

添加回収試験：添加3濃度+ブランク

無汚染ピーナッツ

無汚染アーモンド

無汚染ピスタチオ

無汚染ヘーゼルナッツ

自然汚染：汚染ピーナッツ

汚染アーモンド

検体数 x 測定回数 (1前処理法)

$$4 \times 4 \times 2 + 2 \times 2 = 36$$

とする。

評価委員会からの意見

・マトリックスが多すぎる。センターラボがあらかじめ試験し、同様の結果が得られるものは除く方法もある(LC/MS/MSにおいてマトリックス検量線と標準検量線とに違いがある食品とない食品)。

・添加濃度は、基準値の上を1濃度、下を1濃度とする。(たとえばトータル24, 8 ng/g)

・参考データとしてセンターラボはB1, G1のliniarityを検討する。

・センターラボが今回の質疑を考慮して案を提出することとなった。

3) 第3回議事録

平成20年12月11日(木)神戸市環境保健研究所で開催。

内容：(1) DON・NIV一斉分析法の評価報告書について

原案をもとに、委員から出されたコメントおよび修正案を検討し、HPに公表する最終版を作成した。

(2) コラボラティブスタディ「トータルアフラトキシン試験法」のプロトコールの評価

原案をもとに、委員から出されたコメントおよび修正案を検討し、HPに公表する案を作成した。今後の予定は、約1ヶ月間パブコメを募集し、プ

ロトコール最終版を作成後、コラボラティブスタディ参加機関を公募する。

2. 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妥当性確認のためのコラボラティブスタディの結果

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

表1-1から1-6にコラボラティブスタディの結果を示した。

表1-1 HPLCによるDONの分析

| 前処理法 | 1.0mg/kg添加 | | 0.5mg/kg添加 | | 0.1mg/kg添加 | |
|----------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
| | MF-T 1500 | #227 | MF-T 1500 | #227 | MF-T 1500 | #227 |
| 参加試験室数 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 有効試験室数 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| 回収率(%) | 93.3±6.5 | 100.0±4.2 | 94.1±3.5 | 101.5±3.4 | 91.0±2.4 | 106.1±2.2 |
| RSD _r (%) | 1.1 | 1.7 | 6.0 | 7.6 | 7.6 | 11.5 |
| RSD _d (%) | 7.2 | 4.3 | 8.0 | 6.8 | 25.2 | 21.0 |
| HorRat | 0.45 | 0.27 | 0.45 | 0.38 | 1.12 | 0.9 |

表1-2 HPLCによるNIVの分析

| 前処理法 | 1.0mg/kg添加 | | 0.5mg/kg添加 | | 0.1mg/kg添加 | |
|----------------------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| | MF-T 1500 | #227 | MF-T 1500 | #227 | MF-T 1500 | #227 |
| 参加試験室数 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 有効試験室数 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| 回収率(%) | 76.1±5.3 | 80.6±9.0 | 78.2±3.7 | 84.2±3.7 | 71.9±2.3 | 90.6±1.7 |
| RSD _r (%) | 4.5 | 2.1 | 3.8 | 3.9 | 10.7 | 7.2 |
| RSD _d (%) | 7 | 11.5 | 9.6 | 9.1 | 31.4 | 18.1 |
| HorRat | 0.44 | 0.72 | 0.54 | 0.51 | 1.39 | 0.8 |

表1-3 HPLCによる自然汚染小麦の分析

| 前処理法 | DON | | NIV | |
|----------------------|-----------|------|-----------|------|
| | MF-T 1500 | #227 | MF-T 1500 | #227 |
| 参加試験室数 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 有効試験室数 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| 平均定量値 | 0.99 | 1.06 | 1.06 | 1.11 |
| RSD _r (%) | 4.3 | 2.1 | 5.8 | 4.5 |
| RSD _d (%) | 9.5 | 7.4 | 8.3 | 12.9 |
| HorRat | 0.6 | 0.5 | 0.52 | 0.57 |

表1-4 LC/MS/MSによるDON分析

| 前処理法 | 1.0mg/kg添加 | | 0.5 mg/kg添加 | | 0.1 mg/kg添加 | |
|----------------------|------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|
| | MF-T 1500 | #227 | MF-T 1500 | #227 | MF-T 1500 | #227 |
| 参加試験室数 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| 有効試験室数 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| 回収率 (%) | 96.4±12.7 | 100.0±8.2 | 101.1±6.8 | 104.1±4.4 | 105.1±1.8 | 110.8±1.6 |
| RSD _r (%) | 6.4 | 5.7 | 3.8 | 4.3 | 6.9 | 6.7 |
| RSD _D (%) | 9.4 | 8.3 | 10.8 | 8.5 | 17.5 | 14.8 |
| HorRat | 0.59 | 0.52 | 0.61 | 0.48 | 0.77 | 0.65 |

