

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

**基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査
と生体影響評価に関する研究**

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 局 博一

東京大学大学院農学生命科学研究科

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

．総括研究報告書

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と生体影響評価 に関する研究 -----	1
---	---

局 博一

．分担研究報告書

1．カビ毒の食品汚染実態調査と生態調査、曝露量評価

食品汚染カビ毒の実態調査 -----	11
--------------------	----

小西 良子

国内流通食品における <i>Fusarium</i> 属菌の分布状況 -----	20
--	----

渡辺 麻衣子

カビ毒産生菌の生態学的研究 -----	28
---------------------	----

作田 庄平

我が国におけるデオキシニバレノールの年齢別曝露評価 -----	33
---------------------------------	----

小西 良子

2．毒性評価

かび毒の発達神経毒性評価 -----	37
--------------------	----

渋谷 淳

T-2 トキシンの経口摂取による心拍・体温・活動量への影響 -----	50
-------------------------------------	----

局 博一

III．個表

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

基準値の策定に資する食品汚染かび毒の実態調査
と生体影響評価に関する研究

研究代表者 局 博一

東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター特任教授

研究要旨

1. カビ毒の食品汚染実態調査と生態調査、曝露量評価

1) 食品汚染カビ毒の実態調査

2010年～2013年の調査に引き続いて3種のフザリウムトキシン(T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノン)を対象に市販食品における実態調査を行った。本年度は14品目298検体について分析を行った。ゼアラレノンは、主に大麦、ゴマ、小豆及び雑穀米で、T-2 トキシンとHT-2 トキシンはライ麦粉、ハト麦加工品、ビール及び小豆から検出された。汚染濃度については、ハト麦粉と小豆ではゼアラレノンの下限平均濃度が15 µg/kgを超えていた。T-2 トキシンについては、下限平均濃度が1 µg/kgを超えた食品はなく、HT-2 トキシンについては、ライ麦粉、ハト麦加工品及び小豆において下限平均濃度が1 µg/kgを超えており、小豆における平均濃度が最も高く、7.1 µg/kgであった。カビ毒の汚染には年次変化があることを踏まえ、汚染が認められる試料を重点的に調査していく必要性が示唆された。

2) 国内流通食品における *Fusarium* 属菌の分布状況

国内で流通している国産小豆および対照として国産大豆・外国産小豆の計20検体について *Fusarium* 属菌の分布状況を調べた。その結果、*Fusarium* 属菌の陽性検体数は、国産小豆では8検体(88.9%)、国産大豆では4検体(57.1%)、外国産小豆では0検体(0.0%)であった。国産小豆の陽性検体率は、国産大豆および外国産小豆と比較して有意に高かった。*Fusarium* 属菌種には産地によって偏りがみられた。また、検出菌種にはトリコテセン系マイコトキシン等の産生菌が含まれた。今後、供試検体のマイコトキシン汚染状況および分離株のマイコトキシン産生性について解析を進めるとともに、産地数と1産地あたりの検体数を増やして調査を継続する必要があると考えられた。

3) カビ毒産生菌の生態学的研究

上記の2)の調査により分離された *Fusarium* 属菌の代謝産物を分析する方法の検討を行った。4種のカビ毒(T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ネオソラニオールおよびジアセトキシシルペノール)が良好に分析できるLC-TOF/MSの分析条件を用いて、11種の

カビについて代謝産物を調べた。その結果、11種合計で580の代謝産物が検出され、また、標準品とした4種のカビ毒の生産性については、T-2トキシン生産菌が1株、ジアセトキシシルペノール生産株が4株であった。本分析法は、次年度以降で行う多くの菌株についての代謝産物の分析に有効であると考えられた。

4) 我が国におけるデオキシニバレノール (DON) の年齢別暴露評価

DONの汚染が報告されている国内流通の食品につき、日本人への曝露量を統計学的に評価した。汚染量調査の対象となった食品のうち、そもそも汚染量がきわめて少ないもの及び、摂取者の割合が少ないものを除き、小麦、大麦、ビール、小豆についての曝露量を年齢層ごとに求め、それを合算した総量によって、日本人のDONの曝露評価を年齢層ごとに行った。GEMS-FOODの最新の勧告に基づき、lower boundとupper boundの二つの場合のそれぞれについてシミュレーションを行った。結果として99.8%タイルで1~6才、7~14才、15~19才、20才以上のどの年齢層でも暫定一日耐容摂取量(1.0 µg/体重kg/日)を上回らなかった。99.9%タイルでの結果とも合わせて考察すると、日本人のDON摂取による健康被害は極めて小さいものと推定された。

2. 毒性評価

1) かび毒の発達神経毒性評価

妊娠ICRマウスを用いてT-2トキシン(0、1、3、9 ppm)の発達期暴露試験(各群12匹)を行った。妊娠6日目から離乳時(生後21日目)まで母動物に対して混餌投与することにより、経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時と生後77日目にそれぞれ解剖を行った。母動物は9 ppmで分娩後に体重の低値、前胃粘膜の過形成、肝臓重量の高値が認められた。また、1 ppmから胸腺重量の低値が認められた。児動物では、9 ppmで投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後も出生後77日まで体重低値が継続した。また、離乳時脳絶対重量の低値が3 ppmから認められ、9 ppmでの体重や諸臓器の重量低値と併せてT-2トキシンによる発達障害が示唆された。出生後77日の児動物では雌9 ppmで肝臓及び胸腺重量の低値がみられたが、出生時に比較して変化の程度は小さく、回復性のある変化であると考えられた。離乳時の雄児動物における脳海馬歯状回の免疫組織学的検査の結果、顆粒細胞層下帯でのTbr2陽性細胞が3 ppmから減少し、T-2トキシンによるtype 2前駆細胞を標的としたニューロン新生障害が起きているものと考えられた。歯状回門部ではreelin陽性細胞の増加が9 ppmで認められ、前駆細胞の移動異常を反映して介在ニューロンからの産生が増加した可能性が考えられた。

2) T-2トキシンの経口摂取による心拍・体温・活動量への影響

T-2トキシンの経口摂取による全身機能(循環機能、体温および活動量)に及ぼす影響を自由行動下のラットのテレメトリー観察によって行った。実験群は3群(0 ppm、6 ppm、12 ppm;各群6匹)とした。その結果、12 ppm-T2トキシン摂取群および6 ppm-T2トキシン摂取群で、摂取期間中(5日間)に心拍数、活動量および体温のレベルおよび日周リズムへの影響が摂取開始の翌日から認められ、その影響は12 ppm-T2トキシン摂取群は6 ppm-T2トキシン摂取群に比べて大きい傾向がみられた。心拍数、活動量、体温周期性の変化はT-2トキシンの摂取を中止すると摂取前の状態近くまで回復した。摂食量および体重(実験終了日)は12 ppm-T2トキシン摂取群、6 ppm-T2トキシン摂取群、0 ppm-Tトキシン群の順に低値を示した。これらの試験結果から、6 ppm~12 ppmのT-2トキシンの短期間経口摂取によって全身性指標である循環機能などに可逆性の機能的影

響が生じることが明らかになった。

上述のとおり、国内流通食品におけるフザリウム毒素およびフザリウム菌の汚染実態と T-2 トキシンの毒性影響の一端が明らかになった。これらの研究は食品衛生上重要な知見を含むことから引き続き詳細な研究を行う必要性が考えられた。

A.研究目的

諸外国から輸入される様々な食品および国内産食品の安全性を確保するため、国際標準に準じた我が国の成分規格策定やリスク評価を行っていく必要がある。そのため我が国におけるカビ毒の実態調査・暴露評価および毒性評価に関して継続的に調査研究を行う必要がある。また、予防的措置として、欧米等で注目される新規カビ毒、あるいはまだ毒性評価されていないカビ毒複合体を対象に情報収集を行うとともに、輸入食品を汚染するカビ毒産生菌の実態およびその毒素産生能を検討し、モニタリング対象カビ毒の選定を検討する必要性もある。

本研究グループでは平成 22 年～24 年度までに 15 食品目、約 800 検体のカビ毒汚染調査（カビ毒陽性検出率、汚染濃度）を実施し、とくに T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノンの汚染状況を明らかにしてきた。実態調査の結果、比較的高頻度に汚染が検出されている現状を重要視し、平成 25 年度からは一部新たな食品目を加えさらに 3 年間の実態調査を行う方針で進めている。本年度では食品汚染カビ毒（フザリウム毒素）を対象に、汚染実態調査、暴露量評価、食品中のフザリウム属菌の生態調査ならびに毒性評価を行った。

B.研究方法

1.カビ毒の食品汚染実態調査と生態調査、曝露量評価

1) 食品汚染カビ毒の実態調査

調査対象品目：農林水産省から提供された国産小麦（試料数：40）及び国産大麦（試料数：10）のほか、ランダムに購入した市販の食品目（13 種類）

の合計 298 試料を検査対象とした。T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンの分析は、試料（25 g）からメタノール溶媒で抽出、イムノアフィニティーカラムで精製後、LC-MS/MS を用いて測定した。

2)国内流通食品における *Fusarium* 属菌の分布状況

国内に流通する小豆を中心とした食品について、産地別に *Fusarium* 属菌の分布状況を検討した。国産小豆および対照として国産大豆・外国産小豆の計 20 検体を供試した。小豆および大豆の全粒を寒天平板培地上で培養後、*Fusarium* 属菌の特徴を示すコロニーの発育がみられた粒数を計測した。発育したコロニーを単離し、形態観察および分子生物学的指標によって菌種を同定した。

3)カビ毒産生菌の生態学的研究

上記の 2) の調査により分離された *Fusarium* 属菌の代謝産物を分析する方法の検討を行った。4 種のカビ毒（T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ネオソラニオールおよびジアセトキシシルペノール）が良好に分析できる LC-TOF/MS の分析条件を用いて、11 種のカビについて代謝産物を調べた。

4)我が国におけるデオキシニバレノール（DON）の年齢別暴露評価

DON の汚染が報告されている国内流通の食品につき、日本人への曝露量を統計学的に評価した。汚染量調査の対象となった食品のうち、汚染量がきわめて少ない食品や摂取者の割合が少ない食品を除き、小麦、大麦、ビール、

小豆についての曝露量を年齢層ごとに求め、それを合算した総量によって、日本人の DON の曝露評価を年齢層ごとに行った。GEMS-FOOD の最新の勧告に基づき、lower bound と upper bound の二つの場合のそれぞれについてシミュレーションを行った。

2. 毒性評価

1) かび毒の発達神経毒性評価

妊娠 ICR マウスを計 4 群 (12 匹 / 群) に分け、T-2 トキシンを 0、1、3、9 ppm の用量で妊娠 6 日から分娩後 21 日まで混餌投与した。出生後 4 日目以降は各母動物に雄 8 匹、雌 2 匹を確保するよう児動物数を調整した。検査項目としては、着床数、産仔数、臓器 (脳、肝臓、胸腺、脾臓) の重量および病理学的、免疫組織学的変化を観察した。

離乳時の雄児動物において、新生ニューロンの分化指標である Sox2、Tbr2 及び doublecortin 陽性細胞数を海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において検索した。一方、GABA 性介在ニューロンの指標である reelin 及び parvalbumin、成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。

2) T-2 トキシンの経口摂取による心拍・体温・活動量への影響

T-2 トキシンの経口摂取による全身機能 (循環機能、体温および活動量) に及ぼす影響を自由行動下のラットのテレメトリー観察によって行った。実験群は 3 群 (0 ppm、6 ppm、12 ppm ; 各群 6 匹) とした。Wistar 系ラット (雄、8 週齢) の背部皮下にテレメトリー送信機を埋入後、7 日間の術後回復期を経て 3 日間の対照期間、5 日間の試験餌 (T-2 トキシン混餌) 摂取期間および 5 日間の試験餌終了期間における心電図、活動量、皮下体温を同時に連続記録した。試験結果は心拍数、活動量、体温のレベル変化および日周リズムの

変化を中心に分析した。

C. 研究結果

1. カビ毒の食品汚染実態調査と生態調査、曝露量評価

1) 食品汚染カビ毒の実態調査

ゼアラレノン

【検出率 (%)】国産大麦 (100)、雑穀米 (95)、小豆 (90)、ゴマ (90)、ソバ (75)、ハト麦加工品 (70)、国産小麦 (60) で高かった。

【下限平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)】小豆 (33.4)、ハト麦加工品 (15.3)、雑穀米 (6.2)、国産大麦 (1.2)、ライ麦粉 (1.0)、国産小麦 (0.8) などであった。

【最大濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)】ハト麦加工品 (170)、小豆 (103)、雑穀米 (59.5)、国産小麦 (22)、ゴマ (11.8)、ライ麦粉 (10.3) などであった。

T-2 トキシン

【検出率 (%)】ビール (95)、小豆 (75)、グラノーラ (40)、ハト麦加工品 (40)、雑穀米 (35)、コーングリッツ (25) などであった。

【下限平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)】ハト麦加工品 (1.0)、小豆 (0.8)、雑穀米 (0.5) などであった。

【最大濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)】ハト麦加工品 (9.5)、雑穀米 (4.4)、小豆 (4.2)、ライ麦粉 (1.7) などであった。

HT-2 トキシン

【検出率 (%)】ビール (85.0)、小豆 (85.0)、ライ麦粉 (60.0)、ライ麦加工品 (50.0)

【下限平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)】小豆 (7.1)、ライ麦粉 (1.7)、ハト麦加工品 (1.4)、グラノーラ (1.0) などであった。

【最大濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)】小豆 (103)、ハト麦加工品 (10.3)、ライ麦粉 (8.4)、ソバ (8.3)、国産大麦 (7.9)、国産小麦 (6.4) などであった。

T-2 トキシン + HT-2 トキシン

【下限平均濃度($\mu\text{g}/\text{kg}$)】小豆(7.9)、ハト麦加工品(2.3)、ライ麦粉(1.9)、グラノーラ(1.3)などであった。

【最大濃度($\mu\text{g}/\text{kg}$)】小豆(104)、ハト麦加工品(19.9)、ライ麦粉(10.1)、ソバ(9.5)、国産大麦(9.3)、国産小麦(7.1)などであった。

(2001 年に行われた JECFA における毒性評価は、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの合計として一日耐容摂取量を規定している。そのため、本実態調査においても同様に合計汚染量を計算した。その結果、最も下限平均濃度が高かったのは小豆の 7.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、その次がハト麦加工品の 2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大値は小豆の 104 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。)

2) 国内流通食品における *Fusarium* 属菌の分布状況

Fusarium 属菌の陽性検体数は、国産小豆では 8 検体(88.9%)、国産大豆では 4 検体(57.1%)、外国産小豆では 0 検体(0.0%)となり、外国産小豆からは *Fusarium* 属菌の検出は無く、国産小豆の陽性検体率は、国産大豆および外国産小豆と比較して有意に高かった($p < 0.05$)。小豆・大豆 100 粒あたりの *Fusarium* 属菌の陽性粒率が最も高かった検体は、国産小豆では北海道産で 9.0%であった。各地域の大豆・小豆から検出された *Fusarium* 属菌種には、産地によって偏りがみられ、*Fusarium* 属菌の地理的分布が異なる可能性が示唆された。また、検出菌種にはトリコセセン系マイコトキシン等の産生菌が含まれた。

3) カビ毒産生菌の生態学的研究

今回採用した分析法が既知のカビ毒を検出できるかどうかを調べるために、4 種のカビ毒標準品を測定し問題がないことを確認した上で、上記 2) の調査により分離された *Fusarium* 属菌の代謝産物を分析する方法の検討を行っ

た。カビ無添加の培地と 11 種のカビの培養液の酢酸エチル抽出物 LC-TOF/MS で分析した。イオンカウントが 10000 以上のものを選択し、カビ無添加の培地で検出された化合物を除いた結果、580 種の化合物が検出された。標準品と保持時間が一致することからリスト中の推定分子量 $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{NO}_9$ の化合物は T-2 トキシン、 $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_7$ の化合物は DAS と考えられた。T-2 トキシン生産菌が 1 株、ジアセトキシスシルペノール生産株が 4 株見出された。

4) 我が国におけるデオキシニバレノール (DON) の年齢別暴露評価

小麦、大麦、ビール、小豆についての曝露量を年齢層ごとに求め、それを合算した総量によって、日本人の DON の曝露評価を年齢層ごとに行った。その際、汚染量の LOD 以上 LOQ 未満の検出値の取り扱いに関する GEMS-FOOD の最新の勧告に基づき、lower bound と upper bound の二つの場合それぞれについてシミュレーションを行った。結果として 99.8%タイルでは 1~6 歳、7~14 歳、15~19 歳、20 歳以上のどの年齢層でも暫定一日耐容摂取量を上回ったものはなかった。すなわち、99.9%タイルにおいては 1~6 歳では lower bound も upper bound も約 112 ng/体重 Kg/日で、7~14 歳では lower bound で約 105 ng/体重 Kg/日であるほか、7~14 歳の upper bound および 20 歳以上はいずれも約 103 ng/体重 Kg/日、また 15~19 歳はいずれも約 70 ng/体重 Kg/日となっており、日本人の DON 摂取による健康被害は極めて小さいものと推定された。

2. 毒性評価

1) かび毒の発達神経毒性評価

母動物は 9 ppm で分娩後 7~14 日にかけて体重低値を示し、分娩後 21 日目までの間に摂餌量、摂水量の低値を認めた。また、9 ppm で前胃粘膜の過形

成を示唆する肥厚性変化が認められた。更に、1 ppm から胸腺重量の低値がみられ、9 ppm では肝臓重量の高値がみられた。母動物では、一般毒性的変化は9 ppm に集中的に見られたものの、免疫系への影響は最も鋭敏であった。児動物では、9 ppm で投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後も出生後77日まで体重低値が継続した。また、離乳時脳絶対重量の低値が3 ppm から認められ、9 ppm での体重や諸臓器の重量低値と併せてT-2 トキシンによる発達障害が示唆された。出生後77日の児動物では雌9 ppm で肝臓及び胸腺重量の低値がみられたが、出生時に比較して変化の程度は小さく、回復性のある変化であると考えられた。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、顆粒細胞層下帯でのTbr2陽性細胞が3 ppm から減少し、T-2 トキシンによるtype 2前駆細胞を標的としたニューロン新生障害が起きているものと考えられた。歯状回門部ではreelin陽性細胞の増加が9 ppm で認められ、前駆細胞の移動異常を反映して介在ニューロンからの産生が増加した可能性が考えられた。

2) T-2 トキシンの経口摂取による心拍・体温・活動量への影響

12 ppm-T2 トキシン摂取群および6 ppm-T2 トキシン摂取群で、摂取期間中に心拍数、活動量および体温のレベルおよび日周リズムへの影響が摂取開始の翌日から認められ、その影響は12 ppm-T2 トキシン摂取群が6 ppm-T2 トキシン摂取群に比べて大きい傾向がみられた。これらの変化はT-2 トキシンの摂取を中止すると摂取前の状態近くまで回復した。心拍数を例にとると、T-2 トキシン混餌の摂取期間中は多くの個体で自己相関係数の低下と周期性の変化が観察された。自己相関係数の明瞭なピークが認められず本来の規則的な周期性が消失した個体も出現した。

その個体数は12 ppm-T2 トキシン群では6匹中2匹、6 ppm-T2 トキシン群では6匹中1匹であった。自己相関係数(コレログラム)の分析では、12 ppm-T2 トキシン群ではT-2 トキシンの摂取前、摂取中、摂取後の期間で有意差(一元配置分散分析、 $P < 0.01$)が認められ、T-2 トキシン摂取中の自己相関係数は摂取前および摂取後に比較して有意に低かった($P < 0.01$)。また6 ppm-T2 トキシン群では、T-2 トキシンの摂取期間中に有意差ではないものの自己相関係数の低下傾向がみられた(一元配置分散分析、 $P = 0.08$)。

これらの試験結果から、少なくとも6 ppm~12 ppmのT-2 トキシンの短期間経口摂取によって全身性指標である循環機能などに可逆性の機能的影響が生じることが明らかになった。

D. 考察

1. カビ毒の食品汚染実態調査と生態調査、曝露量評価

1) 食品汚染カビ毒の実態調査

本年度の実態調査において、ゼアラレノンについてはハト麦加工品、小豆及び雑穀米における汚染が他の試料よりも高かった。T-2 トキシンについてはゼアラレノンと同様にハト麦加工品、小豆及び雑穀米で他の試料よりも汚染が高かった。しかし2012年度にはハト麦加工品で平均3.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /kg、小豆で平均15.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /kgの汚染が認められており、今年度の汚染レベルは低下していた。HT-2 トキシンについては、小豆における汚染が他の試料よりも高かった。

T-2 とHT-2の合算値については、小豆が最も高く、平均7.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /kg、次いでハト麦加工品の平均2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /kg、ライ麦粉の平均1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /kgであった。小豆とハト麦加工品について年次変化はあるものの、他の試料よりもT-2、HT-2汚染レベルが高いことがこれまでの実態調査結果からもわかっており、

今後も調査を続ける必要がある。

小麦粉については国産品を原料としたものと輸入品を原料としたものを区別して調査を行った。両者とも合計値の下限平均濃度は0.5 µg/kg/kg以下と低く、また最大値についても大きな差は認められなかった。

今年度初めて調査を行ったソバについては、合計値の平均が1.0 µg/kg/kg、最大値が9.5 µg/kg/kgであり、国産の小麦や大麦の値を上回っていた。今年度は12検体のみの調査であったが、来年度以降は調査数を増やす必要がある。

2) 国内流通食品における *Fusarium* 属菌の分布状況

我が国ではこれまで、*Fusarium* 属菌の地理的分布について、網羅的な地域および菌種を対象とした検討が行われておらず、全体像が明らかになっていなかった。そこで北海道、東北、関東、九州と地理的に異なる地域産の小豆および大豆を対象に *Fusarium* 属菌の汚染状況の調査を行った。

Fusarium 属菌の陽性検体率および検出菌種について、国産大豆、国産小豆および外国産大豆の間で比較検討を行ったところ、国産小豆では88.9%の検体から *Fusarium* 属菌が検出されており、国産大豆よりも有意に高い結果となった。近年の食品のフザリウムトキシン汚染実態調査において、国産小豆では最大でゼアラレノンが125.0 ppb、T-2 トキシンが48.4 ppb、HT-2 トキシンが45.7 ppb 検出されており、一方で国産大豆では最大でゼアラレノンが0.0 ppb、T-2 トキシンが4.3 ppb、HT-2 トキシンが3.1 ppbと低く、国産小豆での高い汚染傾向が示されており、本研究において得られた国産小豆における高い *Fusarium* 属菌汚染状況は国産小豆の高濃度・高頻度なフザリウムトキシン汚染状況と一致した傾向を示した。

各地域の小豆および大豆から検出された *Fusarium* 属菌の割合について、北海道産および熊本県産から検出された *Fusarium* 属菌種の傾向の違いが示され、

国内において *Fusarium* 属菌の地理的分布が異なる可能性が示唆された。しかし、外国産小豆同様に今回の検討で用いた供試検体数および産地数には限りがあり、今後1産地あたりの供試検体数を増やすとともに、様々な地域の検体について調査を継続する必要がある。

3) カビ毒産生菌の生態学的研究

多くの *Fusarium* 属菌それぞれの株が生産する代謝産物を特徴付けるためには、サンプルの調製が簡便であることと、1回の分析で多数の化合物の存在を推定できることが重要となる。今年度検討したLC-TOF/MSによる分析は、少量の培養液の酢酸エチル抽出物を用いて行うためサンプル調製に手間がかからず、また、数百の代謝産物を区別して分析することが可能である。従って、今回は4種の標準品についての生産性が示されたが、他の標準品やTICにおいて特徴的な化合物について今後調べて行くことにより、それぞれの菌株のマイコトキシン生産性についての情報を得ることが可能になったと考えられる。

4) 我が国におけるデオキシニバレノール (DON) の年齢別暴露評価

WHO GEMS FOODの新しい勧告によれば、LOD以上LOQ未満の取り扱いについて、最初のステップとして、lower boundでLOQ未満は「0」として、upper boundはLOQ未満を「LOQの値」として、両者の差が少なく、かつ規制値よりも低い値であれば、upper boundを使うことが推奨されている。本研究の場合はこの最初の条件に合うので、各年齢層の暴露量推計はupper boundを使うこととした。

食品摂取によるDON曝露の健康被害リスク評価を行った。平成23年度報告による30%の推定誤差を用いても、暫定一日耐容摂取量を超えるのは、99.8%の1才から6才および、99.9%タイルの全年齢層だけである。99.75%タ

イルまではどの年齢層においても、30%増しにしても暫定一日耐容摂取量を超えなかった。

コンピュータシミュレーションであるモンテカルロ法では、得られたサンプルから対数正規分布を仮定することにより母集団のデータを作り出すことから、作成したサンプルデータの一部には通常では存在しえない高値のデータが存在していたことは否定できない。それゆえ、シミュレーション結果の解釈には慎重であるべきと思われる。しかしながら、このような値は暴露量を過大に評価することはあっても、過小評価するわけではないこと、またこうした値は分布のかなり右側に存在するので、健康被害リスクの評価基準となる95%タイル付近には影響はないことなどから、DONの曝露による日本人の健康被害リスクは極めて小さいものと思われる。

