

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に関する研究

平成30年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者 小西 良子

令和元年（2019）年 5月

## 目 次

### I . 総括研究年度終了報告

- ステリグマトシスチンおよび 4,15-ジアセトキシシルペ  
ノールの安全性確保に関する研究 -----1

小西 良子(麻布大学)

### II . 分担研究年度終了報告

- 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  
ルの実態調査 -----15

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 -----37

渋谷 淳 (東京農工大学大学院)

- 3 . 培養によらないカビ毒産生菌種検出法の開発 ---57

小西 良子(麻布大学)

- III . 研究成果の刊行に関する一覧表 -----71

## I . 総括研究年度終了報告



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)

総括研究報告書

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

最終年度は、実態調査においては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 (4,15-4,15-DAS) で行った。毒性試験では STC の発達神経毒性を検討した。モニタリング手法では 4,15-DAS に着目し、Fusarium 属菌のうち 4,15-DAS 産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。

これまでの 2 年間の調査の結果で両かび毒が検出された食品を対象に汚染実態調査を行い、STC については、11 食品目計 257 検体を調査し、ハト麦加工品で 76%、国産小麦粉で 38%、輸入小麦粉で 32% の検出率であった。4,15-4,15-DAS については、8 食品目計 164 検体の調査を行い、コーンフラワーで 67%、ハト麦加工品で 64% の検出率であった。以上の結果より、日本人における STC ばく露の主要源は小麦である可能性が考えられた。また、4,15-4,15-DAS については日本人の摂取量が高い食品の汚染レベルが低いことから、ばく露量は低いと考えられた。

発達神経毒性影響の検討は、各群 12 匹の妊娠 SD ラットを用いて行った。雄児動物を対象とした海馬歯状回 (SGZ) における神経新生への影響を解析した結果、ばく露終了時に 15.0 ppm で顆粒細胞層下帯において、顆粒細胞系譜分化後期にある神経前駆細胞の増殖抑制による type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少を特徴とする神経新生障害と、それに対する修復性の反応として歯状回門における神経新生制御系である CALB1 陽性および PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロン数の増加を認めた。また、神経新生部位での DNA 傷害が示唆された。一方、細胞周期関連遺伝子の発現変動結果から、G1/S ないし G2/M チェックポイント機能の低下による代償性の増殖性反応が示唆された。コリン作動性入力に関連する受容体発現変動から、SGZ における細胞増殖抑制やそれに対する代償性の増殖性の反応が示唆された。成熟後では、顆粒細胞系譜の変化および GABA 性介在ニューロンの変化は消失したことから、STC の発達期ばく露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。児動物の神経新生障害に基づいた無毒性量は母動物の摂取量で 5.0 ppm (0.34–0.85 mg/kg 体重/日) と推定された。

Fusarium 属菌のうち 4,15-DAS 産生菌種のみを検出する方法の開発をモニタリング手法として試みた。昨年度までに行った STC 産生菌種の迅速検出法の開発で確立した、改変型 DNA 合成酵素を用いて標的菌種のみを増幅する PCR 法を 4,15-DAS 産生菌種へ応用した。Fusarium 属菌の種間で  $\beta$ -tubulin 遺伝子および Lys2 遺伝子の塩基配列を比較して、菌種特異的な検出を行うためのプライマーを設計した。Lys2 遺伝子の塩基配列をもとに設計した系ではマルチプレックス PCR にすることによって、一度の PCR で 4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出することとした。その結果、およびの PCR 法において、供試した全ての 4,15-DAS 産生菌種を検出することに成功した。以上の結果から、4,15-DAS 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。この手法は 4,15-DAS 汚染原因菌のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

## 研究協力者

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  
中島 正博 名古屋市衛生研究所  
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  
藤吉 智治 (一財)食品分析開発センタ  
ー

SUNATEC

七戸 八重子 (一財)日本食品検査  
猪之鼻 修一(一財)日本食品分析センタ  
ー  
小杉 正樹 (一財)日本食品分析センタ  
ー  
宮崎 光代 (一財)日本食品分析センタ  
ー  
小林 直樹 (麻布大学)  
渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研  
究所)

## A. 研究目的

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) は、かび毒のリスク評価を行う国際的機関であることから、JECFA でリスク評価の対象となったかび毒は、コーデックス食品規格として設定される可能性が非常に高い。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。

2016 年の JECFA において、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 (4,15-4,15-DAS) がリスク評価の対象となった。しかしながら、我が国におけるそれらかび毒の汚染実態に

ついてはこれまでほとんど報告がない。また、JECFA での結論にもある通り、毒性評価についても不十分な知見しかない。検査法に関しては、機器分析分野ではある程度の知見があるが、迅速簡便法や遺伝子的測定法についての知見は全くない。

そこで、本研究事業において STC 及び 4,15-4,15-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ばく露評価を実施し、日本人の健康に対するそれらかび毒の影響を評価すること、F1 世代への発達期神経障害に焦点を当てた毒性評価をすること、およびカビから直接かび毒産生遺伝子を検出する遺伝子的測定法の開発を行うこととした。

本年度は当該事業の最終年度であることから、昨年度までに得られた汚染実態の知見を用いて、汚染が検出される食品群のサンプル数を増やした。、毒性評価では STC を評価対象として、無毒性量を推定した。

輸入食品における検出法として、遺伝子的測定法の開発は、本年度は、*Fusarium* 属菌における 4,15-DAS 産生菌に着目した検討を行うこととした。

## B. 研究方法

### (1) 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) を用いた。溶出液を窒素気流により乾固後 LC-MS/MS に供した。

#### 2) 4,15-4,15-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。窒素気流により乾固後 LC-MS/MS に供した。

測定結果は平均値で表した。すなわち、検出限界値（LOD）未満の値は 0 に、検出限界値以上定量限界値（LOQ）未満の値は検出限界値に置き換えて算出した。中央値については、陽性率が 50%以上であった試料についてのみ算出した。

## （2）STC の発達神経毒性影響

妊娠 SD ラット（妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー）を、一群あたり 12 匹ずつとして 4 群に分け、STC を 0、1.7、5.0、15.0 ppm の用量で妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで混餌投与した。予備試験結果から、最高用量は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ことが期待される 15.0 ppm に設定した。乳汁移行確認試験は、生後 14 日目に予備試験の 12 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、STC 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 1 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 10～12 例の雄児動物の脳、肝臓、腎臓および肺は、重量を測定後、組織切片を作成した。切片は、DAB 発色にて ABC 法（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）、calbindin-D-28K（CALB1）、成熟ニューロンの指標である neuronal nuclei（NeuN）、細胞増殖活性の指標である proliferating cell nuclear antigen（PCNA）などを用いた。

母動物は分娩後 21 日に脳、肝臓、腎臓、肺重量を測定後、組織切片を作成した。。

残り半数の児動物は出生後 77 日まで STC を含まない通常飼料により飼育し、組織切片を作成、飼育中は一般状態を毎日、体重を週に 1 回の割合で測定した。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 15.0 ppm 群のメタカーン固定脳を用いて、大脳の Bregma の後方約 -2.2 mm の 2 mm 厚スライスより海馬歯状回部分を採取し 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）

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。

### (3) 培養によらないかび毒産生菌種検出法の開発

#### 1) 供試菌株

4,15-DAS 産生菌種として9菌種、これらの菌種と近縁だが4,15-DAS非産生菌種と考えられる、6菌種、合計15菌種15株を用いた。

#### 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℃で2日間培養し、ゲノムDNAの抽出はSDS法またはDNeasy plant mini kit(QIAGEN)を用いて行い、-20℃で保存した。

#### 3) 4,15-DAS産生菌種特異的配列の検索

4,15-DAS産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の  $\alpha$ -tubulin 遺伝子および *Lys2* 遺伝子の登録配列をNCBIのデータベースからダウンロードし、MEGA6.0を用いてClustalWによりアライメントを行った。

#### 4) 菌種特異的検出PCR

3)において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。PCR産物について2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅の有無を確認した。

## C. 研究結果

### (1) 実態調査

#### 1) 添加回収試験

STCの添加回収試験は11種の食品につ

いて実施した。ライ麦粉の4,15-DASの50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  添加群以外の回収率はいずれの濃度においても良好であり、国際的なクライテリアを満たしていた。

#### 2) STCの汚染実態

11食品目計257検体の調査を行った。最も陽性率が高かったのはハト麦加工品の76%であり、米、小豆、ライ麦粉、大麦加工品及びそば粉からも検出された。平均濃度が最も高かったのはハト麦加工品とライ麦粉の0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はライ麦粉の5.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。ハト麦加工品、国産小麦粉、ライ麦粉、そば粉からは0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上が検出された試料が認められたが、輸入小麦粉、米、小豆、大麦加工品においては検出されずとも全て0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。

#### 3) 4,15-DAS

8食品目計164検体について行った。最も陽性率が高かったのはコーンフラワーの67%であり、平均濃度が最も高かったのはハト麦の11  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

### (2) STCの発達神経毒性影響

#### 1) 体重、摂餌量、摂水量、着床数、産仔数:

母動物、児動物の体重は、体重、摂餌量および摂水量にSTCの影響と思われる変化は認められなかった。着床数、産仔数にSTCによる影響は認められなかった。

#### 2) 臓器重量:

母動物は、15.0 ppmで肝臓の絶対重量が高値を示したが、児動物は、ばく露終了時と成熟時の剖検で、雌雄いずれの臓器重量にも変化は認められなかった。



### 3) 免疫組織学的変化:

離乳時の雄児動物の脳海馬歯状回における免疫染色は、SGZにおいてDCX (type-2b, 3神経前駆細胞～未熟顆粒細胞)、PCNA (細胞増殖指標)の陽性細胞数が15.0 ppm群で有意に減少したが、成熟時の雄児動物では離乳時の顆粒細胞系譜および介在ニューロンの変化は全て回復した一方、歯状回門では、GABA性介在ニューロンであるCALB1およびPVALB陽性細胞が15.0 ppm群で有意に増加した。

### 4) 遺伝子発現解析:

離乳時の雄児動物の海馬歯状回における15.0 ppmでの遺伝子発現解析の結果、神経栄養因子をコードする*Bdnf*、細胞周期関連遺伝子である*Ccnd2*、DNA修復関連遺伝子である*Apex1*と*Ercc1*、およびアセチルコリン受容体をコードする*Chrna7*の発現増加を認めた。一方、神経栄養因子受容体をコードする*Ntrk2*、細胞周期関連分子をコードする*Cdk1*、*Cdk2*、*Cdkn1a*、*Cdkn1b*、*Cdkn1c*、*Cdkn2b*、DNA修復関連遺伝子である*Brip1*、アセチルコリン受容体をコードする*Chrn2*およびドパミン受容体をコードする*Drd2*の発現減少を認めた。

### (3) 培養によらないかび毒産生菌種検出法の開発

方法で記述した15菌種を用い、4,15-DAS産生性*Fusarium*属菌種9菌種を特異的に検出する系を検討した。

1) -tubulin 遺伝子部分配列を基にした4,15-DAS産生菌種特異的検出PCR

4,15-DAS産生菌種に特異的なサイトの

検索を行った結果、*F. graminearum* s. str.を除く7菌種にのみ共通するサイトがプライマーの3'末端に来るようにプライマーを設計したとともに*F. graminearum* s. str.特異的な領域にプライマーを設計し、二つのPCRを行うことで4,15-DAS産生菌種を特異的に検出する系の確立を試みた。

前者のプライマーセットでは4,15-DAS産生菌種9菌種のうち*F. graminearum* s. str.を除く8菌種において目的の増幅産物が得られ、後者のプライマーセットでは*F. graminearum* s. str.特異的な増幅が得られた。以上より、これら二つのPCRを組み合わせることで、4,15-DAS産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

2) Lys2 遺伝子部分配列を基にした4,15-DAS産生菌種特異的検出PCR

Lys2 遺伝子の配列がデータベースに登録されていた4,15-DAS産生性菌種7菌種および非産生菌種6菌種について塩基配列を比較したところ、*F. poae*を除く6菌種に共通する領域が存在したため、当該領域にプライマーを設計するとともに、*F. poae* 特異的な領域にプライマーを設計した。

その結果、*F. poae*ではおよそ220 bpの増幅産物が得られ、そのほかの4,15-DAS産生菌種8菌種においてはおよそ400 bpの増幅産物が得られた。4,15-DAS非産生菌種についてはすべて増幅が見られなかった。以上より、設計したマルチプレックスPCRの系により、4,15-DAS産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

## D. 考察

### (1) 実態調査

#### 1) STC の汚染実態

昨年度までの 2 年間の調査において、STC は国産小麦粉、ライ麦粉、ハト麦加工品及びホワイトソルガムから主に検出されたので、今年度も調査を行った結果、STC が検出された。陽性率は 8%と低かったものの、STC が穀類を幅広く汚染している実態が明らかになった。

#### 2) 4,15-DAS の汚染実態

昨年度までの 2 年間の結果と同様にハト麦加工品において陽性検体が多く認められた。日本産よりもタイとラオス産の検体で検出濃度が高い傾向も同様であった。

### (2) STC の発達神経毒性影響

STC は、出生後 21 日目で、15.0 ppm において SGZ における顆粒細胞系譜分化後期にある神経前駆細胞の増殖抑制による type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少を特徴とする神経新生障害が見られたが、それに対する修復性の反応として海馬歯状回門における神経新生制御系である CALB1 陽性および PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロン数の増加も観察された。これは STC 発達期ばく露による神経新生障害に対する神経保護的機構を示している事が示唆された。

STC の発達期ばく露により神経新生部位での DNA 傷害が示唆された。SGZ では PCNA 陽性細胞数が 15.0 ppm で減少しており、STC により type-2b から type-3 の増殖活性を示す神経前駆細胞の細胞増殖

が抑制されたものと考えられた。このことから、STC の曝露終了時では G<sub>1</sub>/S ないし G<sub>2</sub>/M チェックポイント機能の低下が示唆され、減少した神経前駆細胞の数を補うための増殖性反応が生じていることが示唆された。更に、CDK に結合しこれを活性化する補助因子であるサイクリンをコードする *Ccnd2* が STC 曝露により発現増加していた。この *Ccnd2* の発現増加も同様に細胞増殖の抑制により減少した神経細胞数を回復させるための恒常性維持機構の変化をとらえられた。15.0 ppm 群でアセチルコリン作動性入力の一部の受容体遺伝子とドパミン作動性入力の受容体遺伝子の発現減少を認めているが、どちらも細胞増殖と分化（樹状突起の伸長）に関与することが知られていることから、STC 発達期曝露によるアセチルコリン作動性およびドパミン作動性入力の減少が、顆粒細胞系譜の中で分化後期にあたる細胞の減少に関連した変動を示した可能性が示唆された。本研究では、15 ppm の STC 曝露により *Chrnb2* の発現が低値を示したことから、*Chrnb2* を発現するいずれかの GABA 性介在ニューロンの投射の抑制により、SGZ における細胞増殖抑制を生じた可能性がある。15 ppm の STC 曝露により *Chrna7* の発現が高値を示したことから、*Chrna7* を発現するいずれかの GABA 性介在ニューロンの投射の促進により、SGZ における細胞増殖抑制に対して代償性の増殖シグナルを与えた可能性がある。これらのことから、今後、*Drd2* の発現減少については CNTF や ChAT との関連で更なる検討が必要であると考えられる。PVALB<sup>+</sup> 介在ニューロンは歯状

回の顆粒細胞から分泌される BDNF の刺激に応じて増殖・分化を受けることが知られているが、15 ppm の STC ばく露により *Bdnf* の発現が高値を示したことは、顆粒細胞から分泌された BDNF が PVALB<sup>+</sup> 介在ニューロンの増数に機能し、成熟時における神経新生障害の回復に関連しているものと考えられた。

出生後 77 日目では、離乳時に認められた顆粒細胞系譜の変化および歯状回門における GABA 性介在ニューロンの変化は消失したことから、STC の発達期ばく露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。

### (3) 培養によらないかび毒産生菌種検出法の開発

今年度は、*Fusarium* 属菌のうち 4,15-DAS 産生菌種のみを検出する HiDi DNA polymerase を用いる迅速検出法の開発を行った。そこで、4,15-DAS 産生菌種および近縁な 4,15-DAS 非産生菌種について *-tubulin* 遺伝子および *Lys2* 遺伝子の塩基配列を比較し、4,15-DAS 産生菌種特異的な塩基配列にプライマーの設計を試みた。

*-tubulin* 遺伝子ではすべての 4,15-DAS 産生菌種に共通する特異的なサイトは見つからなかったため、*F. graminearum* s. str.のみを認識するプライマーセットと当該菌種を除く 8 菌種をまとめて認識するプライマーセットの二つを併用する系を開発した。この系は特異的に 4,15-DAS 産生菌種を検出することが可能ではあったが、二つの PCR を行う必要があった。

一方、*Lys2* 遺伝子を用いた場合には、配列上近い位置に *F. poae* 特異的なサイトとそのほかの 4,15-DAS 産生菌種 8 種にのみ共通するサイトが存在したことから、マルチプレックス PCR の系を検討した。その結果、全ての 4,15-DAS 産生菌種を検出することに成功した。このことにより、4,15-DAS 産生菌種においても、一度の PCR により迅速に標的菌種のみを検出する系を確立することができた。

今後は、4,15-DAS により汚染された食品から培養を行うことなく直接抽出した DNA を用いて PCR を行い、4,15-DAS 産生菌検出のためのスクリーニング法として利用可能か検討することが望まれる。

