

I . 総合研究報告

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)

総合研究報告書

**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に関する研究**

(2016～2018年度)

研究代表者

小西良子(麻布大学)

研究要旨：2016年のJECFAで4,15-ジアセトキシシルペノール(4,15-DAS)、ステリグマトシスチン(STC)のリスク評価が行われたことを受けて、我が国でもリスク評価に資する知見を収集することを目的に、本事業が始まった。本事業は我が国での実態調査およびばく露評価、いままでかび毒では研究されていない発達神経毒性の評価、輸入食品のかび毒検査に適應できる簡便、迅速な測定法の開発を軸におこなった。

ばく露評価の基礎となる実態調査は2016～2018年の3年間に亘り、日本に流通する食品を対象に、STC及び4,15-DASの汚染調査を行った。まず、それぞれの試験法に関して、分析法の妥当性試験を行い、実態調査に適した分析法を確立した。STCについては、11食品群計583検体の調査を行い、116検体(20%)から定量限界値以上のSTCが検出された。4,15-DASについては、12食品群計461検体の調査を行った。ハト麦加工品、ソルガム及びコーンフラワーから検出され、陽性率はそれぞれ57%、33%及び8%であった。これらの調査結果からモンテカルロシミュレーション法により、日本人における小麦加工品からのSTCばく露量を推定した。90%タイル値は0.05～0.08、95%タイル値は0.08～0.12 ng/kg 体重/日であり、日本人のSTC平均摂取量からMOEを算出した結果、4,000,000～5,300,000であった。

胎児および乳幼児がばく露される可能性があるかび毒として、おもに主食である米、小麦に汚染するかび毒であるシトレオピリジン(CIT)、4,15-DAS、STCを選択し、マウスあるいはラットを用いた発達期ばく露実験を実施した。ばく露終了時における雄児動物の海馬歯状回顆粒細胞層下帯(SGZ)での神経新生への影響を解析した結果、CITはtype-1神経幹細胞の緩やかな減少とtype-2およびtype-3神経前駆細胞の緩やかな増加を認め、4,15-DASはtype-1神経幹細胞から未熟顆粒細胞、STCはtype-2b前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少を特徴とする神経新生障害が認められた。いずれにおいても、発達期ばく露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は、CITで1.0 ppm(0.13-0.51 mg/kg 体重/日)、4,15-DASで0.6 ppm(0.09-0.29 mg/kg 体重/日)、STCで5.0 ppm(0.34-0.85 mg/kg 体重/日)と判断された。

食品を汚染するかび毒産生菌の迅速検出法の開発を目的として、培養を行わずにかび毒産生菌を効率よく検出する方法の開発を行った。今後コーデックス規格基準が設定される可能性が高いSTCおよび4,15-DASを対象とし、それぞれ産生菌種のみを培養なしに検出する方法の開発を試みた。1年目は、STC産生菌の有無を、培養を経ずに検出する手法を確立した。2年目は、1年目に確立した技術的基盤をもとに、1年目の手法を使って玄米から実証試験にも成功し、スクリーニング法としての有効性を示した。3年目は、*Fusarium*属菌のうちDAS産生菌種のみを検出することに成功した。これらの手法はSTCまたはDAS汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

研究協力者

脇 ますみ 神奈川県衛生研究所
橋口 成喜 川崎市健康安全研究所
佐藤 英子 川崎市健康安全研究所
谷口 賢 名古屋市衛生研究所
中島 正博 名古屋市衛生研究所
竹内 浩 三重県保健環境研究所
藤吉 智治 (一財) 食品分析開発センター-SUNATEC
森田 剛史 (一財) 日本穀物検定協会
本田 俊一 (一財) 日本食品検査
七戸 八重子 (一財) 日本食品検査
伊佐川 聡 (一財) 日本食品分析センター
飯塚 誠一郎 (一財) 日本食品分析センター
猪之鼻 修一 (一財) 日本食品分析センター
小杉 正樹 (一財) 日本食品分析センター
笛木 周平 (一財) 日本食品分析センター
宮崎 光代 (一財) 日本食品分析センター
小林 直樹 (麻布大学)
渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)
窪崎 敦隆 (国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

かび毒は、世界的に汚染が報告されておりヒトや動物に対して健康被害を引き起こすため、国際的に対応が急がれている食品の危害物質である。そのためかび毒の世界的汚染および規制値の動向の情報を集めるとともに我が国独自の調査研究を行い、今後の施策策定の根拠とすることは、食の安全性確保において不可欠な課題である。厚労科研補助金による主要な食品汚染かび毒を対象とした調査研究は平成 13 年から行われており、我が国でのリスク評価に必要なデータを得ている。

本研究課題では前述の研究事業で構築した研究組織および手法を用いて、JECFA でのリスク評価が終わり CODEX 委員会で討論されているステリグマトシスティン (STC) と、JECFA で T-2 トキシンと同等の毒性があるとされた 4,15-デアセトキシシルペノール (4,15-DAS) を対象に調査研究を行った。

研究実施経過は 3 つの柱、すなわち 1. 分析法の開発と妥当性評価、実態調査とばく露評価 2. 今まで十分な毒性評価がなされていないかび毒を対象とした毒性評価 3. 輸入食品中の汚染かび毒産生性真菌から汚染かび毒の有無を予測する遺伝子的測定法の確立に対して以下の結果となった。1 では、初年度は実態調査に用いる分析法を LC-MS/MS および HPLC で確立し、かつ複数機関での妥当性試験を行った。我が国で流通している食品の実態調査を通年で言い、ばく露評価のデータを集積し、最終年はモンテカルロ確率手法で STC のばく露評価を行った。2 では、毒性評価が不十分であるシトリオビリジン (初年度) 4,15-DAS (次年度) そして STC (最終年度) を対象に発達期ばく露実験を行い、発達神経毒性の無毒性量を推定した。3 初年度は STC 産生菌をモデルとして、玄米から培養なしにカビ毒産生遺伝子のみを検出できる系を作成し、次年度はその有効性を STC 汚染玄米を用いて実証した。最終年度は DAS 産生菌を小麦から検出する遺伝子測定法を確立した。

