

200837024A

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20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21(2009)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 -----	17
小西 良子	
分析法のバリデーション等に関する研究 -----	59
田中 敏嗣	
カビ毒の消長に関する研究 -----	67
杉山 圭一	
日本人の小麦摂取によるオクラトキシン A 暴露量の推定 -----	79
佐藤 敏彦	
新生児へのゲニスタインおよび $\alpha$ ゼアラレノール暴露の アフラトキシン急性毒性に及ぼす影響 -----	99
熊谷 進	
ニバレノール誘発 IgA 腎症に対する SMTP の修飾作用の検討 -----	109
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

本研究は、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) およびオクラトキシン A (OTA) 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の妥当性評価の検討 3) デオキシニバレノール (DON) およびニバレノール (NIV) の複合毒性の生物学的評価法の確立と評価 4) 日本人の小麦摂取による OTA 曝露量の推定、5) カビ毒の新たな毒性を評価する目的で、新生時期に投与されたゼアラレノンが成熟後にアフラトキシン急性毒性感受性に与える影響および HIGA マウスを NIV のヒト IgA 腎症モデルとして用い、既存の予防治療薬の影響を検討した。

今年度汚染実態調査では、市販食品 13 食品目 195 試料についてフモニシン B1、B2、B3 (FB1, FB2, FB3) を LC/MS-MS を用いて測定した。また、市販食品 20 食品目 379 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測定した。その結果、FB1、B2、B3 は、コーングリッツ類、コーンフレーク、コーンスナック、雑穀米、ビールにおいては 60% 以上の頻度で検出された。昨年度と同様にコーングリッツ類からフモニシン B1 最高値が検出され、その値は 889.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。一方米、生とうもろこし、生アスパラガス、液体コーンスープにおいては定量限界未満であった。OTA は、コーンフレーク等のとうもろこし製品、オートミール、紅茶、ウーロン茶、ブドウジュース、イチジク、米からは検出されなかったが、調査に用いた小麦粉、そば (そば粉) およびパスタでは 50-77.5 %、コリアンダー、チョコレート、ココアおよびインスタントコーヒーからは 80% 以上の頻度で OTA が検出された。最高値はレーズンの 4.24ng/g であった。

カビ毒試験法評価に関しては、今後策定されるカビ毒試験法が、国際的に充分通用する分析法であるかを評価するための「カビ毒試験法評価委員会」を設立し、コラボラティブスタディを実施し、その結果を基に分析法の妥当性の有無を評価した。

今年度は 消化器系および免疫系障害等の毒性があり、穀類に複合汚染するカビ毒、DON および NIV について、通知法による一斉分析法を HPLC-UV および LC-MS を用いコラボラティブスタディの結果を用い、その妥当性を委員会にて評価した。その結果室内併行性、室間併行性等を評価した結果、本分析法の妥当性が認められると判定した。

DON と NIV の複合汚染が問題視されていることから、今年度は昨年報告したバイオアッセイ系が DON と NIV の複合汚染時に適応可能かを検証する目的で、IFN- $\gamma$  がその産生に関与するマクロファージにおけるエンドトキシン誘導性一酸化窒素 (NO) 産生を指標とした DON と NIV 各々単独並びに混合時の影響を検討した。その結果、DON と NIV の共存下では各々単独の処理時と比較し相加と考えられる NO 産生の阻害効果を示した。エンドトキシンで活性化したマクロファージ様細胞からの NO 産生に重要な IFN- $\gamma$  ではあるが、DON と NIV の毒性を評価する場合には不明であった実際の生体への影響が今回初めて明らかとなった。従って、本研究事業で進めているトリコテセン系カビ毒の毒性評価系であるエンドトキシン誘導性 IFN- $\gamma$  レポーターアッセイ系はこれら毒素の複合汚染時の評価にも適応可能であることが示唆された。

カビ毒の新たな毒性評価においては、新生時期でのゲニスタインまたは  $\alpha$  ゼアラレノール暴露による成

熟後におけるアフラトキシン急性毒性に及ぼす影響を究明することを目的として、新生児ラットにゲニスタインまたは $\alpha$ -ゼアラレノールを投与し、血清中 GOT、GGT、GPT、LDH、BUN 活性を測定した。ゲニスタイン投与群は対照群と比べ GOT と GPT は雌雄共に GGT と BUN は雌においてのみ、LDH は雄において有意に低いことが認められた。 $\alpha$ -ゼアラレノール投与群は対照群と比べ、GOT、BUN、GGT は雌雄共に、GPT は雄において、LDH は雌においてそれぞれ有意に低いことが認められた。このことは、新生時期におけるゲニスタインまたは $\alpha$ -ゼアラレノールへの暴露が、成熟時におけるアフラトキシンに対する毒性影響を軽減することを示唆している。また、ヒトの IgA 腎症の成因については不明な点が多く、NIV によってもマウスに IgA 腎症を誘発するが、IgA の糸球体メサンギウム基質への沈着メカニズムを規定する要因は不明である。また、ヒトの IgA 腎症と同様に、IgA 腎症を自然発症する high IgA strain (HIGA) マウスでは、NIV 投与による IgA 腎症では血中 IgA レベルの上昇と腎糸球体への IgA 沈着の促進には相関性がないことから、ヒト発症機序モデルとして有効であることがすでに示されている。そこで今年度では、NIV による IgA 腎症の病態の形成あるいは進行を規定する要因の探索が可能と考えられた。そこで、我々は、組織プロテオリシス活性化化合物で、新規慢性腎疾患治療薬として期待される *Stachybotrys microspora* triprenyl phenols (SMTPs) を用いて、NIV の混餌投与によって BALB/c マウスに誘発される IgA 腎症に対する修飾作用を検討した結果、急性期の IgA 沈着及び、既に沈着した IgA に対して SMTP によって期待されるリモデリング効果による保護ないし修復作用は認められなかった。

次に、小麦のみの実態調査結果を基に、日本人の小麦摂取による OTA 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、140 の小麦サンプル中の OTA 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。1歳～6歳までの群で体重 1 kg あたりの一日曝露量もっとも高くなり、99 パーセンタイル値は、順に、5.22, 5.22, 5.20, 5.20 ng/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 4.0 ng/kg 体重/日以下であった。今回のシミュレーションからは、規制の有無で結果はあまり変わらないことおよび、1歳～6歳の群において 99 パーセンタイル値が 5.0 ng/kg 体重/日を超える結果となったが、1週間換算しても JECFA が暫定的に設けた耐容摂取量 (100 ng/kg) を大きく下回っている。

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

斉藤 史朗 北里大学医学部  
石黒瑛一 (財) 日本食品分析センター  
永山敏廣 東京都健康安全研究センター  
山本勝彦 名古屋学芸大学短期大学部  
内藤成弘 (独) 農業・食品産業技術総合研究  
機構食品総合研究所

鎌田洋一 国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部

大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部

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

中島正博 名古屋市衛生研究所

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

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

和田丈晴 (財) 化学物質評価研究機構

A. 研究目的

カビ毒は気候や気象、土壌の生息菌などに影響を受けるため、人為的操作で制御することが難しい自然毒のひとつである。そのため国際的な機関でのカビ毒汚染への取り組みが為されている。いままでにパツリン、アフラトキシンやオクラト

キシシ A に関しては、コーデックス委員会で食品規格が設定されている。また、国際的に問題となる主要カビ毒についても、WHO/FAO 食品添加物・汚染物合同専門家会議 (JECFA) や欧州食品安全機構 (EFSA) による毒性評価が進んでいる。コーデックス委員会においても農業規範の策定などに取り組んでいる。

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。そのうち、トータルアフラトキシンに関する成果は、食品安全委員会の審議資料となった。一方、OTA および FB については、寄与度の高い食品が限定すること、より正確な暴露評価に資する実態調査データの収集が必要となったため、本研究事業で実態調査をさらに 3 年間継続している。

本研究で行う実態調査に用いる試験法はそのデータの信頼性を左右するものであり、国際的にも評価されるべき性質のものであるので、その妥当性を確保することが極めて重要である。そこで、本研究事業でカビ毒試験法評価委員会を設立し、その妥当性を評価することとした。

