

図3 HT-2 トキシンの汚染実態

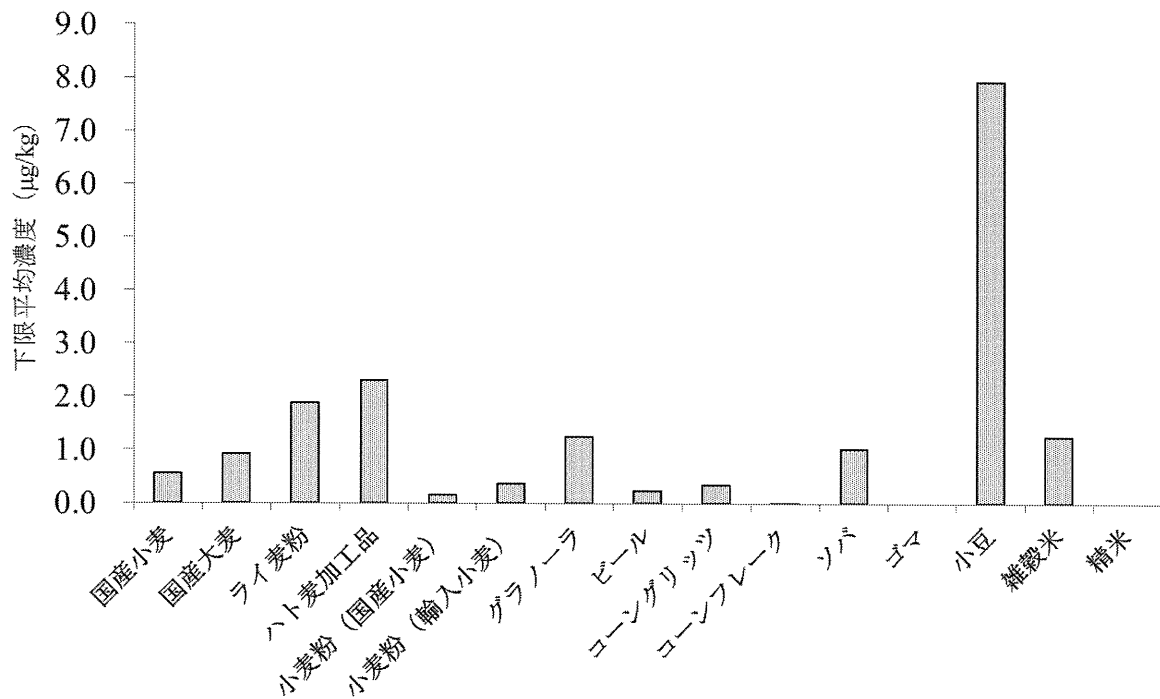


図4 T-2 トキシンの汚染実態

## 厚生労働科学研究費補助金

(食品の安全確保推進研究事業)

### 基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と 生体影響評価に関する研究

#### 分担研究報告書

#### 国内流通食品における *Fusarium* 属菌の分布状況

研究分担者	渡辺 麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部
研究協力者	高橋 治男	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部
	吉成 知也	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部
	小西 良子	麻布大学	生命・環境科学部
	中村 和真	麻布大学	生命・環境科学部

#### 研究要旨

*Fusarium* 属菌は、毒性の強いマイコトキシンを産生する菌として様々な農作物に分布することが知られ、食品衛生学上重要な真菌である。近年の調査では、国産の小豆において、毒性の強いトリコテセン系マイコトキシンをはじめとした複数のマイコトキシンの高濃度・高頻度の汚染が確認されている。しかし、汚染原因となる *Fusarium* 属菌の分布状況など生態については調査が進んでおらず、農作物全体をみても、ある特定の地域や作物を対象とした限定された菌種の分布状況が調査されているのみである。そこで本研究では、国内に流通する小豆を中心とした食品について、産地別に *Fusarium* 属菌の分布状況を検討した。国産小豆および対照として国産大豆・外国産小豆の計 20 検体を供試した。小豆および大豆の全粒を寒天平板培地上で培養後、*Fusarium* 属菌の特徴を示すコロニーの発育がみられた粒数を計測した。発育したコロニーを単離し、形態観察および分子生物学的指標によって同定した。その結果、*Fusarium* 属菌の陽性検体数は、国産小豆では 8 検体(88.9%)、国産大豆では 4 検体(57.1%)、外国産小豆では 0 検体(0.0%)となり、外国産小豆からは *Fusarium* 属菌の検出は無く、国産小豆の陽性検体率は、国産大豆および外国産小豆と比較して有意に高かった( $p < 0.05$ )。小豆・大豆 100 粒あたりの *Fusarium* 属菌の陽性粒率が最も高かった検体は、国産小豆では北海道産で 9.0%であった。各地域の大豆・小豆から検出された *Fusarium* 属菌種には、産地によって偏りがみられ、*Fusarium* 属菌の地理的分布が異なる可能性が示唆された。また、検出菌種にはトリコテセン系マイコトキシン等の産生菌が含まれた。今後、供試検体のマイコトキシン汚染状況および分離株のマイコトキシン産生性について解析を進め、さらに 1 産地あたりの検体数や産地のバリエーションを増やして調査を継続し、日本各地の小豆におけるマイコトキシン汚染とその原因、産生地域別のリスクについて明らかにする必要があると考えられた。

## A. 研究目的

真菌は食品に付着した後に適当な温度・湿度等の条件が揃えば発育する。この時、第2次代謝産物であるマイコトキシンを産生し、豆類・穀類をはじめとする食品を汚染する。マイコトキシンをヒトが経口摂取した場合、発がん性、変異原性、腎・肝障害性<sup>1)</sup>などの健康危害性を発揮する。マイコトキシンは低分子で熱に強いことが知られ<sup>2)</sup>、調理で用いられる100~200℃程度の熱では分解できず、マイコトキシンの食品汚染は、食品衛生上重要な問題となっている。

マイコトキシンのうち、トリコテセン系マイコトキシンは、特に毒性が強いものの一つとして知られ、いわゆるトリコテセン骨格(図1)を共通構造として有するものの総称である<sup>3)</sup>。その構造によりタイプAからDの4つのタイプに分類され、タイプAには、T-2トキシンやHT-2トキシン、タイプBにはニバレノールやデオキシニバレノールが含まれる<sup>3)</sup>。我が国においては、小麦中において2003年5月にデオキシニバレノールで暫定基準値1.1ppmが設定された<sup>4)</sup>。タイプAの毒性はタイプBと同等もしくはそれ以上であると考えられているが、国内流通食品での汚染実態の解明は不十分であり、基準値等は制定されていない。

トリコテセン系マイコトキシンの食品における自然汚染は中緯度から高緯度の広範囲の地域で栽培された麦類およびトウモロコシなどの穀類を中心に世界中で頻繁に起きており、北米、ヨーロッパ、アジア、オセアニアなど、世界中で生産された穀類からの検出例が多数報告されている<sup>3)</sup>。過去に世界で発生した、トリコテセン系マイコトキシンの摂取によるヒトでの食中毒事例としては、以下のものが挙げられる。1940年代に旧ソビエト連邦のシベリアでATA症(alimentary toxic aleukia: 食中毒性無白血球症)により患者の30~80%が死亡し、原因物質としてT-2トキシンが推定されている<sup>3)</sup>。イ

