造したパンは、北海道を除いた全国から、地方での地域販売品をインターネット等で購入した。

OTAの分析、FBの分析は、回収率が一定水準以上あることを確認の上、それぞれ昨年度確立した方法を用いて行った。DON/NIVの分析は本研究事業で妥当性を確認した方法を用いた。汚染推定平均値の算出は、GEMS/FOODに規定されている方法により算出した。

2) 実態調査および規格基準に対応した分析法、すなわちDON、NIV同時分析法、ELISA法による迅速分析法および品質管理に適用できる簡便、迅速分析法の妥当性評価の検討

(1) DON/NIVの分析法の妥当性の検討

自然汚染農産物に深在するカビ毒の特性を考慮し、DONおよびNIVの自然汚染小麦を用いた。試験試料の採取量、抽出時間、精製カラムの種類を変えた6種類の試験法の妥当性を複数機関で検討した。

(2) モノクローナル抗体の作製

NIVにグリシンをスパーサーとして結合させ、キャリアタンパク質と複合体を作らせたものを抗原とし、NIVモノクローナル抗体を作成した。ここで得られた抗体はNIV及びDONを認識するモノクローナル抗体であった。DON、NIV標準溶液またはDON及びNIV添加玄麦水溶液と同量のDON-ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ(DON-HRP)をよく混和した後、あらかじめ本モノクローナル抗体をコーティングしたプレートに移し、反応させる競合的ELISA法を確立した。

(3) SPR測定

SPRによる相互作用測定には本モノクローナル抗体、DON又はNIVとタンパク質(BSA又はIgG)のコンジュゲート体であるNIV-BSA、DON-IgGを用いた。測定機器はGEヘルスケアバイオサイエンス社Biacore T100を使用した。

SPRにおける濃度測定法は阻害法を採用することとした。

3) 市販食品を用いてのカビ毒の加工工程における減衰レベルの推定およびカビ毒と食品成分の複合体の毒性評価を可能とするバイオアッセイ系の構築

(1) 国産小麦粉および国産小麦粉食パンからのDON/NIVの測定

国産も含む小麦粉およびそれを原料として製造された食パンは、全国の9地域からランダ

ムに製造元より購入したものを分析試料としてLC/MS法により含まれるDONおよびNIVの濃度を測定した。加工前小麦粉対加工後小麦粉におけるDONおよびNIVの消長レベルは、食パンに含まれる小麦粉量を補正して算出した

(2) DONのバイオアッセイ系の構築

マウスIFN- β プロモーター領域の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結したIFN- β 依存性レポーター遺伝子を安定的に保持したマウスマクロファージ様細胞RAW264 (IFN- β /RAW26)を用いた。DON (62.5, 125, 250, 500, 1,000 ng/ml) およびエンドトキシンとして *Escherichia coli* O111:B4 Lipopolisaccharide (LPS) を含むDMEMを細胞に加え培養し、インキュベートし、上清を試料としてレポーターアッセイに供した。

また小麦粉抽出液を用いてレポーターアッセイに供し本バイオアッセイ系の応用を試みた。

4) 日本人の小麦摂取によるNIV曝露量の推定

(1) 国産小麦粉中のNIVおよびDON含有量のサンプルデータの作成

実態調査に用いた国産小麦粉の結果から、検出下限が同じであるサンプル59個を用いてサンプルデータを作成した。小麦粉中のDON含有量とNIVの含有量の相関は高いが、4つのグループに分け、その割合に応じて合計1000万件のシミュレーションデータを作成した。検出下限 (LOD, 0.005 ppm) 以下のサンプルの取り扱いについては、0 ppm から0.005 ppm まで一様に分布するものと仮定した (サンプルの平均はLOD/2となる)。

この曝露評価結果から、4つの規制のシナリオを適用し (サンプルとして0.2 ppm (小麦玄麦として0.4 ppm)、0.5 ppm (同じく1 ppm)、1.0 ppm (同じく2 ppm)、規制なし)、10,000,000 サンプルのシミュレーションデータセットを作成した (ソフトウェアとしてCrystal Ball,

構造計画研究所社を使用)。

(2) 小麦の摂取量のサンプルデータ作成

「平成16年度食品摂取頻度・摂取量調査」より、小麦を含んだ108の食品の摂取量データを元にした。1) 粉もの、2) パン類、3) 麺類、4) 中華、5) 菓子類の5つに分け、それぞれ的小麦含有率を考慮し、それぞれにつき摂取量の分布シミュレーションを年齢階級別 (1~6歳、7~14歳、15~19歳、20歳以上) に行なった。各年齢階級とも全食品合計の摂取量は2峰性を示したため、平均値より多い食品グループと少ない食品グループの二つに分け、それぞれ対数正規分布を仮定し作成した。

(3) NIVの曝露量推定

上記の2つの10,000,000 サンプルのデータセットを用いて年齢階級毎1000万人の曝露量分布をシミュレーションにより求めた。この際、DONの現状の規制 (1.1 ppm) の下、前述のNIVの4つの規制シナリオを用いる場合、さらにNIVとDONの合計量として規制値を1.1 ppm、2 ppm、規制なし、の3つのシナリオ、各年齢で合計7通りのシミュレーションを実施した。

5) 新生時期に投与されたFB1の成熟後における薬物代謝活性への影響およびHIGAマウスのIgA腎症病態進行に対するNIVの影響

(1) 胎児期や新生時期にFB1に曝露の影響

2日齢の雌雄フィッシャーラット (F344) にFB1 (10 mg/kg) を皮下投与後、2ヶ月齢時に肝臓と腎臓を摘出した。肝臓からはマイクロゾームとサイトゾールの各分画を得た。

