

図2 T-2 トキシンの汚染実態

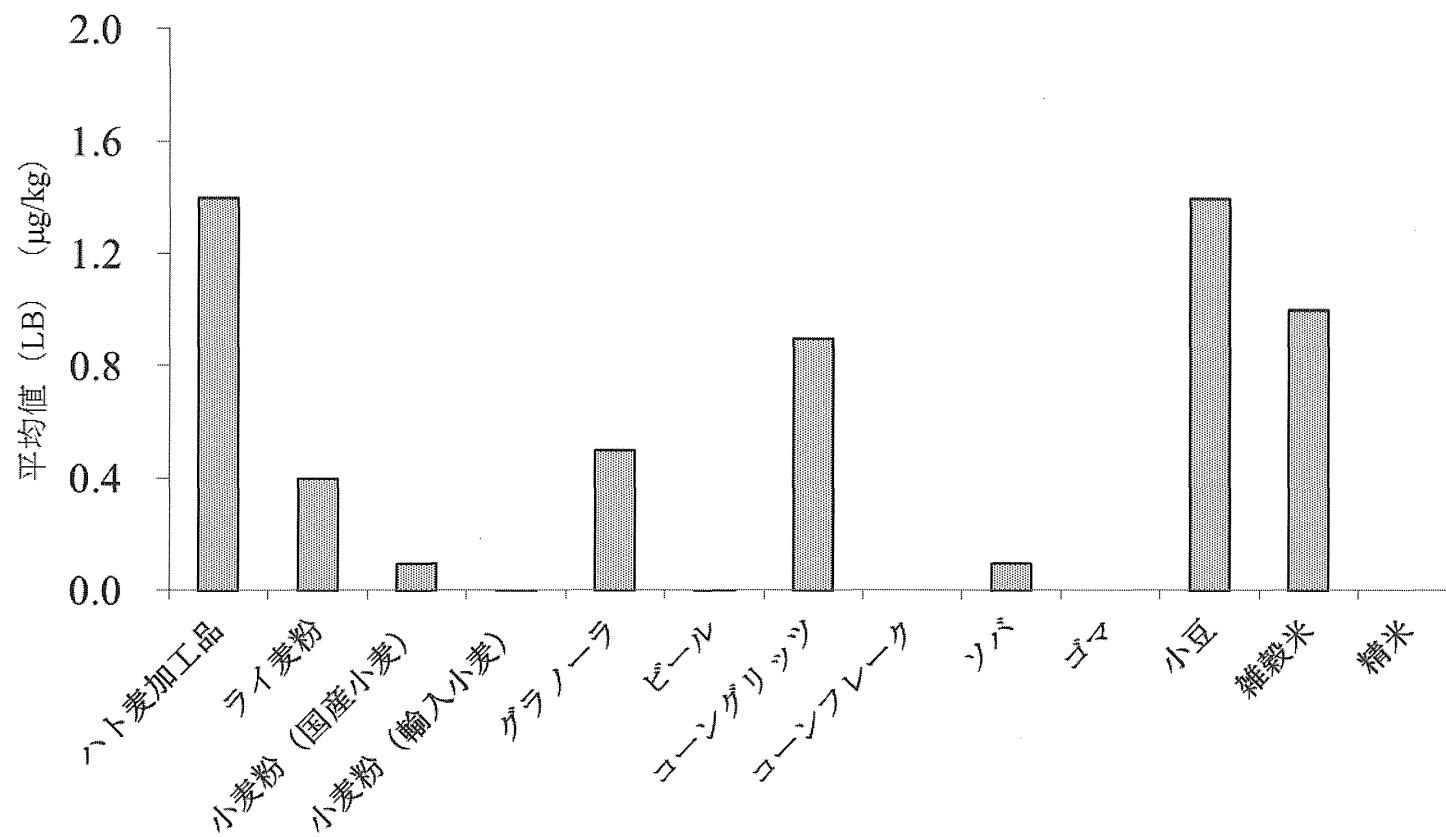


図3 HT-2 トキシンの汚染実態

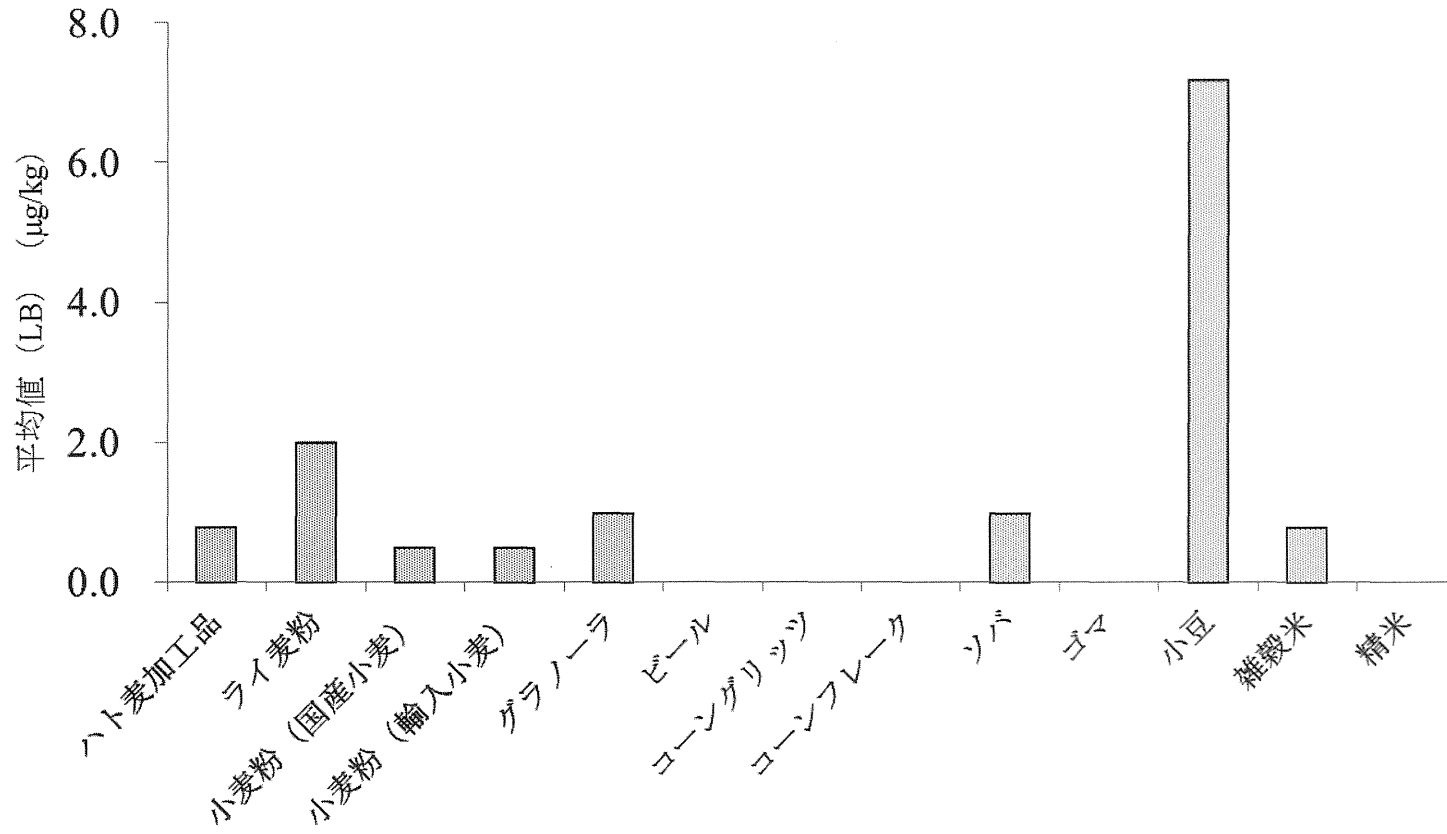
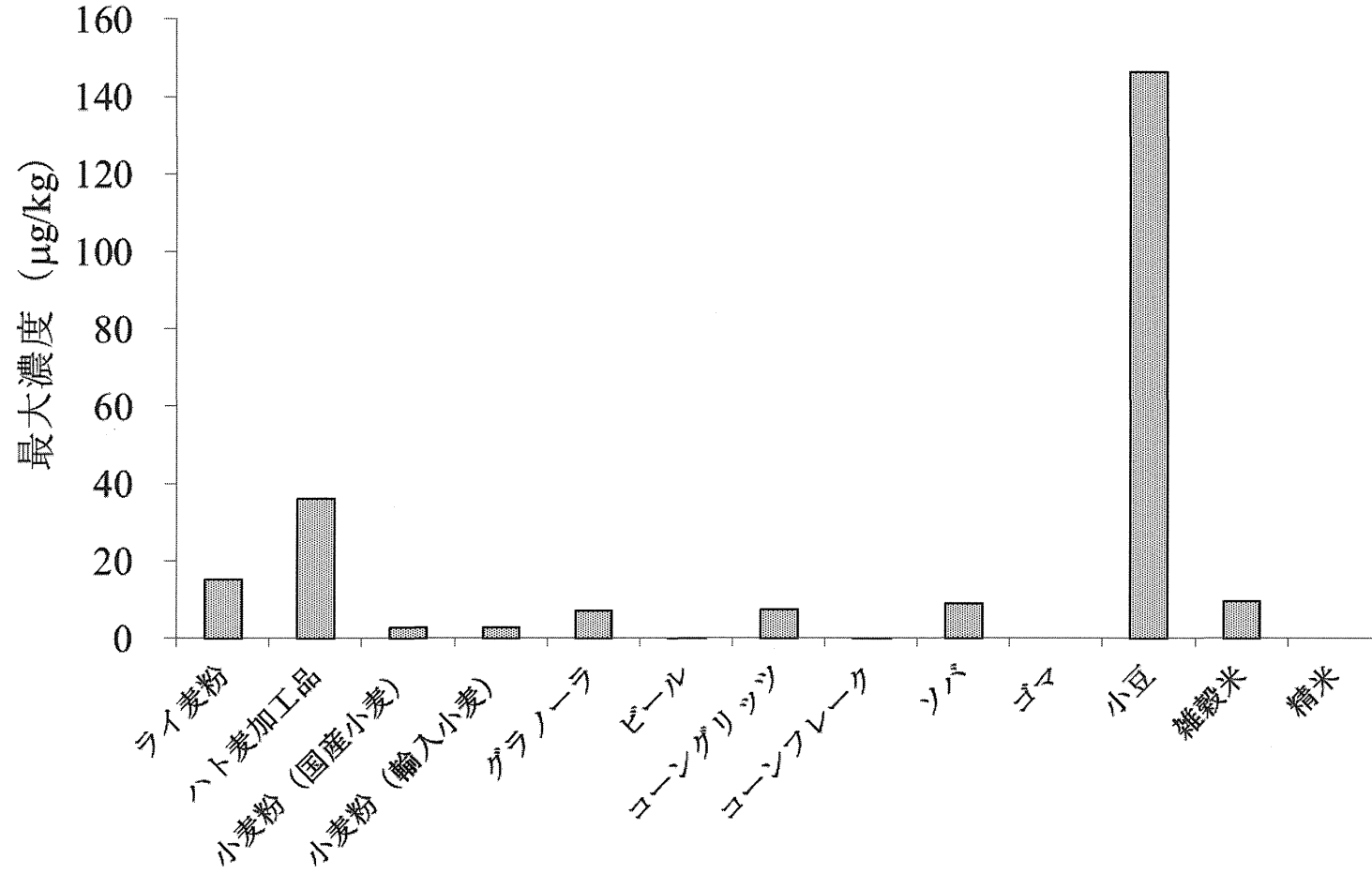