B. 研究方法

(1) STC および DAS の実態調査および STC のばく露評価

1) 試料

検体は日本各地の小売店などからランダムに購入したものをを用いた。

2) 分析法

STC 及び 4,15-DAS の分析は、3 年間同じ方法を用いた。分析法の妥当性は 2016 年度に複数機関で評価し、かび毒試験法評価委員会でその妥当性が評価させた方法を用いた。

2-1) STC の分析法

粉状の検体、ビール及びワイン以外の検体については、破砕機で粉末状に破砕した。ビールとワイン以外の試料からの STC 抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。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）を用いた。

2-2) 4,15-DAS の汚染実態調査

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。精製は多機能カラム（昭和電工社製 Autoprep MF-T 1500）を用いた。平均値については、検出限界値（LOD）未満の値は 0 に、検出限界値以上定量限界値（LOQ）未満の値は検出限界値に置き換えて算出した。中央値は陽性率が 50%以上であった試料においてのみ算出した。

3) ばく露量推定

摂取量は、2005～2007 年に実施された食品摂取量・摂取頻度調査の結果を用いた。対象食品から小麦加工品 139 種を選抜した。Crystal Ball（（株）構造計画研究所）を用いてモデルの探索を行った結果、対数正規分布が適合した（二乗検

定）。曝露量として Lower bound および Upper bound を求めた。

(2) 発達期曝露影響評価

1) CIT 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 日で入荷、日本エスエルシー）を、一群を 10 匹ずつとして計 4 群に分け、最高用量は予備実験の結果を踏まえて 10 ppm に設定したのち、本試験では CIT 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。CIT の乳汁移行は、LC-MS/MS 法により測定した。

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 12 例の雄児動物を灌流固定した。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、組織切片を作成した。切片は、DAB 発色にて ABC 法（による免疫染色を行った。GFAP、SOX2、TBR2、DCX、PCNA、TUNEL、ARC および COX2 陽性細胞数について海馬歯状回顆粒細胞層下帯（SGZ）において単位長さ当たりの陽性細胞数を算出した。一方、RELN、PVALB、CALB1、CALB2、SST、NeuN、GRIA1 および GRIN2D 陽性細胞数については、海馬歯状回門における単位面積当たりの陽性細胞数の検索を行った。

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、組織切片を作成した。

残り半数の児動物は出生後 77 日まで CIT 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 日に各群 10 例の雄児動物を灌流固定した。各群雌

雄各 10 例の児動物は、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、組織切片を作成した。

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を用いて、大脳の Bregma の後方約 -2.2 mm の 2 mm 厚スライスより海馬歯状回部分を採取し、total RNA を抽出した。RT-PCR により遺伝子発現解析を行った。

2) 4,15-DAS のマウスにおける発達期ばく露影響評価

妊娠 ICR マウス（妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー）を、最高用量は予備実験の結果から、6.0 ppm を最高用量として一群あたり 13 匹ずつとして計 4 群に分け、DAS を 0、0.6、2.0、6.0 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。DAS の乳汁移行に関して、4,15-DAS の濃度を LC-MS/MS 法により測定した。組織切片の作成および免疫染色の方法は (2)-1) に準じた。用いた抗体は (2)-1) で用いたものおよび FOS、酸化ストレス指標である MDA、4-HNE および metallothionein-I/II (MT-I/II)、DNA 二重鎖切断の指標である gamma-H2A histone family member X (phospho Ser139) (γ-H2AX)、細胞周期関連分子である cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{CIP1/WAF1}) を加えた。陽性細胞数の算出方法は (2)-1) に準じた。

母動物は分娩後 22 日に脳、肝臓、腎臓重量を測定後、組織切片を作成した。

残り半数の児動物は出生後 77 日まで DAS を含まない通常飼料により飼育し、組織切片の作成および免疫染色の方法は (2)-1) に準じた。

出生後 21 日目および 77 日目の 0 並び

に 6.0 ppm 群のメタカーン固定脳を用いて、(2)-1) に準じて遺伝子発現解析を行った。

3) STC のラットにおける発達期ばく露影響評価

妊娠 SD ラット（妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー）を、最高用量は、予備実験の結果から 15.0 ppm に設定し、一群あたり 12 匹ずつとして 4 群に分け、STC を 0、1.7、5.0、15.0 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。STC の乳汁移行に関して、LC-MS/MS 法により測定した（日本食品分析センター）。

児動物の組織切片、陽性細胞数の算出方法は (2)-1) に準じた。

母動物は分娩後 22 日に脳、肝臓、腎臓重量を測定後、組織切片を作成した。

残り半数の児動物は出生後 77 日まで DAS を含まない通常飼料により飼育し、組織切片の作成および免疫染色の方法は (2)-1) に準じた。

出生後 21 日目および 77 日目の 0 並びに 6.0 ppm 群のメタカーン固定脳を用いて、(2)-1) に準じて遺伝子発現解析を行った。

（統計学的解析）

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群平均ならびに標準偏差を算出した。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。2 群間の比較においては各群

