

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～3（2019～2021）年度

総合研究報告書

研究代表者 吉成 知也

令和4（2022）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. カビ毒の汚染実態調査 -----	8
吉成 知也	
2. エンニアチン類の毒性試験 -----	28
渋谷 淳	
3. 簡易迅速検出法の開発 -----	60
小西 良子	
4. 毒性試験のためのエンニアチン B の大量調製	
国内流通穀物におけるカビ毒複合汚染のリスク因子の解明----	68
渡辺 麻衣子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	86

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)

総合研究報告書

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
(2019～2021 年度)

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

本研究は、3 種の新興カビ毒に対して行政的施策を講じる必要があるかを判断するためのデータの取得を目的とした。

①カビ毒の分析法の開発と汚染実態調査：タイプ A トリコテセン系化合物については、3 年間で累計 10 食品目計 477 検体、エンニアチン類 (ENs) については、累計 12 食品目 658 検体、ステリグマトシスチン (STC) については、累計 8 食品目 507 検体の調査を行った。調査結果を基に算出した日本人におけるばく露量やばく露マージンの値から、いずれの新興カビ毒も直ちに日本人の健康に影響を与える汚染レベルでは無いことが明らかになった。ただし、ライ麦、ハト麦及びきな粉における T-2 トキシンと HT-2 トキシン汚染、ライ麦における ENs 汚染、玄米における STC 汚染など、比較的高レベルの汚染が一部の食品目で認められた。

②毒性試験：エンニアチン B (ENB) 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結果、病理組織学的検査において ENB の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量は最高用量の 30 mg/kg となった。また、薬物動態試験の結果、高い経口バイオアベイラビリティ (85.6%) が確認されことから、ENB の毒性が当初の想定と比較して低い可能性があり、一般毒性は今回用いた用量より高い用量で出現するものと考えられた。

③簡易測定法の開発：STC を対象とした ELISA 測定系については、実態調査に応用できる感度と精度を有する系の開発に成功した。T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS の 3 つを同時に測定できる ELISA を市販品から探索については、市販の 7 種の T-2 トキシン ELISA キットに使われている特異抗体が 4,15-DAS も認識するか否かを検討した結果、いずれも 4,15-DAS には交差性を示さないことがわかった。

④カビ毒の複合汚染のリスク解析：タイプ A トリコテセン系化合物の T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS の複合汚染の原因菌としては、海外産ハト麦においては *Fusarium incarnatum*、国内産ハト麦及びライ麦においては *Fusarium sporotrichioides* 及び *Fusarium armeniacum* が、それぞれ汚染の原因菌となっていた可能性が示された。ハト麦においては 2 年間の調査によって年をまたいでの再現性があることも確認された。ハト麦、ライ麦試料中のタイプ A トリコテセン系化合物の汚染プロファイルの差異と、これらの検出された *Fusarium* 属菌の種類は関連していると考えられ、この菌種の違いがそれぞれの穀類の *Fusarium* トキシン汚染のリスク因子の一端となっている可能性が示唆された。

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年度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。

本研究の研究対象は、以下に述べる3種の新興カビ毒である。新興カビ毒とは、数十年前の発見当時は注目をされていなかったが、昨今の分析技術の発達により、食品における検出例が報告され、新たな食品危害物質として国際的に注目を浴びているカビ毒の総称である。本研究は、それら新興カビ毒に対して行政的施策を講じる必要があるかを判断するためのデータの取得を目的とした。

4,15-ジアセトキシシルペノール(4,15-DAS)については、2016~18年度の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。一方、2017年に公表されたJECFAの評価結果¹⁾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²⁾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った。

ステリグマトシスチン(STC)については、2016~18年度の厚生労働科学研究により分析法の確立と米や小麦などの主要食品における汚染実態を明らかにした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

とした汚染調査を行う必要と考えられた。

エンニアチン類(ENs)とビューベリシン(BEA)は、数ある新興カビ毒の中でもその高い検出頻度から高い注目を浴びており、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。

これらカビ毒について、「国内流通食品を対象とした汚染実態調査」、「毒性に関する研究」及び「簡易分析法の確立」、「複合汚染のリスク因子の解明」を行った。

B. 研究方法

(1) 国内流通食品を対象とした汚染実態調査

①タイプAトリコテセン系化合物の分析法

抽出は、試料25gに抽出溶媒アセトニトリル：水(85：15)100mLを加え、30分間振盪することで行った。精製は多機能カラム(昭和電工社製Autoprep MF-T 1500)を用い、調製した試験溶液中の3種のタイプAトリコテセン化合物(T-2トキシン、HT-2トキシン、4,15-DAS)をLC-MS/MSで定量した。

②STCの分析法

抽出は、試料25gに抽出溶媒アセトニトリル：水(85：15)100mLを加え、30分間振盪することで行った。精製に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。調製した試験溶液中のSTCをLC-MS/MSで定量した。

③BEAとENsの分析法

抽出は、試料20gに抽出溶媒アセトニトリル：水(85：15)200mLを加え、30分間振盪することで行った。精製にはC18カートリッジ(Waters社製SepPak Vac C18 200mg)を用

い、調製した試験溶液中のエンニアチン 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 BEA を LC-MS/MS で定量した。

④ばく露量推定

摂取量は、2005～2007 年に実施された食品摂取量・摂取頻度調査の結果を用いた。対象食品から小麦加工品 139 種を選抜した。Crystal Ball ((株) 構造計画研究所) を用いてモデルの探索を行った。タイプ A トリコテセン系化合物の汚染量は、2019～2021 年度に収集した小麦粉 (国産) 72 件と小麦粉 (輸入) 66 件の結果を用い、4,15-DAS、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの分析値を合算した。3 種のカビ毒の合算値と摂取量の分布を掛け合わせ (試行回数 100000)、ばく露量を求めた。ENs の汚染量は、2019～2021 年度に収集した小麦粉 (国産) 94 件と小麦粉 (輸入) 66 件の結果を用い、ENA、ENA1、ENB 及び ENB1 の分析値を合算した。ENs 濃度と摂取量の分布を掛け合わせ (試行回数 100000)、ばく露量を求めた。STC の汚染量は、2016～2021 年度に収集した小麦粉 (国産) 144 件と小麦粉 (輸入) 127 件の結果を用いた。STC 濃度と摂取量の分布を掛け合わせ (試行回数 100000)、ばく露量を求めた。

(2) 毒性に関する研究

①ENs 混合物を用いた動物試験

ENs 混合物 (B : B1 : A1 = 4 : 4 : 1) をジメチルスルホキシド添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) 染色標本を作製し、鏡検した。

②ENB の毒性試験

ENB をジメチルスルホキシド添加コーン油で調製した被験液を 0、7.5、15、30 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、血液学検査と血液生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) 染色標本を作製し、鏡検した。

③ENB の薬物動態試験

ENB は、終濃度 6% のジメチルスルホキシドに、経口投与群ではコーン油、静脈内投与群では生理食塩水に混じて調製した。6 週齢の雄性マウスに ENB を経口又は尾静脈内投与し、血中 ENB 濃度測定のために各時点において血液を採取した。また、糞中 ENB 濃度測定のために、一定期間に各群 5 匹の糞を採材した。投与から 2 時間後には各群 5 匹を剖検に供し、肝臓 (約 30 mg/サンプル) を採材して遺伝子発現解析に用いた。血漿及び糞中の ENB は、精製後に LC-MS/MS によって濃度を測定した。

(3) 簡易分析法の確立

①STC ELISA の開発

96 穴プレートの各ウェルにマウス抗 IgG ヤギ抗体をコーティングした後、0.4% ウシ血清アルブミン (BSA) でブロッキングを行った。洗浄後 0.2% BSA で希釈したマウス抗 AF 抗体を加え、室温で反応させ洗浄した。45 μ L の 0.2% BSA をあらかじめ入れた各ウェルに 100% メタノールで溶解した標準品および試料を 5 μ L

加えよく攪拌した。すぐにアフラトキシン B2-HRP を 50 μ L ずつ加え競合反応させた。洗浄後、TMB Substrate Reagent により発色させ、0.5 NH_2SO_4 により反応を止めた。プレートリーダー（で 450 nm および 630 nm における吸光度を測定した。

②4,15-DAS を認識する ELISA キットの探索

市販の 7 種類の ELISA キットを購入し、それぞれのキットに添付されている各カビ毒標準品の濃度を参考に、その 1000 倍濃度までの 4,15-DAS 溶液を実験に用いた。ELISA の操作は、各メーカーの説明書に従って行った。

（4）複合汚染のリスク因子の解明

①ハト麦及びライ麦試料からの *Fusarium* 属菌株の分離

Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol 寒天培地（DRBC 寒天培地）平板上に、供試したハト麦及びライ麦を 1 枚のプレートに 5 粒ずつ計 50 粒を置き、25°C で 7 日間培養した。培養後、生育したコロニーを目視によって観察し、*Fusarium* 属様コロニーをポテトデキストロース寒天（PDA）平板培地に釣菌して分離した後、25°C で 1~2 週間培養した。

②分離された *Fusarium* 属菌株の同定

PDA 平板上に生育したコロニー、カーネーションリーフ・アガー培地に生育した菌体のプレパレート観察像を形態学的同定指標とした。さらに分子生物学的同定指標として、分離株菌体を少量培養し、DNA を抽出後、 β -tubulin 及び EF-1 α 遺伝子のシーケンスを行った。

③分離された *Fusarium* 属菌株のトリコテセン系カビ毒産生性の検討

前培養液を 200 mL 三角フラスコに入れた角田培地 30 mL に 100 μ L 接種し、25°C で 7 日間静置培養した。培養液の酢酸エチル抽出物中の T-2 トキシン、HT-2 トキシン、4,15-DAS、デオキシニバレノール（DON）、ニバレノール（NIV）、

アセチル化 DON 及び ENB 量を LC-MS/MS で調べた。

C. 研究結果

（1）国内流通食品を対象とした汚染実態調査

①タイプ A トリコテセン系化合物

3 年間で累計 10 食品目計 477 検体の調査を行った。4,15-DAS は、主にハト麦加工品及びコーンフラワーから、T-2 トキシンは、主にきな粉、ハト麦及びそば粉から、HT-2 トキシンは、主にきな粉、ハト麦加工品及びライ麦粉から検出された。

②BEA と ENs

3 年間で累計 12 食品目 658 検体の調査を行った。BEA は、主にきな粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、雑穀及びゴマから、ENs は、主にライ麦粉及び小麦粉（国産）から検出された。

③STC

3 年間で累計 8 食品目 507 検体の調査を行った。玄米及びそば（乾麺）で主に検出された。

④ばく露量推定

日本人における小麦加工品からのタイプ A トリコテセン化合物の全年齢における 95%ile 値は 1.50~1.55、1~6 歳における 95%ile 値は 3.92~4.02 であった。

日本人における小麦加工品からの ENs ばく露量の全年齢における 95%ile 値は 81.3~82.5、1~6 歳における 95%ile 値は 211.5~221.3 であった。ENs 平均摂取量からばく露マージン（MOE）を算出した結果、全年齢では 1,330,000~1,370,000 で、1~6 歳では 528,000~550,000 であった。

③STC

日本人における小麦加工品から STC ばく露量の全年齢における 95%ile 値は 0.08~0.11、平均値は 0.02~0.04 ng/kg 体重/日であった。日本人の STC 平均摂取量から MOE を算出した結果、4,000,000~8,000,000 であった。

(2) 毒性に関する研究

①ENs 混合物を用いた動物試験

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 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。

②ENB の毒性試験

ENB 投与群で摂餌量の変化や RBC 値の低値、BUN 値の高値、腎臓絶対重量の高値が認められたが、病理組織学的検査において ENB の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量は 30 mg/kg となった。

③ENB の薬物動態試験

経口投与群において、Cmax は 1024 ng/mL、tmax は投与後 1 時間、AUC は 6008 ng・hr/mL と算出された。尾静脈内投与群における AUC は 234 ng・hr/mL と算出された。投与用量は経口投与群が 30 mg/kg、尾静脈内投与群が 1 mg/kg であるが、線形動態に従い、AUC が投与量に比例して増加すると仮定した場合、バイオアベイラビリティは 85.6% と推定された。RNA-Seq 解析では、経口投与群で溶媒対照群と比較して、553 遺伝子の発現が増加した。発現が増加した遺伝子群には、シトクローム P450 をコードする遺伝子が多く含まれていた。

(3) 簡易分析法の確立

①STC ELISA の開発

STC の標準品及び試料の溶解メタノールの濃度を工夫することで、安定して 1.2~1.5 ng/mL の IC₅₀ が得られるようになった。また、Autoprep MF-A 多機能カラムを前処理に用いることで、ELISA 測定を妨害する物質を取り除くことができた。添加回収試験では、玄米と小麦粉でいずれも 90%以上の平均回収率が得られた。

②4,15-DAS の ELISA

7 社の T-2 又は T-2/HT-2 用の ELISA キットを用いて 4,15-DAS との交差性を検討したが、いずれのキットにおいても交差性は認められなかった。

(4) 複合汚染のリスク因子の解明

ハト麦及びライ麦試料から分離された *Fusarium* 属菌種のカビ毒産生性を調べた。国産ハト麦試料から分離された計 3 株の *F. sporotrichioides* と 1 株の *F. armeniacum* の培養液からは、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS が検出された。輸入ハト麦試料から分離された菌のうち、1 株の *F. incarnatum* のみが 4,15-DAS を産生した。ライムギ試料では、国内産の 1 試料からのみ *Fusarium* 属菌を分離することができた。*F. sporotrichioides* が 8 株検出され、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS を同時に産生した。また、タイプ B トリコテセン系化合物の産生菌の *F. graminearum* が 2 株検出され、これらの株は DON、3ADON 及び 15ADON を同時に産生した。さらに ENB 産生能を有する *F. avenaceum* が 9 株検出された。

D. 考察

(1) 国内流通食品を対象とした汚染実態調査

①タイプ A トリコテセン系化合物

1~6 歳及び全年齢における 95 パーセントイル値は、それぞれ 3.92~4.02 及び 1.50~1.55 ng/kg 体重/日であった。JECFA が設定したグループ PMTDI 60ng/kg 体重/日を下回っていたことから、日本人において、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS による健康被害の懸念は小さいと考えられた。

②BEA と ENs

実態調査の結果を基に行ったばく露量推定の結果、全年齢における MOE は 1,330,000~1,370,000、1~6 歳では 528,000~550,000 であ

った。これら値が 10,000 を超えていたことから、ENs による日本人の健康への懸念は低いと考えられた。

③STC

汚染実態調査の結果を踏まえ、小麦加工品からの日本人における STC のばく露量を推定した結果、平均的な日本人におけるばく露量は 0.02~0.04 ng/kg 体重/日となった。平均的な日本人における STC の MOE は 10,000 を上回っており、健康に対する影響は少ないと考えられる。

E. 結論

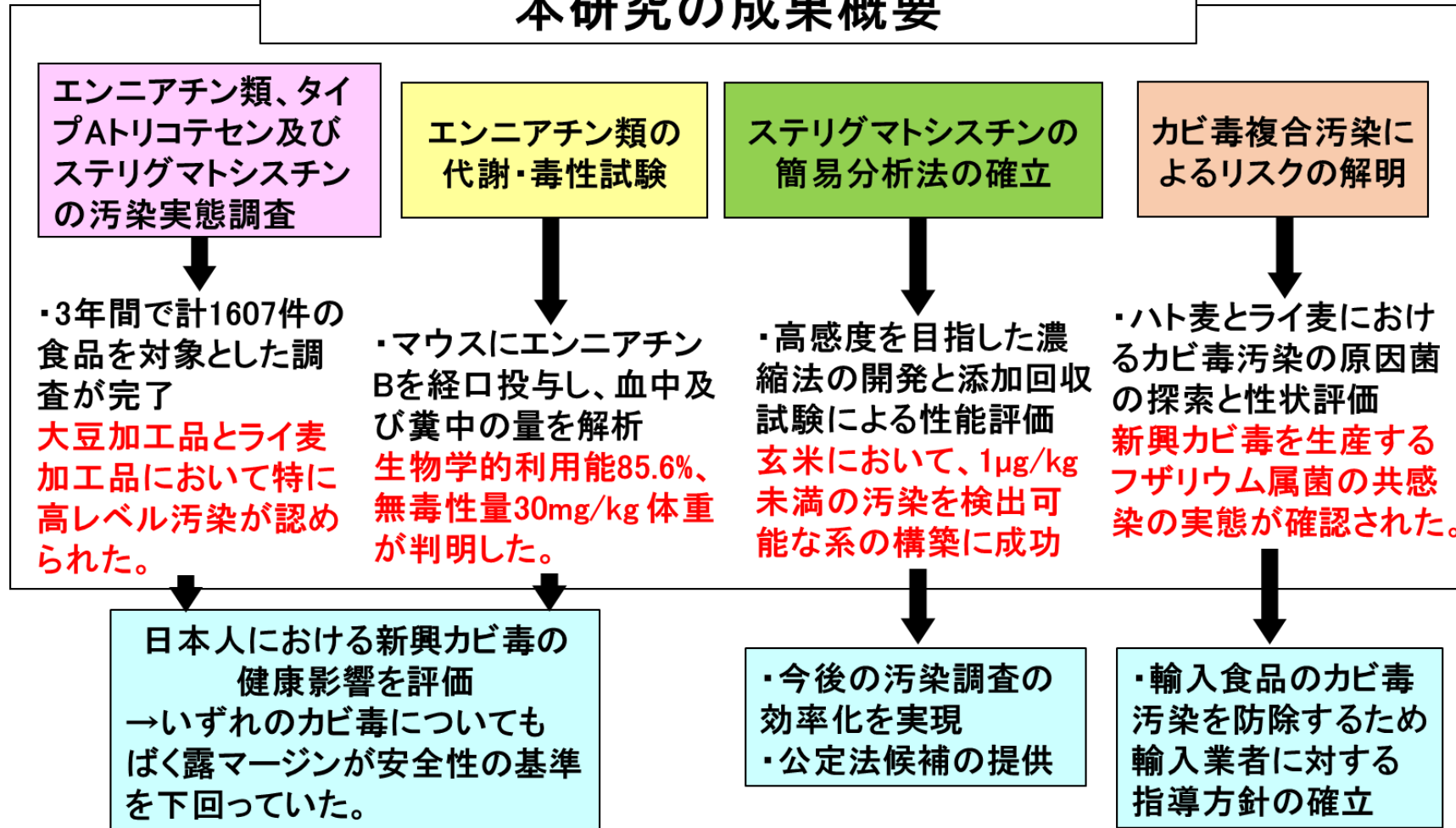
カビ毒の汚染実態調査については、分析法の確立と目標数の汚染調査が完了した。これら結果から、ばく露量を推定し、日本人の健康に与える影響の評価を達成した。毒性試験については、これまで毒性・代謝に関する情報が不足しており、リスクが全く不明であった ENs について、マウスにおいては体内に吸収されるものの、強い毒性は発揮しないという新たな知見を取得した。この結果と汚染調査の結果を合わせ、健康リスクを明らかにすることを達成した。簡易試験法の開発については、STC が高頻度で検出される玄米と小麦において、日本において流通する検体の汚染レベルを調べることのできる感度（カットオフ値 1µg/kg 程度）を有する簡易分析法の確立に成功した。

F. 参考

- 1) World Health Organization. 2017. Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical Report Series, No. 1002:40-54.
- 2) European Food Safety Authority. 2018. Risk to human and animal health related to the presence of 4,15 - diacetoxyscirpenol in food and feed. EFSA Journal 16(8):5367.