図4 T-2 トキシンと HT-2 トキシンの合算値



厚生労働科学研究費補助金研究事業

(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

平成 22 年度から平成 24 年度までの実態調査結果による T-2, HT-2 及び ZEN の限定的曝露評価

研究分担者

小西 良子(麻布大学)・局 博一(東京大学)

研究要旨

近年国際的にも対策が望まれているカビ毒につき、わが国の健康被害のリスクを評価するためにも、曝露評価が必要とされてきているが、いまだに具体的な評価のなされていないカビ毒も存在する。本研究においてはフザリウム系カビ毒である、ゼアラレノン (ZEN)、T-2 トキシン、HT-2 トキシンの 3 種のカビ毒につき、平成 24 年度の研究を受けて、より多くの食品による限定的曝露評価を行った。

今回は平成 22 年度から平成 24 年度の 3 年間で行った実態調査結果と一部平成 26 年度に行った実態調査結果を用いて以下の手法で曝露評価を行った。すなわち摂取者割合および摂取量の少ない食品については、曝露評価の対象から外す事にし、摂取者割合が各年齢層の対象者の 1 %を超える食品について、食品・年齢層別に行った。実際に評価の対象となった食品は、小麦、大麦、小豆、雑穀米、ビールの 5 種であった。

この期間では対象食品の中でも、小豆が、T-2、HT-2、ゼアラレノンの 3 種全てについて汚染量が多く、小麦は T-2 トキシン、HT-2 トキシンについて汚染量が多かった。そのため小麦と小豆の摂取量の多い年齢層 (1 歳から 6 歳、7 歳から 14 歳) では T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの曝露量の増大が見られることとなった。(ゼアラレノンについては、多くの曝露が見られた食品・年齢層においても、PMTDI である 500ng/体重 Kg/日に比べるとかなり低い値であった。)

日本における現状をシミュレーション結果から推察すると、ゼアラレノンについては健康被害のリスクは極めて低いと思われる。HT-2 トキシンについては 95%タイル (20 人のうち 19 人) は健康被害のリスクを考えなくても良いが、輸入小麦と小豆の摂取による曝露が多いため、小麦や小豆の摂取がかなり多い人には、健康被害リスクが存在すると推察される。また T-2 トキシンと HT-2 トキシンの合計量については低年齢層でかなりリスクが高くなっていることがわかった。(1 歳から 6 歳では 97.5%タイルで PMTDI を超え、7 歳から 14 歳では 99%タイルで PMTDI を超えている) 今後さらに実態調査結果数を増やして詳細な解析を行う必要がある。

研究協力者

斉藤 史朗 (東京大学)

A. 研究目的

ゼアラレノン、T-2 トキシン、HT-2 トキシンの 3 種のカビ毒につき、主要な食品摂取を通じての曝露量を、年齢層 (1 歳から 6 歳、7 歳から 14 歳、15 歳から 19 歳、20 歳以上) ごとにシミュレーションして、日本人の食物摂取による上記 3 種のカ

ビ毒による健康被害のリスクを計量化し、PMTDI 値と比較する。

B. 研究方法

1) 対象食品の選定

汚染量を計測した食品は、グラノーラ、コーン

グリッツ、コーンフレーク、そば、はと麦、ビール、ライ麦粉、ゴマ、小麦、大麦、雑穀米、小豆、はと麦、大豆、米であったが、そもそもほとんど汚染が検出されなかった食品（大豆、米）、および摂取者の割合が1%を下回る食品（コーングリッツ、はと麦、ライ麦粉）、摂取量が極めて少なく健康被害のリスクを考えにくいもの（ゴマ）、汚染量データのサンプル数が十分に集まっていない食品（グラノーラ、そば、コーンフレーク）は今回のシミュレーションの対象からは除外した。

結果として今回のシミュレーション対象となったのは、以下の5つの食品である。

- ・小麦
- ・大麦
- ・小豆
- ・雑穀米
- ・ビール

2) 汚染量シミュレーションの方法

下記の各食品の汚染実態における平均と標準偏差は、LOQ以上のサンプルの平均と標準偏差である。

それぞれの食品についてLOQ以上の割合については、下記の平均値と標準偏差値を利用して対数正規分布を作成し、LOQ以上割合を超えるものについては、LOQ値を取るようにシミュレーションを行った。（試行回数は10,000,000回）