の分散を F 検定により比較し、等分散の場合は Student の t 検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定により対照群と各投与群との検定を行った。

(3) 培養によらないかび毒産生菌検出の開発

1) 供試菌株

STC 産生菌種およびその近縁種として、食品および環境から分離した *Aspergillus section Versicolores* 株を合計 60 株供試した。DAS 産生菌種およびその近縁種として以下の 15 菌種 15 株を用いた。

2) 米検体

米は STC 汚染を含む平成 27 年度産の国産玄米 9 検体および平成 25 年度産国産玄米 4 検体を用いた。

3) 培養真菌からのゲノム DNA 抽出

胞子をポテトデキストロース液体培地 (PDB) で培養し、菌糸体を回収後、DNA の抽出は SDS 法または DNeasy plant mini kit (QIAGEN) を用いて行った。

4) 分子生物学的手法による菌種同定

-tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を PCR により増幅し、PCR 産物をエタノール沈殿により精製し、シーケンス反応を行った。シーケンシングは塩基配列を決定したのち、供試菌株の塩基配列を登録配列と共にアライメントした。登録配列は *Aspergillus section Versicolores* に含まれる 14 種および外群 2 種 39 株の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用した。このアライメントを基に MEGA6.0 を用い、近隣結合法により系統樹を作成し、菌種の同定を行っ

た。

5) Thin-layer chromatography (TLC) による STC 産生能の確認

本試験に使用した株の STC 産生能は、TLC により確認した。

6) RNA polymerase 2 遺伝子部分配列の比較

Aspergillus section Versicolores に含まれる種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用し、MEGA6.0 を用い、ClustalW によりアライメントを行った。

7) 米付着カビ胞子からの直接 DNA 抽出

玄米 500 mg (20 粒程度) から、市販抽出キット (NucleoSpin Soil: TaKaRa) を用い、添付のプロトコルに従い、DNA を抽出した。抽出した DNA は使用するまで -20 °C で保存した。

8) 菌種特異的検出 PCR

6) で作成したアライメントを基に、標的菌種の塩基配列がその他の菌種と異なる部分にプライマーを設計し、HiDi DNA polymerase を用い、PCR を行った。

9) α -tubulin 遺伝子部分配列の比較

DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードし、MEGA6.0 を用いて ClustalW によりアライメントを行った。

10) Lys2 遺伝子部分配列の比較

4,15-DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードし、MEGA6.0 を用いて ClustalW によりアライメントを行った。

C. 研究結果

(1) STC および DAS の実態調査および STC のばく露評価

1) STC の汚染実態

3 年間の調査結果をまとめると 583 検体から 116 検体 (20%) で定量限界値以上の STC が検出された。STC 濃度の平均値が比較的高かったのは、ハト麦加工品 (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、ライ麦粉 (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 及び国産小麦粉 (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) であった。

2) 4,15-DAS の汚染実態

3 年間の調査結果をまとめると、計 461 検体の調査を行い、4,15-DAS はハト麦加工品、ソルガム及びコーンフラワーから検出された。平均濃度はハト麦加工品の 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、ソルガムとコーンフラワーではそれぞれ 0.3 及び 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、ハト麦加工品と比べると非常に低かった。最大濃度はハト麦加工品の 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

3) ばく露量推定

モンテカルロシミュレーションに用いて小麦粉の摂取量の分布および小麦粉の STC 汚染量の分布を推定した。日本人における小麦加工品からの STC ばく露量を推定した結果は、50%タイル値は 0.01~0.02、80%タイル値は 0.03~0.05、90%タイル値は 0.05~0.08、95%タイル値は 0.08~0.12 ng/kg 体重/日であり、また平均値は 0.03~0.04 ng/kg 体重/日であった。

2016 年に行われた JECFA による STC のリスク評価の際に採用された BMDL_{10} 0.16 mg/kg 体重/日に基づき、日本人の STC 平均摂取量から MOE を算出した結果、4,000,000~5,300,000 であった。

(2) 発達期ばく露影響評価

1) CIT のマウスにおける発達期曝露影響評価

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。着床数、産仔数、臓器重量 CIT による影響は認められなかった。

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。SGZ において PCNA (細胞増殖活性マーカー) 陽性細胞が 10 ppm で、GCL において ARC (シナプス可塑性マーカー) 陽性細胞が 3 および 10 ppm で、歯状回門部において、GRIA1 (グルタミン酸受容体マーカー) 陽性細胞が 10 ppm で統計学的に有意に増加した。

出生後 21 日目の児動物の脳では、顆粒細胞の分化マーカーをコードする *Gfap*、*Sox2*、*Eomes* (*Tbr2*)、*Neurod1*、*Dcx*、GABA 性介在ニューロンで発現が認められる *Sst*、脳由来神経栄養因子とその受容体をコードする *Bdnf*、*Ntrk2*、シナプス可塑性関連マーカーをコードする *Arc*、海馬に入力する神経伝達物質の一つであるグルタミン酸のトランスポーターをコードする *Slc17a7*、AMPA 型受容体をコードする *Gria2*、*Gria3* はいずれも 10 ppm で発現量が有意に増加した。一方、GABA 性介在ニューロンで発現が認められる *Pvalb*、グルタミン酸のトランスポーターをコードする *Slc17a6*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2d*、コリン作動性入力の受容体をコードする *Chrna4*、*Chrnb2* では発現量が有意に減少した。出生後 77 日目の児動物の脳では、*Gfap*、*Sox2*、*Eomes*、*Neurod1*、*Dcx*、*Bdnf*、*Fos*、*Slc17a7*、*Gria1*、*Gria2*、*Grin2a*、*Grin2d*、*Chrna7* で有意に

