

201033036A

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

食品汚染カビ毒の実態調査ならびに生体毒性影響に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 局 博一

東京大学大学院農学生命科学研究科

平成23(2011)年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

食品汚染カビ毒の実態調査ならびに生体毒性影響に関する研究 -----1  
局 博一

### II. 分担研究報告書

食品汚染カビ毒の実態調査 -----15  
小西良子

T-2 トキシンの心機能への影響に関する研究 -----33  
局 博一

シトリニンのマウス臓器および全身影響に関する研究 -----41  
渋谷 淳

日本人の牛乳を介したカビ毒の曝露量推定～アフラトキシン M1 を例として  
-----48

佐藤敏彦  
斉藤史朗 (研究協力者)

*In vitro* 評価系における T-2, HT-2 トキシンの免疫細胞毒性に関する研究  
-----54

杉山圭一 (研究協力者)

### III. 個表

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)

食品汚染カビ毒の実態調査ならびに生体毒性影響に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 局 博一 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻教授

要旨

麦類やトウモロコシなどを汚染するフザリウム属菌が産生するカビ毒である T-2 トキシシン、HT-2 トキシシン、ゼアラレノンおよび米などを汚染するペニシリウム属菌が産生するシトリニンの食品汚染実態と分析法の検討、これらのカビ毒の生体毒性評価、ならびに日本人のカビ毒曝露量評価のためのモデル開発を行った。

汚染実態調査では、市販食品 19 食品目 183 試料について LC/MS-MS を用いて 3 種のフザリウム毒素を、市販食品 5 食品目 59 試料について HPLC-蛍光検出器を用いてシトリニンを測定した。T-2 トキシシンおよび HT-2 トキシシンは、国産および輸入麦類、小麦粉、コーングリッツ、ハトムギ、胚芽入り加工品から検出された。ゼアラレノンは国産および輸入麦類、コーングリッツ、ハトムギ、胚芽入り加工品に加え、雑穀米、小豆から検出された。シトリニンはコーングリッツ 16 件体中 1 件から検出されたが、押し麦、玄麦、玄米、精米からは検出されなかった。T-2 トキシシンおよび HT-2 トキシシンの検出率は胚芽入り加工品で最も高く、30%から検出された。輸入大麦でも 25%から検出された。国産大麦では 12.5%に留まっていた。小麦においては国産の検出頻度の方が輸入小麦より高く 21.9%であった。小麦粉からの検出率も 21.7%であった。汚染濃度では大麦が国産輸入とも小麦より高かった。最大濃度はハトムギの 22.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$  であり、最も高かった。次いで胚芽入り加工品(14.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、国産大麦 (11.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ,輸入大麦(10.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )であった。ゼアラレノンの検出率は雑穀米、ハトムギで 90 %を示していた。検出濃度は、ハトムギでは平均 8.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (最大濃度 83.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、雑穀米では平均 1.34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (最大濃度 6.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )であった。

毒性評価試験では、T-2 トキシシン 0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg の成熟ラット (Wistar) 皮下投与で不整脈の発現が明瞭に認められた。また心拍数増加、自律神経活動の変化 (トータルパワーの低下など) も認められた。このことから T-2 トキシシンの心臓毒性作用が明らかになった。一方、免疫毒性試験では、マウスマクロファージの LPS 刺激による Toll-like receptor 4 (TLR4) シグナルの動態を調べたところ、T-2 トキシシンは 10 ng/ml から 80 ng/ml で、HT-2 トキシシンは 1.0 ng/ml から 8.0 ng/ml で IFN- $\beta$  プロモーターレポーター活性を濃度依存的に抑制した。また、ELAM/264 細胞を用いて、TLR4 を介する転写因子 NF- $\kappa\text{B}$

の活性化に対する T-2 および HT-2 の作用を検討した結果、LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性は T-2、HT-2 ともに抑制効果を示したものの、顕著な濃度依存的抑制効果は見られなかった。また、シトリンの全身影響および臓器影響の組織学的研究では、BALB/c マウス（雌）にシトリン 0  $\mu$ M、5  $\mu$ M ないし 30  $\mu$ M を飲水にて 10 週間投与したところ、体重、飲水量、摂餌量、一般症状の全てにおいて明らかな変化はなかった。また剖検時での腎・肝・子宮重量に変化はなかったが、卵巣相対重量が 30  $\mu$ M で有意に増加した。病理組織学的な検索により、子宮粘膜の変化として、発情期の組織像を示す個体が多い傾向が認められた。腎臓では、尿細管等に明らかな組織学的変化は認められなかったが、PCNA 染色の結果、尿細管上皮での陽性細胞率がシトリン投与の 2 群で有意な増加を示し、細胞増殖活性の亢進を示すことが見出された。

カビ毒曝露評価では、アフラトキシン M1 を例にとり、牛乳、粉ミルクを介した日本人の曝露量の評価モデルを作成した。基礎となるデータは、「平成 22 年度食品中のかび毒に係る試験検査（アフラトキシン M1）」より求めた。粉ミルクの汚染量と曝露量、牛乳の汚染量と曝露量、および総曝露量を推定した。それぞれ Lower bound と Upper bound を算出した。たとえば、粉ミルクの曝露量の解析結果では、Lower bound に関しては、平均=17.35、標準偏差=127.00、中央値=0、99%タイル値=855.47 となり、Upper bound に関しては、平均=698.19、標準偏差=35.10、中央値=693.627、99%タイル値=855.47 であった。また、牛乳の曝露量では、1 才から 70 才までの合計摂取量に汚染量をかけて、1 才から 70 才までの合計曝露量を計算した。その結果、Lower bound に関しては、平均=842.26、標準偏差=2360.51、中央値=335.03、99%タイル値=8172.75、Upper bound では、平均=851.09、標準偏差=2345.08、中央値=341.10、99%タイル値=8183.10 であった。（単位はすべて ng/kg 体重） 今後は各年齢層における摂取量の順位の間接的相関を利用したシミュレーションが必要と考えられた。

#### 研究分担者：

小西良子 国立医薬品食品衛生研究所  
渋谷 淳 東京農工大学大学院共生科学技術研究部  
佐藤敏彦 北里大学医学部附属臨床研究センター

#### 研究協力者

斉藤史郎 北里大学医学部附属臨床研究センター  
杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所  
田中敏嗣 神戸市環境保健研究所

青山 幸二 (独)農林水産消費安全技術センター (FAMIC)  
石黒 瑛一 (財)日本食品分析センター



甲斐 茂美 神奈川県衛生研究所  
小木曾 基樹 (財)日本食品分析センター多摩研究所  
佐藤孝史 (財)食品分析開発センターSUNATEC  
田端 節子 東京都健康安全研究センター  
谷口 賢 名古屋市衛生研究所  
竹内 浩 三重県保健環境研究所  
橋口 成喜 川崎市衛生研究所  
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  
松井好之 (財)日本冷凍食品協会

