

International, Wallingford.

- 17) 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*
- 18) L. Nazari, E. Patteri, V. Terzi, C. Morcia, V. Rossi. (2014) Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides*. *Food*

Microbiology .39:19–26

- 19) M. Watanabe, T. Yonezawa, Y. Sugita-Konishi, Y. Kamata. (2013) Utility of the phylogenetic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin-producing potential. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 30(8):1370-1381

<i>F. graminearum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • DON、NIV(トリコテセン系タイプB)ZENの主な産生菌種 • T-2、HT-2なども産生性を有するという報告がある
<i>F. sporotrichioides</i>	<ul style="list-style-type: none"> • T-2、HT-2(トリコテセン系タイプA)の主な産生菌種 • ZENなども産生性を有するという報告がある
<i>F. poae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • T-2、HT-2(トリコテセン系タイプA)の主な産生菌種 • DON、NIV、ZENなども産生する
<i>F. equiseti</i>	<ul style="list-style-type: none"> • T-2、HT-2(トリコテセン系タイプA)を産生するが頻度は低い • ZENの産生性を有するという報告がある
<i>F. acuminatum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • T-2、HT-2(トリコテセン系タイプA)を産生するが頻度は低い • ZENの産生性の報告はない
<i>F. avenaceum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Moniliforminを産生する • トリコテセン系マイコトキシンとZENの産生性の報告はされていない