マイクロゾームとS9分画については、トリチウム標識AFB1、子牛胸腺DNA、をインキュベートし、生成されたトリチウム標識AFB1-DNA付加体量を測定することにより付加体生成活性 (AF活性化) 能を調べた。サイトゾール分画については、グルタチオントランスフェラーゼ (GST) によるAFB1付加体生成阻害活性を調べた。さらにサイトゾールについては、他の

化合物への GST 活性を求めた。

(2) NIV 投与による実験的 IgA 腎症モデルの作出

NIV は国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部にて生成されたものを使用した。精製した NIV は、LC/MS によって純度 98%以上であることを確認した。

混餌飼料には、NIV を少量のエタノールに溶解した後、粉末基礎飼料 (MF: オリエンタル酵母工業) に混じて投与した。実験的 IgA 腎症モデルの作出として、Balb/C マウスを対照群として、IgA 腎症の自然発症モデル動物である HIGA マウスを実験群として NIV を 0 ないし 24 ppm の用量で HIGA マウスの IgA 腎症病態進行に対する NIV の影響を解析した。NIV の投与量及び投与期間については、最高用量を 24 ppm とし、用量反応関係をみるために 12 ppm 投与群を設定した。血液について血清中 IgA 及び IgG 濃度を測定した。

糸球体における IgA ならびに IgG 抗体の沈着について、共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscope, TCS NT; Leica) を用いて観察した。病理切片を作成し、糸球体における IgA 及び IgG 分布及び強度について評価した。

C. 研究結果

1) わが国に流通している食品中の FB1, FB2, FB3, OTA および国産小麦粉の DON と NIV の実態調査

OTA は、グレープジュース、米、大麦、雑穀、とうもろこしからは検出されなかったが、パスタ、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、ライ麦粉、小麦粉、オートミールの一部から検出された。90% 以上の高頻度に検出された食品はレーズン、ココア、チョコレートおよびインスタントコーヒーであった。検出された食品の汚染平均値は、

GEMS/FOOD の方法で算出した場合、0.0 から 0.89 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

FB はコーンスナック、コーングリッツ、ポップコーン、コーンフレーク、ビール、コーンスープ、アスパラガス (生鮮)、大豆、雑穀米より検出され、トウモロコシを原料とする加工品における頻度は高かった。

国産小麦粉の NIV および DON の実態調査結果においては、79 検体中 NIV が検出限界以下であったのは 19%、DON では 7.5% にすぎなかった。これらの結果から、国産小麦粉の NIV 及び DON の汚染頻度は非常に高いことが示唆された。しかし汚染調査での最高値は、NIV で 236.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、DON で 633.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、平均値としては NIV 23.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、DON 64.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と低い水準であった。DON と NIV との相関性を見て見ると、相関係数 0.9 以上の相関が認められた。このことは、国産小麦においては NIV と DON の共汚染が多いことを裏付けている。

2) 実態調査および規格基準に対応した分析法、すなわち DON、NIV 同時分析法、ELISA 法による迅速分析法および品質管理に適用できる簡便、迅速分析法の妥当性評価の検討

(1) DON/NIV の分析法の妥当性の検討
複数機関の妥当性試験の結果から、1) 試験法 1-1: 試料 25g を 100ml の抽出液を加え、10 分間放置後 30 分間振とう抽出した試料溶液を多機能カラム Autoprep MF-T1500 で精製し、試験溶液を調製した。2) 試験法 1-2: 試験法 1-1 と同様に操作し、多機能カラムによる精製は MultiSep#227 を用いた。

のいずれも良好な成績であった。

また、本法の定量限界は LC 測定の場合 50ng/g、LC/MS 測定の場合 5ng/g であった。

(2) NIV モノクローナル抗体の性質

DON-HRP を用いた競合的 ELISA 法では、標準品において DON、NIV に対してそれぞれ、0.02 ~ 5.0 mg/kg の濃度範囲で $r^2=0.980$ 以上の直線

性が得られた。DON、NIV それぞれを単独で玄麦に添加した場合、標準スタンダード、マトリックススタンダード、いずれにおいても良好な回収率が得られた。次に DON、NIV 自然汚染小麦試料 (2 検体) を用いて定量を行い、さらに同様の試料を UV 検出器付き HPLC (LC/UV) 及び LC/MS においても定量を行った。その結果、いずれの試料も化学分析の測定結果と相関がみられることが示唆された。

以上の結果から、本研究で検討した NIV モノクローナル抗体は、ELISA 法確立への可能性が示唆された。しかし DON、NIV 共汚染試料、あるいは他のトキシンの同時汚染がある試料の測定には課題が残された。また定量時には、試料マトリクスの影響も考慮しなければならないことが考えられた。

(3) SPR 測定

NIV-BSA を固定化したセンサーチップを用いて、0.01~100ng/ml の濃度範囲で NIV 及び DON の検量線を作成した。NIV、DON 共に 4 パラメーターロジスティック回帰によって近似することで良好な結果が得られた。

3) 市販食品を用いてのカビ毒の加工工程における減衰レベルの推定およびカビ毒と食品成分の複合体の毒性評価を可能とするバイオアッセイ系の構築

(1) 食パン加工工程における DON/NIV の減衰率

原料の小麦粉と食パンに含まれる DON および NIV の含量を各都道府県 (Area) から無作為に抽出したサンプルより測定した結果、小麦粉から食パンの製造工程の可食部グラムあたりにおける DON の減衰率は約 $67.3 \pm 19.4\%$ であった。一方、NIV の減衰率は約 $51.2 \pm 10.6\%$ であった。加工前小麦粉対加工後小麦粉における DON および NIV の消長レベルは各々約 $58.3 \pm 17.2\%$ 、約 $32.4 \pm 11.3\%$ と算出された。なお、わが国の食パン中に含まれる DON と NIV の含量は今回の調査から各々約 9.0 ± 4.7 ng/g、 5.2 ± 0.8 ng/g、

