

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)

総括研究報告書

国際的に問題となる食品中のかび毒の安全性確保に関する研究

研究代表者 小西 良子 (麻布大学)

研究要旨

地球温暖化や異常気象により世界的に農作物のかび毒被害が深刻になってきている。一部の調査では、世界で生産される農作物の25%以上が規制値以上のかび毒に汚染されているとの報告がある。このような背景から、FAO/WHOでは、国際的なリスク評価機関(JECFA)およびリスクマネジメント機関(CODEX委員会)を設立し、かび毒による健康被害の防止および食品の公正な貿易の確保を行っている。わが国はコーデックス委員会の加盟国であるため、コーデックス規格が設定された場合には、適切に対応できる体制をとっておく必要がある。2016年にJECFAでは、新規にステリグマトシスチン(STC)とジアセトキシシルペノール(DAS)のリスク評価を行った。すなわち、我が国は早急にこれらのかび毒に対し、我が国の実態調査を速やかにを行い現状を知ること、日本でのリスク評価に備え、最新の毒性評価を行えるデータを取得あるいは収集しておくこと、対象かび毒の産生菌に対する検査技術を開発し、早期発見と予防に努める施策に貢献することを行うことが求められる。

本研究事業ではSTCと4,15-DASの実態調査に適した分析法を確立し、その妥当性の評価を行った。その後STCと4,15-DASについて日本に流通する食品を対象に予備汚染実態調査を行った。その結果STCは穀類を中心に幅広い食品で汚染が生じていることが確認され、4,15-DASはハト麦でのみ陽性検体が認められた。毒性評価では2006年に起きたブラジルでの米を原因とするかび毒食中毒事例を受けて、その原因物質であるシトリオビリジンの毒性を評価した。米は主食であるため乳児が曝露される可能性が高いことから、発達神経毒性影響を評価した。母動物と児動物への影響は曝露終了時において10ppmで認められた。この結果から児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は母動物の摂取量で3ppm(0.42-1.51mg/kg体重/日)と判断された。次に食品に着生しているかびを培養によらずに検出する方法の検討では、食材に付着したカビ由来のDNAを回収し、非特異的な増幅を回避しながらSTC産生能を持つ菌種のみを検出する技術的基盤を確立することができた。以上の知見を踏まえ、件数、食品目を増やしての実態汚染調査の実施、STCまたはDASおよび我が国で毒性評価が求められているかび毒を用いての発達神経毒性の検討、STC産生能を持つ菌種のみを検出する技術をさらに発展させ、DAS産生菌への応用に展開していく予定である。

A. 研究目的

地球温暖化や異常気象により世界的に干ばつや洪水等が起こっているが、それに伴って農作物のかび毒被害が深刻になってきている。かびは土壌を由来とするが、農作物が干ばつなどでストレスを受け本来持っているかびへの抵抗力が落ちるとカビの寄生や病気などが起こる確率が高くなる。また圃場での収穫の際に付着したかびが貯蔵中に増殖し、かび毒を植物内に蓄積することが、近年のかび毒汚染農作物の増加する原因と考えられる。一部の調査では、世界で生産される農作物の25%以上が規制値以上のかび毒に汚染されているとの報告がある。

このような背景から、かび毒のような自然毒は、世界的に防除するシステムをとらなければ安全な食品を流通させることができないため、FAO/WHOを中心に、かび毒に対するリスクアセスメントを行いリスクマネジメントの一環として国際食品規格（コーデックス規格）の策定等を担っている。具体的には、かび毒のリスクアセスメントは合同食品添加物専門家会議（JECFA）で行われ、毒性評価、摂取量評価、曝露評価等を経て、一日耐容摂取量を設定する。それらの結果をコーデックス委員会の食品汚染部会に提出しその規格の素案が検討され、その後総会で採択されコーデックス規格が決まっていく。現在コーデックス委員会の加盟国は日本を含めて187カ国であるので、コーデックス委員会で採択された規格は消費者の健康の保護および食品の公正な貿易の確保のための重要な役割を担っているといえる。

現時点でのJECFAおよびそれと並んで国際リスク評価機関として認識されている欧州食品安全機関（EFSA）がすでにリスク評価および実態調査が終わっているかび毒（今後予定も含む）およびコーデックス規格が策定されているかび毒を表1に挙げた。JECFAでリスク評価されたものは、調整に時間がかかるものはあるが、

ほとんどコーデックス規格となり、世界貿易のスタンダードとなっていることがわかる（表2）。もし日本がコーデックス規格に適切に対応していなかったら、世界貿易で規格外とされた粗悪食品が輸入食品として国内に流通する恐れがあることとなる。

