

Table 6 平成22年度から平成27年度までのゼアラレノンの汚染実態

食品目	調査数	陽性率 (%)	LB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	UB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	最大値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
小麦 (輸入)	375	10.4	0.7	1.0	151
大麦 (輸入)	103	9.7	0.6	0.8	27.1
ハト麦加工品	120	60.8	16.3	16.4	218
ライ麦粉	70	54.3	1.7	1.7	30.7
小麦粉 (国産)	102	34.3	0.5	0.5	28.7
小麦粉 (輸入)	51	25.5	0.04	0.06	0.9
グラノーラ	50	48.0	0.6	0.7	10.9
ビール	90	1.1	0.001	0.01	0.1
ソバ	52	82.7	0.8	0.9	3.2
コーングリッツ	115	61.8	3.4	3.5	32.2
コーンスナック	20	0	0.0	0.1	-
コーンフレーク	25	72.0	0.5	0.5	2.3
小豆	105	71.4	23.6	23.7	125
大豆	51	0	0	0.06	-
雑穀米	120	87.5	7.4	7.5	109
精米	40	0	0	0.6	-
ゴマ	80	70.0	2.7	2.7	28.7

## 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

## フザリウム系カビ毒の曝露量評価

分担研究者 小西 良子 麻布大学

### 研究要旨

本研究はこれまでの3年間の準備を経て、フザリウム系カビ毒である、ゼアラレノン、T-2 トキシン、HT-2 トキシン3種のカビ毒につき、本格的な曝露評価を行った。

平成25年度の小麦含有食品の摂取量シミュレーションにおいては、従来は各食品における小麦含有割合にかかわらず、小麦含有食品を摂取量の多い食品と少ない食品とにわけて、それぞれの摂取量をシミュレーションしたのちに、大量摂取群、少量摂取群のそれぞれに含まれる食品を同じ割合で食べるものと仮定してシミュレーションを行っていた。今回は、大量摂取群の食品につき、小麦含有割合によって3群に分けてシミュレーションを行い、それぞれの食品群に小麦含有割合をかけるという形でシミュレーションを精緻化した結果、従来の方法が小麦含有食品の摂取量について過大評価していたことが明らかになった。

平成26年度は、小麦、大麦、小豆を含む食品および、ビール、雑穀米のゼアラレノン、T-2 トキシン、HT-2 トキシンの3種のカビ毒の曝露量を評価した。その際に雑穀米の摂取量については「雑穀米」としての摂取量調査が行われていないのであるが、雑穀米によく含まれているアマランサスの摂取量を使って、雑穀米としての摂取量を推定して曝露量を推定し、そのほかの食品と合わせて日本人の上記3種のカビ毒の曝露量推定を行った。

平成27年度も、小麦、大麦、小豆を含む食品およびビール、雑穀米について、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノンの3種のカビ毒の曝露量を評価した。その際に、これまでの汚染量調査の蓄積を活用して、小麦と大麦について輸入国別の輸入割合を考慮して、輸入国別の汚染量の違いを汚染量シミュレーションに反映することができた。

分析の結果、95%タイルでは推計曝露量はいずれの年齢層、カビ毒についてもPMTDIよりも低い値となったことから、日本人の健康被害のリスクは高いものとは言えないが、低年齢層、とりわけ1歳から6歳の年齢層の曝露水準は大人のそれと比べるとかなり高いので、今後とも注視が必要である。また、汚染量の高い国からの輸入割合についても注意を払うべきであると思われる。また、99.5%タイルを超えると、かなり曝露量が多くなる傾向が見られるので、少数ではあるが、曝露量が多く、健康被害のリスクが高い層が存在すると思われる。

### 研究協力者

斉藤 史朗 (東京大学)

### A. 研究目的

#### (1) 小麦含有食品による小麦摂取量の評価方法の改善

従来の小麦含有食品の摂取量評価では、まず全食品を摂取量の中央値で大量摂取群と少量摂取群に分けて、各食品群の摂取量をシミュレーションによって評価した。次に、日本国民全体が各食品を摂取する割合が同等であるとの仮定のもとに、それぞれの群の全小麦含有食品の摂取量に小麦含有割合をかけ

た数値から、各群の平均小麦含有量を算出して、さきほどシミュレーションによって算出した小麦含有食品の摂取量にかけて、各群ごとの小麦摂取量のシミュレーションを行ってきた。

今回は、小麦摂取量評価により大きな影響を与える大量摂取群について、小麦含有割合(100%、50%、30%)によって食品を分類し、それぞれについてシミュレーションを行って算出した小麦含有食品の摂取量に各グループの小麦含有割合をかけて、小麦摂取量をシミュレーションした。

