

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5年度 総括研究報告書

研究代表者 吉成 知也

令和6(2024)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
国立医薬品食品衛生研究所／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 -----	8
国立医薬品食品衛生研究所／吉成 知也	
2. オクラトキシン A の簡易分析法の検討 -----	27
東京農業大学／服部 一夫	
3. モニリフォルミンのマウス 28 日間反復投与毒性試験 -----	38
東京農工大学／渋谷 淳	
4. 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 ----	50
国立医薬品食品衛生研究所／渡辺 麻衣子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	70

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。一つ目のテーマは、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 10 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、自然汚染検体及び人工汚染検体の分析結果のいずれにおいて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 測定用のラテラルフローキットの性能評価を行った。6 種のキットについて、添加回収試験を行った結果、3 種において OTA を測定できる可能性が示された。

二つ目のテーマは、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。昨年度開発した穀類中の MON の分析法について、単一試験室における妥当性評価を実施した。その結果、6 種の穀類において回収率の平均値は 86~105%、併行精度は 0.52~5.9%、室内精度は 2.1~9.3%の範囲内であった。これらのパラメーターは、クライテリアを満たしたことから、汚染調査に用いる性能を有することが確認された。続いて、MON 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。40 mg/kg 群の腎臓皮質における再生尿細管と肝臓における肝細胞肥大が認められたことより、MON は腎臓を毒性標的とする可能性が考えられた。10 mg/kg 群に MON の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量は 10 mg/kg と判断された。さらに、国内に流通する穀物の MON 汚染原因菌を調べた結果、小麦から *F. avenaceum* とその近縁種、ライ麦から *F. oxysporum*、トウモロコシから *F. fujikuroi* とその近縁種が MON 産生菌として検出された。これらの結果から、日本国内で流通する穀物の MON 汚染原因菌の菌種は穀物種毎に傾向があることが明らかとなった。

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。令和 5 年 12 月の薬事・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と大麦について、当該規格に準じて基準値を設定することが了承された。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 10.0 g に抽出溶媒 (アセトニトリル : 水 (5 : 1) にギ酸を終濃度 0.1% で添加したもの) を 50 mL を加え、振盪機を用いて 200 回/分で 30 分間往復振盪抽出した。多機能カラム (PuriTox Total Myco-MS) に抽出液 1.4 mL を加え、溶出液を回収した。溶出液 500 μ L に精製水 500 μ L を加えて良く混ぜた後、質量分析器により DON と OTA を定量した。

国内の 10 分析機関において、小麦を用いた添加回収試験用の 3 検体と汚染小麦 2 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

6社6種類(A~Fキット)のラテラルフローキットを購入した。OTA非汚染麦類にOTA標準品を終濃度3 µg/kg、5 µg/kg、10 µg/kgとなるよう添加した試料を各キットで測定し、回収率を算出した。

(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 5 g 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。妥当性評価については、小麦、大麦、ライ麦、はと麦、コーン及び玄米に MON 標準品を添加したものを各濃度 2 試料調製し、計 5 日間分析を行い、得られた分析値から回収率、併行精度 (RSD_F) 及び室内精度 (RSD_R) を算出した。

②マウスを用いた毒性評価

MON を注射用水で調製した被験液を 0、10、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 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・摂水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。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。

③産生菌の情報を応用した MON 汚染食品の探索

MON 汚染穀物を DRBC 培地に接種し、MON を産生する可能性のある *Fusarium* 属菌を分離・同定した。分離株を液体培地で培養し、産生された MON を定量分析した。穀物の種類ごとに、MON の汚染量と分離された *Fusarium* 属菌の MON 産生性を比較解析した。

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

共同試験に参加した 10 機関のうち、9 機関の結果を解析に採用した。3 種の濃度の添加試料における DON の回収率は、88~89%であった。汚染試料 No.1 と No.2 の平均濃度はそれぞれ 203 及び 736 µg/kg であった。3 種の添加試料と 2 種の汚染試料における RSD_F は 1.0~5.0%、RSD_R は 13~15%、HorRat は 0.7~0.9 の範囲内であった。3 種の濃度の添加試料における OTA の回収率は、91~96%であった。汚染試料 No.1 と No.2 の平均濃度はそれぞれ 9.8 及び 20 µg/kg であった。3 種の添加試料と 2 種の汚染試料における RSD_F は 2.6~7.3%、RSD_R は 4.3~15%、HorRat は 0.2~0.7 の範囲内であった。

②OTA の簡易分析法の検討

小麦を用いた添加回収試験の結果においては、A キットの回収率は 3、5、10 µg/kg 添加試料で 100% 以上であった。B キットの回収率は、10 µg/kg 添加試料で 73% であったが、それ以外の濃度では 50% 以下であった。D キットでは、3 µg/kg 添加試料は陰性となったが、5、10 µg/kg 添加試料では 70% 以上の回収率であった。E キットは 3、5、10 µg/kg 添加試料全てで 100% に近い良好な回収率であった。F キットでは低濃度では回収率は高くなり、高濃度では低くなる傾向が見ら

れたが、全ての濃度で70%以上であった。

定性的ラテラルフローキットであるCキットでは、3 µg/kgでは陰性、5、10 µg/kgで陽性となった。

(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、300及び2,000 µg/kg添加した小麦における回収率の平均値は、それぞれ94、101及び99%であった。大麦、ライ麦、ハト麦、コーン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

一般状態について、投与2日目に高用量群の3例に自発運動の減少がみられ、うち2動物は同日に、1動物は投与3日目に死亡した。また、投与3日目に高用量群の1例に自発運動の減少がみられた。病理組織学検査の結果、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。40 mg/kg投与群で皮質深部を中心に再生尿細管が認められ、その発生率と重症度が有意な増加を示した。また、40 mg/kg投与群の1例で皮質深部に近位尿細管の壊死が認められた。40 mg/kg投与群では肝臓に小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、severityが有意な増加を示した。死亡例では、右心房及び右心室における内腔の拡張と壁の菲薄化、腎臓皮質全域における尿細管壊死が確認された。

③ 産生菌の情報を応用した MON 汚染食品の探索

計169株14菌種がMON汚染穀類より分離された。そのうち、MON産生性を示した菌株は83株であった。それらの種は、*F. fujikuroi*、*F. annulatum*、*F. temperatum*、*F. subglutinans*、*F. andiyazi*、*F. oxysporum*、*F. nisikadoi*、*F. avenaceum*及び*Fusarium* sp.1の9種であっ

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

DONとOTAの同時分析法の開発については、9機関の測定値から得られたDONとOTAの回収率、RSD_F及びRSD_Rは、5種類の試料いずれにおいても事前に設定したクライテリアを満たしたことから、多機能カラムを用いたDONとOTAの同時分析法の妥当性が確認された。

OTAの簡易分析法については、現時点で入手可能な市販ラテラルフローキット6種の性能評価を行った結果、3種のキットについて、OTAの測定に使用できる可能性が示された。一方、OTAの基準値5 µg/kgを踏まえると、カットオフ値は2 µg/kg~2.5 µg/kg程度が適当である。検討したキットのうち、この範囲にカットオフ値を設定したスクリーニングが可能と考えられるものは2種類、さらに良好な回収率が得られたものはそのうち1種類であった。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

分析法の開発については、実施した単一試験室によるMONの分析法の妥当性評価の結果は、いずれも事前に設定したクライテリアを満たした。よって、開発した分析法は、6種の穀類中のMONの汚染実態調査に用いることが可能な性能を有すると考えられた。

毒性試験については、最高用量40 mg/kg、公比2で3段階の用量の投与群構成とした28日間反復投与毒性試験を実施した。MON投与の影響と考えられる変化として、20 mg/kg群以上で腎臓絶対重量が高値を示し、40 mg/kg群で腎臓皮質に再生尿細管が認められた。昨年度に実施したMONの単回投与試験では腎臓皮質に急性尿細管壊死が認められており、本試験における再生尿細管はこれに対する反応性変化と考え

られた。以上より、マウスにおいて MON は腎臓を毒性標的とする可能性が示唆された。

MON 汚染原因菌の探索によって、MON に高濃度汚染された穀物がどのような *Fusarium* 属菌に感染しているか、その実態が明らかとなった。これら穀物の MON 汚染原因菌の情報を元に、国内に流通する穀物における *Fusarium* 属菌の汚染状況を把握することで、MON 汚染のリスク評価に関する知見を蓄積することができた。

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 10 分析機関による試験室間共同試験を実施した。その結果、添加回収試験と汚染試料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。

6 種類の市販ラテラルフローキットを用いて、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。カットオフ値が設定可能で、小麦及び大麦に使用でき、かつ回収率が 70% 以上のものは 1 種類のみであった。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

MON の分析法については、単一試験室による妥当性評価を実施した結果、汚染実態調査に用いることが出来る性能を有することが確認された。

マウスにおける毒性試験を実施した結果、MON は腎臓を毒性標的とする可能性が示唆された。20 mg/kg 群においては腎臓に統計学的に有意な発生率と重症度を示す病理組織学変化は

認められなかったが、絶対重量の高値が認められており、本試験の条件下における無毒性量は 10 mg/kg と判断された。

日本国内で流通する穀物の MON 汚染原因菌の探索を行った結果、MON 汚染をもたらす菌種は穀物種毎に傾向があり、小麦及び大麦では *F. avenaceum*、ライ麦では *F. oxysporum*、トウモロコシは *F. fujikuroi* とその近縁種及び *F. nisikadoii* であることを明らかにした。また *Fusarium* 属における幅広い菌種が MON 産生性を持つとされる従来からの知見とは異なり、MON は特定の系統が産生する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

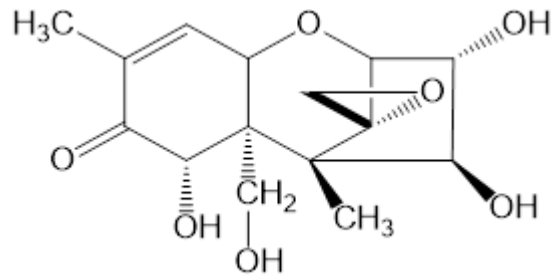
G. 研究業績

【論文発表】

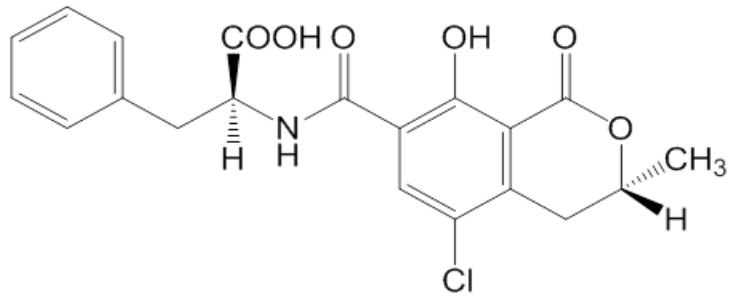
1. Yoshinari T, Sugita-Konishi Y, Sato E, Takeuchi H, Taniguchi M, Fukumitsu T, Shimoyama A, Nakamura A, Murayama S, Owaki S, Miyake S, Hara-Kudo Y.: Survey and risk assessment of aflatoxins and sterigmatocystin in Japanese staple food items and the evaluation of an in-house ELISA technique for rapid screening. Food Control 2024;157:110154.
2. Ojiro R, Okano H, Ozawa S, Yamagata H, Zou X, Tang Q, Jin M, Sasaki K, Yoshida T, Yoshinari T, Shibutani M.: Pharmacokinetics and 28-day repeated-dose toxicity of enniatin B after oral administration in mice. Food Chem. Toxicol. 2023;177:113814.

【学会発表】

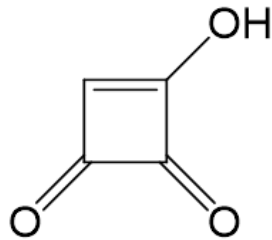
1. 日本マイコトキシン学会第 89 回学術講演会、開催日：2023 年 8 月 18 日、開催場所：金沢大学、概要：小麦中のデオキシニバレノールとオクラトキシン A の一斉分析法の開発について、研究代表者吉成知也が口頭発表を行った。
2. 第 119 回日本食品衛生学会学術講演会、開催日：2023 年 10 月 12～13 日、開催場所：タワーホール船堀、概要：新興カビ毒モニリフォルミン汚染穀物中の原因菌探索について、研究協力者青木渉が口頭発表を行った。
3. 第 119 回日本食品衛生学会学術講演会、開催日：2023 年 10 月 12～13 日、開催場所：タワーホール船堀、概要：食品中の新興カビ毒モニリフォルミンの分析法の開発について、研究代表者吉成知也が口頭発表を行った。
4. 日本マイコトキシン学会第 90 回学術講演会、開催日：2024 年 1 月 10 日、開催場所：東京農業大学、概要：*Fusarium* 属におけるカビ毒モニリフォルミン産生能評価法の検討について、研究協力者青木渉が口頭発表を行った。
5. 日本農芸化学会 2024 年度東京大会、開催日：2024 年 3 月 24～27 日、開催場所：東京農業大学、概要：*Fusarium* 属真菌によるタイプ A トリコテセン系カビ毒の産生に対する抗真菌剤の影響について、研究代表者吉成知也が口頭発表を行った。
6. 日本薬学会第 144 年会、開催日：2024 年 3 月 28～31 日、開催場所：パシフィコ横浜、概要：マイコトキシンの規制と試験法について、研究代表者吉成知也が口頭発表を行った。



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・衛生微生物部)

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。オクラトキシン A (OTA) については、小麦と大麦について基準値の設定が 2023 年 12 月に了承された。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 の同時分析法の開発を行った。小麦からの抽出液を多機能カラムで精製し、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、3 種の濃度の標準品添加試料と 2 種類の汚染試料の計 5 種の試料を用いた試験室間共同試験を実施した。9 機関から得られた分析値を解析した結果、回収率の平均値については DON で 88~89%、OTA で 91~96%であった。5 種の試料における併行相対標準偏差 (RSD_F) は DON で 1.0~5.0%、OTA で 2.6~7.3%で、室間再現性標準偏差 (RSD_R) は DON で 13~15%、OTA で 4.3~15%の範囲内となり、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、開発した多機能カラムを精製に用いる分析法は、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。昨年度開発した陰イオン交換カートリッジによる精製とイオンペア剤を用いた HPLC 検出法を組み合わせた分析法について、6 種の穀類を対象とした単一試験室による妥当性評価を行った。その結果、回収率の平均値は 86~105%、併行精度は 0.52~5.9%、室内精度は 2.1~9.3%の範囲内であった。これらのパラメーターは、クライテリアを満たしたことから、汚染調査に用いる性能を有することが確認された。

研究協力者	原 有紀	三重県保健環境研究所	
青木 渉	国立医薬品食品衛生研究所	福光 徹	神奈川県衛生研究所
佐藤 英子	川崎市健康安全研究所	後藤麻美子	(一財) 食品分析開発センター
谷口 賢	名古屋市衛生研究所		SUNATEC

廣川有里加 (一財) 食品分析開発センター
SUNATEC

朝倉 敬行 (一財) 東京顕微鏡院

飯田 智成 (一財) 東京顕微鏡院

竹内 俊彦 (一財) 日本穀物検定協会

徳本 脩 (一財) 日本穀物検定協会

下山 晃 (一財) 日本食品検査

中村 歩 (一財) 日本食品分析センター

五十嵐奈津子 (一財) 日本食品分析センター

立石 晶浩 (一財) マイコトキシン検査協会

石田 和暁 (一財) マイコトキシン検査協会

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人における食品からの OTA の摂取によるリスク評価 (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、2023 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と大麦について、基準値を設定することが了承された。これまで日本で実施された 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際、輸入検疫において 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を開発し、その妥当性が確認された。ただ、OTA の回収率が低い結果となった機関があったこと、カラムが高価であること、精製操作が煩雑であ

るという課題が残った。そこで、今年度は、安価で精製操作が簡単な多機能カラムを用いた同時分析法を開発することとした。

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。今年度は、単一試験室による分析法の妥当性評価を実施することとした。

B. 研究方法

(1) DONとOTAの同時分析法

①試験室間共同試験(予備試験)における抽出・精製法

DON(終濃度1,000 µg/kg)とOTA(終濃度5 µg/kg)を添加した小麦(10.0 g)が入った50 mL容チューブに抽出溶媒(アセトニトリル:水(5:1)にギ酸を終濃度0.1%で添加したもの)20.0 mLを加え、振盪機を用いて200回/分で15分間往復振盪抽出した。チューブを遠心分離(1,000 rpm(190 g)、5分間)後、三角フラスコに抽出液を回収した。残渣に抽出溶媒20.0 mLを加え、タッピングにより沈殿物を破碎後、振盪機を用いて200回/分で15分間往復振盪抽出した。チューブを遠心分離(3,000 rpm(1,410

g)、10分間)後、1回目の抽出液を回収した三角フラスコに抽出液を回収し、よく混合した。

精製には、多機能カラム(PuriTox Total Myco-MS:R-Biopharm社製)を用いた。抽出液1.4 mLをカラムに加え、プランジャーを外筒にゆっくりと押し込み、抽出液を樹脂に通し、溶出液を1.5 mL容マイクロチューブに回収した。チューブ中の溶出液を試験管ミキサーにかけて均一にした後、400 µLを新たな1.5 mL容マイクロチューブに移した。精製水600 µLを加えて良く混ぜた後、12,000 gで5分間遠心し、その上清をLC-MS/MS測定用試験溶液とした。

