

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

国内流通食品に検出されるカビ毒に対する
安全性確保の方策の確立に資する研究

令和4年度 総括研究報告書

研究代表者 吉成 知也

令和5（2023）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
国内流通食品に検出されるカビ毒に対する安全性確保の方策の 確立に資する研究	--- 1
吉成 知也	
II. 分担研究報告	
1. カビ毒の分析法の開発と汚染実態調査 -----	9
吉成 知也	
2. オクラトキシン A の簡易分析法の検討 -----	24
服部 一夫	
3. モニリフォルミンのマウス単回及び 14 日間反復投与毒性試験 -----	35
渋谷 淳	
4. 生産菌の情報を応用した新興カビ毒汚染食品の探索 -----	52
渡辺 麻衣子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	62

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

総括研究報告書

国内流通食品に検出されるカビ毒に対する安全性確保の方策の確立に資する研究

研究代表者 吉成 知也 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

カビ毒は、カビが感染した農作物中に産生され、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る。これまで厚生労働科学研究において、平成 13 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。

本研究事業は、カビ毒に関して二つのテーマに取り組む。一つ目のテーマが基準値設定に係るカビ毒の分析法に関する研究で、オクラトキシン A (OTA) とデオキシニバレノール (DON) の同時分析法の開発を行った。小麦からの抽出液を多機能イムノアフィニティーカラムで精製し、LC-MS/MS で両カビ毒の定量を行う分析法を考案した。その分析法の妥当性を評価するために、国内の 8 分析機関による多機関共同試験を実施した結果、添加回収試験と自然汚染検体の分析結果のいずれも事前に設定したクライテリアを満たした。さらに、小麦、ライ麦及び大麦中の OTA 測定用の ELISA キットの性能評価を行った。4 種のキットについて、添加回収試験を行った結果、そのうち 2 種が小麦中の OTA スクリーニングに適応性の高いキットであることが確認された。

二つ目のテーマが新興カビ毒として国際的に注目を浴びているモニリフォルミン (MON) に関する研究である。まずは、食品中の MON の汚染実態調査を行うための分析法の開発を行った。5 倍量の 85%アセトニトリル水溶液による 3 回抽出を行い、陰イオン交換カートリッジで精製後に HPLC で定量する方法を採用し、その性能評価のために、麦類と米を用いて添加回収試験を行った結果、回収率は 83.7~105.2%の範囲内に収まり、良好であった。この分析法を用い、来年度以降汚染実態調査を実施する。続いて、マウスにおける毒性試験を実施した結果、単回投与試験においては高用量群で死亡例や腎臓の尿細管の壊死が、14 日間の反復投与試験においても再生尿細管がみられるといった腎臓への影響が認められた。これらの結果より、MON はマウスに対して急性の致死毒性と腎毒性を示すことが明らかとなった。さらに、産生菌の情報を応用した MON 汚染食品の探索を行うための第一段階として、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系を確立した。その系を用いて保存株の MON 産生性を調べた結果、日本の様々な地域で分離された *Fusarium* 属菌において MON 産生性が確認された。

A. 研究目的

カビ毒は、カビが感染した農作物中に産生され、カビ毒に汚染された食品の摂取により急性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る。これまで厚生労働科学研究において、平成 13 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。

デオキシニバレノール (DON) は、主に穀類に検出されるカビ毒で、食品中の健康危害物質として国際的に認知されており、多くの国・地域で規制が行われている。我が国においては、令和 3 年 7 月に小麦 (玄麦) 中の DON に対して規格基準が設定された。オクラトキシン A (OTA) は、麦類、種実類、豆類を汚染するカビ毒で、発がん性や腎毒性を有することが知られている。平成 26 年の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において、基準値設定の議論がなされ、コーデックス委員会で基準が定められている小麦等について、当該規格に準じて基準値を検討することが了承されている。今後、OTA の基準値が設定された場合、輸入検査において DON に加え OTA の検査も実施する必要が生じ、現場の負担の増加が懸念されている。そこで本研究においては、小麦における DON と OTA の同時分析法の開発と多機関共同試験を実施し、妥当性の確認された DON と OTA の同時分析法を開発し、公定法の候補として提唱する。また、OTA の効率的な検査のためのスクリーニング法の検討を合わせて実施し、公定法として採用可能かを判断するデータを得る。

一方で、近年新興カビ毒と呼ばれる新たな概念が提唱されている。発見は数十年前であり、当時は健康危害物質として認知されていなかった

たものの、近年の分析法の発展によって食品を汚染していることが明らかになってきたカビ毒の総称である。モニリフォルミン (MON) は、新興カビ毒に分類される化合物で、平成 29 年に公表された欧州食品安全機関 (EFSA) の評価結果において、実験動物に対して致死毒性を示すこと、様々な穀類に検出されることが公表され、国際的な関心が高まっており、さらなる情報の収集が望まれている。そこで本研究においては、MON の日本人の健康に対するリスクはどの程度見込まれるかを判断し、将来的に規格基準を設定する必要があるかを議論する根拠となるデータを得るために、食品中の MON の分析法の開発、マウスにおける毒性評価、MON 汚染の原因となる因子の解明を行う。本研究が研究対象とするカビ毒の化学構造を図 1 に示した。

B. 研究方法

(1) 基準値設定に係るカビ毒の分析法に関する研究

①DON と OTA の同時分析法の開発

小麦破砕物 25 g に抽出溶媒 (水、アセトニトリル及びメタノール混合比 2 : 1 : 1) 200 mL を加え、振盪抽出した。抽出物の一部 (約 40 mL) を 50 mL 容遠心チューブに移して遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) し、上清を抽出液とした。抽出液 10.0 mL を 50 mL 容のメスフラスコにとり、標線までリン酸緩衝液を加え良く混合した。ガラス繊維ろ紙でろ過後、ろ液 20.0 mL をイムノアフィニティーカラム (IAC) に注入した。カラムを精製水 3 mL で 6 回洗浄後、溶出液 (メタノール及び酢酸混合比 98:2) 3 mL でカビ毒を溶出した。溶出液を乾固後、HPLC 注入液 (水、アセトニトリル及び酢酸混合比 70:30:1) 1.0 mL にて再溶解後、質量分析器により DON と OTA を定量した。

国内の 8 分析機関において、小麦を用いた添

加回収試験用の2検体(DON 200 µg/kgとOTA 1 µg/kg及びDON 1,000µg/kgとOTA 5 µg/kg)と自然汚染小麦3検体を配布し、上述の分析法に従ってDONとOTAの定量を行った。得られた定量値から回収率、併行相対標準偏差(RSD_r)及び室間再現性標準偏差(RSD_R)を算出し、AOACが公表するガイドラインに記載されたクライテリアを満たすかどうかを評価した。

②OTAの簡易分析法の検討

OTA非汚染の小麦、ライ麦又は大麦の破砕物に、OTA標準品を終濃度2、5又は10 µg/kgとなるよう添加した検体を調製した。4種のOTA測定用のELISAキット(NEOGEN Corporation社製Veratox ochratoxin A, Romer Labs社製AgraQuant Ochratoxin ELISA test、Meizheng社製ToxinFast Grains and Feed Mycotoxin Ochratoxin A ELISA Test Kit及びr-Biopharm社製RIDA screen Ochratoxin A)について、それぞれのキットのプロトコールに従い、添加検体からのOTAの抽出及び検出を行い、回収率を算出し、キットの性能評価を行った。

(2) 新興カビ毒MONに関する研究

①穀類を対象とした分析法の開発

穀類破砕物5gに対し、抽出溶媒(アセトニトリル及び水混合比85:15)25 mLによる抽出を3回行った。抽出液22.5 mLを窒素気流により乾固後、メタノールに懸濁し、平衡化した陰イオン交換カートリッジに負荷した。カートリッジを洗浄後、イオンペア剤を用いてMONを溶出した。イオンペア剤を添加した移動相を用いたHPLC法により、溶出液中のMONを定量した。MON非汚染の小麦、ライ麦、ハト麦、玄米及びコーンに、終濃度50、300又は2,000 µg/kgとなるようMONを添加した検体を用いた添加回収試験により、分析法の性能を評価した。

②マウスを用いた毒性評価

ICRマウスを用いた単回投与試験については、MONを20、40及び80 mg/kg体重の用量で、各群5匹のマウスに経口投与を行い、急性な毒性を観察した。14日間反復投与試験については、急性毒性試験の結果を参考にして、MONを0、20及び40 mg/kg体重の用量で各群3匹のマウスに経口投与を行った。投与期間中は、一般状態、体重、摂餌量の測定を行い、投与期間終了後には、血液検査、器官重量の測定、病理組織学的検査(肝臓、脾臓、腎臓、肺、副腎、胸腺、心臓、胃、腸管、精巣、脳、骨髄)を実施した。

③産生菌の情報を応用したMON汚染食品の探索

Potato dextrose broth (PDB 培地: Sigma-Aldrich)、Sucrose salt asparagine 液体培地(SSA 培地)および Czapek-dox 液体培地(CZ 培地:Difco)の3種類の液体培地で、MON産生性の比較検討を行った。MON産生性を有する可能性のある菌株をPDA斜面培地に接種し、25°C・暗条件で1週間前培養を行った。それぞれの液体培地を200 mL三角フラスコに100 mLずつ分注し、そこに前培養した*Fusarium*菌株を接種し、25°C・暗条件で最長で28日間静置培養した。7日間ごとに培養液を150 µL回収してMON産生量を測定し、経時的に産生量を観察した。分取した培養液をメタノール1 mLと混合し、25°C・3,000 rpmで5分間遠心分離した。その後、平衡化したAgilent SAXカラムに通液し、カラム内を洗浄して、吸着させたMONを1.5 mLのイオンペア剤で溶出し、HPLCで分析した。

最もMON産生量の高かった培地を用い、*Fusarium*属保存株計28菌株を接種して培養し、25°C・暗条件で28日間静置培養した。その後培養液中のMONを定量分析し、各菌株のMON産生性として評価した。

C. 研究結果

(1) 基準値設定に係るカビ毒の分析法に関する研究

①DON と OTA の同時分析法の開発

DON と OTA を同時に精製可能な市販の固相カラムと IAC を入手し、DON と OTA の標準品を添加した小麦検体を用いた添加回収試験を行い、性能評価を行った。その結果、Perkin Elmer 社製の MaxSignal 4in1+のみで良好な結果が得られたことから、今回開発する同時分析法における精製カラムとして採用した。さらに、回収率を向上させるため、抽出溶媒の検討を行い、メタノール:アセトニトリル:水(混合比 1:1:2)の混液が、DON と OTA の抽出に最適であることを見出した。開発した分析法の妥当性を評価するために、国内の 8 分析機関の協力を得て、多機関共同試験による妥当性の評価を行った。その結果、添加回収試験においては、DON の回収率は 97.0~98.3%の範囲内、OTA の回収率は 83.8~90.3%の範囲内であった。また、DON 濃度 209.9、435.6 及び 1540.3 µg/kg、OTA 濃度 2.5、7.4 及び 15.0 µg/kg のそれぞれ 3 濃度の自然汚染小麦を用いた試験においては、室間再現性標準偏差は 12.2~31.0%の範囲内であった。

②オクラトキシン A の簡易分析法の検討

3 濃度 (2、5、10 µg/kg) の OTA を添加した検体を用いてそれぞれのキットの回収率を調べた結果、r-Biopharm 社製キットで最も良好な結果が得られ、小麦、ライ麦及び大麦とも 3 種の添加濃度における回収率は、88-127%の範囲内であった。次に良好な結果が得られたのが Meizheng 社製キットで、大麦における回収率はやや高めであったが、小麦とライ麦では 3 種の添加濃度における回収率は、94-150%の範囲内であった。小麦における回収率は、Neogen 社製キットで 35-69%、Meizheng 社製キットでは

126-150%、r-Biopharm 社製キットで 87-127%の範囲内であった。Romer Labs 社製キットでは、妨害物質のためか発色ができなかった。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

①穀類を対象とした分析法の開発

開発した分析法の性能を評価するために、麦類と米を用いて添加回収試験を行った。その結果、MON を 50 又は 300 µg/kg 添加した小麦における回収率の平均値は、それぞれ 104.2 又は 105.2%であった。ライ麦、ハト麦、玄米及び玄米を用いた添加回収試験においても同様の回収率が得られた。

②マウスを用いた毒性試験

単回投与試験においては、投与後 1~2 時間に 80 mg/kg 投与群の 1 例で死亡、3 例で瀕死状態が認められ、概略の LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg であった。病理組織学的検査の結果、40 mg/kg 投与群の 3 例及び 80 mg/kg 投与群の 2 例で皮質深部を中心とした近位尿細管の壊死、80 mg/kg 投与群の 3 例でうっ血といった被験物質の投与に起因すると考えられる変化が腎臓に認められた。

14 日間反復投与試験においては、腎臓に被験物質の投与に起因すると考えられる変化が認められ、20 mg/kg 投与群の 1 例及び 40 mg/kg 投与群の全例で皮質深部を中心に再生尿細管が認められた。

③産生菌の情報を応用した MON 汚染食品の探索

CZ 培地と PDB 培地では、いずれも SSA 培地での培養像と比較して菌体の生育性は著しく低く、培養液中の MON は非検出であった。SSA 培地で培養した *F. subglutinans* IFM50097 では培養 7 日目で 1.8 mg/kg、14 日目で 8.1 mg/kg、21 日目で 18.1 mg/kg、28 日目で 26 mg/kg の MON 産生が認められた。*F. proliferatum* IFM50127 では培養 7 日目で 1.7 mg/kg、培養 14 日目で 5.2 mg/kg、培養 21 日目で 10.9 mg/kg、

培養 28 日目で 16.7 mg/kg の MON の産生が認められた。

保存していた *Fusarium* 属菌 28 株を SSA 培地で 3 週間または 6 週間培養し、培養液中の MON 産生量を調べた。今回供試した 28 株中では、6 週間の培養期間終了後までに、沖縄県サトウキビ畑土壌由来の *F. proliferatum* IFM50127、北海道小麦畑土壌由来の *F. tricinctum* IFM50055 および沖縄県土壌由来の *F. suglutinans* TSY0645 の 3 株が MON 産生性を有した。これら 4 株以外の菌種ではいずれも MON の産生は認められなかった。

D. 考察

(1) 基準値設定に係るカビ毒の分析法に関する研究

小麦中の DON と OTA の同時分析法の開発について、多機関共同試験の結果で得られたパラメーターは、全て AOAC が公表するクライテリアを満たしていたことから、妥当性が示された。ただ、今回開発したイムノアフィニティーカラムを用いた精製法は、カラムの価格が高いことや操作が煩雑といった欠点がある。次年度は、安価で精製操作が容易な多機能カラムを使用した分析法を開発し、妥当性を検証することとする。

OTA を対象にして、現時点において日本で入手可能な市販 ELISA キット 4 種を用いて、その適応性を検討した。そのために、OTA 非汚染大麦、小麦、ライ麦を用いた添加回収試験を行い、回収率を評価した Cut off 値を 2 µg/kg と想定し、各製品の結果を評価すると、2 種のキットはスクリーニングに適さないと考えられた。1 種のキットでは、大麦における回収率は高い値であったが、小麦、ライ麦では許容範囲であった。もう 1 種のキットでは、3 種の麦類いずれにおいても回収率は 85%以上であり、想定 cut off 値で安定した測定が可能と考えられた。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