## (2) 雑穀米の摂取量推定

「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。

## (3) 小麦と大麦の輸入国別別を考慮したシミュレーション

従来は輸入の小麦と大麦は、輸入相手国の違いを無視して全て輸入小麦として汚染量を評価していた(表1)。だが実際には輸入元の国によって汚染量の分布はかなりの違いを示している。今回は数年度にわたる汚染量調査の結果を利用することができ、一部、サンプル数の少ない国もあったが、大部分で輸入国別に小麦と大麦のカビ毒3種の汚染量のシミュレーションを行うことができた。その上で、国別の輸入割合をもとに、輸入の小麦と大麦全体の汚染量を推定した。

また、国産の小麦と大麦については別途汚染量をシミュレーションし、国内流通小麦の輸入と国産の割合に応じるように上記結果を組み合わせて、国内流通している小麦と大麦のカビ毒3種の汚染量を評価した。

## (4) ゼアラレノン、T-2 トキシン、HT-2 トキシンの曝露評価

上記(1)から(3)の方法によってデータを準備して、ゼアラレノン、T-2 トキシン、HT-2 トキシンの曝露量を推定した。

## B. 研究方法

### 1) 小麦含有食品からの小麦摂取量の推定方法の改善

#### (1) 大量摂取群と少量摂取群との区分

「平成17年度～19年度食品摂取頻度・摂取量調査」より小麦含有食品を選んで、平均の摂取量の中央値をとって、中央値より大きいものを大量摂取群、中央値を含み少ないものを少量摂取群とした。

#### (2) 小麦含有割合による大量摂取群のグループ

分け

大量摂取群の食品を、小麦含有割合が30%のもの、50%のもの、100%のものにわけて、それぞれについて食品としての摂取量をシミュレーションした上で、小麦含有割合をかけて、小麦の摂取量をシミュレーションした。その後、少量摂取群の食品による小麦摂取量と合算して小麦の摂取量の評価とした。(少量摂取群の食品からの小麦の摂取量シミュレーションは従来通り、含有割合は総重量の平均値を用いた。)

## 2) 雑穀の摂取量のシミュレーション

今回は19商品についての分量(重量)比を明らかにすることができたので、それをもとに、雑穀米摂取の概算を求めたが、算出方法は以下の作業仮説に基づいている。

### 【作業仮説】

- ① サンプルとなった商品としての「雑穀米」の市場シェアはどれも等しいとする。
- ③ どの商品「雑穀米」も、同じ分量(重量)ずつ食べられるものとする。(すなわち、ある穀物を含んだ商品は、その他の商品よりも多く、あるいは少なく摂取されることはない。)

### 【計算の仕方】

- ④ 食品番号を持ち、かつ、「雑穀米」として以外の食用が考えにくい食品として「アマランサス」を選択(全19サンプルのうち、15の商品に含まれている)
- ⑤ アマランサスを摂取した人の割合(摂取者割合)の19/15倍の人が雑穀を摂取していると仮定。(年齢層7歳から14歳および、20歳以上で摂取者割合が1%を超えたので、シミュレーション対象とする)(アマランサスそのものの摂取者割合は表3参照)
- ⑥ アマランサスを含まない商品については、重量比を0%として、19商品における平均の重量比を算出した。(約3.16%)
- ⑦ それゆえ、摂取量については、アマランサスの摂取量をシミュレーションした上で、3.16%の逆数倍したもの(31倍)を雑穀米の摂取量分布とした。

その際、雑穀米の摂取者割合は、アマランサスを含まない雑穀米を考慮して、アマランサスの摂取者割合を19/15倍したものを使用した。

年齢層	人数	摂取した人の数	摂取者割合
1歳から6歳	1,619	5	0.31%
7歳から14歳	3,419	26	0.76%
15歳から19歳	2,542	4	0.16%
20歳以上	32,814	288	0.88%

### 3) 輸入国別の小麦と大麦の汚染量評価

#### (1) 小麦の輸入国別を考慮した汚染量評価

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対する割合(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) 大麦の別を考慮した汚染量評価

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)

#### 【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)

	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) そのほかの食費の汚染実態

#### ■ 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

## ■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

## ■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 0575 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。

### 4) ゼアラレノン、T-2 トキシン、HT-2 トキシンの曝露量評価

#### (1) 対象食品の選定

汚染実態調査結果が得られた対象食品は、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。これらの食品のうち、汚染の検出されなかったもの（大豆、米）および、摂取者の割合が 1% を下回るもの（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もの（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 食品である。

