

表 1 DON、NIV 単独添加時の添加回収率

		NIV	DON
Solvent	回収率(%)	117.7	120.7
STD	RSD(%)	7.2	7.9
Matrix	回収率(%)	115.9	108.9
STD	RSD(%)	4.1	12.4

表 2 DON、NIV 混合添加時の添加回収率

		NIV
Solvent	回収率(%)	111.3
DON STD	RSD(%)	8.3
Matrix	回収率(%)	91.3
DON STD	RSD(%)	16.8

表 3 自然汚染小麦試料での NIV 定量値

		小麦試料A	小麦試料B	
NIV濃度 (μ g/kg)	ELISA	Solvent STD	635	10641
		Matrix STD	730	11268
	LC/MS		572	13006
	LC/UV		463	13453

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(表 3)。

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。

D. 結論

1. 玄麦試料への NIV 単独添加においては、良好な回収結果が得られた。
2. 玄麦試料への DON、NIV 混合添加及び汚染試料においては、NIV 抗体での定量値から DON 抗体での DON 定量値を差し引いた値が、NIV 定量値であることが示唆された。
3. 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。

以上の結果より、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た。

E. 研究発表

1. 学会発表

滝埜昌彦(アジレントテクノロジー株式会社)、田中宏輝((社)全日本検数協会、現、サントリー株式会社)、田中敏嗣(神戸市環境保健研究所)、小西良子(国立医薬品食品衛生研究所):第 94 回日本食品衛生学会学術講演会、平成 19 年 10 月 26-27 日、静岡県立大学

【文献】

- 1) Maragos, C., Busman, and Sugita-Konishi, Y. :*Food Addit Contam.* 23, 816-825 (2006).
- 2) Maragos, C. and McCormick, S. :*Food Agric Immun.* 12, 181-192 (2000).

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（Ⅲ）

SPR を用いたニバレノール及びデオキシニバレノール分析法の検討

研究分担者 田中 敏嗣 神戸市環境保健研究所

研究協力者 門田智之、伊藤勇二 キリンホールディングス株式会社

フロンティア技術研究所 食品安全科学センター

研究要旨 ニバレノール(NIV)及びデオキシニバレノール(DON)は *Fusarium* 属菌が産生するマイコトキシンであり、穀物類を中心に広く汚染が報告されている。NIV 及び DON に汚染された農産物を摂取することで健康被害が危惧されており、それを防止する上で、現場で品質管理的に分析可能な簡便かつ迅速な分析法が求められている。そこで、より簡便・迅速な NIV 及び DON 分析法の構築を目的として、NIV 及び DON を認識するモノクローナル抗体を用いた SPR(surface plasmon resonance, 表面プラズモン共鳴)による NIV 及び DON 分析が可能であるか検討を行った。検討の結果、抗体及び NIV-BSA コンジュゲート体を用いた分析系にて NIV 及び DON の検量線が作成可能であり、SPR による NIV 及び DON の分析法確立の可能性が確認できた。検出感度としては標準品において NIV が 1~5ng/ml、DON が 0.02ng/ml 程度の濃度から検出可能であったが、NIV と DON の間で検出感度に大きな差が見られたため、NIV について定量を行うためには今後詳細に検討を行っていく必要があると考えられた。

A.研究目的

ニバレノール(NIV)及びデオキシニバレノール(DON)は赤カビである *Fusarium* 属菌が産生するマイコトキシンであり、小麦、大麦、とうもろこし等の穀物にて主に汚染が報告されている(1)。NIV 及び DON に汚染された農産物を摂取することで健康被害が危惧されており、NIV の毒性は European Committee により暫定耐用 1 日摂取量が 0.7µg/kg-bw/day と報告されている(2)。NIV と同様の基本骨格を持つ DON については FAO/WHO 合同食品添加物専門委員会において評価され、我が国でも小麦(玄麦)に対して暫定基準値が 1.1ppm と

設定されている(3,4)。日本、ヨーロッパ等の一部の地域では、これら NIV と DON は単独での汚染のみならず、同時汚染も認められている(5)。

NIV 及び DON による健康被害を防止するためには、食品中の NIV 及び DON の分析法を開発し、品質管理を行っていくことが必要である。現在、NIV 及び DON の分析については機器分析により行われている状況であるが、品質管理を行っていく上では、より簡便かつ迅速な分析法が求められる。そこで、簡便・迅速な NIV 及び DON の分析法の構築を目的として、欧米等海外において簡便・迅速に測定できる手法として注目されている

抗体抗原反応を用いた SPR(surface plasmon resonance) による NIV 及び DON の分析が可能であるか検討を行うこととした。

B. 研究方法

(1) SPR の原理

SPR は光が金属に入射した際に発生するエバネッセント波と表面プラズモンが共鳴することで起こる表面プラズモン共鳴現象に基づいた分析機器である。センサーチップ表面で生じる微量の質量変化を SPR シグナルの角度変化から検出可能であり、分子をセンサーチップ上に固定することによって、その分子に対する分子間相互作用をリアルタイムで検出できる。また、相互作用量(結合量)は濃度に依存するため、検量線を作成して濃度測定が可能である。尚、分子間相互作用としては抗体抗原反応が多く用いられている。

本測定の特徴としては (I) 分子間の特異的な相互作用を利用しているため、分析時の前処理は抽出後に希釈、遠心分離、フィルターろ過等の簡単な作業のみであり、複雑なクリーンアップが不要な点、(II) 測定時間はセンサーチップの再生作業も合わせて 15 分程度である点、が挙げられ、スクリーニング法としても注目を集めている。尚、SPR は食品分析にも広く応用されており、動物用医薬品(クロラムフェニコール、ストレプトマイシン等)やビタミンの測定用キットが市販されている(6、7)。

(2) 測定方法

SPR による相互作用測定には国立医薬品食品衛生研究所小西良子部長より供与頂いた NIV 及び DON を認識する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(8)。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測定対象となる NIV の分子量が抗体及びコンジュゲート体と比較して非常に小さいことを考慮し、阻害法を採用することとした。阻害法を用いる場合、NIV を含む試料に一定濃度の抗体を混合して NIV と抗体を反応させた後、DON 又は NIV のコンジュゲート体を固定化したセンサーチップへと供して未反応の抗体を検出する。試料内の NIV 濃度によって残存する反応する抗体量に変化することから、SPR で未反応の抗体を検出することによって定量を行なうことができる(図 1)。

センサーチップへの固定化は、カルボキシル基の導入されたセンサーチップを EDC/NHS 混合液で活性化し、各コンジュゲート体をそれぞれセンサーチップに結合後、エタノールアミンで残存活性部位をブロックングすることで行なった。固定化時間は、活性化、固定化、ブロックングがそれぞれ 10 分であり、ランニング緩衝液に 0.01M HEPES(0.15M NaCl)を用いて流速 10 μ l/min で行なった。固定化時の pH は 3.5~5.0 の範囲で検討した。

検量線は NIV の標準品をアセトニトリルで溶解後、水により 0.01~100ng/ml の濃度範囲で段階的に希釈した標準液と、濃度 100ng/ml の抗体を等量で混合したものを SPR に供し、阻害法によって作成した。測定時の流速は 10 μ l/min であり、測定時間は 5 分である。また、NIV 抗体は NIV のみではなく DON も認識するため、DON も同様の条件で検量線を作成することとした。

