

Fig 2. Production areas of adzuki beans tested in this study.

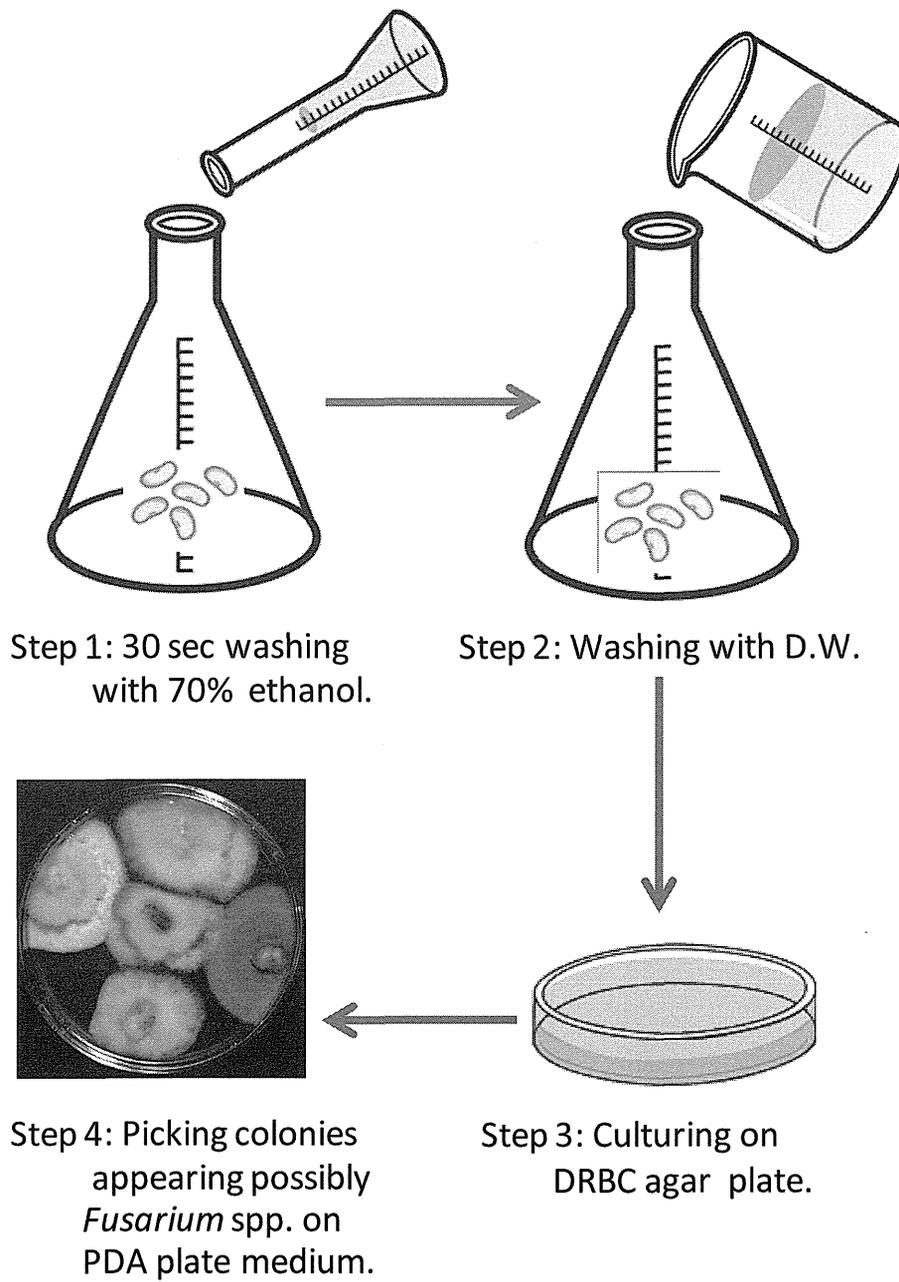


Fig 3. Flow diagram of isolation methods for *Fusarium* spp. from adzuki beans.

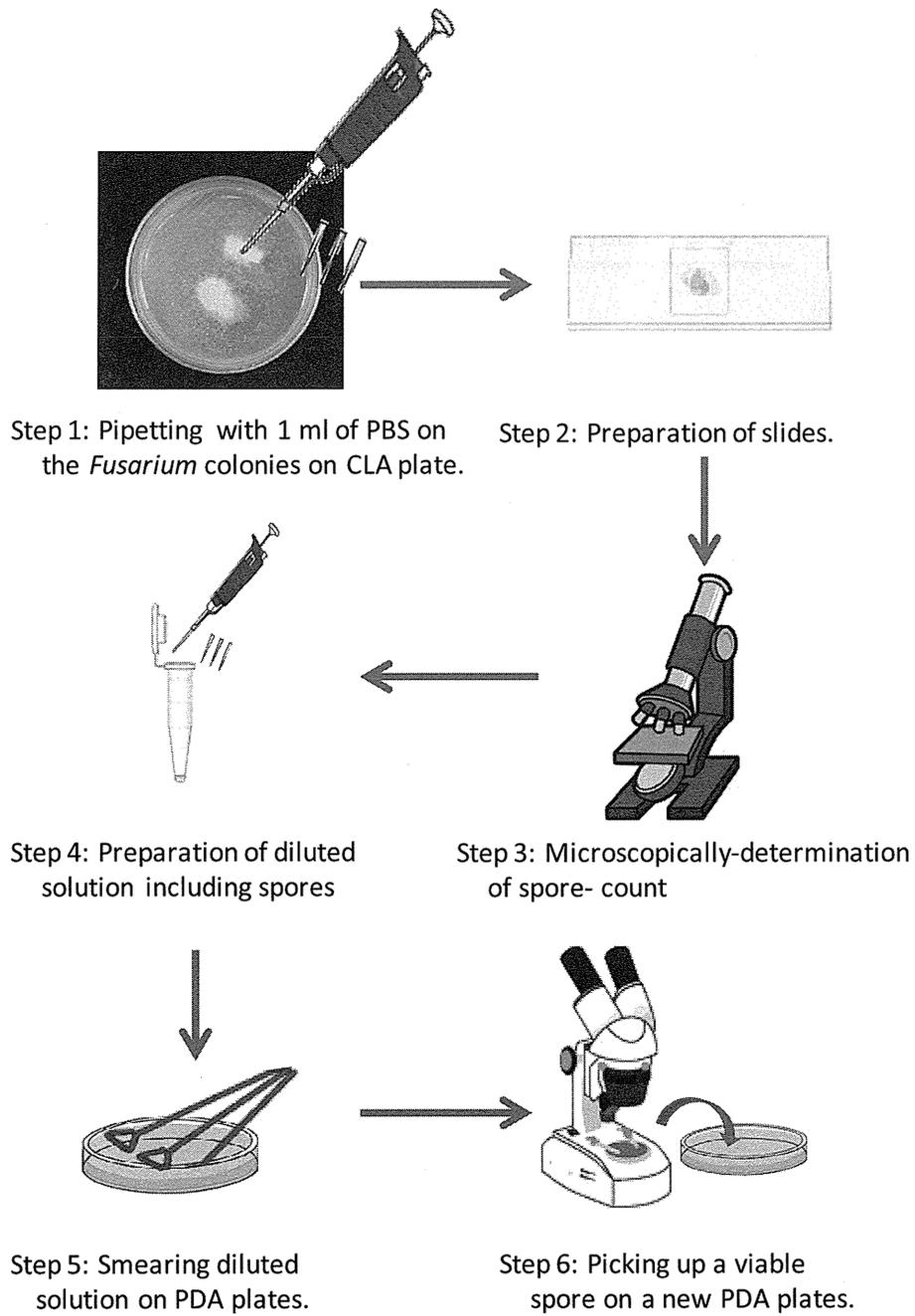
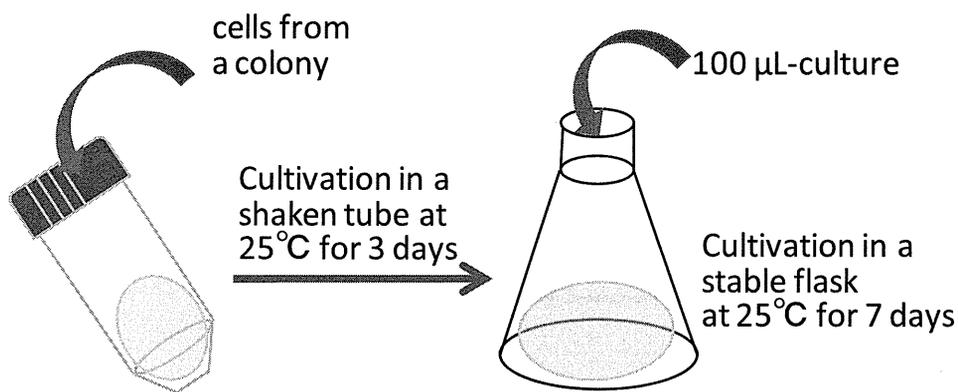