図 1. *Fusarium* 属菌種における一般的な毒性

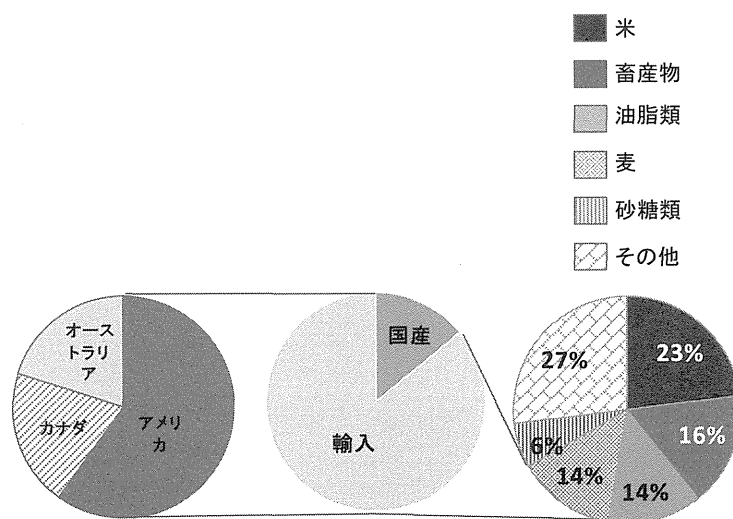


図 2. わが国の食料消費と小麦の生産地割合

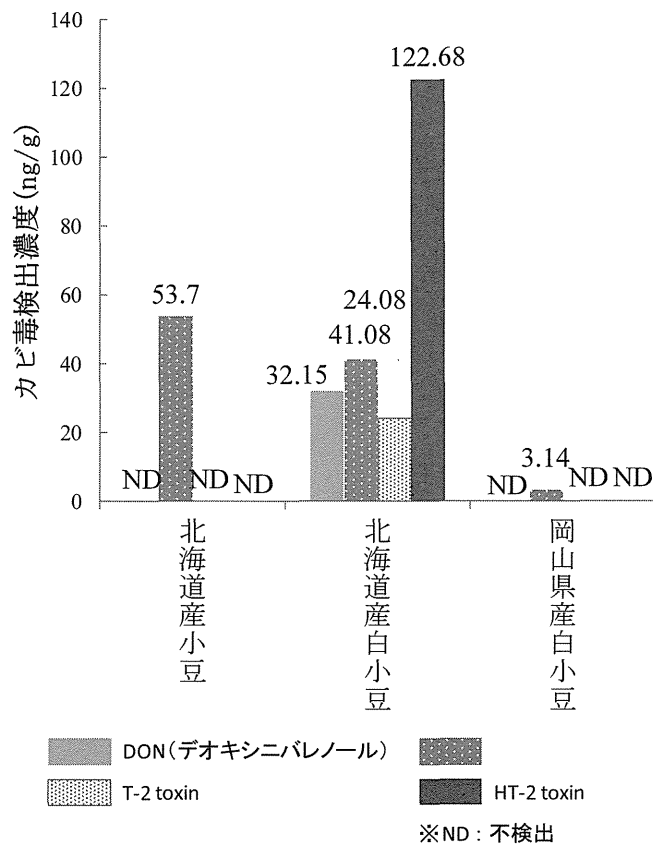


図 3. 供試した小豆のカビ毒汚染状況

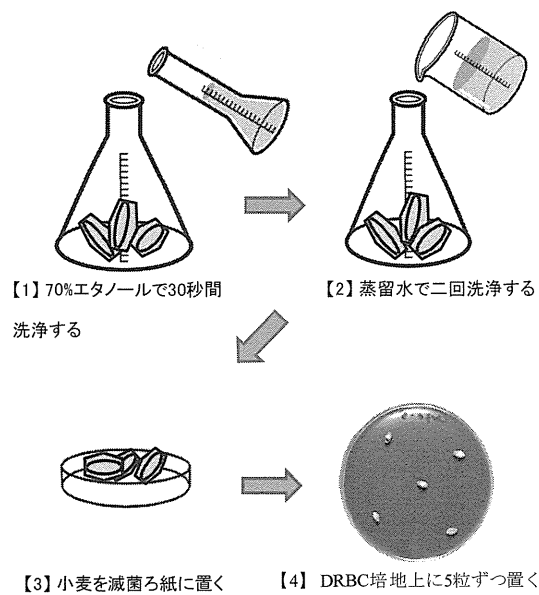
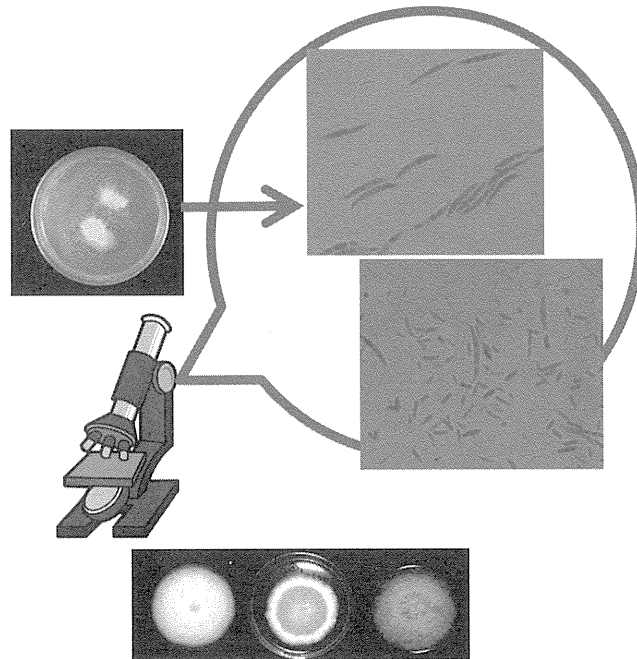


図 4. 食品からの真菌分離方法

【1】CLA培地上に形成された分生子の形態観察

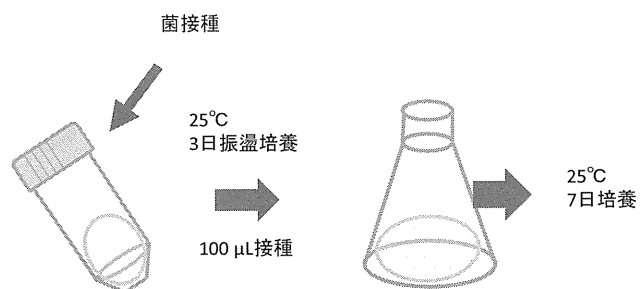


【2】PDA培地上に形成された巨大集落の形態観察



【3】βチューブリン遺伝子の塩基配列を決定し、系統解析を行い、既知の配列との系統関係を参照

図 5. *Fusarium* 属菌の同定方法



【1】抗生物質(クロラムフェニコール (100 mg/L) 入り液体培地を用いて前培養を行う

【2】液体培地100mlを用いて本培養を行う

培地組成(1L)	
硝酸ナトリウム	2 g
リン酸水素二カリウム	1 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 g
スクロース	50 g