C. 結果

(1) センサーチップへの固定化

NIV-BSA、DON-IgG の両コンジュゲート体の固定化条件を検討したところ、NIV-BSA については

緩衝液のみの固定化条件下で十分な固定化量が得られないことが考えられたため、界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)を使用したところ良好な結果が得られた。DON-IgG は CTAB を用いない条件であっても固定化は可能であると考えられたが、固定化量の増大が見込まれたため NIV-BSA と同様に CTAB を使用することとした。pH は両コンジュゲート体共に 4.0 とした。

(2)相互作用測定

それぞれのコンジュゲート体を固定化したセンサーチップに対し抗体濃度 10 μ g/ml で相互作用測定を行なったところ、両者にて相互作用が確認された。これにより、固定化の際にコンジュゲート体中の DON 及び NIV において抗体の認識部位が失われていないことがわかった。

尚、相互作用測定の際にレスポンスの再現性が得られないことがあり、抗体のバイアルへの吸着が原因として考えられたため、サンプルの希釈の際に界面活性剤 surfactant P20 を 0.05% 含むものを用いたところ改善された。従って、以降の分析ではサンプル希釈及びランニング緩衝液に 0.01M HEPES(0.15M NaCl, 0.05% surfactant P20)を使用することとした。

SPR は繰り返して分析を行うために、測定後はセンサーチップを洗浄し、センサーチップ表面を測定前の状態に戻す必要がある。今回、抗体が結合した後のセンサーチップ再生には、DON 認識抗体を用いて SPR による DON 分析法を検討した文献に従い 6M guanidine-HCl (in 50mM glycine-HCl pH2.0)を用いたところ、NIV-BSA については良好な結果が得られた(9,10)。DON-IgG の場合はこの再生溶液を用いても完全には再生できなかったため、更に 50mM NaOH により洗浄を行なったところ再生が可能であった。

固定化を行なったセンサーチップについて、連続分析が可能であるか安定性試験を行なった。抗体濃度 100ng/ml にて 50 回繰り返し測定を行なったところ、NIV-BSA を固定した場合はレスポンスに変動が少なかったものの、DON-IgG ではインジェクション数が増えるにつれレスポンスに変動(減少)が見られた(図 2)。これは固定化した DON-IgG が測定を繰り返すことによりセンサーチップから外れているものと推測され、定量分析を行なうことは困難であると考えられた。これより、検量線作成は NIV-BSA を固定化したセンサーチップで検討を行うこととした。

(3)検量線の作成

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。尚、測定の際にはセンサーチップに対する非特異的な吸着を考慮するため、リファレンスセルについても同時にサンプルを注入し、センサーグラムを差し引きしてレスポンス値を算出した。

D.考察

NIV の検量線について 0.01~1ng/ml の範囲では顕著なレスポンスの変化は得られなかったため、標準品としてこの濃度での検出は困難であると考えられた。5ng/ml 程度の範囲では良好な検量線が得られており、SPR による NIV 分析法確立の可能性を確認できた(図 3)。一方、抗体は DON に対して非常に高感度であり、標準品にて 0.02ng/ml 程度の濃度から十分なレスポンス変化が得られた(図 4)。検討の結果、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($\mu\text{g/ml}$)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。

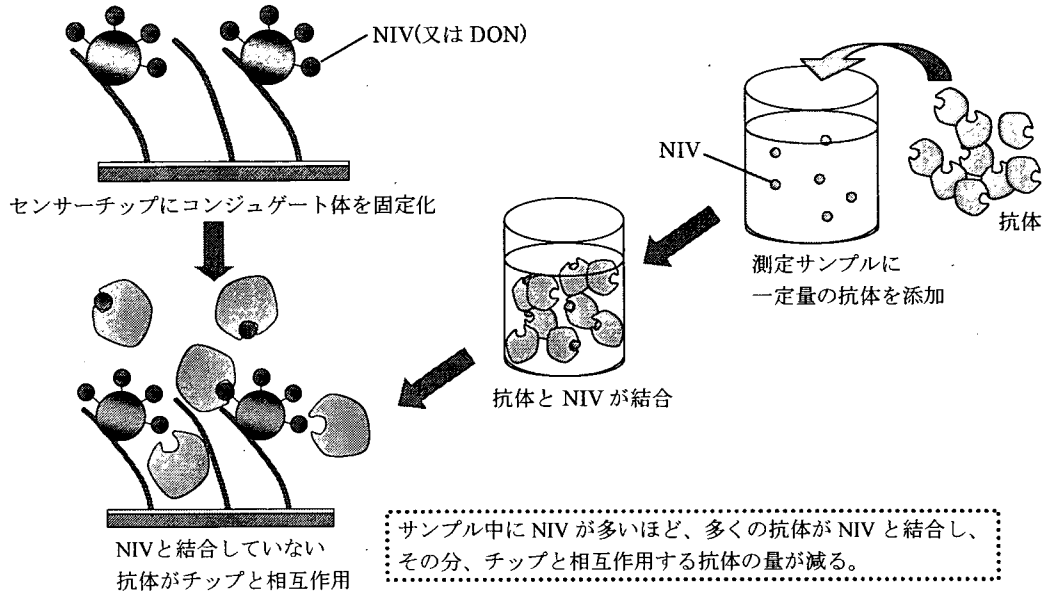
今回の検討結果では NIV と DON の間で約 100 倍程度の感度差が見られた。抗体と標準品の混合時間を長くして反応時間を十分にとった場合でも同様の結果が得られ、感度差は抗体の特性によるものである可能性が考えられた。今回の検討では NIV と DON の感度差が少ない条件は得ることができなかった。このため、DON が含まれている試料について NIV を分析する場合は、DON に由来するレスポンスが非常に大きく NIV の測定に影響を与えると考えられた。測定試料が NIV と DON で同時に汚染されていることも考えられるため、これは実際に分析を行う上で大きな問題となると考えられる。

以上より、DON を含む試料にて NIV の分析を行なうためには試料中の DON を取り除く必要があると考えられる。今後分析系から DON を排除するクリーンアップ方法を検討し、引き続き NIV の分析法を検討していく予定である。