つぎに、わが国におけるトリコテセン系カビ毒による共汚染が報告されて久しいが、現在の規制は、DON のみの暫定的基準に留まっている。そのため、法的効力のある基準値を策定する必要があるかを検討するには、複合毒性を指標とする DON と NIV の毒性研究の必要性が高まっている。そこで、昨年度確立した免疫毒性を *in vitro* 法で高感度に検出できる系で測定・評価できるバイオアッセイ法を用いて、DON/NIV 複合毒性を検討した。

暴露評価研究としては、昨年コーデックス委員会で、穀類の OTA を対象に  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  に設定された。それを受けていままでの我が国での小麦汚染のデータより、小麦摂取による OTA の摂取量を推定した。

毒性評価としては、カビ毒の新たな毒性を解明する目的で、2つの研究を行った。一つ目は胎児や新生児へのエストロゲン暴露による

アフラトキシン急性毒性に対する感受性の変化に関する研究、二つ目は NIV によって引き起こされるマウス IgA 腎症に関する研究である。NIV によって引き起こされるマウス IgA 腎症は、その発生機序がヒトの IgA 腎症と類似しているため、今後予防治療薬を考える上で有用なモデルになる。今年度は、既存慢性腎炎治療薬の NIV 起因 IgA 腎症

への効果を検討した。

## B. 研究方法

1) わが国に流通している食品中の FB1, FB2, FB3 および OTA 汚染実態調査

### FB1, FB2, FB3 の分析

試料をミキサーまたは遠心粉砕器で粉砕し混合してから振とう抽出し、イオン交換カートリッジカラムでクリーンアップを行なった。抽出液を LC/MS による分析に供した。この方法で回収率が得られない食品目に関しては、それぞれに適した試験法を確立し測定した。

### OTA の分析

固体試料はミキサーあるいは遠心粉砕器等で粉砕し、均一になるように良く混合してから、食品目に適した抽出液でそれぞれ振とう抽出した。ワイン、ビールなど液体検体については 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。抽出物は、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。測定は HPLC (で行い、確認は LC/MS/MS で行った。

### 汚染推定平均値の算出

それぞれの食品について、定量限界以上の検体の平均値を平均汚染量として計算した。また、検出頻度も定量限界以上の検体数を対象に算出した。

2) 実態調査および規格基準に対応した分析法の妥当性評価の検討

カビ毒試験法評価委員会を設立した。組織は次の通り

委員長：田中敏嗣 (神戸市環境保健研究所)

実務委員：石黒瑛一 (財) 日本食品分析センター)  
伊藤嘉典 (国立医薬品食品衛生研究所  
食品衛生管理部)

永山敏廣 (東京都健康安全研究センター)  
中島正博 (名古屋市衛生研究所)

統計学的評価委員：山本勝彦 (名古屋学芸大学短期大学部)

内藤成弘 (独) 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所)

事務局 (作業部会)：小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

鎌田洋一 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

大西貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

本委員会は、食品のカビ毒分析および統計解析の専門家を集め、将来我が国で基準値が設定された場合に通知法となりうる方法または実態調査に

用いられるカビ毒試験法の妥当性を科学的にオーソライズする委員会とした。AOAC などの手順を参考にして、プロトコルの評価、コラボラティブスタディの結果評価を行う。

3) デオキシニバレノール(DON)およびニバレノール(NIV)の複合毒性の生物学的評価法の確立と評価

マウスマクロファージ RAW264 細胞を用い、37 °C、5 %CO<sub>2</sub>条件下で培養した。

DON (Wako 社製)、NIV (Riedel-de Haën 社製、GERMANY) を標準品として用いた。

*Escherihica coli* 0111:B4 株由来エンドトキシン (Sigma 社製) は滅菌水に溶解し、使用前にソニケーションを行った。

RAW264 細胞を細胞濃度が $2 \times 10^6$  cells/ml となるよう DMEM で細胞を希釈し、96 well plate

(Techno Plastic Products 社製) に 100 ml/well で播種し、37 °C、5 %CO<sub>2</sub>条件下で一晩培養した。培養後、予め調製した DON/NIV およびエンドトキシンを含む DMEM にて培地を置換し、37 °C、5 %CO<sub>2</sub>条件下で 24 時間培養し、培養上清をサンプルとして NO 量の測定に供した。

NO<sub>2</sub>/NO Assay Kit-CII (Colormetric) -Griess Reagent Kit- (同仁化学研究所) を用いて、NO 量を測定した。

#### 4) 日本人の小麦摂取による OTA 曝露量の推定

全国より集められた 140 の小麦サンプル中の OTA を測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。「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。これら 108 の食品の摂取量合計の分布を年齢階級別 (1~6 歳、7~14 歳、15~19 歳、20 歳以上) にとってみると、各年齢階級とも 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て、よりシミュレーションにふさわしい分布とした。それぞれ対数正規分布を仮定し、二つを合わせることで、より適合度の高い分布を得ることができた。この作業により、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。上記の 2 つの 10,000,000 サンプルのデータセット (汚染量のデータセットと摂取量のデータセット) 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、上記の条件で 4 つのシナリオによる 4 つの結果を得た。

- LOQ 未満は LOQ の二分の一の二様分布で規制なし
- LOQ 未満は LOQ の二分の一の二様分布で規制の基準値は 5 μg/kg

• LOQ 未満はゼロで、規制なし

• LOQ 未満はゼロで、規制の基準値は 5 μg/kg (ソフトウエアとして SAS 社の Base SAS を使用)。

#### 5) カビ毒の新しい毒性評価

(1) 胎児や新生児へのエストロゲン暴露アフラトキシン急性毒性への感受性の変化に関する研究

2 日齢の雌雄フィッシャーラット (F344) にゲニスタイン (2 mg/ラット) または αゼアラレノール (2.5 mg/ラット) を皮下投与後、2 ヶ月齢時にアフラトキシン (1.5 ml/kg、1.5 mg/ml DMSO) を皮下投与し、投与 48 時間後にエーデル麻酔下で採血し、と殺後に肝臓を摘出した。

血液から血清を分離し、血液を生化学検査キットを用いて血清中 GOT、GGT、GPT、LDH、BUN 各活性を測定した。肝臓は常法に従い、組織切片とし、病理組織学的検索を行った。対照として、溶媒である DMSO を投与したラットおよび無処理ラットを用いた。

(2) NIV によって引き起こされるマウス IgA 腎症に関する研究

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。NIV を 24 ppm の混餌用量で Higa マウスに投与して IgA 腎症を誘発するモデルで、*Stachybotrys microspora* triprenyl phenols を 10 mg/kg/日、週 3 回の割合で、8 週間の間 NIV と同時投与する群、ないし 16 週間 NIV を投与して最後の 4 週間に *Stachybotrys microspora* triprenyl phenols を投与する群を設定して実験を行った。

NIV の投与量及び投与期間については、昨年までに我々が実施した BALB/c マウスを用いた NIV 誘発 IgA 腎症モデルを基にして 24 ppm と設定した。解剖時には、腎臓を摘出して重量を測定後、短軸・長軸方向に半割した組織について、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定するか、OCT compound にて包埋後、ドライアイス上で急速凍結した。ホルマリン固定標本については、定法に従ってパラフィン包埋後、薄切、ヘマトキシリンエオジン染色ならびに PAS 染色を施した。凍結組織材料については、クリオスタットにて約 4 μm に薄切し、-20°C で 5 分間アセトン固定した切片について、蛍光免疫染色を実施した。糸球体における IgA 分布及び強度については、200 倍視野で 1 個体につきランダムに 5 ヶ所観察し、0~3 のスコアをつけて評価した。

統計学的解析は、体重、血清 IgA・IgG 濃度、臓器重量について各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は Turkey の多重比較を行

