

表紙

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)

国際的に問題となる食品中のかび毒の安全性確保に関する研究

平成 28 年度 総括・分担研究者報告書

研究代表者 小西 良子
麻布大学 生命・環境科学部 食品生命科学科
麻布大学大学院 環境保健学研究科

平成 29 (2017) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

国際的に問題となる食品中のかび毒の安全性確保に関する研究

小西 良子（麻布大学 生命・環境科学部）.....

II. 分担研究報告

1. ステリグマトシスチンと 4,15-ジアセトキシシルペノールの汚染実態調査

吉成 知也（国立医薬品食品衛生研究所）.....

2. かび毒の発達神経毒性評価

渋谷 淳（東京農工大学大学院 農学研究院 動物生命科学部門）

.....

3. 培養によらないカビ毒産生菌種検出法の開発

小西 良子（麻布大学 生命・環境科学部）.....

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

総括研究報告書

国際的に問題となる食品中のかび毒の安全性確保に関する研究

研究代表者 小西 良子 (麻布大学)

研究要旨

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

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

A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

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

B. 研究方法

1)STC と DAS の試験法の妥当性確認と予備実態調査

(1) STC の予備汚染実態調査

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

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

(2) 4,15-DAS の汚染実態調査

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

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

(3) 試験法の妥当性評価のためのコラボラティブスタディ

STC の分析法

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

考資料）。

4,15-DAS の分析法

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

2) シトロオピリジンの発達神経毒性評価

妊娠 ICR マウス（妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー）を、一群 10 匹ずつとして計 4 群に分け、シトロオピリジンを 0、1、3、10 ppm の用量で妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで混餌投与した。シトロオピリジンの乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 10 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、シトロオピリジンの濃度を LC-MS/MS 法により測定した（日本食品分析センター）。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、体重、摂餌量および摂水量を週に 2 回の頻度で測定した。混餌飼料の調製は 2 週間を超えない頻度で行った。各群雄 15～22 例、雌 10 例の児動物は、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、固定し切片の作成に使用した。切片は、免疫染色を行った。アポトーシス活性の指標として TUNEL 染色を行った。

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

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

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

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

3) 培養によらないカビ毒産生菌種検出法の開発

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

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

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

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

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

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

C. 研究結果

1) STC および DAS の予備汚染実態と分析法妥当性試験

(1) STC および DAS の予備汚染調査

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

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

(2) STC および DAS 分析法の妥当性試験

STC の分析法および 4,15-DAS の分析法

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

2) シトロオビリジンの発達毒性評価結果

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

病理学的変化および免疫組織学的変化では、母動物の剖検時における組織学的な所見として、肝臓における肝細胞壊死が全投与群で認められ、統計学的に有意な発生頻度の増加が 10 ppm で認められた。離乳時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、SGZ にお

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

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

3) 培養によらないカビ毒産生菌種検出法

(1) STC 産生菌の検出法

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

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

(2) 米付着カビ孢子からの直接 DNA 抽出法の開発

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

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

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

る方法の開発の重要な知見が得られた。

E. 結論

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

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

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

の迅速検出法を確立できると考えられる。

F. 参考文献

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

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

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

G. 研究業績

【論文発表】

なし

【学会発表】

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

表1. かび毒の国際的な動向

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

表2. 諸外国でのかび毒の規制

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

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

表3 ステリグマトシスチンとデアセトキシスペリノールのリスクプロファイル

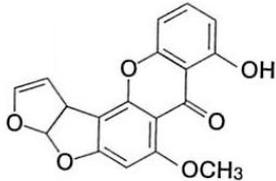
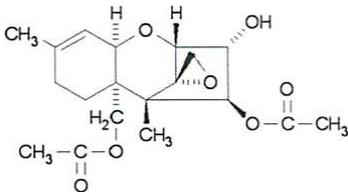
	ステリグマトシスチン (STC)	デアセトキシスペリノール (DAS)
構造	 <p>molecular weight 324.28 Da</p>	 <p>molecular weight 366.4 Da</p>
化学式	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	C ₁₉ H ₂₆ O ₇
CAS	10048-13-2	2270-40-8
産生菌	24 種以上の <i>Aspergillus</i> , <i>Emercella</i> , <i>Bipolaris</i> , <i>Botryotrichum</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Moelleriella</i> ,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

表4. カビ毒試験法評価委員会

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

委員会名簿

• 2016～2018年度

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

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

評価までの流れ

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

分析法の紹介

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

・プロトコール

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

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

・プロトコール

・コラボラティブスタディの結果

とうもろこし中のフモニシン類の分析法(2012年5月掲載)

・プロトコール

・コラボラティブスタディの結果

・英語論文 Yoshinari et al. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2013;54(4):266-276.

小麦中のアセチル化デオキシニバレノールの分析法(2012年5月掲載)

・プロトコール

・コラボラティブスタディの結果

・英語論文 Yoshinari et al. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2013;54(1):75-82.

ピーナッツ中の総アフラトキシシンの分析法

・プロトコールと結果

生乳中のアフラトキシシンM1の分析法

・プロトコール

・コラボラティブスタディの結果

小麦中のデオキシニバレノール及びニバレノールの同時分析法

・プロトコール

・コラボラティブスタディの結果

・英語論文 Aoyama et al. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2012;53(3):152-6.

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

ステリグマトシスチンと 4,15-ジアセトキシシルペノールの汚染実態調査

研究分担者 吉成 知也 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

ステリグマトシスチン (STC) 及び 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) は、2016 年の FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) においてリスク評価がなされ、国際的に注目が集まっている。しかしながら、我が国におけるそれらカビ毒の汚染実態についてはこれまでほとんど報告がない。そこで、本研究事業において STC 及び 4,15-DAS を対象に日本に流通する食品における汚染実態を調査し、得られたデータから曝露評価を実施し、日本人の健康に対するそれらカビ毒の影響を評価することとした。2016 年度は両カビ毒の分析法の妥当性の確認と検出される食品のスクリーニングを行った。

国内の指定検査機関及び地方衛生研究所計 8 機関と協力して分析法の妥当性確認試験を行ったところ、両カビ毒において回収率の平均値は 90~100%に収まり、良好な結果が得られた。このことより、本年度考案した分析法は今後実態調査に用いることが可能と結論付けられた。汚染実態調査の結果では、STC は小麦粉、エン麦、ライ麦、ハト麦、雑穀米、コーングリッツ、アーモンド及びコーヒーにおいて陽性検体 (定量限界値 0.05 µg/kg) が認められた。陽性率が最も高かったのはライ麦の 50%、次いでコーヒーの 40%であった。最高濃度はライ麦における 7.1 µg/kg であった。4,15-DAS についてはハト麦のみから 63%の陽性率で検出され、最高濃度は 137 µg/kg であった。以上の結果から、日本に流通する食品に STC と DAS が混入している実態が明らかになり、実態調査を継続してリスク評価を行うための情報を取得する必要性が示唆された。

研究協力者

森田 剛史 (一財) 日本穀物検定協会

脇 ますみ 神奈川県衛生研究所

竹内 浩 三重県保健環境研究所

谷口 賢 名古屋市衛生研究所

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

本田 俊一 (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

藤吉 智治 (一財) 食品分析開発センター

SUNATEC

A. 研究目的

世界的に汚染頻度が高く、健康被害が予測されるカビ毒は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) で毒性評価が行われ、コーデックス委員会で規格策定が行われている。我が国はコーデックス委員会の加盟国であることから、コーデックス規格を食品の規格基準に採用することが厚生労働省の方針として決められている。

厚生労働省は、リンゴジュース中のパツリン、小麦玄麦中のデオキシニバレノール、全食品中の総アフラトキシン及び乳中のアフラトキシン M₁ に対して規制を行っている。また、コーデックス規格が定められているオクラトキシン A やフモニシンに関しては、本研究事業で実態調査が行われており、オクラトキシン A については食品安全委員会において我が国におけるリスク評価が実施され、フモニシンについては行われているところである。また、JECFA において毒性評価が行われた T-2 トキシン、HT-2 トキシン及びゼアラレノンの 3 種のフザリウムトキシンについても汚染実態調査を行った。

今年度より本事業が研究対象とするステリグマトシスチン (STC) と 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) については、日本における汚染実態はほとんどわかっていない。一方で、STC については欧州食品安全機関 (EFSA) により 2013 年にリスク評価、2015 年に汚染実態調査の結果が報告され、また、2016 年に JECFA においてリスク評価が実施された。4,15-DAS も同様に 2016 年の JECFA で評価され、今後 EFSA においてもリスク評価が実施される予定である。このような背景からこの 2 種のカビ毒に対する関心が国際的に高くなってきている。

STC と 4,15-DAS の確立された分析法は無い。初年度においてはまず分析法を開発する対象食品を決定するためにヨーロッパで実施された実

態調査の結果を参照に STC 又は 4,15-DAS が検出される食品のスクリーニングを行う。

B. 研究方法

(1) STC の汚染実態調査 (フローチャート 1)

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル : 水 (85 : 15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。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。コーヒーについては、抽出液を多機能カラム MultiSep 226 AflaZon+ (Romer Labs 社製) に通し、流出液 5.5 mL を回収した。

精製はイムノアフィニティーカラム (IAC、堀場製作所社製 AFLAKING STC) を用いた。抽出液 5.0 mL をピペッターで 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 20 mL を IAC に添加し、PBS 10 mL と蒸留水 10 mL で洗浄後、アセトニトリル 3 mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル 0.5 mL で溶解後、さらに蒸留水 0.5 mL を加えてから混合したものを試験溶液とした。

< LC-MS/MS の測定条件 >

HPLC

カラム : InertSustain C18

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度 : 40

移動相 : A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件 : 0 分 A : B = 60 : 40

13 分 A : B = 10 : 90

流速 : 0.2 mL/分

注入量 : 10 μL

MS

イオン化 : ESI positive

モニタリングイオン：325[M+H]⁺>281

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

(2) 4,15-DAS の汚染実態調査(フローチャート2)

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水(85：15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。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。

精製は多機能カラム(昭和電工社製 Autoprep MF-T 1500)を用いた。抽出液約 10 mL をカラムに入れ、最初の流出液 3 mL は捨て、次いで流出する約 2.4 mL を試験管に採った。その溶出液から 2.0 mL を別の試験管に正確にとり、窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル：水(1：9) 0.5 mL で溶解したものを試験溶液とした。

<LC-MS/MS の測定条件>

HPLC

カラム：InertSustain C18

2.1×150 mm, 3 µm

カラム温度：40

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件：0分 A：B = 80：20

8分 A：B = 10：90

12分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：10 µL

MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：384[M+H]⁺>307

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

(3) コラボラティブスタディ

STC の分析法

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

- ・STC 不検出の小麦玄麦破砕物 約 200 g
- ・STC 標準品アセトニトリル溶液(検量線作成用 10 mg/L) 約 2 mL
- ・STC 添加回収試験溶液 0、62.5、625 µg/L の濃度のアセトニトリル溶液 300 µL を入れた小瓶を 2 つずつ。濃度は未記載で番号のみ記した。
- ・イムノアフィニティーカラム 8 本

4,15-DAS の分析法

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

- ・4,15-DAS フリー小麦玄麦粉砕物 約 200 g
- ・4,15-DAS 標準品アセトニトリル溶液(検量線用 10 mg/L) 約 2 mL
- ・4,15-DAS 添加用溶液 0、625、6250 µg/L の濃度のアセトニトリル溶液 300 µL を入れた小瓶を 2 つずつ。濃度は未記載で番号のみ記した。
- ・多機能カラム 8 本

C. 研究結果

(1) STC の汚染実態(表 1、図 1)

穀類及びその加工品 8 品目、豆類及びその加工品 3 品目と木の実 2 品目の合計 233 検体について STC 汚染を調べた。最も陽性率が高かったのはライ麦の 50%であり、続いてコーヒーの 40%、小麦粉(国産)の 39%であった。5 µg/kg 以上の濃度の STC が検出されたのはライ麦とハト麦でそれぞれ 1 件ずつ、1.5~5 µg/kg の濃

度範囲の STC が検出されたのはライ麦と小麦粉（国産）でそれぞれ 1 件ずつであった。平均濃度が最も高かったのはライ麦とハト麦の 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、続いてコーヒーの 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はライ麦の 7.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。小麦粉（輸入）、エン麦、雑穀米、米及びアーモンドにおいて陽性検体が認められたが、濃度は全て 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下であった。ビール、小豆、黒豆及びクルミでは陽性検体は認められなかった。

（ 2 ） 4,15-DAS（表 2）

穀類 4 品目と小豆の合計 102 検体について 4,15-DAS の汚染を調べた。小麦、ライ麦、エン麦及び小豆に陽性検体はなく、ハト麦でのみ陽性検体が認められ、陽性率は 63% であった。ハト麦における平均濃度は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大濃度は 137 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

（ 3 ） コラボラティブスタディ

STC の分析法

各機関から得られたデータをまとめ、統計学的パラメーターを算出した結果を検討した。ブランクの検体の定量値はいずれの機関においても 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加群の回収率は 80 ~ 110% で平均値が 100%、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加群の回収率は 70 ~ 112% で平均値が 92% であった。室間相対標準偏差（ RSD_R ）は 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加群でそれぞれ 10% 及び 12% で、HorRat は 0.4 及び 0.6 であった。

4,15-DAS の分析法

各機関から得られたデータをまとめ、統計学的パラメーターを算出した結果を検討した。ブランクの検体の定量値はいずれの機関においても 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加群の回収率は 77 ~ 116% で平均値が 97%、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加群の回収率は 75 ~ 116% で平均値が 94% であった。室間相対標準偏差（ RSD_R ）は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及

び 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加群でそれぞれ 12% 及び 12% で、HorRat は 0.6 及び 0.6 であった。

D. 考察

（ 1 ） STC の汚染実態

日本における STC の汚染実態については情報がほとんど得られていなかったため、初年度は幅広い食品群を対象に汚染調査を行った。その結果、麦類、コーングリッツ、米類などの穀類やコーヒー、アーモンドにおいて STC 陽性検体が認められた。小麦粉については国産と輸入に分けてデータを示したが、陽性率は国産で 39%、輸入で 5% と差があった。また、国産の検体の中でも特に北海道産のものにおいて陽性率、汚染濃度共に高い傾向であった。EFSA から 2015 年に報告されたヨーロッパでの調査の結果では、小麦粉 85 検体における STC の検出率は 4% で、最高濃度は 0.66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。国産の小麦粉における STC の汚染頻度と最高濃度はともにヨーロッパの結果よりも高く、小麦の STC 汚染には地域差が生じている可能性が考えられた。ライ麦については北海道産、アメリカ産、カナダ産、ドイツ産が主であるが、小麦粉と同様に北海道産で陽性率が高かった。米において陽性率は 30% であったが、最高濃度は 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、小麦やライ麦と比較すると汚染レベルは低かった。ヨーロッパでの実態調査では米 28 検体中 27 検体から STC が検出され、そのうち 10 検体が 1.5 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲で汚染しており、最高濃度は 5.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、我々の結果よりも高い汚染レベルであった。穀類以外ではコーヒーにおいて STC が 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 検出された検体が認められた。コーヒーでは STC 以外にもアフラトキシン類やオクラトキシン A が検出されることが知られており、複合汚染が生じている可能性がある。

