

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29年度 総括研究報告書

研究代表者 小西 良子

平成29(2018)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-	5
小西 良子	
II . 分担研究報告	
1 . かび毒の発達神経毒性評価	----- 15
渋谷 淳	
2 . 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	
-----	34
吉成 知也	
(資料) 個票	
3 . 輸入食品の汚染カビ毒産生性真菌からの汚染カビ毒の予測--	58
小西 良子	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	
-----	71

## I . 總括研究報告

**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**

**総括研究報告書**  
**小西良子 (麻布大学 生命・環境科学部)**

**研究要旨**

かび毒は、世界的に汚染が報告されておりヒトや動物に対して健康被害を引き起こすため、国際的に対応が急がれている食品の有害物質のひとつである。そのためかび毒の世界的汚染および規制値の動向の情報を集めるとともに我が国独自の調査研究を行い、今後の施策策定の根拠とすることは、食の安全性確保において不可欠な課題である。現在 JECFA においてステリグマトシスティン(STC)およびジアセトキシシルベノール(DAS)についてリスク評価が行われたところであり、我が国においてのリスク評価も必要となる可能性が高い。そこで、本研究事業においてこれらについての毒性評価、暴露評価および簡易分析法の基礎的研究を行うこととした。

毒性評価として DAS 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。6.0 ppm を高用量として妊娠 ICR マウスを用いて発達期暴露試験(各群 13 匹)を行った。母動物は 6.0 ppm で摂餌量の低値が認められ、剖検時には 6.0 ppm で胸腺重量の低値と肝臓および腎臓の高値を認めた。児動物では、6.0 ppm で雌雄ともに生後 4 日目から 77 日目までの間、断続的な体重の低値を認めた。雄児動物で暴露終了時に 2.0 および 6.0 ppm で顆粒細胞層下帯における type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの減少を認めた。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は 0.6 ppm (0.09-0.29 mg/kg 体重/日)と判断された。

暴露評価は、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、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。本年度は、市販流通食品を対象とした汚染実態調査を行った。STC については、9 食品目計 182 検体の調査を行った。その結果、小麦粉、ハト麦、ソルガム、米、ライ麦、大麦及びインスタントコーヒーにおいて STC 陽性検体が認められた。陽性率が最も高かったのは国産小麦粉の 90%、次いでハト麦の 42%であった。最高濃度はハト麦における 4 µg/kg であった。4,15-DAS については、8 食品目 165 検体の調査を行った。ハト麦、ソルガム、小豆及びコーングリッツの 4 食品目において検出された。ハト麦で陽性率 67%、平均値が 9 µg/kg と汚染レベルが最も高かった。

簡易分析法の基礎的研究では、培養を行わずにかび毒産生菌を効率よく検出する方法の開発を行った。STC 産生菌種を多く含む *Aspergillus section Versicolores* を対象に、STC 産生菌種のみを検出する方法の開発および STC 産生非菌種を検出しない方法を試みた。*Aspergillus section Versicolores* に属する菌株の中で国内で最も高率に検出される、*A. creber* を対象にして当該菌種のみを検出することに改変型 DNA 合成酵素を用いる系で成功した。STC 非産生菌種 *A. sydowii* を除いた *Aspergillus section Versicolores* に属する菌種をまとめて検出する系の開発に成功した。次に玄米において、本方法の有効性を検討した。その結果、STC 汚染が確認された玄米では、全てにおいて STC 産生菌種が検出された。また、STC 未検出の玄米においても STC 産生菌種の存在が確認され、STC 産生菌の増殖前のリスクを検出することができた。

## A. 研究目的

かび毒は、世界的に汚染が報告されておりヒトや動物に対して健康被害を引き起こすため、国際的に対応が急がれている食品の有害物質である。そのためかび毒の世界的汚染および規制値の動向の情報を集めるとともに我が国独自の調査研究を行い、今後の施策策定の根拠とすることは、食の安全性確保において不可欠な課題である。厚労科研補助金による主要な食品汚染かび毒を対象とした調査研究は平成 13 年から行われており、今までの成果として CODEX 規格が策定されている総アフラトキシン、アフラトキシン M1、デオキシニバレノール、オクラトキシン A、フモニシン（平成 16-22 年）および、JECFA で国際的リスク評価が行われた T-2 及び HT-2 トキシン、ゼアラレノン（平成 23-27 年）のリスク評価に必要なデータを得ている。

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

## B. 研究方法

### 1. 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、一群あたり 13 匹ずつとして計 4 群に分け、DAS を 0、0.6、2.0、6.0 ppm の用量で妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで混餌投与した。DAS の乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 8 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、DAS 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）。出生後 21 日目（離乳時）に児動物の半数を解剖に供した。各群 10～13 例の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で 4% paraformaldehyde (PFA) / 0.1M リン酸バッファ

ーにより灌流固定を行った。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 (RELN)、parvalbumin (PVALB)、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である TUNEL、シナプス可塑性の指標として

activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC) および cyclooxygenase 2 (COX2) の各免疫染色を行った。母動物は分娩後 22 日に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺重量を測定後、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 DAS 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 10～13 例の雄児動物を灌流固定を行った。各群雌雄各 10～13 例の児動物は脳、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺重量を測定後、脳はメタカーンもしくは 10%中性緩衝ホルマリン液、その他の臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

### 2. 実態調査

#### (1) STC の汚染実態調査

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。精製は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。希釈液 20 mL（ビールのみ 5 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。インスタントコー

ヒ-については、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]<sup>+</sup>>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

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル : 水 (85 : 15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。精製は多機能カラム (昭和電工社製 Autoprep MF-T 1500) を用いた。ピールについては、試料 10.0 g をピペッターで 50 mL のメスフラスコにとり、蒸留水で 50 mL にメスアップした。Monospin C18 (GL サイエンス社製) に希釈液 0.5 mL を負荷した。蒸留水 0.3 mL で洗浄後、アセトニトリル 0.3 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 : 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]<sup>+</sup>>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。

2. 毒性評価

3. 簡易分析法の基礎的研究

(1) 供試菌株および米検体

食品および環境から分離した *Aspergillus section Versicolorese* 株を供試した米は平成 27 年度産の国産玄米 9 検体および平成 25 年度産国産玄米 4 検体を用いた。

(2) 培養真菌からのゲノム DNA 抽出

胞子をポテトデキストロース液体培地 (PDB) に接種して 25 °C で 2 日間培養し、ゲノム DNA の抽出は SDS 法<sup>1)</sup>または DNeasy plant mini kit (QIAGEN) を用いて添付のプロトコルに従って行った。

(3) 分子生物学的手法による菌種同定と STC 産生能の測定

-tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を PCR により増幅した。その後、PCR 産物をエタノール沈殿により精製し、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。登録配列は *Aspergillus section Versicolores* に含まれる 14 種<sup>3)</sup>および外群 2 種 39 株の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用した。このアライメン

トを基に MEGA6.0<sup>4)</sup>を用い、近隣結合法により系統樹を作成し、菌種の同定を行った。

STC 産生能は、得られた孢子をポテトデキストロース寒天培地 (PDA) に接種し、25 °C で 2 週間培養したのち、コルクボークで 1 cm<sup>2</sup> にくりぬき、メタノール：クロロホルム (1:2) を 1 mL 加えて振盪した。得られた素抽出物を、Silica gel 60 薄層版 (Merck 社) にスポットした。メタノール：クロロホルム (2:98) を用いて展開し、366 nm の光の下でシグナルを確認した。STC 標準品 (Major Chemicals) と同じ時間に現れるスポットを STC のシグナルと判断した。RNA polymerase 2 遺伝子部分配列の比較は、*Aspergillus section Versicolores* に含まれる種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用し、MEGA6.0<sup>4)</sup> を用い、ClustelW によりアライメントを行った。

#### (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。菌種特異的検出 PCR は、5 °C で作成したアライメントを基に、標的菌種の塩基配列がその他の菌種と異なる部分にプライマーを設計し、PCR を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 毒性評価

母動物は、摂餌量の低値が 6.0 ppm 群で分娩後 18 日および 21 日目に認められた。摂水量の高値は 0.6 ppm 群と 2.0 ppm 群で分娩後 1 日および 15 日目に認められた。

児動物は、6.0 ppm 群の雌雄児動物において、18 日目から 77 日目までは連続して体重の低値が認められた。母動物は、6.0 ppm で胸腺重量の低値と肝臓および腎臓の高値を示した。児動物は、暴露終了時雄児動物において脳絶対重量および肝臓、脾臓、腎臓の重量が低値を示し、雌児動物では脳絶対重量および肝臓重量が低値を示した。

また、成熟時には雌雄ともに脳絶対重量の低値および雄では腎臓の低値を認めた。脳重量の低値は出生後 77 日目にも持続して認められた。

離乳時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、SGZ において GFAP (type-1 神経幹細胞)、SOX2 (type-1 神経幹細胞 ~ type-2b 神経前駆細胞)、TBR2 (type-2b ~ type-3 神経前駆細胞)、DCX (type-3 神経前駆細胞 ~ 未熟顆粒細胞) の陽性細胞数が 2.0 および 6.0 ppm 群で有意に減少し、TUNEL (アポトーシス) の陽性細胞が 6.0 ppm 群で有意に増加した。また、歯状回門では、GABA 性介在ニューロンである PVALB 陽性細胞が 6.0 ppm 群で有意に減少した (Fig. 4)。一方、成熟時の雄児動物では、離乳時の顆粒細胞系譜の変化は全て回復したが、海馬歯状回では ARC 陽性細胞が 6.0 ppm で有意に減少し、歯状回門では RELN 陽性細胞数が 2.0 および 6.0 ppm 群で有意に増加した。

離乳時の雄児動物の脳における 6.0 ppm での遺伝子発現解析の結果、*Casp9* と *Casp12*、*Gria3*、*Grin2a*、*Slc17a7*、*Chrna7* の発現減少を認めた。一方、*Slc17a6* の発現増加を認めた。

### 2 実態調査

STC の添加回収率は 80~120%、4,15-DAS の添加回収率は 80~110% の範囲に収まった。

STC の汚染実態は、9 食品目計 182 検体の調査を行った。最も陽性率が高かったのは国産小麦粉の 90% であり、続いてハト麦の 42%、輸入小麦粉の 40%、ライ麦の 39% であった。最大濃度はハト麦の 4 μg/kg であった。輸入小麦粉、米、ライ麦及び大麦において陽性検体が認められたが、濃度は低かった。小豆及びビールでは陽性検体は認められなかった。

4,15-DAS では、8 食品目計 165 検体について実態調査を行った。最も陽性率が高かったのはハト麦の 67% であり、次いでソルガムの 57% であった。平均濃度が最も高かったのはハト麦のソルガム、

小豆及びコーングリッツに陽性検体は認められたが、ハト麦と比較して汚染濃度は低かった。最大濃度はハト麦で 54 µg/kg、平均濃度 9 µg/kg であった。

### 3. 簡易分析法の基礎的研究

#### (1) プライマーの設計

国内の食品および環境から多数分離した *Aspergillus* section *Versicolorese* の菌種の同定を行った。-tubulin 遺伝子部分配列(377 bp) を決定し、合計 60 株の配列データを得た。それぞれの菌株が含まれるクレードの登録配列の菌種をもとに同定を行った。供試菌株には、*A. amoenus* が 1 株、*A. creber* が 12 株、*A. jensenii* が 4 株、*A. protuberus* が 2 株、*A. puulaauensis* が 1 株、*A. sydowii* が 22 株、*A. tabacinus* が 1 株、*A. tennesseensis* が 10 株、*A. venenatus* が 3 株、*A. versicolor sensu stricto* が 4 株含まれた。60 株の分離・同定を行った結果、*Aspergillus* section *Versicolores* に属する 14 菌種の内、10 菌種の株を得ることができた。

STC 産生能に関しては、*A. creber* の 12 株中 8 株、*A. jensenii* の 4 株中 2 株、*A. tennesseensis* 10 株中 4 株、*A. venenatus* の 3 株中 1 株、*A. versicolor sensu stricto* の 4 株中 3 株で STC 産生能が確認された。*A. amoenus* (1 株)、*A. protuberus* (2 株)、*A. puulaauensis* (1 株)、*A. sydowii* (22 株) および *A. tabacinus* (1 株) においては、STC 産生株は検出されなかった。

国内において分離される *Aspergillus* section *Versicolores* の中で、分離頻度が高く、且つ STC 産生菌株の頻度が高い菌種である *A. creber* を用い、HiDi DNA polymerase を用いた PCR により、*A. creber* のみを特異的に増幅する系を検討した。HiDi DNA polymerase はプライマーの 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改変型 DNA 合成酵素であるため、データベース登録配列より、*A.*

*creber* が他の菌種と異なる配列を探索した。*RPB2* 遺伝子において、*A. creber* に特徴的な塩基配列が見出されたため、当該配列を基に *A. creber* のみを標的とするプライマーセットを設計した。さらに、*A. creber* では増幅がおこらない相補的なプライマーセットの設計も行った。これらのプライマーを使用して培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートに PCR を行ったところ、前者のプライマーセットでは *A. creber* 特異的に増幅が見られ、後者のプライマーセットでは *A. creber* では増幅が起こらず、他の菌種では増幅が確認された。このことから、HiDi DNA polymerase を用いた PCR により、国内の主要な STC 産生菌種と考えられる *A. creber* を特異的に検出することが可能であることが確認された。

次に *A. sydowii* は国内で最も高頻度に分離される *Aspergillus* section *Versicolores* だが、STC を産生しない菌種であることから、*A. sydowii* を除いて残りの *Aspergillus* section *Versicolores* の菌種をまとめて検出する、STC 産生菌を検出する系を検討した。*RPB2* 遺伝子において、*A. sydowii* のみで特異的に他の菌種と配列が異なる箇所をターゲットに、*A. sydowii* 以外の菌種の塩基配列と一致するプライマーセットを設計し、PCR を行ったところ、*A. sydowii* では増幅が見られず、その他の菌種では全てのサイズの増幅が観察された。この結果から、STC 産生菌種を多く含む *Aspergillus* section *Versicolorese* の中で STC 非産生菌種である *A. sydowii* 以外の菌種を特異的に増幅することが可能であることが確認された。

#### (2) 玄米における STC 産生菌の検出

*A. sydowii* 以外の菌種を特異的に増幅する PCR の系を用い、玄米からの STC 産生菌の検出を行った。STC による汚染が確認された玄米 5 検体と STC が検出されていない玄米 8 検体に付着するカビから DNA を抽出し、PCR を行った。その結果、STC が検出された玄米については全てにおいて



目的サイズの増幅産物が確認された。STC が未検出の玄米についても、8 検体中 7 検体で増幅産物が確認された。

#### D. 考察

DAS のマウスに対する発達期暴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、2.0 と 6.0 ppm において脳の SGZ における type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの減少と海馬歯状回門における神経新生制御系の発現減少を特徴とする神経新生障害が認められた。一方、歯状回での遺伝子発現解析において、0 ppm 対照群と 6.0 ppm 群の比較において、6.0 ppm 群でグルタミン酸作動性入力の種類受容体とアセチルコリン作動性入力の一部の受容体で発現低下が認められたことから、DAS による神経新生障害は 2.0 ppm 以上で type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの広い細胞標的性と、6.0 ppm ではさらに介在ニューロンの標的性が示唆された。出生後 77 日目では、離乳時に認められた顆粒細胞系譜の変化は消失したが、海馬歯状回において 6 ppm でシナプス可塑性に関わる ARC<sup>3</sup>陽性細胞の減少を認め、歯状回門においては神経細胞の移動や神経突起伸長などに関わる RELN<sup>4</sup>陽性細胞の増加を認めたことから、DAS の発達期暴露により成熟後の神経突起伸長の異常が示唆され、その修復応答として RELN の発現が増加したものと考えられた。これらの結果より、神経新生障害は不可逆的であることが示唆された。以上の実験から NOAEL を推測すると、母動物の摂取量で 0.6 ppm (0.09-0.29 mg/kg 体重/日) と算出される。これは、JECFA で評価された 0.03 mg/kg bw per day に近い数値であり、現在 JECFA が算出した PMTDI を支持する結果であった。

STC の実態調査では、昨年度同様国産小麦粉、ライ麦、ハト麦及びインスタントコーヒーから主に検出された。平均濃度は昨年度の結果と同程度

であった。今年度より新たに検査対象としてソルガムを加えたが、7 検体中 1 検体のみから STC が検出された。アフリカにおいてソルガムの STC 陽性検体の 10% から 100 µg/kg 以上の濃度で STC が検出されたとの報告があるため、調査は継続する必要がある。