発現減少、*Pvalb*、*Sst*、*Chrna4*、*Chrnb2* で有意に発現増加が認められた。

2) 4, 15-DAS のマウスにおける発達期ばく露影響評価

母動物は、摂餌量の低値が 6.0 ppm 群で分娩後 18 日および 21 日目に認められた。摂水量の高値が 0.6 ppm 群と 2.0 ppm 群で分娩後 1 日および 15 日目に認められた。児動物は、6.0 ppm 群の雌雄児動物において、出生後 4 日目から 11 日目まで、および 18 日目から 77 日目まで連続して体重の低値が認められた。

母動物は、6.0 ppm で胸腺重量の低値と肝臓および腎臓の高値を示した。児動物は、曝露終了時の剖検で、雄児動物において脳絶対重量および肝臓、脾臓、腎臓の重量が低値を示し、雌児動物では脳絶対重量および肝臓重量が低値を示した。また、成熟時には雌雄ともに脳絶対重量の低値および雄では腎臓の低値を認めた。脳重量の低値は出生後 77 日目にも持続して認められた。

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 GFAP (type-1 神経幹細胞)、SOX2 (type-1 神経幹細胞 ~ type-2b 神経前駆細胞)、TBR2 (type-2b ~ type-3 神経前駆細胞)、DCX (type-3 神経前駆細胞 ~ 未熟顆粒細胞) の陽性細胞数が 2.0 および 6.0 ppm 群で、歯状回門では、GABA 性介在ニューロンである PVALB 陽性細胞が 6.0 ppm 群で有意に減少した。SGZ において TUNEL (アポトーシス) の陽性細胞が 6.0 ppm 群で有意に増加した。海馬歯状回では ARC 陽性細胞が 6.0 ppm で有意に減少し、歯状回門では RELN 陽性細胞数が 2.0 および

6.0 ppm 群で有意に増加した。離乳時の SGZ においては、酸化ストレスの指標である MDA 陽性細胞、酸化ストレスや神経障害に起因して増加する MT-1/11 陽性細胞と、DNA 二本鎖切断の指標である γ -H2AX の増加を認めた。

離乳時の雄児動物の脳における 6.0 ppm での遺伝子発現解析の結果、アポトーシス関連遺伝子、グルタミン酸トランスポーター、グルタミン酸受容体、NMDA 型グルタミン酸受容体およびアセチルコリン受容体をコードする遺伝子の発現減少を認めた。一方、グルタミン酸トランスポーターをコードする遺伝子の発現増加を認めた。成熟時には、グルタミン酸受容体、RELN 受容体をコードする遺伝子の発現増加を認めた。

3) STC のラットにおける発達期ばく露影響評価

母動物の体重、摂餌量および摂水量、着床数、産仔数および児動物の体重に STC の影響と思われる変化は認められなかった。母動物は、15.0 ppm で肝臓の絶対重量が高値を示した。児動物は、変化は認められなかった。

離乳時の雄児動物を対象とした海馬歯状回における免疫染色の結果、SGZ において DCX (type-3 神経前駆細胞 ~ 未熟顆粒細胞)、PCNA (細胞増殖指標) の陽性細胞数が 15.0 ppm 群で有意に減少した。一方、GABA 性介在ニューロンである PVALB および CALB1 陽性細胞が 15.0 ppm 群で有意に増加した成熟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、離乳時の顆粒細胞系譜および介在ニューロンの変化は全て回復した。

(3) 培養によらないかび毒産生菌検出法の開発

1) 国内に分布する *Aspergillus section Versicolores* の分離、同定および STC 産生能

食品及び環境から分離された合計 60 株について、 α -tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を決定し、配列データを得た。その結果、全ての登録配列は単系統群を形成した。60 株の分離・同定を行った結果、*Aspergillus section Versicolores* に属する 14 菌種の内、10 菌種の株を得ることができた。

2) 培養を経ずに標的菌種のみを特異的に検出する PCR 法の確立

玄米に付着したカビからの DNA 検出方法を検討した。DNA 抽出は、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。特異性の高い PCR 法の開発のため改変型 DNA 合成酵素 (HiDi DNA polymerase) を活用した検出方法を検討した。その結果、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。

以上より、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 ST 産生能を持つ菌種のみを検出することができることが示され、食品を汚染するかび毒産生菌の迅速検出法の技術的基盤を確立することができた。

3) *Aspergillus creber* 特異的検出 PCR

2) で確立した HiDi DNA polymerase を用いた PCR により、*A. creber* のみを特異的に増幅する系を検討した。*A. creber* 特異的に増幅が見られ、HiDi DNA

polymerase を用いた PCR により国内の主要な STC 産生菌種と考えられる *A. creber* を特異的に検出することが可能であることが示された。

4) *Aspergillus sydowii* を除く *Aspergillus section Versicolores* 検出 PCR

A. sydowii を除く *Aspergillus section Versicolores* の他菌種をまとめて検出することで効率よく STC 産生菌を検出する系を検討した。3) と同様に、*RPB2* 遺伝子において、*A. sydowii* のみで特異的に他の菌種と配列が異なるサイトをターゲットに、*A. sydowii* 以外の菌種の塩基配列と一致するプライマーセットを設計したところ、*A. sydowii* では増幅が見られず、その他の菌種では全て目的のサイズの増幅が観察された。

以上の結果から、STC 産生菌種を多く含む *Aspergillus section Versicolorese* の中で STC 非産生菌種である *A. sydowii* 以外の菌種を特異的に増幅することが可能であることが確認された。