（ 2 ） 4,15-DAS の汚染実態

STCと同様に4,15-DASの日本における汚染実態の情報もほとんど得られていないため、4,15-DASの生産菌であるフザリウム属が感染しやすい穀類と4,15-DASの類縁体であるT-2トキシンが高頻度で検出された小豆を対象に調査を行った。その結果、ハト麦においてのみ陽性検体が認められた。ハト麦においては国産と東南アジア産の両方に4,15-DAS陽性検体が認められたが、汚染濃度は東南アジア産の検体の方が高い傾向にあった。昨年度までの調査の結果でT-2トキシンやHT-2トキシンが検出された小麦や小豆では4,15-DASは検出されなかったことから、4,15-DASの汚染が生じる条件はT-2トキシンやHT-2トキシンと異なると考えられる。

(3) コラボラティブスタディ

STCについては、汚染実態調査の結果と摂取量を勘案し、小麦玄麦を対象に分析法の妥当性を検証することにした。4,15-DASについては、ハト麦のみで陽性検体が認められたが、ハト麦の摂取量はそれほど多くないことを勘案し、まずはSTCと同じく小麦玄麦で分析法を検討することとした。

Codexが定める分析法の性能のガイドラインによると、添加濃度が1、10及び100 µg/kgの試験における回収率はそれぞれ40～120%、60～115%及び80～110%の範囲内に収まること、RSD_Rはいずれの添加濃度においても44%以下であることとなっている。今回実施したSTC及び4,15-DASのコラボラティブスタディではこれらのクライテリアを満たした。また、Commission Regulation (EC) No 836/2011ではHorRatが2未満であることとされており、このクライテリアも今回の結果は満たした。以上の結果より、今年度検証したSTCと4,15-DASの分析法の妥当性は確認されたと考えられた。

E. 結論

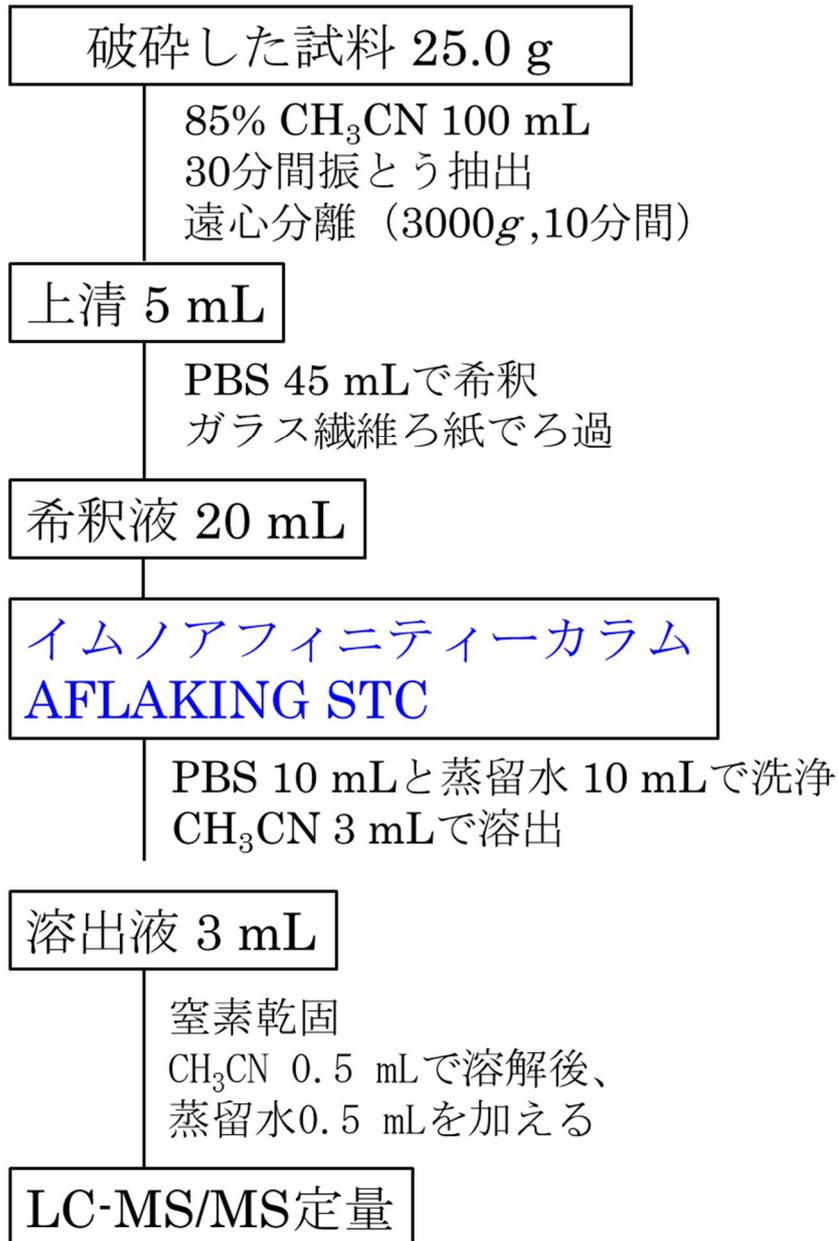
STCと4,15-DASについて日本に流通する食品を対象に汚染実態調査を行った。STCは穀類を中心に幅広い食品で汚染が生じていることが確認された。4,15-DASはハト麦でのみ陽性検体が認められ、T-2トキシンと比べると汚染の範囲が限定的であることがわかった。また、コラボラティブスタディを実施し、STCと4,15-DASの分析法に妥当性があることを確認した。来年度は妥当性の確認された分析法を用い、検体数を増やした調査を行う。

F. 研究業績

【学会発表】

1) 吉成知也、竹田名菜水、寺嶋淳、小林直樹、小西良子：発がん性を有するカビ毒ステリグマトシスチンの我が国に流通する食品における汚染実態、第112回日本食品衛生学会学術講演会(2016.10)

フローチャート1 ステリグマトシスチンの分析法



フローチャート 2 4,15-ジアセトキシシルペノールの分析法



表1 ステリグマトシスチンの汚染実態

製品	検体数	陽性数	各濃度 (µg/kg) に含まれる検体数				平均濃度 (µg/kg)	最大濃度 (µg/kg)
			LOQ-0.5	0.5-1.5	1.5-5	>5		
穀物								
小麦粉 (国産)	31	12 (39 %)	11		1		0.1	2.5
小麦粉 (輸入)	19	1 (5 %)	1				0.008	0.1
オーツ麦	10	1 (10 %)	1				0.01	0.1
ライ麦	30	15 (50 %)	9	4	1	1	0.3	7.1
ハト麦	23	4 (17 %)	1	3		1	0.3	5.3
コーングリッツ	12	2 (17 %)		2			0.1	1.0
雑穀米	10	2 (20 %)	2				0.06	0.3
米	10	3 (30 %)	3				0.03	0.1
ビール	13	0 (0 %)						
豆類								
小豆	14	0 (0 %)					-	-
黒豆など	11	0 (0 %)					-	-
コーヒー	30	12 (40 %)	8	4			0.2	1.1
木の实								
クルミ	10	0 (0 %)	0				-	-
アーモンド	10	2 (20 %)	2				0.03	0.2

LOQ : 0.05 µg/kg

図1 ステリグマトシスチンの汚染実態（陽性率）

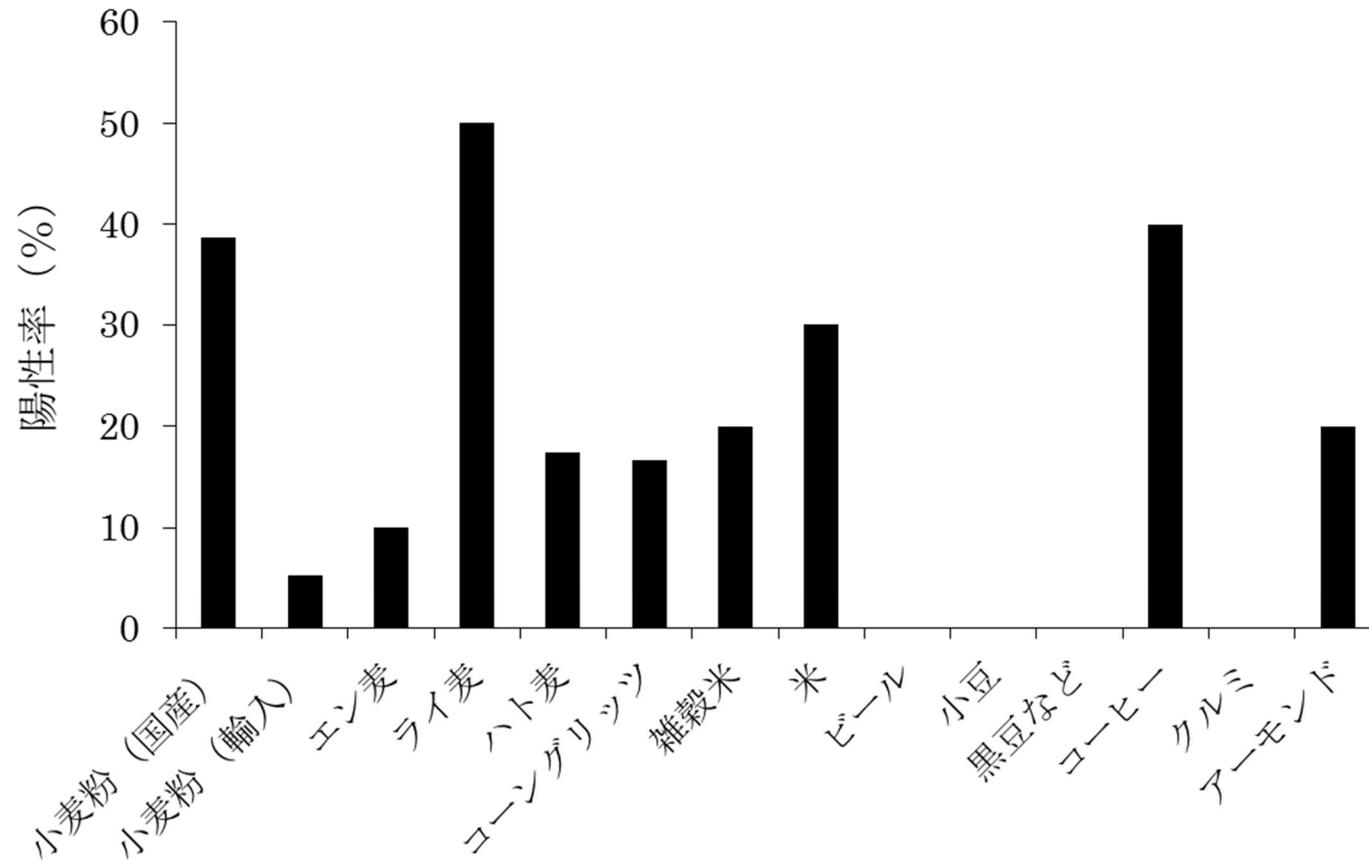


表2 4,15-ジアセトキシシルペノールの汚染実態

食品名	検体数	陽性数	各濃度範囲 (µg/kg) に含まれる検体数				平均濃度 (µg/kg)	最大濃度 (µg/kg)
			LOQ-1.5	1.5-5	5-50	>50		
小麦粉 (国産)	31	0 (0 %)						
小麦粉 (輸入)	18	0 (0 %)						
エン麦	10	0 (0 %)						
ライ麦	13	0 (0 %)						
ハト麦	16	10 (63 %)	3	1	4	2	20	137
小豆	14	0 (0 %)						

LOQ : 0.5 µg/kg

参考資料

「穀物中のシアセトキシシルペノール試験法」

「食品中のステリグマトシスチン試験法」

個票

「穀類中のジアセトキシシルペノール試験法」

実態調査班用（平成28年9月改定）

操作手順

1. 抽出

- ① DASブランク小麦25gを正確に抽出用容器に量り採る。
- ② DAS01～06の添加溶液を200 μ Lとり、それぞれの番号に対応する試料に添加して、暗所に1時間放置する。
- ③ 抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）を100mL加え、30分間振とう抽出する。
- ④ 遠心分離（3000 g、10分間）し、上清を抽出溶液とする。

2. 多機能カラムによる精製

- ① 多機能ミニカラムをカラム架台にセットする。「1.」の操作で得られた抽出液約10mLを入れ、最初の流出液3mLは捨て、次いで流出する2.4mLを共栓付き試験管に採り、溶出液とする。
- ② 溶出液2.0mLを別の共栓付き試験管に正確にとり、窒素気流を用いて乾固する。残さにアセトニトリル：水（1：9）0.5mLを加え、試験管ミキサー等で完全に溶解する。孔径0.2 μ mメンブランフィルター（フィルターを用いる場合は、吸着に注意してください）でろ過するか、あるいは10,000rpm以上で5分間遠心し、その上清をLC-MS/MS用試験溶液とする。HPLC用のバイアルは、ポリプロピレン製のものを用いる。なお、サンプルNo.3と4については、LC-MS/MS用試験溶液100 μ Lに10%アセトニトリル試験溶液900 μ Lを加えて良く混合した10倍希釈の溶液も調製し、同時に測定を行う。

3. 高速液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS/MS）による分析

LC-MS/MSを用いて試験溶液について測定を行う。

測定条件

HPLC

カラム：InertSustain C18 2.1 \times 150mm, 3 μ m（配布済み）

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A溶媒 2mM 酢酸アンモニウム

B溶媒 メタノール

分離条件：0分 A：B = 80：20

8分 A：B = 10：90 12分まで維持

流速：0.2mL/分

注入量：10 μ L

MS

イオン化：ESI

モニターイオン：各機関で以下の定量限界目標値を満たすイオンを選択する

定量限界目標値：1 μ g/L（標準溶液の濃度）

4. 検量線について

配布済みのジアセトキシシルペノール（DAS）標準液（10mg/L）100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、DAS標準液Ⅱ（1mg/L）を作成する。さらにDAS標準液Ⅱ100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、DAS標準液Ⅲ（100 μ g/L）を作成する。さらにDAS標準液Ⅲ100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、DAS標準液Ⅳ（10 μ g/L）を作成する。

No.	1	2	3	4	5	6	7
DAS終濃度(μ g/L)	1	2	5	10	20	50	100
標準液Ⅱ(μ L)						50	100
標準液Ⅲ(μ L)			50	100	200		
標準液Ⅳ(μ L)	100	200					

窒素気流で乾固した後、残さにアセトニトリル：水（1：9）1mL（試験溶液と量が異なるので気を付けてください）を加え、試験管ミキサー等で完全に溶解する。孔径0.2 μ mメンブランフィルター（フィルターを用いる場合は、吸着に注意してください）でろ過するか、あるいは10,000 rpm 以上、5 分間遠心し、その上清を検量線用標準液とする。検量線の重みづけについては、相関係数が1に近づくよう各機関で調整する。

③定量限界値（LOD）と検出限界値（LOQ）の算出方法について

検量線用溶液を測定した場合のシグナル／ノイズ比（S/N）=3をLOD、S/N=10をLOQとして、結果報告用フォーマットに記載してください。

以上

「食品中のステリグマトシスチン試験法」

実態調査班用（平成28年9月改定）

操作手順

1. 抽出

- ① STEブランク小麦25gを正確に抽出用容器6つにそれぞれ量り採り、1～6まで番号を付ける。
- ② STE01～06の添加溶液を200 μ Lとり、それぞれの番号に対応する試料に添加して、暗所に1時間放置する。
- ③ 抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）を100mL加え、30分間振とう抽出する。
- ④ 遠心分離（3000 g、10分間）し、上清を抽出溶液とする。