- 3) Yoshinari 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.

本研究の成果概要



厚生労働省のカビ毒行政の施策の方針決定の根拠となるデータを提供した。

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)

総合研究報告書

カビ毒の汚染実態調査
(2019～2021 年度)

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 グループの新興カビ毒について、分析法の確立、汚染実態調査、ばく露量推定を行った。タイプ A トリコテセン系化合物については、3 年間で累計 10 食品目計 477 検体の調査を行い、4,15-DAS は主にハト麦加工品において、T-2 トキシンと HT-2 トキシンは、小麦、ライ麦、きな粉及びハト麦など 4,15-DAS よりも幅広い食品目から検出された。ばく露量については、1～6 歳及び全年齢における 95 パーセンタイル値は、それぞれ 3.92～4.02 及び 1.50～1.55 ng/kg 体重/日であった。JECFA が設定したグループ PMTDI 60 ng/kg 体重/日を下回っていたことから、日本人において、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS による健康被害の懸念は小さいと考えられた。BEA と ENs については、3 年間で累計 12 食品目 658 検体の調査を行った。BEA については、レーズン以外の幅広い食品目から検出され、その中でも特にきな粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、雑穀及びゴマの汚染レベルが高かった。ENs についても BEA と同様に様々な食品目からの検出が認められたが、特に小麦粉(国産)とライ麦粉において汚染レベルが高かった。ENs の日本人における摂取量に対する、マウスにおけるエンニアチン B の無毒性量 (30 mg/kg) の割合を算出した結果、全年齢では 1,330,000～1,370,000 倍、1～6 歳では 528,000～550,000 倍であった。これら値が安全性の目安とされる 10,000 倍を超えていたことから、ENs による日本人の健康への懸念は低いと考えられた。STC については、玄米や小麦加工品を対象に、3 年間で累計 8 食品目 507 検体の調査を行った。小麦を原料としたパン、麺類及び菓子類において STC が検出された。玄米においては、小麦加工品より高頻度かつ高濃度で STC が検出された。日本人における STC のばく露量を推定した結果、平均的な日本人におけるばく露量は 0.02～0.04 ng/kg 体重/日となり、その値から算出したばく露マージン (MOE) は 10,000 を上回っており、健康に対する影響は少ないと考えられた。以上の結果より、いずれの新興カビ毒も直ちに日本人の健康に影響を与える汚染レベルでは無いことが明らかになった。ただし、ライ麦、ハト麦及びきな粉における T-2 トキシンと HT-2 トキシン汚染、ライ麦における ENs 汚染、玄米における STC 汚染など、比較的高レベルの汚染が一部の食品目で認められた。これら食品は主食ではないため摂取量は多くは無いが、突発的な高汚染の発生などにより健康被害が生じる可能性は否定できず、今後も汚染レベルの監視を行っていく必要が考えられた。

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
平末 実束	(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
村山 智史	(一財) 日本穀物検定協会
下山 晃	(一財) 日本食品検査
本田 俊一	(一財) 日本食品検査
猪之鼻 修一	(一財) 日本食品分析センター
小杉 正樹	(一財) 日本食品分析センター
宮崎 光代	(一財) 日本食品分析センター

A. 研究目的

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年度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。

本研究の研究対象は、以下に述べる3種の新興カビ毒である。新興カビ毒とは、数十年前の発見当時は注目をされていなかったが、昨今の分析技術の発達により、食品における検出例が報告され、新たな食品危害物質として国際的に注目を浴びているカビ毒の総称である。本研究は、それら新興カビ毒に対して行政的施策を講じる必要があるかを判断するためのデータの

取得を目的とした。

4,15-ジアセトキシシルペノール(4,15-DAS)については、2016~18年度の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。一方、2017年に公表されたJECFAの評価結果¹⁾において、T-2、HT-2トキシシンのグループ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²⁾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った。

STCについては、2016~18年度の厚生労働科学研究により分析法の確立と米や小麦などの主要食品における汚染実態を明らかにした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を行う必要と考えられた。

エンニアチン類(ENs)は、数ある新興カビ毒の中でもその高い検出頻度から高い注目を浴びており、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。ENsについては、2019年度に分析法の確立、2020年度と2021年度には、より広範囲の食品を対象とした汚染調査を行い、ばく露量推定に必要なデータの取得を目指した。

B. 研究方法

(1) タイプAトリコテセン系化合物の分析法
ビール以外の検体の抽出は、試料25gに抽出溶媒アセトニトリル：水(85：15)100mL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、汚染レベルを踏まえた濃度のカビ毒を添加し、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, 263

4,15-DAS 384 > 307, 247

(2) STC の分析法

抽出は、試料 25 g に抽出溶媒アセトニトリル : 水 (85 : 15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。添加回収試験の場合は STC の標準溶液を添加し、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。

小麦加工品からの抽出液の精製に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 : 水 (85 : 15) 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：5 µL

MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：325 [M+H]⁺>281

ENA 699 > 210, 682

ENA1 685 > 210, 668

ENB 657 > 196, 640

ENB1 671 > 196, 654

BEA 801 > 134, 784

(3) BEA と ENs の汚染実態調査

ENA、ENA1、ENB、ENB1 及び BEA の抽出は、試料 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：

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。

(4) ばく露量推定

摂取量は、2005～2007 年に実施された食品摂取量・摂取頻度調査の結果を用いた。対象食品から小麦加工品 139 種を選抜した。それぞれの小麦加工品の摂取量に対し、小麦の含有量を掛け、さらに麺類については DON の残存率 0.289 を掛けた。のべ 40364 人のデータに対し、同一人物のデータを平均化することにより、全年齢 4,503 人と 1～6 歳児 227 人の摂取量データを作成した。各個人における 139 種の小麦摂取量を足し合わせ、総小麦摂取量とした。Crystal Ball（（株）構造計画研究所）を用いてモデルの探索を行った結果、1～6 歳と全年齢の分布はいずれも対数正規分布が適合した（図 1）。

タイプ A トリコテセン系化合物の汚染量は、2019～2021 年度に収集した小麦粉（国産）72 件と小麦粉（輸入）66 件の結果を用い、4,15-DAS、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの分析値を合算した。小麦粉（輸入）のデータ数を 6 倍（396 件）に複製し、小麦粉（国産）の約 6 倍のデータ数になるようデータセットを作成した。Lower bound（LB）を求める際には、定量限界値未満の値を 0 µg/kg に、upper bound（UB）を求める際には、検出限界値未満の値をそれぞれの化合物の検出限界値に、検出限界値以上定量限界値未満の値はそれぞれの化合物の定量限界値に置き換えた。分布モデルの探索を行ったが適合するモデルが無かったため、ヒストグラ

ムを作成し、カスタム分布とした。3 種のカビ毒の合算値と摂取量の分布を掛け合わせ（試行回数 100000）、ばく露量を求めた。

ENs の汚染量は、2019～2021 年度に収集した小麦粉（国産）94 件と小麦粉（輸入）66 件の結果を用い、ENA、ENA1、ENB 及び ENB1 の分析値を合算した。小麦粉（輸入）のデータ数を 8 倍（528 件）に複製し、小麦粉（国産）の約 6 倍になるようデータセットを作った。分布モデルの探索を行ったが適合するモデルが無かったため、ヒストグラムを作成し、カスタム分布とした。ENs 濃度と摂取量の分布を掛け合わせ（試行回数 100000）、ばく露量を求めた。

STC の汚染量は、2016～2021 年度に収集した小麦粉（国産）144 件と小麦粉（輸入）127 件の結果を用いた。小麦粉（輸入）のデータ数を 7 倍（889 件）に複製し、小麦粉（国産）の約 6 倍になるようデータセットを作った。分布モデルの探索を行ったが適合するモデルが無かったため、ヒストグラムを作成し、カスタム分布とした。STC 濃度と摂取量の分布を掛け合わせ（試行回数 100000）、ばく露量を求めた。

C. 研究結果

（1）汚染実態調査

①タイプ A トリコテセン系化合物

3 年間で累計 10 食品目計 477 検体の調査を行った。結果を表 1 に示した。4,15-DAS は、小麦粉（国産）、ハト麦加工品、コーンフラワー、きな粉、そば粉及びゴマから検出され、陽性率については、ハト麦加工品とコーンフラワーの 75%が最も高く、次いできな粉の 20%であった。それ以外の食品ではいずれも 7%以下であった。平均値については、ハト麦加工品の 4.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでコーンフラワーの 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度は、ハト麦加工品における 22.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

T-2 トキシンは、小麦粉（輸入）、小麦粉（国

産）、ライ麦粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、きな粉、そば粉、あんこ及びビールから検出された。陽性率については、そば粉の 90%が最も高く、次いでライ麦粉ときな粉で 70%、コーンフラワーで 66%、ハト麦加工品で 56%であり、その他の食品目では 40%以下であった。平均濃度はきな粉の 2.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでハト麦加工品で 1.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、そば粉で 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はきな粉における 32.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

HT-2 トキシンは、T-2 トキシンと同じ食品種から検出された。ライ麦粉の陽性率 73%が最も高く、次いでそば粉で 70%、きな粉で 65%、コーンフラワーで 53%、ハト麦加工品で 51%であり、その他の食品では 50%未満であった。きな粉の平均濃度 6.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでハト麦加工品で 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、ライ麦粉で 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、そば粉で 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はきな粉まにおける 62.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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、平均濃度はきな粉の 8.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでハト麦加工品で 8.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、ライ麦粉の 2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、そば粉の 2.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、小麦粉（国産）で 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度はきな粉における 95.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

②BEA と ENs

3 年間で累計 12 食品目 658 検体の調査を行った。結果を表 2 に示した。BEA については、小麦粉（国産）、小麦粉（輸入）、大麦、ライ麦粉、ハト麦加工品、米、コーンフラワー、そば粉、雑穀、きな粉、ゴマ及びコーヒーから検出された。陽性率が最も高かったのはコーンフラワー（76%）で、次いでハト麦加工品（74%）であった。きな粉の平均濃度 13.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでハト麦加工品で 9.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、コーンフラワーで 6.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、雑穀で 4.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、ゴマの 3.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度は、ハト麦加工品における 127.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。ENs は小麦粉（国

産)、小麦粉(輸入)、大麦、ライ麦粉、ハト麦加工品、米、そば粉、雑穀、きな粉及びコーヒ一豆から検出された。これらの食品においては、4種のENsのうち、ENBの汚染レベルが最も高く、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(88%)で、次いで小麦粉(国産)(84%)で、小麦粉(輸入)(76%)、きな粉(67%)で、その他の食品目では40%以下であった。ENBの平均濃度については、ライ麦粉の987.3 µg/kgが最も高く、次いで小麦粉(国産)の79.7 µg/kgであり、その他の食品目より高い傾向にあった。ENBの最大濃度は、ライ麦粉における48,783 µg/kgであった。

③STC

3年間で累計8食品目507検体の調査を行った。結果を表3に示した。米と小麦加工品である小麦粉(国産)、小麦粉(輸入)、パン・パン粉、そば(乾麺)、ビスケット、スパゲッティ、うどん(乾麺)及びインスタントラーメンからSTCが検出された。陽性率が最も高かったのは玄米(72%)で、次いでそば(乾麺)(70%)であり、その他の食品目では30%未満であった。平均濃度については、玄米の0.4 µg/kgが最も高く、次いでそば(乾麺)の0.2 µg/kgであった。最大濃度は、玄米における5.7 µg/kgであった。

(2)ばく露量推定

①タイプAトリコテセン化合物

小麦粉における汚染量の分布を図2に示した。日本人における小麦加工品からのばく露量を推定した結果を表4に示した。全年齢における50%ile値は0~0.16、90%ile値は0.57~0.70、95%ile値は1.50~1.55、99%ile値は5.86~5.91 ng/kg 体重/日であり、また平均値は0.30~0.44 ng/kg 体重/日であった。1~6歳における50%ile値は0~0.41、90%ile値は1.46~1.62、95%ile値は3.92~4.02、99%ile値は14.02~

14.65 ng/kg 体重/日であり、また平均値は0.75~1.09 ng/kg 体重/日であった。

②ENs

小麦粉のENs汚染量の分布を図3に示した。日本人における小麦加工品からのENsばく露量を推定した結果を表5に示した。全年齢における50%ile値は5.2~5.6、90%ile値は35.0~35.8、95%ile値は81.3~82.5、99%ile値は346.4~352.5 ng/kg 体重/日であり、また平均値は22.0~22.6 ng/kg 体重/日であった。1~6歳における50%ile値は15.2~16.7、90%ile値は84.1~86.3、95%ile値は211.5~221.3、99%ile値は848.9~857.5 ng/kg 体重/日であり、また平均値は54.6~56.9 ng/kg 体重/日であった。本研究事業において、2020年度にマウスを用いて実施した毒性試験でENBの無毒性量30 mg/kgが得られた。その値を暫定的なNOAELとして、ENs平均摂取量に対する割合を算出した結果、全年齢では1,330,000~1,370,000倍で、1~6歳では528,000~550,000倍であった。

③STC

小麦粉のSTC汚染量の分布を図4に示した。日本人における小麦加工品からのSTCばく露量を推定した結果を表6に示した。全年齢における50%ile値は0.02、90%ile値は0.07、95%ile値は0.10~0.11、99%ile値は0.25~0.26 ng/kg 体重/日であり、また平均値は0.02~0.04 ng/kg 体重/日であった。2016年に行われたJECFAによるSTCのリスク評価の際に採用されたBMDL₁₀0.16 mg/kg 体重/日に基づき、日本人のSTC平均摂取量からばく露マージン(MOE)を算出した結果、4,000,000~8,000,000であった。

D. 考察

(1)タイプAトリコテセン系化合物

3種類のタイプAトリコテセン系化合物の一斉分析法を開発し、穀類における汚染を調査し、

目的であったばく露量の推定が完了した。汚染実態については、4,15-DAS はハト麦加工品が主要な汚染食品であることが明らかになった。コーンフラワーやきな粉においても検出は認められたが、汚染レベルはハト麦加工品より非常に低かった。小麦、米といった主食ではほとんど検出されなかったことから、健康への影響は小さいと考えられる。T-2 トキシンと HT-2 トキシンは、4,15-DAS よりも幅広い食品目から検出された。特に小麦粉から中程度の陽性率で検出されたことから、健康への影響を評価するために小麦加工品からのばく露量の推定を行った。1～6歳及び全年齢における95パーセンタイル値は、それぞれ3.92～4.02及び1.50～1.55 ng/kg 体重/日であった。JECFA が設定したグループ PMTDI 60ng/kg 体重/日を下回っていたことから、日本人において、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び4,15-DAS による健康被害の懸念は小さいと考えられた。ただ、幅広い年齢層で食されるきな粉において、比較的高濃度でT-2 トキシンとHT-2 トキシンが検出された検体が複数認められたことから、突発的な食中毒事故が生じる可能性は拭えず、定期的に汚染状況をモニタリングする必要があると考える。

②BEA と ENs

BEA と4種類のENsの一斉分析法を開発し、穀類、種実類及びそれら加工品における汚染を調査し、目的であったばく露量の推定が完了した。BEAについては、レーズン以外の幅広い食品目から検出され、その中でも特にきな粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、雑穀及びゴマの汚染レベルが高かった。しかし、主食である小麦や米における汚染レベルは、ENsよりも非常に低いことから、日本人の健康に対する影響を考える上でENsの方が重要と考えられた。ENsについてもBEAと同様に様々な食品目からの検出が認められたが、特に小麦粉(国産)とライ麦粉において汚染レベルが高かった。ライ麦

粉の方が小麦粉よりも汚染レベルは高いが、日本人における摂取量は小麦加工品の方が圧倒的に多いことから、ばく露量推定は小麦粉のデータを用いた。その結果、全年齢におけるENsの摂取量に対するマウスにおけるNOAELの割合は、1,330,000～1,370,000倍、1～6歳では528,000～550,000倍であった。これら値が10,000を超えていたことから、ENsによる日本人の健康への懸念は低いと考えられた。EFSAが公表したBEAとENsのリスク評価の結果において、ENsのヨーロッパ人におけるばく露量推定値の平均値は0.42～1.82 µg/kg 体重/日、95%ile値は0.91～3.28 µg/kgと算出された⁴⁾。これら値は、本研究で算出した日本人においてばく露量の10倍以上に相当し、小麦加工品の摂取量や汚染レベルの差が原因と考えられる。EFSAは、エンニアチン混合物のマウスにおけるLD₅₀ 350 mg/kg 体重を踏まえ、このばく露量においてはヒトに対する急性的な毒性影響の懸念は低いと結論付けている。日本におけるENsによる健康影響の懸念として、ライ麦において4種のENsの合算値が60mg/kgを超えて検出された検体が認められており、一過性の高ばく露が生じる可能性がある。毒性に関する新たな知見が明らかになった場合、リスク評価を再実施する必要があると考えられた。

③STC

2016～2018年度に厚生労働科学研究により実施されたSTCの汚染調査において、玄米や小麦粉においてSTC汚染が認められたことから、2019～2021年度にはそれら食品について調査を継続するとともに、加工品についての調査も行った。その結果、小麦を原料としたパン、麺類及び菓子類においてSTCが検出された。一部の麺類では、小麦粉で検出される濃度を上回るSTCが検出された検体があり、小麦加工品がSTCの主要なばく露源となっていると考えられた。玄米において、小麦加工品より高頻度かつ

高濃度で STC が検出されたが、精米からは検出限界以上の濃度で検出された検体は認められなかった。精米作業により、STC が除去されたと考えられた。これらの結果を踏まえ、小麦加工品からの日本人における STC のばく露量を推定した結果、平均的な日本人におけるばく露量は 0.02~0.04 ng/kg 体重/日となった。2017 年に公表された JECFA による STC のリスク評価の結果において、アフリカ地域及びカナダにおける平均ばく露量は 16~17 及び 0.3~6.3 ng/kg と推定されている⁶⁾。それら地域と比較すると日本人におけるばく露量は非常に小さい結果となった。平均的な日本人における STC の MOE は 10,000 を上回っており、健康に対する影響は少ないと考えられる。ただ、2004~2006 年度に厚生労働科学研究で実施された日本に流通する食品中のアフラトキシン B1 の汚染実態調査結果を基に行われたばく露量推定の結果⁷⁾では、80%ile 値は 0、90%ile 値は 0.001、95%ile 値は 0.003~0.004 ng/kg 体重/日であり、今回算出された STC のばく露量はアフラトキシン B1 の 20~30 倍であった。STC の毒性がアフラトキシン B1 よりも低いとされていることを勘案しても、日本人におけるカビ毒による肝臓ガン発症のリスク評価を実施する際には STC も考慮に入れる必要があると考えられる。また、玄米から小麦加工品を超える濃度で STC が検出されており、玄米の高摂取群においては STC による健康リスクが高い可能性がある。米や小麦を対象とした STC の汚染調査を継続し、高汚染検体の発生等を監視する必要があると考えられた。

E. 結論

新興カビ毒として健康へのリスクに注目が集まっているカビ毒について、分析法の確立と汚染実態調査を行った。その結果を用い、タイプ A トリコセシン系化合物、BEA と ENs 及び STC の日本人におけるばく露量推定を行った結果、

いずれも直ちに日本人の健康に影響を与える汚染レベルでは無いことが明らかになった。ただし、ライ麦、ハト麦及びきな粉における T-2 トキシンと HT-2 トキシン汚染、ライ麦における ENs 汚染、玄米における STC 汚染など、比較的高レベルの汚染が一部の食品目で認められた。これら食品は主食ではないため摂取量は多くは無いが、突発的な高汚染の発生などにより健康被害が生じる可能性は否定できず、今後も汚染レベルの監視を行っていく必要が考えられた。

F. 参考

- 1) World Health Organization. 2017. Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical Report Series, No. 1002:40-54.
- 2) European Food Safety Authority. 2018. Risk to human and animal health related to the presence of 4,15 - diacetoxyscirpenol in food and feed. EFSA Journal 16(8):5367.
- 3) Yoshinari 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) World Health Organization. 2017.

Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical Report Series, No. 1002:106–122.

- 7) Sugita-Konishi Y et al. Exposure to aflatoxins in Japan: risk assessment for aflatoxin B1. Food Addit. Contam. Part A. 2010;27(3):365-372.

表1 タイプAトリコテセン系化合物の汚染調査結果
(2019～2021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)
小麦粉 (輸入)	66	0	—	—	21	0.04	0.7	14	0.2	5.0	0.3	5.7
小麦粉 (国産)	72	6	0.007	0.2	36	0.1	1.1	26	0.8	16.0	0.9	17.1
ライ麦粉	89	0	—	—	70	0.4	5.6	73	2.0	29.3	2.4	34.9
ハト麦加工品	63	75	4.4	22.4	56	1.8	27.0	51	2.5	33.0	8.7	48.2
玄米	20	0	—	—	0	—	—	0	—	—	—	—
コーンフラワー	32	75	0.2	0.5	66	0.4	2.1	53	0.5	2.3	0.6	2.6
きな粉	40	20	0.05	0.6	70	2.7	32.0	65	6.1	62.7	8.8	95.4
そば粉	20	5	0.004	0.07	90	0.6	2.4	70	1.5	6.7	2.1	9.1
ゴマ	30	7	0.005	0.08	0	—	—	0	—	—	0.005	0.08
あんこ	15	0	—	—	13	0.01	0.1	33	0.2	1.2	0.2	1.3
ビール	30	0	—	—	37	0.05	0.2	43	0.3	1.4	0.3	1.6

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2 BEA と ENs の汚染調査結果 (2019~2021 年度)

食品目	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)
小麦粉 (国産)	94	23	0.5	4.5	18	0.6	14.2	48	3.7	30.3
小麦粉 (輸入)	66	27	1.2	11.3	8	0.2	3.3	5	0.1	3.0
大麦	20	5	0.07	1.5	0	-	-	10	0.1	1.9
ライ麦粉	121	17	1.4	50.2	25	2.8	115.3	60	31.9	1468
ハト麦加工品	88	74	9.7	127.9	0	-	-	0	-	-
米・玄米	60	7	0.3	8.5	0	-	-	0	-	-
コーンフラワー	21	76	6.0	19.7	0	-	-	0	-	-
そば粉	37	24	0.3	5.1	0	-	-	0	-	-
雑穀	20	40	4.6	43.0	0	-	-	0	-	-
きな粉	30	63	13.5	101.5	7	0.1	3.3	3	0.2	5.1
ゴマ	30	50	3.4	19.1	0	-	-	0	-	-
コーヒー	60	7	0.2	6.6	0	-	-	0	-	-
レーズン	11	0	-	-	0	-	-	0	-	-

表2 BEA と ENs の汚染調査結果 (2019~2021 年度) つづき

食品目	調査数	ENB			ENB1		
		陽性率 (%)	平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	陽性率 (%)	平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
小麦粉 (国産)	94	84	79.7	830.4	77	24.4	232.7
小麦粉 (輸入)	66	76	6.4	41.5	62	2.3	10.5
大麦	20	40	2.9	29.5	25	0.9	8.3
ライ麦粉	121	88	987.3	48783	80	255.7	12589
ハト麦加工品	88	2	0.1	8.1	1	0.0	1.9
米・玄米	60	8	0.2	3.6	2	0.1	2.5
コーンフラワー	21	0	-	-	0	-	-
そば粉	37	5	0.05	1.1	0	-	-
雑穀	20	20	3.0	43.0	15	0.6	8.1
きな粉	30	67	3.5	23.9	43	1.4	13.9
ゴマ	30	0	-	-	0	-	-
コーヒー	60	5	0.1	3.3	0	-	-
レーズン	11	0	-	-	0	-	-

検出限界値 : BEA 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ENA 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ENA1 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ENB 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ENB1 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$
 定量限界値 : BEA 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ENA 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ENA1 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ENB 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ENB1 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$

表3 STCの汚染調査結果
(2019～2021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	60	72	0.4	5.7
小麦粉 (国産)	72	24	0.05	1.3
小麦粉 (輸入)	66	5	0.003	0.07
パン・パン粉	50	26	0.03	0.2
ソバ (乾麺)	90	70	0.2	1.0
ビスケット	60	10	0.01	0.2
スパゲッティ	43	7	0.02	0.8
うどん (乾麺)	51	20	0.02	0.2
ラーメン	15	27	0.02	0.1

表4 タイプA トリコテセン系化合物の推定ばく露量

年齢区分		推定ばく露量 (μg/kg 体重/日)				平均値
		パーセンタイル値				
		50	90	95	99	
全年齢	LB	0	0.57	1.50	5.91	0.30
	UB	0.16	0.70	1.55	5.86	0.44
1～6歳	LB	0	1.46	4.02	14.65	0.75
	UB	0.41	1.62	3.92	14.02	1.09

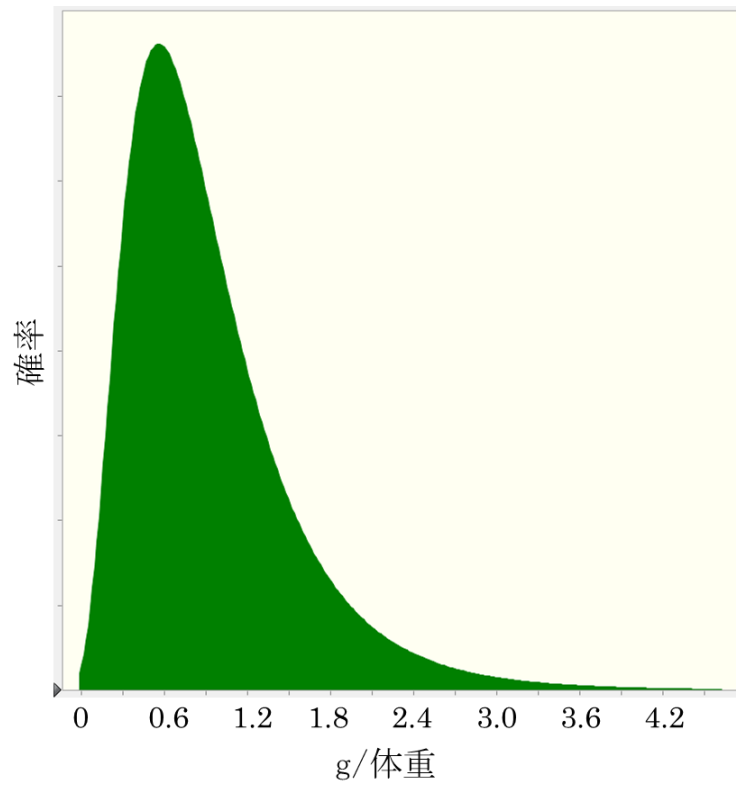
表 5 ENs の推定ばく露量

年齢区分		推定ばく露量 (μg/kg 体重/日)				平均値
		パーセンタイル値				
		50	90	95	99	
全年齢	LB	5.2	35.0	81.3	346.4	22.0
	UB	5.6	35.8	82.5	352.5	22.6
1～6歳	LB	15.2	84.1	211.5	848.9	54.6
	UB	16.7	86.3	221.3	857.5	56.9

表 6 STC の推定ばく露量

	推定ばく露量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日)				平均値
	パーセンタイル値				
	50	90	95	99	
LB	0.02	0.07	0.10	0.25	0.02
UB	0.02	0.07	0.11	0.26	0.04

(A)



(B)

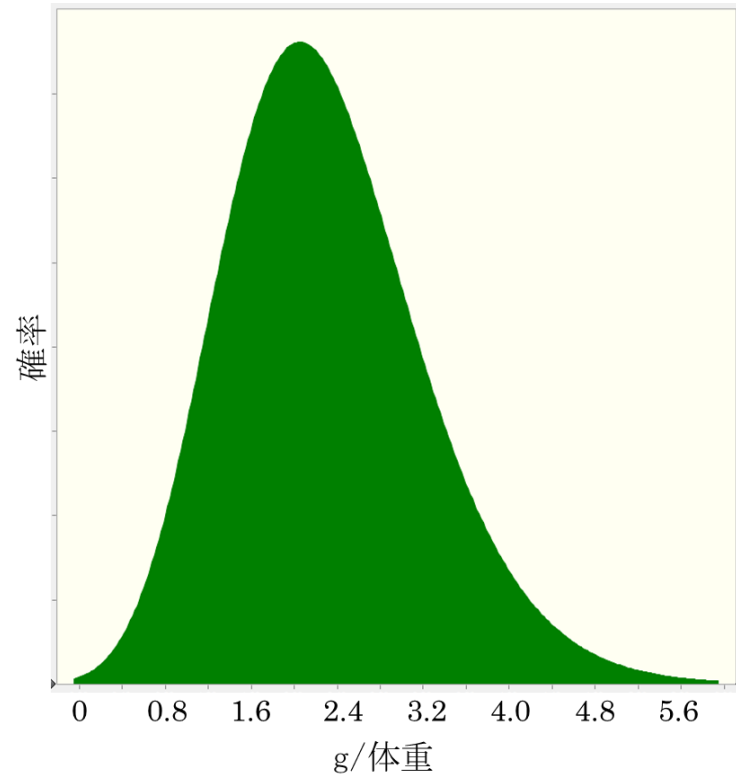


図1 全年齢 (A) 及び 1~6歳 (B) における小麦加工品の摂取量の分布図

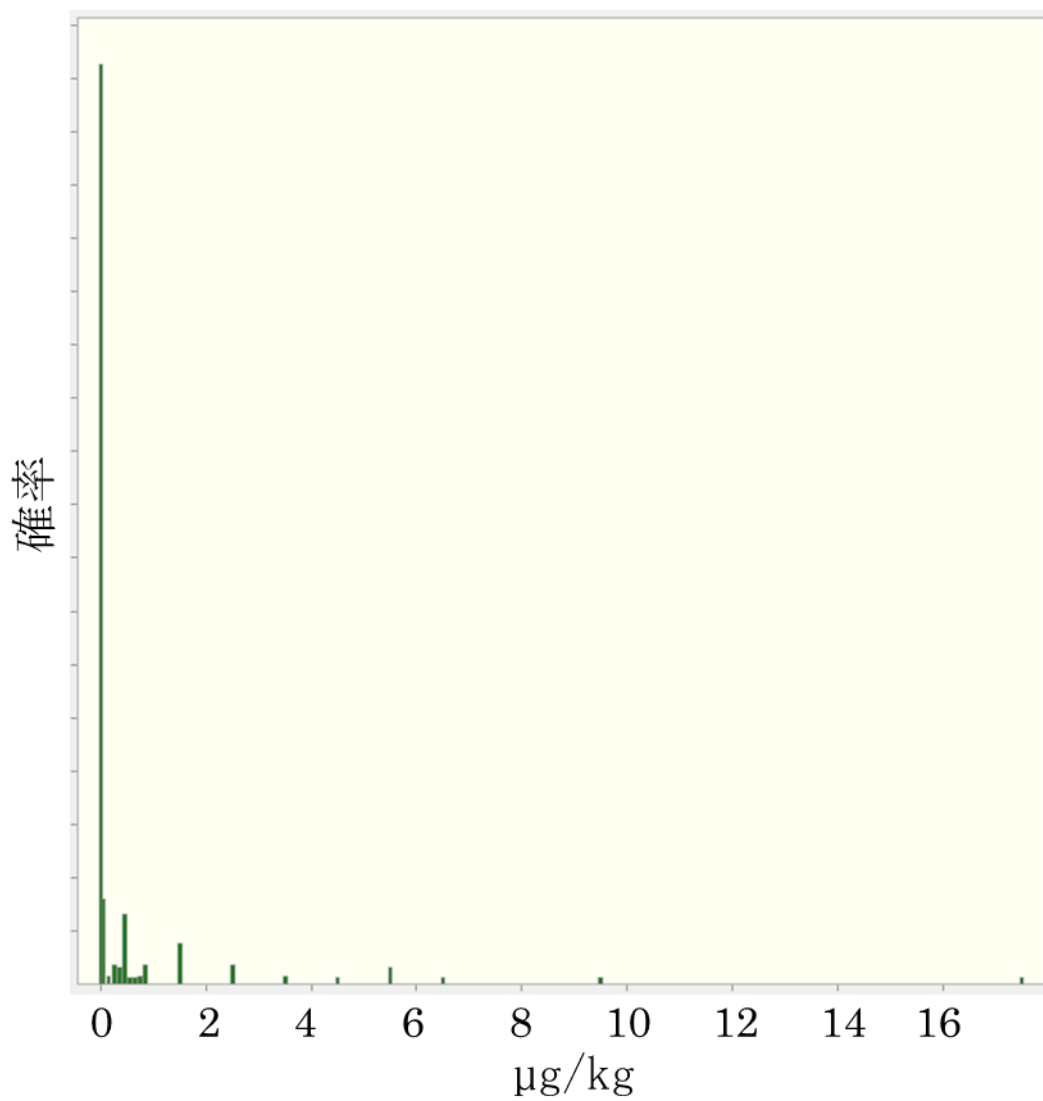


図2 小麦粉における3種のタイプAトリコテセン系化合物汚染量の分布

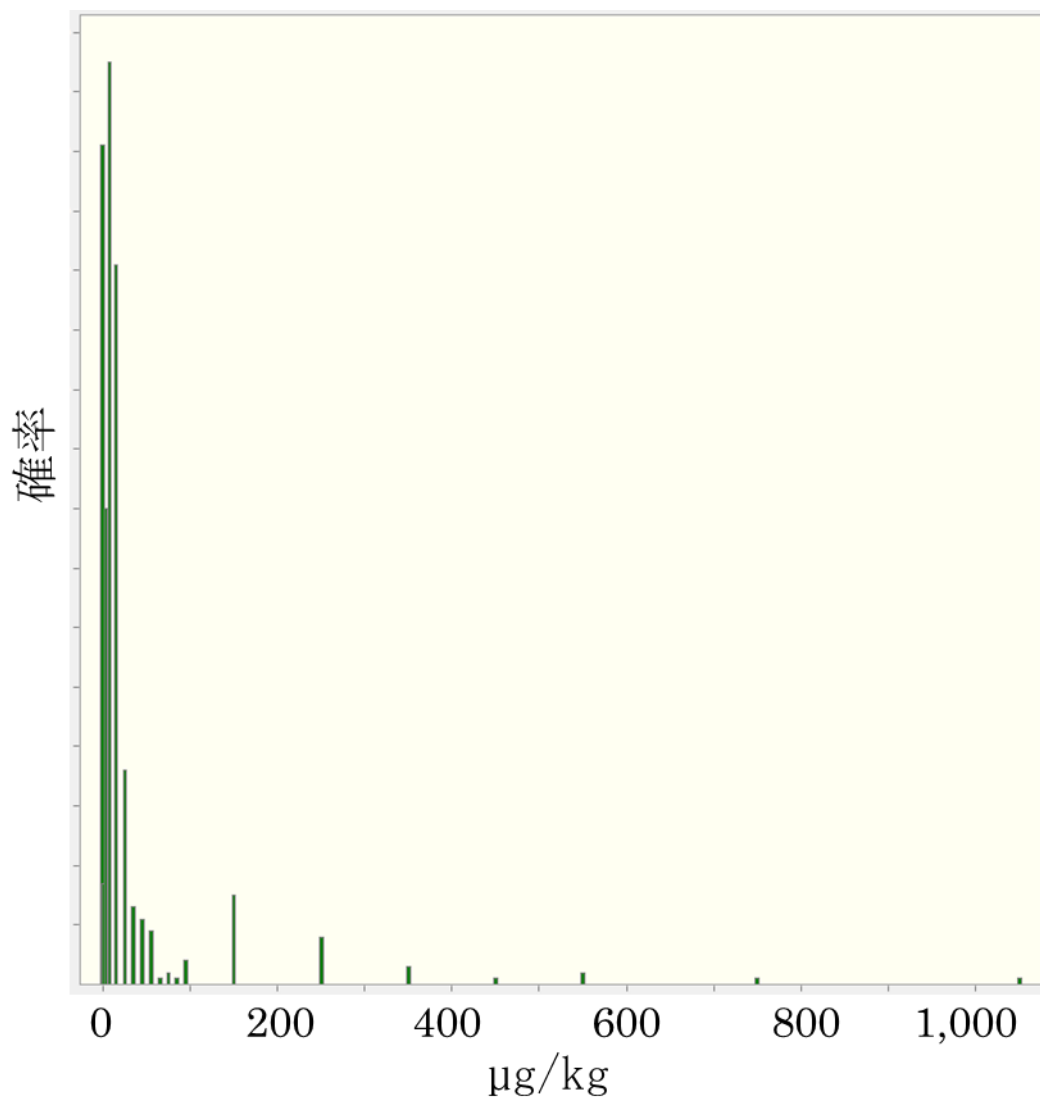


図3 小麦粉における ENs 汚染量の分布

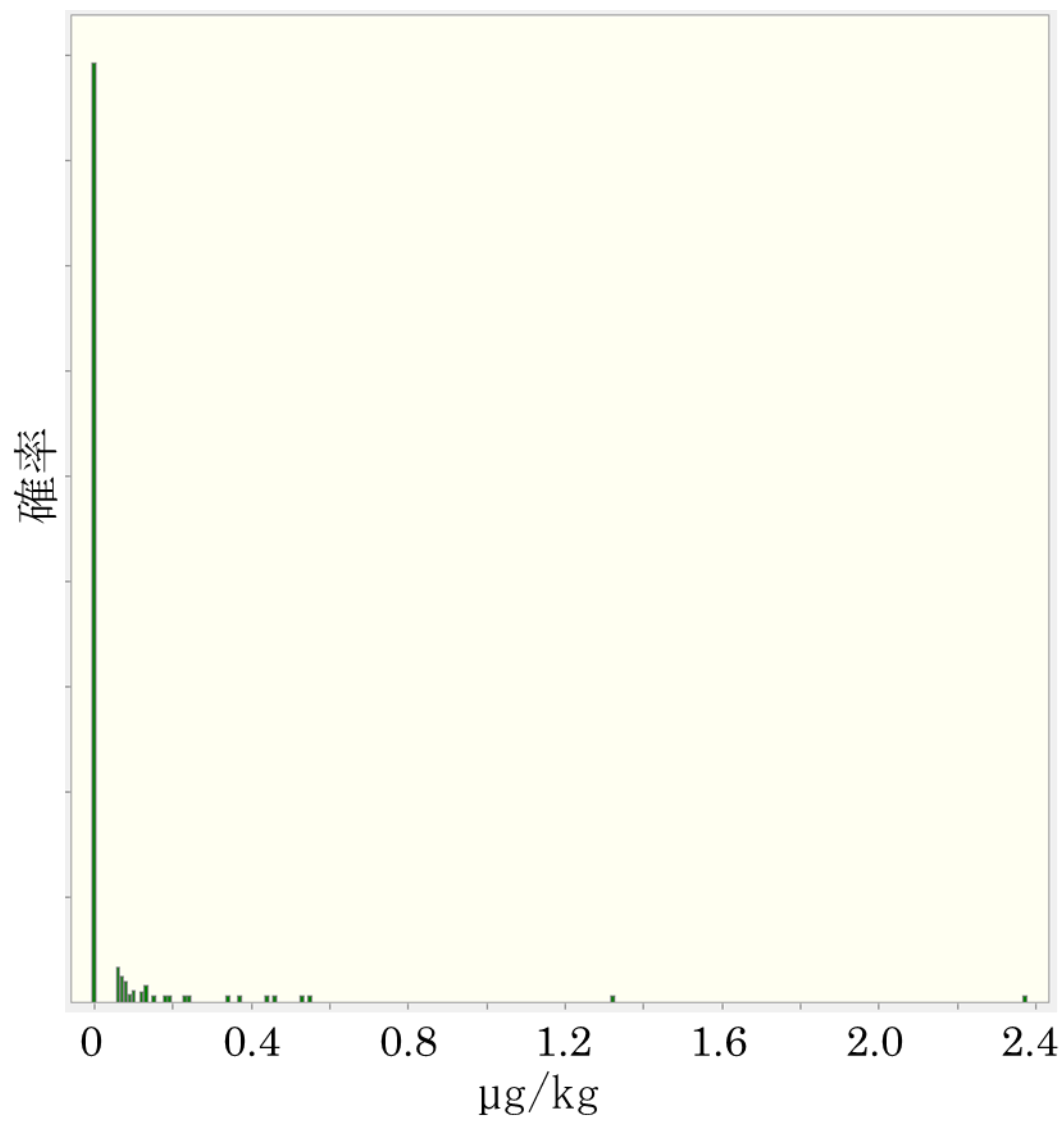


図4 小麦粉におけるSTC汚染量の分布

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)