そのため、我が国での消費者の健康の保護を推進するには、コーデックス規格に適切に対応できる体制をとっておく必要がある。2016年にJECFAでは、新規にステリグマトシスチン（STC）とジアセトキシシルペノール（DAS）のリスク評価を行った。それぞれのリスクプロファイルは表3に示したが、STCは天然物最強の発がん物質といわれるアスペルギルス属の産生するかび毒アフラトキシンの前駆体であり、遺伝毒性を有している化合物である。そのため、できる限り摂取をしないことが推奨されており、その曝露評価には発がん性物質のそれに用いられるベンチマークドーズ（BML₁₀）から推定されたマージンオブエクスポージャー（MOE）が使われる。一方DASは、フザリウム属が産生するトリコテセン系かび毒で、発がん性はないが、免疫毒性、消化器障害を引き起こす。特に1950年代にロシア（旧ソ連）で多くの死者を出した食中毒（ATA症：alimentary toxic aleukia）の原因物質とされるT-2トキシンと同様の構造をもち、毒性も類似していると考えられている。T-2トキシンは、すでにコーデックス規格があるトリコテセン系かび毒、デオキシニバレノールよりも20倍ほど毒性が強い化合物である。EUではSTCおよびDASを対象に実態調査を行っており、穀類等に汚染していることが報告されている。イタリアではSTCがコメに汚染が頻度高くあることが報告されている。中国ではSTCがビールに汚染していることが明らかになっている。これらのかび毒は、おもに輸入食品としてすでに我が国の市場に流通していると考えられる。

すなわち、我が国は早急に JECFA のリスク評価項目となるかび毒に対し、実態調査を速やかに行い、現状を知ること、日本でのリスク評価に備え、最新の毒性評価を行えるデータを取得あるいは収集しておくこと、対象かび毒の産生菌に対する検査技術を開発し、早期発見と予防に努める施策に貢献することなどを行う必要がある。

本研究事業では、この3点を柱とし以下の分担研究を実施することとした。本研究事業は三年間の研究期間を設定しており、その初年度の成果を報告するものである。

B. 研究方法

1)STC と DAS の試験法の妥当性確認と予備実態調査

(1) STC の予備汚染実態調査

試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）精製はイムノアフィニティーカラム（IAC、堀場製作所社製 AFLAKING STC）を用いた。測定は LC-MS/MS で行った。コーヒーについては、抽出液を多機能カラム MultiSep 226 AflaZon+（Romer Labs 社製）で前処理した。

回収率はそれぞれの食品の中で汚染がないものを選び、0.5 µg/kg 及び 5 µg/kg となるよう STC を添加し、抽出、定量を行って算出した。

(2) 4,15-DAS の汚染実態調査

は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）用い、多機能カラム（昭和電工社製 Autoprep MF-T 1500）で精製した。測定は LC-MS/MS で行った。

回収率はそれぞれの食品の中で汚染がないものを選び、5 µg/kg 及び 50 µg/kg となるよう STC を添加し、抽出、定量を行って算出した。

(3) 試験法の妥当性評価のためのコラボラティブスタディ

STC の分析法

国内の 8 分析機関にそれぞれ以下のものを配布し、プロトコールに従った分析を依頼した（参

考資料）。

4,15-DAS の分析法

国内の 8 分析機関にそれぞれ以下のものを配布し、プロトコールに従った分析を依頼した（参考資料）。

2) シトロオピリジンの発達神経毒性評価

妊娠 ICR マウス（妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー）を、一群 10 匹ずつとして計 4 群に分け、シトロオピリジンを 0、1、3、10 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。シトロオピリジンの乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 10 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、シトロオピリジンの濃度を LC-MS/MS 法により測定した（日本食品分析センター）。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、体重、摂餌量および摂水量を週に 2 回の頻度で測定した。混餌飼料の調製は 2 週間を超えない頻度で行った。各群雄 15～22 例、雌 10 例の児動物は、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、固定し切片の作成に使用した。切片は、免疫染色を行った。アポトーシス活性の指標として TUNEL 染色を行った。

母動物は児動物と同じく分娩後 21 日に、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、固定し切片の作成に使用した。

残りの児動物は出生後 77 日までシトロオピリジンを含まない通常飼料により飼育し、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を週に 1 回の割合で測定した。出生後 77 日に雄児動物も同様に病理切片を作成した。

母動物の体重ならびに器官重量、摂餌量、摂水量は母動物ごとに集計し、群平均および標準偏差を算出した。児動物の体重および臓器重量、免疫組織化学染色における陽性細胞のカウント数については児動物の群平均ならびに標準偏差を、統計学的解析は、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は Dunnett、不等分散の場合は Steel の方法により検定を行った。

出生後 21 日目および 77 日目の 0 並びに 10 ppm 群のメタカーン固定脳標本を用いて、total RNA を抽出し real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR、STCepOnePlus Real-time PCR SySTCem、Life Technologies)により遺伝子発現解析を行った。

3) 培養によらないカビ毒産生菌種検出法の開発

食品および環境由来の *Aspergillus section Versicolores* 分離株 37 株を供試した。また、米は S 地区産および H 地区産の玄米を用いた。

ポテトデキストロース液体培地 (PDB) で培養した菌系体から DNA 抽出を行った。DNA 抽出は SDS 法(参考文献 1)または DNeasy plant mini kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコルに従って行う方法で行った。抽出した DNA は使用まで -20 で保存した。

