

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

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6年度 総括研究報告書

研究代表者 吉成 知也

令和7(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
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 -----	33
服部 一夫	
3. 小麦における OTA 汚染原因菌の究明 -----	43
渡辺 麻衣子	
4. 毒性試験（マウスにおけるモニリフォルミンの腎毒性機序解明試験） -----	61
渋谷 淳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	70

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

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んだ。一つ目のテーマは、基準値設定に係るカビ毒に関する研究で、「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」、「簡易測定キットの性能評価」及び「小麦における OTA 汚染原因菌の究明」を実施した。一昨年と昨年度に開発し、妥当性の評価を行った小麦中の DON と OTA の同時分析法について、単独の分析法との性能を比較するために、人工共汚染試料を用いた検討を行った。その結果、同時分析法で得られた分析値は、DON を公定法で、OTA を実態調査で用いられた分析法でそれぞれ分析して得られた分析値と同等であった。この結果より、開発した同時分析法は、単独の分析法の代替法として使用できることが示された。また、市販の ELISA キットとイムノクロマトキットそれぞれ 2 種について、OTA 人工汚染小麦及び大麦中の OTA 濃度を測定した値と、HPLC を用いた機器分析による測定値とを比較し、それらキットの性能を評価した。その結果、いずれのキットも OTA のスクリーニングに使用可能であることが示された。さらに、小麦における OTA 汚染原因菌の究明を行い、*Penicillium verrucosum* だけでなく、*Aspergillus westerdijkiae* も貯蔵中の小麦の OTA 汚染原因菌として留意する必要があることが明らかとなった。

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。一昨年と昨年度に開発した分析法を用いて、合計 399 検体の穀物加工品を対象とした汚染調査を実施した。その結果、MON は麦やトウモロコシ加工品から検出された。小麦は日本人の主食の一つであるため、小麦加工品が日本人の主要な MON のばく露源と考えられた。さらに、MON による腎毒性の発現機序を検討することを目的として、MON 単回投与後の腎臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析を実施した。その結果、MON はマウスの腎臓を標的とし、経口摂取された MON は、腎臓で代謝され、活性中間体や活性酸素種が腎尿細管毒性を誘発し、近位尿細管壊死を引き起こす可能性が示唆された。

A. 研究目的

カビ毒は、カビが感染した農作物中に産生され、カビ毒に汚染された食品の摂取により急性的な中毒症状や慢性的な摂取によるがんの発症などが引き起こされる。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。さらに、小麦における OTA 汚染原因菌を究明するために、*Penicillium* 及び *Aspergillus* 属菌を接種した小麦における OTA 汚染動態を調べる。

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 の汚染実態調査、及びマウスにおける腎毒性の発現機構の解析を行う。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に関する研究

①DON と OTA の同時分析法の開発

小麦粒 300 g にアセトニトリル 300 mL と、DON と OTA の標準品を加え、よく混合後、アセトニトリルをエバポレーターで除去した。一晚ドラフト内で静置後に粉砕機で破砕し、均一化処理したものを DON と OTA の人工共汚染試料とした。DON は 50~2,000 µg/kg、OTA は 0.5~25 µg/kg の濃度範囲で、計 22 検体調製した。それぞれの検体 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 (MFC : 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 µL に精製水 500 µL 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。

②OTA の簡易分析法の検討

研究代表者が調製した OTA 人工汚染小麦 16 検体及び人工汚染大麦 16 検体を用いて、ELISA キット 2 種とイムノクロマトキット 2 種の性能評価を実施した。

③小麦における OTA 汚染原因菌の究明

OTA 産生性が確認された *P. verrucosum* NBRC 30181 及び *A. westerdijkiae* NIHS 3985 を用いて、以下の 4 条件で小麦における OTA 産生性確認試験を行った。