ンドのカシミア地方では1987年、カビに汚染された小麦粉から作ったパンを摂取したために中毒症が発生し、原因食品の小麦粉からデオキシニバレノール、ニバレノール、T-2トキシンが検出されている<sup>3)</sup>。我が国でも、1949年および1965年に北海道で、1946年および1955年に東京で、トリコテセン系マイコトキシンが原因と考えられる食中毒が発生している<sup>3)</sup>。また、平成24年度に行われた国内流通食品のマイコトキシン汚染実態調査では、T-2トキシンおよびHT-2トキシンが、国産の小豆を高濃度・高頻度に汚染している事実が確認された<sup>5)</sup>。

トリコテセン系マイコトキシンの主な産生菌は*Fusarium*属菌である。*Fusarium*属菌が産生するマイコトキシンは総称してフザリウムトキシンと呼ばれ、この中で最も頻出されるマイコトキシンはゼアラレノンである。本トキシンの毒性は、現状では急性毒性よりも女性ホルモン様作用についてよく知られており、深刻な家畜に対する経済的影響をもたらす。ゼアラレノンの自然汚染はヨーロッパ、アメリカ、アジア、アフリカと世界中に広がっており、トウモロコシ、麦類などから検出されている<sup>3)</sup>ことが示すように、過去に世界中で多くのゼアラレノンの摂取による家畜での食中毒事例が報告されている。その例としては、オーストラリアの養豚場でゼアラレノンに汚染されたトウモロコシを摂取したブタ25頭が死亡した<sup>3)</sup>。ヒトへの食中毒事例の報告は無いが、汚染事例および濃度が高いだけに、内分泌攪乱物質としての影響が危惧されている。

*Fusarium*属菌は土壌菌類として世界中に広く分布し、植物病原菌となるため、食品を広く汚染する。菌種によって病原性を発揮する植物等自然界の分布には特異性が有り、また産生するマイコトキシンにも菌種特異性があるため、食品のフザリウムトキシン汚染を制御するためには、菌種レベルの生態把握が必要となる。わ

が国においては、*Fusarium graminearum* や *Fusarium oxysporum* 等一部の *Fusarium* 属菌種のみに関して、ある特定の地域における地理的分布状況が調査されるのみに留まり<sup>6-10)</sup>、*Fusarium* 属菌分布の全体像は把握されていない。フザリウムトキシンの汚染実態を鑑み、T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノンをはじめとしたフザリウムトキシンを産生菌の国産小豆における汚染実態の把握を行う必要がある。

以上のことから、本研究では、*Fusarium* 属菌の食品別・産地別による質的・量的な差異を明らかにすることを目的として、国産および輸入の小豆を中心とした食品について、*Fusarium* 属菌の汚染状況を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 供試検体

北海道産小豆 5 検体、山形県産小豆 1 検体、千葉県産小豆 1 検体、熊本県産小豆 2 検体、小豆の対照試験に用いる検体として、北海道産大豆 1 検体、宮城県産大豆 1 検体、福島県産大豆 1 検体、茨城県産大豆 2 検体、千葉県産大豆 1 検体、熊本県産大豆 1 検体、外国産小豆として中国産小豆 2 検体、カナダ産小豆 2 検体を供試した。詳細は表 1、図 3 に示した。なお、一部の検体は、本研究班の研究分担者・小西らの本年度の研究で供試された検体と同一のものを用いたため、共通の ID を付した。

### (2) 食品からの菌株分離

小豆および大豆検体は、70%エタノールで 30 秒間洗浄し、その後純水で洗浄した後に実験に供した。用いた全ての寒天培地には Chloramphenicol (Cloramphenicol: 和光純薬工業会社、大阪府大阪市) を 50mg/ml の割合で添加した。Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Ager (DRBC: OXOID、イギリス) および Dichloran Glycerol Ager (DG-18:

関東化学株式会社、東京都) 平板上に、洗浄した小豆または大豆を置き、25°C で 7 日間培養した。培養後、発育したコロニーを目視によって観察し、*Fusarium* 様のコロニーを Potato Dextrose Agar (PDA: 栄研化学株式会社、東京都) に釣菌し、25°C で 1~2 週間培養した (図 2)。得られた分離菌株を PDA 斜面培地に接種し、25°C で 1~2 週間培養した後、8°C で保存した。

### (3) 分離菌株の同定

形態学的同定手法および分子生物学的同定手法の両手法から得られた結果を総合的に判断し、同定を行った。

#### ① 形態学的同定法

分離菌株を PDA 平板に接種し、形成されたコロニー形状・色を目視で観察した (図 4)。さらに *Fusarium* 属は、PDA 上では菌種の特徴となるべき巨大分生子の形成が少ないことがあることから、分生子形成を促進させるカーネーションリーフ寒天培地 (CLA) を用いての培養を行い、プレパラートを作製して、形成された孢子形状および孢子形成様式を顕微鏡で観察した (図 4)。培養は、25°C で 14 日間行った。これらの形態学的指標について、Nelson らの方法<sup>11)</sup> を参照し、同定を行った。

#### ② 分子生物学的同定法

染色体 DNA の抽出法として、PDA 斜面培地上のコロニーを 2.0 ml マイクロチューブに入れた Potato Dextrose Broth (PDB: Becton and Dickinson Company、USA) 1 ml に接種後、25°C で 1 晩培養した。培養後、4°C・15,000 rpm で 10 分間遠心分離にかけ、上清を取り除き、菌体のみを得た。菌体からの DNA 抽出は SDS 抽出法<sup>12)</sup> を用いて行った。

遺伝子塩基配列の決定は、PCR 産物のダイレクトシーケンシング法により行った。リボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) 関連遺伝子群のうち、18S

rDNA、Internal spacer region 1、5.8S rDNA、Internal spacer region 2 および 28S rDNA を、さらに $\beta$ -tubulin 遺伝子( $\beta$ -*tub*)の塩基配列を決定した。

プライマーは、rDNA 関連遺伝子群については ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTAACAAGG-3') および NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG G-3')<sup>12)</sup>、 $\beta$ -*tub* については Btu\_F-F01(5'-CAGA CCGGTCAGTGC GTAA-3') および Btu-F\_R01 (5'-TTGGGGT CGAACATCTGCT-3')<sup>13)</sup>を用いた。PCR 反応は、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社、滋賀県)を用い、反応液の組成は添付の実験マニュアルに従った。反応条件は、94°C・3分で熱変成させた後、94°C・30秒、60°C・40秒、72°C・50秒を1サイクルとして35サイクル行い、最後に72°C・5分の伸長反応を行った。この後、アガロースゲル電気泳動によって遺伝子増幅の有無を確認した。PCR産物の精製は、ExoSPO-IT (GEヘルスケア・ジャパン株式会社、東京都)を用い、反応液および反応条件は添付の実験マニュアルに従った。シーケンシング反応は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社、米国)を用い、反応液および反応条件は添付の実験マニュアルに従った。プライマーは、前述のPCR反応と同様のものを用いた。シーケンシング反応物の精製は、Applied Biosystems社が公開している簡易実験マニュアルに従い、エタノール/EDTA/酢酸ナトリウムを用いる方法によって行った。精製後、Applied Biosystems 3730 XL genetic analyzer (Applied Biosystems社)によって塩基配列を決定した。

