

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)

日本国内流通食品に検出される新興カビ毒の安全性確保に関する研究

令和元年度 総括研究報告書

研究代表者 吉成 知也

令和2(2020)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
日本国内流通食品に検出される新興カビ毒の安全性確保に関する研究	---
吉成 知也	1
II. 分担研究報告	
1. カビ毒の分析法の確立と汚染実態調査 -----	14
吉成 知也	
2. ステリグマトシスチンの迅速簡易測定法の開発 -----	53
小西 良子	
3. 毒性試験（エンニアチンのマウス反復投与毒性試験） -----	67
渋谷 淳	
4. 毒性試験のためのエンニアチン B の大量調製 -----	84
渡辺 麻衣子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	93

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

日本国内流通食品に検出される新興カビ毒の安全性確保に関する研究

研究代表者 吉成 知也 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

カビ毒はカビが感染した農作物中に生産され、カビ毒に汚染された食品により、急性的な中毒症状や慢性的な摂取によるガンの発症などが引き起こされている。これまで厚生労働科学研究において、2001年より様々なカビ毒について日本に流通する食品における汚染実態や毒性に関する研究を行い、カビ毒に汚染された食品の摂取の低減を目的とした施策策定の科学的根拠となるデータを取得し、食の安全性確保に貢献してきた。

本研究事業では、3種のタイプAトリコテセン系カビ毒、ステリグマトシスチン (STC)、エンニアチン類 (ENs) 及びビューベリシン (BEA) を研究対象とした。T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-ジアセトキシスシルペノール (4,15-DAS) の一斉分析法を開発するために、コラボラティブスタディを実施した。妥当性が検証された分析法を用いて5食品目計148検体の調査を行った。4,15-DASは主にハト麦加工品から、T-2 トキシンと HT-2 トキシンは主にライ麦粉、ハト麦加工品、小麦粉 (国産) 及びコーンフラワーから検出された。3種のカビ毒の同時汚染はハト麦加工品、コーンフラワー及び小麦粉 (国産) で認められた。BEAとエンニアチンA (ENA)、A1 (ENA1)、B (ENB) 及びB1 (ENB1) の一斉分析法を開発するために、コラボラティブスタディを実施した。妥当性が検証された分析法を用いて8食品目208検体の調査を行った。BEAはハト麦加工品、コーンフラワー及び小麦粉 (海外) で主に検出された。4種のENsのうち、ENBの汚染レベルがいずれの検体においても最も高く、ライ麦粉と小麦粉 (国産) で主に検出された。STCについては、米と小麦加工品を対象に5食品目144検体の調査を行った。その結果、米と小麦粉 (国産)、小麦粉 (海外)、乾そば、クッキー及びパン粉からSTCが検出された。

STCの分析を迅速かつ低コストで行うために、ELISAによるスクリーニング法を開発した。0.59～13.34 ng/mlの範囲のSTCにおいて良好な直線性が認められ、かつ添加回収試験の結果も良好であったことから、食品を対象とした応用の可能性が示唆された。

ENsについての毒性情報を得るために、ENs混合物のマウスを用いた28日間反復経口投与毒性試験を実施した。最高用量を20 mg/kg、公比5、溶媒対照群を含む4用量群を設定し、一般状態観察、体重、摂餌量測定、投与期間終了後の血液・血液化学検査、剖検、病理組織学検査を実施したが、高用量群の雌雄の摂餌量に若干の低値がみられたのみでその他の検査項目にENs混合物の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量を求めるに至る結果を得ることはできなかった。今後は*F. avenaceum* 菌培養物より単離精製したENB単体を用い、投与量等を再考し、28日間反復経口投与毒性試験の再試験を実施する。

A. 研究目的

カビ毒はカビが感染した農作物中に生産され、カビ毒に汚染された食品により、急性的な中毒症状や慢性的な摂取によるガンの発症などが引き起こされている。これまで厚生労働科学研究において、2001年より様々なカビ毒について日本に流通する食品における汚染実態や毒性に関する研究を行い、カビ毒に汚染された食品の摂取の低減を目的とした施策策定の科学的根拠となるデータを取得し、食の安全性確保に貢献してきた。

4,15-ジアセトキシスシルペノール(4,15-DAS)については平成 28~30 年度に実施された厚生労働科学研究により分析法の確立とハト麦における汚染実態を明らかにしたり。一方、2017年に公表された JECFA の評価結果²⁾において T-2、HT-2 トキシンのグループ PMTDI に 4,15-DAS も組み入れられ、また 2018 年に公表された EFSA の評価結果においてはコーヒーや大豆製品といったトリコテセン系カビ毒の汚染がこれまでほとんど報告されていない食品からの検出が報告された。このような背景を受け、T-2、HT-2、4,15-DAS の一斉分析法を開発し、より広い範囲の食品を対象に調査を行う必要が考えられた。ステリグマトシスチン (STC) については、平成 28~30 年度に実施された厚生労働科学研究により分析法の確立と小麦などの主要食品における汚染実態を明らかにした^{1,3)}。日本人におけるばく露量推定を行うために、より多くの検体を対象とした汚染調査と分析の効率を向上させるため、かつ陰性検体の多い STC と 4,15-DAS の調査を効率良く行うために簡易分析法の開発が必要と考えられた。これらの研究成果により、4,15-DAS、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの 3 種のタイプ A トリコテセンカビ毒と STC については、平成 28~30 年度に実施された厚生労働科学研究の結果¹⁾と合わせ、6 年間の汚染調査と日本人におけるばく露量の結果が

得られ、それらは我が国における基準値策定の根拠として施策決定に直接貢献する。また、4,15-DAS と STC は JECFA においてリスク評価が行われたものの、ヨーロッパ以外の地域における汚染実態の情報が不足しており、十分な評価がなされたとは言えない状況にある。そのため日本におけるそれらカビ毒の汚染実態の結果は今後 JECFA において再評価がなされる際に活用され、国際機関への貢献が可能となる。

本研究においては 4,15-DAS と STC に加え、エンニアチン類 (ENs) とビューベリシン (BEA) も研究対象に加える。ENs と BEA は新興カビ毒として近年関心が高まっており、欧州を中心に 2000~2013 年に 1 万試料を超える大規模な汚染実態調査が行われた⁴⁾。研究代表者が実施した日本に流通する小麦粉を対象とした予備調査⁵⁾においては高濃度かつ高頻度で ENs が検出されており、毒性や小麦以外の食品における汚染実態の情報の取得の必要性が高まっている。

このような背景を踏まえ、2019 年度には、①多機関共同試験により、タイプ A トリコテセン系化合物 3 種の一斉分析法と ENs 5 種の一斉分析法の妥当性の評価、②ENs、STC 及びタイプ A トリコテセン系化合物の汚染調査の予備検討、③ステリグマトシスチンの迅速簡易測定法の開発、④毒性試験に用いるためのエンニアチン B の大量調製、⑤マウスを用いたエンニアチン複合体の毒性試験を実施した。

B. 研究方法

1) カビ毒の汚染調査

(1) タイプ A トリコテセン系化合物の分析法
試料 (ライ麦粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、小麦粉 (国産及び海外)) 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、それぞれの食品の中で汚染がないものを選び、5 µg/kg 又は 50 µg/kg となるようカビ

毒を添加し、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。試験溶液中のカビ毒を LC-MS/MS により定量した。

ビールについては、試料 0.5 mL を水で希釈後、固相カートリッジによる精製を行った。

(2) STC の分析法

抽出は、試料 (米、小麦粉 (国産及び海外)、乾そば、クッキー及びパン粉) 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、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。希釈液 20 mL を IAC に添加し、PBS 10 mL と蒸留水 10 mL で洗浄後、アセトニトリル 3 mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル 0.5 mL で溶解後、さらに蒸留水 0.5 mL を加えてから混合したものを試験溶液とした。試験溶液中のカビ毒を LC-MS/MS により定量した。

(3) BEA と ENs の汚染実態調査

エンニアチン A (ENA)、エンニアチン A1 (ENA1)、エンニアチン B (ENB)、エンニアチン B1 (ENB1) 及びビューベリシン (BEA) の抽出は、試料 (米、小麦粉 (国産及び海外)、ハト麦加工品、ライ麦粉、コーヒー、コーンフラワー、大麦及びそば粉) 20 g に抽出溶媒アセトニトリル : 水 (85 : 15) 200 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カビ毒濃度が 25、100 又は 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となるよう標準品を添加し、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。

抽出液 400 μL に精製水 800 μL を加えて希釈し、遠心分離を行った。メタノール 3 mL と精製水 3 mL で平衡化した C18 カートリッジ (Waters 社製 SepPak Vac C18 200 mg) に希釈液 900 μL を供した後、10%アセトニトリル水溶液 3 mL と 50%アセトニトリル水溶液 3 mL で洗浄後、90%アセトニトリル水溶液 1.5 mL で溶出したものを試験溶液とした。試験溶液中のカビ毒を LC-MS/MS により定量した。

(4) コラボラティブスタディ

①タイプ A トリコテセン系化合物

国内の 8 分析機関において、3 種のカビ毒の最終サンプル濃度が 5 又は 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となるよう調製した小麦粉の分析を実施した。

②BEA と ENs

国内の 8 分析機関において、5 種のカビ毒の最終サンプル濃度が 25、100 又は 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となるよう調製した小麦玄麦と自然汚染小麦粉 2 種の分析を実施した。

③クライテリア

コラボラティブスタディのクライテリアは、Codex 委員会が定める性能基準を参考に設定し

た。回収率のクライテリアは、タイプ A トリコテセン系化合物の 5 µg/kg 添加群で 60-115%、50 µg/kg 添加群で 80-110%、BEA と ENs の 25 µg/kg、100 µg/kg 及び 500 µg/kg 添加群では 80-110%とした。HorRat 値のクライテリアは 2 以下であることとした。

2) STC の迅速簡易測定法の開発

(1) 直接競合 ELISA

96 穴プレートの各ウェルにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈したマウス抗 IgG ヤギ抗体を 100 µL ずつ加え、4°C で一晩静置することでコーティングを行った。抗体を除いた後、PBS に溶解した 0.4% ウシ血清アルブミン (BSA) を各ウェルに 300 µL ずつ加え、4°C で一晩または室温で 1 時間静置することでブロッキングを行った。0.4% BSA を除いた後、各ウェルに PBS に溶解した 0.2% BSA で希釈したマウス抗アフラトキシン (AF) 抗体 (MoAb2-3、100 ng/mL) を 100 µL ずつ加え、室温で 1 時間静置した。静置後、PBS で希釈した 0.02% Tween 20 で 1 回洗浄を行った。STC 標準品を 10% メタノールで 10.7 pg/mL ~ 500 ng/mL (7 段階) に希釈し、サンプルとして用いた。希釈した標準品またはサンプルを AflatoxinB₁-Horse Radish Peroxidase conjugate (AFB₁-HRP、最終濃度、2.5 µg/mL) と試験管で同量混合し、混合液を各ウェルに 100 µL ずつ加え 1 時間静置し競合反応させた。その後 0.02% Tween 20 in PBS で 3 回洗浄を行い、TMB Substrate Reagent を 100 µL ずつ加え、10 分間静置した。0.5N H₂SO₄ を 100 µL ずつ加え反応を止め、マイクロプレートリーダーで 450 nm における吸光度を測定した。

(2) 添加回収試験

添加量は 100 µg/kg (最終サンプル濃度 10 µg/kg)、36 µg/kg (最終サンプル濃度 3.6 µg/kg) および 10 µg/kg (最終サンプル濃度 1.0 µg/kg)

の 3 種類を作成した。50 mL 遠沈管に、粉碎した STC 非汚染の玄米試料 10 g を秤量し、10 µg/kg 添加サンプルには STC 標準品 (10 µg/mL) 100 µL、3.6 µg/kg 添加サンプルには STC 標準品 (5 µg/mL) 72 µL、1.0 µg/kg 添加サンプルには STC 標準品 (1 µg/mL) 100 µL を添加し、室温で 1 時間放置した。その後 90% メタノールを 20 mL およびガラスビーズ 1 個を加え、振とう機で 30 分間強く振とうした。320 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を抽出液とした。これを希釈し、10% メタノールサンプル原液とし、含まれる STC を ELISA で測定した。

3) エンニアチン B の大量調製

(1) ENs 生産菌の探索及び同定

Fusarium 属菌のうち、文献調査から、*Fusarium acuminatum* または *Fusarium avenaceum* で ENs を高濃度に産生することを把握した。そこで、当部で過去に分離収集した菌株ストックから、12 株の *F. acuminatum* または *F. avenaceum* を凍結保存株から復元し、培養による ENs 産生確認および同定に供することとした。

ENs 産生を確認するために、角田液体培地に菌株を接種し、6 日間 25°C で静置培養した。培養後、培養液を 90% アセトニトリルで 1/10000 倍希釈し、LC-MS/MS で ENs 量を測定した。

コロニーの色等性状を目視で観察、およびプレパレートを作製しての生物顕微鏡観察によって孢子形状、孢子形成様式等を判定し、菌種を推定した。β-tubulin 遺伝子の PCR およびシーケンスを行った。得られた遺伝子塩基配列について、NCBI データベースを用いた BLAST サーチにより菌種を推定した。以上の形態学および分子生物学的解析結果を総合し、菌種の同定を行った。

(2) ENB の精製

F. avenaceum KFU-28 株をもち米培地で培養し、85%アセトニトリル水溶液 200 mL を加え、抽出を行った。濃縮後、酢酸エチルで液々抽出した。固相カートリッジによる粗精製後、逆相 HPLC により ENB のピークを分取した。さらに再結晶により、ENB を精製した。

4) エンニアチンのマウス反復投与毒性試験

ENs 混合物 (ENB:ENB1:ENA1=4:4:1) を dimethyl sulfoxide 加コーン油で調製した被験液を 0、0.8、4、20 mg/kg 体重の投与量でそれぞれ 6 週齢 ICR [CrI:CD1 (ICR)] マウス (雌雄各 10 匹/群) に 28 日間反復経口投与した。投与期間中は一般状態の観察及び体重、摂餌量の測定を実施した。投与期間終了後、剖検時に血液を採取し、血液学検査と血液化学検査を実施した。剖検では外表及び全ての器官、組織を詳細に観察した。所定の臓器を採取し重量測定後、固定し、パラフィン包埋した。各臓器のヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色標本作製し、鏡検した。

C. 研究結果

1) カビ毒の汚染調査

(1) コラボラティブスタディ

①タイプ A トリコテセン系化合物

4,15-DAS、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの回収率は 101~111%、併行相対標準偏差は 1.6~7.7%、室間再現性標準偏差は 5.3~8.2%、HorRat 値は 0.2~0.3 の範囲に収まった。

②BEA と ENs

5 種のカビ毒の回収率は 92~100%、併行相対標準偏差は 2.1~4.5%、室間再現性標準偏差は 9.3~15.3%、HorRat 値は 0.33~0.84 の範囲に収まった。自然汚染検体における ENA1、ENB 及び ENB1 の併行相対標準偏差は 2.4~5.7%、

室間再現性標準偏差は 6.2~12.9%、HorRat 値は 0.24~0.46 の範囲に収まった。

(2) 汚染実態調査

①タイプ A トリコテセン系化合物

5 食品目計 148 検体の調査を行った。4,15-DAS はコーンフラワー、ハト麦加工品及び小麦粉 (国産) から検出され、陽性率はコーンフラワーの 66.7%が最も高く、次いでハト麦加工品で 60%であった。平均値についてはハト麦加工品の 3.2 µg/kg が最も高かった。最大濃度はハト麦加工品の 20.0 µg/kg であった。コーンフラワーと小麦粉 (国産) における陽性検体の濃度は全て 1 µg/kg 未満であった。

T-2 トキシンはライ麦粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、小麦粉 (国産) 及びビールで検出された。ハト麦加工品とライ麦粉の陽性率がそれぞれ 86.7%及び 86.2%で他の食品より高かった。平均濃度はハト麦加工品の 3.5 µg/kg が最も高く、次いでライ麦粉の 1.9 µg/kg であった。最大濃度はハト麦加工品における 19.9 µg/kg であった。

HT-2 トキシンは全ての調査品目で検出された。T-2 トキシンと同様にハト麦加工品とライ麦加工品の陽性率が他の食品より高かった。ハト麦加工品の平均濃度 3.6 µg/kg が最も高く、次いでライ麦粉の 0.4 µg/kg、コーンフラワーの 0.3 µg/kg であった。最大濃度はハト麦加工品における 27.0 µg/kg であった。

3 種のタイプ A トリコテセン系化合物の合算値について、平均濃度はハト麦加工品の 10.3 µg/kg が最も高く、次いでライ麦粉の 2.3 µg/kg であった。最大濃度はハト麦加工品における 48.2 µg/kg であった。

②BEA と ENs

8 食品目 208 検体の調査を行った。BEA については、小麦粉 (国産)、小麦粉 (海外)、ハト

麦加工品、ライ麦粉、コーンフラワー、大麦及びそば粉で検出された。陽性率が最も高かったのはハト麦加工品（80%）で、次いでコーンフラワー（76%）、小麦粉（海外）（60%）であった。ハト麦加工品の平均濃度 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでコーンフラワーの 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はハト麦加工品における 128 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。ENs は米、小麦粉（国産）、小麦粉（海外）、ライ麦粉及び大麦で検出された。4 種の ENs のうち、ENB の汚染レベルがいずれの検体においても最も高く、次いで ENB1、ENA1、ENA の順であった。ENB の陽性率が最も高かったのはライ麦粉（93%）で、次いで小麦粉（国産）（73%）、小麦粉（海外）（72%）であった。ライ麦粉の平均濃度 68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いで小麦粉（国産）の 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はライ麦粉における 2845 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

③STC

5 食品目 144 検体の調査を行った。米における陽性率は 45%で、平均濃度は 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大濃度は 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。小麦加工品である小麦粉（国産）、小麦粉（海外）、乾そば、クッキー及びパン粉から STC が検出された。そのうち陽性率が最も高かったのは乾そば（57%）で次いで小麦粉（国産）（31%）であった。乾そばの平均濃度 0.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いで小麦粉（国産）の 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度は小麦粉（国産）における 1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

2) STC の迅速簡易測定法の開発

(1) 直接競合 ELISA の確立

STC 測定に最適な MoAb2-3 及び AFB₁-HRP の濃度はチェッカーボード滴定によって評価し、MoAb2-3 濃度は、100 ng/mL を、AFB₁-HRP については 5.0 ng/mL を最適濃度とした（最終濃度 2.5 ng/mL）。確立した ELISA の cut off 値は、STC に汚染されていない玄米 5 種類につい

て ELISA を行い、その測定結果の平均+標準偏差値とした。その結果 cut off 値は 0.59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となった。

(2) 妥当性評価

玄米 10 g に対して添加濃度 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ における回収率は 96.00 \pm 18.26%、添加濃度 3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では 88.33 \pm 8.50%、添加濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では 90.3 \pm 9.04 %であった。いずれも 85 %以上を示し、1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の濃度で測定可能であることが明らかになった。また、STC の標準曲線から、直線性のある範囲は cut off 値を考慮に入れて 0.59~13.34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とした。

3) エンニアチン B の大量調製

(1) ENs 生産菌の探索及び同定

ENs 生産菌候補 12 株のうち、6 株で ENB の生産が認められ、その中でも KFU-28 株と YF016-B 株に高い生産能が認められた。KFU-28 株と YF016-B 株を米培地で培養し、抽出液中の ENB 量を測定した。その結果、KFU-28 株は米 1 g あたり約 3 mg の ENB を生産したが、YF016-B 株では ENB の生産が認められなかった。そのため、ENB の大量調製には KFU-28 株を用いることとした。KFU-28 株の形態学および分子生物学的同定を行ったところ、巨大分子の湾曲が大きく、小型分子がほとんど形成されていないという特徴が観察された。また、 β -tubulin 遺伝子塩基配列の BLAST サーチの結果から、*F. avenaceum* と推定された。これらの結果を総合し、本株は *F. avenaceum* と同定された。

(2) ENB の精製

1 本あたり米 50 g を入れた 15 本の培養器で KFU-28 株を 11 日間培養し、ENB を生産させた。85%アセトニトリルを加え、培養物を破碎後、抽出液を濾別した。抽出液を乾固後、飽和

炭酸水素ナトリウム水溶液と酢酸エチルで液々分配を行い、酢酸エチル層に ENB を回収した。酢酸エチル層を濃縮し、黒色の油状物質 12.3 g を得た。油状物質を C2 オープンカートリッジで分画し、ENB が含まれる 80%アセトニトリル水溶液溶出画分を得た。溶出画分を濃縮し、茶色の油状物質 9.7 g を得た。逆相 HPLC により、ENB に相当するピークを分取した。分取した画分を濃縮し、ENB 2.6 g を得た。混入している茶色の色素を除くために再結晶を行い、精製 ENB 2 g を得た。精製した ENB の純度を HPLC により確認した結果、98%以上の純度を有していた。

4) エンニアチンのマウス反復投与毒性試験

摂餌量について、雄では投与 4 日の中・高用量群、投与 14 日の高用量群に対照群と比較し低値がみられた。雌では投与 4、14、21 日の高用量群に対照群と比較し低値がみられた。

投与期間中の体重、体重増加量共にいずれの群にも有意な変化は認められなかった。

血液学検査と血液化学検査においては、いずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった。

器官重量については、中用量群の雄の脳絶対重量が対照群と比較し低値を示した。その他の臓器の絶対重量や相対重量に有意な変化は認められなかった。

病理組織学検査の結果においては、計画剖検例のいずれの群にも諸臓器に偶発性的な変化がみられたが、被験物質の投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。

D. 考察

1) カビ毒の汚染調査

(1) コラボラティブスタディ

タイプ A トリコテセン系化合物については 2 種類の濃度の添加回収試験、BEA と ENs につ

いては 3 種類の濃度の添加回収試験と 2 種類の自然汚染検体の分析を行った。いずれのカビ毒の定量値についても Cochran 検定で外れ値と判定されたものはなく、評価に必要な有効試験室数 8 が確保できた。検討を行った 8 種のカビ毒について、回収率と HorRat 値はいずれも設定したクライテリアを満たしたことから、今回実施したコラボラティブスタディの結果は良好であると考えられた。

(2) 汚染実態調査

①タイプ A トリコテセン系化合物

今年度調査した検体のうち、ハト麦加工品、コーンフラワー及び小麦粉（国産）において 3 種の化合物の同時汚染が認められた。ライ麦粉とビールでは T-2 トキシンと HT-2 トキシンの同時汚染が認められた。ライ麦粉とハト麦加工品において特に汚染レベルが高く、これら 2 品目については継続的に調査を行っていく必要があると考えられる。また、国産の小麦粉の方が海外の小麦粉よりも汚染レベルが高いことから、その他の国産農作物においてもタイプ A トリコテセン系化合物が検出される可能性がある。次年度以降は国産農作物の調査数を増やすこととする。