表1-5 LC/MS/MSによるNIV分析

| 前処理法 | 1.0mg/kg添加 | | 0.5 mg/kg添加 | | 0.1 mg/kg添加 | |
|----------------------|------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| | MF-T 1500 | #227 | MF-T 1500 | #227 | MF-T 1500 | #227 |
| 参加試験室数 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| 有効試験室数 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| 回収率 (%) | 80.2±6.5 | 84.3±5.4 | 82.6±4.1 | 87.8±4.4 | 84.2±1.6 | 90.8±2.3 |
| RSD _r (%) | 2.0 | 4.7 | 3.4 | 6.6 | 6.8 | 6.2 |
| RSD _D (%) | 8.3 | 6.5 | 10.2 | 10.2 | 18.6 | 22.0 |
| HorRat | 0.52 | 0.41 | 0.57 | 0.58 | 0.82 | 0.97 |

表1-6 LC-MS/MSによる自然汚染小麦の分析

| 前処理法 | DON | | NIV | |
|----------------------|-----------|------|-----------|------|
| | MF-T 1500 | #227 | MF-T 1500 | #227 |
| 参加試験室数 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| 有効試験室数 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| 平均定量値 | 1.01 | 1.09 | 1.09 | 1.17 |
| RSD _r (%) | 6.1 | 9.1 | 4.9 | 6.3 |
| RSD _D (%) | 16.1 | 16.5 | 14.5 | 13.9 |
| HorRat | 1.00 | 1.00 | 0.91 | 0.87 |

3) 定量下限と検出下限

HPLC・UV 検出法の定量下限と検出下限は、本共同試験の前に行われた予備試験によって求められたもので、表1-7に示した。

表1-7

| | 検出下限 | 定量下限 |
|-----|-----------|----------|
| DON | 0.05mg/kg | 0.1mg/kg |

| NIV | 0.05mg/kg | 0.1 mg/kg |
|-----|-----------|-----------|
|-----|-----------|-----------|

4) 「カビ毒試験法評価委員会」による評価
得られた有効なデータから、室内併行性(RSD_r)と室間併行性(RSD_R)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、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。

5) コラボラティブスタディ参加機関

| | |
|----|---|
| 1 | (株)日清製粉グループ本社 |
| 2 | アサヒビール(株) |
| 3 | キリンホールディングス(株) |
| 4 | キュービー(株)研究所 |
| 5 | (独)農林水産消費安全技術センター |
| 6 | 韓国農業科学技術院 National Institute of Agricultural Science & Technology |
| 7 | (財)日本食品分析センター |
| 8 | (財)日本冷凍食品検査協会 |
| 9 | 神奈川県衛生研究所 |
| 10 | サントリー(株) |
| 11 | (財)日本穀物検定協会 |
| 12 | (独)農林水産消費安全技術センター 仙台センター |

D.参考文献

- 1) Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U.-S., Sugiura, Y., Ueno, Y.: *J. Agric. Food Chem.* **36**, 979-983 (1988)
- 2) Yoshizawa, T.: in *Mycotoxins and Animal Foods*, Smith, J. E. and Henderson R. S. eds., CRC Press, Inc., pp.306-312 (1991)
- 3) *Environmental Health Criteria 105*, Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecens, Ergot, WHO, Geneva, (1990)
- 4) Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Tabaka, S.,

Nakajima, M., Nouno, M., Nakaie, Y., Chonan, T., Aoyagi, M., Kibune, N., Mizuno, K., Ishiguro, E., Kanamaru, N., Minamizawa, M., Aita, N., Kushiro, M., Tanaka, K., Takatori, K.: *Mycopathologia*, **161**, 239-243 (2006)