- ・ 小麦

- ・ 大麦
- ・ 小豆
- ・ 雑穀米
- ・ ビール

#### (2) カビ毒汚染量のシミュレーション

小麦と大麦については、前述の通り、国産と輸入とを分け、輸入については輸入国別の汚染量評価を行って、国内流通の小麦と大麦の汚染量を計算した。そのほかの食品については、それぞれのサンプルの平均と標準偏差を用いて汚染量を計算した。

それぞれの食品について LOQ 以上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 値を取るようシミュレーションを行った。（試行回数は 10,000,000 回）

#### (3) 食品摂取量のシミュレーション

小麦と雑穀米については前述の通りの工夫をして摂取量を評価した。そのほかの食品については、「平成 17 年度～19 年度食品摂取頻度・摂取量調査」の結果を用いて年齢層別（1 歳から 6 歳、7 歳から 14 歳、15 歳から 19 歳、20 歳以上）に摂取量のシミュレーションを行った。（試行回数は 10,000,000 回）

大麦を含んだ食品は「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。

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
- ・ 羊羹

ビールについては、第 1 種ビールにつき、20 歳以上の摂取量データを作成した。

#### (4) 曝露量のシミュレーション

年齢階層ごとに、汚染量 (ng/g) を摂取量 (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

各年齢層ごとに、小麦のHT-2 トキシンの曝露量が大きく、とりわけ低年齢層（1歳から14歳）において大きくなっている。（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/日である。これが20歳以上では、99%タイルでも28.6 ng/体重 Kg/日である。）

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16.9 ng/体重 Kg/日であり、HT-2 トキシンでは15.2 ng/体重 Kg/日であり、ゼアラレノンでは64.6 ng/体重 Kg/日であった（表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

PMTDI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99.9%タイルでPMTDIを超えた。15歳から19歳では99.9%でも38.45 ng/体重 Kg/日しかなく、20歳以上においても99.9%タイルで53.8 ng/体重 Kg/日であり、PMTDIには達しなかった。

### (2)HT-2 トキシン

PMTDI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

PMTDI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。昨年度の推定では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%タイルでこの合算値でのPMTDIを超えていた。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%タイル、7歳から14歳では99.5%タイル、15歳から19歳は99.8%タイル、

20歳以上も99.8%タイルとなっている。

## D. 考察

健康被害対策として特に考慮すべき95%タイルから99%タイルまでについては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

#### (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。（ただし、摂取があった人についてだけ見ている）

#### (2)小麦

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

汚染量の高さと摂取量の多さの二つの条件を合わせることにより、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 トキシンと HT-2 トキシンの合算値で、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。

## 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化に注意すべきであると思われる。

また分布の右側の曝露量がかなり大きくなっているため、少数ではあるが、曝露量が大きく健康被害のリスクの大きい層が存在することには留意しておく必要がある。

#### **F. 健康危害情報**

なし

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### **H. 知的所有権の取得状況**

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



表1 6年間の汚染実態調査からの曝露評価

1～6才	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	3.93	6.93	13.20	26.91	41.66	68.25	95.02
HT-2	16.51	26.29	41.03	69.72	99.81	153.97	209.02
ZEN	7.72	23.15	64.49	140.59	217.22	338.50	441.91
T2+HT2	22.00	34.65	52.73	86.03	119.63	178.07	235.69
7～14才	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	2.71	4.74	8.77	17.68	27.65	46.29	65.39
HT-2	11.06	17.54	27.38	46.71	67.16	103.58	140.66
ZEN	5.83	17.13	42.28	94.84	149.83	236.94	309.93
T2+HT2	14.75	23.05	35.01	57.53	80.71	120.90	161.38
15～19才	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	1.90	3.44	6.35	12.06	17.97	28.28	38.45
HT-2	7.65	12.06	18.66	31.47	45.08	69.22	93.12
ZEN	3.98	13.18	29.63	59.76	91.69	146.16	191.41
T2+HT2	10.30	15.97	23.84	38.06	52.50	77.22	101.45
20才以上	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	2.40	5.35	9.70	17.70	25.84	40.02	53.80
HT-2	7.49	12.02	18.48	30.58	43.08	64.82	86.10
ZEN	9.67	25.72	44.98	77.98	109.92	160.34	203.54
T2+HT2	10.91	17.43	26.03	41.06	55.67	80.25	104.18

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

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	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