4,15-DAS の汚染実態では、昨年度と同様にハト麦において陽性検体が多く認められた。日本産よりも東南アジア産の検体で検出濃度が高い傾向も同様であった 2 年間の調査では日本で摂取される主要な穀類中に 4,15-DAS の汚染は確認されていない。

日本では流通する輸入食品の割合の増加に伴い、検疫所でのモニタリングの頻度、対象食品量も増加している。そのため簡便でかつ正確なモニタリング手法が求められている。カビ毒の検査の場合、簡便な方法として ELISA やラテラルフローなどの検査法が開発されているが、サンプリングからの抽出に多くの手間がかかることやコストが高いことが障害となりあまり汎用されていない。そこでカビの汚染がなければカビ毒は汚染していないことから、農作物に汚染しているカビの有無からカビ毒の存在を予測する方法の開発を試みた。本研究で対象としている STC に注目し、その産生カビの検出を培養しないで検出する方法を開発した。

今年度は、輸入食品から菌株を収集することができなかったため、国内に分布する *Aspergillus section Versicolores* 60 株を分離・同定して用いた。その結果

A) STC 産生菌種 *A. creber* を特異的に検出する系

B) STC 非産生菌種 *A. sydowii* を除き、*Aspergillus section Versicolores* の他菌種をまとめて検出することで効率的に STC 産生菌種を検出する系

以上 2 つの系を、改変型 DNA 合成酵素 (HiDi DNA polymerase) を使用した PCR 技術を基に、*RPB2*

遺伝子上にプライマーを設計することで、目的の特定菌種のみを増幅して検出する方法を確立することができた。

また、確立した PCR の系のうち B ) の系を用いて、玄米からの STC 産生菌の検出を試み、本方法の有効性を検討した。玄米は平成 25 年度産または平成 27 年度産の国産玄米 13 検体を使用した。STC が機器分析で検出された玄米検体では全てにおいて目的サイズの増幅産物が得られ、STC 産生菌種による汚染が認められた(図 4)。一方で、STC 未検出の玄米検体においても 8 検体中 7 検体で目的サイズの増幅産物が見られた。これは、*Aspergillus secton Versicolores* 内の STC 非産生菌種による汚染を検出している可能性が考えられるが、STC 産生にいたらない少数の STC 産生菌種を検出している可能性が高い。本検査法は、サンプルからの抽出工程は無用で、一度に 94 検体が測定できることから、STC 汚染農作物のスクリーニング的検出法として優れている。

#### E. 結論

乳児が暴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 DAS の発達期暴露実験を行った。その結果、DAS の発達期暴露の影響は不可逆的であり、成熟後の神経突起伸長に影響を及ぼす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 0.6 ppm (0.09-0.29 mg/kg 体重/日) と判断された。

食品または飼料に付着したカビ由来の DNA を回収し、培養を行わずに PCR によって STC 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。今回開発した手法では 4 時間程度で検出が可能であり、STC 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

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 は小麦やコーヒーといった日本人における摂取量が多い食品で検出されることが確認された。4,15-DAS に

ついてはハト麦茶などのハト麦の加工品における汚染データを来年度収集する。

#### G. 研究業績

##### 【論文発表】

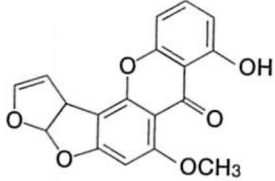
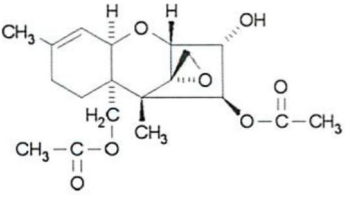
- 1) Onami J<sup>†</sup>, Watanabe M<sup>†</sup>, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kamata Y Takahashi H, Kawakami H, Terajima J: Study on Fumonisin-productivity of *Aspergillus* from Foods and Environment. *Food Safety* in press (†筆頭著者同等貢献者)
- 2) Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J and Sugita-Konishi, Y: Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Safety*, in press.
- 3) Yoshinari, T, Takeda, N, Watanabe, M, Sugita-Konishi, Y.: Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified Forms of 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. *Toxins (Basel)*. (2018)10(5). pii: E178. doi: 10.3390/toxins10050178.

##### 【学会発表】

- 1) Watanabe M, Suzuki Y, Takahashi H, Yoshinari T, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Goto K and Terajima J: Comparative study including fumonisin production on the phylogenetic tree of kuro-koji molds and their relatives isolated from Japanese fermented foods. *UJNR* (2017, 5, Washington DC)
- 2) Kobayashi N, Kubosaki A, Shiratori N,

- Watanabe M, Terajima J and Sugita-Konishi Y: Classification and sterigmatocystin-production of *Aspergillus* section *Versicolores* from Japanese foods and environments. UJNR (2017, 5, Washington DC)
- 3) 窪崎敦隆、小林直樹、高橋治男、吉成知也、高鳥浩介、寺嶋淳、小西良子、渡辺麻衣子. 高度識別型 DNA 合成酵素を用いた玄米汚染真菌の検出. 第 44 回日本防菌防黴学会 (2017, 9, 大阪)
  - 4) 小林直樹、窪崎敦隆、渡辺麻衣子、小沼ルミ、上原さとみ、高橋由美、矢内美幸、寺嶋淳、高橋治男、高鳥浩介、小西良子. *Aspergillus* section *Versicolores* におけるステリグマトシスチン産生菌種の分子生物学的検出方法の開発. 日本マイコトキシン学会第 80 回学術講演会 (2017, 7, 東京)
  - 5) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子. 国内で分離された *Aspergillus ochraceus* の再同定とその OTA 産生性. 日本マイコトキシン学会第 81 回学術講演会 (2018, 1, 東京)
  - 6) 窪田祐恵、尾畑瑠衣、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子. 野菜由来乳酸菌のアフラトキシン類への結合能と胃内環境での挙動. 日本マイコトキシン学会第 81 回学術講演会 (2018, 1, 東京)
  - 7) 尾畑瑠衣、窪田祐恵、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子. アフラトキシン結合能を有する野菜由来乳酸菌の探索と消化液での安定性に関する研究. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会 (2017, 11, 東京)
  - 8) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子. *Aspergillus ochraceus* sensu lato における OTA 産生と OTA 生合成関連遺伝子の保有状況. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会 (2017, 11, 東京)
  - 9) 中島 康太、渡邊 洋佑、水上 さやか、猪鼻 真理、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳: シトレオピリジンのマウス発達期曝露による海馬歯状回における神経新生障害の可逆性と制御系シグナルの発現変動、第44回日本毒性学会学術年会、横浜、第44回日本毒性学会学術年会要旨集: P-42、S 229、7月10-12日、2017
  - 10) 中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、吉田 敏則、渋谷 淳: T-2 toxinのマウス発達期曝露による海馬歯状回及び小脳における metallothionein発現増加と発現細胞の同定、第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄、第34回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集: P-56、p.93、1月25-26日、2018

表 1 . 本研究のまとめ

	ステリグマトシスチン (STC)	ジアセトキシシルペノール (DAS)
化学構造	 <p>molecular weight 324.28 Da</p>	 <p>molecular weight 366.4Da</p>
汚染実態	国産小麦粉、ライ麦、ハト麦及びインスタントコーヒー、ソルガムから検出	ハトムギから検出 平成 30 年度ハト麦茶などのハト麦の加工品における汚染データを実施予定
分析法	LC-MS/MS 平成 28 年度本事業で妥当性確認済	LC-MS/MS 平成 28 年度本事業で妥当性確認済
簡易直接測定法	平成 30 年度 実施予定	玄米から STC 産生 <i>Aspergillus</i> section <i>Versicolores</i> の非培養検出法の開発に成功
毒性評価	平成 30 年度 実施予定	母動物の摂取量で 0.6 ppm ( 0.09–0.29 mg/kg 体重/日 ) (JECFA 0.03 mg/kg bw per day)
今後の予定	平成 30 年度に暴露評価を行う。	平成 30 年度に暴露評価を行う。
期待される成果	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ STCおよびDASを対象とした毒性評価・汚染実態を基とした暴露評価が明らかになり、今後のリスク評価の科学的根拠となる。</li> <li>・スクリーニングを含めた分析法が確立されたことにより、基準値策定への検討が容易となる。</li> <li>・本事業で得られた成果は、CODEX 委員会へのデータ提供に寄与するとともに、国際学術誌への掲載により、今後 JECFA 等の国際的リスク評価時に引用される。</li> </ul>	

**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 29 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 29 年度はフザリウム属の真菌により産生されるかび毒であり、神経毒性を誘発することが懸念されるジアセトキシシルペノール (Diacetoxyscirpenol: DAS) 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。6.0 ppm を高用量として選択し、公比 3 で投与群 (0、0.6、2.0、6.0 ppm) を設定し、妊娠 ICR マウスを用いて発達期暴露試験 (各群 13 匹) を行った。妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで母動物に対して混餌投与することにより、児動物に発達期暴露し、出生後 21 日目 (離乳時) と 77 日目 (成熟時) にそれぞれ解剖を行った。母動物は 6.0 ppm で分娩後 18 日および 21 日目に摂餌量の低値が認められた。また、剖検時には 6.0 ppm で胸腺重量の低値と肝臓および腎臓の高値を認めた。一方、児動物では、6.0 ppm で雌雄ともに生後 4 日目から 77 日目までの間、断続的な体重の低値を認めた。暴露終了時の剖検時には、雄児動物で脳絶対重量および肝臓、脾臓、腎臓の絶対及び相対重量が低値を示し、雌児動物では脳絶対重量および肝臓重量が低値を示した。また、出生後 77 日には雌雄ともに脳絶対重量の低値を示し、雄では腎臓の低値を認めた。雄児動物を対象とした海馬歯状回における神経新生への影響を解析した結果、暴露終了時に 2.0 および 6.0 ppm で顆粒細胞層下帯における type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの減少を認めた。また、6.0 ppm で海馬歯状回門における PVALB 陽性の GABA 性介在ニューロンの減少を認めた。成熟時には暴露終了時の顆粒細胞系譜の変化は回復したが、海馬歯状回の顆粒細胞層では 6.0 ppm で ARC 陽性細胞の減少、歯状回門では 2.0 および 6.0 ppm で RELN 陽性細胞の増加を示し、DAS による神経新生障害が不可逆的である可能性が示唆された。さらに、離乳時における 6.0 ppm での遺伝子発現解析の結果、アポトーシス関連遺伝子 (*Casp9* と *Casp12*)、AMPA 型グルタミン酸受容体をコードする *Gria3*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2a*、グルタミン酸トランスポーターをコードする *Slc17a7*、およびアセチルコリン受容体をコードする *Chrna7* の発現減少、*Slc17a6* の発現増加を認めた。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は 0.6 ppm (0.09–0.29 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、基準値設定によるかび毒に高濃度に汚染された食品の排除が効果的であり、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 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その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。神経新生部位は、神経幹細胞の自己複製、神経前駆細胞の増殖および分化(神経突起伸展や髄鞘形成)、神経細胞移動などの神経成熟の全ての過程を含み、発達神経毒性を検出できる可能性を示している。

平成 29 年度は、穀物汚染が危惧されているフザリウム属の真菌によって産生され、神経毒性が懸念されているジアセトキシシルペノール (Diacetoxyscirpenol: DAS) を評価対象とした。DAS 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 DAS 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 日目から分娩後 21 日目まで経胎盤、経乳的に児動物に対して暴露させ、暴露終了時(離乳時)ならびに出生後 77 日目(成熟時)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、一群あたり 13 匹ずつとして計 4 群に分け、DAS を 0、0.6、2.0、6.0 ppm の用量で妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで混餌投与した。最高用量は予備的に 0、8、16 ppm を設定して母動物に対して混餌投与した際に、16 ppm で全例が死産、8 ppm で児動物の体重減少と脳、肝臓、腎臓重量の減少、少数個体に吻端の矮小化が認められたため、母動物への軽度な毒性とともに妊娠の維持と児動物への重篤な毒性が出ない事が期待される 6.0 ppm に設定した。DAS の乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 8 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、DAS 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(1 群: n=10; 2、3 群: n=13; 4 群: n=11)に雄 6 例、雌 4 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 10~13 例の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で 4% paraformaldehyde (PFA) / 0.1M リン酸バッファーにより灌流固定を行った。各群雄 15~22 例、雌 10 例の児動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺重量を測定後、脳はメタカーンもしくは 10% 中性緩衝ホルマリン液、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 カ所で冠状断面を製作して、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 厚の連続切片を製作した。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 (RELN)、parvalbumin (PVALB)、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である TUNEL、シナプス可塑性の指標として activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC) および cyclooxygenase 2 (COX2) の各免疫染色を行った。GFAP、SOX2、TBR2、DCX、PCNA および TUNEL 陽性細胞数については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、RELN および PVALB 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を算出した。なお、NeuN 陽性細胞数については、海馬歯状回顆粒細胞層下帯における単位長さ当たりの陽性細胞数と、海馬歯状回門における単位面積当たりの陽性細胞数の両方について検討した。また、ARC および COX2 陽性細胞数については、顆粒細胞層 (GCL) における計測を行い、SGZ の単位長さ当たりの陽性細胞数を算出した。

母動物は分娩後 22 日に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺重量を測定後、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 DAS 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 10~13 例の雄児動物を CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 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 10~13 例の児動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺重量を測定後、脳はメタカーンもしくは 10% 中性緩衝ホルマリン液、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 6.0 ppm 群のメタカーン固定脳標本を用いて、大脳の Bregma の後方約 -2.2 mm の 2 mm 厚切片より海馬歯状回部分を採取し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。2 μg の total RNA から SuperScript<sup>®</sup> 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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 深麻酔下での灌流固定ならびに腹大動脈および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 6.0 ppm 群で分娩後 18 日および 21 日目に認められた。摂水量の高値が 0.6 ppm 群と 2.0 ppm 群で分娩後 1 日および 15 日目に認められた。体重には DAS の影響と思われる変化は認められなかった (Fig. 1)。

児動物は、6.0 ppm 群の雌雄児動物において、出生後 4 日目から 15 日目までは断続的に、18 日目から 77 日目までは連続して体重の低値が認められた (Fig. 2)。

#### 着床数、産仔数：

着床数、産仔数に DAS による影響は認められなかった (Table 1)。

#### 臓器重量：

母動物は、6.0 ppm で胸腺重量の低値と肝臓および腎臓の高値を示した。児動物は、暴露終了時の剖検で、雄児動物において脳絶対重量および肝臓、脾臓、腎臓の重量が低値を示し、雌児動物では脳絶対重量および肝臓重量が低値を示した。また、成熟時には雌雄ともに脳絶対重量の低値および雄では腎臓の低値を認めた。脳重量の低値は出生後 77 日目にも持続して認められた。(Table 3)。

#### 免疫組織学的変化：

離乳時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、SGZ において GFAP (type-1 神経幹細胞)、SOX2 (type-1 神経幹細胞 ~ type-2b 神経前駆細胞)、TBR2 (type-2b ~ type-3 神経前駆細胞)、DCX (type-3 神経前駆細胞 ~ 未熟顆粒細胞) の陽性細胞数が 2.0 および 6.0 ppm 群で有意に減少し (Fig. 3)、TUNEL (アポトーシス) の陽性細胞が 6.0 ppm 群で有意に増加した (Fig. 5)。また、歯状回門では、GABA 性介在ニューロンである PVALB 陽性細胞が 6.0 ppm 群で有意に減少した (Fig. 4)。一方、成熟時の雄児動物を対象とした脳海馬歯状回における免疫染色の結果、離乳時の顆粒細胞系譜の変化は全て回復したが (Fig. 3)、海馬歯状回では ARC 陽性細胞が 6.0 ppm で有意に減少し (Fig. 6)、歯状回門では RELN 陽性細胞数が 2.0 および 6.0 ppm 群で有意に増加した (Fig. 4)。

#### 遺伝子発現解析：

離乳時の雄児動物の脳における 6.0 ppm での遺伝子発現解析の結果、アポトーシス関連遺伝子である *Casp9* と *Casp12*、AMPA 型グルタミン酸