2. 毒性評価

1) かび毒の発達神経毒性評価

妊娠ICRマウスにT-2トキシンを9ppmを最高用量として妊娠6日から分娩後21日まで混餌投与することで、児動物に経胎盤、経乳的に暴露させ、暴露終了時ならびに出生後77日における影響について解析した。その結果、母動物は9ppmで分娩後7~14日にかけて体重低値を示し、主に9ppmで分娩後21日目までの間に摂餌量、摂水量の低値を認めた。また、9ppmで前胃粘膜の過形成を示唆する肥厚性変化が認められ、摂餌量ならびに摂水量の低下に影響した可能性が考えられた。一方、1ppmから胸腺重量の低値がみられ、9ppmでは肝臓重量の高値がみられた。このことから母動物では、一般毒性的変化は9ppmに集中的に見られたものの、免疫系への影響は最も鋭敏に認められた。児動物では、9ppmで投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後も出生後77日まで体重低値が継続した。一方、離乳時の児動物では脳絶対重量の低値が3ppmから認められ、9ppmでの体重

や諸臓器の重量低値と併せてT-2トキシンによる発達障害が示唆された。出生後77日の児動物では雌9ppmで臓器重量低値がみられたが、出生時と比較して変化の程度は小さく、雄では出生時の変化が消失していることから、回復性のある変化であると考えられた。

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、Tbr2 (Type2前駆細胞に発現)陽性細胞が3ppmから減少し、T-2トキシンによるニューロン新生障害が起きているものと考えられた。9ppmでみられたreelin陽性細胞の増加は前駆細胞の移動異常を反映して介在ニューロンからの産生が増加した可能性が考えられた。

2) T-2トキシンの経口摂取による心拍・体温・活動量への影響に関する研究

平成22~24年度にかけての研究で、成熟ラットへのT-2トキシン(0.1mg~1.0mg/kg)の皮下投与によって投与直後の一過性の心拍数増加に続き循環機能異常(房室伝導障害、心室期外収縮、洞性徐脈、上室性頻拍など)が3日間にわたって生じやすくなること、また投与直後には自律神経機能バランスの明瞭な変化が生じることが明らかになっている(Ngampongsa, S. 2012ら)。また、ラット心筋細胞へのT-2トキシンの直接作用によってミトコンドリア電子伝達系機能の抑制が生じることがわかっている(Ngampongsa, S. 2013ら)。しかしながら、これらの変化は直接投与による変化であるため、実際の摂食を介した影響がどの程度現れるかについては不明である。今回、このような観点からラットにT-2トキシンを含む餌を自由経口摂取した際の全身影響を心電図、活動量、体温を指標として調べた。その結果、T-2トキシン摂取群では摂取期間中に心拍数の変化とともに心拍リズム、活動量リズムおよび体温リズムに変化が認められた。その変

化は 12 ppm 摂取群は 6 ppm 摂取群にくらべて大きかった。また T-2 トキシンの摂取を中止すると、上記の日周リズムが回復する傾向がみられた。そのため、これらの変化は明らかに T-2 トキシンの生体影響としてとらえることができる。T-2 トキシンの摂取期間中の最初の 2 日間の明期における心拍数は対照群や T-2 トキシンの摂取前に比較して増加する傾向が示された。このような初期変化は T-2 トキシンの皮下投与実験で得られた結果に類似していた。

T-2 トキシンの摂取終了後の心拍数は 12 ppm、6 ppm、0 ppm (対照) の順に減少度が大きかった。正常ラットでは心拍数は加齢に伴って減少することが通常の現象であるが、T-2 トキシンの摂取群では対照群に比べて減少度が大きい傾向がみられたが、その再現性や原因をさらに詳しく調べる必要がある。T-2 トキシンの摂取期間中の心拍数の変化の一部は活動量の変化に起因する可能性があるが、活動量の増減と心拍数変化とが一致していない個体も観察されたことから、心拍数の変化は必ずしも活動量の変化による二次的な要因によるとは限らず、T-2 トキシンの自律神経系あるいは心臓への直接作用が影響している可能性も否定できない。一方、6 ppm および 12 ppm のいずれも対照群に比べて摂食量と体重の低値が示されたことから、これらの変化も T-2 トキシンの全身影響とみなされる。このような変化をもたらす要因として T-2 トキシンの混餌に対するラットの忌避行動や消化器障害などの生体内部の変化が考えられる。

E. 結論

1. カビ毒の食品汚染実態調査と生態調査、曝露量評価

1) 食品汚染カビ毒の実態調査

今年度は、6 年間通年で 3 種のフザリウムトキシン (T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノン) を測定す

る 4 年目となる。

毒性の高い T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの今年度も小麦、大麦、麦類加工品で検出された。その他、ソバ、小豆、雑穀米からも検出されたが、全体的に昨年度よりも汚染レベルが低い傾向にあった。カビ毒の汚染には年次変化があることを踏まえ、汚染が認められる試料を重点的に調査していく必要性が示唆された。

2) 国内流通食品における *Fusarium* 属菌の分布状況

本研究の結果から、国産小豆はある程度の頻度および濃度で *Fusarium* 属菌に汚染されていることが明らかとなり、フザリウムトキシン汚染状況を裏付ける結果が得られた。今、今回供試した検体のマイコトキシン汚染状況および分離株のマイコトキシン産生性について解析を進め、さらに 1 産地あたりの検体数や産地のバリエーションを増やして調査を継続し、日本各地の小豆におけるマイコトキシン汚染とその原因、産地域域別のリスクについて明らかにする必要があると考えられた。

3) カビ毒産生菌の生態学的研究

国産大豆、国産小豆等から分離された *Fusarium* 属菌の代謝産物を、簡便かつ多種に渡り分析する方法を確立した。

4) 我が国におけるデオキシニバレノール (DON) の年齢別曝露評価

小麦のみならず、その他の汚染事例が報告された食品を加えた総合的な曝露評価を行ったが、日本人の食品摂取による DON 曝露の健康被害リスクは極めて小さいものと思われる。

2. 毒性評価

1) カビ毒の発達神経毒性評価

T-2 トキシンの発達期曝露により、母動

物と児動物への影響は主に9 ppmで認められたが、母動物では1 ppmより胸腺重量の低下がみられ、児動物では3 ppmより脳の絶対重量の低値と海馬歯状回におけるtype2 前駆細胞を標的とするニューロン新生障害を示唆する変化が認められた。

2) T-2 トキシンの経口摂取による心拍・体温・活動量への影響

12 ppmおよび6 ppmのT-2 トキシンを含む粉餌を自由経口摂取したラットにおいて、摂取期間中に心拍数、活動量および体温（最低体温）レベルの変化、心拍数や活動量の日周リズムの変化が生じることが明らかになった。また、12 ppmは6 ppmに比べて影響の度合いが大きかった。心拍数や活動量の日周リズムは餌をT-2 トキシンを含まない通常の餌に戻すことによって回復する傾向が示された。これらの結果から少なくとも6 ppm以上のT-2 トキシンの短期間経口摂取によって自由行動下のラットにおいて循環系を始めとする全身機能におそらくは可逆性の影響が生じることが明らかになった。

F.研究業績

[学会発表]

- 1) 吉成知也：日本の市販品におけるデオキシニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンの汚染実態。日本マイコトキシン学会、第73回学術講演会（2013.9）
- 2) 竹内浩、吉成知也、青山幸二、中島正博、谷口賢、橋口成喜、甲斐茂美、田端節子、田中敏嗣、佐藤孝史、松井好之、小木曾基樹、石黒瑛一、小西良子：日本に流通する食品中のT-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノンを対象とした3年間サーベイランス。第106回日本食品衛生学会学術講演会(2013.11)

- 3) 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.

- 4) 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)

- 5) 局 博一、スチトラ・ガンボンサ：T-2 トキシンおよびデオキシニバレノールの心筋細胞ミトコンドリア機能に及ぼす影響。日本マイコトキシン学会第73回学術講演会（2013年9月13日、於大阪府立大学）

[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. 30:1370-1381. 2013.
- 2) Ngampongsa S, Hanafusa M, Ando K, Ito K, Kuwahara M, Yamamoto Y, Yamashita M, Tsuru Y, Tsubone H.: Toxic effects of T-2 toxin and deoxynivalenol on the mitochondrial electron transport system of cardiomyocytes in rats. J Toxicol Sci. 38(3): 495-502. 2013.

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

食品汚染カビ毒の実態調査

研究分担者 小西 良子 麻布大学

研究要旨

カビ毒は、農業を営んでいる世界中のすべての地域にも存在し、防御や予防が非常に難しいことから、国際的にも農業規範や食品規格の策定が急がれている。また、地球温暖化などのカビ毒汚染への影響が深刻さをましてきている。

我が国は、輸入食品への依存性が高く、輸入食品の安全性を確保するために、JECFA などにおいて評価されるカビ毒及び我が国において問題となるカビ毒を対象に、我が国の汚染実態を把握し、然るべき対策をとる必要がある。

2010年から2012年の3年間に亘って、3種のフザリウムトキシン(T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノン)を対象に実態調査を行った結果、様々な市販食品中にそれらカビ毒の汚染が認められることがわかった。そのため、暴露評価に必要なデータを収集するために、さらに3年間対象を広げた調査を実施することとした。本研究に使う分析法は「カビ毒試験法評価委員会」で評価した。

今年度の実態調査は14種298品数を対象に行った。ゼアラレノンは、主に大麦、ゴマ、小豆及び雑穀米で、T-2 トキシンとHT-2 トキシンはライ麦粉、ハト麦加工品、ビール及び小豆から検出された。汚染濃度については、ハト麦粉と小豆のゼアラレノンの下限平均濃度が15 µg/kgを超えていた。T-2 トキシンについては、下限平均濃度が1 µg/kgを超えた食品はなく、HT-2 トキシンについては、ライ麦粉、ハト麦加工品及び小豆において下限平均濃度が1 µg/kgを超えており、小豆における平均濃度が最も高く、7.1 µg/kgであった。

研究協力者

吉成 知也 国立医薬品食品衛生研究所
甲斐 茂美 神奈川県衛生研究所
竹内 浩 三重県保健環境研究所
田中 敏嗣 神戸市環境保健研究所
谷口 賢 名古屋市衛生研究所
田端 節子 東京都健康安全研究センター
—
橋口 成喜 川崎市健康安全研究所
中島 正博 名古屋市衛生研究所
永山 敏廣 (明治薬科大学)

堀江 正一 (大妻女子学家政部)
内藤 成弘 ((独) 農業・食品産技術総合研究機構)
秋山 裕 (一財) 日本冷凍食品協会
伊佐川 聡 (一財) 日本食品分析センター
—
石黒 瑛一 (一財) 日本食品分析センター
—
佐藤 孝史 (一財) 食品分析開発センター
—
SUNATEC

A. 研究目的

食品を汚染するカビ毒は、国際的に JECFA やコーデックス委員会などで毒性評価や規格策定の準備が行われており、我が国においてもその対応が急がれている。JECFA では、2007 年以降総アフラトキシン、オクラトキシン A、デオキシニバレノール、フモニシンなどの摂取量の見直しが行われた。コーデックス委員会では、穀物中の総アフラトキシンやデオキシニバレノールの規格策定への動きも出てきており、我が国に関係する事項も多い。

国際的にもカビ毒に対する対策が整えられていることから、我が国でまだ規制値が決まっていないカビ毒に関して、輸入食品の安全性を確保するために、我が国の汚染実態を把握し、しかるべき対策をとる必要がある。

いままでに我が国では、パツリン(リンゴジュースの成分規格)及び総アフラトキシン(食品衛生法第 6 条 2 項)に規制値が決められている。デオキシニバレノールには今のところ暫定基準値が設定されているが、今後国際動向を見ながら、見直しを検討する必要がある。

本研究事業で対象とした T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンは、すでに JECFA において毒性評価がされているカビ毒であるが、コーデックス委員会での規格はまだ作られていない。これらのカビ毒はフザリウム属真菌が産生することから、フザリウム毒素とも言われている。フザリウム属真菌は、温帯地方に生息しており、我が国も生息地の一つである。そのため、2010 年度から 2012 年の 3 年間に亘って、麦類、トウモロコシ及びその加工品、豆類、米類などを中心に実態調査を行った。その結果、小麦、大麦、ハト麦加工品、小豆などの国産の農作物や輸入された小麦に T-2、HT-2 及びゼアラレノン汚染が認められた。そのためフザリウム毒素汚染に対して寄与率

の高い食品を対象に実態調査を続け、より正確な暴露評価が可能となるデータをさらに 3 年間収集することとした。本年度は、これまでに調査を実施した国産小麦、国産大麦、小麦粉、ライ麦粉、ハト麦加工品、グラノーラ、ビール、コーングリッツ、ゴマ、小豆、雑穀米、精米に加え、新たにソバとコーンフレークを対象とした。

B. 研究方法

実態調査に用いた国産小麦(40 点)及び国産大麦(10 点)は農林水産省から提供いただいた。その他の食品は、日本各地の小売店などからランダムに購入したものを用いた。

T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンの分析は、以下の方法で実施した。

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒メタノール：水(75：25)100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。添加回収試験の場合はそれぞれのカビ毒で定めた用量を添加し、暗所に 1 時間放置した後に抽出を行った。遠心分離(1410g、10 分間)により抽出液を分離した。

精製はイムノアフィニティーカラム(R-Biopharm Rhone 社、DZT MS-PREP)を用いた。抽出液 10 mL を正確にピペッターなどで 50 mL のメスフラスコにとり、PBS で 50 mL にメスアップした後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液 10 mL を IAC に添加し、蒸留水で洗浄後、メタノール 2 mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣を HPLC 移動相 0.5 mL に溶解し、試験溶液とした。

なお、2005 年から 2010 年に EU で実施された T-2 及び HT-2 の汚染実態調査の結果と本実態調査の結果の比較を容易にするために、本年度からは平均濃度の算出を以下の様にした。

下限平均濃度：定量限界値(LOQ)未満の値を全て 0 とし、平均値を算出

する。

上限平均濃度：検出限界値（LOD）未満の値を検出限界値に、検出限界値以上定量限界値未満の値を定量限界値とし、平均値を算出する。

< LC-MS/MS の測定例 >

HPLC

カラム：Inertsil ODS-4
3×50 mm, 2 μm

カラム温度：40

移動相：A 10 mM 酢酸アンモニウム
B メタノール

分離条件：0分 A : B = 95 : 5
8分 A : B = 10 : 90
14分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：10 μL MS

イオン化：ESI

モニタリングイオン：

T-2 トキシン(positive) 484/305

HT-2 トキシン(positive) 442/263

ゼアラレノン(negative) 317/131

C. 研究結果

(1) ゼアラレノン（表1、図1）

麦類については、国産小麦で検出率が60%、国産大麦では100%で、下限平均濃度はそれぞれ0.8、1.2 μg/kg/kgであり、最大濃度は国産小麦の22 μg/kgであった。

麦類加工品については、ライ麦粉における検出率が55%、ハト麦加工品で70%、国産小麦粉で19.4%、輸入小麦粉で16%、グラノーラで30%、ビールで10%であり、下限平均濃度はそれぞれ1.0、15.3、0.2、0.05、0.5、0.007 μg/kg/kgであり、最大濃度はハト麦加工品の170 μg/kg/kgであった。

トウモロコシ加工品については、コーングリッツで検出率が30%、コーンフレークで53.3%であり、下限平均濃度はいずれも0.5 μg/kg/kgであり、最大濃度はコーングリッツの2.4 μg/kg/kgであった。

その他、ソバで検出率が75%、ゴマで90%、小豆で90%、雑穀米で95%であり、下限平均濃度はそれぞれ0.6、1.7、33.4、6.2 μg/kg/kgであった。小豆で最大103 μg/kg/kg 検出される試料が認められた。精米からは検出されなかった。

(2) T-2 トキシン（表2、図2）

麦類については、国産小麦、国産大麦共に10%で、下限平均濃度はそれぞれ0.04、0.1 μg/kg/kgであり、最大濃度は国産大麦の1.5 μg/kg/kgであった。麦類加工品については、ライ麦粉における検出率が15%、ハト麦加工品で40%、国産小麦粉で8.3%、輸入小麦粉で12%、グラノーラで40%、ビールで95%であり、下限平均濃度はそれぞれ0.2、1.0、0.02、0.02、0.3、0.03 μg/kg/kgであり、最大濃度はハト麦加工品の9.5 μg/kg/kgであった。

トウモロコシ加工品については、コーングリッツで検出率が25%、コーンフレークで6.7%であり、下限平均濃度はそれぞれ0.2、0.01 μg/kg/kgであり、最大濃度はコーングリッツの1.0 μg/kg/kgであった。

その他、ソバで検出率が8.3%、小豆で75%、雑穀米で35%であり、下限平均濃度はそれぞれ0.1、0.8、0.5 μg/kg/kgであった。雑穀米で最大4.4 μg/kg/kg 検出される試料が認められた。ゴマと精米からは検出されなかった。

(3) HT-2 トキシン（表3、図3）

麦類については、国産小麦で検出率が17.5%、国産大麦では10%であり、下限平均濃度はそれぞれ0.5、0.8 μg/kg/kgであり、最大濃度は国産大麦の7.9 μg/kg/kgであった。

麦類加工品については、ライ麦粉における検出率が60%であり、ハト麦加工品で50%、国産小麦粉で8.3%、輸入小麦粉で20%、グラノーラで40%、ビールで85%であり、下限平均濃度はそれぞれ1.7、1.4、0.1、0.3、1.0、0.2 μg/kg/kgであり、最大濃度はハト麦加工品の

10.3 µg/kg /kg であった。

トウモロコシ加工品については、コーングリッツで検出率が15%、下限平均濃度は0.2 µg/kg /kg、最大濃度は1.4 µg/kg /kg であった。コーンフレークからは検出されなかった。

その他、ソバで検出率が41.7%、小豆で85%、雑穀米で40%であり、下限平均濃度はそれぞれ0.9、7.1、0.7 µg/kg /kg であった。小豆で最大103 µg/kg /kg 検出される試料が認められた。ゴマと精米からは検出されなかった。

(4) T-2 トキシン及び HT-2 トキシン (表4、図4)

2001年に行われたJECFAにおける毒性評価は、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの合計として一日耐容摂取量を規定している。そのため、本実態調査においても同様に合計汚染量を計算した。その結果、最も下限平均濃度が高かったのは小豆の7.9 µg/kg /kg であり、その次がハト麦加工品の2.3 µg/kg /kg であった。最大値は小豆の104 µg/kg /kg であった。

D. 考察

本年度の実態調査において、ゼアラレノンについてはハト麦加工品、小豆及び雑穀米における汚染が他の試料よりも高かった。ハト麦加工品では2010年度から今年度まで毎年平均8~18 µg/kg /kg の汚染が認められている。小豆では2010年度にはほとんど汚染が見られなかったが、2011年度から今年度まで毎年平均32~46 µg/kg /kg の汚染が認められている。雑穀米はハト麦加工品や小豆よりは汚染レベルは低いものの、2011年度以降は毎年平均数 µg/kg /kg の汚染が認められている。

T-2 トキシンについてはゼアラレノンと同様にハト麦加工品、小豆及び雑穀米で他の試料よりも汚染が高かった。しかし2012年度にはハト麦加工品で平均3.4 µg/kg /kg、小豆で平均15.4 µg/kg /kg の汚染が認められており、今

年度の汚染レベルは低下していた。

HT-2 トキシンについては、小豆における汚染が他の試料よりも高かった。

T-2 と HT-2 の合算値については、小豆が最も高く、平均7.9 µg/kg /kg、次いでハト麦加工品の平均2.3 µg/kg /kg、ライ麦粉の平均1.9 µg/kg /kg であった。小豆とハト麦加工品について年次変化はあるものの、他の試料よりも T-2、HT-2 汚染レベルが高いことがこれまでの実態調査結果からもわかっており、今後も調査を続ける必要がある。ライ麦粉については昨年度から調査を開始しており、昨年度は T-2 と HT-2 の合計が150 µg/kg /kg 検出された試料があったため、今年度は調査数を増やした。今年度の結果では合計値が最も高いもので10.1 µg/kg /kg と、昨年度ほど高い試料はなかったものの、平均汚染濃度は他の試料と比較した高いため、今度も調査を続ける必要がある。小麦粉については国産品を原料としたものと輸入品を原料としたものを区別して調査を行った。両者とも合計値の下限平均濃度は0.5 µg/kg /kg 以下と低く、また最大値についても大きな差は認められなかった。ライ麦粉とハト麦加工品以外の麦類加工品では、グラノーラの汚染が平均1.3 µg/kg /kg でライ麦粉に次いで高い傾向にあった。グラノーラは2011年度にも調査を行っており、合計値の平均が2.3 µg/kg /kg であり、毎年一定レベルの汚染は認められている。今年度初めて調査を行ったソバについては、合計値の平均が1.0 µg/kg /kg、最大値が9.5 µg/kg /kg であり、国産の小麦や大麦の値を上回っていた。今年度は12検体のみの調査であったが、来年度以降は調査数を増やす必要がある。

海外における汚染実態については、2005~2010年にかけてヨーロッパにおいて大規模な調査が実施され、その結果が公表されている。その調査では、22ヶ国が参加し、麦類、トウモロコシ

類、コメやそれらの加工品、計 20519 サンプルが対象とされた。例えば小麦においては、計 4738 サンプルが調査され、検出率が 27%、T-2 と HT-2 の合算値の平均値が 4.9 (下限平均濃度) ~ 15 (上限平均濃度) $\mu\text{g}/\text{kg}$ / kg 、最大値が 1165 $\mu\text{g}/\text{kg}$ / kg という結果が報告されている。調査数が大きく異なるため比較は困難ではあるが、日本の食品における T-2、HT-2 汚染はヨーロッパよりも低い傾向が認められた。

E. 結論

今年度は、6 年間通年で 3 種のフザリウムトキシン (T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノン) を測定する 4 年目となる。

毒性の高い T-2 トキシン及び HT-2 トキシンが今年度も小麦、大麦、麦類加工品で検出された。その他、ソバ、小豆、雑穀米からも検出されたが、全体的に昨年度よりも汚染レベルが低い傾向にあった。カビ毒の汚染には年次変化があることを踏まえ、汚染が認められる試料を重点的に調査していく必要性が示唆された。

F. 研究業績

【学会発表】

- 1) 吉成知也 : 日本の市販品におけるデオキシニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンの汚染実態。日本マイコトキシン学会第 73 回学術講演会 (2013.9)
- 2) 竹内浩、吉成知也、青山幸二、中島正博、谷口賢、橋口成喜、甲斐茂美、田端節子、田中敏嗣、佐藤孝史、松井好之、小木曾基樹、石黒瑛一、小西良子: 日本に流通する食品中の T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノンを対象とした 3 年間サーベイランス。第 106 回日本食品衛生学会学術講演会(2013.11)

G. 参考文献

- 1) European Food Safety Authority. (2011). T-2 and HT-2 toxins in food and feed. EFSA Journal, 9, 2481.