また原料の小麦粉については各々約 35.4 ± 28.5 ng/g、 11.1 ± 1.8 ng/g であった。

(2) 免疫毒性を指標とした DON のバイオアッセイ系

今回 IFN- β レポーターアッセイを指標に同誘導を DON が約 125 ng/ml 以上の濃度より濃度依存的に阻害することを明らかにした。この結果を受け、研究方法に記載した抽出方法で回収・添加した小麦粉抽出成分存在下における DON の LPS 誘導性 IFN- β レポーター活性を測定し、本法に従って加えた小麦粉抽出成分存在下においても、少なくとも 500 ng/ml 以上の濃度の DON は有意に LPS 誘導性 IFN- β レポーター活性を阻害することを見出した。この結果をもとに DON の検量線を作成したところ、500~2000ng/ml の DON 濃度において回帰一次方程式 $y = -0.0121x + 50.833$ ($R^2 = 0.9341$) が得られた。

4) 日本人の小麦摂取によるニバレノール (NIV) 曝露量の推定

モンテカルロシミュレーションを行った結果、年齢区分別では、1歳~6歳までの群で体重 1kg あたりの一日曝露量をもっとも高くなり、年齢が上がるにつれて体重 1kg 当たりの曝露量は低下していった。各規制シナリオを比較した場合、当然のことながら「合計量規制なし」の場合の曝露量をもっとも高く、「NIV 単独規制 0.2ppm」がもっとも低い値となった。「合計量規制 1.1ppm」と「NIV 単独規制 1ppm」はほぼ等しく、「合計量規制 2ppm」は「NIV 単独規制 1ppm」を上回った値となった。「1歳~6歳までの群の 99 パーセンタイル値でみると、「NIV 単独規制 0.2ppm」の他は $0.7 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日以上となった。7歳以上の群では、7~14歳の「合計量規制なし」以外は、99 パーセンタイル値は、いずれも $0.7 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日以下であった。

5) 新生時期に投与された FBI の成熟後における薬物代謝活性への影響および HIGA マウスの

IgA 腎症病態進行に対する NIV の影響

(1) 胎児期や新生時期に FBI に暴露の影響

新生児ラットへの FBI 投与によって、2ヶ月齢時の体重が雌雄共に、対照群に比して有意に低かった。肝臓サイトゾール分画の GST 活性については、FBI 投与により、EA を基質とした活性は雄において有意に低下し、t-PBO に対する活性は雌雄共に有意に上昇することが認められたが、CDNB と CPH に対する活性には FBI 投与の影響が認められなかった。腎臓サイトゾール分画の GST 活性については、雌における CDNB と CPH に対する活性の上昇および雌雄における EA に対する活性の上昇が認められた。肝臓 S9 分画の AFBI-DNA 付加体生成活性は、FBI 投与により低下傾向が見られ、とくに雄においては有意に低下したのに対し、腎臓 S9 分画の AFBI-DNA 付加体生成活性は逆に上昇した。

(2) NIV 投与により実験的 IgA 腎症モデルの作出

Balb/c マウスを用いた実験的 IgA 腎症モデルの作出では、実験期間中の体重が、24 ppm で投与 4~6 週目にかけて、12 ppm では投与 6 週目において減少が認められた。4 週間投与における血清 IgA 濃度は、24 ppm において有意な上昇がみられ、8 週間投与では、NIV 投与による用量依存的な IgA 濃度の上昇が認められた。一方、血清 IgG 濃度については、NIV 投与による影響は認められなかった。糸球体への IgA 及び IgG 沈着に関する解析結果では、対照群ではほとんど蛍光が観察されなかったが、NIV 投与群では糸球体メザンギウム領域において IgA の顆粒状沈着が認められた。IgG については、対照群においても約半数の糸球体においてメザンギウムを中心にびまん性に沈着が認められ、IgA と同様、NIV 投与により沈着強度/分布が増加する傾向が認められた。

HIGA マウスの IgA 腎症病態進行に対する NIV の影響では、実験期間を通じ、HIGA マウスの

NIV 投与群において体重低値が観察され、投与 3, 4, 7 週目では有意な減少が認められた。

血清 IgA, IgG 濃度測定では、NIV 投与の有無にかかわらず、HIGA マウスの血清 IgA・IgG 濃度は、対照群として設定した Balb/c マウスと比較して高値を示した。また、HIGA マウス間では、8 週間投与により、有意な IgA 濃度の上昇が、また 4 週間において IgG 濃度の低下がそれぞれ観察された。腎臓重量は、Balb/c マウスの対照群と比較して HIGA マウスで絶対重量の増加ならびに相対重量の減少が認められた。また HIGA マウス間における比較では、投与群において相対重量の増加が観察された。病理組織学的検索の結果、HIGA マウスの腎臓では、軽度のメザンギウム増生ならびに PAS 染色陽性像に一致した尿細管上皮の空胞変性が認められたが、これらの所見も含め、NIV 投与による明らかな変化は観察されなかった。糸球体への IgA 及び IgG 沈着の解析結果では、IgA については、NIV 投与の有無にかかわらずメザンギウム領域を中心に IgA 沈着が認められられ、ヒト IgA 腎症に認められる半球状構造物 (paramesangial deposit) の蛍光像がしばしば観察された。IgG についても、ほとんどの糸球体において全節性に蛍光が認められたが、これらの沈着において、NIV 投与による明らかな影響は観察されなかった。