吉成 知也 国立医薬品食品衛生研究所  
佐久間 久子 国立医薬品食品衛生研究所  
渡辺 康 国立医薬品食品衛生研究所

## A. 研究目的

カビ毒を対象に国際的成分規格の設定に向けた動きが活発になってきている(CODEX、JECFA)。我が国は輸入大国であることを鑑みると、食品の成分規格に対する国際的動向に即対応できる体制を整えておかなければ食の安全性は担保できない。また、国際的には問題とならないカビ毒でも、我が国では重要な危害要因となりうるカビ毒も存在する。たとえば米を汚染するカビ毒はその一つである。本研究では、わが国の食習慣に密接に関係する食品を汚染する可能性があり、国際的に毒性評価がなされているが、わが国では未検討のゼアラレノン、T-2 トキシンとその代謝物であるHT-2 トキシン、オクラトキシン A との複合汚染および国内汚染が危惧されるシトリンを対象に、汚染実態調査(分析法の評価を含む)および毒性評価を行う。また、上記のカビ毒の日本人の曝露量を統計学的

に評価するための基本モデルの検討をアフラトキシン M1 の牛乳汚染を例にして行う。

## B. 研究方法

### I. 汚染実態調査

T-2 トキシン、HT-2 トキシン、オクラトキシン A の3種のフザリウム毒素の汚染実態を市販食品 19 食品目 183 試料について LC/MS-MS 法を用いて測定し、シトリンについては、市販食品 5 食品目 59 試料について HPLC-蛍光検出器を用いて測定した。対象とした食品目は、小麦、大麦、鳩麦、押麦、玄麦、玄米、精米、雑穀米、小豆、小麦粉、胚芽入り加工品、コーングリッツなどである。

### II. 毒性評価

#### (1) T-2 トキシンの心機能への影響に関する研究

成熟雄ラット (Slc:Wistar; 8 週齢 ; 12

匹) にテレメーター送信機を埋入し、1 週間の手術回復期の後、T-2 トキシンを 0.1 mg/kg (n=4) , 0.5 mg (n=4) , 1.0 mg/kg (n=4) の投与量で 3 グループに分けて投与した。心電図は 24 時間連続記録を 2 週間以上にわたって実施した。心電図記録をもとに、不整脈の発現性、心拍数 (HR)、心拍変動解析 (HRV)、心電図波形分析 (PR 間隔、QT 間隔、QRS 持続時間) を測定した。

#### (2) *In vitro* 評価系における T-2, HT-2 トキシンの免疫細胞毒性に関する研究

T-2, HT-2 トキシン (Wako, Osaka, Japan) の免疫系細胞の機能に及ぼす影響を評価するために、マウスマクロファージ RAW264 細胞 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) および IFN- $\beta$  プロモーターを有するプラスミドあるいは NF- $\kappa$ B 依存性プロモーター領域を有するプラスミドをそれぞれ安定的にトランスフェクトした IFN- $\beta$ /RAW264 ならびに ELAM/RAW264 を用いた。これらの細胞に対して Toll-like receptor 4 (TLR4) のアゴニストである lipopolisaccharide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて刺激、活性化させた。

#### (3) シトリニンのマウス臓器および全身影響に関する研究

BALB/c マウス(4 週齢、雌; 日本エスエルシー) を 1 週間の馴化期間後、一群を 15 匹ずつとして計 3 群に群わけし、過去の研究報告を参照にしてシトリニン (Citricin: CTN) を 0, 5, 30  $\mu$ M の用量で 10 週間飲水投与した。観察項目 (指標) は、体重、血清 IgG 及び IgA 濃度、一般血液生化学検査、

腎臓、肝臓、卵巣および子宮の臓器重量および組織学的検査、腎臓および卵巣の細胞増殖性変化 (PCNA 染色) とした。

#### III. 曝露評価 (アフラトキシン M1)

粉ミルクおよび牛乳の汚染量および曝露量を、「平成 22 年度食品中のかび毒に係る試験検査 (アフラトキシン M1)」などの資料に基づいて推定した。年齢層ごとに算出した。粉ミルクの年間摂取量は、それぞれの月ごとに出した一日あたりの体重 1Kg あたりの摂取量に 365.24/12 をかけて算出した。また、全ての月の分を合計して、生まれてからの 1 年間の総摂取量を計算した。

総曝露量は、0 才から 1 才までの粉ミルクによる曝露量合計に、1 才から 70 才までの牛乳による曝露量合計を合算した各シナリオ (lower bound および upper bound) どうしで合算した。1 才から 70 才までについて年齢層をまたぐ場合に、各年齢層での曝露量の順番 (何番目に多く曝露しているか) をあわせて計算した。1 才から 6 才までで一番多く曝露している人は、7 才から 14 才、15 才から 19 才、20 才以上のそれぞれのライフ・ステージでも一番多く曝露していると仮定した。0 才から 1 才までの曝露量合計と 1 才から 70 才までの曝露量合計の合算においては、ランダムに合算した。

#### C. 研究結果

##### I. 汚染実態調査

###### (1) T-2 トキシン

小麦の T-2 トキシン汚染は、国産では 32 検体中 5 検体、輸入では 32 検体中 2 検体に検出限界以上の汚染が検出された。最大濃度は 0.36  $\mu$ g/kg, 0.55  $\mu$ g/kg であった。大麦

は国産では 8 検体中 3 検体、輸入では 8 検体中 2 検体に汚染が検出された。平均濃度はそれぞれ  $0.58\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.22\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。コーングリッツでは 20 検体中 2 検体から、ハトムギでは 20 検体中 2 検体から、胚芽入り加工品では 10 検体中 3 検体から検出され、それぞれの平均濃度は  $0.8\mu\text{g}/\text{kg}$  および  $1.32\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。最大濃度はハトムギの  $14.1\mu\text{g}/\text{kg}$  が最も高かった。

#### (2) T-2 トキシン+HT-2 トキシン

T-2 トキシンの代謝産物である HT-2 トキシンとの合算をみてみると、国産小麦大麦、輸入小麦大麦とも濃度が増加していることから、HT-2 トキシン汚染も認められたことがわかる。特に最大値は、輸入小麦、国産輸入大麦とも  $6.21\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $11.19\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $10.9\mu\text{g}/\text{kg}$  と高い値であった。ハトムギは最大値が  $22.3\mu\text{g}/\text{kg}$  を示していた。

#### (3) ゼアラレノン

小麦のゼアラレノン汚染は、国産では 32 検体中 15 検体、輸入では 32 検体中 6 検体に検出限界以上の汚染を検出した。最大濃度は  $12.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1.32\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。大麦は国産では 8 検体中 2 検体、輸入では 8 検体中 4 検体に汚染が検出された。平均濃度はそれぞれ  $0.42\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $4.66\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。

コーングリッツでは 20 検体中 10 検体から、雑穀米では 20 検体中 18 検体から、小豆からは 10 検体中 2 検体から、ハトムギでは 20 検体中 18 検体から、胚芽入り加工品では 10 検体中 2 検体から検出され、それぞれの平均濃度は  $12.38\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1.34\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.43\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $8.29\mu\text{g}/\text{kg}$  および  $0.48\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。最大濃度 (g) はハトムギの  $83.02\mu\text{g}/\text{kg}$  が最も高かった。