5) 玄米における STC 産生菌の検出

4) で検討した PCR の系を用い、玄米からの STC 産生菌の検出を行った。その結果、STC が検出された玄米については全てにおいて目的サイズの増幅産物が確認された。

6) *Lys2* 遺伝子部分配列を基にした

4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR

4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR の開発では、2 種類の方法を用いたが、より汎用性の高い方法として *Lys2* 遺伝子を用いた PCR が確立された。

Lys2 遺伝子において 4,15-DAS 産生菌

種 8 菌種のうち *F. poae* を除く 6 菌種にのみ共通するサイトが存在したため、当該サイトにプライマーを設計した。併せて、*F. poae* 特異的なサイトにプライマーを設計した。この際、Forward 側のプライマーを同じ位置に設計することで、Reverse 側のプライマーを混合して用いるマルチプレックス PCR の系とする事とした。この方法は、4,15-DAS 非産生菌種においては増幅が見られなかった。以上より、設計したマルチプレックス PCR の系により、4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

D. 考察

(1) STC および DAS の実態調査および STC のばく露評価

1) STC について

2013~2014 年にヨーロッパ 9 カ国で実施された汚染調査の結果では、STC は大麦、トウモロコシ、ライ麦及び小麦など穀類から検出され、平均濃度はそれぞれ 0.032、0.059、0.024 及び 0.015 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。中国で 2016 年に小麦 32 検体を対象とした調査では、STC の陽性率は 53.1%、平均濃度は 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。我々の 3 年間の調査結果における STC 汚染レベルはこれら海外の報告と同等であった。今回算出された我が国の STC のばく露量をアフラトキシン B₁ のばく露量と比較すると、約 20~30 倍高かったことから、発がん性がアフラトキシン B₁ よりも低いことを考慮に入れてもかび毒による肝臓ガン発症のリスク評価を実施する際には STC も加えて算出する必要性があると考えられる。一方で、平均的な日本人における STC の

MOE は 10,000 を上回っていることから、すぐに健康影響が出るレベルではないといえる。

2) 4,15-DAS について

4,15-DAS は T-2 トキシンと化学構造が非常に似た類縁体であることから、T-2 トキシンが検出された食品種を対象に実態調査を行ったが、4,15-DAS が検出された食品はハト麦加工品のみであった。ヨーロッパでもほとんどの小麦、大麦、ライ麦やオーツ麦から 4,15-DAS は検出されず、検出されたものも濃度は 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。

これらのことから、4,15-DAS が汚染する食品は非常に限られており、4,15-DAS を単独で摂取することによる健康リスクは低いと考えられるものの、JECFA では一日耐容摂取量を T-2 トキシンと HT-2 トキシンとともにグループ PMTDI 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ としていることは現状にあった設定と言える。今後は T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS の 3 種まとめて汚染調査を行い、汚染濃度や頻度の違いを明らかにし、健康リスクを評価する必要があると考える。

(2) 発達期曝露影響評価

1) CIT のマウスにおける発達期曝露影響評価

発達期曝露後の雄児動物を対象とした海馬歯状回の免疫組織化学的解析から、出生後 21 日目で、10 ppm において CALB1 陽性ニューロン及び PVALB 陽性介在ニューロンの総数は共に少ないものの、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、系譜を構成する細胞の統計学的に有意な増加にまで及ばずに、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、コリン作動性入力を受容体をコードする *Chrna4* や *Chrn2*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2d*、グルタミン酸トランスポーターをコードする *Slc17a6* 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。CIT 発達期曝露は、曝露終了時において主に神経新生制御系への影響を示す事が示唆された。

出生後 77 日目では、顆粒細胞系譜の免疫組織化学的解析に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。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、発達期の脳では、主に PVALB 陽性細胞に発現が認められる。CIT は、*Pvalb* の遺伝子発現の減少が離乳時に認められているが、PVALB 陽性細胞の数には変化を認めなかったことから、CIT 曝露による *Grin2d* 遺伝子発現減少は、離乳時における個々の PVALB 陽性細胞の機能低下を起こすことが示唆された。この活性低下は、type-1 神経幹細胞減少に対する代償性作用として、神経幹細胞の増殖および分化促進に寄与している事を示唆していると考えた。

2) 4,15-DAS のマウスにおける発達期ばく露影響評価

4,15-DAS の発達期曝露後 雄児動物の海馬歯状回における免疫組織化学的解析の結果、出生後 21 日目で、2.0 と 6.0 ppm

において海馬 SGZ における type-1 神経幹細胞から type-2 および type-3 神経前駆細胞、更には未熟顆粒細胞までの細胞が減少した。一方で、6.0 ppm で SGZ 細胞のアポトーシスの増加を認め、6.0 ppm で検索した脂質過酸化最終産物の一つである MDA に陽性を示す SGZ 細胞の増数を認めた。また、6.0 ppm で MT-1/II 陽性 SGZ 細胞の増数も認めた。DAS と同じ構造を有する T-2 トキシンを用いた発達期曝露影響においても同様の結果が得られたことから、トリコセセン系の A タイプマイコトキシンは共通して、顆粒細胞系譜のうち、type-1 stem cell に始まる細胞集団で、少なくとも type-2b 前駆細胞までの細胞標的性を示すことが示唆された。それには SGZ における酸化性ストレス亢進によるアポトーシスの増加が関与することが示された。また本研究で DAS による酸化性ストレスに由来する DNA 損傷の修復酵素である *Ogg1* と *Parp1* の遺伝子発現レベルの減少を認め、酸化的 DNA 損傷に対する易損性の増加が示唆された。