穀類中の MON の分析法について検討を行った。これまでの報告では、抽出には水又はアセトニトリル水溶液、精製には陰イオン交換カートリッジや多機能カラムを用いた方法が主に用いられている。定量は、HPLC 又は質量分析器が用いられるが、移動相にイオンペア剤やランタン、分離カラムに HILIC カラムを用いることにより、MON の保持を高める工夫が成されている。これらの報告を参考にし、分析法の検討を行った結果、抽出には 85%アセトニトリル水溶液を用いることとした。水による抽出では、水溶性の成分が多く抽出され、MON の精製が困難となった。また、抽出を 3 回行うことで、回収率が大きく向上した。精製には陰イオン交換カートリッジを用い、HPLC にはイオンペア剤を加えて、C18 カラムを分離に用いた。HILIC カラムでは、ピーク形状が悪く、再現性のある保持時間が得られなかった。添加回収試験による性能評価により、良好な結果が得られたことから、来年度以降はこの分析法を用いて汚染実態調査を実施する。

毒性試験については、単回投与試験の結果で求められた LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg であり、過去に 0、10、20、40 及び 80 mg/kg の投与量で実施されたマウスを用いた MON の単回経口投与毒性試験における LD₅₀ 値 47.6 mg/kg と概ね一致した結果が得られた。引き続いて実施された 14 日間反復投与試験では、単回投与試験の結果を基に 40 mg/kg を最高用量として設定して、動物試験を実施した。MON 投与の影響と考えられる変化として、単回投与試験では腎臓の皮質深部を中心とした近位尿細管の急性尿細管壊死が認められ、これに対する反応性変化として、14 日間反復投与試験では再生尿細管が認められたものと考えられた。マウスにおける MON の毒性標的臓器は、腎臓である可能性が示唆さ

れたが、単回投与毒性試験で認められた急性尿細管壊死が MON 投与後の全身性ショック時の有効循環血量の低下に起因する虚血性の皮質壊死に相当するのか、あるいは、MON の腎尿細管における代謝の際生じる活性中間代謝産物等の毒性に起因するかどうかについては、今後検討をする必要がある。

産生菌の情報を応用した新興カビ毒汚染食品の探索については、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功した。さらに、この系を使用して、鹿児島県および沖縄県に分布する *F. subglutinans* や *F. proliferatum* および北海道に分布する *F. tricinctum* で MON の産生性が確認されたことから、産生株は国内では北海道から沖縄までの広い気候帯に分布し、少なくとも鹿児島県や沖縄県産サトウキビおよび北海道産小麦は MON による汚染のリスクがあることが確認された。

E. 結論

(1) 基準値設定に係るカビ毒の分析法に関する研究

小麦からの抽出液を多機能イムノアフィニティークラムで精製し、LC-MS/MS で定量を行う DON と OTA の同時分析法を開発した。その分析法の妥当性を評価するために、国内の 8 分析機関による多機関共同試験を実施した。その結果、添加回収試験と自然汚染検体の分析結果のいずれも事前に設定したクライテリアを満たした。以上より、開発した分析法は、小麦中の DON と OTA の同時分析に使用可能であることが示された。

4 種類の市販 ELISA キットを用いて、大麦、小麦、ライ麦を用いた添加回収試験を行い、その適応性を検討した。その結果、2 種類のキットについて、小麦への適応性が示された。今後は、自然汚染麦類を用いて LC-MS/MS による分

析値との相関性を明らかにして、スクリーニングテストに取り入れることが可能かを明らかにしていく必要がある。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

穀類中の MON の分析法を開発した。単一試験室による添加回収試験で性能を評価した結果、いずれの食品種における回収率も事前に設定したクライテリアを満たした。この結果より、開発した分析法は MON の汚染実態調査に用いることが可能と考えられた。

マウスにおける毒性試験を実施した結果、単回投与試験においては高用量群で死亡例や腎臓の尿細管の壊死が、14 日間の反復投与試験においても再生尿細管がみられるといった腎臓への影響が認められた。これらの結果より、MON はマウスに対して急性の致死毒性と腎毒性を示すことが明らかとなった。

食品における MON 汚染の原因を解明するための第一段階として、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系を確立した。今後、この系を用いた調査を継続することによって、日本国内で流通する食品における MON 産生菌の分布実態に関する情報を蓄積し、食品に MON 汚染をもたらす因子を解明する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究業績

【論文発表】

1. Yoshinari T, Watanabe M, Hara-Kudo Y. Cross-genus inhibitory activity of polyoxins against aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and fumonisin production by *Fusarium fujikuroi*. FEMS Microbiol Lett. 2022;369(1):fnac048.

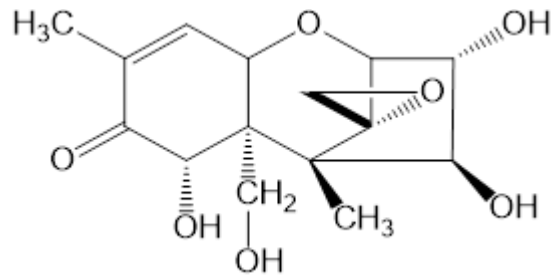
2. Uchiyama Y, Yamazaki D, Kobayashi N, Kanda Y, Sugita-Konishi Y. Electrophysiological effect of citreoviridin on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2022;63:210-217.

【学会発表】

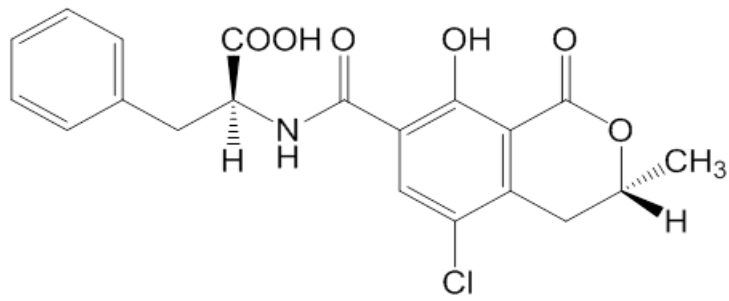
1. 日本毒性学会第 49 回学術年会、開催日：2022 年 6 月 30 日-7 月 2 日、開催場所:札幌、概要：マウスを用いたエンニアチン B の薬物動態試験及び 28 日間反復経口投与毒性試験という演題名で、エンニアチンの血中動態と毒性の関連性について、研究分担者渋谷淳を中心に発表を行った。
2. Asian Mycological Congress 2021、開催日：2022 年 8 月 3-5 日、開催場所、タイ（ハイブリッド）、概要：Development of an analytical method for emerging mycotoxin produced by *Fusarium* spp. isolated from rye という演題名で、新興カビ毒の分析法について、研究代表者吉成知也を中心に発表を行った。
3. International Symposium of Mycotoxicology 2022、開催日：2022 年 9 月 6-9 日、開催場所、タイ（オンライン）、概要：Occurrence of emerging mycotoxins in retail foods in Japan という演題名で、新興カビ毒の日本に流通する食品における汚染実態について、研究代表者吉成知也が発表を行った。
4. International Symposium of Mycotoxicology 2022、開催日：2022 年 9 月 6-9 日、開催場所、タイ（オンライン）、概要：Occurrence of mycotoxins and distribution of trichothecene-producing *Fusarium* spp. In Job's tears products in Japanese retail foods という演題名で、は

と麦におけるカビとカビ毒の汚染実態について、研究分担者渡辺麻衣子が発表を行った。

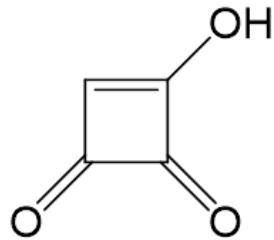
5. 日本防菌防黴学会第 49 回年次大会、開催日：2022 年 9 月 26-27 日、開催場所:東京、概要：形態観察と遺伝子指標両方を用いた同定の実際という演題名で、カビの同定法について、研究分担者渡辺麻衣子が発表を行った。
6. 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会、2022 年 11 月 10-11 日、開催場所：長崎、概要：環状デプシペプチド系カビ毒の分析法の開発と汚染実態調査という題名で、厚生労働科学研究で行ったエンニアチン類の研究について、研究代表者吉成知也が発表を行った。
7. 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会、2022 年 11 月 10-11 日、開催場所：長崎、概要：黒麹菌とその近縁菌のカビ毒産生性及び遺伝子型別に関する研究という演題名で、発酵食品に分布するカビ毒産生菌の分類及びカビ毒産生性について、研究分担者渡辺麻衣子が中心となり発表を行った。
8. 日本マイコトキシン学会第 88 回学術講演会、2023 年 1 月 6 日、開催場所：つくば、概要：タイプ A トリコテセン系カビ毒イソベルカロールの食品における汚染実態と生合成機構の解析という演題名で、新興カビ毒の汚染実態について、研究代表者吉成知也が中心となり発表を行った。



デオキシニバレノール



オクラトキシン A



モニリフォルミン

図 1 本研究が対象とするカビ毒の化学構造

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

カビ毒の分析法の開発と汚染実態調査

研究分担者 吉成 知也 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

デオキシニバレノール (DON) については、小麦において基準値 1.0 mg/kg が設定されている。今後、オクラトキシン A (OTA) についても小麦等について基準値の設定を検討することが予定されている。小麦中の DON と OTA の分析については、両者で抽出溶媒の組成、精製カラム、分析機器が異なっている。そのため、OTA の基準値が設定された場合、同じ検体に対し、DON に加え OTA の検査も新たに実施する必要があるが生じ、現場の負担の増加が懸念されている。そこで、本研究においては小麦における DON と OTA の同時分析法を開発した。小麦からの抽出液を多機能イムノアフィニティーカラムで精製し、LC-MS/MS で定量を行う DON と OTA の同時分析法を考案した。その分析法の妥当性を評価するために、国内の 8 分析機関による多機関共同試験を実施した。その結果、添加回収試験と自然汚染検体の分析結果のいずれも事前に設定したクライテリアを満たした。以上より、開発した分析法は、小麦中の DON と OTA の同時分析に使用可能であることが示された。

モニリフォルミン (MON) は、新興カビ毒に分類される化合物で、2017 年に公表された欧州食品安全機関 (EFSA) の評価結果において、実験動物において致死毒性を示すこと、様々な穀類に検出されることが公表され、国際的な関心が高まっており、さらなる情報の収集が望まれている。そこで本研究は、日本に流通する食品における MON の汚染実態を調べ、MON の日本人におけるばく露量を推定することを目的とした。MON の分析については、既報の方法を改良し、5 倍量の 85%アセトニトリル水溶液による 3 回抽出を行い、陰イオン交換カートリッジで精製後に HPLC で定量する方法を開発した。分析法の性能を評価するために、穀類と米を用いて添加回収試験を行った結果、回収率は 83.7~105.2%の範囲内に収まり、良好であった。開発した分析法により、国内に流通する小麦粉における MON 汚染を調べた結果、国産小麦由来の製品において、50.0%の陽性率で MON が検出された。

研究協力者	森田 剛史 (一財) 日本穀物検定協会
佐藤 英子 川崎市健康安全研究所	村山 智史 (一財) 日本穀物検定協会
竹内 浩 三重県保健環境研究所	下山 晃 (一財) 日本食品検査
谷口 賢 名古屋市衛生研究所	中村 歩 (一財) 日本食品分析センター
福光 徹 神奈川県衛生研究所	小杉 正樹 (一財) 日本食品分析センター
大脇 進治 (一財) 食品分析開発センター	宮崎 光代 (一財) 日本食品分析センター

SUNATEC

A. 研究目的

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

日本においては、リンゴジュース中のパツリン、小麦玄麦中のデオキシニバレノール (DON)、全食品中の総アフラトキシン及び乳中のアフラトキシン M₁ に対して規制が行われている。また、コーデックス規格が定められているオクラトキシン A (OTA) やフモニシンに関しては、これまでの厚生労働科学研究で汚染実態調査が行われており、それらについては食品安全委員会においてリスク評価が実施された。また、JECFA において毒性評価が行われたタイプ A トリコテセン系化合物 (T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-ジアセトキシスシルペノール)、ゼアラレノン (ZEN)、ステリグマトシスチン及びエンニアチン類についても汚染実態調査を行った^{1,2)}。これらカビ毒の汚染実態の情報は、JECFA においてリスク評価がなされる際に活用され、国際機関へ貢献するとともに、日本においてリスク管理を行う必要性を議論するための根拠データとしても活用され、行政施策に直接貢献する。

本事業は、DON、OTA 及びモニリフォルミン (MON) を研究対象とする。DON は、*Fusarium graminearum* などの麦類の赤カビ病の原因となるカビによって産生されるカビ毒で、世界中の穀類において汚染が認められる。日本においては、2022 年 4 月 1 日より小麦について DON の規格基準 1.0 mg/kg が適用されることとなった。それに先立ち、2021 年 9 月 30 日に DON の試験法が通知された。85%アセト

ニトリル水溶液により DON を抽出後、多機能カラムによる精製を行い、HPLC 又は質量分析器を用いて定量を行う。OTA は、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属により産生されるカビ毒で、種実類、豆類や穀類での汚染が問題となっている。コーデックス委員会や EU においては、OTA の最大基準値が設定されているが、日本においては飼料、食品ともに設定されていない。これまで厚生労働科学研究によって 2004~2009 年度の 6 年間に亘って国内に流通する食品についての汚染実態調査が実施された。その結果、麦類やその加工品、カカオ製品、コーヒー豆などから OTA の検出が認められた³⁾。それら汚染実態調査や毒性試験の結果を踏まえ、食品安全委員会により日本における OTA 汚染によるリスク評価 (自ら評価) が実施され、発がん性に関する TDI 15 ng/kg 体重/日が設定された。このような背景を受け、2014 年の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において、基準値設定の議論がなされ、コーデックス委員会で基準が定められている小麦等について、当該規格に準じて基準値を検討することが了承されている。OTA の汚染実態調査では、60%アセトニトリル水溶液により抽出後、イムノアフィニティーカラムによる精製を行い、HPLC で定量を行う分析法が用いられた。対象は同じ麦類であるが、DON と OTA の分析法は全く異なり、今後 OTA の基準値が設定された場合、輸入検疫において DON に加え OTA の検査も実施する必要性が生じ、現場の負担の増加が懸念されている。そこで、本研究においては小麦における DON と OTA の同時分析法を開発することとした。2022 年度には、イムノアフィニティーカラムによって DON と OTA を精製し、LC-MS/MS によって同時定量を行う分析法の妥当性を多機関共同試験によって評価した。

MON は、*Fusarium avenaceum* や *Fusarium subglutinans* などの植物病原性真菌により産生

されるカビ毒で、麦類やトウモロコシにおいて検出される。分子量が 98 と他のカビ毒と比較して小さく、水溶性が非常に高いという物性を有する。ラットに投与すると致死毒性を示す(LD₅₀ 19-25 mg MON/kg 体重) ことが報告されているが、詳細な毒性機構は明らかにされていない。EFSA によるリスク評価が行われ、2017 年にその結果が公表されたことを受け、ヒトの健康に対する新たな危害要因の一つとして国際的な関心が高まっている⁴⁾。そこで本研究においては、MON が日本人の健康に対してリスクを有するかを判断し、将来的に規格基準を設定する必要があるかを議論する根拠となるデータを得ることを目的とする。2022 年度には、穀類を対象とした分析法の開発を行った。

B. 研究方法

(1) DON と OTA の同時分析法

小麦破砕物 25.0 g に抽出溶媒アセトニトリル：メタノール：水 (1 : 1 : 2) 200 mL を加え、30 分間振盪することで抽出を行った。振盪後の試料と抽出溶媒の混合物のうち、約 40 mL を 50 mL 容遠心チューブに移して遠心分離(1,410 g、10 分間) し、抽出液を分離した。