総合研究報告書

エンニアチン類の毒性試験
(2019～2021 年度)

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ため、2019 年度には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なかった。2020 年度にはエンニアチン B 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 30 mg/kg、公比 2、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ところ、エンニアチン B 投与群で摂餌量の変化や RBC 値の低値、BUN 値の高値、腎臓絶対重量の高値が認められた。しかしながら、病理組織学的検査においてエンニアチン B の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量は最高用量の 30 mg/kg となった。上記 2 試験で明らかな毒性が検出されない原因として、エンニアチン B の吸収性が低い可能性が考えられたため、2021 年度にはマウスにおけるエンニアチン B の薬物動態試験と肝臓の遺伝子発現解析を実施した。エンニアチン B の血中動態解析から、マウスにおける高い経口バイオアベイラビリティ (85.6%) が確認された。また、肝臓の遺伝子発現解析ではシトクローム P450 をコードした遺伝子を含む、多くの代謝関連遺伝子の発現がエンニアチン B の経口投与によって増加することが明らかになった。これらの結果から、エンニアチン B がマウスの経口投与によって十分に吸収され、肝臓における代謝を受けた可能性が示唆された。以上より、エンニアチン B の毒性が当初の想定と比較して低い可能性があり、エンニアチン B は経口投与により吸収されるものの、一般毒性は今回用いた用量より高い用量で出現するものと考えられた。

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エンニアチン類が検出されており、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 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、無毒性量が求められている。しかし、公比が大きいかつ用量依存性の乏しいデータが多く、より正確な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た。

そこで、2019 年度にマウスのエンニアチン類混合物 (エンニアチン B : エンニアチン B1 : エンニアチン A1 = 4 : 4 : 1) の 28 日間反復経口投与毒性試験を、2020 年度にエンニアチン B 単体を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。2021 年度には、マウスにおけるエンニアチン B の経口投与後の吸収性を把握することを目的に、マウスにおけるエンニアチン B の薬物動態試験を実施した。また、エンニアチンは肝臓のシトクローム P450 を介して代謝されることから、肝臓の遺伝子発現解析を実施した。

B. 研究方法

<2019 年度>

(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±3°C、湿度 50±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。

エンニアチン類混合物 (B : B1 : A1 = 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。エンニアチン B の 42 日間反復投与毒性試験 (Maranghi et al., EFSA, 2018) 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、それらの変化を以て上記の投与量が設定された。群構成表を Table 1 に示した。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。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) 染色標本を作製し、鏡検した。

(2) 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。

(3) 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。

（4）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。

（5）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。

（6）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。

（7）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。

（8）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。

（9）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、Dunnnett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。

<2020年度>

（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±3°C、湿度50±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。

エンニアチン B を dimethyl sulfoxide 添加コーン油で調製した被験液を 0、7.5、15、30 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。エンニアチン B の 42 日間反復投与毒性試験（Maranghi et al., EFSA, 2018）において、18 mg/kg 群で有意な体重増加抑制が観察されている。また 2019 年度の試験では、投与に起因した変化として高用量群（20 mg/kg）の雌雄の摂餌量に若干の低値がみられた。本試験では、上記 2 試験との投与期間や被験物質の違いを考慮して 30 mg/kg 体重を最高投与量として設定した。群構成表を Table 5 に示した。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、血液学検査と血液生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）染色標本を作製し、鏡検した。

一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液学検査、血液化学検査、剖検、器官重量測定、病理組織学検査、統計解析については、2019 年度と同様に行った。

<2021 年度>

（1）動物実験

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。動物は空調設備の整った動物飼育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±2°C、湿度 50±15% の制御環境下で飼育した。飼育期間中は 1 ケージあたり 4~5 匹の動物を収容し、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。

群構成は溶媒対照群（5 匹）、エンニアチン B 30 mg/kg-経口投与群（10 匹）及びエンニアチン B 1 mg/kg-静脈内投与群（10 匹）の 3 群構成とした（Table 6）。溶媒は 6%濃度の dimethyl sulfoxide となるように、1 群では corn oil、2 群では生理食塩水に混じて調製した。6 週齢の雄性マウスにエンニアチン B を経口又は尾静脈内投与し、血中エンニアチン B 濃度測定のために各時点において血液を採取した。また、糞中エンニアチン B 濃度測定のために、一定期間に各群 5 匹の糞を採材した。投与から 2 時間後には各群 5 匹を剖検に供し、肝臓（約 30 mg/サンプル）を採材して遺伝子発現解析に用いた。肝臓サンプルは、直ちに液体窒素で凍結し、total RNA 抽出まで-80°Cで保存した。解剖時及び実験終了時には当該動物を CO₂/O₂ ガスによる深麻酔下で腹大動脈から放血死させた。

（2）一般状態の観察

馴化期間中、投与前、投与直後及び 24 時間後の間に実施した。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。また、投与日の 6 及び 5 日前、群分け日、投与日に体重測定を実施した。

（3）血中エンニアチン B 濃度測定

採血はエンニアチン B 投与前及び投与から 5、30 分、2 時間後、もしくは 10 分、1、4、8、24 時間後に各群 5 匹ずつの PARTIAL サンプルリングを実施した。各時点で顔面静脈にアニマルランセットを穿刺し、EDTA-2K 抗凝固処理済みの採血管を用いて、約 50-70 µL 採血した。採取した血液はチューブに移して速やかに氷冷し、遠心分離（9,000×g、2 分、約 4°C）して上清（血漿）を新しいチューブに約 10-20 µL 採取した。血漿は移管まで-80°Cフリーザー

にて凍結保存した。血漿は 85%アセトニトリルによる抽出及び C18 カートリッジによる精製を実施した後、LC-MS/MS によってエンニアチン B 濃度を測定した。

(4) 糞中エンニアチン B 濃度測定

溶媒対照群で投与時～2 時間後、他 2 群で投与から 4 時間後～8 時間後及び 8 時間後～24 時間後の間に排泄された全ての糞を対象とした。採取した糞は重量を測定し、チューブに移して-80℃フリーザーにて凍結保存した。抽出については、チューブに 85%アセトニトリルを添加した後、チューブ内で糞をよく破壊し、遠心後 (9,000×g、2 分、約 4℃)、上清の試験溶液を回収した。次いで、C18 カートリッジを用いて精製し、LC-MS/MS によってエンニアチン B 濃度を測定した。

(5) 薬物動態パラメータの算出

各時点の平均濃度に基づき、最高血中濃度 (C_{max})、最高血中濃度到達時間 (t_{max})、血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) を求めた。最終測定時点以降の AUC については、無限大時間までの外挿により算出した。また、静脈内投与後データでは時間 0 への外挿を行った。経口投与群及び尾静脈内投与群における AUC から、バイオアベイラビリティを推定した。

(6) 遺伝子発現解析

エンニアチン B による代謝関連遺伝子の転写レベルの発現変化を検出するために、溶媒対照群と経口投与群の肝臓サンプルを用いて遺伝子発現解析が行われた。RNeasy Mini キット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて組織試料から total RNA を抽出した。抽出した total RNA は、RNA-Seq 解析 (n=5/グループ、1 サンプルとしてプール) に使用された。TruSeq stranded mRNA LT Sample Prep Kit (イルミナ株式会社) を用いて、メーカーのプロトコルに従ってサンプル調製を行い、配列決定には Illumina NovaSeq 6000

を用いた。溶媒対照群と比較して Fold Change (絶対値) ≥ 2 かつ p-value < 0.05 で発現量が増加または減少している遺伝子を選別し、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), version 6.8 により Gene Ontology (GO) に基づくエンリッチメント解析を行った。

(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 (動愛法) を遵守し、実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (環境省告示第 88 号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文部科学省告示第 71 号)、厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針 (厚生労働省通知 科発 0601002 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) の指針およびガイドラインに即して設けられた東京農工大学実験動物取り扱い倫理規程に則り、東京農工大学動物実験小委員会の了承を得て適切に動物実験を実施した。

C. 研究結果

<2019 年度>

(1) 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。

(2) 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 7)。

(3) 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 (Table 8)。

(4) 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 9)。

(5) 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 10)。

(6) 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。計画剖検では溶媒対照群の雌 1 例 (動物番号: 1102) に肝臓の一部暗調化がみられた (Table 11)。

(7) 器官重量

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 (Table 12)。

(8) 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的変化がみられたが、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 13)。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。計画剖検時に溶媒対照群の雌 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。

<2020 年度>

(1) 一般状態の観察

いずれの群においても変化は認められなかった。

(2) 体重の変化

いずれの群においても投与期間中の体重に有意な変化は認められなかった (Table 14)。

(3) 摂餌量の変化

雄では投与 1 日の高用量群、投与 14 日の低・高用量群、投与 21 日の中・高用量群、投与 28 日の高用量群に対照群と比較し高値がみられた。雌では投与 14 日の低用量群、投与 21 日の低用量群、投与 28 日の低・高用量群に対照群と比較し低値がみられた (Table 14)。

(4) 血液学検査結果

雄では高用量群に RBC 値の低値が認められた。雌で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 (Table 15)。

(5) 血液化学検査

雄では高用量群に BUN 値の高値が認められた。雌で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 (Table 16)。

(6) 剖検 (肉眼所見)

計画剖検では低用量群の雄 1 例 (動物番号: 2002) に精巣の白色巣、低用量群の雌 1 例 (動物番号: 2103) に肝臓の白色巣、中用量群の雄 1 例 (動物番号: 3003) に膝関節の隆起巣、高用量群の雄 1 例 (動物番号: 4004) に精巣の小型化がみられた (Table 17)。

(7) 器官重量測定結果

高用量群の雄の腎臓絶対重量が対照群と比較し高値を示した。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 18)。

(8) 病理組織学検査結果

計画剖検例のいずれの群にも諸臓器に偶発性的変化がみられたが、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 19)。計画剖検時に低用量群の雄 1 例にみられた精巣の白色巣は精液瘤、低用量群の雌 1 例にみられた肝臓の白色巣は壊死、中用量群の雄 1 例にみられた膝関節の隆起巣は仮骨形成、高用量群の雄 1 例にみられた精巣の小型化は精細管の変性/萎縮であった。

<2021 年度>

(1) 一般状態及び体重

いずれの群においても変化は認められなかった。

(2) 血中エンニアチン B 濃度

経口投与群において、サンプル処理の誤りのため 1 サンプルを解析から除外した。また、尾静脈投与群では血中から被験物質が検出されなかった 3 サンプルを解析から除外した。したがって、サンプル数は溶媒対照群、経口投与群、尾静脈投与群でそれぞれ 5、9、7 であった。サンプリングデータを Table 20 及び Table 21 に示した。

(3) 糞中エンニアチン B 濃度

上記のサンプル除外により、サンプル数は溶媒対照群、経口投与群、尾静脈内投与群でそれぞれ 5、4、4 であった。経口投与群において、エンニアチン B 投与量の平均 5.26% のエンニアチン B が検出された。尾静脈内投与群ではごく微量のエンニアチン B が検出されるのみであった (Table 22)。

(4) エンニアチン B の薬物動態

各時点の平均濃度に基づいて、薬物動態パラメータを算出した。経口投与群において、 C_{max} は 1024 ng/mL、 t_{max} は投与後 1 時間、AUC は 6008 ng・hr/mL と算出された。尾静脈内投与群における AUC は 234 ng・hr/mL と算出された。投与用量は経口投与群が 30 mg/kg、尾静脈内投与群が 1 mg/kg であるが、線形動態に従い、AUC が投与量に比例して増加すると仮定した場合、バイオアベイラビリティは 85.6% と推定された。

(5) RNA-Seq 解析

経口投与群では、溶媒対照群と比較して、553 遺伝子の発現が増加した。発現が増加した遺伝子の GO term に基づいたエンリッチメント解析では、有機物、窒素化合物及び薬物等に対する反応や、代謝プロセスの制御に関連した GO が濃縮された (Table 23)。発現が増

加した遺伝子群には、シトクローム P450 をコードする遺伝子が多く含まれていた (*Cyp1b1*、*Cyp2a5*、*Cyp2b10*、*Cyp2a12*、*Cyp7a1*、*Cyp21a1*、*Cyp26a1*)。

D. 考察

2019 年度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。本試験はエンニアチン類の混合物を用いており、EFSA が公表した、マウスを用いたエンニアチン B の 42 日間の反復投与試験 (Maranghi et al., EFSA, 2018) と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。

2020 年度にはエンニアチン B 単体を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。本試験では被験物質の影響と考えられる変化として、摂餌量の変化や RBC 値の低値、BUN 値の高値、腎臓絶対重量の高値が認められた。しかしながら、剖検時に血液学及び血液化学検査結果と符号する肉眼所見は得られず、また病理組織学的検査においても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。したがって、最小毒性量を求めることは出来ず、無毒性量は 30 mg/kg という結果となった。エンニアチン B はブロイラーでの経口投与後の吸収性が低いことが文献的に示唆されており、マウス 28 日間毒性試験での明らかな毒性が検出されない理由として、マウスにおいても吸収性が低く、糞中に排泄されている可能性が考えられた。

2021 年度は、マウスにおけるエンニアチン B の経口投与後の吸収性を把握することを目的に、マウスにおけるエンニアチン B の薬物動態試験を実施した。エンニアチン B の血中動態解析からは、マウスにおける高い経口バ

イオアベイラビリティ (85.6%) が確認された。経口投与群の糞中にはエンニアチン B が検出されたが、エンニアチン B 投与量の平均 5.26% であった。また、肝臓の遺伝子発現解析ではシトクローム P450 をコードした遺伝子を含む、多くの代謝関連遺伝子の発現がエンニアチン B の経口投与によって増加することが明らかになった。したがって、エンニアチン B がマウスの経口投与によって十分に吸収され、肝臓における代謝を受けた可能性が示唆された。全身循環前の代謝 (presystemic metabolism) の存在や ATP Binding Cassette トランスポーターの発現が吸収に影響を与えることから、エンニアチン B は個体及び動物種ごとに異なる複雑な動態を示す可能性があることが指摘されている (Fraeyman et al., 2017)。本試験と相反して、ブロイラーにおけるエンニアチン B の経口投与後の低い吸収性が報告されているが、上記のような種差や生体内変化の違いが影響している可能性が考えられた。

上述のように、2019 年度及び 2020 年度に実施した 28 日間反復経口投与試験では、いずれも明らかな毒性が検出されなかった。これらの結果と、マウスでは経口投与によりエンニアチン B が十分に吸収されることを勘案すると、エンニアチン B の毒性が当初の想定と比較して低い可能性が示唆された。以上より、エンニアチン B は経口投与により吸収される

ものの、一般毒性は今回用いた用量より高い用量で出現するものと考えられた。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Okano, H., Okamura, T., Takahashi, Y., Takashima, K., Ojiro, R., Tang, Q., Jin, M., Kikuchi, S., Ogawa, B., Yoshida, T., Yoshinari, T., Shibutani, M.: A 28-day repeated oral dose toxicity study of enniatin complex in mice. *J. Toxicol. Sci.* 46(4), 157–165, 2021.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Table 1. 群構成表（エンニアチン類混合物の 28 日間反復経口投与試験）

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	10	1001~1010
				雌	10	1101~1110
低用量群	0.8	0.16	5	雄	10	2001~2010
				雌	10	2101~2110
中用量群	4	0.8	5	雄	10	3001~3010
				雌	10	3101~3110
高用量群	20	4	5	雄	10	4001~4010
				雌	10	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/陰	√/√	
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)	√*	

組 織	H・E 標本作製	重量測定
大腿部骨格筋	√*	
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. 群構成表（エンニアチン B の 28 日間反復経口投与試験）

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	10	1001~1010
				雌	10	1101~1110
低用量群	7.5	1.5	5	雄	10	2001~2010
				雌	10	2101~2110
中用量群	15	3	5	雄	10	3001~3010
				雌	10	3101~3110
高用量群	30	6	5	雄	10	4001~4010
				雌	10	4101~4110

Table 6. 群構成表 (エンニアチン B の薬物動態試験)

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数
溶媒 対照群	0	0	5	雄	5
経口 投与群	30	6	5	雄	10
尾静脈内 投与群	1	0.2	5	雄	10

Table 7. 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 8. 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 9. 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 10. 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 11. 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 12. 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 13. 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.