遺伝子塩基配列の解析は、以下の手順によって行った。得られたシーケンシングデータは、ソフトウェア ATGC (ゼネティックス社、東京)を用いてマルチプルアライメントを行い、rDNA 関連遺伝子群および $\beta$ -*tub* の部分塩基配

列を得た。得られた塩基配列を用いて、National Center for Biotechnology Information (NCBI)で提供している Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)を用い、GenBank登録配列との相同性検索を行った。この検索結果を参照し、菌種の決定を行った。

## C. 研究結果

### (1) *Fusarium* 属菌の検出状況

各供試検体における *Fusarium* 属菌陽性粒率を図5に示した。北海道産小豆(5検体)では最も高い陽性粒率は9.0%であった。山形県産小豆(1検体)では1.0%、千葉県産小豆(1検体)では1.0%、熊本県産小豆(2検体)では5.0%であった。カナダ産小豆(2検体)では0.0%、中国産小豆(2検体)では0.0%であった。以上のことから、小豆では、*Fusarium* 属菌陽性粒率が北海道産で高く、外国産についてはすべての検体で *Fusarium* 属菌は検出されなかった。大豆では、北海道産大豆、宮城県産大豆、千葉県産大豆(それぞれ1検体)では0.0%、福島県産大豆(1検体)では3.0%、茨城県産大豆(2検体)では13.0%および20.0%、無選別の熊本県産大豆(1検体)では1.0%であった。

また、*Fusarium* 属菌の陽性検体数を表2に示した。国産小豆では9検体中8検体(88.9%)、国産大豆では7検体中4検体(57.1%)、外国産小豆では4検体中0検体(0.0%)となり、国産小豆の陽性検体率は、国産大豆および外国産小豆と比較して有意に高かった( $p<0.05$ )。国産の大豆・小豆別および産地別にみた場合、陽性検体率が最も高かったのは北海道産小豆で、5検体中4検体(80.0%)であった。

### (2) 小豆および大豆ごとの *Fusarium* 属菌検出状況

小豆および大豆から検出された *Fusarium* 属菌の菌種一覧および割合を、表3、4および図6

に示した。国産小豆からは *F. oxysporum*、*Fusarium incarnatum/equisetii/scirpi* species complex(FIESC)<sup>14</sup>、*F. proliferatum*、*F. avenaceum* および *F. camptoceras* が検出された。割合としては、*F. oxysporum* が最も高率に検出された。*F. oxysporum* はモニリフォルミンやフモニシンといった近年注目されているマイコトキシンの産生菌として知られる<sup>15)</sup>。その他には、*F. proliferatum*、*F. camptoceras*、および *F. avenaceum*、が検出された。*F. avenaceum* はモニリフォルミン、*F. proliferatum* はモニリフォルミンやフモニシンの産生性が報告されている<sup>15、16)</sup>。*F. camptoceras* についてはマイコトキシン産生性はこれまでのところ報告されていない。

国産大豆からは FIESC、*F. proliferatum* および *F. oxysporum* が同定された。大豆では species complex である FIESC に属する菌種が最も高率に検出された。species complex とは、形態学および分子生物学的な性質が非常に類似しており識別が困難な、互いに近縁な種の複合体を示す。FIESC の代表菌種は *F. semitectum*、および *F. equiseti* である。これらの菌種は、T-2 トキシン、HT-2 トキシンなどのトリコテセン系マイコトキシンおよびゼアラレノン産生を産生するとの報告がある<sup>20)</sup>。

小豆と大豆から検出された菌種を比較すると、*F. avenaceum* および *F. camptoceras* は小豆のみ検出され、小豆では比較的菌種の多様性がみられた。

### (3)小豆における地域ごとの *Fusarium* 属菌種別検出状況

各地域の小豆から検出された *Fusarium* 属菌の内訳を図 7 に示した。北海道産の小豆からは 18 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち *F. oxysporum* が 6 株 (検出された *Fusarium* 属菌のうち 30.0%)、FIESC が 5 株(27.7%)、

*F. camptoceras* が 1 株(5.6%)、*F. avenaceum* が 1 株(5.6%)、*Fusarium* sp.は 5 株(27.7%)と同定された。熊本県産の小豆からは 6 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち *F. proliferatum* が 1 株(16.7%)、FIESC が 1 株(16.7%)、*Fusarium* spp.が 4 株(66.7%)と同定された。山形県産の小豆および千葉県産の小豆から分離された *Fusarium* 属菌 2 株はいずれも *Fusarium* spp.であったと同定された。北海道産では、熊本県産では検出されなかった *F. camptoceras* および *F. avenaceum* が、熊本県産では、北海道産では検出されなかった *F. proliferatum* が、それぞれ検出された。

### (4)大豆における地域ごとの *Fusarium* 属菌種別検出状況

各地域の大豆から検出された *Fusarium* 属菌の内訳を図 8 に示した。茨城県産の大豆からは 33 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち FIESC が 16 株(48.5%)、*F. proliferatum* が 1 株(3.0%)、*Fusarium* sp.は 16 株(48.5%)と同定された。熊本県産の大豆からは 1 株の *Fusarium* 属菌が検出され、*F. oxysporum* と同定された。福島県産の大豆から検出された *Fusarium* 属菌 3 株はすべて *Fusarium* spp.と同定された。

## D. 考察

我が国ではこれまで、*Fusarium* 属菌の地理的分布について、網羅的な地域および菌種を対象とした検討が行われておらず、全体像が明らかになっていなかった。そこで、北海道、東北、関東、九州と地理的に異なる地域産の小豆および大豆を対象に、*Fusarium* 属菌の汚染状況の調査を行った。

*Fusarium* 属菌の陽性粒率を各地域間で比較したところ、茨城県産大豆 2 検体では、他地域と比較すると 20.0%および 13.0%と非常に高率であった (図 4)。今回供試した 2 検体は製品加

工工程での選別過程を経していない無選別の検体であり(表 1)、そのような農作物は真菌やマイコトキシン汚染を高濃度に受けている傾向にあるという報告<sup>17)</sup>があることから、無選別であったことが影響した可能性がある。このことから、小豆・大豆でも、流通前の選別によって *Fusarium* 属菌やフザリウムトキシンに汚染された個体を除去することができ、製品全体の汚染のリスクを低下させることができる可能性が考えられた。ただし、無選別の熊本産小豆および大豆では陽性粒率は高くなく、今後は、同じ条件で栽培された検体を用いて、選別されたものと無選別のものとの間で、*Fusarium* 属菌やフザリウムトキシンの汚染量・汚染率を比較検討する必要があると考えられた。