い、不等分散の場合はSteel-Dwassの多重比較検定を行った。

### C. 研究結果

1) わが国に流通している食品中のFB1, FB2, FB3およびOTA汚染実態調査

FB1, FB2, FB3の汚染は、検出率としては、コーングリッツ類およびコーンフレークは100%、コーンスナックは90%、雑穀米は83.3%、ビールにおいては60%であった。ポップコーンは昨年度と異なり、検出率は33%に留まっていた。コーングリッツ類の陽性平均汚染濃度は例年高い水準であったが、今年度のコーングリッツ類からもFB1が最高値889.6 $\mu$ g/kgが検出され、昨年を上回っていた。とうもろこし製品のコーンフレーク、コーンスナックのFB1の最高値は、100 $\mu$ g/kg以上であった。大豆からは10検体中1検体から検出され、FB1のみの汚染であった。今年度、FB1, FB2, FB3のすべてが検出された食品目はコーングリッツ類、ポップコーン、コーンフレーク、コーンスナック、雑穀米、ビールであった。いずれもFB1が最も高かった。コーンスープ粉末では検出された。しかし10検体中1検体であった。米、生とうもろこし、生とうもろこし、液体コーンスープにおいてはいずれも定量限界未満であった。(表1, 図1)。

OTAの汚染は、小麦粉では50%、ライ麦では10%、大麦では20%、焙煎コーヒーでは15%、缶コーヒーでは30%、インスタントコーヒーでは96.7%、ビールでは30%、ワインでは25%、ココアでは100%、チョコレートでは78.3%、コリアンダーでは81.8%、レーズンでは31.8%、コリアンダーでは81.8%、そば(そば粉)では60%、パスタでは77.5%の頻度で検出され、特に、レーズンの汚染度は比較的高く、最高4.24 ng/gの汚染が認められた。インスタントコーヒーは検出頻度も高く陽性検体平均汚染量も0.8 ng/gであり、最高値は2.26 ng/gであった。コリアンダーは昨年に引き続き検出されたが、その陽性検体平均汚染量も0.9 ng/gであり、最高値は2.84 ng/gであった。一方コーンフレーク等のとうもろこし製品、オートミール、紅茶、ウーロン茶、ブドウジュース、イチジク、米からは検出されなかった。(表2, 図2)。

2) 実態調査および規格基準に対応した分析法の妥当性評価の検討

(1) デオキシニバレノールおよびニバレノールの一斉分析法

1) HPLC-UVを用いたDON/NIVの一斉分析法

2) LC/MS (LC/MS/MS)を用いたDON/NIVの一斉分析法

(2) カビ毒試験法評価委員会による評価は、妥当性試験から得られた有データーの、室内併行性(RSD<sub>r</sub>)と室間併行性(RSD<sub>b</sub>)を算出し、その値からHorRat値を評価した。本コラボラティブスタディに用いた添加量である0.1 mg/kgから1.0 mg/kgまでの範囲において、本分析法の妥当性は認められると判断された。また、本試験で用いた2種類の多機能カラムにおける有意な分析値の差は認められず、両者とも分析法に使用するのに問題はないと判断された。

3) デオキシニバレノール(DON)およびニバレノール(NIV)の複合毒性の生物学的評価法の確立と評価

RAW264においてエンドトキシンによる誘導されるNO産生におよぼすNIVの影響を検討した。その結果、エンドトキシン誘導性NO産生量は500 ng/ml以上のNIV存在下では顕著に抑制された。すなわち、NIVはRAW264細胞においてエンドトキシン誘導性NO産生を抑制する可能性が認められた。そこで本作用を指標に両毒素の複合毒性を検討するために、次に前述のNIVと同様のアッセイ系でDONのエンドトキシン誘導性NO産生への抑制作用を確認した。エンドトキシン誘導性NO産生量は、NIVと同様に500 ng/ml以上のDON存在下では顕著に抑制されることが確認された。

エンドトキシン誘導性NO産生を指標にDONとNIVの複合毒性を検討した。両毒素が等量で存在する場合、両毒素の総量が500 ng/ml以上の濃度において顕著な抑制作用が認められた。分子あたりとして毒性を評価するために、モル濃度あたりの両毒素の複合毒性を検討した。DONもしくはNIV単独でエンドトキシン誘導性NO産生の抑制作用が認められない濃度である0.6 mM (DON: 約177.6 ng/ml, NIV: 約187.4 ng/ml) にさらにNIVもしくはDONを加えた場合、両毒素とも少なくとも1.5 mM (DON: 約444 ng/ml, NIV: 約468.5 ng/ml) 以上で顕著なエンドトキシン誘導性NO産生の抑制作用が認められた。

これらの結果から、マウスマクロファージ様細胞RAW264を用いたエンドトキシン誘導性NO産生を指標にした場合、DONとNIVの複合毒性は、それぞれ単独での毒性の相加として評価可能であることが示唆された。

4) 日本人の小麦摂取によるOTA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、得られた曝露量分布を各年齢区分別に4つのシナリオ毎のOTAの推定曝露量分布とバセンタイル値を推定した。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がもっとも高くなり、年齢が上がるにつれて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「規制なし」の場合の曝露量の方が高くなっているが、差は僅かである。「1歳～6歳までの群の99パーセンタイル値でみると、規制がない場合は5.22 ng/kg 体重/日、規制を設けた場合でも5.20 ng/kg 体重/日となった。7歳以上の群では、99パーセンタイル値は、いずれも4.0ng/kg 体重/日未満であった。

#### 5) カビ毒の新しい毒性評価

##### (1) 胎児や新生児へのエストロゲン暴露アフラトキシン急性毒性への感受性の変化に関する研究

体重に関してはいずれの群間にも有意差は認められなかった。ゲニスタイン暴露群は、対照群と比べ、GOTとGPTについては雌雄共に、GGTとBUNについては雄において、LDHについては雌において、それぞれ有意に低値を示した。αゼアラレノール投与群は、対照群と比べ、GOT、BUN、とGGTについては雌雄共に、GPTについては雄において、LDHについては雌においてそれぞれ有意に低値を示した。

アフラトキシン単独では顕著な病理組織学的変化を招来したが、ゲニスタイン暴露とαゼアラレノール暴露の両群とも、対照群と比べ明確な相違は認められなかった。

##### (2) NIVによって引き起こされるマウス IgA 腎症に関する研究

2つの実験を行った。実験1はNIVによる急性期のIgA沈着に対するSMTPの修飾作用の検討を行った。血清IgA及びIgG濃度測定の結果では、血清IgA濃度は、対照群と比べてNIV単独群及びNIV+SMTP併用群において有意な上昇が認められたものの、NIV単独群とNIV+SMTP併用における差は認められなかった。糸球体へのIgA沈着に関する解析結果から、IgAについては、対照群では糸球体にほとんど蛍光が観察されなかったが、NIV単独群およびNIV+SMTP併用群では糸球体メザンギウム領域においてIgAの顕著な顆粒状沈着が認められた。しかし、NIV単独群とNIV+SMTP併用群の間で、腎糸球体における蛍光強度に明らかな差は認められなかった。実験2においては、NIVによるIgA腎症病態進行に対するSMTPの修飾作用の検討を行った。血清IgA及びIgG濃度測定の結果から、NIV投与群及びNIV+SMTP投与群の血清IgA濃度は、対照群と比較してNIV投与群とNIV+SMTP投与群で高値を示したものの、NIV投与群とNIV+SMTP投与群における差は認められなかった。糸球体へのIgA沈着の解析から、IgAについては、NIV投与及びNIV+SMTP投与群において、メザンギ

ウム領域を中心にIgA沈着が認められられたものの、これらの沈着において、SMTP投与による明らかな影響は観察されなかった。

#### D. 考察

##### 1) わが国に流通している食品中のFB1, FB2, FB3およびOTA汚染実態調査

我が国のフモニシンの汚染を見てみると大豆、生鮮アスパラガスにも低濃度の汚染がみられたが、とうもろこしは加工品も含めてフモニシンの汚染への寄与率が最も高い食品であった。また、今年度の実態調査では雑穀米に頻度高く検出された。我が国の健康食品ブームでその消費量は増えていることから寄与率の高い食品として考慮すべき食品であろう。カナダでは朝食用シリアルの実態調査から、フモニシンおよびOTAとも30%の頻度で検出されている。ポルトガルではとうもろこしペースの加工品からFB1, FB2が検出されており、コーンミールから検出率が高かった。