Table 14. 体重・摂餌量の変化

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (Control)	7.5	15	30
Males					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)	Day 1	28.8 ± 1.5 ^a	29.0 ± 1.3	28.8 ± 1.1	29.0 ± 1.0
	Day 4	29.5 ± 1.6	30.1 ± 1.7	29.1 ± 1.2	29.7 ± 1.0
	Day 7	30.2 ± 1.5	31.4 ± 1.9	30.0 ± 1.1	30.4 ± 1.2
	Day 14	31.0 ± 1.5	32.4 ± 2.4	31.3 ± 1.4	31.6 ± 1.1
	Day 21	31.7 ± 2.0	33.0 ± 2.3	32.5 ± 1.6	32.8 ± 1.5
	Day 28	32.4 ± 2.1	34.0 ± 2.5	33.2 ± 1.5	33.6 ± 1.8
Food consumption (g/animal/day)	Day 1	4.5 ± 0.6	4.7 ± 0.5	4.9 ± 0.5	5.1 ± 0.4*
	Day 4	4.4 ± 0.4	4.6 ± 0.5	4.3 ± 0.4	4.6 ± 0.5
	Day 7	4.1 ± 0.5	4.5 ± 0.5	4.3 ± 0.6	4.6 ± 0.3
	Day 14	3.9 ± 0.2	4.3 ± 0.4*	4.3 ± 0.4	4.4 ± 0.2*
	Day 21	3.8 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.4**	4.4 ± 0.3**
	Day 28	4.0 ± 0.3	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.5 ± 0.4*
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)	Day 1	23.1 ± 1.3	23.2 ± 1.7	23.0 ± 1.8	23.1 ± 0.9
	Day 4	23.4 ± 1.2	23.3 ± 1.6	23.4 ± 1.5	23.4 ± 1.2
	Day 7	23.9 ± 1.2	23.4 ± 1.5	23.8 ± 1.8	24.3 ± 1.0
	Day 14	25.0 ± 1.4	24.2 ± 1.5	25.2 ± 1.8	25.2 ± 1.3
	Day 21	26.0 ± 1.7	25.4 ± 1.0	26.0 ± 1.8	26.0 ± 1.4
	Day 28	26.6 ± 2.1	26.0 ± 1.3	26.7 ± 1.9	26.7 ± 1.5
Food consumption (g/animal/day)	Day 1	4.3 ± 0.6	3.9 ± 0.8	3.9 ± 0.5	3.9 ± 0.4
	Day 4	3.9 ± 0.4	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.3
	Day 7	4.0 ± 0.4	3.6 ± 0.5	3.9 ± 0.6	3.8 ± 0.5
	Day 14	4.3 ± 0.4	3.7 ± 0.3**	4.0 ± 0.3	4.0 ± 0.2
	Day 21	4.5 ± 0.6	3.8 ± 0.3**	4.1 ± 0.4	4.1 ± 0.3
	Day 28	4.6 ± 0.5	4.0 ± 0.3**	4.3 ± 0.4	4.1 ± 0.4*

^a Mean ± SD.* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Table 15. 血液学検査結果

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (Control)	7.5	15	30
Males					
	No. of animals examined	10	10	10	10
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)		928 \pm 38 ^a	913 \pm 35	912 \pm 60	880 \pm 32*
Hemoglobin (g/dL)		14.3 \pm 0.7	14.2 \pm 0.5	13.9 \pm 0.7	13.7 \pm 0.6
Hematocrit (%)		47.3 \pm 2.1	46.8 \pm 1.5	46.3 \pm 1.9	45.6 \pm 1.6
MCV (fL)		51.0 \pm 0.7	51.3 \pm 1.1	50.9 \pm 2.4	51.9 \pm 1.3
MCH (pg)		15.4 \pm 0.3	15.6 \pm 0.4	15.3 \pm 0.7	15.6 \pm 0.4
MCHC (g/dL)		30.2 \pm 0.4	30.4 \pm 0.3	30.0 \pm 0.4	30.1 \pm 0.5
RDW (%)		12.2 \pm 0.4	12.3 \pm 0.4	12.5 \pm 0.7	12.5 \pm 0.4
Reticulocytes ($10^9/\text{L}$)		318.3 \pm 35.6	325.3 \pm 32.0	332.9 \pm 41.0	330.4 \pm 30.9
Platelets ($10^4/\mu\text{L}$)		121.5 \pm 10.0	124.1 \pm 14.4	118.5 \pm 11.0	117.4 \pm 11.9
WBC ($10^2/\mu\text{L}$)		42.7 \pm 14.6	57.4 \pm 24.8	55.0 \pm 22.3	51.5 \pm 23.3
Differential leukocyte counts ($10^2/\mu\text{L}$)					
Lymphocytes		32.6 \pm 13.0	45.0 \pm 21.4	38.5 \pm 16.4	41.0 \pm 18.8
Neutrophils		7.6 \pm 2.1	9.4 \pm 3.6	13.3 \pm 12.1	7.7 \pm 3.6
Eosinophils		1.4 \pm 0.6	1.5 \pm 0.7	1.9 \pm 1.0	1.5 \pm 0.8
Basophils		0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1
Monocytes		0.9 \pm 0.4	1.1 \pm 0.5	1.1 \pm 0.4	1.0 \pm 0.5
Large unstained cells		0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.3	0.2 \pm 0.3
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)		936 \pm 57	903 \pm 27	929 \pm 52	921 \pm 37
Hemoglobin (g/dL)		14.9 \pm 0.7	14.4 \pm 0.6	14.6 \pm 0.7	14.6 \pm 0.4
Hematocrit (%)		48.9 \pm 1.9	47.4 \pm 1.5	48.1 \pm 2.4	48.1 \pm 1.4
MCV (fL)		52.3 \pm 1.7	52.5 \pm 0.9	51.9 \pm 0.7	52.2 \pm 1.3
MCH (pg)		15.9 \pm 0.5	16.0 \pm 0.4	15.7 \pm 0.4	15.9 \pm 0.5
MCHC (g/dL)		30.4 \pm 0.5	30.5 \pm 0.5	30.3 \pm 0.5	30.5 \pm 0.6
RDW (%)		13.1 \pm 0.5	13.1 \pm 0.5	12.9 \pm 0.4	13.0 \pm 0.5
Reticulocytes ($10^9/\text{L}$)		363.3 \pm 47.8	362.8 \pm 70.9	337.0 \pm 64.6	358.6 \pm 45.4
Platelets ($10^4/\mu\text{L}$)		101.0 \pm 12.0	101.1 \pm 8.2	107.2 \pm 16.9	109.1 \pm 8.8
WBC ($10^2/\mu\text{L}$)		53.7 \pm 12.0	44.9 \pm 12.7	44.3 \pm 14.5	43.4 \pm 6.4
Differential leukocyte counts ($10^2/\mu\text{L}$)					
Lymphocytes		41.8 \pm 11.0	35.3 \pm 10.8	35.2 \pm 12.0	33.3 \pm 4.9
Neutrophils		8.9 \pm 2.9	6.9 \pm 2.4	6.6 \pm 3.0	7.5 \pm 1.8
Eosinophils		1.7 \pm 0.4	1.6 \pm 0.4	1.4 \pm 0.4	1.5 \pm 0.4
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 0.5	0.8 \pm 0.4	0.9 \pm 0.5	0.0 \pm 0.5
Large unstained cells		0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1

^a Mean \pm SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Abbreviations: MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RBC, red blood cell count; RDW, red blood cell distribution width; WBC, white blood cell count.

Table 16. 血液化学検査結果

	Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
	0 (control)	7.5	15	30
Males				
No. of animals examined	10	10	10	10
Total protein (g/dL)	4.9±0.1 ^a	5.1±0.02	5.0±0.2	4.8±0.1
Albumin (g/dL)	3.3±0.2	3.4±0.3	3.3±0.3	3.2±0.1
A/G ratio	2.0±0.3	2.0±0.2	2.0±0.3	1.9±0.1
AST (IU/L)	39±6	46±11	42±10	39±7
ALT (IU/L)	29±5	39±19	31±5	31±13
LDH (IU/L)	175±65	196±40	199±64	194±54
ALP (IU/L)	216±59	229±56	209±58	256±57
Triglyceride (mg/dL)	80±24	94±28	76±37	101±19
Glucose (mg/dL)	204±16	207±22	202±22	202±28
BUN (mg/dL)	22±3	25±5	26±3	26±5*
Creatinine (mg/dL)	0.11±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02	0.12±0.02
Females				
No. of animals examined	10	10	10	10
Total protein (g/dL)	5.0±0.2	4.8±0.2	4.9±0.2	4.9±0.2
Albumin (g/dL)	3.6±0.2	3.5±0.1	3.7±0.2	3.5±0.2
A/G ratio	2.7±0.2	2.8±0.2	2.9±0.3*	2.7±0.2
AST (IU/L)	47±7	47±10	46±12	49±9
ALT (IU/L)	26±4	28±9	26±8	31±11
LDH (IU/L)	157±53	163±56	161±50	145±39
ALP (IU/L)	310±67	337±77	283±46	327±86
Triglyceride (mg/dL)	78±29	66±12	82±30	76±32
Glucose (mg/dL)	178±21	180±11	172±17	174±18
BUN (mg/dL)	22±4	22±2	21±3	20±3
Creatinine (mg/dL)	0.11±0.02	0.11±0.03	0.11±0.03	0.11±0.02

^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Abbreviations: A/G, albumin/globulin; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; LDH, lactate dehydrogenase.

Table 17. 剖検所見：肉眼所見

	Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
	0 (control)	7.5	15	30
Males				
No. of animals examined	10	10	10	10
All tissues				
Not remarkable	10 ^a	9	9	9
Testes				
Focus, white	0	1	0	0
Small	0	0	0	1
Knee joint				
Focus, raised	0	0	1	0
Females				
No. of animals examined	10	10	10	10
All tissues				
Not remarkable	9	10	10	10
Liver				
Focus, white	1	0	0	0

^aThe number of animals with lesions.

Table 18. 剖検時器官重量

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (control)	7.5	15	30
Males					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight	(g)	32.8±2.2 ^a	34.4±2.6	33.6±1.7	34.0±1.9
Brain	(mg)	476±16	476±32	477±27	470±30
	(mg/100g BW)	1460±109	1391±119	1425±122	1385±99
Thymus	(mg)	37±7	44±13	38±6	41±8
	(mg/100g BW)	113±19	130±41	114±15	121±26
Heart	(mg)	153±31	151±15	153±10	152±10
	(mg/100g BW)	465±68	441±34	458±38	449±24
Lungs	(mg)	169±11	177±14	178±13	177±10
	(mg/100g BW)	517±36	515±36	531±31	522±25
Liver	(g)	1.75±0.11	1.86±0.19	1.88±0.21	1.90±0.13
	(g/100g BW)	5.33±0.30	5.39±0.27	5.59±0.49	5.59±0.31
Spleen	(mg)	81±13	91±18	92±18	96±12
	(mg/100g BW)	247±26	264±41	273±43	282±34
Kidneys	(mg)	430±30	471±45	470±33	487±62*
	(mg/100g BW)	1315±101	1372±89	1401±132	1435±170
Testes	(mg)	231±23	239±30	241±29	209±60
	(mg/100g BW)	705±53	698±95	716±70	615±173
Epididymides	(mg)	88±8	88±4	85±6	86±9
	(mg/100g BW)	268±17	257±21	254±17	255±28
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight	(g)	26.6±2.2	26.5±1.5	27.2±1.7	26.5±1.5
Brain	(mg)	475±28	479±27	471±24	474±35
	(mg/100g BW)	1791±124	1811±81	1734±73	1791±99
Thymus	(mg)	52±14	59±9	50±7	46±9
	(mg/100g BW)	193±46	221±34	186±30	175±33
Heart	(mg)	131±15	121±10	129±13	129±14
	(mg/100g BW)	494±58	456±23	476±46	487±43
Lungs	(mg)	165±10	169±14	170±16	165±15
	(mg/100g BW)	621±35	636±28	623±34	621±35
Liver	(g)	1.46±0.18	1.45±0.14	1.47±0.10	1.42±0.18
	(g/100g BW)	5.47±0.33	5.48±0.38	5.41±0.24	5.34±0.50
Spleen	(mg)	100±15	113±17	101±11	100±17
	(mg/100g BW)	374±43	426±55*	370±36	375±48
Kidneys	(mg)	343±37	320±20	333±44	329±27
	(mg/100g BW)	1287±74	1207±49	1222±100	1244±113
Ovaries	(mg)	12.0±2.9	10.0±2.7	9.8±2.2	11.8±4.5
	(mg/100g BW)	45.2±11.1	37.6±8.4	35.9±7.8	44.0±15.0
Uterus	(mg)	141±40	143±35	150±40	148±40
	(mg/100g BW)	524±111	539±123	556±159	558±140

^a Mean ± SD.

Abbreviations: BW, body weight.

**P* < 0.05, significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Table 19. 病理組織学検査

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (control)	7.5	15	30
Males (End of administration)					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Eye					
	Retinal rosettes	1	0	0	0
	minimal	1	0	0	0
Glandular stomach					
	Dilatation, gland	0	1	0	0
	minimal	0	1	0	0
Kidney					
	Basophilia, tubule	0	1	1	1
	minimal	0	1	1	1
	Cyst	0	0	1	0
	minimal	0	0	1	0
	Mineralization, intraluminal	1	0	1	2
	minimal	1	0	1	2
Liver					
	Necrosis, focal	0	0	1	1
	minimal	0	0	1	1
Testis					
	Spermatocele	0	2 ^b	0	0
	minimal	0	2	0	0
	Degeneration/atrophy, tubule	0	0	0	1 ^b
	mild	0	0	0	1
Bone, femur (knee joint)					
	Callus	0	0	1 ^b	0
	moderate	0	0	1	0
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Eye					
	Retinal rosettes	0	1	0	0
	minimal	0	1	0	0
Harderian gland					
	Infiltrate, mixed inflammatory cell	1	0	0	0
	minimal	1	0	0	0
Kidney					
	Basophilia, tubule	1	0	1	0
	minimal	1	0	1	0
	Mineralization, intraluminal	1	1	1	0
	minimal	1	1	1	0
	Dilation, tubule	0	0	1	0
	minimal	0	0	1	0
	Microabscess	0	0	0	1
	minimal	0	0	0	1
Liver					
	Infiltrate, mixed, inflammatory cell	1	3	1	1
	minimal	1	2	1	1
	mild	0	1	0	0
	Necrosis	0	1 ^b	0	0
	moderate	0	1	0	0

^a The number of animals with findings.

^b Lesions with gross findings.

Criterion of the lesions were selected from minimal, mild, moderate or severe.

Table 20. 経口投与群における血中エンニアチン B 濃度

ID	血中濃度 (ng/mL)								
	投与前	投与後							
		5 min	10 min	30 min	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	24 hr
1	BLQ	221	–	790	–	1357	–	–	–
2	BLQ	58	–	432	–	434	–	–	–
3	BLQ	85	–	569	–	258	–	–	–
4	BLQ	189	–	667	–	1068	–	–	–
5	BLQ	163	–	313	–	513	–	–	–
6		–	273	–	918	–	480	237	22
7		–	209	–	1608	–	553	66	BLQ
8		–	214	–	551	–	961	181	138
9		–	194	–	1023	–	648	141	BLQ
Mean		143	222	554	1025	726	660	156	40
SD		69	35	188	438	465	212	72	66

Abbreviation: BLQ, below lower limits of quantitation.

Table 21. 尾静脈内投与群における血中エンニアチン B 濃度

ID	血中濃度 (ng/mL)								
	投与前	投与後							
		5 min	10 min	30 min	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	24 hr
1	BLQ	245	–	71	–	28	–	–	–
2	BLQ	211	–	61	–	27	–	–	–
3	BLQ	231	–	103	–	29	–	–	–
4		–	94	–	41	–	BLQ	BLQ	BLQ
5		–	81	–	BLQ	–	BLQ	BLQ	BLQ
6		–	96	–	BLQ	–	BLQ	BLQ	BLQ
7		–	48	–	18	–	BLQ	BLQ	BLQ
Mean		229	80	78	15	28	–	–	–
SD		17	22	22	19	1	–	–	–

Abbreviation: BLQ, below lower limits of quantitation.

Table 22. 糞中エンニアチン B 濃度

	溶媒対照群	経口投与群 (30 mg/kg)			尾静脈内投与群 (1mg/kg)	
		投与後				
	0-2 hr	4-8 hr	8-24 hr	4-8 hr	8-24 hr	
動物数	5	4	4	4	4	
糞量 (mg)	95.5±24.2 ^a	89.0±71.2	225.0±159.8	198.3 ± 94.7	552.0 ± 246.4	
糞中濃度 (ng/mg)	BLQ	228.3±140.3	218.6±373.0	0.02 ± 0.01	BLQ	
糞中量 (ng)	–	19110±15000	28211 ± 42935	4.7 ± 5.1	–	
糞中総量/投与量 (%)	–	5.26 ± 6.44		0.02 ± 0.02		

^a Mean ± SD.

Abbreviation: BLQ, below lower limits of quantitation.

Table 23. 発現増加した遺伝子群の代謝機能に関連する GO term

GO Accession	GO term	No. of genes	P value
GO:1901700	Response to oxygen-containing compound	89	2.67E-14
GO:0010033	Response to organic substance	129	3.87E-14
GO:0014070	Response to organic cyclic compound	65	4.35E-14
GO:0009628	Response to abiotic stimulus	70	6.36E-14
GO:0070887	Cellular response to chemical stimulus	114	1.60E-12
GO:0033993	Response to lipid	61	2.60E-12
GO:0009893	Positive regulation of metabolic process	122	2.78E-11
GO:0071310	Cellular response to organic substance	94	1.02E-10
GO:0031325	Positive regulation of cellular metabolic process	113	1.69E-10
GO:0010604	Positive regulation of macromolecule metabolic process	112	6.19E-10
GO:0019220	Regulation of phosphate metabolic process	76	1.95E-09
GO:1901698	Response to nitrogen compound	55	2.75E-09
GO:0006796	Phosphate-containing compound metabolic process	112	2.95E-09
GO:0006793	Phosphorus metabolic process	112	3.17E-09
GO:0051246	Regulation of protein metabolic process	98	2.61E-08
GO:0042493	Response to drug	32	3.54E-08
GO:0032268	Regulation of cellular protein metabolic process	90	1.78E-07
GO:0071417	Cellular response to organonitrogen compound	31	3.33E-06
GO:0051173	Positive regulation of nitrogen compound metabolic process	69	5.27E-06
GO:1901699	Cellular response to nitrogen compound	33	8.58E-06

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)

総合研究報告書

簡易迅速検出法の開発
(2019～2021 年度)

研究分担者 小西良子 (東京農業大学)

研究要旨

ステリグマトシスチン (STC) および 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) は 2016 年の JECFA においてリスク評価されたことから、国際的にもそれらの汚染は今後モニタリングの強化など注意を払わなければならないマイコトキシンとなった。STC はアフラトキシンの前駆体であることから、健康被害として発がん性が毒性として挙げられる。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。4,15-DAS は、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンと同様のタイプ A のトリコテセン系マイコトキシンであり、毒性として発がん性は認められないが、消化器障害や免疫毒性などが報告されている。そのため上記 2 つのトリコテセンと共に JECFA では 4,15-DAS をグループとして TDI を設定することとなった。

これらマイコトキシンの分析には精度の高い方法として LC-MS/MS 等の機器分析によって行われているが、食品や飼料等のモニタリングやスクリーニング等多検体を扱う検査には、高コストであり実用的ではない。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 による簡便迅速法を検討した。初年度および最終年度に STC を対象とした ELISA を開発した。初年度に開発したプロトコルの改良を最終年度に行い、実態調査に応用できる感度と精度を実現した。次年度には、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンおよび 4,15-DAS の 3 つを同時に測定できる ELISA を市販品から探索することを試みた。T-2 トキシンと 4,15-DAS は同じトリコテセン系マイコトキシンタイプ A に分類されており、構造に類似性が高い。そのため、抗原構造が共通な部位があると考えられ、市販の T-2 トキシン ELISA キットに使われている特異抗体が 4,15-DAS も認識するか否かを 7 種の市販 T-2 トキシン ELISA キットで検討を行った。その結果、検討した市販のキットは全て 4,15-DAS には交差性を示さないことがわかった。

A. 研究目的

FAO/WHO 食品添加物専門家会議(JECFA) は 2016 年にステリグマトシスチン (STC) および 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) のリスク評価を行った。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、特に穀類を広く汚染して

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。我が国の実態調査に関しては、本事業で行っているが、玄米から検出された。毒性を見ると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。同じくら