#### (4) シトリニン

分析法を確立するために、現在購入できる市販のイムノアフィニティカラムを用いる系で検討を行った。直線性では  $0.2\sim 100\text{ppb}$  の範囲において、直線性が認められ、定量限界は  $1.0\text{ng}/\text{g}$  であった。添加回収試験は、白米を使用 (N=5) した。100 及び  $10\text{ng}/\text{g}$  添加において、80% 弱の回収率が得られた。CIT は今回用いた検出法では定量限界が高く、陰性の検体がほとんどであった。

コーングリッツ 16 検体、押し麦 14 検体、玄麦 6 検体、玄米 8 検体、精米 15 検体を対象に分析したところ、コーングリッツ 1 検体に陽性が見られただけであった。

## II. 毒性評価

### (1) T-2 トキシンの心機能への影響に関する研究

T-2 トキシンの皮下投与によって、心拍数および自律神経機能 (パワースペクトラム解析) に明瞭な変化が出現するとともに、不整脈の発現が認められた。

#### 1) 心拍数

$0.1\text{ mg}/\text{kg}$  では、心拍数に有意な変化が認められなかったが、 $0.5\text{ mg}/\text{kg}$  では、1 回目の投与後の 3 日間において対照群にくらべて明期の心拍数の有意な増加が観察された。 $1.0\text{ mg}/\text{kg}$  では、投与後 24 時間以内の死亡個体が現れるため、測定が可能であった投与直後の明期の心拍数は対照群にくらべて明らかな増加が示された。

#### 2) 自律神経機能 (心拍変動解析)

交感神経と副交感神経の活動を示す LF パワーは、 $0.1\text{ mg}/\text{kg}$  および  $0.5\text{ mg}/\text{kg}$  では、明期および暗期のいずれも有意な

変化が認められなかったが、1.0 mg/kg では、投与後 1 日以内の明期において明らかな低下が示された。副交感神経活動を示す HF パワーは、LF パワーと同様に 0.1 mg/kg および 0.5 mg/kg では有意な変化が認められなかったが、1.0 mg/kg では、投与後 1 日以内の明期において明らかな低下が示された。

LF/HF 比 (自律神経バランス) は、いずれの投与量においても有意差が認められなかった。トータルパワーは、0.1 mg/kg では対照群との間に有意差が認められなかったが、0.5 mg/kg では、明期の値が第 1 回目および第 2 回目の投与のいずれにおいても有意な低下が示された。

### 3) 不整脈

0.1 mg/kg および 0.5 mg/kg のいずれも最初の T-2 トキシン投与後 6 時間以降に不整脈が多く出現した。不整脈の種類は、房室ブロックがもっとも多く、そのほかに上室性期外収縮、洞性徐脈、心室期外収縮が観察された。不整脈の発現は 0.1 mg/kg では、投与後 2 日目にもっとも高く、3 日目にやや減少した。0.5 mg/kg では、投与後 1 日目から房室ブロックを中心にして多くの不整脈が出現し、2 日目、3 日目においても多くの不整脈が認められた。不整脈の発現数は、投与後の 3 日間で 0.1 mg/kg では 22 回 (n=4)、0.5 mg/kg では 56 回 (n=4) を示した。

### 4) 刺激伝導系および心室興奮関連指標の変化

洞房結節から心筋に至る刺激伝導系の興奮伝導時間を示す PR 間隔、心筋全体の興奮時間 (脱分極時間) を示す QRS 持続時間および心筋の脱分極と再分極の合

計時間を示す QT 間隔について、0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg のいずれの投与量においても明瞭な変化が観察されなかった。

## (2) *In vitro* 評価系における T-2、HT-2 トキシンの免疫細胞毒性に関する研究

### 1) RAW264 における LPS 誘導性 IFN- $\beta$ レポーター活性におよぼす T-2 および HT-2 の影響

RAW264 における TLR4 シグナリングに与える T-2 または HT-2 の影響を、IFN- $\beta$  プロモーター活性を指標に検討した。その結果、LPS 誘導性 IFN- $\beta$  プロモーターレポーター活性に対して、T-2 トキシンは 10 ng/ml から 80 ng/ml で濃度依存的な抑制効果を示した。80 ng/ml の T-2 存在下では、LPS 単独刺激時のレポーター活性と比較し、約 10 分の 1 の抑制が認められた。HT-2 トキシンにおいても、1.0 ng/ml から 8.0 ng/ml の濃度範囲において、LPS 誘導性 IFN- $\beta$  プロモーターレポーター活性に対して濃度依存的な抑制効果が認められた。

### 2) RAW264 における LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性におよぼす T-2 および HT-2 の影響

ELAM/264 細胞を用いて、TLR4 を介する転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に対する T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの作用を検討した。その結果、LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 依存性レポーター活性は、両トキシンともに抑制効果を示したものの、IFN- $\beta$  プロモーターレポーター活性に対して認められた顕著な濃度依存的抑制効果は見られなかった。

## (3) シトリニンのマウス臓器および全身



## 影響に関する研究

### 1) 体重、飲水量、摂食量

シトリン(CTN) 5  $\mu$ M 投与群、30  $\mu$ M 投与群のいずれも対照群に比べて、体重、飲水量および摂食量に有意な変化は認められなかった。

### 2) 臓器重量

腎臓、肝臓および子宮の重量は、CTN 5  $\mu$ M 投与群、30  $\mu$ M 投与群のいずれも対照群に比べて差異が認められなかった。一方、CTN 30  $\mu$ M 投与群では、卵巣相対重量の有意な増加( $P < 0.05$ )が観察された。

### 3) 血液生化学検査および免疫グロブリン値測定

Creatinin、BUN、AST、ALP、ALT、TP、albumin のいずれの値も CTN 投与群と対照群との間に差が認められなかった。また、免疫グロブリン (IgG、IgA) についても全ての群間で有意差のある変化が認められなかった。

### 4) 病理組織変化および免疫組織学的変化

病理組織学的変化として、CTN 投与群で、肝臓に肝細胞の単細胞壊死を伴う微小肉芽腫が認められた。また、CTN 投与群で、肝臓における胆管周囲の炎症細胞浸潤の増加傾向が認められた。その他、腎臓における再生尿細管、尿細管上皮の空胞化、水腎症が認められたが、CTN 投与に関連した変化ではなかった。

子宮粘膜の変化として、発情期の組織像を示す個体が多い傾向が認められた (Table 5)。しかし、一次卵胞、二次卵胞、黄体、閉鎖卵胞数をカウントしたところ、群間で明らかな違いは認められなかった。