E. 研究業績

なし

F. 知的所有権の取得状況

なし

別表

| センターラボ担当 | コラボ参加者担当 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ・コラボに供する方法をいくつか pick up し、precollubo のデーターとともに1つの方法を提案する (抽出液、前処理などを含む) ・試料の調整 (均一性のデーター) ・マトリックスが異なるが同様の試験法で測定が可能なものを調べる (同じものは排除する) ・標準液の調製 ・プロトコールの作成 [濃度は基準値の上と下に設定、温度、反応時間などの表現は必ず〇〇±〇〇のように幅を持たせる] ・定量限界、検出限界 linarity の範囲の検証 ・検査機器・器具多様性に対応するための性能の調査、選択 | <ul style="list-style-type: none"> ・プロトコール通り、分析を行い、結果と共に使用した機器の種類、測定条件、温度、反応時間などの情報を報告する。 ・検量線と各クロマトグラムを提出 (LC/MS/MS の場合は、マトリックス検量線と標準検量線をだす) |

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20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。昨年度は麦類を汚染するトリコテセン系カビ毒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製造時の各々の減衰率と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(エンドトキシン誘導性IFN-βレポーターアッセイ系)の構築を試みた。わが国におけるトリコテセン系カビ毒の汚染実態としては、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検証する目的で、IFN-β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-β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-β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。

A. 研究目的

真菌が産生する二次代謝産物であるカビ毒は物理的、化学的処理に極めて安定であるにも関わらず(Sugita-Konishi and Sugiyama 2008; Sugiyama and Sugita-Konishi 2007)、わが国におけるカビ毒に汚染された食糧を加工・調理することによる同毒素の消長についての包括的な研究は乏しいと言わざるを得ない状況である。カビ毒からの健康被害を防止するうえで、カビ毒の消長について正確なデータを把握することは、カビ毒からの食の安心・安全の確保の観点から重要であることは論を待たない。

フザリウム属真菌が小麦等の麦類に感染した場合、収穫された小麦等の粒子にはトリコテセン系カビ毒の残留が認められる。特にわが国ではトリコテセン系カビ毒であるデオキシニ

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)による汚染が報告されている(Yoshizawa 1983)。戦後、日本人の小麦摂取量はパン食により増大したが、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食品の製造は増加傾向にある。この現状は、わが国におけるトリコテセン系カビ毒による汚染対策に、複合毒性としてDONとNIVの毒性研究の必要性が高まっていることを意味する。

昨年度実施された本研究において、DONの毒性の評価系としてマクロファージ様細胞を用いたIFN-βレポーター系を提案した(小西2008)。

本アッセイ系はその汎用性と感度からカビ毒の消長を測定する為のバイオアッセイとしてのアドバンテージは高いと考えられる。しかし、その免疫系におよぼす生物学的意義については不明確という課題も残している。従って、本研究では DON を含むトリコテセン系カビ毒の毒性評価におけるマクロファージ様細胞を用いた IFN- β レポーター系の意義を、同サイトカインがその産生誘導に関与することが知られている感染防御に重要な役割を持つ一酸化窒素 (Nitric Oxide; NO) の活性化マクロファージからの産生レベルを指標に検証した (Shimomura-Shimizu et al. 2005)。あわせて、活性化マクロファージからの NO 産生レベルを指標とした DON と NIV の複合毒性についても検討を加えた。

B. 研究方法

【細胞培養・各種試料の調製】

マウスマクロファージ RAW264 細胞 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) は、10 %非働化仔ウシ血清 (Fatal Bovine Serum, 以後 FBS と略記: Invitrogen 社製) と、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (10,000 U PCs and 10 mg SM/ml in 0.85%-NaCl: ナカライテクス株式会社, 京都) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 以後 DMEM と略記: GIBCO 社製) High Glucose 1 \times の入った 75 cm²の組織培養フラスコ (Techno Plastic Products 社製) に播種後、37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂条件下で培養した。

標準品の DON (Wako 社製) は減衰を防ぐため、アセトニトリルに溶かし、-30 $^{\circ}$ Cで保存した。実験に用いるときは窒素ガスで濃縮乾

固した後、DMEM で溶解した。また、NIV (Riedel-de Haën 社製, GERMANY) の場合も同様に調製した。

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。

【NO 測定】

75 cm²の組織培養フラスコで培養中の RAW264 細胞を CELL SCRAPER で掻き取り、50 ml チューブに全量移し替え、1,000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C で遠心分離した。そして上清のみを除去し、新たに 37 $^{\circ}$ C に温めた DMEM を適量加えサスペンションした。そのうちの 50 μ l をトリパンプルー溶液 (SIGMA 社製) で 2 倍希釈したものを血球計算盤へ適量移し細胞数を計測した。細胞濃度が 2 \times 10⁶ 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 μ l/well で播種し、37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ 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 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ 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。