Fig 4. Flow diagram of methods for single spore isolation



Step 1: Pre-culture in Tsunoda-liquid medium with chloramphenicol (100 mg/L)

Step 2: Main culture in 100 ml of Tsunoda-liquid medium without chloramphenicol

The composition of Tsunoda-liquid medium/L;  
 sodium nitrate 2 g  
 dipotassium hydrogenphosphate 1 g  
 potassium chloride 0.5 g  
 magnesium sulfate 0.5 g  
 yeast extract 2.5 g  
 polypeptone 5 g  
 glucrose 50 g

LC conditions	Models	Agilent 1200 series
	Column	InertSustain C18 150 mm × 2.1 mm i.d., 3 µm
	Column temperature	40 °C
	Mobile phase	A 10 mM Ammonium acetate B Acetonitrile
	Separation condition	0Minute A : B = 90 : 10 40Minute A : B = 18 : 82
	Flow rate	0.2 mL/Minute
	Injection volume	2 µL
MS conditions	Models	Agilent 6530 Q-TOF
	Ion source	ESI Agilent Jet Stream
	Gas temperature	325 °C, drying gas
	Gas flow rate	10 L/Minute
	Nebulizer pressure	30 psi
	Nebulizer voltage	3500 V
	Range of detection	m/z 70~950
Ion mode	positive	

Step 3: Analytical conditions of LC-TOF/MS

Fig5. Culture method of detection assay for mycotoxin-productivity.

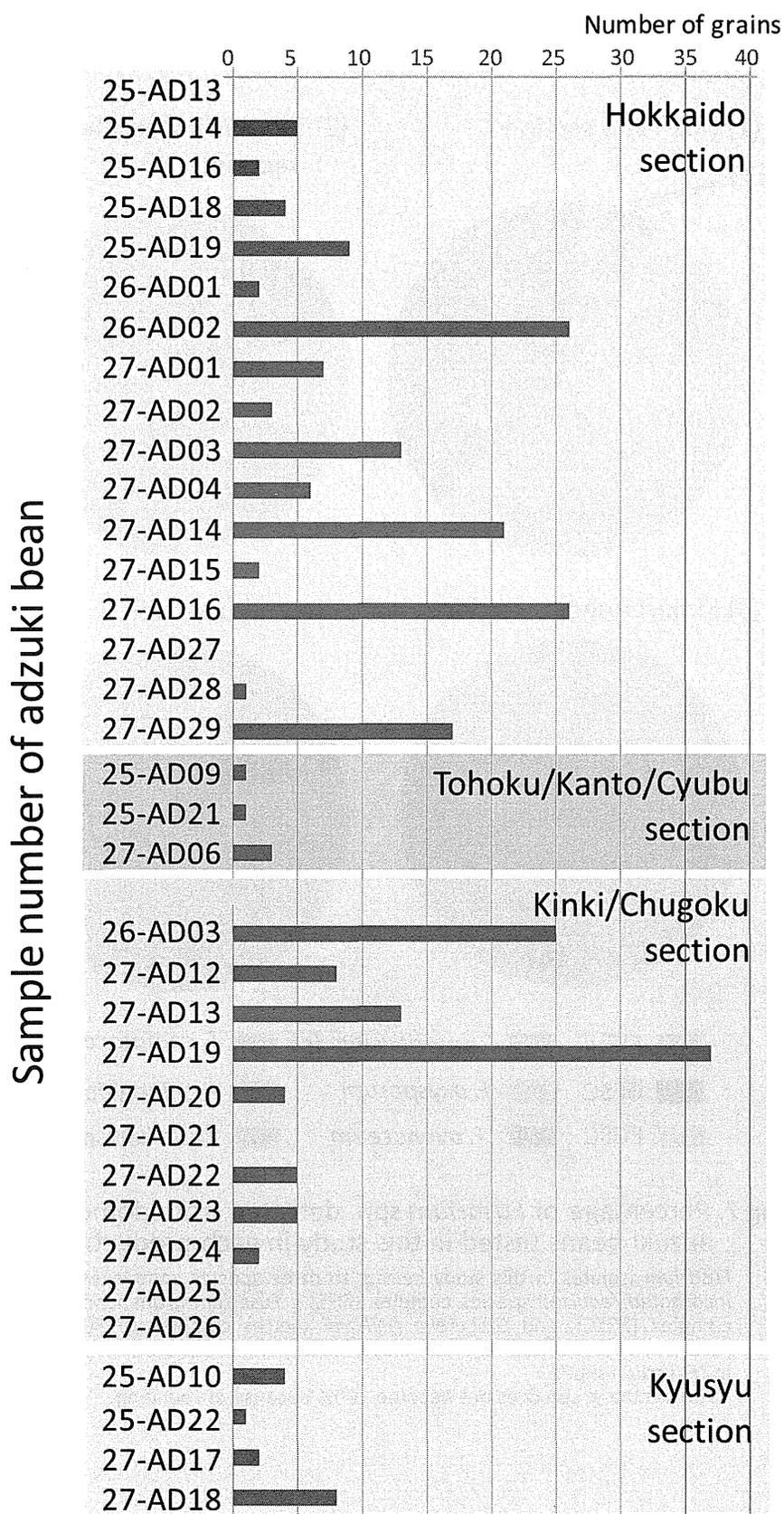


Fig 6. Positive numbers of *Fusarium*-contaminated grains in each samples of domestic adzuki beans