腎臓では、尿細管等に明らかな病理変化は認められなかったが、PCNA 染色の結果、

尿細管上皮の陽性細胞率が CTN 5  $\mu$ M 投与群及び 30  $\mu$ M 投与群で用量依存的に有意に増加した。

## III. 曝露評価 (アフラトキシン M1)

### (1) 粉ミルクを介した曝露量

摂取量に汚染量をかけて曝露量 (体重 1Kg あたりの g 数) を計算した。Lower bound では平均=17.35、標準偏差=127.00、中央値=0、99%タイル値=855.47 となった。Upper bound では平均=698.19、標準偏差=35.10、中央値=693.627、99%タイル値=855.47 となった。

### (2) 牛乳を介した曝露量

年齢層ごとに計算した摂取量の合計から 1 才から 70 才までの合計摂取量を計算し、それに汚染量をかけて、1 才から 70 才までの合計曝露量を計算することにより、次の分布を得た。Lower bound では、平均=842.26、標準偏差=2360.51、中央値=335.03、99%タイル値=8172.75。Upper bound では、平均=851.09、標準偏差=2345.08、中央値=341.10、99%タイル値=8183.10 であった。(いずれも単位は体重 1Kg あたりの ng)

### (3) 総曝露量の推定

シミュレーションによって、1 才までの粉ミルクの曝露量と 1 才から 70 才までの牛乳による曝露量を合わせた総曝露量を求めた。

## D. 考察

### I. 汚染実態調査

T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンは、DON や NIV に比べてはるかに強い免疫毒性を持っている。そのため、実態調査の値

に注意を払う必要がある。

本調査では、T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノンの 3 種のフザリウムトキシンを一斉に捕捉出来るイムノアフィニティーカラムを用いて行った。検出限界値は各食品で異なるが、回収率はすべての食品で 70%以上であった。3 種のフザリウムトキシンに関しては今後の実態調査もこの分析法で行うこととした。

今年度の実態調査結果から、輸入小麦、国産小麦並びに輸入小麦、国産小麦から T-2 トキシンが検出されたが、小麦類より大麦類にその頻度も濃度も高いことが認められた。この結果を踏まえて来年度はさらに検体数を増やして実態調査を行う必要がある。

2003 年に報告されたヨーロッパ連合での T-2 トキシンの実態調査結果によると、T-2 トキシンは小麦、小麦粉、大麦、オート麦、から検出されており、そのレンジは平均で 0.8-280  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。欧州食品化学委員会 (SCF) で設定された一日耐容摂取量により曝露評価を行った結果によると、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンは、成人においては一日耐容摂取量の 61-171%を示しており、子供では 26.7-563.3%と推測された。我が国の曝露評価は今後実態調査を継続して推定されるものであるが、国産小麦および大麦からも検出されていることを考慮すると、基準値設定も必要になるかもしれない。

ZEA は、ハトムギ、雑穀米から高い頻度で検出され、ハトムギの濃度も高い水準であった。これらのほとんどは輸入品であると考えられる。一方国産小麦からも比較的高い頻度で検出されている。しかしその濃度は低レベルである。コーングリッツでは

頻度は国産小麦と同等であったが、その濃度は比較的高かった。今年度の実態調査は ZEA のみとしたが、今後は代謝物も含めて調査する必要があるかもしれない。

CIT は、今回の分析法では高感度には測定出来なかったが、米からは検出されなかった。しかしながら、1 検体ではあるがコーングリッツから検出された。この結果は、シトリニンの食品汚染が我が国においても起こりうることを示している。CIT に関しては今後毒性、分析法などをより検討していく必要がある。

## II. 毒性評価

### (1) T-2 トキシンの心機能への影響に関する研究

本研究では、T-2 トキシンの投与によって心拍数および自律神経機能の変化に加えて、不整脈が高頻度に誘発されることが明らかになった。すなわち、少なくとも 0.1  $\text{mg}/\text{kg}$  の皮下投与によって房室ブロックなどの不整脈が生じることが明らかになった。最近、同じトリコテセン系のマイコトキシンであるデオキシニバレノール (DON) (トリコテセン系 B グループ) において催不整脈作用があることが明らかにされている (Suchitra *et al.*, 2011)。不整脈の発現開始時間は、投与後 6 時間以降であったことから、T-2 トキシンの心臓影響が発現するまでには、ある程度の時間経過が必要であると思われる。DON による催不整脈効果においても、投与後 10 時間程度の時間経過を要すことから、これらのマイコトキシンによる心臓影響の発現には細胞傷害性の変化が関与していることが推測される。本研究か

らトリコテセン系のマイコトキシンは A グループ、B グループのいずれも心臓毒性を有することが確認された。一方、1.0 mg/kg の T-2 トキシンの投与では重度の不整脈を伴う死亡個体が現れたが、デオキシニバレノールでは同用量でも死亡個体がみられず、不整脈の発現性も T-2 トキシンのほど高くないことから、心臓毒性の強さは、T-2 トキシンの > デオキシニバレノールであることが示唆された。

#### (2) *In vitro* 評価系における T-2, HT-2 トキシンの免疫細胞毒性に関する研究

今回、LPS 誘導性 TLR4 シグナリングに対する T-2 および HT-2 影響をマウスマクロファージ様細胞にて検討した。その結果、両毒素とも TLR4 シグナルの下流に存在する 2 経路を阻害することが明らかとなった。この結果は、これまでに報告されてきたトリコテセン系カビ毒のタイプ B に相当する DON と NIV と類似する T-2, HT-2 はともに TLR4 の MyD88 非依存経路を阻害することが示唆された。NF- $\kappa$ B の TLR4 による活性化は MyD88 依存経路が主要な経路と考えられている。従って、TLR4 の MyD88 依存経路に対する阻害作用は両毒素とも限定的であることが示唆された。

今回明らかとなった T-2 トキシンの LPS 誘導性 IFN- $\beta$  レポーター活性に対する抑制作用は、これまでに報告されている DON と NIV の濃度と比較し 1/10 以下の濃度で認められた。この成績は、タイプ B と比較してタイプ A の毒性が強いとされるこれまでの報告と一致する。

#### (3) シトリニンのマウス臓器および全身

#### 影響に関する研究

BALB/c マウスに CTN を 10 週間飲水投与し、腎臓、肝臓、卵巣及び子宮への影響について解析した。その結果、CTN 5~30  $\mu$ M の濃度で、卵巣に明らかな形態学的な変化を伴わないものの、発情期を示す個体が多く認められた。また 30  $\mu$ M 投与群において、卵巣相対重量の増加が認められた。これらの実験結果および過去の研究報告から、CTN による生殖器影響の可能性が示唆された。

また、免疫組織学的検査においては、腎臓の PCNA 染色により、用量依存的に皮質から髄質にかけて腎尿細管上皮の陽性細胞数が増加し、増殖活性の軽度増加が認められ、CTN が尿細管毒性を示す可能性が示唆された。本試験においては、明らかな変性変化は認めなかったものの、腎尿細管上皮の増殖活性の増加が認められたことから、なんらかの受容体を介した細胞増殖シグナルの活性化が示唆され、より高用量域での再現性の検討の後に、発がん性試験ないし二段階発がんモデルを用いた検討を行う必要が示唆された。