### E. 結論

STC と 4,15-DAS の日本に流通する食品を対象とした汚染実態調査では、STC は小麦粉、ライ麦粉、ハト麦加工品などの麦類加工品において主に検出された。4,15-DAS はハト麦加工品で主に検出され、小麦などのその他の穀類からは検出されなかった。

STC の毒性評価として、胎児がばく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した。ばく露終了時で、15.0 ppm において SGZ における顆粒細胞系譜分化後期の神経新生障害と、それに対する修復性の反応を認めた。DNA 修復関連遺伝子は発現増加を示したことから DNA 傷害が示唆された。成熟後では、顆粒細胞系譜の変化および GABA 性介在ニューロンの変化は消失したことから、STC の発達期ばく露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。児動

物の神経新生障害に基づいた無毒性量は母動物の摂取量で5.0 ppm (0.34-0.85 mg/kg 体重/日)と判断された。

培養によらないかび毒産生菌種検出法では、4,15-DAS 産生菌種 9 菌種および非産生菌種 6 菌種を用いて、*F. graminearum* s. str.のみを認識するプライマーセットと当該菌種を除く 8 菌種をまとめて認識するプライマーセットの二つを併用する系と Lys2 遺伝子の情報を基にして作成したマルチプレックス PCR の系を検討した。その結果マルチプレックス PCR の系で、一回の PCR 操作で 4,15-DAS 産生菌種を特異的に、且つ迅速に検出することが可能な方法確立することができた。この方法を利用することで、食品または飼料に付着した 4,15-DAS 産生菌種を培養することなく直接 PCR によって迅速に検出することができると考えられる。4 時間程度で 4,15-DAS を産生するカビの食品等からの検出が可能となり、4,15-DAS 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

## F. 研究業績

### 1. 論文発表

- 1) 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: Fumonisin-production by *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Japanese Foods and Environments. *Food Safety* (2018) 6: 74-82 (†筆頭著者同等貢献者)

- 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* (2018) 6: 67-73
  - 3) Nakajima K, Masubuchi Y, Ito Y, Inohana M, Takino M, Saegusa Y, Yoshida T, Sugita-Konishi Y, Shibutani M. Developmental exposure of citreoviridin transiently affects hippocampal neurogenesis targeting multiple regulatory functions in mice. *Food Chem Toxicol.* (2018) 120: 590-602.
  - 4) Nakajima K, Tanaka T, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Woo GH, Yoshida T, Shibutani M. Developmental Exposure of Mice to T-2 Toxin Increases Astrocytes and Hippocampal Neural Stem Cells Expressing Metallothionein. *Neurotox Res.* (2019) 35(3): 668-683.
- ### 2. 学会発表
- 1) Sugita-Konishi Y, Takeda N, Watanabe M, Kobayashi N and Yoshinari T. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the

- Modified 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. SOT 58<sup>th</sup> annual meeting (2019, 3, Baltimore)
- 2) 加田睦月、内ヶ島美岐子、吉成知也、三宅司郎、小林直樹、小西良子. ステリグマトシステインのELISAによるスクリーニング法の開発. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会 (2019, 1, 川崎)
- 3) 佐藤和貴、吉成知也、窪崎敦隆、小林直樹、小西良子、工藤由起子、渡辺麻衣子. 国内流通穀類におけるステリグマトシステイン産生菌の分布に関する研究. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会 (2019, 1, 川崎)
- 4) 小林直樹、古川優奈、佐藤悠人、渡辺麻衣子、栗林尚志、島津徳人、小西良子. Change of fungal microflora in the house by dogs. 平成 30 年室内環境学会学術大会 (2018, 12, 東京)
- 5) 小池義浩、吉成知也、中川博之、上垣隆一、高橋治男、清水公德、工藤由起子、渡辺麻衣子. *Fusarium* 属菌におけるフモニシン類産生性に関する分類学的検討. 日本マイコトキシン学会第 82 回学術講演会 (2018, 8, 帯広)
- 6) Watanabe M, Onami J, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J. Study on fumonisin-productivity of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* derived from foods in Japanese markets and environment UJNR 2018 (2018, 5, Yokohama)
- 7) 中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳 : ジアセトキシシルペノールのマウス発達期曝露による海馬歯状回における不可逆的な神経新生障害、第45回日本毒性学会学術年会、大阪、第45回日本毒性学会学術年会要旨集 : P-44、S 230、7月18-20日、2018
- 8) Kota Nakajima, Yuko Ito, Yasunori Masubuchi, Satomi Kikuchi, Toshinori Yoshida, Yoshiko Sugita-Konishi, Makoto Shibusani: Reversal effect of citreoviridin and irreversible effect of diacetoxyscirpenol on hippocampal neurogenesis by developmental exposure in mice. ESVP-ECVP Annual Meeting, Rumania, September 5-8<sup>th</sup>, 2018
- 9) 中島康太、伊藤優子、増淵康哲、菊地聡美、小西良子、吉田敏則、渋谷淳 : かび毒シトレオビリジンとジアセトキシシルペノールのマウス発達期曝露による生後の海馬神経新生に対する影響の比較、第161回日本獣医学会学術集会、つくば、第161

回日本獣医学会学術集会講演要旨  
集：BO-33、P. 309、9月11-13日、  
2018

- 10) 中島 康太、伊藤 優子、増淵 康  
哲、菊地 聡美、吉田 敏則、小西  
良子、渋谷 淳：ステリグマトシス  
チンのラット発達期曝露による海馬  
歯状回における神経新生に対する影  
響、第35回日本毒性病理学会総会及  
び学術集会、東京、第35回日本毒性  
病理学会学術集会講演要旨集：P-

02、p.61、1月31-2月1日、2019

#### 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

## II . 分担研究年度終了報告





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)

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(4,15-4,15-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かび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4,15-4,15-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ばく露評価を実施し、日本人の健康に対するそれらかび毒の影響を評価することとした。本年度は、これまでの2年間の調査の結果で両かび毒が検出された食品を対象に汚染実態調査を行った。

STCについては、11食品目計257検体の調査を行った。最も陽性率が高かったのはハト麦加工品の76%であり、続いて国産小麦粉の38%、輸入小麦粉の32%であった。米、小豆、ライ麦粉、大麦加工品及びそば粉からも検出された。コーンフラワー、ホワイトソルガム、ビール及びワインからは定量限界値以上のSTCは検出されなかった。最大濃度はライ麦粉の5.1 µg/kgであった。4,15-4,15-DASについては、8食品目計164検体の調査を行った。最も陽性率が高かったのはコーンフラワーの67%であり、次いでハト麦加工品の64%であった。平均濃度が最も高かったのはハト麦の11 µg/kgであった。コーンフラワー、ソルガム及びライ麦粉の陽性検体中の4,15-4,15-DAS濃度は全て1 µg/kg以下であった。最大濃度はハト麦における60 µg/kgであった。国産小麦粉、輸入小麦粉、そば粉、ハト麦茶及び米からは定量限界値以上の4,15-4,15-DASは検出されなかった。以上の結果より、日本人におけるSTC摂取の主要源は小麦である可能性が考えられた。また、4,15-4,15-DASについては日本人の摂取量が高い食品の汚染レベルが低いことから、ばく露量は低いと考えられた。

研究協力者

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  
中島 正博 名古屋市衛生研究所  
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  
藤吉 智治 (一財)食品分析開発センター  
SUNATEC

七戸 八重子 (一財)日本食品検査  
猪之鼻 修一 (一財)日本食品分析センター  
小杉 正樹 (一財)日本食品分析センター  
宮崎 光代 (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かび毒は、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 M<sub>1</sub> 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、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。

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 (4,15-4,15-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<sup>1,2)</sup>。4,15-4,15-DAS は 2016 年の JECFA で評価され、さらに EFSA においても 2018 年にリスク評価の結果が公表された<sup>3)</sup>。このような背景からこの 2 種のかび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。さらに両かび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。4,15-4,15-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。2017 年度は STC と 4,15-4,15-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、平均濃度は 2016 年度の結果と同程度であった。4,15-4,15-DAS については、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。一部の穀類で 4,15-4,15-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 4,15-4,15-DAS の汚染は確認されていない。2018 年度は、ばく露量推定の実施に向けて両かび毒の汚染調査を継続した。

## 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。

精製はイムノアフィニティーカラム (IAC、堀場製作所社製 AFLAKING) を用いた。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 (一晩置いて脱気した) とワインについては検体 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 (ビールとワインは 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。

<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

#### (2) 4,15-4,15-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試料中の 4,15-4,15-DAS 濃度が 5 又は 50 μg/kg となるよう標準品を添加し、暗所に 1 時間放置した後抽出を行った。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。その抽出液から 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。

ハト麦茶については、製品の作り方に記載された量の沸騰水でティーバックからお茶を煮出したものを試料とした。2 mL のアセトニトリルと 2 mL の蒸留水で前処理した固相カラム (Biotage 社製 ISOLUTE Myco 60mg) に試料

2 g を供した。蒸留水 3 mL と 10%アセトニトリル 3 mL でカラムを洗浄後、アセトニトリル 2 mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル：水 (1 : 9) 1 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

平均値については、検出限界値 (LOD) 未満の値は 0 に、検出限界値以上定量限界値 (LOQ) 未満の値は検出限界値に置き換えて算出した。中央値については、陽性率が 50%以上であった試料についてのみ算出した。

#### C. 研究結果

##### (1) 添加回収試験

STC の添加回収試験の結果を表 1 に示した。11 種の食品について、0.5 μg/kg 添加群においては回収率の平均値は 83.6~106.3%の範囲に収まり、標準偏差は 11.3%以下であった。5 μg/kg 添加群においては、回収率の平均値は 81.2 ~ 101.4%の範囲に収まり、標準偏差は 6.8%以下であった。4,15-4,15-DAS の添加回収試験の結果を表 2 に示した。5 μg/kg 添加群においては、

回収率の平均値は 92.1~105.6%の範囲に収まり、標準偏差は 10.8%以下であった。50 µg/kg 添加群においては、回収率の平均値は 78.3~105.6%の範囲に収まり、標準偏差は 8.6%以下であった。コーデックス委員会が定めた分析法の手順書において、100 µg/kg、10 µg/kg 及び 1 µg/kg 添加時の回収率のクライテリアはそれぞれ 80~110%、60~115%、40~120%とされている。ライ麦粉の 4,15-4,15-DAS の 50 µg/kg 添加群以外の回収率はこれらのクライテリアを満たしていた。

#### ( 2 ) STC の汚染実態 ( 表 3、図 1 )

11 食品目計 257 検体の調査を行った。最も陽性率が高かったのはハト麦加工品の 76%であり、続いて国産小麦粉の 38%、輸入小麦粉の 32%であった。米、小豆、ライ麦粉、大麦加工品及びそば粉からも検出された。コーンフラワー、ホワイトソルガム、ビール及びワインからは定量限界値以上の STC は検出されなかった。平均濃度が最も高かったのはハト麦加工品とライ麦粉の 0.3 µg/kg であった。STC が検出されたその他の食品における平均値は 0.01~0.06 µg/kg の範囲であった。中央値についてはハト麦加工品で 0.09 µg/kg であった。最大濃度はライ麦粉の 5.1 µg/kg であった。ハト麦加工品、国産小麦粉、ライ麦粉、そば粉からは 0.5 µg/kg 以上の STC が検出された試料が認められたが、輸入小麦粉、米、小豆、大麦加工品においては検出された STC は全て 0.5 µg/kg 未満であった。

#### ( 3 ) 4,15-4,15-DAS ( 表 4、図 2 )

8 食品目計 164 検体について 4,15-4,15-DAS の汚染を調べた。最も陽性率が高かったのはコーンフラワーの 67%であり、次いでハト麦加工品の 64%であった。平均濃度が最も高かったのはハト麦の 11 µg/kg であった。コーンフラワー、ソルガム及びライ麦粉の陽性検体中の

4,15-4,15-DAS 濃度は全て 1 µg/kg 以下であった。中央値についてハト麦加工品で 0.8 µg/kg、コーンフラワーで 0.4 µg/kg であった。最大濃度はハト麦における 60 µg/kg であった。国産小麦粉、輸入小麦粉、そば粉、ハト麦茶及び米からは定量限界値以上の 4,15-4,15-DAS は検出されなかった。

#### D. 考察

##### ( 1 ) STC の汚染実態

これまでの 2 年間の調査において、STC は国産小麦粉、ライ麦粉、ハト麦加工品及びホワイトソルガム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 が検出された。各年ごとの汚染レベルに大きな変化はなかったが、小麦粉、ライ麦粉及びハト麦加工品といった麦類においては定常的な汚染が認められた。そば粉については今年度初めて調査を行った。陽性率は 8%と低かったものの、1 検体で 0.6 µg/kg の STC が検出されており、STC が穀類を幅広く汚染している実態が明らかになった。

ハト麦やそば粉といった食品については、ヨーロッパなど他の地域で行われた調査結果は無く、それら食品における STC 汚染は本調査が初の報告である。今後、そば類などの加工品についても調査を行う必要が考えられる。

##### ( 2 ) 4,15-4,15-DAS の汚染実態

これまでの 2 年間の結果と同様にハト麦加工品において陽性検体が多く認められた。日本産よりもタイとラオス産の検体で検出濃度が高い傾向も同様であった。コーンフラワー、ライ麦粉及びホワイトソルガムにおいても 4,15-4,15-DAS が検出されたが、汚染濃度はハト麦加工品と比べると非常に低かった。ハト麦加工品から 4,15-4,15-DAS が高頻度で検出されることから、ハト麦茶の調査を今年度初めて行った。ハト麦加工品とは異なり、4,15-4,15-DAS

陽性の検体は認められなかった。ハト麦茶に使われているハト麦のほとんどが、4,15-4,15-DAS 汚染レベルが低い日本産であることや、お茶にすることで薄まっていることが原因と考えられる。

#### E. 結論

昨年度に引き続き、STC と 4,15-4,15-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 は小麦粉、ライ麦粉、ハト麦加工品などの麦類加工品において主に検出された。小麦加工品は日本人の摂取量が多いことから、日本人における STC 摂取の主要食品と考えられる。4,15-4,15-DAS はハト麦加工品で主に検出され、小麦などのその他の穀類からは検出されなかった。ハト麦茶においても検出されなかったことから、日本人におけるばく露量は 2010～2015 年度に調査を行った T-2 トキシンや HT-2 トキシンよりも非常に少ないと考えられる。

#### F. 参考

- 1) Mo HG, Pietri A, MacDonald SJ, Anagnostopoulos C, Spanjere M. 2015. Survey on sterigmatocystin in food. EFSA Supporting Publications. 12(3):774E.
- 2) World Health Organization. 2017. Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical Report Series, No. 1002:106–122.
- 3) European Food Safety Authority. 2018. Risk to human and animal health related to the presence of 4,15 diacetoxyscirpenol in food and feed. EFSA Journal. 16(8):5367

表1 STCの添加回収試験の結果

食品	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回収率 (n = 6)		
				範囲 (%)	平均値 (%)	標準偏差 (%)
小麦粉			0.5	77.2-100.4	91.5	7.7
			5	92.4-105.2	98.7	5.5
ハト麦加工品			0.5	89.1-104.6	95.6	6.8
			5	92.6-99.9	96.7	2.9
ライ麦粉			0.5	89.2-111.6	98.9	7.8
			5	88.8-102.4	96.4	5.4
米			0.5	101.0-107.4	106.3	4.2
			5	96.2-104.9	101.3	3.3
そば粉			0.5	75.7-88.2	83.6	4.5
			5	78.6-83.0	81.2	1.6
ホワイト ソルガム	0.02	0.05	0.5	82.4-102.8	95.9	7.5
			5	92.4-101.2	97.1	3.6
大麦加工品			0.5	96.7-112.0	102.9	5.9
			5	97.7-104.9	101.4	2.7
小豆			0.5	80.8-112.9	103.2	11.3
			5	91.2-106.9	100.2	6.8
コーン フラワー			0.5	101.0-109.6	104.3	3.0
			5	97.6-100.6	98.7	1.2
ワイン			0.5	84.8-93.9	89.2	4.6
			5	91.2-97.6	94.4	2.5
ビール			0.5	90.7-94.0	92.6	1.3
			5	90.6-101.9	97.6	4.0

表2 4,15-DAS の添加回収試験の結果

食品	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回収率(n=3)	
		平均値 (%)	標準偏差 (%)
コーンフラワー	5	101.5	4.9
	50	105.6	0.7
そば粉	5	93.7	2.0
	50	93.9	1.2
ホワイトソルガム	5	105.0	1.0
	50	99.9	1.2
ハト麦加工品	5	98.5	10.8
	50	103.4	8.6
ライ麦粉	5	101.8	0.9
	50	78.3	1.7
国産小麦粉	5	105.6	1.1
	50	103.6	1.4
精米	5	97.1	1.6
	50	95.7	7.3
輸入小麦粉	5	102.6	0.8
	50	102.1	1.1
ハト麦茶	5	92.1	0.8
	50	87.3	0.8