図 6. 培養によるマイコトキシン産生性の検討法

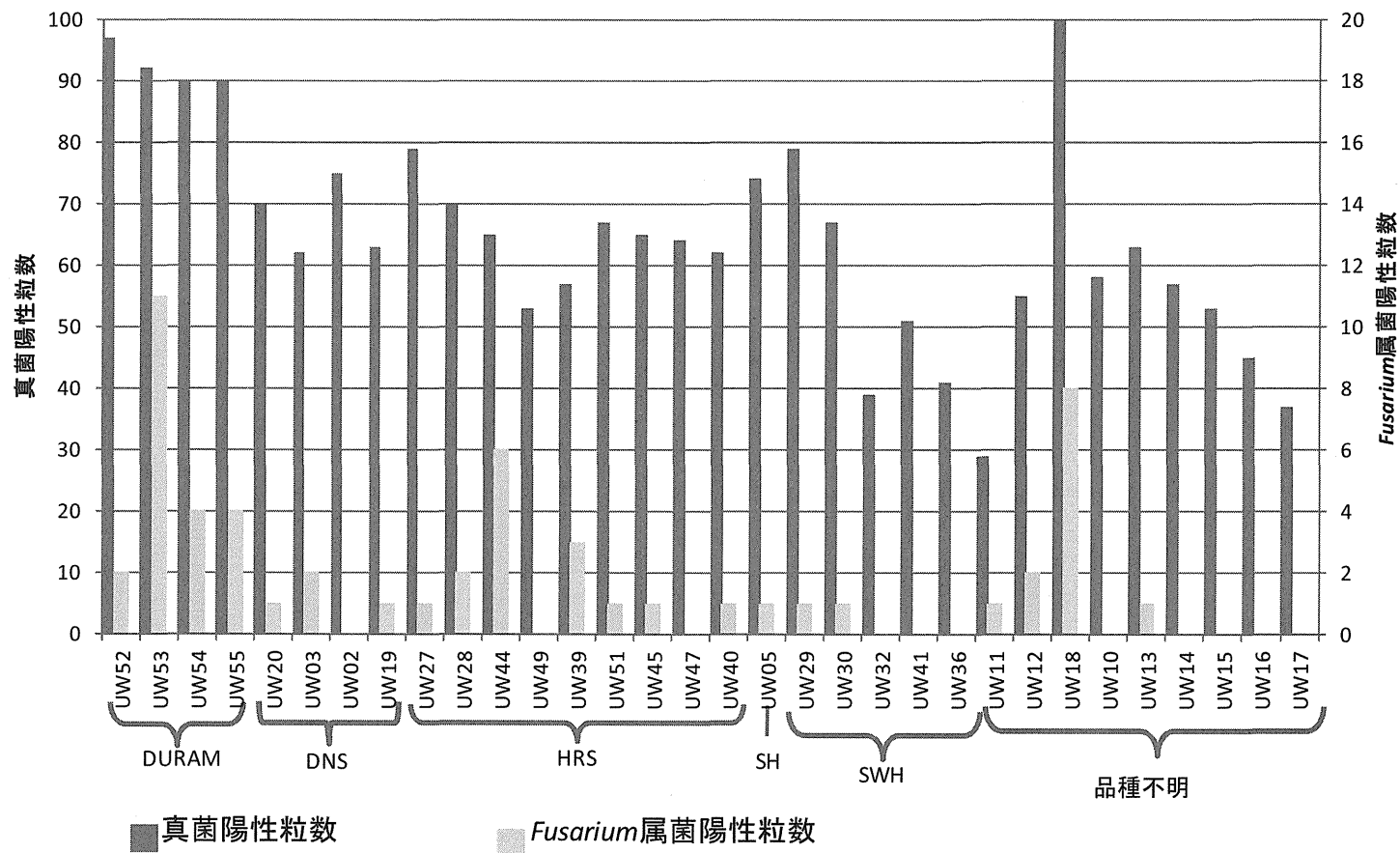


図7. アメリカ産小麦の真菌陽性粒数とFusarium属菌陽性粒数

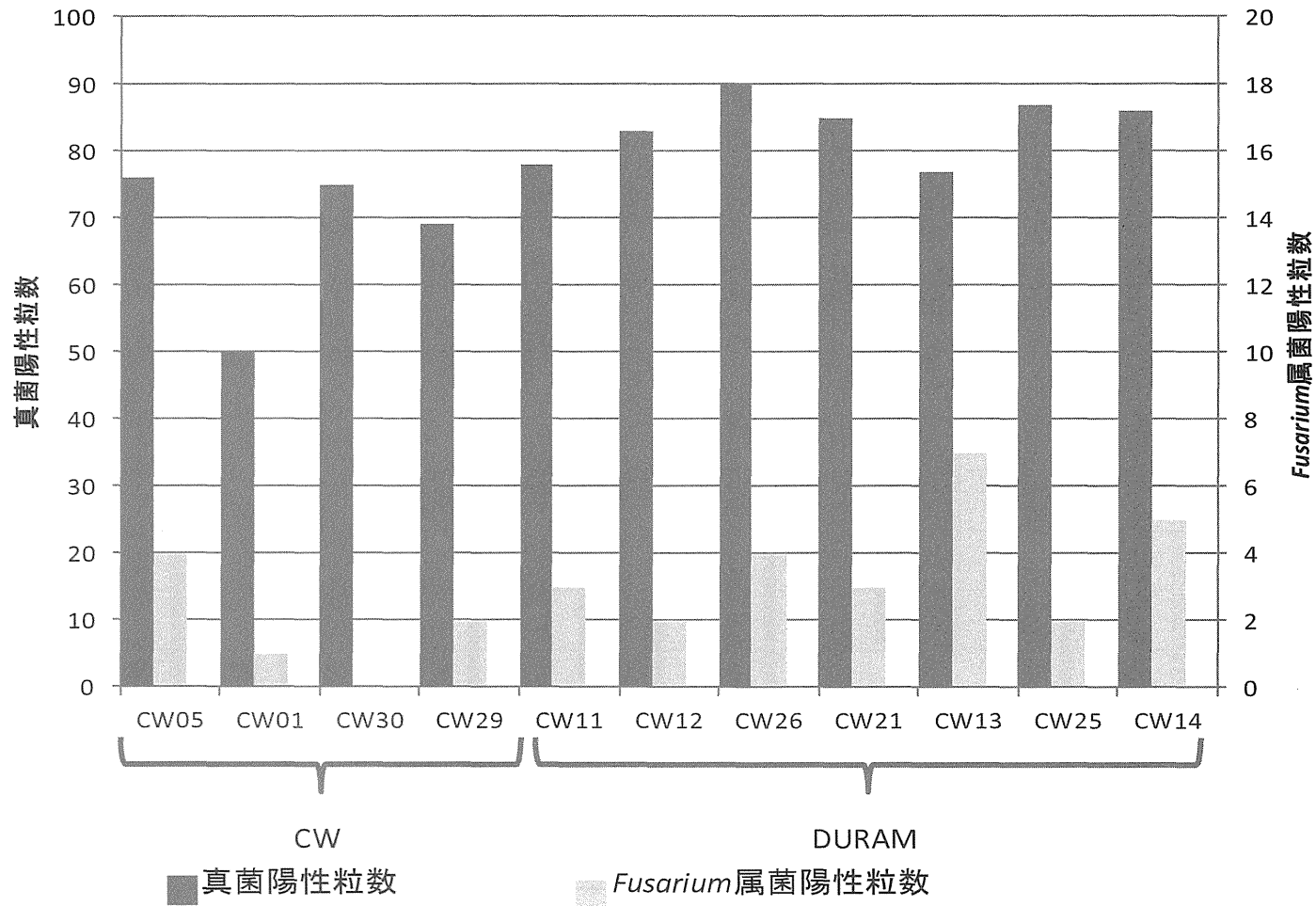
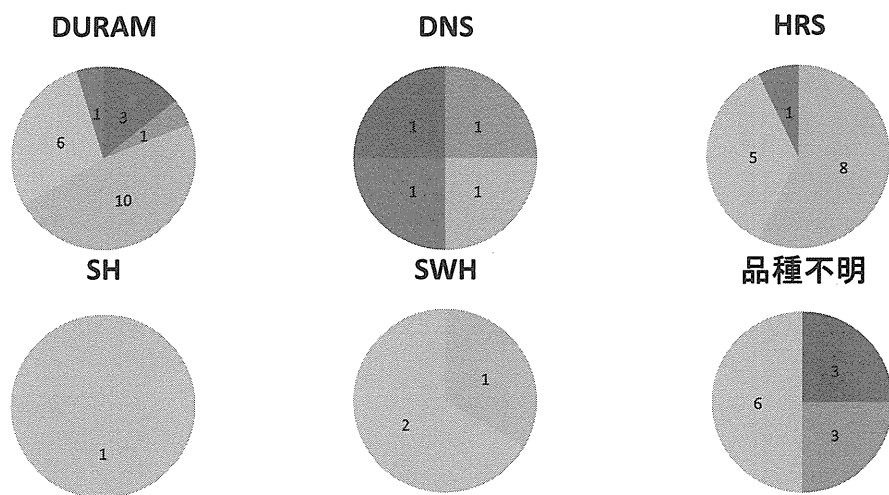
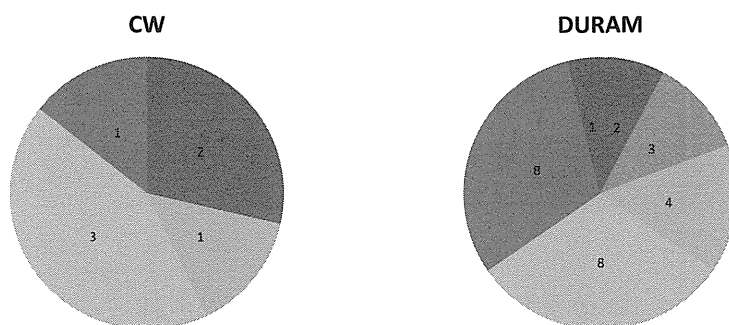


図8. カナダ産小麦の真菌陽性粒数とFusarium属菌陽性粒数



	DON		T-2		HT-2		ZEN		AW	
	最大値	最小値	最大値	最小値	最大値	最小値	最大値	最小値	最大値	最小値
DURAM	541	207	8.0	0.6	62	3.5	1.8	ND	0.68	0.56
DNS	424	224	0.4	ND	3.7	0.7	9.4	ND	0.60	0.56
HRS	819	88	0.7	ND	3.8	0.6	3.1	ND	0.58	0.49
SH	40	---	ND	---	2.0	---	ND	---	0.47	---
SWH	203	5.5	0.8	ND	7.4	ND	0.7	ND	0.56	0.49
品種不明	392	3.6	1.6	ND	7.7	ND	5.2	ND	0.59	0.44

図9. アメリカ産小麦品種別にみたトキシシン汚染量、水分活性値、および検出菌種の割合



■ *F. sportrichioides* ■ *F. poae* ■ *F. graminearum* ■ *F. acuminatum* ■ *F. avenaceum* ■ *F. equiseti*

	DON		T-2		HT-2		ZEN		AW	
	最大値	最小値	最大値	最小値	最大値	最小値	最大値	最小値	最大値	最小値
DURAM	519	94	2.4	ND	17.2	1.5	ND	ND	0.69	0.43
CW	196	57.1	1.0	ND	9.8	3.1	ND	ND	0.69	0.54