- a) 100 mL 容三角フラスコに入れ、オートクレーブ滅菌後乾燥した小麦玄麦粒 5 g に対して、滅菌 DW 0.5 mL (加水率 10%)、1.0 mL (加水率 20%)、1.5 mL (加水率 30%)、2.0 mL (加水率 40%) または 2.5 mL (加水率 50%) を加えて吸水させた。ここに濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、25°C で 2 週間培養した。各加水率×各菌株の培養条件につき 1 回の実験を行った。
- b) 加水率による OTA 産生量変化の再現性を確認するため、*Penicillium* 属菌株のみ接種し実験を行った。加水率 10%、30% または 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、25°C で 2 週間培養した。各加水率につき 3 回の繰り返し実験を行った。
- c) 加水率 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、4°C、15°C または 25°C で 2 週間培養した。各培養温度×各菌株の培養条件につき 3 回の繰り返し実験を行った。
- d) 加水率 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、15°C で 2 または 4 週間培養した。各培養期間×各菌株の培養条件につき 3 回の繰り返し実験を行った。また培養期間 1 週間ごとに、小麦上の菌糸の発達度を画像記録するため写真撮影を行った。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

①国内流通穀類加工品を対象とした汚染調査

小売店から穀類加工品 6 種計 399 検体を収集

し、それぞれ破碎した。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抽出を行った。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 (1410 g、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 (Bond Elut LRC SAX 500 mg : Agilent 社製) 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 (pH 7.0) 1.5 mL で溶出したものを試験溶液とした。HPLC により、試験溶液中の MON を定量した。

②マウスを用いた MON の腎毒性機序の解明

5 週齢の雄マウスを試験に用いた。群構成は溶媒対照群 (6 匹) 及び MON 40 mg/kg-投与群 (12 匹) の 2 群構成とした。溶媒は Milli-Q 水を用いた。実験期間中は一般状態の観察を行い、投与から 6 時間後に各群 6 匹を剖検し、腎臓を採材して重量を測定した後、半割して一方を組織学的検査に、もう一方を遺伝子発現解析に供した。

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

アセトニトリルに浸した小麦粒に、DON の標準品を終濃度 50～2,000 $\mu\text{g/kg}$ 、OTA の標準品を終濃度 0.5～25 $\mu\text{g/kg}$ となるよう添加した。溶媒を除去後、粉碎したものを共汚染試料とした。計 22 種の試料それぞれについて、DON を MFC、OTA をイムノアフィニティーカラム (IAC) で精製し、それぞれ LC-MS/MS で定量した。次に、一昨年と昨年度に開発した 2 種の DON と OTA の同時分析法を用いて各試料を分析した。各試料 2 検体ずつ分析し、平均を分析値とした。DON について、単独分析法 (公定法) で得られた測定値に対する同時分析法の測定値の割合は、IAC 精製で 93～120%、MFC 精製で 87～105% となった。OTA については、単独分析法 (公定法) で得られた測定値に対する同時分析法の測定値の割合は、IAC 精製で 45～91%、MFC 精製で 87～99% となった。

②OTA の簡易分析法の検討

2 種の ELISA キットによる人工汚染小麦及び大麦の分析値と機器分析による測定値の相関係数は、0.9614～0.9978 の範囲内であった。一方、2 種のイムノクロマトキットによる人工汚染小麦の分析値と機器分析による測定値の相関係数は、0.9659～0.9873 の範囲内であった。

③小麦における OTA 汚染原因菌の究明

培養条件 (3) -a) の結果では、*P. verrucosum* 株を接種した小麦では、加水率が高くなるにつれて OTA 含有量も上昇し、加水率 50% で最大濃度 3,122 $\mu\text{g/kg}$ を示した。*A. westerdijkiae* 株を接種した小麦では、加水率 40% で OTA 含有量の最大値を示し、21,691 $\mu\text{g/kg}$ であった。また、加水率 10% の小麦においては *P. verrucosum* 株または *A. westerdijkiae* 株のどちらを接種した場合にも OTA が検出された (149 $\mu\text{g/kg}$ または 162 $\mu\text{g/kg}$)。培養条件 (3) -b) で 3 回繰り返し実験を行った結果は、加水率 10%、30% 及び 50% での培養後の OTA 平均濃度はそれぞれ 9 $\mu\text{g/kg}$ 、2,521