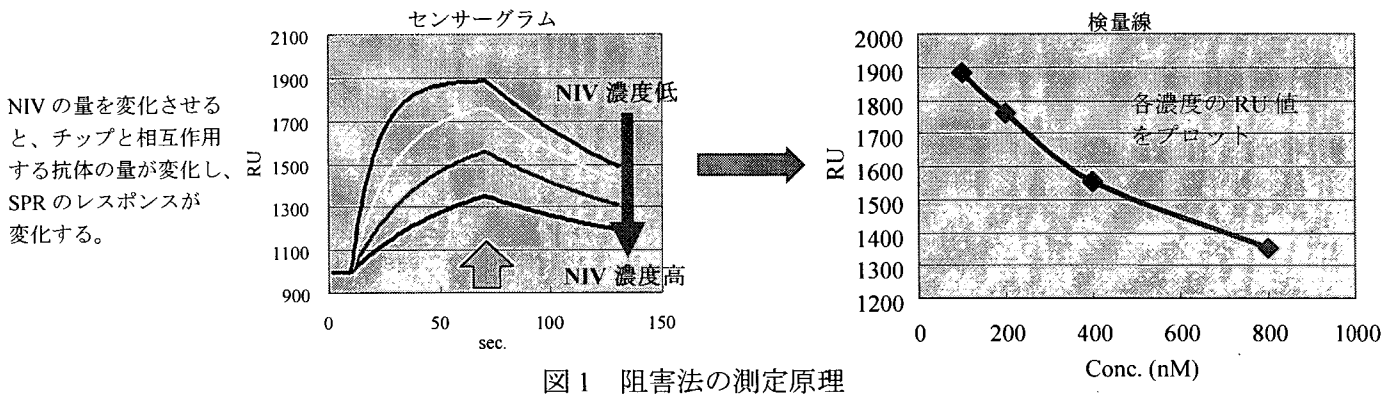
E.参考文献

- (1) Reports on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in Task 3.2.10(April 2003)
- (2) Scientific Committee on food, Opinion of the scientific committee on food on Fusarium toxins Part4:Nivalenol
- (3) JECFA (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series 47
- (4) 厚生労働省通知 食発第0521001号(平成14年5月21日)
- (5) Tanaka, A.Hasegawa, S.Yamamoto, U.Lee, Y.sugiura, Yueno, J.Agric. Food Chem.,36,979-983(1988)
- (6) P.D.Patel, J.AOAC int.,89(3),805-818(2006)
- (7) H.E.Indyk, B.S.persson, M.C.B.Caselunghe, A.Moberg, E.L.Filonzi, D.C.Woollard, J.AOAC int.,85(1),72-81(2002)
- (8) C. Maragos, M. Busman, Y. Sugita-Konishi, Food Additives and Contaminants,23(8),816-825(2006)
- (9) C.Maragos, S.P.Mccormick.,Food and Agricultural Immunology,12,181-192(2000)
- (10) A.J.Tudos, E.R.Lucas-van den Bos, E.C.A.Stigter. J.Agric.Food Chem.,51,5843-5848(2003)