2. イムノアフィニティーカラムによる精製

イムノアフィニティーカラムの取り扱い上の注意：カラム内にはPBS が充填されていて、カラム上部には僅かに空気が入っている。そのため、横に倒すと空気がカラム（充填剤）に触れてしまい、その結果良好な回収率が得られなくなるため、保存時から分析終了時まで直立の状態を保っている必要がある。もし、ゲル上の白いフリット表面に気泡が溜まっていたら、タッピングして除去すること。

- ① イムノアフィニティーカラム（配付）は室温になるまで放置する。
- ② きり等でイムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けてから上キャップをはずした後、下キャップをはずし、ストップコックを取り付け、カラム架台あるいはバキュームマニホールドにセットする。カラム内溶液を自然落下で排出後、あらたにPBSでカラム内を満たし、自然落下で排出させる。再度PBSでカラム内を満たし、PBS を半分程排出させた後、ストップコックを閉じる。
- ③ 「1.」の操作で得られた抽出溶液5.0mLをピペッターなどで50mLのメスフラスコへとり、標線までPBS を加え良く混合する。
- ④ ガラスロートにガラス繊維ろ紙をセットし、③の希釈液をろ過する。ろ液を三角フラスコにとり、試料溶液とする。（~~試料換算~~ 0.5g）
- ⑤ カラムにアダプターを取り付けたリザーバーを連結する。
- ⑥ ④で得られた試料溶液20.0mLをピペッターなどでリザーバーに注入する。ストップコックを開き、1～2滴/秒の速さでろ液を排出させる（途中、排出速度が非常に遅くなった場合には、ゲル上の白いフリット表面に泡が付着していることがあるので、リザーバー及びカラムを手で保持し試料ろ液がこぼれないよう注意し、カラムを指等でタッピングし泡を取り除く）。全ての試料溶液を排出させたのち、リザーバーを取り除き、カラ

ムをPBSで満たし、排出させる操作を3回、さらに蒸留水で同じ操作を3回繰り返すことにより洗浄を行う。カラム内の水分はアダプターを取り付けたシリンジ等で強く通気し十分に追い出す。その後共栓付き10mL容試験管をカラムの下に置き、アセトニトリル1mLをカラムに注入し、自然落下で溶出させた後5分間放置する。さらにアセトニトリル1mLをカラムに注入し溶出する。この操作をもう一度繰り返した後、シリンジで空気を押し出すことによりカラム中ゲル内の溶媒をすべて溶出する。

4. 試料溶液の調製

「2.」の⑥で得られたアセトニトリル溶出液を窒素気流を用いて乾固する。残さをアセトニトリル0.5mLで溶解後、さらに蒸留水0.5mLを加えよく混合する。孔径0.2 μ mメンブレンフィルター（フィルターを用いる場合は、吸着に注意してください）でろ過するか、あるいは10,000rpm以上、5分間遠心し、その上清をLC-MS/MS用試験溶液とする。HPLC用のバイアルは、ポリプロピレン製のものを用いる。なお、STE02とSTE05については、LC-MS/MS用試験溶液100 μ Lに50%アセトニトリル試験溶液900 μ Lを加えて良く混合した10倍希釈の溶液も調製し、同時に測定を行う。

5. 高速液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS/MS）による分析

LC-MS/MSを用いて試験溶液について測定を行う。

測定条件

HPLC

カラム：InertSustain C18 2.1 \times 150mm, 3 μ m（配布済み）

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A溶媒 2mM 酢酸アンモニウム

B溶媒 メタノール

分離条件：0分 A : B = 60 : 40

13分 A : B = 10 : 90

（13分以内にSTEが溶出されない場合は、溶出されるまでこの比率を維持する。）

流速：0.2mL/分

注入量：10 μ L

MS

イオン化：ESI

モニターイオン：各機関で以下の定量限界目標値を満たすイオンを選択する

定量限界目標値：0.1 μ g/L（標準溶液の濃度）

6. 検量線について

配布済みのステリグマトシスチン (STE) 標準液 (10mg/L) 100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、STE標準液II (1mg/L) を作成する。さらにSTE標準液II 100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、STE標準液III (100 μ g/L) を作成する。さらにSTE標準液III 100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、STE標準液IV (10 μ g/L) を作成する。さらにSTE標準液IV 100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、STE標準液V (1 μ g/L) を作成する。

以下の表に従い、7種のバイアルにそれぞれの標準液を加える。

No.	1	2	3	4	5	6	7
STE終濃度(μ g/L)	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10
標準液III(μ L)						50	100
標準液IV(μ L)			50	100	200		
標準液V(μ L)	100	200					

窒素気流で乾固した後、残さをアセトニトリル0.5mLで溶解後、さらに蒸留水0.5mLを加えよく混合する。孔径0.2 μ mメンブランフィルター (フィルターを用いる場合は、吸着に注意してください) でろ過するか、あるいは10,000 rpm 以上、5 分間遠心し、その上清を検量線用標準液とする。検量線の重みづけについては、相関係数が1に近づくよう各機関で調整する。場合によっては最高濃度の標準溶液 (No.7) をはずすことも可能。

③定量限界値 (LOD) と検出限界値 (LOQ) の算出方法について

検量線用溶液を測定した場合のシグナル/ノイズ比 (S/N) =3をLOD、S/N=10をLOQとして、結果報告用フォーマットに記載してください。

以上

4,15-ジアセトキシシルペノールの結果

検出限界値 (0.2 µg/kg) 未満の値を ND

検出限界値 (0.2 µg/kg) 以上定量限界値 (0.5 µg/kg) 未満の値を下線で示した

サンプルID	産地	DAS (µg/kg)
28-国産小麦粉-1	北海道	ND
28-国産小麦粉-2	北海道	ND
28-国産小麦粉-3	北海道	ND
28-国産小麦粉-4	北海道	ND
28-国産小麦粉-5	北海道	ND
28-国産小麦粉-6	北海道	ND
28-国産小麦粉-7	北海道	ND
28-国産小麦粉-8	北海道	ND
28-国産小麦粉-9	北海道	ND
28-国産小麦粉-10	北海道	ND
28-国産小麦粉-11	北海道	ND
28-国産小麦粉-12	北海道	ND
28-国産小麦粉-13	北海道	ND
28-国産小麦粉-14	北海道	ND
28-国産小麦粉-15	北海道	ND
28-国産小麦粉-16	北海道	ND
28-国産小麦粉-17	北海道	ND
28-国産小麦粉-18	北海道	ND
28-国産小麦粉-19	北海道	ND
28-国産小麦粉-20	北海道	ND
28-国産小麦粉-21	北海道	ND
28-国産小麦粉-22	岩手県	ND
28-国産小麦粉-23	岩手県	ND
28-国産小麦粉-24	岩手県	ND
28-国産小麦粉-25	栃木県	ND
28-国産小麦粉-26	長野県	ND
28-国産小麦粉-27	長野県	ND
28-国産小麦粉-28	長野県	ND
28-国産小麦粉-29	熊本県	ND
28-国産小麦粉-30	熊本県	ND
28-国産小麦粉-31	九州産	ND

4,15-ジアセトキシシルペノールの結果

サンプルID	産地	DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
28-輸入小麦粉-1	US、CA	ND	US：アメリカ合衆国 CA：カナダ AU：オーストラリア FR：フランス
28-輸入小麦粉-2	CA他	ND	
28-輸入小麦粉-3	CA、US	ND	
28-輸入小麦粉-4	CA、US	ND	
28-輸入小麦粉-5	CA	ND	
28-輸入小麦粉-6	CA	ND	
28-輸入小麦粉-7	CA	ND	
28-輸入小麦粉-8	AU	ND	
28-輸入小麦粉-9	CA	ND	
28-輸入小麦粉-10	US、CA	ND	
28-輸入小麦粉-11	CA、US	ND	
28-輸入小麦粉-12	CA	ND	
28-輸入小麦粉-13	US、CA	ND	
28-輸入小麦粉-14	FR、北米	ND	
28-輸入小麦粉-15	CA	ND	
28-輸入小麦粉-16	US、CA	ND	
28-輸入小麦粉-17	CA	ND	
28-輸入小麦粉-18	US	ND	

サンプルID	原産地	DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-オーツ麦-1	US	ND
28-オーツ麦-2	US	ND
28-オーツ麦-3	AU	ND
28-オーツ麦-4		ND
28-オーツ麦-5	US	ND
28-オーツ麦-6	北海道	ND
28-オーツ麦-7	FR	ND
28-オーツ麦-8	イギリス	ND
28-オーツ麦-9	US, AU, CA, フィンランド	ND
28-オーツ麦-10	AU	ND

4,15-ジアセトキシシルペノールの結果

サンプルID	原産地	DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	サンプルID	原産地	DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-ライ麦-1	アメリカ	ND	28-ハト麦-1	富山県	ND
28-ライ麦-2	北海道	ND	28-ハト麦-2	岩手県	ND
28-ライ麦-3	北海道	ND	28-ハト麦-3	富山県	1.4
28-ライ麦-4	ヨーロッパ、カナダ	ND	28-ハト麦-4	富山県	2.0
28-ライ麦-5	ドイツ	ND	28-ハト麦-5	国内	ND
28-ライ麦-6	カナダ	ND	28-ハト麦-11	栃木県（鹿沼）	ND
28-ライ麦-7	北海道	ND	28-ハト麦-12	富山県	0.7
28-ライ麦-8	ドイツ	ND	28-ハト麦-13	富山県	ND
28-ライ麦-9	北海道	ND	28-ハト麦-14	富山県	ND
28-ライ麦-10		ND	28-ハト麦-15	タイ	16.2
28-ライ麦-11	オーストラリア	ND	28-ハト麦-16	タイ	14.1
28-ライ麦-12		ND	28-ハト麦-17	タイ	24.4
28-ライ麦-13		ND	28-ハト麦-18	ラオス	41.0
			28-ハト麦-19	鳥取県（出雲）	1.0
			28-ハト麦-20		76.4
			28-ハト麦-21		137

サンプルID	原産地	DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-小豆-1	北海道	ND
28-小豆-2	北海道	ND
28-小豆-3	丹波（兵庫、京都）	ND
28-小豆-4	北海道（十勝）	ND
28-小豆-5	北海道（十勝）	ND
28-小豆-6	北海道（十勝）	ND
28-小豆-7	北海道	ND
28-小豆-8	北海道	ND
28-小豆-9	北海道	ND
28-小豆-10	北海道	ND
28-小豆-11	北海道	ND
28-小豆-12	北海道	ND
28-小豆-13	北海道（十勝）	ND
28-小豆-14	北海道	ND

ステリグマトシスチンの結果

検出限界値 (0.02 µg/kg) 未満の値を ND

検出限界値 (0.02 µg/kg) 以上定量限界値 (0.05 µg/kg) 未満の値を下線で示した

サンプルID	産地	STC (µg/kg)
28-国産小麦粉-1	北海道	<u>0.04</u>
28-国産小麦粉-2	北海道	ND
28-国産小麦粉-3	北海道	ND
28-国産小麦粉-4	北海道	ND
28-国産小麦粉-5	北海道	0.08
28-国産小麦粉-6	北海道	ND
28-国産小麦粉-7	北海道	0.24
28-国産小麦粉-8	北海道	ND
28-国産小麦粉-9	北海道	2.36
28-国産小麦粉-10	北海道	0.18
28-国産小麦粉-11	北海道	ND
28-国産小麦粉-12	北海道	ND
28-国産小麦粉-13	北海道	0.12
28-国産小麦粉-14	北海道	0.07
28-国産小麦粉-15	北海道	0.23
28-国産小麦粉-16	北海道	<u>0.03</u>
28-国産小麦粉-17	北海道	0.43
28-国産小麦粉-18	北海道	0.18
28-国産小麦粉-19	北海道	0.08
28-国産小麦粉-20	北海道	0.23
28-国産小麦粉-21	北海道	<u>0.03</u>
28-国産小麦粉-22	岩手県	ND
28-国産小麦粉-23	岩手県	ND
28-国産小麦粉-24	岩手県	0.06
28-国産小麦粉-25	栃木県	ND
28-国産小麦粉-26	長野県	ND
28-国産小麦粉-27	長野県	ND
28-国産小麦粉-28	長野県	ND
28-国産小麦粉-29	熊本県	ND
28-国産小麦粉-30	熊本県	ND
28-国産小麦粉-31	九州産	ND

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
28-輸入小麦粉-1	US、CA	ND	US：アメリカ合衆国 CA：カナダ AU：オーストラリア FR：フランス
28-輸入小麦粉-2	CA他	ND	
28-輸入小麦粉-3	CA、US	ND	
28-輸入小麦粉-4	CA、US	ND	
28-輸入小麦粉-5	CA	ND	
28-輸入小麦粉-6	CA	ND	
28-輸入小麦粉-7	CA	ND	
28-輸入小麦粉-8	AU	ND	
28-輸入小麦粉-9	CA	ND	
28-輸入小麦粉-10	US、CA	ND	
28-輸入小麦粉-11	CA、US	ND	
28-輸入小麦粉-12	CA	ND	
28-輸入小麦粉-13	US、CA	ND	
28-輸入小麦粉-14	FR、北米	ND	
28-輸入小麦粉-15	CA	0.09	
28-輸入小麦粉-16	US、CA	<u>0.04</u>	
28-輸入小麦粉-17	US	<u>0.02</u>	
28-輸入小麦粉-18	CA	ND	
28-輸入小麦粉-19	US	ND	

サンプルID	産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-オーツ麦-1	US	ND
28-オーツ麦-2	US	0.14
28-オーツ麦-3	AU	ND
28-オーツ麦-4		ND
28-オーツ麦-5	US	ND
28-オーツ麦-6	北海道	ND
28-オーツ麦-7	FR	ND
28-オーツ麦-8	イギリス	ND
28-オーツ麦-9	US, AU, CA, フィンランド	ND
28-オーツ麦-10	AU	ND

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	原産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	サンプルID	原産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-ライ麦-1	アメリカ	ND	28-ハト麦-1	富山県	ND
28-ライ麦-2	北海道	0.57	28-ハト麦-2	岩手県	ND
28-ライ麦-3	北海道	0.56	28-ハト麦-3	富山県	ND
28-ライ麦-4	ヨーロッパ、カナダ	ND	28-ハト麦-4	富山県	ND
28-ライ麦-5	ドイツ	ND	28-ハト麦-5	国内	ND
28-ライ麦-6	カナダ	ND	28-ハト麦-6	鳥取県	ND
28-ライ麦-7	北海道	0.52	28-ハト麦-7	国内	ND
28-ライ麦-8	ドイツ	0.50	28-ハト麦-8	国内	ND
28-ライ麦-9	北海道	0.25	28-ハト麦-9	福岡県	ND
28-ライ麦-10	不明	ND	28-ハト麦-10	不明	ND
28-ライ麦-11	オーストラリア	1.8	28-ハト麦-11	栃木県(鹿沼)	ND
28-ライ麦-12	不明	ND	28-ハト麦-12	富山県	ND
28-ライ麦-13	不明	ND	28-ハト麦-13	富山県	ND
28-ライ麦-14	ドイツ	7.1	28-ハト麦-14	富山県	<u>0.03</u>
28-ライ麦-15		ND	28-ハト麦-15	タイ	0.53
28-ライ麦-16		ND	28-ハト麦-16	タイ	0.61
28-ライ麦-17	北海道	0.12	28-ハト麦-17	タイ	0.14
28-ライ麦-18	北海道	0.23	28-ハト麦-18	ラオス	1.14
28-ライ麦-19	北海道	ND	28-ハト麦-19	鳥取県(出雲)	ND
28-ライ麦-20	北海道	0.25	28-ハト麦-20	不明	0.98
28-ライ麦-21	北海道	0.13	28-ハト麦-21	不明	ND
28-ライ麦-22	アメリカ	0.22	28-ハト麦-22	岩手県	ND
28-ライ麦-23	北海道	0.46	28-ハト麦-23	国内	ND
28-ライ麦-24	北海道	0.30			
28-ライ麦-25	北海道	0.49			
28-ライ麦-26		ND			
28-ライ麦-27	ヨーロッパ、カナダ	ND			
28-ライ麦-28	ドイツ	ND			
28-ライ麦-29	カナダ	ND			
28-ライ麦-30	北海道	ND			