*Fusarium* 属菌の陽性検体率および検出菌種について、国産大豆、国産小豆および外国産大豆の間で比較検討を行ったところ、国産小豆では 88.9%の検体から *Fusarium* 属菌が検出されており、国産大豆よりも有意に高い結果となった。近年の食品のフザリウムトキシン汚染実態調査<sup>5)</sup>において、国産小豆では最大でゼアラレノンが 125.0 ppb、T-2 トキシンが 48.4 ppb、HT-2 トキシンが 45.7 ppb 検出されており、一方で国産大豆では最大でゼアラレノンが 0.0 ppb、T-2 トキシンが 4.3 ppb、HT-2 トキシンが 3.1 ppb と低く、国産小豆での高い汚染傾向が示されており、本研究において得られた国産小豆における高い *Fusarium* 属菌汚染状況は、国産小豆の高濃度・高頻度なフザリウムトキシン汚染状況と一致した傾向を示した。また、研究分担者・小西らの本年度の研究成果(分担研究報告書参照)から、本研究で供試した一部の小豆検体の T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノンおよび DON の汚染状況が示された。これと本研究の表 4 を比較すると、検体 ID:25-AD14 および 19 の高濃度のゼアラレノン汚染はゼアラレノン産生菌である FIESC によるものであ

る可能性が考えられた。今後、分離株のフザリウムトキシン産生能の調査を行う必要がある。

さらに、本研究班研究分担者・作田らの本年度の研究成果から、今回の供試検体から分離された一部の *Fusarium* 属菌株のトリコテセン系マイコトキシンの産生性が調査された(分担研究報告書「カビ毒産生菌の生態学的研究」参照)。これによると、小豆および大豆由来株からは T-2 および HT-2 トキシン産生性は確認されていないものの、ジアセトキシスシルペノール(DAS)産生性が 10 株中 3 株から確認された。今後、本研究で供試した検体に関して、DAS 等、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシン以外のトリコテセン系マイコトキシンの産生性を調査する必要がある。さらに、小西らの本年度の研究成果から高濃度・高頻度のゼアラレノン汚染が検出されたこと、本研究の結果からゼアラレノン産生能を持つ菌種が多数分離されたことから(表 4)、今後これらの分離株についてゼアラレノン産生性についても検証する必要があると考えられた。

また、国産小豆では *Fusarium* 属菌が高い陽性検体率であったが、外国産小豆では *Fusarium* 属菌は 1 検体からも検出されなかった(表 2、図 5)。研究分担者・小西らの研究成果から、本研究で供試した 4 検体の外国産小豆からはいずれのフザリウムトキシンも検出されず(分担研究報告書参照)、*Fusarium* 属菌検出状況はマイコトキシン汚染状況と一致した傾向を示した。このことから、外国産小豆は、国産小豆と比較して *Fusarium* 属菌およびフザリウムトキシンの汚染頻度が低い可能性が示唆された。しかし、今回の検討で用いた供試検体数には限りがあるため上述のように結論付けるには不十分なデータであると言え、今後検証を続ける必要がある。

各地域の小豆および大豆から検出された *Fusarium* 属菌の割合について(図 7、8)、北海道産および熊本県産から検出された *Fusarium* 属菌種の傾向の違いが示され、国内

において *Fusarium* 属菌の地理的分布が異なる可能性が示唆された。しかし、外国産小豆同様、今回の検討で用いた供試検体数および産地のバリエーションには限りがあり、今後 1 産地あたりの供試検体数を増やすとともに、様々な地域の検体について調査を継続する必要がある。

## E. 結論

本研究の結果から、国産小豆はある程度の頻度および濃度で *Fusarium* 属菌に汚染されていることが明らかとなり、フザリウムトキシン汚染状況を裏付ける結果が得られた。今後、今回供試した検体のマイコトキシン汚染状況および分離株のマイコトキシン産生性について解析を進め、さらに 1 産地あたりの検体数や産地のバリエーションを増やして調査を継続し、日本各地の小豆におけるマイコトキシン汚染とその原因、産生地域別のリスクについて明らかにする必要がありと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Maiko Watanabe, Takahiro Yonezawa, Yoshiko Sugita-Konishi, Yoichi Kamata. Application of phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species to the prediction about the potential mycotoxin-productivity. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2013, 30:1370-81.

### 2. 学会発表

1) 渡辺麻衣子、後藤慶一、小西良子、鎌田洋一、工藤由起子. マイクロプレートを用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる *Fusarium* 属菌近縁種間における全ゲノム塩基配列比較手法の検討. 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, 東京, 2013.10.

2) Maiko Watanabe. Utility of the Phylotoxigenic Relationships among Trichothecene-Producing *Fusarium* species for Predicting Their Mycotoxin Producing Potential. 48th Session of the Joint UJNR Panel on Toxic Microorganisms (2014.1) (Tokyo)

## G. 参考文献

- 1) 宇田川俊一. (2004) 食品のカビ汚染と危害. 幸書房. 東京.
- 2) 村上尚. (2004) 食品におけるマイコトキシン汚染の実態とその除去. マイコトキシン 43:27-31.
- 3) 宇田川俊一, 田端節子, 中里光男. (2002) マイコトキシン. 中央法規. 東京.
- 4) 厚生労働省行政情報・報告 小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について. 2002/05/21 - 通知. (2014 年 1 月 28 日アクセス)  
<http://www.ffcr.or.jp/Zaidan/mhwinform.nsf/ab440e922b7f68e2492565a700176026/0da129a07813d14349256df6000bc432?OpenDocument>
- 5) 局博一ら. (2013) 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. 厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業), 平成 22 年度~24 年度 総合研究報告.
- 6) 一戸正勝, 高鳥浩介, 倉田浩. (1973) オオムギ、コムギ穀粒における糸状菌分布. 菌蕈研究所研究報告第 10 号. 627-636.
- 7) 上田晃久, 西本博之, 加藤順久ら. (2007) 東海地方に分布するムギ類赤かび病菌の菌種及びマイコトキシン産生型. 愛知県農業総合試験場研究報告. 39:17-23.
- 8) Suga, H., Karugia, G. W., Ward, T. et al. (2008) Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in



- Japan. Phytopathology. 98:159-166.
- 9) Aoki, T., Tanaka, F., Suga, H., et al. (2012) *Fusarium azukicola* sp. Nov., an exotic azuki bean root-rot pathogen in Hokkaido, Japan. The Mycological Society of America. 104(5) 1068-1084.
- 10) 勝部和則. (1999) 日本産 *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* 菌糸和合性群の地理的分布および圃場内個体群構造. 日本植物病理学会報. 65:563-568.
- 11) Nelson, E.P., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1984) *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- 12) O'Donnell, K. (1993) *Fusarium* and its near relatives. In, The fungal holomorph : mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic. Pp. 225-233. CAB International, Wallingford.
- 13) Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., et al. (2011) Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. J Sci Food Agric. 91:2500-2504.
- 14) O'Donnell, K., Deanna A. Sutton, Mihael G. Rinadi, et al. (2009) Novel Multilocus Sequence Typing Scheme Reveals High Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* Species Complexes within the United States. J Clin Microbiol 12:3851-3861.
- 15) Marasas, W.F.O., Nelson, E.P., T.A. Toussoun. (1984) Toxigenic *Fusarium* Species. The Pennsylvania State University Press. United States of America.
- 16) Jimenez, M., Huerta, T., Mateo, R. (1997) Mycotoxin Production by *Fusarium* species Isolated from Bananas. Environmental Microbiology. 1997-2:364-369.
- 17) 高橋治男. (2012) 落花生やナッツ類のアフラトキシン汚染と近赤外選別機などを利用したその減衰について. 一般財団法人 マイコトキシン検査協会 資料. (2014年1月28日アクセス)  
<http://www.mycotoxin.or.jp/PDF/kinsek.pdf>