図10. カナダ産小麦品種別にみたトキシシン汚染量、水分活性値、および検出菌種の割合

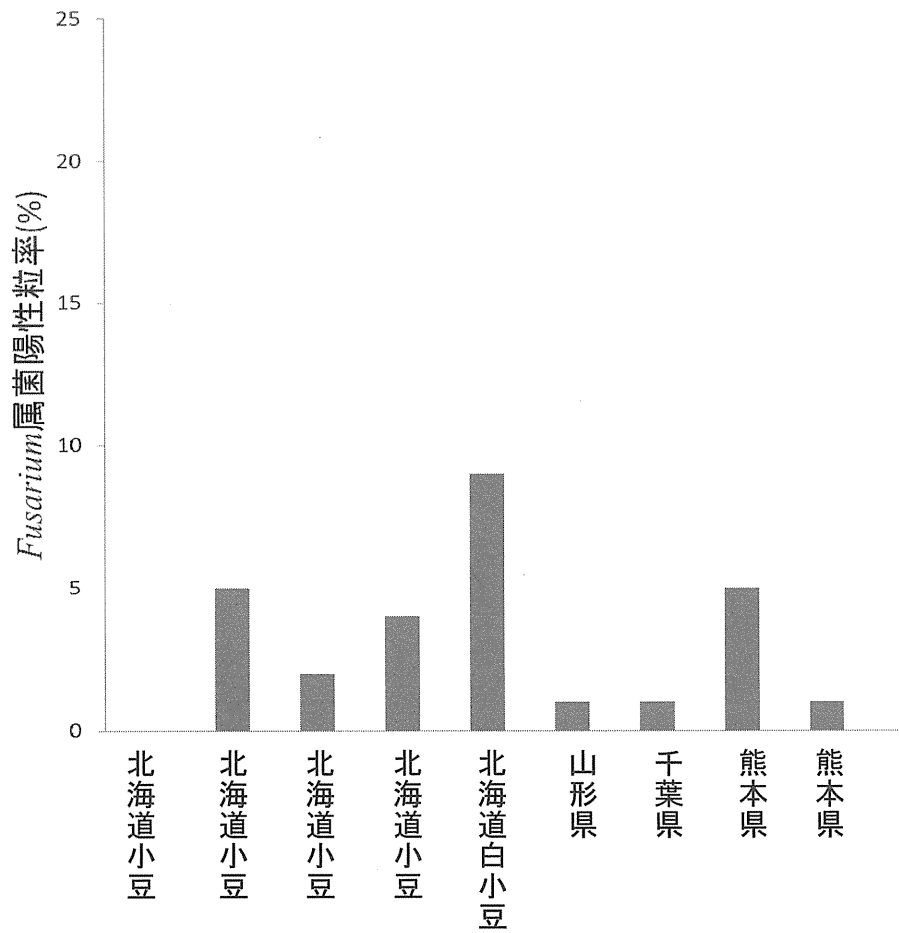
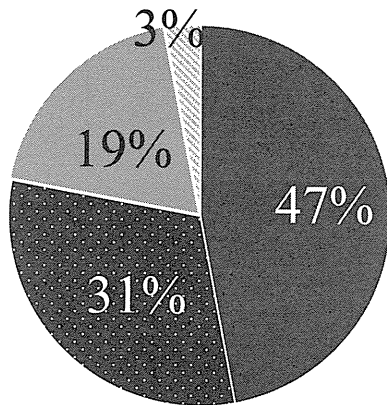
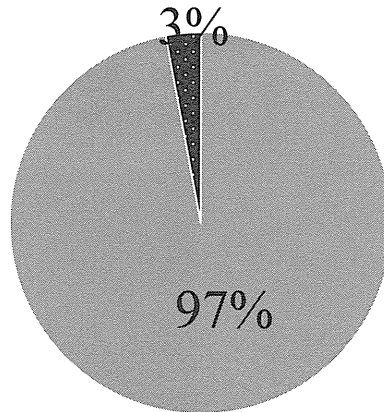


図 11. 平成 25 年度の検討における赤色種皮の小豆および白小豆の *Fusarium* 属菌陽性粒率

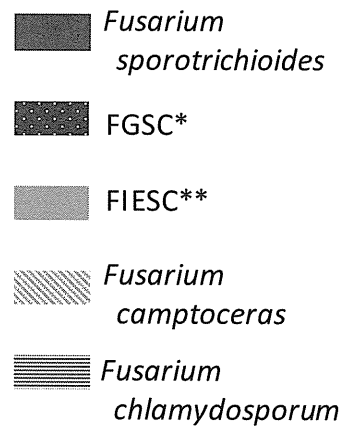
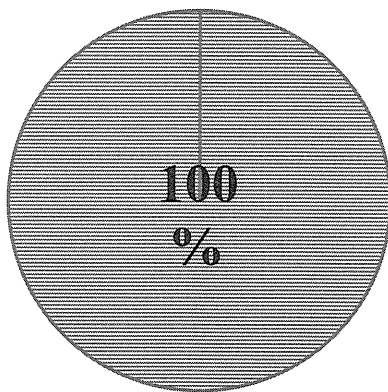
A) 北海道産白小豆