受容体をコードする *Gria3*、NMDA 型グルタミン酸受容体をコードする *Grin2a*、グルタミン酸トランスポートをコードする *Slc17a7*、およびアセチルコリン受容体をコードする *Chrna7* の発現減少を認めた (Table 4)。一方、グルタミン酸トランスポートをコードする *Slc17a6* の発現増加を認めた (Table 4)。神経成長因子および抗酸化関連遺伝子群には発現変動は認められなかった。

#### D. 考察

DAS のマウスに対する発達期暴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学的解析の結果、出生後 21 日目で、2.0 と 6.0 ppm において脳の SGZ における type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの減少と海馬歯状回門における神経新生制御系の発現減少を特徴とする神経新生障害が認められた。一方、歯状回での遺伝子発現解析において、0 ppm 対照群と 6.0 ppm 群の比較において、6.0 ppm 群でグルタミン酸作動性入力の種類受容体とアセチルコリン作動性入力の一部の受容体で発現低下が認められたことから、DAS による神経新生障害は 2.0 ppm 以上で type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの広い細胞標的性と、6.0 ppm ではさらに介在ニューロンの標的性が示唆された。SGZ では TUNEL 陽性細胞数が 6.0 ppm で増加しており、DAS によりアポトーシスが誘導されたと考えられたが、遺伝子解析ではアポトーシス関連遺伝子に変化は見られず、誘導されたアポトーシスの経路について、さらなる検索が必要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、PVALB 陽性細胞数が 6.0 ppm 群で減少を示した。PVALB 陽性介在ニューロンは神経前駆細胞、特に type-2 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り、type-3 神経前駆細胞における前駆細胞指標の発現低下を示した可能性が示唆された。また、出生後の神経新生



の促進に関わるとされるグルタミン酸受容体<sup>1)</sup> およびトランスポーターをコードする *Gria3*、*Grin2a*、*Slc17a7* や、神経新生と神経細胞の分化に関わるとされるアセチルコリン受容体<sup>2)</sup>をコードする *Chrna7* の発現量低下も顆粒細胞系譜の減少に寄与しているものと考えられた。

出生後 77 日目では、離乳時に認められた顆粒細胞系譜の変化は消失したが、海馬歯状回において 6 ppm でシナプス可塑性に関わる ARC<sup>3)</sup>陽性細胞の減少を認め、歯状回門においては神経細胞の移動や神経突起伸長などに関わる RELN<sup>4)</sup>陽性細胞の増加を認めたことから、DAS の発達期暴露により成熟後の神経突起伸長の異常が示唆され、その修復応答として RELN の発現が増加したものと考えられた。これらの結果より、神経新生障害は不可逆的であることが示唆された。現在、DAS による神経新生障害に関するメカニズムについて検索中である。

## E. 結論

乳児が暴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 DAS の発達期暴露実験を行った。母動物は、6.0 ppm で胸腺重量の低値と肝臓および腎臓重量の高値を認めた。児動物は、暴露終了時において 2.0 ppm と 6.0 ppm で海馬顆粒細胞層下帯における type-1 神経幹細胞から type-3 神経前駆細胞までの減少と、6.0 ppm で海馬歯状回門における神経新生制御系である PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロン数の減少を特徴とする神経新生障害が認められた。また、暴露終了時の遺伝子発現検索では、神経新生制御系の発現低下を認め、免疫染色結果の顆粒細胞系譜の減少を支持する結果となった。成熟時には暴露終了時の顆粒細胞系譜の変化は回復したが、海馬歯状回では 6.0 ppm で ARC 陽性細胞の減少、歯状回門では 2.0 および 6.0 ppm で RELN 陽性細胞の増加を示し、DAS による神経新生障害が不可逆的である可能

性が示唆された。DAS の発達期暴露の影響は不可逆的であり、成熟後の神経突起伸長に影響を及ぼす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 0.6 ppm (0.09–0.29 mg/kg 体重/日) と判断された。

## F. 参考文献

- 1) Jansson LC, Åkerman KE. The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014 Aug;121(8):819-36.
- 2) Yadav R, Deepshikha D, Srivastava P. Homology Modeling and Protein Interaction Map of CHRNA7 Neurogenesis Protein. *Ann Neurosci*. 2017 Jul;24(3):173-179.
- 3) Guzowski JF. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*. 2002;12(1):86-104.
- 4) Niu S, Yabut O, D'Arcangelo G. The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2008 Oct 8;28(41):10339-48.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

中島 康太、渡邊 洋佑、水上 さやか、猪鼻 真理、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳：シトロピロジンのマウス発達期曝露による海馬歯状回における神経新生障害の可逆性と制御系シグナルの発現変動、第44回日本毒性学会学術年会、横浜、第44回日本毒性学会学術年会要旨集：P-42、S 229、7月10-12日、2017

中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、吉田 敏則、  
渋谷 淳：T-2 toxinのマウス発達期曝露による海  
馬歯状回及び小脳におけるmetallothionein発現増  
加と発現細胞の同定、第34回日本毒性病理学会総  
会及び学術集会、沖縄、第34回日本毒性病理学会  
学術集会講演要旨集：P-56、p.93、1月25-26日、  
2018

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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

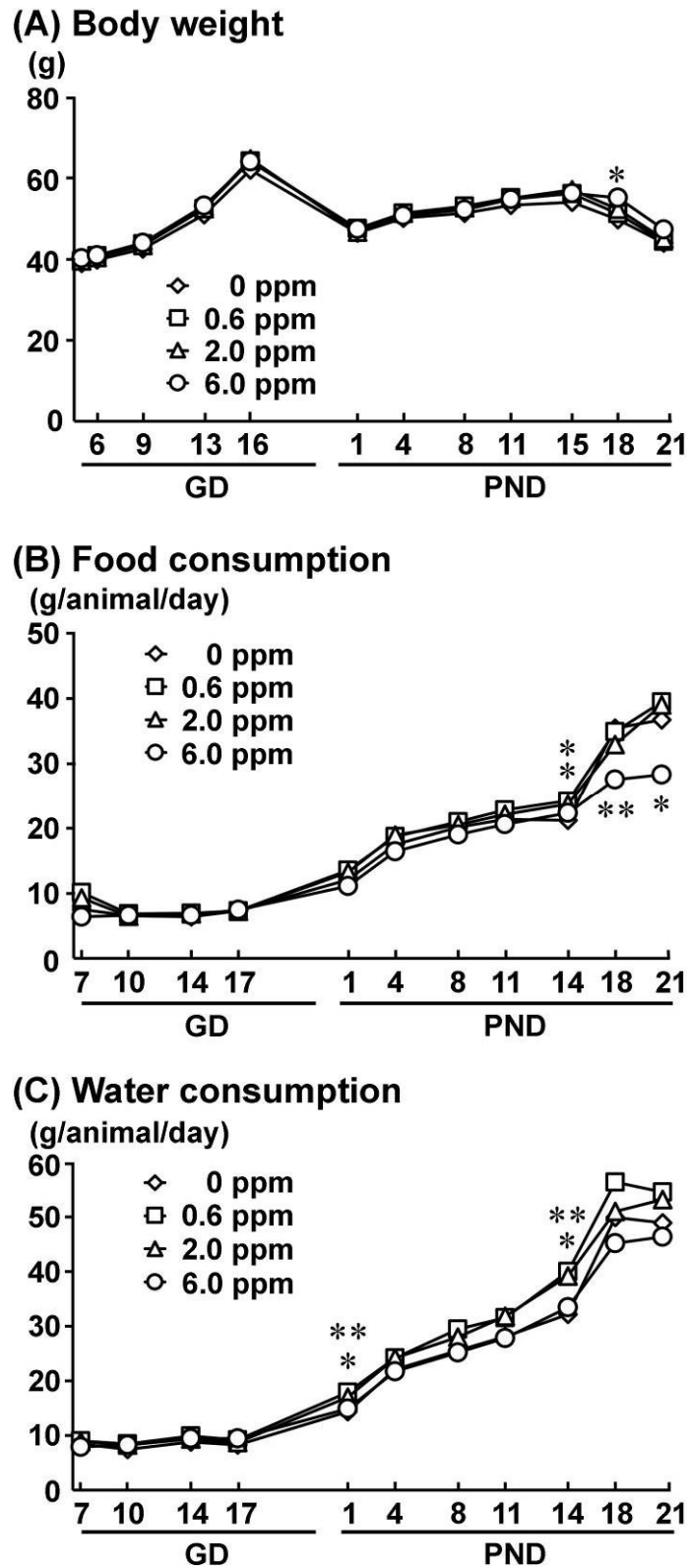
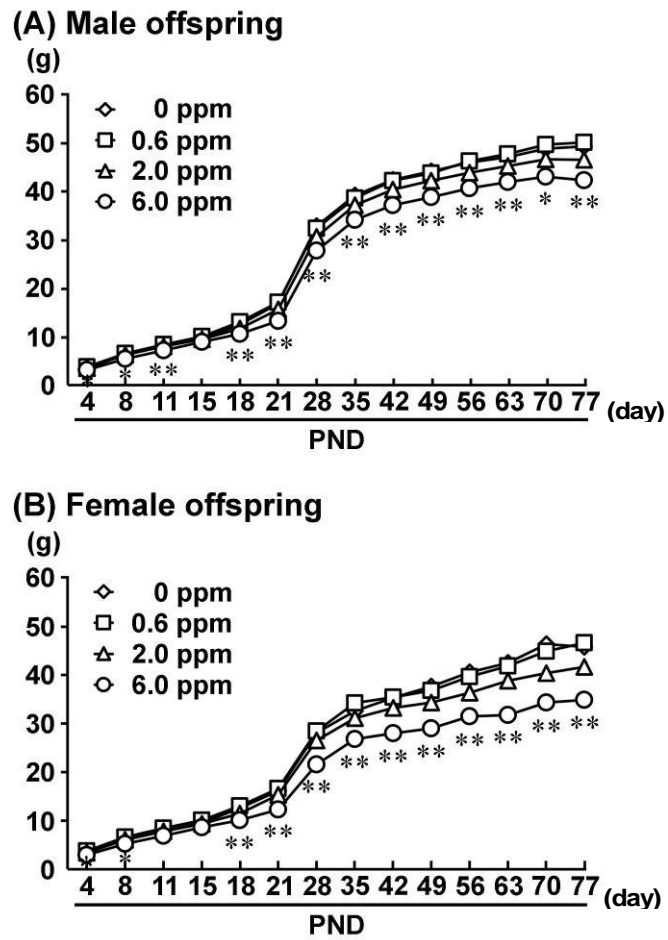


Figure 1. Body weight, food consumption and water consumption of dams given diacetoxyscirpenol from GD 6 to PND 21 in the diet.

(A) Body weight. (B) Food consumption. (C) Water consumption.

\*, \*\* 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 exposed to diacetoxyscirpenol 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 diacetoxyscirpenol from GD 6 to PND 21**

	Diacetoxyscirpenol (ppm)				
	0 (Control)	0.6	2.0	6.0	
No. of dams examined	10	13	13	12	
<b>Reproductive parameters</b>					
No. of implantation sites	13.20±2.44	13.92±2.66	14.92±1.93	15.33±2.87	
No. of live offspring	11.70±2.45	12.85±2.48	14.08±2.22	13.00±2.09	
<b>General parameters on GD</b>					
Mean body weight (g)	46.86±4.39	48.16±3.18	48.12±3.29	48.48±5.18	
Food intake (g/animal/day) <sup>a</sup>	6.98±0.61	7.00±0.73	7.16±1.19	6.77±1.12	
Water consumption (g/animal/day) <sup>a</sup>	8.23±1.04	9.10±1.81	8.80±0.99	8.74±1.82	
<b>General parameters on PND</b>					
Mean body weight (g)	49.87±3.32	51.27±2.89	51.45±2.90	51.99±4.57	
Food intake (g/animal/day) <sup>a</sup>	23.47±1.84	24.92±1.48	23.84±2.09	20.76±2.30	
Water consumption (g/animal/day) <sup>a</sup>	31.57±1.87	36.31±4.82	34.91±4.53	30.64±4.90	
<b>Body and organ weights at PND 22</b>					
Body weight (g)	43.97±3.89	44.43±3.25	44.98±3.10	47.34±5.57	
Brain weight	Absolute (g)	0.48±0.02	0.50±0.01	0.50±0.03	0.50±0.02
	Relative (g/100g BW)	1.11±0.07	1.12±0.09	1.11±0.10	1.06±0.11
Thymus weight	Absolute (g)	0.07±0.02	0.06±0.02	0.07±0.02	0.04±0.01**
	Relative (g/100g BW)	0.15±0.03	0.14±0.04	0.15±0.04	0.09±0.02**
Liver weight	Absolute (g)	2.90±0.29	3.09±0.39	2.99±0.36	3.57±0.82*
	Relative (g/100g BW)	6.59±0.53	6.96±0.75	6.64±0.47	7.48±0.98*
Spleen weight	Absolute (g)	0.15±0.05	0.13±0.02	0.15±0.02	0.16±0.04
	Relative (g/100g BW)	0.34±0.09	0.30±0.06	0.32±0.04	0.33±0.08
Kidney weight	Absolute (g)	0.57±0.03	0.57±0.05	0.61±0.06	0.69±0.08**
	Relative (g/100g BW)	1.31±0.11	1.28±0.11	1.35±0.11	1.47±0.15**
<b>Diacetoxyscirpenol intake (mg/kg BW/day)</b>					
GD, mg/kg body weight/day <sup>a</sup>	0	0.09±0.01	0.30±0.04	0.84±0.15	
PND, mg/kg body weight/day <sup>a</sup>	0	0.29±0.02	0.93±0.10	2.40±0.26	

Mean±SD.

<sup>a</sup> Mean value of each week.

*Abbreviation:* BW; body weight, GD; gestation day, PND; postnatal day.

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

**Table 2. Primary antibodies and experimental conditions used in immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clonality	Clone number	Dilution	Antigen retrieval condition	Manufacturer
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	ARC	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	Microwaving, pH 6.0 <sup>a)</sup>	Synaptic Systems (Goettingen, Germany)
Cyclooxygenase 2	COX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	33	1:200	Autoclaving, pH 6.0 <sup>b)</sup>	BD Transduction Laboratories
Doublecortin	DCX	Rabbit	Polyclonal IgG	n.a.	1:1000	None	Abcam Inc. (Cambridge, UK)
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	GA5	1:200	None	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	A60	1:100	None	EMD Millipore
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	PARV-1 9	1:1000	Microwaving, pH 6.0	EMD Millipore
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Mouse	Monoclonal IgG <sub>2a</sub>	PC10	1:200	None	Dako (Glostrup, Denmark)
Reelin	RELN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	G10	1:1000	None	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Sex determining region Y (SRY)-box 2	SOX2	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	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.