表3 ステリグマトシステンの汚染実態

製品	検体数	陽性数	各濃度 (µg/kg) に含まれる検体数				平均値 (µg/kg)	中央値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)
			LOQ-0.5	0.5-1.5	1.5-5	>5			
ハト麦加工品	25	19 ( 76 %)	14	4	1	0.3	0.09	2.0	
国産小麦粉	21	8 ( 38 %)	7	1		0.06	-	0.5	
輸入小麦粉	22	7 ( 32 %)	7			0.02	-	0.1	
米	20	5 ( 25 %)	5			0.04	-	0.2	
小豆	11	2 ( 18 %)	2			0.01	-	0.07	
ライ麦加工品	27	4 ( 15 %)	1	1	1	0.3	-	5.1	
大麦加工品	20	2 ( 10 %)	2			0.01	-	0.1	
そば粉	25	2 ( 8 %)	1	1		0.04	-	0.6	
コーンフラワー	21	0 ( 0 %)				-	-	-	
ホワイトソルガム	5	0 ( 0 %)				-	-	-	
ビール	30	0 ( 0 %)				-	-	-	
ワイン	30	0 ( 0 %)				-	-	-	



図1 ステリグマトシスチンの汚染実態（平均濃度）

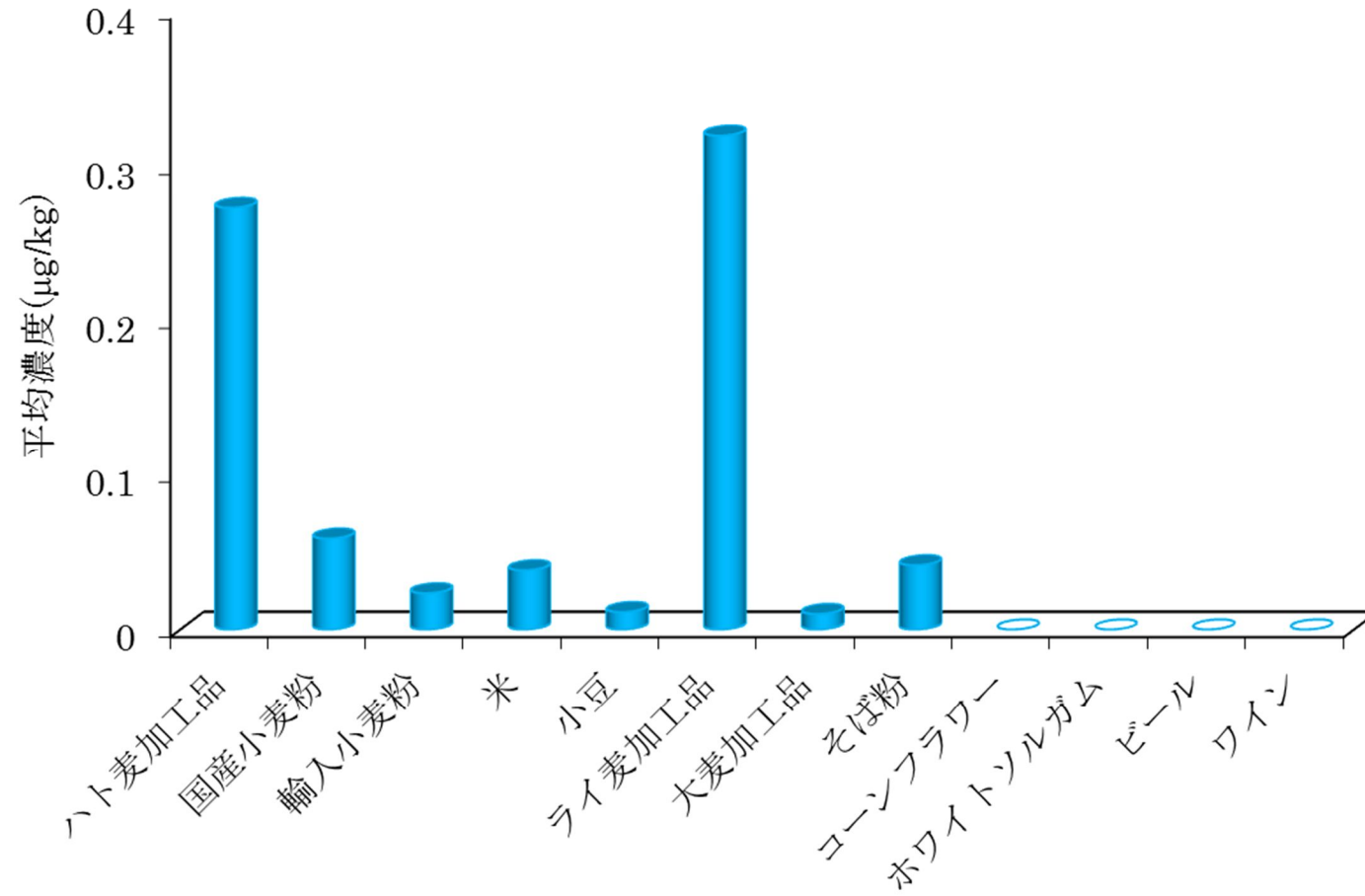
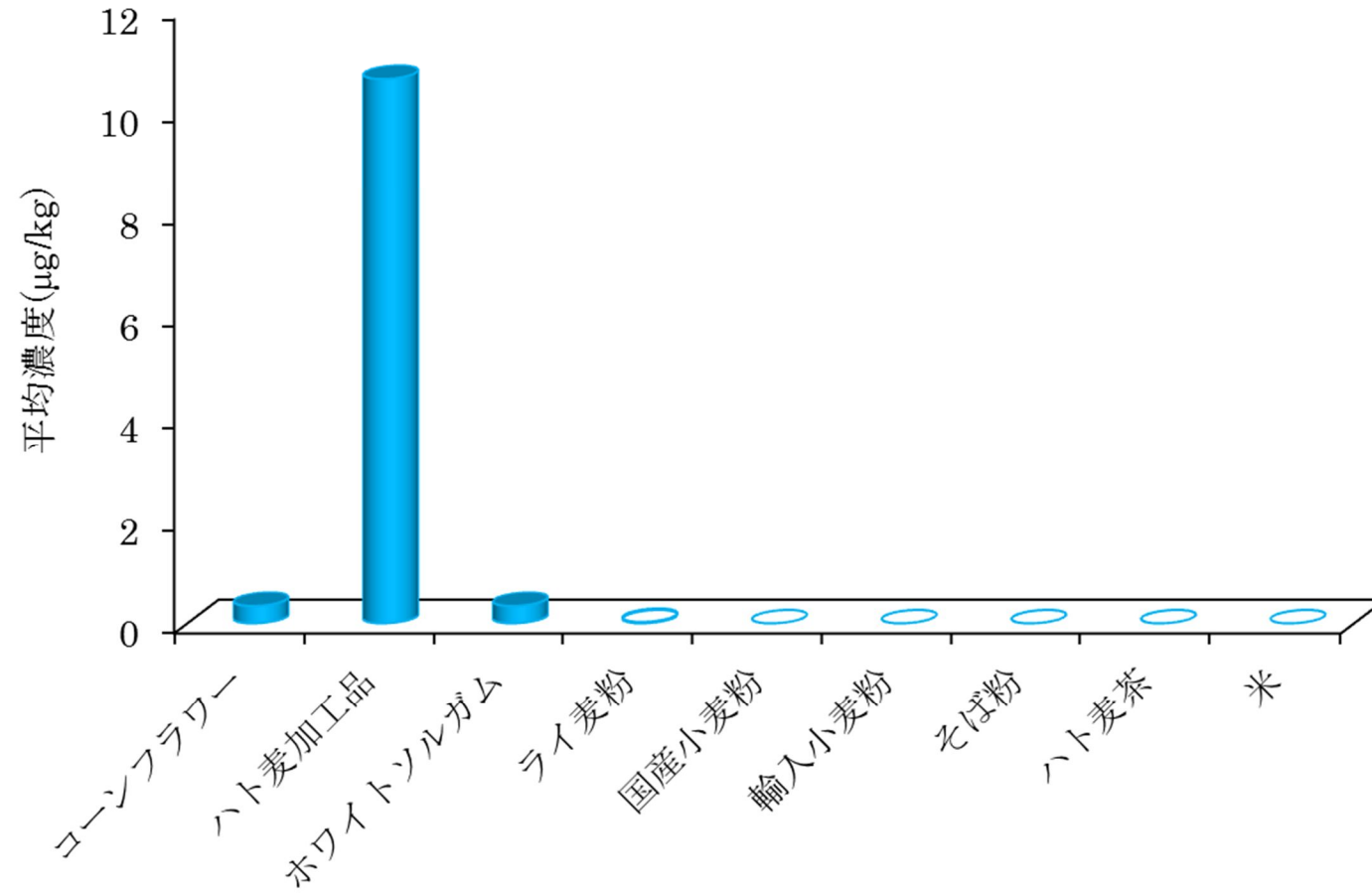


表 4 4,15-ジアセトキシスシルペノールの汚染実態

	調査数	LOD/LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	陽性数(%)	平均値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	中央値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	最大値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
コーンフラワー	21	0.1/0.3	67	0.3	0.4	1
ハト麦加工品	25	0.2/0.5	64	11	0.8	60
ホワイトソルガム	5	0.08/0.3	40	0.3	-	0.8
ライ麦粉	21	0.01/0.03	24	0.03	-	0.2
国産小麦粉	21	0.06/0.2	0	-	-	-
輸入小麦粉	22	0.02/0.06	0	-	-	-
そば粉	17	0.08/0.3	0	-	-	-
ハト麦茶	12	0.03/0.1	0	-	-	-
米	20	0.01/0.04	0	-	-	-

図2 4,15-4,15-DAS の汚染実態 (平均濃度)



別添-1 各試料における STC 汚染濃度

ND は検出限界値( 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$  )未満、下線は検出限界値以上、定量限界値( 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$  )未満の値である。

ハト麦

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-HT01	不明	0.09
30-HT02	タイ	0.72
30-HT03	タイ	0.57
30-HT04	タイ	0.10
30-HT05	不明	0.46
30-HT06	中国	0.11
30-HT07	岩手県	0.06
30-HT08	栃木県	<u>0.03</u>
30-HT09	岩手県	0.07
30-HT10	岩手県	<u>0.05</u>
30-HT11	栃木県	<u>0.03</u>
30-HT12	出雲市斐川町	<u>0.02</u>
30-HT13	岩手県	0.05
30-HT14	栃木県	0.06
30-HT15	岩手県	0.05
30-HT16	岩手県	0.05
30-HT17	タイ	0.36
30-HT18	国産	0.11
30-HT19	不明	0.83
30-HT20	ラオス	1.98
30-HT21	岩手県	<u>0.03</u>
30-HT22	国産	ND
30-HT23	タイ	0.64
30-HT24	国産	0.27
30-HT25	不明	0.21

国産小麦粉

サンプルID	産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-JWF01	国産	0.08
30-JWF02	北海道	0.07
30-JWF03	北海道	0.07
30-JWF04	北海道	0.1
30-JWF05	北海道	0.1
30-JWF06	北海道	0.5
30-JWF07	北海道	0.06
30-JWF08	北海道	<u>0.03</u>
30-JWF09	北海道	0.07
30-JWF10	福岡県	ND
30-JWF11	福岡県	ND
30-JWF12	九州産	ND
30-JWF13	九州産	ND
30-JWF14	北海道	<u>0.02</u>
30-JWF15	九州産	ND
30-JWF16	北海道	<u>0.02</u>
30-JWF17		<u>0.03</u>
30-JWF18	北海道	<u>0.03</u>
30-JWF19	九州産	ND
30-JWF20	滋賀県産	ND
30-JWF21	熊本県菊池市	<u>0.03</u>

輸入小麦粉

サンプルID	産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-FWF01	フランス	<u>0.03</u>
30-FWF02	フランス、北米主体	<u>0.04</u>
30-FWF03	北米、オーストラリア主体	0.10
30-FWF04	カナダ、アメリカ	0.12
30-FWF05	カナダ、アメリカ	0.07
30-FWF06	アメリカ、カナダ主体	0.05
30-FWF07	カナダ、アメリカ	<u>0.03</u>
30-FWF08	イタリア	<u>0.04</u>
30-FWF09	アメリカ、カナダ主体	<u>0.03</u>
30-FWF10	カナダ、アメリカ主体	<u>0.03</u>
30-FWF11	カナダ	<u>0.02</u>
30-FWF12	カナダ、アメリカ、国産主体	<u>0.04</u>
30-FWF13	フランス	0.05
30-FWF14	カナダ、アメリカ主体	ND
30-FWF15	カナダ、アメリカ主体	ND
30-FWF16	カナダ、アメリカ主体	ND
30-FWF17	北米全体	0.06
30-FWF18	アメリカ、カナダ、オーストラリア主体	ND
30-FWF19	カナダ、アメリカ主体	<u>0.03</u>
30-FWF20	アメリカ主体	ND
30-FWF21	アメリカ主体	ND
30-FWF22	アメリカ主体	0.05

## 米

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-RC01	秋田県大潟村	0.1
30-RC02	日本	<u>0.03</u>
30-RC03	秋田県	<u>0.04</u>
30-RC04	北海道	<u>0.03</u>
30-RC05	新潟県	0.06
30-RC06	新潟県	<u>0.04</u>
30-RC07	茨城県	0.1
30-RC08	熊本県	0.2
30-RC09	北海道	ND
30-RC10	日本	ND
30-RC11	日本	<u>0.03</u>
30-RC12	山形県庄内産	ND
30-RC13	京都府丹後産	ND
30-RC14	北海道空知	ND
30-RC15	北海道	ND
30-RC16	佐賀県	ND
30-RC17	岩手県	ND
30-RC18	青森県	ND
30-RC19	新潟県	ND
30-RC20	日本	0.1

## 小豆

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-AD01	北海道	0.05
30-AD02	北海道	ND
30-AD03	北海道(十勝)	ND
30-AD04	北海道	ND
30-AD05	北海道	ND
30-AD06	北海道	ND
30-AD07	岡山県	ND
30-AD08	日本	ND
30-AD09	岡山県	ND
30-AD10	中国	0.07
30-AD11	岡山県	ND

ライ麦加工品

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-RY01	ドイツ	ND
30-RY02	カナダ	ND
30-RY03	不明	ND
30-RY04	不明	ND
30-RY05	ドイツ	ND
30-RY06	不明	ND
30-RY07	オーストラリア	5.1
30-RY08	フランス	ND
30-RY09	不明	ND
30-RY10	不明	ND
30-RY11	ドイツ、カナダ主体	ND
30-RY12	ドイツ、カナダ主体	ND
30-RY13	フランス	ND
30-RY14	不明	ND
30-RY15	不明	0.9
30-RY16	不明	2.6
30-RY17	不明	ND
30-RY18	不明	ND
30-RY19	不明	ND
30-RY20	不明	0.08
30-RY21	ドイツ	ND
30-RY22	ドイツ	ND
30-RY23	不明	ND
30-RY24	ドイツ、カナダ主体	ND
30-RY25	長野県	ND
30-RY26	ドイツ	ND
30-RY27	ドイツ	ND

大麦加工品

サンプルID	原産国	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-BA01	岩手県	ND
30-BA02	岩手県	ND
30-BA03	国内産	ND
30-BA04	国内産	ND
30-BA05	国内産	ND
30-BA06	岩手県	ND
30-BA07	国内産	ND
30-BA08	国内産	ND
30-BA09	九州	ND
30-BA10	国内産	ND
30-BA11	国内産	0.1
30-BA12	アメリカ、カナダ	ND
30-BA13	アメリカ、カナダ	ND
30-BA14	ニュージーランド	ND
30-BA15	岡山県美作市産	ND
30-BA16	不明	ND
30-BA17	不明	ND
30-BA18	岩手県	0.1
30-BA19	国内産	ND
30-BA20	国内産	ND

コーンフラワー

サンプルID	産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-CG01	オーストラリア	ND
30-CG02		ND
30-CG03	アメリカ	<u>0.03</u>
30-CG04	アメリカ	ND
30-CG05		ND
30-CG06	アメリカ	ND
30-CG07		ND
30-CG08		ND
30-CG09		ND
30-CG10		ND
30-CG11	アメリカ	ND
30-CG12	アメリカ	ND
30-CG13	メキシコ	ND
30-CG14	アメリカ	ND
30-CG15	中国	ND
30-CG16		ND
30-CG17	アメリカ	ND
30-CG18	アメリカ	ND
30-CG19	アメリカ	ND
30-CG20	アメリカ	ND
30-CG21	アメリカ	ND



そば粉

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-SF01	北海道	ND
30-SF02	北海道	ND
30-SF03		0.4
30-SF04		ND
30-SF05	北海道	ND
30-SF06	秋田県	ND
30-SF07	長野県	ND
30-SF08	北海道	ND
30-SF09	国産	ND
30-SF10	国産	ND
30-SF11	国産	ND
30-SF12	福島県	ND
30-SF13	国産	ND
30-SF14	国産	ND
30-SF15		ND
30-SF16	北海道	ND
30-SF17	国産	ND
30-SF18	北海道	ND
30-SF19	秋田県	ND
30-SF20	北海道	ND
30-SF21	北海道	ND
30-SF22	国産	ND
30-SF23	輸入	0.6
30-SF24	北海道	ND
30-SF25	長野県	ND

### ホワイトソルガム

サンプルID	産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-WS01	アメリカ	ND
30-WS02	不明	<u>0.03</u>
30-WS03	不明	ND
30-WS04	オーストラリア	<u>0.04</u>
30-WS05	アメリカ	ND

ビールは 30 検体中 1 件がアメリカからの輸入品で、その他は国産であった。ワインは国産 15 検体と輸入品 15 検体の合計 30 検体であった。ビールとワイン中の STC は全て ND。