近年エーゲ海地域を生産地とする乾燥イチジクからのフモニシン汚染が報告されている。1

これらの報告から、フモニシン汚染の食品群は今後増える傾向にあること、その汚染生産地も広がりつつあることを考慮して実態調査を進めていく必要がある。

OTAは、ココア、インスタントコーヒーの汚染頻度が昨年度に続き100%近い値を示していたが、年齢層によっては慢性的に大量に摂取するグループもあり、その基準値設定も視野に入れる必要があるかもしれない。

我が国では米、小麦、そばが主食であるが、これらの穀物にもOTA汚染があるレベル検出される場合には、積極的に基準値設定を考えるべきであろう。今年度までの実態調査では米からのOTA汚染は検出されていない。しかし、諸外国では米への汚染が報告されており、OTAの汚染食品の一つであることは否めない。パスタやそばは我が国でも頻度高くOTAが検出されているが、暴露評価の結果においては、基準値策定を検討する可能性があらう。

##### 2) 実態調査および規格基準に対応した分析法の妥当性評価の検討

本研究事業で設立されたカビ毒試験法評価委員会は、コラボラティブスタディのプロトコールおよび結果を第3者が評価する方法として非常に優れている。今年度評価を行ったDON/NIVの一斉分析は、LC/MS/MSにおいて感度が高く、今後実態調査の測定法として妥当性があることが確認された。なお、HPLC分析では、LC/MS/MSと比較するとその感度は劣るが、規格基準が策定された場合には、その試験法として十分に耐えることが明らかとな

った。

3) デオキシニバレノール(DON)およびニバレノール(NIV)の複合毒性の生物学的評価法の確立と評価

昨年度の分担研究として、マクロファージ様細胞におけるDONによるエンドトキシン誘導性IFN- $\beta$ レポーター活性の阻害を報告したが、本アッセイ系は測定が比較的簡便であり、また同活性に対するDONの阻害が比較的低濃度(約125 ng/ml)から認められ、且つ得られた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ものであったことから、DONの毒性のバイオアッセイ系として有望な測定系の1つと考えられた。しかし、その生物学的意義については明確な答えは得られてはいなかった。今年度は、活性化マクロファージより産生されるNOに対するDONとNIVの影響を検討した。本研究では新規な毒性として今回初めて活性化マクロファージからのNO産生に及ぼすDONとNIVの影響を検討した。その結果、共存下の場合等量混合の場合ではDONとNIVの各々の毒素単独処理時の効果の和に相当するレベルであったことが明らかとなった。この結果は少なくとも、DONとNIVのエンドトキシン誘導性NO産生への阻害において、その作用点が共通していることを予想させる。この推測は、DONとNIVの複合毒性を分子あたりで検討した結果からも支持されるものと考えられる。今回得られた結果はその意義を明確にし、トリコテセン系カビ毒の毒性評価へのエンドトキシン誘導性IFN- $\beta$ レポーター活性の適応の妥当性を高めたものといえる。今後は、DON/NIVを含むトリコテセン系カビ毒の基準値策定にあつたの科学的根拠として、トリコテセン系カビ毒の毒性として最も危惧される免疫毒性を感度よく検出できる本評価法を活用して、DON/NIV以外のトリコテセン系カビ毒との複合汚染も検討する必要がある。

4) 日本人の小麦摂取によるOTA曝露量の推定

OTAについては、2007年にJECFAで、従来から用いられてきた暫定的評価基準である一週間耐容摂取量100ng/kgを用いてリスク評価を行うこととなった。今回のシミュレーションからは、曝露量の一番多い即ち、1~6歳群においても99%点での一日の曝露量は5.22ng/kg体重/日となっている。この結果は、単純に7倍して一週間の曝露量を計算した場合でも、たかだか40ng/kg体重/日にすぎない。

それゆえ、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る。

最後に、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ない高値のデータが存在する可能性がある。

しかし、実際に小麦含有食品の摂取について、考え得る最大の摂取量と考えられるものを基準値として設け、それ以上の摂取をデータから削除して得た結果と比べてみてもさほどの違いは見られなかったため、数理シミュレーションによる非現実的な結果が今回の分析結果を左右しているものとは考えられない。

5) カビ毒の新しい毒性評価

(1) 胎児や新生児へのエストロゲン暴露アフラトキシン急性毒性への感受性の変化に関する研究

新生時期にエストロゲン活性をもつゲニスタインおよび $\alpha$ -ゼアラレノールに暴露されると、成熟時でのアフラトキシンの毒性が減弱されることが示唆された。ただし、その毒性低減化は、アフラトキシンB<sub>1</sub>1.5 mg/kg投与によって誘起された肝臓の病理組織学的傷害を軽減するには至らなかった。

本研究で認められたアフラトキシンの毒性に対する感受性の低下は、肝臓におけるアフラトキシンB<sub>1</sub>の代謝変化を反映したものと考えられ、新生時期におけるゲニスタインや $\alpha$ -ゼアラレノールへの暴露は、その後の内分泌機能の発達を不可逆的に障害し、その結果、アフラトキシンの活性化や解毒に関わる肝臓のグルタチントランスフェラーゼやチトクロームP450の活性を変化させることによるものと考えられる。

(2) NIVによって引き起こされるマウスIgA腎症に関する研究

BALB/cマウスを用いたNIVにより誘発されるIgA腎症において、8週間のSMTP併用投与による修飾作用について、IgA及びIgGの血清中濃度ならびに糸球体へのIgAの沈着を検討した。その結果、NIVの単独投与群及びNIV+SMTP併用投与群では、血清中IgA濃度の上昇が観察され、さらに糸球体へのIgA沈着が認められたものの、SMTP投与による明らかな変化は認められなかった。

また、本IgA腎症モデルにおいて、16週間NIVを投与し最後の4週間のみSMTPを短期投与することにより、腎症がより進行した時期でのSMTPの反応性を検討した結果、NIV投与群及びNIV+SMTP投与群で、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ものの、SMTP投与による変化は認められなかった。以上の結果は、既に沈着したIgAに対して

SMTP によって期待されるリモデリング効果による修復作用は認められないと考えられた。

#### E. 結論

今年度、市販食品13食品目195試料のFB1, FB2, FB3を分析した結果、米、生とうもろこし、生とうもろこし、液体コーンスープにおいては定量限界未満であった。コーングリッツ類、コーンフレーク、コーンスナック、雑穀米、ビールにおいて頻度高く検出され、昨年度と同様にコーングリッツ類からはフモニシン B1最高値 889.6 µg/kg が検出された。

OTAは20食品目379検体を対象に測定した結果、コーンフレーク等のとうもろこし製品、オートミール、紅茶、ウーロン茶、ブドウジュース、乾燥イチジク、米からは検出されなかったが、小麦粉、ライ麦、大麦、焙煎コーヒー、缶コーヒー、インスタントコーヒー、ビールコリアンダー、ワイン、ココア、チョコレート、レーズン、パスタ、そば（そば粉）およびパスタから検出された。特に、レーズンの汚染度は比較的高く、最高 4.24 ng/g の汚染が認められた。ワインも頻度は低いものの比較的汚染濃度が高かった。

今年度の結果から、OTAおよびFBの暴露に寄与率の高い食品がより浮き彫りとなった。また、カビ毒は年次変化が著しいことが裏付けられ、通年の実態調査の重要性が示唆された。今後は寄与率の高い食品の情報をさらに収集し精度を高め、基準値策定の検討に資するデータとする。

また、平成16年度から18年度に行った実態調査の結果と昨年度および今年度の結果を、主な食品目に注目し、平均汚染量および検出頻度を比較してみると、コーングリッツ類のFB1の汚染濃度が先の3年間の平均より10倍程度高くなっている変化が認められた。OTAにおいてもワインやレーズンの平均汚染量が近年高くなっていることが明らかになった。

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。

今回DONとNIVの免疫毒性として、エンドトキシンにより活性化されたマクロファージ様細胞からのNO産生に対する阻害作用が評価系として利用できることを明らかにした。また、その複合毒性