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	サンプルID	産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-コーングリッツ-1	アメリカ	ND	28-雑穀米-1	国内	ND
28-コーングリッツ-2	アメリカ	ND	28-雑穀米-2	国内	ND
28-コーングリッツ-3	アメリカ	ND	28-雑穀米-3	国産	ND
28-コーングリッツ-4	アメリカ	1.47	28-雑穀米-4	-	0.31
28-コーングリッツ-5	アメリカ	ND	28-雑穀米-5	国産	ND
28-コーングリッツ-6	アメリカ	ND	28-雑穀米-6	国産	ND
28-コーングリッツ-7	アメリカ	ND	28-雑穀米-7	-	ND
28-コーングリッツ-8	アメリカ	ND	28-雑穀米-8	-	ND
28-コーングリッツ-9	アメリカ	0.79	28-雑穀米-9		0.28
28-コーングリッツ-10	-	ND	28-雑穀米-10	北海道	ND
28-コーングリッツ-11	中国	ND			
28-コーングリッツ-12	中国	ND			

サンプルID	原産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	サンプルID	産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-米-1	秋田県	ND	28-ビール-1		ND
28-米-2	北海道	ND	28-ビール-2		ND
28-米-3	秋田県	0.11	28-ビール-3		ND
28-米-4	国内	ND	28-ビール-4	沖縄	ND
28-米-5	福岡県	0.06	28-ビール-5		ND
28-米-6	新潟県	0.11	28-ビール-6		ND
28-米-7	山形県	ND	28-ビール-7		ND
28-米-8	タイ	ND	28-ビール-8		ND
28-米-9	タイ	ND	28-ビール-9		ND
28-米-10	タイ	ND	28-ビール-10		ND
			28-ビール-11	沖縄	ND
			28-ビール-12		ND
			28-ビール-13		ND

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	原産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	サンプルID	原産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-小豆-1	北海道	ND	28-豆類-1	アメリカ	ND
28-小豆-2	北海道	<u>0.04</u>	28-豆類-2	アメリカ	ND
28-小豆-3	丹波(兵庫、京都)	ND	28-豆類-3	アメリカ	ND
28-小豆-4	北海道(十勝)	ND	28-豆類-4	北海道	ND
28-小豆-5	北海道(十勝)	ND	28-豆類-5	岡山県	ND
28-小豆-6	北海道(十勝)	ND	28-豆類-6	岡山県	ND
28-小豆-7	北海道	ND	28-豆類-7	岩手県	ND
28-小豆-8	北海道	ND	28-豆類-8	北海道函館	ND
28-小豆-9	北海道	ND	28-豆類-9	兵庫県	ND
28-小豆-10	北海道	ND	28-豆類-10	兵庫県	ND
28-小豆-11	北海道	ND	28-豆類-11	北海道	ND
28-小豆-12	北海道	ND			
28-小豆-13	北海道(十勝)	ND			
28-小豆-14	北海道	ND			

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-コーヒー-1	ブラジル、インドネシア、他	0.30
28-コーヒー-2	ジャマイカ、ブラジル、他	ND
28-コーヒー-3	ベトナム、ブラジル	1.12
28-コーヒー-4	ベトナム、アイボリーコースト	0.57
28-コーヒー-5	ブラジル	ND
28-コーヒー-6	パプアニューギニア、ペルー、メキシコ	ND
28-コーヒー-7	メキシコ、ブラジル	0.18
28-コーヒー-8	エクアドル	ND
28-コーヒー-9	パプアニューギニア、ペルー、メキシコ	ND
28-コーヒー-10	コロンビア、ベトナム、他	ND
28-コーヒー-11	メキシコ、インド	0.50
28-コーヒー-12	ブラジル	ND
28-コーヒー-13	ベトナム、ブラジル	1.09
28-コーヒー-14	ブラジル、インドネシア、他	ND
28-コーヒー-15	インドネシア、ブラジル	<u>0.02</u>
28-コーヒー-16	メキシコ、ブラジル	0.60
28-コーヒー-17	ブラジル、エクアドル、他	ND
28-コーヒー-18	ブラジル、コロンビア、他	0.13
28-コーヒー-19	ブラジル、コスタリカ、タンザニア	ND
28-コーヒー-20	コロンビア	0.09
28-コーヒー-21	インドネシア、ブラジル、他	0.43
28-コーヒー-22	ブラジル、コスタリカ、タンザニア	ND
28-コーヒー-23	ブラジル	ND
28-コーヒー-24	ブラジル、コロンビア	ND
28-コーヒー-25	インドネシア	ND
28-コーヒー-26	ブラジル、コロンビア	ND
28-コーヒー-27	カメルーン、ケニア、他	ND
28-コーヒー-28	タンザニア	0.07
28-コーヒー-29	ジャマイカ、コロンビア、他	ND
28-コーヒー-30	コロンビア	0.06

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	原産国	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-クルミ-1	チリ	<u>0.03</u>
28-クルミ-2	アメリカ	ND
28-クルミ-3	アメリカ	ND
28-クルミ-4	アメリカ (カリフォルニア)	ND
28-クルミ-5	アメリカ	<u>0.04</u>
28-クルミ-6	アメリカ (カリフォルニア)	ND
28-クルミ-7	アメリカ	ND
28-クルミ-8	アメリカ	ND
28-クルミ-9	アメリカ	ND
28-クルミ-10	アメリカ	ND

サンプルID	原産国	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
28-アーモンド-1	アメリカ	ND
28-アーモンド-2	アメリカ	ND
28-アーモンド-3	アメリカ (カリフォルニア)	ND
28-アーモンド-4	アメリカ (カリフォルニア)	ND
28-アーモンド-5	イタリア	0.23
28-アーモンド-6	アメリカ (カリフォルニア)	ND
28-アーモンド-7	アメリカ	0.06
28-アーモンド-8	アメリカ	ND
28-アーモンド-9	アメリカ	ND
28-アーモンド-10	オーストラリア	ND

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)

国際的に問題となる食品中のかび毒の安全性確保に関する研究

平成 28 年度分担研究報告書

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学大学院 農学研究院 動物生命科学部門 教授

かび毒の発達神経毒性評価

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 28 年度はペニシリウム属やアスペルギルス属の真菌により産生されるかび毒であり、実験的に神経毒性を誘発することが知られているシトレオビリジン (citroviridin) 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。10 ppm を高用量として選択し、公比 3 で投与群 (0、1、3、10 ppm) を設定し、妊娠 ICR マウスを用いて発達期曝露試験 (各群 10 匹) を行った。妊娠 6 日目から離乳時 (出生後 21 日目) まで母動物に対して混餌投与することにより、児動物に発達期曝露し、出生後 21 日目と 77 日目にそれぞれ解剖を行った。母動物は 10 ppm で分娩後 21 日目に摂餌量の低値と、3 ppm で摂水量の高値が認められた。また、病理組織学的に 10 ppm で肝細胞の壊死が認められた。それ以外にシトレオビリジンによる影響と思われる変化は認められなかった。児動物では、出生後 21 日目および 77 日目で一般状態や臓器重量などにシトレオビリジンによる影響と思われる変化は認められなかった。雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における神経新生の解析の結果、曝露終了時に 10 ppm で脳の顆粒細胞層下帯における細胞増殖の増加と神経新生制御系の発現変動を特徴とする神経新生障害を示唆する変化が認められた。成熟後には曝露終了時に発現変動を示した遺伝子の殆どが逆の発現変動を示し、免疫組織化学的に顆粒細胞系譜と GABA 性介在ニューロンの分布に変動を認めなかったことから、曝露終了時に観察された影響がフィードバック機序により打ち消される結果と判断され、離乳時の障害が恒常性維持機構により修復されることが示唆された。一方で、NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2D をコードする *Grin2d* の遺伝子発現が離乳時から成熟後まで持続して減少を示したことから、シトレオビリジンの発達期曝露の影響は不可逆である可能性が示唆された。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は 3 ppm (0.42–1.51 mg/kg 体重/日) と判断された。

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きている。かび毒の健康被害を防ぐには、基準値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曝露実態を正確に把握する必要がある。また、輸入食品を汚染するかび毒産生菌の種およびかび毒産生を考慮に入れた予防対策を構築する必要がある。

本研究では、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、記憶や学習の中核であり、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神経新生を障害することを見出している。

平成 28 年度は、穀物汚染が危惧されているペニシリウム属やアスペルギルス属の真菌によって産生されるシトレオビリジン (citreoviridin) を評価対象とした。シトレオビリジ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。そこでシトレオビリジ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 日目から出生後 21 日目 (離乳時) まで経胎盤、経乳的に児動物に対して曝露させ、曝露終了時ならびに出生後 77 日目に解剖して神経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 10 匹ずつとして計 4 群に分け、シトレオビリジンを 0、1、3、10 ppm の用量で妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで混餌投与した。最高用量は予備的に 0、10 ppm を設定して母動物に対して混餌投与した際に、10 ppm で児動物の体重減少と肝臓重量の減少が認められたため、母動物への軽度な毒性とともに妊娠の維持が期待される 10 ppm に設定した。シトレオビリジンの乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 10 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、シトレオビリジンの濃度を LC-MS/MS 法により測定した (日本食品分析センター)。本実験では、出生後 4 日目に間引きを行い、各母動物 (n=9 または 10) に雄 7 例、雌 3 例を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、体重、摂餌量および摂水量を週に 2 回の頻度で測定した。混餌飼料の調製は 2

週間を超えない頻度で行った。出生後 21 日目 (離乳時) に児動物の半数を解剖に供した。各群 12 例の雄児動物を CO₂/O₂ 麻酔下で 4% paraformaldehyde (PFA) / 0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行った。各群雄 15 ~ 22 例、雌 10 例の児動物は CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、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、Table 2 に示した条件で以下の各分子に対する抗体を用いて、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段階指標である glial fibrillary acidic protein (GFAP)、sex determining region Y (SRY)-box 2 (SOX2)、T-box brain 2 (TBR2)、doublecortin (DCX)、介在ニューロンの指標である reelin、parvalbumin (PVALB)、calbindin-D-28K (CALB1)、calbindin-D-29K (calretinin、CALB2)、成熟ニューロンの指標である NeuN、細胞増殖活性の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、アポトーシス活性の指標として TUNEL 染色を行った。GFAP、SOX2、TBR2、DCX、PCNA および TUNEL 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単位長さ当たりの陽性細胞数を算出した。一方、reelin、PVALB、CALB1、CALB2 および NeuN 陽性細胞数については、海馬歯状回門における単位面積当たりの陽性細胞数の検索を行った。

母動物は児動物と同じく分娩後 21 日に CO₂/O₂ 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓重量を測定後、脳はブアン固定液、その他の臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

残り半数の児動物は出生後 77 日までシトレオビリジンを含まない通常飼料により飼育し、一般

状態を1日1回観察し、体重を週に1回の割合で測定した。出生後77日に各群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、腎臓重量を測定後、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器官重量、摂餌量、摂水量は母動物ごとに集計し、群平均および標準偏差を算出した。児動物の体重および臓器重量、免疫組織化学染色における陽性細胞のカウント数については児動物の群平均ならびに標準偏差を算出した。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。

出生後21日目および77日目の0並びに10ppm群のメタカーン固定脳標本を用いて、大脳のBregmaの後方約-2.2mmの2mm厚切片より海馬歯状回部分を採取し、AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen)を用いてtotal RNAを抽出した。2μgのtotal RNAからSuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies)を用いてcDNAを合成し、real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR, StepOnePlus Real-time PCR System, Life Technologies)により遺伝子発現解析を行った。

(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、摂水量、摂餌量：

母動物は、摂餌量の低値が10ppm群で、摂水量の高値が3ppm群で分娩後21日目に認められた (Fig. 1)。児動物は雌雄ともにシトレオビリジンによる影響と思われる体重の変化は認められなかった (Fig. 2)。

着床数、産仔数：

着床数、産仔数にシトレオビリジンによる影響は認められなかった (Table 1)。

臓器重量：

臓器重量にシトレオビリジンによる影響は認められなかった (Table 3)。

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組織学的な所見として、肝臓における肝細胞壊死が全投与群で認められ、統計学的に有意な発生頻度の増加が10ppmで認められた (Table 4)。

離乳時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、SGZにおいてPCNA (細胞増殖活性マーカー) 陽性細胞が10ppmで統計学的に有意に増加したが (Fig. 5)、顆粒細胞系譜の各分化段階マーカーの陽性細胞は有意な変動を示さなかった (Fig. 3)。また、歯状回門部では、GABA性介在ニューロンであるCALB1陽性細胞が10ppmで減少したが、CALB2陽性介在ニューロン、reelin陽性介在ニューロン、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 (Fig. 4)。

遺伝子発現解析：

出生後21日目の児動物の脳では、顆粒細胞の分化マーカーをコードする*Sox2*、*Eomes*(*Tbr2*)、*Dcx*、脳由来神経栄養因子をコードする*Bdnf*、海馬に入力する神経伝達物質の一つであるグルタミン酸のトランスポーターをコードする*Slc17a7*、

AMPA 型受容体をコードする *Gria2*、*Gria3* はいずれも 10 ppm で発現量が有意に増加した (Table 5)。一方、コリン作動性入力を受容体をコードする *Chrna4*、*Chrnb2*、GABA 性介在ニューロンで発現が認められる *Pvalb*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2d*、グルタミン酸トランスポーターをコードする *Slc17a6* では発現量が有意に減少した。出生後 77 日目の児動物の脳では、*Sox2*、*Tbr2*、*Dcx*、*Bdnf*、*Gria1*、*Gria2*、*Grin2d*、*Chrna7* で有意に発現減少、*Chrna4*、*Chrnb2*、*Pvalb* で有意に発現増加が認められた (Table 6)。

D. 考察

シトレオビリジンのマウスに対する発達期曝露後の雄児動物を対象とした海馬歯状回における免疫組織化学的解析の結果、出生後 21 日目で、10 ppm において SGZ における細胞増殖活性の増加を反映した PCNA 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、歯状回での遺伝子発現解析において、0 ppm 対照群と 10 ppm 群の比較において、10 ppm 群で顆粒細胞系譜の神経幹細胞・神経前駆細胞指標のうち、*Sox2* (type-1 神経幹細胞 ~ type-2b 神経前駆細胞)、*Eomes* (type-2b ~ type-3 神経前駆細胞)、*Dcx* (type-2b 神経前駆細胞 ~ 未熟顆粒細胞) の発現増加及び神経新生の促進に関わる *Bdnf* とグルタミン酸作動性入力の各種受容体の発現増加が認められた。また、免疫組織化学的には、統計学的な有意差は認められないものの、10 ppm 群において、SOX2 陽性細胞、TBR2 (EOMES と同義) 陽性細胞、DCX 陽性細胞、TUBB3 陽性細胞 (未熟顆粒細胞) のいずれも増加傾向を認めた。GFAP 陽性の type-1 神経幹細胞の数に明らかな変動を認めなかったことから、SGZ における増殖活性の増加は type 2 神経前駆細胞 ~ 未熟顆粒細胞の増加を反映した変化であると考えられた。一方、歯状回門における GABA 性介在ニューロンのうち、CALB1 陽性ニューロン数が 10 ppm 群で減少を示した。また、免疫組織化学的には陽性細胞分布に変動を認めなかつ