β -tubulin 遺伝子部分配列を決定し、これまで報告されている *A. section Versicolores* に含まれる種の登録配列と共に配列比較を行った。

シーケンシングは ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて行い、塩基配列を決定した。決定した供試菌株 37 株の塩基配列と登録配列をアライメントし、近隣結合法により系統樹を作製した。

米付着カビ孢子からの直接 DNA 抽出は、玄米 500 mg (20 粒程度) から、市販抽出キット (NucleoSpin Soil; TaKaRa) を用い、DNA を抽出した。

特異性の高い STC 産生菌種検出 PCR 法の開発は、それぞれの種に適合するプライマーを設計し、HiDi DNA polymerase (myPOLLS Biotec GmbH) を用いて PCR を行った。

C. 研究結果

1) STC および DAS の予備汚染実態と分析法妥当性試験

(1) STC および DAS の予備汚染調査

穀類及びその加工品 8 品目、豆類及びその加工品 3 品目と木の実 2 品目の合計 233 検体について STC 汚染を調べ、ライ麦、コーヒー、小麦粉 (国産)、エン麦、雑穀米、米及びアーモンドから検出された。平均濃度が最も高かったのはライ麦とハト麦の 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、続いてコーヒーの 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はライ麦の 7.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

穀類 4 品目と小豆の合計 102 検体について 4,15-DAS の汚染を調べ、ハト麦でのみ陽性検体が認められた。ハト麦における平均濃度は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大濃度は 137 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

(2) STC および DAS 分析法の妥当性試験

STC の分析法および 4,15-DAS の分析法

各機関から得られたデータをまとめ、統計学的パラメーターを算出した結果を、本事業で設立した第 3 者評価機関である「かび毒試験法評価委員会」(表 4) で審議された。その結果、いずれの試験法も妥当性は担保されたが、今後通知法等で用いられる場合には、前処理カラムのバラエティを増やす必要があること、プロトコルの表示の仕方を検討する必要があることなどが指摘された。

2) シトロオビリジンの発達毒性評価結果

体重、摂水量、摂餌量では、母動物は、摂餌量の低値が 10 ppm 群で、摂水量の高値が 3 ppm 群で分娩後 21 日目に認められた。児動物は雌雄ともにシトロオビリジンによる影響と思われる体重の変化は認められなかった。着床数、産仔数では影響は認められなかった。臓器重量では、影響は認められなかった。

病理学的変化および免疫組織学的変化では、母動物の剖検時における組織学的な所見として、肝臓における肝細胞壊死が全投与群で認められ、統計学的に有意な発生頻度の増加が 10 ppm で認められた。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、SGZ にお

いて PCNA (細胞増殖活性マーカー) 陽性細胞が 10 ppm で統計学的に有意に増加した。また、歯状回門部では、GABA 性介在ニューロンである CALB1 陽性細胞が 10 ppm で減少したが、そのほかでは変動を認めなかった。

遺伝子発現解析では、出生後 21 日目の児動物の脳では、一部の遺伝子発現で有意に発現減少、または有意に発現増加が認められた。

3) 培養によらないカビ毒産生菌種検出法

(1) STC 産生菌の検出法

STC 産生能を持つ菌種を PCR 増幅の有無で識別できるプライマーをデザインすることを目的に、 β -tubulin 遺伝子塩基配列を多数収集し、STC 産生能を持つ菌種の系統のみに共通する特徴的な塩基配列の検出を行った。その結果、全菌株間で 108 サイトにおいて多型が検出された。

今回対象とした *A. secton Versicolores* 14 菌種の内、STC 産生の報告がある 11 菌種にのみ共通し、STC 産生能の報告がない 3 菌種とは異なるサイトは検出されなかった。しかし、菌種ごとに特徴的な変異を示すサイトが複数検出された。

(2) 米付着カビ胞子からの直接 DNA 抽出法の開発

食材に付着したカビ胞子を培養することなく直接検出することを目的に、玄米に付着したカビからの DNA 検出方法を検討した。産地の異なる米 2 検体から抽出した DNA を鋳型に β -tubulin 遺伝子部分配列の増幅を試みた。その結果、国内 S 地区産の米について予想される産物長の増幅が確認され、玄米付着カビ胞子から直接 DNA を抽出でき、PCR によりカビを検出することが可能であると考えられた。

つぎに *A. jensenii* および *A. versicolor* を用い、それぞれの菌種を標的とする β -tubulin 遺伝子増幅用 PCR プライマーセットをデザインして実験を行った。その結果、標的の菌種 DNA に

おいては目的サイズの増幅が観察されたのに対し、プライマーの 3'末端の 1 塩基が異なるカビの DNA から増幅が起らず、標的カビ以外の DNA の混入があっても菌種特異的な検出が可能であることが確認できた。