$\mu\text{g/kg}$ 及び 3,801 $\mu\text{g/kg}$ となった。培養条件 (3) -c) の結果では、加水率 50% の条件下では、両菌株で小麦中の OTA 含有量は 25°C 培養時に最大値を示し、平均濃度はそれぞれ 8,548 $\mu\text{g/kg}$ 及び 57,482 $\mu\text{g/kg}$ 、最大濃度はそれぞれ 10,150 $\mu\text{g/kg}$ 及び 109,871 $\mu\text{g/kg}$ であった。15°C の培養時でも、*P. verrucosum* 株では最大 895 $\mu\text{g/kg}$ の濃度で、*A. westerdijkiae* 株では最大 38 $\mu\text{g/kg}$ で、OTA 産生性が確認された。培養温度 4°C では、いずれの菌株でも OTA 産生は確認されなかった。培養条件 (3) -d) では、培養温度 15°C 加水率 50% の条件下では、接種したいずれの菌株でも小麦中の OTA 含有量は 2 週間培養後に比べて 4 週間後のほうが高く、培養 4 週間後の小麦中 OTA 濃度は、*P. verrucosum* 株では平均 2,202 $\mu\text{g/kg}$ 及び最大 2,371 $\mu\text{g/kg}$ 、*A. westerdijkiae* 株では平均 7,558 $\mu\text{g/kg}$ 及び最大 12,791 $\mu\text{g/kg}$ であり、条件 (3) -c) で培養した実験区の結果と比べると、培養期間を 4 週間に延長すれば、15°C でも、特に *A. westerdijkiae* 株で比較的高い OTA 産生性を示すようになることが確認された。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

①国内流通穀類加工品を対象とした汚染調査

昨年度までに開発した分析法を用いて、日本に流通する穀類加工品 6 種計 399 検体における MON の汚染実態を調べた。全 399 検体のうち、145 検体 (36%) から定量限界値 (10 $\mu\text{g/kg}$) 以上の MON が検出された。そのうち、10～100 $\mu\text{g/kg}$ の濃度範囲に含まれる検体が最も多かった (92 検体)。1,000 $\mu\text{g/kg}$ を超えて MON が検出された検体数は 11 (3%) であった。最も陽性率が高かったのは、ハト麦加工品の 73% であり、次いでトウモロコシ加工品の 61%、ライ麦の 39%、小麦粉 (国産) の 37%、大麦の 23% であった。小麦粉 (輸入) と米における陽性率はそれぞれ 4% と 0% で、他の穀類加工品より低かった。

②マウスを用いた MON の腎毒性機序の解明

RNA-Seq 解析の結果においては、MON 投与群では、溶媒対照群と比較して、397 遺伝子の発現が増加し、321 遺伝子の発現が減少した。遺伝子オントロジーに基づく機能アノテーション解析により、MON を 40 mg/kg 体重で単回経口投与した 6 時間後に発現が有意に増加した遺伝子は、多くの機能グループを形成していることが明らかになった。免疫組織化学的解析の結果においては、MON 投与群で認められた壊死尿細管において IV 型 collagen 陽性を示す基底膜が観察された。

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 2 種の同時分析法について、多機関共同試験を一昨年と昨年度に実施し、妥当性を確認した。これら同時分析法が、DON の公定法や OTA の汚染調査で用いられた分析法と同等の性能を有するかを確認するために、人工汚染試料を用いて単独の分析法と同様の分析値が得られるかどうかを確認した。単独の分析法と同時分析法の分析値を比較した結果、DON については、公定法による分析値と 2 種の同時分析法による分析値は同等であった。一方で、OTA については、汚染実態調査で使用された IAC を用いた単独の分析法と MFC を用いた同時分析法による分析値は同等であったが、IAC を用いた同時分析法の分析値は、全体的に低い値となった。この結果から、昨年度に開発した MFC を用いた同時分析法のみが、単独の分析法と同等の分析値が得られることが明らかとなり、代替法として使用できることが示された。