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。

4,15-DAS の毒性評価では、単独での毒性の情報が少ないことから、JECFA は T-2、HT-2 および 4,15-DAS の 3 つのカビ毒を一つのグループとして、グループ TDI 0.06 µg/kg を設定した。トリコテセン系マイコトキシンの毒性は、強い消化器障害であるが、タイプ A トリコテセン系マイコトキシンの T-2 の毒性は特に ATA 症と呼ばれる白血球減少や放射線障害様症状が現れ、致死率も高い。我々は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）の研究から、北海道地域で T-2、HT-2 が豆類から検出されることを明らかにしているが、4,15-DAS 汚染に関してはほとんど情報がない。

国際的なリスク評価が行われると、今後コーデックス委員会における規制等が審議されることになるが、その時までには我が国における STC および T-2、HT-2、4,15-DAS を対象としたモニタリングのデータが必要となる。分析法としては LC/MS-MS での同時分析法などが開発されているが、高価な装置と技術が必要なため、モニタリングやスクリーニングには迅速簡便な測定法の開発が望まれている。

そのため、本課題の分担研究として、STC および T-2、HT-2、4,15-DAS を対象とする簡便迅速測定法を確立することとした。STC を対象とした簡便迅速測定法は、市販されている ELISA キットがあるものの限られており、高価であり、かつ品質に問題があることから、本研究として開発することとした。T-2 および HT-2 を対象とする簡便迅速測定法は、市販されている ELISA キットが多いことからそれらが 4,15-DAS にも対応できるか否かを検討した。

B. 研究方法

(1) STC ELISA の開発

1) 材料

①玄米

2021 年度の実態調査で使用した国産玄米から非汚染米を添加回収試験に用いた。玄米は、500 g を粉砕機で 5~10 秒×2 回粉砕を行った後、4°C で保存した。自然汚染玄米は、2021 年度実態調査に用いた神奈川県で購入した市販品を用いた。

②小麦粉

2021 年度の実態調査で使用した市販小麦粉（神奈川県で購入した市販品）から非汚染小麦粉を添加回収試験に用いた。

2) 直接競合 ELISA

AflatoxinB₂-Horse Radish Peroxidase conjugate (AFB₂-HRP、HORIBA) を用いた直接競合 ELISA を行った。図 1 にプロトコルを示した。96 穴プレート (Nunc-ImmunoPlate II、サーモフィッシャーサイエンティフィック株) の各ウェルにマウス抗 IgG ヤギ抗体 (Scientific 社製、4 µg/mL) をコーティングしたのち 0.4% ウシ血清アルブミン (BSA、和光純薬工業株式会社) でブロッキングを行った。洗浄後 0.2% BSA で希釈したマウス抗 AF 抗体 (MoAb2-3、HORIBA 社から提供) (100 ng/mL) を加え、室温で反応させ洗浄した。45 µL の 0.2% BSA をあらかじめ入れた各ウェルに 100% メタノールで溶解した標準品および試料を 5 µL 加えよく攪拌した。すぐに AFB₂-HRP (HORIBA 社から提供、最終濃度 150 ng/mL) を 50 µL ずつ加え競合反応させた。洗浄後、TMB Substrate Reagent (BD 社) により発色させ、0.5 NH₂SO₄ により反応を止めた。プレートリーダー (Powerscan-HT, DS Pharma Biomedical 社、USA) で 450 nm および 630 nm における吸光度を測定した。

3) 試料の前処理法

ELISA に供する試料は、ELISA 反応への妨害物質を除くため Autoprep MF-A (昭和電工 (株)) による前処理を行った。

(2) 4,15-DAS の ELISA

1) 使用した ELISA キット

T-2 又は T-2/HT-2 測定用 ELISA キットとして MAX Signal T-2 ELISA kit (PerkinElmer)、T-2 Toxin ELISA Test kit (Meizheng Bio-Tech)、AgraQuant T-2 Toxin ELISA test (Romer Labs)、RIDASCREEN T-2 Toxin (R-Biopharm AG)、RIDASCREEN T-2/HT-2 Toxin (R-Biopharm AG)、Celer T2 (Eurofins)、Veratox for T-2/HT-2 (NEOGEN) の 7 種類を用いた。

2) 4,15-DAS の添加濃度

4,15-DAS は、市販の ELISA キットに添付されている各マイコトキシンの標準品の濃度を参考に、その 1000 倍濃度までの溶液を実験に用いた。その際、適量の stock solution を窒素乾固したのち、各メーカーが用いている buffer により順次希釈した。

3) ELISA の手順

ELISA の操作は、各メーカーの説明書に従って行った。

(3) 統計処理

STC ELISA での濃度計算は、統計処理のソフト GEN 5 (Version2.0, Biotek, Vermont, USA) を用いた。T-2 および T-2/HT-2 ELISA キットでの濃度計算は、メーカー付属の計算ソフトを用いた。

C. 研究結果

(1) STC ELISA の開発

初年度検討した直接競合 ELISA の以下の 2 つの問題点について改良を行った。①測定者による標準曲線、50% 阻害濃度 (IC_{50}) のばらつき、②玄米品種の違いによる測定値のばらつきが認められる。①の対処として、STC の標準品および試料の溶解メタノールの濃度を工夫することで、安定して 1.2~1.5 ng/mL の IC_{50} が得られるようになった。②の対処としては、Autoprep MF-A 多機能カラムを用いることで、ELISA 測定を妨害する物質を取り除くことができた。

表 1 に、今年度確立した ELISA を用いた玄米および小麦粉の添加回収試験と汚染試

料の測定結果を示した。添加回収試験では、玄米と小麦粉で 90% 以上の回収率が得られた。

(2) 4,15-DAS の ELISA

表 2 に 7 社の T-2 または T-2/HT-2 用の ELISA キットを用いて 4,15-DAS との交差性を検討したが、いずれのキットにおいても交差性は認められなかった。

D. 考察

ELISA 法は、一度に多検体を短時間で測定できること、特異抗体を用いることから対象物への特異性が高いことでマイコトキシン測定においてスクリーニングやモニタリングに活用されている。ELISA 法には、様々な種類あり、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、マイコトキシン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。間接競合法は、プレートにマイコトキシン-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マイコトキシン-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、マイコトキシン特異抗体の抗体サブクラスに対する抗体、例えば特異抗体がマウスモノクローナル IgG 抗体の場合であれば、ヤギ抗マウス IgG 抗体を特異抗体で反応しやすいように固相化したのち、測定サンプルと競合物質—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マイコトキシン-キャリアたんぱく質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 STC の ELISA としては、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。

本研究で開発した STC 用 ELISA は、測定可能範囲は 0.1~10.0 ng/mL、 IC_{50} は 1.2 ng/mL であった。汚染実態調査で検出された試料を使った実態調査への応用においても、1.17

μg/kg の STC 汚染玄米から検出が可能であり、5 つの自然汚染玄米 (いずれも 1–5 ng/g) において、LC-MS/MS の測定値と良い相関性が得られており、実用化に向けての可能性が示唆された。

本研究で開発した ELISA は、AF 特異抗体と AFB₂-HRP を競合物質として用いた方法であるため、AF が汚染している試料においては、本 ELISA で陽性と判定された場合、LC-MS/MS において AF の汚染と STC の汚染の両方を測定することとなる。しかし ELISA はスクリーニングの一環としてとらえれば、AF と STC の共汚染を測定できる ELISA として活用は広がる。現状、我々の実態調査からは国産の米や小麦粉では AF の汚染例は報告されていないので、この研究で確立した ELISA 法は国産玄米と小麦粉の ELISA としては適用できると考えられた。

特異抗体を利用する ELISA 法のメリットを利用して、グループ TDI として今後測定法の開発が必要な 4,15-DAS についてもその応用性を検討した。T-2、HT-2、4,15-DAS は、ともにタイプ A トリコテセン系マイコトキシンに属し、構造上、8 位に置換基がないか、水酸基またはエステル結合が存在しているもので類似性が高い。構造的に見て、T-2 と 4,15-DAS は 2 位から 7 位までの構造が同じであることから、この部位を認識している特異抗体であれば、4,15-DAS も認識することが考えられる。そこで現在市販されている T-2 の ELISA キットにおいて 4,15-DAS と交差性はあるか否かを検討した。現在日本で購入できる ELISA キットとして市販されている製品は、T-2 または T-2/HT-2 を対象としたものである。そこで、7 種の T-2 用 ELISA キットについて、4,15-DAS が測定できるかを検証した。しかし、7 種類すべてにおいて 4,15-DAS に対する交差性はほとんど認められなかったことから、これらのキットに含まれている抗体は、4,15-DAS と T-2 の共通する構造は認識しないことがわかった。これら

の結果から、市販の T-2 又は T-2/HT-2 用 ELISA キットを用いてグループ TDI に指定されている 3 種のマイコトキシンを同時に認識することはできないことがわかった。そして 3 つのカビ毒が共通する部位を認識する抗体を作成すれば、3 種検出 ELISA は可能であると考えられた。

E. 結論

本研究は、3 年間を通じて、2016 年 JECFA においてリスク評価された STC および 4,15-DAS を対象とした ELISA 法の確立を目標に行った。STC を対象とした ELISA の測定可能範囲は汚染実態に適したものであり、汚染試料の測定値も LC-MS/MS と相関性が取れていることから、国産玄米および小麦粉の STC 汚染食品のスクリーニングには充分に対応できる方法として確立することができた。一方、T-2、HT-2 トキシンのグループ PMTDI に組み入れられた 4,15-DAS の ELISA においては、現在市販品として購入できる T-2/HT-2 測定を対象にした ELISA キットを用いて 4,15-DAS の測定は出来ないことが明らかになり、3 種のタイプ A トリコテセン系マイコトキシンを同時に認識する ELISA の開発が今後必要になることが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

【論文発表】

1) Takashima, K., Nakajima, K., Shimizu, S., Ojima, R., Tang, Q., Okano, H., Takahashi, Y., Ozawa, S., Jin, M., Yoshinari, T., Yoshida, T., Sugita-Konishi, Y., Shibutani, M., Disruption of postnatal neurogenesis and adult-stage suppression of synaptic plasticity in the hippocampal dentate gyrus after developmental

exposure to sterigmatocystin in rats. Toxicol Lett, 349, 69-83.2021.

【学会発表】

1) 吉成知也、小西良子、他「市販 ELISA kit によるタイプトリコテセン系カビ毒の迅速簡易測定法の検討」第 117 回日本食品衛生学会学術講演会, 2021.11 月

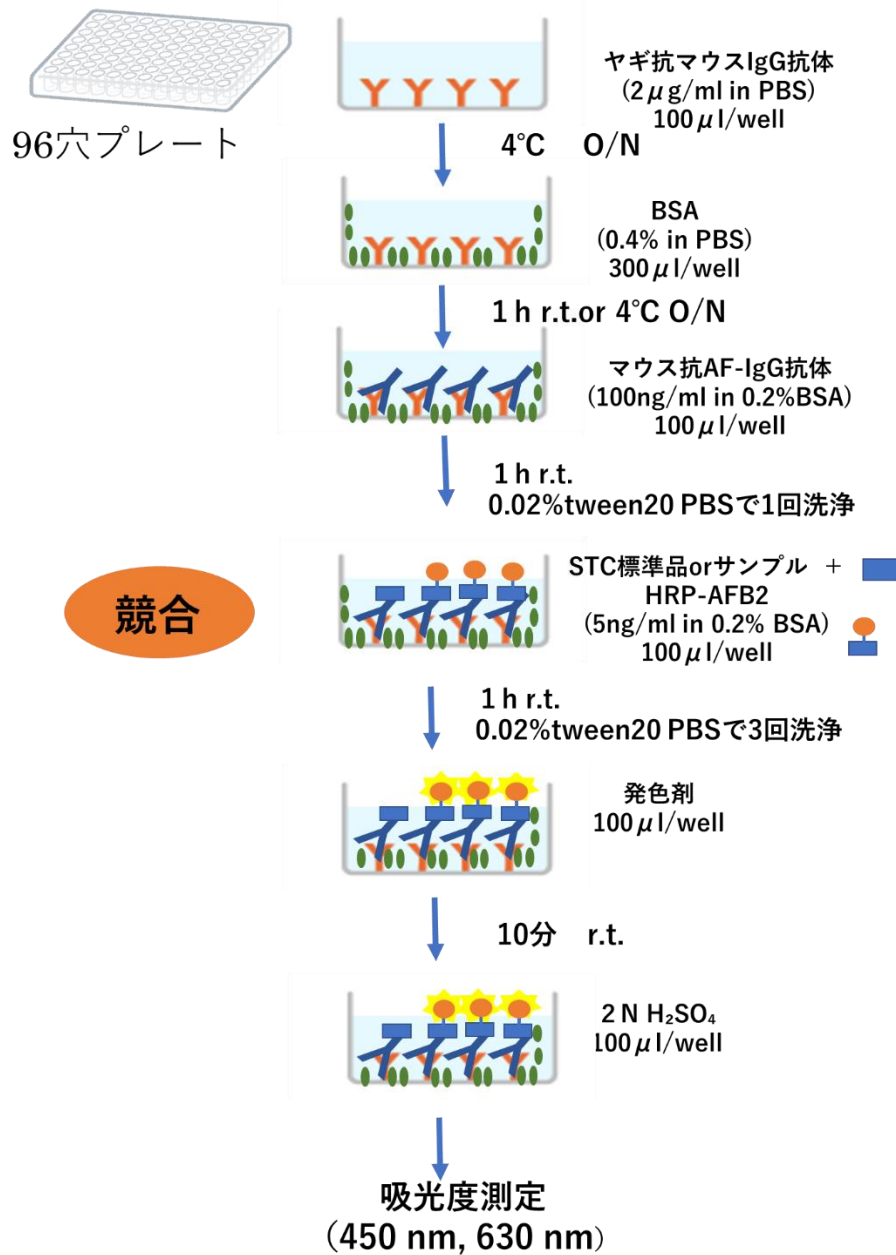


図1. プロトコール：ステリグマトシスチンの ELISA 法

STC ; ステリグマトシスチン、O/N ; 一昼夜、 r.t.;室温、HRP-AFB2 ; ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ

表 1. STC ELISA の性能評価結果

A) 玄米

添加回収試験	回収率 (% , n=6)	
STC 添加 2 ppb	114.5 ±25.8	
STC 添加 6 ppb	94.6±17.3	
STC 添加 20 ppb	121.2±11.6	
自然汚染検体	測定値	LC-MS/MS 測定値
検体①	1.40 ppb	1.34 ppb
検体②	1.08 ppb	1.25 ppb
検体③	6.92 ppb	5.67 ppb
検体④	1.46 ppb	1.17 ppb

B) 小麦粉

		回収率 (% , n=6)
STC 添加	2 ppb	117.9 ±11.1
STC 添加	6 ppb	96.0±7.5
STC 添加	20 ppb	91.5±3.9

表 2. 市販 T-2 toxin 用 ELISA キットにおける 4,15-DAS への交差性

製品名	製造元	交差性		
		T-2 toxin	HT-2 toxin	4,15-DAS
MAX Signal T-2 ELISA kit	PerkinElmer	○	×	×
T-2 Toxin ELISA Test kit	Meizheng Bio-Tech	○	×	×
AgraQuant T-2 Toxin ELISA test	Romer Labs	○	×	×
RIDASCREEN T-2 Toxin	R-Biopharm AG	○	×	×
RIDASCREEN T-2/HT-2 Toxin	R-Biopharm AG	○	○	×
Celer T2	Eurofins	○	△	×
Veratox for T-2/HT-2	NEOGEN	○	○	×

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)

総合研究報告書

毒性試験のためのエンニアチン B の大量調製
国内流通穀物におけるカビ毒複合汚染のリスク因子の解明
(2019～2021 年度)

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

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環として、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の ENB の大量調製、および国内流通穀物におけるカビ毒複合汚染のリスク因子の解明に関する検討を行った。ENB の大量調製では、研究室保存株の中から培養法によるエンニアチン類 (ENs) 高産生株の探索を行ったところ、最も高産生であった *Fusarium avenaceum* KFU-28 を見出した。本株を用いて米培地による大量培養を行ったところ、本培地での ENB の生産量は約 3 mg/g であった。この培養物から精製および HPLC による分取によって、ENB 約 2 g を得た。また、国内流通穀物におけるカビ毒複合汚染のリスク因子の解明では、本研究班の過去の成果を参照し、穀物のうちで *Fusarium* トキシンの汚染頻度・濃度が高いことが明らかとなっているハトムギおよびライムギを対象とした。試料を購入して収集し、カビ毒汚染の原因菌の探索を目的として、*Fusarium* トキシン、アフラトキシン (AF)、ステリグマトシスチン (STC) の分析、およびカビ毒汚染量が高かった検体からの *Fusarium* 属の分離・同定を行った。さらに、分離株のカビ毒産生性を調査するため、分離株培養物中の *Fusarium* トキシン等の分析を行った。その結果、国内流通ハトムギでは、輸入品では 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS)、ニバレノール (NIV)、ステリグマトシスチン (STC)、アフラトキシン B1 (AFB1) およびビューベリシン (BEA) の複合汚染リスクが、国産品では T-2 トキシン、HT-2 トキシン、デオキシニバレノール (DON)、NIV および BEA の複合汚染リスクが、それぞれ高いことが示唆された。国内流通ライムギでは、4,15-DAS を除く今回調査した全ての *Fusarium* トキシンにおいて、海外産よりも国内産で汚染濃度が高い傾向にあることが示され、特に DON および ENs でその傾向が強かった。これらの試料からの分離株の *Fusarium* トキシン産生性調査の結果、ハトムギ試料では、海外産からは 4,15-DAS のみを産生する *F. incarnatum* 菌株が、国内産からはタイプ A トリコテセン系化合物のうち T-2 トキシン・HT-2 トキシン・4,15-DAS を同時に産生する *F. armeniacum* および *F. sporotrichioides* 菌株が多く分離された。ライムギ試料では、国内産のからのみ T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよび 4,15-DAS を同時に産生する *F. sporotrichioides* が分離された。このことは、2 年間連続で調査を実施したハトムギにおいて、年をまたいでの再現性があることも確認された。この菌種の差異がそれぞれの穀類のフザリウムトキシン汚染のリスク因子の一端となっている可能性が示唆された。今後、この菌種の差異をもたらす要因を解明する必要がある。

研究協力者

吉成 知也 国立医薬品食品衛生研究所
高橋 治男 国立医薬品食品衛生研究所
清水 公德 東京理科大学
平山 美咲 東京理科大学
千葉大学真菌医学研究センター
矢口 貴志 千葉大学真菌医学研究センター
伴 さやか 千葉大学真菌医学研究センター

A. 研究目的

エンニアチン類 (ENs) およびタイプ A トリコテセン系化合物は新興カビ毒として近年関心が高まっている。ENs については、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。

また、タイプ A トリコテセン系化合物については、2016 年 FAO/WHO 合同食品規格委員会では、T-2/HT-2 トキシンのグループ PMTDI 0.06 µg/kg 体重/日 に 4,15-ジアセトキシスシルペノール (4,15-DAS) も含めるとされたり。これら 3 種のカビ毒汚染程度を複合的に評価する必要がある。また、国内流通穀類においてはデオキシニバレノール (DON) やニバレノール (NIV) といったタイプ B トリコテセン系化合物の汚染があることが広く知られている。トリコテセン系化合物の主な産生菌は *Fusarium* 属菌であるが、このカビは一部の菌種が複数種類