NO₂/NO₃ 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。付属の NaNO₂ 標準溶液、及び緩衝溶液を用いて、NO₂ 濃度 (0, 25, 50, 100 μ mol/l) を 80 μ l 調製して検量線を作成した。サンプルも同様に 80 μ l 使用した。それぞれに付属の緩衝溶液を 20 μ l 加え Griess Reagent (SIGMA 社製) を 100 μ l 加え混和し 15 分間放置した。その後 550 nm の吸光度を測定し作成した検量線からサンプル中の NO 濃度を求めた。

C. 研究結果

【エンドトキシン誘導性 NO 産生への NIV の影響】

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。NIV 存在下、RAW264 細胞をエンドトキシンで刺激し、その細胞上清を用いて NO 量を Griess 法により測定した。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 (Fig. 1)。

【エンドトキシン誘導性 NO 産生への DON の影響】

以上の結果より、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。その結果、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 (Fig. 2)。

【DON と NIV 共存下におけるエンドトキシン誘導性 NO 産生】

エンドトキシン誘導性 NO 産生を指標に DON と NIV の複合毒性を検討するため、DON と NIV 共存下での同産生量を検討した。両毒素が等量で存在する場合、Fig. 1 および 2 と同様に両毒素の総量が 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 (Fig. 3)。

さらに分子あたりとして毒性を評価するた

めに、モル濃度あたりで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 μ M (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 μ M (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 (Fig. 4, 5)。

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。

D. 考察

今回、活性化マクロファージより産生される NO に対するトリコテセン系カビ毒である DON と NIV の影響を検討した。DON は欧米においてその汚染が認められることから、免疫毒性を含め多くの毒性の報告がなされている (Tryphonas et al. 1986; Sugita-Konishi and Sugiyama 2008; Sugiyama and Sugita-Konishi 2007)。一方、NIV についてはわが国のほか、韓国などその汚染が東アジアに限局されることから (Sugiyama et al. 2009)、毒性を含め研究報告例は少ない。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 産生におよぼす DON と NIV の影響を検討した。その結果、各々の毒素単独処理による阻害レベルは両毒素間で顕著な差異は認められず、共存下の場合においても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 (Fig.

1, 2, 3)。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 Fig. 4 および 5 の結果からも支持されるものと考えられる。DON による免疫毒性として易感染性が指摘されているが、その詳細な分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。今回、リステリア菌や結核菌、サルモネラ菌等の細胞内寄生菌からの感染防御に重要な役割の担うと考えられている NO 産生への DON もしくは NIV の阻害作用は、これら病原菌感染時におけるトリコテセン系カビ毒による易感染性を説明しうるエビデンスの 1 つと考えられる。但し、最終的な結論を導くには、他の体液性免疫へのトリコテセン系カビ毒の影響を追加検討したうえで、*in vivo* での感染実験の実施が必要であろう。

昨年度の実験研究として、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- β レポーター活性の阻害を報告した (小西 2008)。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- β 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、実際のトリコテセン系カビ毒の消長に向け必要な各種阻害因子耐性を付与したアッセイ系へのブラッシュアップ、具体的には食品からの毒素抽出時に多機能カラム等を利用することで食品由来成分による検出障害の低減化等を図る必要があるであろう。

E. 結論

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。翻って本研究は、IFN- β がオートクライン・パラクライン的に関与することで活性化マクロファージから産生される炎症性メディエーターの NO への影響を確認したものである。従って、昨年度に実施したエンドトキシン誘導性 IFN- β レポーター活性を用いたトリコテセ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、消長を含むトリコテセン系カビ毒複合汚染原料の毒性評価に IFN- β レポーターアッセイが適用できる可能性を示していると換言できる。

参考文献

- Sugita-Konishi, Y. and Sugiyama, K: The risk assessment of mycotoxins and its international trends, *J. Food Hyg. Soc. Japan* **49**, 1-10 (2008).
- Sugiyama, K. and Sugita-Konishi, Y: Mycotoxin regulations in foods in European Union, United States and Japan, *A Technical Journal on Food*

Chemistry & Chemicals **264**, 73-78 (2007).

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

小西良子: カビ毒を含む食品の安全性に関する研究、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、(2008)。

Shimomura-Shimizu, M., Sugiyama, K., Muroi, M. and Tanamoto, K: Alacholr and carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by differentially inhibiting NF- κ B activation, *Biochem Biophys Res Commun.* **332**, 793-799 (2005).