別添-2 各試料における 4,15-4,15-DAS の汚染濃度

ND は検出限界値未満、下線は検出限界値以上、定量限界値未満の値である。  
各試料の検出限界値と定量限界値は表 3 に示している。

コーンフラワー			ハト麦加工品		
サンプルID	原産国	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	サンプルID	原産地	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-CG01	オーストラリア	ND	30-HT01	不明	2
30-CG02		0.39	30-HT02	タイ	42
30-CG03	アメリカ合衆国	ND	30-HT03	タイ	47
30-CG04	アメリカ合衆国	ND	30-HT04	タイ	60
30-CG05		<u>0.25</u>	30-HT05	不明	4
30-CG06	アメリカ合衆国	<u>0.18</u>	30-HT06	中国	1
30-CG07		0.37	30-HT07	岩手県	ND
30-CG08		1.17	30-HT08	栃木県	ND
30-CG09		0.45	30-HT09	岩手県	ND
30-CG10		0.79	30-HT10	岩手県	ND
30-CG11	アメリカ合衆国	<u>0.25</u>	30-HT11	栃木県	ND
30-CG12	アメリカ合衆国	ND	30-HT12	出雲市斐川町	1
30-CG13	メキシコ	0.38	30-HT13	岩手県	ND
30-CG14	アメリカ合衆国	0.31	30-HT14	栃木県	ND
30-CG15	中国	0.46	30-HT15	岩手県	1
30-CG16		0.32	30-HT16	岩手県	2
30-CG17	アメリカ合衆国	0.33	30-HT17	タイ	10
30-CG18	アメリカ合衆国	0.50	30-HT18	国産	25
30-CG19	アメリカ合衆国	0.42	30-HT19	不明	34
30-CG20	アメリカ合衆国	0.55	30-HT20	ラオス	12
30-CG21	アメリカ合衆国	0.38	30-HT21	岩手県	ND
			30-HT22	国産	ND
			30-HT23	タイ	15
			30-HT24	国産	11
			30-HT25	不明	1

ライ麦粉

サンプルID	原産地	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-RY01	ドイツ	ND
30-RY02	カナダ	ND
30-RY03	不明	ND
30-RY04	不明	ND
30-RY05	ドイツ	ND
30-RY06	不明	0.11
30-RY07	オーストラリア	ND
30-RY08	フランス	0.17
30-RY09	不明	ND
30-RY10	不明	0.10
30-RY11	ドイツ、カナダ主体	ND
30-RY12	ドイツ、カナダ主体	0.10
30-RY13	フランス	0.11
30-RY14	不明	ND
30-RY15	不明	ND
30-RY16	不明	ND
30-RY17	不明	ND
30-RY18	不明	ND
30-RY19	不明	ND
30-RY20	不明	ND
30-RY21	ドイツ	ND

ホワイトソルガム

サンプルID	原産地	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-SG01	アメリカ	0.8
30-SG02	不明	0.8
30-SG03	不明	<u>0.09</u>
30-SG04	オーストラリア	ND
30-SG05	アメリカ	ND

ハト麦茶

サンプルID	原産地	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30-HTT01	日本	ND
30-HTT02	富山県、島根県	ND
30-HTT03	日本	ND
30-HTT04	日本	ND
30-HTT05	鳥取県	ND
30-HTT06	日本	ND
30-HTT07		ND
30-HTT08	日本	ND
30-HTT09	中国、タイ	ND
30-HTT10	島根県	ND
30-HTT11	島根県	ND
30-HTT12	熊本県	ND
30-HTT13	富山県	ND

国産小麦粉、輸入小麦粉、米及びそば粉（30-SG01-17を調査）については、STCの調査と同じ品目であり、かつ4,15-4,15-DASは検出されなかったので記載はしない。

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 30 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 30 年度はステリグマトシスチン (Sterigmatocystin: STC) について検討した。各群 12 匹の妊娠 SD ラットを用いて、妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで母動物に対して 0、1.7、5.0、15.0 ppm の用量で混餌投与し、児動物について出生後 21 日目 (離乳時) と 77 日目 (成熟時) に解剖を行った。母動物では試験期間を通じて体重、摂餌量および摂水量に変化は認められなかったが、剖検時には 15.0 ppm で肝臓の絶対重量の低値を認めた。一方、児動物では、雌雄ともに対照群と STC 曝露群の間で体重と臓器重量に差は認められなかった。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、曝露終了時に 15.0 ppm で顆粒細胞層下帯における顆粒細胞系譜分化後期にある神経前駆細胞の増殖抑制による type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少を特徴とする神経新生障害と、それに対する修復性の反応として歯状回門における神経新生制御系である CALB1 陽性および PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロン数の増加を認めた。DNA 修復関連遺伝子は発現増加を示し、神経新生部位での DNA 傷害が示唆された。一方、細胞周期関連遺伝子の発現変動結果から、G<sub>1</sub>/S ないし G<sub>2</sub>/M チェックポイント機能の低下による代償性の増殖性の反応が示唆された。コリン作動性入力に関連する受容体発現変動から、SGZ における細胞増殖抑制やそれに対する代償性の増殖性の反応が示唆された。また、*Bdnf* は発現高値を示したことから、顆粒細胞から分泌された BDNF が PVALB<sup>+</sup> 介在ニューロンの増数に機能して成熟時における神経新生障害からの回復に寄与した可能性が示唆された。成熟後では、顆粒細胞系譜の変化および GABA 性介在ニューロンの変化は消失したことから、STC の発達期曝露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。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 5.0 ppm (0.34-0.85 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 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。分担研究者らは、記憶や学習の中枢であり、生後もニューロンを産生し続ける海馬歯状回に着目し、顆粒細胞層下帯 (SGZ) における顆粒細胞系譜の各種分化指標と歯状回門に分布して顆粒細胞の分化や移動を制御する介在ニューロンの分布を検討することで、数々の神経毒性物質が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発生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 30 年度は、*Aspergillus* 属の真菌により産生されるアフラトキシン B<sub>1</sub> の前駆物質であり、酸化的 DNA 損傷誘発性と共に弱い発がん性が報告されているかび毒であるステリグマトシスチン (Sterigmatocystin: STC) を評価対象とした。STC 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 STC 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曝露させ、曝露終了時 (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 SD ラット (妊娠 1 日で入手、日本エスエルシー) を、一群あたり 12 匹ずつとし

て 4 群に分け、STC を 0、1.7、5.0、15.0 ppm の用量で妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで混餌投与した。最高用量は、予備的に 0、6、12 ppm を設定して母動物に対して混餌投与した際に、12 ppm の児動物で PND 5 ~ PND 12 にかけて、用量依存的な体重減少が認められたが、母動物には影響が認められなかったため、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ことが期待される 15.0 ppm に設定した。STC の乳汁移行に関して、生後 14 日目に予備試験の 12 ppm 投与群の児動物の胃から乳汁を採取し、STC 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=11; 2 群: n=12; 3、4 群: n=10) に雄 6 例、雌 2 例を確保するよう児動物数を調整した。投与期間中、一般状態は 1 日 1 回観察し、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 1 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 ~ 12 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 30 ~ 40 例、雌 11 ~ 18 例の児動物は CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓および肺重量を測定後、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 1 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)、calbindin-D-28K (CALB1)、成熟ニューロンの指標である neuronal nuclei (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 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、PVALB および CALB1 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 SGZ 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。

母動物は分娩後 21 日に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 麻酔下で放血し、脳、肝臓、腎臓、肺重量を測定後、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 STC 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 10~12 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 10~12 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、肺重量を測定後、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 15.0 ppm 群のメタカーン固定脳を用いて、大脳の Bregma の後方約 -2.2 mm の 2 mm 厚スライスより海馬歯状回部分を採取し、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、摂餌量、摂水量：

母動物は、体重、摂餌量および摂水量に STC の影響と思われる変化は認められなかった (Fig. 1)。



また、児動物の体重も、曝露終了時および成熟時ともに、STCの影響と思われる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STCによる影響は認められなかった (Table 2)。

#### 臓器重量：

母動物は、15.0 ppmで肝臓の絶対重量が高値を示した (Table 2)。児動物は、曝露終了時と成熟時の剖検で、雌雄いずれの臓器重量にも変化は認められなかった (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DCX (type-2b, 3 神経前駆細胞～未熟顆粒細胞) の陽性細胞数が15.0 ppm群で有意に減少し (Fig. 3)、PCNA (細胞増殖指標) の陽性細胞数が15.0 ppm群で有意に減少した (Fig. 5)。また、歯状回門では、GABA性介在ニューロンであるCALB1およびPVALB陽性細胞が15.0 ppm群で有意に増加した (Fig. 4)。一方、成熟時の雄児動物を対象とした海馬歯状回における免疫染色の結果、離乳時の顆粒細胞系譜および介在ニューロンの変化は全て回復した (Fig. 3, 4)。

#### 遺伝子発現解析：

離乳時の雄児動物の海馬歯状回における15.0 ppmでの遺伝子発現解析の結果、神経栄養因子をコードする*Bdnf*、細胞周期関連遺伝子である*Ccnd2*、DNA修復関連遺伝子である*Apex1*と*Ercc1*、およびアセチルコリン受容体をコードする*Chrna7*の発現増加を認めた (Table 4)。一方、神経栄養因子受容体をコードする*Ntrk2*、細胞周期関連分子をコ

ードする*Cdk1*、*Cdk2*、*Cdkn1a*、*Cdkn1b*、*Cdkn1c*、*Cdkn2b*、DNA修復関連遺伝子である*Brip1*、アセチルコリン受容体をコードする*Chrn2*およびドパミン受容体をコードする*Drd2*の発現減少を認めた。

#### D. 考察

STCのラット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、15.0 ppmにおいてSGZにおける顆粒細胞系譜分化後期にある神経前駆細胞の増殖抑制によるtype-2b前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少を特徴とする神経新生障害と、それに対する修復性の反応として海馬歯状回門における神経新生制御系であるCALB1陽性およびPVALB陽性GABA性介在ニューロン数の増加を認めた。

曝露終了時において、歯状回門におけるGABA性介在ニューロンのうち、PVALB陽性細胞とCALB1陽性細胞の数が15.0 ppm群で増加を示した。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<sup>1)</sup> (Song et al., 2013)、type-3神経前駆細胞の数の回復のために増加していた可能性がある。また、PVALBおよびCALB1はcalcium-buffering proteinとも呼ばれ、カルシウムの恒常性を維持することにより、成体神経新生に対して神経保護的に働くとされている<sup>2)</sup> (Verdaguer et al., 2015)。そのため、PVALBおよびCALB1陽性細胞の増加は、STC発達期曝露による神経新生障害に対する神経保護的機構を示している事が示唆された。SGZにおける免疫組織化学的解析でPCNA陽性細胞の減少を認めているものの、遺伝子発現解析では、細胞周期関連遺伝子の多くで細胞増殖に向かう方向での発現変動

が認められたことから、STC 発達期曝露によって生じた神経新生における細胞増殖抑制に対し、発達期曝露が終了する時期で代償性の機序が作用して神経新生の回復性の変化が始まっている可能性が示唆された。

曝露終了時の歯状回での遺伝子発現解析において、0 ppm 対照群と 15.0 ppm 群の比較において、DNA 修復関連遺伝子の *Apex1* と *Ercc1* で発現の増加を認めたことから、STC の発達期曝露により神経新生部位での DNA 傷害が示唆された。SGZ では PCNA 陽性細胞数が 15.0 ppm で減少しており、STC により type-2b から type-3 の増殖活性を示す神経前駆細胞の細胞増殖が抑制されたものと考えられた。一方、15 ppm の STC により、G<sub>1</sub> 期あるいは G<sub>2</sub> 期の進行に機能するサイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase; CDK) や細胞周期関連分子をコードする遺伝子の発現が減少を示した。このことから、STC の曝露終了時では G<sub>1</sub>/S ないし G<sub>2</sub>/M チェックポイント機能の低下が示唆され、減少した神経前駆細胞の数を補うための増殖性の反応が生じていることが示唆された。更に、CDK に結合しこれを活性化する補助因子であるサイクリンをコードする *Ccnd2* が STC 曝露により発現増加していた。D 型サイクリンは、各種分裂促進因子 (マイトジェン) などの刺激に呼応して発現し、CDK4 または CDK6 と結合し、その cyclin D-CDK4/6 複合体は細胞周期の標的タンパク質をリン酸化し、細胞周期を G<sub>1</sub> 期から S 期へと移行させる<sup>3)</sup> (Malumbres & Barbacid, 2009) ことが知られている。よって、*Ccnd2* の発現増加も同様に細胞増殖の抑制により減少した神経細胞数を回復させるための恒常性維持機構の変化をとらえたものと考えられた。15.0 ppm 群でアセチルコリン作動性入力の一部の受容体遺伝子とドパミン作動性入力の受容

体遺伝子の発現減少を認めているが、どちらも type-3 神経前駆細胞に入力し細胞増殖と分化 (樹状突起の伸長) に関与することが知られている<sup>4)</sup> (Campbell et al., 2010) ことから、STC 発達期曝露によるアセチルコリン作動性およびドパミン作動性入力の減少が、顆粒細胞系譜の中で分化後期にあたる細胞の減少に関連した変動を示した可能性が示唆された。具体的には、CHRNA7 と CHRNB2 はコリン作動性入力の投射を受ける海馬歯状回のニューロンに発現する代表的なイオンチャンネル型ニコチン作動性アセチルコリン受容体であり<sup>5)</sup> (Kaneko et al., 2006) 其中で CHRNB2 は GABA 性介在ニューロンに発現しており、SGZ に分布する神経前駆細胞の増殖に必須の役割を果たすことが知られている<sup>6)</sup> (Harrist et al., 2004)。ラットの海馬歯状回では、外部からのコリン作動性入力が CHRNB2 を発現する GABA 性介在ニューロンを興奮させることが知られている<sup>7)</sup> (Pitler and Alger, 1992)。本研究では、15 ppm の STC 曝露により *Chrnb2* の発現が低値を示したことから、*Chrnb2* を発現するいずれかの GABA 性介在ニューロンの投射の抑制により、SGZ における細胞増殖抑制を生じた可能性がある。CHRNA7 は歯状回の顆粒細胞や GABA 性介在ニューロンに発現することが知られており、特に後者に強く発現して、SGZ における顆粒細胞系譜の増殖や神経保護の役割を担う<sup>8)</sup> (Liu and Wu, 2006)。本研究では、15 ppm の STC 曝露により *Chrna7* の発現が高値を示したことから、*Chrna7* を発現するいずれかの GABA 性介在ニューロンの投射の促進により、SGZ における細胞増殖抑制に対して代償性の増殖シグナルを与えた可能性がある。ドパミン作動性入力に関しては、D2 受容体の活性化による海馬の神経新生の促進に毛様体神経栄養因子 (CNTF) の関与が

知られている<sup>9)</sup> (Yang et al., 2008)。一方で、D2 様ドパミン受容体のアゴニストは SGZ の顆粒細胞系譜の増殖や分化に影響を与えないとの報告がある<sup>10)</sup> (Takamura et al., 2014)。更には、歯状回門における GABA 性介在ニューロンは ChAT を発現しており<sup>11)</sup> (Mahalik et al., 1988)、ラットに対して D2 受容体のアンタゴニストであるハロペリドールの投与により ChAT の発現を増加させるとの報告がある<sup>12)</sup> (Levey et al., 1984)。以上より、今後、*Drd2* の発現減少については CNTF や ChAT との関連で更なる検討が必要であると考えられる。介在ニューロンは *trkB* 受容体を発現しており<sup>13)</sup> (Altar et al., 1994)、その中で、PVALB<sup>+</sup>介在ニューロンは歯状回の顆粒細胞から分泌される BDNF の刺激に応じて増殖・分化を受けることが知られている<sup>14,15)</sup> (Danzer and McNamara, 2004; Waterhouse et al., 2012)。本研究では、15 ppm の STC 曝露により *Bdnf* の発現が高値を示したことは、顆粒細胞から分泌された BDNF が PVALB<sup>+</sup>介在ニューロンの増数に機能し、成熟時における神経新生障害の回復に関連しているものと考えられた。

出生後 77 日目では、離乳時に認められた顆粒細胞系譜の変化および歯状回門における GABA 性介在ニューロンの変化は消失したことから、STC の発達期曝露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。

## 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、ラットを用いた STC の発達期曝露実験を行った。その結果、曝露終了時で、15.0 ppm において SGZ における顆粒細胞系譜分化後期にある神経前駆細胞の増殖抑制による type-2b 前駆細胞～未熟顆粒細胞の減少を特

徴とする神経新生障害と、それに対する修復性の反応として歯状回門における神経新生制御系である CALB1 陽性および PVALB 陽性 GABA 性介在ニューロン数の増加を認めた。DNA 修復関連遺伝子は発現増加を示し、神経新生部位での DNA 傷害が示唆された。一方、細胞周期関連遺伝子の発現変動結果から、G<sub>1</sub>/S ないし G<sub>2</sub>/M チェックポイント機能の低下による代償性の増殖反応が示唆された。コリン作動性入力に関連する受容体発現変動から、SGZ における細胞増殖抑制やそれに対する代償性の増殖性の反応が示唆された。また、*Bdnf* は発現高値を示したことから、顆粒細胞から分泌された BDNF が PVALB<sup>+</sup>介在ニューロンの増数に機能して成熟時における神経新生障害からの回復に寄与した可能性が示唆された。成熟後では、顆粒細胞系譜の変化および GABA 性介在ニューロンの変化は消失したことから、STC の発達期曝露による神経新生障害は可逆的であることが示唆された。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 5.0 ppm(0.34-0.85 mg/kg 体重/日)と判断された。