D. 考察

JECFA(SCF)により推定された FB, OTA, DON および NIV の暫定一日 (週) 耐容量は、それぞれ 2 μ g/kg bw/day、0.1 μ g/kg bw/week、1 μ g/kg/day、0.7 μ g/kg/day である。

OTA のわが国の汚染平均値は、0.00-0.89 μ g/kg と非常に低い水準であったが、今年度の pasta またはそばの汚染頻度は、ともに 60% 以上であった。汚染濃度は比較的低位が、主食として広い年齢層で食されている食品だけに今

後の実態調査が重要であり、その動向によっては基準値策定も必要かもしれない。

嗜好品としては、ココア、チョコレート、インスタントコーヒーなどに、高頻度の検出がみられた。嗜好品を大量に摂取するグループには注意が必要であろう。

今年度の結果より、小麦粉（パスタを含む）そば、チョコレートなどが、その摂取量が多いものもあり、OTA 汚染の寄与率が高い食品であると考えられる。パスタなどは若い層で今後ますますその需要は増えることが予想される。我が国では基準値が未整備であることを勘案すると、食生活の動向も踏まえながら、OTAによる健康被害を未然に防ぐ施策が必要となってくると思われる。

FB は今年度も今までと同様にとうもろこし加工品に頻度高く検出された。特にコーングリッツ、ポップコーンやコーンスナックに高濃度の汚染が認められた。これらの結果から、スイートコーンと呼ばれる品種には汚染はないものの、とうもろこしはFBの汚染への寄与率が最も高い食品であり、今後もより多くの実態汚染データを集めることが重要であると考えられた。

国産小麦粉のDONとNIVの実態調査の結果から、DONとNIVとの相関性は非常に高かった。今回の調査には北海道を除く地域から購入した国産小麦を用いたが、これらの小麦にはDONとNIVの共汚染が多いことが示された。しかしDONは、最高汚染濃度でも暫定基準値を超えていなかった。現時点では、我が国に流通する小麦は輸入品が9割、国産品が1割の比率であり、輸入品にはNIVの汚染がほとんどないことから、流通している小麦粉中のNIVの汚染濃度は、国産小麦粉で示された値より低くなると思われる。そのため現時点では、NIVにより引き起こされる健康被害を憂慮する状況ではないと考えられるが、今後地産地消などの動きもあり、

国産小麦の需要が高まってくるとすれば、NIVの基準値策定も必要であろう。

実態調査に用いた分析法の妥当性評価を行った結果、LC/MSによるDON/NIVの一斉分析法は、DONおよびNIVともに定量限界5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、検出限界2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、96%以上の回収率が担保され、実態調査として感度高く、正確に分析するための分析法として妥当であるとの結論を得た。

ELISA法の検討では、DONのみを認識する特異抗体を併用して使用することにより、本抗体での定量値からDON抗体を用いたELISAで得られたDON定量値を差し引いて、NIVを定量する方法を構築した。本実験に供した小麦品種では、ELISA測定値と化学分析測定値との間に相関があることが示唆された。

SPR測定の検討では、測定可能範囲は5ng/ml～の範囲で良好な検量線が得られていることから、SPRによるNIV分析法確立の可能性を確認できた。標準品においてはNIVが1～5ng/ml、DONが0.02ng/ml程度の濃度から検出できる可能性が示唆された。DONの暫定基準値である1.1ppm($\mu\text{g}/\text{ml}$)を目安として考えると、両化合物ともに十分な測定感度が得られていると考えられる。今回の検討結果ではNIVとDONの間で約100倍程度の感度差が見られた。抗体と標準品の抗体の特性によるものである可能性が考えられたが、DONが含まれている試料についてNIVを分析する場合は、DONに由来するレスポンスが非常に大きくNIVの測定に影響を与えたと考えられた。測定試料がNIVとDONで同時に汚染されている場合、前処理などの処理を講じる必要が示唆された。

今年度、国産も含む小麦粉とそれを原料に製造された食パンの製造工程におけるDONおよびNIVの消長を、各地域より購入した合計35検体を用いて検討した。その結果、可食部あたりではDONおよびNIVともに、約50～70%の減衰率であると判断できる結果を得た。平成14年度

の厚生労働科学特別研究においてパン製造におけるDONの減衰率の報告があり、それによると減衰率は2.9%となっている。本研究での減衰率は実際の製造工場で食パンが製造された場合の数値であり、前述の報告書では市販のホームベーカリー器を使用した研究室内でのパンの製造工程における減衰率である。従ってこれら数値を単純に比較することはできないが、大量製造用の製パン設備と家庭用の製パン器でのスペックの相違、並びに製パン工程の差異が減衰率の差につながっているとも考えられる。故に、本研究でのサンプル間で減衰率の差異もこれら要因が寄与している可能性が考えられる。

汚染実態としては、特定の地域で比較的高濃度のDONの混入が認めることから、汚染動態のモニタリングの継続が求められるといえよう。

DONとNIVの加工中生成される複合体の毒性評価法に関しては、細胞毒性を指標にするバイオアッセイ法はいくつか報告されている。しかし、トリコセシン系カビ毒の毒性としての易感染性などの免疫毒性を鋭敏にアッセイできる方法が有用であると考えられるので、今年度はマウスマクロファージ様細胞を用いたエンドトキシン誘導性IFN- β レポーター活性によるバイオアッセイ系を構築した。この方法はDONの毒性評価方法として細胞毒性を指標とする評価系よりも鋭敏である可能性が示唆された。今後はDONの食品成分からの抽出方法を多機能カラム等を利用することにより、その後のバイオアッセイ系における各種抽出成分による検出障害の低減化を図りつつ、DONと食品成分との複合体の毒性を正確に反映するアッセイ系構築の為にブラッシュアップが必要であろう。