精製にはイムノアフィニティーカラム (PerkinElmer 社製 MaxSignal IAC 4-in-1 アフラトキシン B₁/ZEN/DON/OTA Combo) を用いた。抽出液 10.0 mL を 50 mL 容のメスフラスコにとり、標線まで PBS を加え混合した。ガラスロートにガラス繊維ろ紙をセットし、希釈した抽出液を全てろ過した。イムノアフィニティーカラムに、アダプターを取り付けたリザーバーを連結し、ろ液 20.0 mL を添加した。全てのろ液を通過させたのち、リザーバーを取り除き、カラムに精製水 3 mL を加え、排出させる操作を 6 回繰り返すことによりカラムの洗浄を行った。カラム内の残った水分を、アダプターを取り付けたシリンジで通気し、除去した。ガ

ラス試験管をカラムの下に置き、メタノール：酢酸 (49 : 1) 1 mL をカラムに注入し、自然落下で DON と OTA を溶出させた。溶出液が全て通過してから 5 分後、メタノール：酢酸 (49 : 1) 2 mL をカラムに注入した。アダプターを取り付けたシリンジでカラム担体内の溶媒を押し出した。窒素気流により溶出液を乾固後、残渣をアセトニトリル：水：酢酸 (30 : 70 : 1) 1.0 mL で溶解したものを試験溶液とした。

<LC-MS/MS の測定条件>

HPLC

カラム : InertSustain Swift C18 HP

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度 : 40 °C

移動相 : A 0.1%ギ酸水溶液

B 0.1%ギ酸含有アセトニトリル

分離条件 : 0 分 A : B = 90 : 10

6 分 A : B = 10 : 90

9.5 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 :

DON 297 [M+H]⁺ > 249, 203

OTA 404 [M+H]⁺ > 239, 102

(2) 多機関共同試験

添加回収試験用の試料については、日本国内で購入した全粒粉のうち、DON と OTA が不検出であったものを混合して調製した。3 種の自然汚染試料のうち、2 種は Trilogy 社が販売しているオクラトキシン A 用の管理標準試料 (Batch Code 121201(13.1B) と 121205(5.5B)) を購入し、それぞれ自然汚染検体 No.1 及び No.2 とした。もう 1 種 (No.3) は、日本国内で購入したデュラム小麦の全粒粉を用いた。自然汚染試料は、

配布前に一元分散分析による均一性の確認を行った。各試料から 25.0 g を 10 検体量り取り、さらにそれぞれの検体から 10.0 g を分取し、8 倍量の抽出溶媒を加え、上述の方法で精製を行った後、DON と OTA を定量した。

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

- ・DON と OTA 不検出の小麦玄麦破砕物 200 g
- ・自然汚染小麦 30 g 計 6 袋 (No.01、02、03 を 2 袋ずつ)
- ・DON 標準品アセトニトリル溶液 (100 mg/L) 1 mL (検量線作成用)
- ・OTA 標準品トルエン：酢酸 (98：2) 溶液 (10 mg/L) 1 mL (検量線作成用)
- ・3 種の DON 添加回収試験溶液 0、20 及び 100 mg/L の濃度のアセトニトリル溶液約 0.6 mL を入れたガラス製バイアル小瓶を 2 つずつ。濃度は未記載で番号のみ記した。
- ・3 種の OTA 添加回収試験溶液 0、100 及び 500 µg/L の濃度のトルエン：酢酸 (98：2) 溶液約 0.6 mL を入れたガラス製バイアル小瓶を 2 つずつ。濃度は未記載で番号のみ記した。
- ・イムノアフィニティーカラム 14 本

多機関共同試験の結果の判断には、コーデックス委員会が公表する手順書に記載のクライテリアを参照した。各検体における回収率と室間再現性標準偏差 (RSD_R) のクライテリアを表 1 に示した。HorRat 値のクライテリアは 2 以下であることとした。

(3) MON の分析法

抽出は、試料 5 g にアセトニトリル：水 (85：15) 25 mL を加え、15 分間振盪することで行った。遠心分離 (470 g、10 分間) により抽出液を分離し、三角フラスコに回収した。沈殿にアセトニトリル：水 (85：15) 25 mL を加え、同じ抽出操作を行った。再度、沈殿にアセトニ

トリル：水 (85：15) 25 mL を加え、抽出操作後に遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離し、計 3 回の抽出液を合わせた。抽出液 22.5 mL をガラス容器に移し、窒素気流により乾固後、2 mL のメタノールに懸濁した。抽出液からの MON の精製には強陰イオン交換 (SAX) カートリッジ (Agilent 社製 Bond Elut LRC SAX 500 mg) を用いた。メタノール 2 mL、水 2 mL 及び 0.1M リン酸水溶液 2 mL で平衡した SAX カートリッジにメタノール懸濁液を全量添加した。ガラス溶液をメタノール 2 mL で洗浄後、洗浄液をカラムに添加した。0.1M リン酸水溶液 2 mL と 10%アセトニトリル水溶液 2 mL でカートリッジを洗浄後、減圧して残留する液体を除去した。3.5%硫酸水素テトラブチルアンモニウム含有 0.2M リン酸二水素カリウム水溶液 (pH7.0) 1.5 mL で溶出したものを試験溶液とした。

添加回収試験については、精製水に溶解した MON の標準溶液 (1 mg/mL) を精製水で適宜希釈し、試料中の終濃度が小麦、ライ麦、玄麦については、50 又は 300 µg/kg、はと麦とコーンについては、50、300 又は 2,000 µg/kg となるよう添加し、30 分間放置後に抽出を行った。

<HPLC の測定条件>

カラム：InertSustainSwift C18

4.6×250 mm, 5 µm

カラム温度：30 °C

移動相：水、7%硫酸水素テトラブチルアンモニウム含有 0.4M リン酸二水素カリウム水溶液 (pH7.0) と アセトニトリルの混液 (92：1：8)

分離時間：50 分

流速：1.0 mL/分

注入量：100 µL

(4) MON の汚染実態調査

国産小麦由来の小麦粉 40 件と海外産小麦由来の小麦粉 41 件を神奈川県内の小売店から、又はオンラインで販売されているものを入手した。上述の「MON 分析法」により、各検体中の MON 濃度を測定した。平均値は、検出限界値 (ND) 未満の値を 0 として算出した。

C. 研究結果

(1) DON と OTA の同時分析法の多機関共同試験

自然汚染試料の均一性については、計 20 検体の分析結果を用いた一元分散分析により、いずれの試料においても均一と判断された。自然汚染試料 No.1、No.2 及び No.3 の DON 濃度の平均値は、それぞれ 435.6 µg/kg、209.9 µg/kg 及び 1,540.3 µg/kg、OTA 濃度の平均値は、それぞれ 15.0 µg/kg、7.4 µg/kg 及び 2.5 µg/kg であった。

DON と OTA の各機関の測定値、平均値、回収率の平均値、併行相対標準偏差 (RSD_r)、室間再現性標準偏差 (RSD_R) 及び HorRat を表 2 と表 3 にそれぞれ示した。添加回収試験における DON の回収率は、97.0~98.3%、RSD_r は 2.5~3.3%、RSD_R は 8.3~10.1%、HorRat は 0.4~0.5 の範囲に収まった。3 種の自然汚染試料の DON 濃度の平均値は、それぞれ 380.0 µg/kg、191.5 µg/kg 及び 1436.3 µg/kg であった。RSD_r、RSD_R 及び HorRat は、それぞれ 2.2~8.4%、12.2~16.9% 及び 0.6~0.8 の範囲に収まった。添加回収試験における OTA の回収率は、83.8~90.3%、RSD_r は 3.1~3.7%、RSD_R は 16.0~19.7%、HorRat は 0.7~0.9 の範囲に収まった。3 種の自然汚染試料の OTA 濃度の平均値は、それぞれ 15.6 µg/kg、7.5 µg/kg 及び 2.6 µg/kg であった。RSD_r、RSD_R 及び HorRat は、それぞれ 11.7~26.7%、21.3~31.0% 及び 1.0~1.4 の範囲に収まった。

(2) MON の分析法の開発

既報の方法⁵⁾を改良した分析法により、MON の精製と定量を行った。85%アセトニトリル水溶液で 3 回抽出を行い、抽出液を強陰イオン交換カートリッジで精製後にイオンペア剤を移動相に添加した HPLC で定量を行った。性能評価のために実施した添加回収試験の結果を表 4 に示した。5 種の食品種に 2 又は 3 種の添加濃度で MON を添加した検体からの MON の回収率は、83.7~105.2%の範囲内に収まり、標準偏差は 7.6%以下であった。

(3) 国内流通小麦粉を対象とした MON の汚染調査

国産小麦由来の小麦粉 40 件と海外産小麦由来の小麦粉 41 件の調査結果を表 5、個別の製品における検出濃度を表 6、7 及び 8 に示した。小麦粉 (国産) における陽性率は 50.0%、平均値は 22.6 µg/kg、最大濃度は 198 µg/kg であり、小麦粉 (海外産) における陽性率は 14.6%、平均値は 3.1 µg/kg、最大濃度は 36.3 µg/kg であった。

D. 考察

(1) DON と OTA の同時分析法の多機関共同試験

DON と OTA の同時分析法を開発するにあたり、まずは精製用のカラムを探索した。操作の簡便さから、固相抽出カラムを最初に検討したが、用いた 3 種のいずれにおいても DON の回収率が 50%、OTA の回収率が 70%程度と十分な回収率が得られなかったことから、検討を中止した。次に DON と OTA を含む複数種のカビ毒を同時に精製可能な多機能イムノアフィニティーカラムを検討した。予備検討において、DON と OTA とともに 90%以上の回収率が得られた MaxSignal 4-in-1 を多機関共同試験に用いることとした。

国内の 8 分析機関において、2 種の添加検体と 3 種の自然汚染検体を分析した結果、回収率、 RSD_R 、 RSD_F 及び $HorRat$ はいずれも事前に設定したクライテリアを満たした。この結果より、小麦から DON と OTA をメタノール、アセトニトリルと水の混液で抽出し、多機能イムノアフィニティーカラムによる精製後に LC-MS/MS で定量を行う分析法の妥当性が示された。ただ、OTA の 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加検体の分析結果において、Laboratory No.5 と 8 における回収率が、クライテリアの下限に近い値であったこと、さらに、OTA の自然汚染検体 No.2 の RSD_F が AOAC が公表するクライテリア (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で 21%以下) を上回った。このことより、OTA の分析において、分析機関によっては回収率がクライテリアを下回るといった問題が生じる可能性が考えられた。また、イムノアフィニティーカラムを用いた精製法は、コストが高いことや操作が煩雑といった欠点もある。次年度は、安価で精製操作が容易な多機能カラムを使用した分析法を開発し、妥当性を検証することとする。

(2) MON の分析法の開発及び汚染実態調査

穀類中の MON の分析法については、様々な方法が報告されている⁶⁾。抽出には水又はアセトニトリル水溶液、精製には陰イオン交換カートリッジや多機能カラムを用いた方法が主に用いられている。定量は、HPLC 又は質量分析器が用いられるが、移動相にイオンペア剤やランタン、分離カラムに HILIC カラムを用いることにより、MON の保持を高める工夫が成されている。これらの報告を参考にし、分析法の検討を行った結果、抽出には 85%アセトニトリル水溶液を用いることとした。水による抽出では、水溶性の成分が多く抽出され、MON の精製が困難となった。また、抽出を 3 回行うことで、回収率が大きく向上した。精製には陰イオン交換カートリッジを用い、HPLC の移動相にイオ

ンペア剤を加えて、C18 カラムを分離に用いた。HILIC カラムでは、ピーク形状が悪く、再現性のある保持時間が得られなかった。開発した分析法の性能を単一試験室による添加回収試験で評価した結果、いずれの食品種における回収率もコーデックス委員会が公表する手順書に記載のクライテリア (80-110%) を満たした。この結果より、開発した分析法により MON の汚染実態調査を行うこととした。

今年度は小麦粉のみの調査を行った。国産と海外産で MON の汚染レベルに大きな違いがあり、平均値は国産が海外産の約 7 倍であった。海外産の検体における検出濃度は、定量限界値 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ~40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲であったが、国産では 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を超えて検出された検体が散見された。ドイツとオランダにおける報告によると、収集された小麦粉 22 検体中 1 検体からのみ 10.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の MON が検出され、ノルウェーの報告においては、収集された小麦からは最大 950 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と高い濃度の MON が検出された^{5,6)}。以上から、MON の汚染は地域差が大きい可能性が考えられる。次年度は、開発した分析法を用いてより多くの食品種における MON 汚染を調べる。

E. 結論

小麦からの抽出液を多機能イムノアフィニティーカラムで精製し、LC-MS/MS で定量を行う DON と OTA の同時分析法を開発した。その分析法の妥当性を評価するために、国内の 8 分析機関による多機関共同試験を実施した。その結果、添加回収試験と自然汚染検体の分析結果のいずれも事前に設定したクライテリアを満たした。以上より、開発した分析法は、小麦中の DON と OTA の同時分析に使用可能であることが示された。

MON の分析については、既報の方法を改良し、5 倍量の 85%アセトニトリル水溶液による

3回抽出を行い、陰イオン交換カートリッジで精製後に HPLC で定量する方法を開発した。分析法の性能を評価するために、麦類と米を用いて添加回収試験を行った結果、回収率は 83.7～105.2%の範囲内に収まり、良好であった。国内に流通する小麦粉における MON 汚染を調べた結果、国産小麦粉由来の製品において、50.0%の陽性率で MON が検出された。

F. 参考

- 1) Yoshinari T. *et al.* Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. *Food Addit Contam Part A.* 2019; 36(9):1404-1410.
- 2) 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):1620-1626.
- 3) Sugita-Konishi Y. *et al.* Exposure and risk assessment for ochratoxin A and fumonisins in Japan. *Food Addit Contam Part A.* 2016;30(8):1392-1401.
- 4) European Food Safety Authority. Risks to human and animal health related to the presence of moniliformin in food and feed. *EFSA Journal.* 2018;16(3):5082.
- 5) Uhlig S. *et al.* Moniliformin in Norwegian grain. *Food Addit Contam Part A.* 2004;21(6):598-606.
- 6) Herrera M. *et al.* Survey of moniliformin in wheat- and corn-based products using a straightforward analytical method. *Mycotoxin Res.* 2017;33:333-341.