## 参考文献

- 1) Song J, Sun J, Moss J, Wen Z, Sun GJ, Hsu D, Zhong C, Davoudi H, Christian KM, Toni N, Ming GL, Song H. Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus. *Nat Neurosci.* 2013; 16(12): 1728–1730.
- 2) Verdaguer E, Brox S, Petrov D, Olloquequi J, Romero R, de Lemos ML, Camins A, Auladell C. Vulnerability of calbindin, calretinin and parvalbumin in a transgenic/knock-in

- APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis. *Exp Gerontol.* 2015; 69: 176–188.
- 3) Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(3): 153–166.
  - 4) Campbell NR, Fernandes CC, Halff AW, Berg DK. Endogenous signaling through alpha7-containing nicotinic receptors promotes maturation and integration of adult-born neurons in the hippocampus. *J Neurosci.* 2010; 30(26): 8734–8744.
  - 5) Kaneko N, Okano H, Sawamoto K. Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes Cells.* 2006; 11(10): 1145–1159.
  - 6) Harrist A, Beech RD, King SL, Zanardi A, Cleary MA, Caldarone BJ, Eisch A, Zoli M, Picciotto MR. Alteration of hippocampal cell proliferation in mice lacking the beta 2 subunit of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Synapse.* 2004; 54(4): 200–206.
  - 7) Pitler TA, Alger BE. Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol.* 1992; 450: 127–142.
  - 8) Liu Q, Wu J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors serve as sensitive targets that mediate beta-amyloid neurotoxicity. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 27(10): 1277–1286.
  - 9) Yang P, Arnold SA, Habas A, Hetman M, Hagg T. Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice. *J Neurosci.* 2008; 28(9): 2231–2241.
  - 10) Takamura N, Nakagawa S, Masuda T, Boku S, Kato A, Song N, An Y, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T, Kusumi I. The effect of dopamine on adult hippocampal neurogenesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014; 50: 116–124.
  - 11) Mahadik SP, Laev H, Korenovsky A, Karpiak SE. Haloperidol alters rat CNS cholinergic system: enzymatic and morphological analyses. *Biol Psychiatry.* 1988; 24(2): 199–217.
  - 12) Levey AI, Wainer BH, Rye DB, Mufson EJ, Mesulam MM. Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons intrinsic to rodent cortex and distinction from acetylcholinesterase-positive neurons. *Neuroscience.* 1984; 13(2): 341–353.
  - 13) Altar CA, Boylan CB, Fritsche M, Jackson C, Hyman C, Lindsay RM. The neurotrophins NT-4/5 and BDNF augment serotonin, dopamine, and GABAergic systems during behaviorally effective infusions to the substantia nigra. *Exp Neurol.* 1994; 130(1): 31–40.
  - 14) Danzer SC, McNamara JO. Localization of brain-derived neurotrophic factor to distinct

terminals of mossy fiber axons implies regulation of both excitation and feedforward inhibition of CA3 pyramidal cells. J Neurosci. 2004; 24(50): 11346–11355.

- 15) Waterhouse EG, An JJ, Orefice LL, Baydyuk M, Liao GY, Zheng K, Lu B, Xu B. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. J Neurosci. 2012; 32(41): 14318–14330.

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakajima K, Masubuchi Y, Ito Y, Inohana M, Takino M, Saegusa Y, Yoshida T, Sugita-Konishi Y, Shibutani M. Developmental exposure of citreoviridin transiently affects hippocampal neurogenesis targeting multiple regulatory functions in mice. Food Chem Toxicol. 2018; 120: 590-602.
- 2) Nakajima K, Tanaka T, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Woo GH, Yoshida T, Shibutani M. Developmental Exposure of Mice to T-2 Toxin Increases Astrocytes and Hippocampal Neural Stem Cells Expressing Metallothionein. Neurotox Res. 2019; 35(3): 668-683.

### 2. 学会発表

- 1) 中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳：ジアセ

トキシスシルペノールのマウス発達期曝露による海馬歯状回における不可逆的な神経新生障害、第45回日本毒性学会学術年会、大阪、第45回日本毒性学会学術年会要旨集：P-44、S 230、7月18-20日、2018

- 2) Kota Nakajima, Yuko Ito, Yasunori Masubuchi, Satomi Kikuchi, Toshinori Yoshida, Yoshiko Sugita-Konishi, Makoto Shibutani: Reversal effect of citreoviridin and irreversible effect of diacetoxyscirpenol on hippocampal neurogenesis by developmental exposure in mice. ESVP-ECVP Annual Meeting, Rumania, September 5-8<sup>th</sup>, 2018
- 3) 中島康太、伊藤優子、増淵康哲、菊地聡美、小西良子、吉田敏則、渋谷淳：かび毒シトレオビリジンとジアセトキシスシルペノールのマウス発達期曝露による生後の海馬神経新生に対する影響の比較、第161回日本獣医学会学術集会、つくば、第161回日本獣医学会学術集会講演要旨集：B0-33、P. 309、9月11-13日、2018
- 4) 中島 康太、伊藤 優子、増淵 康哲、菊地 聡美、吉田 敏則、小西 良子、渋谷 淳：ステリグマトシスチンのラット発達期曝露による海馬歯状回における神経新生に対する影響、第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、第35回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集：P-02、p.61、1月31-2月1日、2019

## 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



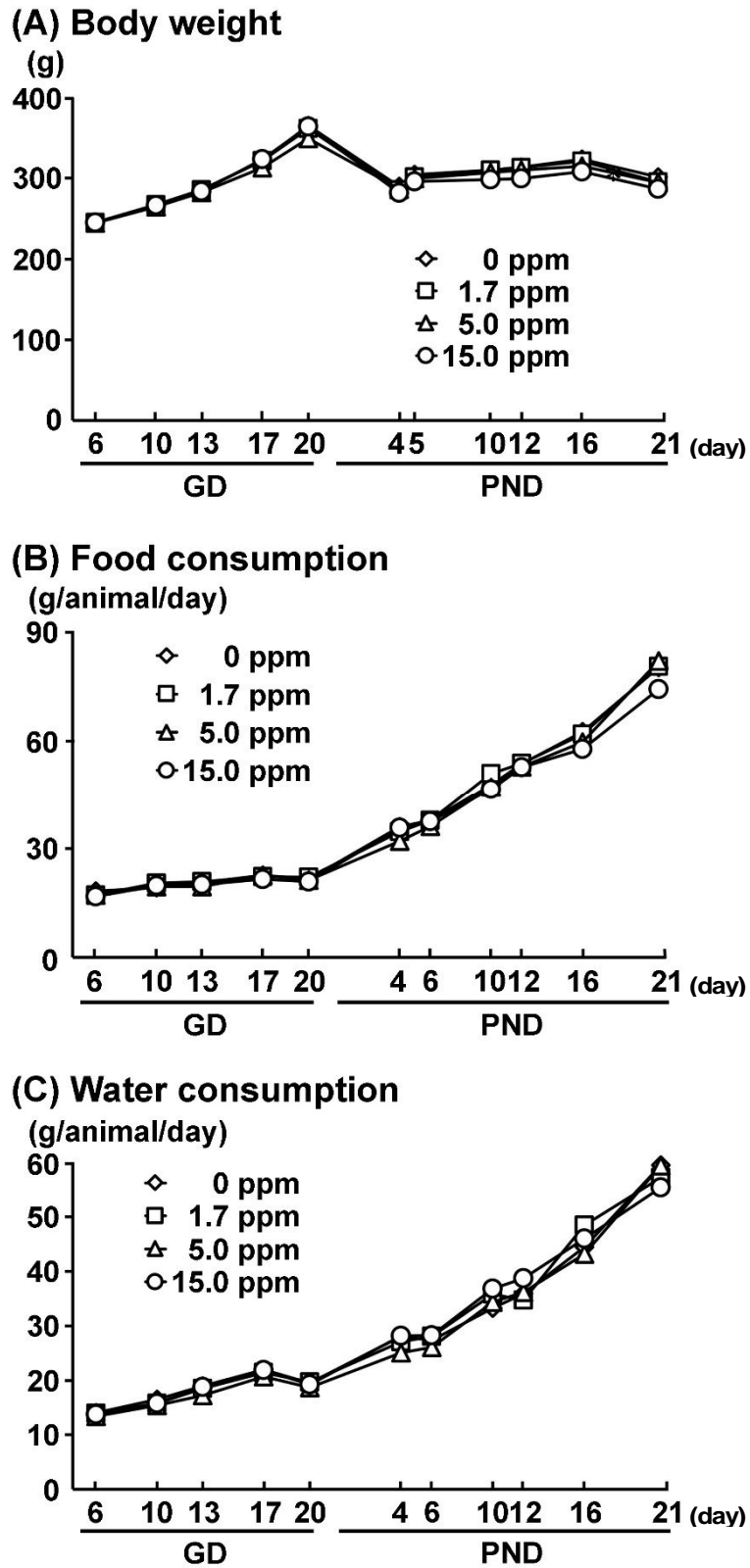
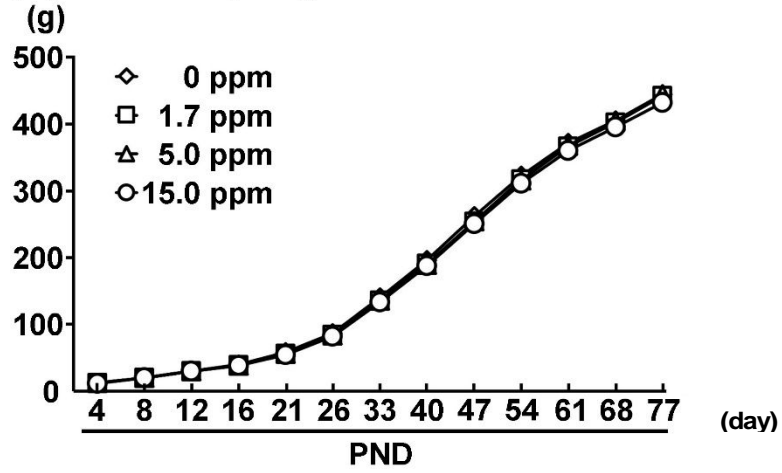


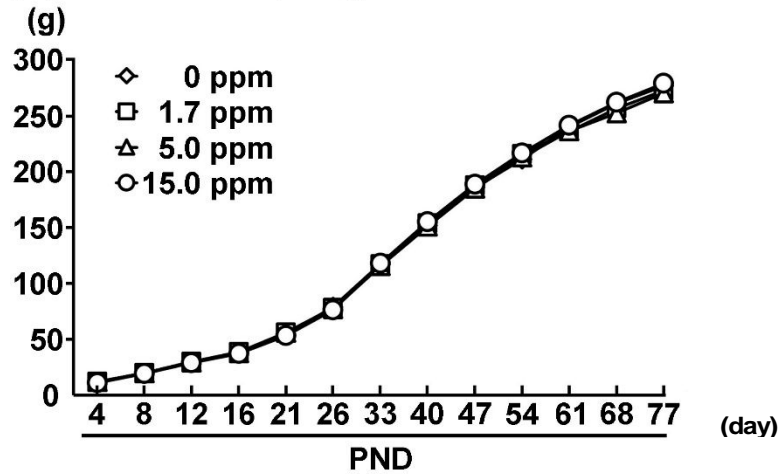
Figure 1. Body weight, food consumption and water consumption of dams given sterigmatocystin from GD 6 to PND 21 in the diet. (A) Body weight. (B) Food consumption. (C) Water consumption.



**(A) Male offspring**



**(B) Female offspring**



**Figure 2. Body weight of male and female offspring exposed to sterigmatocystin at postnatal day.**

(A) Male offspring. (B) Female offspring.

**Table 1. 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 <sub>1</sub>	CB-955	1:500	Microwaving, pH 6.0 <sup>a)</sup>	Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
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	Merck KGaA
Neuron-specific nuclear protein	NeuN	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	A60	1:100	None	Merck KGaA
Parvalbumin	PVALB	Mouse	Monoclonal IgG <sub>1</sub>	PARV-19	1:1000	Microwaving, pH 6.0	Merck KGaA
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 <sup>b)</sup>	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 2. Reproductive and general parameters of dams given sterigmatocystin from GD 6 to PND****21**

	Sterigmatocystin (ppm)				
	0 (Control)	1.7	5.0	15.0	
No. of dams examined	11	12	10	10	
<b>Reproductive parameters</b>					
No. of implantation sites	12.64±2.01 <sup>a</sup>	12.08±1.62	10.90±2.33	11.91±4.06	
No. of live offspring	11.82±2.44	10.83±1.90	10.20±2.04	12.70±1.06	
<b>General parameters on GD</b>					
Mean body weight (g)	296.9±24.0	296.2±21.8	294.7±19.5	298.5±18.6	
Food intake (g/animal/day) <sup>a</sup>	20.51±2.51	20.63±1.51	20.07±1.76	19.87±1.71	
Water consumption (g/animal/day) <sup>a</sup>	36.46±5.88	35.76±4.19	34.16±3.60	35.76±4.39	
<b>General parameters on PND</b>					
Mean body weight (g)	307.2±27.6	304.4±17.6	304.9±19.9	297.3±17.3	
Food intake (g/animal/day) <sup>a</sup>	53.10±4.97	53.34±3.08	52.05±5.24	50.83±2.65	
Water consumption (g/animal/day) <sup>a</sup>	76.18±9.89	77.14±8.74	74.53±9.75	77.58±6.06	
<b>Body and organ weights at PND 21</b>					
Body weight (g)	301.4±26.5	295.2±18.7	294.7±17.8	286.9±16.6	
<b>Organ weight</b>					
Brain weight	Absolute (g)	1.91±0.06	1.90±0.10	1.92±0.09	1.90±0.07
	Relative (g/100g BW)	0.64±0.05	0.64±0.04	0.65±0.04	0.66±0.04
Liver weight	Absolute (g)	15.19±1.52	14.11±1.22	14.50±1.23	13.89±0.72*
	Relative (g/100g BW)	5.05±0.39	4.78±0.23	4.87±0.25	4.82±0.15
Lung weight	Absolute (g)	1.48±0.38	1.32±0.20	1.32±0.12	1.28±0.16
	Relative (g/100g BW)	0.49±0.11	0.45±0.07	0.44±0.04	0.44±0.04
Kidneys weight	Absolute (g)	2.13±0.19	2.14±0.19	2.04±0.12	2.09±0.16
	Relative (g/100g BW)	0.71±0.04	0.72±0.04	0.69±0.02	0.72±0.03
<b>Diacetoxyscirpenol intake (mg/kg BW/day)</b>					
GD, mg/kg body weight/day <sup>a</sup>	0	0.12±0.01	0.34±0.02	1.00±0.07	
PND, mg/kg body weight/day <sup>a</sup>	0	0.30±0.01	0.85±0.07	2.57±0.15	

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&lt;0.05, Dunnett's or Steel's test).

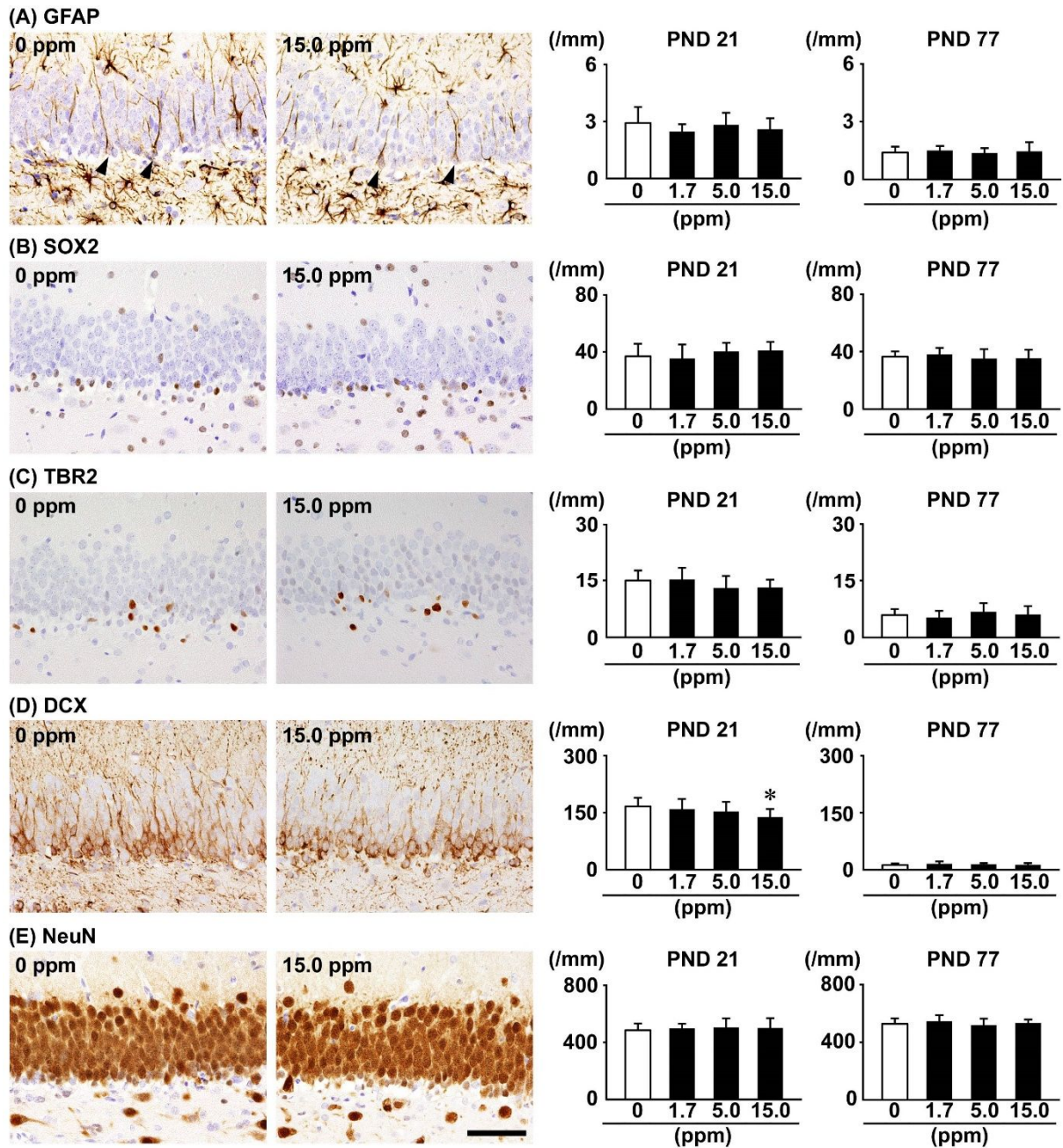
**Table 3. Body and organ weights at the prepubertal and terminal necropsies of offspring**