NIVの暫定的な一日耐容摂取量(t-TDI)については、2000年にEUの食品科学委員会(SCF)で、0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日と設定している。今回は、我が国に流通する小麦粉は全て国産小麦粉

であるという仮定の下、NIV曝露量の推定シミュレーションを行った。その結果、1歳~6歳の群においてはNIV単独規制0.2ppm以外では99パーセンタイル値がこの値を超える結果となった。即ち、1~6歳の日本人の1%は一日耐容摂取量以上のNIVを曝露する可能性を示したが、日本人のほとんどが小麦摂取により健康影響を受けることはないものと推定された。今回のシミュレーションモデルは極端な条件設定ではあるが、乳幼児は成人と比較し影響を受けやすいことを考えれば、乳幼児向けの食品に使用する小麦については成人より厳格な規制が必要かもしれない。

また、コンピュータシミュレーションであるモンテカルロ法では、得られたサンプルから対数正規分布を仮定することにより母集団のデータを作り出すことから作成したサンプルデータの一部には通常では存在しえない高値のデータが存在していたことは否定できない。従って、その適合性には十分配慮した上で結果を考察することが重要である。

毒性評価実験では、新生児ラットへのFB1単回投与による成熟時の肝臓と腎臓の薬物代謝酵素活性に及ぼす影響を調べた。その結果、肝臓ミクロゾームのAFB1-DNA付加体生成活性は雌雄共にFB1投与による低下が認められたが、これは、新生児へのFB投与によって、肝臓薬物代謝酵素CYPのAFB1-epoxide生成に関わる酵素が抑制されることを示唆している。本研究で認められた新生児へのFB曝露による成熟後の関連酵素活性の変化は、胎児または新生児へのFB曝露の影響が成熟後まで残ることを示唆している。実験的IgA腎症モデルの作出では、Balb/cマウスの結果、NIVの投与量・投与期間に関連した血清中IgA濃度の上昇が観察され、さらに糸球体へのIgA沈着に明らかな増強が認められた。今回の実験モデルは、IgA腎症発症のごく早期の段階を反映したものと考えられ、

病態の進行にはさらにNIVを反復投与することが必要であると推察された。HIGAマウスのIgA腎症病態進行に対するNIVの影響を検討した結果、HIGAマウスでは、Balb/cマウスと比較して血清IgA・IgG濃度が高度に保たれており、メザンギウムにおけるIgA・IgG沈着が優位に認められることが確認された。今回、HIGAマウスにNIVを高濃度で8週間投与した結果、HIGAマウスの血清IgA値に有意な上昇が認められたことから、NIVがHIGAマウスの病態進行を促進する可能性が考えられたが、糸球体へのIgA沈着を含む病理組織学的解析では、NIVの影響を示唆する所見は認められず、結論は得られなかった。

E. 結論

今年度の汚染実態調査の結果と過去3年間の結果を合わせて、FB汚染に寄与度の高い食品は、コーンスナック、コーングリッツ、ポップコーン、コーンフレークであり、とくにスイートコーンではない種類のトウモロコシからの加工品が寄与率が高いと考えられた。OTAの汚染に寄与率が高い食品はパスタ、レーズン、ワイン、ビール、生コーヒー豆、焙煎コーヒー、そば粉、ライ麦粉、小麦粉、オートミール、ココア、チョコレート、インスタントコーヒーであると考えられた。今後これらの食品の試料数を増やしてより現状に則した汚染実態を把握していく予定である。今年度のOTA汚染濃度の最高値はココアの3.25 ng/gであり、EUの基準値より低い値であった。市販の国産小麦粉79試料のDONとNIV分析の結果、国産小麦粉は低いレベルながら高い頻度でこれらのカビ毒に汚染されており、両カビ毒には0.97以上の相関があることが認められた。分析法の妥当性については、LC/MSを用いた方法で良好な結果が得られ、実態調査に用いる方法の信頼性が担保された。また、DON/NIVの両方を認識するモノク

ローナル抗体を用いて、ELISA法やSPR法を検討した結果、ELISA法は、DONのみを認識する抗体との併用により、NIVの定量化の可能性が示唆された。同じ抗体を用いてSPR法も検討したが、この系はDONへの結合性が増加され、NIVと同等の結合性を示さないことがわかった。

わが国において国産も含む小麦粉で生産された食パンにおけるDONとNIVの減衰率は可食部グラムあたり各々約67.3±19.4%、51.2±10.6%であることを明らかにした。またトリコテセン系カビ毒の主要な毒性である免疫毒性を指標としたDONのバイオアッセイ系の構築を試み、同方法が、既に報告されている細胞毒性を指標とした検出系より鋭敏にDONの毒性を測定できる可能性を示唆した。

毒性評価では、ハイリスクグループへの健康被害を評価できる系を2つ検討した。FBIは新生児のときに暴露されると影響が成熟した後にも残ることが本研究から明らかになった。NIVはIgA腎症との関係が言われているが、現在まではっきりしたエビデンスは報告されていない。今回NIVの暴露とIgA腎症発現との関係をモデル動物を用いて示した。