②BEA と ENs

今年度調査した食品のうち、BEA の汚染レベルが高かったのはハト麦加工品とコーンフラワー、ENs の汚染レベルが高かったのはライ麦粉と小麦粉（国産）であり、BEA と ENs で汚染が認められる食品が明確に分かれていた。BEA と ENs は化学構造は類似しているが、生産する菌種が異なる。それぞれの生産菌の生息域や感染しやすい農作物の違いが原因と考えられる。今回調査した食品では麦類の汚染レベルが高かったが、ヨーロッパで実施された汚染調査ではドライフルーツや木の実、コーヒー豆からも

BEA や ENs が検出されている。次年度以降はヨーロッパの調査結果を参考に、対象を広げた調査を行う。

③STC

今年度は4種類の小麦加工食品の調査を行ったが、小麦粉、乾そば、クッキー及びパン粉のいずれからでもSTCが検出された。特に乾そばでは小麦粉(国産)よりも陽性率と平均値が高かった。今回調査を行っていない小麦加工品にも小麦由来と推定されるSTCが混入している可能性があり、日本人におけるSTCのばく露量を算出するためには様々な小麦加工品を検査する必要性が考えられた。また、米においてもSTCが小麦粉と同等のレベルで検出された。ばく露量を算出する際には米も考慮に入れる必要があると考えられる。

2) STCの迅速簡易測定法の開発

本研究で開発したSTC用ELISAでは、測定可能範囲は0.59~13.34 ng/mLであった(IC₅₀ 2.3 ng/mL)。既に開発されているSTC用のELISAとして、Kongらは感度の高いモノクローナル抗体を用いて、穀類製品であるシリアルに含まれるSTCの分析を行う間接競合ELISAを報告している⁶⁾。また、直接競合ELISAとしてはOplatowska-Stachowiakらが米、トウモロコシ、及び小麦を対象としたELISAを報告している⁷⁾。これらのELISAのIC₅₀値は0.092-0.64 ng/mLであり、本研究で開発したELISAのIC₅₀値はやや高い傾向にあったが、実態調査で検出されている汚染量をカバーするには十分であると考えられた。国産米では現在AFの汚染は確認されていないので、本ELISAはSTCのスクリーニングに有効であると考えられるが、本研究で用いた特異抗体は抗AF抗体であることから、AFとSTCの両方を検出できるため、両者が汚染している食品に対しては、STC

のみの検出ができないという欠点もある。今後両者が汚染する食品を対象にする場合は、STCのみを検出できるモノクローナル抗体を作成し、本研究で構築した方法でSTC特異的ELISAを開発することが望まれる。

3) エンニアチンのマウス反復投与毒性試験

Maranghiにより実施されたENBの42日間反復投与毒性試験⁸⁾では、エンニアチンの影響と考えられる変化として雌に胸腺、子宮、脾臓の組織形態学的な変化、雄に十二指腸腸上皮細胞の空胞化や脳酸化ストレス量の増加が観察されており、その変化を以て本実験の投与量が設定された。しかし、本試験では被験物質の影響と考えられる変化として摂餌量の低値が認められたものの、病理組織学的検査をはじめとするその他の検査項目に被験物質の影響を示唆する明らかな変化は認められなかった。本試験はENsの混合物(ENB:ENB1:ENA1=4:4:1)を用いており、投与期間の違いはあるものの被験物質の違いが結果に影響した可能性が示唆された。なお、投与期間中に死亡した高用量群の1例は剖検及び病理組織学検査の結果、上腕部からの出血が死因と考えられた。しかし、計画剖検では他の生存動物に出血性の変化を示す所見は認められず、当該動物の死因は被験物質投与に起因したものではなく、何らかの事故による上腕部の外傷によるものと考えられた。ENsの確かな毒性情報を得るには再試験が必要であると考えられ、今後はENB単体を用いた28日間反復経口投与毒性試験を実施する予定である。

E. 結論

小麦中に含まれる3種のタイプAトリコテセン系化合物とBEAとENsについて、分析法の妥当性を確認するために多機関共同試験を行った。いずれの分析法についても回収率とHorRat値はクライテリアを満たし、良好な結果が得ら

れた。これら分析法はライ麦やハト麦、コーンフラワーなどの食品にも適用可能であることを添加回収試験によって確認した。タイプ A トリコテセン系化合物の汚染調査の結果、ライ麦粉とハト麦加工品で汚染レベルが高かった。BEA はハト麦加工品とコーンフラワーにおいて、ENs はライ麦粉と小麦粉（国産）において主に汚染が認められた。STC は小麦粉のみならず、クッキーなどの加工品においても汚染が認められた。次年度以降は海外で実施された調査結果を参考に、より対象を広げた調査を実施する。また、簡易試験法については、米を対象とした ELISA 法を確立した。今後はカビ毒汚染調査で用いる検体について、LC-MS/MS 法と ELISA 法の両方で STC を測定し、定量値の相関を調べ、簡易試験法としての有効性を評価する必要がある。マウスを用いた毒性試験については、ヨーロッパで実施された試験で認められた変化は認められなかった。次年度は精製した ENB をより高濃度で投与し、毒性を評価する。

F. 参考文献

- 1) 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 28 年度から平成 31 年度総合・分担研究報告書（研究代表者 小西良子）
- 2) World Health Organization. 2017. Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical Report Series, No. 1002:40–54.
- 3) Yoshinari T, et al. Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. Food Addit Contam Part A. 2019, 36(9):1404-1410.
- 4) European Food Safety Authority. 2014.

Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. EFSA Journal. 12(8):3802.

- 5) Yoshinari T., et al. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat flour and corn grits on the Japanese market, and their co-contamination with type B trichothecene mycotoxins. Food Addit Contam Part A. 2016, 33(10):1620-162.
- 6) Kong D. et al. Development of indirect competitive ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of sterigmatocystin in cereal products. Food and Agricultural Immunology. 2017, 28(2):260-273.
- 7) Oplatowska-Stachowiak M. et al., Development and in-house validation of a rapid and simple to use ELISA for the detection and measurement of the mycotoxin sterigmatocystin. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2018, 410(12):3017–3023.
- 8) Maranghi F., et al. *In vivo* toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins. Combined approach to study in vivo toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENNB). EFSA Supporting Publications. 2018, 15(5):1406E.

G. 研究業績

【論文発表】

- 1) Yoshinari T, et al. Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. Food Addit Contam Part A. 2019;36(9):1404-1410.

- 2) Kobayashi N, et al. Microflora of Mycotoxigenic Fungi in Rice Grains in Kyushu Region of Japan and Their Changes during Storage under non-Controlled Conditions. *Biocontrol Sci.* 2019;24(3):161-166.
- 3) Kubosaki A, et al. A New Protocol for Detection of *Aspergillus* Section *Versicolores* Using a High Discrimination Polymerase. *Biocontrol Sci.*, submitted.
- 4) Nakajima K, et al. Developmental exposure of mice to T-2 toxin increases astrocytes and hippocampal neural stem cells expressing metallothionein. *Neurotox. Res.* 2019;35(3):668–683.
- 5) Nakajima K. et al. Developmental exposure to diacetoxyscirpenol reversibly disrupts hippocampal neurogenesis by inducing oxidative cellular injury and suppressed differentiation of granule cell lineages in mice. *Food Chem. Toxicol.* 2020, 136:111046.

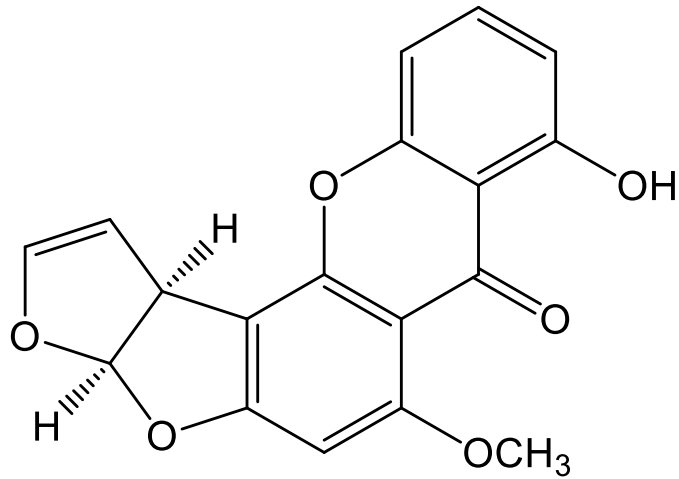
るスクリーニング法の開発」

H. 健康危険情報

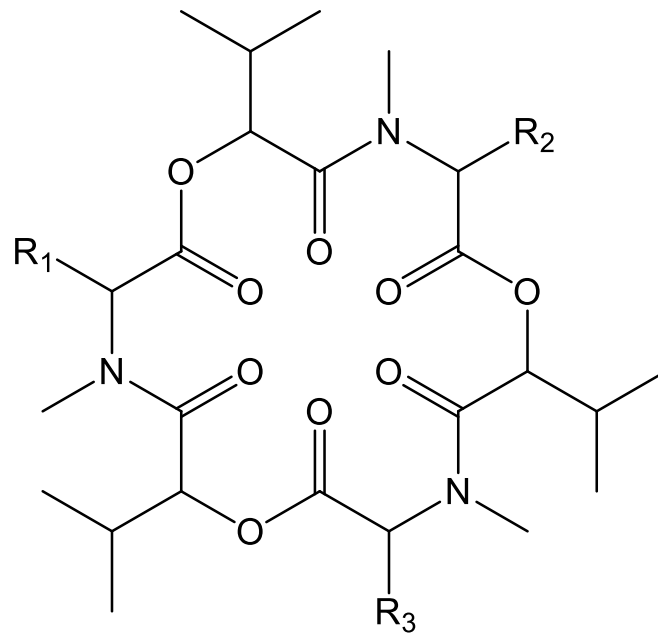
なし

【学会発表】

- 1) 第 115 回日本食品衛生学会学術講演会、2019 年 10 月 3～4 日、東京、ポスター発表「食品中のステリグマトシスチンの分析法の検討及び汚染実態調査」
- 2) 第 35 回日本毒性病理学会学術集会、2019 年 1 月 31 日-2 月 1 日、東京、ポスター発表「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」
- 3) 第 46 回日本毒性学会学術年会、2019 年 6 月 26～28 日、徳島、ポスター発表「海馬神経新生に着目したかび毒の発達神経毒性」
- 4) 第 83 回日本マイコトキシン学会学術講演会、2019 年 1 月 11 日、神奈川、ポスター発表「ステリグマトシスチンの ELISA によ

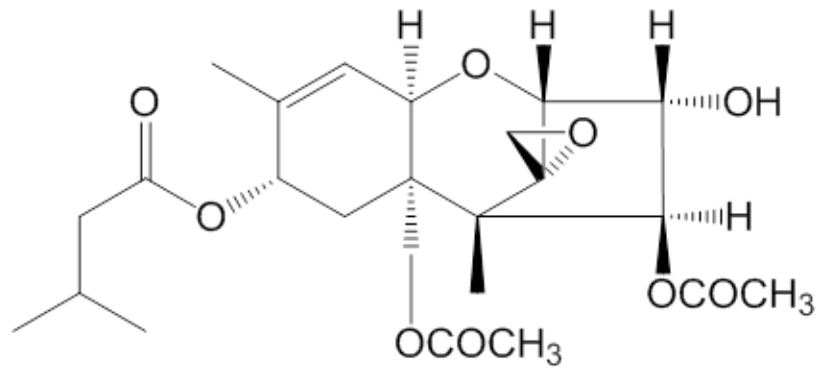


ステリグマトシスチン

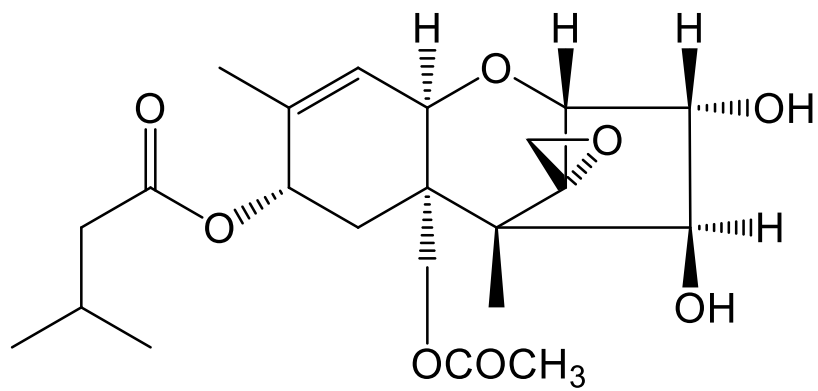


	R ₁	R ₂	R ₃
ビューベリシン	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅
エンニアチンA	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
エンニアチンA ₁	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
エンニアチンB	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
エンニアチンB ₁	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃

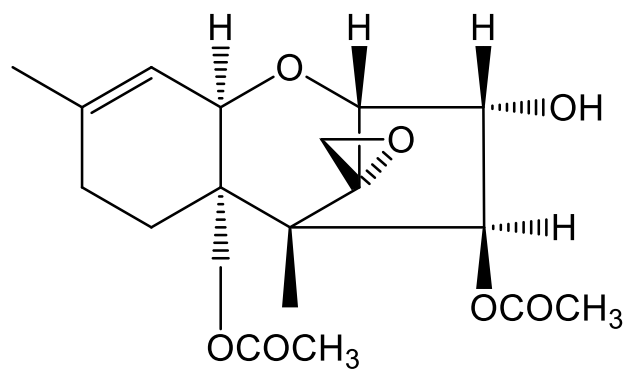
図 1 本研究が対象とするカビ毒の化学構造



T-2 トキシシン



HT-2 トキシシン



4,15-ジアセトキシシルペノール

図1 本研究が対象とするカビ毒の化学構造 (続き)

表1 国際機関によってリスク評価が実施されたカビ毒の一覧

JECFA	EFSA	日本	CODEX
<ul style="list-style-type: none"> ・ 総アフラトキシン (落花生) ・ アフラトキシンM1 ・ T-2/HT-2トキシン ・ ゼアラレノン ・ パツリン ・ 総アフラトキシン (木の实) ・ オクラトキシンA ・ DON ・ フモニシン ・ ステリグマトシスチン ・ 4,15-DAS 	<ul style="list-style-type: none"> ・ DON ・ マスクドDON ・ フモニシン ・ オクラトキシンA ・ アフラトキシンM1 ・ T-2/HT-2トキシン ・ ゼアラレノン ・ ビューベリシン ・ エンニアチン類 ・ NIV ・ アルタナリオール ・ ステリグマトシスチン ・ モリニフォルミン ・ モディファイド フモニシン ・ 4,15-DAS 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 総アフラトキシン ・ アフラトキシンM1 ・ パツリン ・ オクラトキシンA ・ DON ・ NIV ・ フモニシン 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 総アフラトキシン (落花生) ・ アフラトキシンM1 ・ パツリン ・ 総アフラトキシン (木の实) ・ オクラトキシンA ・ DON ・ フモニシン

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

カビ毒の分析法の確立と汚染実態調査

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

3種のタイプAトリコテセン系カビ毒(T-2トキシン、HT-2トキシン及び4,15-ジアセトキシシシルペノール(4,15-DAS)の一斉分析法を開発するために、コラボラティブスタディを実施した。ブランク検体と2濃度の添加検体を8機関で分析し、良好な結果が得られた。開発した分析法を用いて5食品目計148検体の調査を行った。4,15-DASは主にハト麦加工品から、T-2トキシンとHT-2トキシンは主にライ麦粉、ハト麦加工品、小麦粉(国産)及びコーンフラワーから検出された。3種のカビ毒の同時汚染はハト麦加工品、コーンフラワー及び小麦粉(国産)で認められた。ビューベリシン(BEA)とエンニアチンA(ENA)、A1(ENA1)、B(ENB)及びB1(ENB1)の一斉分析法を開発するために、コラボラティブスタディを実施した。ブランク検体、3濃度の添加検体と2種類の自然汚染検体を8機関で分析し、良好な結果が得られた。開発した分析法を用いて8食品目208検体の調査を行った。BEAはハト麦加工品、コーンフラワー、小麦粉(海外)で主に検出された。4種のエンニアチンのうち、ENBの汚染レベルがいずれの検体においても最も高く、ライ麦粉と小麦粉(国産)で主に検出された。ステリグマトシスチン(STC)については、米と小麦加工品を対象に5食品目144検体の調査を行った。その結果、米と小麦粉(国産)、小麦粉(海外)、乾そば、クッキー及びパン粉からSTCが検出された。

今年度は穀類を中心に調査を行ったが、いずれのカビ毒も頻りに検出された。次年度以降については、本年度に開発に成功した分析法を用いて、より幅広い食品を対象に調査を行い、各カビ毒の汚染分布の傾向に関する情報を得る。

研究協力者

中島 正博 名古屋女子大学
竹内 浩 三重県保健環境研究所
谷口 賢 名古屋市衛生研究所
橋口 成喜 川崎市健康安全研究所
佐藤 英子 川崎市健康安全研究所
福光 徹 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

森田 剛史 (一財)日本穀物検定協会
下山 晃 (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

SUNATEC

鈴木 実束 (一財)食品分析開発センター

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、コーデックス委員会で規格策定が行われている。我が国はコーデックス委員会の加盟国であることから、コーデックス規格を食品の規格基準に採用することが厚生労働省の方針として決められている。

厚生労働省は、リンゴジュース中のパツリン、小麦玄麦中のデオキシニバレノール、全食品中の総アフラトキシン及び乳中のアフラトキシン M₁ に対して規制を行っている。また、コーデックス規格が定められているオクラトキシン A やフモニシンに関しては、本研究事業で実態調査が行われており、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タイプ A トリコテセン系化合物 (T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-ジアセトキシンシルペノール (4,15-DAS))、ゼアラレノン及びステリグマトシスチン (STC) についても汚染実態調査を行った。

本事業はタイプ A トリコテセン系化合物、STC 及びエンニアチン類 (ENs) を研究対象とする。タイプ A トリコテセン系化合物については、T-2 トキシンと HT-2 トキシンの汚染調査を 2010~2015 年度、4,15-DAS の汚染調査を 2016~18 年度に実施し、麦類や豆類における汚染実態を明らかにした。その一方で、2016 年 11 月に開催された JECFA において、T-2 トキシンと HT-2 トキシンのグループ PMTDI (0.06 µg/kg bw/day) に 4,15-DAS も組み入れられることが提唱され、3 種のタイプ A トリコテセン系化合物を一斉に定量分析し、リスク評価を行う必要性が生じた¹⁾。そこで今年度は 3 種のタイプ A トリコテセン系化合物の一斉分析法を開発し、他機関共同試験による妥当性の評価と汚染調査

を行うこととした。STC については、2016~18 年度に実施した研究により、分析法の確立と小麦などの食品における汚染実態を明らかにした²⁾。日本人におけるばく露量推定を行うために、小麦加工品など対象とした汚染調査を行うこととした。ENs は新興カビ毒として近年関心が高まっており、欧州を中心に 2000~2013 年に 1 万試料を超える大規模な汚染実態調査が行われ、穀類加工品、ドライフルーツ、木の実、コーヒーなど幅広い食品で汚染が認められた³⁾。また、研究代表者が実施した日本に流通する小麦粉を対象とした予備調査においては高濃度かつ高頻度で ENs が検出されており、小麦以外の食品における汚染実態の情報の取得の必要性が高まっている⁴⁾。ENs については初年度に分析法の確立、汚染調査の予備試験を行う。

B. 研究方法

(1) タイプ A トリコテセン系化合物の分析法
ビール以外の試料 (ライ麦粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、小麦粉 (国産及び海外)) については、25 g を量りとり、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抽出を行った。添加回収試験の場合は、それぞれの食品の中で汚染がないものを選び、5 µg/kg 又は 50 µg/kg となるようカビ毒を添加し、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、一晩放置して炭酸を抜い

た検体 0.5 mL に精製水 2 mL を加え希釈した。アセトニトリル 2 mL と精製水 2 mL で平衡化した固相カートリッジ (Biotage 社製 ISOLUTE Myco) に希釈液全量を加え、精製水 3 mL と 5% アセトニトリル 3 mL で洗浄後、シリンジを用いてカラム内の水分を除去した。アセトニトリル 2 mL で溶出し、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 : Inertsil ODS-3

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度 : 40°C

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 = 50 : 50

8 分 A : B = 10 : 90

11 分まで保持

流速 : 0.2 mL/分

注入量 : 2 μL

MS

イオン化 : ESI positive

モニタリングイオン :

T-2 トキシシン 484 > 305, 215

HT-2 トキシシン 442 > 215, 187

4,15-DAS 384 > 307, 247

(2) STC の分析法

抽出は、試料 (米、小麦粉 (国産及び海外)、乾そば、クッキー及びパン粉) 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。希釈液 20 mL を IAC に添加し、PBS 10 mL と蒸留水 10 mL で洗浄後、アセトニトリル 3 mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル 0.5 mL で溶解後、さらに蒸留水 0.5 mL を加えてから混合したものを試験溶液とした。

<LC-MS/MS の測定条件>

HPLC

カラム : InertSustain C18

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度 : 40°C

移動相 : A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件 : 0 分 A : B = 60 : 40

13 分 A : B = 10 : 90

流速 : 0.2 mL/分

注入量 : 10 μL

MS

イオン化 : ESI positive

モニタリングイオン : 325 [M+H]⁺>281

(3) BEA と ENs の汚染実態調査

エンニアチン A (ENA)、エンニアチン A1 (ENA1)、エンニアチン B (ENB)、エンニアチン B1 (ENB1) 及びビューベリシン (BEA) の抽出は、試料 (米、小麦粉 (国産及び海外)、ハト麦加工品、ライ麦粉、コーヒー、コーンフラワー、大麦及びそば粉) 20 g に抽出溶媒アセトニトリル：水 (85 : 15) 200 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

合は試料中のカビ毒濃度が 25、100 又は 500 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。

抽出液 400 µL に精製水 800 µL を加えて希釈し、遠心分離を行った。メタノール 3mL と精製水 3 mL で平衡化した C18 カートリッジ (Waters 社製 SepPak Vac C18 200 mg) に希釈液 900 µL を供した後、10%アセトニトリル水溶液 3 mL と 50%アセトニトリル水溶液 3 mL で洗浄後、90%アセトニトリル水溶液 1.5 mL で溶出したものを試験溶液とした。

<LC-MS/MS の測定条件>

HPLC

カラム : Inertsil ODS-3

2.1×150 mm, 3 µm

カラム温度 : 40°C

移動相 : A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B アセトニトリル

分離条件 : 0分 A : B = 30 : 70

20分 A : B = 20 : 80

22分まで保持

流速 : 0.2 mL/分

注入量 : 5 µL

MS

イオン化 : ESI positive

モニタリングイオン :