		Sterigmatocystin in diet (ppm)			
		0 (Control)	1.7	5.0	15.0
<b>Male offspring on PND 21</b>					
No. of animals examined		11	12	10	10
Body weight (g)		58.95±5.13 <sup>a</sup>	56.93±4.05	56.66±4.33	55.34±4.74
<b>Organ weight</b>					
Brain	Absolute (g)	1.56±0.04	1.56±0.03	1.56±0.03	1.56±0.04
	Relative (g/100g BW)	2.72±0.24	2.75±0.18	2.77±0.22	2.83±0.22
Liver	Absolute (g)	2.42±0.21	2.33±0.22	2.45±0.24	2.31±0.21
	Relative (g/100g BW)	4.18±0.23	4.08±0.16	4.32±0.16	4.18±0.13
Lung	Absolute (g)	1.00±0.25	1.03±0.23	0.96±0.32	0.93±0.20
	Relative (g/100g BW)	1.72±0.42	1.80±0.36	1.67±0.48	1.68±0.38
Kidneys	Absolute (g)	0.65±0.06	0.66±0.05	0.64±0.07	0.62±0.05
	Relative (g/100g BW)	1.12±0.04	1.15±0.04	1.13±0.06	1.13±0.03
<b>Female offspring on PND 21</b>					
No. of animals examined		11	12	10	10
Body weight (g)		54.53±9.27	56.06±4.50	56.25±3.64	53.47±4.68
<b>Organ weight</b>					
Brain	Absolute (g)	1.47±0.12	1.52±0.04	1.52±0.05	1.50±0.05
	Relative (g/100g BW)	2.75±0.38	2.72±0.21	2.72±0.22	2.83±0.21
Liver	Absolute (g)	2.23±0.22	2.18±0.22	2.30±0.20	2.23±0.25
	Relative (g/100g BW)	4.17±0.68	3.89±0.13	4.09±0.21	4.16±0.15
Lung	Absolute (g)	0.70±0.19	0.74±0.12	0.76±0.19	0.72±0.19
	Relative (g/100g BW)	1.30±0.31	1.32±0.13	1.36±0.32	1.36±0.34
Kidneys	Absolute (g)	0.61±0.09	0.62±0.05	0.64±0.06	0.61±0.06
	Relative (g/100g BW)	1.13±0.13	1.11±0.03	1.13±0.05	1.14±0.06
<b>Male offspring on PND 77</b>					
No. of animals examined		11	12	10	10
Body weight (g)		441.56±27.44	455.14±27.74	457.84±18.13	444.88±31.75
<b>Organ weight</b>					
Brain	Absolute (g)	2.12±0.07	2.12±0.04	2.11±0.03	2.11±0.11
	Relative (g/100g BW)	0.48±0.03	0.47±0.03	0.46±0.02	0.48±0.04
Liver	Absolute (g)	18.96±1.84	19.21±2.05	19.75±1.20	19.37±2.36
	Relative (g/100g BW)	4.29±0.24	4.21±0.27	4.32±0.25	4.35±0.37
Lung	Absolute (g)	2.00±0.64	1.94±0.42	2.41±0.49	1.90±0.14
	Relative (g/100g BW)	0.45±0.12	0.43±0.09	0.53±0.11	0.43±0.04
Kidneys	Absolute (g)	2.79±0.22	2.75±0.20	2.86±0.17	2.71±0.20

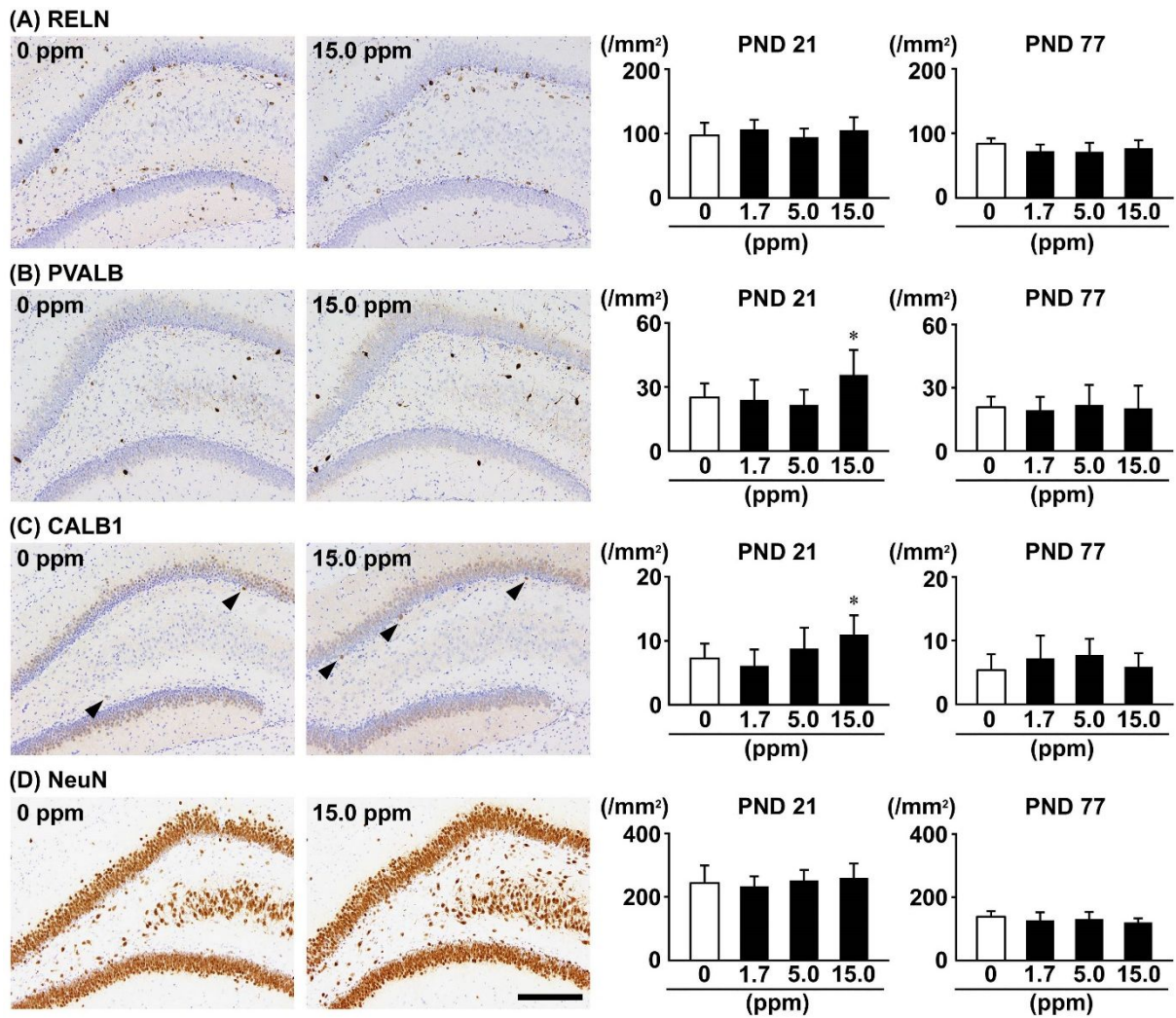
	Relative (g/100g BW)	0.63±0.05	0.61±0.03	0.63±0.05	0.61±0.04
Female offspring on PND 77					
	No. of animals examined	11	12	10	10
	Body weight (g)	277.14±25.31	273.01±28.11	270.77±19.06	279.41±19.65
Organ weight					
Brain	Absolute (g)	1.96±0.06	1.98±0.05	1.98±0.06	1.98±0.08
	Relative (g/100g BW)	0.71±0.05	0.73±0.07	0.73±0.05	0.71±0.04
Liver	Absolute (g)	10.29±1.14	9.96±1.43	9.59±1.05	10.40±0.71
	Relative (g/100g BW)	3.71±0.19	3.64±0.25	3.54±0.22	3.73±0.13
Lung	Absolute (g)	1.29±0.13	1.38±0.16	1.57±0.40	1.30±0.17
	Relative (g/100g BW)	0.47±0.05	0.51±0.04	0.58±0.13	0.47±0.04
Kidneys	Absolute (g)	1.77±0.20	1.71±0.15	1.71±0.16	1.72±0.13
	Relative (g/100g BW)	0.64±0.04	0.63±0.03	0.63±0.04	0.62±0.03

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

<sup>a</sup> Mean ± SD.

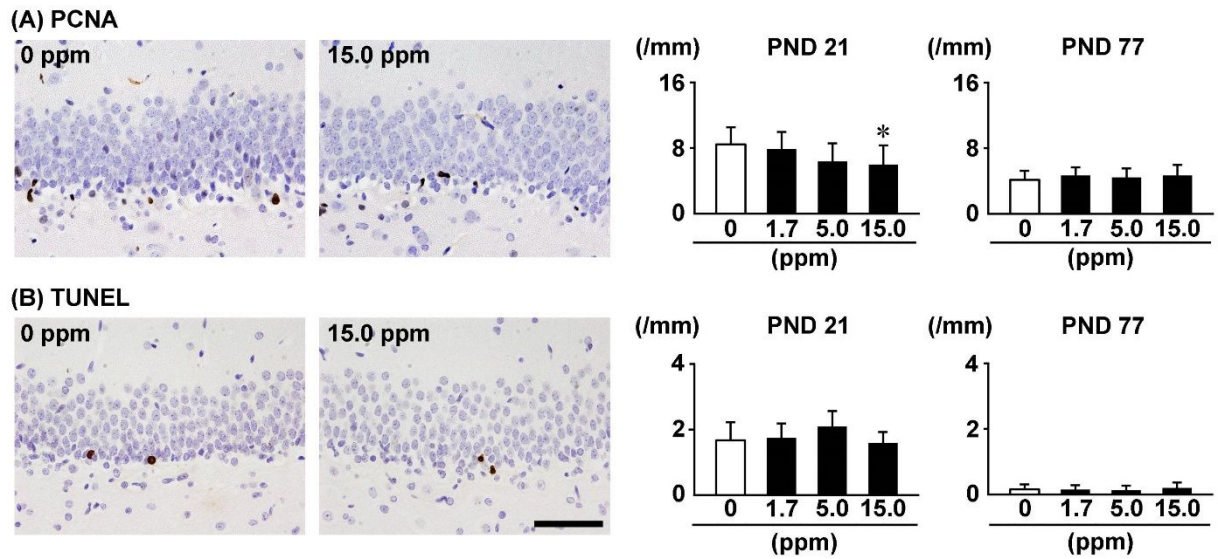


**Figure 3. Distribution and number of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers of granule cell lineages in the subgranular zone (SGZ), and a mature neuronal marker in the granule cell layer (GCL) of the hippocampal dentate gyrus of male PND 21 and PND 77 offspring exposed to sterigmatocystin.** (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 15.0 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  $\pm$  SD. N = 10/group. \* Significantly different from the untreated controls ( $P < 0.05$ , 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 sterigmatocystin.** (A) Reelin (RELN). (B) Parvalbumin (PVALB). (C) Calbindin-D-28K (CALB1). (D) Neuron-specific nuclear protein (NeuN). Representative images from 0 ppm control and the 15.0 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 = 10/group.

\* Significantly different from the untreated controls ( $P < 0.05$ , 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 sterigmatocystin.** (A) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). (B) Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL). Representative images from 0 ppm control and the 15.0 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  $\pm$  SD. N = 10/group.

\* 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 sterigmatocystin**

	Sterigmatocystin in diet (ppm)			
	0 (Control)		15.0	
	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>	1.08±0.47	1.03±0.28	2.07±0.18**	1.49±0.12**
<i>Ntrk2</i>	1.02±0.22	1.00±0.08	0.98±0.25	0.70±0.15**
<b>Cell cycle regulators</b>				
<i>Ccnd2</i>	1.08±0.42	1.06±0.35	1.98±0.40**	1.41±0.23
<i>Cdk1</i>	1.06±0.38	1.03±0.29	0.81±0.47	0.57±0.31*
<i>Cdk2</i>	1.03±0.25	1.01±0.15	1.10±0.28	0.78±0.16*
<i>Cdkn1a</i>	1.03±0.26	1.02±0.24	0.52±0.27**	0.37±0.18**
<i>Cdkn1b</i>	1.02±0.21	1.00±0.10	0.91±0.24	0.65±0.15**
<i>Cdkn1c</i>	1.02±0.25	1.02±0.19	0.88±0.18	0.63±0.10**
<i>Cdkn2b</i>	1.02±0.19	1.00±0.06	1.09±0.23	0.78±0.12**
<i>Cdkn2c</i>	1.02±0.22	1.01±0.11	1.16±0.34	0.82±0.19
<b>DND repair-related genes</b>				
<i>Apex1</i>	1.02±0.23	1.00±0.05	1.32±0.18*	0.94±0.08
<i>Brip1</i>	1.02±0.20	1.01±0.17	1.14±0.24	0.81±0.12*
<i>Chek1</i>	1.15±0.61	1.10±0.49	1.35±0.62	0.97±0.43
<i>Ercc1</i>	1.01±0.18	1.01±0.15	1.32±0.27*	0.94±0.13
<b>Cholinergic receptors</b>				
<i>Chrna7</i>	1.03±0.25	1.00±0.09	1.75±0.23**	1.26±0.17**
<i>Chrn2</i>	1.01±0.11	1.01±0.15	0.84±0.14*	0.60±0.08**
<b>Dopaminergic receptor</b>				
<i>Drd2</i>	1.09±0.46	1.08±0.41	0.45±0.43*	0.32±0.29**

*Abbreviations:* *Apex1*,apurinic/aprimidinic endonuclease 1; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; *Brip1*, BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1; *Ccnd2*, cyclin D1; *Cdk1*, cyclin-dependent kinase 1; *Cdk2*, cyclin-dependent kinase 2; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21); *Cdkn1b*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; *Cdkn1c*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57); *Cdkn2b*, cyclin dependent kinase inhibitor 2B; *Cdkn2c*, cyclin dependent kinase inhibitor 2C; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7; *Chrn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal); *Drd2*, dopamine receptor D2; *Ercc1*, excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyl transferase; *Ntrk2*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2.