D. 考察

本事業の目的である実態調査を速やかに行い、現状を知ることが目的に STC および DAS の汚染実態調査を計画しているが、その前に測定に用いる分析法の妥当性を評価することが必要である。近年、FAO/WHO では、加盟国で行われている実態調査に関して、GEMS/FOOD へのデータ提供が求められている。この統計的システムによって、世界的な摂取量調査が可能となり、より適正なコーデックス規格策定に貢献する。わが国でもその責務を担っていることから、実態調査に用いる法が妥当性のあるものであることを証明する必要がある。そこで、今後実態調査を行う分析機関 8 機関の協力を得て、AOAC および IUPAC が提唱している妥当性試験方法に則り、妥当性試験を行った。さらにその結果を第 3 者の専門家会議である「かび毒試験法評価委員会」により、評価を行った。その結果、STC および DAS の分析法は、妥当性を評価するために必要なクライテリアをすべて満たしており、妥当性は担保できるという評価であった。

この評価を受けて、日本における STC および DAS の汚染実態については情報がほとんど得られていなかったため、本分析法により国内に流通しているいくつかの食品を用い、実態調査を行う前の予備実態調査を実施した。その結果、麦類、コーングリッツ、米類などの穀類やコーヒー、アーモンドにおいて STC 陽性検体が認められた。小麦粉については、陽性率は国産のほうが高かった。EFSA から 2015 年に報告されたヨーロッパでの調査の結果では、小麦粉 85

検体における STC の検出率は 4%で、最高濃度は 0.66 µg/kg であった。国産の小麦粉における STC の汚染頻度と最高濃度はともにヨーロッパの結果よりも高く、小麦の STC 汚染には地域差が生じている可能性が考えられた。米において陽性率は 30%であったが、最高濃度は 0.1 µg/kg で、小麦やライ麦と比較すると汚染レベルは低かった。ヨーロッパでの実態調査では我々の結果よりも高い汚染レベルであった。穀類以外ではコーヒーにおいて STC が検出されたが、STC 以外にもアフラトキシン類やオクラトキシン A が検出されることが知られており、複合汚染が生じている可能性がある。

4,15-DAS の汚染実態では、その生産菌であるフザリウム属が感染しやすい穀類と 4,15-DAS の類縁体である T-2 トキシンが高頻度で検出された小豆を対象に調査を行った。その結果、ハト麦においてのみにおいて陽性検体が認められた。

次に毒性評価であるが、2006 年に起こったコメに汚染するかび毒（黄変米毒）の一つであるシトロピリジンがブラジルで食中毒の原因となった事例を考慮し、米主食国として、シトロピリジンの毒性評価を優先して今年度は行った。

シトロピリジンのマウスに対する発達期曝露後の雄児動物を対象とした海馬歯状回における免疫組織化学的解析では、出生後 21 日目で、10 ppm において PCNA 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、歯状回での遺伝子発現解析において、0 ppm 対照群と 10 ppm 群の比較において、10 ppm 群で顆粒細胞系譜の神経幹細胞・神経前駆細胞指標のうち、*Sox2* (type-1 神経幹細胞 ~ type-2b 神経前駆細胞)、*Eomes* (type-2b ~ type-3 神経前駆細胞)、*Dcx* (type-2b 神経前駆細胞 ~ 未熟顆粒細胞) の発現増加及び神経新生の促進に関わる *Bdnf* とグルタミン酸作動性入力の種類受容体の発現増加が認められた。一方、

歯状回門における GABA 性介在ニューロンのうち、CALB1 陽性ニューロン数が 10 ppm 群で減少を示した。また、介在ニューロン指標遺伝子である *Pvalb* の発現低下も認めている。CALB1 陽性ニューロン及び PVALB 陽性介在ニューロンは、神経前駆細胞の分化促進に機能することが知られていることから、顆粒細胞系譜の分化に抑制がかかったため、それぞれの前駆細胞における前駆細胞指標の発現増加を示した可能性が示唆された。また、コリン作動性入力受容体、NMDA 型グルタミン酸受容体、グルタミン酸トランスポーターをコードするそれぞれの遺伝子の発現量低下も顆粒細胞系譜の分化抑制に寄与しているものと考えられた。

出生後 77 日目では、いくつかの遺伝子発現の減少が認められた。また、グルタミン酸受容体の一つである *Grin2d* 以外の遺伝子の発現が 21 日目と逆の変動を示した。このことから、曝露終了時に観察された影響がフィードバック機序により打ち消される結果と判断され、離乳時の障害が恒常性維持機構により修復されることが示唆された。また、*Grin2d* の遺伝子発現が離乳時から持続して減少を示していたことから、その蛋白質である NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2D は GABA 性介在ニューロンに分布することが知られており、得られたデータからは、シトロピリジンの神経新生に与える影響は不明であるものの、不可逆的影響であることが示唆された。

3 つ目として、対象かび毒の産生菌に対する検査技術を開発し、早期発見と予防に努める施策に貢献することを目的として、培養を経ずにカビ毒産生菌を検出できる方法の開発を行った。我が国のかび毒検査は、規制のあるかび毒に関して輸入時点の理化学的検査が行われているが、その時点で陰性でも、その後市場で貯蔵された場合にはかびが存在すればかび毒は生産される可能性は否定できない。特に STC は貯蔵菌とし