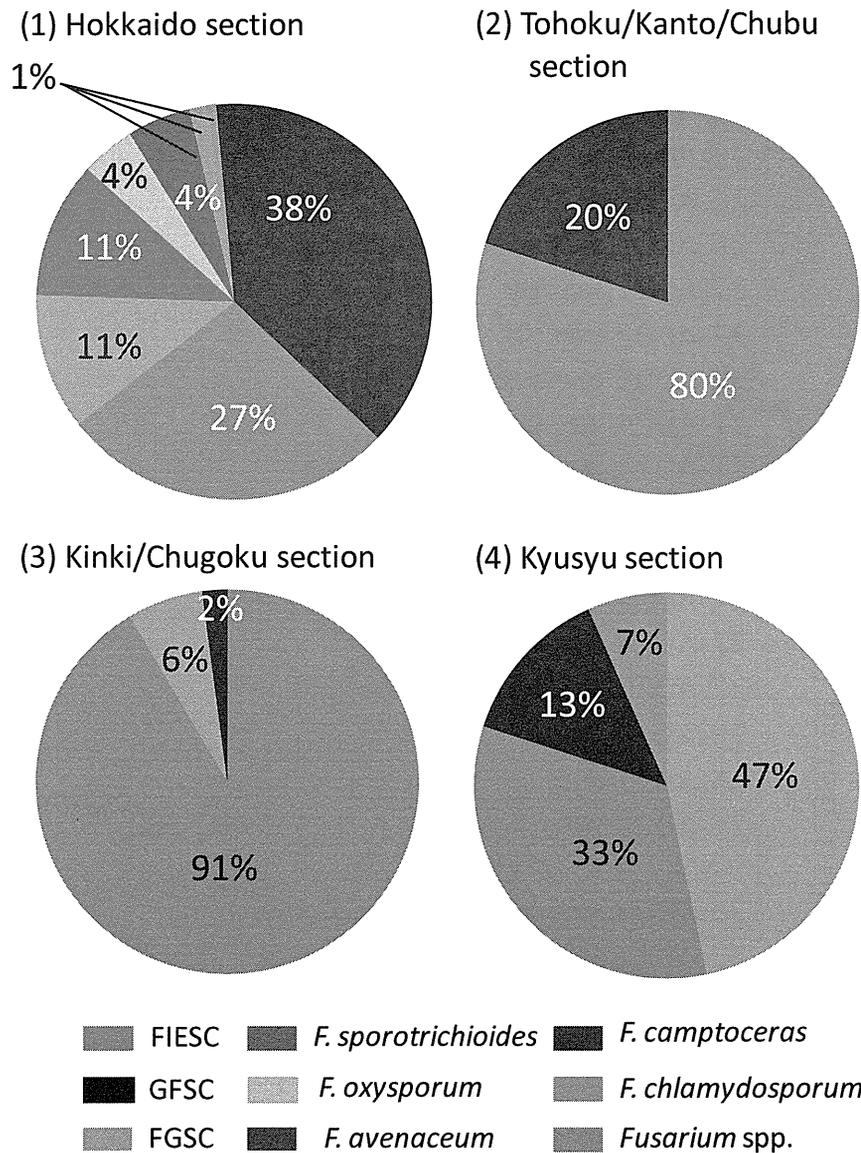
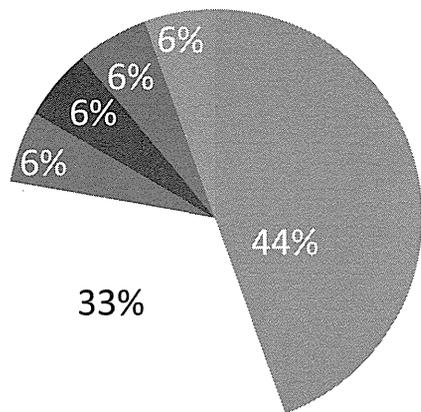


Fig 7. Percentage of *Fusarium* spp. detected from domestic adzuki beans tested in this study in each production area.

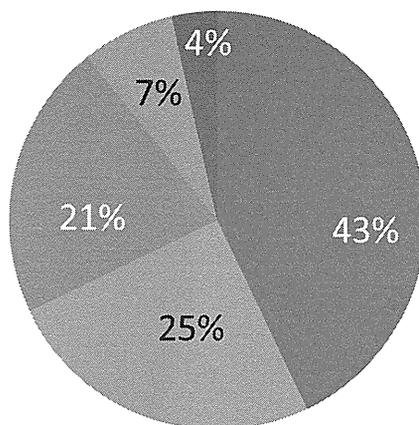
*Fusarium* isolates in this study belong to three species complexes; *Fusarium incarnatum/equiseti* species complex (FIESC), *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), and *Gibberella fujikuroi* species complex (GFSC), and five *Fusarium* species. *Fusarium* isolates not-identified in this study were grouped in "*Fusarium* spp."

Ratio has the graph does not become 100% because of rounding.

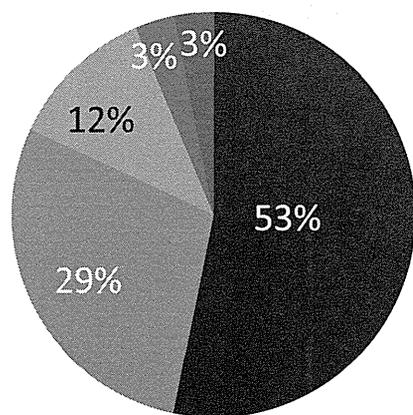
(1) 2012



(2) 2013



(2) 2014



- FIESC
- GFSC
- FGSC
- *F. sporotrichioides*
- *F. oxysporum*
- *F. avenaceum*
- *F. camptoceras*
- *F. chlamydosporum*
- *Fusarium* spp.

Fig 8. Percentage of *Fusarium* spp. detected from domestic adzuki beans harvested in 2012-2014 tested in this study.

*Fusarium* isolates in this study belong to three species complexes; *Fusarium incarnatum/equiseti* species complex (FIESC), *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), and *Gibberella fujikuroi* species complex (GFSC), and five *Fusarium* species. *Fusarium* isolates not-identified in this study were grouped in "*Fusarium* spp."

Ratio has the graph does not become 100% because of rounding.

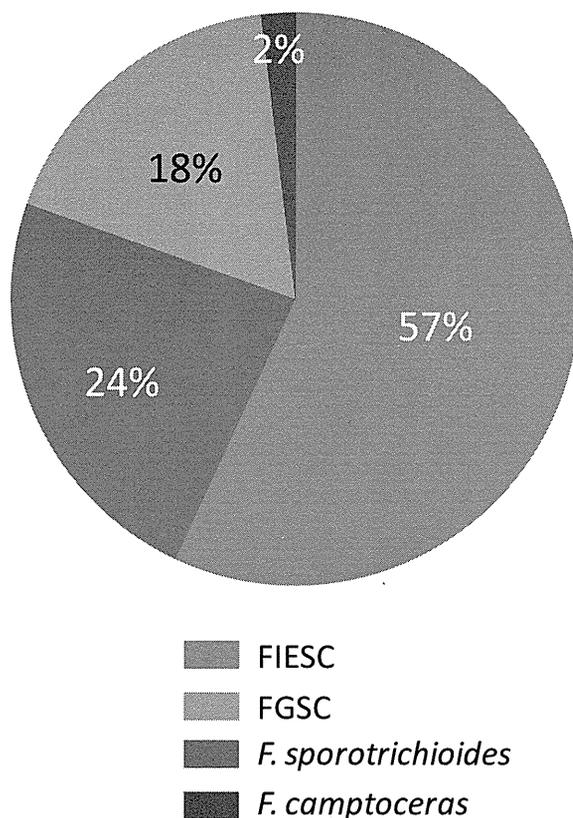


Fig9. Percentage of *Fusarium* spp. detected in domestic white adzuki beans tested in this study.

*Fusarium* isolates detected from samples of white adzuki in this study belong to two species complexes; *Fusarium incarnatum/equiseti* species complex (FIESC) and *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), and two *Fusarium* species. Ratio has the graph does not become 100% because of rounding.