②試験室間共同試験(本試験)における抽出・精製法

250 mL容プラスチックボトルに量り採った小麦破碎物10.0 gに抽出溶媒(アセトニトリル:水(5:1)にギ酸を終濃度0.1%で添加したもの)を50 mLを加え、振盪機を用いて200回/分で30分間往復振盪抽出した。振盪器から外したボトルを机の上に10分程度置き、検体と抽出液を分離した。

精製には、多機能カラム(PuriTox Total Myco-MS)を用いた。抽出液1.4 mLをカラムに加え、プランジャーを外筒にゆっくりと押し込み、抽出液を樹脂に通し、溶出液を1.5 mL容マイクロチューブに回収した。チューブ中の溶出液を試験管ミキサーにかけて均一にした後、500 µLを新たな1.5 mL容マイクロチューブに移した。精製水500 µLを加えて良く混ぜた後、12,000 gで5分間遠心し、その上清をLC-MS/MS測定用試験溶液とした。

③LC-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 = 95 : 5
18分 A : B = 20 : 80
23分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：5 μ L

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) 試験室間共同試験（本試験）の試料

添加回収試験用のブランク試料については、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。DON と OTA の標準品溶液を添加して添加試料を作成した。添加濃度は、レベル1: DON 0.4 mg/kg と OTA 2 μ g/kg、レベル2: DON 1 mg/kg と OTA 5 μ g/kg、レベル3: DON 2 mg/kg と OTA 10 μ g/kg とした。汚染試料については、Trilogy 社から購入したオクラトキシン A 用の内部品質管理用試料 (Batch Code 121242(9.2B)) を汚染試料 No.1 として、小麦粒に DON (設計値 1 mg/kg) と OTA (設計値 25 μ g/kg) の標準品を均一に添加し、破碎した疑似汚染試料を No.2 として用いた。

国内の 10 分析機関にそれぞれ以下のものを配付し、(1) に記載の方法で分析を依頼した。

- ・DON と OTA 添加済みの小麦 (10 g) が入った 250 mL 容プラスチックボトル (3 レベルを各 2 本ずつ)
- ・汚染試料 No.1 (10 g) が入った 250 mL 容プラスチックボトル 2 本ずつ
- ・汚染試料 No.2 (10 g) が入った 250 mL 容プラスチックボトル 2 本ずつ
- ・乾固状態の DON と OTA 標準品が入った 1.5 mL チューブ 2 本 (予備 1 本)
- ・多機能カラム 14 本

汚染試料の均質性の確認については、汚染試料 No.1 と No.2 からそれぞれ 11g を 10 試料分取し、1 試料当たり 2 点の併行分析を行った。得られた分析値について、IUPAC の技能試験ハーモナイズドプロトコール 2006 年度版で示された Recommendation 7 並びに Recommendation 8 に従い解析し、均質性を評価した。

試験室間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分析法の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 0.5~2 であることとした。

(3) マトリクスによるイオン化への影響の解析

添加回収試験用のブランク試料を用いて、(1) ①に記載の方法により調製した試験溶液に、DON を終濃度 1,000 μ g/kg、OTA を終濃度 5 μ g/kg とするよう添加した。共同試験の各参加機関において、(1) ③に記載の条件で定量を行い、マトリクスによる測定値への影響を調べた。

(3) MON の分析法

抽出は、破碎した試料 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、減圧してカラム内に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、大麦、ライ麦、はと麦、コーンについては、50、300 µg/kg 又は 2,000 µg/kg、玄米については、50 又は 300 µg/kg となるよう添加し、30 分間放置後に抽出を行った。各濃度 2 試料調製し、計 5 日間分析を行い、得られた分析値から回収率、併行精度及び室内精度を算出した。

<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

C. 研究結果

(1) DON と OTA の同時分析法の試験室間共同試験

① 予備試験

DON と OTA を添加した小麦を各機関にて 2 試料ずつ分析し、得られた測定値を表 2 に、平均値、平均回収率、併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現性標準偏差 (RSD_R) を表 3 に示した。DON 及び OTA の回収率はそれぞれ 90% 及び 108%、RSD_r はそれぞれ 1.6% 及び 3.4%、RSD_R はそれぞれ 26% 及び 14% であった。

② マトリクスによるイオン化への影響の解析

各機関において、ブランク試料由来の試験溶液に標準品を添加した検体を分析し、得られた測定値を表 4 に示した。DON については、機関 3、5 及び 8 においてイオン化率が 80% を下回り、その他の機関では 85~103% の範囲内に収まった。OTA については、機関 5 及び 8 でイオン化率が 80% を下回り、機関 3 及び 10 で 110% を上回った。その他の機関では 84~102% の範囲に収まった。

③ 汚染試料の均質性の確認

汚染試料 No.1 と No.2 について、計 20 試料の分析結果を表 5 に示した。これらの分析値から、DON と OTA の併行精度 (σ_{an}) と試験室間共同試験に諮られる分析法に予想される室間再現精度 (σ_p) を求め、その割合を算出した結果を表 6 に示した。2 種の汚染試料中の DON と OTA において、 σ_{an} / σ_p は 0.5 を下回り、IUPAC の技能試験ハーモナイズドプロトコール 2006 年度版で示された Recommendation 7 を満たした。また、 S_{sam}^2 と $F_1 \times \sigma_{all}^2 + F_2 \times S_{an}^2$ を算出した結果を表 7 に示した。2 種の汚染試料中の DON と OTA において、 S_{sam}^2 は $F_1 \times \sigma_{all}^2 + F_2 \times S_{an}^2$ を下回ったことから、IUPAC の技能試験ハーモナイズドプロトコール 2006 年度版で示された Recommendation 8 を満たした。以上の結果から、調製された 2 種の汚染試料の均質性が確認された。

④ 本試験

共同試験に参加した 10 機関のうち、測定値を

採用した 9 機関における DON と OTA の測定値を表 8 及び表 9 に、平均値、平均回収率、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 10 にそれぞれ示した。3 種の濃度の添加試料における DON の回収率は、88~89%であった。汚染試料 No.1 と No.2 の平均濃度はそれぞれ 203 及び 736 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。3 種の添加試料と 2 種の汚染試料における RSD_r は 1.0~5.0%、 RSD_R は 13~15%、HorRat は 0.7~0.9 の範囲内であった。3 種の濃度の添加試料における OTA の回収率は、91~96%であった。汚染試料 No.1 と No.2 の平均濃度はそれぞれ 9.8 及び 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。3 種の添加試料と 2 種の汚染試料における RSD_r は 2.6~7.3%、 RSD_R は 4.3~15%、HorRat は 0.2~0.7 の範囲内であった。

(2) MON の分析法の開発

昨年度開発した MON の分析法を用い、6 種の穀類において添加回収試験を実施し、回収率の平均値、併行精度及び室内精度を算出した結果を表 11 に示した。回収率の平均値は 86~105%、併行精度は 0.52~5.9%、室内精度は 2.1~9.3%の範囲内であった。

D. 考察

(1) DON と OTA の同時分析法の試験室間共同試験

研究代表者が開発した、多機能カラムを用いた DON と OTA の同時分析法について、試験室間共同試験により妥当性の評価を行った。第一段階として、添加試料 2 検体を用いた予備試験を実施した。回収率の平均値は DON と OTA ともにクライテリアを満たしたが、DON の回収率が機関 3 において 37%、機関 10 において 74%と 77%となり、80%を下回った。マトリクスによるイオン化への影響を解析した結果、機関 3 においては低いイオン化率を示したことから、

回収率が低い原因は残存するマトリクスによると考えられた。機関 3 において、マトリクスの影響を軽減するための検討を行った結果、HPLC への試験溶液の注入量を減らすことで回収率が改善した。また、OTA の回収率が 100%を超える機関が 10 機関中 6 機関であった。抽出を 2 回行い、合わせた抽出液の定容を行わなかったため、検体に吸収された抽出液の分、回収率が上がったと考えられた。定容を行うと簡便性が失われるので、本試験では 1 回抽出に変更し、用いる溶媒量を増やすこととした。

本試験の結果について、参加した 10 機関のうち 1 機関において、DON の回収率が 60%を下回った。予備試験において強いイオン化抑制が認められた機関であったことから、この機関が使用した HPLC は今回開発した多機能カラムを用いた分析法に適していないと考え、解析に用いないこととした。9 機関の測定値から得られた DON と OTA の回収率と RSD_R は、5 種類の試料いずれにおいても事前に設定したクライテリアを満たした。また、Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 22nd ed. の Appendix F : Guidelines for standard method performance requirement において、分析法における併行精度の期待値が 1 mg/kg では 11%であり、DON の測定値の RSD_r はこの値を下回った。また、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ における期待値は 21%であり、OTA の測定値の RSD_r はこの値を下回った。HorRat については、Appendix F において、0.5~2 の範囲に収まることが妥当とされている。DON の測定値の HorRat はその範囲に収まったが、OTA では 3 種の添加試料と人工汚染試料で 0.5 を下回った。原因は不明であるが、OTA の測定値の機関間のバラつきが非常に小さかったためと考えられる。以上の結果より、多機能カラムを用いた DON と OTA の同時分析法の妥当性が確認された。ただ、機関によってはマトリクスの影響によると想定されるイ

オン化抑制により、DON の回収率が 80%を下回った。今回検証した HPLC の条件は、研究代表者の装置に最適化されていた。異なる装置を用いる場合、マトリクスの影響を軽減する条件を各装置で設定する必要があると考えられた。

(2) MON の分析法の開発

コーデックス委員会が公表する分析法の手順書において、100 µg/kg~10 mg/kg の濃度の化学物質における回収率のクライテリアは 80~110%、室内精度のクライテリアは 100 µg/kg で 44%以下、1 mg/kg で 32%以下とされている。また、併行精度については、上述の AOAC のガイドラインにおいて 100 µg/kg で 15%以下、1 mg/kg で 11%以下とされている。今回実施した MON の添加回収試験の結果は、いずれもこれらのクライテリアを満たした。よって、開発した分析法は、6 種の穀類中の MON の汚染実態調査に用いることが可能な性能を有すると考えられた。

E. 結論

小麦からの抽出液を多機能カラムで精製し、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 10 分析機関による試験室間共同試験を実施した。その結果、添加回収試験と汚染試料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 の分析法については、単一試験室による妥当性評価を実施した結果、汚染実態調査に用いることが出来る性能を有することが確認された。

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.

表 1 試験室間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		
	400	1,000	2,000	2	5	10
回収率 (%)	80-110	80-110	80-110	60-115	60-115	60-115
室間再現性 標準偏差(%)	< 32	< 32	< 32	< 44	< 44	< 44

B) 汚染試料

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

表 2 試験室間共同試験（予備試験）の各機関の測定値

機関No.	添加したカビ毒；濃度（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）			
	DON; 1,000		OTA; 5	
1	935	966	5.2	5.2
2	1,073	1,077	5.6	5.8
3	370	370	5.8	5.7
4	1,182	1,166	6.4	6.4
5	874	893	4.5	4.4
6	1,030	1,010	5.8	5.5
7	943	962	4.4	4.4
8	<u>1,085</u>	<u>937</u>	4.8	4.5
9	943	941	4.8	5.0
10	770	736	6.5	5.8

下線は Cochran 検定による外れ値

表 3 試験室間共同試験（予備試験）の結果

	添加したカビ毒； 濃度 (µg/kg)	
	DON;1,000	OTA;5
平均値 (µg/kg)	902	5.4
平均回収率 (%)	90	108
相対併行標準偏差RSD _T (%)	1.6	3.4
室間再現相対標準偏差RSD _R (%)	26	14

表 4 試験室間共同試験の参加機関におけるマトリクスによるイオン化への影響

機関No.	イオン化率 (%)	
	DON	OTA
1	86	94
2	94	98
3	39	115
4	103	89
5	69	75
6	100	102
7	85	84
8	70	66
9	103	98
10	86	141

表 5 汚染試料の均質性の確認

1) 自然汚染試料 (Trilogy 社内部品質管理用試料) の分析値

No.	Conc. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	DON		OTA	
1	236	244	7.4	8.3
2	233	232	7.9	10.2
3	228	234	7.0	7.4
4	236	232	8.0	8.4
5	223	255	8.2	7.3
6	231	225	8.7	8.3
7	223	232	7.9	7.7
8	216	229	7.2	7.7
9	219	210	7.3	7.1
10	227	221	8.7	7.6

2) 疑似汚染試料の分析値

No.	Conc. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	DON		OTA	
1	821	784	23.0	23.1
2	822	791	22.8	22.5
3	826	789	22.6	22.4
4	825	784	22.5	22.3
5	829	788	23.1	21.7
6	767	764	21.1	21.4
7	762	752	21.6	21.0
8	768	758	20.9	21.1
9	778	787	20.7	21.3
10	775	763	21.3	21.2

表 6 IUPAC2006 Recommendation 7 による分析試料の均質性の確認結果

	Analyte	σ_{an}	σ_p	σ_{an} / σ_p
Sample	DON	8.88	45.8	0.19
No.1	OTA	0.437	2.62	0.17
Sample	DON	19.5	130	0.15
No.2	OTA	0.379	4.82	0.079

表 7 IUPAC2006 Recommendation 8 による分析試料の均質性の確認結果

	Analyte	S_{sam}^2	$F1 \times \sigma_{all}^2 + F2 \times S_{an}^2$
Sample	DON	17.9	434
No.1	OTA	0.125	0.954
Sample	DON	267	3264
No.2	OTA	0.543	4.07

表 8 試験室間共同試験（本試験）における DON の測定値

機関No.	測定値 (µg/kg)									
	添加濃度 (µg/kg)						汚染試料 No.1		汚染試料 No.2	
	400	400	1,000	1,000	2,000	2,000				
A	364	415	944	919	<u>1,774</u>	<u>1,893</u>	193	187	790	739
B	361	348	901	910	1,800	1,781	198	197	747	764
C	396	391	963	970	1,976	1,984	222	221	790	805
D	273	282	758	715	1,448	1,430	164	155	603	599
E	404	436	1,058	1,078	2,085	2,112	242	246	906	879
F	388	396	984	949	1,888	1,903	221	225	785	808
G	288	267	727	745	1,552	1,531	160	167	618	603
H	354	369	914	900	1,783	1,759	222	224	743	754
I	343	312	799	757	1,622	1,578	199	203	678	637

下線は Cochran 検定による外れ値

表 9 試験室間共同試験（本試験）における OTA の測定値

機関No.	測定値 (µg/kg)									
	添加濃度 (µg/kg)						汚染試料 No.1		汚染試料 No.2	
	2	5	10							
A	<u>1.9</u>	<u>2.5</u>	4.5	4.8	9.0	9.2	9.0	10.9	22.1	20.2
B	2.0	2.1	4.6	4.3	8.9	8.3	10.0	8.8	20.8	19.5
C	2.0	2.2	4.8	4.7	9.9	10.2	9.1	10.1	21.2	20.7
D	2.0	1.8	4.6	4.3	8.5	8.7	7.4	7.3	19.8	19.6
E	1.8	1.9	4.5	4.7	9.1	9.3	11.7	11.1	20.7	20.3
F	2.1	2.2	5.1	5.0	9.9	9.9	12.0	11.6	19.7	20.1
G	1.9	1.8	4.6	4.5	9.3	9.3	10.5	10.2	20.1	19.8
H	1.9	1.9	4.7	4.5	8.7	9.2	10.4	9.1	19.2	19.3
I	1.8	1.6	4.0	4.1	8.2	8.3	9.3	8.2	19.1	18.6

下線は Cochran 検定による外れ値

表 10 試験室間共同試験（本試験）の結果

1) DON

	添加濃度 (µg/kg)			汚染試料 No.1	汚染試料 No.2
	400	1,000	2,000		
平均値 (µg/kg)	355	888	1,764	203	736
平均回収率 (%)	89	89	88	-	-
RSD _r (%)	5.0	2.1	1.0	1.8	2.6
RSD _R (%)	15	13	13	14	13
HorRat	0.8	0.8	0.9	0.7	0.8