表1 ゼアラレノンの汚染実態

試料名	調査数	検出率 (%)	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	下限平均濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	上限平均濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	最大濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
国産小麦	40	60.0	0.02	0.05	0.8	0.8	22.0
国産大麦	10	100	0.02	0.05	1.2	1.2	6.0
ライ麦粉	20	55.0	0.07	0.2	1.0	1.1	10.3
ハト麦加工品	20	70.0	0.05	0.2	15.3	15.3	170
小麦粉(国産小麦)	36	19.4	0.02	0.06	0.2	0.2	2.5
小麦粉(輸入小麦)	25	16.0	0.02	0.06	0.05	0.1	0.9
グラノーラ	10	30.0	0.1	0.3	0.5	0.6	1.6
ビール	20	10.0	0.01	0.02	0.007	0.02	0.1
コーングリッツ	20	30.0	0.1	0.3	0.5	0.6	2.4
コーンフレーク	15	53.3	0.02	0.05	0.5	0.5	2.3
ソバ	12	75.0	0.05	0.2	0.6	0.7	2.4
ゴマ	20	90.0	0.01	0.03	1.7	1.7	11.8
小豆	20	90.0	0.2	0.6	33.4	33.5	103
雑穀米	20	95.0	0.2	0.6	6.2	6.2	59.5
精米	10	0	0.6	2	0	0.6	-

表2 T-2 トキシンの汚染実態

試料名	調査数	検出率 (%)	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	下限平均濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	上限平均濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	最大濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
国産小麦	40	10.0	0.02	0.07	0.04	0.06	0.7
国産大麦	10	10.0	0.02	0.07	0.1	0.2	1.5
ライ麦粉	20	15.0	0.07	0.2	0.2	0.3	1.7
ハト麦加工品	20	40.0	0.07	0.2	1.0	1.0	9.5
小麦粉(国産小麦)	36	8.3	0.03	0.1	0.02	0.05	0.4
小麦粉(輸入小麦)	25	12.0	0.03	0.1	0.02	0.05	0.3
グラノーラ	10	40.0	0.1	0.3	0.3	0.3	1.5
ビール	20	95.0	0.003	0.01	0.03	0.03	0.1
コーングリッツ	20	25.0	0.1	0.3	0.2	0.3	1.0
コーンフレーク	15	6.7	0.02	0.07	0.01	0.03	0.1
ソバ	12	8.3	0.07	0.2	0.1	0.2	1.2
ゴマ	20	0	0.02	0.05	0	0.02	-
小豆	20	75.0	0.04	0.1	0.8	0.9	4.2
雑穀米	20	35.0	0.04	0.1	0.5	0.5	4.4
精米	10	0	0.1	0.3	0	0.1	-

表3 HT-2 トキシンの汚染実態

試料名	調査数	検出率 (%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	下限平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	上限平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
国産小麦	40	17.5	0.1	0.4	0.5	0.7	6.4
国産大麦	10	10.0	0.1	0.4	0.8	0.9	7.9
ライ麦粉	20	60.0	0.3	1	1.7	2.1	8.4
ハト麦加工品	20	50.0	0.1	0.3	1.4	1.5	10.3
小麦粉(国産小麦)	36	8.3	0.1	0.3	0.1	0.3	2.3
小麦粉(輸入小麦)	25	20.0	0.1	0.3	0.3	0.4	3.5
グラノーラ	10	40.0	0.4	1	1.0	1.2	5.2
ビール	20	85.0	0.02	0.05	0.2	0.2	0.6
コーングリッツ	20	15.0	0.4	1	0.2	0.5	1.4
コーンフレーク	15	0	0.1	0.4	0	0.1	-
ソバ	12	41.7	0.1	0.3	0.9	1.0	8.3
ゴマ	20	0	0.08	0.3	0	0.1	-
小豆	20	85.0	0.05	0.2	7.1	7.1	103
雑穀米	20	40.0	0.05	0.2	0.7	0.8	3.0
精米	10	0	1	4	0	1.0	-

表4 T-2 トキシンと HT-2 トキシンの合算値

試料名	調査数	下限平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
国産小麦	40	0.6	7.1
国産大麦	10	0.9	9.3
ライ麦粉	20	1.9	10.1
ハト麦加工品	20	2.3	19.9
小麦粉(国産小麦)	36	0.2	2.4
小麦粉(輸入小麦)	25	0.4	3.7
グラノーラ	10	1.3	6.8
ビール	20	0.2	0.7
コーングリッツ	20	0.4	2.4
コーンフレーク	15	0.01	0.1
ソバ	12	1.0	9.5
ゴマ	20	0	0
小豆	20	7.9	104
雑穀米	20	1.2	7.3
精米	10	0	0

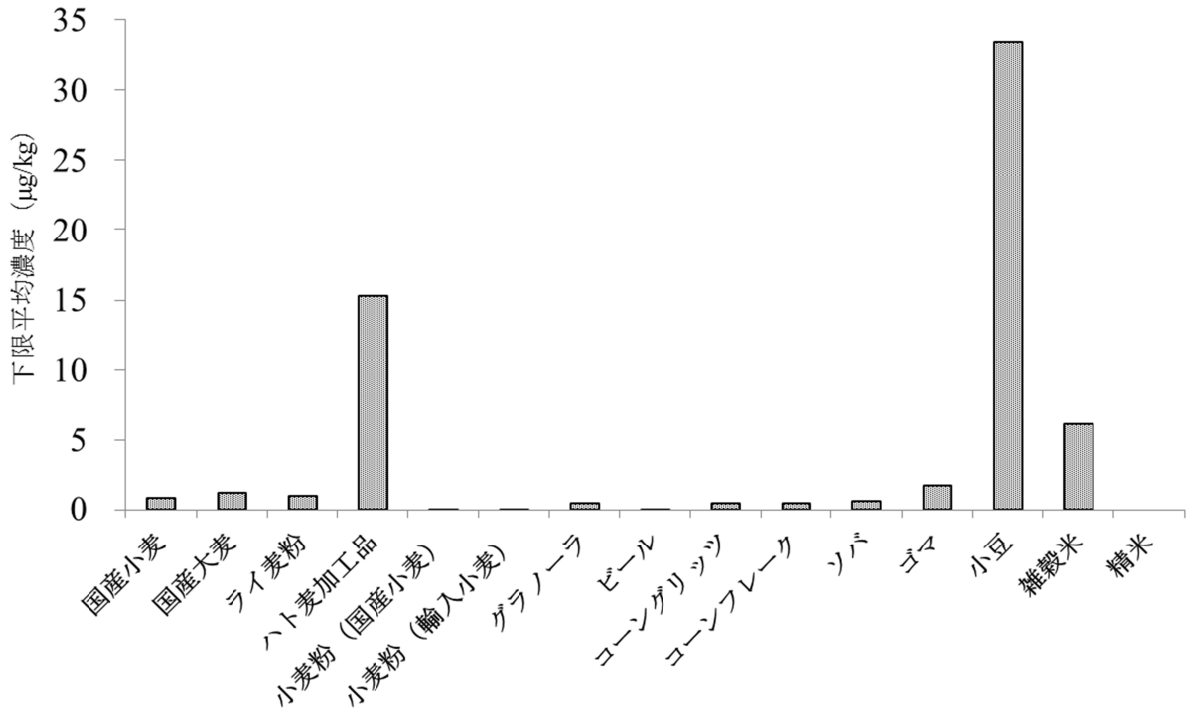


図1 ゼアラレノンの汚染実態

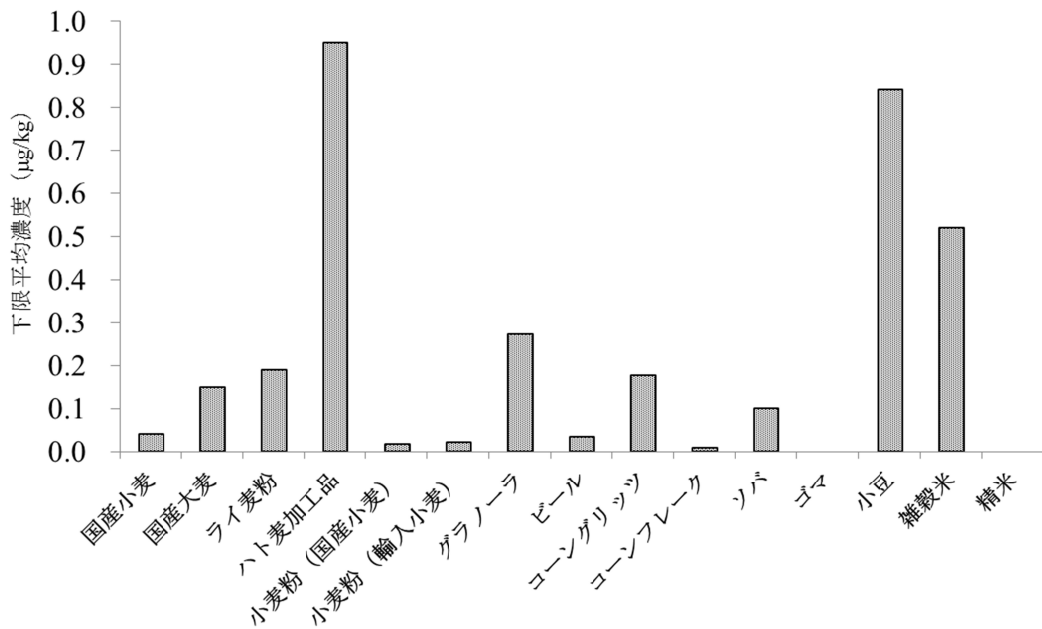


図2 T-2 トキシンの汚染実態

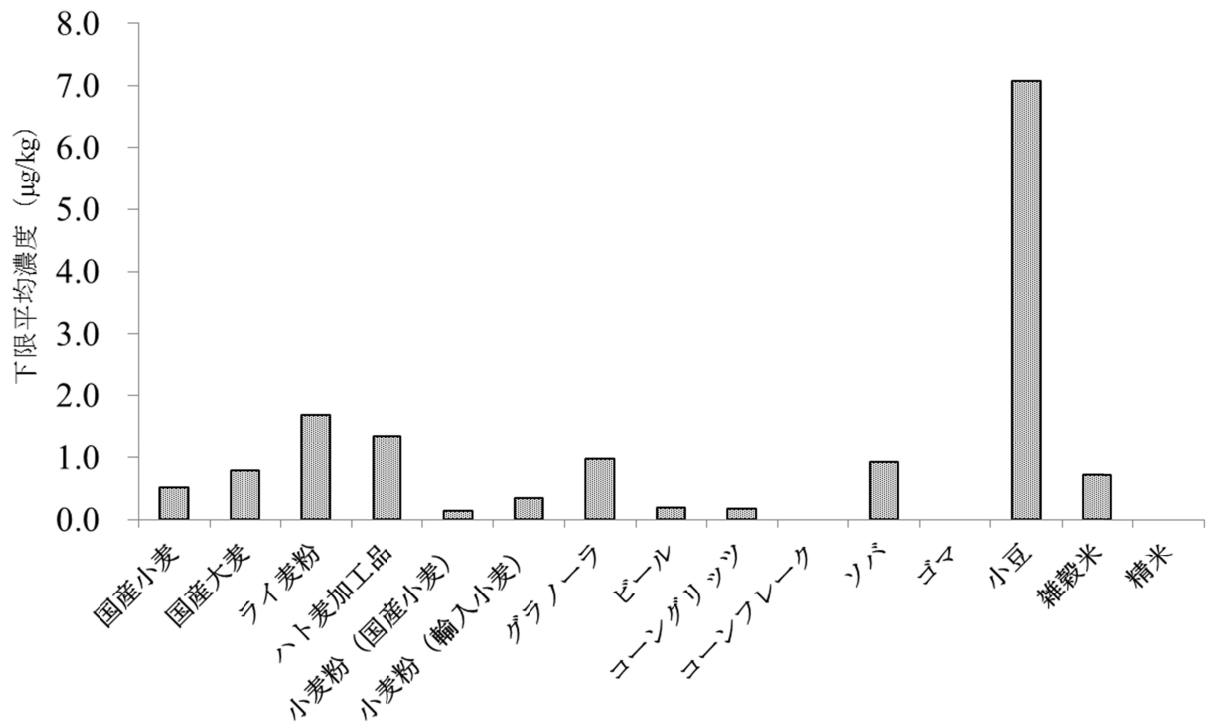


図3 HT-2 トキシンの汚染実態

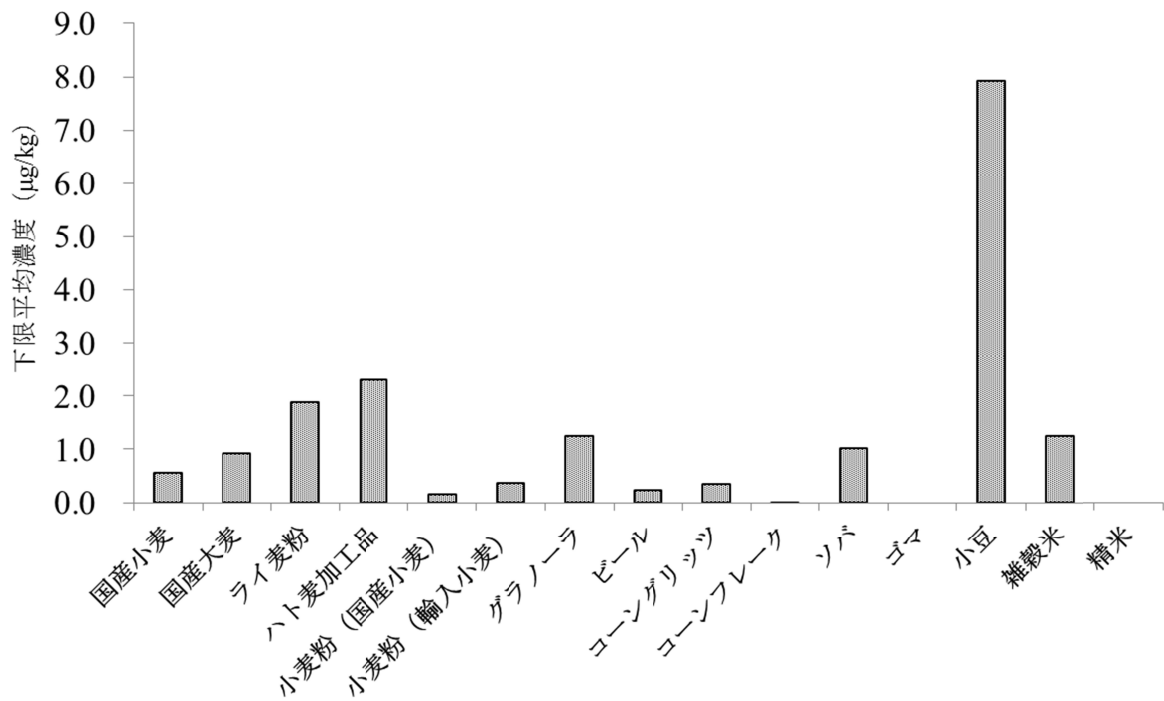


図4 T-2 トキシンとHT-2 トキシンの合算値

厚生労働科学研究費補助金

(食品の安全確保推進研究事業)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と 生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

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	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

Fusarium 属菌は、毒性の強いマイコトキシンを産生する菌として様々な農作物に分布することが知られ、食品衛生学上重要な真菌である。近年の調査では、国産の小豆において、毒性の強いトリコテセン系マイコトキシンをはじめとした複数のマイコトキシンの高濃度・高頻度の汚染が確認されている。しかし、汚染原因となる *Fusarium* 属菌の分布状況など生態については調査が進んでおらず、農作物全体をみても、ある特定の地域や作物を対象とした限定された菌種の分布状況が調査されているのみである。そこで本研究では、国内に流通する小豆を中心とした食品について、産地別に *Fusarium* 属菌の分布状況を検討した。国産小豆および対照として国産大豆・外国産小豆の計 20 検体を供試した。小豆および大豆の全粒を寒天平板培地上で培養後、*Fusarium* 属菌の特徴を示すコロニーの発育がみられた粒数を計測した。発育したコロニーを単離し、形態観察および分子生物学的指標によって同定した。その結果、*Fusarium* 属菌の陽性検体数は、国産小豆では 8 検体(88.9%)、国産大豆では 4 検体(57.1%)、外国産小豆では 0 検体(0.0%)となり、外国産小豆からは *Fusarium* 属菌の検出は無く、国産小豆の陽性検体率は、国産大豆および外国産小豆と比較して有意に高かった($p < 0.05$)。小豆・大豆 100 粒あたりの *Fusarium* 属菌の陽性粒率が最も高かった検体は、国産小豆では北海道産で 9.0%であった。各地域の大豆・小豆から検出された *Fusarium* 属菌種には、産地によって偏りがみられ、*Fusarium* 属菌の地理的分布が異なる可能性が示唆された。また、検出菌種にはトリコテセン系マイコトキシン等の産生菌が含まれた。今後、供試検体のマイコトキシン汚染状況および分離株のマイコトキシン産生性について解析を進め、さらに 1 産地あたりの検体数や産地のバリエーションを増やして調査を継続し、日本各地の小豆におけるマイコトキシン汚染とその原因、産生地域別のリスクについて明らかにする必要があると考えられた。

A. 研究目的

真菌は食品に付着した後に適当な温度・湿度等の条件が揃えば発育する。この時、第2次代謝産物であるマイコトキシンを産生し、豆類・穀類をはじめとする食品を汚染する。マイコトキシンをヒトが経口摂取した場合、発がん性、変異原性、腎・肝障害性¹⁾などの健康危害性を発揮する。マイコトキシンは低分子で熱に強いことが知られ²⁾、調理で用いられる100~200℃程度の熱では分解できず、マイコトキシンの食品汚染は、食品衛生上重要な問題となっている。

マイコトキシンのうち、トリコテセン系マイコトキシンは、特に毒性が強いものの一つとして知られ、いわゆるトリコテセン骨格(図1)を共通構造として有するものの総称である³⁾。その構造によりタイプAからDの4つのタイプに分類され、タイプAには、T-2トキシンやHT-2トキシン、タイプBにはニバレノールやデオキシニバレノールが含まれる³⁾。我が国においては、小麦中において2003年5月にデオキシニバレノールで暫定基準値1.1ppmが設定された⁴⁾。タイプAの毒性はタイプBと同等もしくはそれ以上であると考えられているが、国内流通食品での汚染実態の解明は不十分であり、基準値等は制定されていない。

トリコテセン系マイコトキシンの食品における自然汚染は中緯度から高緯度の広範囲の地域で栽培された麦類およびトウモロコシなどの穀類を中心に世界中で頻繁に起きており、北米、ヨーロッパ、アジア、オセアニアなど、世界中で生産された穀類からの検出例が多数報告されている³⁾。過去に世界で発生した、トリコテセン系マイコトキシンの摂取によるヒトでの食中毒事例としては、以下のものが挙げられる。1940年代に旧ソビエト連邦のシベリアでATA症(alimentary toxic aleukia: 食中毒性無白血球症)により患者の30~80%が死亡し、原因物質としてT-2トキシンが推定されている³⁾。イ

ンドのカシミール地方では1987年、カビに汚染された小麦粉から作ったパンを摂取したために中毒症が発生し、原因食品の小麦粉からデオキシニバレノール、ニバレノール、T-2トキシンが検出されている³⁾。我が国でも、1949年および1965年に北海道で、1946年および1955年に東京で、トリコテセン系マイコトキシンが原因と考えられる食中毒が発生している³⁾。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、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事実が確認された⁵⁾。

トリコテセン系マイコトキシンの主な産生菌は*Fusarium*属菌である。*Fusarium*属菌が産生するマイコトキシンは総称してフザリウムトキシンと呼ばれ、この中で最も頻出されるマイコトキシンはゼアラレノンである。本トキシンの毒性は、現状では急性毒性よりも女性ホルモン様作用についてよく知られており、深刻な家畜に対する経済的影響をもたらす。ゼアラレノンの自然汚染はヨーロッパ、アメリカ、アジア、アフリカと世界中に広がっており、トウモロコシ、麦類などから検出されている³⁾ことが示すように、過去に世界中で多くのゼアラレノンの摂取による家畜での食中毒事例が報告されている。その例としては、オーストラリアの養豚場でゼアラレノンに汚染されたトウモロコシを摂取したブタ25頭が死亡した³⁾。ヒトへの食中毒事例の報告は無いが、汚染事例および濃度が高いだけに、内分泌攪乱物質としての影響が危惧されている。

*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。菌種によって病原性を発揮する植物等自然界の分布には特異性が有り、また産生するマイコトキシンにも菌種特異性があるため、食品のフザリウムトキシン汚染を制御するためには、菌種レベルの生態把握が必要となる。わ

が国においては、*Fusarium graminearum* や *Fusarium oxysporum* 等一部の *Fusarium* 属菌種のみに関して、ある特定の地域における地理的分布状況が調査されるのみに留まり⁶⁻¹⁰⁾、*Fusarium* 属菌分布の全体像は把握されていない。フザリウムトキシンの汚染実態を鑑み、T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよびゼアラレノンをはじめとしたフザリウムトキシン産生菌の国産小豆における汚染実態の把握を行う必要がある。

以上のことから、本研究では、*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ことを目的として、国産および輸入の小豆を中心とした食品について、*Fusarium* 属菌の汚染状況を検討した。

B. 研究方法

(1) 供試検体

北海道産小豆 5 検体、山形県産小豆 1 検体、千葉県産小豆 1 検体、熊本県産小豆 2 検体、小豆の対照試験に用いる検体として、北海道産大豆 1 検体、宮城県産大豆 1 検体、福島県産大豆 1 検体、茨城県産大豆 2 検体、千葉県産大豆 1 検体、熊本県産大豆 1 検体、外国産小豆として中国産小豆 2 検体、カナダ産小豆 2 検体を供試した。詳細は表 1、図 3 に示した。なお、一部の検体は、本研究班の研究分担者・小西らの本年度の研究で供試された検体と同一のものを利用したため、共通の ID を付した。

(2) 食品からの菌株分離

小豆および大豆検体は、70%エタノールで 30 秒間洗浄し、その後純水で洗浄した後に実験に供した。用いた全ての寒天培地には Chloramphenicol (Cloramphenicol: 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) および Dichloran Glycerol Ager (DG-18:

関東化学株式会社、東京都) 平板上に、洗浄した小豆または大豆を置き、25℃ 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℃ で 1~2 週間培養した(図 2)。得られた分離菌株を PDA 斜面培地に接種し、25℃ で 1~2 週間培養した後、8℃ で保存した。

(3) 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。

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(図 4)。さらに *Fusarium* 属は、PDA 上では菌種の特徴となるべき巨大分生子の形成が少ないことがあることから、分生子形成を促進させるカーネーションリーフ寒天培地 (CLA) を用いての培養を行い、プレパラートを作製して、形成された孢子形状および孢子形成様式を顕微鏡で観察した(図 4)。培養は、25℃ 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¹¹⁾ を参照し、同定を行った。

分子生物学的同定法

染色体 DNA の抽出法として、PDA 斜面培地上のコロニーを 2.0 ml マイクロチューブに入れた Potato Dextrose Broth (PDB: Becton and Dickinson Company, USA) 1 ml に接種後、25℃ で 1 晩培養した。培養後、4℃・15,000 rpm で 10 分間遠心分離にかけ、上清を取り除き、菌体のみを得た。菌体からの DNA 抽出は SDS 抽出法¹⁸⁾を用いて行った。

遺伝子塩基配列の決定は、PCR 産物のダイレクトシーケンシング法により行った。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 β -tubulin 遺伝子(β -*tub*)の塩基配列を決定した。

プライマーは、rDNA 関連遺伝子群については ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTAACAAGG-3') および NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG G-3')¹²⁾、 β -*tub* については Btu_F-F01(5'-CAGA CCGGTCAGTGCGTAA-3') および Btu-F_R01 (5'-TTGGGGTTCGAACATCTGCT-3')¹³⁾を用いた。PCR 反応は、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社、滋賀県)を用い、反応液の組成は添付の実験マニュアルに従った。反応条件は、94・3分で熱変成させた後、94・30秒、60・40秒、72・50秒を1サイクルとして35サイクル行い、最後に72・5分の伸長反応を行った。この後、アガロースゲル電気泳動によって遺伝子増幅の有無を確認した。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)を用い、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。シーケンス反応は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社、米国)を用い、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。プライマーは、前述のPCR反応と同様のものを用いた。シーケンス反応物の精製は、Applied Biosystems社が公開している簡易実験マニュアルに従い、エタノール/EDTA/酢酸ナトリウムを用いる方法によって行った。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。

遺伝子塩基配列の解析は、以下の手順によって行った。得られたシーケンスデータは、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 β -*tub* の部分塩基配

列を得た。得られた塩基配列を用いて、National Center for Biotechnology Information (NCBI) で提供している Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用い、GenBank 登録配列との相同性検索を行った。この検索結果を参照し、菌種の決定を行った。

C. 研究結果

(1) *Fusarium* 属菌の検出状況

各供試検体における *Fusarium* 属菌陽性粒率を図5に示した。北海道産小豆(5検体)では最も高い陽性粒率は9.0%であった。山形県産小豆(1検体)では1.0%、千葉県産小豆(1検体)では1.0%、熊本県産小豆(2検体)では5.0%であった。カナダ産小豆(2検体)では0.0%、中国産小豆(2検体)では0.0%であった。以上のことから、小豆では、*Fusarium* 属菌陽性粒率が北海道産で高く、外国産についてはすべての検体で *Fusarium* 属菌は検出されなかった。大豆では、北海道産大豆、宮城県産大豆、千葉県産大豆(それぞれ1検体)では0.0%、福島県産大豆(1検体)では3.0%、茨城県産大豆(2検体)では13.0%および20.0%、無選別の熊本県産大豆(1検体)では1.0%であった。

また、*Fusarium* 属菌の陽性検体数を表2に示した。国産小豆では9検体中8検体(88.9%)、国産大豆では7検体中4検体(57.1%)、外国産小豆では4検体中0検体(0.0%)となり、国産小豆の陽性検体率は、国産大豆および外国産小豆と比較して有意に高かった($p < 0.05$)。国産の大豆・小豆別および産地別にみた場合、陽性検体率が最も高かったのは北海道産小豆で、5検体中4検体(80.0%)であった。

(2) 小豆および大豆ごとの *Fusarium* 属菌検出状況

小豆および大豆から検出された *Fusarium* 属菌の菌種一覧および割合を、表3、4および図6

に示した。国産小豆からは *F. oxysporum*、*Fusarium incarnatum/equiseti/scirpi* species complex(FIESC)¹⁴⁾、*F. proliferatum*、*F. avenaceum* および *F. camptoceras* が検出された。割合としては、*F. oxysporum* が最も高率に検出された。*F. oxysporum* はモニリフォルミンやフモニシンといった近年注目されているマイコトキシンの産生菌として知られる¹⁵⁾。その他には、*F. proliferatum*、*F. camptoceras*、および *F. avenaceum* が検出された。*F. avenaceum* はモニリフォルミン、*F. proliferatum* はモニリフォルミンやフモニシンの産生性が報告されている^{15、16)}。*F. camptoceras* についてはマイコトキシン産生性はこれまでのところ報告されていない。

国産大豆からは FIESC、*F. proliferatum* および *F. oxysporum* が同定された。大豆では species complex である FIESC に属する菌種が最も高率に検出された。species complex とは、形態学および分子生物学的な性質が非常に類似しており識別が困難な、互いに近縁な種の複合体を示す。FIESC の代表菌種は *F. semitectum*、および *F. equiseti* である。これらの菌種は、T-2 トキシン、HT-2 トキシンなどのトリコテセン系マイコトキシンおよびゼアラレノンを生産するとの報告がある²⁰⁾。

小豆と大豆から検出された菌種を比較すると、*F. avenaceum* および *F. camptoceras* は小豆のみ検出され、小豆では比較的菌種の多様性がみられた。

(3)小豆における地域ごとの *Fusarium* 属菌種別検出状況

各地域の小豆から検出された *Fusarium* 属菌の内訳を図 7 に示した。北海道産の小豆からは 18 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち *F. oxysporum* が 6 株 (検出された *Fusarium* 属菌のうち 30.0%)、FIESC が 5 株(27.7%)、