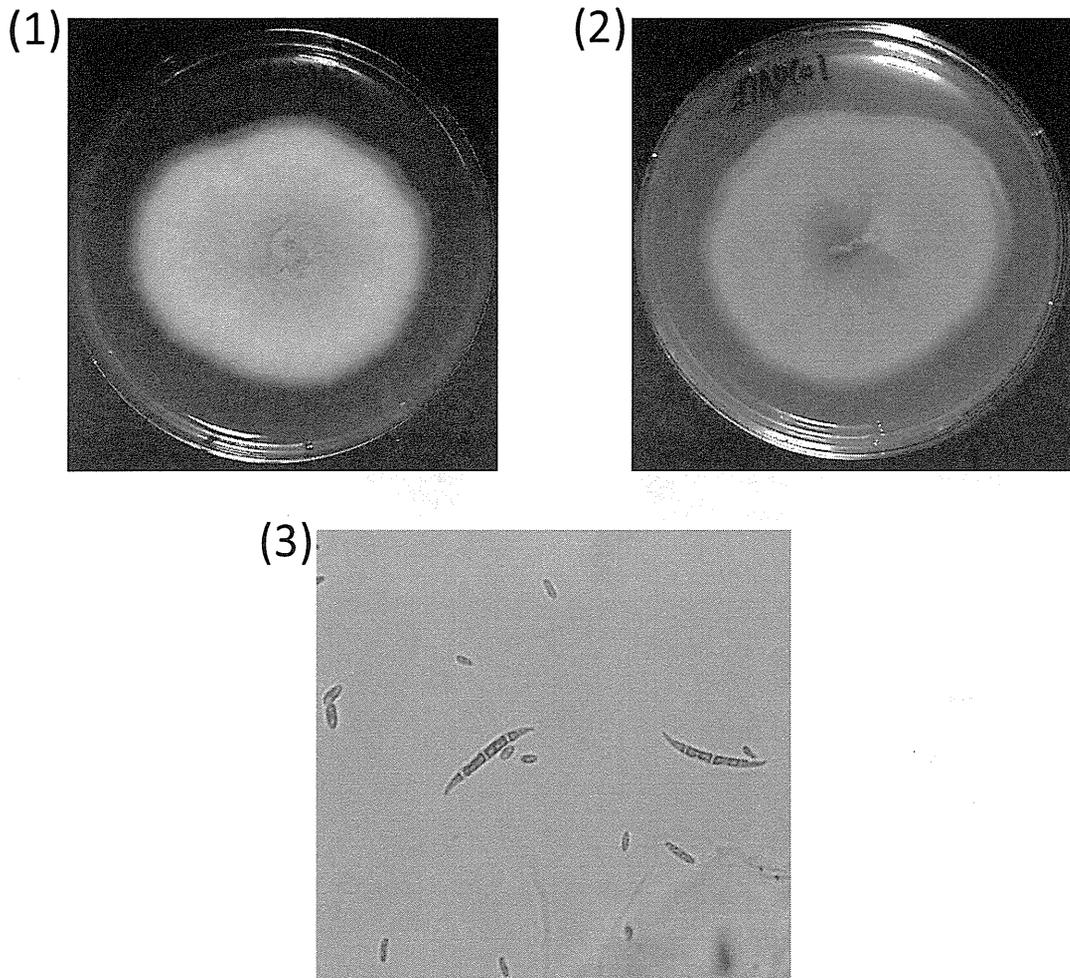
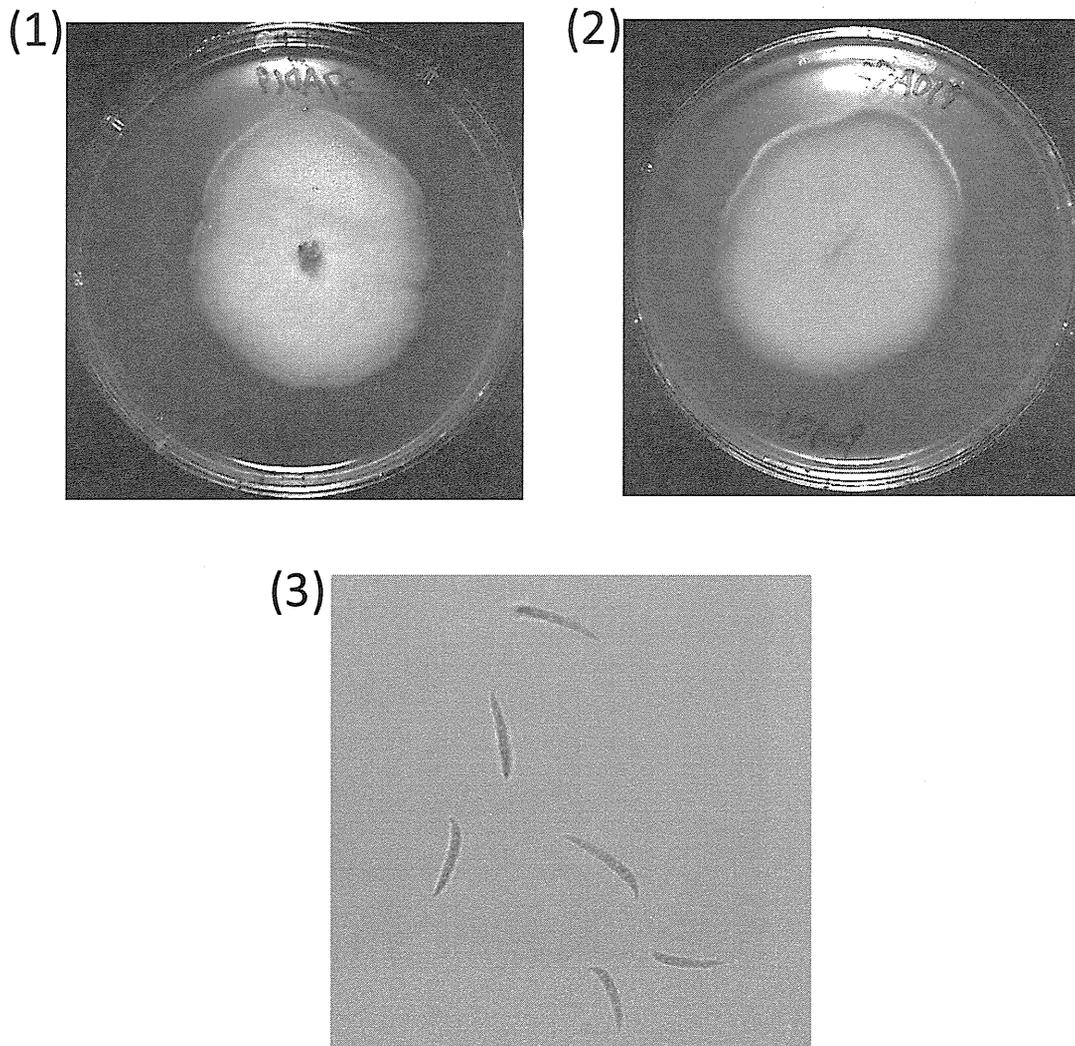


Fig 10. Morphological characters of *Gibbelleria fujikuroi* species complex.