ENA 699 > 210, 682

ENA1 685 > 210, 668

ENB 657 > 196, 640

ENB1 671 > 196, 654

BEA 801 > 134, 784

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。

(4) コラボラティブスタディ

①タイプ A トリコテセン系化合物

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

- ・ 3 種のカビ毒不検出の小麦粉 約 200 g
- ・ 3 種のカビ毒混合標準品アセトニトリル溶液 (検量線作成用 2.5 mg/L) 約 2 mL
- ・ 3 種のカビ毒添加回収試験溶液 0、0.25 及び 2.5 mg/L の濃度のアセトニトリル溶液約 0.8 mL を入れた小瓶を 2 つずつ。濃度は未記載で番号のみ記した。
- ・ 固相カートリッジ 8 本

②BEA と ENs

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

- ・ ENs 不検出の小麦玄麦粉砕物 約 200 g
- ・ ENs5 種混合標準品アセトニトリル溶液 (検量線用 10 mg/L) 約 2 mL
- ・ 4,15-DAS 添加用溶液 0、0.5、2 及び 10 mg/L の濃度のアセトニトリル溶液約 1.3 mL を入れた小瓶を 2 つずつ。濃度は未記載で番号のみ記した。
- ・ 自然汚染小麦粉 No.1 約 30 g を 2 セット
- ・ 自然汚染小麦粉 No.2 約 30 g を 2 セット
- ・ 固相カートリッジ 15 本

③クライテリア

コラボラティブスタディのクライテリアは、Codex 委員会が定める性能基準を参考に設定した。回収率のクライテリアは、タイプ A トリコテセン系化合物の 5 µg/kg 添加群で 60-115%、50 µg/kg 添加群で 80-110%、BEA と ENs の 25 µg/kg、100 µg/kg 及び 500 µg/kg 添加群では 80-110%とした。HorRat 値のクライテリアは 2 以下であることとした。

C. 研究結果

(1) コラボラティブスタディ

①タイプ A トリコテセン系化合物

4,15-DAS、T-2 トキシシン及び HT-2 トキシシンの各機関の測定値、検出限界値 (LOD)、定量限界値 (LOQ)、平均値、回収率、併行相対標準偏差 (RSDr)、室間再現性標準偏差 (RSDR) 及び HorRat 値を表 1~3 に示す。3 種のカビ毒における 4,15-DAS、T-2 トキシシン及び HT-2 トキシシンの回収率は 101~111%、併行相対標準偏差は 1.6~7.7%、室間再現性標準偏差は 5.3~8.2%、HorRat 値は 0.2~0.3 の範囲に収まった。

②BEA と ENs

BEA と 4 種の ENs の各機関の測定値、検出限界値 (LOD)、定量限界値 (LOQ)、平均値、回収率、併行相対標準偏差 (RSDr)、室間再現性標準偏差 (RSDR) 及び HorRat 値を表 4~8 に示す。5 種のカビ毒の回収率は 92.4~99.8%、併行相対標準偏差は 2.1~4.5%、室間再現性標準偏差は 9.3~15.3%、HorRat 値は 0.33~0.84 の範囲に収まった。自然汚染検体における ENA1、ENB 及び ENB1 の併行相対標準偏差は 2.4~5.7%、室間再現性標準偏差は 6.2~12.9%、HorRat 値は 0.24~0.46 の範囲に収まった。

(2) 添加回収試験

①タイプ A トリコテセン系化合物

ハト麦加工品、ライ麦粉、コーンフラワー及びビールを用いた 3 種のカビ毒の添加回収試験の結果を表 9 に示した。5 µg/kg 添加群においては 3 種のカビ毒の回収率の平均値は 91.4~111.3%の範囲に収まり、標準偏差は 5.7%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 88.3~109.5%の範囲に収まり、標準偏差は 9.0%以下であった。コーデックス委員会により作成され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。4 種の食品における 3 種のカビ毒の回収率はこのクライテリアを満たしていた。

②BEA と ENs

ハト麦加工品、ライ麦粉、そば粉、インスタントコーヒー、コーンフラワー、大麦加工品及び米を用いた 5 種のカビ毒の添加回収試験の結果を表 10 に示した。BEA の回収率は 86.9~108.7%の範囲内、標準偏差は 5.7%以下、ENA の回収率は 84.3~105.0%の範囲内、標準偏差は 6.8%以下、ENA1 の回収率は 83.3~104.2%の範囲内、標準偏差は 3.9%以下、ENB の回収率は 90.8~109.3%の範囲内、標準偏差は 8.6%以下、ENB1 の回収率は 89.7~104.3%の範囲内、標準偏差は 6.3%以下であった。コーデックス委員会により作成された分析法の手順書において、1 mg/kg、100 µg/kg 及び 10 µg/kg 添加時の回収率のクライテリアはそれぞれ 80~110%、80~110%及び 60~115%とされている。7 種の食品における 5 種のカビ毒の回収率はこのクライテリアを満たしていた。

③STC

乾そば、クッキー及びパン粉を用いた添加回収試験の結果を表 11 に示した。0.5 µg/kg 添加群における回収率は 92.0~106.8%の範囲に収まり、標準偏差は 5.4%以下であった。5 µg/kg 添加群における回収率は 90.7~101.2%の範囲に収まり、標準偏差は 5.5%以下であった。得られた回収率は、上述したコーデックス委員会により作成された分析法の手順書に記載されたクライテリアを満たしていた。

(3) 汚染実態調査

①タイプ A トリコテセン系化合物

5 食品目計 148 検体の調査を行った。結果を表 12 に示した。4,15-DAS はコーンフラワー、ハト麦加工品及び小麦粉 (国産) から検出され、

陽性率はコーンフラワーの 66.7%が最も高く、次いでハト麦加工品で 60%であった。平均値についてはハト麦加工品の 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高かった。最大濃度はハト麦加工品の 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。コーンフラワーと小麦粉（国産）における陽性検体の濃度は全て 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。

T-2 トキシンはライ麦粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、小麦粉（国産）及びビールで検出された。ハト麦加工品とライ麦粉の陽性率がそれぞれ 86.7%及び 86.2%で他の食品より高かった。平均濃度はハト麦加工品の 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでライ麦粉の 1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はハト麦加工品における 19.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

HT-2 トキシンは全ての調査品目で検出された。T-2 トキシンと同様にハト麦加工品とライ麦加工品の陽性率が他の食品より高かった。ハト麦加工品の平均濃度 3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでライ麦粉の 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、コーンフラワーの 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はハト麦加工品における 27.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

3 種のタイプ A トリコテセン系化合物の合算値について、平均濃度はハト麦加工品の 10.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでライ麦粉の 2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はハト麦加工品における 48.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

②BEA と ENs

8 食品目 208 検体の調査を行った。結果を表 13 に示した。BEA については、小麦粉（国産）、小麦粉（海外）、ハト麦加工品、ライ麦粉、コーンフラワー、大麦及びそば粉で検出された。陽性率が最も高かったのはハト麦加工品（80%）で、次いでコーンフラワー（76%）、小麦粉（海外）（60%）であった。ハト麦加工品の平均濃度 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでコーンフラワーの 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はハト麦加工品にお

ける 128 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。ENs は米、小麦粉（国産）、小麦粉（海外）、ライ麦粉及び大麦で検出された。4 種の ENs のうち、ENB の汚染レベルがいずれの検体においても最も高く、次いで ENB1、ENA1、ENA の順であった。ENB の陽性率が最も高かったのはライ麦粉（93%）で、次いで小麦粉（国産）（73%）、小麦粉（海外）（72%）であった。ライ麦粉の平均濃度 68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いで小麦粉（国産）の 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はライ麦粉における 2,845 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

③STC

5 食品目 144 検体の調査を行った。結果を表 14 に示した。米における陽性率は 45%で、平均濃度は 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大濃度は 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。小麦加工品である小麦粉（国産）、小麦粉（海外）、乾そば、クッキー及びパン粉から STC が検出された。そのうち陽性率が最も高かったのは乾そば（57%）で次いで小麦粉（国産）（31%）であった。乾そばの平均濃度 0.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いで小麦粉（国産）の 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度は小麦粉（国産）における 1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

D. 考察

(1) コラボラティブスタディ

タイプ A トリコテセン系化合物については 2 種類の濃度の添加回収試験、BEA と ENs については 3 種類の濃度の添加回収試験と 2 種類の自然汚染検体の分析を行った。いずれのカビ毒の定量値についても Cochran 検定で外れ値と判定されたものはなく、評価に必要な有効試験室数 8 が確保できた。検討を行った 8 種のカビ毒について、回収率と HorRat 値はいずれも設定したクライテリアを満たしたことから、今回実施したコラボラティブスタディの結果は良好であると考えられた。

(2) 汚染実態調査

①タイプ A トリコテセン系化合物

今年度調査した検体のうち、ハト麦加工品、コーンフラワー及び小麦粉（国産）において 3 種の化合物の同時汚染が認められた。ライ麦粉とビールでは T-2 トキシンと HT-2 トキシンの同時汚染が認められた。ライ麦粉とハト麦加工品において特に汚染レベルが高く、これら 2 品目については継続的に調査を行っていく必要があると考えられる。また、国産の小麦粉の方が海外の小麦粉よりも汚染レベルが高いことから、その他の国産農作物においてもタイプ A トリコテセン系化合物が検出される可能性がある。次年度以降は国産農作物の調査数を増やすこととする。

②BEA と ENs

今年度調査した食品のうち、BEA の汚染レベルが高かったのはハト麦加工品とコーンフラワー、ENs の汚染レベルが高かったのはライ麦粉と小麦粉（国産）であり、BEA と ENs で汚染が認められる食品が明確に分かれていた。BEA と ENs は化学構造は類似しているが、生産する菌種が異なる。それぞれの生産菌の生息域や感染しやすい農作物の違いが原因と考えられる。今回調査した食品では麦類の汚染レベルが高かったが、ヨーロッパで実施された汚染調査ではドライフルーツや木の実、コーヒー豆からも BEA や ENs が検出されている。次年度以降はヨーロッパの調査結果を参考に、対象を広げた調査を行う。

③STC

今年度は 4 種類の小麦加工食品の調査を行ったが、小麦粉、乾そば、クッキー及びパン粉のいずれからでも STC が検出された。特に乾そばでは小麦粉（国産）よりも陽性率と平均値が高か

った。今回調査を行っていない小麦加工品にも小麦由来と推定される STC が混入している可能性があり、日本人における STC のばく露量を算出するためには様々な小麦加工品を検査する必要性が考えられた。また、米においても STC が小麦粉と同等のレベルで検出された。ばく露量を算出する際には米も考慮に入れる必要があると考えられる。

E. 結論

小麦中に含まれる 3 種のタイプ A トリコテセン系化合物と BEA と ENs について、分析法の妥当性を確認するために多機関共同試験を行った。いずれの分析法についても回収率と HorRat 値はクライテリアを満たし、良好な結果が得られた。これら分析法はライ麦やハト麦、コーンフラワーなどの食品にも適用可能であることを添加回収試験によって確認した。タイプ A トリコテセン系化合物の汚染調査の結果、ライ麦粉とハト麦加工品で汚染レベルが高かった。BEA はハト麦加工品とコーンフラワーにおいて、ENs はライ麦粉と小麦粉（国産）において主に汚染が認められた。STC は小麦粉のみならず、クッキーなどの加工品においても汚染が認められた。次年度以降は海外で実施された調査結果を参考に、より対象を広げた調査を実施する。

F. 参考

- 1) World Health Organization. 2017. Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical Report Series, No. 1002:40-54.
- 2) Yoshinari T, et al. Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. Food Addit Contam Part A. 2019, 36(9):1404-1410.
- 3) European Food Safety Authority. 2014.

Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal*. 12(8):3802.

- 4) Yoshinari T., et al. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat flour and corn grits on the Japanese market, and their co-contamination with type B trichothecene mycotoxins. *Food Addit Contam Part A*. 2016, 33(10):1620-162.

表1 コラボラティブスタディの結果 (4,15-DAS)

	Spiked sample						LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	Blank		5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$			
1	ND	ND	5.1	5.4	51.4	51.7	0.005	0.02
2	ND	ND	4.9	5.0	48.6	49.8	0.04	0.1
3	ND	ND	4.7	4.7	47.7	46.5	0.003	0.009
4	ND	ND	5.3	5.3	52.2	52.3	0.002	0.006
5	ND	ND	5.1	5.2	51.1	52.3	0.004	0.01
6	ND	ND	5.6	5.6	55.6	53.4	0.02	0.07
7	ND	ND	5.3	4.8	54.4	53.5	0.02	0.08
8	ND	ND	5.0	5.2	46.3	45.8	0.1	0.3
Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	5.1	5.1	50.8	50.8		
Mean recovery (%)	-	-	102.9	102.9	101.6	101.6		
Repeatability relative SD [RSDr,%]	-	-	3.3	3.3	1.6	1.6		
Reproducibility relative SD [RSDR,%]	-	-	5.6	5.6	6.1	6.1		
HorRat	-	-	0.2	0.2	0.2	0.2		

表2 コラボラティブスタディの結果 (T-2 トキシン)

	Blank		Spiked sample				LOD	LOQ
			5 µg/kg		50 µg/kg		(µg/kg)	(µg/kg)
1	ND	ND	5.3	5.5	49.6	51.7	0.004	0.01
2	ND	ND	5.4	5.4	53.3	54.2	0.008	0.03
3	ND	ND	5.9	5.7	50.7	61.1	0.01	0.03
4	ND	ND	5.3	5.2	51.6	51.5	0.001	0.005
5	ND	ND	5.3	5.3	54.6	49.5	0.004	0.01
6	ND	ND	6.2	6.5	64.1	53.2	0.03	0.09
7	ND	ND	5.8	5.3	55.4	55.0	0.007	0.02
8	ND	ND	5.2	5.3	46.5	50.3	0.09	0.3
Mean (µg/kg)	-	-	5.5		53.3			
Mean recovery (%)	-	-	110.9		106.5			
Repeatability relative SD [RSDr,%]	-	-	3.0		7.7			
Reproducibility relative SD [RSDR,%]	-	-	7.1		8.2			
HorRat	-	-	0.2		0.3			

表3 コラボラティブスタディの結果 (HT-2 トキシン)

	Blank		Spiked sample				LOD	LOQ
			5 µg/kg		50 µg/kg		(µg/kg)	(µg/kg)
1	ND	ND	5.2	5.6	53.5	53.5	0.02	0.07
2	ND	ND	5.1	4.9	48.8	50.0	0.04	0.1
3	ND	ND	4.7	5.1	46.4	50.7	0.06	0.2
4	ND	ND	5.3	5.2	51.6	51.5	0.06	0.2
5	ND	ND	5.3	5.2	51.0	52.5	0.03	0.09
6	ND	ND	5.5	5.7	57.0	54.9	0.07	0.2
7	ND	ND	5.1	4.8	53.0	51.7	0.04	0.1
8	ND	ND	5.7	5.4	47.8	54.8	0.05	0.2
Mean (µg/kg)	-	-	5.2		51.8			
Mean recovery (%)	-	-	104.9		103.6			
Repeatability relative SD [RSDr,%]	-	-	3.5		4.3			
Reproducibility relative SD [RSDR,%]	-	-	5.3		5.3			
HorRat	-	-	0.2		0.2			

表4 コラボラティブスタディの結果 (BEA)

	Spiked sample								Naturally contaminated wheat				LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	Blank		25 $\mu\text{g}/\text{kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$		500 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Sample 1		Sample 2			
1	ND	ND	20.3	21.2	87.7	82.6	438.1	399.0	0.1	0.1	1.6	1.7	0.04	0.1
2	ND	ND	22.6	22.6	89.5	91.5	450.0	452.5	0.2	0.2	1.7	1.8	0.1	0.5
3	ND	ND	21.7	22.7	95.0	101.6	511.9	490.1	0.5	0.5	2.1	2.1	0.2	0.8
4	ND	ND	25.5	25.8	101.9	102.7	501.9	510.4	0.2	0.2	2.0	2.1	0.01	0.04
5	ND	ND	19.9	17.3	80.9	70.3	366.9	376.4	ND	ND	ND	ND	0.5	2
6	ND	ND	29.0	28.7	118.7	120.5	569.5	583.3	0.3	0.3	2.4	2.3	0.05	0.2
7	ND	ND	26.3	24.8	102.9	102.3	513.2	486.9	ND	ND	2.6	2.3	0.2	0.5
8	ND	ND	20.9	20.6	83.9	78.3	399.4	375.8	ND	ND	0.9	1.2	0.4	1
Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	23.1	-	94.4	-	464.1	-	-	-	-	-	-	-
Mean recovery (%)	-	-	92.4	-	94.4	-	92.8	-	-	-	-	-	-	-
Repeatability relative SD [RSDr,%]	-	-	3.7	-	4.0	-	3.2	-	-	-	-	-	-	-
Reproducibility relative SD [RSDR,%]	-	-	14.7	-	15.3	-	15.1	-	-	-	-	-	-	-
HorRat	-	-	0.5	-	0.7	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-

表5 コラボラティブスタディの結果 (ENA)

	Spiked sample								Naturally contaminated wheat				LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	Blank		25 $\mu\text{g}/\text{kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$		500 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Sample 1		Sample 2			
1	ND	ND	21.8	22.9	92.4	89.4	465.4	432.9	0.2	0.1	2.8	2.1	0.04	0.1
2	ND	ND	23.2	24.0	92.5	97.5	487.0	473.5	0.1	0.1	2.6	2.3	0.06	0.2
3	ND	ND	20.1	23.1	97.0	100.0	500.5	495.5	0.6	0.6	3.2	2.4	0.08	0.3
4	ND	ND	25.4	25.9	99.6	100.1	494.8	499.7	0.2	0.2	2.5	2.1	0.05	0.2
5	ND	ND	21.0	19.1	85.1	76.0	395.6	424.0	ND	ND	1.8	1.6	0.1	0.3
6	ND	ND	27.7	26.9	110.9	113.4	544.8	562.8	0.5	0.4	2.4	2.9	0.05	0.2
7	ND	ND	25.1	24.9	98.4	99.9	492.0	478.7	ND	ND	2.7	2.6	0.2	0.5
8	ND	ND	23.8	22.0	91.6	88.2	412.0	408.2	ND	ND	1.2	2.0	0.3	1
Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	23.6	-	95.7	-	473.0	-	-	-	2.3	-	-	-
Mean recovery (%)	-	-	94.2	-	95.7	-	94.6	-	-	-	-	-	-	-
Repeatability relative SD [RSDr,%]	-	-	4.5	-	3.1	-	2.7	-	-	-	16.5	-	-	-
Reproducibility relative SD [RSDR,%]	-	-	10.4	-	9.9	-	10.4	-	-	-	22.7	-	-	-
HorRat	-	-	0.4	-	0.4	-	0.6	-	-	-	0.6	-	-	-

表6 コラボラティブスタディの結果 (ENA1)

	Spiked sample								Naturally contaminated wheat				LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	Blank		25 $\mu\text{g}/\text{kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$		500 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Sample 1		Sample 2			
1	ND	ND	23.0	23.9	95.9	90.5	475.6	440.7	4.0	4.2	20.8	19.3	0.08	0.3
2	ND	ND	23.7	24.2	96.0	96.0	490.0	478.5	3.9	3.9	20.1	19.4	0.1	0.4
3	ND	ND	22.1	23.6	98.3	105.6	536.4	517.9	4.5	4.7	23.5	19.9	0.2	0.7
4	ND	ND	25.5	25.9	101.2	101.4	499.9	509.5	4.1	4.0	21.2	21.5	0.03	0.1
5	ND	ND	21.0	19.5	86.7	75.6	393.4	426.5	3.9	3.6	17.9	15.4	0.09	0.3
6	ND	ND	27.3	27.9	114.2	116.1	559.1	574.4	5.1	5.0	23.8	22.5	0.1	0.4
7	ND	ND	26.3	24.4	100.3	98.6	504.0	482.3	4.5	4.5	23.3	22.8	0.1	0.3
8	ND	ND	25.6	25.0	97.3	97.1	478.7	476.1	3.8	4.1	25.6	25.0	0.4	1
Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	24.3		98.2		490.2		4.2		21.4			
Mean recovery (%)	-	-	97.2		98.2		98.0		-		-			
Repeatability relative SD [RSDr,%]	-	-	3.3		3.7		3.1		2.9		5.7			
Reproducibility relative SD [RSDR,%]	-	-	9.4		10.0		9.7		10.8		12.9			
HorRat	-	-	0.3		0.4		0.5		0.3		0.5			

表7 コラボラティブスタディの結果 (ENB)

	Spiked sample								Naturally contaminated wheat				LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	Blank		25 $\mu\text{g}/\text{kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$		500 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Sample 1		Sample 2			
1	ND	ND	23.4	24.8	96.0	96.1	488.5	456.1	134.5	140.0	382.9	358.0	0.04	0.1
2	ND	ND	24.4	24.2	97.0	95.0	492.5	470.5	138.5	132.0	367.0	354.0	0.02	0.06
3	ND	ND	24.2	21.3	96.5	104.0	499.5	504.2	145.8	143.7	404.5	402.0	0.05	0.2
4	ND	ND	26.2	25.7	103.4	103.5	509.5	520.1	147.6	143.3	390.4	394.8	0.01	0.04
5	ND	ND	21.6	19.4	86.3	77.1	399.4	438.0	128.5	122.7	340.7	326.1	0.07	0.2
6	ND	ND	28.5	28.6	117.9	119.7	581.6	592.2	170.0	165.4	446.7	435.0	0.03	0.1
7	ND	ND	24.7	24.2	99.7	99.5	503.6	474.2	146.5	140.2	399.0	388.1	0.1	0.4
8	ND	ND	26.0	25.2	100.5	99.3	463.8	465.2	149.3	148.5	385.9	375.9	0.3	1
Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	24.5		99.5		491.2		143.5		384.4			
Mean recovery (%)	-	-	98.1		99.5		98.2		-		-			
Repeatability relative SD [RSDr,%]	-	-	4.1		3.1		3.3		2.4		2.4			
Reproducibility relative SD [RSDR,%]	-	-	10.1		10.5		10.1		8.7		8.4			
HorRat	-	-	0.4		0.5		0.6		0.4		0.5			

表 8 コラボラティブスタディの結果 (ENB1)

	Spiked sample								Naturally contaminated wheat				LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	Blank		25 $\mu\text{g}/\text{kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$		500 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Sample 1		Sample 2			
1	ND	ND	24.6	25.2	100.5	95.2	505.2	452.6	37.1	37.2	137.0	133.8	0.2	0.6
2	ND	ND	23.6	24.9	98.5	100.5	489.0	489.0	37.8	36.5	133.5	126.5	0.05	0.2
3	ND	ND	22.6	23.0	99.4	104.7	508.7	496.8	38.3	39.9	144.0	138.4	0.08	0.3
4	ND	ND	26.1	26.0	103.2	103.4	506.5	524.8	39.1	37.2	137.8	140.6	0.01	0.1
5	ND	ND	20.9	20.0	86.1	76.9	396.2	440.3	34.5	32.0	122.8	110.2	0.1	0.4
6	ND	ND	28.4	28.2	117.5	119.1	567.0	580.0	42.1	40.1	147.6	145.2	0.07	0.2
7	ND	ND	25.2	25.1	99.1	99.1	496.0	478.8	38.2	38.3	140.6	137.9	0.2	0.5
8	ND	ND	26.3	25.4	97.4	97.0	471.3	466.2	36.8	38.2	141.0	139.6	0.5	2
Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	24.7	-	99.8	-	491.8	-	37.7	-	136.0	-	-	-
Mean recovery (%)	-	-	98.8	-	99.8	-	98.4	-	-	-	-	-	-	-
Repeatability relative SD [RSDr,%]	-	-	2.1	-	3.0	-	3.8	-	2.9	-	3.0	-	-	-
Reproducibility relative SD [RSDR,%]	-	-	9.6	-	10.3	-	9.3	-	6.2	-	7.1	-	-	-
HorRat	-	-	0.3	-	0.5	-	0.5	-	0.2	-	0.3	-	-	-