たものの、介在ニューロン指標遺伝子である *Pvalb* の発現低下も認めている。CALB1 陽性ニューロン及び PVALB 陽性介在ニューロンの総数は共に少ないものの、神経前駆細胞の分化促進に機能することが知られていることから、顆粒細胞系譜の分化に抑制がかかったため、系譜を構成する細胞の統計学的に有意な増加にまで及ばずに、それぞれの前駆細胞における前駆細胞指標の発現増加を示した可能性が示唆された。また、コリン作動性入力を受容体をコードする *Chrna4* や *Chrnb2*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2d*、グルタミン酸トランスポーターをコードする *Slc17a6* の発現量低下も顆粒細胞系譜の分化抑制に寄与しているものと考えられた。

出生後 77 日目では、顆粒細胞系譜の免疫組織化学的解析による分布に変動を認めなかったものの、*Sox2*、*Eomes*、*Dcx* の遺伝子発現の減少が認められた。また、検索した神経新生制御系 (グルタミン作動性、コリン作動性、及び GABA 作動性入力) の遺伝子のうち、グルタミン酸受容体の一つである *Grin2d* 以外の遺伝子の発現が 21 日目と逆の変動を示した。このことから、曝露終了時に観察された影響がフィードバック機序により打ち消される結果と判断され、離乳時の障害が恒常性維持機構により修復されることが示唆された。また、*Grin2d* の遺伝子発現が離乳時から持続して減少を示していた。その蛋白質である NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2D は GABA 性介在ニューロンに分布することが知られており、得られたデータからは、シトレオビリジンの神経新生に与える影響は不明であるものの、不可逆的影響であることが示唆された。現在、神経新生制御系に関連する蛋白質分子の細胞分布の変動は解析中である。

E. 結論

乳児が曝露される可能性が高いかび毒の発達神経毒性影響を評価することを目的として、マウスを用いたシトレオビリジンの発達期曝露実験

を行った。母動物と児動物への影響は曝露終了時において 10 ppm で認められた。母動物では 10 ppm で肝細胞の壊死がみられ、児動物では曝露終了時に 10 ppm で脳の海馬歯状回の SGZ における細胞増殖の増加と神経新生制御系の発現変動を特徴とする神経新生障害を示唆する変化が認められた。成熟後には曝露終了時に発現変動を示した遺伝子の殆どが逆の発現変動を示し、免疫組織化学的に顆粒細胞系譜と GABA 性介在ニューロンの分布に変動を認めなかったことから、曝露終了時に観察された影響がフィードバック機序により打ち消される結果と判断され、離乳時の障害が恒常性維持機構により修復されることが示唆された。一方で、NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2D をコードする *Grin2d* の遺伝子発現が離乳時から成熟後まで持続して減少を示したことから、シトレオビリジンの発達期曝露の影響は不可逆的である可能性が示唆された。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は母動物の摂取量で 3 ppm (0.42–1.51 mg/kg 体重/日) と判断さ

れた。

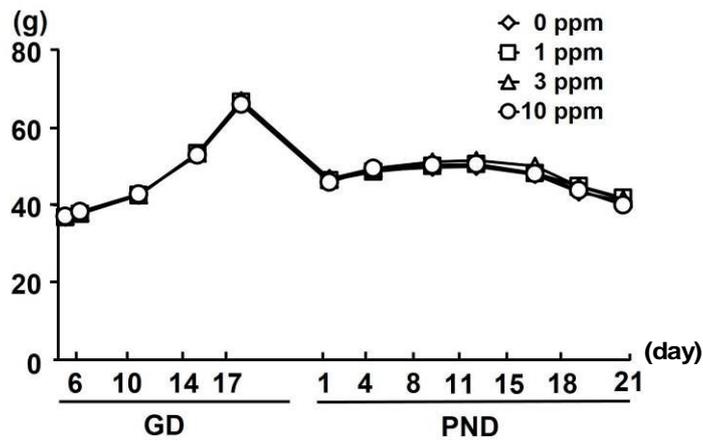
G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

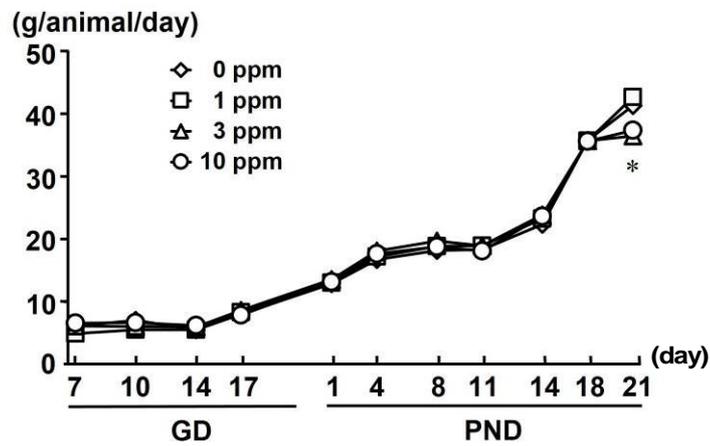
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

A. Body weight



B. Food consumption



C. Water consumption

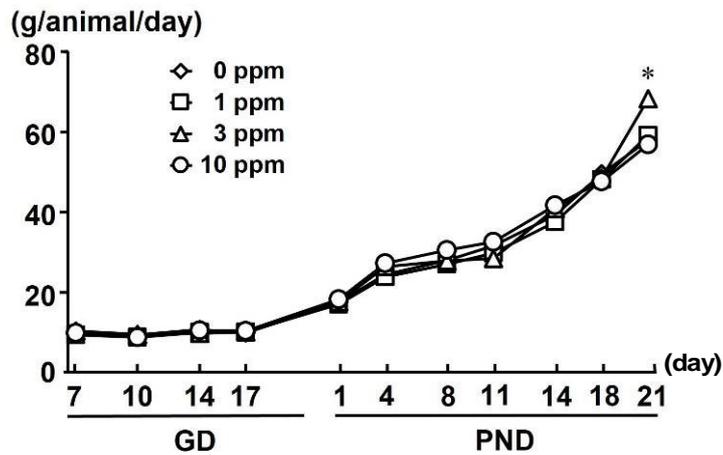
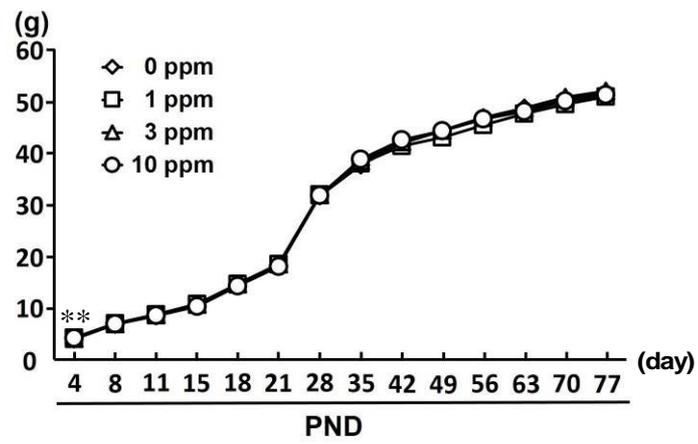


Figure 1. Body weight, food consumption and water consumption of dams given citreoviridin from GD 6 to PND 21 in the diet.

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

A. Male offspring



B. Female offspring

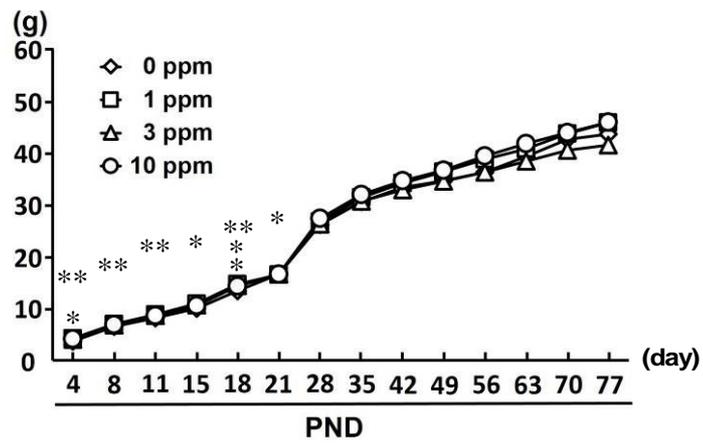


Figure 2. Body weight of male and female offspring exposed to citreoviridin at postnatal day. (A) Male offspring. (B) Female offspring.

*,** 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 citreoviridin from GD 6 to PND 21

	No. of dams	Citreoviridin (ppm)			
		0 (Control)	1	3	10
Reproductive parameters					
No. of implantation sites		14.75±1.39	14.80±1.55	15.33±2.06	13.89±2.09
No. of live offspring		13.78±2.22	13.30±1.25	13.56±1.81	13.33±1.58
Mean body weight (GD, g)		46.49±4.75	47.36±3.12	47.53±3.37	47.39±3.68
Mean body weight (PND, g)		46.76±2.53	47.18±2.69	47.82±2.70	46.81±2.58
Food intake (GD, g/animal/day) ^a		6.63±0.82	6.04±0.42	6.68±0.70	6.80±1.48
Food intake (PND, g/animal/day) ^a		23.63±1.21	24.22±1.39	24.05±1.22	23.47±1.59
Water consumption (GD, g/animal/day) ^a		9.89±0.86	9.56±1.13	9.96±1.15	9.98±1.15
Water consumption (PND, g/animal/day) ^a		35.46±5.37	34.67±3.81	36.82±3.47	36.40±4.18
Citreoviridin intake					
GD, mg/kg body weight/day ^a		0	0.13±0.01	0.42±0.05	1.46±0.43
PND, mg/kg body weight/day ^a		0	0.51±0.02	1.51±0.11	5.02±0.37

Mean±SD.

^aMean value of each week.

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

Table 2. Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone number	Dilution	Antigen retrieval condition	Manufacturer
Calbindin-D-28K	CALB1	Mouse	Monoclonal IgG ₁	CB-955	1:500	Microwaving, pH 6.0 ^a	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
Calbindin-D-29K (Calretinin)	CALB2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	CRT01/ O.N.40	1:100	Microwaving, pH 6.0	LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA)
Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2	Chrn2	Rabbit	Polyclonal	n.a.	1:300	Autoclaving ^b	Bioss Inc. (Woburn, Massachusetts, USA)
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	None	Abcam Inc.
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG ₁	GA5	1:200	None	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG ₁	A60	1:100	None	EMD Millipore
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG ₁	PARV-1 9	1:1000	Microwaving, pH 6.0	EMD Millipore
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	PC10	1:200	None	Dako (Glostrup, Denmark)
Reelin	–	Mouse	Monoclonal IgG ₁	G10	1:1000	None	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Sex determining region Y (SRY)-box 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG ₁	9-9-3	1:4000	None	Abcam Inc.
T box brain 2	TBR2	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:500	Autoclaving, pH 6.0	Abcam Inc.
Tubulin, beta 3 class III	TUBB3	Mouse	Monoclonal IgG _{2a}	TuJ-1	1:500	Microwaving, pH6.0	Abcam Inc.

^a Microwaving at 90 °C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

^b Autoclaving at 121 °C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

Table 3. Body and organ weights at the prepubertal and terminal necropsies of offspring

		Citreoiviridin in diet (ppm)			
		0 (Control)	1	3	10
Male offspring on PND 21					
No. of animals examined		19	22	19	15
Body weight (g)		18.58±1.44 ^a	18.74±1.16	18.80±1.09	17.43±1.75
Brain weight	Absolute (g)	0.45±0.02	0.45±0.02	0.46±0.02	0.44±0.02
	Relative (g/100g BW)	2.43±0.16	2.42±0.12	2.44±0.15	2.55±0.23
Liver weight	Absolute (g)	0.96±0.11	0.99±0.08	1.01±0.10	0.93±0.11
	Relative (g/100g BW)	5.19±0.51	5.26±0.32	5.35±0.43	5.32±0.17
Kidneys weight	Absolute (g)	0.13±0.01	0.13±0.01	0.14±0.01	0.13±0.02
	Relative (g/100g BW)	0.72±0.06	0.71±0.05	0.74±0.05	0.74±0.06
Female offspring on PND 21					
No. of animals examined		10	10	10	10
Body weight (g)		16.98±0.82	17.47±0.89	17.86±1.86	17.05±2.19
Brain weight	Absolute (g)	0.44±0.01	0.45±0.02 *	0.45±0.02	0.44±0.02
	Relative (g/100g BW)	2.57±0.11	2.60±0.17	2.53±0.22	2.64±0.29
Liver weight	Absolute (g)	0.79±0.07	0.81±0.12	0.81±0.08	0.78±0.12
	Relative (g/100g BW)	4.67±0.31	4.62±0.60	4.56±0.15	4.56±0.19
Kidneys weight	Absolute (g)	0.12±0.01	0.14±0.02 *	0.13±0.02	0.12±0.01
	Relative (g/100g BW)	0.70±0.04	0.79±0.06 **	0.71±0.05	0.73±0.05
Male offspring on PND 77					
No. of animals examined		12	11	12	12
Body weight (g)		51.68±3.91	50.89±2.13	52.02±3.88	51.27±5.05
Brain weight	Absolute (g)	0.48±0.02	0.50±0.02 *	0.49±0.02	0.49±0.02
	Relative (g/100g BW)	0.96±0.07	1.00±0.09	0.96±0.11	0.94±0.09
Liver weight	Absolute (g)	2.40±0.19	2.24±0.29	2.26±0.38	2.29±0.42
	Relative (g/100g BW)	4.79±0.46	4.45±0.28	4.37±0.49	4.38±0.45
Kidneys weight	Absolute (g)	0.36±0.03	0.37±0.03	0.36±0.05	0.36±0.02
	Relative (g/100g BW)	0.73±0.08	0.73±0.08	0.69±0.08	0.70±0.06
Female offspring on PND 77					
No. of animals examined		10	10	10	10
Body weight (g)		43.63±6.19	45.88±3.32	41.57±3.64	45.93±5.77
Brain weight	Absolute (g)	0.49±0.03	0.51±0.03	0.50±0.02	0.50±0.02
	Relative (g/100g BW)	1.13±0.19	1.11±0.13	1.17±0.10	1.13±0.17
Liver weight	Absolute (g)	1.90±0.46	1.98±0.21	1.70±0.23	1.90±0.20
	Relative (g/100g BW)	4.23±0.66	4.32±0.30	3.95±0.43	4.26±0.49
Kidneys weight	Absolute (g)	0.23±0.03	0.25±0.03	0.24±0.02	0.24±0.01
	Relative (g/100g BW)	0.52±0.06	0.54±0.08	0.55±0.07	0.54±0.09

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

^a Mean ± SD.

P* < 0.05, *P* < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

Table 4. Histopathological findings of dams exposed to citreoviridin from gestation day 6 to day 21 after delivery

	Citreoviridin in diet (ppm)			
	0 (Control)	1	3	10
No. of dams examined	9	10	10	10
Brain				
Abnormalities detected	0 ^a	0	0	0
Liver				
Abnormalities detected	0 ^a (0/0/0) ^b	2 (2/0/0)	3 (2/1/0)	4 (2/2/0) [†]
Kidney				
Abnormalities detected	0	0	0	0

^aTotal number of animals that exhibited abnormality.