2) OTA

	添加濃度 (µg/kg)			汚染試料 No.1	汚染試料 No.2
	2	5	10		
平均値 (µg/kg)	1.9	4.6	9.1	9.8	20
平均回収率 (%)	96	91	91	-	-
RSD _r (%)	4.0	3.0	2.6	7.3	2.9
RSD _R (%)	7.7	6.3	6.8	15	4.3
HorRat	0.3	0.3	0.3	0.7	0.2

表 11 MON の分析法の性能評価の結果

食品種	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率の 平均値(%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
小麦	50	94	3.0	7.9
	300	101	1.8	3.3
	2,000	99	1.4	3.3
大麦	50	98	3.1	6.8
	300	93	5.9	9.3
	2,000	97	0.87	3.6
ライ麦	50	98	5.9	5.9
	300	104	3.2	3.2
	2,000	104	1.6	2.1
はと麦	50	89	3.8	4.2
	300	87	0.52	3.5
	2,000	86	1.2	3.7
コーン	50	101	3.7	4.0
	300	105	1.5	2.6
	2,000	103	0.84	2.4
玄米	50	101	2.4	8.1
	300	100	2.0	3.8

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

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

本研究事業では 国内で販売されているオクラトキシン A (OTA) 測定用のラテラルフローキットを入手し、小麦、ライ麦及び大麦中の OTA のスクリーニングに適しているかの評価を行った。現在日本国内で市販されているキットは A: Rosa Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社)、B: Ochra-Vertu TOUCH (Vicam 社)、C: OTA Lateral Flow Assay Kit (Elabscience 社)、D: QuickScan (EnviroLogix 社)、E: Rapid Test Kit (Meizheng 社)、F: AuroFlow AQ Ochratoxin A Strip Test Kit (PerkinElmer 社) の 6 種であり、これらの性能を添加回収実験 (0, 3, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で検討した。測定は、それぞれのキットのプロトコールに沿って行った。

定量的ラテラルフローキットの回収率は小麦では、A キット 133.3~151.3%、B キット 34.3~73.3%、D キット 76.0~126.7%、E キット 103.3-112.1%、F キット 72.7-171.1%であった。大麦では A キット 130.7~142.2%、B キット 35.6~57.3%、D キット測定不可、E キット 84.3-92.2%、F キット 47.0-118.9%であった。ライ麦では、A キット 112.3~149.3%、B、D、F キットは測定不可、E キット 57.8-86.4%であった。C キットは定性的キットであることから回収率は算出できないが、OTA が 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上含有しているかの有無で判定した場合、小麦、大麦、ライ麦すべてで 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下の含有では陰性、以上の含有では陽性であった。

これらの結果から、小麦を対象にした場合はおおむね試験に供したキットで測定が可能であったが、大麦では 1 キット、ライ麦では 3 キットが測定できないことが明らかになった。この理由としては、測定液の粘性が大きく影響していたことから、ラテラルフローに適する穀類は限られていることが考えられた。今回評価したキットのうち、定量的ラテラルフローでは 2 キット、cut off 値付近の信頼性に問題があるものの定性的ラテラルフローでは 1 キットが小麦、大麦の OTA を測定できる可能性が示された。しかし 1 検体ずつ測定する必要があること、装置などが高価であることから多検体処理を必要とするスクリーニングには適当でないと考えられた。

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、*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の両種で産生され、発がん性や腎毒性を有するカビ毒である。また、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毒性学的にも重要なハザードである。汚染は麦類、種実類、豆類などにみられるが、飼料として摂取された後、畜産物へ移行することから、食品衛生的な対応が必要である。国際的にはコーデックス規格が 1995 年に、小麦、大麦、ライ麦を対象にそれぞれ 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と定められた。

わが国でもコーデックスの規格設定を受けて OTA の規格基準について、食品安全委員会で評価がなされ、令和 5 年 12 月 11 日に開催された薬事・食品衛生審議会（食品衛生分科会食品規格部会）で基準値が設定された。コーデックスに準じて小麦、大麦、ライ麦を規制の対象にするか、米や嗜好品にまで範囲を広げるかについては、わが国における小麦・大麦・ライ麦および小麦・大麦・ライ麦以外の食品からの OTA 経口ばく露状況（インスタントコーヒー、香辛料、ココア、コーヒー豆、そば（乾麺）、チョコレート、ドライフルーツ、ビール、ワインを対象）から判断され、¹⁾ 「小麦及び大麦については、本汚染実態調査による通常年の OTA 経口摂取の推定値が TDI より低かったが、高濃度汚染の発生可能性を考慮した際の健康被害の未然の防止及び国際整合の観点から、基準値をそれぞれ 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と設定することが適当である。なお、ライ麦について、消費量割合は麦類全体で 0.3 % であり、実態調査における OTA の濃度分布もライ麦の方が小麦より低い傾向にあることから、小麦に比べて OTA 摂取量に対する寄与度は極めて低いと考えられる」との結論に至った。この結果を受けて、小麦、大麦、ライ麦を対象にスクリーニングとして使われる簡便迅速試験法の

評価が必要とされたため、本研究では、市販のラテラルフロー測定キットの評価を行った。

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玄麦、殻なしライ麦および、殻なし大麦の粉碎物を吉成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。

②ラテラルフロー キット

Rosa Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社)、Ochra-Vertu TOUCH (Vicam 社)、OTA Lateral Flow Assay Kit (Elabscience 社)、QuickScan (EnviroLogix 社)、Rapid Test Kit (Meizheng 社)、AuroFlow AQ Ochratoxin A Strip Test Kit (PerkinElmer 社) の 6 社 6 種類のキットを用いた。

(2) 麦類を用いた添加回収実験

添加回収試験は OTA 原液（アセトニトリル溶液 1 mg/L ）を調製して行った。OTA 非汚染麦類を 2 g から 10 g 秤量し、原液を最終濃度 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ になるように添加し、1 昼夜静置して、それぞれの試料とした。陰性対象としてアセトニトリルを、それぞれのキットに添加する OTA 原液と同じ液量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。

(3) 抽出操作

①Rosa Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社) では 70%メタノールを試料 10 g に対して 20 mL の割合で加え約 2 分間振とうした後、遠心操作を行い上清 100 μL と 1.0 mL の OCHRAQ dilution buffer を混和したものをサンプルとし、ストリップに供した。

②Ochra-Vertu TOUCH (Vicam 社) は、専用のカップに試料 5 g に対して同社から販売されているアクアプレミックスを 25 mL 加え、バートウ

PREP ミキサーにセットして30秒間振とうし、V フィルターカップにてろ過したものをサンプルとし、ストリップに供した。

③OTA Lateral Flow Assay Kit (Elabscience社) では、15 mL容遠心管に2 g秤量した試料を入れ、3 mLのメタノールを加え3分振とうした後、遠心し、上清1 mLを異なる遠心管に入れ窒素乾固した。添付のreconstitution buffer 0.3 mLで30秒溶解した。次に120 μ Lをとり、金コロイド標識マイクロウエルにいれ2分間反応させた。泡立っていないようにクリアな液になるように混合した。2分後に金コロイド標識マイクロウエルのすべての液をストリップのサンプルウエルに入れて、5-8分間反応をさせた。

④QuickScan (EnviroLogix 社) では、破砕した試料10 gに試料の5倍量の添付の抽出用bufferを加え、手振りで30秒振とうした後、一部をマイクロチューブにとり2000 x gで3分間遠心分離を行った。反応容器に添付のDB bufferを50 μ Lを分取し、遠心した上清を200 μ L加えたのち、色が均一になるまで混合しサンプルとしストリップに供した。

⑤Rapid Test Kit (Meizheng社) では、破砕した試料5.0 gを50 mL容の遠心チューブに入れ、50%メタノールを20 mL加え、ボルテックスで1分間振とうした後、4000 x gで3分間遠心分離して、上清100 μ Lに対して添付の試料希釈溶液300 μ Lを加えよく混合したものをサンプルとし、ストリップに供した。

⑥AuroFlow AQ Ochratoxin A Strip Test Kit (PerkinElmer社) では、添付の抽出バックに破砕試料10 gを入れ、添付のAQパウダーパック1包を加えた。その後蒸留水37 mLを加え、1分30秒間激しく振とうした。添付のフィルターを漏斗にセットし、10 mLの抽出液を負荷し、2-3 mLのろ過液が得られたらこれをサンプルとし、ストリップに供した。

(4) 測定

定量的ラテラルフローの場合、キャリブレーションも含めて測定に使用する測定器は専用のものを使う必要がある。キットにより、キャリブレーションの方法は異なるが、QR コードなどで読み込むものや、専用機器にあらかじめ搭載されている機器など、様々である。測定値の精度を担保するには、キャリブレーションが正確にできることが必須条件となるが、各社で提供しているキャリブレーションのデータはそれぞれ独自で開発されたものであり、日本で流通している小麦、大麦、ライ麦に対して作られたものではない。品種によってキャリブレーションが使えるかどうか不明なこともあるが、今回の測定値は、各キットが推奨するキャリブレーションを行った場合の回収率とした。

C. 研究結果

本研究で対象にしたキットには定量的キットと定性的キットの2種類がある。回収率は定量することで算出されることから、定量キットでは回収率で評価した。

(1) 食品目ごとの回収率 (定量的ラテラルフローキット)

大麦、小麦、ライ麦ごとの回収率を示した(図1)。

①小麦

Dキットでは、OTA 3 μ g/kg 添加サンプルにおいて定量限界以下となったが、その他のキットでは使用したOTA濃度において、検出は可能であった。Aキットの回収率は3、5、10 μ g/kgで100%以上であった。

Bキットの回収率は、OTA 10 μ g/kg濃度で73%であったが、それ以外の濃度では50%以下であった。Dキットでは、5、10 μ g/kgでは70%以上の回収率を示した。Eキットは3、5、10 μ g/kgのすべての濃度で100%に近い良好な回収率であった。Fキットでは低濃度では回収率は高く

なり、高濃度では低くなる傾向が見られたが、すべての濃度で70%以上であった。

定性的ラテラルフローキットであるCキットでは、3 µg/kgでは陰性、5、10 µg/kgで陽性となった(図2)。

②大麦

大麦に対応できる定量的キットはA、B、E、Fの4キットであった。Dキットでは、サンプル液の粘性が強かったため、サンプルがキット内のろ紙上で展開できなかつた。Aキットは小麦と同じくすべての濃度で100%以上の回収率であった。Bキットでは検出はできたが、回収率はすべての濃度で70%以下であった。Eキットでは3 µg/kg濃度では3回測定したうち1回だけ回収率が70%以上であったが、2回は検出限界以下となった。5、10 µg/kg濃度では70%以上の回収率であった。Fキットは3、5 µg/kgで70%以上の回収率であったが、10 µg/kgでは50%に満たなかつた。

定性的ラテラルフローキットであるCキットでは3 µg/kg以下は陰性、5、10 µg/kgでは陽性となった(図2)。

③ライ麦

定量的キットでは、AキットとEキットしか適応できなかつた。Aキットは3濃度とも100%以上の回収率であった。Eキットは3 µg/kg濃度では検出限界以下となり、5 µg/kgでは回収率が70%以下であったが、10 µg/kgでは70%以上であった。

定性ラテラルフローキットであるCキットでは3 µg/kg以下は陰性、5、10 µg/kgでは陽性となった(図2)。

(2) 各社のラテラルフロー測定に関する所見(表1)

①Aキット

本キットは測定範囲0~30 µg/kg、検出限界は2 µg/kg、対象試料は小麦、大麦、ライ麦など、測定時間は35分程度であった。専用のリーダー

が必要で、そのキャリブレーションは測定前に毎回行うが、煩雑で時間がかかった(30~50分程)。また、同じサンプルを異なる日に測定すると多少測定値が変動した。

有効な反応(Valid

Test)はControlのLineが確実に確認された場合であり、されない場合やあいまいな場合は無効(Invalid Test)となる。

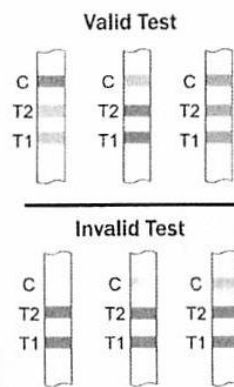
②Bキット

本キットは測定範囲0~30 µg/kg、検出限界は2 µg/kg、対象試料はコーン、大麦、小麦などである。測定時間は35分程度であった。測定には専用チューブ、ミキサーおよび測定機器が必要である。特筆すべきことは、ライ麦抽出液の粘性が高いのでストリップの展開が遅いため測定不可であること、およびVICAM専用チューブを使用しないといけないため、多検体ある場合はそのチューブの数量により制限がかかり洗浄時間が余分にかかった。キャリブレーションはキットに付属しているQRコードを読み込んで行うが、ライ麦のキャリブレーションコードはまだなかつたため、小麦のキャリブレーションコードで行った。全体的に低い回収率である理由は、キャリブレーションが測定した麦類に合致していないことが考えられた。

③Cキット

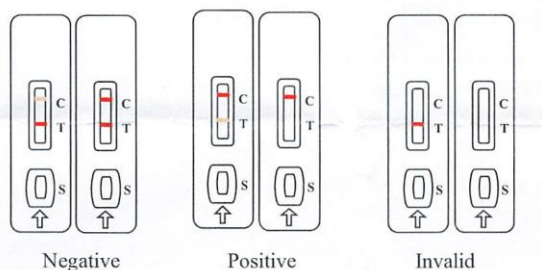
本キットは定性分析キットであり、専用機器の必要はなく、目視で判定を行なえる。

測定範囲は明記がなかつた。検出限界は5 µg/kgであり、対象試料はコーン、大麦、小麦などで、測定時間は約40分を要した。定性分析のため、判定はControlのLineが必ず検出され、



抗体との競合反応であるので T の Line が検出されないもしくは薄くなる場合が陽性となる。

特筆すべきことは、窒素ガス乾固に 10~15



分くらい時間がかかるので、1 検体の所要時間が長くかかったこと、展開液（金コロイド粒子）の反応を待つ時間が細かく指定されているのでサンプル数が多いと煩雑になることである。

④D キット

本キットの測定範囲は 1.5~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、検出限界は 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、対象試料はコーン、小麦などが測定可能である。測定時間は 30 分程度であった。判定には専用の機器が必要である。

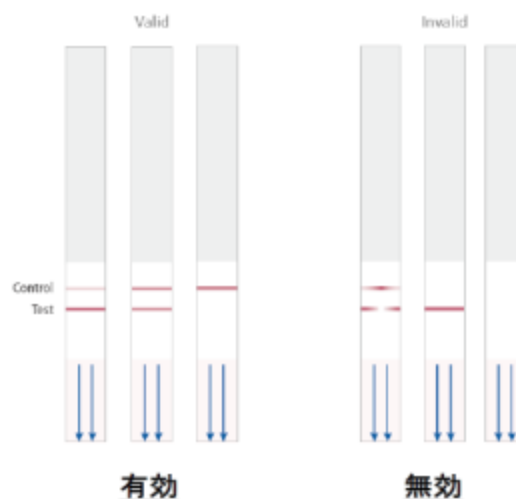
判定は、Control とサンプルの 2 本の Line が確認された場合、定量が可能となる。特筆すべきことは、大麦・ライ麦ともにストリップの展開が遅く、測定不可であった。

⑤E キット

本キットの測定範囲は 0~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、検出限界は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、対象試料は穀類（飼料）であり、測定にかかる時間は 30~35 分程度であった。専用のインキュベーターと測定機器が必要である。キャリブレーションは専用のバーコードを読み込ませて行う。特筆すべきことは、ストリップをサンプル添加前と後にインキュベートする必要があり、流れ作業ではできないため、多検体の測定は困難と考えられた。ライ麦はサンプル液に混濁が認められたため、2 回遠心分離操作を行った。

⑥F キット

本キットの測定範囲は 2~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、検出限界は 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、対象試料は小麦であり、測定にかかる時間は 20 分程度であった。判定は Control の Line が目視で確認されるものを、専用の測定機器に入れ Line の濃淡から濃度を計算する。Control の Line の一部が欠けた場合や検出しない場合は無効となる。



D. 考察

表 2 に本研究で扱った 6 種類のラテラルフローキットについての測定結果を示した。小麦、大麦、ライ麦において測定が可能だったのは A キットと C キットのみであった。OTA 検出用のラテラルフローキットが対象としている食品（飼料）は、コーン、穀類、小麦、大麦であり、ライ麦も測定できると明記しているのは A キットのみであった。

そこで、日本で基準値設定が行われる小麦と大麦を対象を絞ると、適応可能なキットは A、B 及び C キットの 3 種類となった。E キットは大麦に OTA を 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加したとき擬陰性が出る可能性があったため、△になっているが、ほかの条件では良好な回収率が得られていた。