は各々の毒素の相加として評価可能と考えられる結果を得た。従って、昨年度に実施したエンドトキシン誘導性IFN- $\gamma$ レポーター活性を用いたトリコセシン系カビ毒の毒性評価法が、生体への影響を反映したものであることが強く示唆され、消長を含むトリコセシン系カビ毒複合汚染原料の毒性評価にIFN- $\gamma$ レポーターアッセイが適用できる可能性を示している。

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。カビ毒のゼアラレノン、エストロゲン様作用を有するが、エストロゲン様化学物質（ゲニスタインまたは $\alpha$ -ゼアラレノール）に新生児のときに暴露されると、成熟時におけるアフラトキシンに対する毒性影響を軽減することが示唆された。

また、NIVはHigaマウスIgA腎症がヒトIgA腎症の良いモデルとなることが示されているが、現在既存の慢性腎臓治療薬での改善が見られないことが明らかになり、いままでも知られていないIgA腎症の機序が存在する可能性が示唆された。

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率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、信頼にたる科学的根拠の提供のために不可欠であると考えられる。

#### F. 研究業績

##### 【論文】

1. 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, *J. Food Hyg. Soc. Japan* 49, 352-355 (2008).
2. Sugiyama, K., Tanaka, H., Kamata, Y., Tanaka, T. and Sugita-Konishi, Y. A reduced rate of deoxynivalenol and nivalenol during bread production from wheat flour in Japan, *Mycotoxins* 59, 1-6 (2009).
3. 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 and*

Chemical Toxicology, 46,125-135 (2008)

4.Kubosaki, A., Aihara, M., Park, B- J., Sugiura, Y., Shibusaki, M., Hirose, M., Suzuki, Y., Takatori, K., Sugita-Konishi, Y., Immunotoxicity of Nivalenol after Subchronic Dietary Exposure to Rats. Food and Chemical Toxicology, 46, 253-258 (2008)

5.Poapolathep, A., Poapolathep, S., Sugita-Konishi Y., Imsilp, K., Tasanawat T., Sinthusing C., Itoh Y and Kumagai, S. Fate of fusarenon-X in broilers and ducks. Poultry Sci., 87, 1510-15. (2008)

6.Poapolathep, A., Poapolathep, S., Klangkaew, N., Sugita-Konishi, Y., and Kumagai, S. Detection of deoxynivalenol contamination in wheat products in Thailand. Poultry Sci., 71, 1931-33. (2008)

7. Dong, K., Sugita-Konishi, Y., Yu, J., Tulayakul, P., 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)

8. Yoshinari, T.; Yaguchi, A.; Takahashi-Ando, N.; Kimura, M.; Takahashi, H.; Nakajima, T., Sugita-Konishi, Y.; Nagasawa, H.; Sakuda, S., Spiroethers of German chamomile inhibit production of aflatoxin G1 and trichothecene mycotoxin by inhibiting cytochrome P450 monooxygenases involved in their biosynthesis. FEMS Microbiology Letters, 284,184-190, (2008)

9.Mizutani, K., Hirasawa, Y., Sugita-Konishi, Y., Mochizuki, N., Morita, H., Structural and conformational analysis of hydroxycyclochlorotene and cyclochlorotene, chlorinated cyclic peptides from *Penicillium islandicum*. J.Nat.Prod., 71, 1297-1300 (2008)

10.Kumagai S.I, Nakajima M., Tabata S., Tanaka T., Norizuki H., Itoh Y., Sato T., Saito S., Yoshiike N., Takatori K.II, Sugita-Konishi Y., Surveillance of mycotoxin contamination in retail foods and exposure assessment based on it in Japan, Food additives and contamination, 25, 1101-1106 (2008)

11. Sugita-Konishi, Y., A. Kubosaki, M. Aihara, B.J.Park, T. Tanaka, Y. Suzuki, K. Takatori, M. Hirose, M. Shibusaki, Nivalenol targets female reproductive system as well as hematopoietic and immune systems in rats after 90-day exposure through diet. Food additives and contamination, 25, 1118-1127 (2008)

12. Mochizuki, N., Hoshino, M., Suga, K.,

Sugita-Konishi, Y., Identification of an interfering substrate in apple juice and improvement for determination of patulin with HPLC analyses. J.Food Protection. in press, (2009)

13.Mizutani, K., Kumagai, S., Mochizuki, N., Kitagawa, Y., Sugita-Konishi, Y., Determination of yellow rice toxin, Luteoskyrin, in rice using liquid chromatography/ tandem mass spectrometric with electrospray ionization. J.Food Protection, in press (2009).

14.Yaguchi, A., Yoshinari, T., Tsuyuki, R., Takahashi, H., Nakajima, T., Sugita-Konishi, Y., Nagasawa, H., Sakuda, S., Isolation and identification of precocenes and piperitone from essential oils as specific inhibitors of trichothecene production by *Fusarium graminearum*" J.Agric.Food Chem. in press (2009)

15.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, 870-873. (2008)

#### 【総説・解説】

1. 杉山圭一：第47回 SOTにおけるマイコトキシン関連研究発表の動向 (From 47<sup>th</sup> SOT meeting), *Mycotoxins*, **58**, 155-157 (2008) .

2. 杉山圭一：自然免疫からみた免疫毒性 (An innate immunity-based approach for examining immunotoxicity -Bacteriology has led me to the field of immunotoxicology-) , *ImmunoTox Letter*, **13**, 8-9 (2008) .

3. 杉山圭一：麹菌と *Aspergillus* 属についての一考察, 生物工学会誌 **86**, 557 (2008) .

4. 杉山圭一, 小西良子：わが国におけるカビ毒による食中毒とその現状, 公衆衛生. **73**, 101-103 (2009) .

#### 【プロシーディング】

Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y: Effect of deoxynivalenol and nivalenol on LPS-induced nitric oxide production by mouse macrophages, *Innate Immunity*, **14**, 48 (2008).

#### 【招待講演】

杉山圭一, 小西良子：食品成分を用いたマイコトキシン毒性制御のアプローチ, 東京大学大学院農学生命科学研究科 食の安全研究センターシンポジウム (日本農芸化学会 蕨田セミナー), 2009年3月10日.

【学会発表】

1) Takino M, Sugita-Konishi Y, Pestka J: Determination of macrocyclic trichothecenes in a water damaged house by LC/MS.

The 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry  
Denver, Colorado, 2008.6,

2) Tsunoda M, Tsunoda H, Itai K, Zhang Y, Kodama Y, Sugita-Konishi Y, Katagiri H, Hosokawa M, Sugaya C, Inoue Y, Miki T, Kudo Y, Satoh T, Aizawa Y: Effect of fluoride on viability and splenic cytokine productions of male hereditary nephrotic mice after oral administration. 28th International Society for Fluoride Research 2008.8, Toronto, Canada

3) 杉山圭一、齊藤史朗、佐藤敏彦、鎌田洋一、田中宏輝、田中敏嗣、小西良子：わが国に流通している国産小麦由来食パン等におけるDONおよびNIVの減衰に関する研究、日本マイコトキシン学会第64回学術講演会講演要旨集 27 (2008, 8)。

4) 滝埜昌彦、亀井克彦、落合恵理、小西良子：LC/TOF-MSおよびLC/MS/MSを用いた真菌中の大環状トリコセチン類及びグリオトキシンの分析。第64回日本マイコトキシン学会学術講演会、名古屋、2008.8

5) Poapolathep A, Poapolathep S, Sugita-Konishi Y, Machii K, Itoh Y, Kumagai S: Effect of naringenin on dispositions of deoxynivalenol in pigs. 第64回日本マイコトキシン学会学術講演会、名古屋、2008.8

6) Poapolathep S, Poapolathep A, Sugita-Konishi Y, Machii K, Kumagai S: The effect of oral administration of curcumin on aflatoxin B1 metabolism and its acute toxicity in rats.