<sup>a</sup> Mean ± 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  
培養によらないかび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)

研究要旨

食品を汚染するかび毒産生菌の迅速検出法の開発を目的として、培養を行わずにかび毒産生菌を効率よく検出する方法の開発を行った。本年度は、今後モニタリングを強化していくべきかび毒として、ジアセトキシシルペノール(4,15-DAS)に着目し、*Fusarium* 属菌のうち 4,15-DAS 産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。昨年度までに行った STC 産生菌種の迅速検出法の開発に際して確立した、改変型 DNA 合成酵素を用いて標的菌種のみを増幅する PCR 法を 4,15-DAS 産生菌種へ応用し、特異的検出法の開発を行った。まず *Fusarium* 属菌の種間で  $\beta$ -tubulin 遺伝子および Lys2 遺伝子の塩基配列を比較して、対象となる 4,15-DAS 産生菌種にのみ共通する塩基配列を検索し、菌種特異的な検出を行うためのプライマーを設計した。 $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列をもとに設計した系では二つの独立した PCR を行うことで 4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出することとした。さらに、Lys2 遺伝子の塩基配列をもとに設計した系ではマルチプレックス PCR にすることによって、一度の PCR で 4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出することとした。その結果、いずれの遺伝子を用いた PCR 法においても、供試した全ての 4,15-DAS 産生菌種を検出することに成功した。以上の結果から、4,15-DAS 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。初年度に開発した、食品または飼料に付着したカビ孢子から直接 DNA を抽出する方法と組み合わせることで、培養を行わずに食品および飼料のから 4,15-DAS 産生菌種を検出することが可能であると考えられ、4,15-DAS 汚染原因菌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

食品や飼料となる農作物や加工品において、かび毒産生菌が付着、増殖し、かび毒汚染が発生する場合がある。かび毒が検出されていない食品や飼料においても、その後の貯蔵、流通等の管理が不適切であった場合には、かび毒産生菌が増殖し、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、生産時にかび毒による汚染が検出されない場合にもかび毒産生菌種が存在していると、貯蔵中に増殖してかび毒が産生され、かび毒により汚染される恐れがある。したがって、食品や飼料のかび毒汚染を真にコントロールするためには、かび毒を検出するだけでなく、食品そのものや周辺環境におけるかび毒産生菌による汚染の有無を調べることにより、菌汚染のルートや増殖の原因を解明し、汚染防止に努めることが重要である。以上の理由から、かび毒産生菌を食品から検出する必要がある。また、かび毒はかび毒産生菌が死滅した後も食品中に残存することから死滅したかび毒産生菌の存在の有無を判定する必要がある。そこで、本研究では、培養を経ずに食品からかび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。

本研究では、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かび毒として、昨年度までに、ステリグマトシスチン（STC）の代表的な産生菌種として知られる *Aspergillus section Versicolores* のうち STC 産生菌種にのみを検出する培養によらない PCR 法を確立した。本年度は、*Fusarium* 属菌におけるジアセトキシシルペノール（4,15-DAS）産生菌に着目した検討を行うこととした。

*Fusarium* 属菌は、トリコテセン系かび毒、フモニシン、ゼアラレノン、モニリフォルミン等、食品を汚染する複数のかび毒の産生菌とし

て知られる。4,15-DAS はこれらのうち最も毒性が強いトリコテセン系かび毒のタイプ A に属する（図 1）。主な産生菌としては、*F. acuminatum*、*F. equiseti*、*F. graminearum sensu strict (s. str.)*、*F. langsethiae*、*F. longipes*、*F. poae*、*F. scirpi*、*F. semitectum* および *F. sporotrichioides* が挙げられる。これらの顕微鏡像を図 2 に示した。これらの菌種は世界各地で、米や麦をはじめとした穀類、豆類、イモ類、および青果物等、多くの農作物からの検出例が報告されている。そのため、4,15-DAS は多種類の食品、および多くの輸入相手国産の食品から検出される可能性がある。しかし 4,15-DAS 産生菌は同じトリコテセン系かび毒タイプ A の T-2 トキシンおよび HT-2 トキシン産生菌と比較して、環境や食品における分布実態が十分に把握されておらず、迅速に大量の検体から産生菌の有無を調査できる検出法の開発が必要である。

そこで、本年度は、STC 産生菌で確立した方法を応用して、*Fusarium* 属菌において 4,15-DAS 産生菌種のみを検出できる PCR 法の開発を行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

4,15-DAS 産生菌種として *F. acuminatum*、*F. equiseti*、*F. graminearum s. str.*、*F. langsethiae*、*F. longipes*、*F. poae*、*F. scirpi*、*F. semitectum* および *F. sporotrichioides* の 9 菌種、これらの菌種と近縁だが 4,15-DAS 非産生菌種と考えられる、*F. avenaceum*、*F. crookwellense*、*F. culmorum*、*F. kyushuense*、*F. lateritium*、*F. tritinctum* の 6 菌種、合計 15 菌種 15 株を用いた（表 1、図 2）。

### 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、その後菌系体

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. 4,15-DAS 産生菌種特異的配列の検索

4,15-DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の  $\beta$ -tubulin 遺伝子および *Lys2* 遺伝子の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードし、MEGA6.0<sup>2)</sup> を用いて ClustalW によりアライメントを行った。使用した  $\beta$ -tubulin 遺伝子登録配列のアクセッション番号は以下の通り：AB587072 (*F. poae*)、AB587071 (*F. langsethiae*)、AB587036 (*F. semitectum*)、AB587076 (*F. sporotrichioides*)、AB587049 (*F. acuminatum*)、AB587047 (*F. equiseti*)、AB820716 (*F. longipes*)、AB587040 (*F. graminearum*)、AB820714 (*F. camptoceras*)、AB587077 (*F. tricinatum*)、AB587052 (*F. lateritium*)、AB820709 (*F. culmorum*)、AB587067 (*F. kyushuense*)、AB587059 (*F. verticillioides*)、使用した *Lys2* 遺伝子登録配列のアクセッション番号は以下の通り：AB586973 (*F. poae*)、AB586953 (*F. acuminatum*)、AB586972 (*F. langsethiae*)、AB586975 (*F. sporotrichioides*)、AB586944 (*F. graminearum*)、AB586951 (*F. equiseti*)、AB586940 (*F. semitectum*)、AB586968 (*F. kyushuense*)、AB586969 (*F. crookwellense*)、AB586942 (*F. culmorum*)、AB586954 (*F. lateritium*)、AB586979 (*F. tricinatum*)、AB586965 (*F. avenaceum*)。

### 4. 菌種特異的検出 PCR

3 において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 (myPOLLS Biotec GmbH) を用い、添付のプロ

トコルに従って PCR を行った。PCR 条件は、95℃ で 3 分間熱変性を行った後、95℃ 15 秒、60℃ 10 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 産物について 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅の有無を確認した。

### C. 研究結果

昨年度までに *Aspergillus* section *Versicolores* における STC 産生菌種の迅速検出法として確立した、改変型 DNA 合成酵素を使用した PCR 技術を、4,15-DAS 産生菌種の特異的検出に応用して、4,15-DAS 産生菌種の迅速検出系の開発を行った。

先行研究<sup>3)</sup>を基に、*F. acuminatum*、*F. equiseti*、*F. graminearum* s. str.、*F. langsethiae*、*F. longipes*、*F. poae*、*F. scirpi*、*F. semitectum*、*F. sporotrichioides* の 9 菌種を対象とする 4,15-DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種とし、これらの近縁種の中から 4,15-DAS を産生することが知られていない 6 菌種 (*F. avenaceum*、*F. crookwellense*、*F. culmorum*、*F. kyushuense*、*F. lateritium*、*F. tricinatum*) を加えた合計 15 菌種を用い、4,15-DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種 9 菌種を特異的に検出する系を検討した。

#### (1) $\beta$ -tubulin 遺伝子部分配列を基にした 4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR

まず、4,15-DAS 産生菌種を含む *Fusarium* 属菌種について、データベースに登録されている遺伝子の塩基配列をダウンロードして比較し、4,15-DAS 産生菌種に特異的なサイトの検索を行った。

はじめに、真菌において種の同定に頻繁に用いられる  $\beta$ -tubulin 遺伝子について、4,15-DAS 産生菌種特異的塩基配列の検索を行った。対象

菌種のうち、 $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列がデータベースに登録されていた 4,15-DAS 産生性菌種 8 菌種および 4,15-DAS 非産生菌種 5 菌種について塩基配列を比較した。全菌種でアライメントが可能であった 871 bp において、4,15-DAS 産生菌種 (8 菌種) に共通し、4,15-DAS 非産生菌種 (5 菌種) とは異なるサイトを検索したが、条件を満たすサイトは存在しなかった。そこで、できる限り多くの 4,15-DAS 産生菌種に共通し、4,15-DAS 非産生菌種と異なるサイトを検索したところ、*F. graminearum* s. str. を除く 7 菌種にのみ共通するサイトが存在したため、当該サイトがプライマーの 3' 末端に来るようにプライマーを設計した (図 3A)。併せて、*F. graminearum* s. str. 特異的な領域にプライマーを設計し (図 3B)、二つの PCR を行うことで 4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出する系の確立を試みた。

培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートに HiDi DNA polymerase を用いた PCR を行なったところ、前者のプライマーセットでは 4,15-DAS 産生菌種 9 菌種のうち *F. graminearum* s. str. を除く 8 菌種において目的の増幅産物が得られ (図 4A)、後者のプライマーセットでは *F. graminearum* s. str. 特異的な増幅が得られた (図 4B)。以上より、これら二つの PCR を組み合わせることで、4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

## (2) Lys2 遺伝子部分配列を基にした 4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR

次に、 $\beta$ -tubulin 遺伝子と同様にしばしば真菌の系統解析に使用される Lys2 遺伝子について、4,15-DAS 産生菌種特異的塩基配列の検索を行った。

対象菌種の内、Lys2 遺伝子の配列がデータベースに登録されていた 4,15-DAS 産生性菌種 7

菌種および非産生菌種 6 菌種について塩基配列を比較した。全菌種でアライメントが可能であった 668 bp において、4,15-DAS 産生菌種 (7 菌種) に共通し、4,15-DAS 非産生菌種 (6 菌種) とは異なるサイトを検索したが、条件を満たすサイトは存在しなかった。そこで、4,15-DAS 産生菌種のうち *F. poae* を除く 6 菌種に共通する領域が存在したため、当該領域にプライマーを設計し (図 5A) 併せて、*F. poae* 特異的な領域にプライマーを設計した (図 5B)。この際、Forward 側のプライマーを同じ位置に設計することで、Reverse 側のプライマーを混合して用いたマルチプレックス PCR の系とすることとした。

培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートに、設計した 3 つのプライマーを用いた HiDi DNA polymerase によるマルチプレックス PCR を行ったところ、*F. poae* ではおよそ 220 bp の増幅産物が得られ、そのほかの 4,15-DAS 産生菌種 8 菌種においてはおよそ 400 bp の増幅産物が得られた (図 6)。4,15-DAS 非産生菌種についてはすべて増幅が見られなかった。以上より、設計したマルチプレックス PCR の系により、4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

## D. 考察

本研究では、食品において今後モニタリングを強化していくべきかび毒として 4,15-DAS に着目し、*Fusarium* 属菌のうち 4,15-DAS 産生菌種のみを検出する迅速検出法の開発を行った。昨年度までに *Aspergillus* section *Versicolores* のうち STC 産生菌種にのみを迅速に検出する系として確立した、配列特異性の高い改変型酵素を用いた PCR 法を 4,15-DAS 産生菌種に応用した。この系ではプライマーの 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ことが報告されている HiDi DNA polymerase を用いる。そこで、4,15-DAS 産生菌種および近縁な 4,15-DAS 非産生菌種について  $\beta$ -tubulin 遺伝子および Lys2 遺伝子の塩基配列を比較し、4,15-DAS 産生菌種特異的な塩基配列にプライマーの設計を試みた。

$\beta$ -tubulin 遺伝子の配列比較においてはすべての 4,15-DAS 産生菌種に共通する特異的なサイトは見つからず、4,15-DAS 産生菌種 9 菌種のうち *F. graminearum* s. str.のみを認識するプライマーセットと当該菌種を除く 8 菌種をまとめて認識するプライマーセットの二つを併用することで、4,15-DAS 産生菌種をすべて検出可能な系を開発した(図 3 および図 4)。開発した系は特異的に 4,15-DAS 産生菌種を検出することが可能ではあったが、二つの PCR を行う必要があり、STC 産生菌種を対象に確立した迅速検出法に比べて煩雑であった。

一方、Lys2 遺伝子の配列比較においても 4,15-DAS 産生菌種に共通する特異的なサイトは見つけることができなかったが、配列上近い位置に *F. poae* 特異的なサイトとそのほかの 4,15-DAS 産生菌種 8 種にのみ共通するサイトが存在した。これらの位置にそれぞれ Reverse 側のプライマーを設計し、Forward 側のプライマーを共通にすることでマルチプレックス PCR の系を検討した。その結果、マルチプレックス PCR により、全ての 4,15-DAS 産生菌種を検出することに成功した(図 5 および図 6)。このことにより、4,15-DAS 産生菌種においても、STC 産生菌種を対象とした系と同様に一度の PCR により迅速に標的菌種のみを検出する系を確立することができた。

今後は、4,15-DAS により汚染された食品から培養を行うことなく直接抽出した DNA を用いて PCR を行い、4,15-DAS 産生菌検出のためのスクリーニング法として利用可能か検討することが望まれる。ただ、昨年度までの研究によっ

て、培養を経ずに食品に付着したカビ孢子から直接 DNA の抽出が可能であることを示しており、4,15-DAS 産生菌についても、食品や飼料からの直接検出が可能であると考えられる。

#### E. 結論

以上の結果から、4,15-DAS 産生菌種を特異的に、且つ迅速に検出することが可能な方法を確立することができた。この方法を利用することで、食品または飼料に付着した 4,15-DAS 産生菌種を培養することなく直接 PCR によって迅速に検出することができると考えられる。4 時間程度で 4,15-DAS を産生するカビの食品等からの検出が可能となり、4,15-DAS 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

#### F. 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) 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
- 3) Watanabe M, Yonezawa T, Sugita-Konishi Y and Kamata Y: Utility of the phylo-toxic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin-producing potential. *Food Addit Contam Part A* (2013) 30: 1370–

## G. 研究業績

## 【論文発表】

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: Fumonisin-production by *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Japanese Foods and Environments. *Food Safety* (2018) 6: 74-82 (†筆頭著者同等貢献者)

Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J and Sugita-Konishi, Y: Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Safety* (2018) 6: 67-73

## 【学会発表】

1) Sugita-Konishi Y, Takeda N, Watanabe M, Kobayashi N and Yoshinari T. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. SOT 58<sup>th</sup> annual meeting (2019, 3, Baltimore)

2) 加田睦月、内ヶ島美岐子、吉成知也、三宅 司郎、小林直樹、小西良子. ステリグマトシ スティンの ELISA によるスクリーニング

3) 佐藤和貴、吉成知也、窪崎敦隆、小林直樹、小西良子、工藤由起子、渡辺麻衣子. 国内流通穀類におけるステリグマトシチン産生菌の分布に関する研究. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会(2019, 1, 川崎)

4) 小林直樹、古川優奈、佐藤悠人、渡辺麻衣子、栗林尚志、島津徳人、小西良子. Change of fungal microflora in the house by dogs. 平成 30 年室内環境学会学術大会(2018, 12, 東京)

5) 小池義浩、吉成知也、中川博之、上垣隆一、高橋治男、清水公德、工藤由起子、渡辺麻衣子. *Fusarium* 属菌におけるフモニシン類産生性に関する分類学的検討. 日本マイコトキシン学会第 82 回学術講演会 (2018, 8, 帯広)

6) Watanabe M, Onami J, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J. Study on fumonisin-productivity of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* derived from foods in Japanese markets and environment UJNR 2018 (2018, 5, Yokohama)

表 1 . 供試菌株

菌種	株番号
DAS産生菌種	
<i>F. acuminatum</i>	MAFF236716
<i>F. equiseti</i>	MAFF236434
<i>F. graminearum</i> sensu strict	MAFF240270
<i>F. langsethiae</i>	FRC T-1000
<i>F. longipes</i>	IFM50036
<i>F. poae</i>	MAFF305947
<i>F. scirpi</i>	CBS448.84
<i>F. semitectum</i>	MAFF236521
<i>F. sporotrichioides</i>	ATCC34914
DAS非産生菌種	
<i>F. avenaceum</i>	ATCC200255
<i>F. crookwellense</i>	MAFF101144
<i>F. culmorum</i>	IFM50210
<i>F. kyushuense</i>	MAFF237645
<i>F. lateritium</i>	MAFF235344
<i>F. tritinctum</i>	ATCC38183



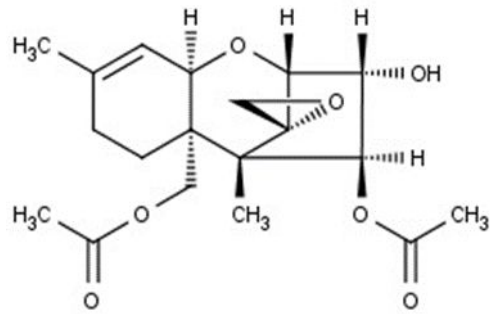
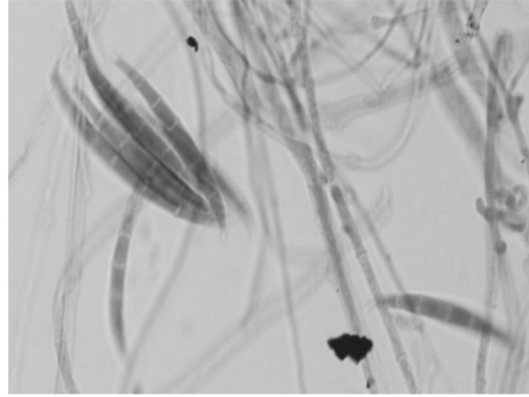


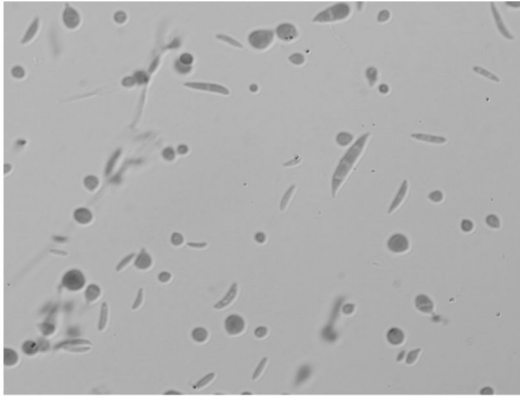
図 1. ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) 構造式



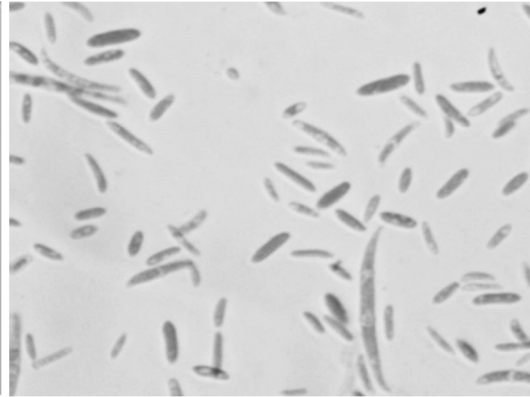
*Fusarium acuminatum*



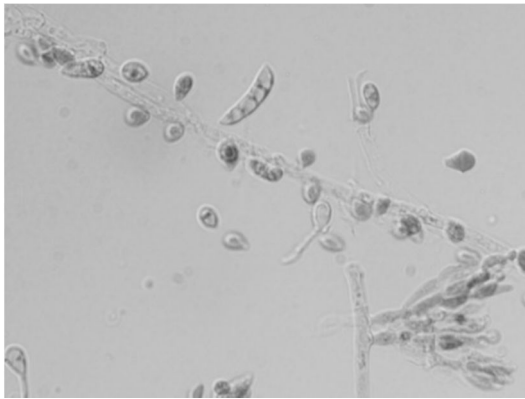
*Fusarium graminearum*



*Fusarium sporotrichioides*



*Fusarium equiseti*



*Fusarium poae*



*Fusarium semitectum*

図2 . 4,15-DAS 産生菌の顕微鏡像

A.