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).

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).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

【原著論文】

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).

【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 47th 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 藪田セミナー), 2009年3月10日.

【学会発表】

1. 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, 7).
 2. 杉山圭一, 斉藤史朗, 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).
 3. 杉山圭一, 室井正志, 葉袋裕二, 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).
 4. 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, 伊藤嘉則, 小西良子: 日本に流通する食品中のオクラトキシン A およびフモニシン汚染実態調査 (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, 9).
 5. 斉藤史朗, 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).
 6. 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).
 7. 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).
- #### 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
なし

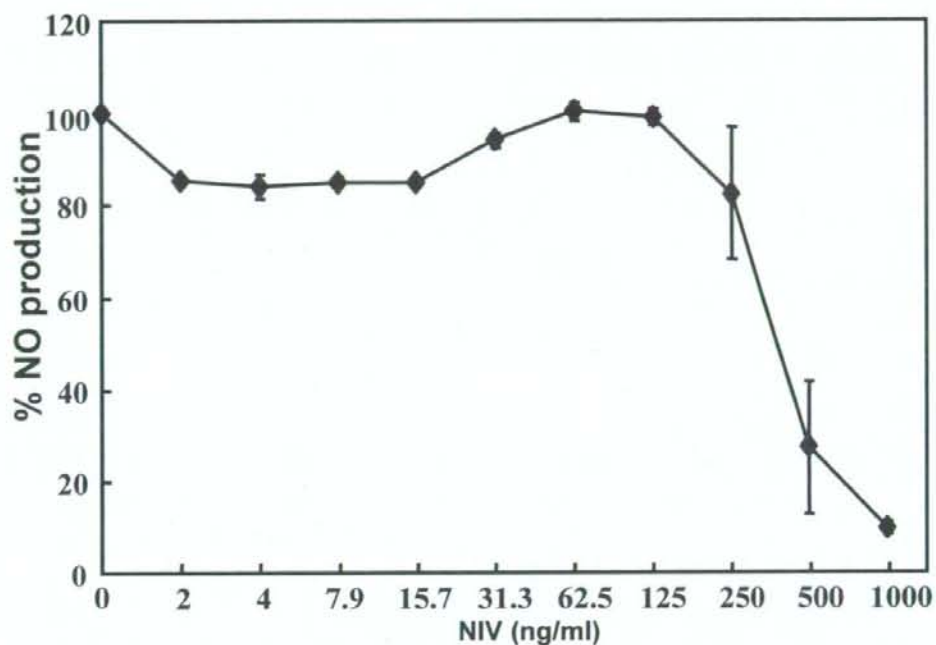


Fig. 1. Concentration-dependent effects of NIV on LPS-induced NO production by RAW 264 cells. RAW 264 cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of NIV (0 - 1000 ng/ml) for 24 h. The culture supernatants were analyzed for NO levels. Values are means \pm SEM from three independent experiments. NO induced by LPS treatment alone is expressed as 100%.