(1) 小麦

汚染レベルが輸入小麦と国産小麦で異なっていると言われていたので、それぞれにつき汚染量をシミュレーションし、曝露量を計算する際に国内流通の割合で案分した。

今回使用したデータでは国産小麦については小麦粉の汚染量データを利用したので、減衰はないものとした。輸入小麦は玄麦であるので、減衰を50%と仮定した。

■ 輸入小麦の汚染実態（単位：ng/g）

	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	150	150	150
LOQ以上数	9	21	7
平均	2.8	13.4	1.8
標準偏差	2.5	19.5	0.9

※データは平成22年度から24年度実態調査より
※なお、ZENについては1件のはずれ値（150.7 ng/g）のサンプルがあったので、150分の1の確

率で150.7 ng/gを再現するようにシミュレーションを行った。

■ 国産小麦の汚染実態（単位：ng/g）

	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	26	26	26
LOQ以上数	4	16	4
平均	0.37	0.75	1.14
標準偏差	0.5	0.5	0.69

※データは平成26年度実態調査より

(2) 大麦

汚染レベルが輸入大麦と国産大麦で異なっていると言われていたので、それぞれにつき汚染量をシミュレーションし、曝露量を計算する際に国内流通の割合で案分した。

国産大麦については、農林水産省の公表値に標準偏差の記載がなかったため、輸入大麦の平均と標準偏差にならって、国産大麦の標準偏差を仮定した。

輸入大麦も国産大麦も玄麦なので減衰を50%と仮定した。

■ 輸入大麦の汚染実態（単位：ng/g）

	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	41	41	41
LOQ以上数	4	7	4
平均	1.7	4.2	8.95
標準偏差	1.6	2.8	12.25

※データは平成22年度から24年度実態調査より
※なお、HT-2については1件のはずれ値（21.4 ng/g）のサンプルがあったので、41分の1の確率で21.4 ng/gを再現するようにシミュレーションを行った。

■ 国産大麦の汚染実態（単位：ng/g）

	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	30	30	300
LOQ以上数	8	5	185
平均	0.6	1.6	4.9
標準偏差	0.56	1.07	6.7

※データは農林水産省サイトの公開情報より

(3) 小豆

■小豆の汚染実態 (単位: ng/g)

	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	40	40	40
LOQ以上数	28	28	29
平均	11.12	9.93	44.94
標準偏差	13.14	12.36	32.03

※データは平成22年度から24年度実態調査より

(4)雑穀米

■雑穀米の汚染実態 (単位: ng/g)

	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	80	80	80
LOQ以上数	16	18	67
平均	0.85	0.98	5.73
標準偏差	1.03	0.89	11.35

※データは平成22年度から24年度実態調査と平成26年度実態調査の結果を合わせて利用

(5)ビール

■ビールの汚染実態 (単位: ng/g)

	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	30	30	30
LOQ以上数	25	2	0
平均	0.05	0.575	-
標準偏差	0.03	-	-

※データは平成22年度から24年度実態調査より

※ HT-2 に関しては汚染サンプルが二つしかなかったため、LOQ 以上の割合である 0.067 の確率で全てを 0.575 とし、それ以外を LOQ 値と同じ 0.4 としてシミュレーションした。

※ゼアラレノン検出サンプルがなかったためシミュレーション対象としなかった。

3) 食品摂取量シミュレーションの方法

下記の食品につき、年齢層 (1 歳から 6 歳、7 歳から 14 歳、15 歳から 19 歳、20 歳以上) にわけて摂取量をシミュレーションした。(試行回数は 10,000,000 回)

(各食品・年齢層ごとの摂取量については添付資料(1)を参照)

(1)小麦含有食品

「平成 17 年度~19 年度食品摂取頻度・摂取量調査」より、小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。

小麦含有食品の摂取量は以下の食品群ごとに計算した。(詳細は平成 23 年度中間報告参照)

- ・少量摂取群
- ・含有率 30%群
- ・含有率 50%群
- ・含有率 100%群

(2)大麦含有食品

「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(「七分つき押し麦(01005)」「押し麦(01006)」「米粒麦(01007)」)(括弧内は食品番号)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。

(3)小豆含有食品

「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。

小豆含有食品の摂取量は以下の食品群ごとに計算した。(詳細は平成 24 年度報告書参照)

- ・赤飯
- ・あんこ
- ・まんじゅう
- ・羊羹

(4)ビール

「平成 17 年度~19 年度食品摂取頻度・摂取量調査」より、ビール類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。(第一種ビール)

(5)雑穀米

「平成 17 年度~19 年度食品摂取頻度・摂取量調査」には「雑穀米」という項目での調査結果が存在しない。また、市販の「雑穀米」と称する商品は、それぞれにどのような穀物を含んでいるのか、種類や混合割合が異なっている。そこで、多くの商品に含まれていて、かつ、調査データが存在する「アマランサス」が、汚染量調査のサンプルに重量比でどれくらい含まれているのかを計測して、その割合をもとに、「雑穀米」としての摂取量を推定した。

4)曝露量の計算

年齢階層ごとに、汚染量 (ng/g) を摂取量 (ng/体重 1Kg/日) と掛け合わせて、1 日あたりの体重

1Kg に対する曝露量 (ng) を計算し、パーセンタイルごとの曝露量を明らかにした。

C. 研究結果

1)カビ毒・年齢層ごとの推定曝露量

小麦の HT-2 トキシンの曝露量が各年齢層で多く、とりわけ低年齢層 (1 歳から 14 歳) において大きくなった。(1 歳から 6 歳の小麦の HT-2 トキシンの曝露量は 99% タイルで 73.2 ng/体重 Kg/日であり、7 歳から 14 歳の小麦の HT-2 トキシンの曝露量は 99% タイルで 49.1 ng/体重 Kg/日であった。20 歳以上では、99% タイルで 28.6 ng/体重 Kg/日と減少した。)

また、小豆については全てのカビ毒で曝露量が高くなった。たとえば 20 歳以上の 99% タイルでは、H-2 トキシンの曝露量が 16.9 ng/体重 Kg/日であり、HT-2 トキシンの曝露量は 15.2 ng/体重 Kg/日であり、ゼアラレノンは 64.6 ng/体重 Kg/日であった。

(食品・カビ毒ごとの各年齢階層の曝露量は資料 2 を参照)

2) 食品合計によるカビ毒の推定曝露量

(1)T-2 トキシンの曝露量

PMTDI (JECFA) は 60 ng/体重 Kg/日である。1 歳から 6 歳では、99.8% タイルで PMTDI を超え、7 歳から 14 歳では 99.8% タイルで PMTDI を超えた。15 歳から 19 歳では 99.9% でも 39.4 ng/体重 Kg/日しかなく、20 歳以上でも、99.9% タイルでも 54.1 ng/体重 Kg/日と、PMTDI には達しなかった。(資料 3 を参照)

(2)HT-2 トキシンの曝露量

PMTDI (JECFA) は 60 ng/体重 Kg/日である。1 歳から 6 歳では、99% タイルで PMTDI を超え、7 歳から 14 歳では 99.5% タイルで、15 歳から 19 歳では 99.8% タイルで、20 歳以上では 99.8% タイルで PMTDI を超えた。

(3)ゼアラレノンの曝露量

PMTDI (JECFA) は 500 ng/体重 Kg/日であるが、いずれの年齢階層でも PMTDI を超えることはなかった。

(4)T-2 トキシンの曝露量と HT-2 トキシンの曝露量の合算値での PMTDI

JECFA(2001)では、T-2 トキシンの曝露量と HT-2 トキシンの曝露量について、それぞれ単独で 60 ng/体重 Kg/日という値のほか、この二つのカビ毒の合算値でも同じく 60 ng/体重 Kg/日という基準を作成

している。この基準と比較した場合、1 歳から 6 歳では 97.5% タイルで、7 歳から 14 歳は 99% タイルで、15 歳から 19 歳は 99.8% タイルで、20 歳以上は 99.8% タイルで PMTDI を超えた。

(全食品の年齢階層ごとの曝露量推定は資料 3 を参照。)