表9 タイプA トリコテセン系化合物の添加回収試験の結果

	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%、平均値 \pm 標準偏差)		
		4,15-DAS	T-2 toxin	HT-2 toxin
ハト麦加工品	5	106.4 \pm 0.8	110.2 \pm 1.9	103.5 \pm 2.5
	50	109.5 \pm 2.4	107.5 \pm 1.8	104.7 \pm 9.0
ライ麦粉	5	105.4 \pm 2.0	109.3 \pm 3.2	113.3 \pm 4.3
	50	101.8 \pm 1.3	105.3 \pm 0.7	102.0 \pm 4.3
コーンフラワー	5	104.7 \pm 2.2	107.8 \pm 1.3	105.8 \pm 2.9
	50	101.6 \pm 0.9	101.7 \pm 3.0	99.9 \pm 3.1
ビール	5	103.8 \pm 0.6	91.4 \pm 1.1	101.7 \pm 5.7
	50	99.5 \pm 0.1	88.3 \pm 1.9	97.0 \pm 1.4

表 10 BEA と ENs の添加回収試験の結果

	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%、平均値 \pm 標準偏差)				
		BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1
ハト麦加工品	25	100.3 \pm 0.7	95.4 \pm 1.7	99.9 \pm 2.7	109.3 \pm 8.6	103.5 \pm 3.7
	100	90.2 \pm 1.9	84.3 \pm 0.7	90.9 \pm 1.3	95.7 \pm 1.6	94.6 \pm 1.6
ライ麦粉	100	102.1 \pm 1.1	99.9 \pm 2.3	101.8 \pm 3.0	102.5 \pm 1.2	104.3 \pm 3.4
	500	101.9 \pm 1.9	99.2 \pm 1.8	99.0 \pm 2.0	99.6 \pm 1.9	101.6 \pm 1.3
そば粉	25	89.0 \pm 1.6	87.7 \pm 1.8	83.3 \pm 1.7	95.5 \pm 3.7	93.1 \pm 3.5
	100	86.9 \pm 0.9	88.7 \pm 0.1	84.0 \pm 0.6	90.8 \pm 0.3	89.7 \pm 0.4
インスタントコーヒー	25	97.8 \pm 0.6	96.6 \pm 1.0	96.1 \pm 1.5	96.7 \pm 2.1	97.0 \pm 1.1
	100	98.6 \pm 4.4	95.0 \pm 2.2	95.6 \pm 1.7	96.7 \pm 1.9	97.1 \pm 1.3
コーンフラワー	25	98.5 \pm 5.7	97.9 \pm 3.3	98.2 \pm 3.2	99.3 \pm 2.8	100.4 \pm 2.6
	100	93.8 \pm 3.5	92.8 \pm 3.4	95.6 \pm 1.9	95.6 \pm 2.1	95.8 \pm 2.1
大麦加工品	25	105.9 \pm 4.1	102.9 \pm 6.8	101.6 \pm 3.9	99.7 \pm 5.7	101.0 \pm 6.3
	100	108.7 \pm 3.5	105.0 \pm 2.7	104.2 \pm 2.0	104.3 \pm 3.2	103.0 \pm 1.8
米	25	107.4 \pm 1.8	102.3 \pm 0.9	102.4 \pm 3.4	103.0 \pm 2.6	101.0 \pm 0.9
	100	105.6 \pm 0.9	101.0 \pm 1.6	101.2 \pm 1.1	100.7 \pm 0.9	99.2 \pm 0.8

表 11 STC の添加回収試験の結果

	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%、平均値 \pm 標準偏差)
乾そば	0.5	106.8 \pm 3.7
	5	101.2 \pm 1.2
クッキー	0.5	92.0 \pm 5.4
	5	90.7 \pm 5.5
パン粉	0.5	97.2 \pm 1.6
	5	95.5 \pm 3.8

表 12 タイプ A トリコテセン系化合物の汚染実態 (2019 年度)

	調査数	4,15-DAS			T-2 toxin			HT-2 toxin			合算値	
		陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)
ライ麦粉	29	0	-	-	86.2	1.9	12.1	86.2	0.4	2.8	2.3	14.9
ハト麦加工品	15	60.0	3.2	20.0	86.7	3.5	19.9	86.7	3.6	27.0	10.3	48.2
コーンフラワー	21	66.7	0.1	0.5	47.6	0.4	2.3	61.9	0.3	2.1	0.9	4.8
小麦粉 (国産)	29	6.9	0.01	0.2	6.9	0.2	5.4	31.0	0.09	0.7	0.3	6.1
小麦粉 (海外)	25	0	-	-	0	-	-	24.0	0.04	0.4	0.0	0.4
ビール	29	0	-	-	44.8	0.3	1.3	58.6	0.08	0.2	0.4	1.5

検出限界値 : 4,15-DAS 0.02 µg/kg, T-2 toxin 0.007 µg/kg, HT-2 toxin 0.09 µg/kg

定量限界値 : 4,15-DAS 0.06 µg/kg, T-2 toxin 0.02 µg/kg, HT-2 toxin 0.3 µg/kg

表 13 BEA と ENs の汚染実態 (2019 年度)

	調査数	BEA			ENA			ENA1		
		陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)
米	20	0	-	-	0	-	-	0	-	-
小麦粉(国産)	30	23	0.6	5	17	0.5	6	43	4	27
小麦粉(海外)	25	60	3	11	20	0.4	3	0	-	-
ハト麦加工品	15	80	22	128	0	-	-	0	-	-
ライ麦粉	30	10	2	34	30	9	4	73	251	88
コーヒー	30	0	-	-	0	-	-	0	-	-
コーンフラワー	21	76	6	20	0	-	-	0	-	-
大麦	20	5	0.1	1	0	-	-	10	0.1	2
そば粉	17	12	0.4	5	0	-	-	0	-	-

	調査数	ENB			ENB1		
		陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)
米	20	5	0.2	3	0	-	-
小麦粉(国産)	30	73	55	336	67	19	118
小麦粉(海外)	25	72	7	41	64	3	10
ハト麦加工品	15	0	-	-	0	-	-
ライ麦粉	30	93	68	2845	77	0.7	706
コーヒー	30	0	-	-	0	-	-
コーンフラワー	21	0	-	-	0	-	-
大麦	20	40	3	30	25	0.9	8
そば粉	17	0	-	-	0	-	-

検出限界値 :

BEA 0.1 µg/kg, ENA 0.1 µg/kg,
ENA1 0.4 µg/kg, ENB 0.2 µg/kg,
ENB1 0.3 µg/kg

定量限界値 :

BEA 0.4 µg/kg, ENA 0.4 µg/kg,
ENA1 1 µg/kg, ENB 0.6 µg/kg,
ENB1 1 µg/kg

表 14 STC の汚染実態 (2019 年度)

食品	調査数	陽性率 (%)	平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
米	20	45	0.1	0.7
小麦粉(国産)	29	31	0.07	1.3
小麦粉(海外)	25	8	0.005	0.07
乾そば	30	57	0.09	0.3
クッキー	20	20	0.02	0.2
パン粉	20	15	0.01	0.07

検出限界値 : 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$

定量限界値 : 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$

別添-1 各試料におけるタイプ A トリコテセン系化合物の汚染濃度
(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。)

2019 年度 ライ麦粉

サンプルID	原産地	4,15-DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HT-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	T-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	合算値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-ライ麦-1	不明	ND	1.9	0.3	2.3
31-ライ麦-2	不明	ND	2.6	0.4	3.0
31-ライ麦-3	ドイツ	ND	2.7	0.8	3.4
31-ライ麦-4	不明	ND	0.8	0.2	0.9
31-ライ麦-5	不明	ND	1.3	0.3	1.7
31-ライ麦-6	ドイツ	ND	1.3	0.2	1.5
31-ライ麦-7	ドイツ	ND	1.2	0.3	1.5
31-ライ麦-8	ドイツ	ND	1.8	0.5	2.3
31-ライ麦-9	不明	ND	1.6	0.3	1.9
31-ライ麦-10	アメリカ	ND	ND	ND	-
31-ライ麦-11	オーストラリア	ND	ND	ND	-
31-ライ麦-12	北海道	ND	12.1	2.8	14.9
31-ライ麦-13	ドイツ、カナダ主体	ND	0.5	0.1	0.6
31-ライ麦-14	ドイツ、カナダ主体	ND	2.5	0.4	3.0
31-ライ麦-15	フランス	ND	0.8	0.1	0.9
31-ライ麦-16	ドイツ、カナダ主体	ND	1.8	0.3	2.1
31-ライ麦-17	ドイツ	ND	ND	ND	-
31-ライ麦-18	不明	ND	3.2	0.4	3.7
31-ライ麦-19	滋賀県	ND	ND	ND	-
31-ライ麦-20	不明	ND	1.0	0.2	1.2
31-ライ麦-21	不明	ND	0.4	0.1	0.5
31-ライ麦-22	北海道	ND	11.3	2.6	13.9
31-ライ麦-23	ドイツ、カナダ主体	ND	0.5	0.2	0.7
31-ライ麦-24	ドイツ、カナダ主体	ND	0.5	0.1	0.6
31-ライ麦-25	フランス	ND	0.6	0.1	0.8
31-ライ麦-26	ドイツ、カナダ主体	ND	1.1	0.2	1.3
31-ライ麦-27	ドイツ	ND	0.4	0.1	0.5
31-ライ麦-28	ドイツ	ND	1.7	0.3	2.0
31-ライ麦-29	ドイツ	ND	1.2	0.2	1.4

2019年度 ハト麦加工品

サンプルID	原産地	4,15-DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HT-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	T-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	合算値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-ハト麦-1	国産	4.9	2.7	4.2	11.8
31-ハト麦-2	岩手県産	ND	9.3	6.0	15.2
31-ハト麦-3	国産	1.2	19.9	27.0	48.2
31-ハト麦-4	栃木県	ND	ND	ND	-
31-ハト麦-5	タイ産	6.2	ND	ND	6.2
31-ハト麦-6	富山県産	20.0	0.7	1.1	21.7
31-ハト麦-7	富山県産	1.8	3.7	5.9	11.4
31-ハト麦-8	富山県産	2.4	1.0	1.1	4.5
31-ハト麦-9	富山県産	10.0	0.7	0.9	11.6
31-ハト麦-10	富山県産	0.4	1.1	0.3	1.8
31-ハト麦-11	岩手県産	ND	2.4	1.3	3.6
31-ハト麦-12	岩手県産	ND	4.2	3.0	7.2
31-ハト麦-13	岩手県産	ND	4.4	1.5	5.9
31-ハト麦-14	栃木県	ND	1.6	2.1	3.7
31-ハト麦-15	富山県産	0.5	0.4	0.2	1.1

2019年度 コーンフラワー

サンプルID	原産国	4,15-DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HT-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	T-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	合算値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-コーンフラワー-1		0.2	0.7	0.6	1.5
31-コーンフラワー-2		0.1	ND	ND	0.1
31-コーンフラワー-3	アメリカ	ND	ND	ND	-
31-コーンフラワー-4	アメリカ	0.1	ND	ND	0.1
31-コーンフラワー-5	アメリカ	0.1	ND	0.1	0.2
31-コーンフラワー-6	中国	0.1	0.4	0.1	0.7
31-コーンフラワー-7	中国	0.4	1.2	0.9	2.5
31-コーンフラワー-8	中国	0.1	ND	ND	0.1
31-コーンフラワー-9	アメリカ	ND	ND	ND	-
31-コーンフラワー-10	アメリカ	ND	0.7	0.2	0.8
31-コーンフラワー-11	アメリカ	ND	ND	ND	-
31-コーンフラワー-12		0.1	0.7	0.7	1.5
31-コーンフラワー-13		0.1	0.5	0.5	1.1
31-コーンフラワー-14	アメリカ	0.3	2.0	0.7	3.0
31-コーンフラワー-15	アメリカ	<u>0.0</u>	0.4	0.2	0.6
31-コーンフラワー-16	アメリカ	0.1	<u>0.2</u>	0.5	0.8
31-コーンフラワー-17	アメリカ	ND	ND	0.1	0.1
31-コーンフラワー-18	アメリカ	ND	ND	ND	-
31-コーンフラワー-19		0.5	2.3	2.1	4.8
31-コーンフラワー-20	中国	0.1	ND	ND	0.1
31-コーンフラワー-21		0.1	0.5	0.5	1.1

2019年度 小麦粉（国産）

サンプルID	原産地	4,15-DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HT-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	T-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	合算値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-小麦粉(国産)-1	北海道	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-2	国内産	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-3	北海道	ND	ND	0.2	0.2
31-小麦粉(国産)-4	国内産	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-5	北海道	ND	ND	0.1	0.1
31-小麦粉(国産)-6	岐阜県	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-7	岩手県	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-8	国内産	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-9	群馬県	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-10	北海道	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-11	岩手県	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-12	岩手県	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-13	国内産	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-14	北海道	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-15	岩手県	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-16	岩手県	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-17	国内産	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-18	国内産	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-19	国内産	ND	ND	0.1	0.1
31-小麦粉(国産)-20	北海道	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-21	北海道	ND	ND	0.1	0.1
31-小麦粉(国産)-22	青森県	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-23	青森県	ND	ND	0.4	0.4
31-小麦粉(国産)-24	国内産	ND	ND	0.7	0.7
31-小麦粉(国産)-25	青森県	ND	ND	0.2	0.2
31-小麦粉(国産)-26	北海道	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-27	北海道	0.2	5.4	0.5	6.1
31-小麦粉(国産)-28	北海道	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(国産)-29	岩手県	0.2	1.6	0.5	2.3

2019年度 小麦粉（海外）

サンプルID	原産地	4,15-DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HT-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	T-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	合算値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-小麦粉(海外)-1	北米産	ND	ND	0.1	0.1
31-小麦粉(海外)-2	フランス	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-3	フランス	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-4	フランス	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-5	カナダ	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-6	カナダ	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-7	フランス	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-8	カナダ、アメリカ	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-9	北米産	ND	ND	0.4	0.4
31-小麦粉(海外)-10	アメリカ他	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-11	カナダ、アメリカ主体	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-12	カナダ、アメリカ主体	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-13	フランス	ND	ND	0.2	0.2
31-小麦粉(海外)-14	北米他	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-15	カナダ	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-16	カナダ	ND	ND	0.1	0.1
31-小麦粉(海外)-17	カナダ	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-18	カナダ主体	ND	ND	0.1	0.1
31-小麦粉(海外)-19	アメリカ	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-20	イタリア	ND	ND	0.1	0.1
31-小麦粉(海外)-21	不明	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-22	不明	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-23	不明	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-24	不明	ND	ND	ND	-
31-小麦粉(海外)-25	不明	ND	ND	ND	-

2019年度 ビール

サンプルID	4,15-DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HT-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	T-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	合算値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-ビール-1	ND	1.23	0.14	1.36
31-ビール-2	ND	ND	0.11	0.11
31-ビール-3	ND	ND	0.12	0.12
31-ビール-4	ND	1.27	0.19	1.46
31-ビール-5	ND	ND	ND	-
31-ビール-6	ND	0.85	0.13	0.98
31-ビール-7	ND	0.36	0.11	0.47
31-ビール-8	ND	0.69	0.12	0.81
31-ビール-9	ND	<u>0.30</u>	0.09	0.39
31-ビール-10	ND	ND	ND	-
31-ビール-11	ND	0.41	0.14	0.55
31-ビール-12	ND	<u>0.24</u>	ND	0.24
31-ビール-13	ND	ND	ND	-
31-ビール-14	ND	ND	ND	-
31-ビール-15	ND	ND	0.09	0.09
31-ビール-16	ND	0.42	0.12	0.54
31-ビール-17	ND	ND	ND	-
31-ビール-18	ND	<u>0.24</u>	0.12	0.36
31-ビール-19	ND	0.40	0.10	0.50
31-ビール-20	ND	<u>0.29</u>	0.12	0.41
31-ビール-21	ND	<u>0.23</u>	0.11	0.34
31-ビール-22	ND	ND	ND	-
31-ビール-23	ND	0.66	ND	0.66
31-ビール-24	ND	0.52	0.19	0.71
31-ビール-25	ND	0.63	0.19	0.83
31-ビール-26	ND	0.45	ND	0.45
31-ビール-27	ND	0.55	ND	0.55
31-ビール-28	ND	ND	ND	-
31-ビール-29	ND	ND	ND	-

別添-2 各試料における BEA と ENs の汚染濃度

2019 年度 米						
サンプルID	原産地	BEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-米-01	秋田県大潟村	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-02		ND	ND	ND	ND	ND
31-米-03	岩手県産	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-04	北海道空知	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-05	山形県庄内	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-06	岩手県	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-07	新潟県	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-08	福井県	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-09	青森県	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-10	宮城県登米市	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-11	北海道	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-12	新潟県魚沼市	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-13	北海道	ND	ND	ND	3.4	ND
31-米-14	山形県	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-15	福島県	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-16	千葉県	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-17	福島県	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-18	新潟県岩船	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-19	千葉県	ND	ND	ND	ND	ND
31-米-20	国内	ND	ND	ND	ND	ND

2019年度 小麦粉（国産）

サンプルID	原産地	BEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-小麦粉(国産)-1	北海道	ND	ND	3.0	47.1	14.8
31-小麦粉(国産)-2	国内産	ND	ND	ND	10.8	3.8
31-小麦粉(国産)-3	北海道	ND	ND	5.6	132.3	36.8
31-小麦粉(国産)-4	国内産	ND	ND	2.5	14.8	7.3
31-小麦粉(国産)-5	北海道	ND	ND	6.1	146.8	41.3
31-小麦粉(国産)-6	岐阜県	ND	ND	ND	ND	2.3
31-小麦粉(国産)-7	岩手県	ND	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(国産)-8	国内産	2.9	ND	ND	4.9	2.8
31-小麦粉(国産)-9	群馬県	ND	ND	ND	ND	2.1
31-小麦粉(国産)-10	北海道	ND	ND	3.5	80.7	21.5
31-小麦粉(国産)-11	岩手県	ND	ND	ND	2.9	ND
31-小麦粉(国産)-12	岩手県	1.8	ND	ND	3.2	2.5
31-小麦粉(国産)-13	国内産	ND	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(国産)-14	北海道	ND	ND	2.0	43.3	12.4
31-小麦粉(国産)-15	岩手県	ND	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(国産)-16	岩手県	ND	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(国産)-17	国内産	ND	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(国産)-18	国内産	ND	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(国産)-19	国内産	ND	ND	ND	6.9	3.4
31-小麦粉(国産)-20	北海道	ND	ND	ND	10.9	3.6
31-小麦粉(国産)-21	北海道	ND	ND	5.4	150.4	40.5
31-小麦粉(国産)-22	青森県	ND	ND	3.0	76.3	21.2
31-小麦粉(国産)-23	青森県	4.5	1.6	5.5	82.6	27.0
31-小麦粉(国産)-24	国内産	3.5	5.6	26.5	251.1	111.4
31-小麦粉(国産)-25	青森県	1.9	3.0	3.3	22.0	8.7
31-小麦粉(国産)-26	北海道	ND	ND	ND	9.2	ND
31-小麦粉(国産)-27	北海道	2.1	2.1	20.0	336.2	117.7
31-小麦粉(国産)-28	北海道	ND	ND	ND	14.7	ND
31-小麦粉(国産)-29	岩手県	ND	ND	ND	6.8	ND
31-小麦粉(国産)-30	国内産	2.7	3.9	20.1	190.6	81.2

2019年度 小麦粉 (海外)

サンプルID	原産地	BEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-小麦粉(海外)-1	北米産	2.6	2.4	ND	9.3	6.0
31-小麦粉(海外)-2	フランス	3.2	1.5	ND	3.6	3.2
31-小麦粉(海外)-3	フランス	2.1	ND	ND	6.4	2.7
31-小麦粉(海外)-4	フランス	2.1	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(海外)-5	カナダ	6.0	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(海外)-6	カナダ	11.3	ND	ND	4.3	ND
31-小麦粉(海外)-7	フランス	11.3	ND	ND	6.5	3.1
31-小麦粉(海外)-8	カナダ、アメリカ	9.6	1.8	ND	41.5	10.3
31-小麦粉(海外)-9	北米産	6.8	3.3	ND	9.9	8.2
31-小麦粉(海外)-10	アメリカ他	6.3	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(海外)-11	カナダ、アメリカ主体	3.5	ND	ND	12.3	3.7
31-小麦粉(海外)-12	カナダ、アメリカ主体	5.0	ND	ND	4.1	1.9
31-小麦粉(海外)-13	フランス	1.6	ND	ND	3.4	2.1
31-小麦粉(海外)-14	北米他	2.6	ND	ND	4.6	2.5
31-小麦粉(海外)-15	カナダ	ND	ND	ND	3.6	ND
31-小麦粉(海外)-16	カナダ	ND	ND	ND	5.9	2.5
31-小麦粉(海外)-17	カナダ	ND	ND	ND	7.7	3.1
31-小麦粉(海外)-18	カナダ主体	1.8	ND	ND	12.2	4.6
31-小麦粉(海外)-19	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(海外)-20	イタリア	ND	2.1	ND	21.5	9.2
31-小麦粉(海外)-21	不明	ND	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(海外)-22	不明	ND	ND	ND	5.2	2.6
31-小麦粉(海外)-23	不明	ND	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(海外)-24	不明	ND	ND	ND	ND	ND
31-小麦粉(海外)-25	不明	ND	ND	ND	14.6	5.0

2019年度 ハト麦加工品

サンプルID	原産地	BEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-ハト麦-1	国産	38.3	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-2	岩手県	7.1	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-3	国産	127.9	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-4	栃木県	15.5	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-5	タイ	4.5	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-6	富山県	22.5	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-7	富山県	4.5	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-8	富山県	12.7	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-9	富山県	52.7	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-10	富山県	ND	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-11	岩手県	ND	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-12	岩手県	1.6	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-13	岩手県	ND	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-14	栃木県	42.9	ND	ND	ND	ND
31-ハト麦-15	富山県	3.6	ND	ND	ND	ND