F. camptoceras が 1 株(5.6%)、*F. avenaceum* が 1 株(5.6%)、*Fusarium* sp.は 5 株(27.7%)と同定された。熊本県産の小豆からは 6 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち *F. proliferatum* が 1 株(16.7%)、FIESC が 1 株(16.7%)、*Fusarium* spp.が 4 株(66.7%)と同定された。山形県産の小豆および千葉県産の小豆から分離された *Fusarium* 属菌 2 株はいずれも *Fusarium* spp.であったと同定された。北海道産では、熊本県産では検出されなかった *F. camptoceras* および *F. avenaceum* が、熊本県産では、北海道産では検出されなかった *F. proliferatum* が、それぞれ検出された。

(4)大豆における地域ごとの *Fusarium* 属菌種別検出状況

各地域の大豆から検出された *Fusarium* 属菌の内訳を図 8 に示した。茨城県産の大豆からは 33 株の *Fusarium* 属菌が検出され、そのうち FIESC が 16 株(48.5%)、*F. proliferatum* が 1 株(3.0%)、*Fusarium* sp.は 16 株(48.5%)と同定された。熊本県産の大豆からは 1 株の *Fusarium* 属菌が検出され、*F. oxysporum* と同定された。福島県産の大豆から検出された *Fusarium* 属菌 3 株はすべて *Fusarium* spp.と同定された。

D. 考察

我が国ではこれまで、*Fusarium* 属菌の地理的分布について、網羅的な地域および菌種を対象とした検討が行われておらず、全体像が明らかになっていなかった。そこで、北海道、東北、関東、九州と地理的に異なる地域産の小豆および大豆を対象に、*Fusarium* 属菌の汚染状況の調査を行った。

Fusarium 属菌の陽性粒率を各地域間で比較したところ、茨城県産大豆 2 検体では、他地域と比較すると 20.0%および 13.0%と非常に高率であった(図 4)。今回供試した 2 検体は製品加

工工程での選別過程を経ていない無選別の検体であり(表 1)、そのような農作物は真菌やマイコトキシン汚染を高濃度に受けている傾向にあるという報告¹⁷⁾があることから、無選別であったことが影響した可能性がある。このことから、小豆・大豆でも、流通前の選別によって *Fusarium* 属菌やフザリウムトキシンに汚染された個体を除去することができ、製品全体の汚染のリスクを低下させることができる可能性が考えられた。ただし、無選別の熊本産小豆および大豆では陽性粒率は高くなく、今後は、同じ条件で栽培された検体を用いて、選別されたものと無選別のものとの間で、*Fusarium* 属菌やフザリウムトキシンの汚染量・汚染率を比較検討する必要があると考えられた。

Fusarium 属菌の陽性検体率および検出菌種について、国産大豆、国産小豆および外国産大豆の間で比較検討を行ったところ、国産小豆では 88.9%の検体から *Fusarium* 属菌が検出されており、国産大豆よりも有意に高い結果となった。近年の食品のフザリウムトキシン汚染実態調査⁵⁾において、国産小豆では最大でゼアラレノンが 125.0 ppb、T-2 トキシンが 48.4 ppb、HT-2 トキシンが 45.7 ppb 検出されており、一方で国産大豆では最大でゼアラレノンが 0.0 ppb、T-2 トキシンが 4.3 ppb、HT-2 トキシンが 3.1 ppb と低く、国産小豆での高い汚染傾向が示されており、本研究において得られた国産小豆における高い *Fusarium* 属菌汚染状況は、国産小豆の高濃度・高頻度なフザリウムトキシン汚染状況と一致した傾向を示した。また、研究分担者・小西らの本年度の研究成果(分担研究報告書参照)から、本研究で供試した一部の小豆検体の T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノンおよび DON の汚染状況が示された。これと本研究の表 4 を比較すると、検体 ID:25-AD14 および 19 の高濃度のゼアラレノン汚染はゼアラレノン産生菌である FIESC によるものであ

る可能性が考えられた。今後、分離株のフザリウムトキシン産生能の調査を行う必要がある。

さらに、本研究班研究分担者・作田らの本年度の研究成果から、今回の供試検体から分離された一部の *Fusarium* 属菌株のトリコテセン系マイコトキシンの産生性が調査された(分担研究報告書「カビ毒産生菌の生態学的研究」参照)。これによると、小豆および大豆由来株からは T-2 および HT-2 トキシン産生性は確認されていないものの、ジアセトキシシルペノール(DAS)産生性が 10 株中 3 株から確認された。今後、本研究で供試した検体に関して、DAS 等、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシン以外のトリコテセン系マイコトキシンの産生性を調査する必要がある。さらに、小西らの本年度の研究成果から高濃度・高頻度のゼアラレノン汚染が検出されたこと、本研究の結果からゼアラレノン産生能を持つ菌種が多数分離されたことから(表 4)、今後これらの分離株についてゼアラレノン産生性についても検証する必要があると考えられた。

また、国産小豆では *Fusarium* 属菌が高い陽性検体率であったが、外国産小豆では *Fusarium* 属菌は 1 検体からも検出されなかった(表 2、図 5)。研究分担者・小西らの研究成果から、本研究で供試した 4 検体の外国産小豆からはいずれのフザリウムトキシンも検出されず(分担研究報告書参照)、*Fusarium* 属菌検出状況はマイコトキシン汚染状況と一致した傾向を示した。このことから、外国産小豆は、国産小豆と比較して *Fusarium* 属菌およびフザリウムトキシンの汚染頻度が低い可能性が示唆された。しかし、今回の検討で用いた供試検体数には限りがあるため上述のように結論付けるには不十分なデータであると言え、今後検証を続ける必要がある。

各地域の小豆および大豆から検出された *Fusarium* 属菌の割合について(図 7、8)、北海道産および熊本県産から検出された *Fusarium* 属菌種の傾向の違いが示され、国内

において *Fusarium* 属菌の地理的分布が異なる可能性が示唆された。しかし、外国産小豆同様、今回の検討で用いた供試検体数および産地のバリエーションには限りがあり、今後 1 産地あたりの供試検体数を増やすとともに、様々な地域の検体について調査を継続する必要がある。

E. 結論

本研究の結果から、国産小豆はある程度の頻度および濃度で *Fusarium* 属菌に汚染されていることが明らかとなり、フザリウムトキシン汚染状況を裏付ける結果が得られた。今後、今回供試した検体のマイコトキシン汚染状況および分離株のマイコトキシン産生性について解析を進め、さらに 1 産地あたりの検体数や産地のバリエーションを増やして調査を継続し、日本各地の小豆におけるマイコトキシン汚染とその原因、産生地域別のリスクについて明らかにする必要があると考えられた。

F. 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)

G. 参考文献

- 1) 宇田川俊一. (2004) 食品のカビ汚染と危害. 幸書房. 東京.
- 2) 村上尚. (2004) 食品におけるマイコトキシン汚染の実態とその除去. マイコトキシン 43:27-31.
- 3) 宇田川俊一, 田端節子, 中里光男. (2002) マイコトキシン. 中央法規. 東京.
- 4) 厚生労働省行政情報 - 報告 小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について. 2002/05/21 - 通知. (2014 年 1 月 28 日アクセス)
<http://www.ffcr.or.jp/Zaidan/mhwinform/ab440e922b7f68e2492565a700176026/0da129a07813d14349256df6000bc432?OpenDocument>
- 5) 局博一ら. (2013) 食品汚染カビ毒の実態調査ならびに生体毒性影響に関する研究. 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), 平成 22 年度 ~ 24 年度 総合研究報告.
- 6) 一戸正勝, 高鳥浩介, 倉田浩. (1973) オオムギ、コムギ穀粒における糸状菌分布. 菌蕈研究所研究報告第 10 号. 627-636.
- 7) 上田晃久, 西本博之, 加藤順久ら. (2007) 東海地方に分布するムギ類赤かび病菌の菌種及びマイコトキシン産生型. 愛知県農業総合試験場研究報告. 39:17-23.
- 8) Suga, H., Karugia, G. W., Ward, T. et al. (2008) Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in

- Japan. *Phytopathology*. 98:159-166.
- 9) Aoki, T., Tanaka, F., Suga, H., et al. (2012) *Fusarium azukicola* sp. Nov., an exotic azuki bean root-rot pathogen in Hokkaido, Japan . The Mycological Society of America. 104(5) 1068-1084.
- 10) 勝部和則 . (1999) 日本産 *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* 菌糸和合性群の地理的分布および圃場内個体群構造. 日本植物病理学会報. 65:563-568.
- 11) Nelson, E.P., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1984) *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- 12) 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.
- 13) 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 Agric. 91:2500-2504.
- 14) O'Donnell, K., Deanna A. Sutton, Mihael G. Rinadi, et al. (2009) Novel Multilocus Sequence Typing Scheme Reveals High Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* Species Complexes within the United States. J Clin Microbiol 12:3851-3861.
- 15) Marasas, W.F.O., Nelson, E.P., T.A. Toussoun. (1984) Toxigenic *Fusarium* Species . The Pennsylvania State University Press. United States of America.
- 16) Jimenez, M., Huerta, T., Mateo, R. (1997) Mycotoxin Production by *Fusarium* species Isolated from Bananas. Environmental Microbiology. 1997-2:364-369.
- 17) 高橋治男. (2012) 落花生やナッツ類のアフラトキシン汚染と近赤外選別機などを利用したその減衰について. 一般財団法人 マイコトキシン検査協会 資料. (2014 年 1 月 28 日アクセス)
<http://www.mycotoxin.or.jp/PDF/kinsek.pdf>

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

カビ毒産生菌の生態学的研究

研究分担者 作田庄平 東京大学大学院農学生命科学研究科
研究協力者 吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

国産大豆、国産小豆あるいは外国産小麦より研究分担者(渡辺麻衣子)が分離した *Fusarium* 属菌の代謝産物を分析する方法の検討を行った。それぞれのカビを液体培地で静置培養し、得られた培養液上清の酢酸エチル抽出物を分析サンプルとした。4種のカビ毒(T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ネオソラニオールおよびジアセトキシシルペノール)が良好に分析できる LC-TOF/MS の分析条件を用いて、11種のカビについて代謝産物を調べた。その結果、11種合計で580の代謝産物が検出され、また、標準品とした4種のカビ毒の生産性については、T-2 トキシン生産菌が1株、ジアセトキシシルペノール生産株が4株であったことより、本分析法は、次年度以降で行う多くの菌株についての代謝産物の分析に有効であると考えられた。

A. 研究目的

過去の研究から、輸入コムギ、国産小豆等において、フザリウムトキシンの一種であるゼアラレノン、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの高濃度・高頻度の汚染が確認されている。しかし、これらのフザリウムトキシン汚染の原因菌については、明らかにされていない。また、原因菌は、菌種によって、これらのフザリウムトキシンと同時に、これまで国内流通食品において汚染状況が知られていなかった複数のマイコトキシンを産生する可能性が高いことも考えられる。そこで、国内流通食品における、これら複数のフザリウムトキシンによる汚染のリスクを明らかにするために、研究分担者の渡辺麻衣子が国産および輸入食品から分離した *Fusarium* 属菌について、それら菌株の生産す

るマイコトキシンを同定することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. カビの培養

渡辺が国産小豆、国産大豆あるいは外国産小麦から単離した11種のカビ(表1)について、以下の組成の液体培地 100 mL を入れた 300 mL 容三角フラスコで7日間、25℃で静置培養を行った。

培地組成(1L当り)

硝酸ナトリウム	2.0 g
リン酸水素二カリウム	1.0 g
塩化カリウム	0.5 g
硫酸マグネシウム	0.5 g

酵母エキス 2.5 g
ポリペプトン 5.0 g
スクロース 50 g

キャピラリー電圧：3500 V
検出範囲： m/z 70 ~ 950
イオンモード：positive

2. 抽出液の調製

ろ過により菌体を除去した培養液 500 μ L に対して酢酸エチル 500 μ L を加え、激しく攪拌後、遠心分離 (12000 g, 5 分) を行った。上清の酢酸エチル層を回収し、同様の操作をもう一度繰り返して抽出を行った。2 回の酢酸エチル抽出液を合わせて、窒素気流下乾固した。乾固物に 100 μ L のアセトニトリルを加えて超音波処理によって懸濁後、900 μ L の蒸留水を加えてよく混ぜた。遠心分離 (12000 g, 5 分) 後、上清を MS 分析に用いた。

3. LC-TOF/MS による分析

抽出液に含まれる代謝物を以下の条件で検出した。

HPLC

機種種：Agilent 1200 series
カラム：InertSustain C18
150 mm \times 2.1 mm i.d., 3 μ m
カラム温度：40 $^{\circ}$ C
移動相：A 10 mM 酢酸アンモニウム
B アセトニトリル
分離条件：0 分 A : B = 90 : 10
40 分 A : B = 18 : 82
流速：0.2 mL/分
注入量：2 μ L

MS

機種種：Agilent 6530 Q-TOF
イオンソース：ESI Agilent Jet Stream
ガス温度：325 $^{\circ}$ C, drying gas
ガス流量：10 L/分
ネブライザー圧力：30 psi

C. 研究結果

1. 標準品の測定

上述の分析法が既知のカビ毒を検出できるかどうかを調べるために、4 種のカビ毒標準品を測定した。T-2 トキシンと HT-2 トキシンの混合液のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を図 1 に、ネオソラニオール (NES) とジアセトキシシルペノール (DAS) の混合液の TIC を図 2 に示した。T-2 トキシンは保持時間 28.4 分に m/z 484.2546 $[M+NH_4]^+$ 、HT-2 トキシンは保持時間 23.6 分に m/z 442.2440 $[M+NH_4]^+$ が検出され、NES は保持時間 13.0 分に m/z 400.1967 $[M+NH_4]^+$ 、DAS は保持時間 21.6 分に m/z 384.2021 $[M+NH_4]^+$ が検出された。

2. カビの代謝物の測定

カビ無添加の培地と 11 種のカビの培養液の酢酸エチル抽出物を LC-TOF/MS で分析した (0006 株についての分析例を図 3 に示した)。イオンカウントが 10000 以上のものを選択し、カビ無添加の培地で検出された化合物を除いた結果、580 種の化合物が検出された。その一部を表 2 に示した。標準品と保持時間が一致することからリスト中の推定分子量 $C_{24}H_{37}NO_9$ の化合物は T-2 トキシン、 $C_{19}H_{29}NO_7$ の化合物は DAS と考えられた。つまり 0020 株が T-2 トキシン生産菌、0011、0016、0018 及び 0019 株が DAS 生産菌であった。

D. 考察

多くの *Fusarium* 属菌それぞれの株が生産する代謝産物を特徴付けるためには、サンプルの調製が簡便であることと、1 回の分析で多数の化合物の存在を推定できることが重要となる。

今年度検討した LC-TOF/MS による分析は、少量の培養液の酢酸エチル抽出物を用いて行うためサンプル調製に手間がかからず、また、数百の代謝産物を区別して分析することが可能である。従って、今回は4種の標準品についての生産性が示されたが、他の標準品や TIC において特徴的な化合物について今後調べて行くことにより、それぞれの菌株のマイコトキシン生産性についての情報を得ることが可能になったと考えられる。

E. 結論

国産大豆、国産小豆等から分離された *Fusarium* 属菌の代謝産物を、簡便かつ多種に渡り分析する方法を確立した。

F. 研究業績

【学会、論文発表】

なし

表 1 培養液を調製したカビの由来と同定結果

株番号	由来	産地	生産年	同定結果
0006	小豆	山形県	2012	不明
0010	小豆	熊本県	2012	不明
0011	小豆	熊本県	2012	<i>Fusarium semitectum</i>
0013	小豆	熊本県	2012	<i>Fusarium semitectum</i>
0014	大豆	茨城県	2011	不明
0015	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0016	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0017	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0018	大豆	茨城県	2011	<i>Fusarium semitectum</i>
0019	大豆	茨城県	2011	不明
0020	小麦	アメリカ (24-FW54)	2012	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (形態観察のみ)

表 2 検出された化合物のリストの一部

推定分子式	分子質量	保持時間 (分)	株番号									
			0006	0010	0011	0013	0014	0015	0016	0017	0018	0019
イオンカウント												
C ₆ H ₇ NO ₃	141.0424	2.9			1618509			1034790	440053	852836	1746376	2259217
C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234.1623	20.2	1905641					119604	389306	214155		309677
C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₃ S	314.1386	21.2		24171478								2505805
C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	330.1335	17.7		46644168								25343652
C ₂₂ H ₃₁ NO ₄	373.2260	32.9			4861740				1513450	2965083	855850	1012209
C ₁₉ H ₂₉ NO ₇	383.1953	21.6			1259118				305922		397341	4674189
C ₁₉ H ₂₇ NO	413.1694	17.6			1668987				367909	114025	695786	495151
C ₂₄ H ₃₇ NO ₉	483.2473	28.5										304752

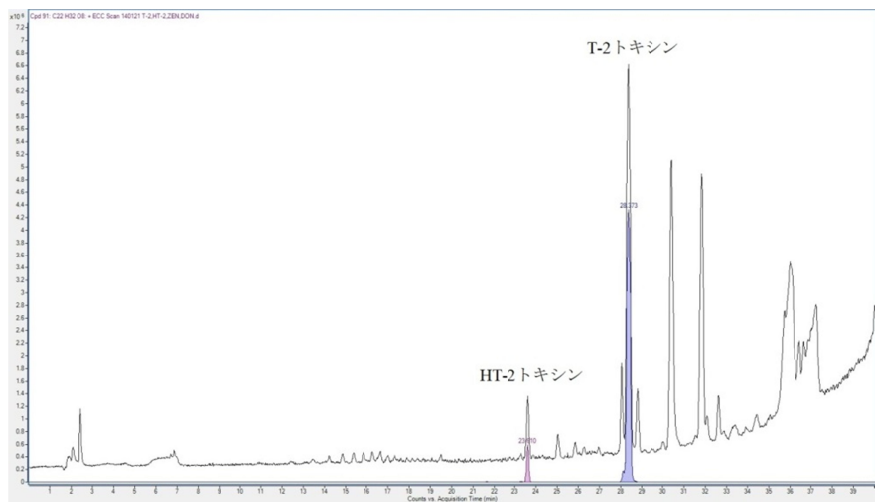


図1 T-2 トキシンと HT-2 トキシンの TIC

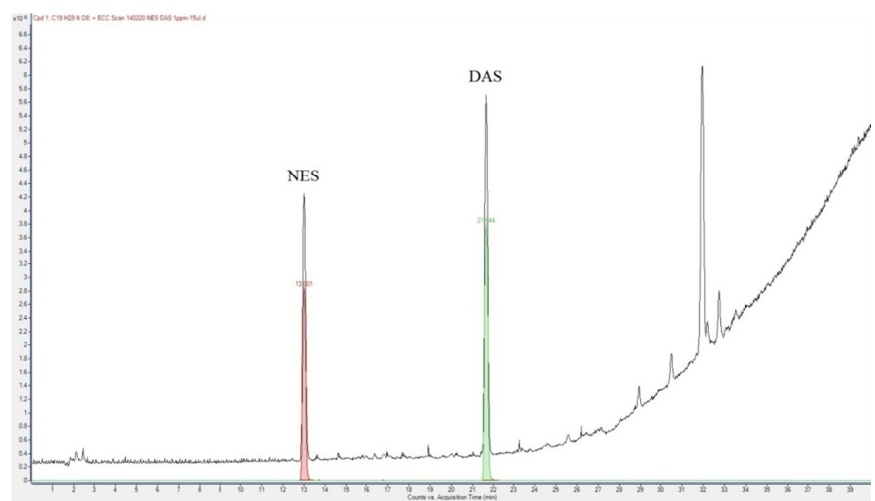


図2 ネオソラニオール (NES) とジアセトキシスシルペノール (DAS) の TIC

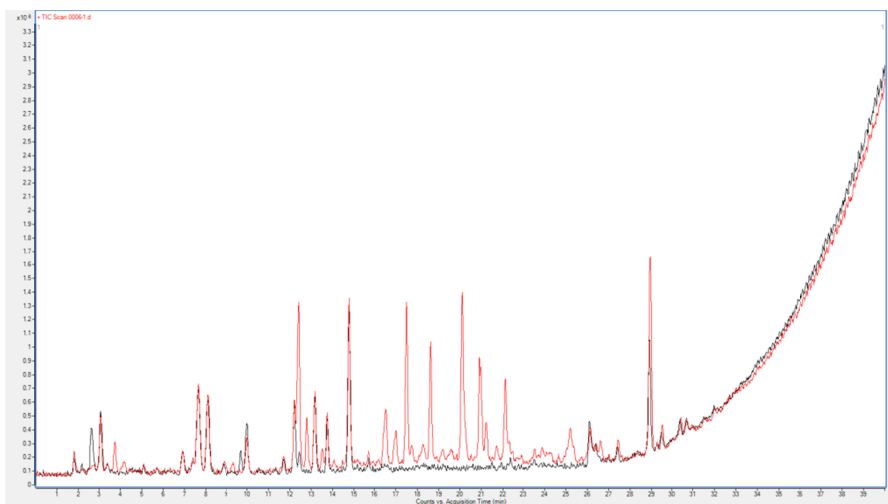


図3 0006 株培養液抽出物の TIC (抽出物の TIC (赤) と培地の TIC (青) を重ねて表示)

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

我が国におけるデオキシニバレノールの年齢別暴露評価

研究分担者 小西 良子 麻布大学

研究要旨

デオキシニバレノール(DON)の健康被害については、古くからの調査・研究の蓄積があり、各国で汚染食品の規制が行われるほか、国際機関による規制値や耐容摂取量の設定などが行われてきた。我が国では、小麦について1.1mg/Kgの流通規制が行われているほか、健康評価の基準として1.0 µg/体重 Kgの一日耐容摂取量が暫定的に用いられている。本研究の目的は、DONの汚染が報告されている国内流通している食品につき、総合的にその曝露量を評価しようというものである。汚染量調査の対象となった食品のうち、そもそも汚染量がきわめて少ないもの及び、摂取者の割合が少ないものを除いた、小麦、大麦、ビール、小豆についての曝露量を年齢層ごとにもとめ、それを合算した総量によって、日本人のDONの曝露評価を年齢層ごとに行った。その際、汚染量のLOD以上LOQ未満の検出値の取り扱いに関するGEMS-FOODの最新の勧告に基づき、lower boundとupper boundの二つの場合それぞれについてシミュレーションを行った。結果として99.8%タイルでは1歳から6歳、7歳から14歳、15歳から19歳、20才以上のどの年齢層でも暫定一日耐容摂取量を上回ったものはなく、99.9%タイルにおいては1歳から6歳ではlower boundもupper boundも約112ng/体重 Kg/日で、7才から14歳ではlower boundで約105ng/体重 Kg/日であるほか、7歳から14歳のupper boundおよび20歳以上はいずれも約103ng/体重 Kg/日にとどまっていた、15歳から19歳はいずれも約70ng/体重 Kg/日となっており、日本人のDON摂取による健康被害は極めて少ないものと推定される。

研究協力者

斉藤 史朗(東京大学)

A. 研究目的

食品経路による日本人のDONの曝露評価

今回、3カ年にわたってDONの汚染量の調査をしているいくつかの食品を摂取することによるDONの曝露量をシミュレーショ

ンによって評価することを目的とする。

調査対象の商品は、小麦、大麦、はと麦、雑穀米、小豆、大豆、コーンスナック、コーングリッツ、ビール、ごまの10種類であった。

そのうち、まず最初に汚染量サンプルが極めて少ない大豆、ごま、コーンスナックを対象から除いた。次いで摂取者の割合が各年齢層で1%に満たない食品である、はと麦、雑穀米、コーングリッツを除いた。結果として曝露評価の対象食品となったのは、小麦、大麦、ビール、小豆の4食品であった。

この4食品の汚染量のデータと食品摂取のデータを用いて、1才から6才、7才から14才、15才から19才、20才以上の各年齢層について、曝露量のシミュレーションを行った。

B. 研究方法

1) 食品中のDON含有量のサンプルデータの作成

(1)小麦含有食品におけるカビ毒含有量

国産小麦の汚染量データと輸入小麦の汚染量データを利用して、それぞれ別々にDON含有量のサンプルを作成した。(曝露量を計算する際に、日本国内で消費されている国産小麦と輸入小麦の割合に応じて、それぞれの含有量の値を利用した。)

3カ年にわたって集められた300サンプルを使って国産小麦のDON含有量(汚染量)について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。輸入小麦についても3カ年にわたって集められた150のサンプルを用いてDON含有量(汚染量)について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。

小麦については1.1mg/Kgの流通規制があるので、シミュレーションの値がこれを上回るものは除外してサンプルを作成した。

LOQ未満の処理として、WHO GEMS FOODの新たな勧告に従ってupper bound(LOQ未満については、LOQの汚染があるものとする)とlower bound(LOQ未満については、汚染を無しとする)の二つのシナリオを用意し、それぞれ10,000,000件のシ

ミュレーション・データセットを作成した。

(2)大麦含有食品におけるDON含有量

3カ年にわたって集められた国産大麦の300サンプルおよび輸入大麦の41サンプルを使ってDONの含有量(汚染量)について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。

LOQ未満の処理として、WHO GEMS FOODの勧告に従ってupper boundとlower boundの二種類のシナリオを用意した。

(3)ビールにおけるDON含有量

3カ年にわたって集められたビールの30サンプルを使ってDONの含有量(汚染量)について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。