#### III. 曝露評価 (アフラトキシン M1)

##### (1) シナリオによる総曝露量の違い

99%タイルまでは、シナリオによる総曝露量の違いが大きいですが、これは、粉ミルクの摂取量シミュレーションにおける LOE 未満の値の処理の違いによるものと思われる。すなわち、約 99.5%までが LOE 未満なので、lower bound では約 99.5%までについては摂取量がゼロになってしまうのに対して、upper bound では約 99.5%までは摂取量が 0.12 とされているため、そこまでについて

は、粉ミルクによる曝露量に大きな相違が生じてしまうのである。

(2) アフラトキシン M1 曝露による健康への影響について

アフラトキシン M1 の健康への影響のうちで最も考慮しなければならないのは発ガンであるが、これについては、以下のような発ガン率の計算式が認められている。

※体重 1Kg あたりのアフラトキシン M1 の曝露量 (ng) × {B 型肝炎キャリアー% (日本では 2%) \* 0.03 (キャリアのアフラトキシン M1 の発がん率) + B 型肝炎非キャリアー% (日本では 98%) \* 0.001 (健常人のアフラトキシン M1 の発がん率)} = 10 万人あたりにガンを発生する人の数

そこで、まずは 70 才までの生涯の総曝露量から、一日あたりの曝露量を計算するために、総曝露量を (365.24 × 70) = 25566.8 (単位は日) で割る。さらにその値に、上記の計算式による日本人の現状の数値をあてはめて、0.00158 をかけると、それぞれの % タイルにおける 10 万人あたりのガンを発生する人の数がわかる。

たとえば、99% タイルにおける両シナリオよりも多めに 9,000ng と仮定してみると、10 万人あたりにガンを発生する人の数は 0.000553 人となり、日本人口総数を 1 億 2 千万人としても、0.000553 × 1200 = 0.636 人で、一人にも満たないことになる。

それゆえ、現状では牛乳を介したアフラトキシン M1 による発ガンの恐れは、ほぼないと考えてよいと思われる。

(3) 今後の課題について

a. 粉ミルクの摂取量データ

生後時期ごとに、どれくらいの粉ミルクを摂取しているのか (体重 1Kg あたり)、摂取がない場合についても含めたデータが必要である

b. 粉ミルクの汚染量計算

GEMS FOOD の規定をそのまま適用しているが、lower bound は少し過少評価だろうし、upper bound はあまりに過大評価をしていると思われる。この間を取るような、LOQ 以下の評価の仕方を考えてみる必要がある

c. 牛乳の摂取量計算における年齢層をまたぐ場合の取り扱い方法について

今回は、各年齢層における摂取量の順位は人 (サンプル) によって異ならないとした。いわば、いくつになっても、多く摂取する人は多く摂取するという考え方を極端にしたものである。しかし、現実には、各年齢層ごとの摂取量の順位は高い相関はあるだろうが、厳密に一致するものではあるまい。そこで、各年齢層における摂取量の順位の相関を利用したシミュレーションが行えると、より現実的になろうかと思われる。ただし、その場合、相関係数を求めるためのデータの入手という新しい課題が発生する。

d. 牛乳の摂取パターンについて :

年齢が上がるに従って、「牛乳を飲む頻度が少ない」人が増えてくる。頻度の少ない人と、多い人とでは、摂取計算を別にした方が良いかもしれない。

## E. 結論

### I. 汚染実態調査

本研究では今後 3 年間通年で 3 種のフザリウムトキシン (T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノン) とシトリニンを測定した。トリコテセン系カビ毒の中で最

も毒性が高い T-2 トキシン、HT-2 トキシンが、国産および輸入麦類から検出された。国際的にもまだ基準値が設定されていないが、その汚染はヨーロッパを中心に報告されており、基準値の必要性が高まってきている。我が国においても汚染があることが確認されたことから、より詳細なデータを収集する必要がある。

ZEA は、我が国にも生産菌が生息しており、その産生菌は DON および NIV も産生することが知られている。そのため、DON、NIV、ZEA の共汚染を危惧しなければならない。今年度の実態調査では、ハトムギおよびコーングリッツで比較的高濃度が検出されているが、国産輸入小麦においては低レベルの汚染であった。

CIT は黄変米毒の 1 種であるため、米への汚染を注意しなければならないが、今年度の実態調査では米汚染は見られなかった。一方低レベルではあるが、コーングリッツに汚染が見られた。

## II. 毒性評価

### (1) T-2 トキシンの心機能への影響に関する研究

本研究によって、T-2 トキシンは心機能および自律神経系に対して明らかな影響をもたらすことが明らかになった。T-2 トキシンを大量に摂取した場合には、基礎疾患を有すハイリスク患者などでは心臓障害を高める危険性が示唆された。

### (2) *In vitro* 評価系における T-2, HT-2 トキシンの免疫細胞毒性に関する研究

タイプ A トリコテセン系カビ毒の T-2 と HT-2 について、これら毒素が本研究からタ

イプ B と同様に LPS 誘導性 TLR4 シグナルを抑制すること、特に、その下流 MyD88 非依存経路については濃度依存的な阻害活性を有することを明らかにした。免疫毒性をその特徴の 1 つとするトリコテセン系カビ毒の毒性のプロファイルから推測した場合、今回得られた結果に矛盾はないと考えられ、またその作用点が TLR4 シグナル伝達経路の MyD88 非依存経路に存在する可能性を示唆したことは、今後のトリコテセン系カビ毒の精緻なリスクアナリシスに寄与すると考えられる。なお、留意点として T-2 とともに HT-2 の毒性についても注意を払う必要性を挙げる。本研究結果から T-2 と比較して HT-2 の毒性が高いことが示唆され、今後のリスクマネジメントにあたってはこの点を十分考慮する必要があると考えられる。

### 3) シトリニンのマウス臓器および全身影響に関する研究

雌 BALB/c マウスに CTN を飲水投与した結果、卵巣相対重量の増加および発情期を示す個体の増加が認められた。さらに、腎臓を用いた PCNA 染色の結果、尿細管上皮において、増殖活性の軽度増加が認められた。以上より、極低用量の CTN による卵巣に対する毒性および腎発がん誘発の可能性が考えられ、今後さらなる検討を行う必要性が示唆された。

## III. 曝露評価 (アフラトキシン M1)

現在、日本国内に流通している粉ミルクおよび牛乳を介したアフラトキシン M1 の曝露量によって健康に悪い影響が生じる恐れはほぼないと考えられる。(99%タイトルと

いう高い曝露量の水準で計算しても日本総人口あたりにガンを発症する人数は1人未満となる。)

## F. 研究業績

### 【論文】(カビ毒関係)

#### ○汚染実態調査(分析法含む)

- 1) Aoyama, K., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Noriduki, H., Itoh, Y., Fugita, K., Kai, S., Tsutsumi, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Iizuka, S., Ogiso, M., Maeda, M., Yamaguchi, S., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S. (2010): Four-year surveillance for ochra-toxin A and fumonisins in retail foods in Japan. *J. Food Protection*. 73: 344-352.
- 2) Tanaka, H., Sugita-Konishi, Y., Takino, M., Tanaka, T., Toriba, A. and Hayakawa, K. (2010): A survey of the occurrence of Fusarium Mycotoxins in Biscuits in Japan by using LC/MS. *J. Health Science*. 56: 1-7
- 3) Kadota, T., Takezawa, Y., Horano, S., Tajima, O., Maragos, C., Nakajima, T., Tanaka, T., Kamata, Y. and Sugita-Konishi, Y. (2010): Rapid detection of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using surface plasmon resonance immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 673: 173-178.
- 4) Tanaka, H., Takino, M., Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Leeman, D., Toriba, A. and Hayakawa, K. (2010): Determination of Fusarium mycotoxins by liquid chromatography/tandem mass spectrometry coupled with immunoaffinity extraction. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 24: 2445-2452.
- 5) 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).