2019年度 インスタントコーヒー

サンプルID	原産地	BEA (µg/kg)	ENA (µg/kg)	ENA1 (µg/kg)	ENB (µg/kg)	ENB1 (µg/kg)
31-コーヒー-1	ブラジル、エクアドル他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-2	ブラジル、コロンビア他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-3	コロンビア	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-4	ジャマイカ、ブラジル他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-5	ベトナム、インドネシア他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-6	インドネシア、ベトナム他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-7	エチオピア、ブラジル他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-8	コロンビア、ベトナム他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-9	ブラジル、インドネシア他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-10	ベトナム、メキシコ他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-11	ジャマイカ、コロンビア他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-12	ブラジル、コロンビア、他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-13	インドネシア	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-14	ジャマイカ、ブラジル、他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-15	ブラジル	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-16	ベトナム	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-17	ブラジル、ベトナム、他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-18	ブラジル、コロンビア	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-19	メキシコ、インドネシア、他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-20	エクアドル	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-21	ベトナム、ブラジル	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-22	ブラジル	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-23	タンザニア、エルサルバドル、他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-24	ブラジル、コスタリカ、タンザニア	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-25	ブラジル、コスタリカ、他	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-26	ホンジュラス、ボリビア、ペルー、メキシコ	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-27	コロンビア	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-28	パプアニューギニア、ペルー、メキシコ	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-29	インドネシア	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーヒー-30	ブラジル	ND	ND	ND	ND	ND

2019年度 コーンフラワー

サンプルID	原産国	BEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-コーンフラワー-1		4.5	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-2		5.9	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-3	アメリカ	6.6	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-4	アメリカ	11.7	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-5	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-6	中国	2.8	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-7	中国	12.8	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-8	中国	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-9	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-10	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-11	アメリカ	3.7	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-12		4.1	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-13		9.5	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-14	アメリカ	17.5	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-15	アメリカ	6.7	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-16	アメリカ	6.6	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-17	アメリカ	2.2	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-18	アメリカ	4.9	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-19		19.7	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-20	中国	ND	ND	ND	ND	ND
31-コーンフラワー-21		7.0	ND	ND	ND	ND

2019年度 大麦

サンプルID	原産地	BEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-大麦-1	岩手県	ND	ND	ND	ND	ND
31-大麦-2	岩手県	ND	ND	ND	10.0	2.2
31-大麦-3	国内産	ND	ND	ND	<u>0.5</u>	ND
31-大麦-4	国内産	ND	ND	ND	ND	ND
31-大麦-5	国内産	ND	ND	1.1	4.2	2.9
31-大麦-6	岩手県	ND	ND	ND	ND	ND
31-大麦-7	国内産	ND	ND	ND	ND	ND
31-大麦-8	国内産	ND	ND	ND	1.4	ND
31-大麦-9	九州	ND	ND	ND	3.1	<u>0.8</u>
31-大麦-10	国内産	ND	ND	<u>0.9</u>	4.8	2.4
31-大麦-11	国内産	ND	ND	ND	ND	ND
31-大麦-12	アメリカ、カナダ	ND	ND	ND	ND	ND
31-大麦-13	アメリカ、カナダ	ND	ND	ND	ND	ND
31-大麦-14	ニュージーランド	ND	ND	<u>0.6</u>	4.8	1.9
31-大麦-15	岡山県美作市	ND	ND	ND	ND	ND
31-大麦-16	不明	ND	ND	ND	ND	ND
31-大麦-17	不明	ND	ND	ND	ND	ND
31-大麦-18	岩手県	1.5	ND	1.9	29.5	8.3
31-大麦-19	国内産	ND	ND	ND	0.7	ND
31-大麦-20	国内産	ND	ND	ND	ND	ND

2019年度 そば粉

サンプルID	原産地	BEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENA1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ENB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-そば粉-1	北海道	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-2	北海道	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-3		ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-4		ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-5	北海道	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-6	秋田県	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-7	長野県	5.1	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-8	北海道	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-9	国産	2.0	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-10	国産	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-11	国産	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-12	福島県	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-13	国産	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-14	国産	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-15		ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-16	北海道	ND	ND	ND	ND	ND
31-そば粉-17	国産	ND	ND	ND	ND	ND

別添-3 各試料における STC の汚染濃度

2019 年度 米			2019 年度 小麦粉 (国産)		
サンプルID	原産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	サンプルID	原産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-米-1	秋田県大潟村	0.2	31-小麦粉(国産)-1	北海道	ND
31-米-2		0.06	31-小麦粉(国産)-2	国内産	ND
31-米-3	岩手県	ND	31-小麦粉(国産)-3	北海道	ND
31-米-4	北海道空知	ND	31-小麦粉(国産)-4	国内産	ND
31-米-5	山形県庄内	ND	31-小麦粉(国産)-5	北海道	ND
31-米-6	岩手県	ND	31-小麦粉(国産)-6	岐阜県	ND
31-米-7	新潟県	ND	31-小麦粉(国産)-7	岩手県	ND
31-米-8	福井県	ND	31-小麦粉(国産)-8	国内産	<u>0.03</u>
31-米-9	青森県	ND	31-小麦粉(国産)-9	群馬県	ND
31-米-10	宮城県登米市	ND	31-小麦粉(国産)-10	北海道	0.06
31-米-11	北海道	ND	31-小麦粉(国産)-11	岩手県	ND
31-米-12	新潟県魚沼市	0.5	31-小麦粉(国産)-12	岩手県	0.1
31-米-13	北海道	ND	31-小麦粉(国産)-13	国内産	0.2
31-米-14	山形県	0.09	31-小麦粉(国産)-14	北海道	0.06
31-米-15	福島県	0.7	31-小麦粉(国産)-15	岩手県	ND
31-米-16	千葉県	0.2	31-小麦粉(国産)-16	岩手県	ND
31-米-17	福島県	0.7	31-小麦粉(国産)-17	国内産	ND
31-米-18	新潟県岩船	0.2	31-小麦粉(国産)-18	国内産	ND
31-米-19	千葉県	0.09	31-小麦粉(国産)-19	国内産	<u>0.03</u>
31-米-20	国内	ND	31-小麦粉(国産)-20	北海道	<u>0.02</u>
			31-小麦粉(国産)-21	北海道	ND
			31-小麦粉(国産)-22	青森県	ND
			31-小麦粉(国産)-23	青森県	0.1
			31-小麦粉(国産)-24	国内産	1.3
			31-小麦粉(国産)-25	青森県	0.05
			31-小麦粉(国産)-26	北海道	0.08
			31-小麦粉(国産)-27	北海道	<u>0.05</u>
			31-小麦粉(国産)-28	北海道	<u>0.03</u>
			31-小麦粉(国産)-29	岩手県	0.07

2019年度 小麦粉 (海外)

サンプルID	原産地	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-小麦粉(海外)-1	北米産	ND
31-小麦粉(海外)-2	フランス	ND
31-小麦粉(海外)-3	フランス	ND
31-小麦粉(海外)-4	フランス	ND
31-小麦粉(海外)-5	カナダ	ND
31-小麦粉(海外)-6	カナダ	ND
31-小麦粉(海外)-7	フランス	ND
31-小麦粉(海外)-8	カナダ、アメリカ	ND
31-小麦粉(海外)-9	北米産	ND
31-小麦粉(海外)-10	アメリカ他	ND
31-小麦粉(海外)-11	カナダ、アメリカ主体	ND
31-小麦粉(海外)-12	カナダ、アメリカ主体	ND
31-小麦粉(海外)-13	フランス	<u>0.02</u>
31-小麦粉(海外)-14	北米他	ND
31-小麦粉(海外)-15	カナダ	ND
31-小麦粉(海外)-16	カナダ	ND
31-小麦粉(海外)-17	カナダ	ND
31-小麦粉(海外)-18	カナダ主体	ND
31-小麦粉(海外)-19	アメリカ	ND
31-小麦粉(海外)-20	イタリア	ND
31-小麦粉(海外)-21	不明	ND
31-小麦粉(海外)-22	不明	0.07
31-小麦粉(海外)-23	不明	<u>0.04</u>
31-小麦粉(海外)-24	不明	<u>0.04</u>
31-小麦粉(海外)-25	不明	0.05

2019年度 乾そば

サンプルID	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-乾そば-1	0.2
31-乾そば-2	0.1
31-乾そば-3	ND
31-乾そば-4	0.06
31-乾そば-5	0.2
31-乾そば-6	<u>0.02</u>
31-乾そば-7	0.3
31-乾そば-8	0.1
31-乾そば-9	0.07
31-乾そば-10	0.04
31-乾そば-11	0.08
31-乾そば-12	<u>0.03</u>
31-乾そば-13	<u>0.03</u>
31-乾そば-14	<u>0.04</u>
31-乾そば-15	0.1
31-乾そば-16	0.1
31-乾そば-17	0.1
31-乾そば-18	0.2
31-乾そば-19	0.2
31-乾そば-20	<u>0.03</u>
31-乾そば-21	<u>0.04</u>
31-乾そば-22	0.3
31-乾そば-23	ND
31-乾そば-24	ND
31-乾そば-25	0.05
31-乾そば-26	ND
31-乾そば-27	<u>0.05</u>
31-乾そば-28	<u>0.02</u>
31-乾そば-29	0.2
31-乾そば-30	0.2

2019年度 クッキー

サンプルID	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-クッキー-1	0.06
31-クッキー-2	ND
31-クッキー-3	0.07
31-クッキー-4	ND
31-クッキー-5	ND
31-クッキー-6	ND
31-クッキー-7	<u>0.02</u>
31-クッキー-8	<u>0.02</u>
31-クッキー-9	0.08
31-クッキー-10	ND
31-クッキー-11	ND
31-クッキー-12	ND
31-クッキー-13	0.2
31-クッキー-14	<u>0.03</u>
31-クッキー-15	ND
31-クッキー-16	ND
31-クッキー-17	ND
31-クッキー-18	ND
31-クッキー-19	ND
31-クッキー-20	ND

2019年度 パン粉

サンプルID	STC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
31-パン粉-1	0.07
31-パン粉-2	0.05
31-パン粉-3	<u>0.03</u>
31-パン粉-4	0.07
31-パン粉-5	ND
31-パン粉-6	ND
31-パン粉-7	ND
31-パン粉-8	<u>0.02</u>
31-パン粉-9	<u>0.03</u>
31-パン粉-10	<u>0.02</u>
31-パン粉-11	ND
31-パン粉-12	ND
31-パン粉-13	ND
31-パン粉-14	ND
31-パン粉-15	<u>0.04</u>
31-パン粉-16	ND
31-パン粉-17	ND
31-パン粉-18	ND
31-パン粉-19	ND
31-パン粉-20	ND

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

ステリグマトシスチンの迅速簡易測定法の開発

研究分担者 小西良子 (麻布大学)

研究要旨

ステリグマトシスチン (STC) は 2016 年の JECFA においてリスク評価され、国際的にもその汚染は深刻に受け止めなければいけないマイコトキシンの一つである。アフラトキシンの前駆体であることから、健康被害として最も懸念されるのは発がん性である。STC は *Aspergillus nidulans*、*A. versicolor* などによって産生され、穀物や穀物加工品、ナッツ、コーヒー生豆、スパイス、ビール、チーズなどでの汚染が報告されている。しかし、現在のところ STC の汚染実態に関するデータは少ないため、今後基準値策定などのプロセスに発展する場合、STC の汚染実態の知見を増やすことが急務となっている。

STC の分析は LC-MS/MS 等の機器分析によって行われているが、コストや時間に加え高度な技術が必要なことから、食品や飼料等のスクリーニング等多検体を扱う検査には適していない。そこで、分担研究では迅速かつ低コストで行える方法として ELISA によるスクリーニング法を開発した。

ELISA は、抗原特異的抗体を固相化する直接的競合的方法を用いた。同時に ELISA 測定に適切な米からの STC 抽出の条件検討を 60, 70, 80, 90% メタノールを用いて行った。本研究で確立した方法を用いて、添加回収率を求めることで本測定法の妥当性の検討も行った。

抽出溶媒(メタノール)の濃度の違いによる玄米からの回収率は、60% メタノールで 14.0% , 70% メタノールで 77.5% , 80% メタノールで 88.0% , 90% メタノールで 95.9% であり、90% メタノールが最適であることが明らかとなった。開発した ELISA では 0.59~13.34 ng/ml の範囲の STC において良好な直線性が認められ、食品を対象とした応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

ステリグマトシスチン (Sterigmatocystin:STC)は *Aspergillus* 属の *A.versicolor*, *A.nidulans* などにより産生されるマイコトキシンであり、土壌、農作物、特に穀類に広く汚染している。世界的には、穀物、穀物加工品、ナッツ、コーヒー生豆、スパイス、チーズ等で検出されている¹⁾⁴⁾。

STC の構造は自然界で最も強力な発がん性を有するマイコトキシンであるアフラトキシン (Aflatoxin:AF) と構造的に類似しており (図 1)、肝障害、肝がんの発生のリスクがあるとされている。2016 年、FAO/WHO 食品添加物専門家会議 (JECFA) によるリスク評価が行われ、STC は遺伝毒性発がん性があると評価され、ラットを用いた動物試験に基づいた肝血管肉腫のベンチマークドーズレベル BMDL₁₀ は 160 µg/kg/day であった。同じくラットでの AflatoxinB₁ (AFB₁) の BMDL₁₀ は 170 ng/kg/day であることから、STC は AFB₁ の 1/1000 程度の発がん性を有すると考えられる⁵⁾。現在は国内外でヒトにおける中毒事例の報告はないが、国際がん研究機関 (IARC) は STC をグループ 2B (ヒトに対して発がんの可能性はある) に分類している。このような背景から、今後国内外での規格基準が定められる可能性があることから、STC の汚染状況における知見を増やすことが喫緊に求められている。そのため信頼性の高い分析法、スクリーニング法が求められており、これに応じて本研究では STC の ELISA を開発することとした。

STC の分析は通常、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS)、高速液体クロマ

トグラフィー (HPLC) 等の機器分析によって行われているが、迅速さにおいては充分ではなくスクリーニング方法としては、ELISA 法が適していると判断した。ELISA は主に 96 穴マイクロプレートを用いた分析方法のため、一度に多数の検体の処理が可能であり、かつ測定は数時間で終了する。また、使用する試薬の種類が少なく、かつ単純な操作のみで測定を行えるため、確実性が高く、コスト効率の良い手法であると言える。ELISA 法には、いろいろなバリエーションがあり、対象物質の分子量が大きい場合には直接法が用いられるが、カビ毒のような低分子を検出する場合には間接競合法および直接競合法が用いられることが多い。間接競合法では、プレートに STC-キャリアたんぱく質のコンジュゲートを固相化して、対象物質に対する特異抗体を測定サンプルと STC-キャリアたんぱく質とで競合させる手法である。一方直接競合法は、特異抗体を固相化し、測定サンプルと対象物質-酵素コンジュゲートを競合させる方法である。しかし、間接競合法は多量の STC-キャリアたんぱく質のコンジュゲートが必要となりコスト的にも高くなる可能性がある。また工程数が多いため、不確実性も高くなる。そこで本研究では、間接競合法より工程数の少ない直接競合 ELISA の開発を行った。

B. 研究方法

1-1. 材料

国産玄米 (2019 年産の国産玄米 5 種類) を STC 非汚染米として用いた。それぞれの玄米は、200 g 程度取り、粉砕機で 5~10 秒×4 回粉砕を行った。その後全体を 1 mm の目のふ

るいにか、混合し、4°Cで保存した。添加回収試験に使用する STC 非汚染米には、千葉県産ふさおとめを使用した。

1-2. 直接競合 ELISA

直接競合 ELISA のプロトコールを図 1 に示した。本方法は、特異抗体の結合効率を高めるために、あらかじめプレートに特異抗体のサブクラスに対する抗体を固相化しておき、特異抗体をさらに固相化し、測定サンプルと一定量の酵素標識抗原を競合的に抗体と結合させる手法である。特異抗体としては、STC とアフラトキシン (AF) の構造が類似していることから (図 2)、既に感度が良いことが報告されている抗 AF 特異モノクローナル抗体を用いた。

96 穴プレート (Nunc-Immuno™ Plate サーモフィッシャーサイエンティフィック社) の各ウェルにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈したマウス抗 IgG ヤギ抗体 (Thermo, CatNo:31160, 4 µg/mL) を 100 µL ずつ加え、4°Cで一晩静置することでコーティングを行った。抗体を除いた後、PBS に溶解した 0.4%ウシ血清アルブミン (BSA、和光純薬工業株式会社) を各ウェルに 300 µL ずつ加え、4°Cで一晩または室温で 1 時間静置することでブロッキングを行った。0.4%BSA を除いた後、各ウェルに PBS に溶解した 0.2%BSA で希釈したマウス抗 AF 抗体 (MoAb2-3、HORIBA、100 ng/mL) を 100 µL ずつ加え、室温で 1 時間静置した。静置後 PBS で希釈した 0.02% Tween 20 で 1 回洗浄を行った。STC 標準品 (MAKOR CHEMICALS LTD) を 10%メタノールで 10.7 pg/mL~500 ng/mL (7 段

階) に希釈し、サンプルとして用いた。希釈した標準品またはサンプルを AflatoxinB₁-Horse Radish Peroxidase conjugate (AFB₁-HRP、HORIBA) (最終濃度、2.5 µg/mL) と試験管で同量混合し、混合液を各ウェルに 100 µL ずつ加え 1 時間静置し競合反応させた。その後 0.02% Tween 20 in PBS で 3 回洗浄を行い、TMB Substrate Reagent (Thermo) を 100 µL ずつ加え、10 分間静置した。0.5N H₂SO₄ を 100 µL ずつ加え反応を止め、マイクロプレートリーダー (EL800 Universal Microplate Reader バイオテック株式会社) で 450 nm における吸光度を測定した。

1-3. マウス抗 AF 抗体 (MoAb2-3) 及び AFB₁-HRP の最適濃度の検討

固定化に用いるマウス抗 AF 抗体 (MoAb2-3) の濃度は 18.8 ng/mL~30 µg/mL、HRP の濃度は 62.5 pg/mL~500 ng/mL で希釈液を調製した。ELISA 法において、マイクロプレートの各ウェルで MoAb2-3 及び HRP の濃度が全て異なる組み合わせになるように加え、直接競合 ELISA を行った。

1-4. 抽出溶媒の最適濃度検討

抽出溶媒の最適濃度の検討のプロトコールを図 3 に示した。50 mL 遠沈管に、粉碎した STC 非汚染の玄米試料 (千葉県産ふさおとめ) 10 g を秤量し、STC 標準品 (10 µg/mL) 100 µL を添加し、最終濃度 10 µg/kg 添加試料とし、室温で 1 時間放置した。その後 60、70、80、90%メタノールを 20 mL、およびガラスビーズ 1 個を加え、振とう機で 30 分間強く振とう

した。320 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を抽出液とした。これを蒸留水で 9 倍希釈し、10%メタノールサンプル原液とした。

1-5. 妥当性評価法

1-5-1 添加回収試験

添加量は 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (最終サンプル濃度 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (最終サンプル濃度 3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) および 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (最終サンプル濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の 3 種類を作成した。50 mL 遠沈管に、粉碎した STC 非汚染の玄米試料 10 g を秤量し、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加サンプルには STC 標準品 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL 、3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加サンプルには STC 標準品 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 72 μL 、1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加サンプルには STC 標準品 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL を添加し、室温で 1 時間放置した。その後 90%メタノールを 20 mL およびガラスビーズ 1 個を加え、振とう機で 30 分間強く振とうした。320 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を抽出液とした。これを希釈し、10%メタノールサンプル原液とした。

1-5-2 検出限界量の算出

10.7 pg/mL ~500 ng/mL の間で 7 段階希釈した STC 標準液の吸光度から、標準曲線を作成し、直線性、検出限界量を算出した。

C. 研究結果

1. 直接競合 ELISA の確立

STC の ELISA は Yamasaki ら⁶⁾の方法を参考に構築した。STC 測定に最適な MoAb2-3 及び AFB₁-HRP の濃度はチェッカーボード滴定によって評価し、MoAb2-3 濃度は、100 ng/mL を、AFB₁-HRP については 5.0 ng/mL を最適

濃度とした (最終濃度 2.5 ng/mL)。

確立した ELISA の cut off 値は、STC に汚染されていない玄米 5 種類について ELISA を行い、その測定結果の平均+標準偏差値とした (表 1)。その結果 cut off 値は 0.59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となった。

2. 抽出溶媒の最適濃度検討

開発した ELISA を玄米サンプルに適用するにあたり、STC 抽出に最適な抽出溶媒の濃度を検討するため、STC 非汚染米を使用した添加回収試験を行った。抽出溶媒には 60、70、80、90%メタノールを使用した。図 4 に示した通り、各々の回収率はメタノール濃度 60% で 14.00 \pm 6.52%、メタノール濃度 70% で 77.47 \pm 14.47%、メタノール濃度 80% で 88.00 \pm 13.64%、メタノール濃度 90% で 95.93 \pm 18.21%であった。添加回収試験の回収率は 70~120%の範囲内であれば妥当であると評価されることから、メタノール濃度 70~90%は抽出に用いることができるが、中でも 90%メタノールは回収率が最も 100%に近く、抽出に最適であることが明らかとなった。この結果から、今後の玄米における添加回収試験には抽出溶媒は 90%メタノールを使用することとした。

3. 妥当性評価

3-1. 添加回収試験

STC 最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の添加回収試験の結果を表 2 に示した。玄米 10 g に対して添加濃度 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では 96.0 \pm 18.2%、添加濃度 3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では回収率 88.3 \pm 8.5%、添加濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では回収率 90.3 \pm 9.1%であった。いずれも 85%以上を示

し、1.0 µg/kg 以上の濃度で測定可能であることが明らかになった。

3-2. 検出限界の算出

STC の標準曲線 (図 5) から、直線性のある範囲は cut off 値を考慮に入れて 0.59~13.34 µg/kg とした。

D. 考察

STC の汚染実態は本研究でも調査を行っているが、いままでの報告から、国内では、Nomura ら⁷⁾が 2010~2015 年の日本市場においてトウモロコシから 1.2~6.4 µg/kg、大豆ミールから 0.63 µg/kg の STC を検出したことが報告している。なお、国内の穀類乾燥調製施設内には STC を産生するカビが広く存在している可能性があることを報告している⁸⁾ことから、国産米の実態調査が必要となるかもしれない。海外での汚染としては、1972 年にカナダの小麦で最大 300 µg/kg、1977 年にポーランドの動物飼料で 100 µg/kg、コーヒー豆で 12000 µg/kg、1982 年にインドのトウモロコシで 100 µg/kg、1994 年にエジプトの赤トウガラシを含むいくつかのスパイスで 18~23 µg/kg、2014~2015 年にイタリアの玄米で 1.32 µg/kg などが検出されている^{8,9)}。しかし実態調査数としては少ないため、迅速簡易かつ安価なスクリーニング法を確立することは、さらなる汚染実態の解明に急務である。

STC の化学的構造は、AF の構造に類似しており、どちらもビスフラン構造を持っている。この点に着目し、Sasaki らはマウス抗 AF 抗体 (MoAb2-3) が STC に交差反応性を示すことを報告した¹⁰⁾。

本研究で開発した STC 用 ELISA では、測定可能範囲は 0.59~13.34 ng/mL であった (IC₅₀ 2.3 ng/mL)。既に開発されている STC 用の ELISA として、Kong らは感度の高いモノクローナル抗体を用いて、穀類製品であるシリアルに含まれる STC の分析を行う間接競合 ELISA を報告している¹²⁾。また、直接競合 ELISA としては Oplatowska-Stachowiak らが米、トウモロコシ、及び小麦を対象とした ELISA を報告している¹¹⁾。これらの ELISA の IC₅₀ 値は 0.092-0.64 ng/mL であり、本研究で開発した ELISA の IC₅₀ 値はやや高い傾向にあったが、実態調査で検出されている汚染量をカバーするには十分であると考えられた。国産米では現在 AF の汚染は全く検出されていないので、本 ELISA は STC のスクリーニングに有効であると考えられるが、本研究で用いた特異抗体は抗 AF 抗体であることから、AF と STC の両方を検出できるため、両者が汚染している食品に対しては、STC のみの検出ができないという欠点もある。今後両者が汚染する食品を対象にする場合は、STC のみを検出できるモノクローナル抗体を作成し、本研究で構築した方法で STC 特異的 ELISA を開発することが望まれる。

次に食品からの STC 抽出法の検討を行った。米からの STC 抽出には、本研究で行われた成果の一つとしてアセトニトリルを使用した方法が妥当性確認されている¹³⁾。しかし、ELISA 法で使用する抗体は有機溶媒耐性が低く、アセトニトリル抽出液では反応が阻害されることから、本研究では使用したマウス抗 AF 抗体に対して耐性があるメタノールを抽出に使用す

ることとした。その結果 60~90%メタノールで抽出を行った結果、90%メタノールが最適で、100%近い抽出率を示すことが示された。Kongらは95%アセトニトリルで抽出後PSA固相カラムで前処理をしてELISAサンプルとして用いており、サンプルの準備にコストと時間がかかる¹²⁾。Oplatowska-Stachowiak¹⁾の抽出法は60%メタノールを用いていたが、国産玄米を用いた我々の研究結果においては低い抽出率であった。すなわち同じ米でも、その品種、精米度により抽出率が異なる可能性が示され、今後基準値を策定する場合には、対象となる食品に応じた抽出率を検討する必要がある。

E. 結論

本研究で開発したELISA法は、測定可能範囲は0.59~13.34 ng/mLであり、1.0 µg/kg以上では85%以上の回収率を示し、cut off値は0.59 µg/kgと、食品のスクリーニングには充分に対応できる方法であることが明らかになった。また、喫緊の課題である国産米への実態調査へ応用できるよう、国産玄米からの抽出条件を検討し、90%メタノールが最も抽出効率が良いことを見出した。

本ELISAは、LC-MS/MSやHPLCといった機器分析法と比較して低コストであり、かつ高度な技術を必要としないスクリーニング法として、応用する可能性が示唆された。

参考文献

1) Oplatowska-Stachowiak, M., Reiring, C., Sajic, N., Haasnoot, W., Brabet, C., Campbell, K., Elliott, C. T., Salden, M.: Development and in-house validation of

a rapid and simple to use ELISA for the detection and measurement of the mycotoxin sterigmatocystin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410, 3017–3023, 2018.