表 1 多機関共同試験の結果を評価するクライテリア

A) 添加回収試験

	添加濃度 (μg/kg)			
	DON		OTA	
	200	1000	1.0	5.0
回収率 (%)	80-110	80-110	60-115	60-115
室間再現性 標準偏差 (%)	< 32	< 32	< 44	< 44

B) 自然汚染試料

自然汚染試料	室間再現性標準偏差の クライテリア (%)	
	DON	OTA
No.1	< 32	< 44
No.2	< 32	< 44
No.3	< 22	< 44

表 2 多機関共同試験の結果 (DON)

A) 添加回収試験

	Spiked sample (µg/kg)					
	0 µg/kg		200 µg/kg		1,000 µg/kg	
Laboratory No.1	< 6.0	< 6.0	212.3	204.1	1057.2	1026.6
Laboratory No.2	6.0	6.7	214.9	206.4	1006.1	1070.8
Laboratory No.3	< 6.0	6.0	200.6	190.4	932.8	971.0
Laboratory No.4	< 6.0	6.6	168.3	170.8	820.2	826.2
Laboratory No.5	< 6.0	< 6.0	191.7	190.9	989.4	1016.4
Laboratory No.6	< 6.0	< 6.0	209.1	209.6	1025.2	1043.9
Laboratory No.7	< 6.0	6.5	207.9	217.7	1083.2	1018.7
Laboratory No.8	< 6.0	< 6.0	158.3	162.8	959.9	890.3
Mean (µg/kg)			193.9		982.8	
Mean recovery (%)			97.0		98.3	
Repeatability relative SD [RSD _r ,%]			2.5		3.3	
Reproducibility relative SD [RSD _R ,%]			10.1		8.3	
HorRat			0.5		0.4	

B) 自然汚染試料

	Naturally contaminated sample (µg/kg)					
	No.1		No.2		No.3	
Laboratory No.1	439.4	437.1	211.6	204.2	1549.6	1560.5
Laboratory No.2	377.5	440.9	229.0	220.6	1597.2	1591.0
Laboratory No.3	405.5	376.9	201.8	192.5	1364.1	1386.8
Laboratory No.4	287.2	207.5	160.1	135.7	1070.5	1069.5
Laboratory No.5	422.9	420.1	193.9	195.7	1588.0	1583.1
Laboratory No.6	348.4	404.9	205.4	211.0	1548.9	1490.1
Laboratory No.7	427.5	385.5	165.7	200.4	1472.1	1365.9
Laboratory No.8	349.1	349.2	174.5	161.0	1379.7	1364.1
Mean (µg/kg)	380.0		191.5		1436.3	
Mean recovery (%)	-		-		-	
Repeatability relative SD [RSD _r ,%]	8.4		6.2		2.2	
Reproducibility relative SD [RSD _R ,%]	16.9		13.6		12.2	
HorRat	0.8		0.6		0.6	

表3 多機関共同試験の結果 (OTA)

A) 添加回収試験

	Spiked sample ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
	0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
Laboratory No.1	< 0.2	< 0.2	1.1	1.1	5.4	5.1
Laboratory No.2	0.2	0.2	0.9	1.0	4.8	5.1
Laboratory No.3	< 0.2	< 0.2	1.0	1.0	4.6	4.8
Laboratory No.4	< 0.2	< 0.2	0.8	0.8	3.7	3.7
Laboratory No.5	< 0.2	< 0.2	0.7	0.7	3.0	3.1
Laboratory No.6	< 0.2	< 0.2	1.1	1.0	4.6	4.6
Laboratory No.7	< 0.2	< 0.2	1.0	0.9	4.0	4.1
Laboratory No.8	< 0.2	< 0.2	0.8	0.8	3.3	3.1
Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			0.9		4.2	
Mean recovery (%)			90.3		83.8	
Repeatability relative SD [$\text{RSD}_r, \%$]			3.7		3.1	
Reproducibility relative SD [$\text{RSD}_R, \%$]			16.0		19.7	
HorRat			0.7		0.9	

B) 自然汚染試料

	Naturally contaminated sample ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
	No.1		No.2		No.3	
Laboratory No.1	20.9	17.3	12.1	7.0	2.8	3.3
Laboratory No.2	21.8	18.4	10.0	7.3	3.2	2.9
Laboratory No.3	17.3	21.8	9.3	8.2	3.1	2.5
Laboratory No.4	13.7	14.7	5.9	5.8	2.3	3.0
Laboratory No.5	10.9	12.0	4.1	7.4	1.8	2.0
Laboratory No.6	15.0	16.1	9.2	9.8	3.3	3.2
Laboratory No.7	13.7	13.7	4.7	8.9	2.5	2.0
Laboratory No.8	10.1	12.8	5.2	4.8	1.9	2.1
Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	15.6		7.5		2.6	
Mean recovery (%)	-		-		-	
Repeatability relative SD [$\text{RSD}_r, \%$]	11.8		26.7		11.7	
Reproducibility relative SD [$\text{RSD}_R, \%$]	24.2		31.0		21.3	
HorRat	1.1		1.4		1.0	

表 4 MON の分析法の性能評価のための添加回収試験の結果

食品種	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%)	
		平均値	標準偏差
小麦	50	105.2	4.3
	300	104.2	2.8
はと麦	50	89.6	4.9
	300	86.3	0.8
	2,000	83.7	1.3
ライ麦	50	97.8	7.6
	300	104.4	1.6
玄米	50	94.2	5.6
	300	100.8	2.8
コーン	50	98.9	2.7
	300	102.6	1.7
	2,000	101.3	1.4

(n=4)

表 5 国内に流通する小麦粉における MON 汚染の実態

	検体数	陽性数	陽性率 (%)	平均値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
国産	40	20	50.0	22.6	198
海外産	41	6	14.6	3.1	36.3

表 6 小麦粉（国産）における MON 汚染濃度

サンプルID	原産地	MON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	サンプルID	原産地	MON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
33-JWF01	北海道	36.6	34-JWF01	北海道	ND
33-JWF02	北海道	18.2	34-JWF02	北海道	32.3
33-JWF03	北海道	ND	34-JWF03	岩手県	ND
33-JWF04	北海道	22.5	34-JWF04	北海道	ND
33-JWF05	北海道	98.2	34-JWF05	北海道	40.4
33-JWF06	北海道	51.9	34-JWF06	国内産	ND
33-JWF07	国産	ND	34-JWF07	北海道	ND
33-JWF08	北海道	ND	34-JWF08	国産	ND
33-JWF09	北海道	17.8	34-JWF09	国産	ND
33-JWF10	国産	18.6	34-JWF10	北海道	15.8
33-JWF11	国産	22.2	34-JWF11	北海道	43.3
33-JWF12	国産	ND	34-JWF12	岩手県	14.3
33-JWF13	岩手県	ND	34-JWF13	国内	22.4
33-JWF14	国産	35.4	34-JWF14	国産	ND
33-JWF15	北海道	113.5	34-JWF15	国産	40.7
33-JWF16	滋賀県	ND	34-JWF16	北海道	ND
33-JWF17	九州産	ND	34-JWF17	国産	ND
33-JWF18	北海道	ND	34-JWF18	北海道	ND
33-JWF19	北海道	198.1	34-JWF19	北海道	29.9
33-JWF20	北海道	ND	34-JWF20	北海道	30.5

ND : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満

表7 小麦粉（海外産）における MON 汚染濃度-1

サンプルID	原産地	MON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
32-FWF01	フランス	ND
32-FWF02	不明	ND
32-FWF03	イタリア	ND
32-FWF04	不明	ND
32-FWF05	北米他	ND
32-FWF06	北米他	ND
32-FWF07	フランス	ND
32-FWF08	アメリカ他	ND
32-FWF09	北米他	ND
32-FWF10	フランス	19.3
32-FWF11	カナダ、アメリカ主体	ND
32-FWF12	北米、オーストラリア他	ND
32-FWF13	北米他	ND
32-FWF14	カナダ主体	ND
32-FWF15	ドイツ	ND
32-FWF16	北米、オーストラリア他	ND
32-FWF17	北米、オーストラリア他	ND
32-FWF18	カナダ	ND
32-FWF19	カナダ	ND
32-FWF20	北米産	ND
32-FWF21	北米産	ND

ND : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満

表 8 小麦粉（海外産）における MON 汚染濃度-2

サンプルID	原産地	MON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
34-FWF01	オーストラリア	30.9
34-FWF02	オーストラリア	ND
34-FWF03	オーストラリア	36.3
34-FWF04	オーストラリア	ND
34-FWF05	アメリカ他	ND
34-FWF06	フランス	ND
34-FWF07	フランス	ND
34-FWF08	カナダ主体	17.5
34-FWF09	カナダ、アメリカ	ND
34-FWF10	ドイツ	13.2
34-FWF11	ドイツ	11.2
34-FWF12	アメリカ	ND
34-FWF13	インド	ND
34-FWF14	北米	ND
34-FWF15	アメリカ	ND
34-FWF16	カナダ	ND
34-FWF17	カナダ、アメリカ	ND
34-FWF18	北米、オーストラリア他	ND
34-FWF19	フランス、北米他	ND
34-FWF20	北米他	ND

ND : 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

オクラトキシン A の簡易分析法の検討
研究分担者 服部 一夫 (東京農業大学)

研究要旨

国内外で販売されているオクラトキシン A (OTA) 測定用の ELISA キットを入手し、小麦、ライ麦及び大麦中の OTA のスクリーニングに使用可能なものがあるか評価を行った。日本国内の輸入代理店を通じて入手が可能であった 4 種の ELISA キットについて、添加回収試験による性能評価を実施した。その結果、A 社製キットでは、大麦における回収率が 111.0~439.0%、小麦における回収率が 35.0~69.0%、ライ麦における回収率が 21.0~52.0%であり、大麦における回収率が高く、小麦、ライ麦では低かった。B 社製キットでは、大麦における回収率が 39.1~45.2%、小麦における回収率が算出不能、ライ麦における回収率が 30.1~44.4%となり、小麦の回収率が測定できなかつたとともに大麦、ライ麦共に回収率が低かった。C 社製キットでは、大麦における回収率が 149.6~216.0%、小麦における回収率が 126.3~150.5%、ライ麦における回収率が 94.3~118.7%であり、大麦の回収率が高めの結果となったが、小麦とライ麦では良好であった。D 社製キットでは、大麦における回収率が 87.5~106.0%、小麦における回収率が 86.5~127.3%、ライ麦における回収率が 87.7~107.6%となり、大麦、小麦、ライ麦ともに良好な回収率が得られた。

以上の結果から、検討した 4 種の ELISA キットのうち、2 種が小麦中の OTA スクリーニングに適応性の高いキットであることが確認された。

研究協力者 小西良子 (東京農業大学)

A. 研究目的

オクラトキシン A (OTA) は、麦類、種実類、豆類を汚染し、発がん性や腎毒性を有するカビ毒である。産生菌は、*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の両種である。

OTA は血清中タンパク質と結合し、体内に長時間残存することから、蓄積性のあるカビ毒として認識されている。また、畜産物への移行も報告されており、食品衛生的な対応が必要なカビ毒の 1 つである。国際的にはコーデックス規格が 1995 年に、小麦、大麦、ライ麦を対象に 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と定められている。諸外国では EU、韓国、中国などが様々な食品を対象に基準値を設定している。

日本では、2014 年に食品安全委員会から評価書が公表されており、非発がん毒性としての LOAEL は 8 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ であり、不確実係数 500 として TDI を 16 $\text{ng}/\text{kg bw}/\text{日}$ としている。一方発がん性の NOAEL は、ラットの 2 年間発がん試験の結果から 15 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ と評価し、不確実係数 1000 として TDI を 15 $\text{ng}/\text{kg bw}/\text{day}$ とした。JECFA では 100 $\text{ng}/\text{kg bw}$ を 1 週間の PTWI を設定している。EFSA では、ラットにおいて OTA が腎臓がんを発生させた濃度に基づき、BMDL₁₀ 14.5 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ が提唱された。

食品安全委員会の評価を受けて 2014 年に開催された厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において、OTA の基準値設定の議論がなされ、コーデックス委員会で基準が定められている小麦等について、当該規格に準じて基準値を検討することが了承されている。そのため、OTA の効率的な検査のためのスクリーニング法の検討を実施し、公定法として採用可能かを判断する基礎的なデータを得ることを目的に本研究を行った。

B. 研究方法

(1) 材料

①麦類

LC-MS/MS で測定した結果、OTA が検出されなかった小麦、ライ麦および大麦を研究代表者から供与された。これらを添加回収試験に用いた。

②ELISA キット

Neogen Veratox (Neogen 社製)、Agra Quant (Romar 社製)、Meizheng OTA (Meizheng 社製)、RIDA screen (R-Biopharm 社製) の 4 種の ELISA キットを用いた。なお、キット名については A、B、C、D 社製と以降は記載する。

(2) 麦類を用いた添加回収試験

市販の OTA 粉末をアセトニトリルに溶解し、標準品原液 (1 mg/L) を調製した。OTA 非汚染麦類を 5 g 量りとり、原液をそれぞれ 10 μL (最終濃度 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、25 μL (最終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、50 μL (最終濃度 10 ng/g) 添加し、1 昼夜静置したものを添加試料とした。陰性対象としてアセトニトリル 50 μL (最終濃度 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を添加した試料を用いた。その後の抽出工程は、それぞれのキットのプロトコールに従って行った (表 1)。

(3) 抽出操作

A 社製キットと B 社製キットは、抽出液として 70%メタノールを、C 社製キットでは 60%メタノールをそれぞれ用いた。D 社製キットでは、専用抽出液が付属しており、組成は不明であった。また、A 社製キットと B 社製キットは、抽出液をそのまま ELISA に供したが、C 社製キットと D 社製キットは、試料希釈液で希釈してから ELISA に供した。

(4) ELISA 測定

それぞれのキットのプロトコールに従って得られた抽出液を、それぞれのキットの手順書に従って ELISA 測定を行った (表 2)。

(5) 統計処理

ELISA の測定値からの標準曲線の作成と抽出液中の OTA の濃度の計算は、統計処理のソフト GEN 5 (Version 2.0, Biotek, Vermont, USA) を用いた。

C. 研究結果

(1) ELISA の所要時間

それぞれの ELISA キットの所要時間は、測定者の手技による影響も大きいので、各工程の反応時間+15 分程度として算出した。A 社製キットでは 25-40 分、B 社製キットでは 15-30 分、C 社製キット OTA では 46-60 分、D 社製キットでは 46-60 分であった。

(2) 標準曲線

図 1 に、それぞれのキットに付帯している標準品を用いて作成した標準曲線を示した。各キットの測定範囲は、各キットのプロトコールによると、A 社製キットは 5-50 ppb、B 社製キットは 2-40 ppb、C 社製キットと D 社製キットの検出限界はそれぞれ 0.05 ppb および 1.25 ppb であった。

(3) 添加回収試験

大麦、小麦、ライ麦それぞれの回収率を示した (図 2)。

①大麦

A 社製キットでは、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度を添加した検体において著しく高い回収率が得られた。B 社製キットでは、2、5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の添加検体でいずれも 50%程度の回収率であった。C 社製キットでは、いずれの添加検体においても回収率は 100~200%の範囲内であった。D 社製キットでは、いずれの添加検体においても回収率は 100%程度であった。

②小麦

A 社製キットではいずれの添加検体においても回収率は 100%未満であった。B 社製キットでは、非特異的な発色が見られ、計測不能であった。C 社製キットでは、すべての添加検体で回収率は 100%~150%の範囲内であった。ELISA などの簡便迅速法では許容範囲と考えられた。D 社製キットでは、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の添加検体で回収率は 130%であったが、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の添加検体では 85%以上の回収率が認められた。

③ライ麦

A 社製キットおよび B 社製キットでは 60%以下の回収率であったが、C 社製キットおよび D 社製キットでは、100%近い回収率が得られた。

(4) キットによる回収率の違い

4種のキットそれぞれの回収率をまとめた結果を図 3 に示した。

①A 社製キット

大麦における回収率は 111~439%、小麦における回収率は 35~69%、ライ麦における回収率は 21~52%であった。大麦での回収率が高い値とあったが、濃度依存性は認められなかった。小麦とライ麦における回収率は低い傾向にあった。

②B 社製キット

大麦における回収率は 39.1~45.2%、小麦における回収率は測定値が検量線の下限を下回ったため算出不能、ライ麦における回収率は 30.1~44.4%であった。いずれの検体においても回収率は低い傾向であった。

③C 社製キット

大麦における回収率は 149.6~216.0%、小麦における回収率は 126.3~150.5%、ライ麦における回収率は 94.3~118.7%であった。

④D 社製キット

大麦における回収率は 87.5~106.0%、小麦における回収率は 86.5~127.3%、ライ麦における

回収率は 87.7~107.6%となった。

D. 考察

ELISA は、迅速性、簡易性、効率性からみて、現在スクリーニングとして使用される方法として一般的である。すでに日本でもアフラトキシンおよびデオキシニバレノールのスクリーニング法に使われており、妥当性も検証されている。