<sup>a)</sup> Microwaving at 90 °C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

<sup>b)</sup> 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**

		Diacetoxyscirpenol in diet (ppm)			
		0 (Control)	0.6	2.0	6.0
Male offspring on PND 21					
No. of animals examined		30	39	40	32
Body weight (g)		16.85±1.37 <sup>a</sup>	17.13±1.67	15.59±2.12	13.26±1.28 **
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.44±0.04	0.45±0.02	0.43±0.02	0.39±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	2.69±0.29	2.67±0.23	2.94±0.48 *	3.13±0.36 **
Thymus	Absolute (g)	0.09±0.02	0.09±0.02	0.08±0.03	0.07±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.56±0.14	0.55±0.12	0.54±0.12	0.54±0.11
Liver	Absolute (g)	0.87±0.13	0.86±0.14	0.75± <sup>0.12</sup> <sub>**</sub>	0.56±0.11 **
	Relative (g/100g BW)	5.28±0.43	5.09±0.49	5.02±0.37	4.33±0.33 **
Spleen	Absolute (g)	0.14±0.04	0.13±0.03	0.12±0.04	0.09±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.83±0.18	0.79±0.15	0.80±0.20	0.67±0.13 **
Kidneys	Absolute (g)	0.26±0.04	0.26±0.04	0.23± <sup>0.03</sup> <sub>**</sub>	0.18±0.04 **
	Relative (g/100g BW)	1.57±0.17	1.54±0.15	1.54±0.14	1.39±0.17 **
Female offspring on PND 21					
No. of animals examined		18	15	12	11
Body weight (g)		16.19±1.14	16.66±1.44	15.34±2.09	12.37±1.68 **
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.43±0.03	0.44±0.02	0.42±0.02	0.38±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	2.88±0.27	2.71±0.19	3.09±0.48	3.20±0.33 *
Thymus	Absolute (g)	0.09±0.02	0.10±0.01	0.08±0.02	0.07±0.02 *
	Relative (g/100g BW)	0.59±0.08	0.58±0.07	0.54±0.10	0.60±0.13
Liver	Absolute (g)	0.72±0.09	0.76±0.09	0.65±0.10	0.52±0.07 **
	Relative (g/100g BW)	4.72±0.27	4.64±0.29	4.64±0.25	4.31±0.16 **
Spleen	Absolute (g)	0.13±0.02	0.14±0.02	0.12±0.04	0.09±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.86±0.14	0.83±0.11	0.85±0.22	0.73±0.15
Kidneys	Absolute (g)	0.23±0.03	0.25±0.02	0.21±0.03	0.16±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	0.70±0.04	0.79± <sup>0.06</sup> <sub>**</sub>	0.71±0.05	0.73±0.05
Male offspring on PND 77					
No. of animals examined		10	13	13	11
Body weight (g)		49.26±4.46	50.15±3.55	46.48±4.49	42.32± <sup>3.18</sup> <sub>**</sub>
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	0.49±0.02	0.49±0.02	0.48±0.02	0.45±0.01

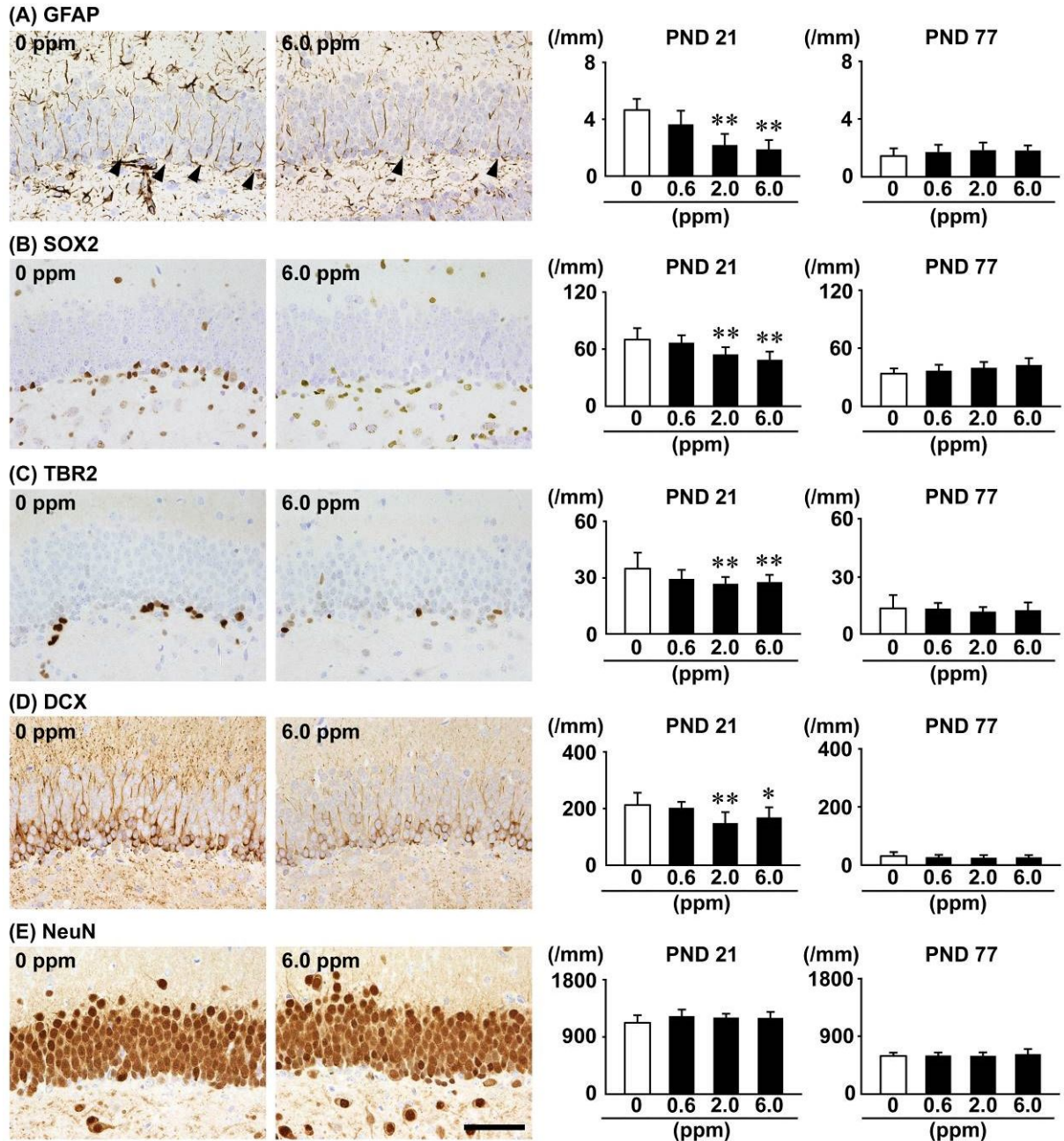


					**
	Relative (g/100g BW)	1.02±0.11	0.99±0.07	1.06±0.11	1.06±0.11
Thymus	Absolute (g)	0.05±0.02	0.07±0.04	0.06±0.03	0.05±0.04
	Relative (g/100g BW)	0.10±0.04	0.15±0.07	0.13±0.06	0.13±0.09
Liver	Absolute (g)	2.56±0.23	2.38±0.26	2.29±0.31	2.15±0.31 *
	Relative (g/100g BW)	5.23±0.33	4.77±0.34	4.95±0.42	5.10±0.91
Spleen	Absolute (g)	0.14±0.03	0.13±0.02	0.12±0.02	0.13±0.04
	Relative (g/100g BW)	0.29±0.06	0.26±0.04	0.27±0.05	0.30±0.09
Kidneys	Absolute (g)	0.82±0.10	0.74±0.13	0.76±0.09	0.63± <sup>0.06</sup> <sub>**</sub>
	Relative (g/100g BW)	1.53±0.09	1.51±0.07	1.55±0.16	1.33± <sup>0.09</sup> <sub>**</sub>
Female offspring on PND 77					
	No. of animals examined	10	13	12	12
	Body weight (g)	45.86±5.82	46.69±6.18	41.75±7.51	34.90±5.36 **
	Organ weight				
Brain	Absolute (g)	0.50±0.01	0.50±0.03	0.49±0.03	0.43±0.02 **
	Relative (g/100g BW)	1.11±0.13	1.09±0.13	1.20±0.20	1.26±0.19
Thymus	Absolute (g)	0.09±0.03	0.07±0.03	0.09±0.03	0.06±0.03
	Relative (g/100g BW)	0.19±0.06	0.16±0.05	0.21±0.06	0.17±0.06
Liver	Absolute (g)	1.96±0.25	2.05±0.32	1.86±0.32	1.59±0.27 *
	Relative (g/100g BW)	4.31±0.60	4.39±0.33	4.48±0.48	4.57±0.29
Spleen	Absolute (g)	0.16±0.05	0.16±0.03	0.17±0.04	0.13±0.02
	Relative (g/100g BW)	0.35±0.14	0.33±0.06	0.40±0.09	0.38±0.10
Kidneys	Absolute (g)	0.48±0.04	0.53±0.05	0.47±0.05	0.39±0.06 **
	Relative (g/100g BW)	1.07±0.17	1.14±0.12	1.16±0.19	1.13±0.14

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

<sup>a</sup> Mean ± SD.

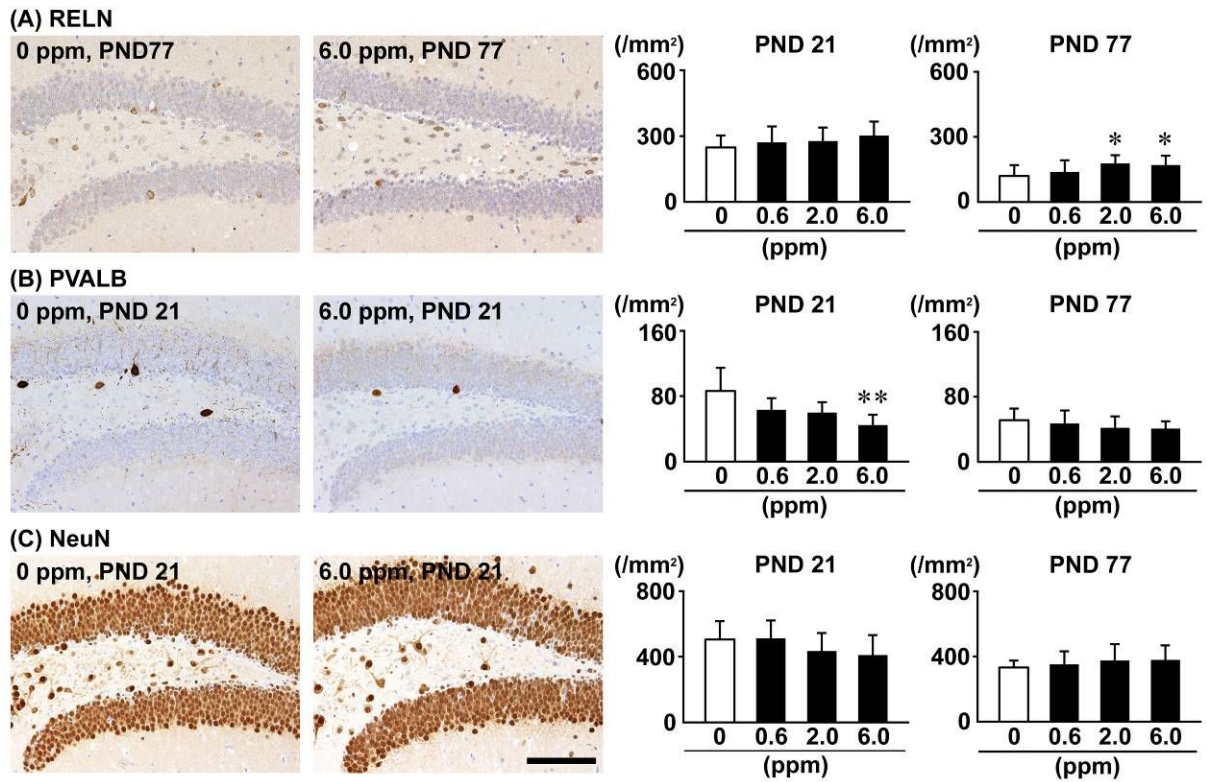
\*, \*\* Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).



**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 diacetoxyscirpenol.** (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) Neuron-specific nuclear protein (NeuN) in the GCL. Representative images from 0 ppm control and the 6.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 $\times$ ; bar = 50  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit length (mm) of

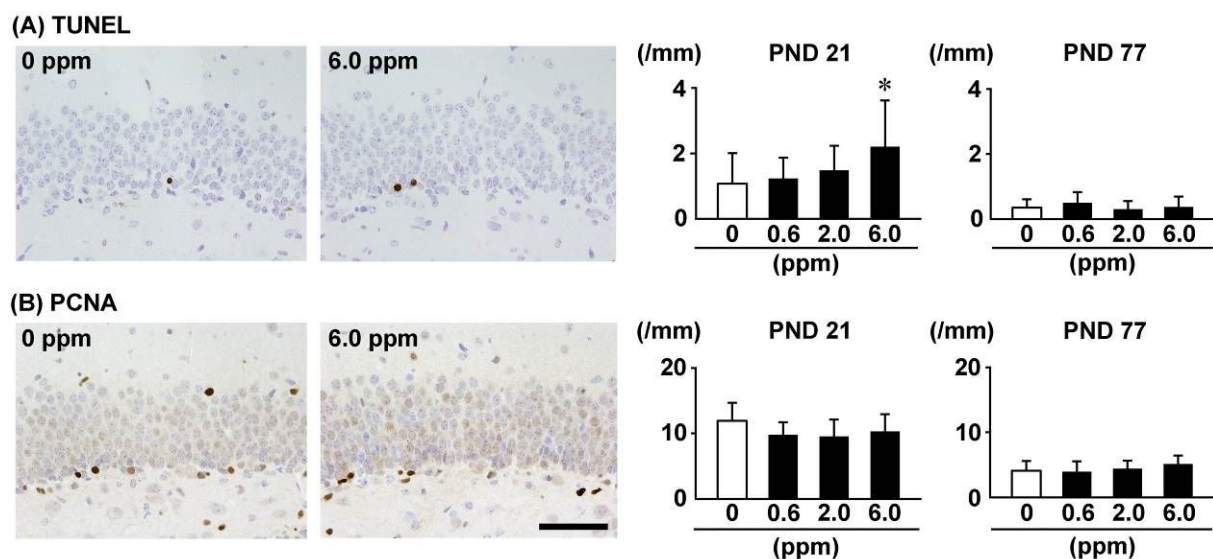
the SGZ or GCL of the bilateral sides. Values are expressed as mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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



**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 diacetoxyscirpenol.** (A) Reelin (RELN). (B) Parvalbumin (PVALB). (C) NeuN. Representative images from 0 ppm control and the 6.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 200 $\times$ ; bar = 100  $\mu$ m. Graphs show the number of immunoreactive cells/unit area (mm<sup>2</sup>) of the hilus of bilateral hemispheres. Values are expressed as the mean + SD. N = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

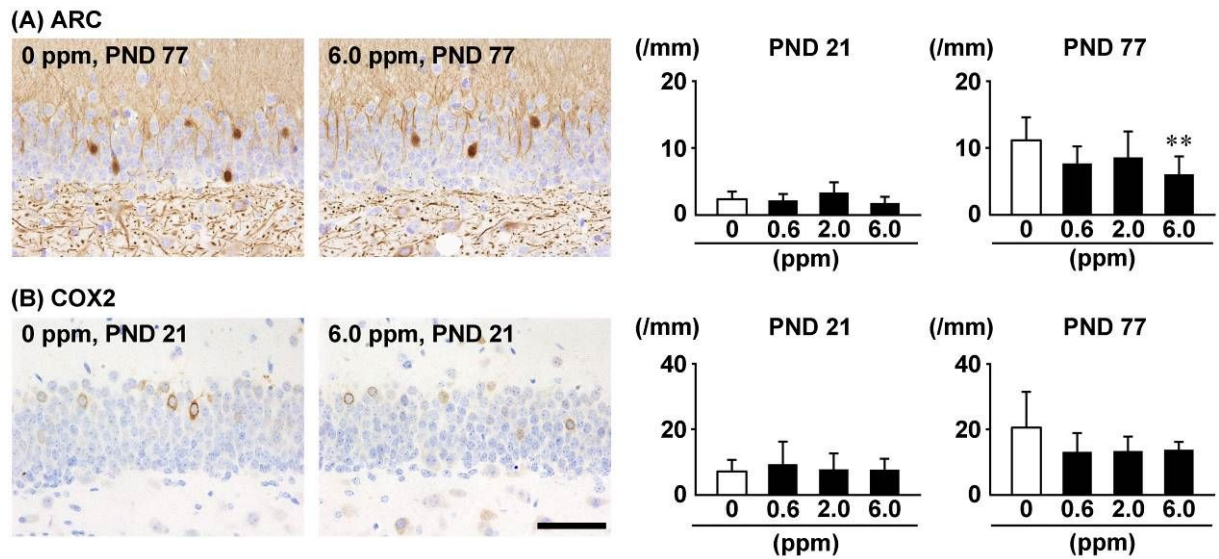
\*, \*\* Significantly different from the untreated controls (P<0.05, P<0.01, Dunnett's or Steel's test).



**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 diacetoxyscirpenol.**

(A) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). (B) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Representative images from 0 ppm control and the 6.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 $\times$ ; bar = 50  $\mu$ 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 = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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



**Figure 6. Distribution and number of immunoreactive cells for marker of synaptic plasticity in the SGZ and GCL of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to diacetoxyscirpenol.** (A) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC). (B) Cyclooxygenase 2 (COX2). Representative images from 0 ppm control and the 6.0 ppm group at PND 21 are shown. Magnification: 400 $\times$ ; bar = 50  $\mu$ 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 = 9-10/group (0 ppm control in PND 21, N=9; the other groups are N=10).