て問題となるかびが産生するものであるため、かびを検査することが重要になってくる。しかし通常カビの培養には1 - 2週間かかり、輸入食品がカビに汚染されているかが判明するころにはすでに流通していることが多い。そこで、食品から直接かび毒産生菌を検出する技術が求められている。

今年度はSTCに着目し、その代表的産生菌である *Aspergillus versicolor* とその近縁種において、STC産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。

STC産生菌種と非産生菌種には系統の偏りがあるため、STC産生菌種のみの特徴的な塩基配列の検出をめざし、 β -tubulin 遺伝子部分配列の塩基配列比較を行った。STC産生菌種特異的な塩基配列を検出することはできなかったが、菌種特異的なサイトが複数検出されたため、 β -tubulin 遺伝子部分配列を基に、PCRの増幅の有無で菌種を識別可能な系を構築できる可能性が示された。今後、別な遺伝子を対象として、STC産生菌種のみ共通する特徴的な塩基配列の検出を行う予定である。

次に、培養を経ずに食材に付着したカビを直接検出する方法の検討を行うため、玄米に付着するカビからのDNA抽出を試み、DNA抽出法として有効な方法を見出した。一方で、別な検体においては、非特異的な増幅と思われる増幅産物が検出されたため、PCRによる検出法には改良が必要であると考えられた。そこで種間で塩基配列の異なる部位にプライマーを設計し、本酵素でのPCRを行った。その結果、標的とする菌種のみで目的とする産物長の増幅が確認されたのに対し、1プライマー認識配列あたり3'末端の1塩基のみが異なる菌種のDNAからは増幅が起こらず、また非特異的な増幅も確認されなかった。このことから、標的とするカビ以外のDNAの混入があっても特異的な検出が可能であることが確認され、培養を経ずに検出す

る方法の開発の重要な知見が得られた。

E. 結論

STCと4,15-DASの実態調査に適した分析法を確立し、その妥当性の評価を行った。その後STCと4,15-DASについて日本に流通する食品を対象に予備汚染実態調査を行った。STCは穀類を中心に幅広い食品で汚染が生じていることが確認され、4,15-DASはハト麦でのみ陽性検体が認められた。

ブラジルでの食中毒事例を受けて、シトリオビリジンの毒性を評価した。コメは主食であるため乳児が曝露される可能性が高いことから、発達神経毒性影響を評価した。母動物と児動物への影響は曝露終了時において10ppmで認められた。母動物では10ppmで肝細胞の壊死がみられ、児動物では曝露終了時に10ppmで脳の海馬歯状回のSGZにおける細胞増殖の増加と神経新生制御系の発現変動を特徴とする神経新生障害を示唆する変化が認められた。これらの所見は成熟後には曝露終了時に観察された影響がフィードバック機序により打ち消される結果と判断され、離乳時の障害が恒常性維持機構により修復されることが示唆されたが、NMDA型グルタミン酸受容体NR2Dをコードする *Grin2d* の遺伝子発現は不可逆的である可能性が示唆された。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は母動物の摂取量で3ppm(0.42–1.51mg/kg体重/日)と判断された。

食品に着生しているかびを培養によらずに検出する方法の検討では、食材に付着したカビ由来のDNAを回収し、非特異的な増幅を回避しながらSTC産生能を持つ菌種のみを検出する技術的基盤を確立することができた。今後、 β -tubulin 遺伝子のより広範な配列比較および別のターゲット遺伝子における配列比較を行い、STC産生菌種にのみ共通する特異的な塩基配列を検出することで、食品を汚染するSTC産生菌