D. 考察

結果に示されているように、低年齢層における曝露量が多く、とりわけ HT-2 トキシンの曝露量がかなり多くなっている。その原因としては次の二つが考えられる。

1)汚染量の高い食品

(1)小豆

T-2 トキシンの曝露量、HT-2 トキシンの曝露量、ゼアラレノンの曝露量のいずれも汚染の程度が高く、他の食品の 10 倍から 100 倍も汚染されている。

(2)輸入小麦

国産小麦と比べて、輸入小麦はかなり汚染が高く出ている。平均値で比べた場合、T-2 トキシンの曝露量は輸入小麦は国産小麦の 8 倍近く、ゼアラレノンでは 1.6 倍、HT-2 トキシンの曝露量は 18 倍近くにもなっている。国産小麦は小麦粉なので減衰しないことを考慮に入れてもなお、かなりの違いである。

2) 摂取量の多い食品

(1)小豆

1 歳から 19 歳までは、主食である米の約 10 分の 1 の量の摂取であるが、20 歳以上になると小麦の摂取量の約 17% もの高い水準で消費されている。(ただし、摂取があった人についてだけ見ているので、摂取者割合が低くなっているかもしれない)

(2)小麦

体重 1Kg で比べてみた場合、年齢が低くなるほど、小麦を含む食品を摂取する量が大きくなる傾向にある。

汚染量の高さや摂取量の多さの二つの条件を合わせることで、低年齢層の曝露量、とりわけ HT-2 の曝露量が大きくなっている。

3) 今後の課題

T-2 トキシンの曝露量と HT-2 トキシンの曝露量の合算値で、PMTDI を測定するという方法を取る場合、この両者には強い相関が認められるが、シミュレーションにおいてもこの二つのカビ毒の発生を互いに強い相関で行うようなシミュレーションが必要であると思われるので、今後の研究ではこの点を反映するアルゴリズムを作成してシミュレーションを行いたい。

化に注意すべきであると思われる。

E. 結論

95%タイルでは今のところ推計曝露量はPMTDIよりも低い水準にある。

しかし低年齢層の曝露水準は大人に比べるとかなり高いので、今後とも、食品汚染のレベルの変

F. 研究発表

- 1.論文発表：特になし
- 2.学会発表：特になし

資料1. 年齢層毎の食品摂取量(単位: g/体重kg/日)

(A) 1歳から6歳

食品	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
小麦	10.58	13.52	16.62	21.13	24.99	30.89	35.99
大麦	0.00	0.12	0.26	0.42	0.55	0.72	0.87
小豆	0.00	0.90	1.65	2.54	3.25	4.26	5.12

(B) 7歳から14歳

食品	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
小麦	7.13	9.04	11.02	13.84	16.19	19.72	22.75
大麦	0.05	0.16	0.26	0.41	0.54	0.73	0.90
小豆	0.00	0.54	1.02	1.71	2.31	3.22	4.00
雑穀	0.00	0.00	0.00	0.00	1.30	3.39	5.31

(C) 15歳から19歳

食品	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
小麦	4.94	6.23	7.55	9.42	10.95	13.22	15.15
大麦	0.11	0.16	0.22	0.29	0.35	0.43	0.50
小豆	0.00	0.46	0.71	1.01	1.24	1.55	1.81

(D) 20歳以上

食品	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
小麦	4.19	5.27	6.36	7.83	9.02	10.70	12.08
大麦	0.00	0.00	0.10	0.26	0.40	0.63	0.85
小豆	0.43	0.71	0.97	1.34	1.64	2.09	2.50
雑穀米	0.00	0.00	0.00	0.00	0.71	2.44	4.52
ビール	0.00	0.00	0.00	4.29	8.09	12.91	16.86

資料2. 年齢層毎のカビ毒曝露量推定(単位: ng/体重kg/日)

(A) 1歳から6歳

カビ毒	食品	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
T-2	小麦	3.53	4.80	6.60	10.90	16.23	25.72	34.72
	大麦	0.00	0.03	0.07	0.13	0.18	0.28	0.38
	小豆	0.00	0.29	8.84	23.57	38.81	65.88	92.48
HT-2	小麦	16.03	29.73	47.47	73.16	94.44	125.80	152.56
	大麦	0.00	0.09	0.21	0.39	0.61	1.15	1.78
	小豆	0.00	0.74	7.62	20.87	34.87	60.26	86.13
ゼアラレノン	小麦	4.99	6.62	8.69	13.70	79.78	381.99	576.33
	大麦	0.00	0.06	0.20	0.58	1.04	1.92	2.83
	小豆	0.00	1.87	47.09	102.14	151.97	232.60	306.91

(B) 7歳から14歳

カビ毒	食品	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
T-2	小麦	2.37	3.20	4.36	7.24	10.86	17.28	23.37
	大麦	0.01	0.05	0.08	0.13	0.19	0.29	0.39
	小豆	0.00	1.15	5.92	15.37	25.64	44.61	63.75
	雑穀	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.85	1.50
HT-2	小麦	10.66	19.88	31.98	49.05	62.99	82.93	99.95
	大麦	0.04	0.13	0.23	0.43	0.68	1.23	1.83
	小豆	0.00	1.02	5.14	13.65	23.04	40.83	59.18
	雑穀	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	1.89	3.12
ゼアラレノン	小麦	3.36	4.41	5.74	8.92	52.97	258.39	386.43
	大麦	0.03	0.12	0.29	0.69	1.16	2.03	2.94
	小豆	0.00	8.40	30.06	66.15	101.43	161.20	217.60
	雑穀	0.00	0.00	0.00	0.00	2.08	10.64	23.50

(C) 15歳から19歳

カビ毒	食品	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
T-2	小麦	1.64	2.19	2.97	4.95	7.48	11.92	16.07
	大麦	0.03	0.05	0.07	0.11	0.14	0.22	0.29
	小豆	0.00	1.14	4.59	10.58	16.63	27.08	37.25
HT-2	小麦	7.26	13.76	22.24	33.97	43.40	56.96	68.19
	大麦	0.09	0.14	0.22	0.40	0.66	1.10	1.47
	小豆	0.00	0.96	3.99	9.42	15.06	24.91	34.69
ゼアラレノン	小麦	2.32	3.03	3.92	6.02	26.83	178.35	268.59
	大麦	0.08	0.19	0.36	0.70	1.06	1.69	2.31
	小豆	0.00	8.24	22.97	43.99	62.62	91.91	118.10

(D) 20歳以上

カビ毒	食品	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
T-2	小麦	1.38	1.84	2.46	4.09	6.21	9.98	13.42
	大麦	0.00	0.00	0.03	0.08	0.12	0.21	0.30
	小豆	0.70	4.27	8.74	16.86	25.02	39.20	53.00
	雑穀米	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.63	1.28
	ビール	0.00	0.00	0.00	0.15	0.34	0.63	0.90
HT-2	小麦	5.97	11.28	18.62	28.64	36.54	47.68	56.68
	大麦	0.00	0.00	0.08	0.22	0.39	0.73	1.15
	小豆	0.62	3.71	7.72	15.18	22.85	36.38	49.63
	雑穀米	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	1.38	2.63
	ビール	0.00	0.00	0.00	1.75	3.32	5.33	6.97
ゼアラレノン	小麦	1.96	2.56	3.27	4.91	14.70	149.52	228.46
	大麦	0.00	0.00	0.07	0.26	0.54	1.16	1.87
	小豆	6.09	21.88	38.32	64.62	88.71	127.31	162.90
	雑穀米	0.00	0.00	0.00	0.00	1.34	7.37	17.66

資料3. 食品合計の曝露量推定(単位: ng/体重kg/日)

(A) 1歳から6歳

カビ毒	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
T-2	4.36	7.54	14.45	28.79	43.70	70.33	96.83
HT-2	18.54	33.57	51.79	78.60	101.38	135.61	165.42
ゼアラレノン	6.50	18.47	62.04	144.32	244.78	442.85	616.43
T-2+HT-2の合計	25.16	41.93	61.92	92.26	118.67	159.80	196.45

(B) 7歳から14歳

カビ毒	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
T-2	3.00	5.13	9.58	19.02	29.06	47.62	66.62
HT-2	12.36	22.49	34.87	52.84	67.85	90.22	109.87
ゼアラレノン	4.80	15.04	40.67	97.76	170.19	308.46	426.06
T-2+HT-2の合計	16.80	28.01	41.51	61.89	79.49	107.24	132.72