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

**Table 4. Transcript levels in the hippocampal dentate gyrus of PND 21 offspring exposed to diacetoxyscirpenol**

	Diacetoxyscirpenol in diet (ppm)			
	0 (Control)		6.0	
	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
<b>Neurotrophin-related genes</b>				
<i>Bdnf</i>	1.06±0.37 <sup>a</sup>	1.08±0.44	0.83±0.54	0.90±0.55
<i>Ntrk2 (Trkb)</i>	1.03±0.27	1.03±0.25	0.83±0.13	0.90±0.18
<b>Intrinsic pathway of apoptosis</b>				
<i>Bax</i>	1.03±0.30	1.04±0.35	1.17±0.39	1.25±0.38
<i>Bcl2</i>	1.04±0.31	1.02±0.21	1.18±0.27	1.30±0.41
<i>Bak1</i>	1.02±0.20	1.01±0.15	0.94±0.16	1.02±0.19
<i>Casp3</i>	1.04±0.33	1.03±0.27	1.02±0.21	1.11±0.21
<i>Casp9</i>	1.01±0.15	1.02±0.21	0.77±0.16 <sup>*</sup>	0.84±0.18
<i>Casp12</i>	1.06±0.41	1.04±0.35	0.61±0.16 <sup>*</sup>	0.67±0.21 <sup>*</sup>
<b>Glutamate transporters and receptors</b>				
<i>Slc17a6</i>	1.03±0.27	1.02±0.22	3.07±1.86 <sup>*</sup>	3.44±2.34 <sup>*</sup>
<i>Slc17a7</i>	1.02±0.24	1.04±0.34	0.50±0.29 <sup>**</sup>	0.54±0.29 <sup>*</sup>
<i>Gria1</i>	1.04±0.28	1.06±0.36	0.80±0.24	0.87±0.26
<i>Gria2</i>	1.05±0.38	1.07±0.44	1.02±0.33	1.09±0.31
<i>Gria3</i>	1.01±0.15	1.02±0.25	0.79±0.18 <sup>*</sup>	0.85±0.12
<i>Grin2a</i>	1.03±0.29	1.06±0.38	0.56±0.13 <sup>**</sup>	0.61±0.16 <sup>*</sup>
<i>Grin2b</i>	1.00±0.10	1.01±0.13	1.39±0.88	1.55±1.09
<i>Grin2d</i>	1.01±0.14	1.01±0.16	0.92±0.46	1.01±0.57
<b>Cholinergic receptors</b>				
<i>Chrna4</i>	1.03±0.26	1.03±0.26	1.06±0.35	1.16±0.42
<i>Chrna7</i>	1.01±0.18	1.03±0.25	0.67±0.24 <sup>*</sup>	0.72±0.25
<i>Chrn2</i>	1.01±0.12	1.00±0.09	0.77±0.23	0.83±0.19
<b>Antioxidant related genes</b>				
<i>Sod1</i>	1.02±0.23	1.02±0.24	1.33±0.53	1.41±0.47
<i>Sod2</i>	1.01±0.16	1.01±0.17	0.90±0.25	0.99±0.36
<i>Cat</i>	1.03±0.27	1.03±0.24	0.75±0.18	0.82±0.22
<i>Prdx1</i>	1.03±0.24	1.02±0.20	0.99±0.18	1.07±0.20
<i>Prdx2</i>	1.02±0.19	1.01±0.13	1.14±0.29	1.23±0.24
<i>Prdx3</i>	1.01±0.14	1.00±0.07	1.06±0.18	1.14±0.14
<i>Prdx4</i>	1.02±0.22	1.02±0.21	1.20±0.47	1.29±0.45
<i>Prdx5</i>	1.01±0.16	1.02±0.22	1.18±0.27	1.28±0.31
<i>Mt1</i>	1.06±0.34	1.06±0.36	1.29±0.35	1.39±0.36
<i>Mt2</i>	1.02±0.22	1.02±0.21	1.32±0.50	1.42±0.55
<i>Mt3</i>	1.18±0.59	1.18±0.63	0.94±0.58	1.04±0.70
<i>Keap1</i>	1.01±0.18	1.02±0.22	0.96±0.17	1.05±0.22
<i>Nfe2l2 (Nrf2)</i>	1.02±0.20	1.02±0.19	0.80±0.16	0.87±0.21

Abbreviations: *Bak*, BCL2-antagonist/killer 1; *Bax*, BCL2-associated X protein; *Bcl2*, B cell leukemia/lymphoma 2;

*Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Casp3*, caspase 3; *Casp9*, caspase 9; *Casp12*, caspase 12; *Cat*, catalase;

*Chrna4*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha

polypeptide 7; *Chrn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal); *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); *Grin2b*, glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2); *Grin2d*, glutamate receptor,

ionotropic, NMDA2D (epsilon 4); *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *Keap1*, kelch-like ECH-associated protein 1; *Mt1*, metallothionein 1; *Mt2*, metallothionein 2; *Mt3*, metallothionein 3; *Nfe2l2*, nuclear factor, erythroid derived 2, like 2; *Ntrk2*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2; *Prdx1*, peroxiredoxin 1; *Prdx2*, peroxiredoxin 2; *Prdx3*, peroxiredoxin 3; *Prdx4*, peroxiredoxin 4; *Prdx5*, peroxiredoxin 5; *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; .

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from 0 ppm control 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**

**ステリグマトシスチンと 4,15-ジアセトキシシルベ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-ジアセトキシシルベノール(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暴露評価を実施し、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。本年度は、昨年度検討した分析法では十分な回収が得られない食品を対象とした分析法の開発及び市販流通食品を対象とした汚染実態調査を行った。

STCについては、9食品目計182検体の調査を行った。その結果、小麦粉、ハト麦、ソルガム、米、ライ麦、大麦及びインスタントコーヒーにおいてSTC陽性検体が認められた。陽性率が最も高かったのは国産小麦粉の90%、次いでハト麦の42%であった。最高濃度はハト麦における4µg/kgであった。4,15-DASについては、8食品目165検体の調査を行った。その結果、4,15-DASはハト麦、ソルガム、小豆及びコーングリッツの4食品目において検出された。ハト麦で陽性率67%、平均値が9µg/kgと汚染レベルが最も高かった。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った。特にSTCは小麦やコーヒーといった日本人において摂取量が高い食品に混入していることから、重点的に調査を行っていく必要性が示唆された。

**研究協力者**

佐藤 英子	川崎市健康安全研究所	藤吉 智治	(一財)食品分析開発センター
竹内 浩	三重県保健環境研究所		SUNATEC
谷口 賢	名古屋市衛生研究所	本田 俊一	(一財)日本食品検査
中島 正博	名古屋市衛生研究所	宮崎 光代	(一財)日本食品分析センター
橋口 成喜	川崎市健康安全研究所		
脇 ますみ	神奈川県衛生研究所		
飯塚 誠一郎	(一財)日本食品分析センター		
七戸 八重子	(一財)日本食品検査		
笛木 周平	(一財)日本食品分析センター		

**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、CODEX 委員会で規格策定が行われている。我が国は CODEX 委員会の加盟国であることから、CODEX 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 M<sub>1</sub> に対して規制を行っている。また、CODEX 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、それら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た。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。

昨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-ジアセトキシスシルペノール (4,15-DAS) については、日本に流通する食品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。

2016 年度では、分析法を確立するためにコラボラティブスタディを実施した。さらに両カビ毒が検出される食品のスクリーニングを行い、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。今年度は昨年度検討した分析法が適用できないインスタントコーヒーや乾燥いちじくなどの食品を対象とした分析法の開発と検体数を増やした調査を行った。

## B. 研究方法

### (1) STC の汚染実態調査

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル：水 (85 : 15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。添加回収試験の場合は STC の標準溶液を添加し (終濃度 0.5 又は 5.0 µg/kg)、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。乾燥イチジクについては、包丁で細かく切断後、ドライアイスと共にロボクープカッターミキサーで粉碎した。抽出時にセラライト約 20 g を加えた。

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。インスタントコーヒーについては、抽出液 1.0 mL をピペッターで 100 mL のメスフラスコにとり、PBS で 100 mL にメスアップした。ビールについては、一晩置いて脱気した検体 5.0 g を 50 mL のメスフラスコにとり、PBS で 50 mL にメスアップした。

希釈液 20 mL (ビールのみ 5 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。インスタントコーヒーについては、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]<sup>+</sup>>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

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。

ビールについては、試料 10.0 g をピペッターで 50 mL のメスフラスコにとり、蒸留水で 50 mL にメスアップした。あらかじめメタノール 0.2 mL と蒸留水 0.2 mL で前処理した Monospin C18 (GLサイエンス社製) に希釈液 0.5 mL を負荷した。蒸留水 0.3 mL で洗浄後、アセトニトリル 0.3 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：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]<sup>+</sup>>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。

## C. 研究結果

### (1) 添加回収試験

STC の添加回収試験の結果 (表 1) においては、回収率は 80~120% の範囲に収まり、4,15-DAS の添加回収試験の結果 (表 2) においては、回収率は 80~110% の範囲に収まった。

### (2) STC の汚染実態 (表 3、図 1)

9 食品目計 182 検体の調査を行った。最も陽性率が高かったのは国産小麦粉の 90% であり、続いてハト麦の 42%、輸入小麦粉の 40%、ライ麦の 39% であった。平均濃度が最も高かったのはハト麦の 0.5 µg/kg で、続いて国産小麦粉の 0.1 µg/kg、インスタントコーヒーの 0.09 µg/kg であった。中央値が算出されたのは国産小麦粉の 0.06 µg/kg のみであった。最大濃度はハト麦の 4 µg/kg であった。輸入小麦粉、米、ライ麦及び大麦において陽性検体が認められたが、濃度は全て 0.5 µg/kg 以下であった。小豆及びビールでは陽性検体は認められなかった。

### (3) 4,15-DAS (表 4、図 2)

8 食品目計 165 検体について 4,15-DAS の汚染を調べた。最も陽性率が高かったのはハト麦の 67% であり、次いでソルガムの 57% であった。平均濃度が最も高かったのはハト麦の 9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。ソルガム、小豆及びコーングリッツに陽性検体は認められたが、汚染濃度は全て 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以下であった。最大濃度はハト麦における 54  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。

#### D. 考察

##### (1) STC の汚染実態

昨年度実施した調査において、STC は国産小麦粉、ライ麦、ハト麦及びインスタントコーヒーから主に検出された。それら食品については今年度も調査を行った結果、STC が検出され、平均濃度は昨年度の結果と同程度であった。今年度より新たに検査対象としてソルガムを加えたが、7 検体中 1 検体のみから STC が検出された。アフリカにおいてソルガムの STC 陽性検体の 10% から 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の濃度で STC が検出されたとの報告<sup>1)</sup>があるため、調査は継続する必要がある。

日本以外の地域における STC 汚染については、最近中国に流通するビールと小麦製品における報告がなされた<sup>2, 3)</sup>。ビール 101 検体からは STC は検出されなかったが、小麦 31 検体においては陽性率が 53.1% (LOD 0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、平均値が 0.07  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大値が 0.31  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。この結果は我々の調査と同レベルであった。

##### (2) 4,15-DAS の汚染実態

昨年度と同様にハト麦において陽性検体が多く認められた。日本産よりも東南アジア産の検体で検出濃度が高い傾向も同様であった。一部の穀類で 4,15-DAS は検出されたが、検出濃度は非常に低かった。2 年間の調査では日本で摂取される主要な穀類中に 4,15-DAS の汚染は確認されていない。

#### E. 結論

昨年度に引き続き、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 は小麦やコーヒーといった日本人における摂取量が多い食品で検出されることが確認された。暴露推定を行うために、それら食品における汚染データの収集を来年度重点的に実施する。4,15-DAS についてはハト麦茶などのハト麦の加工品における汚染データを来年度収集する。

#### F. 参考文献

- 1) WHO Technical Report Series, No.1002, 2007
- 2) Zhao Y et al. Food Addit Contam Part B Surveill. 2018, 11(1):9-14.
- 3) Zhao Y et al. Food Addit Contam Part B Surveill. 2017, 10(1):64-68.

#### G. 研究業績

##### 【論文発表】

- 1) [Yoshinari, T.](#), [Takeda, N.](#), [Watanabe, M.](#), [Sugita-Konishi, Y.](#): Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified Forms of 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. [Toxins \(Basel\)](#). 2018, 10(5). pii: E178. doi: 10.3390/toxins10050178.

表1 STCの添加回収試験の結果

食品名	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回収率 (平均値 $\pm$ 標準偏差)		
小麦粉	0.5	107.8	$\pm$	1.6
	5	118.7	$\pm$	6.3
ハト麦	0.5	105.7	$\pm$	6.5
	5	107.6	$\pm$	1.6
ソルガム	0.5	108.6	$\pm$	3.8
	5	107.9	$\pm$	2.0
小豆	0.5	92.3	$\pm$	1.3
	5	103.4	$\pm$	0.8
米	0.5	88.9	$\pm$	1.4
	5	96.2	$\pm$	2.8
ビール	0.5	91.2	$\pm$	2.4
	5	90.0	$\pm$	1.7
ライ麦	0.5	86.8	$\pm$	2.3
	5	88.4	$\pm$	1.4
乾燥いちじく	0.5	97.9	$\pm$	9.3
	5	90.8	$\pm$	2.4
大麦	0.5	91.1	$\pm$	1.8
	5	92.2	$\pm$	0.6
インスタントコーヒー	0.5	87.7	$\pm$	3.5
	5	80.3	$\pm$	2.9

表2 4.15-DASの添加回収試験の結果

食品名	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回収率 ( $\text{平均値} \pm \text{標準偏差}$ )
小麦粉	5	98.4 $\pm$ 2.2
	50	100.0 $\pm$ 5.7
ハト麦加工品	5	94.2 $\pm$ 4.7
	50	92.8 $\pm$ 5.2
ソルガム	5	94.9 $\pm$ 1.7
	50	88.6 $\pm$ 1.7
小豆	5	100.5 $\pm$ 5.4
	50	91.0 $\pm$ 3.4
コーングリッツ	5	105.0 $\pm$ 4.0
	50	94.7 $\pm$ 3.0
ビール	5	80.9 $\pm$ 1.6
	50	85.6 $\pm$ 1.4
ライ麦	5	97.2 $\pm$ 2.8
	50	100.2 $\pm$ 1.7
大麦	5	103.8 $\pm$ 3.6
	50	104.5 $\pm$ 0.8

表3 ステリグマトシスチンの汚染実態

食品名	検体数	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	陽性率 (%)	各濃度範囲に含まれる検体数				平均値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	中央値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	最大値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
					LOQ-0.5	0.5-1.5	1.5-5	> 5			
国産小麦粉	20	0.002	0.006	90	17	1			0.1	0.06	0.5
輸入小麦粉	20	0.003	0.01	40	8				0.02	<LOD	0.1
ハト麦	24	0.01	0.04	42	5	1	4		0.5	<LOD	4
ソルガム	7	0.01	0.04	14	1				0.04	<LOD	0.3
小豆	14	0.008	0.03	0					-	-	-
米	10	0.008	0.03	10	1				0.04	<LOD	0.4
ビール	20	0.01	0.04	0					-	-	-
ライ麦	28	0.01	0.02	39	11				0.04	<LOD	0.5
大麦	15	0.008	0.03	13	2				0.004	<LOD	0.03
インスタントコーヒー	24	0.03	0.1	21	3	2			0.09	<LOD	0.8