第64回日本マイコトキシン学会学術講演会、名古屋、2008.8

7) 露木利枝、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：精油に含まれるデオキシニバレノール生産阻害物質。第64回日本マイコトキシン学会学術講演会、名古屋、2008.8

8) 杉山圭一、室井正志、栗袋裕二、棚元憲一、芳賀 実、小西良子：デオキシニバレノールの Toll-like receptor シグナル伝達系に対する作用機構の解析、第15回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集 78 (2008, 9)。

9) 杉山圭一、室井正志、棚元憲一、小西良子：マウスマクロファージにおける LPS 誘導性

NO 産生に与えるデオキシニバレノールおよびニバレノールの影響、第14回日本エンドトキシン研究会、プログラム・講演抄録集、34 (2008, 10)。

10) 門田智之、伊藤勇二、竹澤陽子、坂元雄二、Maragos Chris、小西良子、田中敏嗣：SPRによる小麦中のニバレノール及びデオキシニバレノールの迅速分析法の検討。第96回学術講演会日本食品衛生学会、神戸、2008.9

11) 中島正博、永山敏廣、石黒瑛一、内藤成弘、伊藤嘉典、鎌田洋一、小西良子、山本勝彦、田中敏嗣：デオキシニバレノール及びニバレノール同時分析法妥当性試験の評価。第96回学術講演会日本食品衛生学会、神戸、2008.9

12) 佐久間久子、鎌田洋一、佐藤敏彦、齊藤史朗、小西良子：バター・チーズ中のアフラトキシン M1 分析法の検討。第96回学術講演会日本食品衛生学会、神戸、2008.9

13) 青山幸二、中島正博、堤 徹、法月廣子、小木曾基樹、石黒瑛一、甲斐茂美、田端節子、山口茂明、前田 守、田中敏嗣、杉山圭一、伊藤嘉典、小西良子：日本に流通する食品中のオクラトキシン A およびフモニン汚染実態調査 (平成19年度)、第96回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 98 (2008)。

14) 齊藤史朗、佐藤敏彦、田中敏嗣、高橋正紀、田中宏輝、小木曾基樹、前田 守、杉山圭一、小西良子：国産小麦粉中のNIVの汚染実態とそれに基づいた暴露評価、第96回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 99 (2008, 9)。

15) Sugita-Konishi Y, Sugiyama K, Saito S, Sato T, Maragos C, Kodaka T, Takezawa Y, Kamata Y, Tanaka T: Co-contamination of DON and NIV in domestic flour in Japan: Survey, intake, reduction and rapid assay. UJNR Panel meeting, New Orleans, LA., 2008.11

16) Kadota T, Ito Y, Takezawa Y, Sakamoto Y, Maragos C, Nakajima T, Tanaka T, Sugita-Konishi Y: Rapid screening assay for the detection of Nivalenol and Deoxynivalenol using monoclonal antibody and Surface Plasmon Resonance.

The fifth conference of The World Mycotoxin Forum  
Noordwijk aan Zee, the Netherlands, 2008.11

17) 滝埜昌彦、落合恵理、亀井克彦、小西良子：LC/TOF-MSを用いた *Stachbotrys chartarum* 及び *Aspergillus fumigatus* のキャラクタリゼーション。

第65回日本マイコトキシン学会学術講演会, 多摩, 東京, 2009.1

18) 落合恵理, 亀井克彦, 滝埜昌彦, 小西良子, 矢口貴志, 松澤哲宏, 佐藤綾香, 永吉 優, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* によるマイコトキシン産生性についての検討  
真菌症フォーラム第10回学術集会, 名古屋, 2009.2

19) 井上 薫, 吉田 緑, 高橋美和, 小西良子, 西川秋佳: ニバレノール短期間投与による遺伝性ネフローゼモデルマウスの腎病変に及ぼす影響  
第25回日本毒生病理学会総会及び学術集会, 浜松, 2009.1

20) Poapolathep A, Poapolathep S, Sugita-Konishi Y, Machii K, Itoh Y, Kumagai S: Effect of naringenin on dispositions of deoxynivalenol in piglets.

SOT 48th Annual Meeting & Tox Expo, Baltimore Maryland, 2009.3

21) Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y: Effect of deoxynivalenol and nivalenol on LPS-induced nitric oxide production by mouse macrophages, The 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society, 48 (2008)

22) 杉山圭一, 川上 浩, 鎌田洋一, 小西良子: マクロファージのLPS誘導性NO産生を指標としたデオキシニバレノールとニバレノールの複合毒性の解析, 日本農芸化学会大会講演要旨集 (2009・福岡) 212 (2009,3) .

## 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  
和田文晴 (財)化学物質評価研究機構

要旨

市販食品 13 食品目 195 試料についてフモニシン B1、B2、B3 (FB1、FB2、FB3) を LC/MS-MS を用いて測定した。また、市販食品 20 食品目 379 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測定した。その結果、FB1、B2、B3 は、コーングリッツ類、コーンフレーク、コーンスナック、雑穀米、ビールにおいて 60% 以上の頻度で検出された。昨年度と同様にコーングリッツ類からフモニシン B1 最高値が検出され、その値は 889.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。一方、米、生とうもろこし、生アスパラガス、液体コーンスープにおいては定量限界未満であった。OTA は、コーンフレーク等のとうもろこし製品、オートミール、紅茶、ウーロン茶、ブドウジュース、イチジク、米からは検出されなかったが、調査に用いた小麦粉、そば (そば粉) およびバスタでは 50-77.5%、コリアンダー、チョコレート、ココアおよびインスタントコーヒーからは 80% 以上の頻度で OTA が検出された。最高値はレーズンの 4.24  $\text{ng}/\text{g}$  であった。平成 16-18 年度に行った実態調査のときの結果と比べると、FB1 はコーンフレーク、雑穀米でその検出頻度が上昇傾向にあることが分かった。汚染量もコーングリッツ類において 10 倍近く増えている傾向にあった。OTA 汚染ではバスタの検出頻度が年々上昇傾向にあり、インスタントコーヒー、チョコレート、ココアは恒常的に検出されることが明らかになった。汚染量はレーズン、ワインで今年度は高めであった。

A. 研究目的

近年食品に汚染するカビ毒の危害が認識され、国際的にも規格基準の策定が進んでいる。昨年開かれたコーデックス規格部会では、木の実を対象としたトータルアフラトキシン

および穀類を対象としたオクラトキシン A (OTA) の規格基準が設定された。

フモニシンに対する規格基準もコーデックス規格部会ではまだ検討段階に至らないが、アメリカ、ヨーロッパを始めとする諸外国では、すでにトウモロコシ加工品を中心に基準が設定されている。

このように国際的にはカビ毒に対する対策が着々ととられているにも関わらず、我が国においては、基準値が定められているのはパツリンのみであり、アフラトキシン B1 は食品衛生法第 6 条 2 項により規定され、デオキシニバレンロールにおいては暫定的基準値により対処している。現在我が国の輸入食品への依存率は増加の一途をたどっており、その食品の種類も、多様化していくことが予想される。このような状況において、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・暴露評価に関するデータは十分には得られていない。

わおはわおは、トータルアフラトキシン、OTA、フモニシン(FB)を対象に平成16年度から18年度までの3年間厚生労働科学研究事業において、通年実態調査を行った。その結果、また我が国で基準のない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ることが明らかになった。しかし、正確な暴露評価を行うためには、寄与率の高い食品の選定、暴露評価に耐え得る検体数を確保する必要があるため、平成19年度からさらに3年間の実態調査を続けることとなった。

昨年度は平成16年度から18年度の結果を基に、OTAではパスタ、レーズン、チョコレート、インスタントコーヒー、ココアが、FB1、FB2、FB3ではコーンスナック、コーングリッツ、ポップコーン、コーンフレーク、大豆、ビールが寄与率の高い食品と推定されたので、これら食品を対象に、1食品目の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。今年度も昨年度対象にした食品目に紅茶やコリアンダーを加え測定を行った。

#### FB1、FB2、FB3の分析

試料をミキサーまたは遠心粉砕器で粉砕し混合してから、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(9.9+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 $\alpha$ -アミラーゼ及び $\beta$ -マンノシダーゼで処理したのち、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、検出限界は、食品別に附表に記載した。