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と  
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

カビ毒産生菌の生態学的研究

研究分担者 作田庄平 東京大学大学院農学生命科学研究科  
研究協力者 吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

国産大豆、国産小豆あるいは外国産小麦より研究分担者（渡辺麻衣子）が分離した *Fusarium* 属菌の代謝産物を分析する方法の検討を行った。それぞれのカビを液体培地で静置培養し、得られた培養液上清の酢酸エチル抽出物を分析サンプルとした。4種のカビ毒（T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ネオソラニオールおよびジアセトキシシルペノール）が良好に分析できる LC-TOF/MS の分析条件を用いて、11種のカビについて代謝産物を調べた。その結果、11種合計で 580 の代謝産物が検出され、また、標準品とした4種のカビ毒の生産性については、T-2 トキシン生産菌が1株、ジアセトキシシルペノール生産株が4株であったことより、本分析法は、次年度以降で行う多くの菌株についての代謝産物の分析に有効であると考えられた。

A. 研究目的

過去の研究から、輸入コムギ、国産小豆等において、フザリウムトキシンの一種であるゼアラレノン、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの高濃度・高頻度の汚染が確認されている。しかし、これらのフザリウムトキシンの汚染の原因菌については、明らかにされていない。また、原因菌は、菌種によって、これらのフザリウムトキシンのと同時に、これまで国内流通食品において汚染状況が知られていなかった複数のマイコトキシンを産生する可能性が高いことも考えられる。そこで、国内流通食品における、これら複数のフザリウムトキシンの汚染のリスクを明らかにするために、研究分担者の渡辺麻衣子が国産および輸入食品から分離した

*Fusarium* 属菌について、それら菌株の生産するマイコトキシンを同定することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. カビの培養

渡辺が国産小豆、国産大豆あるいは外国産小麦から単離した11種のカビ（表1）について、以下の組成の液体培地 100 mL を入れた 300 mL 容三角フラスコで7日間、25°Cで静置培養を行った。

培地組成（1 L 当り）

硝酸ナトリウム 2.0 g  
リン酸水素二カリウム 1.0 g

塩化カリウム	0.5 g
硫酸マグネシウム	0.5 g
酵母エキス	2.5 g
ポリペプトン	5.0 g
スクロース	50 g

ガス流量：10 L/分  
 ネブライザー圧力：30 psi  
 キャピラリー電圧：3500 V  
 検出範囲： $m/z$  70~950  
 イオンモード：positive

## 2. 抽出液の調製

ろ過により菌体を除去した培養液 500  $\mu$ L に対して酢酸エチル 500  $\mu$ L を加え、激しく攪拌後、遠心分離 (12000 g、5 分) を行った。上清の酢酸エチル層を回収し、同様の操作をもう一度繰り返して抽出を行った。2 回の酢酸エチル抽出液を合わせて、窒素気流下乾固した。乾固物に 100  $\mu$ L のアセトニトリルを加えて超音波処理によって懸濁後、900  $\mu$ L の蒸留水を加えてよく混ぜた。遠心分離 (12000 g、5 分) 後、上清を MS 分析に用いた。

## 3. LC-TOF/MS による分析

抽出液に含まれる代謝物を以下の条件で検出した。

### HPLC

機種種：Agilent 1200 series  
 カラム：InertSustain C18  
 150 mm  $\times$  2.1 mm i.d., 3  $\mu$ m  
 カラム温度：40  $^{\circ}$ C  
 移動相：A 10 mM 酢酸アンモニウム  
 B アセトニトリル  
 分離条件：0 分 A : B = 90 : 10  
 40 分 A : B = 18 : 82  
 流速：0.2 mL/分  
 注入量：2  $\mu$ L

### MS

機種種：Agilent 6530 Q-TOF  
 イオンソース：ESI Agilent Jet Stream  
 ガス温度：325 $^{\circ}$ C, drying gas

## C. 研究結果

### 1. 標準品の測定

上述の分析法が既知のカビ毒を検出できるかどうかを調べるために、4 種のカビ毒標準品を測定した。T-2 トキシンと HT-2 トキシンの混合液のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を図 1 に、ネオソラニオール (NES) とジアセトキシシルペノール (DAS) の混合液の TIC を図 2 に示した。T-2 トキシンは保持時間 28.4 分に  $m/z$  484.2546  $[M+NH_4]^+$ 、HT-2 トキシンは保持時間 23.6 分に  $m/z$  442.2440  $[M+NH_4]^+$  が検出され、NES は保持時間 13.0 分に  $m/z$  400.1967  $[M+NH_4]^+$ 、DAS は保持時間 21.6 分に  $m/z$  384.2021  $[M+NH_4]^+$  が検出された。

### 2. カビの代謝物の測定

カビ無添加の培地と 11 種のカビの培養液の酢酸エチル抽出物を LC-TOF/MS で分析した (0006 株についての分析例を図 3 に示した)。イオンカウントが 10000 以上のものを選択し、カビ無添加の培地で検出された化合物を除いた結果、580 種の化合物が検出された。その一部を表 2 に示した。標準品と保持時間が一致することからリスト中の推定分子量  $C_{24}H_{37}NO_9$  の化合物は T-2 トキシン、 $C_{19}H_{29}NO_7$  の化合物は DAS と考えられた。つまり 0020 株が T-2 トキシン生産菌、0011、0016、0018 及び 0019 株が DAS 生産菌であった。

## D. 考察

多くの *Fusarium* 属菌それぞれの株が生産する代謝産物を特徴付けるためには、サンプルの

調製が簡便であることと、1回の分析で多数の化合物の存在を推定できることが重要となる。今年度検討した LC-TOF/MS による分析は、少量の培養液の酢酸エチル抽出物を用いて行うためサンプル調製に手間がかからず、また、数百の代謝産物を区別して分析することが可能である。従って、今回は4種の標準品についての生産性が示されたが、他の標準品や TIC において特徴的な化合物について今後調べて行くことにより、それぞれの菌株のマイコトキシン生産性についての情報を得ることが可能になったと考

えられる。

#### E. 結論

国産大豆、国産小豆等から分離された *Fusarium* 属菌の代謝産物を、簡便かつ多種に渡り分析する方法を確立した。

#### F. 研究業績

【学会、論文発表】

なし

表 1 培養液を調製したカビの由来と同定結果

株番号	由来	産地	生産年	同定結果
0006	小豆	山形県	2012	不明
0010	小豆	熊本県	2012	不明
0011	小豆	熊本県	2012	<i>Fusarium semitectum</i>
0013	小豆	熊本県	2012	<i>Fusarium semitectum</i>
0014	大豆	茨城県	2011	不明
0015	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0016	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0017	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0018	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0019	大豆	茨城県	2011	不明
0020	小麦	アメリカ (24-FW54)	2012	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (形態観察のみ)