以上のことから、今年度の市販食品におけるカビ毒の汚染濃度は、直ちにヒトの健康障害が直ちに引き起こされる濃度ではないと考えられた。しかし、年齢層によって食品の嗜好や摂取量が異なることを考慮に入れると、我が国のカビ毒汚染に寄与度の高い食品を限定し、年齢層による摂取量を把握し、暴露評価を行うことが必要である。また、同時に最終食品におけるカビ毒の残存率を正確に把握すること、常に新しい毒性を見出す研究を行うことが、信頼にたつ科学的根拠の提供のために不可欠であると考える。

F. 研究業績

【論文・総説等】

1. Sugita-Konishi Y, Niimi S, Sugiyama K: An inter-laboratory study to validate quantitative and qualitative immunoassay kits for rapid detection of aflatoxin in corn, *Mycotoxins* **57**, 75-80 (2007)
 2. Takahashi, M., Shibutani, M., Sugita-Konishi, Y., Aihara, M., Inoue, K., Woo, G-H., Fujimoto, H., Hirose, M.: A 90-day subchronic toxicity study of nivalenol, a trichothecene mycotoxin, in F344 rats, *Food Chem Toxicol* **46** p125-135 (2008)
 3. Kubosaki, A., Aihara, M., Park, B. J., Sugiura, Y., Shibutani, M., Hirose, M., Suzuki, Y., Takatori, K., Sugita-Konishi, Y.: Immunotoxicity of nivalenol after subchronic dietary exposure to rats, *Food Chem Toxicol* **46** p235-258 (2008)
 4. Sugita-Konishi, Y.: Toxicity and control of trichothecene mycotoxins, *Mycotoxins* **58** p23-28 (2008)
 5. 小西良子: カビ毒のリスクファイルと直面する問題, 国際生命科学研究機構 **89** p56-62 (2007)
 6. 杉山圭一, 小西良子: 食品のマイコトキシンに関する欧米の規制と日本の規制, フードケミカル **264**, 73-78 (2007)
 7. 小西良子, 杉山圭一: カビ毒のリスク評価と国際的な動向, 食品衛生学雑誌 **49**, 1-10 (2008)
 8. Sugiyama K, Muroi M, Tanamoto K, Nishijima M, Sugita-Konishi Y: Effect of deoxynivalenol on LPS signaling in macrophage, *The Toxicologist* **102**, 102 (2008)
 9. Sugita-Konishi Y, Kubosaki A., Sugiyama K, Poapolathep A, Dong K, Kumagai S: Effects of T-2 toxin on hepatic drug metabolizing enzymes and the binding activity of aflatoxin B1 to DNA in rats, *The Toxicologist* **102**, 101 (2008)
 10. Poapolathep, A., Poapolathep, S., Imsilp, K., Wannapat, N., Klangkaew, N., Kusutjarit, N. and Kumagai, S. Distribution and residue depletion of oxytetracycline in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Food Protection*, Vol 70, in press
 11. Tulayakul P, Dong KS, Li JY, Manabe N, Kumagai S. The effect of feeding piglets with the diet containing green tea extracts or coumarin on in vitro metabolism of aflatoxin B1 by their tissues. *Toxicol.* **50**:339-48. (2007)
 12. Dong, K., Sugita-Konishi, Y., Yu, J., Tulayakul, P., and Kumagai, S. The effects of subcutaneous administration of T-2 toxin on liver drug metabolizing enzymes in piglets. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **90**, 401-413. (2008)
- 【学会発表】
1. Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M.; and Sugita-Konishi, Y: Effect of deoxynivalenol on LPS signaling in macrophage, 47th Society of Toxicology (March, 2008)
 2. Sugita-Konishi, Y., Kubosaki, A., Sugiyama, K., Poapolathep, A., Dong, K. and Kumagai, S: Effects of T-2 toxin on hepatic drug metabolizing enzymes and the binding activity of aflatoxin B1 to DNA in rats, 47th Society of Toxicology

- (March, 2008)
3. 杉山圭一、濱田 理、室井正志、葉袋裕二、棚元憲一、芳賀 実、小西良子: Toll-like receptor シグナリングに及ぼすデオキシニバレノールの影響, 2008 年度日本農芸化学会 2008. 3 月
 4. 矢口 篤、吉成知也、高橋治男、中島 隆、小西良子、長澤寛道、作田庄平: デオキシニバレノール生産阻害物質の探索 その2, 日本農芸化学会 2008. 3 月
 5. Sugita-Konishi Y, Kumagai S, Park B J, Saito S, Sato T: Intake of deoxynivalenol (DON) from wheat consumption in Japan and reduction on the processing of wheat product, UJNR 2007. 11 月
 6. 小西良子: カビ毒の毒性と制御, 第28回日本食品微生物学会シンポジウム 2007. 9 月
 7. 小西良子: カビ毒の毒性と制御に関する研究, 第62回日本マイコトキシン学会 2007. 9 月
 8. A Poapolathep, S Poapolathep, K Imsilp, C Sinthusing, Y Sugita-Konishi, S Kumagai: Dispositions and bioavailability of fusarenon-x, a mycotoxin, in broilers and ducks, International Congress of Toxicology Montreal Canada, 2007. 7 月
 9. A. t Poapolathep, S. Poapolathep, K. Imsilp, N. . Klangkaew, Y. Sugita-Konishi, S. Kumagai: Detection of deoxynivalenol contamination in weat products, Princess Chulabhorn Congress, バンコク、タイ 2007. 11 月
 10. 中島正博、青山幸二、石黒瑛一、堤 徹、法月廣子、大須賀裕美、藤田和弘、甲斐茂美、田端節子、杉浦義紹、田中敏嗣、田中宏揮、高橋正紀、伊藤義典、小西良子、熊谷進: 日本に流通する食品中のオクラトキシンA およびフモニシン汚染実態調査(平成 16-18 年度), 第94回日本食品衛生学会 2007. 10 月
 11. 斉藤史朗、熊谷進、中島正博、田端節子、田中敏嗣、佐藤敏彦、吉池信男、伊藤義典、小西良子: 日本におけるアフラトキシンの暴露評価, 第94回日本食品衛生学会 2007. 10 月
 12. 滝埜昌彦、小西良子、J J Pestka: LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS を用いたマクロサイクリックトリコテセン類の分析, 日本マイコトキシン学会 2008. 1 月
 13. Bong Joo Park, Yoshiko Sugita-Konishi, Jong-chul Park, Kosuke Takatori: Gliotoxin-induced apoptosis in lung cells is mediated by caspases activities, International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins イスタンブール 2007. 5 月
 14. Saito S, Watanabe M, Tanaka T, Yoshiike N, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Satoh T: Simulation of exposure to deoxynivalenol from wheat consumption in Japan, International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins イスタンブール 2007, 5 月
 15. Sugita-Konishi Y, Nakajima M, Tabata S, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y: Surveillance of aflatoxin contamination in retail foods and exposure assessment for aflatoxins in Japan, X II International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins イスタンブール 2007, 5 月