の *Fusarium* トキシンを産生することが知られており、また同一の農作物から複数の *Fusarium* 属菌が同時に検出されることも多い。このことから、穀類など *Fusarium* 属菌汚染が多い農作物は、複数種類のカビ毒の複合汚染のリスクがあることを念頭に置く必要がある。汚染実態の詳細が明らかになっていないタイプ A トリコテセン類を中心に、*Fusarium* トキシンの複合汚染のリスク因子の解明が急務である。

そこで、2019 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 を単離精製した。さらに 2020 および 2021 年度は、これまでの実態調査の成果から国内流通製品がタイプ A トリコテセン類に汚染していることが明らかとなっているハトムギおよびライムギを対象として、海外産と国内産との間のカビ毒汚染リスクの違いの年次変動の有無を明らかにすること、及びカビ毒汚染原因菌を特定してカビ毒複合汚染のリスク因子を解明することを目的とした調査を行った。

B. 研究方法

(1) ENs 生産菌の探索

国立医薬品食品衛生研究所にて保管していた ENs を生産することが報告されている *Fusarium* 株の菌種 12 株を選択し、ENs 高産生株の探索を行った。1 ウェルあたり角田液体培地 (1L あたりの組成; 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 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 (表 1)。LC-MS/MS の条件は、B (3) で後述する。菌株は B (6) に後述する方法で再同定を行い、菌種を確認した。

(2) ENs 生産菌培養による ENB の大量精製

PDA 斜面培地に接種し 25°C で 1 週間培養した *Fusarium avenaceum* KFU-28 株を 300 mL 三角フラスコに入れた角田液体培地に接種し、25°C で 24 時間振盪培養し、これを前培養液とした。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、オートクレーブ滅菌した米培地に KFU-28 株の前培養液 10 mL を接種し、25°C 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、培養液を回収し、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 で、続いて酢酸エチル 20 mL でそれぞれ懸濁し、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。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 ENB 1 g にメタノールおよび精製水を加え溶解後、上清を回収し、結晶を析出させた。結晶を凍結乾燥し、ENB を得た。

(3) 各種カビ毒に汚染されたハトムギおよびライムギ試料の探索

Fusarium 属菌の分離効率を高めるため、第一段階としてハトムギおよびライムギ試料のタイプ A トリコテセン類の汚染濃度を確認し、第二段階として汚染レベルが高かった試料から *Fusarium* 属を分離し、分離株の同定およびカビ毒産生性を調査した。国内の小売店から、2020 年から 2021 年度にかけて、ハトムギの輸入品 21 検体および国産品 25 検体の計 46 検体、ライムギの輸入品 19 検体および国産品 9 検体の計 28 検体を購入して収集した。収集した粒状のハトムギおよびライムギをミキサーで粉碎し、カビ毒の分析に用いた。トリコテセン系化合物および ENs に加えて、*Fusarium* トキシンでありトリコテセン類との複合汚染が予測されるおよびビューベリシン (BEA)、および穀類における高濃度汚染がしばしばみられるアフラトキシン (AF) およびステリグマトシスチン (STC) の汚染調査を行った。

ハトムギおよびライムギ試料中のタイプ A トリコセテン類の測定は以下の通り実施した。ハトムギ 7.5 g に 85%アセトニトリル 30 mL を加え、30 分振盪した。この抽出液約 10 mL を多機能カラム (昭和電工社製 AutoprepMF-T 1500) を用いて精製後、その 2 mL を窒素気流により乾固し、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。試験溶液中のタイプ A トリコセテン類を LC-MS/MS により定量した。LC-MS/MS の測定条件は以下の通りとした；

HPLC

カラム：Inertsil ODS-3

2.1×150 mm、3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件：0分 A : B = 50 : 50

20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 657>307、247

ハトムギおよびライムギ試料中のタイプ B トリコセテン系カビ毒の測定は以下の通り実施した。ハトムギ 5 g に水 20 mL を加え 30 分間振盪した。上清 5 mL に PBS 25 mL を加え、その 12 mL に PBS 10 mL および D.W. 10 mL を加えたものをカラムで精製した。精製後、メタノール 50 μL およびアセトニトリル 1.5 mL で溶出し窒素乾固を行った。その後、LC-MS/MS を用いて測定した。LC-MS/MS の測定条件は以下の通りとした；

HPLC

カラム：Inertsil ODS-3

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B アセトニトリル

分離条件：0分 A : B = 95 : 5

8分 A : B = 10 : 90

10分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：5 μL

MS

イオン化：ESI negative

モニタリングイオン：

DON 295>265

NIV 371>281

3-アセチル DON (3ADON) 337>307

15-アセチル DON (15ADON) 337>150

ハトムギおよびライムギ試料中の ENs 類の測定は以下の通り実施した。測定対象をエンニアチン 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) およびビューベリシン (BEA) とした。ハトムギ 2.5 g にアセトニトリル：水 (85 : 15) 25 mL を加え、30 分間振盪した。この抽出液 400 μL に精製水 800 μL を加え、その 900 μL をメタノール 3 mL と精製水 3 mL で平衡化した C18 カートリッジ (SepPak Vac C18 200 mg、Waters 社) で精製した後、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 ENs および BEA を定量した。LC-MS/MS の測定条件は以下の通りとした；

HPLC

カラム：Inertsil ODS-3

2.1×150 mm、3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B 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

ハトムギおよびライムギ試料中の AF および STC の測定は以下の通り実施した。ハトムギまたはライムギ 7.5 g にアセトニトリル：水（85：15）30 mL を加え、30 分振盪後、イムノアフィニティーカラム（IAC；AFLAKING、堀場製作所）を用いて精製した。その 5.0 mL を 50 mL のメスフラスコにとり、PBS で 50 mL にメスアップした後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。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 および蒸留水 0.5 mL を加えて溶解したものを試験溶液とし、AFB1 と STC を定量した。LC-MS/MS の測定条件は以下の通りとした；

HPLC

カラム：InertSustain C18

2.1×150 mm、3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件：0 分 A：B = 60：40

13 分 A：B = 10：90

流速：0.2 mL/分

注入量：10 μL

MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：325 > 281

（4）カビ毒汚染程度が高いハトムギおよびライムギ試料からの *Fusarium* 属菌株の分離

Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol 寒天培地（DRBC 寒天培地、Difco）平板上に、供試したハトムギおよびライムギを 1 枚のプレートに 5 粒ずつ計 50 粒を置き、25℃で 7 日間培

養した。この際、事前に 70%エタノールで 30 秒間洗浄し、食品表面に付着した真菌を除いてから培養に供した。培養後、生育したコロニーを目視によって観察し、*Fusarium* 属様コロニーをポテトデキストロース寒天（PDA、栄研化学）平板培地に釣菌して分離した後、25℃で 1～2 週間培養した。

（5）分離された *Fusarium* 属菌株の同定

PDA 平板上に生育したコロニー、カーネーションリーフ・アガー培地に生育した菌体のプレパレート観察像を形態学的同定指標とした。さらに分子生物学的同定指標として、分離株菌体を少量培養し、ここから Maxwell RSC Plant DNA Kit（プロメガ株式会社）で DNA を抽出した。これを用いて β-tubulin および EF-1α 遺伝子のシーケンスを行った。この際プライマーは、β-tubulin 遺伝子では Btu_F-F01 および Btu_F-R01²⁾、EF-1α 遺伝子では EF-1 および EF-2³⁾を用いた。得られた同定指標を参照し、菌種の同定を行った。

（6）分離された *Fusarium* 属菌株のトリコテセン系カビ毒産生性の検討

前述の（5）で同定した *Fusarium* 属菌株について、トリコテセン系カビ毒の産生能を持つ菌種と同定された場合に、タイプ A およびタイプ B トリコテセンの産生量を調査した。前培養として角田培地に PDA 斜面培地で生育した菌体を接種して振盪培養で 25℃1 日間培養した。この培養液を 200 mL 三角フラスコに入れた角田培地 30 mL に 100 μL 接種し、25℃で 7 日間静置培養した。その培養液 500 μL の酢酸エチル抽出物に 200 μL のメタノールを加え溶解したものを、50%メタノールを用いて 100～10,000 倍に適宜希釈し、（1）で上述の条件にて LC-MS/MS によって T-2 トキシン、HT-2 トキシン、4,15-DAS、DON、NIV、3ADON、15ADON

および ENB の測定を行った。

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 の生産が認められた。その中で高い産生性が認められた KFU-28 株と YF016-B 株を米培地で培養した結果、KFU-28 株は米 1 g あたり約 3 mg の ENB を生産し、最も高い ENB 産生性を示した。形態観察および β -tubulin 遺伝子塩基配の解析結果から、本菌株は *F. avenaceum* であることを確認した。

(2) ENs 生産菌の培養による ENB の大量精製

米培地に KFU-28 株を接種し培養後の抽出物を濃縮し、精製後、再結晶を行い、精製 ENB を 2 g 得た。精製した ENB の純度を HPLC により確認し (図 1)、98%以上の純度を有することを確認した。

(3) ハトムギ試料中のカビ毒汚染量の評価

2020 年度に購入して調査したハトムギ試料の結果を表 2 に示した。輸入ハトムギ 11 検体からは、100%の検出率で定量限界以上の STC (0.02-1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) および 4,15-DAS (1.0-22.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) が検出され、検出量の平均値は国産品と比較して有意に高かった (STC ; $p=3.7\text{E-}04$ 、4,15-DAS ; $p=4.0\text{E-}05$)。国産ハトムギ 10 検体からは、90.0%の検出率で定量限界以上の T-2 トキシン (定量下限値 \sim 6.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) が、90.0%の検出率で定量限界以上の HT-2 トキシン (定量下限値 \sim 33.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) がそれぞれ検出され、検出量の平均値は輸入品と比較して高い傾向にあった (T-2 トキシン ; $p=0.005$ 、HT-2 トキシン ; $p=0.071$)。

2021 年度に購入して調査したハトムギ試料

の結果を表 3 に示した。輸入ハトムギ 10 検体からは、100%の検出率で 4,15-DAS (0.8-16.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) が、および 80.0%の検出率で LOQ 以上の STC (LOQ 未満 \cdot 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) が検出され、これらのカビ毒の検出量の平均値は国産品と比較して有意に高かった (4,15-DAS ; $p=0.004$ 、DAS ; $p=0.05$)。また海外産ハトムギ群では 50.0%の検出率で AFB1 が検出された (LOQ 未満 \cdot 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) が、国内産ハトムギ群では今回調査した全検体から LOQ 以上の検出は確認されず、有意な差ではなかったものの、海外産ハトムギでは国産品よりも比較的 AFB1 が検出される傾向が強いことが示された。国内産ハトムギ 15 検体からは、73.3%の検出率で HT-2 トキシン (LOQ 未満 \cdot 12.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) が、100%の検出率で DON (LOQ 未満 \cdot 36.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$) が、それぞれ検出され、これらのカビ毒の検出量の平均値は国産品と比較して有意に高かった (HT-2 トキシン ; $p=0.005$ 、DON ; $p=0.005$)。また国内産ハトムギ群では 93.3%の検出率で T-2 トキシンが検出された (LOQ 未満 \cdot 18.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ことに対して、海外産ハトムギ群では今回調査した全検体から LOQ 以上の検出は確認されず、有意な差ではなかったものの、輸入品ハトムギでは国産品よりも比較的 T-2 トキシンが検出される傾向が強いことが示された。また NIV については海外産および国内産の全検体から 1.4-233 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度で検出され、BEA については海外産で 90.0%、国内産で 93.3%のハトムギ検体から検出され (LOQ 未満 \cdot 62.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、海外産および国内産の両群から検出される頻度は高かった。

2 年間の結果を総合的に評価すると、2 年間を通じて同様の結果が得られ、国内流通ハトムギにおいては、輸入品では 4,15-DAS、NIV、STC、AFB1 および BEA の複合汚染リスクが、国産品では T-2 トキシン、HT-2 トキシン、DON、NIV および BEA の複合汚染リスクが、それぞれ高いことが示唆された。

(4) ライムギ試料中のカビ毒検出量の評価

2021 年度に購入して調査したライムギ試料中のカビ毒分析の結果を表 4 に示した。海外産ライムギ群および国産品ライムギ群の結果を比較したところ、*Aspergillus* トキシンの STC および AFB1 については特段検出頻度や濃度に傾向の差は見られなかったが、4,15-DAS を除く今回調査した全ての *Fusarium* トキシンについては、有意な差ではなかったものの、検出率および検出濃度平均値は国産品のほうが高かった。また国産品群からは DON で平均値±SD は 439.4±797.7 µg/kg、BEA で平均値±SD は 3.6±6.6 µg/kg、ENA で平均値±SD は 2.6±4.7 µg/kg、ENA1 で平均値±SD は 22.7±35.6 µg/kg、ENB で平均値±SD は 817.9±1189.6 µg/kg、ENB1 で平均値±SD は 223.7±344.0 µg/kg の濃度で検出され、海外産群の平均値よりも 10 倍以上高く検出された。以上のことから、国内流通ライムギについては、4,15-DAS を除く今回調査した全ての *Fusarium* トキシンにおいて、海外産よりも国内産の方が汚染濃度が高い傾向にあり、特に DON および ENs でその傾向が強いことが示された。

(5) ハトムギおよびライムギ試料から分離された *Fusarium* 属菌種およびフザリウムトキシンの産生性

2020 年度のハトムギ試料中のカビ毒分析の結果を参照し、タイプ A トリコテセン系化合物の検出量が多かったまたは特徴的であったハトムギ 5 検体から *Fusarium* 属菌の分離を試みた。その結果、23 株の *Fusarium* 属菌が分離された。これらの分離株について、角田液体培地における各種カビ毒の検出結果および同定結果を表 5 に示した。国産ハトムギ試料 32-HT06 から分離された計 3 株の *F. sporotrichioides* からはそれぞれ T-2 トキシン (最大 368 mg/kg)、HT-2 ト

キシン (最大 23 mg/kg)、および 4,15-DAS (最大 8.1 mg/kg) が検出された。また、国産ハトムギ試料 32-HT10 から分離された 1 株の *F. armeniacum* からは、T-2 トキシン 152 mg/kg、HT-2 トキシン 2.6 mg/kg、および 4,15-DAS 7.8 mg/kg が検出された。輸入ハトムギ試料からは、32-HT04 から分離された 1 株の *F. incarnatum* のみがトリコテセン類を産生 (DAS、2.2 mg/kg) した。

DON の前駆体である 3ADON の産生性については、分離株 32-HT06-12 および 32-HT10-04 は角田培地の培養では 16 mg/kg 程度の 3-AcDON の産生が確認されたところ、この株を米培養に供したところ、DON (316 mg/kg) および 3-AcDON (492 mg/kg) の産生が確認でき、これらの産生性が高まったことが確認された。このことから、米培養では、角田液体培地での培養と比較して、DON および 3ADON の産生性を向上させることが確認された。

2021 年度のハトムギ試料中のカビ毒分析の結果を参照し、タイプ A トリコテセン系化合物の検出量が多かったまたは特徴的であったハトムギ 7 検体およびライムギ 3 検体から分離された *Fusarium* 属菌分離株について、角田液体培地における各種カビ毒の検出結果を表 6 に示した。なお 2021 年度は米培地による検討は行わなかった。その結果、ハトムギからは計 42 株、ライムギからは計 30 株の *Fusarium* 属菌がそれぞれ分離された。これらの分離株を培養し、培養液中の T-2 トキシン、HT-2 トキシン、4,15-DAS、DON、NIV、3ADON、15ADON および ENB を測定し、いずれか 1 種類以上のカビ毒の産生性が認められた分離株については、同定を行った。その結果、輸入ハトムギからはタイプ A トリコテセン系化合物の産生菌の *F. incarnatum* のみが 2 株検出され、これらの株は 4,15-DAS の産生性のみを有した。国内産ハトムギからはタイプ A トリコテセン系化合物の

産生菌の *F. armeniacum*、*F. sporotrichioides* および *F. incarnatum* が検出され、*F. armeniacum* は T-2 トキシンおよび 4,15-DAS を、*F. sporotrichioides* は T-2 トキシン HT-2 トキシンおよび 4,15-DAS を、それぞれ同時に産生した。*F. incarnatum* は T-2 トキシンまたは 4,15-DAS のどちらかのみを産生する菌株が検出された。ライムギ試料では、国内産の 1 検体 (33-RY25) からのみ *Fusarium* 属菌を分離することができた。タイプ A トリコテセン系化合物の産生菌の *F. sporotrichioides* が 8 株検出され、これらの株は T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよび 4,15-DAS を同時に産生した。またタイプ B トリコテセン系化合物の産生菌の *Fusarium graminearum* が 2 株検出され、これらの株は DON、3ADON および 15ADON を同時に産生した。さらに ENB 産生能を有する *F. avenaceum* が 9 株検出された。

全ての分離株のうち、タイプ A トリコテセン系化合物 3 種全ての産生性が最も高かったのは、国内産ハトムギ試料 33-HT01 から分離された *F. sporotrichioides* の T-2 トキシン 2368 mg/kg、HT-2 トキシン 484 mg/kg、および 4,15-DAS 76.4 mg/kg であった。この株の 3 種のタイプ A トリコテセン系化合物の合算値は 2928 mg/kg となり、2 年間の調査で分離されたハトムギ由来の *F. sporotrichioides* および *F. armeniacum* の全菌株中最も高く、他の菌株のおおよそ 10 倍程度の産生量であることを確認した。

D. 考察

(1) 毒性試験のための ENB の大量調製

本研究の結果から、国内に分布する *F. avenaceum* は ENB の生産性が高いことが示され、十分量の ENB を精製することができた。また、国産農作物の ENB 汚染の原因菌として本菌が重要であることが示唆された。

(2) 国内流通穀物におけるカビ毒複合汚染のリスク因子の解明

タイプ A トリコテセン系化合物のうち T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよび 4,15-DAS の 3 種全ての産生能を持つ菌種としては *F. sporotrichioides*、*Fusarium poae*、*F. armeniacum* が広く知られており、3 者のタイプ A トリコテセン類の複合汚染のケースが、多くの穀物で確認されていることから、これらの合計値でのリスク評価を実施する国も多い。今回調査したライムギ試料もこれと一致する結果となった (表 4)。その一方で、*F. incarnatum*、*Fusarium sambucinum*、*Fusarium venenatum* は 4,15-DAS を産生するが T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの産生性の報告はほとんど無く^{4,5)}、タイプ A トリコテセン系化合物の中でも、汚染原因菌は必ずしも共通ではない。汚染プロファイルを 3 種のカビ毒で確認することによって、汚染原因菌を推定することが可能となる場合がある。

本研究の結果から、タイプ A トリコテセン系化合物について、ハトムギ試料においては、2 年間の調査結果にわたって 4,15-DAS だけが国産品と比較して輸入品から有意に高い濃度で検出されたのに対して、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンでは逆に輸入品と比較して国産品から明らかに高く検出される傾向となり、タイプ A トリコテセンの 3 種の間で検出傾向は一律ではなかった。このことから、4,15-DAS は同じタイプ A トリコテセンであっても T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンとは汚染原因菌が異なり、ハトムギの産地ごとにカビ毒の汚染プロファイルが異なる要因は、汚染原因菌の違いによるものであることが考えられた。本研究では、実際に 2 年間の調査にわたって 4,15-DAS のみを産生する *F. incarnatum* が分離された。以上のことから、国内産ハトムギでは、T-2 トキシン・HT-2 トキシン・4,15-DAS の複合汚染が問題となり、

汚染原因菌が主に *F. sporotrichioide* および *F. armeniacum* である一方で、海外産ハトムギのタイプAトリコテセン系化合物の汚染で問題となるのは 4,15-DAS であり、その汚染原因菌は *F. incarnatum* が有力な候補であると考えられた。さらには、輸入品からの *F. incarnatum* 以外の汚染原因菌分離も目指しての検討を継続する必要がある。

ハトムギ・ライムギ試料中のタイプAトリコテセン系化合物の汚染プロファイルの差異と、これらの検出された *Fusarium* 属菌の種類は関連していると考えられ、この菌種の違いがそれぞれの穀類のフザリウムトキシン汚染のリスク因子の一端となっている可能性が示唆された。海外産ハトムギは東南・東アジア諸国産である一方で、海外産ライムギは北米およびヨーロッパ諸国産であり、この傾向の違いは、農作物の種類に特有であるのか、産地の地理的条件によるものであるのか、詳細は不明である。これを解明することは、タイプAトリコテセン系化合物の農作物汚染のリスク因子解明およびリスク軽減策の作出につながると期待できることから、ハトムギ以外にも、温暖な地域で生産される品目のタイプAトリコテセン汚染状況を、文献調査および分析による実態調査によって検討するなど、継続した調査が必要である。

E. 結論

本研究の結果から、国内に流通するハトムギおよびライムギ製品では、作物の種類や生産地によって、*Aspergillus* トキシンおよび *Fusarium* トキシンの汚染状況、および汚染原因菌の種類に偏りが存在することが明らかとなった。この菌種の違いがそれぞれの穀類のフザリウムトキシン汚染のリスク因子の一端となっている可能性が示唆された。今後、ハトムギおよびライムギ製品に含まれる *Fusarium* トキシンによる日本人の健康に対するリスクに注視し

つつ、より多検体を供試した検討を継続する必要がある。さらには、作物の種類や生産地によって分布する *Fusarium* 属菌の偏りが生じる原因とメカニズムを解明し、汚染を軽減させるための研究を実施する必要がある。

F. 参考文献

- 1) World Health Organization & Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2017. Evaluation of certain contaminants in food: eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series; 1002*, pp. 41-55.
- 2) Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., et al. 2011. Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. *J. Food Sci.* 91:2500-2504.
- 3) O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2044-2049.
- 4) Marasas, W.F.O., Nelson, E.P, Toussoun, T.A. 1984. *Toxigenic Fusarium Species*. The Pennsylvania State University Press. USA.
- 5) Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Oxford, UK.