表 2 検出された化合物のリストの一部

推定分子式	分子質量	保持時間 (分)	株番号									
			0006	0010	0011	0013	0014	0015	0016	0017	0018	0019
イオンカウント												
C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	141.0424	2.9			1618509			1034790	440053	852836	1746376	2259217
C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	234.1623	20.2	1905641				119604	389306	214155			309677
C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	314.1386	21.2		24171478								2505805
C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	330.1335	17.7		46644168								25343652
C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>	373.2260	32.9			4861740			1513450	2965083	855850	1012209	
C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>7</sub>	383.1953	21.6			1259118			305922		397341	4674189	
C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NO	413.1694	17.6			1668987			367909	114025	695786	495151	
C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>9</sub>	483.2473	28.5										304752

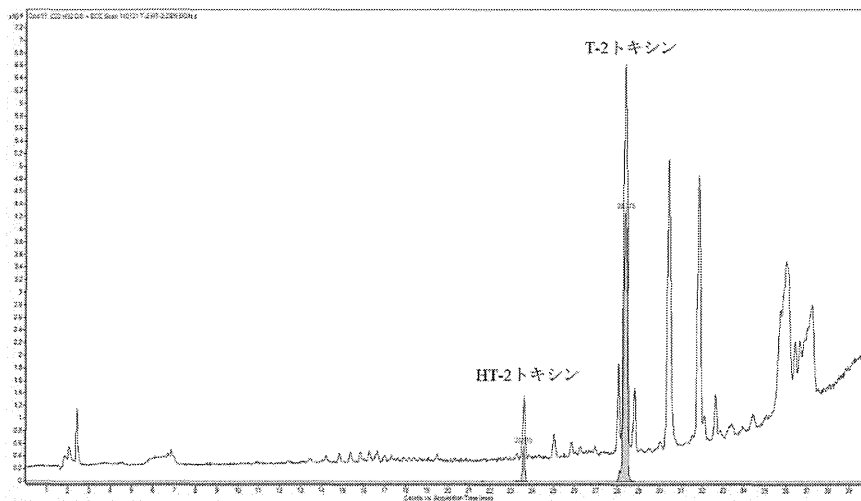


図1 T-2 トキシシと HT-2 トキシシの TIC

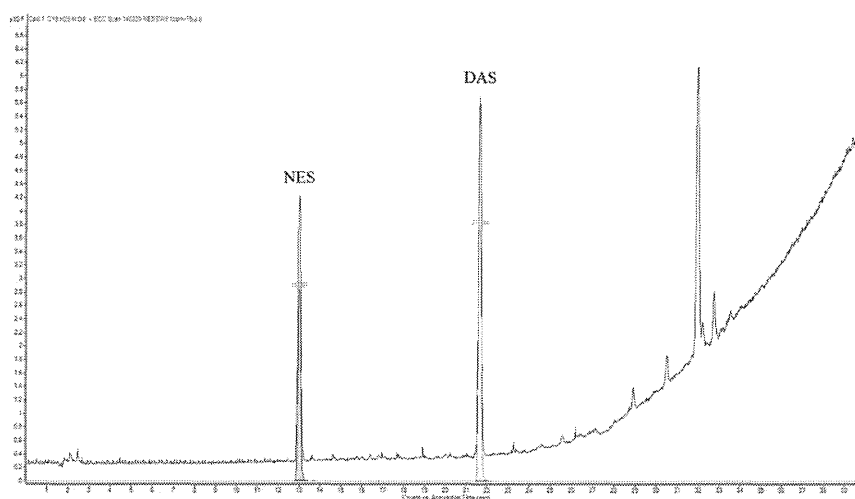


図2 ネオソラニオール (NES) とジアセトキシシルペノール (DAS) の TIC

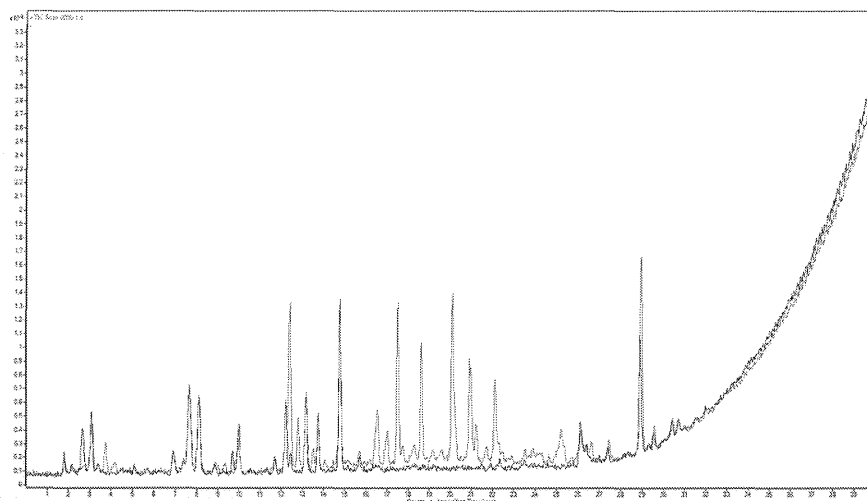


図3 0006 株培養液抽出物の TIC (抽出物の TIC (赤) と培地の TIC (青) を重ねて表示)

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と  
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

我が国におけるデオキシニバレノールの年齢別暴露評価

研究分担者 小西 良子 麻布大学

研究要旨

デオキシニバレノール (DON) の健康被害については、古くからの調査・研究の蓄積があり、各国で汚染食品の規制が行われるほか、国際機関による規制値や耐容摂取量の設定などが行われてきた。我が国では、小麦について 1.1mg/Kg の流通規制が行われているほか、健康評価の基準として 1.0  $\mu$ g/体重 Kg の一日耐容摂取量が暫定的に用いられている。本研究の目的は、DON の汚染が報告されている国内流通している食品につき、総合的にその曝露量を評価しようというものである。汚染量調査の対象となった食品のうち、そもそも汚染量がきわめて少ないもの及び、摂取者の割合が少ないものを除いた、小麦、大麦、ビール、小豆についての曝露量を年齢層ごとにもとめ、それを合算した総量によって、日本人の DON の曝露評価を年齢層ごとに行った。その際、汚染量の LOD 以上 LOQ 未満の検出値の取り扱いに関する GEMS-FOOD の最新の勧告に基づき、lower bound と upper bound の二つの場合それぞれについてシミュレーションを行った。結果として 99.8%タイルでは 1 歳から 6 歳、7 歳から 14 歳、15 歳から 19 歳、20 才以上のどの年齢層でも暫定一日耐容摂取量を上回ったものはなく、99.9%タイルにおいては 1 歳から 6 歳では lower bound も upper bound も約 112ng/体重 Kg/日で、7 才から 14 歳では lower bound で約 105ng/体重 Kg/日であるほか、7 歳から 14 歳の upper bound および 20 歳以上はいずれも約 103ng/体重 Kg/日にとどまっていた、15 歳から 19 歳はいずれも約 70ng/体重 Kg/日となっており、日本人の DON 摂取による健康被害は極めて少ないものと推定される。