本分担研究では、OTA を対象にして、現時点において日本で入手可能な市販 ELISA キットを用いて、その適応性を検討した。そのために、OTA 非汚染大麦、小麦、ライ麦を用いた添加回収試験を行い、回収率を評価した。各キットの分析時間については、いずれも 60 分以内であり、迅速性があると考えられた。

定性的なスクリーニングのために使用する簡便迅速法では、cut off 値による判定の妥当性が重要であると考えられる。あるレベル以上の濃度で汚染している検体を迅速に選別し、疑わしい検体に対しては理化学的手法で定量するというプロセスが、検査の効率化を実現する。総アフラトキシン（規制値 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）の公定法においては、ELISA の cut off 値は 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と設定されている。

OTA の場合、日本がコーデックス規格と同じ基準値を設定した場合、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となるため、cut off 値は 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となると想定される。そこで 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の回収率を穀類ごと、メーカーごとに見た。なお、ELISA キットの回収率の性能基準としては、令和 3 年 9 月 30 日付け生食発 0930 第 2 号「小麦中のデオキシニバレノール試験法について」において、60~140%の範囲内であることが示されていることから、その値を参考とした。A 社製キットについては、大麦の 2 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加検体で 140%を超え、小麦の 5 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加検体とライ麦の全検体で 60%を下回ったことから、スクリーニングには適さないと考えられた。B 社製キットについては、3 種

類の麦の全検体で回収率が 60%を下回ったので、適さないと考えられた。C 社製キットでは、大麦の全検体で回収率は 140%を上回ったが、小麦とライ麦では性能基準の範囲内であった。D 社製キットでは、3 種の麦類の全検体において回収率は性能基準の範囲内であり、想定 cut off 値で安定した測定が可能と考えられた。

次に、回収率が良好でなかったキットに関してその原因を考察した。表 3 に 4 つのキットのプロトコルをそれぞれ示した。A 社製キットおよび B 社製キットに共通して、メタノールで抽出後希釈の工程がなかった。そのため、麦類の夾雑物が ELISA 反応に影響を与えた可能性が示唆された。また、コンジュゲートを入れた後で白濁したことから、ミセルができることで正しい抗原抗体反応ができなかった可能性が考えられた。

E. 結論

現時点において日本で入手できる市販 ELISA キットを用いて、大麦、小麦、ライ麦を用いた添加回収試験を行い、その適応性を検討した。その結果、D 社製キットの回収率が参考とした性能基準の範囲内であり、3 種類の麦への高い適応性が示された。C 社製キットでは、大麦には適応しなかったが、小麦、ライ麦には適応する可能性が示された。今後は、品種の違いによる影響等を検討する必要がある。さらに自然汚染麦類を用いて、LC-MS/MS による分析値との相関性を明らかにして、適応性の高い ELISA キットに関しては、妥当性の評価を行い、スクリーニングテストに取り入れることが可能かを明らかにしていく必要がある。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Uchiyama Y, Yamazaki D, Kobayashi N, Kanda Y, Sugita-Konishi Y.

Electrophysiological effect of citreoviridin on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2022;63:210-217.

2. Su J, Zhu B, Inoue A, Oyama H, Morita I, Dong J, Yasuda T, Sugita-Konishi Y, Kitaguchi T, Kobayashi N, Miyake S, Ueda H. The Patrol Yeast: A new biosensor armed with antibody-receptor chimera detecting a range

of toxic substances associated with food poisoning. *Biosens Bioelectron* 2022;219:114793.

(2) 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 各 ELISA キットの抽出条件と抽出方法

	A社製キット	B社製キット	C社製キット	D社製キット
抽出方法	<p>5 g添加試料に70%メタノール溶液20 mLを加える</p> <p>①激しくshake×5 min</p> <p>②遠心分離機3500 rpm×5 min</p> <p>③100 μLを使用</p> <p>★ライ麦のみ50%メタノール溶液を使用</p>	<p>5 g添加試料に70%メタノール溶液25 mLを加える</p> <p>①激しくshake×3 min</p> <p>②遠心分離機3500 rpm×5 min</p> <p>③100 μLを使用</p>	<p>5 g添加試料に60%メタノール溶液25 mLを加える</p> <p>①激しくshake×10 min</p> <p>②遠心分離機3500 rpm×5 min</p> <p>③上澄み液200 μlに試料希釈buffer 600 μL加えVortex×5 sec</p> <p>④50 μLを使用</p>	<p>5 g添加試料に専用抽出液25 mLを加える</p> <p>①Vortex 10 sec</p> <p>②激しくshake 5 min</p> <p>③遠心分離機3500 rpm×5 min</p> <p>④上澄み液1 mLに試料希釈buffer 1 mL加える</p> <p>⑤50 μLを使用</p> <p>★ライ麦のみ2.5g添加試料に専用抽出液25 mLを加え、後は同上。</p>

表2 各 ELISA キットのプロトコール

	A社製キット	B社製キット	C社製キット	D社製キット
ELISA	<p>①サンプルとSTD各2個ずつ分の希釈wellと抗体固定wellをフォルダーに置く</p> <p>②Conjugate液100 μLを希釈wellに加える</p> <p>③サンプル、STD 100 μLを希釈wellに加える</p> <p>④ピペットで3回攪拌後、抗体wellに100 μL加える</p> <p>⑤10 min 室温で incubate</p> <p>⑥蒸留水で5回洗浄し水分除去</p> <p>⑦Substrate液100 μLを加える</p> <p>⑧10 min incubate</p> <p>⑨Stop液100 μL加える</p> <p>⑩650 nmで 20 min以内に測定</p>	<p>①サンプルとSTD各2個ずつ分の希釈wellと抗体固定wellをフォルダーに置く</p> <p>②Conjugate液200 μLを希釈wellに加える</p> <p>③サンプル、STD 100 μLを希釈wellに加える</p> <p>④ピペットで3回攪拌後、抗体wellに100 μL加える</p> <p>⑤10 min 室温でincubate</p> <p>⑥蒸留水で5回洗浄し水分除去</p> <p>⑦Substrate液100 μLを加える</p> <p>⑧5 min 室温で incubate</p> <p>⑨Stop液100 μL加える</p> <p>⑩450 nm/630 nmで10 min以内に測定</p>	<p>①サンプルとSTD各2個ずつ分のwellをフォルダーに置く</p> <p>②各サンプルとSTD 50 μLずつを各wellに加える</p> <p>③抗体液50 μLを加え 1 min攪拌</p> <p>④15 min遮光・室温でincubate</p> <p>⑤250 μL専用洗浄液で4回洗浄後、水分除去</p> <p>⑥Enzyme Conjugate液100 μLをwellに加える</p> <p>⑦15 min遮光・室温でincubate</p> <p>⑧250 μL専用洗浄液で4回洗浄後、水分除去</p> <p>⑨Substrate A 50 μL加えた後 Substrate B 50 μL加え、1 minやさしく攪拌</p> <p>⑩15 min 遮光・室温でincubate</p> <p>⑪Stop液 50 μLを加え攪拌する</p> <p>⑫450 nm/630 nmで5 min以内に測定</p>	<p>①サンプルとSTD各2個ずつ分のwellをフォルダーに置く</p> <p>②各サンプルとSTD 50 μLずつをwellに各加える</p> <p>③Conjugate液50 μLを加えやさしく攪拌する</p> <p>④30 min遮光・室温でincubate</p> <p>⑤250 μL専用洗浄液で2回洗浄後、水分除去</p> <p>⑥Substrate液100 μLを加えやさしく攪拌する</p> <p>⑦15min 遮光・室温でincubate</p> <p>⑧Stop液 100 μLを加え攪拌する</p> <p>⑨450 nm/630 nmで15 min以内に測定</p>

表3 各 ELISA キットのサンプル調製法の比較

	A社製キット	B社製キット	C社製キット	D社製キット
抽出条件	70%メタノール (ライ麦: 50%メタノール) 5 g試料に20 mL抽出溶媒	70%メタノール 5 g試料に25 mL抽出溶媒	60%メタノール 5 g試料に25 mL抽出溶媒	専用抽出溶液 (ECO extractor) 5 g試料に25 mL抽出溶媒 (ライ麦:2.5 g試料に25 mL抽出)
抽出方法	shake 15 min 遠心分離 3500 rpm × 5 min	shake 5 min 遠心分離 3500 rpm × 5 min	shake 10 min 遠心分離 3500 rpm × 5 min	vortex 10 sec shake 5 min 遠心分離 3500 rpm × 5 min
希釈	なし	なし	専用bufferで4倍希釈 少し白濁	専用bufferで2倍希釈 少し白濁
希釈率	4倍	5倍	20倍	10倍(ライ麦のみ20倍)
抽出液	黄色(ライ麦 > 小麦) 白濁(大麦)	黄色(ライ麦 > 小麦) 白濁(大麦)	黄色(ライ麦 > 小麦) 白濁(大麦)	少し茶色
注意点	Conjugate液をいれると白濁	Conjugate液をいれると白濁	抗体液を入れても変化なし	Conjugate液を入れても変化なし

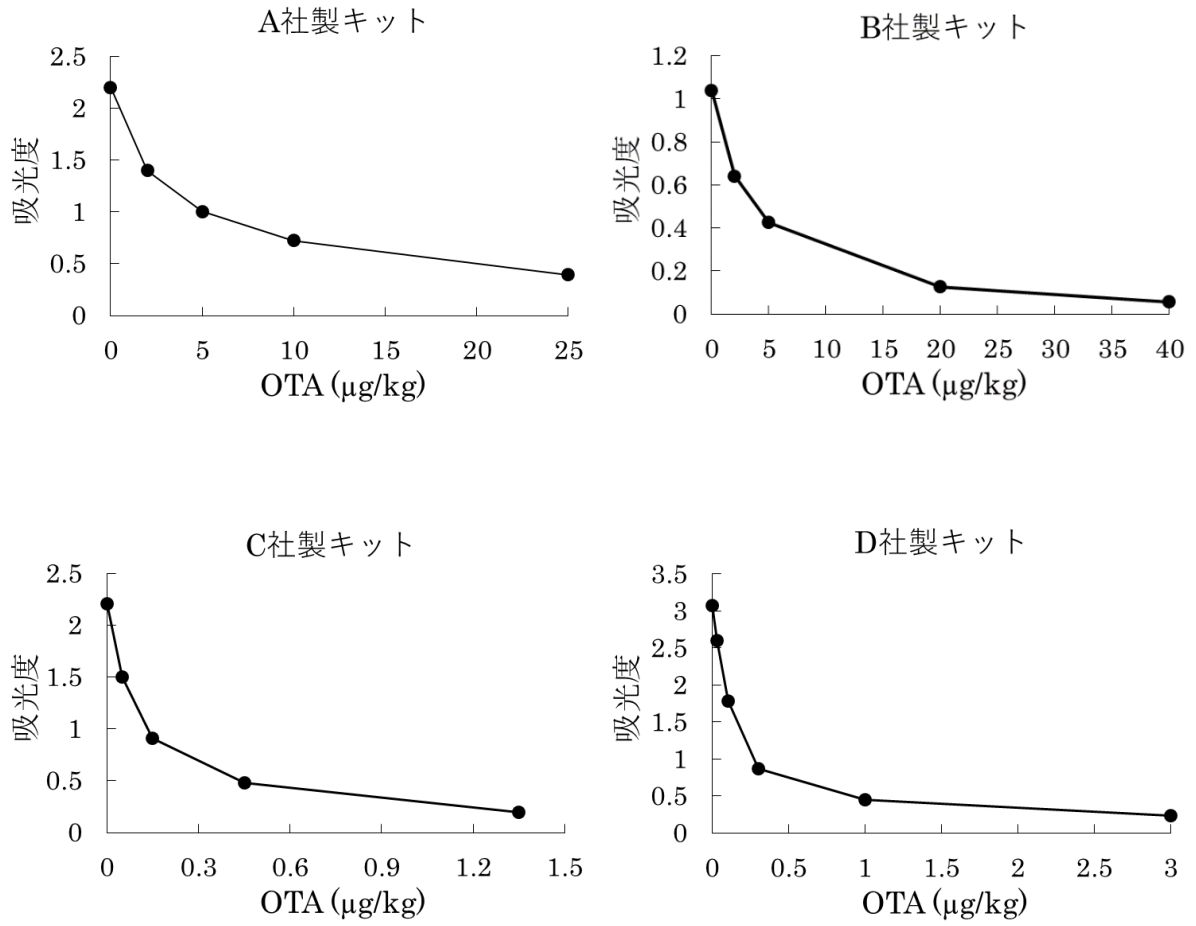


図 1. 各 ELISA キットにおける標準曲線

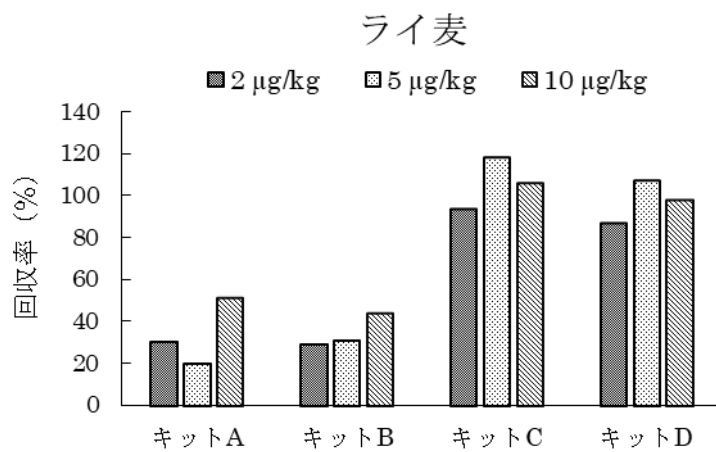
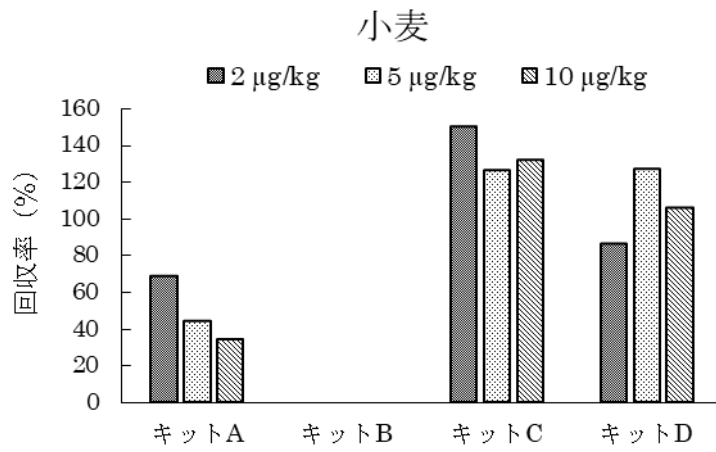
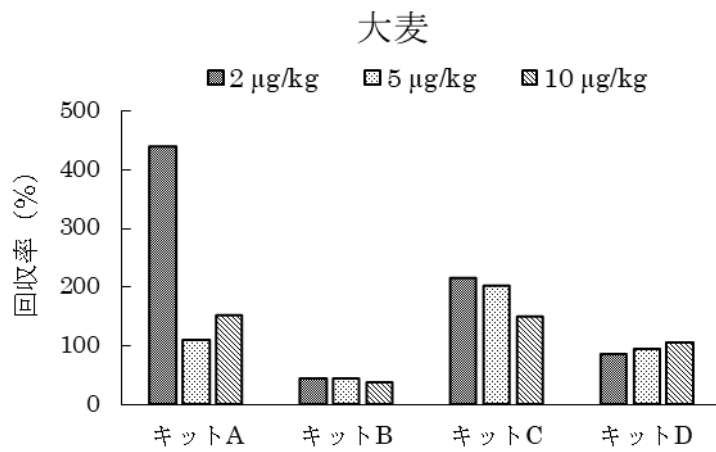