研究要旨

輸入小麦および国産小豆は、*Fusarium* 属菌が産生するマイコトキシンに高濃度かつ高頻度で汚染されていることが確認された。しかし、その汚染原因となる *Fusarium* 属菌の分布状況についての調査は進んでおらず、汚染の防止策を講じるために、これらの食品上での *Fusarium* 属菌の生態学的研究がなされる必要がある。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、輸入小麦および国産小豆の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。本研究では、アメリカおよびカナダ産全粒小麦合計 43 検体、および輸入または国内各地産小豆合計 39 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、同定した。その後、分離株の培養を行い、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、アメリカ・カナダ産 DURAM 小麦、および国産、特に北海道産小豆は、他と比較して *Fusarium* 属菌が分布しやすい傾向にあることが明らかとなった。また、T-2 トキシン汚染が確認された複数の輸入小麦および北海道産小豆検体から *F. sporotrichioides* が分離マイコトキシン汚染のリスクが高いことが考えられたされ、さらにそれらの分離株において T-2 トキシン産生性が確認されたことから、これら食品の 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。さらに、本研究において分離した T-2 トキシン産生性 *F. sporotrichioides* を小豆に接種し、複数の温湿度条件で培養後、小豆中の T-2/HT-2 トキシンの含有量を測定した。その結果、小豆における T-2 および HT-2 トキシン産生に最も適している温湿度は、20-25℃で相対湿度 95%程度の中温高湿度条件であること、および北海道地方の小豆栽培条件が小豆の T-2 および HT-2 トキシン汚染を促進する可能性があり、摂食による健康リスクにおいて産地間に差が有ることが示唆された。

## 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。主に穀類(特に麦・トウモロコシ)、豆類、ナッツ類は、*Fusarium*属菌の産生するフザリウムトキシンの汚染レベルが高いことがよく知られる。*Fusarium*属菌のトキシン産生性は菌種間で異なることが報告されたことから<sup>1,2)</sup>、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。

小麦は、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、かつ消費する小麦の84%が輸入であるため<sup>3)</sup>、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があることが知られ、また産地によってその汚染状況は様々である。カナダ産小麦からは *Fusarium poae*、*Fusarium sporotrichioides* および *Fusarium acuminatum* が検出され、様々な菌種の検出例の報告がある<sup>4)</sup>。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、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であるトリコテセン系マイコトキシンの 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<sup>5)</sup>。しかし、これらの食品のフザリウムトキシン汚染原因となる *Fusarium* 属菌の分布状況についての調査は進んでいない。

汚染の防止策を講じるために、これらの食品上での *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必要がある。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、輸入小麦および国産小豆のマイコトキシンおよび *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、同時に検討した。

## 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。検体には、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ものを供試した。

### ② 国産小豆

国産小豆は、本研究班の研究分担者・小西による平成24・25年度の研究結果を参照すると、検討した国内流通食品のうちで、トリコテセン系タイプ A の高頻度・高濃度汚染状況が報告されている。最も高濃度のもので T-2 トキシン 0.96 ppb、HT-2 トキシン 102.59 ppb が記録された。本研究では、あらかじめトリコテセン系マイコトキシン汚染濃度が判明しているカナダまたは中国小豆 4 検体、国産小豆 35 検体(北海道産 17、東北・関東・中部地方産 3、関西・中国地方産 11、九州地方産 4)を供試した。

### (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

小麦および小豆検体は、70%エタノールで 30 秒間洗浄し、その後即座に純水で洗浄し実験に供した。用いた全ての寒天培地には Chloramphenicol (Chloramphenicol: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°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。*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、純培養するためにカーネーションリーフアガー(CLA)培地を用いての単孢子分離を行った。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。

#### 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。さらに巨大分子の形成が良い CLA 培地を用いての培養を行い、プレパラートを作製して、形成された分子形状および分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<sup>6)</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、培養菌体を用いての SDS 抽出法<sup>7)</sup>を行った。

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  $\alpha$ -tubulin 遺伝子 ( $\alpha$ -*tub*) の塩基配列を決定した。プライマーおよび PCR 反応条件は、0' Doneil ら<sup>8)</sup>および Watanabe ら<sup>9)</sup>を参照し行った。PCR 反応は、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社、滋賀県) を用い、得られた 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、PCR 産物のシーケンス反応は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社、米国) を用いて、それぞれ行った。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。シーケンス反応物の精製後、Applied Biosystems 3730 XL genetic analyzer (Applied Biosystems 社) によって塩基配列を決定した。

得られた遺伝子塩基配列解析は、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  $\alpha$ -*tub* の部分塩基配列を得た。それらを用いて、National Center for Biotechnology Information (NCBI) で提供している Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用い、GenBank 登録配列との相溶性検索を行った。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