研究協力者

斉藤 史朗 (東京大学)

A. 研究目的

食品経路による日本人の DON の曝露評価

今回、3 ヶ年にわたって DON の汚染量の調査をしているいくつかの食品を摂取することによる DON の曝露量をシミュレーショ

ンによって評価することを目的とする。

調査対象の商品は、小麦、大麦、はと麦、雑穀米、小豆、大豆、コーンスナック、コーングリッツ、ビール、ごまの 10 種類であった。

そのうち、まず最初に汚染量サンプルが極めて少ない大豆、ごま、コーンスナックを対象から除いた。次いで摂取者の割合が各年齢層で1%に満たない食品である、はと麦、雑穀米、コーングリッツを除いた。結果として曝露評価の対象食品となったのは、小麦、大麦、ビール、小豆の4食品であった。

この4食品の汚染量のデータと食品摂取のデータを用いて、1才から6才、7才から14才、15才から19才、20才以上の各年齢層について、曝露量のシミュレーションを行った。

## B. 研究方法

### 1) 食品中の DON 含有量のサンプルデータの作成

#### (1)小麦含有食品におけるカビ毒含有量

国産小麦の汚染量データと輸入小麦の汚染量データを利用して、それぞれ別々に DON 含有量のサンプルを作成した。(曝露量を計算する際に、日本国内で消費されている国産小麦と輸入小麦の割合に応じて、それぞれの含有量の値を利用した。)

3 年にわたって集められた 300 サンプルを使って国産小麦の DON 含有量 (汚染量) について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。輸入小麦についても 3 年にわたって集められた 150 のサンプルを用いて DON 含有量 (汚染量) について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。

小麦については 1.1mg/Kg の流通規制があるので、シミュレーションの値がこれを上回るものは除外してサンプルを作成した。

LOQ 未満の処理として、WHO GEMS FOOD の新たな勧告に従って upper bound(LOQ 未満については、LOQ の汚染があるものとする) と lower bound (LOQ 未満については、汚染を無しとする) の二つのシナリオを用意し、それぞれ 10,000,000 件のシ

ミュレーション・データセットを作成した。

#### (2)大麦含有食品における DON 含有量

3 年にわたって集められた国産大麦の 300 サンプルおよび輸入大麦の 41 サンプルを使って DON の含有量 (汚染量) について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。

LOQ 未満の処理として、WHO GEMS FOOD の勧告に従って upper bound と lower bound の二種類のシナリオを用意した。

#### (3)ビールにおける DON 含有量

3 年にわたって集められたビールの 30 サンプルを使って DON の含有量 (汚染量) について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。

LOQ 未満の処理として、WHO GEMS FOOD の勧告に従って upper bound と lower bound の二種類のシナリオを用意した。

#### (4)小豆含有食品における DON 含有量

3 年にわたって集められた小豆の 40 サンプルを使って DON の含有量 (汚染量) について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。

LOQ 未満の処理として、WHO GEMS FOOD の勧告に従って upper bound と lower bound の二種類のシナリオを用意した。

### 2) 食品摂取量のサンプルデータ作成

摂取量推定にあたり、「1 歳から 6 歳」「7 歳から 14 歳」「15 歳から 19 歳」「20 歳以上」の 4 つの階層に分けてシミュレーションを行った。

#### (1)小麦含有食品の摂取量

平成 17 年度から平成 19 年度にかけて行われた「食品摂取量・摂取頻度調査」の調査対象食品のうち小麦を含有する約 80 の食品を対象とする。最初に各年齢層ごとに摂取量の平均を取り、平均よりも摂取量の多かった「大量摂取群」とし、それ以外を「少量摂取



群」とする。大量摂取群はさらに、小麦の含有割合により、含有率 100%、50%、30%の3つのグループにわけて、それぞれ分布を推定してシミュレーションを行った。

### (2)大麦含有食品の摂取量

「平成 17 年度~19 年度食品摂取頻度・摂取量調査」より、大麦を含んだ食品の摂取量データを元にして、年齢階層別に摂取量データを作成した。対象となった大麦含有食品は「七分つき押麦(01005)」「押麦(01006)」「米粒麦(01007)」（括弧内は食品番号）の3種類の食品である。

### (3)ビールの摂取量

「平成 17 年度~19 年度食品摂取頻度・摂取量調査」より、大麦を含んだ食品の摂取量データを元にして、年齢階層別に摂取量データを作成した。対象となったのは、「ビール淡色(16006)」「ビール 黒(16007)」「ビール スタウト(16008)」の3種類の食品である。

### (4) 小豆含有食品の摂取量

「平成 17 年度~19 年度食品摂取頻度・摂取量調査」より、小豆を含んだ食品の摂取量データを元にして、年齢階層別に摂取量データを作成した。

摂取量は小豆の含有量に応じて「赤飯」(10%)、「あんこ」(100%)、「まんじゅう」(50%)、「ようかん」(80%)の4つの食品群ごとに計算した。

## 3) 曝露量のシミュレーション

### (1)小麦と大麦の曝露量計算

小麦と大麦の DON 汚染（含有量）は玄麦で計測されているが、小麦も大麦も精麦により、付着している DON が半分くらいの量になると報告されているので、曝露量計算の際に、摂取量 (g/体重 Kg) に汚染量 (ng/g) をかけて、さらにそれに 0.5 をかけている。

また、前述のように、日本国内で消費され

ている小麦と大麦は国産のものと輸入のものが混ざっているため、小麦については国産比率を 14%とし、大麦については同じく 31%として曝露量を計算した。

・小麦： $(\text{輸入小麦汚染量} \times 0.86 + \text{国産小麦汚染量} \times 0.14) \times \text{小麦摂取量} \times 0.5$

・大麦： $(\text{輸入大麦汚染量} \times 0.69 + \text{国産大麦汚染量} \times 0.31) \times \text{小麦摂取量} \times 0.5$

### (2)その他の食品の曝露量計算

その他の対象食品（小豆とビール）については、単純に摂取量 (g/体重 Kg) に汚染量 (ng/g) をかけている。

## C. 研究結果

下記に年齢層ごとの lower bound と upper bound のシミュレーション結果を示す。単位はいずれも ng/体重 Kg/日である。

シナリオ	99% タイ	99.5% タイル	99.8% タイル	99.9% タイル
1才から6才 lower bound	37.9	55.7	85.1	112.1
1才から6才 upper bound	37.5	55.2	84.5	112.0
7才から14才 lower bound	35.6	51.6	78.8	104.8
7才から14才 upper bound	35.2	51.2	78.4	103.7
15才から19才 lower bound	29.0	39.0	55.2	69.9
15才から19才 upper bound	28.6	38.6	54.9	69.8
20才以上 lower bound	27.4	43.0	72.4	103.1
20才以上 upper bound	27.2	42.5	72.0	102.8

## D. 考察

### (1) WHO GEMS FOOD の勧告

WHO GEMS FOOD の新しい勧告によれば、LOD 以上 LOQ 未満の取り扱いにつき、First Step として、lower bound として LOQ 未満は「0」として、upper bound は LOQ 未満を「LOQ の値」として、両者の差が少なくかつ、規制値よりも低い値であれば、upper bound を使