図2 各麦における回収率

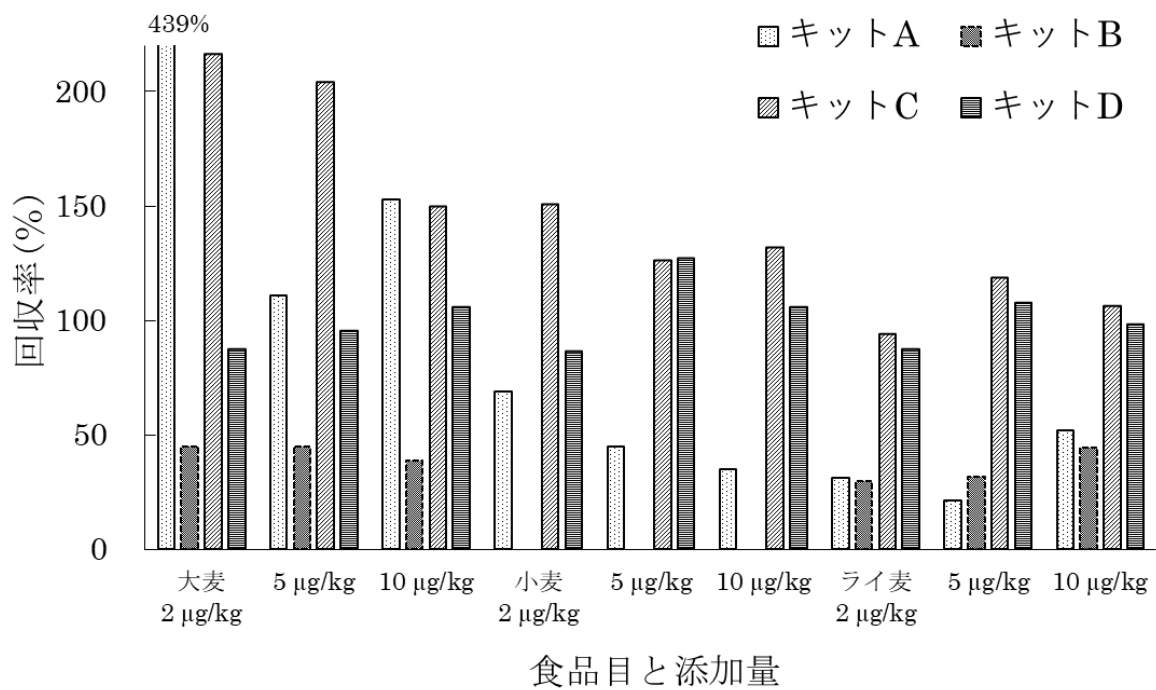


図 3. 各 ELISA キットにおける回収率

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

モニリフォルミンの Maus 単回及び 14 日間反復投与毒性試験

分担研究者 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、新興カビ毒の一つであるモニリフォルミンについての毒性情報を得る為、モニリフォルミンの Maus を用いた一般毒性試験を実施する目的で、単回及び 14 日間反復経口投与毒性試験を実施した。単回投与試験では、文献値を参考に最高用量を 80 mg/kg とし、公比 2、溶媒対照群を含む 4 用量群を設定して投与し、投与後 24 時間、一般状態を観察後、剖検、病理組織学検査を実施したところ、最高用量群で投与後 1-2 時間で死亡及び瀕死例が認められ、LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg であった。また、病理組織学的検査において 40 mg/kg 以上の投与群の腎臓で皮質深部を中心に近位尿細管の壊死が認められた。次いで 14 日間反復投与試験では、この試験結果を参考として最高用量を 40 mg/kg、公比 2、溶媒対照群を含む 3 用量群を設定して投与を行い、一般状態観察、体重、摂餌量測定、剖検、病理組織学検査を実施した。その結果、投与期間中の一般状態及び体重に変化は認められなかったが、病理組織学検査において 20 mg/kg 以上の投与群の腎臓で皮質深部を中心に再生尿細管が認められた。今後は Maus を用いた 28 日間反復投与毒性試験及び腎尿細管壊死の機序解明試験を実施する予定である。

A. 研究目的

カビ毒はカビが感染した農作物中に生産され、歴史的には、カビ毒に汚染された食品の急性摂取による中毒症状や慢性的な摂取による臓器障害が引き起こされている。また、動物実験の実施により腫瘍誘発性が証明されたことで、発がん性等の毒性が懸念されている。これまで厚生労働科学研究において、平成13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ている。

近年、新興カビ毒と呼ばれる今まで見られてこなかった一群の新たなカビ毒の存在が注目されてきている。発見は数十年前であり、当時は汚染物質として認知されていなかったものの、近年の分析法の発展によって食品を汚染している実態が明らかになった。モニリフォルミン (MON) は、新興カビ毒に分類される化合物で、平成29年に公表された欧州食品安全機関 (EFSA) の評価結果において、実験動物において致死毒性を示すこと、様々な穀類に検出されることが公表され、国際的な関心が高まっており、さらなる情報の収集が望まれている。

既存のマウスを用いた MON の毒性試験 (Burmeister ら、1980) では、単回経口投与毒性試験における LD₅₀ 値が 47.6 mg/kg (体重 20 g と仮定して約 1 mg/animal/day) であったのに対し、21 日間反復飲水投与毒性試験においては上記 LD₅₀ 値の約 3 倍の摂取量に相当する 2.9 mg/animal/day の飲水投与用量群においても、有意な体重増加量の減少が認められたのみであり、一貫した結果が得られていない。そのため、EFSA による MON のリスク評価 (EFSA, 2018) において

マウスの毒性情報は考慮されていない。

そこで本分担研究では、マウスを用いた MON の単回及び一般毒性試験を実施し、毒性兆候及び無毒性量等、リスク評価に必要な毒性情報を取得することを目的とした。本年度は、今後実施する 28 日間反復毒性試験の用量設定のための予備検討として、マウスを用いた単回及び 14 日間反復投与試験を実施した。

B. 研究方法

<単回投与試験>

動物実験

5 週齢の雄マウス (ICR [CrI:CD1 (ICR)]) をジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、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。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±3°C、湿度 50±20% の制御環境下で飼育した。飼育期間中は 1 ケージあたり 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。

MON (UkrOrgSyntez Ltd. から購入した化学合成品) を蒸留水に溶解し調製した被験液を 0、20、40、80 mg/kg 体重の投与量でそれぞれ 6 週齢 ICR [CrI:CD1 (ICR)] マウス (雄 5 匹/群) に 5 mL/kg の容量で単回経口投与した。群構成表を Table 1 に示す。投与前後に各動物の生死及び一般状態を観察し、投与から約 24 時間後に剖検を実施した。剖検では外表及び全ての器官、組織を詳細に観察した。Table 2 に示す所定の臓器を採取後、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

投与前、投与直後及び1、2、3、4、6、8、10及び24時間後に実施した。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。

剖検

投与から約24時間後に剖検を実施した。但し、死亡または瀕死状態の個体は、発見後速やかに剖検に供した。死亡動物を除く全ての動物をイソフルランによる吸入麻酔下での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。

病理組織学検査

全ての動物について、Table 2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。全ての動物の検査対象器官/組織についてパラフィン包埋し、H・E染色標本を作製した。作製した全てのH・E染色標本について鏡検を実施した。

統計解析

IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corporation) を用いてLD₅₀値を算出した。

<14日間反復投与試験>

動物実験

5週齢の雄マウス(ICR [CrI:CD1 (ICR)])をジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、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。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±3°C、湿度50±20%の制御環境下で飼育した。飼育期間中は1ケージあたり3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。

MONを蒸留水に溶解し調製した被験液を0、20、40 mg/kg 体重の投与量でそれぞれ6週齢ICR [CrI:CD1 (ICR)] マウス(雄3匹/群)に5 mL/kgの容量で14日間反復経口投与した。群構成表をTable 6に示す。投与期間中は一般状態の観察及び体重、摂餌量の測定を実施した。最終投与の翌日に剖検を実施した。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

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

体重測定

投与期間中は投与1、4、7、10及び13日の投与前、剖検日は動物搬出前に実施した。全動物について08:00~12:00の間に測定した。

摂餌量測定

投与1、4、7、10及び13日の投与前、剖検日は動物搬出前に実施した。ケージ毎に08:00~12:00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、7、10及び13日は3日間の累積摂取量、剖検日は2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。

剖検

最終投与の翌日に剖検を実施した。全ての動物をイソフルランによる吸入麻酔下で

の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。

病理組織学検査

全ての動物について、Table 7 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。全ての動物の検査対象器官/組織についてパラフィン包埋し、H・E 染色標本を作製した。作製した全ての H・E 染色標本について鏡検を実施した。

統計解析

体重について IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corporation) 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。Levene の検定で等分散性を確認した後、Dunnnett の検定あるいは Bonferroni 補正を用いた Aspin-Welch の t 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（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）の指針及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

<単回投与試験>

一般状態の観察

投与後 1 時間までに 40 mg/kg 投与群の 1

例（動物番号：305）及び 80 mg/kg 投与群の全例で自発運動の低下が認められた。40 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：305）では、投与後 2 時間で状態の回復が認められた。一方で、投与後 1~2 時間に 80 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：405）で死亡、3 例（動物番号：401、402、404）で瀕死状態が認められたため、当該動物については速やかに剖検に供した。80 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：403）では、投与後 3 時間には状態の回復が認められた（Table 3）。概略の LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg であった。

剖検（肉眼所見）

剖検では 80 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：403）に消化管のうっ血、80 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：402）に左心房の拡大がみられた（Table 4）。

病理組織学検査結果

腎臓に被験物質の投与に起因すると考えられる変化が認められた（Table 5）。すなわち 40 mg/kg 投与群の 3 例及び 80 mg/kg 投与群の 2 例で皮質深部を中心とした近位尿細管の壊死、80 mg/kg 投与群の 3 例でうっ血が認められた。80 mg/kg 投与群で剖検時に消化管のうっ血と左心房の拡大が 1 例ずつ認められたが、組織学的な著変は見出されなかった。

<14 日間反復投与試験>

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。

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 8）。

摂餌量の変化

いずれの群においても投与期間中の摂餌量に顕著な変化は認められなかった (Table 8)。

剖検 (肉眼所見)

剖検時の肉眼所見に投与による影響は認められなかった (Table 9)。

病理組織学検査結果

腎臓に被験物質の投与に起因すると考えられる変化が認められた (Table 10)。すなわち 20 mg/kg 投与群の 1 例及び 40 mg/kg 投与群の全例で皮質深部を中心に再生尿細管が認められた。

D. 考察

本単回投与試験の結果求められた LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg であり、過去に 0、10、20、40 及び 80 mg/kg の投与量で実施されたマウスを用いた MON の単回経口投与毒性試験

(Burmeister ら、1980) における LD₅₀ 値 47.6 mg/kg と概ね一致した結果が得られた。引き続いて実施された 14 日間反復投与試験では、単回投与試験の結果を基に 40 mg/kg を最高用量として設定して、動物試験を実施した。MON 投与の影響と考えられる変化として、単回投与試験では腎臓の皮質深部を中心とした近位尿細管の急性尿細管壊死が認められ、これに対する反応性変化として、14 日間反復投与試験では再生尿細管が認められたものと考えられた。なお、単回経口投与毒性試験及び 14 日反復投与試験で認められたその他の所見については、用量依存性が認められなかったことから自然発生性または偶発性変化であると考えられた。

また、ラットを用いた MON の 12 週間反復混餌投与試験 (Kriek ら、1977) において、

当該試験の最低用量である混餌濃度 2% (約 17 mg/kg 相当) 以上の投与量で、心筋の変性・壊死・線維化が認められることが報告されているが、マウスを用いた本試験において心筋の病変は認められなかった。また、ラットを用いた 12 週間試験では (Kriek ら、1977)、2% 混餌濃度において好中球の貪食活性の低下も認めているが、EFSA によるレビューでは、本パラメーターについては信頼性の観点からリスク評価に用いられていない。以上より、マウスにおける MON の毒性標的臓器は、腎臓である可能性が示唆されたが、単回投与毒性試験で認められた急性尿細管壊死が MON 投与後の全身性ショック時の有効循環血量の低下に起因する虚血性の皮質壊死に相当するのか、あるいは、MON の腎尿細管における代謝の際生じる活性中間代謝産物等の毒性に起因するかどうかについては、今後検討をする必要がある。

また、来年度に実施予定であるマウスを用いた 28 日間反復投与毒性試験は、40 mg/kg を最高用量とし、公比 2-3 で 3 段階の用量の投与群構成とすることで、マウスにおける MON の毒性兆候及び無毒性量に関する情報を得ることが可能であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

「Oral pharmacokinetics and general toxicity after 28-day repeated oral doses of enniatin B in mice.」 Ryota Ojira, Hiromu Okano, Shunsuke Ozawa, Kazumi Takashima, Yasunori Takahashi, Qian Tang, Xinyu Zou, Toshinori Yoshida,

Tomoya Yoshinari, Makoto Shibutani (尾城 椋太、岡野 拓、小澤俊介、高嶋和巳、高橋康徳、唐 倩、鄒 昕羽、吉田敏則、吉成知也、渋谷 淳：新興カビ毒エンニアチンBのマウスにおける薬物動態と28日間反復投与による一般毒性について.)

The 10th ASVP and 10th JCVP Joint Conference. (The 10th conference of Asian Society of Veterinary Pathology and the 10th Annual Meeting of Japanese College of Veterinary Pathologists Joint Conference.) PC-15, p.177.

March 29-31, 2023.

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－単回投与試験

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	5	101 - 105
低用量群	20	4	5	雄	5	201 - 205
中用量群	40	8	5	雄	5	301 - 305
高用量群	80	16	5	雄	5	401 - 405

Table 2. 病理組織学検査対象器官/組織－単回投与試験

組 織	H・E 標本作製
副腎	√
胸腺	√
脾臓	√
顎下リンパ節	√
腸間膜リンパ節	√
心臓	√
肺（気管支を含む）	√
胃	√
十二指腸	√
空腸	√
回腸（パイエル板を含む）	√
盲腸	√
結腸	√
直腸	√
肝臓	√
腎臓	√

各項目該当ある場合は√で示す。

Table 3. 一般状態－単回投与試験

	Animal No.	Clinical observations								
		Pre-dosing	1h	2h	3h	4h	6h	8h	10h	24h
Control	101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D.W.	102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	104	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	105	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Moniliformin	201	N	N	N	N	N	N	N	N
20 mg/kg	202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	204	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	205	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Moniliformin	301	N	N	N	N	N	N	N	N
40 mg/kg	302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	304	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	305	N	Decrease in locomotor activity	N	N	N	N	N	N	N
	Moniliformin	401	N	Decrease in locomotor activity	Moribundity	-	-	-	-	-
80 mg/kg	402	N	Decrease in locomotor activity	Moribundity	-	-	-	-	-	-
	403	N	Decrease in locomotor activity	Decrease in locomotor activity	N	N	N	N	N	N
	404	N	Decrease in locomotor activity	Moribundity	-	-	-	-	-	-
	405	N	Decrease in locomotor activity	Death	-	-	-	-	-	-

N : No abnormalities.