Ⅱ. 分担研究報告書

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)

食品中のカビ毒汚染実態に関する研究

分担研究報告書

分担研究者	小西 良子	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長
協力研究者	青山幸二	(独) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC)
	伊藤嘉典	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	甲斐茂美	神奈川県衛生研究所
	田端節子	東京都健康安全研究センター
	田中敏嗣	神戸市環境保健研究所
	中島正博	名古屋市衛生研究所
	法月廣子	(財) 日本穀物検定協会
	小木曾基樹	(財) 日本食品分析センター 多摩研究所
	前田 守	(財) 日本冷凍食品協会
	高橋正紀	(社) 全日本検数協会

要旨

市販食品 16 食品目 223 試料についてフモニシン B1、B2、B3 (FB1, FB2, FB3) と、市販の国産小麦粉 79 試料のデオキシニバレノール(DON) とニバレノール(NIV) を LC/MS を用いて分析した。また、市販食品 20 食品目 398 試料についてオクラトキシン A(OTA) を、HPLC—蛍光検出器を用いて分析した。その結果、フモニシン B1、B2、B3 は、市販の、コーンスナック、コーングリッツ、ポップコーン、コーンフレークにおいては高い頻度で検出された。米、生とうもろこし、スイートコーン、そば粉、コーンスターチにおいては定量限界未満であった。OTA は、グレープジュース、米、大麦、雑穀、コーンフレーク等のとうもろこし製品からは検出されなかったが、パスタ、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、ライ麦粉、小麦粉、オートミールの一部から、また、ココア、チョコレートとインスタントコーヒーの大部分から最高 3.25ng/g の汚染が認められた。トリコテセン系カビ毒の汚染実態調査においては、国産小麦粉の 92.5% に DON が、81% に NIV が検出限界 (2 ng/g) 以上検出された。さらに DON と NIV には 0.97 以上の相関が認められた。このことから現在基準値が設定されていない OTA および FB1, FB2, FB3 は、多品目の食品から検出されることが明らかになり、さらなるモニタリングの必要性が示唆された。また、国産小麦粉の DON と NIV の共汚染は高頻度で起こっており、それを踏まえた基準値設定が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

アフラトキシン M1、フモニシン、オクラトキシン A、デオキシニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、フモニシン、オクラトキシン A、が 2001 年の WHO/FAO 食品添加物・汚染物合同専門家会議 (JECFA) により健康評価

が行なわれ、アフラトキシン M1 を除いて一日耐容摂取量が設定された。トータルアフラトキシンに関しては、毒性を始め摂取量など何度かコーデックス委員会の諮問を受けて JECFA においてリスク評価が行われている。それを受けて 1997 年には未加工ピーナッツを対象に基準値

がコーデックス委員会において設定された。また、昨年開催された JECFA において、木の実のトータルアフラトキシンを対象とした暴露評価がなされ、近々コーデックス委員会において基準値が設定される予定である。

このように国際的にはカビ毒に対する対策がとられているにも関わらず、我が国においては、基準値が設けられているのはパツリンのみであり、アフラトキシン B 1 は食品衛生法第 6 条により、デオキシニバレノール (DON) においては暫定基準値により対処している。我が国の輸入食品への依存率は 60% を超えつつあり、今度もさらに輸入食品は多様化していくことが予想される。このような状況のなか、輸入食品の安全性を確保するために、我が国に適したカビ毒の基準値策定が早急に望まれるが、その科学的根拠となる主要なカビ毒の食品の汚染実態・暴露評価に耐え得るデータは十分には得られていない。平成 16 年度から 18 年度までの厚生労働科学研究事業において、われわれは、トータルアフラトキシン、OTA、フモニシン (FB) について 3 年間通年実態調査を行った。その結果、トータルアフラトキシンの汚染実態は、非常に低いものであり、暴露量もすぐに健康被害を憂慮する値ではないことが明らかになった。これはアフラトキシン B 1 の規制が既に食品衛生法により行われていることに起因するものと考えられる。しかし、OTA および FB については、汚染濃度は低いものの、多くの食品から検出された。しかし、正確な暴露評価を行うためには、寄与率の高い食品を選び、その検体数を増やす必要があるため、さらに食品目数および試料数を増やし、通年で実態調査を続けることとなった。