うようにとある。本件の場合はこの First Step の条件に合うので、各年齢層の曝露量推計は upper bound を使うことになる。

## (2)食品摂取による DON 曝露の健康被害リスク

平成 23 年度報告による 30%の推定誤差を用いても、暫定一日耐容摂取量を超えるのは、99.8%の 1 才から 6 才および、99.9%タイルの全年齢層だけである。99.75%タイルまではどの年齢層においても、30%増しにしても暫定一日耐容摂取量を超えることはない。

## (3)モンテカルロ・シミュレーションについて

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していたことは

否定できない。それゆえ、シミュレーション結果の解釈には慎重であるべきだが、こうした値は曝露量を過大に評価することはあっても、過小評価するわけではないこと。また、こうした値は分布のかなり右側に存在するので、健康被害リスクの評価基準となる 95%タイル付近には影響はない。以上のことからして、DON の曝露による日本人の健康被害リスクは極めて少ないものと思われる。

## E. 結論

小麦のみならず、その他の汚染事例が報告された食品を加えた総合的な曝露評価を行ったが、日本人の食品摂取による DON 曝露の健康被害リスクは極めて少ないものと思われる。

## F. 研究発表

- 1.論文発表：特になし
- 2.学会発表：特になし

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と  
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

かび毒の発達神経毒性評価

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学農学研究大学院動物生命科学部門 教授

**研究要旨**

本研究は、発達神経毒性が懸念されているかび毒について、実験病理学的に発達神経毒性影響を検討する。平成 25 年度はフザリウム属真菌により産生されるかび毒であり、実験的に低用量で神経毒性を誘発することが知られている T-2 トキシン (T-2 toxin) について、マウスを用いて発達期神経毒性影響を検討した。9 ppm を高用量として選択し、公比 3 で投与群 (0、1、3、9 ppm) を設定し、妊娠 ICR マウスを用いて発達期暴露試験 (各群 12 匹) を行った。妊娠 6 日目から離乳時 (生後 21 日目) まで母動物に対して混餌投与することにより、経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時と生後 77 日目にそれぞれ解剖を行った。母動物は 9 ppm で分娩後 7~14 日にかけて体重低値を示し、分娩後 21 日目までの間に摂餌量、摂水量の低値を認めた。また、9 ppm で前胃粘膜の過形成を示唆する肥厚性変化が認められた。更に、1 ppm から胸腺重量の低値がみられ、9 ppm では肝臓重量の高値がみられた。このことから母動物では、一般毒性的変化は 9 ppm に集中的に見られたものの、免疫系への影響は最も鋭敏であった。児動物では、9 ppm で投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後も出生後 77 日まで体重低値が継続した。また、離乳時脳絶対重量の低値が 3 ppm から認められ、9 ppm での体重や諸臓器の重量低値と併せて T-2 トキシンによる発達障害が示唆された。出生後 77 日の児動物では雌 9 ppm で肝臓及び胸腺重量の低値がみられたが、出生時に比較して変化の程度は小さく、回復性のある変化であると考えられた。離乳時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、顆粒細胞層下帯での Tbr2 陽性細胞が 3 ppm から減少し、T-2 トキシンによる type 2 前駆細胞を標的としたニューロン新生障害が起きているものと考えられた。歯状回門部では reelin 陽性細胞の増加が 9 ppm で認められ、前駆細胞の移動異常を反映して介在ニューロンからの産生が増加した可能性が考えられた。

**A. 研究目的**

近年、農作物へのかび毒等自然毒の汚染が国際的に深刻な問題となっており、かび毒の国際的成分規格を設定する動きが活発にな

って来ている。かび毒の健康被害を防ぐには、基準策定が最も効果的であり、それに向けた国際的取り組みがなされている。すでに近年、木の実を対象とした総アフラトキシン、穀物

のオクラトキシン A (OTA) の新たな規格基準が設定され、更にはフモニシン、デオキシニバレノールの毒性再評価が行われている。今後さらに対象のかび毒が増えることが予想される。このような状況にあつて、輸入大国の我が国としては、国際動向に準じた基準値策定は急務であることから、我が国の食品中のかび毒汚染実態および国民の暴露実態を正確に把握する必要がある。また、輸入食品を汚染するかび毒産生菌の種およびかび毒産生を考慮に入れた予防対策を構築する必要がある。

本研究では、神経毒性影響の懸念ないし報告のあるかび毒を対象として、高感受性集団である胎児・乳幼児を想定した神経発達に対するリスク評価を目的とする。我々は、記憶や学習の中枢であり、生後もニューロンを産生し続ける海馬歯状回に着目し、顆粒細胞層下帯(SGZ)における顆粒細胞系譜の各種分化指標と歯状回門に分布して顆粒細胞の分化や移動を制御する介在ニューロンの分布を検討することで、数々の神経毒性物質がニューロン新生を障害することを見出している。

平成 25 年度は、穀物汚染が危惧されているフザリウム属真菌によって産生される T-2 トキシン (T-2 toxin) を評価対象とした。T-2 トキシンについては日本ならびにコーデックス委員会においても食品中の基準値は策定されておらず、リスク管理措置の検討のためより多くの毒性データが必要とされている。そこで T-2 トキシンの発達期神経毒性影響を明らかにすることを目的として母動物に混餌投与することにより、妊娠 6 日から出生後 21 日 (離乳時) まで経胎盤、経乳的に児動物に対して暴露させ、暴露終了時ならびに出生後 77 日に解剖してニューロン新生に対する影響を検討し、離乳時における影響ならびにその回復性を評価することとした。

## B. 研究方法

妊娠 ICR マウス (妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー) を、一群を 12 匹ずつとして計 4 群に分け、T-2 トキシンを 0、1、3、9 ppm の用量で妊娠 6 日から分娩後 21 日まで混餌投与した。最高用量は予備的に 0、6、12 ppm を設定して母動物に対して混餌投与した際に、12 ppm で児動物の低体重、産仔数の減少が認められ、6 ppm では影響がみられなかったため、体重の低値とともに妊娠の維持が期待される 9 ppm に設定した。出生後 4 日目に間引きを行い、各母動物に雄 8 例、雌 2 例を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、週に 2 回の割合で体重及び摂餌量、週に 1 回、摂水量の測定を行った。混餌飼料の調製は 2 週間を超えない頻度で行った。出生後 21 日 (離乳時) に児動物の半数を解剖に供した。各群 10 例の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で 4%PFA / 0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行った。各群雄 31~35 例、雌 13~20 例の児動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、胸腺、脾臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。PFA 灌流固定脳標本については大脳の Bregma の後方約-3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面 (2 切面) が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μm 厚の連続切片を作製した。切片は、抗マウス Sox2 抗体 (x4000 倍、Abcam 株式会社)、抗マウス Tbr2 抗体 (x500 倍、Abcam 株式会社)、抗マウス doublecortin 抗体 (x1000 倍、Abcam 株式会社)、抗マウス reelin 抗体 (x1000 倍、Novus Biologicals, Inc., Co.)、抗マウス NeuN 抗体 (x100 倍、IgG、Clone A60、Millipore Corporation)、抗マウス parvalbumin 抗体