#### ○毒性評価

- 1) Sugiyama, K.I., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M. and Sugita-Konishi, Y. (2010): Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. *Toxicol Lett*. 192: 150-154.
- 2) Poapolathep, A., Poapolathep, S., Sugita-Konishi, Y., Wongpanit, K., Machii, K., Itoh, Y. and Kumagai, S. (2010): The Effect of Naringenin on the Fate and Dis-position of Deoxynivalenol in Piglets. *J Vet Med Sci*. 72: 1289-1294.
- 3) Ngamponsa S., Ito, K., Kuwahara M., Kumagai, S. and Tsubone H. : Arrhythmias and alterations in autonomic nervous function induced by deoxynivalenol (DON) in unrestrained rats. *J. Toxicol. Sci*. 2011. (in press)

#### ○曝露評価

- 1) Sato, T., Saito, S., Nakajima, M., Tabata, T., Tanaka, S., Norizuki, H., Ito, Y., Kai, S., Sugiyama, K., Kamata, Y., Yoshiike, N. and Kumagai, S. (2010): Exposure to aflatoxins in Japan. Risk assessment for aflatoxin B1. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 27: 365-372.

### 【著書】

- 1) 局 博一 (2010): 第8章 全身健康影響指標を利用した安全性評価. 「食の安全科学の展開 - 食のリスク予測と制御に向けて -」(東京大学 食の安全研究センター編)。シーエムシー出版 67 - 72 頁。

### 【学会発表】(カビ毒関係)

#### ○汚染実態調査(分析方法含む)

- 1) 門田智之、竹澤陽子、平野哲、田嶋修、Chris Maragos、中島隆、田中敏嗣、鎌田



- 洋一、小西良子：SPR によるニバレノール、デオキシニバレノール分別検出法の検討。日本マイコトキシン学会第 68 回学術講演会，つくば，2010.9
- 2) 佐久間久子、伊藤有加里、小林政人、渡辺康、杉山圭一、鎌田洋一、小西良子：木の実中の総アフラトキシンの迅速法キットの検討。  
日本マイコトキシン学会第 68 回学術講演会，つくば，2010.9
- 3) 渡辺康、佐久間久子、鎌田洋一、杉山圭一、斉藤史朗、佐藤敏彦、小西良子：パスタ調理におけるオクラトキシン A の消長について。  
第 100 回日本食品衛生学会学術講演会，熊本，2010.9
- 4) 門田智之、木村真、平野哲、田嶋修、中島隆、鎌田洋一、小西良子：LC/MS/MS を用いた小麦中のトリコテセン系マイコトキシン（タイプ B）及びその前駆体・代謝産物の同時分析。第 100 回日本食品衛生学会学術講演会，熊本，2010.9
- 5) 青山幸二、甲斐茂美、小木曾基樹、高橋正紀、山口茂明、田中敏嗣、熊谷進、小西良子：日本に流通する食品中のフモニシンを対象とした 6 年間のサーベイランス。第 100 回日本食品衛生学会学術講演会，熊本，2010.9
- 6) 中島正博、永山敏廣、石黒瑛一、内藤成弘、堀江正一、大西貴弘、鎌田洋一、小西良子、田中敏嗣：アフラトキシン M1 試験法の妥当性評価。第 100 回日本食品衛生学会学術講演会，熊本，2010.9
- 7) 法月廣子、中島正博、田端節子、青山幸二、和田丈晴、菊川浩二、伊藤嘉典、石黒瑛一、田中敏嗣、熊谷進、小西良子：日本に流通する食品中のオクラトキシン A を対象とした 6 年間のサーベイランス。第 100 回日本食品衛生学会学術講演会，熊本，2010.9
- 8) Sugita-Konishi Y : Current topics of food poisoning in Japan : Mycotoxins and Mrine toxins. 2010 International Symposium, 韓国ソウル, 2010.10
- 9) 渡辺康、佐久間久子、鎌田洋一、杉山圭一、斉藤史朗、佐藤敏彦、小西良子：パスタ調理におけるオクラトキシン A の消長について、第 100 回日本食品衛生学会学術講演会（2010，9）。
- 10) 佐久間久子、伊藤有加里、小林政人、渡辺康、杉山圭一、鎌田洋一、小西良子：木の実中の総アフラトキシンの迅速法キットの検討、日本マイコトキシン学会第 68 回学術講演会講演要旨集 31(2010，9)。
- 毒性評価
- 1) Sugita-Konishi Y, Itoh S, Tamura C, Kamata, Y : Pectin Gelation Suppresses Bioavailability of Deoxynivalenol in Mice. 45th Annual Meeting of the UJNR Joint Panel on Toxic Microorganisms, Seattle, WA, 2010.11
- 2) Sugita-Konishi Y, Itoh S, Tamura C, Kamata Y : Pectin Gelation Suppresses Bioavailability of Deoxynivalenol in Mice. 45th Annual Meeting of the UJNR Joint Panel on Toxic Microorganisms, Seattle, WA, 2010.11
- 3) Suchitra, N., Ito, K., Kuwahara, M., Kumagai, S., Tsubone H.: Circulatory and autonomic nervous short-term effects of deoxynivalenol toxin evaluating by a telemetric system as a recorder in conscious rats. 第 67 回日本マイコトキシン学会学術講演会、東京、2010。
- 4) 杉山圭一、石澤聡美、木下麻緒、薬袋裕二、小西良子：Type A トリコテセンの自然免疫系におよぼす影響。  
日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会，東京，船堀，2011. 1
- 5) 戸谷香央里、門田智之、新井佐知子、鎌田洋一、伊東正吾、小西良子：Type A ト

リコテセンの自然免疫系におよぼす影響：日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会，東京，船堀，2011. 1

6) Poapolathep A, Poapolathep S, Isariyodom S, Imsilp K, Klangkaew N, Sugita-Konishi Y, Kumagai S : Metabolic Conversion of Aflatoxin B2 to Aflatoxin B1 in Ducks. Society of Toxicology Annual Meeting 2011, Washinton,D.C. USA,2011.3

7) 杉山圭一、石澤聡美、木下麻緒、薬袋裕二、小西良子：Type A トリコテセンの自然免疫系におよぼす影響、日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会講演要旨集 19 (2011, 1) .