OTA の簡易分析法については、人工汚染試料を用いた検討を実施した。その結果、ELISA キット 2 種及びイムノクロマトキット 2 種は、機

器分析の測定値と良好な相関係数を示した。このことから、これらキットはスクリーニングに用いる迅速簡便キットとして使用可能であると考えられた。

OTA 産生性を有する 2 種の菌株をそれぞれ接種・培養後の小麦において、2 週間培養後では *P. verrucosum* NBRC 30181 は *A. westerdijkiae* NIHS 3985 よりも OTA を多く産生したが、4 週間培養後には、*A. westerdijkiae* NIHS 3985 を接種した小麦の方が OTA 含有量は高くなった。このことから、15℃という室温より低い条件下でも、*A. westerdijkiae* は、小麦の保管期間が 4 週間以上と長期にわたった場合には、小麦における主要な OTA 汚染原因菌として知られる *P. verrucosum* と同程度の OTA 汚染原因菌となり得る可能性が示唆された。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

一昨年と昨年度に開発した分析法を用いて、日本国内に流通する穀類加工品を対象とした汚染実態調査を実施した結果、麦類やトウモロコシの加工品から MON が検出された。1 mg/kg を超えて検出される検体も散見されており、MON は、DON やフモニシンと同程度の汚染が生じているカビ毒であることが明らかとなった。小麦粉（輸入）における MON の汚染レベルは、小麦粉（国産）と比較すると非常に低かった。日本は小麦の多くを輸入に頼っていることから、MON の小麦製品からの摂取量は多くないと考えられる。また、分担研究者によって実施された、マウスにおける毒性試験の結果、MON の NOAEL は 10 mg/kg 体重/日とされた。この値より一日耐用摂取量（TDI）を 100 µg/kg 体重/日（安全係数 100）とすると、その値を超えるためには高濃度の MON に汚染された食品を一日あたり数 kg 摂取する必要がある。よって、MON については、汚染された穀類加工品が日本国内に流通しているが、それを摂取すること

によって直ちに健康被害が生じる可能性は低いと考えられた。

また、昨年度までに見出した MON の腎毒性について、40 mg/kg 体重の MON 単回投与後の遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析によってその発現機序を検討した。免疫組織化学的解析の結果、壊死した尿細管における尿細管再生に不可欠な IV 型 collagen の基底膜の免疫反応性は、MON の単回投与後も保持されていた。この再生能力の主要な決定因子は、尿細管基底膜の維持であり、これは低灌流由来の虚血性傷害後よりも、毒性由来の傷害後の方で保持され易いことが知られている。これらの所見から、マウスに MON を反復投与した後の近位尿細管再生は、代謝活性化により誘発された MON 毒性により、反復投与初期に急性尿細管壊死が生じた後遺症である可能性が示唆された。

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

一昨年と昨年度に開発し、妥当性の評価を行った小麦中の DON と OTA の同時分析法について、単独の分析法との性能を比較するために、人工共汚染小麦を用いた検討を行った。多機能カラムを用いた同時分析法で得られた分析値は、DON を公定法で、OTA を実態調査で用いられた分析法でそれぞれ分析して得られた分析値と同等であった。この結果より、開発した同時分析法は、単独の分析法の代替法として使用できることが示された。

また、国内で販売されている OTA 測定用の迅速簡便測定法キットを入手し、小麦及び大麦中の OTA のスクリーニングに適用可能か調べた。初年度ならびに次年度で得られた成果をもとに、ELISA キット 2 種、イムノクロマトキット 2 種を選び、OTA 人工汚染小麦及び大麦中の OTA

濃度を測定した値と、HPLC を用いた機器分析による測定値と比較し、それらキットの性能を評価した。その結果、ELISA キット 2 種、イムノクロマトキット 2 種とも良好な相関係数を示した。これらの結果から、最終年度の検討に用いたキットは、どのキットも OTA の迅速簡便なスクリーニングに使用可能であると考えられた。

さらに、小麦における OTA 汚染原因菌についての解析の結果、室温より低温の 15℃においても、小麦への加水量が多く、4 週間培養した結果、*A. westerdijkiae* も *P. verrucosum* と同程度以上の OTA 産生性を示すことを確認した。このことから、*A. westerdijkiae* に汚染された小麦がある程度の水分を含有した状態で長期保存された場合、室温より低温の貯蔵環境下でも *A. westerdijkiae* による高度な OTA 汚染が発生する可能性がある。貯蔵中の小麦の OTA 汚染原因菌として、*P. verrucosum* だけでなく *A. westerdijkiae* にも留意する必要があることが示された。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