B) 岡山県産白小豆



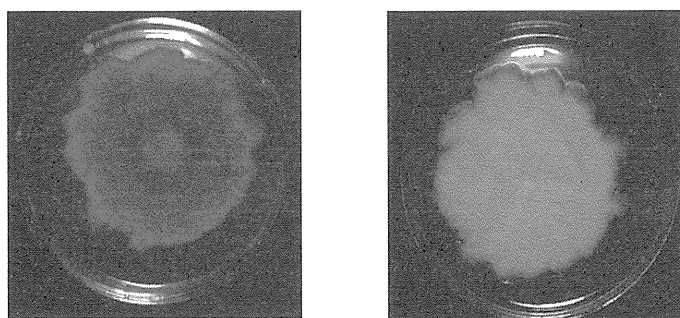
C) 北海道産小豆



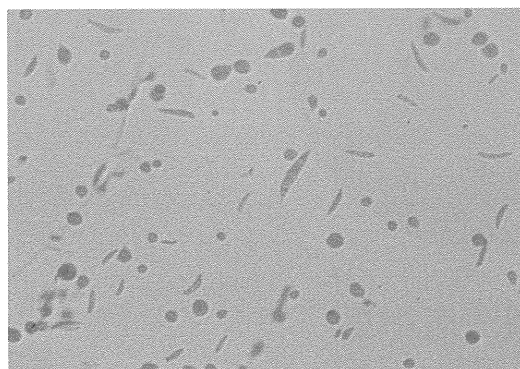
**F. graminearum* species-complex
(O'Donnell, et al. Fungal Genet. Biol. 2004 , 41:600-623)

***F. incarnatum/equiseti* species-complex
(O'Donnell, et al. J. Clin. Microbiol. 2009 , 47:3851-3861)

図12. 平成26年度産国産小豆から検出された *Fusarium* 属菌の割合



A) 裏面 B) 表面
PDA平板培地上の集落像(25℃・7日間培養)



C) 生物顕微鏡像

図13. 検出された*Fusarium sporotrichioides*の観察像

表1. 各産地における供試検体の品種と検体数

産地	小麦品種	検体数
アメリカ	DURAM	4
	DNS	4
	HRS	9
	SH	1
	SWH	5
	品種不明	9
カナダ	CW	4
	DURAM	7

表2. アメリカ産供試検体およびそのマイコトキシン
検出量(ppb)

品種	検体番号	T-2	HT-2	ZEN
DURAM	UW52	3.4	30.5	1.8
	UW53	8.0	62.4	ND**
	UW54	0.6	3.5	ND
	UW55	3.2	19.5	ND
DNS	UW20	0.4	3.7	9.4
	UW03	ND	0.9	ND
	UW02	ND	0.8	1.0
	UW19	ND	2.3	ND
HRS	UW27	ND	1.6	ND
	UW28	0.4	3.5	3.1
	UW44	0.3	0.7	ND
	UW49	ND	1.3	ND
	UW39	0.2	2.0	ND
	UW51	ND	1.5	ND
	UW45	ND	0.6	ND
	UW47	ND	1.2	ND
	UW40	0.7	3.9	ND
SH	UW05	ND	2.0	ND
SWH	UW29	0.8	7.4	0.7
	UW30	0.2	2.3	ND
	UW32	ND	ND	ND
	UW41	ND	ND	ND
	UW36	ND	ND	ND
品種不明	UW11	ND	ND	ND
	UW12	ND	ND	ND
	UW18	1.6	7.7	5.2
	UW10	ND	ND	ND
	UW13	ND	4.1	0.2
	UW14	ND	1.0	ND
	UW15	ND	0.8	ND
	UW16	ND	ND	ND
	UW17	ND	ND	ND

表3. カナダ産供試検体およびそのマイコトキシン
検出量(ppb)

品種	検体番号	T-2	HT-2	ZEN
CW	CW05	ND	3.1	ND
	CW01	0.3	6.5	ND
	CW30	1.0	9.8	ND
	CW29	0.3	3.1	ND
DURAM	CW11	2.1	15.2	ND
	CW12	2.4	15.9	ND
	CW26	1.4	17.2	ND
	CW21	0.3	1.5	ND
	CW13	0.3	1.9	ND
	CW25	0.3	3.1	ND
	CW14	ND	2.9	ND