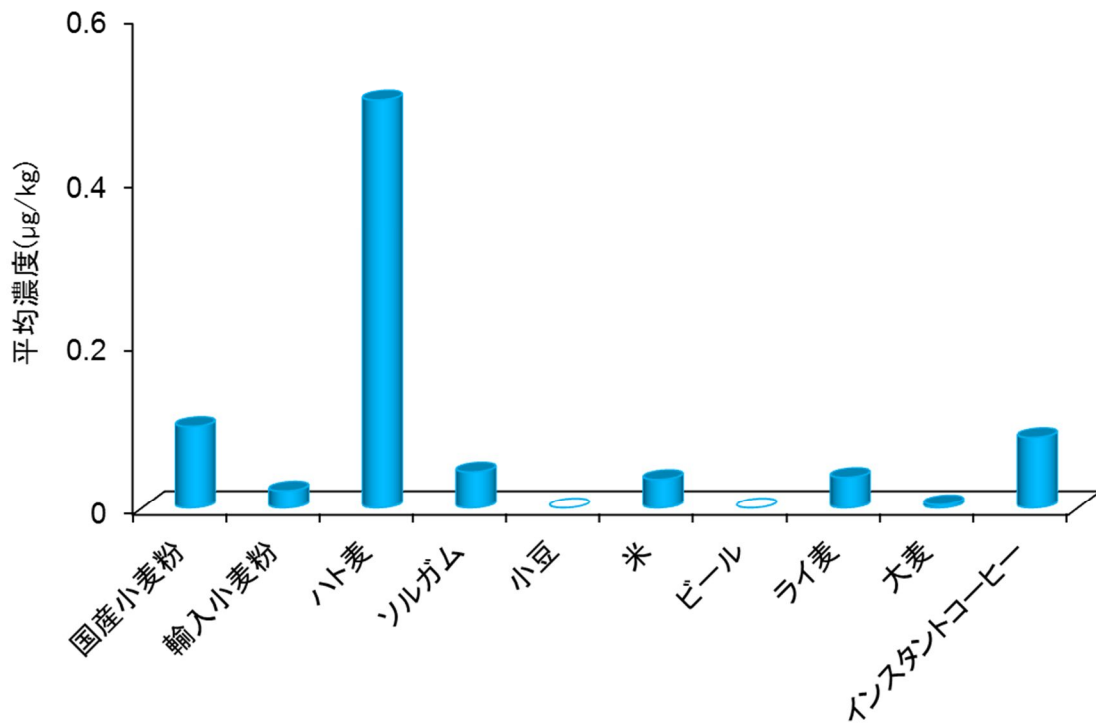


図1 ステリグマトシスチンの汚染実態（平均濃度）



表 4 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	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	陽性率 (%)	各濃度範囲 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) に含まれる検体数				平均値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	中央値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	最大値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
					LOQ-1.5	1.5-5	5-50	>50			
国産小麦粉	20	0.1	0.2	0					-	-	-
輸入小麦粉	20	0.1	0.2	0					-	-	-
ハト麦	24	0.1	0.2	67	5	1	9	1	9	1	54
ソルガム	7	0.1	0.2	57	4				0.3	0.2	1
小豆	16	0.1	0.2	19	3				0.05	<LOD	0.3
コーングリッツ	15	0.1	0.2	27	4				0.1	<LOD	1
ビール	20	0.2	0.6	0					-	-	-
ライ麦	28	0.1	0.2	0					-	-	-
大麦	15	0.06	0.2	0					-	-	-

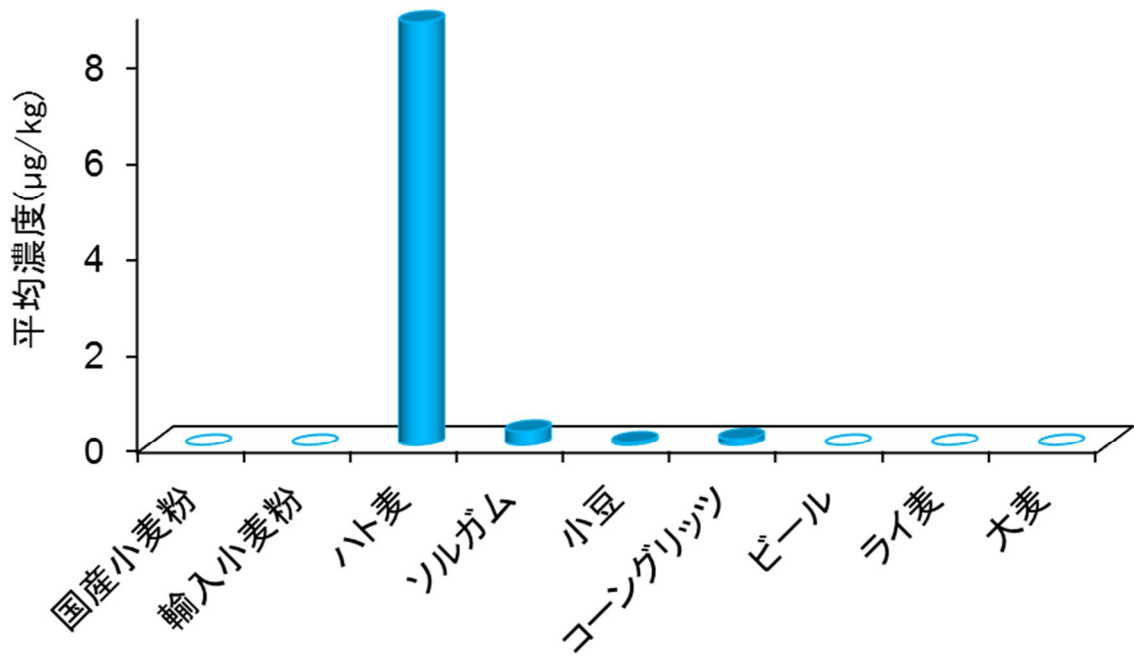


図2 4,15-DASの汚染実態(平均濃度)

## 汚染実態調査 個票データ

検出限界値未満の場合は ND と表記し、検出限界値以上かつ定量限界値未満の数値は下線を付した。

資料(個票)

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-国産小麦粉-1	北海道	0.5
29-国産小麦粉-2	北海道	0.04
29-国産小麦粉-3	北海道	0.1
29-国産小麦粉-4	北海道	0.5
29-国産小麦粉-5	北海道	0.05
29-国産小麦粉-6	北海道	0.08
29-国産小麦粉-7	北海道	0.06
29-国産小麦粉-8	北海道	0.05
29-国産小麦粉-9	北海道	0.05
29-国産小麦粉-10	北海道	0.06
29-国産小麦粉-11	青森	0.09
29-国産小麦粉-12	青森	0.09
29-国産小麦粉-13	青森	ND
29-国産小麦粉-14	岩手県	0.06
29-国産小麦粉-15	岩手県	0.02
29-国産小麦粉-16	北海道	0.02
29-国産小麦粉-17	関東	0.02
29-国産小麦粉-18	石川県	0.03
29-国産小麦粉-19	岐阜県	ND
29-国産小麦粉-20	九州産	0.1

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-輸入小麦粉-1	CA	ND
29-輸入小麦粉-2	CA、US	ND
29-輸入小麦粉-3	FR	ND
29-輸入小麦粉-4	US	ND
29-輸入小麦粉-5	US	ND
29-輸入小麦粉-6	US、CA	0.02
29-輸入小麦粉-7	US、CA	0.03
29-輸入小麦粉-8	CA、US	ND
29-輸入小麦粉-9	CA、US	0.02
29-輸入小麦粉-10	US、CA	0.1
29-輸入小麦粉-11	FR	ND
29-輸入小麦粉-12	CA、US	0.03
29-輸入小麦粉-13	US	ND
29-輸入小麦粉-14	US	ND
29-輸入小麦粉-15	FR	0.05
29-輸入小麦粉-16	CA	ND
29-輸入小麦粉-17	CA	ND
29-輸入小麦粉-18	CA	0.02
29-輸入小麦粉-19	CA	ND
29-輸入小麦粉-20	CA、US	0.1

CA : カナダ、US : アメリカ、FR : フランス

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-八ト麦-1	富山県	ND
29-八ト麦-2	岩手県	ND
29-八ト麦-3	富山県	ND
29-八ト麦-4	富山県	ND
29-八ト麦-5	富山県	<u>0.02</u>
29-八ト麦-6	ラオス	4
29-八ト麦-7	不明	2
29-八ト麦-8	鳥取県（出雲）	ND
29-八ト麦-9	栃木県（鹿沼）	ND
29-八ト麦-10	タイ	0.4
29-八ト麦-11	タイ	0.3
29-八ト麦-12	富山県	<u>0.02</u>
29-八ト麦-13	富山県	ND
29-八ト麦-14	富山県	ND
29-八ト麦-15	タイ	0.6
29-八ト麦-16	国産	0.08
29-八ト麦-17	タイ	2
29-八ト麦-18	岩手県	ND
29-八ト麦-19	国産	ND
29-八ト麦-20	岩手県	ND
29-八ト麦-21	岩手県	<u>0.03</u>
29-八ト麦-22		0.2
29-八ト麦-23	タイ	0.3
29-八ト麦-24	不明	2

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-ソルガム-1	アメリカ	ND
29-ソルガム-2	アメリカ	ND
29-ソルガム-3		ND
29-ソルガム-4		ND
29-ソルガム-5		ND
29-ソルガム-6	オーストラリア	<u>0.03</u>
29-ソルガム-7	オーストラリア	0.3

ステリグマトシスチンの結果



サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-小豆-1	北海道	ND
29-小豆-2	丹波（兵庫、京都）	ND
29-小豆-3	北海道（十勝）	ND
29-小豆-4	北海道	ND
29-小豆-5	北海道（十勝）	ND
29-小豆-6	岡山県	ND
29-小豆-7	北海道	ND
29-小豆-8	北海道	ND
29-小豆-9	北海道	ND
29-小豆-10	岩手県	ND
29-小豆-11	岩手県	ND
29-小豆-12	北海道	ND
29-小豆-13	北海道	ND
29-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 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-米-1	新潟県	ND
29-米-2	新潟県	ND
29-米-3	秋田県	ND
29-米-4	新潟県	ND
29-米-5	山形県	ND
29-米-6		0.4
29-米-7	北海道	ND
29-米-8	国内産	ND
29-米-9	北海道	ND
29-米-10	福島県	ND

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-ビール-1		ND
29-ビール-2		ND
29-ビール-3	沖縄	ND
29-ビール-4		ND
29-ビール-5		ND
29-ビール-6		ND
29-ビール-7		ND
29-ビール-8		ND
29-ビール-9		ND
29-ビール-10		ND
29-ビール-11		ND
29-ビール-12		ND
29-ビール-13	長野	ND
29-ビール-14	長野	ND
29-ビール-15	長野	ND
29-ビール-16	長野	ND
29-ビール-17	長野	ND
29-ビール-18	長野	ND
29-ビール-19	岩手	ND
29-ビール-20	岩手	ND

ステリゲマトシスチンの結果

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-ライ麦-1	北海道	0.03
29-ライ麦-2		ND
29-ライ麦-3	北海道	0.07
29-ライ麦-4		ND
29-ライ麦-5		ND
29-ライ麦-6	フィンランド	ND
29-ライ麦-7		ND
29-ライ麦-8		ND
29-ライ麦-9	ドイツ	0.03
29-ライ麦-10		ND
29-ライ麦-11	北海道	0.07
29-ライ麦-12	北海道	0.07
29-ライ麦-13	ドイツ	ND
29-ライ麦-14	ドイツ	ND
29-ライ麦-15	アメリカ	0.1
29-ライ麦-16	北海道	0.05
29-ライ麦-17	フランス	<u>0.02</u>
29-ライ麦-18	ドイツ	0.02
29-ライ麦-19	ドイツ、カナダ主体	ND
29-ライ麦-20	ドイツ、カナダ主体	<u>0.02</u>
29-ライ麦-21	ドイツ、カナダ主体	ND
29-ライ麦-22	ドイツ	ND
29-ライ麦-23	ドイツ	ND
29-ライ麦-24	ドイツ	0.07
29-ライ麦-25	ドイツ	<u>0.01</u>
29-ライ麦-26	ドイツ	0.5
29-ライ麦-27	ドイツ	ND
29-ライ麦-28	北海道	0.02

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	原産国	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-大麦-1	国内産	<u>0.02</u>
29-大麦-2	国内産	ND
29-大麦-3		ND
29-大麦-4		ND
29-大麦-5	九州産	ND
29-大麦-6	九州産	<u>0.02</u>
29-大麦-7	国内産	ND
29-大麦-8	岩手県産	0.03
29-大麦-9	国内産	ND
29-大麦-10	国内産	ND
29-大麦-11	国内産	ND
29-大麦-12	国内産	0.03
29-大麦-13	岩手県産	<u>0.02</u>
29-大麦-14	国内産	ND
29-大麦-15	国内産	<u>0.02</u>

ステリグマトシスチンの結果

サンプルID	生豆生産国名	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-コーヒー-1	ブラジル	ND
29-コーヒー-2	ベトナム、インドネシア他	ND
29-コーヒー-3	エチオピア、ブラジル他	ND
29-コーヒー-4	ブラジル、インドネシア他	ND
29-コーヒー-5	インドネシア、ブラジル他	ND
29-コーヒー-6	インドネシア、ベトナム他	ND
29-コーヒー-7	コロンビア、ベトナム他	ND
29-コーヒー-8	ベトナム、インドネシア他	ND
29-コーヒー-9	メキシコ、インドネシア他	0.6
29-コーヒー-10	インドネシア	0.1
29-コーヒー-11	インドネシア	ND
29-コーヒー-12	パプアニューギニア、ペルー、メキシコ	ND
29-コーヒー-13	コロンビア	0.1
29-コーヒー-14	ブラジル、コロンビア	ND
29-コーヒー-15	ベトナム、ウガンダ他	ND
29-コーヒー-16	ブラジル	ND
29-コーヒー-17	タンザニア、エルサルバドル他	ND
29-コーヒー-18	ブラジル、カメルーン他	ND
29-コーヒー-19	インドネシア、ベトナム他	ND
29-コーヒー-20	インドネシア、ベトナム他	ND
29-コーヒー-21	ブラジル、エクアドル他	ND
29-コーヒー-22	ベトナム、インド、ウガンダ、ケニア	0.8
29-コーヒー-23	インド、ケニア、ベトナム	0.4
29-コーヒー-24	ブラジル、コロンビア	ND





#### 4,15-DAS の結果

国産小麦粉、輸入小麦粉、ビール、ライ麦及び大麦については STC の調査と同じ検体であり、かつ全て ND であるため省略する。

サンプルID	原産地	DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-八ト麦-1	富山県	9
29-八ト麦-2	岩手県	0.3
29-八ト麦-3	富山県	ND
29-八ト麦-4	富山県	ND
29-八ト麦-5	富山県	7
29-八ト麦-6	ラオス	11
29-八ト麦-7	不明	54
29-八ト麦-8	鳥取県(出雲)	0.4
29-八ト麦-9	栃木県(鹿沼)	0.2
29-八ト麦-10	タイ	18
29-八ト麦-11	タイ	19
29-八ト麦-12	富山県	0.5
29-八ト麦-13	富山県	ND
29-八ト麦-14	富山県	ND
29-八ト麦-15	タイ	8
29-八ト麦-16	国産	3
29-八ト麦-17	タイ	14
29-八ト麦-18	岩手県	ND
29-八ト麦-19	国産	ND
29-八ト麦-20	岩手県	ND
29-八ト麦-21	岩手県	ND
29-八ト麦-22		1
29-八ト麦-23	タイ	22
29-八ト麦-24	不明	46

4,15-DAS の結果

サンプルID	産地	DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-ソルガム-1	アメリカ	ND
29-ソルガム-2	アメリカ	0.3
29-ソルガム-3		0.5
29-ソルガム-4		0.2
29-ソルガム-5		1
29-ソルガム-6	オーストラリア	ND
29-ソルガム-7	オーストラリア	ND

サンプルID	原産地	DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-小豆-1	北海道	ND
29-小豆-2	丹波（兵庫、京都）	ND
29-小豆-3	北海道（十勝）	ND
29-小豆-4	北海道	0.2
29-小豆-5	北海道（十勝）	ND
29-小豆-6	岡山県	0.3
29-小豆-7	北海道	ND
29-小豆-8	北海道	ND
29-小豆-9	北海道	0.2
29-小豆-10	岩手県	ND
29-小豆-11	岩手県	ND
29-小豆-12	北海道	ND
29-小豆-13	北海道	ND
29-小豆-14	北海道	ND
29-小豆-15	北海道	<u>0.1</u>
29-小豆-16	北海道	ND

4,15-DAS の結果

サンプルID	産地	DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
29-コーングリッツ-1	アメリカ	ND
29-コーングリッツ-2	アメリカ	ND
29-コーングリッツ-3	アメリカ	ND
29-コーングリッツ-4		ND
29-コーングリッツ-5		ND
29-コーングリッツ-6		ND
29-コーングリッツ-7	アメリカ	ND
29-コーングリッツ-8	オーストラリア	ND
29-コーングリッツ-9	アメリカ	ND
29-コーングリッツ-10	アメリカ	ND
29-コーングリッツ-11	アメリカ	0.5
29-コーングリッツ-12	アメリカ	0.2
29-コーングリッツ-13	アメリカ	ND
29-コーングリッツ-14	アメリカ	0.3
29-コーングリッツ-15	アメリカ	0.8