- 2) Zhao, Y., Wang, Q., Huang, J., Ma, L., Chen, Z., Wang, F.: Aflatoxin B1 and sterigmatocystin in wheat and wheat products from supermarkets in China. *Food additives & contaminants. Part B, Surveillance*. 11(1), 9-14, 2018
- 3) Díaz, Nietoa, CH., Granerob, AM., Zonb, M. A., Fernández, H.: Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food and Chemical Toxicology*. 118, 2018.
- 4) European Food Safety Authority (EFSA) : Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA Journal*. 11(6), 81, 2013, doi: 10.2903/j.efsa.2013.3254
- 5) JECFA: JECFA/83/SC- 1 - JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES Eighty-third meeting. (SUMMARY AND CONCLUSIONS).2016
- 6) Yamasaki, T., Miyake, S., Sato, N., Hirakawa, Y., Iwasa, S., Narita, H., Watanabe, T.: Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Analysis of Total Aflatoxins Based on Monoclonal Antibody Reactive with Aflatoxins B1, B2, G1 and G2. *Food Hygienic Society* . 59(5), 200-205, 2018

- 7) Nomura, M., Aoyama, K., Ishibashi, T.: Sterigmatocystin and aflatoxin B₁ contamination of corn, soybean meal, and formula feed in Japan. *Mycotoxin research*. 34(1), 21-27, 2018
- 8) 須永恭之, 漆山哲夫, 秋元京子, 朝倉健司, 山田友紀子: 米の乾燥調製施設真菌査と分離 *Aspergillus* のかび毒産生能 日本マイコトキシン学会第 76 回学術講演会要旨集.
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/papers_posters/pdf/76th_mt.pdf (2020.3.12 access)
- 9) Versilovskis, A., Saeger, SD.: Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods – An overview. *Molecular nutrition & food research*. 54, 136-147, 2010
- 10) Bertuzzi, T., Romani, M., Rastelli, S., Mulazzi, A., Pietri, A.: Sterigmatocystin Occurrence in Paddy and Processed Rice Produced in Italy in the Years 2014-2015 and Distribution in Milled Rice Fractions. *Toxins (Basel)*. 9(3),86, 2017
- 11) Sasaki, R., Hossain, MZ., Abe, N., Uchigashima, M., Goto, T.: Development of an analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using LCMS after immunoaffinity column purification. *Mycotoxin research*. 30(2), 123-129, 2014
- 12) Kong, D., Xie, Z., Liu, L., Song, S., Kuang, H., Cui, G., Xu, C.: Development of indirect competitive ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of sterigmatocystin in cereal products. *Food and Agricultural Immunology*. 28, 260-273, 2017
- 13) Yoshinari, T., Takeuchi, H., Kosugi, M., Taniguchi, M., Waki, M., Hashiguchi, S., Fujiyoshi, T., Shichinohe, Y., Nakajima, M., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y.: Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 36(9), 1404-1410, 2019,
- F. 健康危機情報
特になし
- G. 研究発表
1. 論文発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし

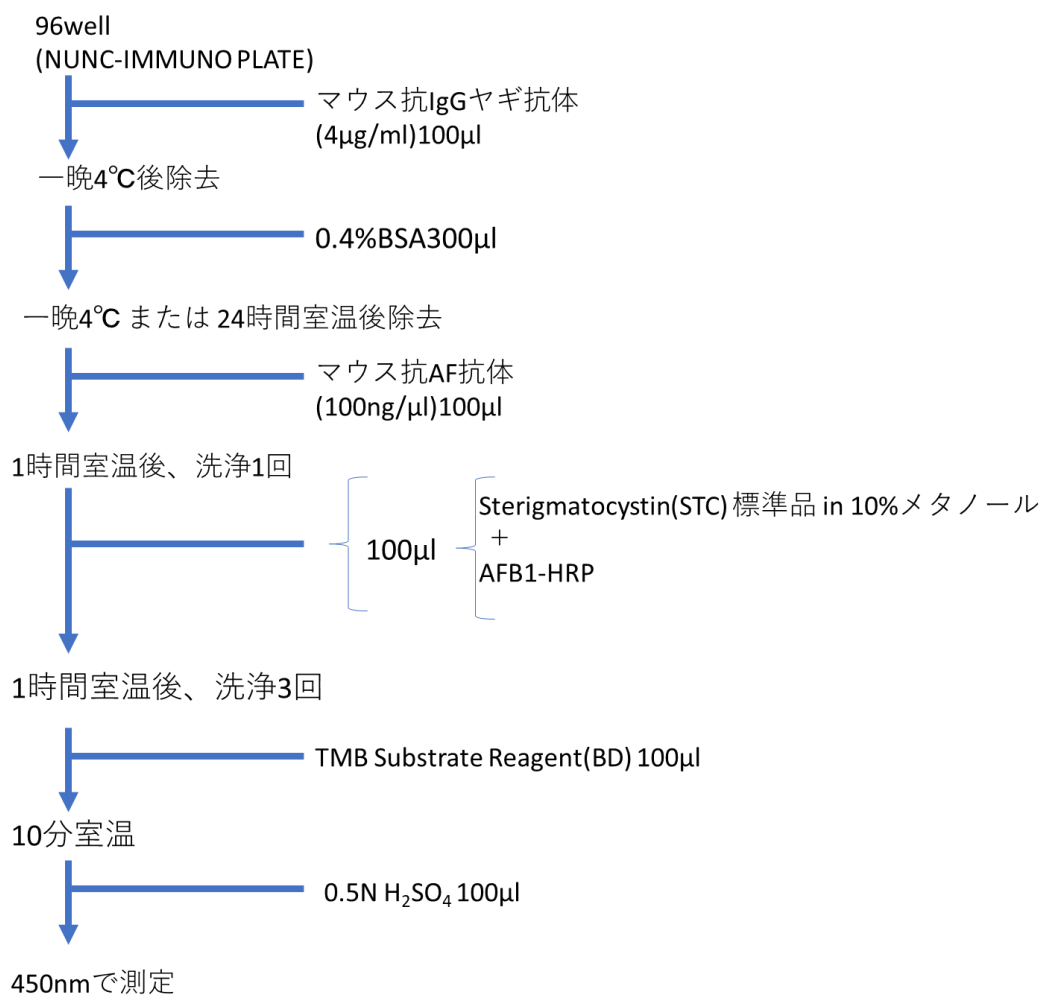


図1. 直接競合法 ELISA のプロトコール

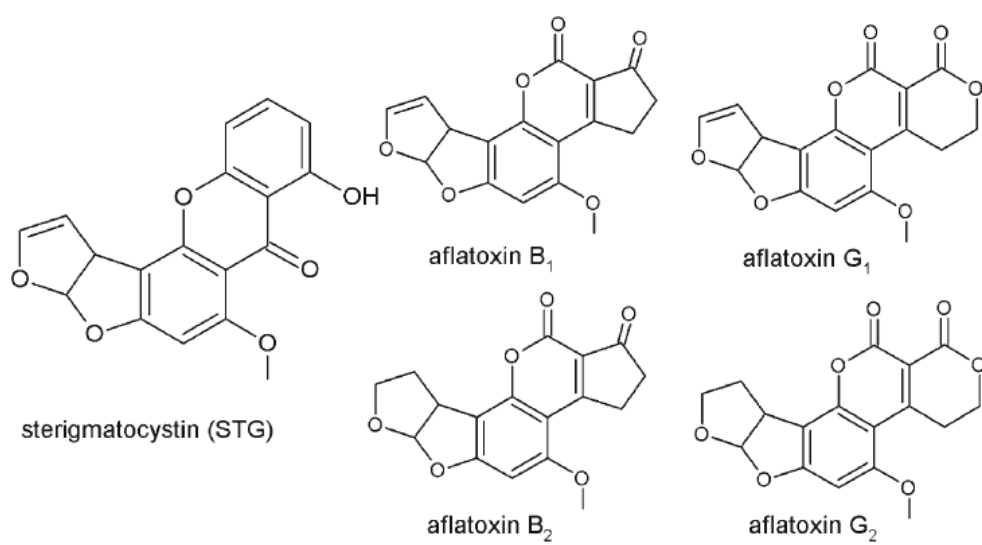


図2. ステリグマトシスチン及びアフラトキシンの構造

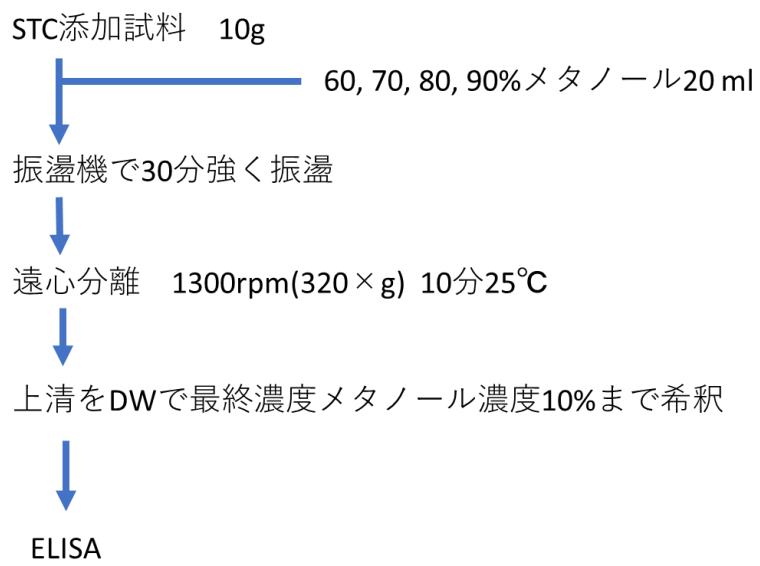


図3. 抽出溶媒の最適濃度検討のプロトコール

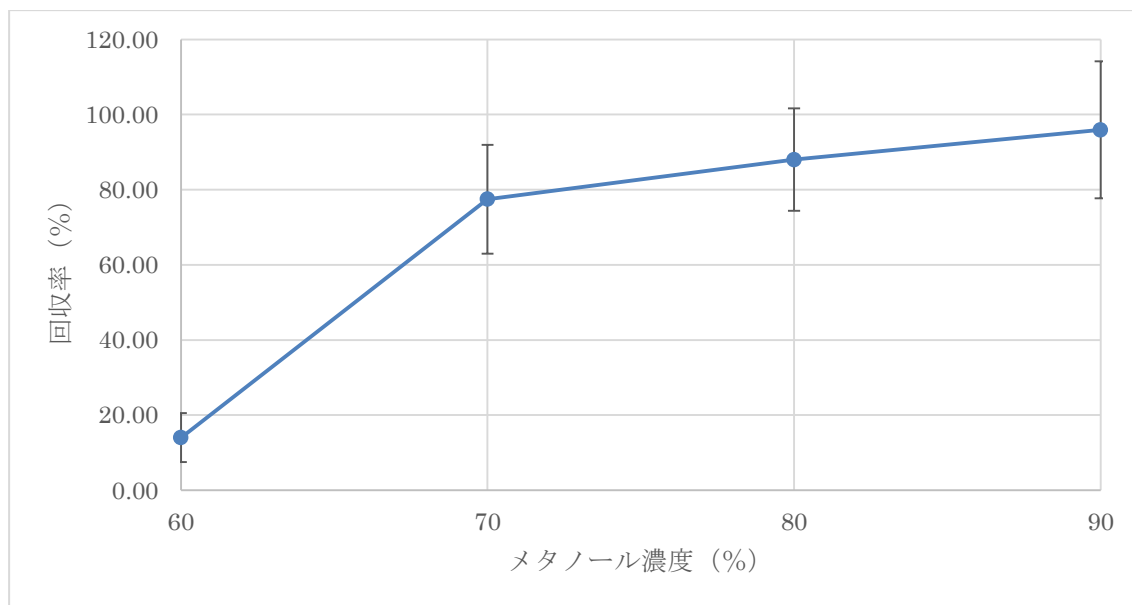


図4. 抽出溶媒の各濃度での回収率

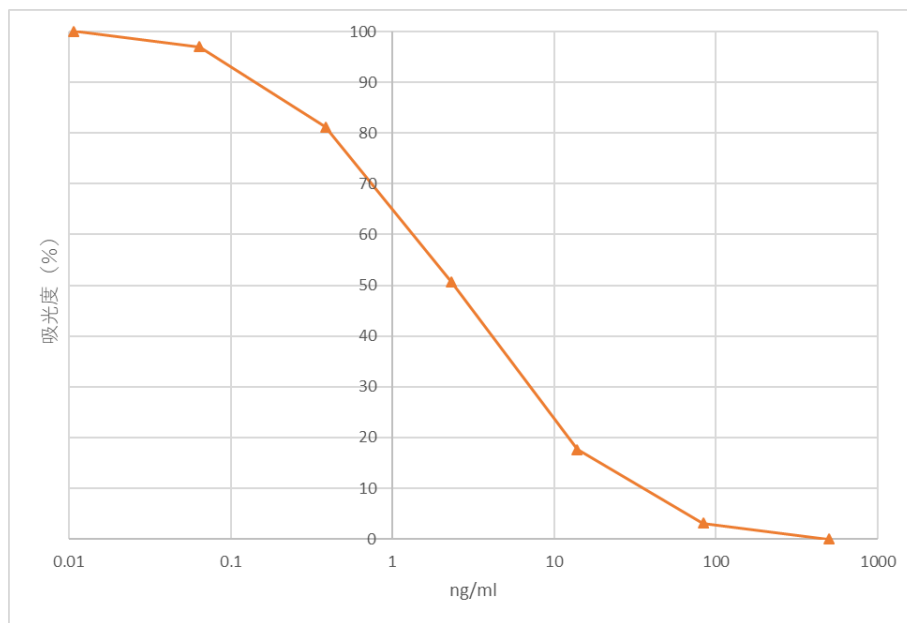


図 5. 直接競合法における STC の検量線

表1 STC 非汚染玄米の ELISA による測定値 (Cut off 値)

STC 非汚染玄米銘柄	濃度(ng/mL)	平均濃度	標準偏差	cut off 値
千葉県産ふさおとめ	0.387	0.447	0.143	0.590
新潟県産岩舟コシヒカリ	0.333			
茨城県産あきたこまち	0.723			
あきたこまち (国立衛生研保存)	0.443			
あきたこまち (産地不明)	0.350			

表 2. 添加回收試驗結果

添加濃度 (最終濃度 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	
	平均	標準偏差
10.0	96.0	18.2
3.6	88.3	8.5
1.0	90.3	9.1

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

毒性試験 (エンニアチンのマウス反復投与毒性試験)

研究分担者 渋谷 淳 (東京農工大学大学院)

研究要旨

日本国内流通食品に検出される新興カビ毒の安全性確保に関する研究の一端として、エンニアチン類についての毒性情報を得る為、エンニアチン類混合物のマウスを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。最高用量を 20 mg/kg、公比 5、溶媒対照群を含む 4 用量群を設定し、一般状態観察、体重、摂餌量測定、投与期間終了後の血液・血液化学検査、剖検、病理組織学検査を実施したが、高用量群の雌雄の摂餌量に若干の低値がみられたのみでその他の検査項目にエンニアチンの影響と考えられる変化は認められず、無毒性量を求めるに至る結果を得ることはできなかった。今後は過去に毒性評価報告のあるエンニアチン B 単体を用い、投与量等を再考し、28 日間反復経口投与毒性試験の再試験を実施する。

A. 研究目的

カビ毒はカビが感染した農作物中に生産され、カビ毒に汚染された食品により、急性的な中毒症状や慢性的な摂取によるがんの発症などが引き起こされている。これまで厚生労働科学研究において、2001年より様々なカビ毒について日本に流通する食品における汚染実態や毒性に関する研究を行い、カビ毒に汚染された食品の摂取の低減を目的とした施策策定の科学的根拠となるデータを取得し、食の安全性確保に貢献してきた。エンニアチン類(ENs)は新興カビ毒として近年関心が高まっており、欧州を中心に2000~2013年に1万試料を超える大規模な汚染実態調査が行われた。日本に流通する小麦粉を対象とした予備調査(Food Addit Contam Part A, 33, 1620-26, 2016)においては高濃度かつ高頻度でENsが検出されており、毒性や小麦以外の食品における汚染実態の情報の取得の必要性が高まっている。EFSAが公表した、マウスを用いたエンニアチンB(ENB)の42日間の反復投与試験(Maranghi et al., EFSA, 2018)では、公比10を設定し0.18, 1.8, 18 mg/kg/日の用量で強制経口投与試験を実施している。しかし、公比が大きかつ用量依存性の乏しいデータが多く、無毒性量を求めるためにはガイドラインに沿った一般毒性試験の実施が必要であると考えられる。そこで、ENsについて初年度にはマウスを用いた28日間反復経口投与試験、2年目以降に90日間反復経口投与試験を行いENsの無毒性量等、リスク評価に必要な毒性情報を取得する。

B. 研究方法

(1) 動物実験

動物実験は株式会社ボゾリサーチセンターに委託し実施した。5週齢の雌雄マウス(ICR [CrI:CD1 (ICR)])を日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センターより購入し、1週

間の馴化後実験に用いた。バリア動物室のプラスチックケージにて、12時間の明暗サイクル、室温 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 20\%$ の制御環境下で個別に飼育した。実験期間中は固形飼料CRF-1(γ 線滅菌：オリエンタル酵母工業株式会社)と水道水を自由摂取させた。

(2) エンニアチンのマウスを用いた28日間反復経口投与毒性試験

ENs混合物(ENB:エンニアチンB1(ENB1):エンニアチンA1(ENA1)=4:4:1)をDimethyl sulfoxide加コーン油で調製した被験液を0, 0.8, 4, 20 mg/kg体重の投与量でそれぞれ6週齢ICR [CrI:CD1 (ICR)]マウス(雌雄各10匹/群)に28日間反復経口投与した。群構成表をTable 1に示す。投与期間中は一般状態の観察及び体重、摂餌量の測定を実施した。投与期間終了後、剖検時に血液を採取し、血液学検査と血液化学検査を実施した。剖検では外表及び全ての器官、組織を詳細に観察した。所定の臓器を採取し重量測定後、固定し、パラフィン包埋した。死亡例については発見後速やかに剖検を実施したが採血及び臓器重量の測定は行わなかった。各臓器のヘマトキシリン・エオジン(H・E)染色標本作製し、鏡検した。

・一般状態の観察

投与期間中は投与前、投与直後及び1~3時間後の間に、剖検日は動物搬出前に1回実施した。全動物について、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察した。

・体重測定

投与期間中は投与1, 4及び7日、以降は7日ごとに毎週1回、剖検日は動物搬出前に実施した。全動物について07:00~12:30の間に測定した。剖検日には相対器官重量算出のため、体重(非絶食)を測定した。死亡・瀕死期剖検動

物については、搬出前に測定した。また、投与期間中の体重増加量（投与1日から投与28日）を算出した。

・摂餌量測定

投与1、4及び7日、以降は7日ごとに毎週1回実施した。全動物について07:00~12:30の間に給餌量/残餌量を測定した。投与開始日の測定は前日からの1日量、投与4及び7日は3日間の累積摂取量、その後は7日ごとに7日間の累積摂取量に基づいて、1匹当たりの1日摂餌量を算出した。

・血液学検査

計画剖検時に、全動物（非絶食）をイソフルラン麻酔下で開腹し、ヘパリンナトリウムで処理したシリンジを用いて後大静脈から全採血し、一部（約0.3 mL）をEDTA-2K加採血瓶（BDマイクロティナMAP：日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に採取した。得られた血液についてTable 2に記載した項目及び方法で検査した。