表4. 平成25年産の国産小豆から検出された*Fusarium*属菌一覧

豆種類	産地	検体No.	検出された <i>Fusarium</i> 属菌
小豆	北海道	25-AD13	不検出
	北海道	25-AD14	FIESC(4株) <i>F. oxysporum</i> (1株)
	北海道	25-AD16	<i>F. verticillioides</i> (1株) <i>Fusarium</i> sp. (1株)
	北海道	25-AD18	<i>F. oxysporum</i> (2株) <i>F. avenaceum</i> (1株) <i>F. camptoceras</i> (1株)
	北海道	25-AD19	<i>F. oxysporum</i> (4株) FIESC(4株) <i>Fusarium</i> sp. (1株)
	山形県	25-AD9	FIESC(1株)
	千葉県	25-AD21	FIESC(1株)
熊本県	25-AD10	FIESC(1株)	
熊本県	25-AD22	FIESC(1株)	

表5. アメリカ産小麦から検出された*Fusarium*属菌の同定結果

小麦検体番号	菌種
UW52	<i>F. acuminatum</i> 2株
UW53	<i>F. graminearum</i> 9株
	<i>F. sporotrichioides</i>
	<i>F. poae</i>
UW54	<i>F. sporotrichioides</i>
	<i>F. acuminatum</i> 3株
UW55	<i>F. graminearum</i>
	<i>F. acuminatum</i>
	<i>F. avenaceum</i>
	<i>F. sporotrichioides</i>
UW20	<i>F. poae</i>
UW03	<i>F. avenaceum</i>
	<i>F. poae</i>
UW19	<i>F. graminearum</i>
UW27	<i>F. equiseti</i>
UW28	<i>F. graminearum</i>
	<i>F. acuminatum</i>
UW44	<i>F. graminearum</i> 2株
	<i>F. acuminatum</i> 4株
UW39	<i>F. graminearum</i>
	<i>F. acuminatum</i>
	<i>F. avenaceum</i>
UW51	<i>F. graminearum</i>
UW45	<i>F. graminearum</i>
UW40	<i>F. acuminatum</i>
UW05	<i>F. acuminatum</i>
UW29	<i>F. acuminatum</i>
UW30	<i>F. graminearum</i>
UW32	<i>F. graminearum</i>
UW12	<i>F. poae</i>
UW18	<i>F. poae</i> 2株
UW10	<i>F. sporotrichioides</i> 2株
	<i>F. acuminatum</i> 6株
UW14	<i>F. sporotrichioides</i>

表6. カナダ産小麦から検出された*Fusarium*属菌の同定結果

小麦検体番号	菌種
CW05	<i>F. graminearum</i> 1株 <i>F. acuminatum</i> 1株 <i>F. avenaceum</i> 1株 <i>F. sporotrichioides</i> 1株
CW01	<i>F. acuminatum</i> 1株
CW29	<i>F. sporotrichioides</i> 1株 <i>F. acuminatum</i> 1株
CW11	<i>F. graminearum</i> 1株 <i>F. acuminatum</i> 2株
CW12	<i>F. acuminatum</i> 2株
CW26	<i>F. graminearum</i> 2株 <i>F. acuminatum</i> 1株 <i>F. poae</i> 1株
CW21	<i>F. equiseti</i> 1株 <i>F. acuminatum</i> 1株 <i>F. avenaceum</i> 1株
CW13	<i>F. graminearum</i> 1株 <i>F. sporotrichioides</i> 2株 <i>F. poae</i> 1株 <i>F. acuminatum</i> 1株 <i>F. avenaceum</i> 2株
CW25	<i>F. avenaceum</i> 2株
CW14	<i>F. poae</i> 1株 <i>F. acuminatum</i> 1株 <i>F. avenaceum</i> 3株

表7. 小麦由来の*Fusarium*属分離株のマイコトキシン産生性

A) マイコトキシン産生性が確認された菌株とその詳細

同定結果	由来	小麦品種	マイコトキシン	
			T-2	HT-2
<i>F. sporotrichioides</i>	UW29	SWH	+	N.D
	UW53	DURAM	+	N.D
	UW53	DURAM	+	N.D
	UW13	品種不明	+	N.D
	UW18	品種不明	+	N.D
	UW18	品種不明	+	N.D
<i>F. sporotrichioides</i>	CW13	DURAM	+	N.D
	CW13	DURAM	+	N.D

B) 菌種別にみたT-2トキシン産生株率の比較

菌種	産生株率(産生菌/検出株数)
<i>F. poae</i>	0%
<i>F. sporotrichioides</i>	89%
<i>F. graminearum</i>	0%
<i>F. acuminatum</i>	0%
<i>F. avenaceum</i>	0%
<i>F. equiseti</i>	0%

表8. 平成26年度産国産小豆における*Fusarium*属菌陽性粒率一覽

食品種類	検体No.	食品産地	供試粒数	陽性粒率
小豆	26-AD01	北海道産	100	2%
白小豆	26-AD02	北海道産	100	26%
	26-AD03	岡山県産	100	25%

表9. 平成26年度産国産小豆における*Fusarium*属菌陽性粒率一覽

食品種類	検体番号	食品産地	供試粒数	陽性粒率
小豆	26-AD01	北海道産	100	2%
白小豆	26-AD02	北海道産	100	26%
	26-AD03	岡山県産	100	25%