○曝露評価（疫学手法含む）

1 ) Saito M, Irikura D, Yahata Y, Sugita-Konishi Y, Kaji Y, Kamata Y : The Japanese habit of eating raw equine flesh has presented a new parasitic foodborne disease. 45th Annual Meeting of the UJNR Joint Panel on Toxic Microorganisms , Seattle, WA, 2010.11

2) Sato T, Saito S, Nakajima M, Tabata S, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Kai S, Aoyama K, Wada T, Kikukawa K, Ogiso M, Yamaguchi M, Yoshida K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y : Exposure to ochratoxin A

and fumonisin in Japan. International Mycotoxin Conference MycoRed, Penang, Malaysia,2010,12

2) Saito M, Irikura D, Yahata Y, Sugita-Konishi Y, Kaji Y, Kamata Y : The Japanese habit of eating raw equine flesh has presented a new parasitic foodborne disease. 45th Annual Meeting of the UJNR Joint Panel on Toxic Microorganisms, Seattle, WA, 2010.11

4) 青山幸二、佐藤敏彦、斉藤史朗、中島正博、田端節子、田中敏嗣、法月廣子、伊藤嘉典、甲斐茂美、和田文晴、菊川浩史、小木曾基樹、山口茂明、由田克士、熊谷進、小西良子：我が国における食品からのオクラトキシン A およびフモニシンの曝露評価。日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会，東京，船堀，2011. 1

5) Kadota T, Kimura M, Hirano S, Tajima O, Nakajima T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y : Simultaneous Determination of Type B Trichothecene Mycotoxins and Their Derivatives in Wheat by LC/MS/MS. Society of Toxicology Annual Meeting 2011,Washinton,D.C. USA,2011.3

6) Irikura D, Saito M, Sugita-Konishi Y, Kamata Y : New Food-Borne Hazard Parasite Toxin. Society of Toxicology Annual Meeting 2011,Washinton,D.C. USA,2011.3

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安心・安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

食品汚染カビ毒の実態調査

研究分担者 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

近年国際的潮流としてカビ毒に対する対策推進が進んでいる。我が国の輸入食品依存体制から鑑みても、輸入食品の安全性を確保するために、JECFA およびコーデックスにおいて評価されるカビ毒を対象に、我が国の汚染実態を把握ししかるべき対策をとる必要がある。

そこで今年度から3年間通年で、3種のフザリウム毒素(T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノン(ZEA))およびシトリニン (CIT) を対象に実態調査を行った。

今年度は市販食品 19 食品目 183 試料について LC/MS-MS を用いて 3 種のフザリウム毒素を、市販食品 5 食品目 59 試料について HPLC-蛍光検出器を用いて CIT を、測定した。T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンは、国産、輸入麦類、小麦粉、コーングリッツ、ハトムギ、胚芽入り加工品から検出された。ZEA は国産、輸入麦類、コーングリッツ、ハトムギ、胚芽入り加工品に加え、雑穀米、小豆から検出された。CIT はコーングリッツ 16 件体中 1 件から検出されたが、押し麦、玄麦、玄米、精米からは検出されなかった。T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの検出率は胚芽入り加工品で最も高く、30%から検出された。輸入大麦でも 25%から検出された。国産大麦では 12.5%に留まっていた。小麦においては国産の検出頻度の方が輸入小麦より高く 21.9%であった。小麦粉からの検出率も 21.7%であった。汚染濃度では大麦が国産輸入とも小麦より高かった。最大濃度はハトムギの 22.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$  であり、最も高かった。続いて胚芽入り加工品(14.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、国産大麦 (11.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) , 輸入大麦(10.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )であった。

ZEA の検出率は雑穀米、ハトムギで 90%を示していた。検出濃度は、ハトムギでは平均 8.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (最大濃度 83.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、雑穀米では平均 1.34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (最大濃度 6.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )であった。

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)	竹内 浩 三重県保健環境研究所
	田中 敏嗣 神戸市環境保健研究所
石黒 瑛一 (財)日本食品分析センター	橋口 成喜 川崎市衛生研究所
甲斐 茂美 神奈川県衛生研究所	中島 正博 名古屋市衛生研究所
小木曾 基樹 (財)日本食品分析センター多摩研究所	法月 廣子 (財)日本穀物検定協会
	松井好之 (財)日本冷凍食品協会
佐藤孝史 (財)食品分析開発センター SUNATEC	吉成 知也 国立医薬品食品衛生研究所
田端 節子 東京都健康安全研究センター	佐久間 久子 国立医薬品食品衛生研究所
谷口 賢 名古屋市衛生研究所	渡辺 康 国立医薬品食品衛生研究所

## A. 研究目的

食品汚染カビ毒への関心は年々高まり、国際的にも規格基準の策定が進んでいる。JECFA では 2007 年は総アフラトキシンおよびオクラトキシン A、2010 は 2 月にはデオキシニバレノールの見直しが行われ、2011 年にはフモニシンの見直しが予定されている

それを受けてコーデックスでも具体的な基準作りが進んでおり、2008 年には木の実の総アフラトキシンおよび大麦、小麦のオクラトキシン A の基準値が設定された。

このように国際的レベルでカビ毒に対する対策がとられている。我が国の輸入食品依存体制から鑑みても、輸入食品の安全性を確保するために、我が国において、近い将来 JECFA およびコーデックスにおいて評価されるカビ毒を対象に、我が国の汚染実態を把握し、しかるべき対策をとる必要がある。

現在のところ基準値が設けられているのはパツリンではリンゴジュースでの成分規格として、総アフラトキシンは食品衛生法第 6 条 2 項により規定され、デオキシニバレノールには暫定的基準値が設定されている。

また、昨年までの厚生科学研究費補助金では、フモニシンおよびオクラトキシン A を対象に 6 年間の通年汚染実態調査を実施されている。

そこで今年度から 3 年間通年で、トリコテセン系マイコトキシンである T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノンを対象に輸入小麦、国産小麦、輸入大麦、輸入大麦、小麦粉、ハトムギ、コーングリッツ、小豆、胚芽入り加工品を分析した。さらに黄変米の

一種である CIT を対象に分析法の検討を行い、やや定量限界が高い検出法ではあるが今年度開発した方法で、米、玄米、ミニマムアクセス米を分析した。

## B. 研究方法

実態調査に用いた麦類は、国産小麦 (32 点) 大麦 (8 点)、輸入小麦 (32 点) 大麦 (8 点) であり、農林水産省から提供された。コーングリッツ、雑穀米、小豆、小麦粉、はと麦、胚芽入り加工品は、市販品を用いた。

(1) T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノンの分析は次の方法で行った (スキーム 1)。

抽出は、試料 25g を抽出溶媒メタノール：水 (75 : 25) を 100mL を加え、30 分間振とう抽出することで行った。遠心分離 (3000rpm (1410g)、10 分間) でおこなったあと添加用試料の場合はそれぞれのカビ毒を決められた用量を添加後、暗所に 1 時間放置した後、抽出した。