スクリーニングテストとして使用する簡便迅速法では、分析値の正確さよりも、cut off 値が重要である。ある程度以上汚染している検体を迅速に検出できることがもっとも求められる。

OTA の場合、日本は 5 µg/kg と設定されたことから、cut off 値は 2 µg/kg ~2.5 µg/kg 程度が適当である。この観点から A, B 及び C キットの 3 種類を見てみると、A, B キットはともに検出限界が 2 µg/kg、C キットは検出限界が 5 µg/kg であった。そこで、この 3 種について考察していく。

A キットは定量キットであり、回収率は本評価に使用した濃度で 100% 以上であり、やや高い傾向にあった。OTA 無添加のサンプル液でも小麦では 1.0-1.8 µg/kg、大麦では 3 検体のうち 1 検体で 1.3 µg/kg を示す値が検出されたが、いずれも検出限界以下であったことから、スクリーニングとして用いる場合には 2 µg/kg ~2.5 µg/kg を cut off 値と設定すれば使用できると考えられた。但し、キットの単価が他のキットの 3 倍ほどするため、費用対効果は低くなる。

B キットは定量キットである。ライ麦の OTA は測定できなかった。小麦、大麦の回収率は低かったが、測定は可能であった。今回はキットに付属しているキャリブレーションプログラムを使用しているが、このキャリブレーションは測定値に大きく影響を及ぼすことから、わが国で使用を検討する場合に、わが国の流通麦に合ったキャリブレーションをメーカーに作成してもらう必要があるだろう。キット単価としては他のキットと同等であった。

C キットは検出限界 5 µg/kg の定性キットであるが、小麦、大麦及びライ麦において 5 µg/kg 添加以上では陽性、3 µg/kg では陰性であった。擬陽性は確認されず高価な機器も必要としないため、迅速簡便法としては適していると評価できるが、cut off 値から考えると本研究の目的に使用するには難しいと思われた。

いずれのキットも前処理に時間を要するため、多検体のスクリーニングには適さないことから、

生産現場や原料チェックなどに用いる方法として有用と考える。

E. 結論

現時点において日本で手に入る市販ラテラルフローキットを用いて、OTA 非汚染大麦、小麦、ライ麦を用いた添加回収試験を行い、その適応性の評価を行った。

6 種類のキットを検討した結果、小麦および大麦に使用できるキットでかつ回収率が 70% 以上のものは 1 種類のみであった。しかしその 1 種類もコストがかかりすぎる短所がある。すなわち現時点ではスクリーニングにラテラルフローキットを用いることは現実的ではないと考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

参考文献

- 1) 薬事・食品衛生審議会（食品衛生分科会食品規格部会）資料
https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/000019545_9_00006.html. 2024 年 3 月 26 日現在

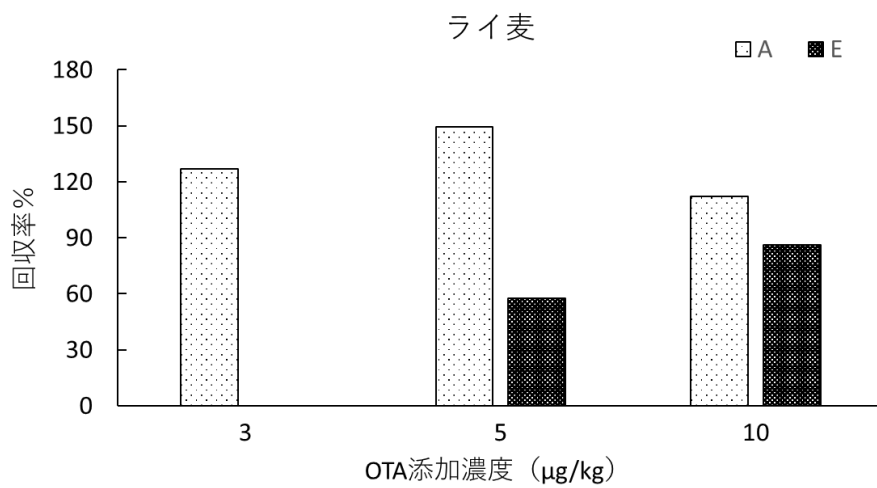
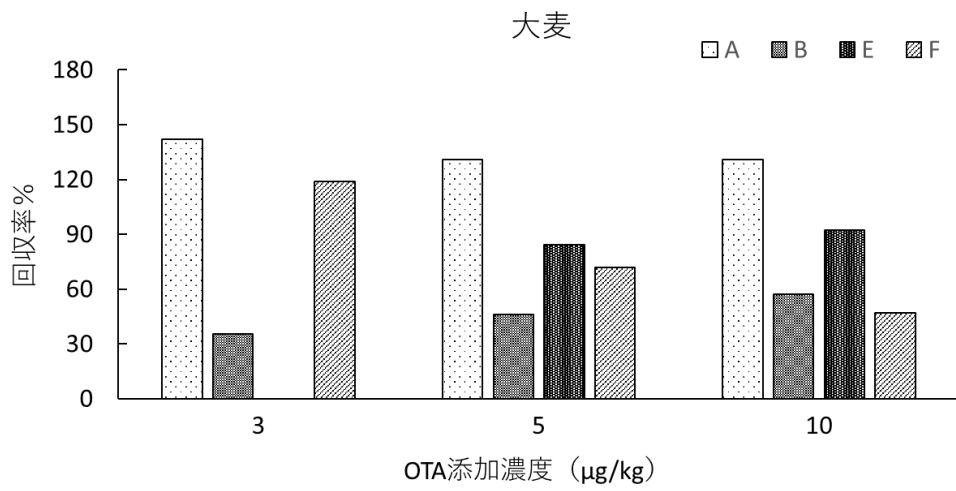
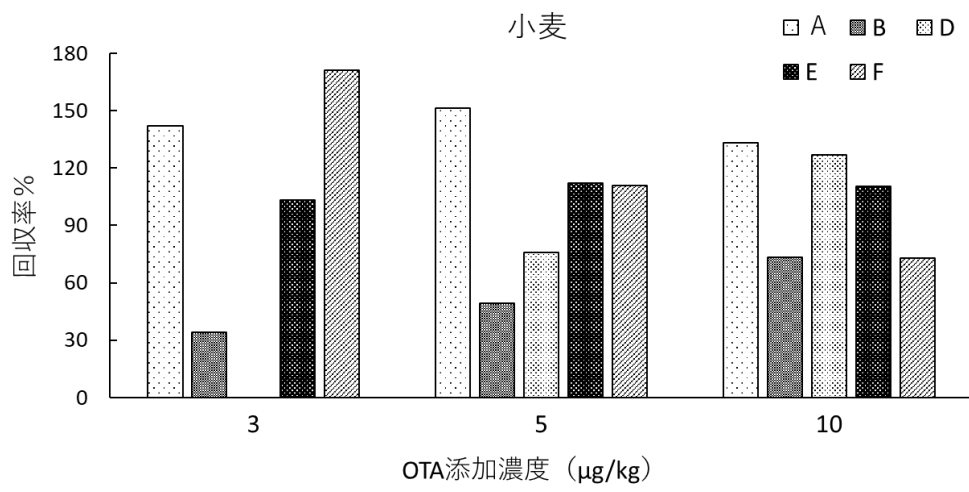
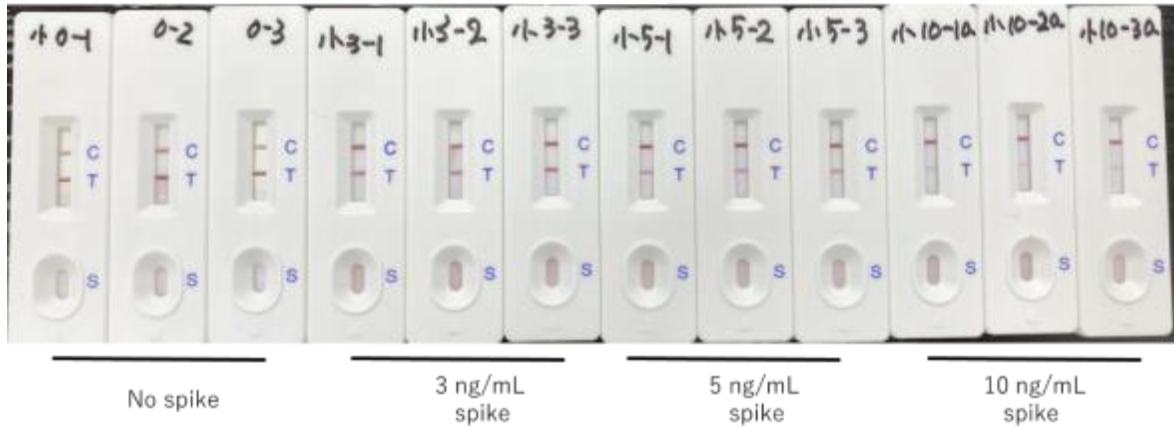
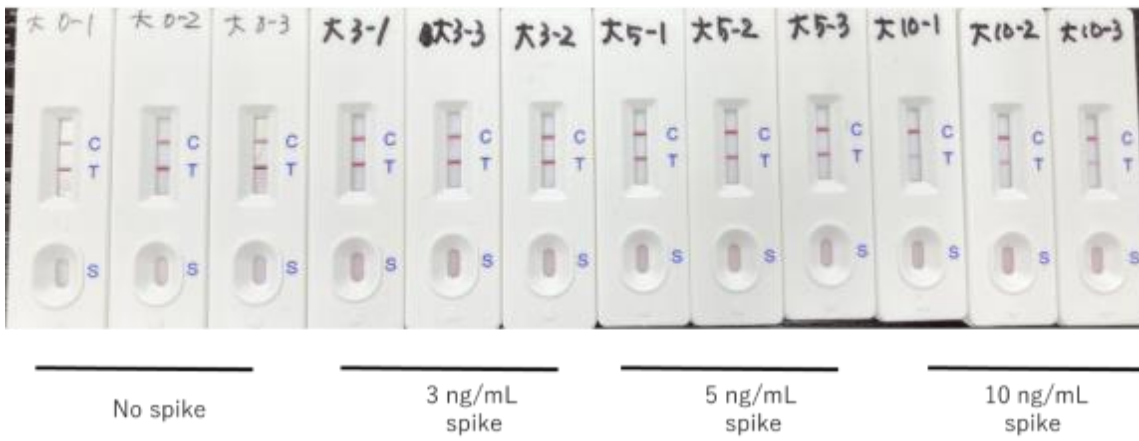


図1 食品目別の回収率

小麦



大麦



ライ麦

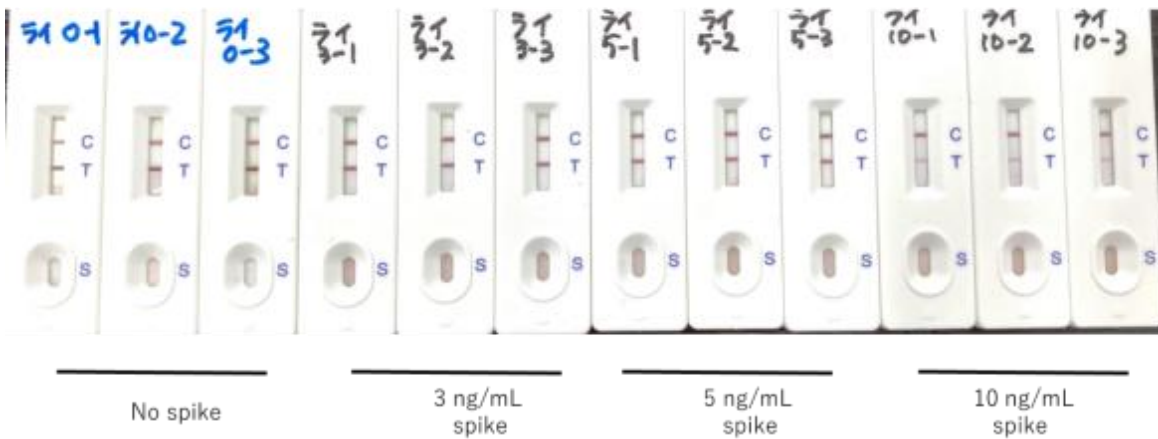


図2 定性キットの判定写真

表1 各キットの比較

キット名	A	B	C
測定範囲	0~30 µg/kg	0~30 µg/kg	記載なし
検出限界	2 µg/kg	2 µg/kg	5 µg/kg
検出機器	専用	専用	なし
定量/定性	定量分析	定量分析	定性分析
対象試料	小麦、大麦、ライ麦など	コーン、大麦、小麦など	穀類、飼料
測定時間	約 35 分	約 20 分	約 40 分
試料	5 g	5 g	2 g
注意点	リーダーのキャリブレーションの確認が煩雑で時間がかかる(30~50分程)。そのためか、日によって多少測定値が変動した。	①ライ麦抽出液の粘性が高いためストリップの展開が遅く、測定不可。 ②VICAM 専用チューブを使用しないといけないため洗浄時間が余分にかかった。	①窒素乾固に 10~15 分かかった。 ②定性分析のため、機器の準備がなく、窒素乾固以外は取り扱いが簡単だったが、展開液の反応を待つ時間が細かく指定されているのでサンプル数が多いと煩雑になると思われる。

表1 各キットの比較 (つづき)

キット名	D	E	F
測定範囲	1.5～30 µg/kg	0～30µg/kg (0～200µg/kg)	2～100 µg/kg
検出限界	1.5 µg/kg	5 µg/kg (25 µg/kg)	2 µg/kg
検出機器	専用	専用	専用
定量/定性	定量分析	定量分析	定量分析
対象試料	小麦、コーン	穀類 (飼料)	小麦
測定時間	約 30 分	30～35 分	約 25 分
試料	5 g	5 g	10 g
注意点	大麦・ライ麦ともにストリップの展開が遅く、測定不可。抽出液を薄めて測定しても測定は不可。	①ライ麦のみ混濁があったので2度遠心分離を行った。 ②インキュベートが2回あるため、サンプル数が多くなると、煩雑になると思われる。	①ライ麦は、ストリップの展開が遅く、測定が不可。 ②大麦・小麦共に、測定は出来たが、測定値と添加量の用量依存性が見られなかった。 ③試料調製の方法により、試料を10g以下のスケールに出来なかった。

表 2 各キットの総合評価

	A 定 量 分 析	B 定 量 分 析	C 定 性 分 析	D 定 量 分 析	E 定 量 分 析	F 定 量 分 析
小 麦	○ 擬 陽 性 +	○ 擬 陽 性 +	○	△	○	△ 擬 陽 性 +
大 麦	○	○	○	×	△	△ 擬 陽 性 +
ラ イ 麦	○	×	○	×	△	×

擬陽性の有無は、添加なしの試料の結果から評価した。

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)

分担研究報告書

モニリフォルミンの Maus 28 日間反復投与毒性試験

研究分担者 渋谷 淳 (東京農工大学大学院 農学研究院 動物生命科学部門)

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 (MON) についての毒性情報を得るため、MON の Maus 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 40 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・摂水量測定、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。投与 2 日目及び 3 日目には 40 mg/kg 群の 3 例に死亡が認められ、投与 28 日目には 40 mg/kg 群の体重及び摂餌量が高値を示した。計画剖検時には 20 mg/kg 以上群で腎臓の絶対重量、40 mg/kg 群の心臓、肝臓の絶対重量が高値を示し、病理組織学的検査では 40 mg/kg 群の腎臓皮質における再生尿細管と肝臓における肝細胞肥大が認められた。一方で、いずれの投与群においても心臓に明らかな病理組織学変化は認められなかった。以上より、MON は腎臓を毒性標的とする可能性が考えられた。10 mg/kg 群に MON の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量は 10 mg/kg と判断された。今後は Maus における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、歴史的にカビ毒に汚染された食品により、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おり、動物実験の実施により腫瘍誘発性が証明されるようになり、発がん性等の毒性が懸念されてきている。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垣間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、当時は健康危害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ことが明らかになってきたカビ毒の総称であり、国際的な関心が高まっている。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) においても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。昨年度は、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。単回投与試験では LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg と求められ、14 日間反復投与試験では、40 mg/kg を最高用量として設定した。単回投与試験では腎臓の皮質深部を中心とした近位尿管の急性尿管壊死が認められ、14 日間反復投与試験では再生尿管が認められた。これらの結果を基に、今年度は 40 mg/kg を最高用量とし、公比 2 で 3 段階の用量の投与群構成とした 28 日間反復投与毒性試験を実施した。

B. 研究方法

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。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。

MON を注射用水で調製した被験液を 0、10、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 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・摂

水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。死亡例については発見後速やかに剖検を実施したが、採血及び臓器重量の測定は行わなかった。各臓器のヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色標本作製し、鏡検した。