^bNumber of animals with each grade (grade 1/grade 2/grade 3). The degree of abnormalities: grade 1, slight; grade 2, moderate; grade 3, marked.

[†] $P < 0.05$, significantly different from 0-ppm controls by the Mann–Whitney’s *U*-test.

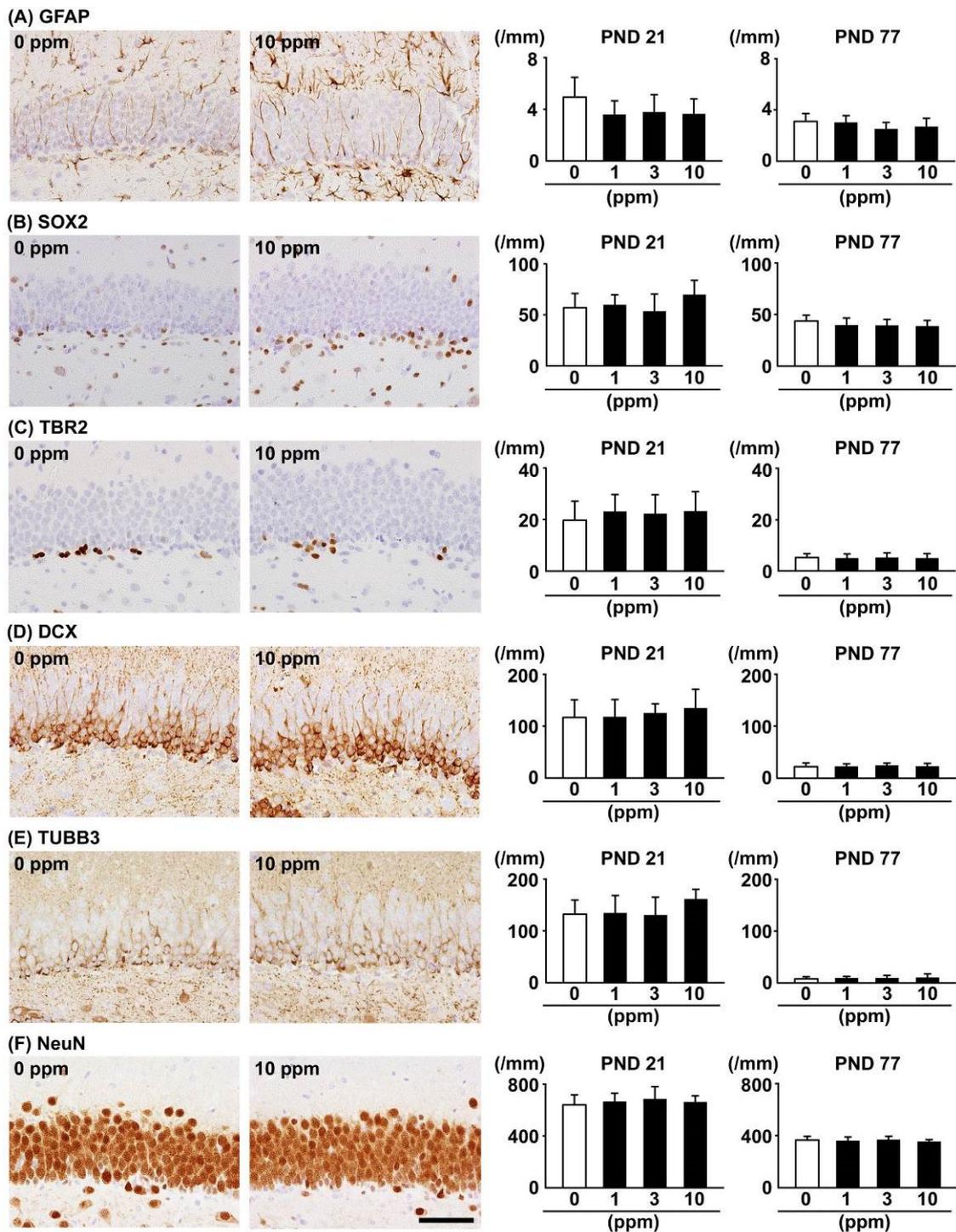


Figure 3. Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (A) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the SGZ, arrowheads indicate immunoreactive cells. (B) Sex determining region Y (SRY)-box 2 (SOX2) in the SGZ. (C) T box brain 2 (TBR2) in the SGZ. (D) Doublecortin (DCX) in the SGZ. (E) Tubulin, beta 3 class III (TUBB3) in the SGZ. (F) Neuron-specific nuclear protein (NeuN) in the GCL. Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 \times ; bar = 50 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ or GCL of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8).

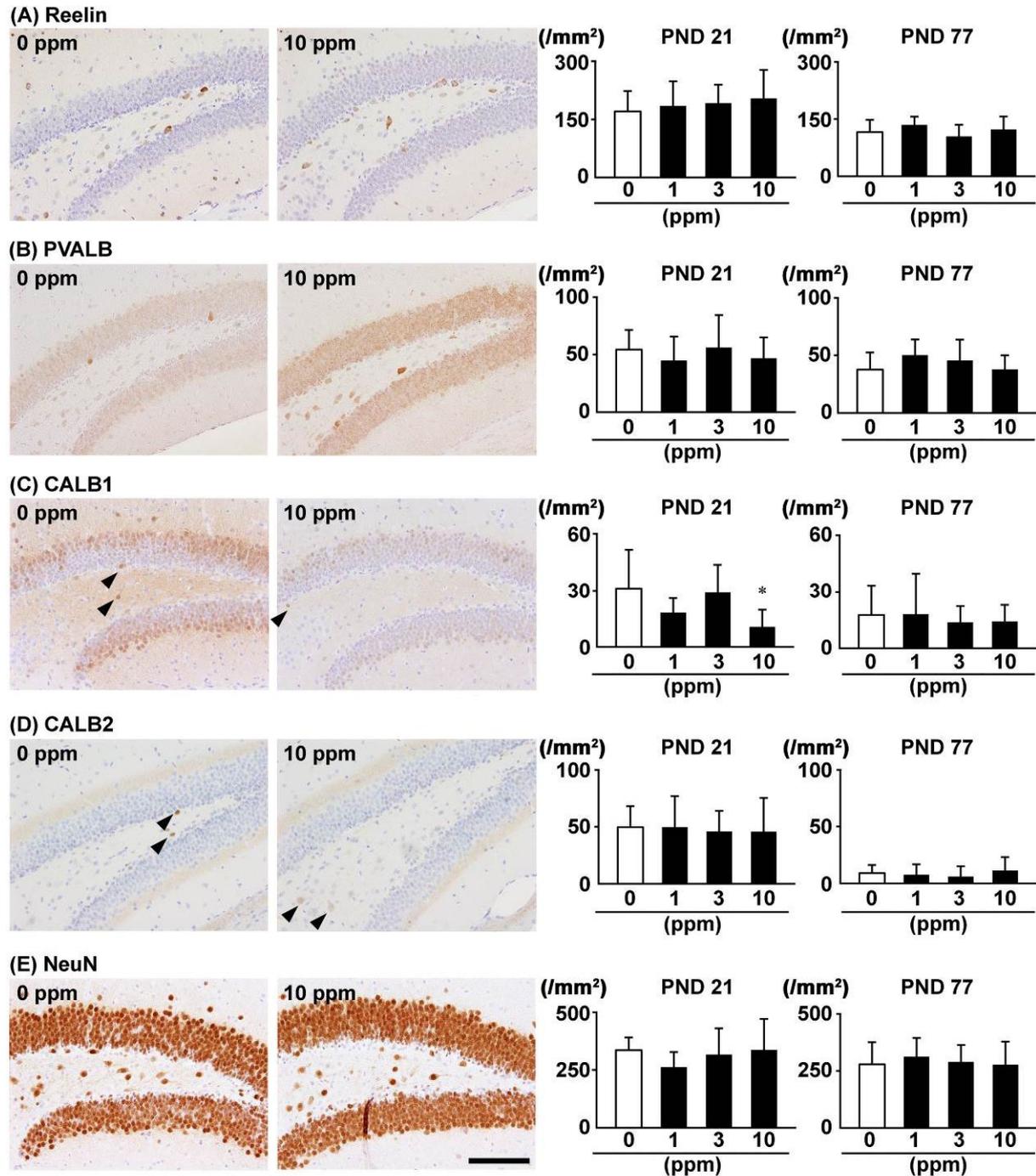


Figure 4. Distribution and number of immunoreactive cells for interneuronal markers and a mature neuronal marker in the hilus of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (A) Reelin. (B) Parvalbumin (PVALB). (C) Calbindin (CALB1), arrowheads indicate immunoreactive cells. (D) Calretinin (CALB2), arrowheads indicate immunoreactive cells. (E) NeuN. Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 200 \times ; bar = 100 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm²) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8). * $P < 0.05$, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

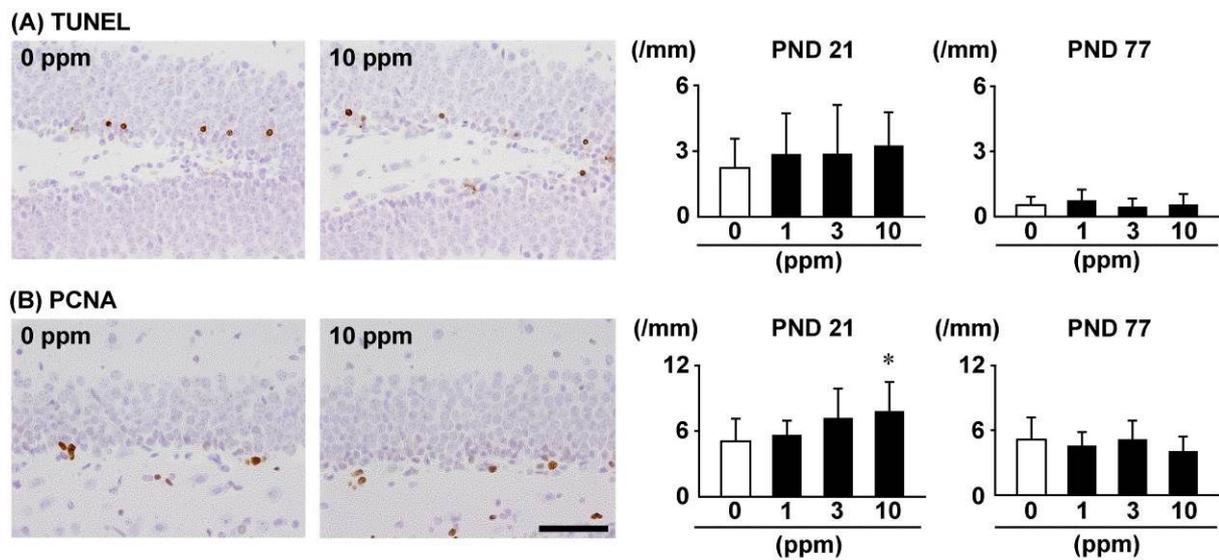


Figure 5. Distribution and number of apoptotic and proliferating cells in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to citreoviridin. (A) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). (B) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Representative images from 0 ppm controls and the 10 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 \times ; bar = 50 μ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of the SGZ of the bilateral sides. Values are expressed as the mean + SD. N = 8-10/group (0 ppm controls and 10 ppm citreoviridin 9; 1 ppm citreoviridin, 10; 3 ppm citreoviridin, 8). * $P < 0.05$, significantly different from 0-ppm controls by the Dunnett's test or Steel's test.

Table 5. Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 21 offspring exposed to citreoviridin

	Citreoviridin in diet (ppm)			
	0 (Control)		10	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
Neuronal stage-defining markers of granule cell lineages				
<i>Sox2</i>	1.03±0.23 ^a	1.01±0.18	1.12±0.20	1.38±0.19 **
<i>Eomes</i>	1.08±0.43	1.13±0.51	3.70±1.24 **	4.51±1.39 **
<i>Dcx</i>	1.02±0.19	1.02±0.18	1.59±0.30 **	1.99±0.51 **
Interneuron subpopulations				
<i>Pvalb</i>	1.06±0.35	1.02±0.23	0.61±0.28 *	0.73±0.28
<i>Reln</i>	1.02±0.22	1.02±0.19	0.97±0.21	1.22±0.38
Stem cell regulators				
<i>Bdnf</i>	1.04±0.31	1.02±0.23	1.34±0.37	1.68±0.52 **
Glutamate transporters and receptors				
<i>Slc17a6</i>	1.05±0.34	1.01±0.14	0.48±0.32 *	0.59±0.33 *
<i>Slc17a7</i>	1.06±0.33	1.12±0.49	1.53±0.31 *	1.89±0.42 *
<i>Gria1</i>	1.03±0.29	1.05±0.33	1.21±0.29	1.52±0.46
<i>Gria2</i>	1.03±0.26	1.03±0.25	1.21±0.34	1.51±0.46 *
<i>Gria3</i>	1.01±0.15	1.02±0.20	1.16±0.29	1.45±0.42 *
<i>Grin2a</i>	1.03±0.23	1.07±0.38	1.29±0.52	1.61±0.67
<i>Grin2d</i>	1.06±0.33	1.03±0.26	0.60±0.10 **	0.74±0.16 *
Cholinergic receptors				
<i>Chrna4</i>	1.04±0.27	1.04±0.33	0.62±0.27 *	0.75±0.27
<i>Chrna7</i>	1.01±0.14	1.03±0.25	0.89±0.20	1.10±0.27
<i>Chrb2</i>	1.04±0.27	1.03±0.24	0.77±0.11 *	0.96±0.15
Antioxidant enzymes				
<i>Sod1</i>	1.04±0.29	1.03±0.27	0.87±0.18	1.08±0.23
<i>Sod2</i>	1.02±0.22	1.01±0.17	0.76±0.14	0.95±0.22

Abbreviations: *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Chrna4*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrb2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal) ; *Dcx*, doublecortin; *Eomes (Tbr2)*, eomesodermin homolog; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1); *Gria2*, glutamate receptor, ionotropic, *Gria3*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3); *Grin2a*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1); *Grin2d*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4); *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; *Slc17a6*, solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7; *Sod1*, superoxide dismutase 1, soluble; *Sod2*, superoxide dismutase 2, mitochondrial;

^a Mean ± SD. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

Table 6. Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 77 offspring exposed to citreoviridin

	Citreoviridin in diet (ppm)			
	0 (Control)		10	
	Relative transcript level normalized to		Relative transcript level normalized to	
	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i>
No. of animals examined	6	6	6	6
Neuronal stage-defining markers of granule cell lineages				
<i>Sox2</i>	1.01±0.11 ^a	1.00±0.09	0.75±0.24 *	0.88±0.19
<i>Eomes</i>	1.27±0.99	1.27±1.04	0.25±0.44 *	0.28±0.49
<i>Dcx</i>	1.02±0.25	1.02±0.21	0.63±0.17 **	0.74±0.11 *
Interneuron subpopulations				
<i>Pvalb</i>	1.14±0.69	1.17±0.78	3.06±0.84 **	3.73±1.26 **
<i>Reln</i>	1.10±0.55	1.10±0.58	0.84±0.64	0.96±0.65
Stem cell regulators				
<i>Bdnf</i>	1.05±0.35	1.03±0.26	0.35±0.15 **	0.41±0.13 **
Glutamate transporters and receptors				
<i>Slc17a6</i>	1.18±0.72	1.21±0.80	1.59±0.49	1.95±0.72
<i>Slc17a7</i>	1.07±0.42	1.05±0.33	0.57±0.20 *	0.67±0.21 *
<i>Gria1</i>	1.02±0.20	1.01±0.11	0.44±0.13 **	0.50±0.09 **
<i>Gria2</i>	1.02±0.24	1.01±0.16	0.60±0.27 *	0.69±0.23 *
<i>Gria3</i>	1.01±0.16	1.00±0.06	0.97±0.14	1.16±0.17
<i>Grin2d</i>	1.05±0.40	1.02±0.26	0.65±0.14 *	0.77±0.13
Cholinergic receptors				
<i>Chrna4</i>	1.06±0.40	1.08±0.46	1.81±0.26 **	2.22±0.64 **
<i>Chrna7</i>	1.03±0.27	1.01±0.16	0.47±0.13 **	0.55±0.09 **
<i>Chrb2</i>	1.01±0.12	1.01±0.16	1.42±0.19 **	1.70±0.27 **

Abbreviations: *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Chrna4*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrb2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal) ; *Dcx*, doublecortin; *Eomes (Tbr2)*, eomesodermin homolog; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Gria1*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1); *Gria2*, glutamate receptor, ionotropic, *Gria3*, glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3); *Grin2d*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4); *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *Pvalb*, parvalbumin; *Reln*, reelin; *Slc17a6*, solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6; *Slc17a7*, solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7; *Sod1*, superoxide dismutase 1, soluble; *Sod2*, superoxide dismutase 2, mitochondrial; *Sox2*, sex determining region Y (SRY)-box 2; *Tbr2*, T box brain 2.