(1) Macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (2) macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (3) microscopic image on a prepared specimen. . (×400)



**Fig 11. Morphological characters of *Fusarium incarnatum/equiseti* species complex.**

(1) Macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (2) macroscopic image from the reverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (3) microscopic image on a prepared specimen. (× 400)

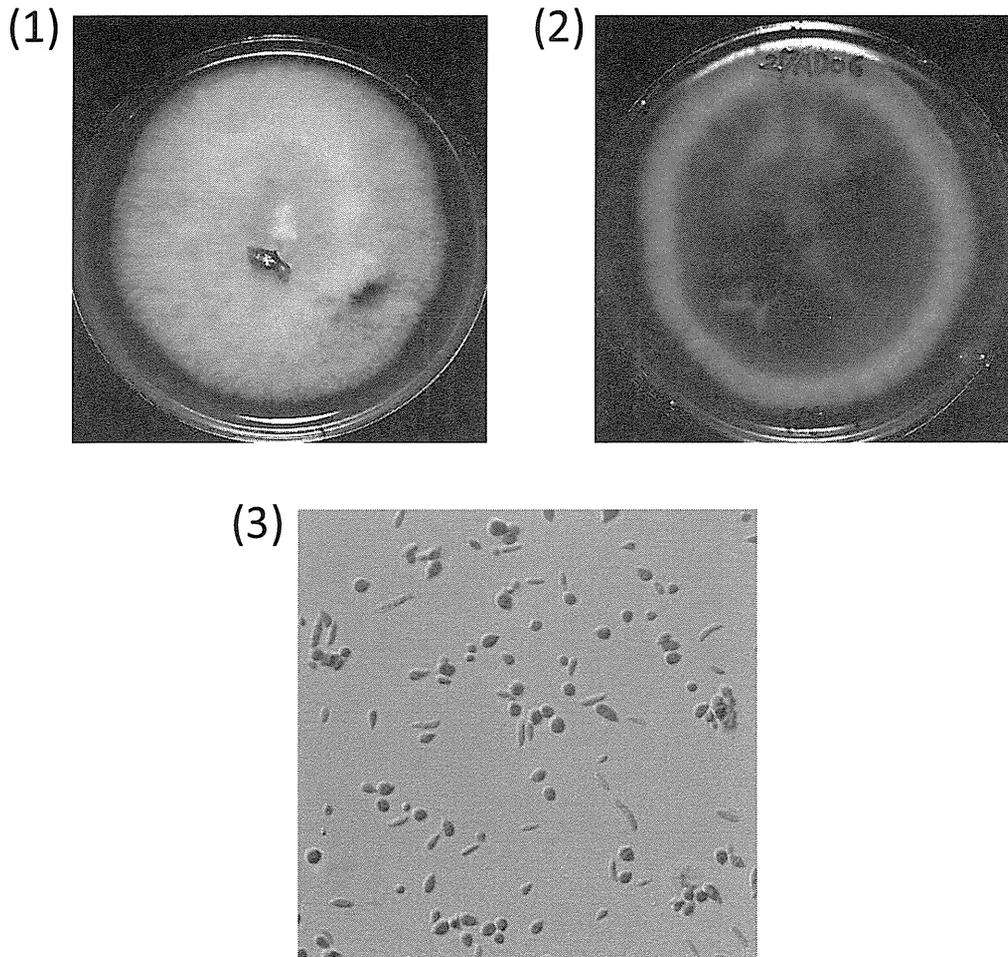


Fig 12. Morphological characters of  
*Fusarium sporotrichioides*

(1) Macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (2) macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (3) microscopic image on a prepared specimen. (× 400)

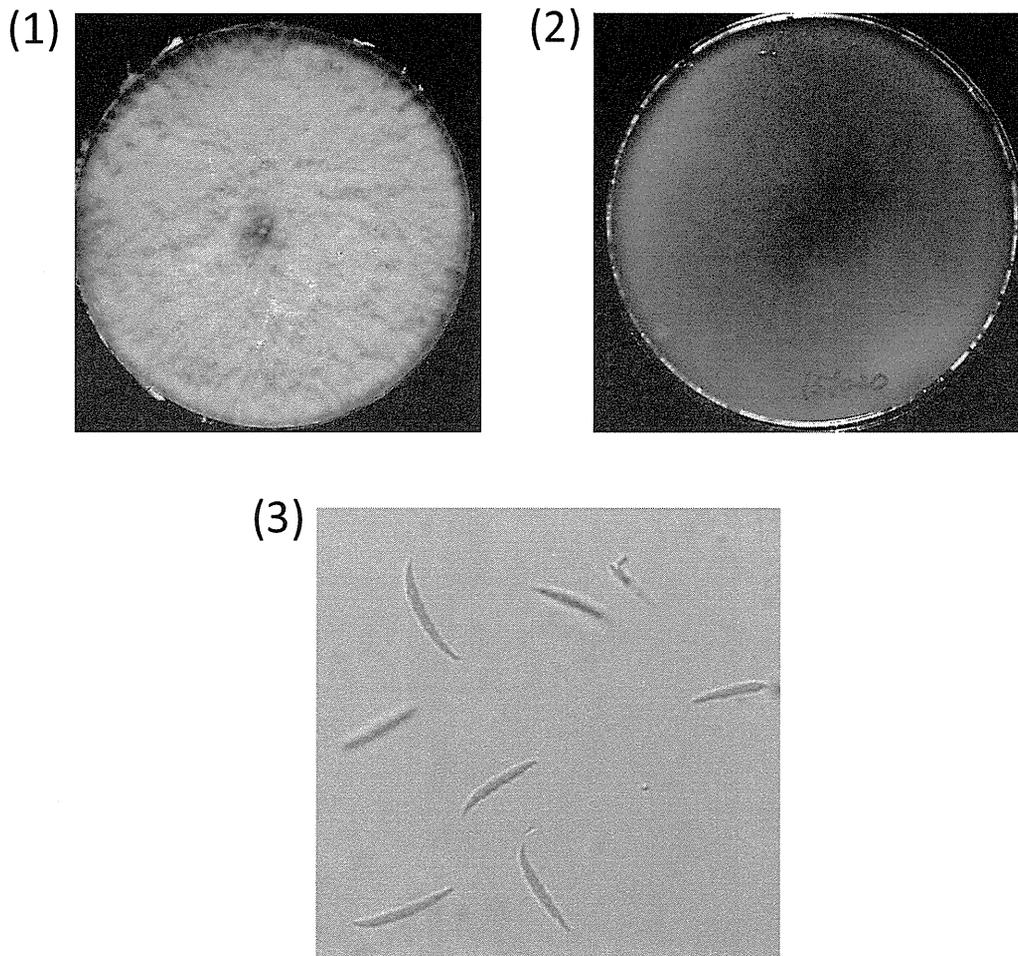


Fig 13. Morphological characters of *Fusarium graminearum* species complex.