一般状態の観察

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

体重測定

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

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。

摂水量測定

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 の間に給水瓶を用いて重量法で測定した。前日

からの 1 日摂水量に基づいて 1 匹当たりの 1 日摂水量を算出した。

血液学検査

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

血液生化学検査

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）した。

剖検、器官重量測定

全ての動物を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。Table 1 に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、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。

病理組織学検査

全ての動物について、Table 1 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 染色標本作製した。作製した全ての H・E 染色

標本について鏡検を実施した。

統計解析

計量データ（体重/体重増加量、摂餌量、摂水量、血液学検査、血液化学検査及び器官重量）につ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 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。病理組織学変化については Fisher の正確確率検定と Mann-Whitney の *U* 検定を実施した。統計解析には IBM SPSS Statistics ver. 29 (IBM Corporation) を用いた。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

一般状態の観察

投与2日目に高用量群の3例に自発運動の減少がみられ、うち2動物は同日に、1動物は投与3日目に死亡した。また、投与3日目に高用量群の1例に自発運動の減少がみられた。

体重の変化

投与28日目の高用量群に対照群と比較し高値がみられた（Table 2）。

摂餌量の変化

投与28日目の高用量群に対照群と比較し高値がみられた（Table 2）。

摂水量の変化

いずれの群においても投与期間中の摂水量に顕著な変化は認められなかった（Table 2）。

血液学検査

中間用量群において、hemoglobin が対照群と比較し低値を示し、red blood cell distribution width が対照群と比較し高値を示した（Table 3）。

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 4）。

剖検（肉眼所見）

剖検時の肉眼所見に明らかな変化は認められなかった。

器官重量

中間用量群の脾臓絶対重量が対照群と比較し高値を示した。高用量群の心臓及び肝臓が対照群と比較し高値を示した。中間用量群及び高用量群の腎臓絶対重量が対照群と比較し高値を示した（Table 5）。

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 6）。すなわち、40 mg/kg 投与群で皮質深部を中心に再生尿細管が認められ、その発生率と重症度が有意な増加を示した。また、40 mg/kg 投与群の1例で皮質深部に近位尿細管の壊死が認められた。40 mg/kg 投与群では肝臓

に小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、severity が有意な増加を示した。死亡例では、右心房及び右心室における内腔の拡張と壁の菲薄化、腎臓皮質全域における尿細管壊死が確認された。

D. 考察

昨年度の結果を基に、最高用量 40 mg/kg、公比 2 で 3 段階の用量の投与群構成とした 28 日間反復投与毒性試験を実施した。MON 投与の影響と考えられる変化として、20 mg/kg 群以上で腎臓絶対重量が高値を示し、40 mg/kg 群で腎臓皮質に再生尿細管が認められた。昨年度に実施した MON の単回投与試験では腎臓皮質に急性尿細管壊死が認められており、本試験における再生尿細管はこれに対する反応性変化と考えられた。また、40 mg/kg 群で肝臓絶対重量が高値を示した。病理組織学検査では小葉中心性の肝細胞肥大が認められており、MON を代謝ないし解毒するための適応反応と考えられた。40 mg/kg 群では、心臓絶対重量が高値を示した。ラットを用いた MON の 12 週間反復混餌投与試験 (Kriek ら、1977) では、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・線維化が認められた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臓の病理組織学変化は認められなかった。以上より、マウスにおいて MON は腎臓を毒性標的とする可能性が示唆された。20 mg/kg 群においては腎臓に統計学的に有意な発生率と重症度を示す病理組織学変化は認められなかったが、絶対重量の高値が認められており、本試験の条件下における無毒性量は 10 mg/kg と判断された。MON の腎毒性が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のか、あるいは、腎尿細管における MON 代謝の際

生じる活性中間代謝産物等の毒性に起因するのかについては、今後検討が必要と考えられた。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ojiro, R., Okano, H., Ozawa, S., Yamagata, H., Zou, X., Tang, Q., Jin, M., Sasaki, K., Yoshida, T., Yoshinari, T., Shibutani, M.: Pharmacokinetics and 28-day repeated-dose toxicity of enniatin B after oral administration in mice. Food Chem. Toxicol. 177:113814, 2023.

2. 学会発表

1. 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。第 10 回アジア獣医病理学会／第 10 回日本獣医病理学専門家協会合同学術集会。東京 (ハイブリッド開催)、第 10 回アジア獣医病理学会／第 10 回日本獣医病理学専門家協会合同学術集会講演要旨集：PC-15, pp.85, 3 月 29 日-31 日, 2023 (オンライン)。

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 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	√	√
精巣上部	√	√
前立腺	√	
精嚢 (凝固腺を含む)	√	
胸骨 (骨髄を含む)	√	
大腿骨 (膝関節及び骨髄を含む)	√*	
大腿部骨格筋	√*	
皮膚 (鼠径部)	√*	

組 織	H・E 標本作製	重量測定
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 2

Changes in body weight and food and water consumption during the administration period of the 28-day dosing study of moniliformin in CD1 (ICR) male mice

No. of animals examined	Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
	0 (controls)	10	20	40
	10	10	10	7 or 10
Body weight (g)				
Day 1	30.9 ± 1.3 ^a	31.0 ± 1.7	31.0 ± 1.9	31.1 ± 1.7
Day 4	31.2 ± 1.6	31.0 ± 1.6	31.3 ± 2.0	31.4 ± 1.7
Day 7	31.7 ± 1.6	31.5 ± 1.7	31.9 ± 2.3	32.1 ± 2.0
Day 14	32.3 ± 1.9	32.4 ± 1.9	33.2 ± 2.5	33.5 ± 2.1
Day 21	32.8 ± 2.2	32.9 ± 2.0	33.9 ± 2.3	34.8 ± 2.4
Day 28	33.7 ± 2.3	33.8 ± 2.0	35.3 ± 2.3	36.5 ± 2.4*
Food consumption (g/animal/day)				
Day 1	5.1 ± 0.7	5.2 ± 0.5	5.0 ± 0.4	5.5 ± 0.5
Day 4	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.4	4.6 ± 0.4	4.6 ± 0.3
Day 7	4.9 ± 0.5	4.6 ± 0.3	4.7 ± 0.4	4.9 ± 0.6
Day 14	4.6 ± 0.3	4.5 ± 0.4	4.7 ± 0.5	4.9 ± 0.7
Day 21	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.5 ± 0.6	4.8 ± 0.6
Day 28	4.5 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.7 ± 0.5	5.1 ± 0.6*
Water consumption (mL/animal/day)				
Day 1	8.0 ± 1.8	7.7 ± 1.2	7.7 ± 1.3	7.6 ± 1.1
Day 4	6.8 ± 1.3	6.9 ± 1.2	7.2 ± 1.5	8.3 ± 1.0
Day 7	6.5 ± 1.1	6.7 ± 1.0	6.9 ± 0.9	7.5 ± 0.6
Day 14	6.5 ± 0.8	6.4 ± 1.2	7.3 ± 0.9	7.7 ± 1.1
Day 21	6.7 ± 1.2	6.3 ± 0.8	6.9 ± 0.9	7.8 ± 2.2
Day 28	6.1 ± 1.2	6.4 ± 1.0	6.6 ± 0.9	7.3 ± 0.8

^a Mean ± SD.

* $P < 0.05$, compared with the vehicle controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 3
Hematological data at the end of repeated administration of moniliformin for 28 days in CD1 (ICR) male mice

No. of animals examined	Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
	0 (controls)	10	20	40
	10	10	10	7
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	936.0 \pm 35.0 ^a	941.0 \pm 45.0	912.0 \pm 76.0	898.0 \pm 23.0
Hemoglobin (g/dL)	14.3 \pm 0.4	14.2 \pm 0.8	13.5 \pm 1.0*	13.9 \pm 0.5
Hematocrit (%)	46.9 \pm 1.2	46.8 \pm 2.1	44.8 \pm 2.8	45.3 \pm 1.5
MCV (fL)	50.1 \pm 1.6	49.7 \pm 1.2	49.3 \pm 2.3	50.5 \pm 1.2
MCH (pg)	15.3 \pm 0.6	15.1 \pm 0.4	14.9 \pm 0.9	15.5 \pm 0.4
MCHC (g/dL)	30.6 \pm 0.5	30.3 \pm 0.6	30.1 \pm 0.6	30.6 \pm 0.3
RDW (%)	12.5 \pm 0.4	12.5 \pm 0.5	13.3 \pm 0.7**	12.9 \pm 0.5
Reticulocytes ($10^9/\text{L}$)	309.9 \pm 28.5	315.8 \pm 24.3	339.5 \pm 39.1	346.8 \pm 38.2
Platelets ($10^4/\mu\text{L}$)	119.7 \pm 12.0	112.5 \pm 12.1	114.9 \pm 13.6	115.9 \pm 9.3
WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	48.6 \pm 15.1	49.0 \pm 17.1	46.6 \pm 22.7	53.7 \pm 14.4
Differential leukocyte counts ($10^2/\mu\text{L}$)				
Lymphocytes	39.2 \pm 12.5	41.0 \pm 15.6	35.8 \pm 17.8	44.2 \pm 13.4
Neutrophils	7.5 \pm 2.9	5.9 \pm 1.6	8.3 \pm 5.2	6.9 \pm 1.4
Eosinophils	1.0 \pm 0.4	1.1 \pm 0.5	1.1 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1
Monocytes	0.8 \pm 0.5	0.8 \pm 0.3	1.0 \pm 0.7	0.9 \pm 0.4
Large unstained cells	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2

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.

^a Mean \pm SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the vehicle controls by Dunnett's test or Aspin-Welch's t -test with Bonferroni correction.

Table 4

Blood biochemistry data at the end of repeated administration of moniliformin for 28 days in CD1 (ICR) male mice

No. of animals examined	Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
	0 (controls)	10	20	40
	10	10	10	7
AST (IU/L)	42.0 ± 5.0 ^a	38.0 ± 5.0	42.0 ± 10.0	38.0 ± 4.0
ALT (IU/L)	28.0 ± 3.0	25.0 ± 3.0	30.0 ± 17.0	26.0 ± 4.0
LDH (IU/L)	166.0 ± 47.0	159.0 ± 42.0	186.0 ± 61.0	166.0 ± 70.0
ALP (IU/L)	229.0 ± 44.0	213 ± 47.0	222.0 ± 27.0	212.0 ± 43.0
Triglyceride (mg/dL)	114.0 ± 13.0	112.0 ± 35.0	90.0 ± 24.0	91.0 ± 27.0
Glucose (mg/dL)	220.0 ± 39.0	216.0 ± 22.0	214.0 ± 22.0	211.0 ± 22.0
BUN (mg/dL)	23.0 ± 3.0	23.0 ± 4.0	24.0 ± 3.0	21.0 ± 4.0
Creatinine (mg/dL)	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01
Total protein (g/dL)	4.9 ± 0.3	4.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.7 ± 0.1
Albumin (g/dL)	3.3 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.2 ± 0.1	3.1 ± 0.1
A/G ratio	2.0 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1

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

^a Mean ± SD.

Table 5

Organ weight data at the necropsy after repeated administration of moniliformin for 28 days in CD1 (ICR) male mice

No. of animals examined		Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
		0 (controls)	10	20	40
		10	10	10	7
Body weight	(g)	34.1 ± 2.4 ^a	34.4 ± 2.0	35.7 ± 2.5	36.8 ± 2.5
Brain	AB (mg)	494.0 ± 24.0	475.0 ± 22.0	490.0 ± 18.0	502.0 ± 20.0
	RE (%)	1.45 ± 0.09	1.39 ± 0.11	1.38 ± 0.08	1.37 ± 0.06
Thymus	AB (mg)	41.0 ± 10.0	39.0 ± 8.0	38.0 ± 12.0	42.0 ± 8.0
	RE (%)	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.03
Spleen	AB (mg)	83.0 ± 16.0	87.0 ± 16.0	101.0 ± 14.0*	101.0 ± 11.0
	RE (%)	0.24 ± 0.04	0.25 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.28 ± 0.04
Heart	AB (mg)	152.0 ± 11.0	147.0 ± 11.0	156.0 ± 11.0	167.0 ± 10.0*
	RE (%)	0.45 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.44 ± 0.01	0.46 ± 0.03
Lung	AB (mg)	173.0 ± 19.0	174.0 ± 8.0	183.0 ± 13.0	180.0 ± 12.0
	RE (%)	0.51 ± 0.04	0.51 ± 0.02	0.51 ± 0.02	0.49 ± 0.03
Liver	AB (g)	1.82 ± 0.17	1.93 ± 0.12	1.99 ± 0.15	2.08 ± 0.22**
	RE (%)	5.34 ± 0.31	5.61 ± 0.35	5.58 ± 0.22	5.64 ± 0.30
Kidney	AB (mg)	468.0 ± 50.0	510.0 ± 45.0	541.0 ± 72.0*	555.0 ± 91.0*
	RE (%)	1.38 ± 0.15	1.48 ± 0.05	1.51 ± 0.11	1.50 ± 0.16
Testis	AB (mg)	226.0 ± 40.0	249.0 ± 30.0	233.0 ± 70.0	206.0 ± 46.0
	RE (%)	0.66 ± 0.09	0.73 ± 0.09	0.65 ± 0.19	0.56 ± 0.11
Epididymis	AB (mg)	88.0 ± 8.0	91.0 ± 5.0	92.0 ± 17.0	90.0 ± 12.0
	RE (%)	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.05	0.25 ± 0.02

Abbreviation: AB, absolute weight; RE, Relative weight by body weight.

^a Mean ± SD.

**P* < 0.05, compared with the vehicle controls by Dunnett's test or Aspin–Welch's *t*-test with Bonferroni correction.

Table 6

Histopathological data after repeated administration of moniliformin for 28 days in CD1 (ICR) male mice

End of administration	No. of animals examined	Dose of moniliformin (mg/kg/day)			
		0 (controls)	10	20	40
Kidney		10	10	10	7
Necrosis, proximal tubule		0 ^a	0	0	1
minimal		0	0	0	1
Regeneration, tubule		2	2	3	6*
minimal		2	2	3	2 ##
mild		0	0	0	4
Infiltrate, mononuclear cell		0	0	1	2
minimal		0	0	1	2
Cast, hyaline		0	0	0	1
minimal		0	0	0	1
Vacuolation, tubule		0	0	0	1
moderate		0	0	0	1
Dilatation, tubule		1	0	1	0
minimal		1	0	1	0
Heart					
Infiltrate, mononuclear cell		0	0	0	1
minimal		0	0	0	1
Liver					
Hypertrophy, hepatocyte		0	0	0	3
minimal		0	0	0	2 #
mild		0	0	0	1
Infiltrate, mixed inflammatory cell		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Infiltrate, mononuclear cell		0	0	1	0
minimal		0	0	1	0
Glandular stomach					
Dilatation, gland		0	0	1	0
minimal		0	0	1	0

^a The number of animals with findings.* $P < 0.05$, significantly different from the vehicle controls by Fisher's exact test.# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, significantly different from the vehicle controls by Mann-Whitney's U test.