	Forward primer →	Reverse primer ←
<i>F. poae</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	---CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
<i>F. langsethiae</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	---CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. sporotrichioides</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	---CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. acuminatum</i>	ACTGGGCG ····TACTGAGGGAGCTG-----	---CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. graminearum</i>	ACTGGGCC ····TACACGAGGGGTGCTG-----	---CCTCTTACGGCGACC ····TCTCTGCC
<i>F. equiseti</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	---CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
<i>F. longipes</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	---CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
<i>F. semitectum</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	---CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
-----		
<i>F. kyushuense</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	---CCTCTTATGGGAGACC ····TCTCCGCC
<i>F. culmorum</i>	ACTGGGCC ····TACACGAGGGGTGCTG-----	---CCTCTTACGGCGACC ····TCTCTGCC
<i>F. lateritium</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGGTGCCG-----	---CATCCTACGGGAGACC ····TCTCCGCC
<i>F. tricinctum</i>	ACTGGGCG ····TACACGAGGGAGCTG-----	---CCTCTTACGGGAGACC ····TCTCCGCC
<i>F. avenaceum</i>	ACTGGGCG ····TACTGAGGGAGCTG-----	---CCTCTTACGGGAGACC ····TCTCCGCC

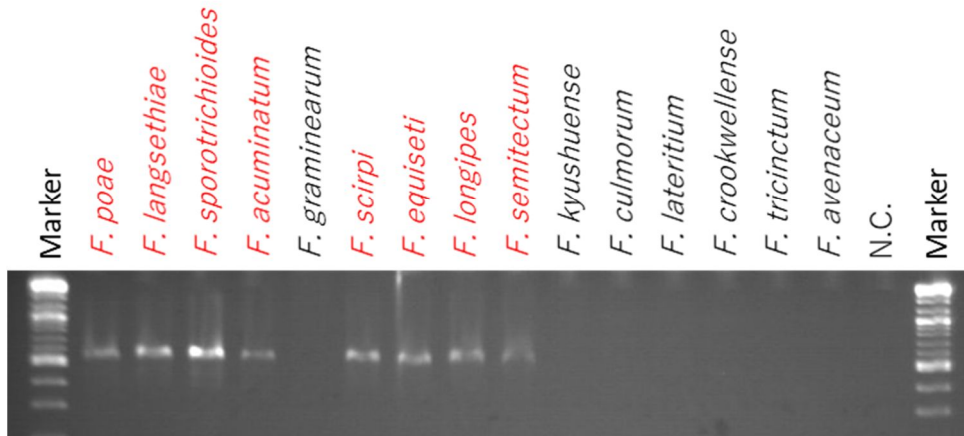
B.

	Forward primer →	Reverse primer ←
<i>F. poae</i>	CTTCAACG ····TCACTGTTGTCACGAA-----	---ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. langsethiae</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	---ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. sporotrichioides</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	---ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. acuminatum</i>	CTTCAACG ····CCACTCATGCCACGAA-----	---ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. graminearum</i>	CTTCAACG ····TCACTACTGCCACGAA-----	---ACACCGAGGGGTGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. equiseti</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	---ACACTGAAGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. longipes</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	---ACACTGAAGGAGCTG ····CAACGTCT
<i>F. semitectum</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	---ACACTGAAGGAGCTG ····CAACGTCT
-----		
<i>F. kyushuense</i>	CTTCAACG ····TCATTCCACACGAAA-----	---ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. culmorum</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	---ACACCGAGGGGTGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. lateritium</i>	CTTCAACG ····ACATTGATTGCAAGAA-----	---ACACTGAGGGGTGCCG ····CCAGGTCT
<i>F. tricinctum</i>	CTTCAACG ····ACACTGATTGCAAGAA-----	---ACACCGAGGGAGCTG ····CCAGGTCT
<i>F. avenaceum</i>	CTTCAACG ····ATATTGATTTGAGAA-----	---ACACTGAGGGAGCTG ····CCAGGTCT

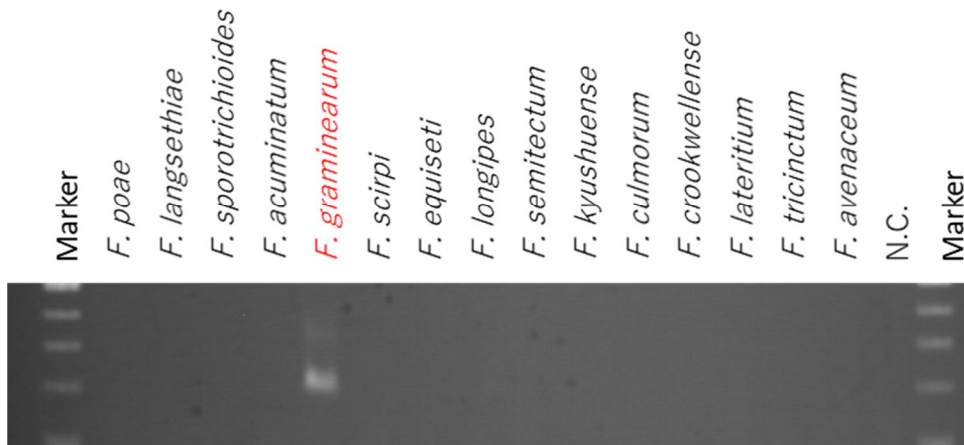
図 3. 4,15-DAS 産生菌種特異的検出用 Primer の検討 (β-tubulin)

β-tubulin 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を示す。A：4,15-DAS 産生菌種 8 菌種の内、*Fusarium graminearum* を除く 7 菌種特異的な領域。 B：*Fusarium graminearum* 特異的な領域。

A.



B.



**図 4. 4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR ( $\beta$ -tubulin)**

A : 4,15-DAS 産生菌種 9 菌種の内、*Fusarium graminearum* を除く 8 菌種特異的な増幅.

B : *Fusarium graminearum* 特異的な増幅.

A.

	Forward primer →	Reverse primer 1 ←
<i>F. poae</i>	CCGCACTG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCGTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. langsethiae</i>	CCGCACTG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. sporotrichioides</i>	CCGCACGG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. acuminatum</i>	CCGCACAG ····ACGCTACCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTATG
<i>F. graminearum</i>	CCGCACAG ····GCGTTACCTTGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTATG
<i>F. equiseti</i>	CCGCACAG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. semitectum</i>	CCGCACAG ····ACGTTACCTTGAGTCGG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
-----		
<i>F. kyushuense</i>	CCGCACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. crookwellense</i>	CCGCACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. culmorum</i>	CCGCACAG ····GCGTTACCTTGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. lateritium</i>	TCGTACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	GTCAGAACCCCTTGA ····TAAGGTACG
<i>F. tricinctum</i>	TTGCACAG ····ACGTCACTTTGAATCTT-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. avenaceum</i>	TCGCACAG ····ACGTTATCTTGAAATCCG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG

B.

	Forward primer →	Reverse primer 2 ←
<i>F. poae</i>	CCGCACTG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	AGCCAACTCTCGTCA ····TCCTGAGTT
<i>F. langsethiae</i>	CCGCACTG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	AACCAACTCTCGTCA ····TCCTGAGTT
<i>F. sporotrichioides</i>	CCGCACGG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	AACCAACTCTCGTGA ····TCCCGAGTT
<i>F. acuminatum</i>	CCGCACAG ····ACGCTACCTCGAGTCTG-----	AACCAACTCTCGTAA ····TCCTGAGTT
<i>F. graminearum</i>	CCGCACAG ····GCGTTACCTTGAGTCTG-----	AGCCAACTCTCGTCA ····TCCTGAGTT
<i>F. equiseti</i>	CCGCACAG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	AGCCAACTCTCGTCA ····TCCTGAATT
<i>F. semitectum</i>	CCGCACAG ····ACGTTACCTTGAGTCGG-----	AGCCAACTCTCGTCA ····CCCTGAGTT
-----		
<i>F. kyushuense</i>	CCGCACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	AGCCAACTCTCGTCA ····TCCCGAGCT
<i>F. crookwellense</i>	CCGCACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	AGCCAACTCTCGTCA ····TCCCGAGCT
<i>F. culmorum</i>	CCGCACAG ····GCGTTACCTTGAGTCTG-----	AACCAACTCTCGTCA ····TCCTGAGTT
<i>F. lateritium</i>	TCGTACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	AGCCGATTCTCGTGA ····TCCCGAGTT
<i>F. tricinctum</i>	TTGCACAG ····ACGTCACTTTGAATCTT-----	AGCCAACTCTCGTAA ····TCCCGAGTT
<i>F. avenaceum</i>	TCGCACAG ····ACGTTATCTTGAAATCCG-----	AGCCAACTCTCGTAA ····TCCTGAGTT

図 5. 4,15-DAS 産生菌種特異的検出用 Primer の検討 (Lys2)

Lys2 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を示す。  
 A : *Fusarium poae* 特異的な領域 . B : 4,15-DAS 産生菌種 7 菌種の内、*Fusarium poae* を除く 6 菌種特異的な領域 .

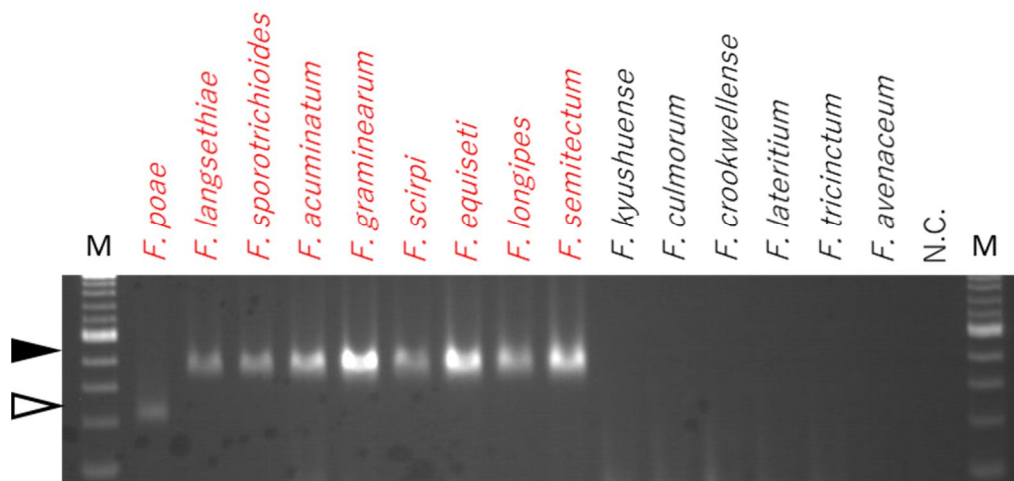


図 6. 4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR (*lys2*)

*Fusarium poae* において約 220 bp の増幅産物(白矢頭)が検出され、他の 8 種の 4,15-DAS 産生菌種において約 400 bp の増幅産物(黒矢頭)が検出された。

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

## 書籍

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

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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( <sup>†</sup> 筆 頭著者同等貢献 者)	Fumonisin-production by <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> isolates from Japanese Foods and Environments.	Food Safe ty	6	74-82	2018
Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J, Sugita-Konishi, Y	Distribution of sterigmatocystin-producing <i>Aspergilli</i> in Japan.	Food Safe ty	6	67-73	2018
Nakajima, K., Tanaka, T., Masubuchi, Y., Ito, Y., Kikuchi, S., Woo, G-H., Yoshida, T., Shibutani, M.	Developmental Exposure of Mice to T-2 Toxin Increases Astrocytes and Hippocampal Neural Stem Cells Expressing Metallothionein.	Neurotoxicit y Research	35	668-683	2019

## 東京農工大学動物実験計画書

東京農工大学学長 殿

■ 新規 □ 変更・年度更新

提出年月日

2018年 5月 17日

受付年月日

2018年 5月 18日

受付番号

30-71

研究課題	ラットにおける母動物を介したステリグマトシスチン曝露による児動物の発達期神経毒性試験						
研究目的	かび毒の発達神経毒性リスク評価の一環として、妊娠ラットにステリグマトシスチンを妊娠期・授乳期曝露し、児動物の海馬歯状回におけるニューロン新生及び分化状況と介在ニューロンへの影響、メカニズム、無毒性量の決定を目的とし、離乳時と成熟後で検討する。						
動物実験責任者名 (選択項目を■)	フリガナ	シブタニ マコト			部局名	職	動物実験の経験等
	氏名	渋谷 淳			獣医学部生理学研究室 連絡先TEL: 042-367-5771	教授	教育訓練受講の■有□無
動物実験実施者名 (括弧内にフリガナ、 選択項目を■)	フリガナ	中島 康太 ( ナカジマ コウタ )			獣医学部生理学研究室 連絡先TEL: 042-367-5874	D3	教育訓練受講の■有□無
	e-mail	knakaji@m2.tuat.ac.jp					
	フリガナ	増淵 康哲 ( マスブチ ヤスリ )			獣医学部生理学研究室 連絡先TEL: 042-367-5874	D2	教育訓練受講の■有□無
	e-mail	y-masubuchi@m2.tuat.ac.jp					
	フリガナ	伊藤 優子 ( イウ コウコ )			獣医学部生理学研究室 連絡先TEL: 042-367-5874	D2	教育訓練受講の■有□無
e-mail	yitoh@m2.tuat.ac.jp						
フリガナ	菊地 聡美 ( キクチ サトミ )			獣医学部生理学研究室 連絡先TEL: 042-367-5874	D1	教育訓練受講の□有■無	
e-mail	satomi-kikuchi@m2.tuat.ac.jp						
実験実施期間	承認後 ~ 20( 18 )年 9月				中止・終了等	20( )年 月 日	
飼養保管施設 及び 実験室	飼養保管施設	4号館1階動物室			実験室	獣医学部生理学研究室(4号館)	
使用動物	動物種	系統	性別	匹数	微生物学的品質	入手先(導入機関名)	備考
	ラット	SD	雌	49	SPF	日本SLC株式会社	妊娠1日目で入荷
	ラット	SD	児動物	392			
研究計画と方法	<p><b>研究概要</b> (研究計画と方法について、その概要を記入する。)</p> <p>ラットを用いてかび毒であるステリグマトシスチンの経胎盤・経乳的な発達期曝露を行い、児動物の脳海馬歯状回におけるニューロン新生及び分化状況と介在ニューロンへの影響を離乳時と成熟後で解析を行い、リスク評価の一助とする。</p> <p><b>実験方法</b> (動物に加える処置、使用動物数の根拠を具体的に記入し、「想定される苦痛のカテゴリー」や「動物の苦痛軽減・排除方法」等と整合性をもたせる。)</p> <p>発達神経毒性試験ガイドライン(OECD TG426)に準じ、ステリグマトシスチン(STC)を妊娠6日から生後21日目までの約38日間、母ラットに混餌投与し、母動物の一般状態および産児数、児動物の発育を観察する。投与濃度は0、1.7、5.0および15.0 ppmの4群構成とする。投与濃度の根拠として、先行して実施した予備試験(試験番号30-22)において、STCを0、6及び12 ppmの濃度で母動物に妊娠6日から生後21日目まで混餌投与した結果、母動物では明らかな毒性影響は認められなかった。児動物では、12 ppmで対照群と比較して体重が生後12日目まで一時的に減少したが、その後対照群と同等まで回復して良好に発育した。よって本実験では、母動物に軽微な影響が出ると予想され、出生児に対して神経毒性の適切な評価ができなくなるような過度の毒性(胎児期や新生児期の死亡または奇形)を生じさせない最大量の投与量として、15.0 ppmを高用量群とし、公比3で除した5.0および1.7 ppmを中用量群及び低用量群として設定する。</p> <p>各群の母動物と、児動物の半数を生後21日目に、残りの半数の児動物は生後77日目まで解剖し検査に供する。生後21日目から77日目まではSTCの投与は行わない。解剖時の安楽死は、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>ガスによる深麻酔下で腹大動脈からの放血により行う。本実験で評価を予定している解剖部位である海馬歯状回ニューロン新生部位は、エストロジェンの影響を受けるため雌動物が解析に不向きであることから、生後4日目で間引きする。</p> <p>使用する母動物は49匹とし、1用量当たりの母動物数は発達毒性で推奨される10匹/群を確実に確保するために、不妊動物の予備を考慮して、対照群を13匹、投与群を12匹/群とする。全動物が妊娠し、かつ各母動物から児動物が8匹産まれると仮定した場合、使用動物数は母動物49匹+児動物392匹で計441匹となる。</p> <p>STCはラットおよび各種動物において発がん性や遺伝毒性が報告されているが、本実験の用量および投与期間では、各諸臓器での急性および亜急性毒性、あるいは発がん性を発現する可能性は低く、動物に与える苦痛やストレスはごく軽度であると推測される。なお、実験期間中に重篤な神経症状が認められた場合、人道的エンドポイント処置として当該動物をCO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>ガスによる深麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽死させる。</p>						