LOQ未満の処理として、WHO GEMS FOODの勧告に従ってupper boundとlower boundの二種類のシナリオを用意した。

(4)小豆含有食品におけるDON含有量

3カ年にわたって集められた小豆の40サンプルを使ってDONの含有量(汚染量)について測定し、これを用いてサンプルデータを作成した。

LOQ未満の処理として、WHO GEMS FOODの勧告に従ってupper boundとlower boundの二種類のシナリオを用意した。

2) 食品摂取量のサンプルデータ作成

摂取量推定にあたり、「1歳から6歳」「7歳から14歳」「15歳から19歳」「20歳以上」の4つの階層に分けてシミュレーションを行った。

(1)小麦含有食品の摂取量

平成17年度から平成19年度にかけて行われた「食品摂取量・摂取頻度調査」の調査対象食品のうち小麦を含有する約80の食品を対象とする。最初に各年齢層ごとに摂取量の平均を取り、平均よりも摂取量の多かった「大量摂取群」とし、それ以外を「少量摂取

群」とする。大量摂取群はさらに、小麦の含有割合により、含有率 100%、50%、30%の3つのグループにわけて、それぞれ分布を推定してシミュレーションを行った。

(2) 大麦含有食品の摂取量

「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。対象となった大麦含有食品は「七分つき押麦(01005)」「押麦(01006)」「米粒麦(01007)」(括弧内は食品番号)の3種類の食品である。

(3) ビールの摂取量

「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。対象となったのは、「ビール淡色(16006)」「ビール黒(16007)」「ビールスタウト(16008)」の3種類の食品である。

(4) 小豆含有食品の摂取量

「平成 17 年度~19 年度食品摂取頻度・摂取量調査」より、小豆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。

摂取量は小豆の含有量に応じて「赤飯」(10%)、「あんこ」(100%)、「まんじゅう」(50%)、「ようかん」(80%)の4つの食品群ごとに計算した。

3) 曝露量のシミュレーション

(1) 小麦と大麦の曝露量計算

小麦と大麦の DON 汚染(含有量)は玄麦で計測されているが、小麦も大麦も精麦により、付着している DON が半分くらいの量になると報告されているので、曝露量計算の際に、摂取量(g/体重 Kg)に汚染量(ng/g)をかけて、さらにそれに 0.5 をかけている。

また、前述のように、日本国内で消費され

ている小麦と大麦は国産のものと輸入のものが混ざっているため、小麦については国産比率を 14%とし、大麦については同じく 31%として曝露量を計算した。

・小麦： $(\text{輸入小麦汚染量} \times 0.86 + \text{国産小麦汚染量} \times 0.14) \times \text{小麦摂取量} \times 0.5$

・大麦： $(\text{輸入大麦汚染量} \times 0.69 + \text{国産大麦汚染量} \times 0.31) \times \text{小麦摂取量} \times 0.5$

(2) その他の食品の曝露量計算

その他の対象食品(小豆とビール)については、単純に摂取量(g/体重 Kg)に汚染量(ng/g)をかけている。

C. 研究結果

下記に年齢層ごとの lower bound と upper bound のシミュレーション結果を示す。単位はいずれも ng/体重 Kg/日である。

シナリオ	99% タイル	99.5% タイル	99.8% タイル	99.9% タイル
1才から6才 lower bound	37.9	55.7	85.1	112.1
1才から6才 upper bound	37.5	55.2	84.5	112.0
7才から14才 lower bound	35.6	51.6	78.8	104.8
7才から14才 upper bound	35.2	51.2	78.4	103.7
15才から19才 lower bound	29.0	39.0	55.2	69.9
15才から19才 upper bound	28.6	38.6	54.9	69.8
20才以上 lower bound	27.4	43.0	72.4	103.1
20才以上 upper bound	27.2	42.5	72.0	102.8

D. 考察

(1) WHO GEMS FOOD の勧告

WHO GEMS FOOD の新しい勧告によれば、LOD 以上 LOQ 未満の取り扱いにつき、First Step として、lower bound として LOQ 未満は「0」として、upper bound は LOQ 未満を「LOQ の値」として、両者の差が少なくかつ、規制値よりも低い値であれば、upper bound を使

うようにとある。本件の場合はこの First Step の条件に合うので、各年齢層の曝露量推計は upper bound を使うことになる。

(2)食品摂取による DON 曝露の健康被害リスク

平成 23 年度報告による 30% の推定誤差を用いても、暫定一日耐容摂取量を超えるのは、99.8% の 1 才から 6 才および、99.9% タイルの全年齢層だけである。99.75% タイルまではどの年齢層においても、30% 増しにしても暫定一日耐容摂取量を超えることはない。

(3)モンテカルロ・シミュレーションについて

最後に、コンピュータシミュレーションであるモンテカルロ法では、得られたサンプルから対数正規分布を仮定することにより母集団のデータを作り出すことから作成したサンプルデータの一部には通常では存在しえない高値のデータが存在していたことは

否定できない。それゆえ、シミュレーション結果の解釈には慎重であるべきだが、こうした値は曝露量を過大に評価することはあっても、過小評価するわけではないこと。また、こうした値は分布のかなり右側に存在するので、健康被害リスクの評価基準となる 95% タイル付近には影響はない。以上のことからして、DON の曝露による日本人の健康被害リスクは極めて少ないものと思われる。

E. 結論

小麦のみならず、その他の汚染事例が報告された食品を加えた総合的な曝露評価を行ったが、日本人の食品摂取による DON 曝露の健康被害リスクは極めて少ないものと思われる。

F. 研究発表

- 1.論文発表：特になし
- 2.学会発表：特になし

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

かび毒の発達神経毒性評価

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学農学研究院動物生命科学部門 教授

研究要旨

本研究は、発達神経毒性が懸念されているかび毒について、実験病理学的に発達神経毒性影響を検討する。平成 25 年度はフザリウム属真菌により産生されるかび毒であり、実験的に低用量で神経毒性を誘発することが知られている T-2 トキシン (T-2 toxin) について、マウスを用いて発達期神経毒性影響を検討した。9 ppm を高用量として選択し、公比 3 で投与群 (0、1、3、9 ppm) を設定し、妊娠 ICR マウスを用いて発達期暴露試験 (各群 12 匹) を行った。妊娠 6 日目から離乳時 (生後 21 日目) まで母動物に対して混餌投与することにより、経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時と生後 77 日目にそれぞれ解剖を行った。母動物は 9 ppm で分娩後 7~14 日にかけて体重低値を示し、分娩後 21 日目までの間に摂餌量、摂水量の低値を認めた。また、9 ppm で前胃粘膜の過形成を示唆する肥厚性変化が認められた。更に、1 ppm から胸腺重量の低値がみられ、9 ppm では肝臓重量の高値がみられた。このことから母動物では、一般毒性的変化は 9 ppm に集中的に見られたものの、免疫系への影響は最も鋭敏であった。児動物では、9 ppm で投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後も出生後 77 日まで体重低値が継続した。また、離乳時脳絶対重量の低値が 3 ppm から認められ、9 ppm での体重や諸臓器の重量低値と併せて T-2 トキシンによる発達障害が示唆された。出生後 77 日の児動物では雌 9 ppm で肝臓及び胸腺重量の低値がみられたが、出生時に比較して変化の程度は小さく、回復性のある変化であると考えられた。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、顆粒細胞層下帯での Tbr2 陽性細胞が 3 ppm から減少し、T-2 トキシンによる type 2 前駆細胞を標的としたニューロン新生障害が起きているものと考えられた。歯状回門部では reelin 陽性細胞の増加が 9 ppm で認められ、前駆細胞の移動異常を反映して介在ニューロンからの産生が増加した可能性が考えられた。

A. 研究目的

近年、農作物へのかび毒等自然毒の汚染が国際的に深刻な問題となっており、かび毒の国際的成分規格を設定する動きが活発にな

って来ている。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って、輸入大国の我が国としては、国際動向に準じた基準値策定は急務であることから、我が国の食品中のかび毒汚染実態および国民の暴露実態を正確に把握する必要がある。また、輸入食品を汚染するかび毒産生菌の種およびかび毒産生を考慮に入れた予防対策を構築する必要がある。

本研究では、神経毒性影響の懸念ないし報告のあるかび毒を対象として、高感受性集団である胎児・乳幼児を想定した神経発達に対するリスク評価を目的とする。我々は、記憶や学習の中枢であり、生後もニューロンを産生し続ける海馬歯状回に着目し、顆粒細胞層下帯(SGZ)における顆粒細胞系譜の各種分化指標と歯状回門に分布して顆粒細胞の分化や移動を制御する介在ニューロンの分布を検討することで、数々の神経毒性物質がニューロン新生を障害することを見出している。

平成 25 年度は、穀物汚染が危惧されているフザリウム属真菌によって産生される T-2 トキシン (T-2 toxin) を評価対象とした。T-2 トキシンについては日本ならびにコーデックス委員会においても食品中の基準値は策定されておらず、リスク管理措置の検討のためより多くの毒性データが必要とされている。そこで T-2 トキシンの発達期神経毒性影響を明らかにすることを目的として母動物に混餌投与することにより、妊娠 6 日から出生後 21 日 (離乳時) まで経胎盤、経乳的に児動物に対して暴露させ、暴露終了時ならびに出生後 77 日に解剖してニューロン新生に対する影響を検討し、離乳時における影響ならびにその回復性を評価することとした。

B. 研究方法

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 12 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 日から分娩後 21 日まで混餌投与した。最高用量は予備的に 0、6、12 ppm を設定して母動物に対して混餌投与した際に、12 ppm で児動物の低体重、産仔数の減少が認められ、6 ppm では影響がみられなかったため、体重の低値とともに妊娠の維持が期待される 9 ppm に設定した。出生後 4 日目に間引きを行い、各母動物に雄 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、週に 2 回の割合で体重及び摂餌量、週に 1 回、摂水量の測定を行った。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 (離乳時) に児動物の半数を解剖に供した。各群 10 例の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4% PFA / 0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行った。各群雄 31~35 例、雌 13~20 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、胸腺、脾臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。PFA 灌流固定脳標本については大脳の Bregma の後方約 -3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面 (2 切面) が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μm 厚の連続切片を作製した。切片は、抗マウス Sox2 抗体 (x4000 倍、Abcam 株式会社) 抗マウス Tbr2 抗体 (x500 倍、Abcam 株式会社) 抗マウス doublecortin 抗体 (x1000 倍、Abcam 株式会社) 抗マウス reelin 抗体 (x1000 倍、Novus Biologicals, Inc., Co.) 抗マウス NeuN 抗体 (x100 倍、IgG、Clone A60、Millipore Corporation) 抗マウス parvalbumin 抗体 (x1000 倍、IgG、Millipore Corporation) を

用いて、DAB 発色にて ABC 法

(VECTASTAIN ABC Elite kit、Vector Laboratories) による免疫染色を行った。新生ニューロンの分化指標である Sox2、Tbr2 及び doublecortin 陽性細胞数について海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において検索を行った。一方、GABA 性介在ニューロンの指標である reelin 及び parvalbumin、成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。

母動物は分娩後 22 日に CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、胸腺、脾臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。また T-2 トキシンの慢性毒性試験で病理変化が報告されている胃についても同時に採取した。

残り半数の児動物は出生後 77 日まで T-2 トキシ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 日に各群 10 例の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4% PFA / 0.1M リン酸バッファーによる灌流固定を行った。各群雌雄各 10 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、胸腺、脾臓重量を測定後、脳はメタカーンもしくはブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

母動物の体重ならびに期間重量、摂餌量、摂水量は母動物ごとに集計し、群平均及び標準偏差を算出した。児動物の体重及び臓器重量、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算出した。統計学的解析は、体重、摂餌量、摂水量、臓器重量、免疫染色における陽性細胞カウント値について、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。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物は全て CO₂/O₂ 深麻酔下での灌流固定ならびに後大静脈からの放血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理にあつては、国立大学法人 東京農工大学の実験取扱い倫理規定に従った。

C. 研究結果

体重、飲水量、摂餌量：

母動物は、体重低値が 9 ppm 群で分娩後 7 ~ 14 日にかけて、摂餌量の低値が 9 ppm 群で分娩後 5, 18, 21 日目に、摂水量の低値が 9 ppm 群で 14, 18, 21 日目に、3 ppm 群で 18 日目に認められた (Fig. 1)。児動物は雌雄とも 9 ppm で投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後もこの群で出生後 77 日目まで体重低値が継続した (Fig. 2, 3、Table 1)。雌では、1 及び 3 ppm で出生後 35 日目以降体重の低値傾向を示し、3 ppm では 56 及び 63 日目で、1 ppm では 63 日目で低値が統計学的に有意であった (Fig. 3)。

着床数、産仔数：

着床数、産仔数に T-2 トキシンによる影響は認められなかった (Table 1)。

臓器重量：

母動物では 1 ppm から胸腺絶対重量の低値が認められ、相対重量の低値も 1 及び 9 ppm で認められた。9 ppm では肝臓の絶対重量及び相対重量の高値が認められた (Table 2)。

児動物では離乳時に雌雄共に 3 ppm から脳絶対重量の低値がみられ、9 ppm では肝臓、胸腺、脾臓の絶対重量の低値がみられた

(Table 3)。雄では胸腺の絶対重量の低値が 3 ppm から認められた。出生後 77 日では雌 9 ppm で肝臓、胸腺の絶対重量低値がみられた (Table 4)。

病理学的変化および免疫組織学的変化：

母動物の剖検時における肉眼的な所見として、前胃粘膜の肥厚が 3 ppm より認められ、発現数は用量に相関して増加した (Table 5)。

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 Tbr2 (Type2 前駆細胞に発現) 陽性細胞が 3 ppm から減少したが、Sox2 (主に type 1 幹細胞と type 2a 前駆細胞に発現) ないし doublecortin 陽性細胞は統計学的有意な変動を示さなかった (Table 6)。また、歯状回門部では、介在ニューロンから産生され、ニューロンの移動制御に機能することが知られている reelin 陽性細胞が 9 ppm で増加したが、parvalbumin 陽性介在ニューロンや NeuN 陽性成熟ニューロン数には変動を認めなかった。

D. 考察

妊娠 ICR マウスに T-2 トキシンを 9 ppm を最高用量として妊娠 6 日から分娩後 21 日まで混餌投与することで、児動物に経胎盤、経乳的に暴露させ、暴露終了時ならびに出生後 77 日における影響について解析した。その結果、母動物は 9 ppm で分娩後 7~14 日にかけて体重低値を示し、主に 9 ppm で分娩後 21 日目までの間に摂餌量、摂水量の低値を認めた。また、9 ppm で前胃粘膜の過形成を示唆する肥厚性変化が認められ、摂餌量ならびに摂水量の低下に影響した可能性が考えられた。一方、1 ppm から胸腺重量の低値がみられ、9 ppm では肝臓重量の高値がみられた。このことから母動物では、一般毒性的変

化は 9 ppm に集中的に見られたものの、免疫系への影響は最も鋭敏に認められた。児動物では、9 ppm で投与期間を通じて体重低値を示し、離乳後も出生後 77 日まで体重低値が継続した。一方、離乳時の児動物では脳絶対重量の低値が 3 ppm から認められ、9 ppm での体重や諸臓器の重量低値と併せて T-2 トキシンによる発達障害が示唆された。出生後 77 日の児動物では雌 9 ppm で臓器重量低値がみられたが、出生時と比較して変化の程度は小さく、雄では出生時の変化が消失していることから、回復性のある変化であると考えられた。

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、Tbr2 (Type2 前駆細胞に発現) 陽性細胞が 3 ppm から減少し、T-2 トキシンによるニューロン新生障害が起きているものと考えられた。9 ppm でみられた reelin 陽性細胞の増加は前駆細胞の移動異常を反映して介在ニューロンからの産生が増加した可能性が考えられた。

E. 結論

T-2 トキシンの発達期暴露により、母動物と児動物への影響は主に 9 ppm で認められたが、母動物では 1 ppm より胸腺重量の低下がみられ、児動物では 3 ppm より脳の絶対重量の低値と海馬歯状回における type2 前駆細胞を標的とするニューロン新生障害を示唆する変化が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

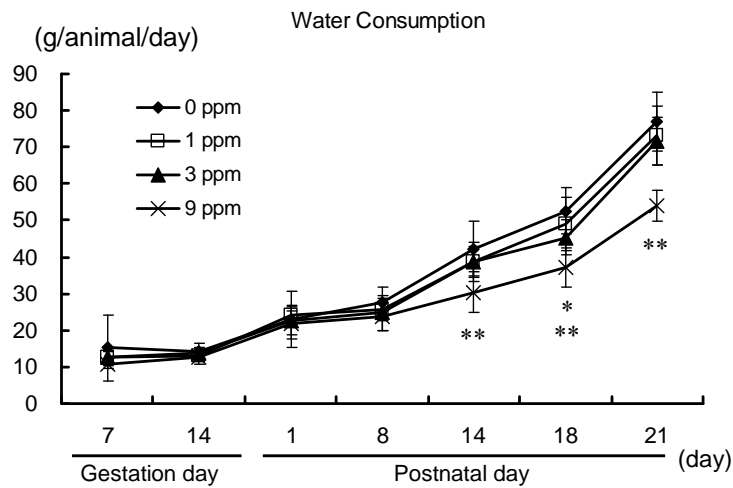
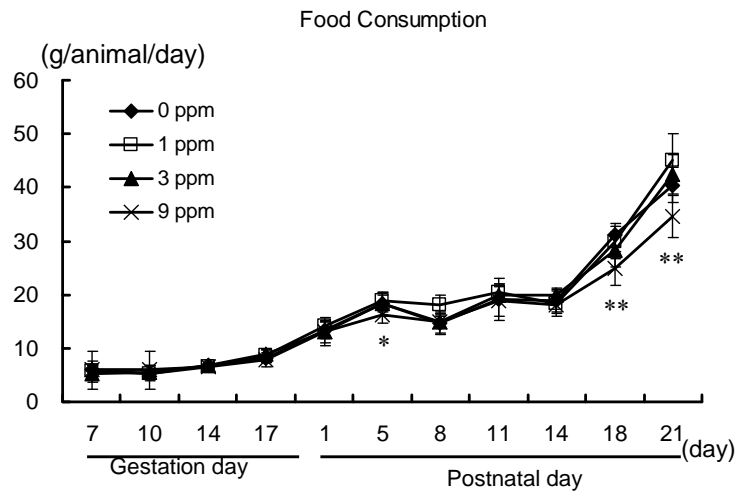
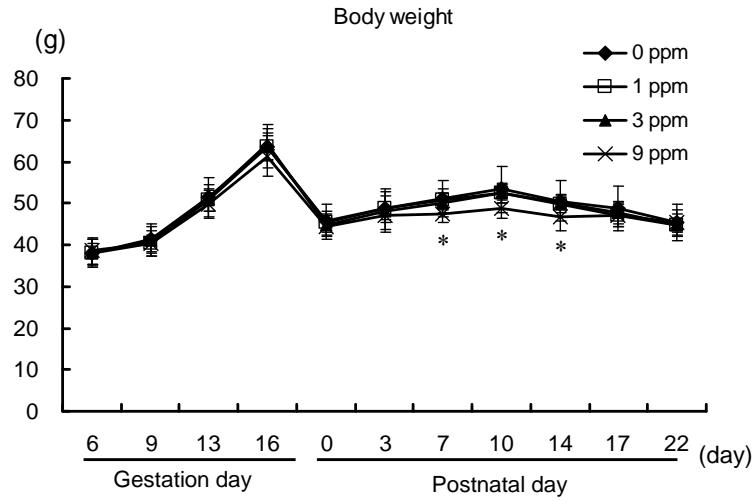


Figure 1. Body weight, food consumption and water consumption of dams given T-2 Toxin from GD 6 to PND 22 in the diet.

*,** Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

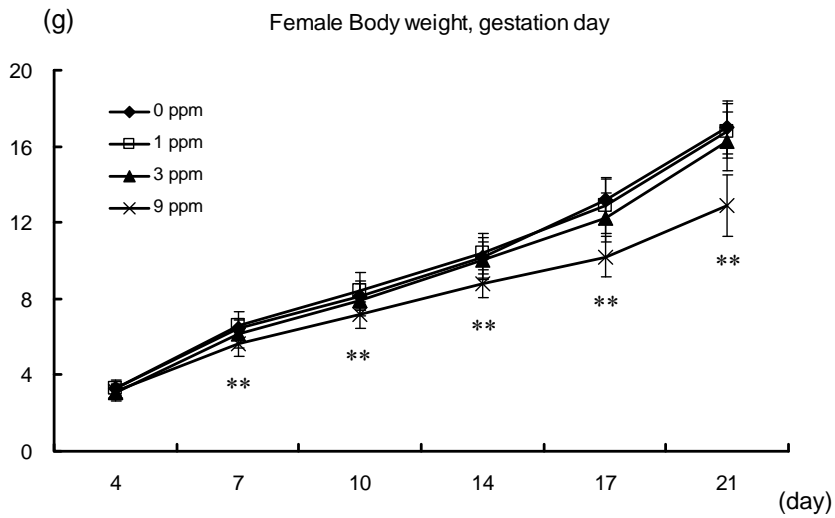
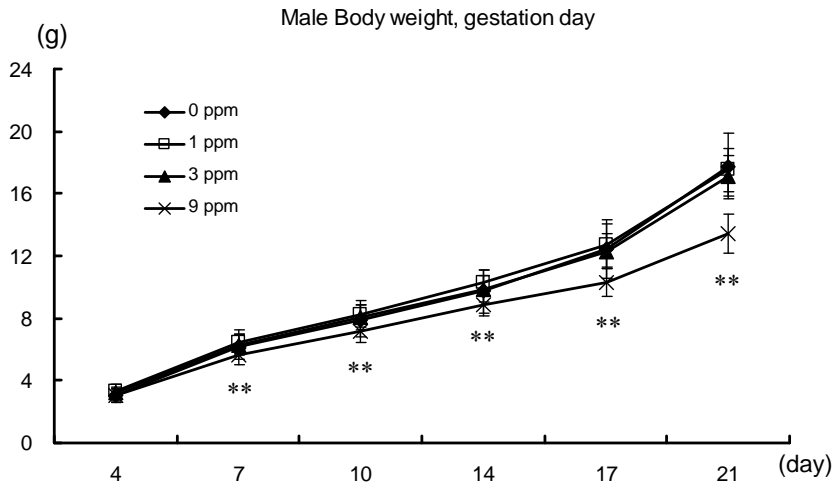


Figure 2. Body weight of male and female offspring at gestation day.

** Significantly different from the untreated controls ($P < 0.01$, Dunnett's or Steel's test).

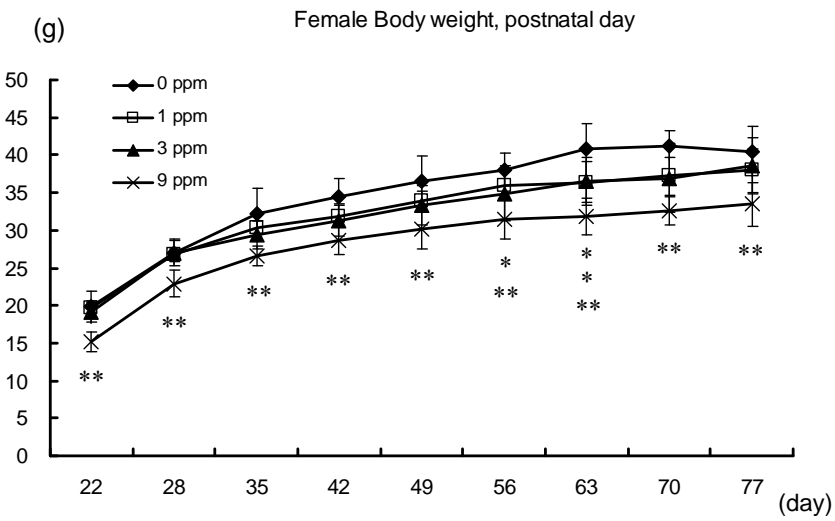
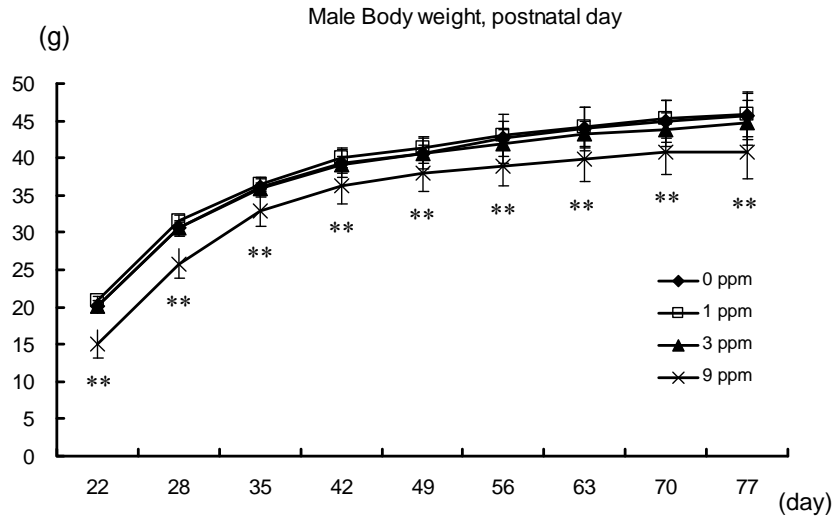


Figure 3. Body weight of male and female offspring at postnatal day.

*,** Significantly different from the untreated controls ($P < 0.05$, $P < 0.01$, Dunnett's or Steel's test).