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

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

研究分担者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部)

研究要旨

モニリフォルミン (MON) は、諸外国で飼育用または食用となる主要穀物を汚染していることが近年報告され、人々や家畜への健康への被害が懸念されている。一方で、MON の主要な産生菌は植物病原菌の一種である *Fusarium* 属菌が知られるが、過去の研究事例から *Fusarium* 属内でも MON 産生系統と非産生系統の存在が認知されている。さらに *Fusarium* 属では近年、種が細分化される傾向にあり、菌名の再編成等が多くなされていることから、現在の分類体系によって認識される各菌種において、改めて MON 産生能を再評価する必要がある。そこで本年度は、比較的高濃度の MON に汚染されていることをあらかじめ把握した穀物から *Fusarium* 属菌を分離し、前年度に確立した *Fusarium* 属菌株の高産生性 MON 培養法を用いて分離株の MON 産生性を確認することで、国内に流通する穀物の MON 汚染原因菌を特定した。国内に流通する主要穀物である小麦、大麦、ハト麦、ライ麦およびトウモロコシの 5 種の MON 汚染量を定量分析し、比較的高濃度の MON に汚染されていた 16 検体から 169 株の *Fusarium* 属菌の分離・同定を行った。SSA 液体培地を用いて分離株の培養を行い、HPLC-DAD を用いて株毎の MON 産生量を定量した。その結果、MON 産生菌として、小麦から *F. avenaceum* とその近縁種、ライ麦から *F. oxysporum*、トウモロコシから *F. fujikuroi* とその近縁種が検出された。今回分離された菌株の中で最も高産生性であったのはトウモロコシ由来の *F. fujikuroi* で 359 mg/L の MON 産生性を示した。今回、ハト麦および大麦からは MON 産生菌が検出されなかった。さらに、*Fusarium* 属における幅広い菌種が MON 産生性を持つとされる従来からの知見とは異なり、MON は特定の系統が産生する可能性が考えられた。これらの結果から、日本国内で流通する穀物の MON 汚染原因菌の菌種は穀物種毎に傾向があることが明らかとなった。今回判明した穀物毎の汚染原因菌の情報を元に、国内に流通する穀物における *Fusarium* 属菌の汚染状況を把握することで、MON 汚染のリスク評価に関する知見を蓄積することができた。

研究協力者

青木 渉 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

Fusarium 属菌は、様々な農作物へ感染して稲ばか苗病 (*F. fujikuroi*) や赤かび病 (*F. graminearum*) 等の特徴的な表徴により植物体を病変させる植物病原菌として知られる (図 1)。そのような菌類に感染した農作物は *Fusarium* 属菌の二次代謝産物であるカビ毒に汚染され、人々の健康へ影響を与えるとともに、穀物を原料とした加工産業等への被害が度々報告されている¹⁾。近年では分析技術の発展に伴い、LC-MS や TOF-MS 等の高感度・高分解能の分析機器が登場している。これにより新たに様々な農産物を汚染することが判明したカビ毒を新興カビ毒と呼称するが、その一種であるモニリフォルミン (MON) が注目を浴びている (図 2)。

MON は *Fusarium* 属菌と *Penicillium melanoconidium* において産生例が報告されている四員環ジケトン構造を持つ水溶性の化合物で、他のカビ毒と比較して低分子な化合物として知られる。1973 年に病変したトウモロコシ実生に由来する *F. moniliforme* (= *F. fujikuroi* species complex) から発見された。近年、ヨーロッパ食品安全委員会 (EFSA) は欧州で流通している食用の小麦・大麦を含む過去 14 年間に渡る 1683 検体の汚染実態調査事例をまとめ、数多くの種類の穀物で MON による汚染が蔓延していることを報告している²⁾。穀物における MON 汚染の調査は MON 汚染リスク評価に重要な因子の一つと言える。

Fusarium 属菌での MON 産生能については、1970 年代から多くの確認実験がなされ、*F. verticillioides*、*F. subglutinans*、*F. sporotrichioides*、*F. culmorum*、*F. equiseti*、*F. semitectum*、*F. tricinctum*、*F. avenaceum*、*F. tricinctum*、*F. clamydosporum* の計 10 菌種で MON 産生の報告がある^{3,4)}。しかし未だに不明な点も多く、

文献によっては同一種であっても産生能が大きく異なるなど、*Fusarium* 属菌の系統内でも産生スペクトルには曖昧な点が見受けられる^{4,5)}。その上、*Fusarium* 属では近年では種が細分化される傾向にあり、分子系統分類学的手法により解析が進められ、新種報告が多くなされている^{6,7)}ことから、現在の分類体系によって認識される各菌種において、改めて MON 産生能を再評価する必要がある。日本国内で農作物の MON 汚染の原因となる *Fusarium* 属菌を特定することは、MON 汚染リスクの評価に重要な因子であると考えられる。

本年度は、比較的高濃度の MON に汚染されていることをあらかじめ把握した穀物から *Fusarium* 属菌を分離し、前年度に確立した *Fusarium* 属菌株の高産生性 MON 培養法を用いて分離株の MON 産生性を確認することで、国内に流通する穀物の MON 汚染原因菌を特定したので、その成果を報告する。

B. 研究方法

(1) 分離元検体の選抜

吉成ら (2023)⁸⁾の方法を参考に、ダイオードアレイ付き HPLC (HPLC-DAD) による MON 定量法から汚染量を把握した。国内のスーパーマーケットやオンラインショップで販売されている小麦、大麦、ハト麦、ライ麦、トウモロコシを含む計 109 の穀物検体を収集した。検体の約 50 g をミルミキサーにより破碎して実験に供するまで 4°C で保管した。破碎検体 5 g を 50 mL 容ファルコンチューブへ加え、ここに 85%アセトニトリル 25 mL を加えて 15 分振盪培養、その後 1,000 rpm で 5 分間遠心分離してから上清を 300 mL 容共栓付き三角フラスコへデカントで移す操作を三回繰り返した。得られた上清液約 75 mL をよく攪拌してから上清の 22.5 mL を 25 mL 容試験

管へ入れて窒素の吹付乾固をした。乾固物へ 2 mL のメタノールを加えてソニケーターで溶解後に平衡化した Bond Elut SAX (アジレント・テクノロジー社製) に通液して MON を吸着させ、カラム内を 0.1M リン酸と 10%アセトニトリルで洗浄した。吸着させた MON は 1.5 mL のイオンペア剤 (3.5%TBAHS 0.2 M KH₂PO₄) 1.5 mL で溶出し、試験溶液とした。試験溶液中のカビ毒を HPLC-DAD により定量した。MON の吸光波長は 229nm と 260nm で極大を示すためこれを特徴とした。HPLC 測定条件は以下の通りである；

HPLC : 1260 Infinity (Agilent Technology)

カラム : Intert Sustain Swift C18、
5 μm、4.6×250 mm (ジエールサイエンス社製)

移動相 : 水 : 7% TBAHS + 0.4M KH₂PO₄ (pH7.0):アセトニトリル(92:1:8)アイソクラティック溶出

流速 : 1 mL/min

注入量 : 100 μL

検出波長 : 229 nm

解析時には 10、30、100、300、1,000、3,000 μg/L の濃度段階で作成した標準品を用意した。229 nm の面積値より検量線を作成し、検体中の MON のピーク面積から培地中の濃度を算出した。解析結果から、100 μg/kg 以上の濃度で MON に汚染されている検体を選抜し、*Fusarium* 属菌分離実験に供した。

(2) 穀物からの *Fusarium* 属菌株の分離

(1) で選抜した MON 汚染穀物を材料として、各穀物検体 70 粒程度を滅菌済み 300 mL 容三角フラスコへ入れ、そこに約 60 mL の 70%エタノールを加えて 30 秒攪拌後、直ちに液体のみを廃棄して滅菌蒸留水 100 mL を

加え 30 秒程度攪拌し液体を廃棄した。この洗浄作業を 2 回繰り返した。得られた洗浄済み穀物は滅菌濾紙の上に広げ、水分を除去後、DRBC 平板培地上に 5 点等間隔に播種し、暗条件下で 25°C・5 日間程培養した。培養後に、菌糸を伸長する *Fusarium* 属様菌のコロニーを PDA 平板培地へと釣菌して 25°C・1 週間培養した。培養後に PDA 平板培地上で生育したコロニーを PDB へ接種して 2 日間・25°C培養を行い、培養後得られた菌糸体を DNA 解析試料とした。

(3) *Fusarium* 属菌の同定

DNA 抽出には DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 株式会社) を用い、添付のプロトコルに従って実験を進めた。得られた DNA 抽出物は使用まで -80°Cディープフリーザー内で冷凍して保管した。PCR には TaKaRa EX Taq (タカラ株式会社) を用い、試薬組成は 1 サンプルあたり 10×Ex Taq Buffer 2.5 μL、dNTP mixture 2 μL、フォワードプライマー (5 pmol/μL) 1 μL、リバースプライマー (5 pmol/μL) 1 μL、ExTaq 0.12 μL、テンプレート DNA (50-100 ng) を加え、体積が 25.0 μL となるように DW を加えて調製した。各種プライマーについては、18S partial-ITS1-5.8S-ITS2-28S partial (ITS 領域) の増幅には ITS5 : 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'⁹⁾および NL4 : 5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G -3'¹⁰⁾を、elongation factor-1 alpha 遺伝子 (*EF-1α*) の増幅には EF1 : 5'- ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC -3'¹¹⁾ および EF2new : 5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT -3' (本研究においてデザインした) の組み合わせをそれぞれ用いた。サーマルサイクラーの反応プロトコルは初期変性 94°C・3 分ののち、変性 94°C・30 秒、再生 55°C・40 秒、伸長 72°C・50 秒の反応を 35 サ

イクル行い、最終伸長 72°C・5 分で反応させた。得られた PCR 産物は ExoSap 2 μL 添加し、37°C・15 分ののち、80°C・15 分で精製反応を進め、得られた精製産物をシーケンシング反応のテンプレートとして用いた。シーケンシング反応には BigDye Terminator v.3.1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用い、マスターミックスの組成は、BigDye Terminator 1 μL、フォワードもしくはリバースプライマー 1 μL、DW 6 μL および精製済 PCR 産物 2 μL の計 10 μL の条件とした。シーケンシング反応は、初期変性 95°C・5 分、変性 95°C・30 秒、再生 52°C・10 秒、伸長 60°C・4 分を 25 サイクル繰り返した。シーケンスサンプルの精製はエタノール沈殿法により行い、最終産物を 12 μL の HiDi ホルムアルデヒド (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) へ溶解した。サンガーシーケンスリードの取得には 3730xl DNAanalyzer (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いた。得られた ab1 形式ファイルを ATGC (株式会社ゼネティックス) へ取り込み、波形データの補正および配列のアセンブリを行った。得られた各菌株の遺伝子塩基配列を FASTA 形式ファイルで出力した。

Han et al.⁷⁾および農業生物ジーンバンク¹²⁾を参考に、Genbank からダウンロードした *EF-1α* のリファレンス配列を本研究で得られた分離培養株の *EF-1α* の配列とともにマルチプロアライメントソフトウェア MAFFT ver. 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) を用いて解析し、配列の 5'領域と 3'領域のトリミングを行ったものをアラインメントファイルとして分子系統解析に供した。分子系統解析には RAxML ver. 8¹³⁾ を用い、GTRGAMMAI model およびブートストラップ法 1000 反復の条件で系統樹を構築した。解

析結果の出力には Figtree ver. 1.44 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) を用いた。得られた系統解析結果を参照し、ブートストラップ値 85 以上でリファレンス配列と単系統を形成したことを同定の根拠として分離菌株群を同定し、それとは異なる系統に属した種については *Fusarium sp. #*とした。

(4) 培養株からの MON 産生性のスクリーニングと HPLC による定量方法

紙栓 (Steristoppers : Heinz Herenz 株式会社) をして滅菌した 100 mL 容三角フラスコ (AGC テクノグラス株式会社) へ Sucrose salt asparagine 液体培地 (SSA 培地 : 組成は表 1 に示す) 25 mL を加え、ここに (1) にて分離同定し、かつダニ等からの汚染を受けていないことを確認した 163 菌株 (表 3) について、1 週間の前培養後の PDA 半斜面培地の表面積 2 cm² に当たる体積の菌糸を接種し、25°C・暗条件で 10 日間静置培養した。培養後の培養液 300 μL を 1.5 mL マイクロチューブへ回収し、6N 塩酸 60 μL および酢酸エチル 300 μL を加えてボルテックス後、12,000 rpm で 5 分遠心し、上清液 200 μL を回収した。上清を取り去った下層の液に対してこの操作をさらに 1 回繰り返して上清液 300 μL を回収し、合計 500 μL の上清液を回収した。上清液は窒素吹付により乾固し、30 μL の酢酸エチルを加えて TLC 試料液とした。展開溶媒にはトルエン : アセトン : メタノール : 酢酸 = 4 : 3 : 2 : 1 混合液を使用した。TLC プレート (Aluminum TLC plate, silica gel coated with fluorescent indicator F254 : Merck) を用い、試料液を 2 μL ずつ 2 回スポットした。陽性対照には MON 濃度 100 ng/μL を 1 μL スポットした。展開して風乾後、UV イルミネーター (UV box : ベルトールドジャパン株式会社) を用いて波長 256 nm で Rf 値 4.5 に出現した

蛍光減退バンドから MON の陽性判定を行った (図 3)。

MON 陽性が確認された、もしくは疑いのある培養液は HPLC-DAD による MON 産生能の定量評価を行った。MON 陽性培養液 150 μL を新たな 1.5 mL マイクロチューブへ移し、分取した培養液をメタノール 1 mL と混合し、25 $^{\circ}\text{C}$ ・3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。その後は穀物検体と同様の方法で前処理を行い、HPLC-DAD で検出・定量して培養液中 MON 濃度を算出した。

C. 研究結果

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の濃度で MON に汚染されている検体として、計 16 検体の穀物を菌株分離元として使用した (表 2)。小麦からは *F. poae* が 6 株、*Fusarium* sp.1 (*F. avenaceum* species-complex に含まれるが 1 菌種に同定できない) が 3 株、*F. avenaceum* が 5 株、*Fusarium* sp. 2 (*F. incarnatum-F. equiseti* species-complex に含まれるが 1 菌種に同定できない) が 2 株が検出され、大麦からは *F. graminearum* が 1 株および *F. avenaceum* が 1 株、ハト麦からは *F. luffae* が 9 株と *F. verticillioides* が 1 株、ライ麦からは *F. oxysporum* が 1 株、トウモロコシからは *F. fujikuroi* が 65 株、*F. annulatum* が 8 株、*F. andiyazi* が 3 株、*F. temperatum* が 5 株、*F. nisikadoi* が 1 株、*Fusarium* sp.2 が 1 株、*F. verticillioides* が 50 株、*F. subglutinans* が 2 株および *F. luffae* が 5 株の計 169 株 14 菌種が分離された (表 2)。また、系統解析と形態観察による種同定の結果を図 4 に示した。MON 産生性を示した菌株は実験に供試した全 163 株中 83 株であった。*Fusarium* 属種毎の培地中の MON 濃度の平均値および MON 産生陽性株の比率は、*F. fujikuroi* (MON 平均濃度, MON 陽性株数/分離株数 : 83.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

62/65)、*F. annulatum* (21.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4/8)、*F. temperatum* (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3/5)、*F. subglutinans* (1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1/2)、*F. andiyazi* (39.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2/2)、*F. oxysporum* (165.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1/1)、*F. nisikadoi* (88.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1/1)、*F. avenaceum* (6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8/9) および *Fusarium* sp.1 (25.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3/3) であり、9 種で MON 産生性が確認された (図 5)。MON 産生性陽性株の比率については種によって差がある傾向が見られた。また、最も MON を産生性が高かった菌株は *F. fujikuroi* の Zea020-29 株で、359 mg/L の濃度で検出された。*F. verticillioides*、*F. luffae*、*F. poae*、*F. equiseti* および *F. graminearum* は供試したすべての分離株で MON 産生性が確認されなかった (表 4)。

D. 考察

各種 MON 汚染穀物から分離された MON 産生株を穀物の MON 汚染原因菌として考えた場合、その菌種は、小麦では *F. avenaceum* および *Fusarium* sp. 1、ライ麦では *F. oxysporum*、トウモロコシでは *F. fujikuroi*、*F. annulatum*、*F. temperatum*、*F. andiyazi*、*F. subglutinans* および *F. nisikadoi* であり、穀物によって MON 産生菌種は異なる傾向が見られた (表 3)。トウモロコシからは *F. fujikuroi* やその近縁種が多数検出され、*F. verticillioides* 以外の種のほとんどの分離株で MON 産生性を有していた。*F. fujikuroi* とその近縁種は稲や小豆等の農作物からの検出事例が多い菌類で、稲ばか苗病などの植物病原菌でもある¹⁴⁾。本研究では、*F. fujikuroi* では 300 mg/L 以上の高濃度 MON 産生菌株の存在が確認され、熊本県から山梨県まで、国内の幅広い地域のトウモロコシから MON 産生菌株が検出された (表 3)。*F. fujikuroi* とその近縁種は国内での主な MON 汚染原因菌であ

る可能性が高く、本菌の検出頻度の高い穀物は他の農産物に比べて MON 汚染リスクが高いと考えられた。

小麦では、*F. avenaceum* とその近縁種汚染原因菌が MON 汚染原因菌となっている可能性が示された。一方で、今回は大麦からは 2 株の *Fusarium* 属菌しか分離できず、*F. avenaceum* を含むこれらの分離株からは MON 産生性が確認されなかったため、大麦の MON 汚染原因菌に関しての情報は得られなかった。しかし、欧州等の小麦および大麦畑での *Fusarium* 属菌の菌叢解析調査において *F. avenaceum* 系統がしばしば検出されており¹⁵⁾、また *F. avenaceum* は赤カビ病の原因菌として日本国内に多く分布することが知られる。本研究の結果から MON 産生性が高いことが判明した *F. fujikuroi* でも MON を産生しない株が分離され (表 3)、一つの菌種においても MON 産生株と非産生株が混在するところがあることを考慮すると、大麦の MON 汚染で *F. avenaceum* が原因菌となっている可能性はあると考えられた。今後の大麦での MON 汚染原因菌探索の継続が必要である。