上述の方法で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トキシンタイプ A に属する T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびピアラ

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、前培養として、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 15ml~20ml に分離株を接種し、25°C で 3 日間振とう培養した。その後の本培養として、トリコテセン系マイコト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を 200ml 三角フラスコに 100ml ずつ分注し、ここに前培養液を 100 $\mu$ 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トキシンを抽出し、LC-MS/MS での測定に供した。

#### (6) 小豆を用いた培養法によるマイコトキシン産生性の確認

本研究の検討結果から最も T-2 トキシンの産生性が高かった小豆由来分離株を用いて、小豆における培養の温湿度条件による T-2 トキシン産生性の比較実験を行った。用いた培養条件は、温度 5°C・湿度 65%、15°C・65%、15°C・95%、20-25°C・95%、20-25°C・78%の計 5 条件とした。各条件について 2 回繰り返し検討を行った。培養に用いた小豆は、LC-MS/MS による分析で T-2 トキシンの自然汚染がないことを確認した後、ガス滅菌を行い、実験に供した。滅菌した直径 12 cm ガラスシャーレ内に、金槌で軽く粉砕した滅菌小豆を 100 g 入れた。PDA 平板培地に接種し 25°C 7 日間培養した分離株をコルクボーラーで寒天ごと打ち抜き、この寒天片をガラスシャーレ内の小豆に接種し、上述の各温湿度条件で 2 週間から 60 日間静置培養を行った。2 週間または 60 日間培養後、小豆を 50 g 取り出し、ミキサーで完全に粉砕後、5 g 分取し、二倍量の 70%メタノールと振り混ぜてマイコトキシンを抽出した。抽出液は、イムノクロマト法を利用した測定キット (ROSA T2/TH2 quantitative test for feed and grain; Charm Sciences Inc., USA) を用いて T-2 トキシンの産生性を定量した。測定方法は、添付の説明書に従って行った。

### 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 100 粒における *Fusarium* 属菌陽性粒数の最高値は、DURAM 小麦 (4 検体) では 97 粒、DNS 小麦 (4 検体) では 70 粒、HRS 小麦 (9 検体) では 79 粒、SWH 小麦 (5 検体) では 79 粒、品種が不明な小麦 (9 検体) では 100 粒であ

った。これらから陽性粒が出現する比率を小麦品種ごとに比較すると、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 ( $p < 0.05$ )。以上のことから、DURAM小麦は *Fusarium* 属菌に対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。

カナダ産小麦の各供試検体 100 粒における *Fusarium* 属菌陽性粒数の最高値は、CW小麦 (4 検体) で 76 粒、DURAM小麦 (7 検体) で 90 粒であった。陽性粒が出現する比率を小麦品種ごとに比較したところ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。

#### (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、以下に示した。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) 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 1 に示した。検出された 6 菌種のうち、*F. sporotrichioides* においてのみ T-2 トキシンの産生性がみられ、供試した菌株における産生陽性率は 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。

#### (4) 国産小豆における *Fusarium* 属菌の検出状況

輸入および国産小豆における *Fusarium* 属菌陽性粒数を以下に示した。各供試検体 100 粒における *Fusarium* 属菌陽性粒数の最高値は、輸入小豆で 0 粒、北海道地方産小豆で 26 粒、東北・関東・中部地方産小豆で 3 粒、関西・中国地方産で 37 粒、九州地方産で 8 粒であった。これらから陽性粒が出現する比率

を小豆産地ごとに比較すると、輸入小豆の陽性粒率は国産小豆よりも有意に低かった ( $p < 0.01$ )。したがって、輸入小豆は *Fusarium* 属菌の分布濃度が低いことが示された。国内各地方間の汚染傾向に有意差は見られなかったものの、北海道地方および関西・中国地方産では *Fusarium* 属菌に汚染される傾向が比較的高かった。以上のことから、国内に流通する小豆は、産地によって *Fusarium* 属菌に対する汚染頻度に差があることが示された。

#### (5) 産地別に見た *Fusarium* 属菌検出菌種の比較

検出された菌種は、北海道地方産では *Gibberella fujikuroi* species complex (GFSC) および *Fusarium equiseti/incarnatum* species complex (FIESC) の合計が 64% を占め、また *F. sporotrichioides* が 11% と比較的高い割合を示した。東北・関東・中部地方および近畿・中国地方では FIESC がそれぞれ 80%、91% を占めた。九州地方では *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) および FIESC の合計が 80% を占めた。北海道地方とその他の地方を比較すると、北海道地方では *F. sporotrichioides* が 3 検体合計 15 粒から検出されたが、他地方では 1 粒からも検出されなかった。また、北海道では *F. avenaceum*、*F. chlamydosporum*、*F. camptoceras* といった菌種も検出されたが、他産地では 1 粒からも検出されず、北海道に特異的な特徴として多様な *Fusarium* 属菌が検出されることが確認された。