マウスの SGZ において、*Kitlg* 遺伝子によりコードされる stem cell factor (SCF) は type-1 神経幹細胞以外の顆粒細胞系譜で発現し、type-1 神経幹細胞及び type-2 神経前駆細胞に発現する KIT 受容体に結合して、それらの細胞の増殖及び分化を促進することが知られているが、6.0 ppm の 4,15-DAS 曝露により *Kit* の遺伝子発現の有意な減少が認められた。この結果は、4,15-DAS の発達期曝露が KIT の下方制御を介した細胞増殖及び分化を抑制し、この抑制が type-1 から type-2 の細胞集団の減少の原因となり得る事を

示唆している。4,15-DAS 発達期曝露によるアポトーシスの増加には、SGZ における酸化性ストレスの増加の他に、SFC/KIT 相互作用の低下が関与することが示唆された。

6.0 ppm で GABA 性介在ニューロンのうち、PVALB 陽性細胞の有意な減数が認められた。T-2 toxin を用いた以前の我々の研究とは異なった結果となったが、この介在ニューロンの減数は TBR2 陽性細胞から DCX 陽性細胞への分化障害を示唆し、DCX 陽性細胞の減数に繋がったものと解釈できる。更に、6.0 ppm の 4,15-DAS 曝露で、海馬歯状回のニューロンに発現する代表的なイオンチャンネル型ニコチン作動性アセチルコリン受容体である *Chrna7* の遺伝子発現が減少を示したが、これは type-3 神経前駆細胞の特異的な減少に作用した可能性が指摘できる。

3)STC のラットにおける発達期曝露影響評価

STC ではラットを用いて実験を行った。雄児動物の海馬歯状回における免疫組織化学的解析の結果、出生後 21 日目で、15.0 ppm において SGZ における顆粒細胞系譜分化後期にある神経前駆細胞の増殖抑制による type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少と、CALB1 陽性および PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロン数の増加を認めた。

曝露終了時において、歯状回門における GABA 性介在ニューロンのうち、PVALB 陽性細胞と CALB1 陽性細胞の数が 15.0 ppm 群で増加を示した。この増加は、STC 発達期曝露による神経新生障害に対する神経保護的機構を示している事が示唆された。曝露終了時の歯状回での遺伝子

発現解析において、0 ppm 対照群と 15.0 ppm 群の比較において、DNA 修復関連遺伝子の *Apex1* と *Ercc1* で発現の増加を認めたことから、STC の発達期曝露により神経新生部位での DNA 傷害が示唆された。SGZ では PCNA 陽性細胞数が 15.0 ppm で減少しており、STC により type-2b から type-3 の増殖活性を示す神経前駆細胞の細胞増殖が抑制されたものと考えられた。一方、15 ppm の STC により、 G_1 期あるいは G_2 期の進行に機能するサイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase; CDK) や細胞周期関連分子をコードする遺伝子の発現が減少を示した。このことから、STC の曝露終了時では G_1/S ないし G_2/M チェックポイント機能の低下が示唆され、減少した神経前駆細胞の数を補うための増殖性の反応が生じていることが示唆された。本研究では、15 ppm の STC 曝露により *Chrn2* の発現が低値を示したことで *Chrn2* を発現するいずれかの GABA 性介在ニューロンの投射の抑制により、SGZ における細胞増殖抑制を生じた可能性がある。また、*Chrna7* の発現が高値を示したことから、*Chrna7* を発現するいずれかの GABA 性介在ニューロンの投射の促進により、SGZ における細胞増殖抑制に対して代償性の増殖シグナルを与えた可能性がある。さらに、15 ppm で *Bdnf* の発現が高値を示したことは、顆粒細胞から分泌された BDNF が PVALB 陽性介在ニューロンの増数に機能し、成熟時における神経新生障害の回復に関連しているものと考えられた。

出生後 77 日目では、離乳時に認められた顆粒細胞系譜の変化および歯状回門に

おける GABA 性介在ニューロンの変化は消失したことから、STC の発達期曝露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。

(3) 培養によらないかび毒産生菌検出法の開発

本研究では、食品において今後モニタリングを強化していくべきかび毒として STC および 4,15-DAS に着目し、これらのかび毒産生菌種の迅速検出法の開発を目的に、培養を経ずにかび毒産生菌を検出できる方法の開発を行った。

まず、土壌や堆積物から微量の微生物等の DNA を効率よく抽出可能な市販のキットを用い、玄米に付着するカビからの DNA 抽出を試みた。その結果、食品中のカビを直接検出するための DNA 抽出法として有効であることが示された。目的 DNA 以外の DNA の混入による非特異的増幅を防ぐため、改変型 DNA 合成酵素である HiDi DNA polymerase を用いて、より特異的な増幅反応を示す PCR を検討した。

次に、確立した系を基に STC 産生菌種の特異的な検出法の開発を行った。国内の食品および環境から *A. spergillus* section *Versicolores* に属する菌株の分布と STC 産生能を検討したところ、*A. sydowii* を除いた *Aspergillus* section *Versicolores* に属する菌種をまとめて検出する系の開発を試みた。*RPB2* 遺伝子上にプライマーを設計することで、目的の特定菌種のみを増幅して検出する方法を確立することができた。

さらに、*A. sydowii* を増幅させずに他の菌種をまとめて検出する系を用い、玄米からの STC 産生菌の直接検出を試みた

ところ、STC 汚染が確認された玄米では、全てにおいて STC 産生菌種が検出されたことから、培養を行わずに STC 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。