MON 産生菌の識別に関しては、過去の報告を参照すると、トウモロコシから分離された *F. incarnatum* (文献中ではシノニムの *F. semitectum*) から MON が産生されたとの⁴⁾ 報告が存在するが、本研究ではこれとの近縁種である *F. luffae* や *Fusarium* sp.2 などの複数菌株から MON 産生性は一切確認されなかったことから、少なくとも国内に分布する *F. incarnatum* や *F. luffae* の系統は MON をほとんど産生しない可能性が考えられた。また、今回分離した *F. fujikuroi*、*F. andiyazi*、*F. annulatum*、*F. subglutinans* では MON 産生性が確認されたが、これらと近縁種の中では *F. verticillioides* のみで MON 産生性は一切確認されなかった (図 5)。これらのことから、

互いに近縁であっても系統によって MON 産生性は異なることが示唆された。また *Fusarium* 属における幅広い菌種が MON 産生性を持つとされる従来からの知見とは異なり、MON は特定の系統が産生する可能性が考えられた。

今回の MON 汚染原因菌探索によって、MON に高濃度汚染された穀物がどのような *Fusarium* 属菌に感染しているか、その実態が明らかとなった。さらに、多くの検体で単一の菌種に汚染されているわけではなく、多種の *Fusarium* 属に汚染されていた。過去の研究から、今回検出された *F. fujikuroi* とその近縁種はフモニシン類やフザレノン X、*F. avenaceum* とその近縁種はエンニアチン類等のカビ毒産生性が報告されている⁷⁾。また小麦や大麦からは、ジアセトキシシルペノール (DAS) やデオキシニバレノール (DON) などのトリコテセン系カビ毒を産生する *F. equiseti*、*F. poae* および *F. graminearum* などの菌も合わせて検出されている⁴⁾。したがって、1つの菌種が複数のカビ毒を産生する、または複数種の *Fusarium* 属菌が同時に感染しそれぞれが別個のカビ毒を産生する状況となる場合があり、穀物は MON 以外の様々なカビ毒にも複合的に汚染される可能性がある。他のカビ毒との複合的な健康影響¹⁶⁾も考慮する必要がある。

今年度の検討によって判明した穀物の MON 汚染原因菌の情報を元に、国内に流通する穀物における *Fusarium* 属菌の汚染状況を把握することで、MON 汚染のリスク評価に関する知見を蓄積することができた。一方で、今年度の検討では、MON 汚染ハト麦からは MON 汚染の原因と推定される MON 産生菌の検出ができなかった。これはハト麦が収穫されてから時間が経過したことや貯蔵中の農薬の使用等によって、汚染原因菌が死滅したことが

原因と考えられる。流通品における菌の分布調査を行うためには、死滅菌でも検出可能な方法を採用する必要がある。そこで今後は、今年度の研究で判明した菌種毎の MON 産生性の情報を有効に活用しつつ、試料に残留する DNA をテンプレートとして次世代シーケンサーを用いた菌総解析を行い、穀物に付着した MON 産生菌種を検出する予定である。

E. 結論

日本国内で流通する穀物の MON 汚染原因菌の菌種は穀物種毎に傾向があり、小麦および大麦では *F. avenaceum*、ライ麦では *F. oxysporum*、トウモロコシは *F. fujikuroi* とその近縁種および *F. nisikadoii* であることを明らかにした。また *Fusarium* 属における幅広い菌種が MON 産生性を持つとされる従来からの知見とは異なり、MON は特定の系統が産生する可能性が考えられた。今回判明した汚染原因菌の情報を元に、国内に流通する穀物における *Fusarium* 属菌の汚染状況を把握することで、MON 汚染のリスク評価に関する知見を蓄積することができた。今後は、さらなる MON 汚染原因菌の実態に関する情報を明らかにするため、調査を継続する必要がある。

F. 参考文献

- 1) 岩手県産小麦から「かび毒」検出「JA 全農いわて」が会見 | NHK | 農業 (2023/11/29). <https://www3.nhk.or.jp/news/html/20231129/k10014272631000.html>
- 2) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risks to human and animal health related to the presence of moniliformin in food and feed. 2018, EFSA Journal, 16, e05082.
- 3) Watanabe, M., Yonezawa, T., Sugita-Konishia, Y., Kamata, Y. Utility of the phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin-producing potential. Food Add. Contamin. A. 2013, 30, 1370–1381.
- 4) Abraham, ZJ. *Fusarium* Species: Their biology and toxicology. A Wiley-Interscience Publications. 1986.
- 5) Schütt, F., Nirenberg, HI., and Deml, G. Moniliformin production in the genus *Fusarium*. 1998, Mycotoxin Research, 14, 35-40.
- 6) Yilmaz, N. Sandoval-Denis, M., Lombard, L. Visagie CM., Wingfield, BD., Crous, PW. Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. 2021, Persoonia, 46, 129-162.
- 7) Han, SL., Wang, MM., Ma, ZY., Raza, M., Zhao, P., Liang, JM., Gao, M., Li, YJ., Wang, JW., Hu, DM., Cai, L.: *Fusarium* diversity associated with diseased cereals in China, with an updated phylogenomic -assessment of the genus. 2023, Studies in Mycology, 104, 87-148.
- 8) 令和 4 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）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，分担研究報告書「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」渡辺麻衣子，2023 年
- 9) White, TJ., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Edited by: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. White TJ: Academic Press. pp. 315-322 (1990)
- 10) O'Donnell, K.: *Fusarium* and its near relatives, in The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics, ed. by Reynolds DR and Taylor JW. CAB International, Wallingford, UK. pp. 225–233 (1993).

- 11) O'Donnell, K., Kistler, HC., Cigelnik, E., Ploetz, RC.: Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene sgenealogies. Proc Natl Acad Sci. USA 1998, 95(5):2044-2049.
- 12) 農業生物資源ジェーンバンク . https://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php
- 13) Stamatakis, A. RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 2014, 30:1312-3.
- 14) Kushiro, M., Zheng, Y., Nagata, R., Nakagawa, H., and Nagashima, H. Limited Surveillance of Fumonisin in Brown Rice and Wheat Harvested in Japan. Journal of Food Protection. 2009, 72, 1327–1331.
- 15) Boutigny, AL., Gautier, A., Basler, R., Dauthieux, F. Leite, S., Valade, R., Aguayo, J., Ioos, R., Laval, V. Metabarcoding targeting EF1 alpha region to assess Fusarium diversity on cereals. 2019, PLOS One, 14, e0207988.
- 16) Fremy, JM., Alassane-Kpembé, I., Oswald, IP., Cottrill, B., and Van Egmond, HP. A review on combined effects of moniliformin and co-occurring Fusarium toxins in farm animals. 2019, World Mycotoxin Journal, 12, 281-291.
- オルミン産生能評価法の検討. 日本マイコトキシン学会第 90 回学術講演会. 2024. 1. 10.

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

G. 研究業績

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 1) 青木渉、吉成知也、工藤由起子、渡辺麻衣子. 新興カビ毒モニリフォルミン汚染穀物中の原因菌探索. 第 119 回食品衛生学会学術講演会. 2023.10.17-18.
- 2) 青木渉、吉成知也、工藤由起子、渡辺麻衣子. *Fusarium* 属におけるカビ毒モニリフ

表 1 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-pantothenate	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 2 本研究で使用した汚染穀物一覧

検体 ID	穀物種	産地	穀物中 MON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
R5-Coi002	ハト麦	岩手県	23
R5-Coi004	ハト麦	富山, 栃木県	3109
R5-Coi008	ハト麦	中国	1569
R5-Sec009	ライ麦	北海道	1644
R5-Hor006	大麦	石川県	473
R5-Hor024	大麦	北海道	93
R5-Hor025	大麦	北海道	20
R5-Tri006	小麦	北海道	390
R5-Tri012	小麦	北海道	1218
R5-Zea004	トウモロコシ	アメリカ	1442
R5-Zea005	トウモロコシ	アメリカ	198
R5-Zea008	トウモロコシ	栃木県	877
R5-Zea010	トウモロコシ	山梨県	100
R5-Zea011	トウモロコシ	山梨県	1120
R5-Zea019	トウモロコシ	埼玉県	651
R5-Zea020	トウモロコシ	熊本県	271

表3 本研究で分離した *Fusarium* 属菌株一覧

株番号	同定種名	由来穀物	由来検体	MON 産 生 量 (mg/L) * ¹
Coi002-3	<i>F. luffae</i>	ハト麦	R5-Coi002	<0.1
Coi002-4	<i>F. luffae</i>	ハト麦	R5-Coi002	<0.1
Coi002-5	<i>F. luffae</i>	ハト麦	R5-Coi002	<0.1
Coi004-16	<i>F. luffae</i>	ハト麦	R5-Coi004	<0.1
Coi004-21-1	<i>F. luffae</i>	ハト麦	R5-Coi004	<0.1
Coi004-21-2	<i>F. luffae</i>	ハト麦	R5-Coi004	<0.1
Coi006-6	<i>F. luffae</i>	ハト麦	R5-Coi006	<0.1
Coi006-7	<i>F. luffae</i>	ハト麦	R5-Coi006	<0.1
Coi008-2	<i>F. verticillioides</i>	ハト麦	R5-Coi008	<0.1
Sec009-48	<i>F. oxysporum</i>	ライ麦	R5-Sec009	88.1
Hor025-17	<i>F. avenaceum</i>	大麦	R5-Hor025	0.00
Hor024-10	<i>graminearum</i>	大麦	R5-Hor024	<0.1
Tri006-6	<i>Fusarium</i> sp.2	小麦	R5-Tri006	<0.1
Tri006-7	<i>Fusarium</i> sp.2	小麦	R5-Tri006	<0.1
Tri006-9	<i>F. avenaceum</i>	小麦	R5-Tri006	21.7
Tri006-41	<i>Fusarium</i> sp.1	小麦	R5-Tri006	13.8
Tri012-1	<i>F. avenaceum</i>	小麦	R5-Tri012	8.5
Tri012-14	<i>Fusarium</i> sp.1	小麦	R5-Tri012	2.0
Tri012-15-1	<i>Fusarium</i> sp.1	小麦	R5-Tri012	60.4
Tri012-15-2	<i>F. poae</i>	小麦	R5-Tri012	<0.1
Tri012-20	<i>F. poae</i>	小麦	R5-Tri012	<0.1
Tri012-24	<i>F. poae</i>	小麦	R5-Tri012	<0.1
Tri012-25	<i>F. poae</i>	小麦	R5-Tri012	<0.1
Tri012-3	<i>F. poae</i>	小麦	R5-Tri012	<0.1
Tri012-7	<i>F. poae</i>	小麦	R5-Tri012	<0.1
Tri012-2-16	<i>F. avenaceum</i>	小麦	R5-Tri012	5.0
Tri012-2-19	<i>F. avenaceum</i>	小麦	R5-Tri012	0.5
Tri012-2-20	<i>F. avenaceum</i>	小麦	R5-Tri012	8.3
Zea008-1	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	n.t. * ²
Zea008-10	<i>F. luffae</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-12	<i>F. andiyazi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	29.0
Zea008-14	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-15	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-17	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	107.6
Zea008-18	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	39.7
Zea008-2	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-20	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	8.1
Zea008-21	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	77.7
Zea008-22	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-24	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	5.1
Zea008-25	<i>F. luffae</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-26	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	1.7
Zea008-27-1	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	n.t. * ²
Zea008-27-2	<i>F. luffae</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-29	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	8.8
Zea008-3	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	n.t. * ²
Zea008-30	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-31	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	112.8
Zea008-32	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-33	<i>F. andiyazi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-35	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-37	<i>F. andiyazi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	39.0
Zea008-4-1	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	50.9

*¹ 検出下限値は0.1 mg/L。*² 試験せず。

表3 本研究で分離した *Fusarium* 属菌株一覧 (続き)

株番号	同定種名	由来穀物	由来検体	MON 産 生 量 (mg/L) * ¹
Zea008-4-2	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	109.5
Zea008-5	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	n.t. * ²
Zea008-7	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	<0.1
Zea008-8	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	3.2
Zea008-9	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea008	31.3
Zea004-1-1	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea004	<0.1
Zea004-1-2	<i>F. subglutinans</i>	トウモロコシ	R5-Zea004	<0.1
Zea004-2-1	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea004	<0.1
Zea004-2-2	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea004	<0.1
Zea004-3	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea004	<0.1
Zea019-11	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-1-1	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-12	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-1-2	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-13	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-14	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-15	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-16	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-17	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-18	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-19	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-20	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-23	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-24	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-26	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-28	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-29	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-3	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-30	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-31	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-32	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	65.3
Zea019-33	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-34-1	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-34-2	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-4	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-5	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-6	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-7	<i>F. annulatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-8	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea019-9	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea019	<0.1
Zea011-1	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	41.4
Zea011-2	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	19.0
Zea011-3	<i>F. annulatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	17.0
Zea011-4	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	4.4
Zea011-5	<i>F. annulatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-6	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	25.2
Zea011-7	<i>F. temperatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	3.0
Zea011-8	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	164.2
Zea011-9	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-10	<i>F. luffae</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-11	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-12	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	21.0
Zea011-13	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	51.8

*¹ 検出下限値は 0.1 mg/L。*² 試験せず。

表3 本研究で分離した *Fusarium* 属菌株一覧 (続き)

株番号	同定種名	由来穀物	由来検体	MON 産 生 量 (mg/L)* ¹
Zea011-14-1	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-14-2	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-15-1	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	66.1
Zea011-15-2	<i>F. temperatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-16	<i>F. annulatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-18	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	98.5
Zea011-19	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	88.1
Zea011-20	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	30.0
Zea011-22	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	69.7
Zea011-23	<i>F. annulatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-24	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	39.0
Zea011-25	<i>F. nisikadoi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	165.9
Zea011-26	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-27	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	185.8
Zea011-28	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	39.5
Zea011-29	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	19.7
Zea011-30	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-31	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-32	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-33	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	73.9
Zea011-35	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	20.2
Zea011-36	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	8.5
Zea011-37	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	6.5
Zea011-38	<i>F. verticillioides</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	<0.1
Zea011-39	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	40.5
Zea011-40	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	4.8
Zea011-41	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	124.7
Zea011-42	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	68.9
Zea011-43	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	34.3
Zea011-44	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea011	132.5
Zea020-2	<i>F. annulatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	35.3
Zea020-3	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	305.3
Zea020-5	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	309.2
Zea020-6	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	296.0
Zea020-7	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	53.2
Zea020-8	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	17.4
Zea020-9	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	57.2
Zea020-10	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	202.8
Zea020-11	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	58.1
Zea020-15	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	39.0
Zea020-16	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	60.3
Zea020-17	(未同定)	トウモロコシ	R5-Zea020	9.7
Zea020-18	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	274.7
Zea020-19	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	98.6
Zea020-21	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	153.0
Zea020-22	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	90.8
Zea020-25	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	227.1
Zea020-26	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	313.0
Zea020-27	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	52.3
Zea020-29	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	359.0
Zea020-30	<i>F. annulatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	91.7
Zea020-32	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	126.1
Zea020-34	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	147.0

*¹ 検出下限値は 0.1 mg/L。*² 試験せず。

表3 本研究で分離した *Fusarium* 属菌株一覧 (続き)

株番号	同定種名	由来穀物	由来検体	MON 産 生 量 (mg/L) * ¹
Zea020-36	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	53.9
Zea020-37	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea020	54.9
Zea005-3	<i>F. annulatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea005	27.9
Zea005-4	<i>F. subglutinans</i>	トウモロコシ	R5-Zea005	3.7
Zea010-4	<i>F. luffae</i>	トウモロコシ	R5-Zea010	<0.1
Zea010-9	<i>Fusarium</i> sp. 2	トウモロコシ	R5-Zea010	<0.1
Zea010-2-1	<i>F. temperatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea010	1.0
Zea010-2-2	<i>F. temperatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea010	<0.1
Zea010-5-1	<i>F. temperatum</i>	トウモロコシ	R5-Zea010	0.9
Zea010-5-2	<i>F. fujikuroi</i>	トウモロコシ	R5-Zea010	16.9