(C) 15歳から19歳

カビ毒	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
T-2	2.10	3.71	6.89	12.91	18.95	29.32	39.40
HT-2	8.50	15.53	24.01	36.00	45.84	60.14	72.37
ゼアラレノン	3.27	11.96	28.70	60.43	102.52	195.50	278.22
T-2+HT-2の合計	11.73	19.38	28.40	41.46	52.42	68.78	82.78

(D) 20歳以上

カビ毒	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
T-2	2.55	5.64	10.08	18.12	26.26	40.34	54.06
HT-2	8.41	14.85	22.40	33.30	42.48	56.18	68.53
ゼアラレノン	8.89	25.26	44.76	81.27	121.81	197.92	265.21
T-2+HT-2の合計	12.37	20.09	28.86	42.04	53.59	71.93	88.86

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。わが国における食料消費量のうち 14%を占める小麦では、その 84%は輸入品でまかなわれているが、*Fusarium* 属菌が産生するマイコトキシン汚染の問題が大きいことで知られる主要な農作物のひとつである。また、近年の調査では、国産の小豆において、トリコテセン系マイコトキシンのひとつである T-2 トキシン等の高濃度・高頻度の汚染が確認されている。これらの食品に関する安全性の検討は重要な課題である。しかし、これらにおいて、マイコトキシンの汚染原因となる *Fusarium* 属菌の分布状況については調査が進んでおらず、生態学的に詳細な研究はなされていない。そこで本研究では、マイコトキシン汚染の原因菌の特定を目的として、マイコトキシンおよび *Fusarium* 属菌の汚染状況、および分離株のマイコトキシン産生性を同時に検討した。今年度の検討では、アメリカおよびカナダ産小麦合計 43 検体、および北海道産および岡山県産小豆 3 検体を供試した。検体 100 粒あたりの *Fusarium* 属菌陽性粒率を算出し、全ての *Fusarium* 属菌を分離した。小麦検体から 88 菌株、小豆検体から 77 菌株の *Fusarium* 属菌分離株を得た。これらの分離株に、本研究班の昨年度の研究結果から得られた国産小豆由来株 24 菌株を加え、形態学および分子生物学的手法によって同定した後に、角田培地を用いて培養を行い、LC-MS-MS によって培養液中の T-2 トキシンおよびゼアラレノン等マイコトキシンの含有量を定量した。これらの検討の結果、特にアメリカ・カナダ産 DURAM 小麦および国産白小豆は、他品種と比較して *Fusarium* 属菌に汚染されやすい傾向にあることが明らかとなり、マイコトキシン汚染のリスクが高いことが考えられた。また、T-2 トキシン汚染状況と分離された *F. sporotrichioides* の T-2 トキシン産生性が一致したことから、輸入小麦および国産白小豆の T-2 トキシンの汚染原因菌種は本菌であることが示唆された。

研究協力者 作田 庄平 東京大学大学院 農学生命科学研究科
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

A. 研究目的

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。*Fusarium* 属菌は、耐冷性・好湿性が高く、土壌菌として温帯から冷帯の広い地域に分布しており¹⁾、穀類(特に麦・トウモロコシ)、豆類、ナッツ類を汚染する。*Fusarium* 属菌が産生するマイコトキシンをフザリウムトキシンとよぶ。*Fusarium* 属菌のトキシン産生性は菌種間で異なる(図 1)ことが報告されることから^{2,3)}、食品のフザリウムトキシン汚染を制御するためには、産生菌の菌種レベルの生態把握が必要となる。

フザリウムトキシンのうち、最も毒性が強いもののひとつとしてトリコテセン系マイコトキシンが挙げられる。その構造により、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ジアセトキシスペノール(DAS)、ネオソラニオール(NES) などのタイプ A、ニバレノール(NIV)やデオキシニバレノール(DON) などのタイプ B に分類される¹⁾。トリコテセン系マイコトキシンの摂取によるヒトまたは家畜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) が発生し、患者の 30~80%が死亡した¹⁾。この原因となった穀物から *Fusarium sporotrichioides* が検出され、産生される毒性画分の主要素が T-2 トキシンであること、T-2 トキシンを投与したサルが同様の症状を示したことから T-2 トキシンが原因物質と推定されている¹⁾。インドのカシミール地方では 1987 年に DON、NIV、T-2 トキシンおよびアセチルデオキシニバレノールに汚染された小麦から作ったパンを摂取したために中毒が発生した¹⁾。我が国でも、1949 年および 1965 年に北海道で、フザリウムトキシンの汚染が原因と考えられる小麦加工食品による食中毒事例発生の報告がある^{4,5)}。これらの事例から、欧米諸国を中心に数カ国では、食品や飼料に対して DON や T-2 トキシンに規制値

が設けられている。我が国においては、2003 年 5 月に小麦において DON の暫定基準値 1.1 ppm が設定されている⁶⁾。

小麦は、上述のとおり世界中でフザリウムトキシン中毒事件の原因食品となりリスクが高く、食品衛生学上注意が必要な食品である。消費量に着目した場合、わが国では米及び畜産物の次に 1 日摂取カロリーが高い食品であり⁷⁾ (図 2)、かつ消費する小麦の 84%が輸入であるため⁷⁾、輸入小麦の危害性を調査する必要性は高い。海外産小麦および国内産小麦では、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、DON および NIV などのフザリウムトキシン汚染の報告があり⁸⁻¹¹⁾、また産地によってその汚染状況は様々である¹²⁾。カナダ産小麦からは *Fusarium poae*、*Fusarium sporotrichioides* および *Fusarium acuminatum* が検出され¹³⁾、様々な菌種の検出例の報告がある。しかし、国内で消費される輸入小麦から検出されたフザリウムトキシンの汚染原因菌についての報告はほとんどなく、輸入小麦から分離した *Fusarium* 属菌のトキシン産生性と、その検体を汚染するフザリウムトキシンを比較し、汚染の原因菌を直接明らかにする必要がある。

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ことが明らかとなった。これを受けて、本研究班では、平成 H25 年度の研究成果として、それらの産生菌である *Fusarium* 属菌の小豆における分布状況について検討した。その結果、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こと、小豆 100 粒あたりの *Fusarium* 属菌の陽性粒率が最も高かった検体は北海道産小豆であったこと、さらに、各地域の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。

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麦・小豆について、*Fusarium* 属菌の汚染状況、および分離された菌株の T-2 トキシンを中心としたフザリウムトキシン産生性について検討した。

B. 研究方法

(1) 供試検体

① 輸入小麦

輸入小麦 43 検体(アメリカ産 32 検体、カナダ産 11 検体)を供試した。アメリカ産における小麦の品種は DURAM、DNS、HRS、SH および WH であった。また、品種が不明なものも使用した。カナダ産における小麦の品種の内訳は DURAM および CW であった。詳細は表 1 に示した。また、あらかじめトリコテセン系マイコトキシン汚染濃度が測定してある供試検体を使用した。詳細は表 2 及び表 3 に示した。

② 国産小豆

本研究班における平成 25 年度の成果による分離株(表 4)について、フザリウムトキシンの産生性を検討した。菌株の詳細は以下のとおりである。国産小豆 9 検体からの分離株 27 株で、菌種の内訳は、*Fusarium avenaceum* 1 株、*Fusarium camptoceras* 1 株、*Fusarium incarnatum/equiseti* species complex (FIESC) 9 株、*Fusarium oxysporum* 7 株、*Fusarium proliferatum* 1 株、*Fusarium verticillioides* 1 株、*Fusarium* sp. 1 株である。

また、本研究班の研究分担者・小西らによる平成 25 年度の検討の結果を参照し、最も高いトリコテセン系タイプ A の汚染濃度を記録した小豆検体は白小豆(T-2 トキシン 0.96 ppb、HT-2 トキシン 102.59 ppb)であったため、今年度は北