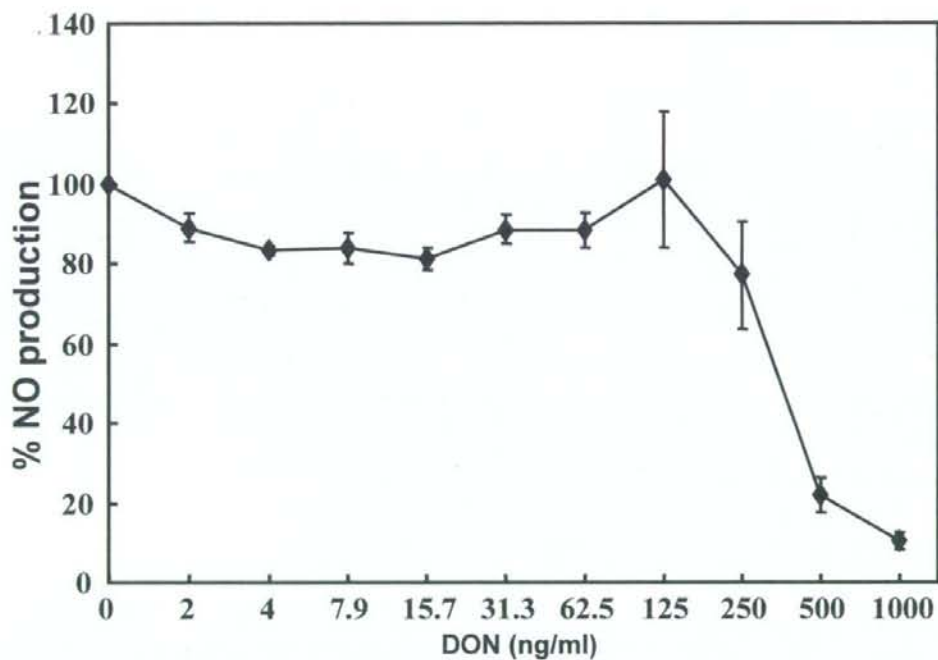


Fig. 2. Concentration-dependent effects of DON on LPS-induced NO production by RAW 264 cells. RAW 264 cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of DON (0 - 1000 ng/ml) for 24 h. The culture supernatants were analyzed for NO levels. Values are means \pm SEM from three independent experiments. NO induced by LPS treatment alone is expressed as 100%.

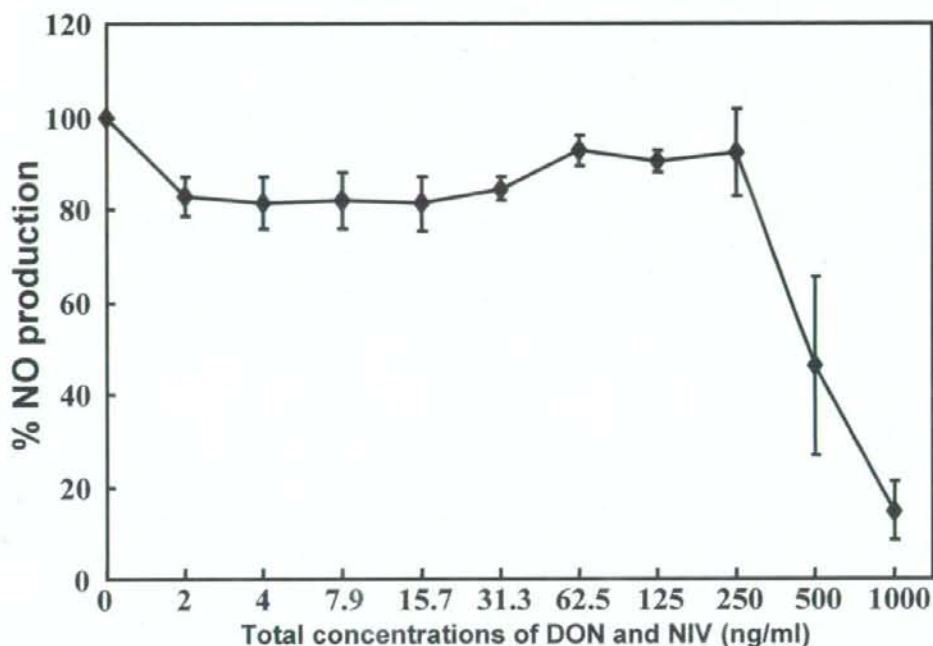


Fig. 3. Concentration-dependent effects of DON and NIV on LPS-induced NO production by RAW 264 cells. RAW 264 cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of indicated total concentrations of DON and NIV (1:1) for 24 h. The culture supernatants were analyzed for NO levels. Values are means \pm SEM from three independent experiments. NO induced by LPS treatment alone is expressed as 100%.