*¹ 検出下限値は 0.1 mg/L。

*² 試験せず。

表 4 各 MON 汚染穀物から分離された *Fusarium* 属菌と汚染原因菌 (灰背景)の一覧

穀物検体	穀物種	産地	穀物中 MON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^{*2}	主要 MON 産生菌	検出 株数	MON 産生量 (Min-Max:mg/kg) ^{*3}
R5-Coi002	ハト麦	岩手県	22.59	<i>F. luffae</i>	3	N.D. ^{*1}
R5-Coi004	ハト麦	富山県, 栃木県	3109.26	<i>F. luffae</i>	3	N.D. ^{*1}
R5-Coi008	ハト麦	中国	1569.27	<i>F. verticillioides</i>	1	N.D. ^{*1}
R5-Sec009	ライ麦	北海道	1643.61	<i>F. oxysporum</i>	1	88.1
R5-Tri006	小麦	北海道	390.3	<i>F. avenaceum</i>	1	21.7
				<i>Fusarium</i> sp.1	1	13.8
				<i>Fusarium</i> sp.2	2	N.D. ^{*1}
R5-Tri012	小麦	北海道	1218.40	<i>F. avenaceum</i>	4	0.5-21.6
				<i>Fusarium</i> sp.2	2	2.0-60.4
				<i>F. poae</i>	6	N.D. ^{*1}
R5-Hor006	大麦	石川県	473.31	非検出	-	N.D. ^{*1}
R5-Hor024	大麦	北海道	93.2	<i>F. graminearum</i>	1	N.D. ^{*1}
R5-Hor025	大麦	北海道	20.4	<i>F. avenaceum</i>	1	N.D. ^{*1}
R5-Zea004	トウモロコシ	アメリカ	1441.58	<i>F. verticillioides</i>	4	N.D. ^{*1}
				<i>F. subglutinans</i>	1	N.D. ^{*1}
R5-Zea005	トウモロコシ	アメリカ	197.5	<i>F. annulatum</i>	1	27.9
				<i>F. subglutinans</i>	1	3.7
R5-Zea008	トウモロコシ	栃木県	877.00	<i>F. fujikuroi</i>	14	1.7-112.8
				<i>F. andiyazi</i>	3	21.0-50.9
				<i>F. verticillioides</i>	8	N.D. ^{*1}
				<i>F. luffae</i>	3	N.D. ^{*1}
R5-Zea010	トウモロコシ	山梨県	100.0	<i>F. luffae</i>	1	N.D. ^{*1}
				<i>Fusarium</i> sp.2	1	N.D. ^{*1}
				<i>F. temperatum</i>	3	0.9-1.0
				<i>F. fujikuroi</i>	1	16.9
R5-Zea011	トウモロコシ	山梨県	1120.29	<i>F. fujikuroi</i>	27	4.4-185.8
				<i>F. annulatum</i>	4	17.0
				<i>F. temperatum</i>	2	3.0
				<i>F. verticillioides</i>	7	N.D. ^{*1}
				<i>F. luffae</i>	1	N.D. ^{*1}
R5-Zea019	トウモロコシ	埼玉県	651.39	<i>F. fujikuroi</i>	1	65.3
				<i>F. annulatum</i>	1	N.D. ^{*1}
				<i>F. verticillioides</i>	25	N.D. ^{*1}
R5-Zea020	トウモロコシ	熊本県	270.5	<i>F. annulatum</i>	2	35.3-91.7
				<i>F. fujikuroi</i>	23	17.4-36.0

*1 非検出

*2 検出下限値は 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

*3 検出下限値は 0.1 mg/kg

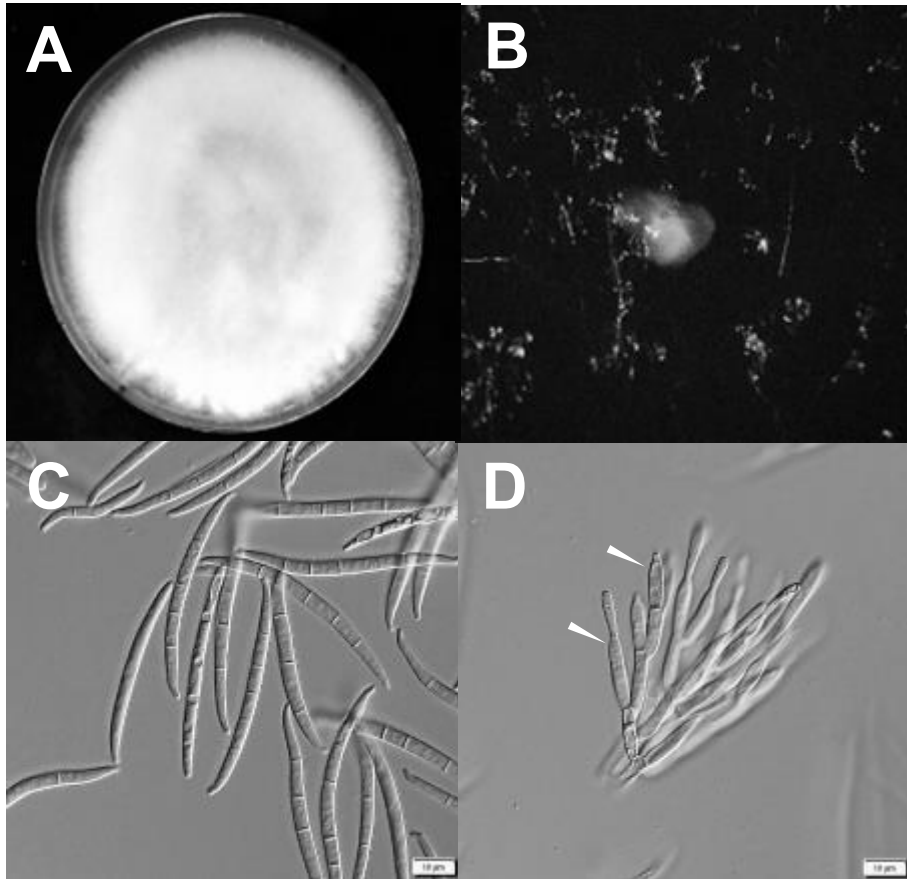


図1 *Fusarium* 属 (*F. fujikuroi*: Zea008-17) の形態

A) コロニー形態 (1週間), B) 分生子座, C) 分生子, D) フィアライドと未成熟分生子 (白矢印)

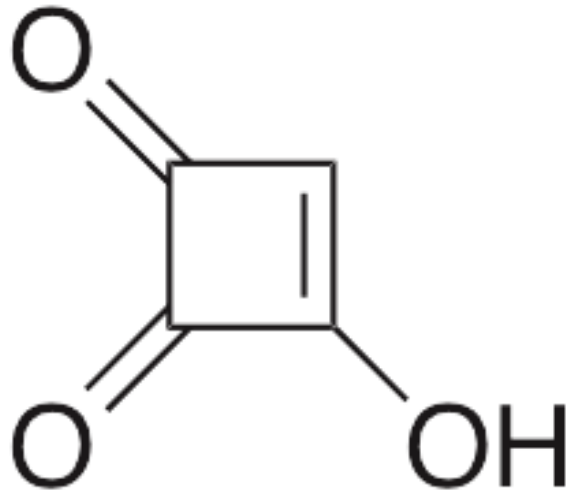


図2 モニリフォルミン(MON)化学構造式

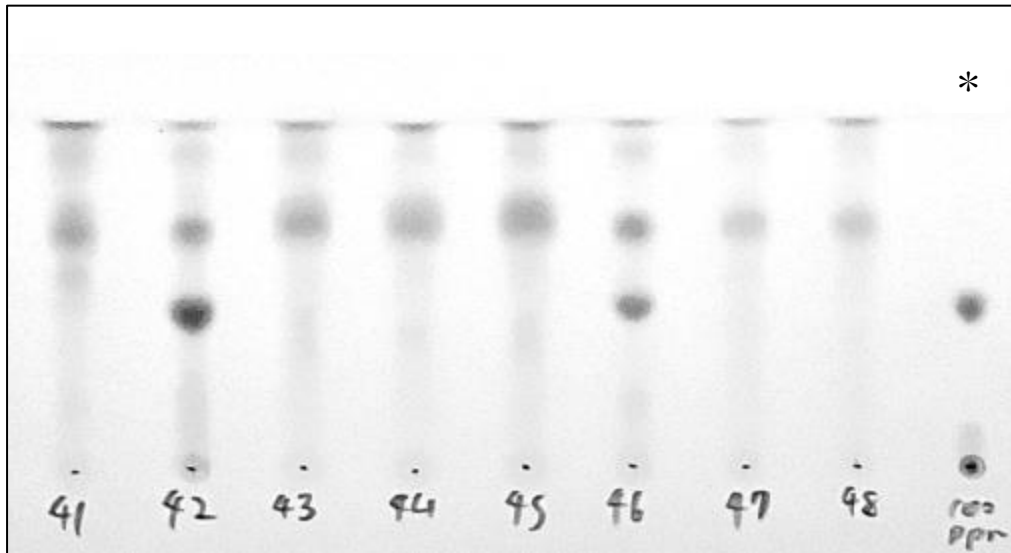


図3 256 nm 下での TLC 展開図の例

*:陽性対象は 100 mg/L 濃度の MON を展開

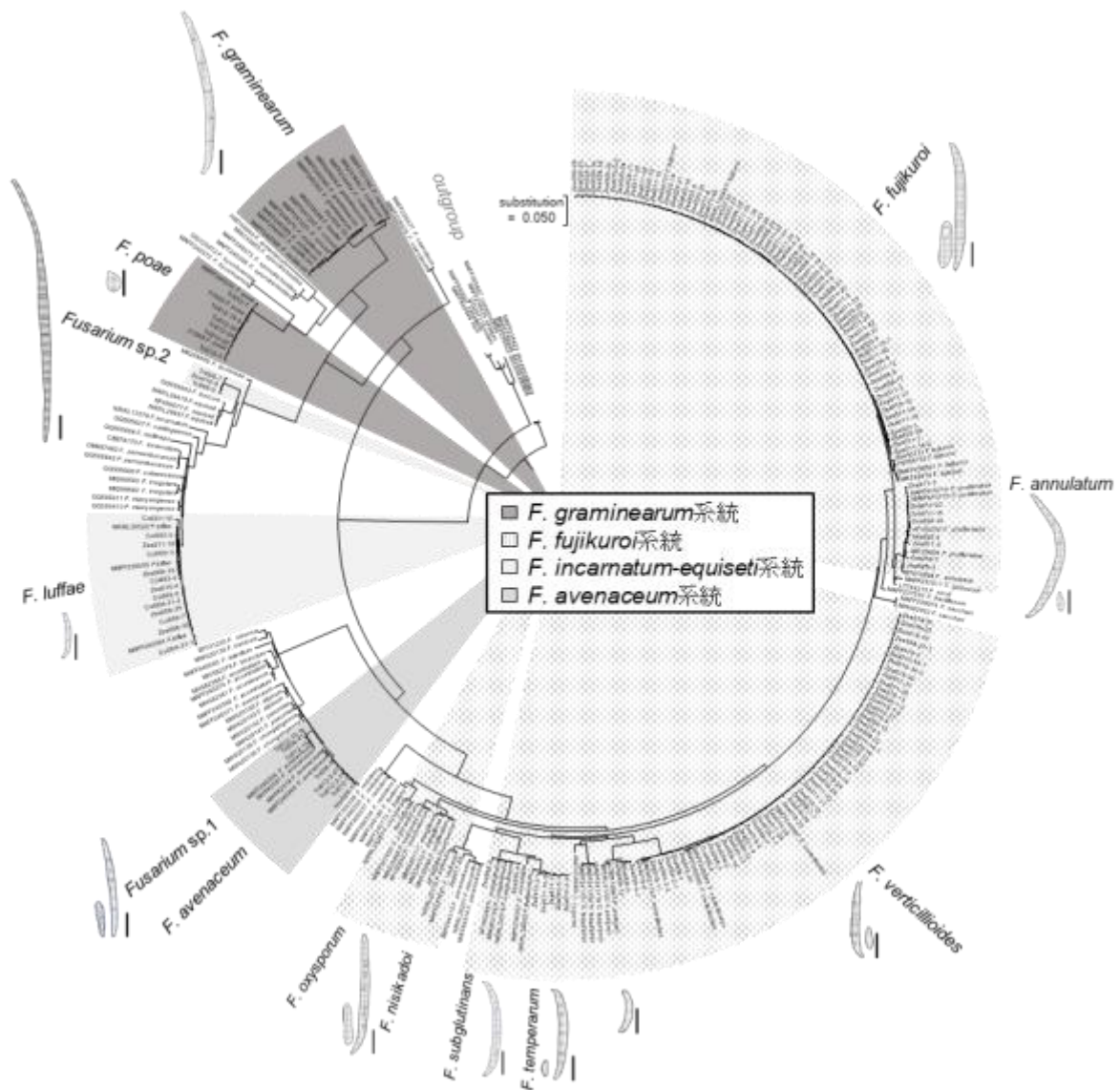


図4 *EF-1α* 遺伝子の塩基配列に基づいた *Fusarium* 属菌の最尤系統樹

本研究で識別された系統は灰背景で表示。各系統の大孢子および小孢子形態の線画に示したスケールバーは全て 10 μm の長さを示す。

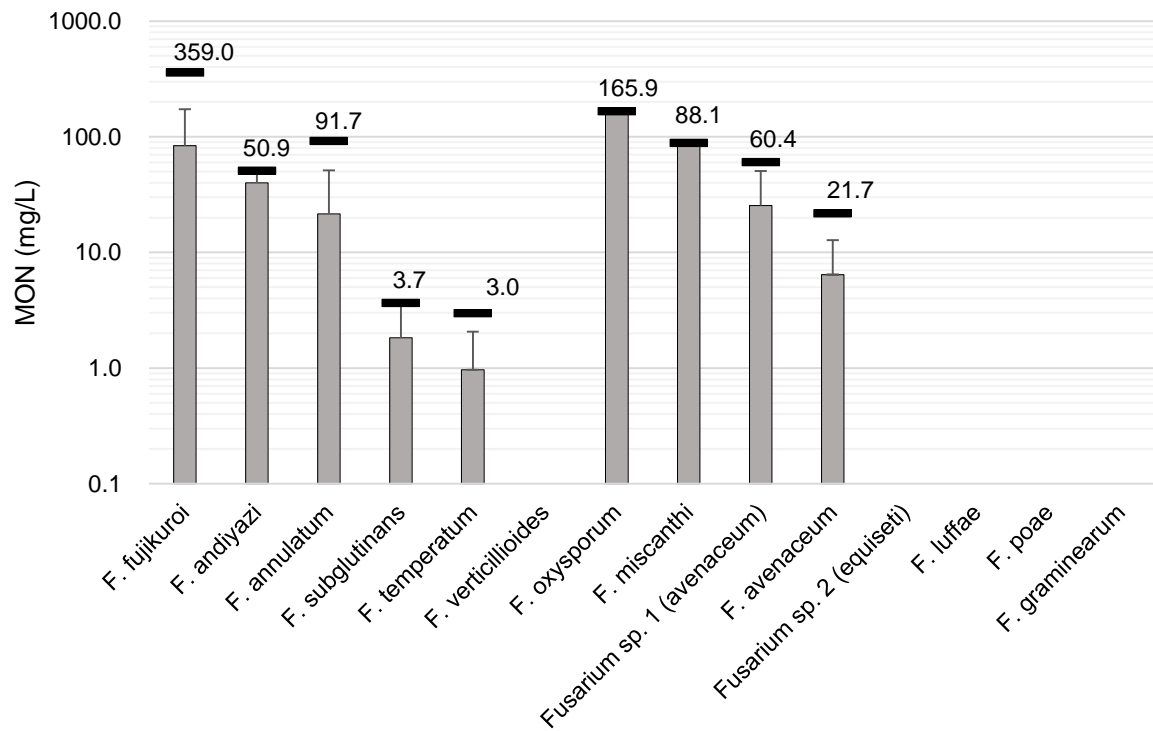


図5 本研究で分離された *Fusarium* 属菌株の MON 産生量の比較

縦軸は対数表示である。縦棒は平均値を示し、横棒と数字は最大値を示す。T 字のバーは標準偏差を示す。検出下限値は 0.1 mg/L。

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, Sugita -Konishi Y, Sato E, Takeuchi H, Tanig uchi M, Fukumitsu T, Shimoyama A, Nakamura A, Mura yama S, Owaki S, Miyake S, Hara-Kur do Y.	Survey and risk asse ssment of aflatoxins and sterigmatocystin in Japanese staple fo od items and the eva luation of an in-hous e ELISA technique fo r rapid screening.	Food Control	157	110154	2024
Ojiro R, Okano H, Ozawa S, Yamagat a H, Zou X, Tang Q, Jin M, Sasaki K, Yoshida T, Yosh inari, T, Shibutani M.	Pharmacokinetics and 28-day repeated-dose toxicity of enniatin B after oral administ ration in mice.	Food Chem. T oxicol.	177	113814	2023

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 本間 正充

次の職員の令和5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。

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（元号） 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 令和5年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
2. 研究課題名 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 （針の名称：東京農工大学動物実験等に関する規程 /（株）ボゾリサーチセンター動物実験に係る指針）	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東京農工大学 受託機関 （株）ボゾリサーチセンター	<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"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容： ）

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

令和6年4月8日

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 (ハツトリ 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 本間 正充

次の職員の令和5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。