・血液化学検査

血液学検査用試料の採取後に残った血液（約0.4 mL）をヘパリン加試験管（キャピジェクトIIヘパリンリチウム：テルモ株式会社）に移し、遠心分離（3,100 rpm、1,690 ×g、12分間）し、得られた血漿についてTable 3に記載の項目及び方法により検査した。

・剖検、器官重量測定

全ての計画剖検動物について、採血後腹大動脈切断により放血致死させ、外表及び全ての器官/組織を詳細に観察した。死亡動物は、発見後速やかに剖検を行った。全ての計画剖検動物について、Table 4に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重

から体重100 g当たりの相対重量を算出した。両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価した。死亡動物の器官重量測定は行わなかった。

・病理組織学検査

全ての動物について、Table 4に示した対象器官/組織をリン酸緩衝10%ホルマリン液で固定した。ただし、眼球及び視神経はリン酸緩衝3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン液で固定、精巣及び精巣上体はブアン液で固定後、リン酸緩衝10%ホルマリン液で保存した。全ての動物の検査対象器官/組織についてパラフィン包埋し、H・E染色標本を作製した。作製した全てのH・E染色標本について鏡検を実施した。

・統計解析

計量データ（体重/体重増加量、摂餌量、血液学検査、血液化学検査及び器官重量）についてSAS Release 9.1.3（SAS Institute Inc.）を用いて溶媒対照群と各被験物質投与群との間で検定を行った。Bartlett検定で等分散性を確認した後、Dunnettの検定あるいはSteelの検定を行った。

・倫理面への配慮

動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和48年10月1日法律第105号）、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日環境省告示第88号）、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議、平成18年6月1日）に従い動物福祉に考慮し実施された。また、社内動物実験委員会の承認後、各標準操作手順書に則って適切に実施された。

C. 研究結果

・一般状態の観察

投与 22 日と 23 日に高用量群の雄 1 例（動物番号：4010）に自発運動の減少と皮膚の退色がみられた。同動物は投与 24 日に死亡した。

- ・体重測定

投与期間中の体重、体重増加量共にいずれの群にも有意な変化は認められなかった（Table 5）。

- ・摂餌量測定

雄では投与 4 日の中・高用量群、投与 14 日の高用量群に对照群と比較し低値がみられた。雌では投与 4、14、21 日の高用量群に对照群と比較し低値がみられた（Table 6）。

- ・血液学検査

いずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった（Table 7）。

- ・血液化学検査

いずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった（Table 8）。

- ・剖検（肉眼所見）

高用量群の雄死亡例（動物番号：4010）に、皮膚の蒼白化、全身諸臓器の退色、左腋窩部皮下の暗赤色巣（1カ所、25×20 mm）、左上腕部の暗赤色化がみられた。計画剖検では溶媒对照群の雌 1 例（動物番号：1102）に肝臓の一部暗調化がみられた（Table 9）。

- ・器官重量

中用量群の雌の脳絶対重量が对照群と比較し低値を示した。その他の臓器の絶対重量や相対重量に有意な変化は認められなかった（Table 10）。

- ・病理組織学検査

計画剖検例のいずれの群にも諸臓器に偶発性の変化がみられたが、被験物質の投与に起因すると考えられる変化はみられなかった（Table 11）。剖検時にみられた死亡例の左腋窩部皮下の暗赤色巣と左上腕部の暗赤色化は、病理組織学的に出血だった。また、出血による状態悪化が原因と考えられるリンパ系組織の萎縮が同動物に認められた。計画剖検時に溶媒对照群の雌 1 例にみられた肝臓の一部暗調化は病理組織学的に壊死であった。

D. 考察

ENB の 42 日間反復投与毒性試験 (Maranghi et al., EFSA, 2018) では、その影響と考えられる変化として雌に胸腺、子宮、脾臓の組織形態学的な変化、雄に十二指腸腸上皮細胞の空胞化や脳酸化ストレス量の増加が観察されており、その変化を以て本実験の投与量が設定された。しかし、本試験では被験物質の影響と考えられる変化として摂餌量の低値が認められたものの、病理組織学的検査をはじめとするその他の検査項目に被験物質の影響を示唆する明らかな変化は認められなかった。本試験は ENs の混合物 (ENB : ENB1 : ENA1 = 4 : 4 : 1) を用いており、投与期間の違いはあるものの被験物質の違いが結果に影響した可能性が示唆された。なお、投与期間中に死亡した高用量群の 1 例は剖検及び病理組織学検査の結果、上腕部からの出血が死因と考えられた。しかし、計画剖検では他の生存動物に出血性の変化を示す所見は認められず、当該動物の死因は被験物質投与に起因したものではなく、何らかの事故による上腕部の外傷によるものと考えられた。ENs の確かな毒性情報を得るには再試験が必要であると考えられ、今後は ENB 単体を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施する予定である。

E. 健康危機情報

特になし

Table 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
溶媒 対照群	0	0	5	雄 雌	10 10	1001~1010 1101~1110
低用量群	0.8	0.16	5	雄 雌	10 10	2001~2010 2101~2110
中用量群	4	0.8	5	雄 雌	10 10	3001~3010 3101~3110
高用量群	20	4	5	雄 雌	10 10	4001~4010 4101~4110

Table 2. 血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

検査項目	測定方法	単位
赤血球数 (RBC)	フローサイトメトリー法 ^{a)}	10 ⁴ (E4)/μL
ヘモグロビン濃度 (HGB)	シアンメトヘモグロビン変法 ^{a)}	g/dL
ヘマトクリット値 (HCT)	RBC 及び MCV から算出 ^{a)}	%
平均赤血球容積 (MCV)	フローサイトメトリー法 ^{a)}	fL
平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)	RBC 及び HGB から算出 ^{a)}	pg
平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)	HGB 及び HCT から算出 ^{a)}	g/dL
赤血球容積分布幅 (RDW)	赤血球容積ヒストグラムの標準偏差と MCV から算出 ^{a)}	%
網赤血球数 (Retic)	フローサイトメトリー法 ^{a)}	10 ⁹ (E9)/L
血小板数 (PLT)	フローサイトメトリー法 ^{a)}	10 ⁴ (E4)/μL
白血球数 (WBC)	フローサイトメトリー法 ^{a)}	10 ² (E2)/μL
白血球分類 ^注	フローサイトメトリー法 ^{a)}	10 ² (E2)/μL
使用測定機器		
^{a)} : 総合血液学検査装置 アドヴィア 120 又は 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.)		
注: リンパ球 (LYMP)、好中球 (NEUT)、好酸球 (EOS)、好塩基球 (BASO)、単球 (MONO) 及び大型非染色球 (LUC)		

Table 3. 血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

検査項目	測定方法	単位
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	UV-rate 法 ^{a)}	IU/L
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	UV-rate 法 ^{a)}	IU/L
乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)	UV-rate 法 ^{a)}	IU/L
アルカリホスファターゼ (ALP)	Bessey-Lowry 法 ^{a)}	IU/L
トリグリセライド (TG)	LPL-GK-GPO-POD 法 ^{a)}	mg/dL
グルコース (GLU)	グルコースデヒドロゲナーゼ法 ^{a)}	mg/dL
尿素窒素 (BUN)	Urease-LEDH 法 ^{a)}	mg/dL
クレアチニン (CRNN)	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-POD 法 ^{a)}	mg/dL
総タンパク質 (TP)	Biuret 法 ^{a)}	g/dL
アルブミン (ALB)	BCG 法 ^{a)}	g/dL
A/G 比 (A/G)	総タンパク質及びアルブミンから算出	
使用測定機器		
^{a)} : 臨床化学自動分析装置 TBA-120FR 形 (キャノンメディカルシステムズ株式会社)		

Table 4. 病理学検査対象器官/組織

組 織	H・E 標本作製	重量測定
大脳	√	√ (脳として)
小脳	√	
脊髄 (胸部)	√	
坐骨神経	√*	
眼球	√	
視神経	√	
ハーダー腺	√	
下垂体	√	
甲状腺	√	
上皮小体	√*#	
副腎	√	
胸腺	√	√
脾臓	√	√
顎下リンパ節	√*	
腸間膜リンパ節	√	
心臓	√	√
胸大動脈	√	
気管	√	
肺 (気管支を含む)	√	√
舌	√	
食道	√	
胃	√	
十二指腸	√	
空腸	√	
回腸 (パイエル板を含む)	√	
盲腸	√	
結腸	√	
直腸	√	
顎下腺	√	
舌下腺	√	
肝臓	√	√ (肝臓として)
胆嚢	√	
膵臓	√	
腎臓	√	√
膀胱	√	
精巣/卵巣	√/√	√/√
精巣上体/子宮	√/√	√/√
前立腺/膣	√/√	
精嚢 (凝固腺を含む)	√	
乳腺 (鼠径部、雌のみ)	√*	
胸骨 (骨髄を含む)	√	
大腿骨 (膝関節及び骨髄を含む)	√*	
大腿部骨格筋	√*	

組 織	H・E 標本作製	重量測定
皮膚（鼠径部）	√*	
肉眼的異常部位	√	
喉頭		（保存のみ）
鼻腔		（保存のみ）
個体識別部（耳標を装着した耳介）		（保存のみ）

各項目該当ある場合は√で示す。

*：両側を摘出し、片側を標本作製する（他の両側性器官は両側を鏡検）。

#：上皮小体は微小な器官であるため両側の標本作製を試みる。各群 80%以上の動物で片側（左を優先）の鏡検が可能と判断される場合、標本の再作製は行わない。

Table 5. 体重測定

		Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
		0 (control)	0.8	4	20
Males					
	No. of animals examined	10	10	10	10 (9 ^b)
Body weight (g)	Day 1	32.2 ± 1.5 ^a	31.6 ± 1.3	31.9 ± 1.3	31.3 ± 1.0
	Day 4	32.6 ± 1.7	32.1 ± 1.2	32.2 ± 1.4	32.1 ± 1.0
	Day 7	32.8 ± 1.5	32.5 ± 1.2	32.3 ± 1.3	32.6 ± 1.2
	Day 14	34.2 ± 1.5	33.8 ± 1.2	33.8 ± 1.5	34.1 ± 1.1
	Day 21	35.1 ± 1.6	34.8 ± 1.2	34.7 ± 1.3	35.5 ± 1.5
	Day 28	36.2 ± 1.7	35.7 ± 1.2	35.9 ± 1.7	36.1 ± 1.8 ^b
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)	Day 1	23.7 ± 1.0	23.6 ± 1.2	23.9 ± 1.2	23.3 ± 1.1
	Day 4	24.3 ± 1.3	24.0 ± 1.3	24.3 ± 1.1	23.9 ± 1.0
	Day 7	24.2 ± 1.2	24.6 ± 1.2	24.6 ± 0.8	23.9 ± 1.3
	Day 14	25.8 ± 1.1	25.6 ± 1.6	25.8 ± 1.2	25.5 ± 1.5
	Day 21	26.4 ± 0.9	27.0 ± 1.5	26.7 ± 1.2	26.3 ± 1.4
	Day 28	27.4 ± 1.1	27.8 ± 1.5	27.4 ± 1.2	27.2 ± 1.6

^a Mean ± SD.

^b One animal (animal No. 4010) was found dead on the 24th day of administration, so 9 animals were examined.

Table 6. 摂餌量測定

		Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
		0 (control)	0.8	4	20
Males					
	No. of animals examined	10	10	10	10 (9 ^b)
Food consumption (g/animal/day)	Day 1	5.6 ± 0.4 ^a	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.4	5.2 ± 0.6
	Day 4	5.0 ± 0.5	4.7 ± 0.3	4.6 ± 0.3 [*]	4.5 ± 0.5 [*]
	Day 7	4.9 ± 0.4	5.0 ± 1.0	4.6 ± 0.2	4.4 ± 0.5
	Day 14	4.8 ± 0.4	4.9 ± 0.9	4.6 ± 0.3	4.4 ± 0.2 [*]
	Day 21	4.8 ± 0.8	5.3 ± 2.8	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.5
	Day 28	5.0 ± 0.6	5.8 ± 3.5	4.9 ± 1.1	4.5 ± 0.3
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Food consumption (g/animal/day)	Day 1	4.7 ± 0.6	4.6 ± 0.7	5.0 ± 0.6	4.6 ± 0.8
	Day 4	4.5 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.3 ± 0.8	3.8 ± 0.5 [*]
	Day 7	4.5 ± 0.7	4.7 ± 0.5	4.6 ± 0.8	3.8 ± 0.5
	Day 14	4.6 ± 0.3	4.9 ± 0.7	4.5 ± 0.5	4.0 ± 0.3 ^{**}
	Day 21	4.7 ± 0.4	4.9 ± 0.6	4.6 ± 0.4	4.2 ± 0.3 [*]
	Day 28	4.7 ± 0.2	4.8 ± 0.4	4.6 ± 0.4	4.3 ± 0.4

^a Mean ± SD.

^b One animal (animal No. 4010) was found dead on the 24th day of administration, so 9 animals were examined.

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, significantly different from control group (Dunnett's test, two-side).

Table 7. 血液学検査

		Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
		0 (control)	0.8	4	20
Males					
	No. of animals examined	10	10	10	9
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)		927 \pm 61 ^a	929 \pm 67	924 \pm 53	918 \pm 45
Hemoglobin (g/dL)		13.8 \pm 0.6	14.0 \pm 0.9	13.9 \pm 0.5	13.7 \pm 0.6
Hematocrit (%)		46.1 \pm 1.5	46.8 \pm 2.9	46.7 \pm 1.9	45.8 \pm 2.2
MCV (fL)		49.8 \pm 2.2	50.4 \pm 1.2	50.6 \pm 1.5	50.0 \pm 1.5
MCH (pg)		14.9 \pm 0.7	15.1 \pm 0.5	15.1 \pm 0.4	14.9 \pm 0.4
MCHC (g/dL)		30.0 \pm 0.5	29.9 \pm 0.6	29.9 \pm 0.5	29.9 \pm 0.3
RDW (%)		12.4 \pm 0.5	12.5 \pm 0.7	12.4 \pm 0.5	12.1 \pm 0.3
Reticulocyte ($10^9/\text{L}$)		337.6 \pm 42.3	331.4 \pm 43.6	319.6 \pm 27.1	312.9 \pm 29.4
Platelets ($10^4/\mu\text{L}$)		124.6 \pm 9.7	117.5 \pm 13.0	121.3 \pm 12.4	121.8 \pm 13.0
WBC ($10^2/\mu\text{L}$)		54.0 \pm 18.5	59.2 \pm 18.5	50.5 \pm 18.0	53.9 \pm 15.5
Differential leukocyte counts ($10^2/\mu\text{L}$)					
Eosinophils		1.3 \pm 0.3	1.5 \pm 0.4	1.1 \pm 0.4	1.4 \pm 0.5
Neutrophils		10.7 \pm 5.3	11.4 \pm 4.3	8.1 \pm 4.1	10.7 \pm 5.2
Lymphocytes		40.7 \pm 17.6	44.7 \pm 14.7	40.2 \pm 14.3	40.6 \pm 11.1
Basophils		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1
Monocytes		0.9 \pm 0.4	1.2 \pm 0.5	0.8 \pm 0.3	0.8 \pm 0.4
Large unstained cells		0.3 \pm 0.3	0.5 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)		919 \pm 45	892 \pm 40	893 \pm 33	903 \pm 52
Hemoglobin (g/dL)		14.1 \pm 0.6	14.0 \pm 0.6	13.7 \pm 0.5	14.0 \pm 0.7
Hematocrit (%)		47.1 \pm 1.5	46.7 \pm 1.9	46.1 \pm 1.5	46.2 \pm 2.2
MCV (fL)		51.4 \pm 1.4	52.4 \pm 1.2	51.7 \pm 1.1	51.3 \pm 1.9
MCH (pg)		15.4 \pm 0.5	15.7 \pm 0.3	15.3 \pm 0.3	15.5 \pm 0.5
MCHC (g/dL)		29.9 \pm 0.7	30.0 \pm 0.5	29.7 \pm 0.5	30.3 \pm 0.4
RDW (%)		13.0 \pm 0.5	13.3 \pm 0.5	13.3 \pm 0.6	13.0 \pm 0.5
Reticulocyte ($10^9/\text{L}$)		309.8 \pm 50.2	346.6 \pm 82.6	338.3 \pm 38.3	324.7 \pm 54.0
Platelets ($10^4/\mu\text{L}$)		113.8 \pm 15.8	110.4 \pm 9.3	113.1 \pm 12.4	107.8 \pm 13.2
WBC ($10^2/\mu\text{L}$)		49.3 \pm 20.9	46.3 \pm 18.5	43.6 \pm 18.1	45.3 \pm 15.7
Differential leukocyte counts ($10^2/\mu\text{L}$)					
Eosinophils		1.2 \pm 0.5	1.4 \pm 0.5	1.0 \pm 0.5	1.4 \pm 0.7
Neutrophils		8.2 \pm 4.4	7.3 \pm 4.1	7.0 \pm 2.8	9.9 \pm 9.7
Lymphocytes		38.9 \pm 16.5	36.5 \pm 15.4	34.7 \pm 15.6	33.3 \pm 11.9
Basophils		0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1
Monocytes		0.6 \pm 0.4	0.7 \pm 0.6	0.5 \pm 0.3	0.5 \pm 0.4
Large unstained cells		0.3 \pm 0.2	0.4 \pm 0.3	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1

^a Mean \pm SD.

Table 8. 血液化学検査

	Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
	0 (control)	0.8	4	20
Males				
No. of animals examined	10	10	10	9
TP (g/dL)	5.0 ± 0.2 ^a	4.9 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.1 ± 0.2
Alb (g/dL)	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1
A/G ratio	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2
AST (IU/L)	44 ± 7	39 ± 5	42 ± 6	39 ± 3
ALT (IU/L)	30 ± 7	30 ± 7	32 ± 13	29 ± 6
LDH (IU/L)	190 ± 65	175 ± 48	181 ± 38	200 ± 63
ALP (IU/L)	227 ± 69	249 ± 84	238 ± 71	213 ± 45
TG (mg/dL)	85 ± 32	104 ± 42	87 ± 28	88 ± 22
Glucose (mg/dL)	211 ± 20	194 ± 17	210 ± 21	198 ± 14
BUN (mg/dL)	22 ± 3	24 ± 3	24 ± 4	25 ± 4
CRN (mg/dL)	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.03
Females				
No. of animals examined	10	10	10	10
TP (g/dL)	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.4
Alb (g/dL)	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.2
A/G ratio	2.7 ± 0.3	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.2
AST (IU/L)	54 ± 9	51 ± 7	47 ± 6	53 ± 11
ALT (IU/L)	29 ± 7	26 ± 6	25 ± 6	30 ± 7
LDH (IU/L)	180 ± 51	188 ± 60	179 ± 43	168 ± 42
ALP (IU/L)	352 ± 75	302 ± 79	310 ± 78	317 ± 51
TG (mg/dL)	68 ± 25	87 ± 22	68 ± 32	67 ± 35
Glucose (mg/dL)	174 ± 12	179 ± 12	182 ± 19	174 ± 18
BUN (mg/dL)	24 ± 4	23 ± 5	22 ± 4	22 ± 5
CRN (mg/dL)	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.02

^a Mean ± SD.

Table 9. 剖検（肉眼所見）

	Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
	0 (control)	0.8	4	20
Male (Found dead)				
No. of animals examined	0	0	0	1
Whole animal				
Discoloration, pale, skin	0 ^a	0	0	1
Discoloration, pale, all tissue	0	0	0	1
Skin				
Focus, dark red, subcutaneous	0	0	0	1
Arm				
Discoloration, dark red	0	0	0	1
Males (End of administration)				
No. of animals examined	10	10	10	9
All tissues				
Not remarkable	10	10	10	9
Females (End of administration)				
No. of animals examined	10	10	10	10
All tissues				
Not remarkable	9	10	10	10
Liver				
Discoloration, dark, partial	1	10	10	10

^aThe number of animals with lesions.

Table 10. 器官重量

		Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
		0 (control)	0.8	4	20
Males					
	No. of animals examined	10	10	10	9
Body weight	(g)	36.5 ± 1.6 ^a	36.0 ± 1.3	36.2 ± 1.3	36.4 ± 1.7
Brain	(mg)	496 ± 21	494 ± 18	494 ± 15	493 ± 32
	(mg/100g)	1360 ± 86	1373 ± 50	1365 ± 41	1356 ± 69
Thymus	(mg)	45 ± 10	41 ± 6	41 ± 7	45 ± 11
	(mg/100g)	122 ± 26	115 ± 17	113 ± 15	123 ± 33
Heart	(mg)	165 ± 12	163 ± 8	160 ± 10	164 ± 20
	(mg/100g)	451 ± 28	453 ± 16	443 ± 25	452 ± 48
Lung	(mg)	192 ± 10	194 ± 10	197 ± 10	200 ± 6
	(mg/100g)	527 ± 27	539 ± 24	545 ± 31	551 ± 24
Liver	(g)	2.05 ± 0.16	2.09 ± 0.11	2.06 ± 0.12	2.14 ± 0.15
	(g/100g)	5.6 ± 0.28	5.81 ± 0.22	5.69 ± 0.35	5.88 ± 0.26
Spleen	(mg)	94 ± 22	97 ± 15	98 ± 12	96 ± 12
	(mg/100g)	257 ± 52	268 ± 40	272 ± 36	265 ± 31
Kidneys	(mg)	522 ± 66	530 ± 42	513 ± 28	556 ± 29
	(mg/100g)	1426 ± 145	1471 ± 81	1419 ± 89	1529 ± 77
Testes	(mg)	262 ± 30	233 ± 24	280 ± 25	245 ± 42
	(mg/100g)	719 ± 97	646 ± 68	774 ± 68	675 ± 119
Epididymides	(mg)	92 ± 8	97 ± 8	95 ± 6	93 ± 12
	(mg/100g)	252 ± 20	270 ± 17	264 ± 16	257 ± 35
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight	(g)	27.5 ± 1.0	27.8 ± 1.7	27.2 ± 1.5	26.7 ± 1.8
Brain	(mg)	489 ± 17	487 ± 18	469 ± 15 [*]	484 ± 20
	(mg/100g)	1779 ± 52	1754 ± 105	1733 ± 118	1819 ± 116
Thymus	(mg)	53 ± 10	51 ± 15	52 ± 13	51 ± 8
	(mg/100g)	192 ± 37	184 ± 50	192 ± 46	193 ± 42
Heart	(mg)	137 ± 15	137 ± 15	133 ± 9	132 ± 6
	(mg/100g)	497 ± 42	491 ± 38	489 ± 37	496 ± 45
Lung	(mg)	170 ± 6	172 ± 9	169 ± 8	167 ± 12
	(mg/100g)	618 ± 29	617 ± 36	624 ± 44	628 ± 50
Liver	(g)	1.51 ± 0.10	1.55 ± 0.17	1.47 ± 0.11	1.43 ± 0.17
	(g/100g)	5.5 ± 0.29	5.55 ± 0.37	5.42 ± 0.25	5.33 ± 0.36
Spleen	(mg)	101 ± 9	104 ± 19	95 ± 15	98 ± 18
	(mg/100g)	366 ± 25	376 ± 73	351 ± 60	369 ± 68
Kidneys	(mg)	351 ± 29	371 ± 31	342 ± 27	337 ± 21
	(mg/100g)	1277 ± 96	1333 ± 107	1262 ± 121	1262 ± 53
Ovaries	(mg)	12.9 ± 3.6	13.7 ± 1.9	12.0 ± 5.6	11.7 ± 3.1
	(mg/100g)	46.6 ± 12.4	49.3 ± 5.8	44.1 ± 20	43.7 ± 10.7
Uterus	(mg)	158 ± 40	164 ± 58	160 ± 71	168 ± 51
	(mg/100g)	575 ± 150	589 ± 209	586 ± 247	629 ± 187

^a Mean ± SD.^{*} $P < 0.05$, significantly different from control group (Dunnett's test, two-side).