Table 1. Reproductive and general parameters of dams given T-2 Toxin from GD 6 to PND 22

	T-2 Toxin (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
No. of dams	9	10	10	10
No. of implantation sites	15.30±1.77	16.33±1.87	16.15±1.41	15.50±2.65
No. of live offspring	14.36±2.50	14.50±2.07	14.92±1.19	13.75±2.34
Mean body weight (GD, g)	48.37±3.53	48.06±2.33	48.78±2.51	47.85±3.43
Mean body weight (PND, g)	49.12±4.52	48.44±1.74	48.58±1.75	46.67±1.76
Food intake (GD, g/animal/day) ^a	6.48±0.69	6.61±0.84	6.57±0.58	6.77±1.92
Food intake (PND, g/animal/day) ^a	22.61±1.63	23.51±1.77	22.55±1.54	20.09±1.51**
Water consumption (GD, g/animal/day) ^a	13.85±2.59	12.94±1.47	13.44±1.58	11.78±1.27*
Water consumption (PND, g/animal/day) ^a	44.25±5.00	42.12±4.11	40.89±4.10	33.58±3.45**
T-2 Toxin intake (GD, mg/kg body weight/day) ^a	0	0.14±0.02	0.40±0.03	1.18±0.25
T-2 Toxin intake (PND, mg/kg body weight/day) ^a	0	0.49±0.03	1.39±0.07	3.79±0.24

Mean±SD.

^a Mean value of each week.

*, ** Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: GD; gestation day, PND; postnatal day.

Table 2. Organ weights of dams at PND 22

		T-2 Toxin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
No. of animals		9	10	10	10
Final body weight (g)		45.30 ± 4.38	44.78 ± 1.61	44.71 ± 2.53	45.39 ± 2.92
Brain	Absolute (g)	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.02
	Relative (g/100g BW)	1.11 ± 0.06	1.11 ± 0.03	1.10 ± 0.05	1.07 ± 0.06
Liver	Absolute (g)	2.91 ± 0.33	2.89 ± 0.36	2.96 ± 0.23	3.45 ± 0.30**
	Relative (g/100g BW)	6.43 ± 0.35	6.45 ± 0.69	6.63 ± 0.46	7.60 ± 0.50**
Thymus	Absolute (g)	0.094 ± 0.013	0.070 ± 0.020**	0.073 ± 0.016*	0.031 ± 0.011**
	Relative (g/100g BW)	0.209 ± 0.029	0.158 ± 0.046*	0.164 ± 0.040	0.069 ± 0.011**
Spleen	Absolute (g)	0.164 ± 0.029	0.157 ± 0.025	0.211 ± 0.064	0.207 ± 0.093
	Relative (g/100g BW)	0.360 ± 0.043	0.350 ± 0.050	0.470 ± 0.126	0.451 ± 0.183

Mean±SD.

*, ** Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: BW; body weight, PND; postnatal day.

Table 3. Organ weights of offspring at PND 21

		T-2 Toxin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	9
No. of male animals		31	35	32	32
Final body weight (g)		17.98 ± 1.78	17.63 ± 1.44	17.13 ± 1.33	13.61 ± 1.22**
Brain	Absolute (g)	0.441 ± 0.025	0.433 ± 0.016	0.425 ± 0.019**	0.411 ± 0.022**
	Relative (g/100g BW)	2.467 ± 0.232	2.477 ± 0.198	2.491 ± 0.176	3.033 ± 0.227**
Liver	Absolute (g)	1.03 ± 0.14	1.02 ± 0.12	0.98 ± 0.13	0.71 ± 0.10**
	Relative (g/100g BW)	5.69 ± 0.36	5.79 ± 0.42	5.73 ± 0.43	5.25 ± 0.40**
Thymus	Absolute (g)	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.02**	0.08 ± 0.02**
	Relative (g/100g BW)	0.67 ± 0.16	0.64 ± 0.11	0.60 ± 0.10	0.58 ± 0.13**
Spleen	Absolute (g)	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.02**
	Relative (g/100g BW)	0.79 ± 0.18	0.78 ± 0.10	0.79 ± 0.15	0.66 ± 0.13**
No. of female animals		13	17	20	19
Final body weight (g)		16.99 ± 1.37	16.81 ± 1.40	16.27 ± 1.54	12.89 ± 1.62**
Brain	Absolute (g)	0.433 ± 0.027	0.422 ± 0.014	0.414 ± 0.018*	0.410 ± 0.020**
	Relative (g/100g BW)	2.556 ± 0.167	2.524 ± 0.189	2.561 ± 0.224	3.218 ± 0.350**
Liver	Absolute (g)	0.88 ± 0.12	0.92 ± 0.10	0.87 ± 0.11	0.64 ± 0.11**
	Relative (g/100g BW)	5.16 ± 0.37	5.45 ± 0.33	5.35 ± 0.42	4.98 ± 0.38
Thymus	Absolute (g)	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.02**
	Relative (g/100g BW)	0.69 ± 0.13	0.67 ± 0.12	0.69 ± 0.15	0.62 ± 0.13
Spleen	Absolute (g)	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.03**
	Relative (g/100g BW)	0.83 ± 0.12	0.80 ± 0.15	0.78 ± 0.15	0.72 ± 0.19

Mean±SD.

*, ** Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: PND; postnatal day, BW; body weight.

Table 4. Organ weights of offspring at PND 77

	T-2 Toxin (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
No. of male animals	10	10	10	10
Final body weight (g)	45.96 ± 5.47	46.60 ± 5.19	43.71 ± 4.95	40.75 ± 3.78**
Brain Absolute (g)	0.515 ± 0.090	0.502 ± 0.016	0.487 ± 0.017	0.494 ± 0.021
Relative (g/100g BW)	1.128 ± 0.182	1.087 ± 0.113	1.126 ± 0.123	1.222 ± 0.121
Liver Absolute (g)	2.198 ± 0.347	2.244 ± 0.337	2.154 ± 0.158	2.191 ± 0.263
Relative (g/100g BW)	4.960 ± 0.423	4.984 ± 0.536	5.079 ± 0.505	5.314 ± 0.387
Thymus Absolute (g)	0.056 ± 0.019	0.050 ± 0.010	0.045 ± 0.014	0.047 ± 0.020
Relative (g/100g BW)	0.126 ± 0.039	0.112 ± 0.027	0.105 ± 0.031	0.113 ± 0.045
Spleen Absolute (g)	0.134 ± 0.025	0.134 ± 0.025	0.139 ± 0.022	0.134 ± 0.036
Relative (g/100g BW)	0.307 ± 0.069	0.299 ± 0.048	0.332 ± 0.080	0.325 ± 0.077
No. of female animals	10	10	10	10
Final body weight (g)	40.70 ± 3.55	38.00 ± 3.63	38.55 ± 3.74	33.43 ± 2.94**
Brain Absolute (g)	0.525 ± 0.022	0.515 ± 0.018	0.505 ± 0.015	0.504 ± 0.020
Relative (g/100g BW)	1.296 ± 0.102	1.362 ± 0.105	1.321 ± 0.138	1.517 ± 0.120**
Liver Absolute (g)	2.082 ± 0.387	1.858 ± 0.269	1.672 ± 0.575	1.690 ± 0.211*
Relative (g/100g BW)	5.095 ± 0.725	4.885 ± 0.486	4.349 ± 1.403	5.069 ± 0.577
Thymus Absolute (g)	0.080 ± 0.020	0.071 ± 0.010	0.074 ± 0.011	0.063 ± 0.017*
Relative (g/100g BW)	0.197 ± 0.043	0.188 ± 0.031	0.193 ± 0.034	0.187 ± 0.038
Spleen Absolute (g)	0.175 ± 0.051	0.177 ± 0.059	0.178 ± 0.041	0.166 ± 0.047
Relative (g/100g BW)	0.425 ± 0.104	0.465 ± 0.159	0.462 ± 0.092	0.494 ± 0.123

^a Mean ± SD.

*, ** Significantly different from the untreated controls (P < 0.05, P < 0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: PND; postnatal day, BW; body weight.

Table 5. Macroscopical finding with dams at PND 22

	T-2 Toxin (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
No. of animals	12	11	13	13
Forestomach				
Thickening of mucosa	0	0	2	7

Abbreviation: PND; postnatal day.

Table 6. Immunohistochemical data in the hippocampal dentate gyrus of male offspring on PND 21

	T-2 Toxin (ppm)			
	0 (Control)	1	3	9
No. of animals	9	10	10	10
Number of positive cells at subgranular zone (/mm)				
Sox2	37.3 ± 3.3	38.6 ± 3.4	40.5 ± 2.5	36.2 ± 2.9
Tbr2	10.68 ± 2.84	8.71 ± 2.04	6.91 ± 1.82**	7.33 ± 2.25**
doublecortin	89.7 ± 14.0	86.1 ± 8.0	90.8 ± 12.3	76.1 ± 13.7
Number of positive cells at hilus (/mm ²)				
reelin	147.7 ± 44.1	177.5 ± 42.7	178.8 ± 39.0	224.0 ± 53.6**
NeuN	291.7 ± 43.0	277.2 ± 61.5	263.1 ± 56.0	283.6 ± 58.4
parvalbumin	37.9 ± 19.5	49.0 ± 18.2	36.8 ± 15.9	41.7 ± 13.1

Mean±SD.

** Significantly different from the untreated controls (P<0.01, Dunnett's or Steel's test).

Abbreviation: PND; postnatal day, Sox2; SRY (sex determining region Y)-box 2, Tbr 2; T box brain 2, NeuN; neuron-specific nuclear protein.

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)

基準値の策定に資する食品汚染カビ毒の実態調査と
生体影響評価に関する研究

分担研究報告書

T-2 トキシンの経口摂取による心拍・体温・活動量への影響

分担研究者 局 博一

東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター特任教授

研究要旨

T-2 トキシンは免疫抑制、造血障害、嘔吐作用などの生体影響を起こすことがよく知られている。一方、T-2 トキシンの循環器（心臓血管系）影響に関する知見は乏しい。平成 22 年度から 24 年度にかけて T-2 トキシンの循環機能影響を詳細に調べた結果、正常ラットへの T-2 トキシンの皮下投与（0.1 mg/kg 以上）によって房室伝導障害や心室期外収縮などの不整脈が誘発されること、また自律神経機能に影響を及ぼすこと、また投与後 1 日目の測定では血中の活性酸素レベルが上昇することなどが明らかになった。また、*in vitro* の実験では、ラット一次培養心筋細胞への T-2 トキシンの作用によってミトコンドリア機能が抑制されることが明らかになった。

本年度は上記の知見に関連した生体影響が T-2 トキシンの経口摂取によって生じるかどうかを明らかにするために以下の実験を行った。すなわち、T-2 トキシンの経口摂取（5 日間）による全身機能（循環機能、体温および活動量）に及ぼす影響を自由行動下のラットのテレメトリー観察によって行った。摂取群は 3 群（0 ppm、6 ppm、12 ppm；各群 6 匹）とした。その結果、12 ppm-T-2 トキシンの摂取群および 6 ppm-T-2 トキシンの摂取群で、摂取期間中に心拍数、活動量および体温のレベルおよび日周リズムへの影響が摂取開始の翌日から認められ、その影響は 12 ppm-T-2 トキシンの摂取群は 6 ppm-T-2 トキシンの摂取群に比べて大きい傾向がみられた。これらの変化は T-2 トキシンの摂取を中止すると摂取前の状態近くまで回復した。これらの試験結果から、少なくとも 6 ppm～12 ppm の T-2 トキシンの短期間経口摂取によって循環機能を始めとした全身性、可逆性の機能的影響が生じることが明らかになった。

A. 研究目的

T-2 トキシンの循環器影響に関する研究報告は 1980 年代から断片的になされている。

我々は T-2 トキシンの心臓血管系および自律神経系に及ぼす影響を、全身レベル（*in vivo*）および細胞レベル（*in vitro*）の両面から観察している。これまでの研究で、T-2 トキシンを 0.1 mg/kg 以上の用量でラットに皮

下投与すると、心拍数の変化に加えて房室伝導障害や心室期外収縮などの不整脈が誘発され、それらの背景要因として自律神経機能変化による影響と自律神経機能に影響されない心筋固有の異常性が関与する可能性が示唆された。一方、細胞レベルの研究では、T-2 トキシンの作用によって心筋細胞ミトコンドリア機能（電子伝達系機能）の低下が生じるこ

とが明らかになった。

上記の研究経緯をふまえ、今年度は T-2 トキシンの自由経口摂取による全身影響を明らかにするために、代表的な観察指標である心電図、体温、活動量の変化を自由行動下のラットを用いて観察した。

B. 研究方法

1. T-2 トキシンの経口摂取試験

・実験群の構成

実験群は、12 ppm-T-2 トキシンの群 (6 匹)、6 ppm-T-2 トキシンの群 (6 匹)、0 ppm-T-2 トキシンの群 (対照群) (6 匹) とした。

・T-2 トキシンの混餌作製

T-2 トキシンは T-2 トキシン標準品 (和光純薬) を用いた。ラット用粉末飼料 (オリエンタル酵母、MF) を用いて、上記 T-2 トキシンの最終含有濃度が 12 ppm および 6 ppm になるように飼料 (T-2 トキシン混餌) を作製した。T-2 トキシン混餌の作製後、使用直前まで -20 °C の冷凍庫内で保存した。T-2 トキシン混餌は粉餌専用給餌器 (夏目製作所、KN-675-4) に所定量を入れてケージ内で自由摂食させた。

・試験プロトコルおよびデータ取得

すべての実験群で成熟雄ラット (Slc: Wistar; 8 週齢) にラット用小型テレメーター送信機 (DSI 社、TA11CTA-F40) を全身麻酔下で外科手術によって皮下に埋入した。1 週間の術後回復期の後、3 日間、通常餌の条件下で心電図、皮下体温、活動量の記録 (投与前対照記録) を行った後、T-2 トキシン摂取群では T-2 トキシン混餌を 5 日間にわたって連続給与した。その後 T-2 トキシンを含まない通常粉餌に切り替えさらに 5 日間飼育した。また、対照群では全期間で T-2 トキシンを含まない通常餌のみで飼育した。この期間中、上記の指標の記録を連続して行った。データは各ラットで 5 分間の間隔で 10 秒間ずつの自動サンプリングを専用のデータ取得・解析システム (Dataquest A.R.T) を用いて

行った。また、同時に心電図専用解析ソフト (ソフトロン社、SBP2000U) を用いて心電図波形を連続記録した。なお、摂餌、飲水は自由摂取とし、専用飼育チャンバー内の温度を 23 °C、明暗周期は 8:00 (点灯) 20:00 (消灯) に維持した。通常餌と T-2 トキシン混餌との間の切り替えは 11:00 ~ 12:00 の時間帯に行った。

・統計学的有意差検定

12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T-2 トキシン群、0 ppm-T-2 トキシン群 (対照群) の各群内において、T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の値 (各個体の平均値) の有意差検定を一元配置分散分析 (対応あり) および Bonferroni test によって行った。また、上記 3 群間における T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の値の有意差検定を二元配置分散分析 (対応あり) および Tukey テストによって行った。いずれも $P < 0.05$ で有意差ありとした。

C. 研究結果

1. T-2 トキシンの経口摂取試験

12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T-2 トキシン群および 0 ppm-T-2 トキシン群 (対照群) における心拍数、活動量、皮下温 (体温) の経時的変化を図 1~3 に示す。これらの測定指標はいずれも暗期に高く、明期に低い日リズムを示した。しかしながら、T-2 トキシンを摂取した群では、摂取期間中において心拍数の日リズムの変動幅が摂取前に比べて減弱した。とくに 12 ppm-T-2 トキシン群ではその変化が明瞭であった。活動量は T-2 トキシン摂取期間中にやや減少する傾向がみられ、体温レベルは明期に低下する個体も認められたが、全体的にはほぼ安定した経過が示された。

各指標のより詳細な変化を下に述べる。

1) 心拍数レベルの変化

暗期および明期を通じた全体の平均心拍数を T-2 トキシンの摂取前、摂取中、摂取後と比較すると 12 ppm-T-2 トキシン群ではそれぞれ 420.4 bpm、411.5 bpm、381.8 bpm を示した。また、6 ppm-T-2 トキシン群では

408.9 bpm、406.8 bpm、383.2 bpm を示した。両群とも心拍数は日数の経過とともに減少する傾向があり、これらの変化は有意差($P = 0.001$)が存在した。摂取経過に関係した比較では、摂取前(3日間)と摂取中(5日間)との間での有意差はなく、摂取前(3日間)と摂取後(5日間)および摂取中(5日間)と摂取後(5日間)において有意差($P < 0.01$)が認められた。

観察期間全体を通じて心拍数は日数の経過に伴って減少する傾向があったが、T-2 トキシン摂取群では対照群に比べて減少の度合いが大きかった(図4)。一方、0 ppm-T-2 トキシン群では、摂取前、摂取中、摂取後に相当する期間の平均心拍数は、409.0 bpm、410.7 bpm、400.3 bpm を示し、減少傾向があるものの有意な変化ではなかった($P = 0.12$)。

2. 明期および暗期ごとの心拍数、体温、活動量の変化

1) 平均心拍数の変化

12 ppm-T-2 トキシン群：

暗期では、T-2 トキシンの摂取前(3日間)、摂取中(5日間)、摂取後(5日間)でそれぞれ平均 442.8 bpm、423.9 bpm、404.7 bpm を示し、明期では、395.9 bpm、394.4 bpm、355.1 bpm を示した。T-2 トキシンの摂取開始後2日間における明期の心拍数は摂取前に比較して増加する傾向があり、この期間だけの平均心拍数は408.7 bpm を示した。この2日間における明期の心拍数は対照群および6 ppm-T-2 トキシン群の同じ時期の心拍数と比較して有意差がみられた($P < 0.05$ vs 6 ppm-T-2 トキシン群、 $P < 0.001$ vs 0 ppm-T-2 トキシン群)(図5)。

一方、摂取後の期間では12 ppm-T-2 トキシン群および6 ppm-T-2 トキシン群は0 ppm-T-2 トキシン群に比べて明期の心拍数が少なく有意差(12 ppm, $P < 0.005$; 6 ppm, $P < 0.05$)が示された(図5)。

6 ppm-T-2 トキシン群：

暗期では、T-2 トキシンの摂取前(3日間)

摂取中(5日間)、摂取後(5日間)で平均 433.4 bpm、422.9 bpm、403.0 bpm を示し、明期では、386.6 bpm、389.2 bpm、360.1 bpm であった。T-2 トキシンの摂取開始後2日間の明期の心拍数は12 ppm 群と同様に摂取前に比較して増加する傾向があり、この期間だけの心拍数は393.7 bpm を示した。

0 ppm-T-2 トキシン群(対照群)：

暗期では、T-2 トキシンの摂取前、摂取中、摂取後に対応する期間中にそれぞれ 429.6 bpm、436.3 bpm、423.5 bpm を示し、明期では、388.4 bpm、384.7 bpm、375.2 bpm であった。

2) 平均体温の変化

12 ppm-T-2 トキシン群：

暗期の体温はT-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後で 37.1、36.8、36.7 を示した。明期では 36.1、35.8、35.8 を示した。

6 ppm-T-2 トキシン群：

暗期の体温はT-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後で 37.2、37.1、36.9 を示した。明期では 36.3、36.1、36.0 を示した。

0 ppm-T-2 トキシン群(対照群)：

暗期の体温はT-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後に対応する期間で 37.0、36.7、36.7 を示した。明期では 36.2、36.1、35.9 を示した。

3) 最低体温の変化：

12 ppm-T-2 トキシン群では、T-2 トキシン摂取前の最低体温は平均 35.7 であったが、T-2 トキシン摂取期間中の最低体温は平均 35.5 (摂取1日目)から 35.0 (摂取5日目)までに進行性に低下した。T-2 トキシンの摂取終了後は一端 35.5 に戻った。6 ppm-T-2 トキシン群においても、最低体温はT-2 トキシン摂取前の 35.8 から、T-2 トキシン摂取期間中は 35.8 (1日目)から 35.3 (5日目)まで低下した。T-2 トキシン摂取終了後2日間は最低体温が低下したが、その後は上昇し 35.6 以上にまで戻った。

4) 平均活動量の変化

12 ppm-T-2 トキシン群：

明期と暗期を合わせた活動量は、T-2 トキシンの摂取期間中は減少する傾向が示された。（摂取前 3.89 counts/min、摂取中 3.35 counts/min、摂取後 3.61 counts/min）

6 ppm-T-2 トキシン群：

12 ppm-T-2 トキシンと同様にT-2 トキシンの摂取期間中は減少する傾向が示された（摂取前 4.55 counts/min、摂取中 3.38 counts/min、摂取後 3.42 counts/min）

0 ppm-T-2 トキシン群（対照群）：

明期および暗期を合わせた活動量には上記のT-2 トキシン摂取群にみられた減少傾向は認められなかった（摂取前 1.43 counts/min、摂取中 1.36 counts/min、摂取後 1.36 counts/min）

5) 心拍数、体温、活動量の日周リズムの変化

心拍数：いずれの実験群も T-2 トキシン混餌の摂取前は明暗周期に同調した明瞭な日周リズムを示した。すなわち心拍数は暗期に増加、明期に減少する規則正しい周期性が観察された。しかしながら、12 ppm-T-2 トキシン群および 6 ppm-T-2 トキシン群において、T-2 トキシン混餌の摂取開始日より心拍数レベルおよび心拍数の周期性に変化が認められた（図 6）

T-2 トキシン混餌の摂取前 3 日間における自己相関係数曲線（コレログラム）では約 24 時間の規則的なピークが観察された。すなわち、12 ppm-T-2 トキシン群における自己相関係数（正）の第 1 ピークは 24.0 時間、第 2 ピークは 46.2 時間、第 3 ピークは 66.8 時間に現れ、自己相関係数は第 1 ピークで 0.48 であった。また、6 ppm-T-2 トキシン群ではそれぞれ 24.1 時間、48.4 時間、67.4 時間であった。自己相関係数は第 1 ピークで 0.43 であった（表 1）

T-2 トキシン混餌の摂取期間中は多くの個体で自己相関係数の減少と周期性の変化が観察された。自己相関係数の明瞭なピークが認められず本来の規則的な周期性が消失した個

体も出現した。その個体数は 12 ppm-T-2 トキシン群では 6 匹中 2 匹、6 ppm-T-2 トキシン群では 6 匹中 1 匹であった（表 1）

自己相関係数（コレログラム）の分析では T-2 トキシン投与群で周期性が乱れる傾向が示された。周期性が消失した個体の自己相関係数を仮に 0 として、T-2 トキシンの摂取前、摂取中、摂取後の期間において統計的に比較すると、12 ppm-T-2 トキシン群では、3 期間の間で有意差（一元配置分散分析、 $P < 0.01$ ）が認められ、T-2 トキシン摂取中の自己相関係数は摂取前および摂取後に比較して有意に低かった（対摂取前 $P < 0.01$ 、対摂取後 $P < 0.01$ ）。また 6 ppm-T-2 トキシン群では、T-2 トキシンの摂取期間中に有意差ではないものの自己相関係数の減少傾向がみられた（一元配置分散分析、 $P = 0.08$ ）

対照群では T-2 トキシン混餌の摂取前、摂取中、摂取後に相当する同じ時期の心拍数の周期性は 24.0 時間、23.8 時間、24.1 時間を示した。自己相関係数はそれぞれ 0.44、0.48、0.44 であり、周期性が正常に維持されており特異的な変化は認められなかった（表 1）

活動量：自己相関係数コレログラムの第 1 ピークだけをみると、12 ppm-T-2 トキシン群では T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の周期性は 23.5 時間、15.5 時間、21.0 時間を示し、自己相関係数（第 1 ピーク）は 0.33、0.27、0.28 であった（表 2）。12 ppm-T-2 トキシン摂取期間中に活動リズムが大きく乱れる個体が 6 匹中 3 匹存在した。6 ppm-T-2 トキシン群では T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の周期性は 24.0 時間、20.5 時間、19.2 時間を示した。また自己相関係数はそれぞれ 0.29、0.25、0.31 が示された。

対照群では T-2 トキシン混餌の摂取前、摂取中、摂取後に相当する同じ時期の活動量の周期性は 23.8 時間、23.7 時間、24.4 時間を示し、自己相関係数は 0.29、0.29、0.27 であった（表 2）

体温：自己相関係数コレログラムの第 1 ピー

クだけを見ると、12 ppm-T-2 トキシン群では T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の周期性は 23.9 時間、23.8 時間、23.7 時間を示し、自己相関係数はそれぞれ 0.57、0.47、0.46 であった。6 ppm-T-2 トキシン群では T-2 トキシン摂取前、摂取中、摂取後の周期性は 24.0 時間、23.8 時間、24.0 時間を示した。また自己相関係数はそれぞれ 0.58、0.46、0.43 が示された(表 3)。

対照群では T-2 トキシン混餌の摂取前、摂取中、摂取後に相当する同じ時期の体温の周期性は 23.9 時間、23.9 時間、23.9 時間を示し、自己相関係数は 0.50、0.58、0.51 であった。

5) 摂食量および体重

T-2 トキシン摂食期間中の摂食量は 12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T-2 トキシン群、0 ppm-T-2 トキシン群(対照群)で、それぞれ 9.81 ± 0.78 g/日、 12.9 ± 1.99 g/日、 14.0 ± 0.77 であった。体重は実験終了時に 12 ppm-T-2 トキシン群で 240.0 ± 13.1 g、6 ppm-T-2 トキシン群で 247.7 ± 2.5 g、対照群で 259.5 ± 16.5 g であった。