の迅速検出法を確立できると考えられる。

F. 参考文献

- 1) Battilani P, Costantini L.G., Dossena A., Gullino M.L., Marchelli R., Galaverna G., Pietri A., Dall'Asta C., Giorni P., Spadaro D., Gualla A., 2009. Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants. (CFP/EFSA/CONTAM/2008/01)
- 3) Codex. 2003. CAC/RCP 51-2003. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Mycotoxin Contamination in Cereals, including Annexes on Ochratoxin A, Zearalenone, Fumonisin and Tricothecenes.
- 4) Codex (.2004). CAC/RCP 54-2004. Code of Practice on Good Animal Feeding.
- 5) Codex. (2015a). CX/CF 15/9/3-Add.1. Matters of Interest Arising from FAO and WHO (Including JECFA) STCatus Report on the FAO/WHO Project on Mycotoxins in Sorghum Supported by The Codex TruSTC Fund.
- 6) Codex. (2015b). REP15/CF. Report of the Ninth Session of the Codex Committee on Contaminants In Foods.
- 7) Abd Alla EA, Metwally MM, Mehriz AM and Abu Sree YH, (1996). Sterigmatocystin: incidence, fate and production by *Aspergillus versicolor* in Ras cheese. *Nahrung*, 40, 310-313.
- 8) Betina V, (1989). *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects (Bioactive Molecules, Vol. 9)*. Elsevier Science, 437 pp.
- 9) Bokhari F and Aly M, (2009). Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia. *Advances in Biological Research*, 3, 71-78.
- 10) EFSA, (2013). Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed, *EFSA Journal*, 2013;11(6):3254.
- 11) IARC, (1976). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Volume 10. Some naturally occurring substances*, p. 245-251.
- 12) IARC, (1987). *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Supplement 7*, 440 pp.
- 13) JECFA. (2016). JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES Eighty-third meeting (SUMMARY AND CONCLUSIONS) . <http://www.who.int/foodsafety/publications/JECFA83-Summary.pdf?ua=1>(2017.3月現在).
- 14) Maekawa, A., Kajiwara, T., Odashima, S., Kurata, H., (1979). Hepatic changes in male ACI/N rats on low dietary levels of Sterigmatocystin. *Gann*. 70:777-781.
- 15) H.G.J. Mol, Pietri, A., MacDonald, S.J., Anagnos Copoulos, C., Spanjere, M.,(2015). Survey on Sterigmatocystin in food. *EFSA Journal*.12(3)<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2015.EN-774/pdf>(2017.3月現在)
- 16) Zhao Y., Huang J., Ma L., Liu S., Wang F., (2017) Aflatoxin B1 and Sterigmatocystin survey in beer sold in China. *Food Addit Contam Part B Surveill*. 10(1):64-68.
- 17) Lima H.C., Porto E.A., Marins J.R., Alves R.M., Machado R.R., Braga K.N., de Paiva FB, Carmo GM, Silva e Santelli AC, Sobel J.(2010). Outbreak of beriberi in the state of

Maranhão, Brazil: revisiting the mycotoxin aetiologic hypothesis. *Trop Doct.*, 40(2):95-97.

18) Rosa C.A., Keller K.M., Oliveira A.A., Almeida T.X., Keller L.A., Marassi A.C., Kruger C.D., Deveza M.V., Monteiro B.S., Nunes L.M., Astoreca A., Cavaglieri L.R., Direito G.M., Eifert E.C., Lima T.A., Modernell K.G., Nunes F.I., Garcia A.M., Luz M.S., Oliveira D.C., (2010). Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhão State, Brazil. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 27(2):241-248.

G. 研究業績

【論文発表】

なし

【学会発表】

- 1) 吉成知也、竹田名菜水、寺嶋淳、小林直樹、小西良子：発がん性を有するカビ毒ステリグマトシスチンの我が国に流通する食品における汚染実態、第 112 回日本食品衛生学会学術講演会 (2016.10)
- 2) 小林直樹：様々な由来の *Aspergillus versicolor* におけるステリグマトシスチン産生性に関する分子生物学的検討。カビ毒研究連絡会 滋賀 (2016.8)
- 3) 小林直樹、渡辺麻衣子、吉成知也、矢内美幸、杉浦義紹、高橋治男、寺嶋淳、小西良子：*Aspergillus versicolor* の系統分類とステリグマトシスチン産生能の検討。日本進化学会第 18 回大会 (2016.8)
- 4) 田形卓巳、白鳥望美、杉浦義紹、小林直樹、小西良子：*Penicillium citreonigrum* 株間におけるシトレオビリジン産生能の比較と毒素産生条件。第 37 回日本食品微生物学会学術総会 (2016.9)
- 5) 鈴木佑奈、宮原彩花、吉成知也、小林直樹、小西良子、寺嶋淳、後藤慶一、高橋治男、渡辺麻衣子：発酵食品から分離された黒麹菌と近縁菌の系統分類学的研究。第 37 回日本食品微生物学会学術総会 (2016.9)
- 6) 白鳥望美、滝埜昌彦、遠藤治、Phitsanu Tulayakul、杉浦義紹、小林直樹、小西良子：エンドファイティックなカビ *Penicillium brocae* による汚染米の安全性について。第 112 回日本食品衛生学会学術講演会 (2016.10)
- 7) Watanabe, M.: Evaluation of molecular markers for identification of *Aspergillus* and *Fusarium* spp. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
- 8) Suzuki, Y., Takahashi, H., Yoshinari, T., Kobayashi, N., Sugita-Konishi, Y., Terajima, J., Goto, K. and Watanabe, M.: Phylogenetic Studies on saccharifying activity and fumonisin production in the STCrains of Kuro-koji molds and their relatives isolated from fermented foods. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
- 9) Shiratori, N., Takino, M., Endo, O., Tulayakul, P., Kobayashi, N. and Sugita-Konishi, Y.: Risk potential of rice grains contaminated with an endophytic fungus *Penicillium brocae*. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
- 10) Shiratori, N., Takino, M., Endo, O., Tulayakul, P., Kobayashi, N. and Sugita-Konishi, Y.: Risk potential of rice grains contaminated with an endophytic fungus *Penicillium brocae*. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)