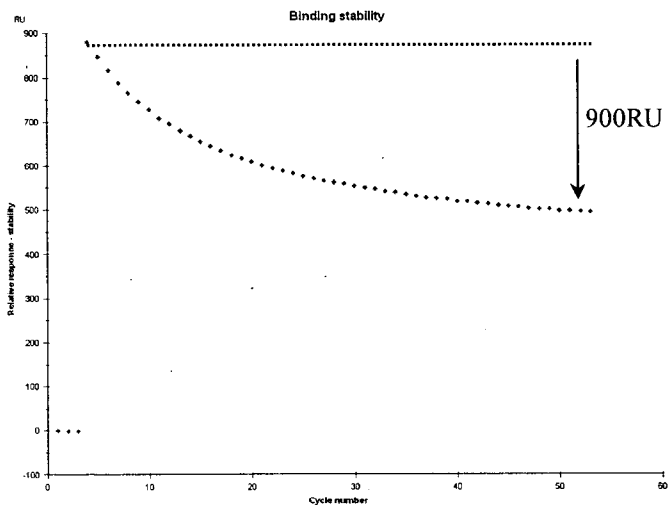
(1)阻害法の原理



(2)検量線の作成法



(1)DON-IgG を固定



(2)NIV-BSA を固定

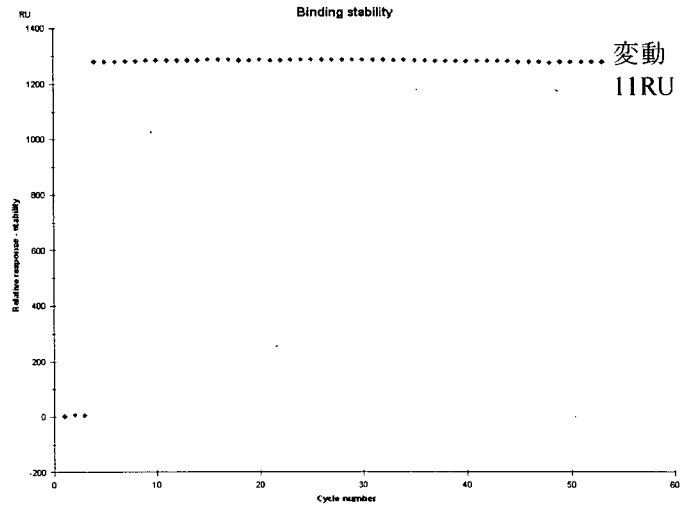


図 2 各コンジュゲート体の繰り返し試験結果

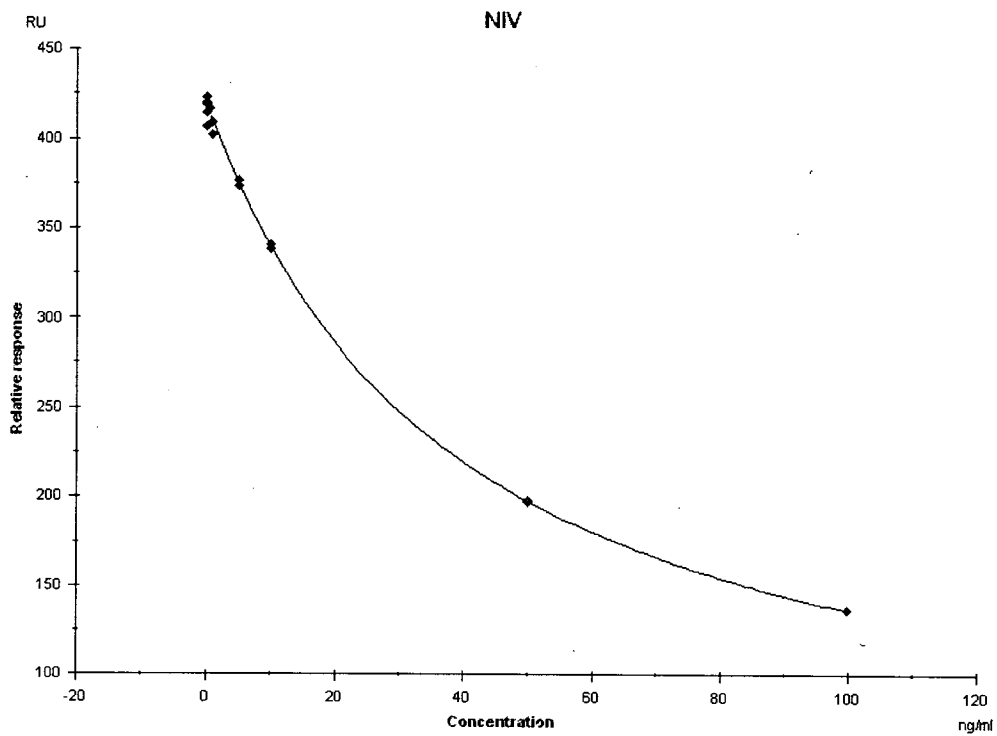


図3 NIVの検量線

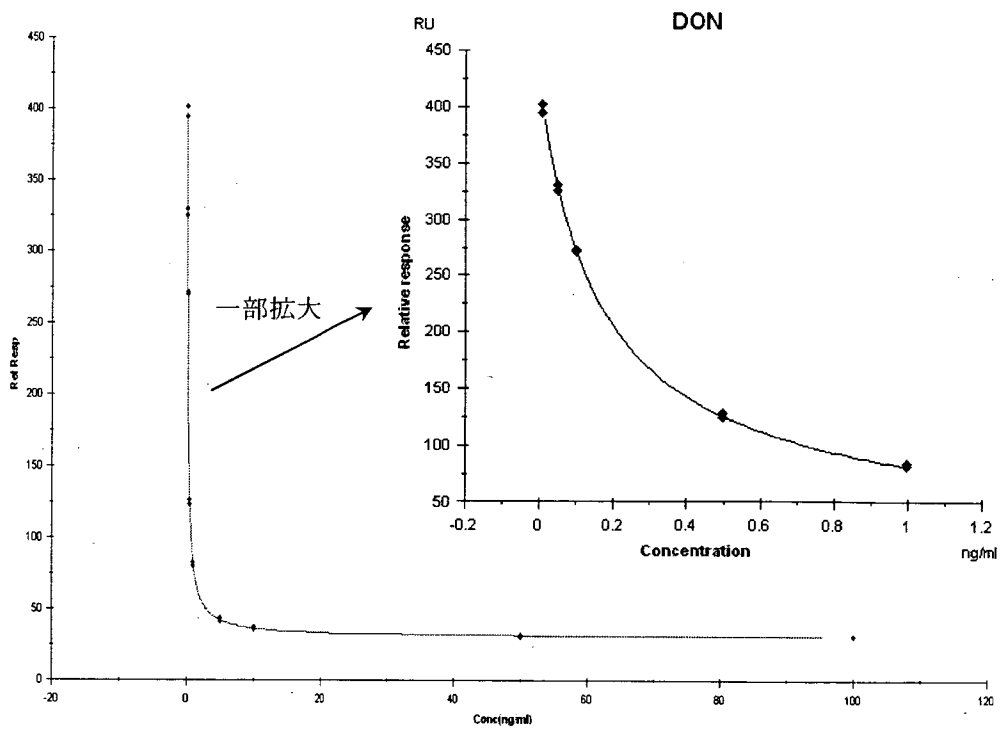


図4 DONの検量線

厚生労働科学研究費補助金研究事業
(食の安全・安心確保推進研究事業)
分担研究報告書(平成19年度)

カビ毒を含む食品の安全性に関する研究
カビ毒の消長に関する研究

分担研究者 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

研究要旨: 本分担研究では、カビ毒の加工工程における減衰レベルを明らかにすることを目的としている。本年度は小麦を汚染するトリコテセン系マイコトキシンであるデオキシニバレノール(DON)とニバレノール(NIV)について、国産小麦粉も含む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、可食部あたりDONは約 $67.3 \pm 19.4\%$ 、NIVは約 $51.2 \pm 10.6\%$ が食パンの製造過程で減衰するとの結果を得た。今年度はさらに近年問題視されつつある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た。今回トリコテセン系マイコトキシンが免疫毒性を有することに着目し、マウスマクロファージ様細胞におけるエンドトキシン誘導性IFN- β レポーター活性に対するDONの影響を検討した。その結果DONが濃度依存的にエンドトキシン誘導性IFN- β レポーター活性を抑制することが明らかとなり、トリコテセン系マイコトキシンの毒性を生物学的に評価するうえで本法が応用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

カビ毒はタンパク質系毒素と比較し物理的、化学的処理に極めて安定であることが報告されているが、実際にわが国においてカビ毒に汚染された食糧を加工・調理することによるカビ毒の消長のレベルについて焦点をあてた包括的な研究は乏しいと言わざるを得ない状況である。カビ毒の消長について正確なデータを把握することは、同毒による健康被害から国民を保護するうえで必要な施策を立案する際の基盤となる情報となる。従って、同研究を推進し実データを収集することは厚生労働行政の観点から急務であると考えられる。

戦後、わが国の食糧事情が逼迫したことから、その緩和を目的の一つとして導入されたパン食は、その後の日本人の食のあり方を大きく変動させるに至った。つまり、日本人の小麦摂取量はパン食により戦後大きく増大し、その後も欧米型の食の拡大が進行しその需要は拡大した。しかし近年、温暖化に代表される地球環境の変化から、小麦の生産・輸出国からの安定的

な供給が揺らぎつつあり、また地産地消の観点からも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。これら現状を鑑み、本研究ではまず小麦を汚染するカビ毒のトリコテセン系マイコトキシンであるデオキシニバレノール(DON)と、その類縁体であり主にわが国を含む東アジアにおいてその汚染が報告されているニバレノール(NIV)について(Yoshizawa, 1983)、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)に混入しているDONおよびNIV各々の含有量と、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。得られた結果は、今後同カビ毒に対する規制値等の施策を講ずる必要が生じた場合の貴重な基礎データとなる。

食品の調理・加工の処理工程は、カビ毒が混入している場合には、使用された原料とともにカビ毒も同時に物理化学的処理されたことに

なる。即ちカビ毒がこれら調理工程においてその原材料となるタンパク質・脂質・核酸等の各種生体成分と化学反応により多種多様な複合体を形成する可能性が懸念される。従ってカビ毒の毒性を評価するにあたり、これら複合体による毒性についても正確に把握する必要性があると考えられる。この毒性の評価には生物学的手法により検討する必要があることは勿論、従来の HPLC 等の理化学的手法では困難であるその定量を可能とする点からも生物学的手法の重要性は高い。

本研究は、カビ毒の消長の研究を実施するうえで、調理・加工によるカビ毒の状態およびその毒性変化も考慮したバイオアッセイ系の構築も目標としており、今回、前述の DON が免疫毒性を有している(Bondy and Pestka, 2000)ことに着目し、その毒性を免疫細胞を用いて測定することも試みた。

B. 研究方法

【小麦粉および食パンからの DON/NIV の測定】

国産を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 (A~I) 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。各試料は、購入した地域および製造元を区分した表記でナンバリングした (例: A-1)。

試料をミキサーもしくは遠心粉碎機により粉碎し、試料 50.0 g を 200 ml 容三角フラスコに取りアセトニトリル:水 (85:15, v/v) 200 ml を加え、振とう機で 60 分間振とう抽出を行った。得られた上清約 40 ml を 50 ml 容の遠心管に分取し 3,000 rpm, 5 min 室温にて遠心分離を行った。得られた上清は MF-T1500 カラム (昭和電工株式会社) に 10 ml 負荷した。流速は 1 ml/min とした。最初に溶出する 4 ml の分画を捨て、次

に溶出する分画 4.5 ml を分取し、2 本のバイアルに同液を 2 ml ずつ取り 45°C 以下の条件下にて窒素気流にて濃縮乾固した。得られたサンプルはバイアル当り 1.0 ml の 10 mM 酢酸アンモニウム:メタノール(90:10, v/v)の移動相で溶解し、LC/MS による分析に供した。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、食パン中に含まれる小麦粉量を食パン 437 g あたり 300 g として算出した(日本麦類研究会, 1981)。本調査研究においては、両カビ毒の検出限界は 2.0 ng/g、定量限界は 5.0 ng/g であった。回収率は食パンについては DON では 106.2±3.5%、NIV では 90.6±1.3%であった。小麦粉については本報告書内の小西の項に記載した。なお今回の DON/NIV 測定方法は共同研究者の田中によりバリデートされたものである。

【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 /RAW264) は国立医薬品食品衛生研究所、衛生微生物部、第一室の室井室長より供与頂いた。