海道産および丹波地方産白小豆をそれぞれ 1 検体ずつ、および対象として北海道産の通常の赤色小豆 1 検体を供試し、*Fusarium* 属菌の分離および分離株のフザリウムトキシン産生性の検討を行った。あらかじめトリコテセン系マイコトキシン汚染濃度が測定してある供試検体を使用した。詳細は図 3、表 8 に示した。なお、小豆検体は、本研究班の研究分担者・小西らの本年度および来年度の研究で供試された(または供試予定)検体と同一のものをを用いたため、共通の ID を付した。

(2) 供試検体の水分活性値測定

供試検体の水分活性値は Pawkit(アイネクス株式会社、東京都)を用いて測定した。室温で供試検体を開封し、直ちに Pawkit に添付の 15ml 容サンプルカップに数粒を入れ、機器をセットして 5 分置き、水分活性値を測定した。

(3) 小麦および小豆からの菌株分離

分離の実験フローを図 4 に示した。小麦および小豆検体は、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)平板上に、洗浄した小豆または大豆を置き、25℃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℃で 1~2 週間培養した。*Fusarium* 属菌では、複数の菌種が混合感染している場合があるため、純培養するために単孢子分離¹⁴⁾を行った。カーネーションリーフアガー(CLA)培地は *Fusarium* 属菌の孢子形成を促進することから、分離株を CLA 培地に接種し、

25°Cで14日間培養した。胞子形成が確認されたCLA寒天培地にPBSを1ml加え、胞子懸濁液を作製した。胞子懸濁液のプレパラートを作製して100倍の倍率で顕微鏡観察を行い、1視野あたりの胞子数を計測した。計測結果を参照し、1視野に対しおおよそ1胞子の割合となるように、胞子懸濁液の希釈を行った。希釈液をPDA寒天平板状に50 μ Lまたは100 μ L接種し、25°Cで12~24時間培養した。実体顕微鏡を用いて、1胞子を新しいPDA寒天平板上に釣菌し、25°C7日間培養した。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。

(4)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。同定の実験フローを図5に示した。

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。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、B(3)で述べたCLA培地を用いての培養を行い、プレパラートを作製して、形成された胞子形状および胞子形成様式を顕微鏡で観察した。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¹⁴⁾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2.0mlマイクロチューブに入れたPotato Dextrose Broth (PDB: Becton and Dickinson Company, USA) 1mlに接種後、25°Cで1晩培養した。培養後、4°C・15,000rpm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¹⁵⁾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ス法により行った。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 β -tubulin遺伝子(β -*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'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')¹⁶⁾、 β -*tub*については、Btu_F-F01(5'-CAGACCGGTCAGTGCCTAA-3')およびBtu-F_R01(5'-TTGGGGTCGAACATCTGCT-3')¹⁷⁾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。シーケンス反応は、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。シーケンス反応物の精製は、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。得られたシーケンスデータは、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 β -*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。

(5) 培養法によるマイコトキシン産生性の確認

培養の実験フローを図 6 に示した。単孢子分離を行い純培養した分離株を用いて、トリコテセン系マイコキシンタイプ A に属する T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノン (ZEN) の産生性を確認するための培養を行った。最初に、前培養を行った。Potato Dextrose Broth (PDB; Becton, Dickinson and Company, USA) に Chloramphenicol を 100mg/L の割合で添加した培養液を遠沈管に 15ml~20ml ずつ分注し、前培養に用いた。ここに PDA 斜面培地上の菌体を接種後、25°C で 3 日間振とう培養した。その後、トリコテセン系マイコキシンの産生に適していることが報告されている角田培地 (水 1L に対し、硝酸ナトリウム 2g、リン酸水素二カリウム 1g、塩化カリウム 0.5g、硫酸マグネシウム 0.5g、酵母エキス 2.5g、ポリペプトン 5g、スクロース 50g) を本培養に用いた。角田培地を 200ml 三角フラスコに 100ml ずつ分注し、ここに前培養液を 100 μ L ずつ接種し、25°C で 7 日間静置培養した。培養後、培地と等量の酢酸エチルを混合し、遠心して酢酸エチル層を除去することによる洗浄を 2 回繰り返したのち、100% アセトニトリルでマイコキシンを抽出し、LC-MS/MS での測定に供した。

C. 研究結果

(1) 輸入小麦からの *Fusarium* 属菌の検出状況

アメリカ産小麦の各供試検体における真菌陽性粒数および *Fusarium* 属菌陽性粒数を図 7 に示した。各供試検体 100 粒における真菌陽性粒数および *Fusarium* 属菌陽性粒数の最高値は、DURAM 小麦 (4 検体) では 97 粒および 11 粒、DNS 小麦 (4 検体) では 70 粒および 2 粒、HRS 小麦 (9 検体) では 79 粒および 6 粒、SH 小麦 (1 検体) では 74 粒および 1 粒、SWH 小麦 (5 検体) では 79 粒および 1 粒、品種が不明な小麦 (9 検体) では 100 粒および 8 粒であった。真菌陽性粒数が高い検体は、*Fusarium* 属菌も比較的多く検出される傾向にあった。アメリカ産小麦の、品種別における *Fusarium* 属菌陽性粒率を算出したところ、アメリカ産の DURAM 小麦 5.3%、DNS 小麦 0.8%、HRS 小麦 1.6%、SH 小麦 1.0%、SWH 小麦 1.0%、品種が不明の小麦は 1.3% であった。DURAM 小麦の真菌陽性粒数は、その他の小麦品種と比較して有意に高かった ($p < 0.001$)。また、DURAM 小麦の *Fusarium* 属菌陽性粒数は、DNS 小麦を除くその他の品種と比較して有意に高かった ($p < 0.005$)。以上のことから、DURAM 小麦は真菌全体および *Fusarium* 属菌に対して、高濃度に汚染されていることが示された。

カナダ産小麦の各供試検体における真菌陽性粒数および *Fusarium* 属菌陽性粒数を図 8 に示した。各供試検体 100 粒における真菌陽性粒数および *Fusarium* 属菌陽性粒数の最高値は、CW 小麦 (4 検体) で、それぞれ 76 粒と 4 粒であった。また、DURAM 小麦 (7 検体) ではそれぞれ 90 粒と 7 粒であった。カナダ産小麦の、品種別における *Fusarium* 属菌陽性粒率を算出したところ、CW 小麦 1.8%、DURAM 小麦 3.7% であった。陽性粒率の間に有意差はみられなかったものの、DURAM 小麦は真菌全体および *Fusarium* 属菌に対して、CW 小麦と比較して高濃度に汚染され

ている傾向にあることが示された。

アメリカ産とカナダ産を合算し、品種別の *Fusarium* 属菌陽性粒率を算出したところ、DURAM 小麦は 4.3%。DNS 小麦 0.8%、HRS 小麦 1.6%、SH 小麦 1.0%、SWH 小麦 1.0%、品種が不明の小麦は 1.3%であった。陽性粒率の間に有意差はみられなかったものの、DURAM 小麦は、他品種の小麦と比較して *Fusarium* 属菌に高濃度に汚染されている傾向にあることが示された。

(2)小麦から検出された *Fusarium* 属菌種に関する産地間の差違

各供試検体から検出された *Fusarium* 属菌分離株の同定結果について、アメリカ産小麦の結果を表 5 に、カナダ産小麦の結果を表 6 に示した。アメリカ産小麦由来株は *F. acuminatum* が 20 株、*F. graminearum* が 19 株、*F. sporotrichioides* が 7 株、*F. poae* が 6 株、*F. avenaceum* が 3 株および *F. equiseti* が 1 株同定された。カナダ産小麦由来株は *F. avenaceum* が 12 株、*F. acuminatum* が 10 株、*F. graminearum* が 5 株、*F. poae* が 3 株、*F. sporotrichioides* が 2 株および *F. equiseti* が 1 株であった。アメリカ産およびカナダ産小麦との間に検出された菌種の傾向に違いは無く、産地による検出菌種および優占菌種についての差はみられなかった。

(3)アメリカ産小麦から検出された *Fusarium* 属菌種に関する小麦品種間の差違

アメリカ産小麦の品種別にみたトキシン汚染量および水分活性値、および検出菌種の割合の最大値と最小値を図 9 に示した。DURAM 小麦からは 21 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち最も多く検出されたのは *F. graminearum* で 10 株(48%)であり、*F. acuminatum* が 6 株(28%)、*F. sporotrichioides* が 3 株(14%)、*F. avenaceum* が 1 株(5%)、*F. poae* が 1 株(5%)検出された。DNS