表1. かび毒の国際的な動向

年代	JECFA	EFSA	日本	CODEX
すでに評価済または実態調査済	<ul style="list-style-type: none"> ・総アフラトキシン(落花生) ・アフラトキシン M1 ・T-2/HT-2 トキシン ・ゼアラレノン ・パツリン ・総アフラトキシン (tree nuts) ・オクラトキシン A ・デオキシニバレノール ・フモニシン ・ステリグマトシスチン (2016) ・デアセトキシシルペノール (2016) 	<ul style="list-style-type: none"> ・デオキシニバレノール ・マスクドデオキシニバレノール ・フモニシン ・オクラトキシン A ・アフラトキシン M1 ・T-2/HT-2 トキシン ・ゼアラレノン ・ビューベリシン ・エンニアチン ・ニバレノール ・アルタナリオール ・ステリグマトシスチン 	<ul style="list-style-type: none"> ・総アフラトキシン ・アフラトキシン M1 ・パツリン ・オクラトキシン A ・デオキシニバレノール/ニバレノール ・フモニシン (審議中) 	<ul style="list-style-type: none"> ・総アフラトキシン(落花生) ・アフラトキシン M1 ・パツリン ・総アフラトキシン (tree nuts) ・オクラトキシン A ・デオキシニバレノール ・フモニシン
これから評価予定		<ul style="list-style-type: none"> ・デオキシニバレノール、その代謝物およびマスクドデオキシニバレノール ・モリニフォルミン ・デアセトキシシルペノール 		

表2. 諸外国でのかび毒の規制

かび毒	Codex	USA	EU	日本
総アフラトキシン (AF)	総 AF ・木の実類(加工用、直接消費用) ・落花生(加工用) ・乾燥イチジク(直接消費用)	総 AF 全ての食品	総 AF & AFB1 木の実類、落花生、穀類・穀類製品、乾燥果実、香辛料 AFB1 穀類を主原料とする乳幼児用食品	総 AF 全ての食品
アフラトキシン M (AFM)	AFM1 乳	AFM1 乳、低脂肪乳、スキムミルク	AFM1 乳、乳児用調製乳	AFM1 乳
オクラトキシン A (OTA)	穀類	-	穀類、干しブドウ、コーヒー、ワイン、ブドウジュース、乳幼児用食品、香辛料、甘草	未定 (食品安全委員会のリスク評価済)
デオキシニバレノール(DON)	・乳幼児向け穀類ベースの食品 ・小麦、とうもろこしや大麦殻出来た小麦粉、セモリア、 ・コーンミールやフレーク ・未精麦の穀粒(小麦、トウモロコシ、大麦)	小麦製品 (製粉前は適用外)	穀類・穀類製品、穀類を主原料とする乳幼児用食品	玄麦(暫定) (食品安全委員会のリスク評価済)
フモニシン (FB1, FB2, FB3)	FB1+FB2 の合計 ・未加工のとうもろこし穀粒 ・コーンフラワー及びコーンミール	ガイドライン FB1+FB2+FB3 の合計 ・脱胚芽された乾式製粉のトウモロコシ製品 ・乾式製粉のコーンブラン ・マーサ製造用の精選したトウモロコシ ・ポップコーン用の精選したトウモロコシ	FB1+FB2 の合計 ・未加工トウモロコシ ・直接消費用のトウモロコシ及び直接消費用のトウモロコシ加工品 ・トウモロコシ由来の朝食用シリアル及コーンスナック ・乳幼児向けトウモロコシ由来加工食品及びベビーフード ・	未定 (食品安全委員会のリスク評価中)

パツリン	りんご果汁	アクションレベル りんご果汁、りんご濃縮還元果汁及びそれらの加工品：	<ul style="list-style-type: none"> ・果汁飲料、濃縮果汁及びネクター ・りんご及び濃縮りんご果汁を原料とするスピリッツ、サイダー及び発酵飲料 ・直接消費用の固形りんご製品（コンポート、ピューレを含む） ・乳幼児用のりんご果汁及び固形りんご製品 ・乳幼児用の穀類製品を除くベビーフード 	りんご果汁
------	-------	---------------------------------------	---	-------