IFN- β /RAW264 を 10% 非働化仔ウシ血清 (Invitrogen)、ペニシリン・ストレプトマイシン (GIBCO) を含む Dulbecc's Modified Eagle Medium (以後 DMEM と略記: GIBCO) High Glucose の培地にさらに 1.0 mg/ml の G418 二硫酸塩 (Nacalai tesuque) を加えた培地にて 37 °C、5% CO₂ 条件下で前培養した同細胞を、12well 平板プレート (Techno Plastic Products) に 3-5 × 10⁵ cells/well となるように 1 ml/well 播種し約 12 時間培養した。培養後 37 °C に保温した Phosphate Buffered Saline (PBS) 1 ml/well で洗浄した。次に DON (62.5, 125, 250, 500, 1,000

ng/ml) およびエンドトキシンとして Sigma の *Escherichia coli* O111:B4 Lipopolisaccharide (LPS) 10 ng/ml をそれぞれ含む DMEM を各 well あたり 500 μ l を加え細胞を培養し、6 時間後培養液を除去した。その後 2 ml の PBS にて各 well を洗浄した。細胞は Passive Lysis Buffer 5 \times (Promega) を 5 倍希釈したものを各 well あたり 200 μ l 加えセルスクレイパーで細胞を掻き取った。掻き取った細胞をマイクロチューブに取り、適宜に vortex を行いながら、氷上に 10 分間置いた。その後、4 $^{\circ}$ C、1,000 rpm、5min 遠心を行い、上清を試料としレポーターアッセイに供した。レポーターアッセイには Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を使用し、回収されたサンプルを 5.0 μ l を供してルシフェラーゼ活性を Multimode Reader TriStar LB 941 (BERTHOLD) により測定した。得られた活性はブラッドフォード法により測定したタンパク質量により補正した。

小麦粉抽出液の作成は以下の通りに行った。小麦粉（日清手打うどんの小麦粉：日清製粉グループ）を 5 g を 50 ml 容の遠心管に取り、アセトニトリル：水 (85:15, v/v) 20 ml を加え、振とう機で 30 分間振とう抽出を行った。抽出後 3,000 rpm、5 min 室温にて遠心分離を行い、得られた上清を小麦粉抽出液とした。同抽出液 300 μ l を 15 ml 容の遠心管に分取し、アセトニトリルにより 100 ppm に調製された DON (Sigma) 溶液より 750、1,500 もしくは 3,000 ng となるよう添加し窒素気流にて濃縮乾固した。得られた試料は -20 $^{\circ}$ C で保存した。冷凍保存した試料を室温にて解凍後、10% 非働化仔ウシ血清、ペニシリン・ストレプトマイシンを含む DMEM 培地 1.5 ml で溶解したのち 500 μ l/well の容量にて前述と同様に培養された IFN- β /RAW264 細胞に加えて Lipopolisaccharide (LPS : Sigma) 10 ng/ml を加えた後 6 時間培養した。刺激後の細胞は前

述同様に細胞抽出液を調製しレポーターアッセイに供した。

C. 研究結果

【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、各々の減衰率ならびにその平均値、標準誤差を算出した。その結果、小麦粉から食パンの製造工程の可食部における 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 との結果を得た (Table 1, 2)。

【免疫毒性を指標とした DON のバイオアッセイ系】

マウスマクロファージ様細胞を LPS 刺激することにより IFN- β の転写が誘導されるが (Lenardo et al., 1989)、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 (Fig. 1)。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た。その結果、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 (Fig. 2)。この結果をもとに DON の検量線を作成したところ、500

～2,000 ng/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 (Fig. 3)。

D. 考察

今回、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 とともに、約 50～70% の減衰率であると判断できる結果を得た (Table 1, 2)。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 (熊谷, 2002)。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、前述の報告書ではホームベーカリーを使用した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。

現在 DON に関しては暫定基準値として 1,100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と規制されており今回調査した小麦粉および食パンとともに同基準値を超える検体は認められなかったが、本結果は、NIV の毒性の詳細ならびに DON との複合毒性の解明により規制値の再検討が必要となった場合の基礎データとなる。また、今回多くの一般家庭で消費されている食パンを検査対象としているため、より低濃度で毒性が発現する可能性が高い低年齢層に配慮する施策を策定する必要性が生じた場合、極めて重要な知見となると考えられる。

汚染実態としては、特定の地域 (Area : H) 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。

また今回の調査結果において、エリア D では DON が食パン製造過程を経て増大したと考えられる結果となっている。本現象は他のエリアでは認められてはいない。従って、D 地域特有の食パン製造工程が本現象に関与している可能性は否定できないため、今後、同地域・同工場の別ロットで同様の現象が再現されるか確認する必要はあろう。

DON と NIV の毒性に関しては、今回新たなバイオアッセイを試みた。DON の毒性としては既に易感染性などの免疫毒性が報告されている (Tryphonas et al., 1986)。この毒性を利用し DON の毒性を評価した結果が Fig. 1 であるが、検討した 62.5 ～ 1,000 ng/ml の DON 存在下で LPS 誘導性 IFN- β レポーター活性は濃度依存的に抑制する傾向を示した。さらに実際に小麦粉抽出成分から DON を測定する場合を想定し、本アッセイ系に対して小麦粉抽出成分を添加した条件下においても測定が可能と考えられる結果を得た (Fig. 2)。同結果をもとに作成した DON の検量線は 500 ～ 2,000 ng/ml の DON 濃度において決定係数 0.9341 の回帰一次方程式を与える (Fig. 3)。同様の実験系において生物学的評価法を基に DON の毒性評価をする方法として、細胞毒性を指標にしたアッセイ系が報告されている (Sugita-Konishi et al., 2006)。しかし、DON による細胞毒性は、NADH によるテトラゾリウム化合物の還元を指標にした細胞毒性試験では少なくとも今回使用したマウスマクロファージ様細胞において 1,000 ng/ml でも認められなかった (data not shown)。従って、LPS 誘導性 IFN- β レポーター活性を指標にしたバイオアッセイによる DON の毒性評価方法は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のブラッシュアップが必要であろう。

E. 結論

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の減衰率は可食部あたり各々約 $67.3 \pm 19.4\%$ 、 $51.2 \pm 10.6\%$ であることを明らかにした。またDONの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。

参考文献

Yoshizawa, T: Trichothecenes-Chemical, Biological and Toxicological Aspects (ed, Ueno, Y.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 195-209 (1983).

Bondy, G. and Pestka, J. J: Immunomodulation by fungal toxins, *J. Toxicol. Environ. Health.* **3**, 109-143 (2000).

Lenardo, M.J., Fan, C.M., Maniatis, T. and Baltimore, D: The involvement of NF- κ B in β -interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction, *Cell* **57**, 287-294 (1989).

Tryphonas, H., Iverson, F., So, Y., Nera, E. A., McGuire, P. F., Ogrady, L., Clayson, D. B. and Scott, P. M. T: Effects of Deoxynivalenol (Vomitoxin) on the humoral and cellular immunity of mice, *Toxicol.* **30**, 137-150 (1986).

Sugita-Konishi, Y., Park, B.J., Kobayashi-Hattori, K., Tanaka, T., Chonan, T., Yoshikawa, K. and Kumagai S: Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1764-1768 (2006).

日本麦類研究会：小麦粉、(有)ユニ・アート、615-666(1981).