#### (6) 液体培養による国産小豆由来株のトリコテセン系マイコトキシンタイプ A の産生性

本研究班において分離された *Fusarium* 属菌のうち、トリコテセン系マイコトキシンタイプ A の主な産生菌種として知られる FIESC および *F. sporotrichioides* 分離株について、液体培地中のトリコテセン系マイコトキシンタイプ A に属する T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ジアセトキシスシルペノール (DAS) およびネオソラニオール (NES) の産生性をそれぞれ検討した。結果を表 2 に示した。*F. incarnatum/equiseti* species complex 分離株 15 株のうち 7 株 (46.7%) で、DAS が、3 株 (20.0%) で NES の産生性がそれぞれ確認された。T-2 および HT-2 トキシンの産生性は確認されなかった。本研究における *F. sporotrichioides* はすべて北海道地方産から分離され、分離株 15 株はのうち 11 株 (73.3%) で T-2 トキシンが、8 株 (53.3%) で DAS が、2 株 (13.3%) で NES の産生性が確認された。HT-2 トキシン産生性は確認されなかった。また、T-2 トキシンが検出さ

れた北海道産小豆のうち2検体(検出濃度:24.08 ppb および 0.53 ppm) から分離された *F. sporotrichioides* からは、T-2 トキシン産生性が本実験によって確認された。以上のことから、国産小豆における高濃度・高頻度の T-2 トキシン汚染の原因菌は *F. sporotrichioides* である可能性が示唆された。

#### (7) 小豆培養による国産小豆由来株の T-2 トキシン産生性

*F. sporotrichioides* を接種し培養後の小豆中の T-2 および HT-2 トキシン合計濃度を以下に示した。培養 14 日目では、気温 5°C/相対湿度 65% で 0.45 ppm、15°C/65% で 0 ppm、15°C/95% で 1.2 ppm、20-25°C/78% で 0.75 ppm、20-25°C/95% で 8.95 ppm であった。小豆の培養をさらに継続し、培養 60 日目では、5°C/65% で 0.45 ppm、15°C/65% で 0.25 ppm、15°C/95% で 0.1 ppm、20-25°C/78% で 0 ppm、20-25°C/95% で 0 ppm であった。本研究で検討した温湿度 5 条件では、培養 14 日目おいての 20-25°C/95% での産生性が最も高く、産生性が確認されなかった条件は、培養 14 日目おいての 15°C/65%、培養 60 日目おいての 20-25°C/78% および 20-25°C/95% であった。したがって、温湿度条件の変動によって *F. sporotrichioides* の T-2、HT-2 トキシン産生性に相違が生じ、また高湿度条件において T-2 トキシン産生性が高まる可能性が示唆された。

#### D. 考察

本研究の小麦に関する検討において、DURAM 小麦はアメリカ産・カナダ産に関わらず、*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。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。

本研究の小豆に関する検討において、国産小豆検体における *Fusarium* 属菌陽性粒率は輸入小豆よりも有意に高く、さらに国内産の中でも、北海道地方産および関西・中国地方産小豆はその他の地域よりも高い陽性粒率を示す傾向が見られた。産地によって汚染傾向が異なる理由としては、本研究の成果から、T-2 トキシンの汚染濃度は温湿度、特に湿度によって影響されるものであることが示唆されたことから、栽培地や保管時の温湿度の違いによるものである可能性があることが示された。他にも、小豆の栽培種の違いや、ポストハーベスト使用の影響など

も考えられ、今後の継続した検討が必要であると考えられた。

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 *F. sporotrichioides* であることが示唆された。本菌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、温帯地および寒冷地を中心とした世界中の広範にわたることが考えられ、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。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、フモニシン、ゼアラレノンなど様々なフザリウムトキシンを産生することが知られる。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。