(1) Macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (2) macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (3) microscopic image on a prepared specimen. (×400)

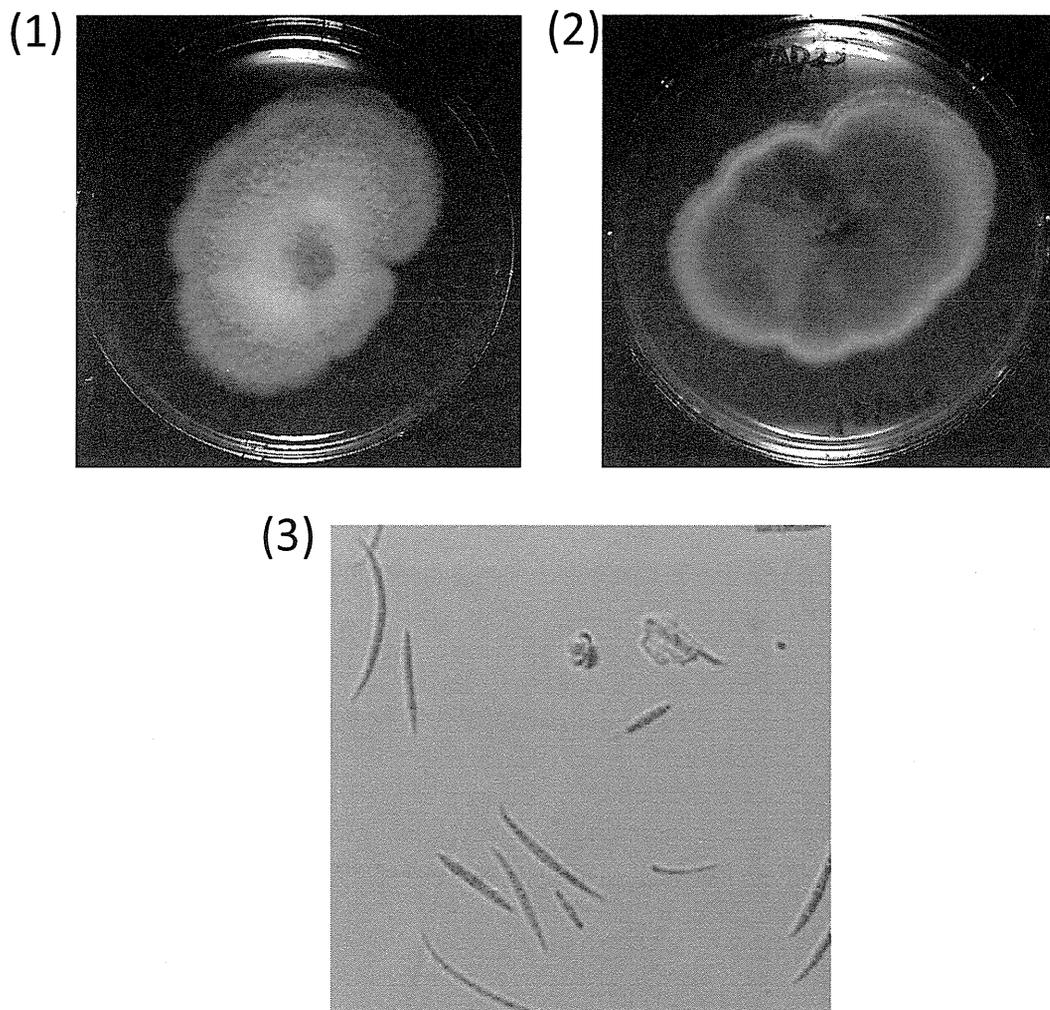


Fig 14. Morphological characters of *Fusarium avenaceum*

(1) Macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (2) macroscopic image from the reverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (3) microscopic image on a prepared specimen. .(×400)

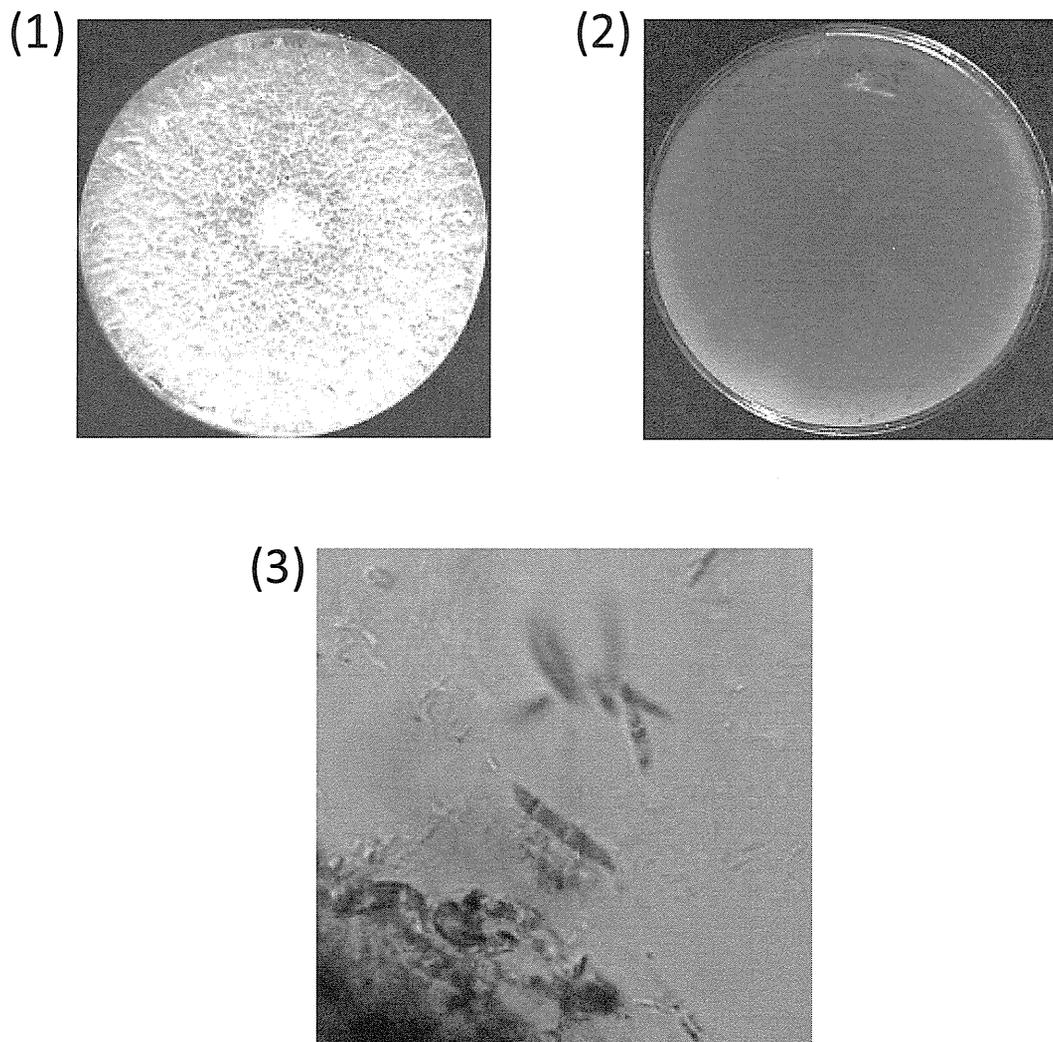


Fig 15. Morphological characters of  
*Fusarium chlamydosporum*

(1) Macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (2) macroscopic image from the reverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (3) microscopic image on a prepared specimen. (×400)