#### OTAの分析

固体試料はミキサーあるいは遠心粉砕器等で粉砕し、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、溶離液で溶離後、HPLC(ODSカラム: 4.6mm i. d.  $\times$  250mm, 5 $\mu$ m, 移動相: アセトニトリル-水-酢酸(55+43+2)、流速: 1ml/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、検出限界は、食品別に附表に記載した。

#### 汚染推定平均値の算出

それぞれの食品について、定量限界以上の検体の平均値を平均汚染量として計算した。また、検出頻度も定量限界以上の検体数を対象に算出した。

#### C. 研究結果

FB1、FB2、FB3の汚染は、米、生とうもろこし、生とうもろこし、液体コーンスープにおいてはいずれも定量限界未満であった。検出率としては、コーングリッツ類およびコーンフレークは100%、コーンスナックは90%、雑穀米は83.3%、ビールにおいては60%であった。ポップコーンは昨年度と異なり、検出率は33%に留まっていた。コーングリッツ類のFB1の陽性平均汚染濃度は例年高い水準であったが、今年度のコーングリッツ類からもFB1が最高値889.6 $\mu$ g/kgが検出され、昨年を上回っていた。とうもろこし製品のコーンフレーク、コーンスナックのFB1の最高値は、100 $\mu$ g/kg以上であった。大豆からは10検体中1検体から検出され、FB1のみの汚染であった。今年度、FB1、FB2、FB3のすべてが検出された食品目はコーングリッツ類、ポップコーン、コーンフレーク、コーンスナック、雑穀米、ビールであった。いずれもFB1が最も高かった。コーンスープからは液状では検出されなかったが、粉末では検出された。しかし10検体中1検体であった(表1、図1)。

OTAの汚染は、コーンフレーク等のとうもろこし製品、オートミール、紅茶、ウーロン茶、ブドウジュース、イチジク、米からは検出されなかったが、小麦粉では50%、ライ麦では10%、大麦では20%、焙煎コーヒーでは15%、缶コーヒーでは30%、インスタントコーヒーでは96.7%、ビールでは30%、ワインでは

25%、ココアでは100%、チョコレートでは78.3%、コリアンダーでは81.8%、レーズンでは31.8%、コリアンダーでは81.8%、そば(そば粉)では60%、パスタでは77.5%の頻度で検出された。特に、レーズンの汚染度は比較的高く、最高4.24 ng/gの汚染が認められた。インスタントコーヒーは検出頻度も高く陽性検体平均汚染量も0.8 ng/gであり、最高値は2.26 ng/gであった。コリアンダーは昨年引き続き検出されたが、その陽性検体平均汚染量も0.9 ng/gであり、最高値は2.84 ng/gであった(表2、図2)。

FB1、FB2、FB3およびOTAの実態調査は平成16-18年度の3年間も行っているが、そのときの平均汚染頻度および平均汚染濃度を昨年度と今年度のそれらと比較してみた。これは、カビ毒は年次変化が非常に大きいと言われていることを我が国でのデータで検証する試みでもある。図3には、FB1の検出率の年次変化を示したが、雑穀米、コーンフレークの検出率が増加していることが認められた。図4では、FB1の平均汚染値の年次変化を示したが、コーングリッツでは検出率はあまり変化がないが、過去の3年間に比べ、最近の2年間の汚染平均量が顕著に高くなっていることが分かる。

図5は、OTAの検出率の年次変化を示したが、そば、ビールの検出率において年次変化が大きいことが分かる。オートミールやライ麦は過去に比べるとその検出率は徐々に減少の傾向が認められた。その平均汚染はレーズン、ワイン、チョコレートが過去に比べて高い値を示していた(図6)。

これらの変化が一時的であるのか、何年か周期で繰り返されるのかは、いまのところ解析できないが、少なくとも3年間以上の通年のサーベランスがより正確な暴露評価に有効であることが裏付けられた。

#### D. 考察

フモニシンは、現在規制としてFB1、FB2、FB3の総和として米国、EUは設定している<sup>1)</sup>。食品に汚染するフモニシン類はFB1、FB2、FB3が主要であるが、その中でもFB1が最も頻度高く見られ、毒性も高い<sup>2)</sup>。毒性としては脂質代謝障害が報告されている。すなわちフモニシンは細胞のスフィンゴシン(スフィンガニン)N-アセチルトランスフェラーゼ阻害剤で、細胞にスフィンガニンやスフィンゴシンの蓄積とスフィンゴ脂質複合体の枯渇をもたらし、細胞周期や分化を阻害し酸化ストレス、アポトーシス、壊死などを引き起こす。FB1は齧歯類で発がん性はあるが遺伝毒性はない<sup>3)</sup>。ヒトでの発がん性は、中国で摂取量と食道がんとの相関性に関する研究も進んでいる<sup>3)</sup>。動物種ではウマ類やブ

タ類が感受性の最も高い動物種で、ウマの白質脳症やブタの肺水腫を示す。1990年から1991年にかけてメキシコボーダーで起った新生児神経管閉鎖障害も、妊婦の摂取したフモニシン量とこの障害の発生に因果関係があることを示す報告がある<sup>4)</sup>。フモニシンは胎盤にある葉酸のレセプターを阻害する作用があると考えられている<sup>5)</sup>。

OTAは、種々の食品にその汚染が見られるが、畜与率の高い、主食となる穀類への汚染が最も危惧されるので、コーデックス委員会では昨年穀類のOTAを5 μg/kgに規格基準を定めた。毒性としては、腎障害、腎ガン、免疫毒性、催奇形性が報告されている<sup>6)</sup>。ヒトによる疫学調査では、未だ十分な証拠は得られていないが、バルカン諸島で頻繁に起こるヒトの腎炎とOTAの食品汚染は何らかの相関性があるとも言われている<sup>7)</sup>。動物実験ではすでにOTAには発がん性があることが明らかとなっているが、その機序については、遺伝毒性なのか非遺伝毒性なのかはまだ不明である<sup>10)</sup>。

我が国のフモニシンの汚染を見てみると大豆、生鮮アスパラガスにも低濃度の汚染がみられたが、とうもろこしは加工品も含めてフモニシンの汚染への畜与率が最も高い食品であった。また、今年度の実態調査では雑穀米に頻度高く検出された。我が国の健康食品ブームでその消費量は増えていることから畜与率の高い食品として考慮すべき食品であろう。カナダでは3年間の朝食用シリアルの実態調査から、フモニシンおよびOTAとも30%の頻度で検出されている<sup>11)</sup>。ポルトガルではとうもろこしベースの加工品からFB1、FB2が検出されており、コーンミールからFB1は100%、FB2は70%の検出率であった。最高値は、FB1 1300 ng/kg、FB2 450 ng/kgであった<sup>12)</sup>。我が国の今回の実態調査結果においては検出率は同様であるが、汚染濃度はやや低かった。韓国でのFB1陽性の汚染報告によると、調査数の約5.1%が陽性あり、汚染レベルは90.86-439.67 ng/gであった。この結果から韓国の暴露評価を行うと0.087ng/kg bwと推定されている<sup>13)</sup>。

近年エーゲ海地域を生産地とする乾燥イチジクからのフモニシン汚染が報告されている。115検体中86検体が陽性で平均汚染量は0.369-0.466 mg/kgであった。陽性検体中9.6%が1 mg/kg以上であった<sup>14)</sup>。また、中国のとうもろこし生産地では99.6%がFB1陽性であり、その汚染レベルは3-71, 121ng/gという報告も最近なされている<sup>15)</sup>。

これらの報告から、フモニシン汚染の食品原料は今後増える傾向にあること、その汚染生産地も広がりつ

つあることを考慮して実態調査を進めていく必要がある。

OTAは、ココア、インスタントコーヒーの汚染頻度が昨年度に続き100%近い値を示していたが、年齢層によっては慢性的に大量に摂取するグループもあり、その基準値設定も視野に入れる必要があるかもしれない。

我が国では米、小麦、そばが主食であるが、これらの穀物にもOTA汚染があるレベル検出される場合には、積極的に基準値設定を考えるべきであろう。今年度までの実態調査では米からのOTA汚染は検出されていない。しかし、諸外国では米への汚染が報告されており、OTAの汚染食品の一つであることは否めない。パスタやそばは我が国でも頻度高くOTAが検出されているが、暴露評価の結果においては、基準値策定を検討する可能性があるだろう<sup>10)</sup>。