熊谷進：小麦等のデオキシニバレノールに係わる規格基準設定のための緊急調査研究、厚生労働科学特別研究、20-30 (2002).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

【論文・総説等】

1. Sugita-Konishi, Y., Niimi, S. and 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. Sugiyama, K., Hiraoka, H. and Sugita-Konishi, Y: Aflatoxin M₁ contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B₁ in corn supplied to dairy cattle in Japan, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* (in submit).
3. 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).
4. 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).
5. Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y: Effect of deoxynivalenol on LPS signaling in

macrophage, *The Toxicologist*. **102**, 102 (2008).

なし

6. 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, *The Toxicologist*. **102**, 101 (2008).

【学会発表】

1. 杉山圭一: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、第34回カビ毒研究連絡会、(2007)
2. 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).
3. 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).
4. 杉山圭一、濱田 理、室井正志、薬袋裕二、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講演要旨集 131 (2008).

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

Table 1 Summary of reducing rate of DON during bread production

Area	Sample	Flour (ng/g)	Bread (ng/g)	Flour Containing Bread (ng/g)	Reducing Rate Estimated from Flour to Bread (%)	Reducing Rate Estimated from Flour to Flour Containing Bread (%)
A	A-1	51.3	15.1	22.0	70.6	57.1
	A-2	27.1	< 5.0	7.3	81.5	73.1
	A-3	51.3	20.3	29.5	60.5	42.4
	A-4	27.1	8.0	11.7	70.4	56.8
	A-5	51.3	10.7	15.6	79.1	69.6
	A-6	27.1	8.5	12.3	68.8	54.5
B	B-1	14.0	< 5.0	7.3	64.3	48.0
	B-2	14.0	< 5.0	7.3	64.3	48.0
	B-3	14.0	< 5.0	7.3	64.3	48.0
C	C-1	30.0	5.7	8.2	81.1	72.5
	C-2	30.0	9.5	13.8	68.4	53.9
	C-3	30.0	13.5	19.6	55.1	34.5
	C-4	30.0	8.7	12.6	71.1	57.9
	C-5	30.0	25.2	36.7	15.9	—
D	D-1	< 5.0	12.2	17.8	—	—
	D-2	< 5.0	8.1	11.8	—	—
	D-3	< 5.0	6.1	8.8	—	—
	D-4	< 5.0	10.9	15.8	—	—
	D-5	< 5.0	7.1	10.3	—	—
E	E-1	21.0	< 5.0	7.3	76.2	65.3
	E-2	21.0	< 5.0	7.3	76.2	65.3
	E-3	31.6	6.0	8.7	81.0	72.4
	E-4	21.0	8.8	12.8	58.2	39.0
	E-5	21.0	5.4	7.9	74.1	62.3
	E-6	21.0	12.4	18.0	41.0	14.1
	E-7	21.0	< 5.0	7.3	76.2	65.3
	E-8	21.0	< 5.0	7.3	76.2	65.3
F	F-1	5.2	< 5.0	7.3	3.8	—
G	G-1	34.4	11.9	17.3	65.4	49.6
	G-2	28.3	12.1	17.6	57.3	37.9
	G-3	34.4	< 5.0	7.3	85.5	78.8
H	H-1	113.2	7.8	11.3	93.1	90.0
	H-2	113.2	14.3	20.8	87.4	81.6
	H-3	113.2	10.4	15.1	90.8	86.6
I	I-1	14.8	5.9	8.7	59.9	41.5
Number		30	35	35	30	28
Mean		35.4	9.0	13.1	67.3	58.3
Standard Deviation		28.5	4.7	6.8	19.4	17.2

The quantitation limit was 5.0 ng/g for flour.

Table 2 Summary of reducing rate of NIV during bread production

Area	Sample	Flour (ng/g)	Bread (ng/g)	Flour Containing Bread (ng/g)	Reducing Rate Estimated from Flour to Bread (%)	Reducing Rate Estimated from Flour to Flour Containing Bread (%)
A	A-1	12.5	<5.0	7.3	60.0	41.7
	A-2	9.6	5.0	7.3	47.9	24.1
	A-3	12.5	<5.0	7.3	60.0	41.7
	A-4	9.6	<5.0	7.3	47.9	24.1
	A-5	12.5	<5.0	7.3	60.0	41.7
	A-6	9.6	<5.0	7.3	47.9	24.1
B	B-1	<5.0	5.0	7.3	—	—
	B-2	<5.0	5.0	7.3	—	—
	B-3	<5.0	5.0	7.3	—	—
C	C-1	10.9	<5.0	7.3	54.1	33.2
	C-2	10.9	<5.0	7.3	54.1	33.2
	C-3	10.9	<5.0	7.3	54.1	33.2
	C-4	10.9	<5.0	7.3	54.1	33.2
	C-5	10.9	<5.0	7.3	54.1	33.2
D	D-1	<5.0	<5.0	7.3	—	—
	D-2	<5.0	5.0	7.3	—	—
	D-3	<5.0	<5.0	7.3	—	—
	D-4	<5.0	5.0	7.3	—	—
	D-5	<5.0	<5.0	7.3	—	—
E	E-1	11.8	5.0	7.3	57.6	38.3
	E-2	11.8	5.0	7.3	57.6	38.3
	E-3	15.9	<5.0	7.3	68.6	54.2
	E-4	11.8	<5.0	7.3	57.6	38.3
	E-5	11.8	<5.0	7.3	57.6	38.3
	E-6	11.8	8.5	12.4	27.7	—
	E-7	11.8	<5.0	7.3	57.6	38.3
	E-8	11.8	8.0	11.7	32.2	1.2
F	F-1	<5.0	5.0	7.3	—	—
G	G-1	9.0	<5.0	7.3	44.4	19.1
	G-2	6.9	<5.0	7.3	27.5	—
	G-3	9.0	<5.0	7.3	44.4	19.1
H	H-1	<5.0	<5.0	7.3	—	—
	H-2	<5.0	5.0	7.3	—	—
	H-3	<5.0	5.0	7.3	—	—
I	I-1	<5.0	<5.0	7.3	—	—
Number		22	35	35	22	20
Mean		11.1	5.2	7.6	51.2	32.4
Standard Deviation		1.8	0.8	1.1	10.6	11.3

The quantitation limit was 5.0 ng/g for flour.