表3 ステリグマトシスチンとデアセトキシスペリノールのリスクプロファイル

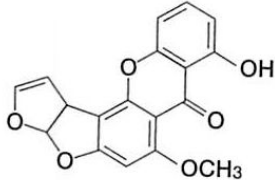
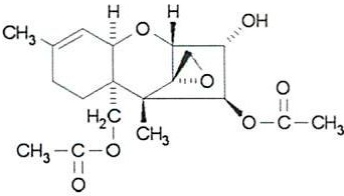
	ステリグマトシスチン (STC)	デアセトキシスペリノール (DAS)
構造	 <p>molecular weight 324.28 Da</p>	 <p>molecular weight 366.4 Da</p>
化学式	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	C ₁₉ H ₂₆ O ₇
CAS	10048-13-2	2270-40-8
産生菌	24 種以上の <i>Aspergillus</i> , <i>Emercella</i> , <i>Bipolaris</i> , <i>Botryotrichum</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Moelleriella</i> , <i>Monocillium</i> , <i>Moelleriella</i> , <i>Podospora</i> および <i>A. tardus</i> に関連性の高い固有の <i>Penicillium</i> 属, <i>P. inflatum</i> などの多くの系統発生的、表現的に異なる真菌属	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. verticillioides</i> (syn. <i>F. moniliforme</i>), <i>F. langsethiae</i> , <i>F. chlamydosporum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. compactum</i> , <i>F. venenatum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. graminearum</i> など
評価履歴	JECFA で初めて評価される	CCCF のリクエストにより JECFA で初めて評価される
毒性（発がん性）	アフラトキシン B1 の前駆体であるため、発がん性（遺伝毒性）がある（IARC グループ 2B）。標的臓器は肝臓 発がん性に関する最も低い BMDL BMDL ₁₀ 0.16 mg/kg bw/day	トリコセセン系かび毒であり、T-2/HT-2 と同じタイプ A に属する。構造が似ているので、毒性も類似性があると判断されている。相加作用の実験から T-2 トキシンより弱い毒性と考えられている。 限られた急性毒性の報告あり 慢性毒性、生殖毒性のデータはなし
NOAEL	設定できず	0.03 mg/kg bw per day
PMTDI	算出しない	0.06 µg/kg bw (T-2+HT-2+DAS)
汚染状況	我が国では飼料の麦類から検出された。貯蔵米から検出されたこともある。今回の予備実態調査では、小麦粉、エン麦、ライ麦、ハト麦、雑穀米、コーングリッツ、アーモンド及びコーヒーへの汚染があった。	麦類が主な汚染食品 農水省の調査ではインゲン豆から検出された。 今回の予備実態調査では、我が国に流通しているハトムギから検出された。

表4. カビ毒試験法評価委員会

公式 Web <http://www.nihs.go.jp/dmb/4th/sample5.html>

委員会名簿

• 2016～2018年度

委員長	中島 正博 (名古屋市衛生研究所)
分析法委員	田中 敏嗣 (元 神戸市環境保健研究所)
分析法委員	永山 敏廣 (明治薬科大学)
分析法委員	田端 節子 (東京都健康安全研究センター)
分析法委員	青山 幸二 ((独)農林水産消費安全技術センター(FAMIC))
バリデーション委員	森 曜子 (公社)日本食品衛生協会
バリデーション委員	藤田 和弘 (一財)日本食品分析センター
作業部会	小西 良子 (麻布大学)
作業部会	吉成 知也 (国立医薬品食衛生研究所)

事務局は作業部会も兼ねており、分析法のプロトコールなどのコラボラティブスタディに用いる試料の調製、配付・回収などを行う。事務局は評価には関与しない。

評価までの流れ

1. 委員会に属する作業部会委員がプロトコール案を作成し、委員会に提出します。
2. 委員会はプロトコールのプレビューをし、必要な修正を申し出ます。
3. 作業部会はプロトコールを修正し、国立医薬品食品衛生研究所のWebページに掲載し、一般からのパブリックコメントを求めます。
4. パブリックコメントを委員会が検討し、必要であれば適切な修正を申し出ます。これらの修正がなされたプロトコールを最終的なものとしてWebページに掲載し、一般からのコラボラティブスタディ参加機関を募ります。
5. 作業部会が試料などを調製し、コラボラティブスタディを実施します。
6. 結果を作業部会がまとめ、委員会に提出します。
7. 委員会は、その結果をもとに分析法の妥当性の有無を評価します。
8. 妥当性があると評価された方法はWebページに公開されます。

分析法の紹介

麦類とその加工品中のデオキシニバレノール、ニバレノール及びそれらの配糖体の分析法(2014年5月掲載)

- ・プロトコール
- ・英語論文 Yoshinari et al. J Agric Food Chem. 2014; 62(5): 1174-80.

小麦中のデオキシニバレノール、ゼアラレノン、T-2トキシシン、HT-2トキシシンの分析法(2013年4月掲載)

- ・プロトコール
- ・コラボラティブスタディの結果

とうもろこし中のフモニシン類の分析法(2012年5月掲載)

- ・プロトコール
- ・コラボラティブスタディの結果
- ・英語論文 Yoshinari et al. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2013;54(4):266-276.

小麦中のアセチル化デオキシニバレノールの分析法(2012年5月掲載)

- ・プロトコール
- ・コラボラティブスタディの結果
- ・英語論文 Yoshinari et al. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2013;54(1):75-82.

ピーナッツ中の総アフラトキシシンの分析法

- ・プロトコールと結果

生乳中のアフラトキシシンM1の分析法

- ・プロトコール
- ・コラボラティブスタディの結果

小麦中のデオキシニバレノール及びニバレノールの同時分析法

- ・プロトコール
- ・コラボラティブスタディの結果
- ・英語論文 Aoyama et al. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2012;53(3):152-6.