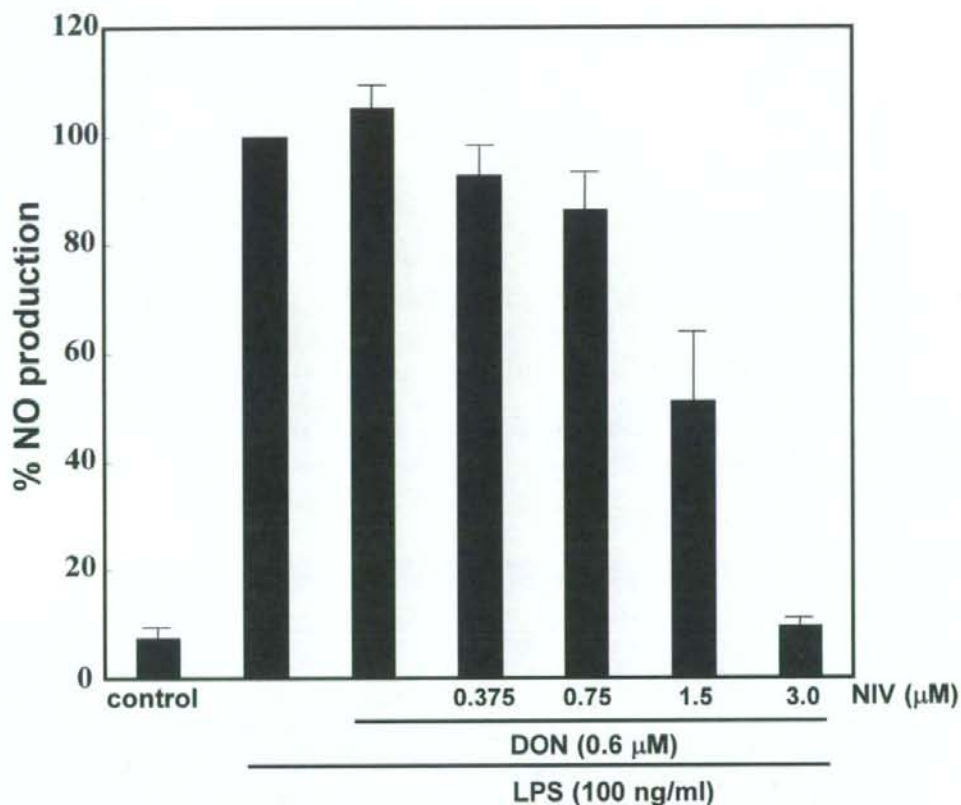


Fig. 4. Concentration-dependent effects of NIV on LPS-induced NO production by RAW 264 cells in the presence of DON. RAW 264 cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of NIV (0 - 3.0 μ M) and DON (0.6 μ M) for 24 h. The culture supernatants were analyzed for NO levels. Values are means \pm SEM from four independent experiments. NO induced by LPS treatment alone is expressed as 100%.

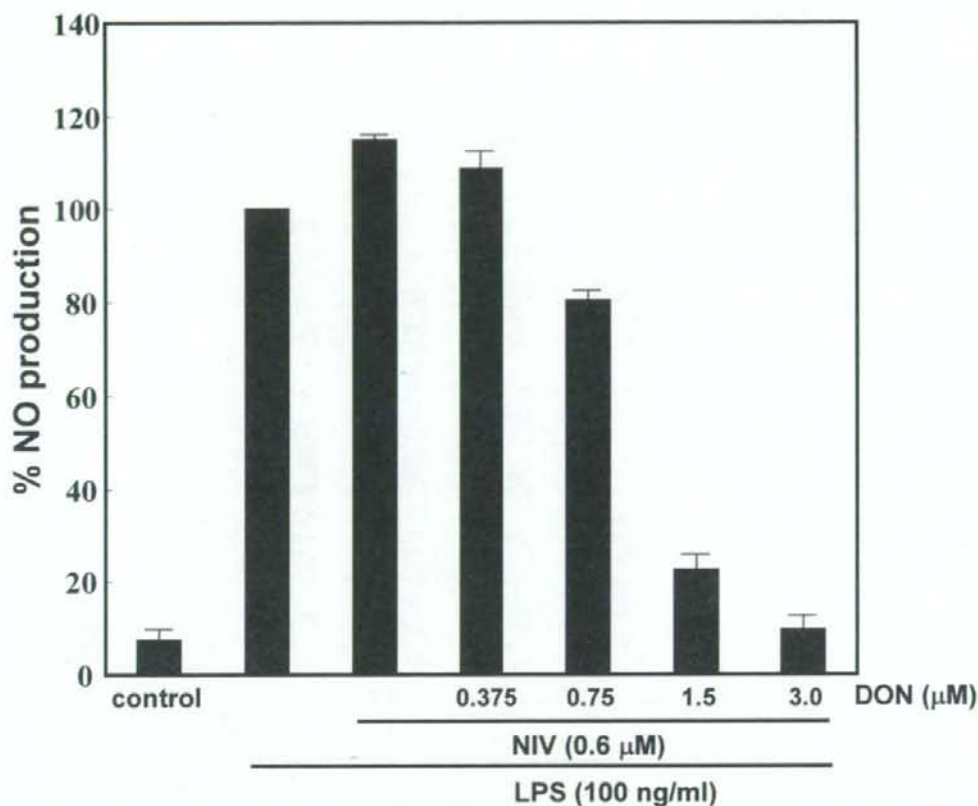


Fig. 5. Concentration-dependent effects of DON on LPS-induced NO production by RAW 264 cells in the presence of NIV. RAW 264 cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) in the presence of DON (0 - 3.0 μM) and NIV (0.6 μM) for 24 h. The culture supernatants were analyzed for NO levels. Values are means \pm SEM from three independent experiments. NO induced by LPS treatment alone is expressed as 100%.