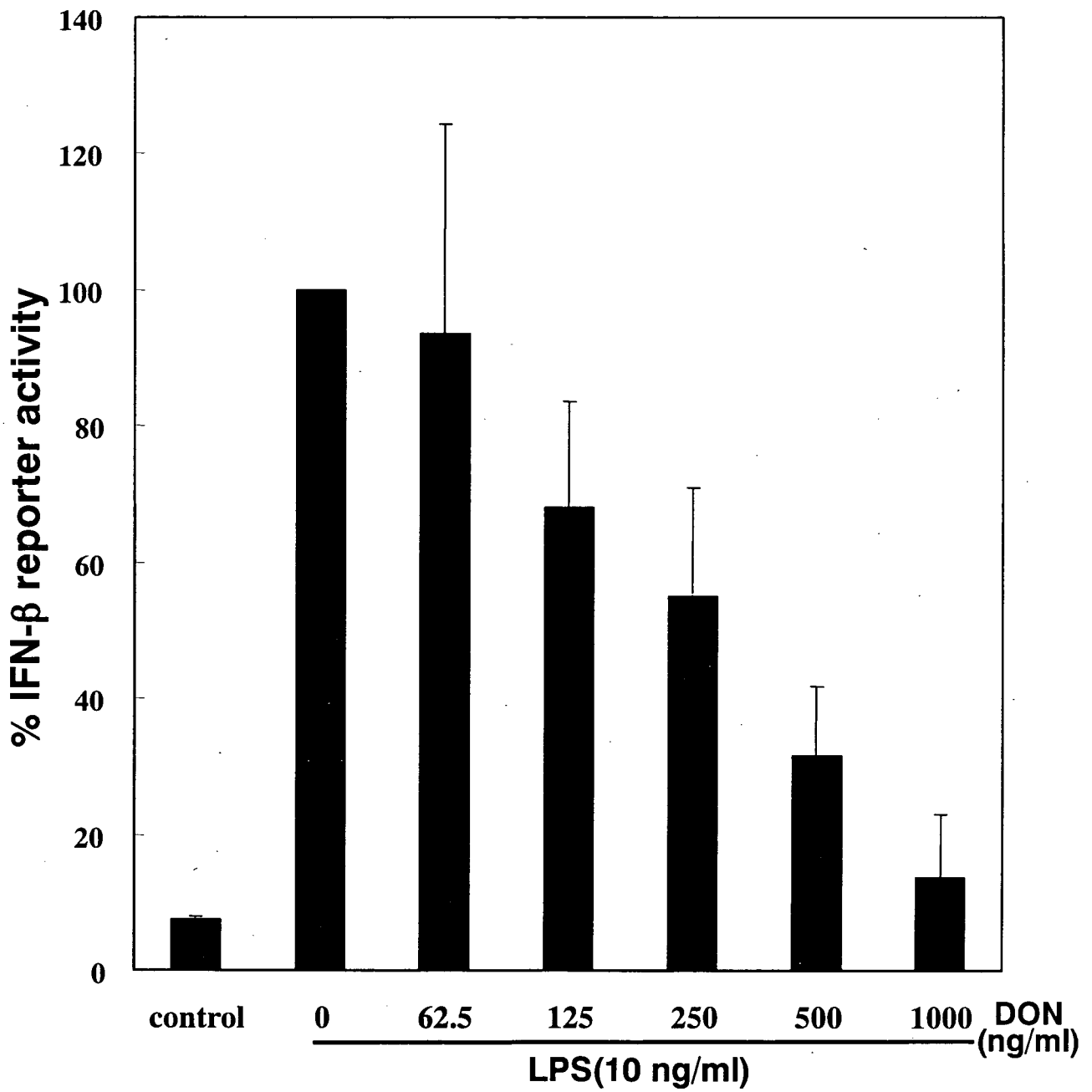


Fig. 1 Effect of DON on LPS-induced IFN-β reporter activity

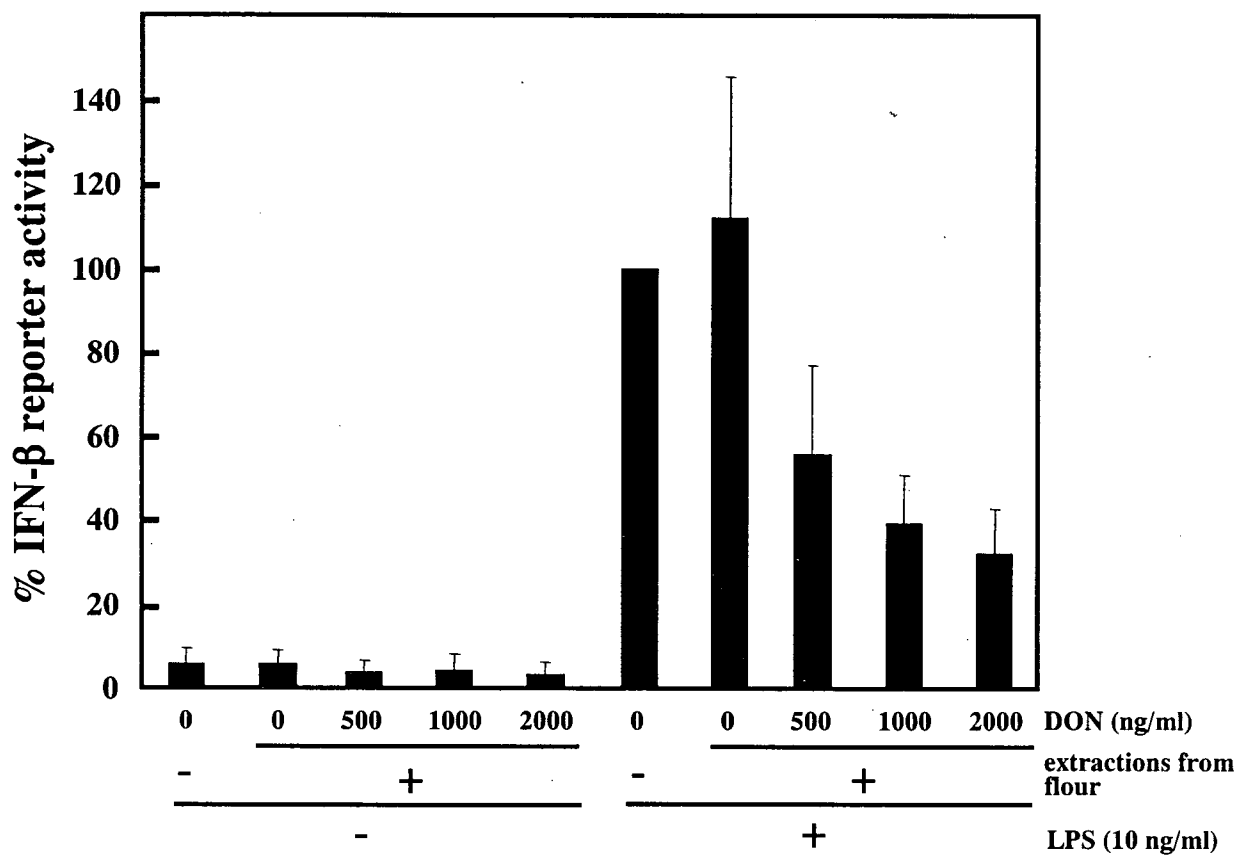


Fig. 2 Effect of DON on LPS-induced IFN-β reporter activity in the presence of extractions from flour