Table 11. 病理組織学検査

		Dose of Enniatin (mg/kg/day)			
		0 (control)	0.8	4	20
Male (Found dead)					
	No. of animals examined	0	0	0	1
Lymph node, mesenteric					
	Atrophy	0 ^a	0	0	1
	mild	0	0	0	1
Lymph node, submandibular					
	Atrophy	0	0	0	1
	mild				
Spleen					
	Atrophy, white pulp	0	0	0	1
	mild	0	0	0	1
Thymus					
	Atrophy	0	0	0	1
	mild	0	0	0	1
Skin					
	hemorrhage	0	0	0	1 ^b
	moderate	0	0	0	1
Males (End of administration)					
	No. of animals examined	10	10	10	9
Glandular stomach					
	Dilatation, gland	1	0	0	0
	minimal	1	0	0	0
	Cyst, glandular	0	1	0	1
	minimal	0	1	0	1
Kidney					
	Basophilia, tubule	1	0	3	1
	minimal	1	0	3	1
	Cyst	0	1	1	1
	minimal	0	1	1	1
	Mineralization, intraluminal	0	0	0	1
	minimal	0	0	0	1
Liver					
	Infiltrate, mixed, inflammatory cell	1	0	1	2
	minimal	1	0	1	2
	Necrosis, focal	0	1	0	0
	minimal	0	1	0	0
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Glandular stomach					
	Dilatation, gland	0	0	1	0
	minimal	0	0	1	0
	Cyst	0	0	1	0
	minimal	0	0	1	0
Kidney					
	Basophilia, tubule	2	2	2	1
	minimal	2	2	2	1
	Cyst	1	1	0	1
	minimal	1	1	0	1
Liver					
	Infiltrate, mixed, inflammatory cell	2	0	2	0
	minimal	2	0	2	0
	Necrosis	1 ^b	0	0	0
	moderate	1	0	0	1
Ovary					
	Cyst, rete ovarii	1	0	0	0
	minimal	1	0	0	0

^aThe number of animals with lesions.^bLesions with gross findings.

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

毒性試験のためのエンニアチン B の大量調製

研究分担者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

マウスを用いたエンニアチン B (ENB) の毒性試験を行うために、ENB の大量調製を行った。エンニアチン類 (ENs) 生産菌の候補 12 株から、角田液体培地を用いた ENs 高産生株の探索を行ったところ、KFU-28 株が高産生であった。本株の形態学的及び分子生物学的同定を行ったところ、*Fusarium avenaceum* と同定された。本株を用いて米培地による大量培養を行った。KFU-28 株の米培地における ENB の生産量は約 3 mg/g であった。KFU-28 株を培養した米培地から ENB を 85% アセトニトリルで抽出し、酢酸エチルと飽和炭酸水素アンモニウム水溶液を用いた液々分配後、C2 カートリッジで精製した。HPLC による分取を繰り返し、ENB 約 2 g を得た。

研究協力者

吉成 知也 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

エンニアチン類 (ENs) は新興カビ毒として近年関心が高まっており、欧州を中心に 2000～2013年に1万試料を超える大規模な汚染実態調査が行われた。日本に流通する小麦粉を対象とした過去の実態調査においては、高濃度かつ高頻度で ENs が検出されており、毒性や小麦以外の食品における汚染実態の情報の取得の必要性が高まっている。欧州食品安全機関 (EFSA) が公表したマウスを用いたエンニアチン B (ENB) の 42 日間の反復投与試験と 42 日間の反復投与による生殖発生毒性試験では、公比 10 を設定し 0.18, 1.8, 18mg/kg/日の用量で強制経口投与試験を実施しているが、用量依存性の乏しいデータが多く、NOAEL を求めるためには再試験が必要であると考えられた。そこで、本年度は国立医薬品食品衛生研究所にて ENs 生産菌を培養し、毒性試験に必要な ENB を単離精製することとした。

B. 研究方法

(1) ENs 生産菌の探索

Fusarium 属菌のうち、文献調査から *Fusarium acuminatum* または *Fusarium avenaceum* が ENs を高濃度に産生することを把握した。そこで、国立医薬品食品衛生研究所で過去に分離収集した菌株ストックから、該当する菌種 12 株を復元し、ENs 高産生株の探索を行った。1 ウェル当たり角田培地 2 mL を加えた 12 ウェルプレートに菌株を接種し、6 日間 25°C で静置培養した。培養後、培養液を 90% アセトニトリルで 1/10000 倍希釈し、LC-MS/MS で ENs 量を測定した。LC-MS/MS の条件は、カビ毒汚染実態調査で用いたものと同様である。

角田培地の組成 (1L あたり)

硫酸ナトリウム : 2.0 g

リン酸水素二カリウム : 1.0 g

塩化カリウム : 0.5 g

硫酸マグネシウム : 0.5 g

酵母エキス : 2.5 g

ポリペプトン : 5.0 g

スクロース : 50 g

(2) ENs 生産菌の同定

復元した 12 株の由来は、食品および土壌等環境である (表 1)。ポテトデキストロース寒天 (PDA) 斜面培地に接種し、25°C で 7 日間前培養した。その後、PDA 平板およびカーネーションリーフ・アガー培地に接種し 25°C で 7 日間培養した。これらに生育したコロニーの色等性状を目視で観察、およびプレパラートを作製しての生物顕微鏡観察によって孢子形状、孢子形成様式等を判定し、菌種を推定した。さらに、PDA 平板培地上に生育した菌体を 2 mL マイクロチューブに入れたポテトデキストロース液体培地 (PDB) 1.5 mL に接種し、2 晩静置培養した。その後、得られた菌体について、Maxwell RSC Plant DNA Kit (プロメガ株式会社) を用いて、DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型として β -tubulin 遺伝子の PCR およびシーケンスを行った。得られた遺伝子塩基配列について、NCBI データベースを用いた BLAST サーチにより菌種を推定した。以上の形態学および分子生物学的解析結果を総合し、菌種の同定を行った。

(3) ENB の精製

スラント状の PDA 培地で 1 週間以上生育させた *F. avenaceum* KFU-28 株をかきとり、100 mL の角田液体培地を入れた 300 mL 容の三角フラスコに入れ、25°C で 24 時間 180 rpm で振盪培養した。15 本の培養器にそれぞれもち米 (新潟産こがねもち 全農パールライス (株)) 50 g と精製水 15 mL を入れ、シリコン栓で蓋をして 3 時間静置後にオートクレーブで滅菌した。

培養器に KFU-28 株の培養液 10 mL と精製水 20 mL を加え、25°C の暗室で 11 日間静置培養した。培養器一本あたり 85%アセトニトリル水溶液 200 mL を加え、ミキサーで破碎後、吸引濾過にて培養液を回収した。ろ紙上に残った培養物にもう一度 85%アセトニトリル水溶液 200 mL を加え、抽出を行った。抽出液を合わせ、エバポレーターで乾固した。残渣を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 25 mL、続いて酢酸エチル 20 mL でそれぞれ懸濁し、50 mL チューブに回収した。懸濁液を激しく攪拌後に遠心分離を行い、上層の酢酸エチル層を回収した。残った水層に酢酸エチル 20 mL を加え、もう一度液々抽出を行った。得られた酢酸エチル層を乾固後、少量のメタノールに溶解した。メタノール 100 mL と 20%アセトニトリル水溶液 100 mL で平衡化した InertSep C2 カートリッジ 25 g (ジューエルサイエンス (株)) にメタノール溶解物 (酢酸エチル抽出物 1 g 相当量) を供し、20%アセトニトリル水溶液 100 mL、50%アセトニトリル水溶液 100 mL で洗浄後、80%アセトニトリル水溶液 100 mL で溶出される画分を回収した。溶出液を乾固後、少量のメタノール約 30 mL に溶解した。逆相 HPLC により ENB のピークを分取した。

<HPLC の条件>

カラム : Inertsil C4

20×250 mm, 5 μm

カラム温度 : 40°C

移動相 : A 0.5%酢酸を含んだ精製水

B アセトニトリル

分離条件 : A : 4 mL/分

B : 10 mL/分

注入量 : 80%アセトニトリル水溶液溶出画分
を乾固したもの約 25 mg

HPLC で分取した画分をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥機で乾固した。乾固して得られ

た ENB1 g あたり 5 mL のメタノールを加え、50°C で 5 分間インキュベートした。室温で 10 分間放置後、精製水 2.5 mL を加えた。沈殿した茶色の油状成分を取らないように上清を回収後、一晚室温で放置した。再び上清を回収し、氷上で 3 時間インキュベートし、析出した結晶を回収した。結晶を凍結乾燥し、ENB を得た。

C. 研究結果

(1) ENs 生産菌の探索

角田液体培地における ENs 生産菌候補 12 株の ENB 生産量を定量した結果を表 1 に示した。12 株のうち、6 株で ENB の生産が認められ、その中でも KFU-28 株と YF016-B 株に高い生産能が認められた。KFU-28 株と YF016-B 株を米培地で培養し、抽出液中の ENB 量を測定した。その結果、KFU-28 株は米 1 g あたり約 3 mg の ENB を生産したが、YF016-B 株では ENB の生産が認められなかった。そのため、ENB の大量調製には KFU-28 株を用いることとした。

(2) ENs 生産菌の同定

ENB の大量調製に用いた KFU-28 株の由来は不明である (表 1)。本株の形態学および分子生物学的同定を行ったところ、巨大分生子の湾曲が大きく、小型分生子がほとんど形成されていないという特徴が観察された (図 1)。また、β-tubulin 遺伝子塩基配列の BLAST サーチの結果から、*F. avenaceum* と推定された。これらの結果を総合し、本株は *F. avenaceum* と同定された。

(3) ENB の精製

1 本あたり米 50 g を入れた 15 本の培養器で KFU-28 株を 11 日間培養し、ENB を生産させた。培養後の写真を図 2 に示した。85%アセトニトリルを加え、培養物を破碎後、抽出液を濾別した。抽出液を乾固後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と酢酸エチルで液々分配を行い、酢

酸エチル層に ENB を回収した。酢酸エチル層を濃縮し、黒色の油状物質 12.3 g を得た。油状物質を C2 オープンカートリッジで分画し、ENB が含まれる 80%アセトニトリル水溶液溶出画分を得た。溶出画分を濃縮し、茶色の油状物質 9.7 g を得た。逆相 HPLC により、ENB に相当するピークを分取した。クロマトグラムを図 3 に示した。分取した画分を濃縮し、ENB 2.6 g を得た。混入している茶色の色素を除くために再結晶を行い、精製 ENB 2 g を得た。精製した ENB の純度を HPLC により確認した(図 4)。ENB の単一ピークのみが確認され、98%以上の純度を有することを確認した。

表 1 エンニアチン生産候補株の液体培地中の ENB 生産量

株名	同定結果	由来	ENB (mg/L)
TSY0039	<i>Fusarium avenaceum</i>	マスクメロン	ND
ATCC200255	<i>Fusarium avenaceum</i>	オーストラリア土壌	29
TSY0741	<i>Fusarium avenaceum</i>	サラミ	ND
TSY0338	<i>Fusarium avenaceum</i>	不明	ND
MAFF239207	<i>Fusarium avenaceum</i>	国産カーネーション	34
MAFF239206	<i>Fusarium avenaceum</i>	国産カーネーション	ND
IFM50012	<i>Fusarium avenaceum</i>	国内小麦畑土壌	2
TSY1093	<i>Fusarium avenaceum</i>	国内住宅外壁	ND
TSY0439	<i>Fusarium avenaceum</i>	不明	ND
KFU28	<i>Fusarium avenaceum</i>	不明	156
YF016-A	<i>Fusarium acuminatum</i>	アメリカ産小麦	18
YF016-B	<i>Fusarium acuminatum</i>	アメリカ産小麦	169



図 1 KFU-28 株の顕微鏡観察像

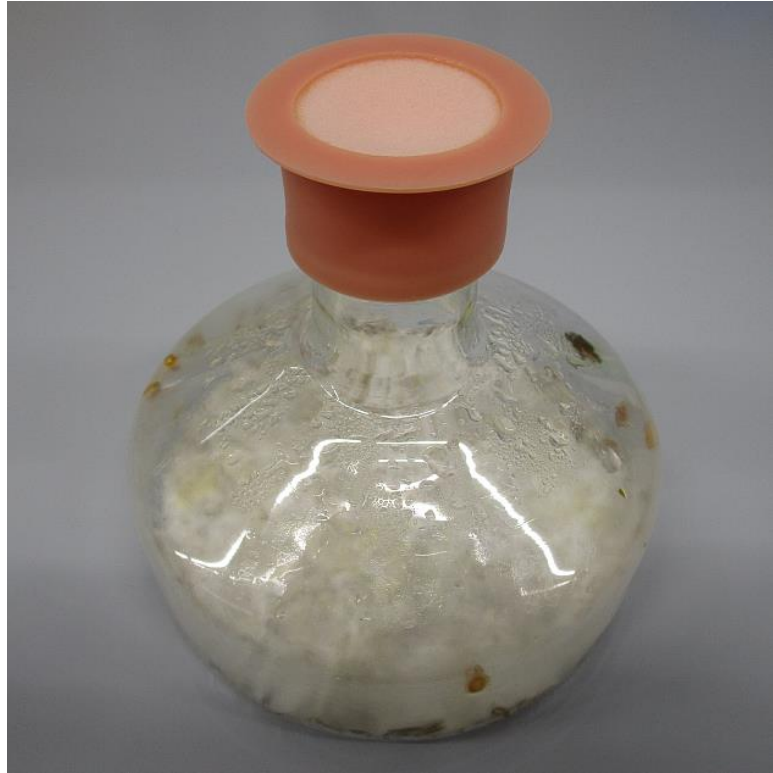


図 2 米培地で培養した KFU-28 株

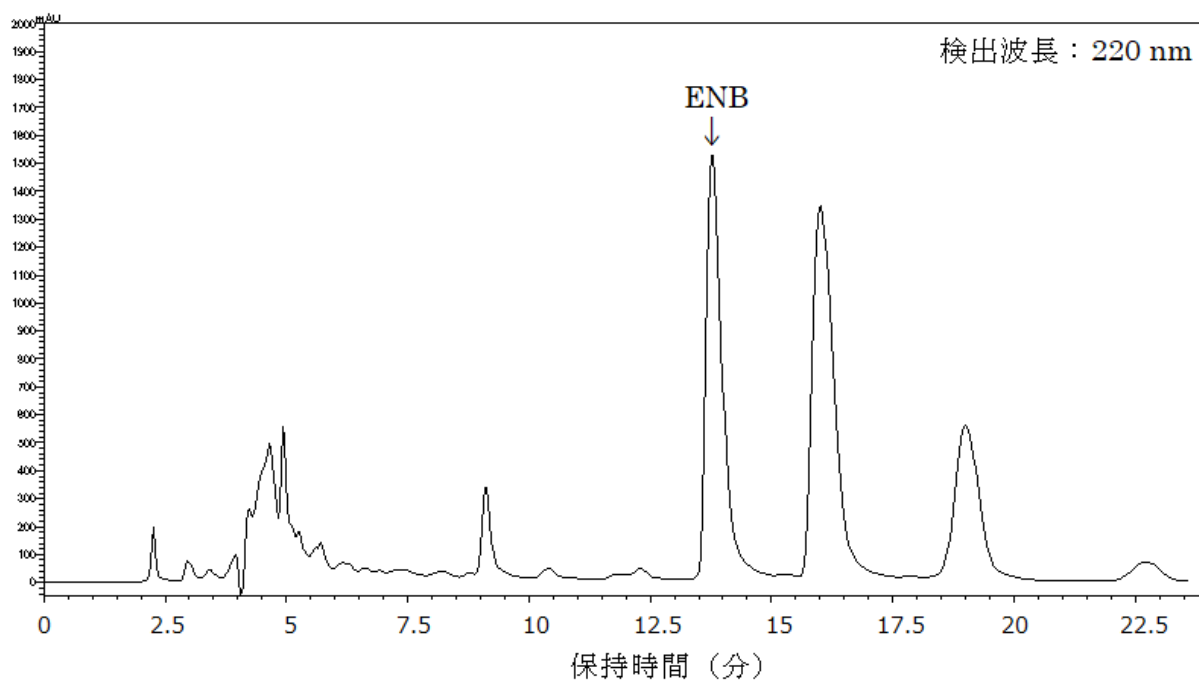


図3 C2 カラム 80%アセトニトリル水溶液溶出画分の HPLC クロマトグラム

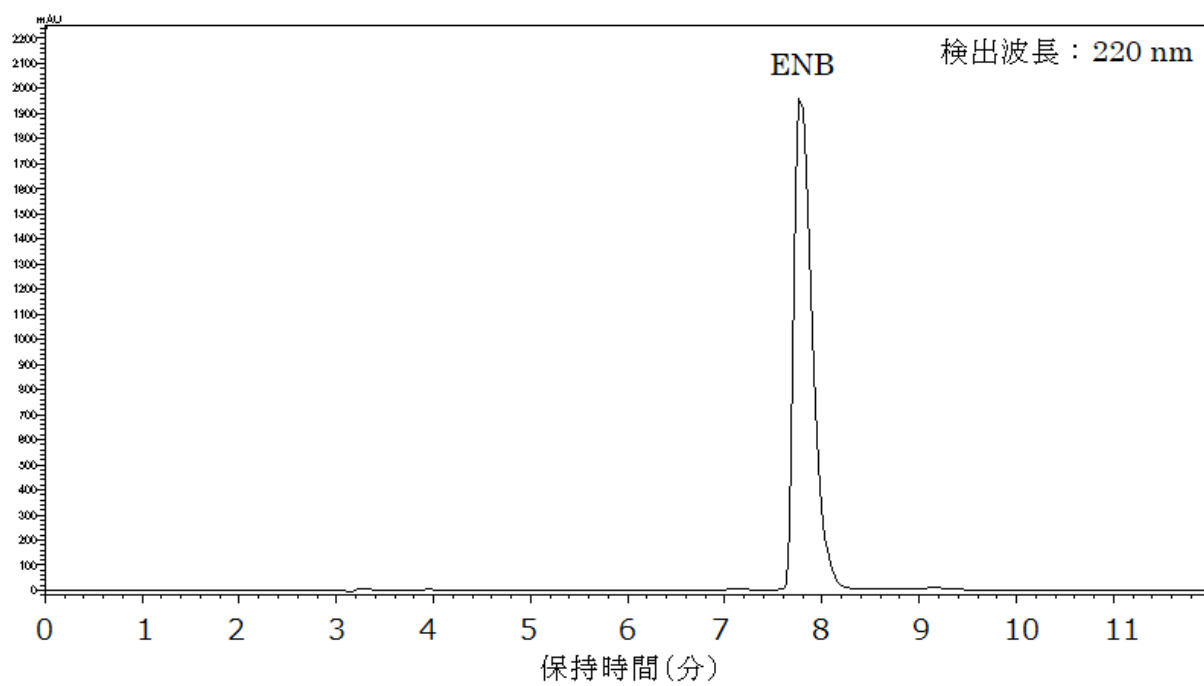


図 4 精製した ENB のクロマトグラム

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshinari T, Takeuchi H, Kosugi M, Taniguchi M, Waki M, Hashiguchi S, Fujiyoshi T, Shichinohe Y, Nakajima M, Ohnishi T, Hara-Kudo Y, Sugita-Konishi Y.	Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data.	Food Addit Contam Part A	36(9)	1404-1410	2019
Kobayashi N, Sakurai K, Nakarai R, Shigaki K, Horikawa K, Honda M, Sugiyama Y, Watanabe M, Takino M, Sugita-Konishi Y.	Microflora of Mycotoxinogenic Fungi in Rice Grains in Kyushu Region of Japan and Their Changes during Storage under non-Controlled Conditions.	Biocontrol Sci.	24(3)	161-166	2019
Kubosaki A, Kobayashi N, Watanabe M, Yoshinari Y, Takatori K, Kikuchi Y, Hara-Kudo Y, Terajima J, Sugita-Konishi Y.	A New Protocol for Detection of Aspergillus Section Versicolores Using a High Discrimination Polymerase.	Biocontrol Sci.	In printing		
Nakajima K, Tanaka T, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Woo GH, Toshinori Yoshida T, Shibutani M.	Developmental exposure of mice to T-2 toxin increases astrocytes and hippocampal neural stem cells expressing metallothionein.	Neurotox. Res.	35(3)	668-683	2019
Nakajima K, Ito Y, Kikuchi S, Okano H, Takashima K, Woo GH, Yoshida T, Yoshinari T, Sugita-Konishi Y, Shibutani M.	Developmental exposure to diacetoxyscirpenol reversibly disrupts hippocampal neurogenesis by inducing oxidative cellular injury and suppressed differentiation of granule cell lineages in mice.	Food Chem. Toxicol.	136	111046	2020

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏 印



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 日本国内流通食品に検出される振興カビ毒の安全性確保に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 衛生微生物部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 吉成 知也・ヨシナリ トモヤ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年3月27日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立大学法人 東京農工大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 大野 弘幸



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 平成31年度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)
- 研究課題名 日本国内流通食品に検出される新興カビ毒の安全性確保に関する研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 農学研究院 動物生命科学部門 教授
(氏名・フリガナ) 渋谷 淳 (シブタニ マコト)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: 東京農工大学/(株)ポゾリサーチセンターの動物実験に係る指針)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東京農工大学・受託機関	<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

動物実験について外注先の(株)ポゾリサーチセンターが適切に実施していることを確認した。

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

令和 2年 5月 18日

厚生労働大臣 殿

機関名 学校法人麻布獣医学園麻布大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 柏崎 直巳



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 平成31年度 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）
- 2. 研究課題名 日本国内流通食品に検出される新興カビ毒の安全性確保に関する研究（19KA1004）
- 3. 研究者名 （所属部局・職名）生命・環境科学部 教授 （2020年3月31日まで所属）

（氏名・フリガナ） こにし よしこ 小西 良子

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容：)

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏 印



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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

2. 研究課題名 日本国内流通食品に検出される振興カビ毒の安全性確保に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 衛生微生物部第三室 室長

(氏名・フリガナ) 渡辺 麻衣子 (ワタナベ マイコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。