^a Mean ± SD. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, significantly different from 0-ppm controls by the Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test.

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

培養によらないカビ毒産生菌種検出法の開発

研究分担者 小西 良子 (麻布大学)
研究協力者 小林 直樹 (麻布大学)
研究協力者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者 窪崎 敦隆 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

食品を汚染するカビ毒産生菌の迅速検出法の開発を目的に、培養を経ずにカビ毒産生菌を検出できる方法の開発を行った。輸入食品において、今後モニタリングを強化していくべきカビ毒として、今年度はステリグマトシチン(ST)産生性 *Aspergillus versicolor* を対象とした。*A. versicolor* とその近縁種を含む *Aspergillus section Versicolores* において、ST産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。まず、ST産生能を持つ菌種をPCR増幅の有無で識別できるプライマーをデザインすることを目的に、 β -tubulin 遺伝子塩基配列を当該 section 内の複数菌種に渡って多数収集し、種間での配列比較を行った。ST産生能を持つ菌種の複数系統に共通する特徴的な塩基配列は検出されなかったものの、菌種特異的なサイトが複数検出された。このことから、 β -tubulin 遺伝子部分配列を基に、PCRの増幅の有無で菌種を識別可能な検出系を構築できる可能性が示された。次に、土壌や堆積物中の微量の微生物等からDNAを効率よく抽出可能な市販のキットを用い、玄米に付着するカビからのDNA抽出を試みたところ、食品中のカビを直接検出するためのDNA抽出法として有効であることが示された。一方で、検体によっては、通常のDNA増幅酵素によるPCRでは非特異的増幅と思われる増幅産物が検出され、疑陽性判定のリスクになると考えられた。そこで、プライマーの3'末端の1塩基の違いを認識し、完全一致しない場合は増幅効率が著しく低下することが報告された改変型DNA合成酵素を用いた特異的なPCR法を検討したところ、標的菌種のみを増幅することができた。以上の結果から、食材に付着したカビ由来のDNAを回収し、非特異的な増幅を回避しながらST産生能を持つ菌種のみを検出することが示され、食品を汚染するカビ毒産生菌の迅速検出法の技術的基盤を確立することができた。

A. 研究目的

食品や飼料のカビ毒による汚染は、食品および飼料中に存在するカビ毒産生菌が増殖し、そのカビがカビ毒を産生することで起こる。カビ毒が検出されなかった食品・飼料においても、貯蔵環境が不適切であった場合には、カビ毒産生菌が増殖し、汚染が生じる可能性がある。食品や飼料のカビ毒汚染を真にコントロールするためには、産生され蓄積されたカビ毒を検出するだけでなく、カビ毒産生菌による汚染の有無を調べることが重要である。

また、輸入食品においては、輸送時の貯蔵および輸入後の貯蔵がなされる。またその貯蔵環境は、貯蔵の前後または貯蔵中に大きく変化する可能性がある。それぞれの貯蔵前においてカビ毒が検出されない場合においても、貯蔵条件によってはカビ毒産生菌が繁殖し、カビ毒が産生される恐れがある。国内で生産される食品についても貯蔵される穀類などで同様のことが考えられる。

一般的にカビ毒産生菌を検出するためには、菌を培養してから供試する必要がある。しかし、カビの培養は1週間から2週間程度の時間を要するため、迅速に検出することは難しい。食品から、培養を経ずに直接カビ毒産生菌の存在の有無が判定できる手法が求められる。そこで、本研究では食品から、培養を経ずにカビ毒産生菌を直接検出できる迅速簡便な方法を遺伝子レベルで開発することを目的とした。さらに、カビ毒はカビ毒産生菌が死滅した後も食品中に残存する。輸送・貯蔵の間にカビが死滅している可能性もあるが、遺伝子レベルで検出を行うことで、食品中のカビがすでに死滅していたとしても検出することが可能となる。

輸入食品において、今後モニタリングを強化していきべきカビ毒を特定する科学的根拠を得るため、ジアセトキシシルペノール (DAS) 産生菌およびステリグマトシスチン (ST) 産生

菌に着目した。初年度に DAS 産生性 *Fusarium* 属菌、次年度に ST 産生性 *Aspergillus versicolor* を対象とする予定であったが、菌株の収集具合から本年度は *A. versicolor* を対象とした。

B. 研究方法

1. 供試菌株および米検体

食品および環境由来の *Aspergillus section Versicolores* 分離株 37 株 (表 1) を供試した。また、米は S 地区産および H 地区産の玄米を用いた。

2. 培養真菌からのゲノム DNA 抽出

ポテトデキストロース液体培地 (PDB) に胞子を接種し、25 °C で 2 日間培養した菌糸体から DNA 抽出を行った。DNA 抽出は SDS 法 (参考文献 1) または DNeasy plant mini kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコルに従って行う方法で行った。抽出した DNA は使用まで -20 °C で保存した。

3. β -tubulin 遺伝子部分配列の比較

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

Glass ら (参考文献 2) の方法を参照に、bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') および bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') を用いて PCR を行った。PCR 条件は、95 °C で 3 分間熱変性を行った後、95 °C 15 秒、60 °C 45 秒、72 °C 60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、72 °C で 120 秒間最終伸長を行った。その後、エタノール沈殿操作により PCR 産物を精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンス反応を行った。シーケンシングは ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて行い、塩基配列を決定し

た。

決定した供試菌株 37 株の塩基配列と登録配列をアライメントし、配列比較を行った。登録配列は NCBI のデータベースからダウンロードして使用し、*A. section Versicolores* に含まれる 14 種および外群 2 種 39 株の登録配列を用いた。また、このアライメントを基に近隣結合法により系統樹を作製した。

4 . 米付着カビ孢子からの直接 DNA 抽出

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

5 . 特異性の高い ST 産生菌種検出 PCR 法の開発

3 . で作製したアライメントを基に、*A. jensenii* および *A. versicolor* の間で塩基配列が異なる部分に、それぞれの種に適合するプライマーを設計し、HiDi DNA polymerase (myPOLS Biotec GmbH) を用いて PCR を行った。*A. jensenii* 用の Forward 用プライマーとして SI423-F (5'-CATCCATTTTCAGATGGTATC-3')、Reverse 用プライマーとして SI423-R1 (5'-CGACTGGCTTCCCTGGCCGC-3') および SI423-R2 (5'-GCTTCAACAGCCCTGCCTTT-3')、*A. versicolor* 用の Forward 用プライマーとして 5364-1-3B-F (5'-CATCCATTTTCAGATGGTATT-3')、Reverse 用プライマーとして 5364-1-3B-R1 (5'-CGACTGGCTTCCCTGGCCGT-3') および 5364-1-3B-R2 (5'-GCTTCAACAGCCCTGCCTTC-3') を用いた。

C. 研究結果

(1) ST 産生菌種とその近縁種における β -tubulin 遺伝子部分配列の比較

まず、ST 産生能を持つ菌種を PCR 増幅の有無で識別できるプライマーをデザインすることを目的に、 β -tubulin 遺伝子塩基配列を多数収集し、ST 産生能を持つ菌種の系統のみに共通する特徴的な塩基配列の検出を行った。

供試した 37 株の β -tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を決定し、39 株のデータベース登録配列と共に配列比較を行った (図 1)。その結果、全菌株間で 108 サイトにおいて多型が検出された。また、この塩基配列を基に作製した系統樹を図 2 に示す。供試菌株はそれぞれ 1 菌種の登録配列と単系統群を形成し、種が同定された。供試菌株には *A. creber* が 12 株、*A. jensenii* が 6 株、*A. venenatus* が 6 株、*A. tennesseensis* が 4 株、*A. protuberus* が 4 株、*A. puulaauensis* が 2 株、*A. versicolor* が 2 株、*A. tabacinus* が 1 株含まれていた。

今回対象とした *A. section Versicolores* 14 菌種の内、ST 産生の報告がある 11 菌種 (*A. amoenus*, *A. crever*, *A. cvjetkovicii*, *A. fructus*, *A. jensenii*, *A. protuberus*, *A. puulauensis*, *A. tennesseensis*, *A. venenatus* および *A. versicolor*) にのみ共通し、ST 産生能の報告がない 3 菌種 (*A. austroafricanus*, *A. sydowii* および *A. tabacinus*) とは異なるサイトは検出されなかった。しかし、菌種ごとに特徴的な変異を示すサイトが複数検出された。

(2) 米付着カビ孢子からの直接 DNA 抽出法の開発

食材に付着したカビ孢子を培養することなく直接検出することを目的に、玄米に付着したカビからの DNA 検出方法を検討した。微量と考えられる付着カビ孢子からの検出を行うにあたり、土壌や堆積物中のバクテリアや真菌、藻類などから効率よく DNA 抽出することができる市販キットの適用を検討した。

産地の異なる米 2 検体から抽出した DNA を

鋳型に β -tubulin 遺伝子部分配列の増幅を試みた。その結果、国内 S 地区産の米について予想される産物長の増幅が確認され、玄米付着カビ胞子から直接 DNA を抽出でき、PCR によりカビを検出することが可能であると考えられた(図 3)。一方で、国内 H 地区産の米については非特異的と考えられる増幅が見られた。

(3) 特異性の高い PCR 法の検討

(2) で検討した米から直接 DNA を抽出する方法において、非特異的と考えられる増幅が見られたことから、特異性の高い PCR 法の検討を行った。プライマーの 3' 末端の 1 塩基の違いを認識し、完全一致しない場合は増幅効率が著しく低下することが報告された改変型 DNA 合成酵素 (HiDi DNA polymerase: myPOLS Biotec GmbH) を活用した検出法を検討した。本酵素の有効性を確認するため、 β -tubulin 遺伝子において数塩基のみ配列が異なることが(1) で明らかとなった *A. jensenii* および *A. versicolor* を用い、それぞれの菌種を標的とする β -tubulin 遺伝子増幅用 PCR プライマーセットをデザインして実験を行った(図 4A)。その結果、標的の菌種 DNA においては目的サイズの増幅が観察されたのに対し、プライマーの 3' 末端の 1 塩基が異なるカビの DNA からは増幅が起こらず、標的カビ以外の DNA の混入があっても菌種特異的な検出が可能であることが確認できた(図 4B)。

D. 考察

本研究では、食品を汚染するカビ毒産生菌の迅速検出法の開発を目指し、培養を経ずにカビ毒産生菌を検出できる方法の開発を目的とした。さらに本年度は、食品において今後モニタリングを強化していくべきと考えられるカビ毒のひとつである ST に着目し、その代表的産生菌で

ある *Aspergillus versicolor* とその近縁種において、ST 産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。

ST 産生菌種と非産生菌種には系統の偏りがあるため、ST 産生菌種のみの特徴的な塩基配列の検出をめざし、まず *A. section Versicolores* に含まれる 14 菌種において β -tubulin 遺伝子部分配列の塩基配列比較を行った。ST 産生菌種特異的な塩基配列を検出することはできなかったが、菌種特異的なサイトが複数検出されたため、 β -tubulin 遺伝子部分配列を基に、PCR の増幅の有無で菌種を識別可能な系を構築できる可能性が示された。今後、別な遺伝子を対象として、ST 産生菌種のみ共通する特徴的な塩基配列の検出を行う予定である。

次に、培養を経ずに食材に付着したカビを直接検出する方法の検討を行うため、土壌や堆積物から微量の微生物等の DNA を効率よく抽出可能な市販のキットを用い、玄米に付着するカビからの DNA 抽出を試みた。抽出した DNA を鋳型に β -tubulin 遺伝子部分配列の増幅を行ったところ、1 検体から予想される産物長の増幅産物が確認され、本手法が食品中のカビを直接検出するための DNA 抽出法として有効であることが示された。一方で、別な検体においては、非特異的増幅と思われる増幅産物が検出され、疑陽性判定のリスクになると考えられた。これは、今回検討した米から直接 DNA を抽出する方法においては、食材自体や環境由来細菌等の DNA の混入が避けられないことが原因と考えられる。そのため、PCR による検出法には改良が必要であると考えられた。

食材自体や環境由来細菌等由来の DNA が混在する中で、微量の目的カビ DNA をターゲットとした増幅を可能とするため、より特異的な増幅反応を示す DNA 合成酵素を用いた PCR を検討した。用いた酵素は HiDi DNA polymerase (myPOLS Biotec GmbH) で、プライマーの 3'

末端の 1 塩基の違いを認識し、完全一致しない場合は増幅効率が著しく低下することが報告された改変型 DNA 合成酵素である。β-tubulin 遺伝子の塩基配列比較より、図 4A のように種間で塩基配列の異なる部位にプライマーを設計し、本酵素での PCR を行った。その結果、標的とする菌種のみで目的とする産物長の増幅が確認されたのに対し、1 プライマー認識配列あたり 3' 末端の 1 塩基のみが異なる菌種の DNA からは増幅が起こらず、また非特異的な増幅も確認されなかった(図 4B)。このことから、標的とするカビ以外の DNA の混入があっても特異的な検出が可能であることが確認された。

E. 結論

以上の結果から、食材に付着したカビ由来の DNA を回収し、非特異的な増幅を回避しながら ST 産生能を持つ菌種のみを検出する技術的基盤を確立することができた。今後、β-tubulin 遺伝子のより広範な配列比較および別のターゲット遺伝子における配列比較を行い、ST 産生菌種にのみ共通する特異的な塩基配列を検出することで、食品を汚染する ST 産生菌の迅速検出法を確立できると考えられる。

F. 参考文献

1) Watanabe M., Lee K., Goto K., Kumagai S., Sugita-Konishi Y., Hara-Kudo Y.: Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. *Journal of Food Protection* (2010) 73: 1077–1084

2) Glass, N. L. and Donaldson, G. C.: Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Microbiology* (1994) 61: 1323-1330

G. 研究業績

【論文発表】

Shiratori, N., Kobayashi1, N., Tulayakul, P., Sugiura, Y., Takino, M., Endo, O. and Sugita-Konishi, Y.: Occurrence of *Penicillium brocae* and *Penicillium citreonigrum*, related to mutagenic and toxic metabolites, respectively, in commercially available rice grains of Thailand. *Toxins*, submitted