最も HT-2 トキシンまたは T-2 トキシン産生性が高かった条件を検討した結果、温度条件では低温 (5°C) を含む 3 条件すべてから T-2 トキシンおよび HT-2 トキシン産生性が確認されたが、95% の高湿度条件であれば 20°C から 25°C の中温の温度条件のほうが産生性はより高くなる傾向が示された。小豆の最適発育温度は 20°C から 25°C とされており、国産小豆の一大産地である北海道十勝地方の小豆栽培時の平均相対湿度は 78.7% である。よって、北海道地方の小豆栽培環境においては *F. sporotrichioides* の発育至適条件が整っており、降雨などにより高湿度条件になった際は更に汚染リスクが高くなることが示唆された。また、低温・低湿度保管時においても T-2 トキシン汚染リスクは有ることが明らかとなった。95% 程度の高湿度条件にさらされた場合には更に汚染リスクが高くなることが示されたことから、低温保管時でも湿度コントロールに留意しなければならないことが明らかとなった。

さらに、培養 60 日目において T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの汚染量が減少される可能性が示唆された。この要因としては、培養中において菌株が均一に発育しなかった可能性や、小豆の含有成分によって T-2 および HT-2 トキシンが別の配糖体 (マスクドマイコトキシン) となった可能性が考えられた。そのため今後は、配糖体の分析や n 数を増やした更なる検討が必要であることが考えられた。小豆検体から検出された *F. sporotrichioides* および FIESC の DAS および NES の産生性についても検討した結果、

両方の菌種において、それぞれ DAS が約 5 割の菌株で、また NES が約 1~2 割の菌株で、産生性が確認された。したがって、国内流通小豆ではトリコテセン系マイコトキシンタイプ A のうち DAS および NES の高濃度汚染も発生するリスクはあると考えられ、今後は DAS および NES の汚染実態調査も実施する必要があると考えられた。

本研究の結果から、国内に流通する小麦および小豆の *Fusarium* 属菌の分布、および HT-2 トキシンまたは T-2 トキシンを中心としたフザリウムトキシンの汚染においては、産地、栽培品種などに起因したと思われる偏りが存在することが明らかとなった。今後、小豆から受けるヒトのフザリウムトキシンの摂取リスクに注視しつつ、より多検体を供試した検討を継続する必要がある。さらにはこの偏りが生じる原因とメカニズムを解明し、汚染を軽減させるための研究を実施する必要があると考えられた。

## 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。

## 参考文献

- 1) 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
- 2) Marasas, W.F.O., Nelson, E.P., T.A Toussoun. (1984) Toxigenic *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press. United States of America.

- 3) 農林水産省- 報告(統計表一覽).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/zyukyu/>
- 4) 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.
- 5) Yoshinari,T., Takeuchi,H., Aoyama,K., et al. (2014) Occurrence of four *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 toxin, and HT-2 toxin, in wheat, barley, and Japanese retail food. *Journal of Food Protection*. 77(11):1940-6.
- 6) Nelson, E.P., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1984) *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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*

## F. 健康危害情報

## G. 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)
- 3) 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、金沢市。2014.12.
- 4) 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.
- 5) 渡辺麻衣子, 吉本優里, 吉成知也, 高橋治男, 小西良子, 寺嶋淳。輸入小麦におけるフザリウムトキシン産生菌の分布に関する研究。第 108 回日本食品衛生学会学術講演会、川崎市。2015.01.
- 6) Maiko Watanabe. Study on distribution of trichothecens-producing *Fusarium* isolated from adzuki beans. 50th Session of the Joint UJNR Panel on Toxic Microorganisms. New Orleans, U.S.A. 2015.1.

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



表 1. 輸入小麦由来の*Fusarium*属分離株の培養液中におけるトリコテセン系マイコトキシンタイプA産生性

A) 菌種別にみたマイコ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>	78%
<i>F. sporotrichioides</i>	89%
<i>F. graminearum</i>	0%
<i>F. acuminatum</i>	0%
<i>F. avenaceum</i>	0%
<i>F. equiste</i>	0%

B) マイコトキシン産生性が確認された菌株とその産生性詳細一覧

同定結果	由来	小麦品種	マイコトキシン			
			DAS	NES	T-2	HT-2
<i>F. poae</i>	UW03	DNS	+	+	N.D	N.D
	UW20	DNS	+	N.D	N.D	N.D
	UW53	DURAM	+	N.D	N.D	N.D
	UW11	品種不明	+	+	N.D	N.D
	UW12	品種不明	+	N.D	N.D	N.D
<i>F. poae</i>	CW13	DURAM	+	N.D	N.D	N.D
	CW14	DURAM	+	N.D	N.D	N.D
<i>F. sporotrichioides</i>	UW29	SWH	+	+	+	N.D
	UW53	DURAM	+	+	+	N.D
	UW53	DURAM	+	N.D	+	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