国際的な規制への動きとしては、OTAに関しては、動向が激しく、昨年コーデックス委員会で、穀類に対する基準値が5 µg/kgと設定された。これを受けて韓国では昨年10月に小麦、ライ麦、麦、コーヒーについて基準値を設定している。小麦、ライ麦、麦、コーヒー豆、炒ったコーヒーに対しては5 µg/kg、インスタントコーヒーに対しては10 µg/kgの基準値を設定した。フモニシンに関しては、JECFAでの検討項目として上がっており、現在各国にデスカッションペーパーの提出を求めている所である。

平成16年度からの3年間の平均と本研究事業の2年間の汚染頻度、陽生平均濃度を見てみると、とうもろこし加工品におけるFB1、ワイン、レーズンのOTAは、最近の2年間上昇傾向が認められた。

我が国は輸入食品依存国であり、輸入先も一定であるわけではない。そのため、この結果は産地の年次変化を反映するものではないが、我が国の暴露量の変動を反映するものと捉えることが出来るだろう。このことは、輸入大国の我が国としてのカビ毒汚染防衛方法の考え方を示すものでもある。すなわち、1) 国際基準に速やかに対応し、規格外食品の輸入を阻止する。2) 輸入する前に生産地のカビ毒汚染の情報を収集し、汚染地帯からの輸入を控えることも有効なのではないだろうか。

## E. 結論

市販食品13食品目195試料のFB1、FB2、FB3を分析した結果、米、生とうもろこし、生とうもろこし、液体コーンスープにおいては定量限界未満であった。コーングリッツ類、コーンフレーク、コーンスナ

ック、雑穀米、ビールにおいては頻度高く検出され、昨年度と同様にコーングリッツ類からはフモニシンB1最高値889.6 µg/kgが検出された。

OTAは20食品目379検体を対象に測定した結果、コーンフレーク等のとうもろこし製品、オートミール、紅茶、ウーロン茶、ブドウジュース、イチジク、米からは検出されなかったが、小麦粉、ライ麦、大麦、焙煎コーヒー、缶コーヒー、インスタントコーヒー、ビールコリアンダー、ワイン、ココア、チョコレート、レーズン、パスタ、そば(そば粉)およびパスタから検出された。特に、レーズンの汚染度は比較的高く、最高4.24 ng/gの汚染が認められた。ワインも頻度は低いものの比較汚染濃度が高かった。

また、平成16年度から18年度に行った実態調査の結果と昨年度および今年度の結果を、主な食品目に注目し、平均汚染量および検出頻度を比較してみると、コーングリッツ類のFB1の汚染濃度が先の3年間の平均より10倍程度高くなっている変化が認められた。OTAにおいてもワインやレーズンの平均汚染量が近年高くなっていることが明らかになった。

今年度の結果から、OTAおよびFBの暴露に寄与率の高い食品がより浮き彫りとなった。また、カビ毒は年次変化が著しく通年の実態調査の重要性が可視化された。今後は寄与率の高い食品の情報をさらに収集し精度を高め、基準値策定の検討に資するデータとする。

## F. 研究業績

### 【論文】

1. 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, *J. Food Hyg. Soc. Japan* 49, 352-355 (2008).

2. Sugiyama, K., Tanaka, H., Kamata, Y., Tanaka, T. and Sugita-Konishi, Y.: A reduced rate of deoxynivalenol and nivalenol during bread production from wheat flour in Japan, *Mycotoxins* (in press).

3. 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 and Chemical Toxicology*, 46, 125-135 (2008)

4. 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 and Chemical Toxicology*, 46, 253-258 (2008)

5. Poapolathep, A., Poapolathep, S., Sugita-Konishi, Y., Imsilp, K., Tasanawat T., Sinthusing C., Itoh Y and Kumagai, S. Fate of fusarenon-X in broilers and ducks. *Poultry Sci.*, 87, 1510-15. (2008)

6. Poapolathep, A., Poapolathep, S., Klangkaew, N., Sugita-Konishi, Y., and Kumagai, S. Detection of deoxynivalenol contamination in wheat products in Thailand. *Poultry Sci.*, 71, 1931-33. (2008)

7. Dong, K., Sugita-Konishi, Y., Yu, J., Tulayakul, P., 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)

8. Yoshinari, T.; Yaguchi, A.; Takahashi-Ando, N.; Kimura, M.; Takahashi, H.; Nakajima, T., Sugita-Konishi, Y.; Nagasawa, H.; Sakuda, S., Spiroethers of German chamomile inhibit production of aflatoxin G1 and trichothecene mycotoxin by inhibiting cytochrome P450 monooxygenases involved in their biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 284, 184-190, (2008)

9. Mizutani, K., Hirasawa, Y., Sugita-Konishi, Y., Mochizuki, N., Morita, H., Structural and conformational analysis of hydroxycyclochlorotriene and cyclochlorotriene, chlorinated cyclic peptides from *Penicillium islandicum*. *J.Nat.Prod.*, 71, 1297-1300 (2008)

10. Kumagai S.I., Nakajima M., Tabata S., Tanaka T., Norizuki H., Itoh Y., Sato T., Saito S., Yoshiike N., Takatori K.I., Sugita-Konishi Y., Surveillance of mycotoxin contamination in retail foods and exposure assessment based on it in Japan, *Food additives and contamination*, 25, 1101-1106 (2008)

11. Sugita-Konishi, Y., A. Kubosaki, M. Aihara, B.J.Park, T. Tanaka, Y. Suzuki, K. Takatori, M. Hirose, M. Shibutani, Nivalenol targets female reproductive system as well as hematopoietic and immune systems in rats after 90-day exposure through diet. *Food additives and contamination*, 25, 1118-1127 (2008)

12. Mochizuki, N., Hoshino, M., Suga, K., Sugita-Konishi, Y., Identification of an interfering substrate in apple juice and improvement for determination of patulin with HPLC analyses. *J.Food Protection*. in press, (2009)

13. Mizutani, K., Kumagai, S., Mochizuki, N., Kitagawa, Y., Sugita-Konishi, Y., Determination of yellow rice toxin, Luteoskyrin, in rice using liquid chromatography / tandem mass spectrometric with electrospray ionization. *J.Food Protection*, in press (2009).

14. Yaguchi, A., Yoshinari, T., Tsuyuki, R., Takahashi, H., Nakajima, T., Sugita-Konishi, Y., Nagasawa, H., Sakuda, S., Isolation and identification of precocenes and piperitone from essential oils as specific inhibitors of trichothecene production by *Fusarium graminearum*" *J.Agric.Food Chem.* in press (2009)

#### 【学会発表】

- 1) Takino M, Sugita-Konishi Y, Pestka J: Determination of macrocyclic trichothecenes in a water damaged house by LC/MS. The 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry Denver, Colorado, 2008.6.
- 2) Tsunoda M, Tsunoda H, Itai K, Zhang Y, Kodama Y, Sugita-Konishi Y, Katagiri H, Hosokawa M, Sugaya C, Inoue Y, Miki T, Kudo Y, Satoh T, Aizawa Y: Effect of fluoride on viability and splenic cytokine productions of male hereditary nephrotic mice after oral administration. 28th International Society for Fluoride Research 2008.8, Toronto, Canada
- 3) 露木利枝、矢口 篤、吉成知也、高橋台男、中島 隆、小西良子、長澤寛道、作田庄平：精油に含まれるデオキシニバレノール生産阻害物質。第 64 回日本マイコトキシン学会学術講演会、名古屋、2008.8
- 4) 門田智之、伊藤勇二、竹澤陽子、坂元雄二、Maragos Chris、小西良子、田中敏嗣：SPR による小麦中のニバレノール及びデオキシニバレノールの迅速分析法の検討。第 96 回学術講演会日本食品衛生学会、神戸、2008.9
- 5) 中島正博、永山敏廣、石黒瑛一、内藤成弘、伊藤嘉典、鎌田洋一、小西良子、山本勝彦、田中敏嗣：デオキシニバレノール及びニバレノール