D. 考察

過去の我々の研究では、一定量の T-2 トキシンの皮下投与によって、心拍数の変化に加えて房室ブロックなどの伝導障害や心室期外収縮などの不整脈の発現性が高まること、また自律神経機能に対する明瞭な影響も存在することが明らかにされてきた。今回の経口自由摂取において上記の変化が生じるか否かに関しては現在詳細な分析を行っている。

本研究ではラットの各個体において心電図、活動量および体温を同時記録する方法(テレメトリー法)が用いられた。T-2 トキシン摂取前の通常の餌条件下では心拍数、活動量(ラットの水平移動量)および体温(皮下温)はいずれも暗期(20:00-8:00)に高く、明期(8:00-20:00)に低くなる日周リズムを発現した。それらのリズムは明暗周期に同調しておよそ 24 時間の周期性を有していた。心拍

数についてみると、T-2 トキシンの摂取期間中に上記の正常な周期性が消失する個体が 12 ppm-T-2 トキシン群と 6 ppm-T-2 トキシン群においてそれぞれ 2 匹(33.3%)、1 匹(16.7%)認められた。また周期性が認められた残りの個体においても周期性の乱れが認められ、周期が短縮する傾向が観察された。T-2 トキシン経口摂取による心拍数の日周リズムの乱れは自己相関係数(コレログラム)においても明瞭に観察された。このような心拍数リズムの乱れの一要因として、活動量の変化に起因する自律神経機能の変化が関与する可能性が考えられる。有意差ではないものの、T-2 トキシン摂取の影響とみられる活動量の変化が観察された。この活動量の変化は主に暗期における活動量の減少として観察された。このような活動量の変化が心拍数のリズム形成に影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、個体ごとに詳細に分析すると、T-2 トキシン摂取期間中の心拍数の変化が必ずしも活動量の変化と一致していない個体もみられるため、活動量の変化とは別に T-2 トキシンによる自律神経系への直接作用が影響した可能性も否定できない。T-2 トキシンはヒトやブタなどの動物では激しい催吐性を有すことから、嘔吐動物ではないもののラットにおいても T-2 トキシンによる神経系影響の可能性が考えられる。我々のこれまでの研究では、T-2 トキシンの皮下投与直後の数時間以内に自律神経バランスの明瞭な変化(LF/HF 比の低下)が生じることや、投与後数日間にわたって発現する房室伝導障害性の不整脈が自律神経遮断薬(アトロピン)でほぼ消失したことから、T-2 トキシンは自律神経系を介した心機能影響を有すものと考えられる。

本実験では、T-2 トキシンの経口摂取開始後の 2 日間にわたって心拍数の増加(主に明期の心拍数増加)が観察されていることから、経口摂取においても比較的早い段階から循環機能影響が生じることが明らかになった。この影響は 6 ppm に比べて 12 ppm の T-2 トキシンでより明瞭であったことから、濃度依存性が存在するものと思われる。

体温変化に関しては、T-2 トキシンの摂取期間中、とくに後半において明期の最低体温が低下する傾向が認められた。体温が低下する要因としては、活動量の減少、基礎代謝の低下、自律神経機能低下（交感神経緊張の低下、副交感神経緊張の上昇）などが考えられる。今回の実験条件においては、これらの要因のいずれもが関与しうる可能性がある。我々のこれまでの研究および他の研究者の研究では、T-2 トキシンはミトコンドリア電子伝達系機能を抑制する作用があることが明らかになっている。そのため T-2 トキシンの摂取によって細胞におけるエネルギー産生能力の抑制が生じていることも推測される。また消化器障害を生じた場合にはそれによる全身影響（活動抑制など）の可能性も考えられる。

本実験において、心拍数および体温の全体的なレベルは時間の経過とともに徐々に低下する傾向が示された。これは本実験に用いたラットは比較的若齢であったため、成長（加齢）に伴う変化がベースに存在したことが推測される。しかしながら、一方で、この経時的な変化は 12 ppm-T-2 トキシンの群、6 ppm-T-2 トキシンの群、0 ppm-T-2 トキシンの群（対照群）の順に強く現れているように見えることから、T-2 トキシンの摂取による影響が潜在する可能性がある。また、摂食量および体重は、12 ppm-T-2 トキシンの群、6 ppm-T-2 トキシンの群、0 ppm-T-2 トキシンの群（対照群）の順に小さかった。本報告書分担研究者の渋谷らのマウスへの経口摂取試験においても 9 ppm の T-2 トキシンの群で体重および摂食量の低値が観察されている。

今後はより低濃度の T-2 トキシンの経口摂取による影響の有無を観察する必要がある。また、全個体の心電図波形解析を行い、房室伝導障害（房室ブロック）や心室期外収縮などの心電図異常を伴う不整脈の発現性についても明らかにしたい。

E. 結論

12 ppm および 6 ppm の T-2 トキシンを含む粉餌を自由経口摂取したラットにおいて、摂取期間中に心拍数、活動量および体温（最低体温）レベルの変化、心拍数や活動量の日周リズムの変化が生じることが明らかになった。また、12 ppm は 6 ppm に比べて影響の度合いが大きかった。心拍数や活動量の日周リズムは餌を T-2 トキシンを含まない通常の餌に戻すことによって回復する傾向が示された。これらの結果から少なくとも 6 ppm 以上の T-2 トキシンの短期間経口摂取によって自由行動下のラットにおいて循環系を始めとする全身機能におそらくは可逆性の影響が生じることが明らかになった。

参考文献

- 1) Bubien, J.K. and Woods W. T. Jr.(1987): Direct and reflex cardiovascular effects of trichothecene mycotoxins. *Toxicol.* 25(3): 325-331.
- 2) Fang, H., Wu, Y., Guo, J., Rong, J., Ma, L., Zhao, Z., Zuo, D., Peng, S. (2012): T-2 toxin induces apoptosis in differentiated murine embryonic stem cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Apoptosis*. 17, 895-907.
- 3) Feuerstein, G. et al. (1985): Cardiorespiratory, sympathetic and biochemical responses to T-2 toxin in the guinea pig and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232(3): 786-794.
- 4) Koshinsky, H., Honour, S., Khachatourians, G., (1988): T-2 toxin inhibits mitochondrial function in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 809-814.
- 5) Ma, Y., Zhang, A., Shi, Z., He, C., Ding, J., Wang, X., Ma, J. Zhang, H.(2012): A mitochondria-mediated apoptotic pathway induced by deoxynivalenol in human colon cancer cells. *Toxicol. in Vitro*. 26, 414-420.
- 6) Magnuson, B. A. et al. (1987): Cardiovascular effects of mycotoxin T-2 after topical application in rats. *Can. J. Physiol.*

- Pharmacol. 65, 799-802.
- 7) Ngampongsa S, Ito K, Kuwahara M, Kumagai S, Tsubone H. (2011): Arrhythmias and alterations in autonomic nervous function induced by deoxynivalenol (DON) in unrestrained rats. *J Toxicol Sci.* 36(4):453-460.
- 8) Ngampongsa S, Ito K, Kuwahara M, Ando K, Tsubone H. (2012): Reevaluation of arrhythmias and alterations of the autonomic nervous activity induced by T-2 toxin through telemetric measurements in unrestrained rats. *Toxicol Mech Methods.* 22: 662-673.
- 9) Ngampongsa S, Hanafusa M, Ando K, Ito K, Kuwahara M, Yamamoto Y, Yamashita M, Tsuru Y, Tsubone H.: Toxic effects of T-2 toxin and deoxynivalenol on the mitochondrial electron transport system of cardiomyocytes in rats. *J Toxicol Sci.* 38(3): 495-502. 2013.
- 10) Pace, J.G. (1983): Effect of T-2 Mycotoxin on rat liver mitochondria electron transport system. *Toxicon.* 21, 675-680.
- 11) Wilson, C. A. et al. (1982): Blood pressure changes and cardiovascular lesions found in rats given T-2 toxin, a trichothecene secondary metabolite of certain *Fusarium microfungi*. *Toxicol Lett.* 10(1):35-40.
- 12) Yarom, R. et al. (1983): T-2 toxin effect on isolated perfused rat hearts. *Basic Res Cardiol.* 78(6):623-630.
- 13) Yarom, R. et al. (1986): T-2 toxin effect on cultured myocardial cells. *Toxicol Lett.* 31(1):1-8.
- 13) Yarom, R. et al. (1987): T-2 toxin effect on rat aorta: cellular changes *in vivo* and growth of smooth muscle cells *in vitro*. *Exp Mol Pathol.* 47(2):143-153.
- F. 健康危険情報
なし。
- G. 研究業績
【学会発表】
1) 局 博一、スチトラ・ガンボンサ：T-2 トキシンおよびデオキシニバレノールの心筋細胞ミトコンドリア機能に及ぼす影響。日本マイコトキシ学会第 73 回学術講演会（2013 年 9 月 13 日、於大阪府立大学）
- 【論文発表】
1) Ngampongsa S, Hanafusa M, Ando K, Ito K, Kuwahara M, Yamamoto Y, Yamashita M, Tsuru Y, Tsubone H.: Toxic effects of T-2 toxin and deoxynivalenol on the mitochondrial electron transport system of cardiomyocytes in rats. *J Toxicol Sci.* 38(3): 495-502. 2013.
- H. 知的所有権の取得状況
1 . 特許所得
なし
2 . 実用新案登録
なし
3 . その他
なし

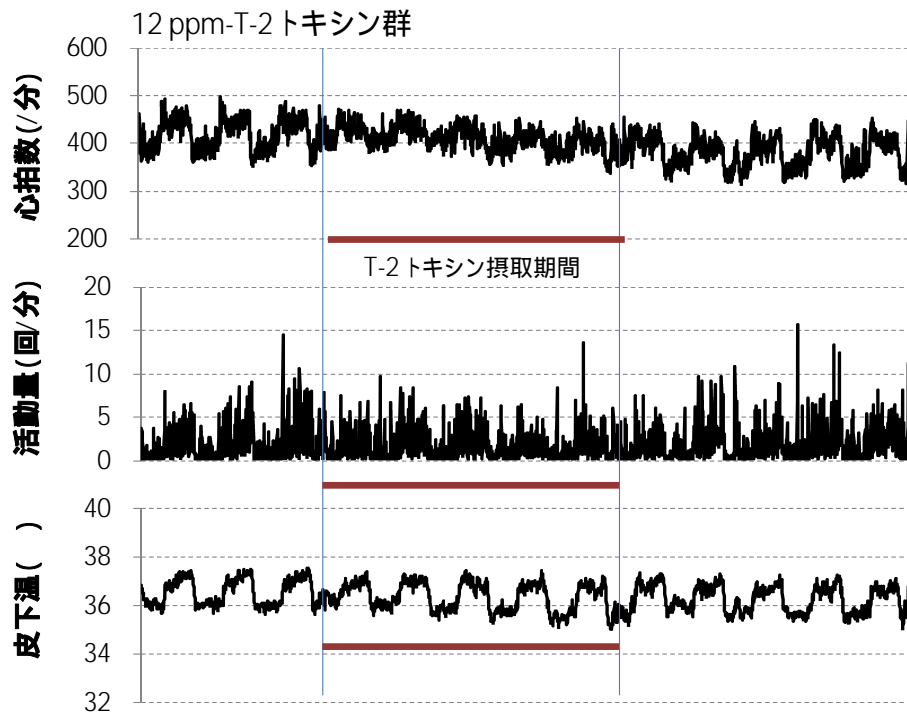


図1. 心拍数、活動量、皮下温の変化(ラット6匹の平均)

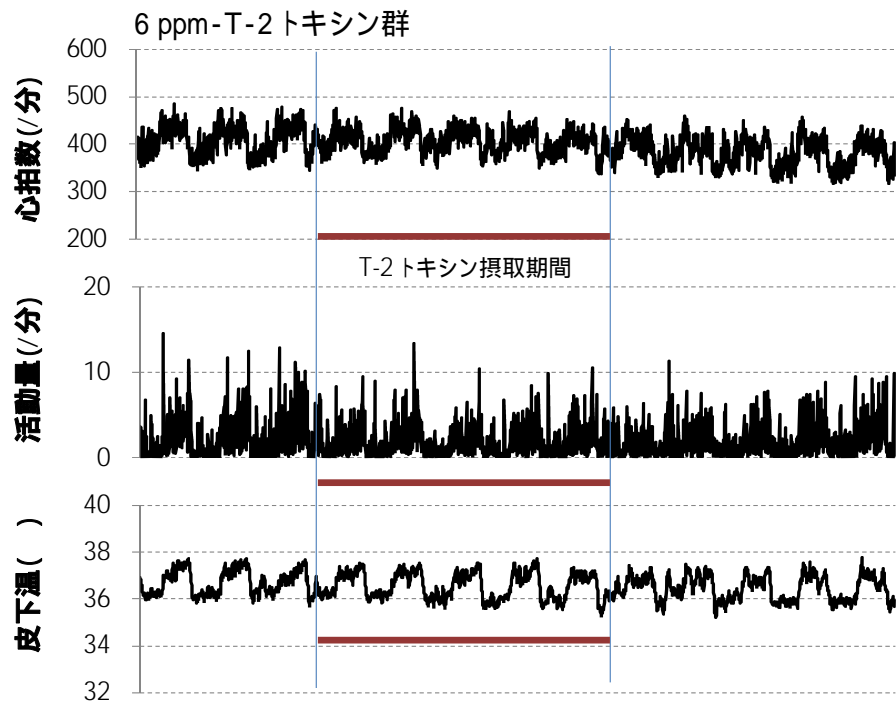


図2. 心拍数、活動量、皮下温の変化(ラット6匹の平均)

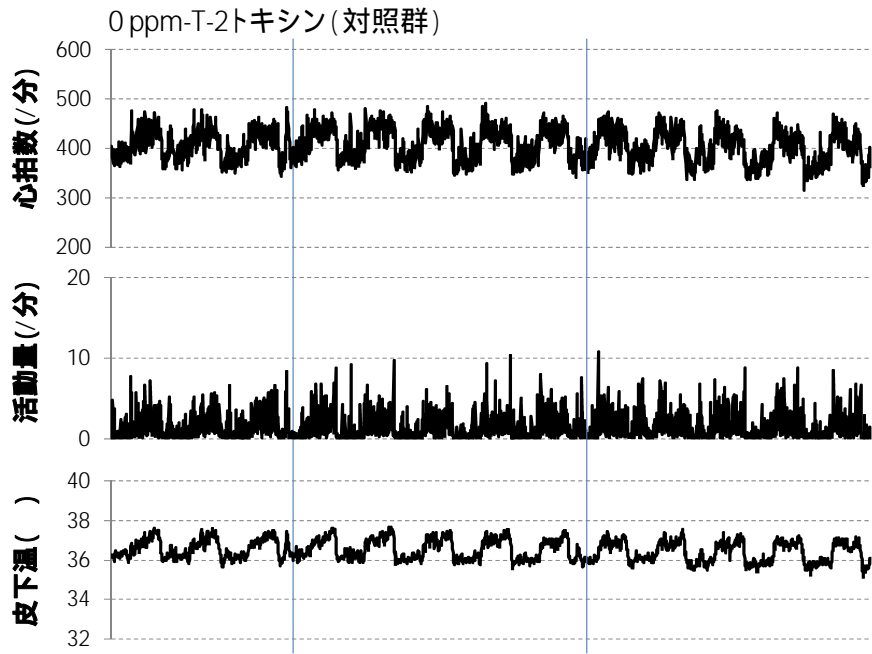


図3. 心拍数、活動量、皮下温の変化(ラット6匹の平均)

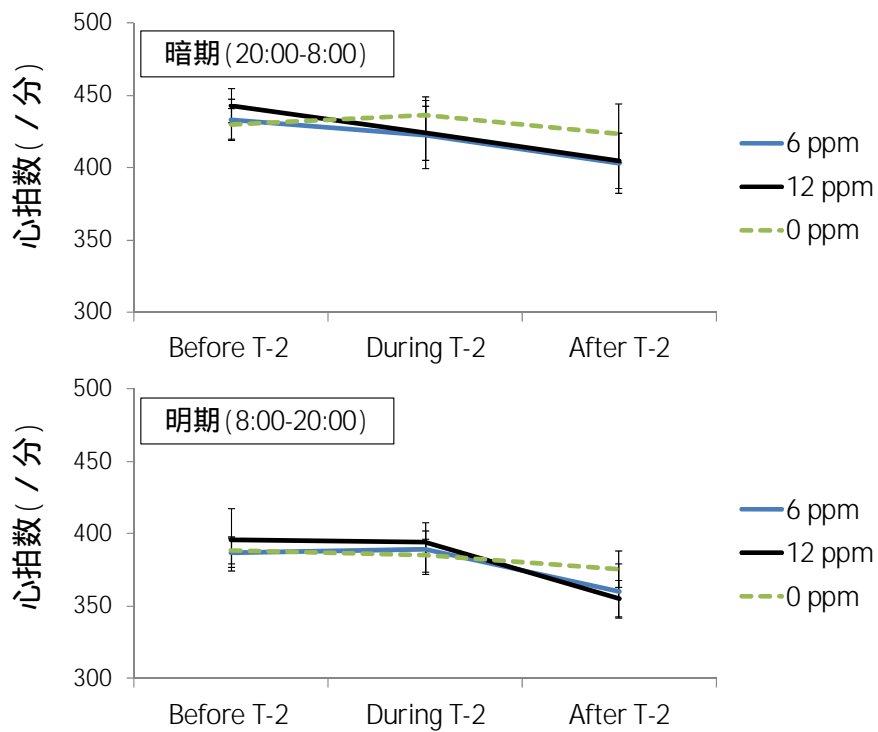


図4. T-2トキシン摂取前、摂取中、摂取後の心拍数の変化

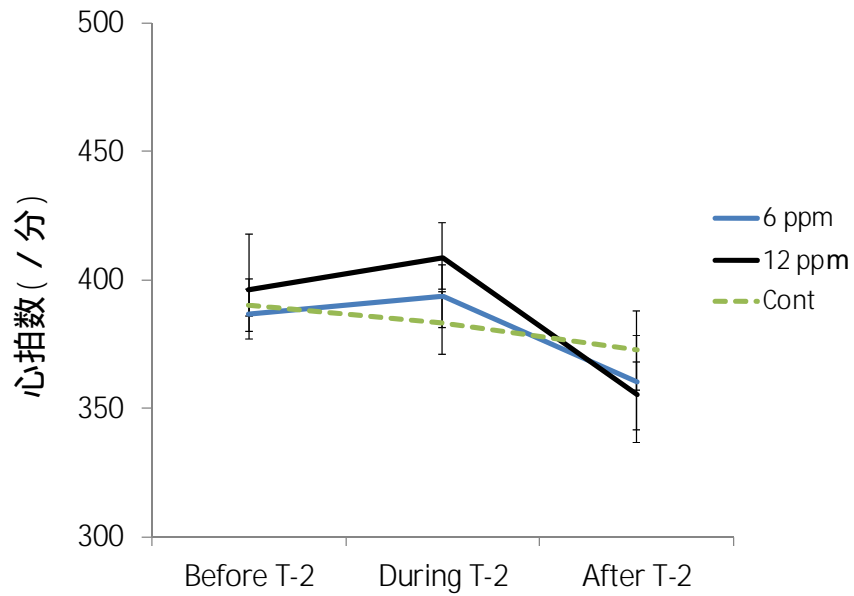


図5. T-2トキシン摂取開始2日間および摂取前後2日間の明期の心拍数の変化

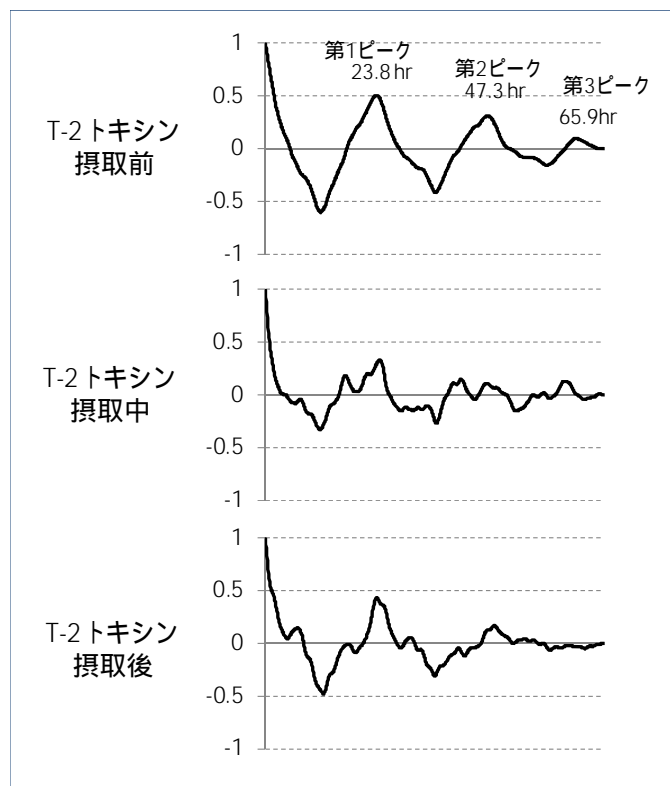


図6. 12 ppm-T-2トキシン群ラットの心拍数コレログラム(自己相関係数)の1例

縦軸は自己相関係数、横軸は周期を示す。

T-2トキシン摂取直前、摂取中、摂取終了後のそれぞれ3日間の解析結果を示す。

表1 .12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T2 トキシン群、0 ppm-T-2 トキシン群(対照群)における心拍数の自己相関係数(A)とその周期性(B)の変化

(A)

		Auto-correlation Coefficient								
Positive peak of auto-correlation	Rat	12 ppm-T2 toxin			6 ppm-T2 toxin			0 ppm-T2 toxin (Control)		
		Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2
Peak 1 (2)	1	0.45		0.22	0.51	0.31	0.14	0.43	0.50	0.53
	2	0.50	0.33	0.43	0.43	0.20	0.41	0.50	0.49	0.44
	3	0.53		0.44	0.47	0.17	0.48	0.36	0.46	0.41
	4	0.44	0.23	0.38	0.48	0.35	0.45	0.48	0.57	0.45
	5	0.54	0.36	0.56	0.39		0.32	0.47	0.47	0.46
	6	0.43	0.38	0.42	0.33	0.47	0.38	0.42	0.42	0.35
Mean		0.48	0.33	0.41	0.43	0.30	0.37	0.44	0.48	0.44
SD		0.05	0.07	0.11	0.07	0.12	0.12	0.05	0.05	0.06
Peak 2 (4)	1	0.23		0.06	0.26	0.16	0.13	0.22	0.27	0.25
	2	0.31	0.15	0.17	0.27	0.08	0.13	0.20	0.25	0.21
	3	0.25		0.22	0.24		0.19	0.25	0.24	0.19
	4	0.25	0.12	0.20	0.24	0.11	0.21	0.21	0.26	0.26
	5	0.27	0.21	0.25	0.18		0.04	0.17	0.26	0.20
	6	0.22	0.19	0.20	0.21	0.19	0.20	0.25	0.28	0.17
Mean		0.25	0.17	0.18	0.23	0.13	0.15	0.22	0.26	0.21
SD		0.03	0.04	0.07	0.03	0.05	0.07	0.03	0.02	0.04
Peak 3 (6)	1	0.05			0.08	0.09	0.08	0.04	0.07	0.08
	2	0.10	0.13		0.06		0.05	0.04	0.06	0.06
	3	0.05			0.06		0.05	0.05	0.07	0.09
	4	0.02	0.11		0.06		0.05	0.06	0.07	0.07
	5	0.05	0.12	0.07	0.05			0.04	0.06	0.01
	6	0.06	0.10	0.04	0.06	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04
Mean		0.05	0.12	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06
SD		0.02	0.01		0.01		0.02	0.01	0.01	0.03
: No obvious peak										

(B)

		Periodicity (hour)								
Positive peak of auto-correlation	Rat	12 ppm-T2 toxin			6 ppm-T2 toxin			0 ppm-T2 toxin (Control)		
		Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2
Peak 1 (2)	1	24.50		23.75	24.25	24.50	23.75	23.75	24.00	24.12
	2	23.75	24.42	23.75	24.00	21.00	23.67	24.08	23.83	23.33
	3	23.83		24.25	24.33	25.25	23.92	23.92	24.17	25.00
	4	23.67	23.83	24.33	23.50	22.75	24.33	24.00	23.67	24.00
	5	24.00	23.08	23.58	24.00		24.42	23.92	23.83	24.25
	6	24.41	23.83	24.33	24.33	24.25	23.58	24.33	23.42	23.83
Mean		24.03	23.79	24.00	24.07	23.55	23.95	24.00	23.82	24.09
SD		0.35	0.55	0.34	0.32	1.69	0.35	0.20	0.26	0.55
Peak 2 (4)	1	46.08		48.58	47.75	47.50	42.42	47.33	48.08	48.33
	2	47.33	41.67	48.67	47.83	40.92	47.42	48.50	48.08	48.33
	3	40.08		40.08	48.08		48.08	48.58	47.83	49.67
	4	48.00	41.33	47.67	48.42	42.00	47.92	47.92	47.17	46.92
	5	47.58	48.75	47.75	49.08		48.83	48.25	47.58	48.33
	6	48.33	47.75	48.75	48.92	48.50	48.92	47.00	47.58	48.75
Mean		46.23	44.875	46.92	48.35	44.73	47.27	47.93	47.72	48.39
SD		3.11	3.92	3.38	0.56	3.82	2.44	0.64	0.35	0.89
Peak 3 (6)	1	65.83			66.25		67.92	69.58	67.67	66.17
	2	65.92	63.67		66.17		66.67	68.67	67.08	66.58
	3	65.75			67.25		66.00	67.83	67.33	64.42
	4	68.17	68.17		67.83		68.75	67.50	67.25	64.25
	5	67.42	66.75	67.00	68.25			67.42	67.42	69.42
	6	67.75	72.17	68.25	68.42	66.67	68.33	68.08	67.92	64.58
Mean		66.81	67.69	67.63	67.36	66.045	67.53	68.18	67.38	66.38
SD		1.09	3.53		0.98		1.158	0.82	0.30	1.98
: No obvious peak										