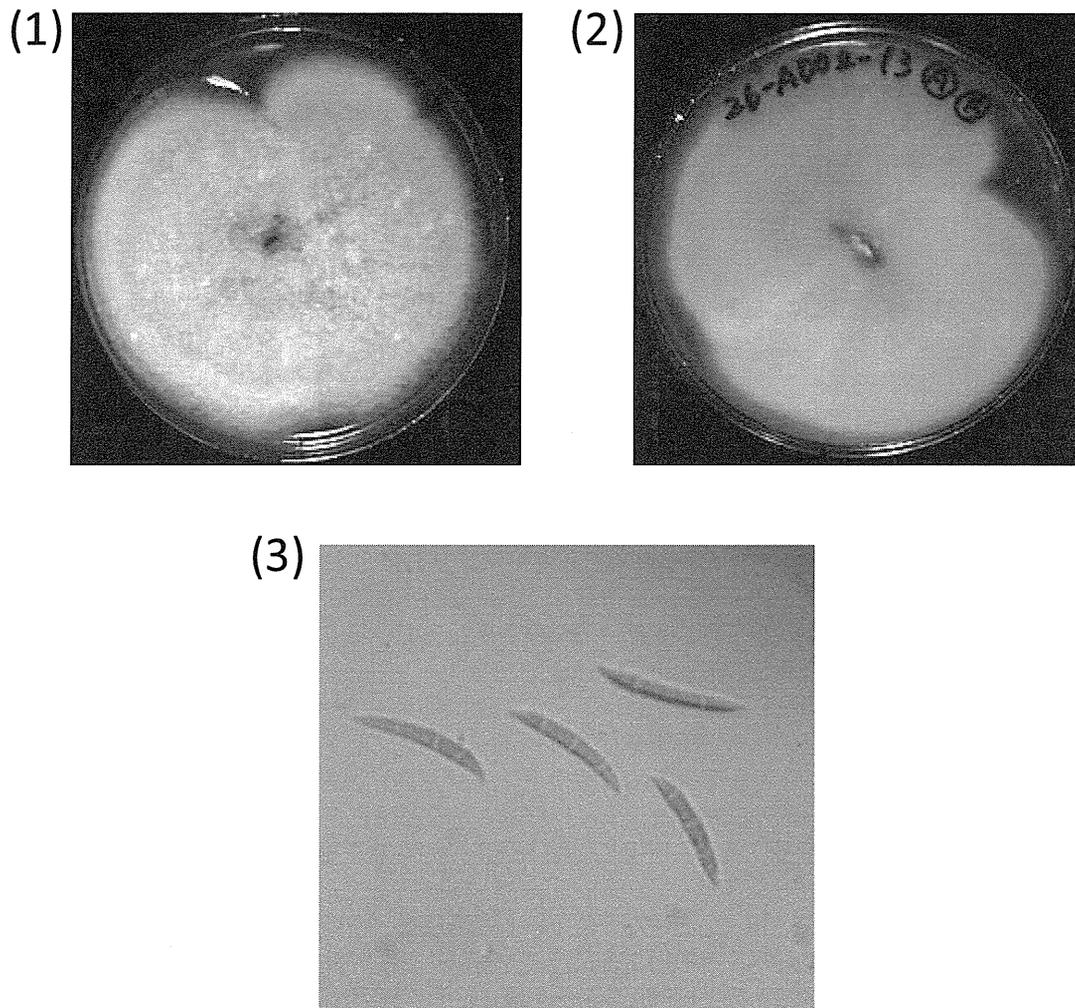


Fig 16. Morphological characters of  
*Fusarium camptoceras*

(1) Macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (2) macroscopic image from the obverse of a colony on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C for 7 days, (3) microscopic image on a prepared specimen. (×400)

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)

分担研究報告書

輸入麦類の汚染量を輸入元国別に推定することによる曝露量推定の精緻化

分担研究者 小西 良子 麻布大学

研究要旨

食物経路の毒物の曝露については、主食を中心に摂取量の多い食品の汚染量が、曝露量に大きく寄与することが知られている。カビ毒についてはとりわけ小麦の寄与が高いという知見が得られている。(平成25年度報告)

他方で、日本国内で消費される小麦の多くは輸入によっており、日本人の曝露量を推定するためには、外国産の小麦の汚染の度合いについての情報が不可欠である。現在、汚染量の調査では輸入元がどの国であったのかが明らかになっているサンプルを利用しており、その結果も輸入元の情報とともに公開されている。

しかし、汚染量をシミュレーションする場合に、主にサンプル数が十分に確保できないことが理由となって、従来は輸出国ごとのシミュレーションを行うことはなかった。しかし、実際に汚染量の調査結果を見てみると、輸入元の国によって汚染の度合いがかなり異なっていることがわかる。それゆえ、本来は汚染量のシミュレーションは輸入元の国別に行うべきである。

今回は昨年度の報告用に利用した平成22年度、24年度に加えて26年度の汚染量データを利用することができたため、一部、サンプル数が不十分なものはあったものの、T-2、HT-2、ゼアラレノンの3種について、小麦(オーストラリア、アメリカ、カナダ、フランス)と大麦(オーストラリア、アメリカ、カナダ)について、輸入元の国別の汚染量シミュレーションを行うことができた。そこで、これらの汚染量推定値に輸入量に占める各国の割合を利用して輸入小麦の汚染量を推定し、食品摂取量の推定値と合わせて、曝露量を推定した。

推定した小麦と大麦の、T-2、HT-2、ゼアラレノンの曝露量に、昨年度推定した小豆、ビール、雑穀の曝露量推定値を加えて、日本人の各年齢層ごとにT-2、HT-2、ゼアラレノンの曝露量全体を推定した。

昨年度の推定曝露量と比べてみると相違が認められるが、その原因は昨年度の汚染量推定においては各国のサンプル全体で汚染量を推定したが、それぞれの国のサンプルの占める割合が実際に輸入された小麦の割合と異なっていることによる。特に大きく注目すべきは、昨年度の推定において懸念が示された1歳から6歳のHT-2の曝露量の99%タイル(78.6ng/体重Kg/日)、およびT-2とHT-2の合計曝露量の97.5%タイル(61.9ng/体重Kg/日)、7歳から14歳のT-2とHT-2の合計曝露量の99%タイル(61.9ng/体重Kg/日)については、いずれも今回の輸入元の各国構成比を考慮したシミュレーションによる結果では昨年度の各国構成比を考慮しない計算結果を下回った。すなわち、1歳~6歳のHT-2の99%タイルは69.2ng/体重Kg/日、T-2とHT-2の合計曝露量では1歳~6歳の97.5%タイルは52.7ng/体重Kg/日、7歳~14歳の99%タイルは57.5ng/体重Kg/日となり、PMTDIを下回った。

研究協力者 斉藤史郎(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種のカビ毒について、主要な食品摂取による曝露量を、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することにより、日本人の食物摂取による上記のカビ

毒による健康被害のリスクを計量化し、PMTDIと比較する。

その際、主要な食品摂取を介する曝露量の推定を従来よりも精密化するために麦類(小麦と大麦)については輸入元の国ごとに汚染量を推定して、曝露量シミュレーションの前提条件を現実に近いけるよ

うにした。

## B. 研究方法

### 1) 対象食品の選定

本報告書に述べられているとおり、3種類のカビ毒の汚染調査対象食品は、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、米があった。これらの食品目のうち、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）、また摂取量が極めて少なく健康被害のリスクを考えにくい食品（ゴマ）、および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

T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノン(ZEN)の汚染実態調査結果を以下の表に示す。表中の平均と標準偏差は、LOQ 以上のサンプルの平均と標準偏差を示している。

それぞれの食品について、LOQ 以上の割合については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るので、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按分した。

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。

輸入小麦については、輸入元の各国別に汚染量を集計した。

#### ■ 輸入小麦の汚染実態(単位 ng/g)

#### 【アメリカ】

小麦(アメリカ)	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	134	134	134
LOQ以上数	11	27	28
平均	2.45	11.1	3.07
標準偏差	2.4	17.5	2.4