Table 4. 剖検所見：肉眼所見－単回投与試験

	Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
	0 (Control)	20	40	80
No. of animals examined	5	5	5	5
All tissues				
Not remarkable	5 ^a	5	5	3
Heart				
Enlargement, Atrium, left	0	0	0	1
Intestine				
Congestion	0	0	0	1

^a The number of animals with lesions.

Table 5. 病理組織学検査—単回投与試験

	Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
	0 (Control)	20	40	80
No. of animals examined	5	5	5	5
Kidney				
Necrosis, tubule	0 ^a	0	3	2
minimal	0	0	3	1
moderate	0	0	0	1
Congestion	0	0	0	3
minimal	0	0	0	3
Heart				
Infiltrate, mixed inflammatory cell	0	1	0	1
minimal	0	1	0	1
Liver				
Necrosis, focal	0	0	0	1
moderate	0	0	0	1
Single cell necrosis	1	0	0	1
minimal	1	0	0	1
Infiltrate, mixed inflammatory cell	1	0	1	2
minimal	1	0	1	2
Fatty change, hepatocyte	0	0	0	2
severe	0	0	0	2
Hemorrhage	0	0	0	1
minimal	0	0	0	1
Lung				
Granuloma, focal	0	0	0	1
mild	0	0	0	1
Abscess	0	0	0	1
minimal	0	0	0	1
Edema	0	0	0	1
minimal	0	0	0	1
Glandular stomach				
Dilatation, gland	0	1	0	0
minimal	0	1	0	0

^a The number of animals with findings.

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

Table 5. 病理組織学検査－単回投与試験（続き）

	Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
	0 (Control)	20	40	80
No. of animals examined	5	5	5	5
Lymph node				
Single cell necrosis	0	0	0	3
minimal	0	0	0	2
mild	0	0	0	1
Hemorrhage	0	0	0	1
minimal	0	0	0	1
Infiltrate, neutrophil	0	1	0	0
mild	0	1	0	0

Table 6. 群構成表－14日間反復投与試験

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	3	101－103
低用量群	20	4	5	雄	3	201－203
高用量群	40	8	5	雄	3	301－303

Table 7. 病理組織学検査対象器官/組織－14日間反復投与試験

組 織	H・E 標本作製
副腎	√
胸腺	√
脾臓	√
顎下リンパ節	√
腸間膜リンパ節	√
心臓	√
肺（気管支を含む）	√
胃	√
十二指腸	√
空腸	√
回腸（パイエル板を含む）	√
盲腸	√
結腸	√
直腸	√
肝臓	√
腎臓	√

各項目該当ある場合は√で示す。

Table 8. 体重・摂餌量の変化－14日間反復投与試験

		Dose of moniliformin (mg/kg/day)		
		0 (Control)	20	40
No. of animals examined		3	3	3
Body weight (g)	Day 1	29.0 ± 1.3 ^a	30.1 ± 1.7	28.7 ± 0.4
	Day 4	29.8 ± 2.0	30.7 ± 2.0	30.2 ± 0.6
	Day 7	30.1 ± 2.4	31.7 ± 2.6	31.4 ± 0.8
	Day 10	29.7 ± 2.4	31.3 ± 2.8	31.0 ± 1.1
	Day 13	30.8 ± 2.1	32.5 ± 3.0	32.3 ± 1.2
	Day 15	31.4 ± 2.3	32.7 ± 3.0	32.9 ± 1.7
	Food consumption (g/animal/day)	Day 1	4.6	5.0
Day 4		4.9	4.5	4.3
Day 7		4.8	4.5	4.8
Day 10		5.3	4.7	4.8
Day 13		5.3	4.1	4.5
Day 15		5.3	4.3	4.4

^a Mean ± SD.

*P < 0.05, **P < 0.01, significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Aspin Welch's t-test with Bonferroni correction.

Table 9. 剖検所見：肉眼所見－14日間反復投与試験

	Dose of moniliformin (mg/kg/day)		
	0 (Control)	20	40
No. of animals examined	3	3	3
All tissues			
Not remarkable	3 ^a	3	3

^a The number of animals with lesions.

Table 10. 病理組織学検査－14日間反復投与試験

	Dose of moniliformin (mg/kg/day)		
	0 (Control)	20	40
No. of animals examined	3	3	3
Kidney			
Regeneration, tubule	0 ^a	1	3
Minimal	0	1	2
Mild	0	0	1
Dilatation, tubule	0	1	0
Minimal	0	1	0
Microgranuloma	1	1	0
Minimal	1	1	0
Liver			
Single cell necrosis	1	1	0
Minimal	1	1	0
Infiltrate, mixed inflammatory cell	1	1	0
minimal	1	1	0
Thymus			
Infiltrate, neutrophil	0	0	1
minimal	0	0	1
Glandular stomach			
Infiltrate, mixed inflammatory cell	0	0	1
minimal	0	0	1

^a The number of animals with findings.

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

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

産生菌の情報を応用した新興カビ毒汚染食品の探索

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

国内に流通する食品において、モニリフォルミン (MON) の汚染が懸念されているが、日本国内における食品の MON の汚染実態調査はほとんど行われておらず、情報が非常に少ない。食品の MON 汚染リスクを詳細に評価するためには、各食品における *Fusarium* 属菌の分布やそれら菌の MON 産生性の把握が必要不可欠である。*Fusarium* 属菌における MON 産生性に関しては、これまでにいくつかの菌種で報告されているが、多くの菌種で産生性の有無についての情報が不足している。そこで本研究では、農作物自体および栽培環境由来 *Fusarium* 属菌株の MON 産生性の確認を行い、MON 汚染原因菌の分布に関する知見を収集する目的で、分離株培養液中の MON 分析法の開発、および過去の *Fusarium* 属菌分離株を利用した MON 産生菌の探索を行った。その結果、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功し、この系を用いて、日本の幅広い地域の由来株での *Fusarium subglutinans*、*Fusarium proliferatum* および *Fusarium tricinctum* での MON 産生性を確認できた。*Fusarium* 属菌は遺伝的には幅広い菌種で MON 産生性を持つことが予想されていることから、今後、今回の検討で得られた培養条件による調査を継続することによって、日本国内で流通する食品における MON 産生菌の分布実態や、MON 産生菌種と関連した食品の MON 汚染リスクを評価するための情報を蓄積し、食品検体の MON 汚染因子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
平山 美咲 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
上田 莉瑚 共立女子大学
川上 浩 共立女子大学

A. 研究目的

モニリフォルミン (MON) は、フザリウムトキシンの 1 種で四員環ジトケン構造を持つ水溶性の化合物である¹⁾。1970 年にアメリカで葉枯病のトウモロコシを食べた家畜の中毒が大発生したのを機に、J.Cole ら²⁾によって *Fusarium moniliforme* の毒性代謝物として単離された。急性致死毒性 (LD₅₀ 値) は、雄マウスで (腹腔内投与) 29.1 mg/kg、雄ラットで (経口投与) 50.0 mg/kg、幼若雄鶏で (経口投与) 4.0 mg/kg、7 日齢アヒル (経口投与) 3.7 mg/kg であり、ラットにおける急性毒性では、心筋変性と壊死以外に、肝臓、腎臓、脾臓および腸管への障害も認められた³⁾。アメリカ、フィンランド、イタリア、スロバキアなど世界の様々な地域における食品汚染が報告されており¹⁾、我が国に流通する食品においても汚染が懸念される。しかし、日本国内における食品の MON の汚染実態についての研究はほとんどなされておらず、情報が非常に少ない。

食品の MON 汚染リスクを詳細に評価するためには、各食品における *Fusarium* 属菌の分布や、それらの菌が MON 産生性を有するかの把握が必要不可欠である。*Fusarium* 属菌での MON の産生菌に関しては、これまでに、*F. verticillioides*、*F. subglutinans*、*F. sporotrichioides*、*F. culmorum*、*F. equiseti*、*F. semitectum*、*F. tricinctum*、*F. avenaceum* 等の菌種で産生性が報告されているが、多くの菌種で産生性の有無についての情報が不足している。また Watanabe ら⁴⁾は、*Fusarium* 属菌種間の系統情報および産生菌の文献情報を統合して、MON 産生性が今のところ知られていない菌種についても産生性の有無を予測したところ、MON 産生性は *Fusarium* 属菌で幅広く保持しており、農作物から多く検出される主要な菌種のうち *F. graminearum* 以外のほぼ全てで MON 産生性を持つ可能性を示唆している。しかし本文献で MON 産生性を持つと予測された菌種の半数以

上では現状予測に留まっており、今後の実証が必要である。

そこで、本年度は、農作物自体および栽培環境由来 *Fusarium* 属菌株の MON 産生性の確認を行い、MON 汚染原因菌の分布に関する知見を収集する目的で、分離株培養液中の MON 分析法の開発、および過去の *Fusarium* 属菌分離株を利用した MON 産生菌の探索を行ったので、その成果を報告する。

B. 研究方法

(1) 供試菌株

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第三室に保管されていた農作物または栽培環境由来の *Fusarium* 属菌保存株の計 28 株を供試した。

(2) 米培地での MON 産生陽性コントロール株の探索及び菌株接種方法の検討

米培地を用いて MON 産生の陽性コントロール株の探索及び菌株接種方法の検討を行った。100 mL 三角フラスコ内に米 10 g と米が浸る程度に蒸留水を入れ、綿栓をしてオートクレーブで 121°C・15 分間滅菌した。表 1 に示した *Fusarium* 属菌 5 株を potato dextrose agar (PDA 培地：化学栄研株式会社) に接種し、25°C・暗条件で 1 週間前培養を行った。培養後、コロニーが十分に生育したことを確認し、PDA 平板培地を約 1 cm 四方に切り取った培地片 (寒天培地片接種法)、またはそこから菌体をかきとって懸濁した孢子懸濁液 100 μL (孢子液接種法) を米培地に接種し、25°C・暗条件で 10 日間静置培養した。三角フラスコ内に 85%アセトニトリル水溶液を 50 mL 添加し、米培地を葉さじで砕いた。三角フラスコの内容物をすべて 50 mL チューブに移し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離後、上清 1 mL を 2 mL チューブに取り、窒素吹き付けにより乾固した。メタノール 2 mL を添加し、チューブ内をよく洗浄後、平衡化した Bond Elut SAX (Agilent SAX : Agilent Technology) に通液し、MON を

吸着させた。さらにカラムにイオンペア剤(3.5% TBAHS 含有 0.2 M KH₂PO₄) 1.5 mL を通液して MON を溶出し、HPLC で分析した。

(3) MON 産生株の液体培養条件の検討

Potato dextrose broth (PDB 培地: Sigma-Aldrich)、Sucrose salt asparagine 液体培地(SSA 培地:組成は表 2)⁵⁾および Czapek-dox 液体培地(CZ 培地: Difco) の 3 種類の液体培地の間で、MON 産生効率の比較検討を行った。MON 産生が認められた菌株を PDA 斜面培地に接種し、25°C・暗条件で 1 週間前培養を行った。121°C・15 分間オートクレーブ滅菌した液体培地のいずれか 1 種類を 200 mL 三角フラスコに 100 mL ずつ分注し、そこに前培養した *Fusarium* 菌株を寒天培地片接種法または孢子液接種法で接種し、25°C・暗条件で最長で 28 日間静置培養した。7 日間ごとに培養液を 150 µL 回収して MON 産生量を測定し、経時的に産生量を観察した。分取した培養液をメタノール 1 mL と混合し、25°C・3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。その後、平衡化した Agilent SAX カラムに通液し、カラム内を洗浄して、吸着させた MON を 1.5 mL のイオンペア剤で溶出し、HPLC で分析した。HPLC の測定条件は以下の通りとした。

HPLC : 1260 Infinity (Agilent Technology)

カラム : Intert Sustain Swift C18、4.6×

250 mm, 5 µm (GL Sciences 株式会社)

移動相 : 水、7%硫酸水素テトラブチルアンモニウム含有 0.4M リン酸二水素カリウム水溶液 (pH7.0) と アセトニトリルの混液 (92 : 1 : 8)

流速 : 1 mL/min

注入量 : 100 µL

検出波長 : 229 nm

(4) 保存株における MON 産生株の検索

(3) で得られた結果を比較し、最も MON 産生性の高かった液体培地種類および菌接種方法を組み合わせ、表 3 の *Fusarium* 属保存株計 28 菌株を接種して培養し、25°C・暗条件で 28 日間静置培養した。その後(3)に記載の方法で抽出・精製・分析し、その結果を各菌株の MON 産生性として評価した。

C. 研究結果

(1) 米培地での MON 産生陽性コントロール株の探索及び菌株接種方法の検討

供試した 5 株の *Fusarium* 属菌株の米培地における MON 検出量を図 1 に示した。鹿児島県サトウキビ土壌由来の *F. subglutinans* IFM50097 では寒天培地接種法で 67.1 mg/kg、孢子液法で 5.2 mg/kg の MON 産生性が、沖縄県サトウキビ土壌由来の *F. proliferatum* IFM50127 では寒天培地接種法で 5.4 mg/kg の MON の産生が認められた。それら以外の菌株および接種方法の組み合わせでは MON 産生性は認められなかった。したがって、前培養した *Fusarium* 菌体の接種方法は、孢子液よりも寒天培地接種法の方が産生量は高くなること、2 株の間では *F. subglutinans* IFM50097 のほうがより MON 産生性が高いことを確認した。本検討の結果から、陽性対照として 2 菌種 2 株の MON 産生株を得ることができた。

(2) MON 産生株の液体培養条件の検討

CZ 培地と PDB 培地では、いずれも SSA 培地での培養像と比較して菌体の生育性は著しく低く、培養液中の MON は非検出であった。SSA 培地において MON 産生が認められた 2 株の培養液の HPLC クロマトグラム、および培養液中の MON 検出濃度の経時変化を図 2 に示した。*F. subglutinans* IFM50097 では培養 7 日目で 1.8 mg/kg、14 日目で 8.1 mg/kg、21 日目で 18.1

mg/kg、28 日目で 26 mg/kg の MON 産生が認められた。*F. proliferatum* IFM50127 では培養 7 日目で 1.7 mg/kg、培養 14 日目で 5.2 mg/kg、培養 21 日目で 10.9 mg/kg、培養 28 日目で 16.7 mg/kg の MON の産生が認められた。これら経時的な MON 産生量データの線形近似をとったところ、その決定係数はそれぞれ $R^2=0.9932$ または $R^2=0.9881$ となり (図 2)、近似性が高かった。以上のことから、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする人工培地でのアッセイ系の確立に成功したこと、また少なくとも 28 日間の培養期間内では時間に比例して MON 産生量が増加することが確認された。

(3) 保存株における MON 産生株の検索

今回の検討で供試した *Fusarium* 属菌 28 株を用いての SSA 培地での 3 週間または 6 週間培養後での培養液中の MON 検出濃度を表 3 に示した。今回供試した 28 株中では、6 週間の培養期間終了後までに、沖縄県サトウキビ畑土壌由来の *F. proliferatum* IFM50127、北海道小麦畑土壌由来の *F. tricinctum* IFM50055 および沖縄県土壌由来の *F. suglutinans* TSY0645 の 3 株が MON 産生性を有した。これに (2) の検討で MON 産生性を示した鹿児島県サトウキビ畑土壌由来の *F. suglutinans* IFM50097 を加え、国内流通食品では、現状では少なくとも、鹿児島県および沖縄県産サトウキビや北海道産小麦で MON 汚染の可能性が有り、さらに MON 産生菌は北海道から沖縄県まで国内に広く分布する可能性があると考えられた。上記 4 株以外の菌種ではいずれも MON の産生は認められなかった。