表2 .12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T2 トキシン群、0 ppm-T-2 トキシン群(対照群)
 における活動量の自己相関係数と周期性の変化 (第 1 ピークのみ)

		Auto-correlation Coefficient								
Positive peak	Rat	12 ppm-T2 toxin			6 ppm-T2 toxin			0 ppm-T2 toxin (Control)		
		Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2
Peak 1 (2)	1	0.17	0.28	0.06	0.48	0.21	0.27	0.38	0.38	0.28
	2	0.44	0.22	0.16	0.17			0.21	0.29	0.25
	3	0.29	0.18	0.26	0.32	0.21	0.25	0.23	0.33	0.26
	4	0.43	0.35	0.44	0.39	0.28		0.22	0.15	0.26
	5	0.26	0.19	0.31	0.17	0.28	0.39	0.38	0.37	0.29
	6	0.39	0.29	0.43	0.23	0.28	0.32	0.31	0.25	
Mean		0.33	0.27	0.28	0.29	0.25	0.31	0.29	0.29	0.27
SD		0.11	0.07	0.15	0.13	0.04	0.06	0.08	0.09	0.02
		Periodicity (hour)								
Positive peak	Rat	12 ppm-T2 toxin			6 ppm-T2 toxin			0 ppm-T2 toxin (Control)		
		Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2
Peak 1 (2)	1	21.58	23.00	24.92	24.25	23.25	3.42	23.83	23.92	24.33
	2	22.92	9.75	7.50	23.08			23.83	23.83	24.25
	3	23.58	15.67	7.58	24.25	24.92	24.42	23.67	23.25	23.67
	4	24.25	23.83	23.83	24.33	4.75		23.92	23.58	25.25
	5	24.17	23.58	23.92	23.58	25.75	24.75	23.42	23.67	24.33
	6	24.33	4.75	24.50	24.33	23.67	24.33	24.00	23.83	
Mean		23.47	15.48	20.95	23.97	20.47	19.23	23.78	23.68	24.37
SD		1.07	8.13	7.49	0.52	8.84	10.54	0.21	0.24	0.57
		: No obvious peak								

表3 .12 ppm-T-2 トキシン群、6 ppm-T2 トキシン群、0 ppm-T-2 トキシン群(対照群)
 における体温の自己相関係数と周期性の変化 (第 1 ピークのみ)

		Auto-correlation Coefficient								
Positive peak	Rat	12 ppm-T2 toxin			6 ppm-T2 toxin			0 ppm-T2 toxin (Control)		
		Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2
Peak 1 (2)	1	0.61	0.39	0.24	0.64	0.48	0.11	0.55	0.62	0.51
	2	0.61	0.44	0.55	0.62	0.41	0.54	0.48	0.50	0.37
	3	0.60	0.41	0.46	0.61	0.40	0.52	0.40	0.59	0.59
	4	0.57	0.52	0.48	0.54	0.50	0.40	0.54	0.62	0.55
	5	0.51	0.55	0.49	0.53	0.38	0.52	0.53	0.58	0.54
	6	0.49	0.54	0.51	0.56	0.60	0.50	0.52	0.57	0.51
Mean		0.57	0.47	0.46	0.58	0.46	0.43	0.50	0.58	0.51
SD		0.05	0.07	0.11	0.04	0.08	0.16	0.05	0.04	0.08
		Periodicity (hour)								
Positive peak	Rat	12 ppm-T2 toxin			6 ppm-T2 toxin			0 ppm-T2 toxin (Control)		
		Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2	Pre-T2	T2	Post-T2
Peak 1 (2)	1	24.17	23.58	23.92	23.83	23.92	23.08	23.92	23.75	24.17
	2	23.92	24.08	23.92	23.92	23.83	23.58	23.92	23.92	23.17
	3	23.83	24.08	22.83	24.08	23.00	24.08	23.67	23.83	24.08
	4	23.67	23.58	23.92	24.17	24.00	24.33	24.00	23.75	23.83
	5	23.92	23.67	23.67	24.17	24.33	24.33	23.92	24.00	24.08
	6	23.75	23.83	24.08	24.08	23.83	24.58	24.08	23.92	23.83
Mean		23.88	23.81	23.72	24.04	23.82	24.00	23.92	23.86	23.86
SD		0.17	0.23	0.46	0.14	0.44	0.56	0.14	0.10	0.37

個 表

各試料における添加回収試験の結果

試料名	ZEN		T-2		HT-2	
	5 µg/kg	50 µg/kg	5 µg/kg	50 µg/kg	5 µg/kg	50 µg/kg
国産小麦	79.3	80.3	87.5	84.6	100.4	101.2
国産大麦	93.8	87.1	87.0	84.8	106.3	103.6
ライ麦粉	84.4-85.4	84.5-89.8	70.8-90.0	89.7-89.8	93.1-100.3	95.8-96.3
ハト麦加工品	93.9	85.2	107.3	95.8	88.3	94.6
小麦粉	71.3	76.2	76.4	77.7	99.3	98.6
グラノーラ	91.5	92.6	76.1	75.9	96.0	87.2
ビール	88.3	73.7	97.7	94.4	93.2	93.2
コーングリッツ	101.5	107.1	81.2	99.3	101.6	101.1
コーンフレーク	73.5	73.0	86.3	85.8	92.3	93.6
ソバ	89.5	95.7	108.5	116.3	87.3	101.9
ゴマ	74.7	74.5	85.7	94.6	91.9	93.1
小豆	95.5	93.2	94.3	96.2	95.9	102.3
雑穀米	92.7	83.7	104.1	89.8	113.1	97.7
精米	89.5	95.1	87.6	104.5	50.8	66.1

それぞれの試料の結果（下線は検出限界値以上、定量限界値未満の値）

・国産小麦

分析用ID	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-DW01	ND	0.14	2.23
25-DW02	ND	0.69	6.39
25-DW03	ND	ND	<u>0.23</u>
25-DW04	ND	ND	ND
25-DW05	ND	ND	<u>0.20</u>
25-DW06	ND	0.08	0.65
25-DW07	ND	ND	<u>0.33</u>
25-DW08	ND	0.69	3.92
25-DW09	0.21	ND	<u>0.31</u>
25-DW10	0.16	ND	2.91
25-DW11	0.17	ND	ND
25-DW12	0.18	ND	ND
25-DW13	ND	ND	ND
25-DW14	0.84	ND	<u>0.29</u>
25-DW15	0.31	ND	ND
25-DW16	ND	ND	ND
25-DW17	ND	ND	ND
25-DW18	0.14	ND	ND
25-DW19	ND	ND	1.37
25-DW20	0.18	ND	ND
25-DW21	ND	ND	ND
25-DW22	0.20	ND	ND
25-DW23	0.81	ND	ND
25-DW24	ND	ND	<u>0.37</u>
25-DW25	0.19	ND	3.02
25-DW26	3.52	ND	ND
25-DW27	0.34	ND	<u>0.27</u>
25-DW28	0.17	ND	ND
25-DW29	0.32	ND	ND
25-DW30	0.31	ND	ND
25-DW31	0.16	ND	ND
25-DW32	ND	ND	ND
25-DW33	22.03	ND	<u>0.29</u>
25-DW34	0.20	ND	ND
25-DW35	ND	ND	ND
25-DW36	0.30	ND	ND
25-DW37	0.31	ND	ND
25-DW38	0.40	ND	ND
25-DW39	0.26	ND	ND
25-DW40	0.72	ND	ND

・国産大麦

分析用ID	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-DB01	6.05	1.49	7.86
25-DB02	3.11	ND	ND
25-DB03	0.86	ND	ND
25-DB04	0.46	ND	ND
25-DB05	0.31	ND	ND
25-DB06	0.18	ND	ND
25-DB07	0.28	ND	ND
25-DB08	0.39	ND	ND
25-DB09	0.39	ND	ND
25-DB10	0.45	ND	ND

・精米

サンプルID	産地	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-RC01	京都府	ND	ND	ND
25-RC02	北海道	ND	ND	ND
25-RC03	島根県	ND	ND	ND
25-RC04	佐賀県	ND	ND	ND
25-RC05	宮城県	ND	ND	ND
25-RC06	熊本県	ND	ND	ND
25-RC07	岐阜県	ND	ND	ND
25-RC08	新潟県	ND	ND	ND
25-RC09	青森県	ND	ND	ND
25-RC10	島根県	ND	ND	ND

・ライ麦粉

サンプルID	原産国	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-RY01	ドイツ	0.29	<u>0.09</u>	1.17
25-RY02	ドイツ	0.93	<u>0.10</u>	1.58
25-RY03	ドイツ	<u>0.18</u>	ND	1.10
25-RY04	ドイツ	0.83	ND	1.33
25-RY05	ドイツ	0.20	<u>0.16</u>	1.39
25-RY06	カナダ	ND	ND	<u>0.80</u>
25-RY07	ドイツ	2.23	<u>0.12</u>	1.56
25-RY08	ドイツ	1.62	ND	<u>0.68</u>
25-RY09	不明	2.69	0.89	7.47
25-RY10	ドイツ	0.22	<u>0.11</u>	1.43
25-RY11	ドイツ・カナダ	<u>0.07</u>	ND	<u>0.61</u>
25-RY12	カナダ	<u>0.11</u>	<u>0.18</u>	1.65
25-RY13	アメリカ	ND	1.24	5.56
25-RY14	ドイツ	0.35	<u>0.07</u>	<u>0.96</u>
25-RY15	ドイツ・カナダ	<u>0.11</u>	ND	<u>0.52</u>
25-RY16	ドイツ・カナダ	<u>0.10</u>	ND	<u>0.44</u>
25-RY17	ドイツ	0.45	<u>0.10</u>	1.36
25-RY18	アメリカ	<u>0.11</u>	ND	<u>0.31</u>
25-RY19	北海道	10.27	1.67	8.39
25-RY20	ドイツ・カナダ	<u>0.16</u>	ND	<u>0.66</u>

・ハト麦加工品

サンプルID	原産国	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-HM01	島根県	0.53	0.75	<u>0.21</u>
25-HM02	日本	ND	<u>0.15</u>	ND
25-HM03	中国	58.47	ND	ND
25-HM04	日本	0.27	ND	ND
25-HM05	-	43.76	ND	ND
25-HM06	中国	169.57	ND	ND
25-HM07	島根県	1.13	ND	ND
25-HM08	岩手県	<u>0.09</u>	1.03	3.73
25-HM09	富山県	1.20	1.78	1.41
25-HM10	日本	0.23	ND	ND
25-HM11	ラオス	24.92	ND	ND
25-HM12	岩手県	ND	4.32	4.94
25-HM13	富山県	0.52	ND	0.38
25-HM14	熊本県	ND	ND	ND
25-HM15	日本	<u>0.13</u>	0.56	1.48
25-HM16	日本	1.27	9.53	10.32
25-HM17	宮城県	2.58	ND	0.74
25-HM18	富山県	1.65	ND	0.45
25-HM19	日本	ND	0.60	2.96
25-HM20	栃木県	0.28	0.47	0.69

・小麦粉（原料：国産小麦）

分析用ID	小麦原産地	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-WF01	北海道	1.75	0.42	1.83
25-WF03	北海道	0.72	ND	<u>0.30</u>
25-WF04	岩手県	ND	ND	ND
25-WF06	北海道	ND	ND	<u>0.13</u>
25-WF09	北海道	2.53	0.14	1.11
25-WF15	国産	0.42	ND	ND
25-WF19	栃木県	ND	ND	ND
25-WF20	栃木県	ND	ND	ND
25-WF21	長野県	ND	ND	ND
25-WF22	長野県	ND	ND	ND
25-WF23	岩手県	ND	ND	ND
25-WF24	岩手県	ND	ND	ND
25-WF25	北海道	ND	0.10	2.30
25-WF26	北海道	ND	ND	ND
25-WF27	北海道	ND	ND	ND
25-WF28	熊本県	0.74	ND	ND
25-WF29	北海道	ND	ND	<u>0.17</u>
25-WF30	北海道	ND	ND	ND
25-WF31	北海道	ND	ND	ND
25-WF32	北海道	ND	ND	ND
25-WF33	群馬県	0.11	ND	ND
25-WF34	青森県	ND	ND	ND
25-WF35	岩手県	ND	ND	ND
25-WF36	北海道	ND	ND	ND
25-WF37	岩手県	ND	ND	ND
25-WF40	神奈川県	ND	ND	ND
25-WF41	福岡県	0.42	ND	ND
25-WF42	福岡県、佐賀県	ND	ND	ND
25-WF43	佐賀県	ND	ND	ND
25-WF44	福岡県	ND	ND	ND
25-WF45	福岡県	ND	ND	ND
25-WF46	佐賀県	ND	ND	ND
25-WF47	北海道（主体）、九州	ND	ND	ND
25-WF48	岩手県	ND	ND	ND
25-WF49	岐阜県	ND	ND	ND
25-WF50	北海道	ND	ND	ND

・小麦粉（原料：輸入小麦）

分析用ID	小麦原産国	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-WF02	カナダ	ND	ND	0.51
25-WF05	アメリカ・カナダ	ND	ND	ND
25-WF08	カナダ	ND	ND	ND
25-WF10	アメリカ・カナダ	ND	0.13	2.39
25-WF11	カナダ・アメリカ	ND	0.14	1.95
25-WF12	カナダ	ND	ND	ND
25-WF13	アメリカ	ND	ND	ND
25-WF14	アメリカ・カナダ	ND	ND	ND
25-WF17	カナダ・アメリカ	ND	ND	ND
25-WF38	フランス	ND	ND	ND
25-WF39	フランス	0.88	ND	0.31
25-WF51	カナダ	ND	ND	ND
25-WF52	アメリカ、カナダ主体	ND	ND	ND
25-WF53	アメリカ、カナダ主体	ND	ND	ND
25-WF54	アメリカ主体	ND	ND	ND
25-WF55	アメリカ、カナダ、オーストラリア主体	0.07	ND	ND
25-WF56	アメリカ、カナダ主体	ND	ND	ND
25-WF57	オーストラリア主体	ND	ND	ND
25-WF58	北米、オーストラリア主体	ND	ND	ND
25-WF59	フランス、北米主体	0.10	ND	ND
25-WF60	カナダ主体	ND	ND	ND
25-WF61	アメリカ主体	ND	ND	ND
25-WF62	カナダ・アメリカ	ND	ND	ND
25-WF63	アメリカ・カナダ・オーストラリア	ND	ND	ND
25-WF64	カナダ	0.08	0.27	3.46

・グラノーラ

サンプルID	原産国	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-GN01	-	<u>0.22</u>	0.51	1.67
25-GN02	-	ND	ND	ND
25-GN03	-	0.73	ND	ND
25-GN04	-	<u>0.16</u>	ND	ND
25-GN05	-	1.41	ND	ND
25-GN06	-	<u>0.16</u>	ND	ND
25-GN07	-	1.60	ND	ND
25-GN08	イギリス	<u>0.14</u>	0.36	1.80
25-GN09	スイス	0.54	1.53	5.22
25-GN10	スイス	0.47	0.33	1.14

・ビール

サンプルID	原産国	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)	α -ZOL (ng/g)	β -ZOL (ng/g)
25-BRf01	日本	<u>0.01</u>	0.03	0.17	ND	0.10
25-BRf02	日本	<u>0.01</u>	0.04	0.26	ND	0.16
25-BRf03	日本	ND	0.02	0.10	ND	0.08
25-BRf04	日本	ND	0.03	0.27	ND	<u>0.08</u>
25-BRf05	日本	ND	0.03	0.09	ND	<u>0.08</u>
25-BRf06	日本	ND	0.03	0.35	ND	0.09
25-BRf07	日本	ND	0.03	0.08	ND	<u>0.04</u>
25-BRf08	日本	ND	0.02	<u>0.04</u>	ND	<u>0.06</u>
25-BRf09	日本	<u>0.01</u>	0.02	0.07	ND	0.14
25-BRf10	日本	ND	<u>0.01</u>	<u>0.04</u>	ND	<u>0.03</u>
25-BRf11	日本	<u>0.01</u>	0.11	0.62	0.03	0.22
25-BRf12	アイルランド	0.1	0.03	0.09	0.02	0.19
25-BRf13	日本	ND	0.02	0.09	ND	<u>0.06</u>
25-BRf14	メキシコ	ND	0.01	<u>0.04</u>	ND	<u>0.05</u>
25-BRf15	ベルギー	<u>0.01</u>	0.03	0.37	0.02	0.11
25-BRf16	ベルギー	ND	0.02	0.27	ND	ND
25-BRf17	ベルギー	ND	0.07	0.15	<u>0.01</u>	0.08
25-BRf18	ドイツ	ND	0.01	0.09	ND	<u>0.05</u>
25-BRf19	ドイツ	0.02	0.11	0.54	ND	0.13
25-BRf20	ドイツ	ND	0.01	0.24	<u>0.01</u>	<u>0.07</u>

・コーングリッツ

サンプルID	原産国	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-CGf01	アメリカ	<u>0.22</u>	<u>0.29</u>	ND
25-CGf02	アメリカ	ND	ND	ND
25-CGf03	中国	2.44	ND	ND
25-CGf04	アメリカ	1.15	ND	ND
25-CGf05	アメリカ	ND	ND	ND
25-CGf06		1.66	0.97	1.42
25-CGf07	アメリカ	ND	ND	ND
25-CGf08	アメリカ	<u>0.10</u>	ND	ND
25-CGf09		0.96	<u>0.21</u>	ND
25-CGf10	アメリカ	ND	ND	ND
25-CGf11	アメリカ	<u>0.12</u>	<u>0.21</u>	ND
25-CGf12		ND	ND	ND
25-CGf13		1.66	0.87	1.11
25-CGf14	アメリカ	1.55	0.86	1.02
25-CGf15	オーストラリア	<u>0.20</u>	ND	ND
25-CGf16	米国	ND	ND	ND
25-CGf17	米国	ND	ND	ND
25-CGf18		ND	0.39	<u>0.45</u>
25-CGf19	イタリア	<u>0.13</u>	ND	ND
25-CGf20	イタリア	<u>0.14</u>	0.48	ND

・コーンフレーク

サンプルID	原産国	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-KF01	-	ND	ND	ND
25-KF02	-	0.64	ND	ND
25-KF03	-	ND	0.15	ND
25-KF04	-	ND	ND	ND
25-KF05	-	ND	ND	ND
25-KF06	-	ND	ND	ND
25-KF07	アルゼンチン	ND	ND	ND
25-KF08	-	0.82	ND	ND
25-KF09	-	1.27	ND	ND
25-KF10	-	1.25	ND	ND
25-KF11	-	1.02	ND	ND
25-KF12	-	0.23	ND	ND
25-KF13	-	ND	ND	ND
25-KF14	-	0.06	ND	ND
25-KF15	ドイツ	2.25	ND	ND

・ソバ

サンプルID	原産地	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-SB01	-	0.51	ND	1.55
25-SB02	-	0.34	ND	<u>0.14</u>
25-SB03	日本	<u>0.11</u>	ND	<u>0.22</u>
25-SB04	-	1.09	ND	ND
25-SB05	-	1.37	ND	ND
25-SB06	-	2.44	ND	<u>0.13</u>
25-SB07	-	ND	ND	0.47
25-SB08	北海道	0.95	1.20	8.26
25-SB09	-	0.36	ND	0.33
25-SB10	北海道	<u>0.16</u>	ND	0.45
25-SB11	-	0.33	ND	<u>0.17</u>
25-SB12	-	0.20	ND	ND

・ゴマ

サンプルID	原産国	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-GM01	グアテマラ,パラグアイ,ボリビア,ニカラグア,スーダン,ブラジル	0.13	ND	ND
25-GM02	グアテマラ,エチオピア	0.09	ND	ND
25-GM03	グアテマラ	0.30	ND	ND
25-GM04	パラグアイ,ボリビア,スーダン,中国,エチオピア,グアテマラ,ニカラグア,ナイジェリア,モザンビーク	0.26	ND	ND
25-GM05	ボリビア,パラグアイ,スーダン	0.12	ND	ND
25-GM06	中国、パラグアイ	0.44	ND	ND
25-GM07	国産	0.09	ND	ND
25-GM08	パラグアイ,グアテマラ,スーダン,ボリビア,エチオピア	0.73	ND	ND
25-GM09	グアテマラ	0.59	ND	ND
25-GM10	主にナイジェリア,パラグアイ	0.18	ND	ND
25-GM11	パラグアイ,ミャンマー	0.97	ND	ND
25-GM12	ミャンマー	1.65	ND	ND
25-GM13	ミャンマー	3.13	ND	ND
25-GM14	ミャンマー,パラグアイ	0.50	ND	ND
25-GM15	ミャンマー,中国,パラグアイ	11.00	ND	ND
25-GM16	ミャンマー	11.84	ND	ND
25-GM17	ミャンマー	2.87	ND	ND
25-GM18	トルコ	<u>0.03</u>	ND	ND
25-GM19	トルコ	<u>0.02</u>	ND	ND
25-GM20	トルコ	0.04	ND	ND

・小豆

サンプルID	原産国	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-ZKf01	日本 他	3.19	ND	ND
25-ZKf02	日本 他	2.97	ND	ND
25-ZKf03	日本 他	4.90	0.26	ND
25-ZKf04	日本 他	1.48	0.54	2.14
25-ZKf05	日本 他	1.72	ND	ND
25-ZKf06	不明	2.92	ND	ND
25-ZKf07	不明	0.85	ND	ND
25-ZKf08	日本	2.02	2.29	2.97
25-ZKf09	日本 他	59.50	ND	0.96
25-ZKf10	日本 他	7.57	ND	ND
25-ZKf11	日本 他	2.21	ND	0.92
25-ZKf12	不明	14.55	0.91	1.45
25-ZKf13	岩手県	8.84	4.40	2.92
25-ZKf14	日本 他	1.59	ND	ND
25-ZKf15	日本 他	2.65	ND	ND
25-ZKf16	日本 他	3.00	ND	ND
25-ZKf17	不明	1.40	0.90	1.38
25-ZKf18	日本	ND	ND	ND
25-ZKf19	日本	0.98	1.12	1.77
25-ZKf20	日本	0.70	ND	ND

・雑穀米

サンプルID	原産国	ZEN (ng/g)	T-2 (ng/g)	HT-2 (ng/g)
25-AD01	北海道	70.31	1.82	7.15
25-AD02	北海道	ND	0.78	3.57
25-AD03	北海道	66.16	0.57	1.41
25-AD04	北海道	83.59	1.77	3.98
25-AD05	北海道	13.55	3.66	6.11
25-AD06	北海道	3.41	0.35	1.04
25-AD07	京都府	2.14	ND	ND
25-AD08	北海道	38.29	ND	1.2
25-AD09	山形県	37.45	0.32	0.85
25-AD10	熊本県	2.63	0.29	ND
25-AD11	中国	ND	ND	ND
25-AD12	カナダ	4.35	ND	1.21
25-AD13	北海道	103.30	0.43	1.17
25-AD14	北海道	60.51	4.24	7.32
25-AD15	中国	1.42	0.35	0.45
25-AD16	北海道	55.12	0.77	1.48
25-AD17	カナダ	1.04	ND	0.81
25-AD18	北海道	40.78	0.28	0.77
25-AD19	北海道	84.09	0.96	102.59
25-AD20	カナダ	0.82	0.25	0.53

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ngampongsa S, Hanafusa M, Ando K, Ito K, Kuwahara M, Yamamoto Y, Yamashita M, Tsuru Y, Tsubone H.	Toxic effects of T-2 toxin and deoxynivalenol on the mitochondrial electron transport system of cardiomyocytes in rats.	J Toxicol Sci.	38(3)	495-502	2013
Yoshinari T, Sakuda S, Furihata K, Furusawa H, Ohnishi T, Sugita-Konishi Y, Ishizaki N, Terajima J.	Structural determination of a nivalenol glucoside and development of an analytical method for the simultaneous determination of nivalenol and deoxynivalenol, and their glucosides, in wheat.	J Agric Food Chem.	62(5)	1174-1180	2014
Kadota T, Furusawa H, Hirano S, Tajima O, Kamata Y, Sugita-Konishi Y.	Comparative study of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol on intestinal transport and IL-8 secretion in the human cell line Caco-2.	Toxicol In Vitro	27(6)	1888-1895	2013
Watanabe M, Yonezawa T, Sugita-Konishi Y, Kamata Y.	Utility of the phylogenetic relationship among trichothecene-producing Fusarium species for predicting their mycotoxin-producing potential.	Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.	30(8)	1370-1381	2013
Yoshinari T, Tanaka T, Ishikuro E, Horie M, Nagayama T, Nishimura T.	Inter-laboratory study of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of	Shokuhin Eiseigaku Zasshi.	54(1)	75-82	2013

<p>Sakamoto N, T suyuki R, Yoshi nari T, Usuma J, Furukawa T, Nagasawa H, Sakuda S.</p>	<p>Correlation of ATP c nitrate lyase and acet yl CoA levels with t trichothecene producti on in <i>Fusarium gra minearum</i>.</p>	<p>Toxins (Base</p>	<p>5(11)</p>	<p>2258-2269</p>	<p>2013</p>