日本人の小麦摂取によるオクラトキシン A 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オクラトキシン A (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オクラトキシン A 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 万回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。その際、仮定としてオクラトキシン A の含有量による規制(0.05ppm)の有無および upper bound と lower bound による計 4 つの異なるシナリオを用意した。シミュレーションした結果、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。

研究協力者

斉藤 史朗 (北里大学)

A. 研究目的

オクラトキシン (OT) は、熱帯地域では *Aspergillus* 属が、温帯地域では *Penicillium* 属が産生するカビ毒である。10 数種類以上ある OT の同族体のうち最も食品汚染報告が多いのは、オクラトキシン A (OTA) であり、次いでオクラトキシン B (OTB) であるが、OTB は毒性が弱いため、毒性評価および基準値策定の対象は OTA に限られている。OTA はたんぱく質合成阻害や酵素活性阻害などの毒性を発現するが、最も問題となるのは腎臓に対する慢性毒性である。

わが国では OTA に対する規制値は設定されていないが、海外では多くの穀類を中心に OTA の基準値が設定されている。近年、EU ではブドウ加工品には $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、乳児用食品には $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ の基準値が設定されている。そこで、今回は基準値を設定しない場合と、暫定的に設定した基準値 ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$) を用いる場合のシナリオにより日本人の小麦摂取による OTA 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 OTA 含有量サンプルデータの作成

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。140 のサンプルのうちの OTA の含有量の分布は以下のようになっている。

表 1. 140 サンプル中の OTA 含有量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

| 範囲 | サンプル数 | 累積% |
|-----------------|-------|-------|
| Low \leq 0.05 | 30 | 21.4 |
| 0.05 \leq 0.1 | 11 | 29.3 |
| 0.1 \leq 0.3 | 43 | 60.0 |
| 0.3 \leq 0.6 | 34 | 84.3 |
| 0.6 \leq 0.9 | 12 | 92.9 |
| 0.9 \leq 1.2 | 6 | 97.1 |
| 1.2 \leq 1.5 | 2 | 98.6 |
| 1.5 \leq High | 2 | 100.0 |
| Total | 140 | |

今回のサンプルの計測において LOD は 0.05 (μ g/kg) で、LOQ は 0.1 (μ g/kg) であった。表 1 のように LOQ 未満のサンプル割合は、29.3% であるので、WHO GEMS FOOD の規定に従って、upper bound (LOQ 未満は LOQ の二分の一を取る) と lower bound (LOQ 未満はゼロとする) を設けることにし、シナリオを二つ用意した。また、仮の規制の基準値として玄麦について 5μ g/kg を適用した場合と、何の基準値もない場合との 2 つのシナリオを用意した。

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。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。

3) OTA 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 (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 の二分の一の様分布で規制なし
- LOQ 未満は LOQ の二分の一の様分布で規制の基準値は 5μ g/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 5μ g/kg (ソフトウェアとして SAS 社の Base SAS を使用)。

C. 結果：推定曝露量

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 (図 1-1~1-16) とパーセンタイル値の表を示す (表 2-1~2-2)。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ももっとも高くなり、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「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 4.0 ng/kg 体重/日 未満であった。

D. 考察

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 100 ng/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 5.22 ng/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 40 ng/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え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。

E. 参考文献

1. 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 Vol.49(1), (2008)
2. 田端ほか「HPLC-FL およびLC/MS/MS による食品中のオクラトキシン A, B およびシトリニンの同時分析法」 食品衛生学雑誌 Vol.49(2),(2008)
3. 吉池信男、残留農薬の暴露量試算のための食品摂取量基準データの検討—1995～1997 年国民栄養調査、食品衛生研究 Vol 50(6),2000
4. 日本人のカドミウム曝露量推計に関する研究 平成 15 年度 総括研究報告書 (2004)
5. Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives 68th Meeting: SUMMARY AND CONCLUSIONS. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2007
6. Scientific Committee on Food. (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol.
7. WHO (World Health Organization) (2002). Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 906. Geneva, pp. 1-62

図1-1:1才~6才、規制なし、upper bound