**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**

**非培養法による簡易分析法の基礎的研究**

**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、培養を行わずにカビ毒産生菌を効率よく検出する方法の開発を行った。今後モニタリングを強化していくべきカビ毒として、ステリグマトシスチン (STC) を取り上げ、STC 産生菌種を多く含む *Aspergillus section Versicolores* 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。昨年度までに、食材に付着したカビ由来の DNA を回収し、改変型 DNA 合成酵素を用いた特異的な PCR 法により、標的菌種のみを増幅する手法を確立した。本年度は、昨年度確立した技術的基盤をもとに、STC 産生菌種を効率よく検出する系の開発を行った。まず、国内の食品および環境から *Aspergillus section Versicolores* に属する菌株を多数分離し、分子生物学的手法を用いて菌種の同定を行い、それぞれの株の STC 産生能を確認した。その結果、*Aspergillus creber* は今回分離した菌株の比較的高い割合を占め、且つ STC 産生能を持つ株の頻度が高いことから、本菌種は国内の主要な STC 産生菌種であることが明らかとなった。そこで、当該菌種のみを検出する系の開発をおこなった。また一方で、*Aspergillus sydowii* は今回分離した菌株のうち最も多くを占めたが、本菌種は STC 非産生菌種であるため、*A. sydowii* を除いた *Aspergillus section Versicolores* に属する菌種をまとめて検出することで、効率よく STC 産生菌種を検出することができると考え、それを実現する系の開発を試みた。いずれの系についても、昨年度確立した改変型 DNA 合成酵素を使用した PCR 技術を基に、*RPB2* 遺伝子上にプライマーを設計することで、目的の特定菌種のみを増幅して検出する方法を確立することができた。最後に、確立した PCR の系のうち *A. sydowii* のみを増幅させずに他の菌種を全て検出する系を用いて、玄米からの STC 産生菌の検出を試みることで、本方法の有効性を検討した。その結果、STC 汚染が確認された玄米では、全てにおいて STC 産生菌種が検出された。また、STC 未検出の玄米においても STC 産生菌種の存在が確認され、STC 産生菌の増殖前のリスクを検出することができた。以上の結果から、食品または飼料から培養を行わずに STC 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。これまでカビを検出するために行われる培養法では、結果を得るまでに 5 日から 14 日程度必要であったが、今回開発した手法では 4 時間程度で STC を産生するカビの検出が可能であり、STC 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

## A. 研究目的

食品や飼料にカビ毒産生菌が存在する場合、これらの菌が増殖し、カビ毒を産生することで、食品または飼料がカビ毒により汚染されることがある。カビ毒が検出されていない食品や飼料においても、保存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。例えば、米や麦などの貯蔵穀物においては、生産時にカビ毒による汚染が検出されない場合にもカビ毒産生菌種が存在していると、貯蔵中に増殖してカビ毒が産生され、カビ毒により汚染される恐れがある。また、輸入食品においては、輸送時またはその前後で貯蔵環境が大きく変化する場合があり、輸送・貯蔵前にカビ毒が検出されない場合にも、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可能性がある。つまり、食品や飼料のカビ毒による汚染を真にコントロールするためには、検体に蓄積されたカビ毒を検出するだけでなく、検体中にカビ毒産生菌が存在するかどうかを調べることが非常に重要となる。

一般に、カビ毒産生菌を食品から検出するためには菌を培養する必要があり、カビの培養は5日から2週間程度の時間を要するため、迅速に検出することは困難である。そのため、食品から培養を行わずに直接カビ毒産生菌の存在を判定できる手法が求められる。そこで本研究では、培養を行わずに食品からカビ毒産生菌を直接検出できる迅速で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。特に、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(STC)産生菌に着目した。

昨年度は、STC産生菌種の代表菌種である *Aspergillus versicolor* を対象として、その近縁種を含む *Aspergillus* section *Versicolores* においてSTC産生性菌種のみを検出する方法の技術的基盤の確立を行った。玄米を例に食材に付着したカビ由来のDNAを直接回収し、特殊な改変型DNA合成酵素を適用することで非特異的な増幅を回避しながら特定

の菌種のみをPCRにより増幅して検出する技術を確立した。

本年度は昨年度確立した技術的基盤をもとに、STC産生菌種を効率よく検出するための系の確立を目指した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株および米検体

食品および環境から分離した *Aspergillus* section *Versicolores* 株を供試した。昨年度供試した37株に加え、新たに23株を加えて合計60株を用いた(表1)。また、米は平成27年度産の国産玄米9検体および平成25年度産国産玄米4検体を用いた。平成27年度産玄米の1検体(検体番号9)および平成25年度産玄米4検体(検体番号10~13)はSTCによる汚染が検出された検体である。

### 2. 培養真菌からのゲノムDNA抽出

胞子をポテトデキストロース液体培地(PDB)に接種して25℃で2日間培養し、その後菌糸体を回収した。ゲノムDNAの抽出はSDS法<sup>1)</sup>またはDNeasy plant mini kit(QIAGEN)を用いて添付のプロトコルに従って行った。抽出したDNAは使用するまで-20℃で保存した。

### 3. 分子生物学的手法による菌種同定

まず、 $\beta$ -tubulin 遺伝子部分配列(377 bp)をPCRにより増幅した。PCRにはFoward用プライマーとしてbt2a(5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3')、Reverse用プライマーとしてbt2b(5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3')を用いた<sup>2)</sup>。PCR条件は、95℃で3分間熱変性を行った後、95℃15秒、60℃45秒、72℃60秒を1サイクルとして35サイクル行い、72℃で120秒間最終伸長を行った。その後、PCR産物をエタノール沈殿により精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いてシーケンシング反応を行った。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。決定した供試菌株の塩基配列を登録配列と共にアライメントした。登録配列は *Aspergillus section Versicolores* に含まれる 14 種<sup>3)</sup>および外群 2 種 39 株の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用した。このアライメントを基に MEGA6.0<sup>4)</sup>を用い、近隣結合法により系統樹を作成し、菌種の同定を行った。

#### 4 . Thin-layer chromatography (TLC)による STC 産生能の確認

胞子をポテトデキストロース寒天培地 (PDA) に接種し、25 °C で 2 週間培養した。1-mL チップを用いてコロニーを寒天ごとくり抜き、サンプルチューブに移し、メタノール：クロロホルム (1:2) を 1 mL 加えて振盪した。得られた素抽出物を、Silica gel 60 薄層版 (Merck 社) にスポットした。メタノール：クロロホルム (2:98) を用いて展開し、366 nm の光の下でシグナルを確認した。STC 標準品 (Major Chemicals) と同じ移動度に現れるスポットを STC のシグナルと判断した。

#### 5 . RNA polymerase 2 遺伝子部分配列の比較

*Aspergillus section Versicolores* に含まれる種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用し、MEGA6.0<sup>4)</sup>を用い、ClustalW によりアライメントを行った。使用した RNA polymerase 2 (RPB2) 遺伝子登録配列のアクセッション番号は、以下の通り：JN853831.1 (*A. creber*)、JN853811.1 (*A. tennesseensis*)、JN853809.1 (*A. jensenii*)、EF652178.1 (*A. versicolor sensu stricto*)、EF652214.1 (*A. tabacinus*)、JN853841.1 (*A. protuberus*)、JN853803.1 (*A. venenatus*)、JN853823.1 (*A. puulaauensis*)、EF652187.1 (*A. sydowii*)、

#### 6 . 米付着カビ胞子からの直接 DNA 抽出

玄米 500 mg (20 粒程度) から、市販抽出キット

(NucleoSpin Soil: TaKaRa) を用い、添付のプロトコルに従い、DNA を抽出した。抽出した DNA は使用するまで -20 °C で保存した。

#### 7 . 菌種特異的検出 PCR

5 . で作成したアライメントを基に、標的菌種の塩基配列がその他の菌種と異なる部分にプライマーを設計し、HiDi DNA polymerase (myPOLS Biotec GmbH) を用い、添付のプロトコルに従って PCR を行った。

### C. 研究結果

#### ( 1 ) 国内に分布する *Aspergillus section Versicolores* の分離および同定

まず、国内の食品および環境から *Aspergillus section Versicolores* を多数分離し、分子生物学的手法を用いて菌種の同定を行った。昨年度に分離した 37 株に加えて、新たに 23 株について、-tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を決定し、合計 60 株の配列データを得た。データベースに配列が登録されている *Aspergillus section Versicolores* の 14 菌種および外群 2 菌種 (計 28 株) と共に系統樹を作成し、菌種の同定を行った (図 1)。その結果、全ての登録配列は単系統群を形成した。それぞれの菌株が含まれるクレードの登録配列の菌種をもとに同定を行った。供試菌株には、*A. amoenus* が 1 株、*A. creber* が 12 株、*A. jensenii* が 4 株、*A. protuberus* が 2 株、*A. puulaauensis* が 1 株、*A. sydowii* が 22 株、*A. tabacinus* が 1 株、*A. tennesseensis* が 10 株、*A. venenatus* が 3 株、*A. versicolor sensu stricto* が 4 株含まれた。60 株の分離・同定を行った結果、*Aspergillus section Versicolores* に属する 14 菌種の内、10 菌種の株を得ることができた。

#### ( 2 ) STC 産生能

供試した 60 株について、STC 産生能を TLC により調べた (表 1)。その結果、*A. creber* の 12 株中 8



株、*A. jensenii* の4株中2株、*A. tennesseensis* 10株中4株、*A. venenatus* の3株中1株、*A. versicolor sensu stricto* の4株中3株でSTC産生能が確認された。*A. amoenus* (1株)、*A. protuberus* (2株)、*A. puulaauensis* (1株)、*A. sydowii* (22株)および*A. tabacinus* (1株)においては、STC産生株は検出されなかった。

### (3) *Aspergillus creber* 特異的検出 PCR

(1)および(2)の結果より、*A. creber* は国内において分離される *Aspergillus* section *Versicolores* の中で、分離頻度が高く、且つSTC産生菌株の頻度が高い菌種であることが明らかとなった。そこで、昨年度確立した菌種特異的増幅を可能とするHiDi DNA polymeraseを用いたPCRにより、*A. creber* のみを特異的に増幅する系を検討した。

HiDi DNA polymeraseはプライマーの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改変型DNA合成酵素であるため、データベース登録配列より、*A. creber* が他の菌種と異なる配列を探索した。*RPB2* 遺伝子において、*A. creber* に特徴的な塩基配列が見出されたため、当該配列を基に *A. creber* のみを標的とするプライマーセットを設計した(図2A)。さらに系の特異性を確認するため、*A. creber* 以外の菌種を増幅し、*A. creber* では増幅がおこらない相補的なプライマーセットの設計も行った。これらのプライマーを使用して培養菌株から抽出したゲノムDNAをテンプレートにPCRを行ったところ、前者のプライマーセットでは *A. creber* 特異的に増幅が見られ、後者のプライマーセットでは *A. creber* では増幅が起こらず、他の菌種では増幅が確認された(図2B)。これらのことから、HiDi DNA polymeraseを用いたPCRにより、国内の主要なSTC産生菌種と考えられる *A. creber* を特異的に検出することが可能であることが確認された。

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

(1)および(2)の結果より、*A. sydowii* は国内で最も高頻度に分離される *Aspergillus* section *Versicolores* であるが、STCを産生しない菌種であることが示された。そこで、*A. sydowii* を除いて残りの *Aspergillus* section *Versicolores* の菌種をまとめて検出することで効率よくSTC産生菌を検出する系を検討した。*RPB2* 遺伝子において、*A. sydowii* のみで特異的に他の菌種と配列が異なる箇所をターゲットに、*A. sydowii* 以外の菌種の塩基配列と一致するプライマーセットを設計した(図3A)。このプライマーセットを用いて、ゲノムDNAをテンプレートにPCRを行ったところ、*A. sydowii* では増幅が見られず、その他の菌種では全て目的のサイズの増幅が観察された(図3B)。また、同時に *RPB2* 遺伝子において、*Aspergillus* section *Versicolores* 14菌種すべての菌種で共通する配列をターゲットに設計したプライマーセットによりPCRを行い、*A. sydowii* を含むすべてのゲノムDNAにおいて正常にPCR反応が起こることを確認した(図3B)。以上の結果から、STC産生菌種を多く含む *Aspergillus* section *Versicolores* の中でSTC非産生菌種である *A. sydowii* 以外の菌種を特異的に増幅することが可能であることが確認された。

### (5) 玄米におけるSTC産生菌の検出

(4)で検討した *A. sydowii* 以外の菌種を特異的に増幅するPCRの系を用い、玄米からのSTC産生菌の検出を行った。STCによる汚染が確認された玄米5検体とSTCが検出されていない玄米8検体に付着するカビからDNAを抽出し、PCRを行った。

その結果、STCが検出された玄米については全てにおいて目的サイズの増幅産物が確認された。また、STCが未検出の玄米についても、8検体中7検体で増幅産物が確認された。

## D. 考察

本研究では、食品においてモニタリングを強化し

ていくべきと考えられているカビ毒のひとつである STC に着目し、STC 産生菌種を多数含む *Aspergillus section Versicolores* において、STC 産生菌種のみを食品から直接検出する方法の開発を試みた。平成 28 年度に、玄米を例に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特定の菌種のみを PCR により増幅して検出する技術を確立した。本年度は、この技術的基盤をもとに、効率よく STC 産生菌種を検出する PCR の系の確立を試みた。

まず、国内に分布する *Aspergillus section Versicolores* 60 株を分離・同定したところ、*Aspergillus sydowii* が最も高い頻度で分離され、次いで *A. creber* が多く分離された。*A. sydowii* は STC 非産生菌種とされているが<sup>5)</sup>、本研究においても、いずれの株も STC 産生能は認められなかった(表 1)。一方で、*A. creber* においては、12 株中 8 株で STC 産生能が確認され、国内の主要な STC 産生菌種であることが示された。

以上のことから、STC 産生菌種を効率的に検出する方法として以下の二つの系を検討した。

- A) 国内の主要な STC 産生菌種と考えられる *A. creber* を特異的に検出する系
- B) 国内で検出頻度が高い STC 非産生菌種である *A. sydowii* を除き、*Aspergillus section Versicolores* の他菌種をまとめて検出することで効率的に STC 産生菌種を検出する系

いずれの系についても、昨年度確立した改変型 DNA 合成酵素 (HiDi DNA polymerase) を使用した PCR 技術を基に、*RPB2* 遺伝子上にプライマーを設計することで、目的の特定菌種のみを増幅して検出する方法を確立することができた。

最後に、確立した PCR の系の内 B) の系を用いて、玄米からの STC 産生菌の検出を試みることで、本方法の有効性を検討した。玄米は平成 25 年度産または平成 27 年度産の国産玄米 13 検体を使用した。これらの検体については STC 汚染濃度の測定をすでに行

っており、5 検体について汚染が確認されている。昨年度確立した食品に付着するカビからの効率的な DNA 抽出法によりゲノム DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。STC が検出された玄米検体では全てにおいて目的サイズの増幅産物が得られ、STC 産生菌種による汚染が認められた(図 4)。一方で、STC 未検出の玄米検体においても 8 検体中 7 検体で目的サイズの増幅産物が見られた。これは、*Aspergillus section Versicolores* 内の STC 非産生菌種による汚染を検出している可能性が考えられるが、STC 産生にいたらない少数の STC 産生菌種を検出している可能性が高い。本検出系は STC 産生菌の増殖前のリスクを検出することが可能と考える。

#### E. 結論

以上の結果から、食品または飼料に付着したカビ由来の DNA を回収し、培養を行わずに PCR によって STC 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。これまで STC を産生するカビを検出するために行われる培養法では、5 日から 14 日程度必要であったが、今回開発した手法では 4 時間程度で検出が可能であり、STC 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

#### F. 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 NL and Donaldson GC: Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Microbiology*

(1994) 61: 1323-1330

*Safety* in press (†筆頭著者同等貢献者)

- 3) Jurjevic Z, Peterson SW and Horn BW: *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus* (2012) 3: 759–795
- 4) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S: MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* (2013) 30: 2725–2729
- 5) Frisvad JC and Thrane U: Chapter 4 Mycotoxin production by food-borne fungi. Introduction to food-borne fungi. Somson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O, eds. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures (1995) 251–260
- 6) Jurjevic Z, Peterson SW, Solfrizzo M and Peraica M. Sterigmatocystin production by nine newly described *Aspergillus* species in section *Versicolores* grown on two different media. *Mycotoxin Res* (2013) 29: 141–145
- Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J and Sugita-Konishi, Y: Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Safety*, in press.
- Shiratori, N†, Kobayashi, N†, Tulayakul, P, Sugiura, Y, Takino, M, Endo, O and Sugita-Konishi Y: Occurrence of *Penicillium brocae* and *Penicillium citreonigrum*, related to mutagenic and toxic metabolites, respectively, in commercially available rice grains of Thailand. *Toxins* (2017) 9: E194 (†筆頭著者同等貢献者)