平成 16 年度から 18 年度までの厚生労働科学研究事業で行った OTA 汚染実態調査の結果から、パスタ、レーズン、チョコレート、インスタントコーヒー、ココアなどが、フモニシン汚染実

態調査の結果から、コーンスナック、コーングリッツ、ポップコーン、コーンフレーク、大豆、ビールが、それぞれのカビ毒の暴露への寄与率が高いという知見が得られたので、今年度はこれら食品について検体数を多くしてクリーンアップ方法を含め予め検討した分析法を用いて、各カビ毒の分析を行なった。フモニシンに関しては、最近アスパラガス汚染の報告があったことから調査対象に加えた。

また、わが国において汚染報告の多いトリコテセン系カビ毒に関して、暴露評価を行うことを目的に、今年度に限り国産小麦粉を対象にニバレノール (NIV) と DON の汚染実態調査を行った。

B. 研究方法

試料

実態調査で用いた食品は全国各地のスーパーマーケット等で購入したものを、それぞれ分析試料とした。国産小麦粉は、全国的に均等になるように、地方での地域販売品をインターネットや直営店などで購入した。

OTA の分析

固体試料はミキサーあるいは遠心粉碎器等で粉碎し、均一になるように良く混合してから、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水溶液 (7+3) でそれぞれ振とう抽出した。ワイン、ビールについては 1%ポリエチレングリコール 8000-5%炭酸水素ナトリウム水溶液を加え混合した。抽出物または混合物をろ紙でろ過してから、イムノアフィニティーカラム (オクラプレップ (r-Biopham-Rhone 社)) でクリーンアップを行

なった。メタノール-酢酸 (99+1) で溶出し、窒素乾固したのち、溶離液で溶解後、HPLC (ODS カラム : 4.6mm i. d. × 250mm, 5 μ m, 移動相 : アセトニトリル-水-酢酸 (55+43+2)、流速 : 1 ml/min、蛍光検出器 : 励起波長 333nm、蛍光波長 460nm) による分析に供した。それぞれの食品により回収率、定量限界、検出限界が異なるので、食品別に附表に記した。

FB の分析

試料をミキサーまたは遠心粉碎器で粉碎し混合してから、塩化ナトリウムとメタノール-水 (3+1) を加え、振とう抽出した。ろ紙 (Whatman No. 4) でろ過し、得られたろ液をイオン交換カートリッジカラム (Bond Elut LRC (VARIAN)) でクリーンアップを行なった。メタノール-酢酸 (99+1) 溶出液を LC/MS (カラム : ZORBAX Eclipse XDB-C18) による分析に供した。コーンスープの粉末の場合、試料を α -アミラーゼ及び β -マンノシダーゼで処理したのち、抽出操作を実施した。酢漬けのアスパラガスは試料採取後 pH 7 に調整したのち、抽出操作を実施した。雑穀米は、pH を 6.0~6.5 に調整後前処理を行った。米は抽出溶媒をメタノール-0.1mol/L 塩酸 (3+1) で、1 時間抽出したのち、前処理なしに抽出液を直接 LC-MS により測定した。スイートコーンおよびコーンフレークは、抽出液を 10 倍に希釈後、前処理を行った。

それぞれの食品により回収率、定量限界、検出限界が異なるので、食品別に附表に記した。

DON/NIV の分析

分担研究者 田中 敏嗣分担研究者が今年度の本研究事業課題で行った「カビ毒を含む食品の安全性に関する調査研究 分析法のバリデーション等に関する研究 (I)」により確認した方法を用いた(分担報告書参照)。

すなわち、試料 25g を 100ml の抽出液を加え、

10 分間放置後 30 分間振とう抽出した試料溶液を多機能カラム Autoprep MF-T1500 で精製し、試験溶液を調製した。試験溶液は LC および LC/MS を用いて DON、NIV の濃度を測定した。LC/MS/MS 測定条件は分担報告書に準じた。

本分析法の定量限界は、NIV および DON とも 5 ng/g (一部 10 ng/g)、検出限界は 2 ng/g (一部 5 ng/g) であった。回収率は 10 μ g/kg を添加した場合は NIV 59.2 \pm 4.7%、DON 82.3 \pm 7.3% であり、100 μ g/kg を添加した場合は NIV 77.2 \pm 1.5%、DON 91.9 \pm 2.8% であった。

汚染推定平均値の算出

それぞれの食品について、汚染平均値を GEMS/FOOD に規定されている方法により算出した。1) 定量(検出)限度未満の検体が全くない場合は、平均値が真の平均値となる。2) 検出限度未満の検体が 60% 未満の場合は、検出限界以下の値を全て検出限界の 1/2 として平均値を算出する。3) 定量(検出)限度未満の検体が 60% 以上 80% 未満の場合は、2 種類の平均値を算出する。すなわち定量限度未満の値をすべて 0 としての平均値 (lower bound) と、定量限度未満検出限界以上の検体を定量限度値、検出限界以下の値を検出限界値としての平均値 (upper bound) である。

C. 研究結果

OTA は、グレープジュース、米、大麦、雑穀、とうもろこしからは検出されなかったが、パスタ、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、ライ麦粉、小麦粉、オートミールの一部から、また、レーズン (21 検体中 12 検体)、ココア (17 検体中 16 検体)、チョコレート (40 検体中 36 検体) およびインスタントコーヒー (30 検体中 28 検体) から高頻度に OTA が検出された。しかし汚染濃度の最高値はココアの 3.25ng/g であり、EU の基準値である 5 μ g/kg より低い値であった (表 1、図 1、附表 1)。GEMS/FOOD の方法で算