D. 考察

今回の検討で、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功した。この系を使用して、鹿児島県および沖縄県に分布する *F. subglutinans* や *F.*

proliferatum、および北海道に分布する *F. tricinctum* で MON の産生性が確認されたことから、産生株は国内では北海道から沖縄までの広い気候帯に分布し、少なくとも鹿児島県や沖縄県産サトウキビおよび北海道産小麦は MON による汚染のリスクがあることが確認された。今回供試した菌種のうち上述 3 菌種以外では、MON 産生性を持たない菌種の可能性もあるが、過去の研究から、*Fusarium* 属菌は遺伝的には幅広い菌種で MON 産生性を持つことが予想されている⁴⁾。本研究では 1 菌種につき 1~2 株しか調査していないため、さらに多菌株を調査し、多くの地域の分離源に由来する上述 3 菌種以外の菌種での MON 産生性の評価を継続する必要があると考えられた。

MON を産生させる人工培地での培養には、SSA 培地での寒天片接種法による培養法が最適であり、28 日間では培養期間に比例して MON 産生量が増加することが認められた。このことから、少なくとも今回の検討での培養日数の上限期間内では、SSA 培地ですできるだけ長期間の培養を行うことで、より感度の高い MON 産生性確認実験ができることが示された。今回の検討で得られた培養条件による調査を継続することによって、日本国内で流通する食品における MON 産生菌の分布実態やこれから生じる食品の MON 汚染リスクを評価するための情報を蓄積することによって、食品検体の MON 汚染因子を解明していく予定である。

E. 結論

本研究の結果から、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功した。この系を用いて、北海道、鹿児島および沖縄県由来株での MON 産生性を確認できた。*Fusarium* 属菌は遺伝的には幅広い菌種で MON 産生性を持つことが予想されていることから、今後、今回の検討で得られた培養条

件による調査を継続することによって、日本国内で流通する食品における MON 産生菌の分布実態やこれから生じる食品の MON 汚染リスクを評価するための情報を蓄積し、食品検体の MON 汚染因子を解明する必要がある。

F. 参考文献

- 1) Gruber-Dorninger C. *et al.* Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *J. Agric. Food Chem.* 2017;65:7052-7070.
- 2) Cole R. J. *et al.* Toxin from *Fusarium moniliforme*: Effects on Plants and Animals. *Science.* 1973;179:4080.
- 3) 駒田旦ら. フザリウムー分類と生態・防除. 初版. 1973. 全国農村教育協会.東京.
- 4) Watanabe M. *et al.* Utility of the phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin-producing potential. *Food Add Contam Part A.* 2013;30: 1370–1381.
- 5) 諸角聖ら.トリコテセン系カビ毒産生用合成培地の検討. *食品と微生物.* 1988;5: 131-136.

G. 研究業績

【学会発表】

- 1) Misaki Hirayama, Maiko Watanabe, Sayaka Ban, Takashi Yaguchi, Yukiko Hara-Kudo, Tomoya Yoshinari. Development of an analytical method for emerging mycotoxin produced by *Fusarium* spp. isolated from rye. *Asian Mycological Congress 2021.* 2022. 8. 3-5. Thailand (ハイブリッド開催)
- 2) Maiko Watanabe, Misaki Hirayama, Sayaka Ban, Takashi Yaguchi, Kiminori Shimizu, Haruo Takahashi, Yukiko

Hara-Kudo, Tomoya Yoshinari. Occurrence of mycotoxins and distribution of trichothecene-producing *Fusarium* spp. in Job's tears products in Japanese retail foods. *International Symposium of Mycotoxicology 2022.* 2022. 9. 6-9. Thailand (ハイブリッド開催)

- 3) 渡辺麻衣子. 形態観察と遺伝子指標両方を用いた同定の実際. 日本防菌防黴学会第 49 回年次大会, シンポジウム 7 カビ試験法. 2022. 9. 26-27.
- 4) 伊藤紫野、山田修、水谷治、橋本一浩、川上裕司、後藤慶一、清水公德、高橋治男、工藤由起子、渡辺麻衣子. 黒麹菌とその近縁菌のカビ毒産生性及び遺伝子型別に関する研究. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 2022. 11. 10-11.

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. 米培地での MON 産生陽性コントロール株の探索に用いた菌株一覧

菌株番号	分離原試料 の産地	分離原	菌種
IFM50023	青森県	小麦土壌	<i>Fusarium equiseti</i>
IFM50097	奄美大島	サトウキビ土壌	<i>Fusarium subglutinans</i>
IFM50127	沖縄県	サトウキビ土壌	<i>Fusarium proliferatum</i>
33HT-01-02	岩手県	ハト麦	<i>Fusarium incarnatum</i>
33HT-01-24	岩手県	ハト麦	<i>Fusarium sporotrichiodes</i>

表 2. 蒸留水 1L あたりの sucrose salt asparagine 培地の組成

化学物質	含有量 (g/L)
Sucrose	200
Asparagine	10
Ca-panthothenate	0.01
NaNO ₃	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1
KH ₂ PO ₄	0.75
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.001
CuSO ₄ · 7H ₂ O	0.001
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.0001
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.001
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.001
Na ₂ B ₄ O ₇	0.001

表 3. *Fusarium* 属保存菌株の SSA 培養液中の MON 産生量

菌株番号	分離原試料 の産地	分離原	菌種	MON 産生量 (mg/L)	
				3 週間	6 週間
1. IFM50127	沖縄県	サトウキビ土壌	<i>Fusarium proliferatum</i>	9.2	8.7
2. IFM50003	秋田県	小麦土壌	<i>Fusarium acuminatum</i>	< 0.2	< 0.2
3. IFM50012	岩手県	小麦土壌	<i>Fusarium avenaceum</i>	< 0.2	< 0.2
4. IFM50013	岩手県	小麦土壌	<i>Fusarium oxysporum</i>	< 0.2	< 0.2
5. IFM50031	青森県	小麦土壌	<i>Fusarium equiseti</i>	< 0.2	< 0.2
6. IFM50036	青森県	小麦土壌	<i>Fusarium longipes</i>	< 0.2	< 0.2
7. IFM50051	北海道	小麦土壌	<i>Fusarium sambucinum</i>	< 0.2	< 0.2
8. IFM50055	北海道	小麦土壌	<i>Fusarium tricinctum</i>	3.6	3.6
9. IFM50097	鹿児島県	サトウキビ土壌	<i>Fusarium subglutinans</i>	< 0.2	< 0.2
10. TSY0339	千葉県	マスクメロン	<i>Fusarium avenaceum</i>	< 0.2	< 0.2
11. TSY0529	不明	茶畑土壌	<i>Fusarium acuminatum</i>	< 0.2	< 0.2
12. TSY0548	沖縄県	土壌	<i>Fusarium camptoceras</i>	< 0.2	< 0.2
13. TSY0552	小笠原	土壌	<i>Fusarium equiseti</i>	< 0.2	< 0.2
14. TSY0645	沖縄県	土壌	<i>Fusarium subglutinans</i>	< 0.2	56.1
15. TSY0664	不明	玄米	<i>Fusarium verticillioides</i>	< 0.2	< 0.2
16. TSY0717	国内	麦	<i>Fusarium</i> sp.	< 0.2	< 0.2
17. TSY0743	不明	生薬シャクヤク	<i>Fusarium poae</i>	< 0.2	< 0.2
18. TSY0769	不明	カムカム果汁	<i>Fusarium</i> sp.	< 0.2	< 0.2
19. TSY0955	愛知県	備蓄米	<i>Fusarium graminearum</i>	< 0.2	< 0.2
20. NS0030	不明	リンゴ	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	< 0.2	< 0.2
21. NS0115	福島県	モモ	<i>Fusarium proliferatum</i>	< 0.2	< 0.2
22. NS0185	長野県	ブドウ	<i>Fusarium proliferatum</i>	< 0.2	< 0.2
23. 33Ry-25-05	北海道	ライ麦	<i>Fusarium avenaceum</i>	< 0.2	< 0.2
24. 33Ry-25-13	北海道	ライ麦	<i>Fusarium sporotrichiodes</i>	< 0.2	< 0.2
25. 33HT-01-02	岩手県	ハト麦	<i>Fusarium incamatum</i>	< 0.2	< 0.2
26. 33HT-01-24	岩手県	ハト麦	<i>Fusarium sporotrichiodes</i>	< 0.2	< 0.2
27. 33HT-01-31	岩手県	ハト麦	<i>Fusarium armeniacum</i>	< 0.2	< 0.2
28. 33HT-10-07	タイ	ハト麦	<i>Fusarium incamatum</i>	< 0.2	< 0.2

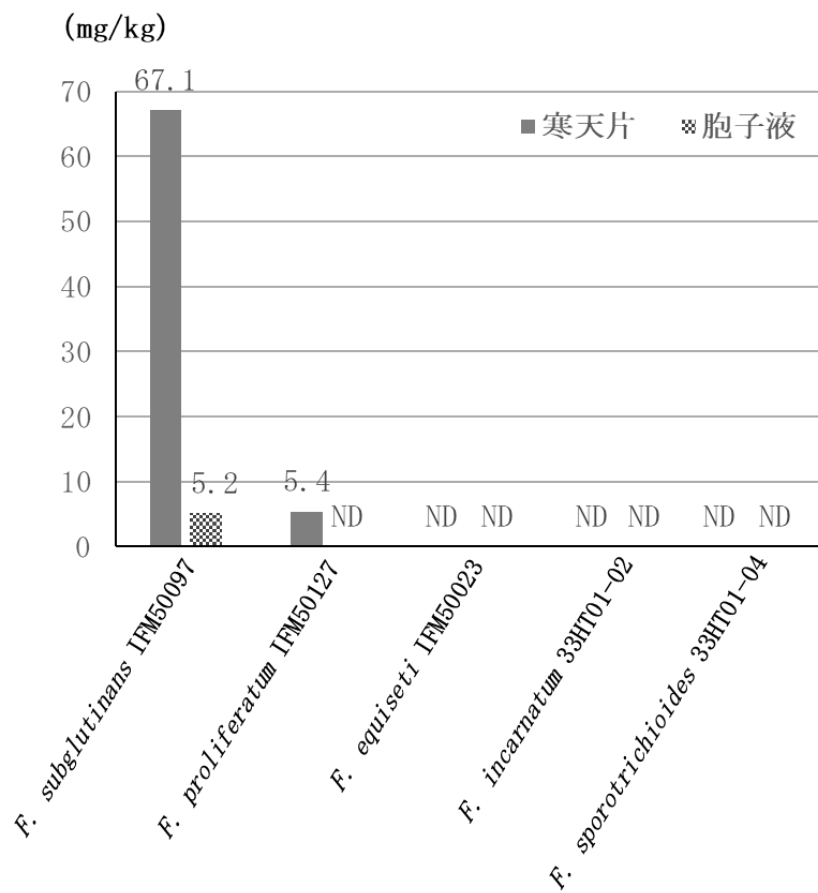
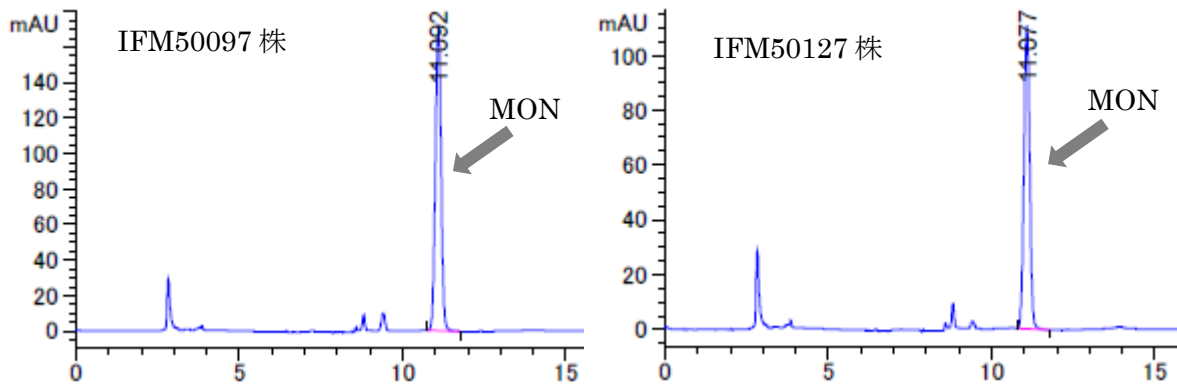
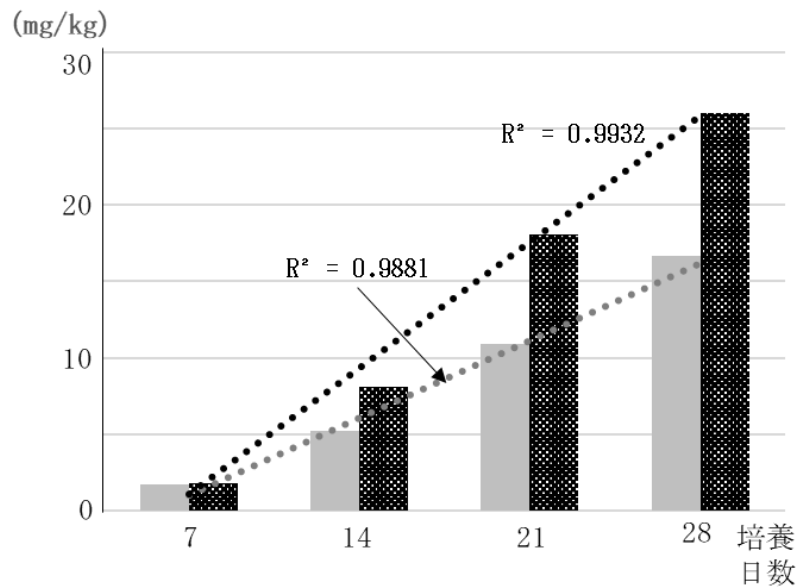


図 1. 米培地での MON 産生量の比較

A) 培養液から精製した MON の HPLC クロマトグラム



B) *Fusarium* 属菌株培養液中の MON 産生量の推移



- IFM50127 国産サトウキビ土壌由来 *F. proliferatum*
- ▨ IFM50097 国産サトウキビ由来 *F. subglutinans*

図 2. SSA 培地での MON 産生量の比較

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, Watanabe M, Hara-Kudo Y.	Cross-genus inhibitory activity of polyoxinols against aflatoxin production by <i>Aspergillus parasiticus</i> and fumonisin production by <i>Fusarium fujikuroi</i> .	FEMS Microbiol Lett.	369(1)	fnac048	2022
Uchiyama Y, Yamazaki D, Kobayashi N, Kanda Y, Sugita-Konishi Y.	Electrophysiological effect of citreoviridin on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.	Shokuhin Eiseigaku Zasshi	63	210-217	2022

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東京農工大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 千葉 一裕

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 国内流通食品に検出されるカビ毒に対する安全性確保の方策の確立に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 農学研究院 動物生命科学部門 教授

(氏名・フリガナ) 渋谷 淳 (シブタニ マコト)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 国内流通食品に検出されるカビ毒に対する安全性確保の方策の確立に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生微生物部第四室・室長

(氏名・フリガナ) 吉成 知也・ヨシナリ トモヤ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 国内流通食品に検出されるカビ毒に対する安全性確保の方策の確立に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生微生物部第三室・室長

(氏名・フリガナ) 渡辺 麻衣子・ワタナベ マイコ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 東京農業大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 江口 文陽

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 国内流通食品に検出されるカビ毒に対する安全性確保の方策の確立に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 応用生物科学部・栄養科学科・教授

(氏名・フリガナ) 服部 一夫 (ハットリ カズオ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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