【学会発表】

G. 研究業績

【論文発表】

- Onami J†, Watanabe M†, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kamata Y Takahashi H, Kawakami H, Terajima J: Study on Fumonisin-productivity of *Aspergillus* from Foods and Environment. *Food*
- 1) Watanabe M, Suzuki Y, Takahashi H, Yoshinari T, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Goto K and Terajima J: Comparative study including fumonisin production on the phylogenetic tree of kuro-koji molds and their relatives isolated from Japanese fermented foods. *UJNR* (2017, 5, Washington DC)
- 2) Kobayashi N, Kubasaki A, Shiratori N, Watanabe M, Terajima J and Sugita-Konishi Y: Classification and sterigmatocystin-production of *Aspergillus* section *Versicolores* from Japanese foods and environments. *UJNR* (2017, 5, Washington DC)

- 3) 窪崎敦隆、小林直樹、高橋治男、吉成知也、高鳥浩介、寺嶋淳、小西良子、渡辺麻衣子。高度識別型 **DNA** 合成酵素を用いた玄米汚染真菌の検出。第 **44** 回日本防菌防黴学会 ( **2017, 9**, 大阪 )
- 4) 小林直樹、窪崎敦隆、渡辺麻衣子、小沼ルミ、上原さとみ、高橋由美、矢内美幸、寺嶋淳、高橋治男、高鳥浩介、小西良子。 ***Aspergillus section Versicolores*** におけるステリグマトシスチン産生菌種の分子生物学的検出方法の開発。日本マイコトキシン学会第 **80** 回学術講演会 ( **2017, 7**, 東京 )
- 5) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子。国内で分離された *Apergillus ochraceus* の再同定とその OTA 産生性。日本マイコトキシン学会第 **81** 回学術講演会 ( **2018, 1**, 東京 )
- 6) 窪田祐恵、尾畑瑠衣、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子。野菜由来乳酸菌のアフラトキシン類への結合能と胃内環境での挙動。日本マイコトキシン学会第 **81** 回学術講演会 ( **2018, 1**, 東京 )
- 7) 尾畑瑠衣、窪田祐恵、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子。アフラトキシン結合能を有する野菜由来乳酸菌の探索と消化液での安定性に関する研究。日本食品衛生学会第 **113** 回学術講演会 ( **2017, 11**, 東京 )
- 8) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子。 ***Aspergillus ochraceus sensu lato*** における OTA 産生と OTA 生合成関連遺伝子の保有状況。日本食品衛生学会第 **113** 回学術講演会 ( **2017, 11**, 東京 )

**表 1 . 供試菌株の同定結果と STC 産生性.**

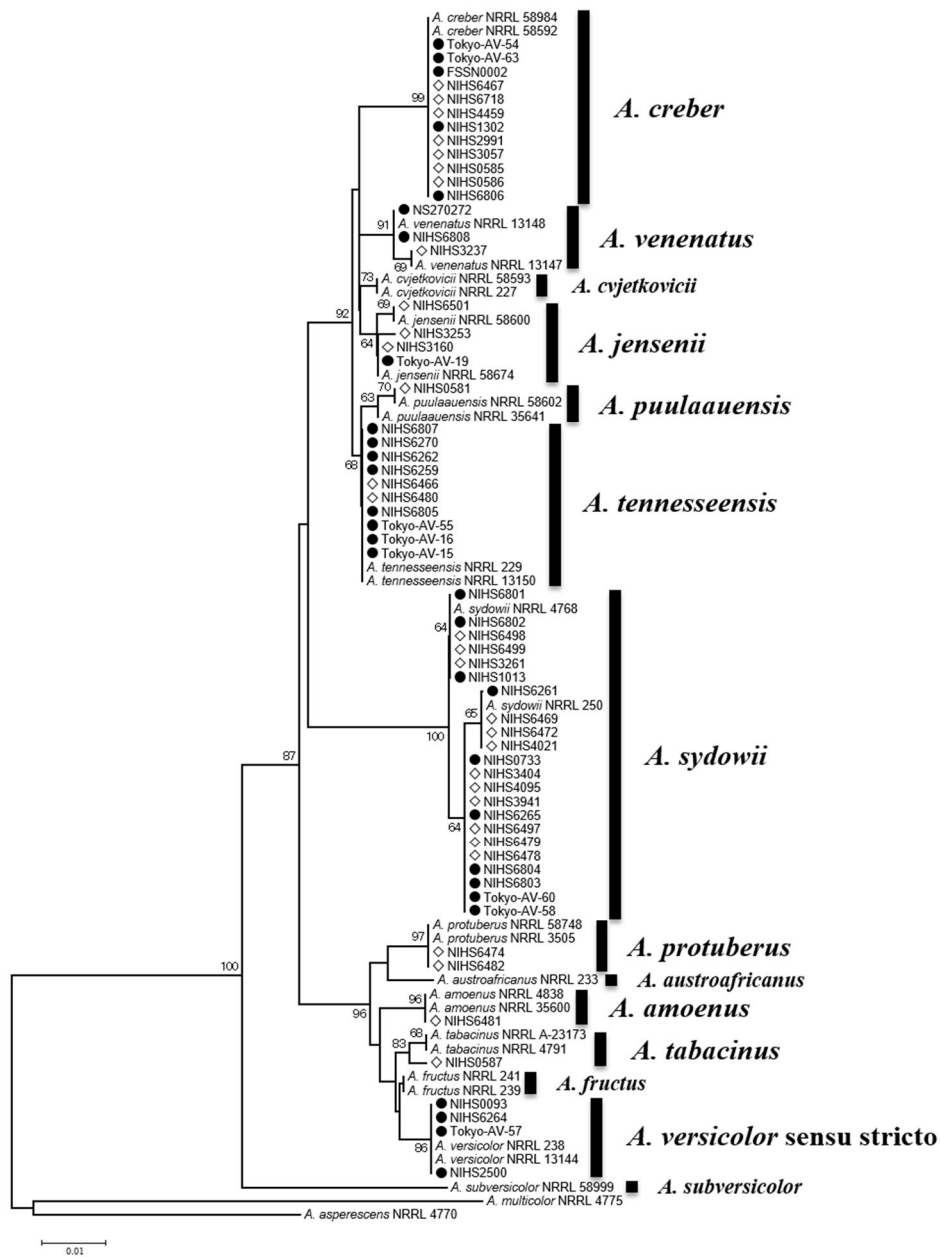
菌種	株番号	由来	STC 産生能	
<i>A. amoenus</i>	NIHS6481	ハウスダスト	-	
<i>A. creber</i>	FSSN0002	トリュフ(缶詰)	-	
	NIHS0585	馬の毛	-	
	NIHS0586	ハウスダスト	+	
	NIHS1302	ブドウ	+	
	NIHS2991	室内空気	+	
	NIHS3057	室内空気	+	
	NIHS4459	環境	+	
	NIHS6467	ハウスダスト	+	
	NIHS6718	ベッド	+	
	NIHS6806	ココア粉末	-	
	Tokyo-AV-54	オリーブオイル	+	
	Tokyo-AV-63	Barley tea	-	
	<i>A. jensenii</i>	NIHS3160	室内空気	+
		NIHS3253	室内付着	-
NIHS6501		ハウスダスト	-	
Tokyo-AV-19		精白きびもち	+	
<i>A. protuberus</i>	NIHS6474	ハウスダスト	-	
	NIHS6482	ハウスダスト	-	
<i>A. puulaauensis</i>	NIHS0581	ビニールクロス	-	
<i>A. sydowii</i>	NIHS0733	生薬	-	
	NIHS1013	寒天	-	
	NIHS3261	外気	-	
	NIHS3404	外気	-	
	NIHS3941	室内空気	-	
	NIHS4021	室内空気	-	
	NIHS4095	室内付着	-	
	NIHS6261	精米	-	
	NIHS6265	精米	-	
	NIHS6469	ハウスダスト	-	
	NIHS6472	ハウスダスト	-	
	NIHS6478	ハウスダスト	-	
	NIHS6479	ハウスダスト	-	

NIHS6497	ハウスダスト	-
NIHS6498	ハウスダスト	-
NIHS6499	ハウスダスト	-
NIHS6801	ピーナッツ	-
NIHS6802	ピーナッツ	-
NIHS6803	飲料	-
NIHS6804	ココナッツオイル	-
Tokyo-AV-58	干しイチジク	-
Tokyo-AV-60	麦茶	-

---

**表 1 . 供試菌株の同定結果と STC 産生性. (つづき)**

菌種	株番号	由来	STC 産生能
<i>A. tabacinus</i>	NIHS0587	セロファン	-
<i>A. tennesseensis</i>	NIHS6259	精米	-
	NIHS6262	精米	+
	NIHS6270	精米	+
	NIHS6466	ハウスダスト	-
	NIHS6480	ハウスダスト	-
	NIHS6805	レモンジュース	-
	NIHS6807	ココア粉末	-
	Tokyo-AV-15	大豆	+
	Tokyo-AV-16	茶葉(ジャスミンティー)	+
Tokyo-AV-55	ターメリック	-	
<i>A. venenatus</i>	NIHS3237	室内付着	-
	NIHS6808	大豆	+
	NS270272	玄米	-
<i>A. versicolor</i> sensu stricto	NIHS0093	玄米	+
	NIHS2500	玄米	+
	NIHS6264	精米	+
	Tokyo-AV-57	冷麺	-

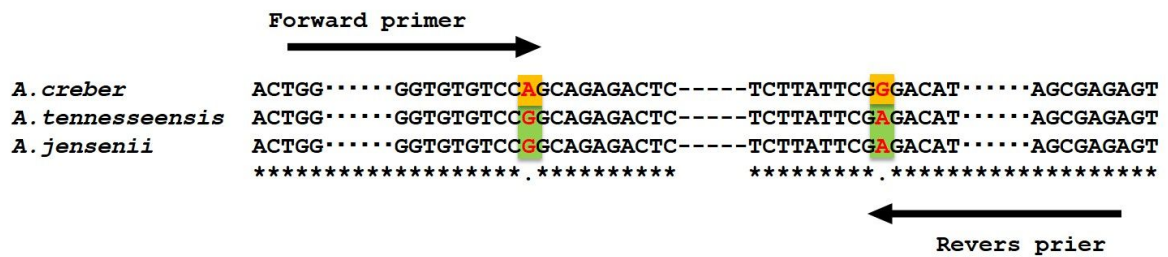


**図 1. 8-tubulin 遺伝子部分配列による系統樹**

供試菌株 60 株の配列データとデータベース登録配列から 39 配列データを使用して近隣結合法 (NJ 法) により系統樹を作成した。各枝状の数字はブートストラップ確立を示している。● : 食品由来株、◇ : 環境由来株



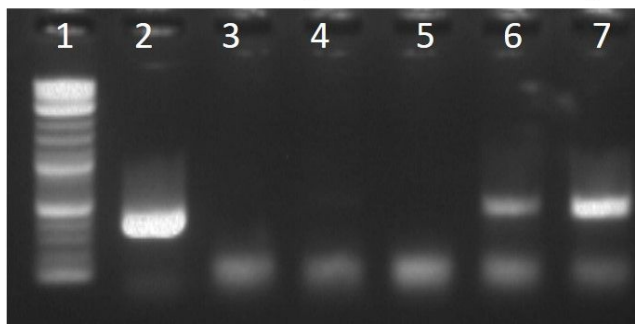
A.



B.

Primer set: creber\_only-F/R    other-F/R

DNA: M    cr    te    je    cr    te    je



DNA

cr: *A. creber*

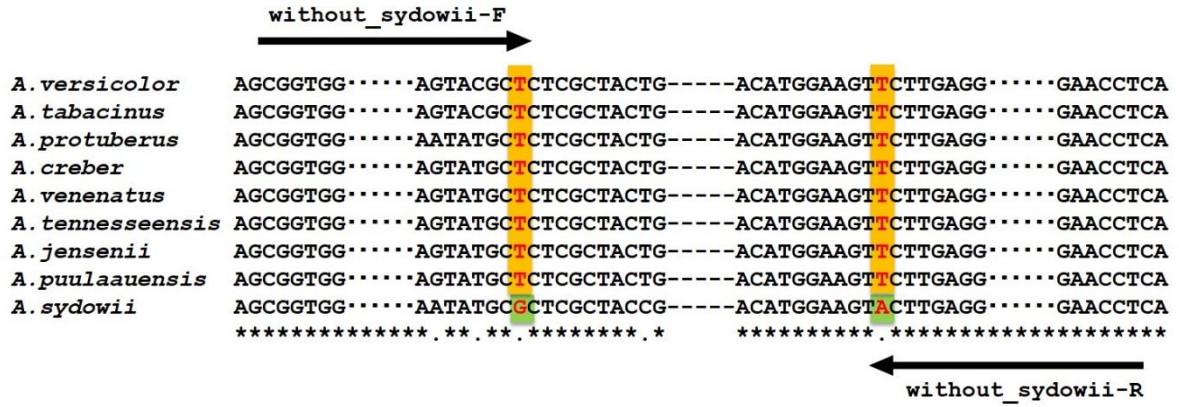
te: *A. tennesseensis*

je: *A. jensenii*

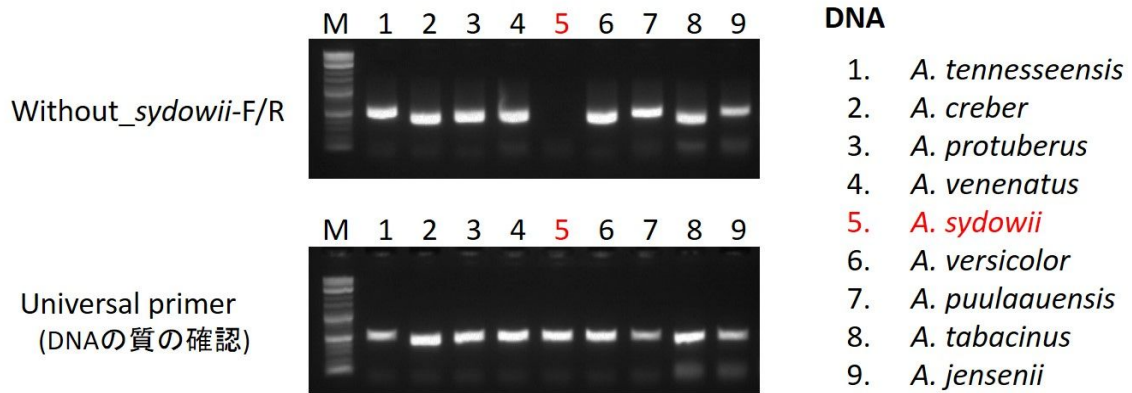
**図 2. *Aspergillus creber* 特異的検出用 Primer の検討**

A. *RPB2* 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニーリング部位。  
 B. HiDi DNA polymerase を用いた PCR の結果。

**A.**



**B.**



**図 3. *Aspergillus sydowii* を除く菌種検出用 Primer の検討**

**A.** *RPB2* 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニーリング部位。**B.** HiDi DNA polymerase を用いた PCR の結果。

	玄米検体													
	NC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
STC濃度 (μg/kg)	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.03	0.02	0.02	0.03

**図 4 . 玄米付着カビからの抽出 DNA における *Aspergillus sydowii* を除く *Aspergillus section Versicolores* の検出**

検体 1 ~ 9:平成 27 年度産国産玄米、検体 10 ~ 13:平成 25 年度産国産玄米。NC: negative control (陰性対照)、ND: Not detected

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 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
Onami J, Watanabe M <sup>†</sup> , Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kamata Y Takahashi H, Kawakami H, Terajima J	Study on Fumonisin-productivity of <i>Aspergillus</i> from Foods and Environment.	<i>Food Safety</i>	in press		2018
Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J and Sugita-Konishi, Y	Distribution of sterigmatocystin-producing <i>Aspergilli</i> in Japan.	<i>Food Safety</i>	in press		2018
Yoshinari, T, Takeda, N, Watanabe, M, Sugita-Konishi, Y.	Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified Forms of 4,15-Diacetoxyscyrpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food.	<i>Toxins (Basel)</i>	10(5). pii: E178. doi: 10.3390/toxins10050178.		2018