G. 研究業績

【論文発表】

- 1) A New Protocol for Detection of *Aspergillus* Section *Versicolores* Using a High Discrimination Polymerase. A. Kubosaki, N. Kobayashi, M. Watanabe, T. Yoshinari, K. Takatori, Y. Kikuchi, Y. Hara-Kudo, J.

Terajima, Y. Sugita-Konishi. *Biocontrol Science*. *Biocontrol Science*. 25:113-118, 2020.

2) Discrimination between edible and poisonous mushrooms among Japanese *Entoloma sarcopum* and related-species based on phylogenetic analysis and insertion/deletion patterns of nucleotide sequences of cytochrome oxidase 1 gene. W. Aoki, M. Watanabe, M. Watanabe, N. Kobayashi, J. Terajima, Y. Sugita-Konishi, K. Kondo, Y. Hara-Kudo. *Genes and Genetic Systems*. *Genes and Genetic System*. 95:133-139, 2020.

3) Hashimoto, K., Kawakami, Y., Hashimoto, R., Kitaoka, Y., Onji, Y., Oda, H., Watanabe, M., et al. 2021. Distribution of *Aspergillus* section Nigri at shochu fermenting places in Japan. *J. Air & Waste Manag. Assoc.* 24:1-8.

【学会発表】

1) 青木渉、渡辺麻衣子、渡邊雅樹、小林直樹、寺嶋淳、小西良子、近藤一成、工藤由起子. CO1 遺伝子塩基配列における挿入/欠失パターンおよび系統解析に基づく日本国内に分布する *Entoloma sarcopum* とその近縁種の食用および毒キノコの識別. 日本食品衛生学会 第 116 回学術講演会. 2021.11. ウェブ開催.

2) 渡辺麻衣子, 平山美咲, 清水公德, 伴さやか, 矢口貴志, 吉成知也, 工藤由起子. 国内流通ハトムギにおけるカビ毒汚染実態およびトリコテセン系カビ毒産生. *Fusarium* 属菌の分布調査. 日本マイコトキシン学会第 87 回学術講演会. 2022.1.7. (オンライン開催)

3) 平山美咲, 渡辺麻衣子, 矢口貴志, 伴さやか, 工藤由起子, 吉成知也. ライ麦から分離されたフザリウム属真菌が生産する新興カビ毒の同定及び分析法の開発. 日本マイコトキシン学会第 87 回学術講演会. 2022.1.7. (オンライ

ン開催)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

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

表 2. 2020 年度に実施した国内流通ハトムギのカビ毒の汚染状況のまとめ

供試検体	検出されたカビ毒 (µg/kg)											
	STC	AFB1	DON	NIV	4,15-DAS	HT-2	T-2	BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1
輸入ハトムギ												
検出率	100	90.9	18.2	100	100	0	9.1	90.9	0	0	0	0
最小値	0.02	< LOQ	< LOQ	10.2	1.0	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
最大値	1.7	6.2	177.8	282.3	22.4	< LOQ	0.0	12.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
平均値±SD	0.9±0.7	0.9±1.9	17.9±53.4	61.1±78.1	12.6±7.3	—	—	2.3±3.4	—	—	—	—
国産ハトムギ												
検出率	90.0	50.0	100	100	90.0	90.0	90.0	100	0	0	0	0
最小値	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
最大値	0.5	0.01	159.3	69.0	8.7	33.0	6.8	14.0	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
平均値±SD	0.01±0.01	0.00±0.00	27.5±50.2	24.2±23.9	0.3±0.4	5.8±10.1	2.2±2.3	3.9±4.1	—	—	—	—
t-test ^{*2}	3.7.E-04	0.126	0.678	0.169	4.0.E-05	0.071	0.005	0.359	—	—	—	—

*1 検出下限値。各カビ毒の値は以下の通り；STC：0.008µg/kg、AFB1：0.02µg/kg、4,15-DAS：0.05µg/kg、T-2トキシソ：0.02µg/kg、HT-2トキシソ：

*2 海外産ハトムギ群と国内産ハトムギ群との間で 2 標本 t 検定を行った結果の p 値を示した。

表 3. 2021 年度に実施した国内流通ハトムギのカビ毒の汚染状況のまとめ

供試検体	検出されたカビ毒 (μg/kg)											
	STC	AFB ₁	DON	NIV	4,15-DAS	HT-2	T-2	BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1
輸入ハトムギ												
検出率	80.0	50.0	10.0	100	100	0	0	90.0	0	0	0	0
最小値	< LOQ ^{*1}	< LOQ	< LOQ	8.9	0.8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
最大値	3.5	1.4	3.8	59.1	16.1	< LOQ	< LOQ	5.9	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
平均値±SD	1.1±1.5	0.3±0.5	0.4±1.2	23.5±16.0	7.2±5.5	—	—	2.1±1.9	—	—	—	—
国産ハトムギ												
検出率	13.3	0	100	100	73.3	73.3	93.3	93.3	0	0	0	0
最小値	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
最大値	0.1	< LOQ	36.9	233.0	5.3	12.4	18.8	62.7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
平均値±SD	0.01±0.04	—	9.4±10.4	26.1±58.1	0.5±1.4	3.3±3.8	2.4±4.7	8.4±15.8	—	—	—	—
t-test ^{*2}	0.05	0.139	0.005	0.873	0.004	0.005	0.073	0.152	—	—	—	—

*¹検出下限値。各カビ毒の値は以下の通り；STC：0.008μg/kg、AFB₁：0.02μg/kg、4,15-DAS：0.05μg/kg、T-2トキシシン：0.02μg/kg、HT-2トキシシン：0.3μg/kg、DON：1μg/kg、NIV：0.7μg/kg、BEA：0.5μg/kg、ENA：1.6μg/kg、ENA1：2.0μg/kg、ENB：2.0μg/kg、ENB1：2.0μg/kg。

*²海外産ハトムギ群と国内産ハトムギ群との間で2標本t検定を行った結果のp値を示した。

表 4. 2021 年度に実施した国内流通ライムギのカビ毒の汚染状況のまとめ

供試検体	検出されたカビ毒 (μg/kg)											
	STC	AFB1	DON	NIV	4,15-DAS	HT-2	T-2	BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1
輸入ライムギ												
検出率	15.8	0	89.5	52.6	0	68.4	47.4	10.5	0	42.1	68.4	63.2
最小値	< LOQ ^{*1}	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
最大値	1.1	< LOQ	41.1	5.6	< LOQ	16.2	4.3	1.0	< LOQ	11.3	43.5	33.4
平均値±SD	0.06±0.24	< LOQ	11.0±11.0	0.8±1.4	—	1.8±3.8	0.4±1.0	0.08±0.3	—	1.2±2.6	11.6±14.5	5.5±7.9
国産ライムギ												
検出率	33.3	0	100	88.9	0	77.8	66.7	88.9	66.7	88.9	100	100
最小値	< LOQ	< LOQ	5.7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	14.3	3.3
最大値	1.1	< LOQ	2180.0	12.7	< LOQ	29.3	5.6	21.1	14.7	112.8	3696.7	1079.0
平均値±SD	0.11±0.32	—	439.4±797.7	3.8±3.8	—	5.0±9.5	1.0±1.8	3.6±6.6	2.6±4.7	22.7±35.6	817.9±1189.6	223.7±344.0
t-test ^{*2}	0.689	—	0.143	0.025	—	0.371	0.332	0.152	0.128	0.108	0.076	0.093

*1検出下限値。各カビ毒の値は以下の通り；STC：0.008μg/kg、AFB1：0.02μg/kg、4,15-DAS：0.05μg/kg、T-2トキシン：0.02μg/kg、HT-2トキシン：0.3μg/kg、DON：1μg/kg、NIV：0.7μg/kg、BEA：0.5μg/kg、ENA：1.6μg/kg、ENA1：2.0μg/kg、ENB：2.0μg/kg、ENB1：2.0μg/kg。

*2海外産ハトムギ群と国内産ハトムギ群との間で2標本t検定を行った結果のp値を示した。

表 5. 2020 年度に分離した *Fusarium* トキシン産生性のハトムギ由来株のカビ毒産生性および同定結果一覧

菌株番号	分離源ハトムギ		分離株同定結果	角田培地 (mg/kg)						米培養 (mg/kg)	
	検体番号	産地		T-2	HT-2	4,15-DAS	DON	NIV	3ADON	DON	3ADON
32-HT04-06	32-HT04	タイ	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT04-09	32-HT04	タイ	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT04-16	32-HT04	タイ	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	2.2	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-10	32-HT06	島根	<i>F. spotrichioides</i>	368	21	8.1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-12	32-HT06	島根	<i>F. boothii</i> or <i>F. graminearum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	160	656
32-HT06-18	32-HT06	島根	<i>F. spotrichioides</i>	257	23	1.6	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-21	32-HT06	島根	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-22	32-HT06	島根	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-23	32-HT06	島根	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-23	32-HT06	島根	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-25	32-HT06	島根	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-28	32-HT06	島根	<i>F. spotrichioides</i>	150	5.2	3.9	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT10-04	32-HT10	岩手	<i>F. boothii</i> or <i>F. graminearum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	16	316	492
32-HT10-07	32-HT10	岩手	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT10-10	32-HT10	岩手	<i>F. armeniacum</i>	152	2.6	7.8	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT10-11	32-HT10	岩手	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT10-12	32-HT10	岩手	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT16-01	32-HT16	栃木	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT16-03	32-HT16	栃木	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT16-04	32-HT16	栃木	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT16-05	32-HT16	栃木	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT16-06	32-HT16	栃木	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT19-01	32-HT19	中国	<i>F. incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT

表 6. 2021 年度に分離した *Fusarium* トキシン産生性のハトムギおよびライムギ由来株のカビ毒産生性および同定結果一覧

(A) ハトムギ

菌株番号	分離原試料 の産地	菌種	培養液中のカビ毒検出量(mg/kg)							
			T-2	HT-2	4,15-DAS	ENB	DON	NIV	3ADON	15ADON
33-HT01-02	岩手県	<i>F. incarnatum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-HT01-09	岩手県	<i>F. incarnatum</i>	< LOQ ^{*1}	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-HT01-24	岩手県	<i>F. sporotrichioides</i>	2368	484	76	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-HT01-31	岩手県	<i>F. armeniacum</i>	7.7	< LOQ	0.5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-HT10-07	タイ	<i>F. incarnatum</i>	< LOQ	< LOQ	1.8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-HT13-09	島根県	<i>F. incarnatum</i>	< LOQ	< LOQ	0.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-HT13-14	島根県	<i>F. incarnatum</i>	< LOQ	< LOQ	0.8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-HT21-02	タイ	<i>F. incarnatum</i>	< LOQ	< LOQ	1.8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

*¹検出下限値。各カビ毒の値は以下の通り；T-2では0.1mg/kg、HT-2では1mg/kg、4,15-DASでは0.2mg/kg、ENBでは8mg/kg、DONでは4mg/kg、NIVでは3mg/kg、3ADONでは0.004mg/kg、15-ADONでは0.024mg/kg。

(B) ライムギ

菌株番号	分離原試料 の産地	菌種	培養液中のカビ毒検出量(mg/kg)							
			T-2	HT-2	4,15-DAS	ENB	DON	NIV	3ADON	15ADON
33-Ry25-03	北海道	<i>F. avenaceum</i>	< LOQ ^{*1}	< LOQ	< LOQ	42	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-04	北海道	<i>F. avenaceum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	28	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-05	北海道	<i>F. avenaceum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	99	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-06	北海道	<i>F. sporotrichioides</i>	8.6	< LOQ	0.7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-09	北海道	<i>F. avenaceum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	41	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-13	北海道	<i>F. sporotrichioides</i>	36	1.9	3.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-19	北海道	<i>F. sporotrichioides</i>	14	< LOQ	2.4	4.2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-20	北海道	<i>F. sporotrichioides</i>	8.0	< LOQ	0.7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-23	北海道	<i>F. sporotrichioides</i>	109	14	3.8	9.5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-25	北海道	<i>F. graminearum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.5	< LOQ	0.09	2.1
33-Ry25-26	北海道	<i>F. avenaceum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	41	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-28	北海道	<i>F. avenaceum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	12	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-29	北海道	<i>F. graminearum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.2	< LOQ	1.1	< LOQ
33-Ry25-30	北海道	<i>F. sporotrichioides</i>	194	31	5.7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-32	北海道	<i>F. avenaceum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	56	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-33	北海道	<i>F. sporotrichioides</i>	44	5.7	5.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-34	北海道	<i>F. avenaceum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	14	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-35	北海道	<i>F. sporotrichioides</i>	144	21	14	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
33-Ry25-36	北海道	<i>F. avenaceum</i>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	49	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

*¹検出下限値。各カビ毒の値は以下の通り；T-2では0.1mg/kg、HT-2では1mg/kg、DASでは0.2mg/kg、ENBでは8mg/kg、DONでは4mg/kg、NIVでは3mg/kg、3ADONでは0.004mg/kg、15ADONでは0.024mg/kg。

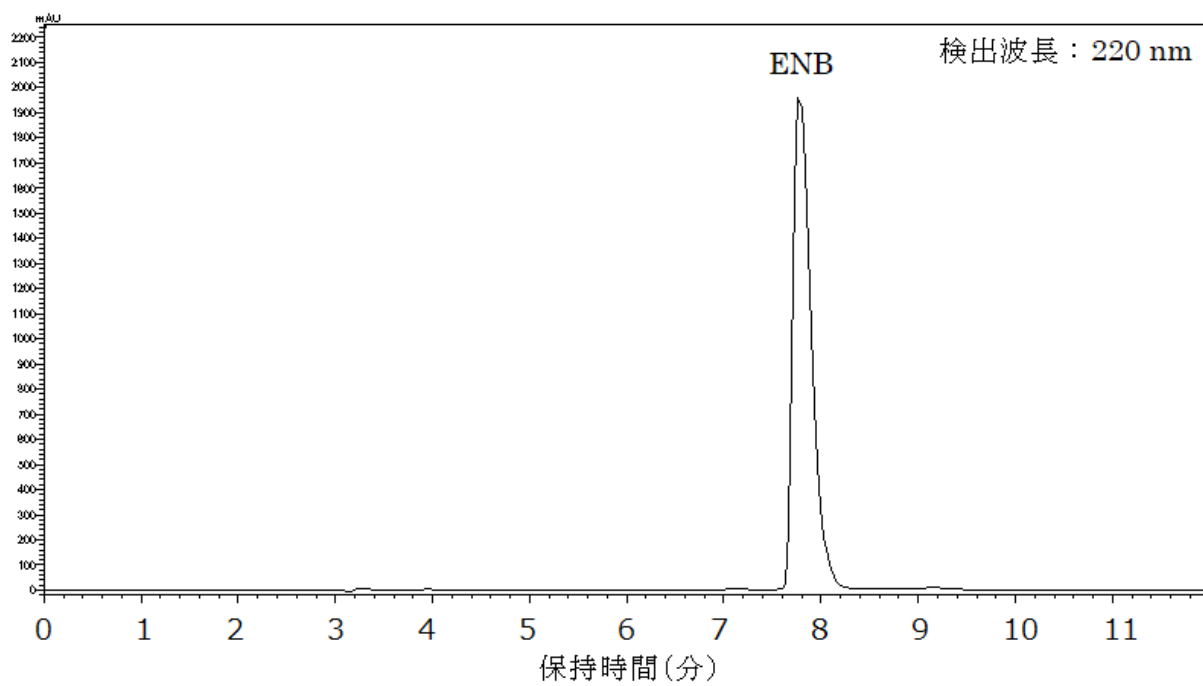


図1 精製した ENB のクロマトグラム

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 Mycotoxigenic 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
Nakajima K, Tanaka T, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Woo GH, Toshinori Yoshihida 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
Kubosaki A, Kobayashi N, Watanabe M, Yoshinari T, 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.	25	113-118	2020

Nakajima, K., Ito, Y., Kikuchi, S., Okano, H., Takashima, K., Woo, G-H., 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
Takashima, K., Nakajima, K., Shimizu, S., Ojio, R., Tang, Q., Okano, H., Takahashi, Y., Ozawa, S., Jin, M., Yoshinari, T., Yoshida, T., Sugita-Konishi, Y., Shibutani, M.	Disruption of postnatal neurogenesis and adult-stage suppression of synaptic plasticity in the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to sterigmatocystin in rats.	Toxicol. Lett.	349	69-83	2021
Okano, H., Okamura, T., Takahashi, Y., Takashima, K., Ojio, R., Tang, Q., Jin, M., Kikuchi, S., Ogawa, B., Yoshida, T., Yoshinari, T., Shibutani, M.	A 28-day repeated oral dose toxicity study of enniatin complex in mice.	The Journal of Toxicological Sciences	46	157-165	2021
Hashimoto K, Kawakami Y, Hashimoto R, Kitaoka Y, Onji Y, Oda H, Watanabe M, Takahashi H, Yokoyama K.	Distribution of Aspergillus section Nigri at shochu fermenting places in Japan.	Journal of the Air & Waste Management Association.	24	1-8	2021