【学会発表】

- 1) 小林直樹：様々な由来の *Aspergillus versicolor* におけるステリグマトシスチン産生性に関する分子生物学的検討. カビ毒研究連絡会 滋賀 (2016.8)
- 2) 小林直樹、渡辺麻衣子、吉成知也、矢内美幸、杉浦義紹、高橋治男、寺嶋淳、小西良子： *Aspergillus versicolor* の系統分類とステリグマトシスチン産生能の検討. 日本進化学会第 18 回大会 (2016.8)
- 3) 田形卓巳、白鳥望美、杉浦義紹、小林直樹、小西良子： *Penicillium citreonigrum* 株間におけるシトレオビリジン産生能の比較と毒素産生条件. 第 37 回日本食品微生物学会学術総会 (2016.9)

- 4) 鈴木佑奈、宮原彩花、吉成知也、小林直樹、小西良子、寺嶋淳、後藤慶一、高橋治男、渡辺麻衣子：発酵食品から分離された黒麹菌と近縁菌の系統分類学的研究. 第 37 回日本食品微生物学会学術総会 (2016.9)
- 5) 白鳥望美、滝埜昌彦、遠藤治、Phitsanu Tulayakul、杉浦義紹、小林直樹、小西良子：エンドファイティックなカビ *Penicillium brocae* による汚染米の安全性について. 第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会 (2016.10)
- 6) Watanabe, M.: Evaluation of molecular markers for identification of *Aspergillus* and *Fusarium* spp. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
- 7) Suzuki, Y., Takahashi, H., Yoshinari, T., Kobayashi, N., Sugita-Konishi, Y., Terajima, J., Goto, K. and Watanabe, M.: Phylogenetic studies on saccharifying activity and fumonisin production in the strains of Kuro-koji molds and their relatives isolated from fermented foods. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)
- 8) Shiratori, N., Takino, M., Endo, O., Tulayakul, P., Kobayashi, N. and Sugita-Konishi, Y.: Risk potential of rice grains contaminated with an endophytic fungus *Penicillium brocae*. ISMYCO2016, Tokyo (2016, 12)

表 1 . 供試菌株

株番号	由来	株番号	由来
5364-1-3B	タイ米	SI595	外気
S209	大豆	SI603	外気
TSY0093	米	SI986	外気
TSY0581	ビニールクロス	SI1011	室内空気
TSY0585	牛の毛	NIHS4470	室内空気
TSY0587	ハウスダスト	NIHS4671	室内空気
TSY1086	アレルギー患者喀痰	NIHS4761	室内空気
Y84	ココア粉末	NIHS4768	室内空気
FSSN0002	トリュフ瓶詰	NIHS4895	室内空気
SN270272	タイ米	NIHS4932	室内空気
h48B	室内空気	NIHS4987	室内空気
h48C	室内空気	NIHS5003	室内空気
SI193	室内空気	NIHS5047	室内空気
SI360	室内空気	NIHS5056	室内空気
SI362	室内空気	NIHS5097	室内空気
SI423	室内付着	NIHS5124	室内空気
SI439	室内付着	NIHS5499	環境
SI446	室内付着	NIHS5500	環境
SI455	室内付着		

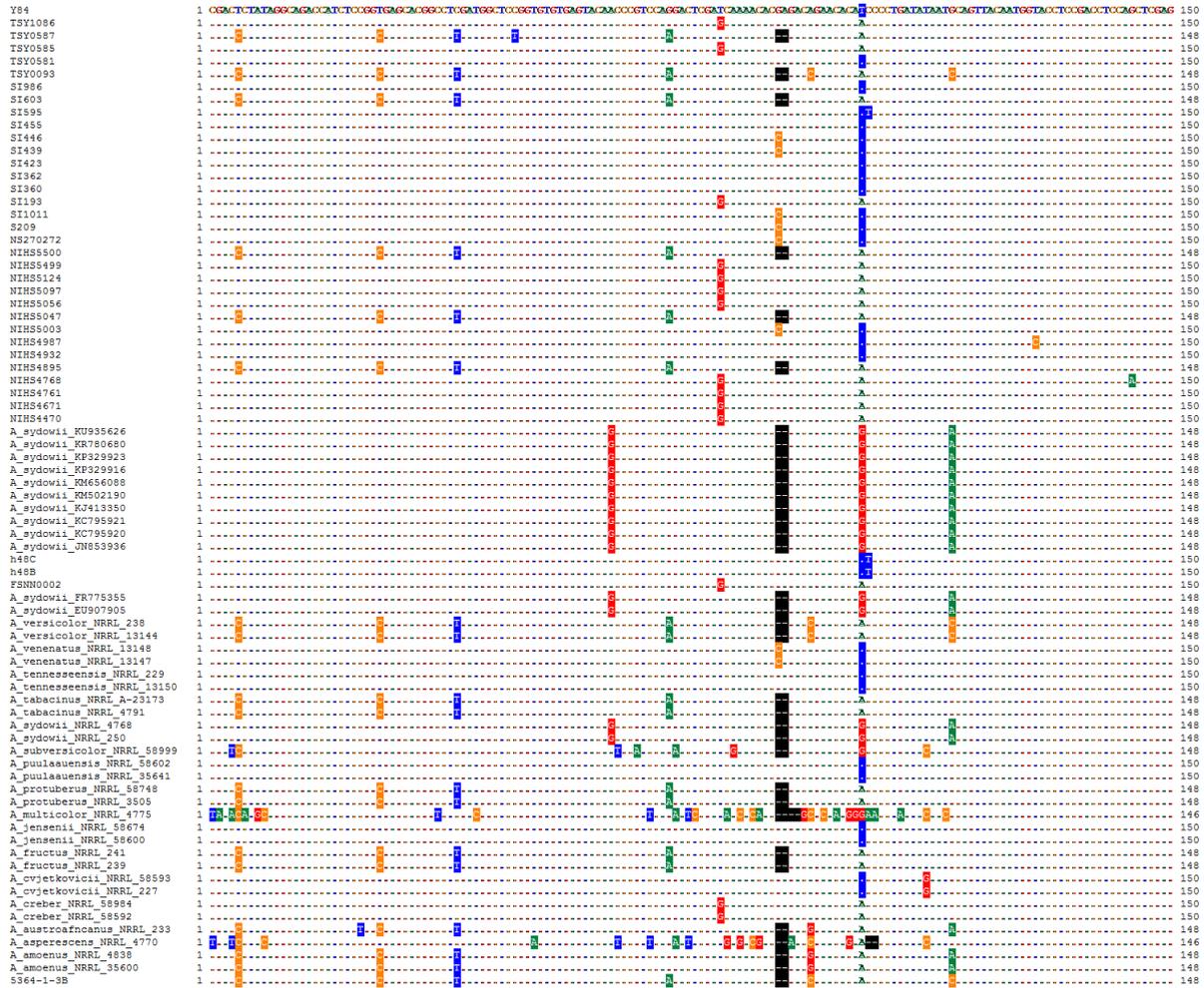


図1. β -tubulin 遺伝子部分配列アライメント.

供試菌株 37 株および *A. section Versicolores* に含まれる 14 種および外群 2 種 39 株の登録配列を用いた。全長 377 bp の内 150 bp を示した。

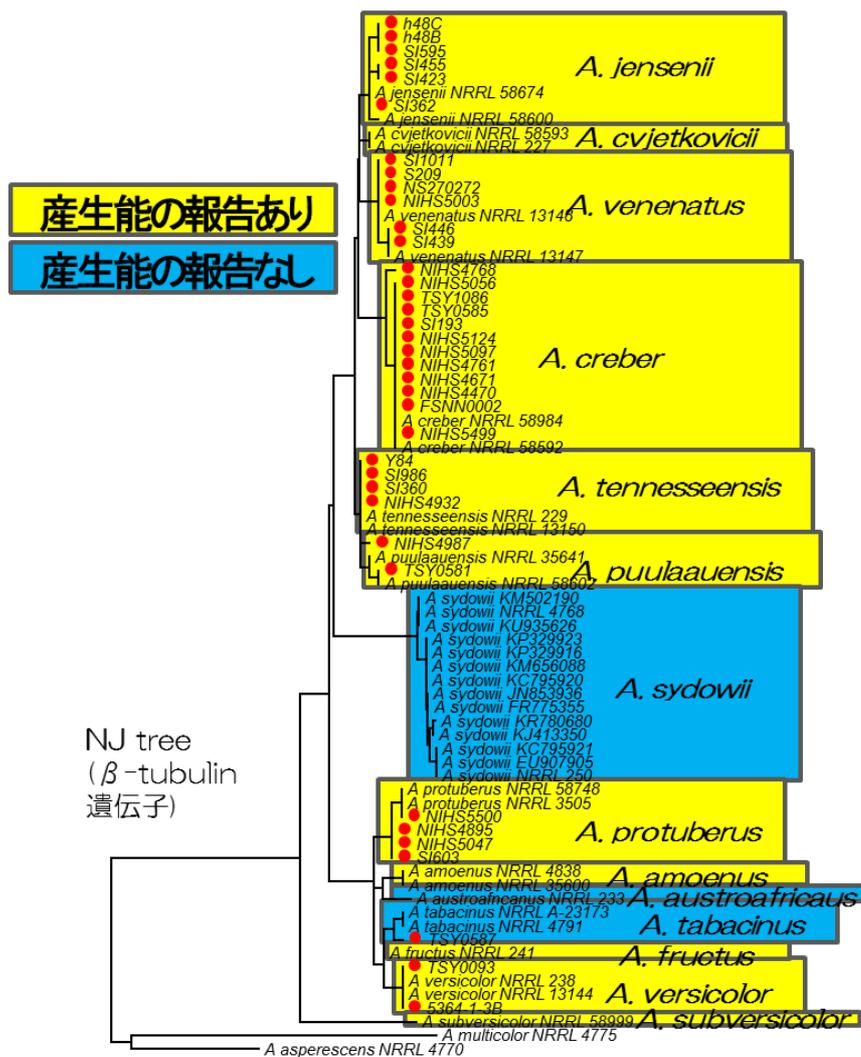


図2. 供試菌株の分生物学的同定.

赤丸は供試菌株を示す。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

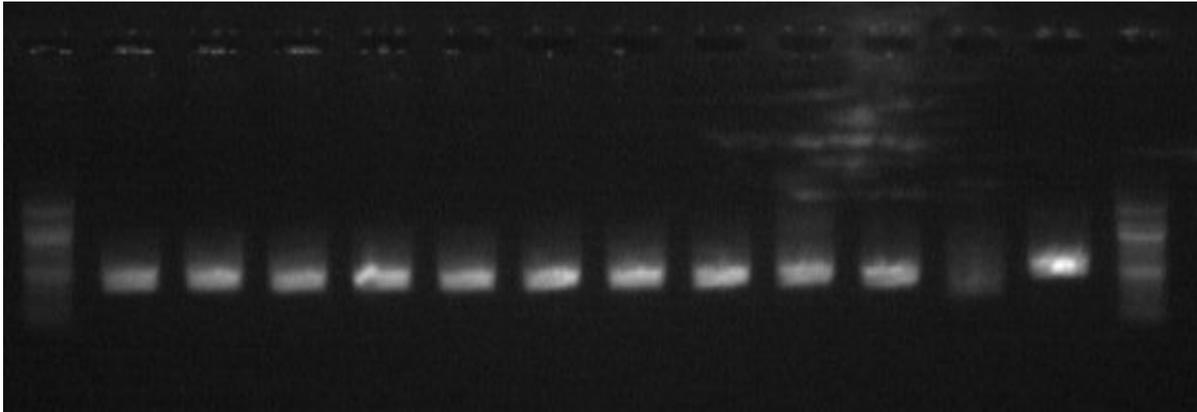
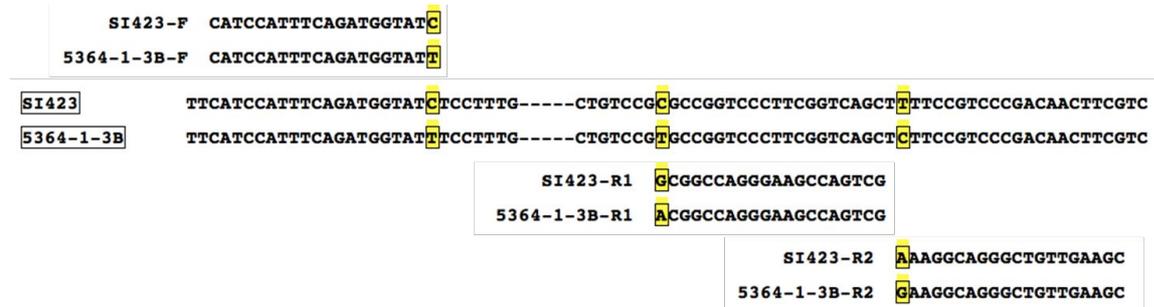


図3 .培養真菌由来DNA および玄米由来DNA における β -tubulin 遺伝子部分配列の増幅.
各レーン番号に対応するDNA サンプルは以下の通り。1. 培養真菌由来DNA (Y84)、2. 培養真菌由来DNA (FSSN0002)、3. 培養真菌由来DNA (NIHS5550)、4. 培養真菌由来DNA (S209)、5. 培養真菌由来DNA (*A.sydowii*)、6. 培養真菌由来DNA (5364-1-3B)、7. 培養真菌由来DNA (TSY0581)、8. 培養真菌由来DNA (TSY0587)、9. 培養真菌由来DNA (SI423)、10. 培養真菌由来DNA (SI455)、11. 玄米由来DNA (国内H地区産)、12. 玄米由来DNA (国内S地区産)、M. 分子量マーカー (100 bp DNA ladder)

A.



B.

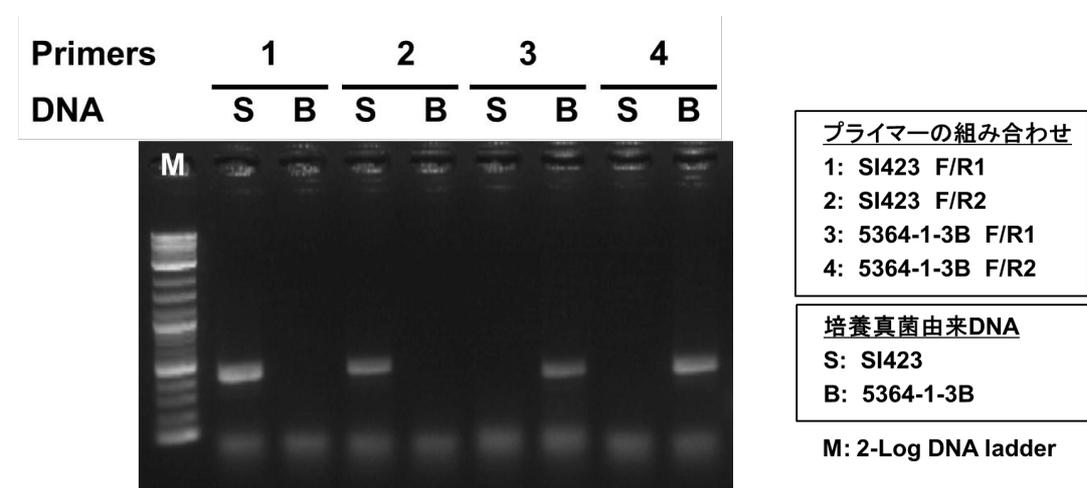


図4. 特異的PCR法の検討.

A. 使用したプライマーのアニーリング部位。B. 特異的増幅酵素を用いた β -tubulin 遺伝子部分配列の増幅結果

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					