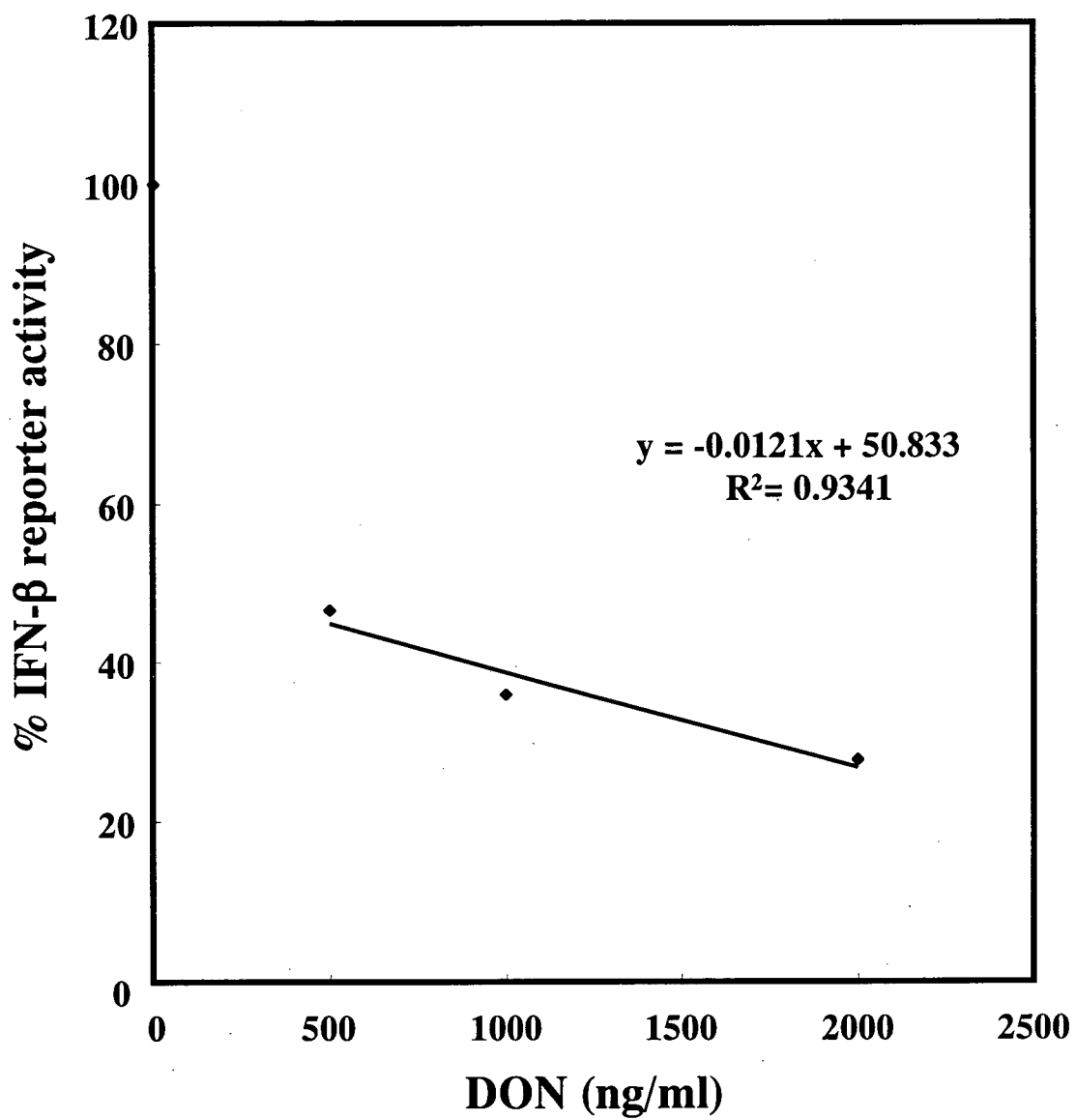


Fig. 3 Relationship of DON concentration and LPS-induced IFN-β reporter activity in the presence of extractions from flour

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

日本人の小麦摂取によるニバレノール曝露量の推定

分担協力者

北里大学医学部 佐藤 敏彦

研究要旨

日本人の小麦摂取によるニバレノール（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。シミュレーションには、59の小麦サンプル中のニバレノールおよびデオキシニバレノール（DON）含有量データと、国民健康・栄養調査における年齢区分別の小麦および小麦食品摂取量データを用いた。これらデータよりそれぞれ1000万件のシミュレーションデータを作成し、これらのデータを掛け合わせたシミュレーションを年齢区分毎に1000万回行った。その結果、DONによる規制(1.1ppm)の下で、NIVの規制値を4つのシナリオ（規制なし、1.0, 0.5, 0.2ppm）でシミュレーションした場合、1歳～6歳までの群で体重1kg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。

研究協力者

斉藤 史朗（東京大学）

A. 研究目的

ニバレノール（NIV）は、デオキシニバレノール（DON）とともに、麦類の病気の一つである赤かび病を起こすフザリウム属のかびから産生されるかび毒である。DONについては、2001年に開催された第56回WHO/FAO合同食品添加物専門家会議（JECFA）におけるリスク評価において、暫定耐容一日摂取量（PTDI）が1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日とされており、わが国では平成14年5月に、厚生労働省により行政上の指導の指針として、小麦のDONの暫定基準値（1.1ppm）が定められている。一方、NIVについては2000年にEUの食品科学委員会（SCF）が暫定的な耐用一日摂取量（t-TDI）として0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日を定めているが、わが国において小麦中の基準値は設定されていない。そこで、今回はいくつかの基準値設定のシナリオを用いて日本人の小麦摂取によるNIV曝露量の分布を求め、基準値設定の基礎資料とすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 小麦中のNIVおよびDON含有量のサンプルデータの作成

全国各地より集められた59の小麦サンプル中のNIVおよびDONを測定し、これを用いてシミュレーション用データセットを作成した。小麦中のDON含有量とNIVの含有量の相関は高いが、検出下限以下の割合が異なるため、サンプルのDONとNIVの検出のされ方により4つのグループに分け（DONのみ検出下限以下、NIVのみ下限以下、いずれも下限以下、いずれも下限以上）、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）。59のサンプルのDONとNIVの含有量の分布については以下の通りである。

表 1. 59 サンプル中の DON および NIV 含有量

(ppm)	DON	NIV	TOTAL
<LOD (0.005)	6	23	5
0.005-	24	21	20
0.05-	11	7	12
0.1-	15	6	14
0.4-	1	2	3
0.6-	0	0	3
1.1-	2	0	2

表 1 のように検出下限以下のサンプル割合は、DON のみが 6 (11.8%)、NIV のみが 23 (39.0%)、いずれも検出下限以下は 5 (8.5%) であった。検出下限以上のサンプルの分布については、DON と NIV の相関を考慮しながら、実際のサンプルデータにもっとも近似するよう対数正規分布を仮定して合計 1000 万件のシミュレーションデータセットを作成した（即ち、シミュレーションデータセットには少数ながらもサンプルデータには見られなかったような高値も含まれることになる）。

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。まず、108 の食品を専門家の意見を参考にしつつ、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を年齢階級別（1～6 歳、7～14 歳、15～19 歳、20 歳以上）に計算した（図 1-1～4）。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、それらを合わせることにより、より適合度の高い分布を得るものとした。この作業により、それぞれ 1000 万件のシミュレーションデータセットを作成した。

3) NIV の曝露量推定

上記の 2 つの 1000 万件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（1.1ppm）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 1.1ppm、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。以上のシミュレーションにはソフトウェアとして Crystal Ball、構造計画研究所社を使用した。

C. 結果

1. 摂取量データのシミュレーション結果

図 1 に、各年齢区分の小麦摂取量のシミュレーションデータの分布を示した（図 2-1～4）。右方に裾を引くような形で、1～6 歳の場合、25g/kg 体重以上の小麦を摂取する人の割合は 2%程度存在することになった。

2. 推定曝露量分布

モンテカルロシミュレーションを行った結果得られた曝露量分布を各年齢区分別に 7 つのシナリオ毎の NIV の推定曝露量分布（図 3-1～28）とパーセンタイル値の表を示す（表 2-1～4）。年齢区分別では、1 歳～6 歳までの群で体重 1 kg 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 1 kg 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 2 ppm」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 μ g/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 μ g/kg 体重/日であった。

D. 考察

NIV については、2000 年に EU の食品科学委員会（SCF）で、暫定的な一日耐容摂取量（t-TDI）を 0.7 μ g/kg 体重/日としている。今回のシミュレーションからは、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