小麦からは 4 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち *F. poae* が 1 株(25%)、*F. graminearum* が 1 株(25%)、*F. avenaceum* が 1 株(25%)、*F. equiseti* が 1 株(25%)検出された。HRS 小麦からは 14 株の *Fusarium* 属菌が検出され、*F. graminearum* が 8 株(57%)、*F. acuminatum* が 5 株(36%)、*F. avenaceum* が 1 株(7%)検出された。SH 小麦からは *F. acuminatum* が 1 株(100%)検出された。SWH 小麦からは 3 株の *Fusarium* 属菌が検出され、*F. graminearum* が 1 株(33%)、*F. acuminatum* が 2 株(67%)検出された。品種が不明の小麦からは 12 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち *F. sporotrichioides* が 3 株(25%)、*F. poae* が 3 株(25%)、*F. acuminatum* が 6 株(50%)検出された。検出された菌種について、品種間の違いはみられなかったが、優占菌種に差がみられた。

各小麦品種から検出された *Fusarium* 属菌分離株を比較した。DURAM 小麦は、*F. sporotrichioides* および *F. poae*、*F. graminearum* が多く検出された。DNS 小麦は、DURAM 小麦から検出された菌種に加え、*F. equiseti* が検出された。HRS 小麦は *F. graminearum* が主に検出された。SH 小麦及び SWH 小麦は、主にマイコトキシンを産生する菌種は検出されなかった。また、HRS 小麦、SH 小麦および SWH 小麦は DURAM 小麦および DNS 小麦と比較して水分活性の値が低い傾向にあった。

(4)カナダ産小麦から検出された *Fusarium* 属菌種に関する小麦品種間の差違

カナダ産小麦の品種別にみたトキシン汚染量および水分活性値の最大値と最小値、および検出菌種の割合を図 10 に示した。CW 小麦からは 7 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち *F. sporotrichioides* が 2 株(22%)、*F. graminearum* が 1 株(11%)、*F. acuminatum* が 3 株(33%)、*F.*

avenaceum が 1 株(11%)であった。DURAM 小麦からは 26 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち *F. sporotrichioides* が 2 株(8%)、*F. poae* が 3 株(11%)、*F. graminearum* が 4 株(15%)、*F. acuminatum* が 8 株(31%)、*F. avenaceum* が 8 株(31%)、*F. equiseti* が 1 株(4%)であった。供試した小麦におけるマイコトキシン検出量を品種間で比較したところ、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンについて DURAM 小麦からの検出量が高い傾向がみられたが、*F. sporotrichioides*、*F. poae*、*F. graminearum* といったトリコテセン系マイコトキシンのタイプ A・B の高産生菌種の検出率に差はなかった。また、カナダ産の DURAM 小麦からは *F. avenaceum* が高率に検出された。

(5) 小麦由来株の T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの産生性

小麦由来の *Fusarium* 属菌分離株のマイコトキシン産生性を表 7 に示した。検出された 6 菌種のうち、*F. sporotrichioides* においてのみ今回測定した T-2 トキシンまたは HT-2 トキシンの産生性がみられ、それらの菌株におけるいずれかのマイコトキシンの産生陽性率を菌種ごとに算出したところ、*F. sporotrichioides* では 89% と高かった。なお小麦からは HT-2 トキシンが検出されたが、これを産生する菌株は検出されなかった。

(6) 国産小豆における *Fusarium* 属菌の検出状況

平成 26 年産の国産小豆 1 検体および白小豆 2 検体における *Fusarium* 属菌陽性粒数を表 8 に示した。各供試検体 100 粒における *Fusarium* 属菌陽性粒数は、北海道産白小豆 26-AD02 では 26 粒、岡山県産白小豆 26-AD03 では 25 粒、北海道産小豆では 2 粒であった。本研究班による平成 25 年度の研究成果から得られた、平成 25 年産の国産小豆における *Fusarium* 属菌陽性粒率を図 11 に示した。ここでは、赤色種皮の小豆 8 検体のうちで最も高い陽性粒率は 5%、白小豆 1

検体の陽性粒率は 9% であった。2 年間の結果を統合し、赤色種皮の小豆 9 検体および白小豆 3 検体の間の *Fusarium* 陽性粒率を比較したところ、白小豆の陽性粒率は赤色種皮の小豆よりも有意に高いことが示された($p < 0.01$)。したがって、白小豆からは *Fusarium* 属菌は高い割合で検出されることが示された。また今年度の白小豆 2 検体から検出された *Fusarium* 属菌を同定した結果を図 12 に示した。2 検体の結果を比較したところ、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシン産生菌として重要な *F. sporotrichioides* は北海道産 26-AD02 からのみ検出され、しかも本検体においては優占菌種(優占率 47%)となっていた。一方で岡山県産 26-AD03 では優占率 97% と大多数が FIESC であり、菌叢が大きく異なることが示された。

(7) 国産小豆由来株の T-2 トキシンおよび ZEN の産生性

本研究班における平成 25 年度の研究において分離された、平成 25 年収穫の小豆由来の *Fusarium* 属菌 27 株について T-2 トキシンおよび ZEN の産生性を、また、今年度の研究において分離された平成 26 年度収穫の小豆由来の *F. sporotrichioides* 11 株について T-2 トキシンの産生性を、それぞれ検討した。その結果(表 10, 11)、平成 25 年度産小豆由来の全ての菌株は T-2 トキシンを産生しなかったが、3 株の FIESC から ZEN の産生性が確認された。一方で、平成 26 年度産小豆由来の *F. sporotrichioides* のうち 8 株(72.7%)で T-2 トキシン産生性が確認された。

D. 考察

本研究の小麦に関する検討において、品種および産地ごとに *Fusarium* 属菌の陽性粒率を比較したところ、DURAM 小麦はアメリカ産・カナダ産に関わらず、真菌および *Fusarium* 属菌に汚染されている傾向が強いことが明らかとなった

(図 7,8)。その理由については未検討であるが、*Fusarium* 属菌およびフザリウムトキシン汚染の程度には小麦品種間で偏りがあることを考慮し、リスク管理を行う必要があると考えられた。

小麦検体から検出されたマイコトキシンの汚染原因菌を推定するため、検体からのマイコトキシン検出量と分離菌種のマイコトキシン産生性を比較した(表 2, 3 および 7)。今回検出された菌株のうち、CW13、UW29、UW18 および UW53 の小麦検体では T-2 トキシンの汚染がみられ、またこれら 4 検体いずれにおいても、分離された *F. sporotrichioides* による T-2 トキシンの産生性が確認された。よって、*F. sporotrichioides* は今回供試した全ての T-2 トキシン汚染小麦の汚染原因菌であった可能性が強く示唆された。また、*F. sporotrichioides* は HT-2 トキシンの産生性も有するという報告がされている³⁾が、本研究では HT-2 トキシンが検出されなかった(表 6)。しかし、トリコテセン系マイコトキシン産生の最適条件は、マイコトキシンの種類、菌種および培養温度によって大きく異なることが報告されている^{18,19)}。DURAM 小麦全粒に *F. sporotrichioides* を接種し、15℃で 7 日間培養すると T-2 トキシンよりも HT-2 トキシンが産生されたという報告がある¹⁸⁾。また、*F. sporotrichioides* におけるマイコトキシン産生最適温度は 10~15℃であるとされ¹⁾、今回の角田培地を用いた培養時の条件である 25℃では、産生性が発揮されなかった可能性がある。本研究において分離された菌株も、培地成分を変更する、または植物体に接種して培養した場合に HT-2 トキシン産生性を発揮する可能性があると考えられた。

本研究の平成 25 年度および今年度の小豆に関する検討の結果から、白小豆は赤色種皮の小豆よりも有意に高い濃度で *Fusarium* 属菌に感染を受けていることが明らかとなった。したがって、感染した *Fusarium* 属菌がカビ毒産生菌種だった場合には、農作物はフザリウムトキシンに汚染