表 2. 国産小豆由来の*Fusarium*属分離株の培養液中におけるトリコテセン系マイコトキシンタイプA産生性

A) *Fusarium incarnatum/equiseti* species

検体 No.	小豆品種 (赤/白)	小豆産地	マイコトキシン産生陽性株率			
			T-2	HT-2	DAS	NES
25-AD_09	赤小豆	東北地方	0/1	0/1	0/1	0/1
25-AD_10	赤小豆	九州地方	0/2	0/2	2/2	2/2
25-AD_14	赤小豆	北海道地方	0/5	0/5	1/5	0/5
25-AD_19	赤小豆	北海道地方	0/5	0/5	3/5	0/5
25-AD_21	赤小豆	関東地方	0/1	0/1	0/1	0/1
25-AD_22	赤小豆	熊本地方	0/1	0/1	0/1	0/1
Total			0/15	0/15	7/15	3/15

B) *Fusarium sporotrichides*

検体No.	小豆品種 (赤/白)	小豆産地	マイコトキシン産生陽性株率			
			T-2	HT-2	DAS	NES
26-AD_02	白小豆	北海道地方	9/12	0/12	6/12	0/12
27-AD_01	赤小豆	北海道地方	2/2	0/2	2/2	2/2
27-AD_02	赤小豆	北海道地方	0/1	0/1	0/1	0/1
Total			11/15	0/15	8/15	2/15

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

かび毒の発達神経毒性評価

分担研究者 渋谷 淳

東京農工大学大学院 農学研究院 動物生命科学部門 教授

研究要旨

本研究では、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した。乳児が曝露される可能性が高いかび毒として、T-2 トキシン、アフラトキシン<sub>B<sub>1</sub></sub> (AFB<sub>1</sub>)、オクラトキシン A (OTA) を選択し、マウスあるいはラットを用いた発達期曝露実験を行った。離乳時における児動物の海馬歯状回顆粒細胞層下帯 (SGZ) におけるニューロン分化指標を検索した結果、T-2 トキシンは type-1 幹細胞及び type-2 前駆細胞、AFB<sub>1</sub> は type-3 前駆細胞、OTA は type-2 神経前駆細胞を標的とするニューロン新生障害が認められた。障害の機序として、いずれのかび毒においてもアセチルコリン作動性入力の減少が示唆されたが、それぞれ異なるサブタイプのアセチルコリン受容体発現が減少しており、異なる分化段階のニューロンが障害される結果につながったと考えられた。加えて、T-2 トキシン及び OTA では蛋白合成阻害作用を示唆する遺伝子発現増加と対応する分子発現減少、SGZ における酸化ストレス増加が認められ、T-2 トキシンでは幹細胞因子の減少を伴うアポトーシス亢進がニューロン新生障害に関与していると考えられた。遺伝毒性が知られる AFM<sub>1</sub> において、児動物の海馬歯状回では DNA 障害を示唆する変化は検出されなかった。これらの結果から、いずれのかび毒においても複数の機序による児動物のニューロン新生障害が見いだされたが、成熟時の児動物では影響が消失しており、回復性が認められた。この原因として、ニューロン新生の亢進に関わる reelin、脳神経由来因子 (BDNF) の発現増加やグルタミン酸やセロトニンによる神経伝達の増加を示唆する結果が得られていることから、代償性のニューロン新生保護作用が働いたためと考えられた。

児動物のニューロン新生障害に基づいた無毒性量は T-2 トキシンで 1 ppm、AFB<sub>1</sub> で 0.1 ppm、OTA で 0.6 ppm と判断された。T-2 トキシン及び OTA の無毒性量における曝露量は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議による暫定最大 1 日耐容摂取量を設定する根拠となったブタにおける毒性発現用量と比較して、それぞれ 5~15 倍、25~50 倍高い値であった。ニューロン新生障害がみられた乳汁中 AFM<sub>1</sub> 濃度は約 26 µg/kg であり、コーデックス委員会における規制値の約 50 倍の値であった。

## 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、農産物の輸入大国である我が国としては、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。

本研究では乳児が曝露される可能性が高いかび毒を対象とし、平成 25 年度は、穀物汚染が危惧されている T-2 トキシン、平成 26 年度は乳中移行代謝物であるアフラトキシン M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) の乳製品への汚染が危惧されているア

フラトキシン B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)、平成 27 年度は穀物を含む幅広い食品汚染が検出されるオクラトキシン A (OTA) を選択した。これらのかび毒による発達期神経毒性影響を明らかにすることを目的として、ICR マウスあるいは SD ラットを用いた発達期曝露実験を実施し、離乳時ならびに成熟時の児動物海馬歯状回におけるニューロン新生障害に対する影響を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 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、最高用量を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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 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