#### 【カナダ】

小麦(カナダ)	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	68	68	68
LOQ以上数	6	14	2
平均	2.64	8.33	3.53
標準偏差	3.92	9.23	—

#### 【オーストラリア】

小麦(オーストラリア)	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	58	58	58
LOQ以上数	0	1	0
平均	—	2.3	—
標準偏差	—	—	—

#### 【フランス】

小麦(フランス)	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	6	6	6
LOQ以上数	0	0	3
平均	—	—	4.89
標準偏差	—	—	5.43

※データは平成22年度、24年度、26年度実態調査より

※断りのない限り、これらの平均と標準偏差を使って対数正規分布の値を発生させた。

※アメリカ産小麦のZENには一サンプルだけはずれ値(150.65)があったので、平均と標準偏差による分布とは別に、一定の割合(134分の1)ではずれ値を発生させた。

※なお、カナダのZENおよびオーストラリアのHT-2については分布を発生させずに、それぞれの出現確率（サンプル数で該当数を割った値）で、それぞれの計測値（カナダのZENは1.08と5.98。オーストラリアのHT-2は2.3）を発生させた。

輸入元ごとに10,000,000件のシミュレーションデータを作成し、それを各国ごとの総輸入量に対する割合で按分して輸入小麦の汚染量を作成した。

【輸入小麦の国別割合】

輸入元	構成比
アメリカ	58.31%
カナダ	23.20%
オーストラリア	18.39%
その他	0.10%

※ 農林水産省「平成25年 麦の需給に関する見通し」より

■ 国産小麦粉の汚染実態(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

■ 国内流通している小麦の汚染量推定

上記輸入小麦の汚染量と国産小麦の汚染量を国内流通している小麦の総量にたいする割合(国産が14%で輸入が86%)で按分して小麦の汚染量をシミュレーションした。

※国産と輸入の比率は農林水産省「平成25年 麦の需給に関する見通し」によった。

(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るので、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按分した。

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ので、輸入大麦の平均と標準

偏差にならって、国産小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。

輸入大麦についても、輸入小麦と同じく、輸入元の国ごとに汚染量をシミュレーションした。

■ 輸入大麦の汚染実態 (単位 ng/g)

【オーストラリア】

大麦(オーストラリア)	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	42	42	42
LOQ以上数	0	0	0
平均	—	—	—
標準偏差	—	—	—

【カナダ】

大麦(カナダ)	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	15	15	15
LOQ以上数	7	14	8
平均	1.24	5.24	5.84
標準偏差	1.28	5.31	8.78

【アメリカ】

大麦(アメリカ)	T-2	HT-2	ZEN
サンプル数	18	18	18
LOQ以上数	0	0	0
平均	—	—	—
標準偏差	—	—	—

※データは平成22年度から24年度実態調査より

※断りのない限り、これらの平均と標準偏差を使って対数正規分布の値を発生させた。

※なお、オーストラリアのZENについては42分の2の確率でサンプルの計測値である2.7と5.3を発生させた。

輸入元ごとに10,000,000件のシミュレーションデータを作成し、それを各国ごとの総輸入量に対する割合で按分して輸入大麦の汚染量を作成した。

【輸入大麦の国別割合】

輸入元	構成比
オーストラリア	75.56%
カナダ	22.22%
その他	2.22%

※ 農林水産省「麦をめぐる事情について（大麦・はだか麦）」

■平成 26 年 9 月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

■国内流通している大麦の汚染量推定

上記輸入大麦の汚染量と国産大麦の汚染量を国内流通している大麦の総量にたいする割合（国産が31%で輸入が69%）で按分して大麦の汚染量をシミュレーションした。

※国産と輸入の割合については農林水産省「麦をめぐる事情について（大麦・はだか麦）」によった。

(3)小豆

■小豆の汚染実態

	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	33.03

※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

	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

	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の対象としなかった。

3) 食品摂取量シミュレーション方法

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、あずき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。

あずき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

・羊糞

#### (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。(詳細は平成 26 年度中間報告を参照)

#### 4)曝露量の計算

年齢階層ごとに、汚染量 (ng/g) を摂取量 (七日の体重 1Kg あたり) とを掛け合わせて、1 日あたりに体重 1Kg に対する曝露量 (ng) を計算し、パーセントマイルごとの曝露量を明らかにした。

### C. 研究結果

#### 1) 食品合計によるカビ毒の推定曝露量

年齢層ごとの各カビ毒の曝露量は「添付資料\_輸入国別を考慮した現状推定」を参照。

##### (1)T-2 トキシン

JECFA が設定している PMTDI は 60ng/体重 Kg/日である。1 歳から 6 歳では、99.8%マイルで PMTDI を超え、7 歳から 14 歳では 99.9%マイルで PMTDI を超えた。一方、15 歳から 19 歳では 99.9%でも 38.45ng/体重 Kg/日しかなく、20 歳以上では 99.9%マイルでも 53.8ng/体重 Kg/日であり、いずれも PMTDI を下回った。

##### (2)HT-2 トキシン

PMTDI は T-2 トキシンと同様に 60ng/体重 Kg/日である。1 歳から 6 歳では、99%マイルで PMTDI を超え、7 歳から 14 歳では 99.5%マイルで、15 歳から 19 歳では 99.8%マイルで、20 歳以上では 99.8%マイルで PMTDI を超えた。

##### (3)ゼアラレノン

PMTDI は 500ng/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 トキシンと HT-2 トキシンの合算値での PMTDI

JECFA(2001)では、T-2 トキシンと HT-2 トキシン

の PMTDI について、それぞれ単独で 60ng/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 60ng/体重 Kg/日という基準を作成している。昨年度の推定では 1 歳から 6 歳では 97.5%マイルで、7 歳から 14 歳は 99%マイルで、15 歳から 19 歳は 99.8%マイルで、20 歳以上は 99.8%マイルでこの合算値での PMTDI を超えているが、本年度の小麦の輸入国の割合を考慮した推定では、この基準を超えるのは 1 歳から 6 歳では 99%マイル、7 歳から 14 歳では 99.5%マイル、15 歳から 19 歳は 99.8%マイル、20 歳以上も 99.8%マイルとなった。

#### 2)昨年度 (2014 年度) の結果との比較

輸入国別に分けずに全体で輸入小麦および輸入大麦の汚染量を推定した場合の曝露量は昨年度 (平成 26 年度) 報告書の「添付資料\_輸入国別を考慮しない全体での現状推定」を参照。

今回の 2015 年の結果で明らかのように、小麦と大麦の輸入国別を考慮したシミュレーションを行うと、99%マイルまでは昨年度と比べて多少曝露量が低く推定されているが、それ以上になると曝露量が昨年度の推定結果を大きく上回っている。

### D. 考察

健康被害対策として特に考慮すべき 95%マイルから 99%マイルまでについては昨年度と同じく低年齢層における曝露量が多く、とりわけ HT-2 トキシンの曝露がかなり多くなっている。その原因もまた昨年度と同様に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、HT-2 トキシン、ゼアラレノン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強くて出ている。中でも HT-2 トキシンは減衰率を考慮に入れてもなお、H-2 トキシンやゼアラレノンの汚染量の 10 倍近くにも多くなっている。

#### 2) 摂取量の多い食品

年齢層ごとの食品摂取量については昨年度 (2014 年度) の報告の添付資料を参照。

##### (1)小豆

1 歳から 19 歳までは、主食である米の約 10 分の 1 の量を摂取していて、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。

##### (2)小麦

体重 1Kg で比べてみた場合、年齢が低くなるほど、