される場合があることから、白小豆は赤色種皮の小豆と比較して、フザリウムトキシン汚染のリスクが高いことが示唆された。

F. sporotrichioides は北ヨーロッパ、北アメリカ、カナダなど平均気温が比較的低い地域でも、植物病原菌として後半に分布する植物病原菌である。実際に、小麦の植物体に菌を接種した実験において、10~30℃と幅広い温度でマイコトキシン産生がされたという報告がある¹⁸⁾。本研究において、アメリカ産・カナダ産の輸入小麦、および国産小豆で T-2 トキシンの汚染原因菌が本菌であることが示唆されたことから、*F. sporotrichioides* の産生するフザリウムトキシンに汚染されるリスクをもつ農作物および地域は、世界中の広範にわたることが考えられた。今後は、より多くの食品を対象に、*Fusarium* 属菌およびフザリウムトキシンの汚染実態を把握し、それらの汚染原因を特定する必要があると考えられた。さらに、*F. sporotrichioides* は、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンだけでなく、これら以外のトリコテセン系マイコトキシンタイプ A やタイプ B、ZEN など様々なフザリウムトキシンを産生することが報告されている³⁾。これらヒトに対して健康危害をもたらす可能性があるフザリウムトキシンについても、汚染実態を把握し、汚染原因菌を特定していく重要性は高いと予想される。

本研究において分離されたその他菌種の菌株については、トリコテセン系マイコトキシンタイプ A および ZEN の産生性を有するとの報告がある *F. equiseti* や *F. graminearum*、*F. acuminatum*³⁾でも、それらトキシンの産生性は確認されなかった(表 7,10)。*F. acuminatum* の中には、T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよび DAS の産生性について、遺伝的にこれらのマイコトキシン産生性の有無が異なる 2 つの系統が存在する²⁾。今回分離された株は、BLAST 検索の結果から産生性を持たない系統に属することが示さ

れた。よって、本研究で分離された *F. acuminatum* 菌株は遺伝的にこれらマイコトキシン産生性を持たない可能性が高く、小麦のマイコトキシン汚染原因とはならないことが考えられた。しかし、本研究で検出された *F. graminearum* および *F. equiseti* の菌株は、マイコトキシン産生に最適な条件にあった場合、小麦のマイコトキシン汚染原因菌になる可能性があることから、引き続き留意が必要である。

また、*Fusarium* 属菌の一部の菌種は圃場菌と呼ばれ、圃場で植物への感染が成立し、その後貯蔵中には菌数がそれほど増加傾向をたどらない菌種がある。反対に、一部の菌種は貯蔵菌と呼ばれ、収穫後、貯蔵環境で植物への感染が成立し、その後増殖が進む菌種がある。*Fusarium* 属菌のなかでも、*F. sporotrichioides* は圃場菌であり、FIESC は貯蔵菌としての性質を持つことが知られる。今回、小豆や小麦から分離される菌種が明らかになったことから、これらの菌の汚染を防ぐためには、菌種ごとの生態的特徴を把握して、栽培から流通の間のいずれのポイントに焦点を当てた対策を行えばよいのか、十分に考慮し、汚染防止に役立てることができると考えられた。

なお、本研究では、平成 25 年度の検討および今年度の検討で供試された小豆および小麦検体の (図 3,表 2,3) 中で、特定のマイコトキシンが検出されたにもかかわらずその汚染原因菌が今回分離されなかった検体が複数見られた。その理由のひとつとして、検体の水分活性値の関与が考えられる。例えば、一般的な小麦の水分活性値 (A_w 0.61~0.64) と比較して、本研究で供試した小麦検体の水分活性値は低い傾向にあった (図 9,10)。輸入食品であるため貯蔵期間が長く乾燥しやすいことから、貯蔵中に水分活性が低下したものと考えられた。*Fusarium* 属菌のような好湿性菌の生存に適した水分活性値は A_w 0.88~1.00 であるとされ、本研究における供試検体の水分活性値程度では、検体に感染していた菌の生存率が

低下していた可能性がある。今後、収穫後、できるだけ早期に検体を真菌分離に供することで、汚染原因菌の特定が出来る可能性が高まると考えられ、検討を進める上でこの点を重要視する必要がある。

E. 結論

フザリウムトキシンに高濃度で汚染されていることが知られる輸入小麦および国産小豆について、フザリウムトキシン汚染の原因菌の特定を目的として、フザリウムトキシンおよび *Fusarium* 属菌の汚染状況、分離株のフザリウムトキシン産生性を同時に検討した。その結果、特にアメリカ・カナダ産 DURAM 小麦および国産白小豆は他品種と比較して *Fusarium* 属菌に汚染されやすい傾向にあることから、マイコトキシン汚染のリスクが高いことが考えられた。また、T-2 トキシン汚染状況と分離された *F. sporotrichioides* の T-2 トキシン産生性が一致したことから、輸入小麦および国産白小豆の T-2 トキシンの汚染原因菌種は本菌であることが示唆された。この他の菌種についても検出株数は多く、フザリウムトキシン産生に最適な条件にある場合、汚染原因菌になり得ると考えられ、引き続き留意が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

- 1) 渡辺麻衣子, 中村和真, 吉成知也, 高橋治男, 石崎直人, 小西良子, 寺嶋 淳. 国内流通小豆および大豆における *Fusarium* 属菌の分布状況. 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会, 金沢. 2014.12.

2) Maiko Watanabe. Natural occurrence of fumonisin B1 in wine and fungal species causing the contamination in Japan. 49th Session of the Joint UJNR Panel on Toxic Microorganisms. New Orleans, U.S.A. 2014.1.

G. 参考文献

- 1) 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.
- 2) P. Marín, A. Moretti, A. Ritieni, et al. (2012) Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. Food Microbiology .31:229-237
- 3) Marasas, W.F.O., Nelson, E.P., T.A Toussoun. (1984) Toxigenic *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press. United States of America.
- 4) 一戸正勝(2002) 異常気象下における麦類赤カビ病とフザリウム毒素類.Mycotoxins Vol.53(1)5-10
- 5) 芳澤宅賽(2003) トリコテセン系マイコトキシンによるヒトの中毒事例. .Mycotoxins Vol.53(2)113-118
- 6) 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.(2015年1月25日アクセス)
<http://www.ffcr.or.jp/Zaidan/mhwinformnsf/ab440e922b7f68e2492565a700176026/0da129a07813d14349256df6000bc432?OpenDocument>
- 7) 農林水産省報告(統計表一覧).平成24年度食料需給表. (2015年1月25日アクセス)
<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/zyukyuu/>
- 8) Y. Lee. (1992) Toxicity and mycotoxin production of *Fusarium* isolates from Korea.

- Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol. No. 36,7-11
- 9) 田中敏嗣,長谷川明彦,山本進,松木幸夫,李雄洙,上野芳夫(1986) *Fusarium* mycotoxins による世界各地の穀類汚染. マイコトキシン.24: 57-59,
 - 10) Y. Sugiura, K. Fukasaku, T. Tanaka, et al. (1993) *Fusarium poae* and *Fusarium crookwellense*, Fungi Responsible for the Natural Occurrence of Nivalenol in Hokkaido. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct:3334-3338
 - 11) 藤沢倫彦,尾上洋一,森實,松崎稔,広武豊,西猛,笠間保一,宮代言恵嗣(1991) An examination of *Fusarium* toxins contamination in wheat, barley, and wheat flours. マイコトキシン.33:37-39
 - 12) 吉成知也(2014) 日本の市販食品におけるデオキシニバレノール, T-2 トキシン, HT-2 トキシン及びゼアラレノンの汚染実態. マイコトキシン 64(1)63-68
 - 13) S. Koizumi, H. Kato, R. Yoshino, et al. (1990) Distribution of Causal Fusaria of Wheat and Barley Scab in Japan. 日植病報 57: 165-173
 - 14) Nelson, E.P., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1984) *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
 - 15) Watanabe, M., Lee,K., Goto,K., et al. (2010) Rapid and Effective DNA Extraction Method with Bead Grinding for a Large Amount of Fungal DNA. Journal of Food Protection. 73:6:1077-1084.
 - 16) 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