表10. 国産小豆由来*Fusarium*属菌のフザリウムトキシン産生性

豆種類	検体 産地	検体No.	検出された <i>Fusarium</i> 属菌	フザリウムトキシン	
				ZEN	T-2
		25-AD13	不検出		
		25-AD14	FIESC	+	-
			<i>F. oxysporum</i>	-	-
小豆	北海道	25-AD16	<i>F. verticillioides</i>	-	-
			<i>Fusarium</i> sp.	-	-
		25-AD18	<i>F. oxysporum</i>	-	-
			<i>F. avenaceum</i>	-	-
			<i>F. camptoceras</i>	-	-
			<i>F. oxysporum</i>	-	-
白小豆	北海道	25-AD19	FIESC	+	-
			<i>Fusarium</i> sp.	-	-
小豆	山形県	25-AD9	FIESC	-	-
	千葉県	25-AD21	FIESC	-	-
	熊本県	25-AD10	FIESC	-	-
	熊本県	25-AD22	FIESC	-	-

表11. 平成26年度産国産小豆由来の*Fusarium sporotrichioides*におけるT-2トキシン産生性

豆種類	検体産地 検体No.	菌株No.	T-2トキシン (ppb)
		NF 014	30
		NF 015	1932
		NF 016	7308
		NF 022	-
		NF 032	1451
白小豆	北海道 26AD-02	NF 034	720
		NF 042	98
		NF 048	8720
		NF 119	402
		NF 120	-
		NF 132	51

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

研究分担者 渋谷 淳
(東京農工大学農学研究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 年度の研究ではマウスにおける T-2 トキシンの発達期曝露 (1、3、9 ppm) により、離乳時の児動物海馬歯状回において type-2 前駆細胞を標的としたニューロン新生障害が 3 ppm から認められたため、平成 26 年度はその毒性メカニズムと標的を免疫染色及び遺伝子発現解析により検討した。その結果、9 ppm の海馬顆粒細胞層下帯 (SGZ) では type-2 前駆細胞に加えて type-1 幹細胞が減少しており、酸化ストレス上昇、幹細胞因子減少、グルタミン作動性入力及びコリン作動性入力減少といった複数の機序によりこれらの分化段階の異なる顆粒細胞のアポトーシスが誘導されたと考えられた。ニューロン新生障害は生後 77 日目では回復がみられた。児動物の無毒性量は胸腺及びニューロン新生への影響が 3 ppm で見られたことから 1 ppm と判断された。平成 26 年度の評価対象として、遺伝毒性を示すことが知られているアフラトキシン (AF) M₁ を選択し、ラットを用いて発達期神経毒性影響を検討した。妊娠 SD ラットを用いて妊娠 6 日目から離乳時 (生後 21 日目) まで AFB₁ を母動物に対して混餌投与 (0.1、0.3、1.0 ppm) することにより、経胎盤・経乳的に AFM₁ を児動物に曝露し、離乳時と生後 77 日目における影響について解析した。母動物では 1.0 ppm で肝臓の重量増加及び *Cyp1a2* 遺伝子発現増加がみられた。雄児動物は出生後 14 日目に 1.0 ppm で一時的な体重低値を示した。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、SGZ では type-3 前駆細胞が 0.3 ppm から減少し、1.0 ppm では細胞増殖活性の低下がみられた。一方、歯状回門部ではアセチルコリンレセプター CHRNA7 を発現する細胞の減少が 0.3 ppm から認められた。いずれの変化も出生後 77 日目に回復した。AFM₁ の発達期曝露により歯状回門からの神経伝達物質による入力が増加した結果、SGZ におけるニューロン新生が障害されたものと考えられた。

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曝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、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、マウスを用いた発達期曝露実験 (0、1、3、9 ppm、妊娠 6 日目から出生後 21 日目まで投与) を行った。その結果、離乳時の児動物海馬歯状回において type-2 前駆細胞を標的としたニューロン新生障害が見出された。平成 26 年度はその障害メカニズムを明らかにするために免疫染色及び遺伝子発現解析を実施した。また、遺伝毒性を有するかび毒であり、乳中に移行することが知られているアフラトキシン (AF) M₁ について、ラットを用いて発達期神経毒性影響を検討した。母動物に AFB₁ を混餌投与することにより、妊

娠 6 日目から出生後 21 日目 (離乳時) まで経胎盤、経乳的に AFM₁ を児動物に対して曝露し、曝露終了時ならびに出生後 77 日目にニューロン新生に対する影響を検討した。

B. 研究方法

<T-2 トキシンのマウスにおける発達期曝露影響評価>

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 13 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 日目から分娩後 21 日目まで混餌投与した。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。T-2 トキシンの乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 12 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、T-2 トキシンの濃度を HPLC 法により測定した (日本食品分析センター)。本実験では出生後 4 日目に間引きを行い、各母動物 (n=9 または 10) 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、体重及び摂餌量を 2 回/週、摂水量を 1 回/週の頻度で測定した。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 日目 (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 CO₂/O₂ 麻酔下で 4% paraformaldehyde (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 CO₂/O₂ 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。残り半数の児動物は出生後 77 日目