4,15-DAS 産生菌種の迅速検出法の開発においては 4,15-DAS 産生菌種および近縁の 4,15-DAS 非産生菌種について *-tubulin* 遺伝子および *Lys2* 遺伝子の塩基配列を用いて 2 種類の方法を比較検討した。その結果 *Lys2* 遺伝子においてはマルチプレックス PCR により、全ての 4,15-DAS 産生菌種を検出することに成功した。

E. 結論

STC 及び 4,15-DAS の我が国の実態調査から、STC は小麦等に汚染があり、その汚染濃度は諸外国とほぼ同じ程度であることがわかった。一方 4,15-DAS では、はと麦以外の食品汚染は検出されず、汚染があっても限られた食品で、かつ低レベルであることが明らかになった。そのため、我が国のばく露評価は STC において行うことにした。モンテカルロ手法により 95% タイル値で 0.08 ~ 0.12 ng/kg 体重/日と推定された。この値は同じ遺伝毒性発がん性物質であるアフラトキシン B1 のばく露量よりも数十倍高い値であるが、発がん毒性が低いことから、すぐに健康被害を起こすことは考えにくいと思われた。

CIT、4,15-DAS、STC の発達神経毒性影響の結果、CIT では type-1 神経幹細胞の緩やかな減少と type-2 および type-3 神経前駆細胞の緩やかな増加を認め、4,15-DAS では type-1 神経幹細胞から未

熟顆粒細胞、STC では type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少を特徴とする神経新生障害が認められた。

CIT では、遺伝子発現解析では、離乳時で観察された神経新生制御系の発現変化が成熟時でほとんどが反転し、恒常性維持作用が示唆された。4,15-DAS では、GABA 性介在ニューロンの細胞数減少と酸化ストレス亢進によるアポトーシス増加を認め、神経新生障害への関与が示唆された。また、成熟時には神経移動と可塑性の増強による神経新生障害に対する回復性の変化が示唆された。STC では、離乳時に神経新生障害に対する修復性の反応として GABA 性介在ニューロン数の増加を認めた。

いずれのかび毒においても、発達期ばく露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。これらの毒性評価から、無毒性量は、CIT で 1 ppm (0.13-0.51 mg/kg 体重/日)、4,15-DAS で 0.6 ppm (0.09-0.29 mg/kg 体重/日)、STC で 5.0 ppm (0.34-0.85 mg/kg 体重/日) と判断された。

簡便迅速スクリーニング法として食品または飼料に付着したカビ由来の DNA を回収し、培養を行わずに PCR によって STC 産生菌種および 4,15-DAS 産生菌種を効率的に検出する方法を開発することができた。

輸入食品のかびを直接チェックすることから、規制値が設定される可能性の高いかび毒に汚染されやすい食品、原産国も調べることができ、モニタリングに有用であると考えられる。いままで産かびを検出するためには培養法が一般的であったが、結果を得るまでに 5 日から 14 日

程度必要であったが、今回開発した手法では 4 時間程度で STC および 4,15-DAS を産生するカビの検出が可能であり、STC および 4,15-DAS 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Nakajima K, Tanaka T, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Woo GH, Yoshida T, Shibutani M. Developmental Exposure of Mice to T-2 Toxin Increases Astrocytes and Hippocampal Neural Stem Cells Expressing Metallothionein. *Neurotox Res*. 2019; 35(3): 668–683.
- 2) Onami J[†], Watanabe M[†], Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J: Fumonisin-production by *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Japanese Foods and Environments. *Food Safety* (2018) 6: 74-82 (†筆頭著者同等貢献者)
- 3) Yoshinari T et al. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified Forms of 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. *Toxins*. 2018;10(5):E178.
- 4) Nakajima K, Masubuchi Y, Ito Y, Inohana M, Takino M, Saegusa Y, Yoshida T, Sugita-Konishi Y,

Shibutani M. Developmental exposure of citreoviridin transiently affects hippocampal neurogenesis targeting multiple regulatory functions in mice. *Food Chem Toxicol.* 2018; 120: 590–602.

- 5) Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J and Sugita-Konishi, Y: Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Safety* (2018) 6: 67-73
- 6) Shiratori, N†, Kobayashi, N†, Tulayakul, P, Sugiura, Y, Takino, M, Endo, O and Sugita-Konishi Y: Occurrence of *Penicillium brocae* and *Penicillium citreonigrum*, related to mutagenic and toxic metabolites, respectively, in commercially available rice grains of Thailand. *Toxins* (2017) 9: E194 (†筆頭著者同等貢献者)

2. 学会発表

- 1) Sugita-Konishi Y, Takeda N, Watanabe M, Kobayashi N and Yoshinari T. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. SOT 58th annual meeting (2019, 3, Baltimore)
- 2) 中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、

菊地 聡美、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳 : ステリグマトシスチンのラット発達期曝露による海馬歯状回における神経新生に対する影響、第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、第35回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集 : P-02、p.61、1月31-2月1日、2019

- 3) 吉成知也、小杉正樹、佐藤英子、七戸八重子、竹内浩、谷口賢、藤吉智治、脇ますみ、小西良子、大西貴弘、工藤由起子 : 国内流通食品におけるステリグマトシスチンの汚染実態調査 第 83 回日本マイコトキシン学会学術講演会 (2019 年 1 月)
- 4) 加田睦月、内ヶ島美岐子、吉成知也、三宅司郎、小林直樹、小西良子. ステリグマトシスチンの ELISA によるスクリーニング法の開発. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会 (2019, 1, 川崎)
- 5) 佐藤和貴、吉成知也、窪崎敦隆、小林直樹、小西良子、工藤由起子、渡辺麻衣子. 国内流通穀類におけるステリグマトシスチン産生菌の分布に関する研究. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会 (2019, 1, 川崎)
- 6) 小林直樹、古川優奈、佐藤悠人、渡辺麻衣子、栗林尚志、島津徳人、小西良子. Change of fungal microflora in the house by dogs. 平成 30 年室内環境学会学術大会 (2018, 12, 東京)
- 7) 小池義浩、吉成知也、中川博之、上垣隆一、高橋治男、清水公德、工藤由起子、渡辺麻衣子. *Fusarium* 属菌におけるフモニシン類産生性に関する分類学的