前処理はイムノアフィニティーカラムカラム (R-Biopharm-Rhone 社、プレップ) を用いた。

IAC に抽出溶液 10.0mL を正確にピペッターまたはホールピペットなどで 50mL のメスフラスコへとり、ガラス繊維ろ紙でろ過を行った。ろ液を三角フラスコにとり、試料溶液とした。

正確にとり IAC に注入する。溶出液を共栓付き 10mL 容試験管にとった。

試験用液は、メタノール溶液を窒素気流を送るカエノポレーターを用いて溶媒を除去し

た。残さを LC/MS/MS 移動相 0.5mL で溶解し、LC/MS/MS 用試験溶液とした。

<LC/MS/MS の測定例>

カラム充填剤 ZORBAX C18 (粒径 1.8 $\mu$ m)  
 カラム [5.1(29)] 内径 2.1mm、長さ 100mm  
 カラム温度 40°C  
 LC/MS/MS 移動相  
 A: 10mmol/L 酢酸アンモニウム  
 B: アセトニトリル  
 グラジエント条件: A/B(90/10) — (20  
 分間) — A/B(30/70)

流速 0.2mL/min

注入量 5 $\mu$ L 質量分析計条件(例)

イオン化モード ESI-positive

ドライガス 7L/min at 350°C

ネプライザーガス 345kPa

フラグメンター電圧 100V

モニターイオン(m/z)

	Pre cor ser	Tar get	Quali fier	CE (Tar get)	CE (Quali fier)
DON	297	249	203	10	10
HT-2	442	263	215	9	9
T-2	484	305	215	10	20
ZEA	319	187	283	20	10

(2) CIT の分析

試料 50g に抽出液 MeOH-3% NaHCO<sub>3</sub>(1+1)  
 200mL を加えホモジナイズを 5 分間行い、  
 Whatman No. 4 でろ過後、ろ液 4mL を PBS-0.01%  
 Tween 20 で 25 倍希釈した。

希釈液を Whatman 934AH でさらにろ過し、  
 ろ液 20 mL (0.2 g 相当) を前処理 IAC カラ  
 ム (CitriTest WB、Vicom 社) へ負荷し、10  
 mM 酢酸アンモニウム溶液 (10 mL 以上) で 溶  
 出した。

溶出液にアセトニトリル 3mL を加えアルミ  
 ブロックヒーター (45°C) 及び窒素気流で  
 0.4mL 程度に濃縮したのち、注入液: H<sub>2</sub>O で  
 1mL にメスアップし、HPLC-蛍光検出器で測定  
 を行った。

分析条件は次の通りである。

分析カラム: Inertsil ODS-4V 4.6mm

i.d.  $\times$  250mm, 粒子径 5 $\mu$ m

GL Sciences (株)

移動相 : CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O-ギ酸(55+45+0.1)

カラム温度: 45°C

注入量 : 100 $\mu$ L

流速 : 1.0mL/min

検出器 : 蛍光検出器(励起波長 333nm,  
 蛍光波長 500nm)

C. 研究結果

(1) T-2 トキシシン

小麦の T-2 トキシシン汚染は、国産では 32  
 検体中 5 検体、輸入では 32 検体中 2 検体に検  
 出限界以上の汚染を検出した。最大濃度は  
 0.36  $\mu$ g/kg, 0.55 $\mu$ g/kg であった。大麦は国  
 産では 8 検体中 3 検体、輸入では 8 検体中 2  
 検体に汚染が検出された。平均濃度はそれぞ  
 れ 0.58 $\mu$ g/kg, 0.22 $\mu$ g/kg であった。

コーングリッツでは 20 検体中 2 検体から、ハ  
 トムギでは 20 検体中 2 検体から、胚芽入り加  
 工品では 10 検体中 3 検体から検出され、それ

その平均濃度は0.8 $\mu$ g/kgおよび1.32 $\mu$ g/kgであった。最大濃度はハトムギの14.1 $\mu$ g/kgが最も高かった(表1、図1、図2)。

#### (2) T-2 トキシンおよびHT-2 トキシン

T-2 トキシンの代謝産物であるHT-2 トキシンとの合算をみても、国産小麦大麦、輸入小麦大麦とも濃度が増加していることから、HT-2 トキシン汚染も認められたことがわかる。特に最大値は、輸入小麦、国産輸入大麦とも6.21 $\mu$ g/kg、11.19 $\mu$ g/kg、10.9 $\mu$ g/kgと高い値であった。ハトムギは最大値が22.3 $\mu$ g/kgを示していた(表2、図3、図4)。

#### (3) ゼアラレノン

小麦のゼアラレノン汚染は、国産では32検体中15検体、輸入では32検体中6検体に検出限界以上の汚染を検出した。最大濃度は12.0 $\mu$ g/kg、1.32 $\mu$ g/kgであった。大麦は国産では8検体中2検体、輸入では8検体中4検体に汚染が検出された。平均濃度はそれぞれ0.42 $\mu$ g/kg、4.66 $\mu$ g/kgであった。

コーングリッツでは20検体中10検体から、雑穀米では20検体中18検体から、小豆からは10検体中2検体から、ハトムギでは20検体中18検体から、胚芽入り加工品では10検体中23検体から検出され、それぞれの平均濃度は12.38 $\mu$ g/kg、1.34 $\mu$ g/kg、0.43 $\mu$ g/kg、8.29 $\mu$ g/kgおよび0.48 $\mu$ g/kgであった。最大濃度はハトムギの83.02 $\mu$ g/kgが最も高かった(表3、図5、図6)。

#### (4) シトリニン

分析法を確立するために、現在購入できる市販のイムノアフィニティカラムを用いる系で検討を行った。

直線性では0.2~100ppbの範囲において、直線性が認められた(表5)。定量限界は1.0ng/gであった。

添加回収試験は、白米を使用(N=5)した。100及び10ng/g添加において、80%弱の回収率が得られた(表6)。典型的なクロマトグラムを図7に示した。

CITは今回用いた検出法では定量限界が高く、陰性の検体がほとんどであった。

コーングリッツ16検体、押し麦14検体、玄麦6検体、玄米8検体、精米15検体を対象に分析したところ、コーングリッツ1検体に陽性が見られただけであった(表4)

## D. 考察

今年度からサーベイランスを開始したフザリウム毒素はT-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノンである。

分析法は、3種のフザリウムトキシンを一斉に捕捉出来るイムノアフィニティカラムを用いて行った。検出限界値は各食品で異なるがT-2 トキシンでは0.1-1.0 $\mu$ g/kgであり、HT-2 トキシンでは0.4-3.8 $\mu$ g/kg、ZEAは0.15-5.7 $\mu$ g/kgであった。回収率はすべての食品で70%以上であった。3種のフザリウムトキシンに関しては今後の実態調査もこの分析法で行うこととした。

CITは、市販のCITを捕捉出来るイムノアフィニティカラムの回収率があまりよくなく、分析法としてはまだ改良の余地が残され