- 検討. 日本マイコトキシン学会第 82 回
 学術講演会 (2018, 8, 帯広)
- 8) Watanabe M, Onami J, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J. Study on fumonisin-productivity of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* derived from foods in Japanese markets and environment UJNR 2018 (2018, 5, Yokohama)
- 9) 中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、吉田 敏則、渋谷 淳 : T-2 toxin のマウス発達期曝露による海馬歯状回及び小脳におけるmetallothionein発現増加と発現細胞の同定、第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄、第34回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集 : P-56、p.93、1月25-26日、2018
- 10) 中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳 : ジアセトキシシルペノールのマウス発達期曝露による海馬歯状回における不可逆的な神経新生障害、第45回日本毒性学会学術年会、大阪、第45回日本毒性学会学術年会要旨集 : P-44、S 230、7月18-20日、2018
- 11) Nakajima,K., Ito, Y., Masubuchi, Y., Kikuchi, S., Yoshida, T., Sugita-Konishi,Y., Makoto Shibutani, Reversal effect of citreoviridin and irreversible effect of diacetoxyscirpenol on hippocampal neurogenesis by developmental exposure in mice. ESVP-ECVP Annual Meeting, Rumania, September 5-8th, 2018
- 12) 中島康太, 伊藤優子, 増淵康哲, 菊地聡美, 小西良子, 吉田敏則, 渋谷淳 : かび毒シトレオビリジンとジアセトキシシルペノールのマウス発達期曝露による生後の海馬神経新生に対する影響の比較、第161回日本獣医学会学術集会、つくば、第161回日本獣医学会学術集会講演要旨集 : B0-33、P. 309、9月11-13日、2018
- 13) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子. 国内で分離された *Apergillus ochraceus* の再同定とその OTA 産生性. 日本マイコトキシン学会第 81 回学術講演会(2018, 1, 東京)
- 14) 窪田祐恵、尾畑瑠衣、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子. 野菜由来乳酸菌のアフラトキシン類への結合能と胃内環境での挙動. 日本マイコトキシン学会第 81 回学術講演会 (2018, 1, 東京)
- 15) 尾畑瑠衣、窪田祐恵、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子. アフラトキシン結合能を有する野菜由来乳酸菌の探索と消化液中での安定性に関する研究. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会 (2017, 11, 東京)
- 16) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子. *Aspergillus ochraceus* sensu lato における OTA 産生と OTA 生合成関連遺伝子の保有状況. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会 (2017, 11, 東京)
- 17) 窪崎敦隆、小林直樹、高橋治男、吉

- 成知也、高鳥浩介、寺嶋淳、小西良子、渡辺麻衣子。高度識別型 DNA 合成酵素を用いた玄米汚染真菌の検出。第44回日本防菌防黴学会（2017, 9, 大阪）
- 18) 小林直樹、窪崎敦隆、渡辺麻衣子、小沼ルミ、上原さとみ、高橋由美、矢内美幸、寺嶋淳、高橋治男、高鳥浩介、小西良子。 *Aspergillus* section *Versicolores* におけるステリグマトシスチン産生菌種の分子生物学的検出方法の開発。日本マイコトキシン学会第80回学術講演会（2017, 7, 東京）
- 19) 吉成知也、竹田名菜水、小西良子、寺嶋淳：4,15-ジアセトキシスシルベノールのモディファイド化合物の汚染実態 第80回日本マイコトキシン学会学術講演会（2017年7月）
- 20) 中島 康太、渡邊 洋佑、水上 さやか、猪鼻 真理、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳：シトレオビリジンのマウス発達期曝露による海馬歯状回における神経新生障害の可逆性と制御系シグナルの発現変動、第44回日本毒性学会学術年会、横浜、第44回日本毒性学会学術年会要旨集：P-42、S 229、7月10-12日、2017
- 21) Watanabe M, Suzuki Y, Takahashi H, Yoshinari T, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Goto K and Terajima J: Comparative study including fumonisin production on the phylogenetic tree of kuro-koji molds and their relatives isolated from Japanese fermented foods. UJNR (2017, 5, Washington DC)
- 22) Kobayashi N, Kubosaki A, Shiratori N, Watanabe M, Terajima J and Sugita-Konishi Y: Classification and sterigmatocystin-production of *Aspergillus* section *Versicolores* from Japanese foods and environments. UJNR (2017, 5, Washington DC)
- 22) 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, 東京）
- 23) 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。かび毒研究連絡会（2016, 8, 滋賀）
- 24) 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, 東京）
- 24) 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, 東京）
- 25) 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, 川崎）

- 26) Watanabe, M.: Evaluation of molecular markers for identification of *Aspergillus* and *Fusarium* spp. ISMYCO2016 (2016, 12, Tokyo)
- 27) 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 strains of Kuro-koji molds and their relatives isolated from fermented foods. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
- 27) 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)
- 28) 吉成知也、竹田名菜水、寺嶋淳、小林直樹、小西良子：発がん性を有するかび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年10月)

G. 知的財産権の出願登録状況