一昨年と昨年度に開発した分析法を用いて、合計 399 検体の穀物加工品を対象とした汚染調査を実施した。MON は、小麦粉（国産）、ハト麦加工品、ライ麦、トウモロコシ加工品から主に検出された。1 mg/kg 以上の MON を含む検体は 11 検体認められた。小麦は日本人の主食の一つであるため、小麦加工品が日本人の主要な MON のばく露源と考えられる。しかし、輸入された小麦から製造された小麦粉における MON の汚染レベルは、他の穀類と比較して非常に低かった。MON の毒性も考慮に入れると、MON は日本人の健康に直ちに影響を与えるカビ毒ではないと考えられた。

また、MON による腎毒性の発現機序を検討することを目的として、MON 単回投与後の腎臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析を実施した。その結果、MON はマウスの腎

臓を標的とし、経口摂取された MON は腎臓で代謝され、活性中間体や活性酸素種が腎尿細管毒性を誘発し、近位尿細管壊死を引き起こす可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究業績

【論文発表】

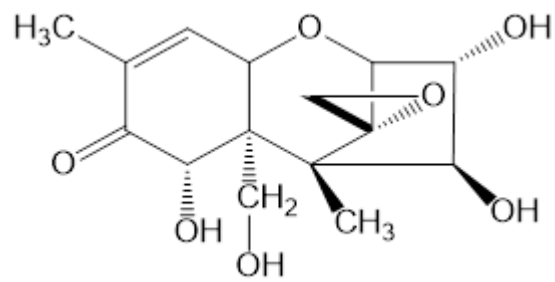
1. Ojio R, Zou X, Yamagata H, Ebizuka Y, Kobayashi M, Kigata T, Tang Q, Yoshida T, Yoshinari T, Shibutani M.: Emerging mycotoxin moniliformin induces renal tubular necrosis after oral exposure in mice. Food Chem. Toxicol. 2025:199:115336.

【学会発表】

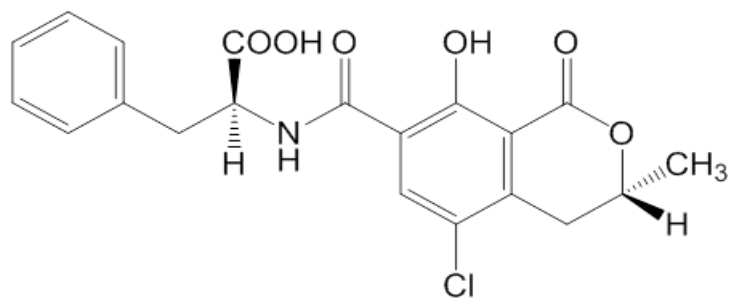
1. 日本マイコトキシン学会 50 周年記念第 91 回学術講演会、開催日：2024 年 8 月 26～27 日、開催場所：栃木県・ライトキューブ宇都宮、概要：小麦中のデオキシニバレノールとオクラトキシン A の一斉分析法の開発について、研究代表者 吉成知也が口頭発表を行った。
2. 第 45 回日本食品微生物学会学術総会、開催日：2024 年 9 月 5～6 日、開催場所：青森県・青森市文化会館、概要：新興カビ毒モニリフォルミン汚染穀物中の原因菌探索について、研究分担者 渡辺麻衣子が口頭発表を行った。
3. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms "Approaches for risk analysis and food safety" in 56th UJNR、開催日：2024 年 9 月 16～17 日、開催場所：東京都・星陵会館、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、研究分担者 渡辺麻衣子が口頭発表を行った。

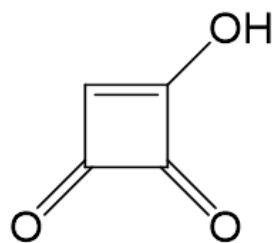
4. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms "Approaches for risk analysis and food safety" in 56th UJNR、開催日：2024 年 9 月 16～17 日、開催場所：東京都・星陵会館、概要：新興カビ毒の分析法の開発と汚染実態について、研究代表者 吉成知也が口頭発表を行った。
5. The 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS2024)、開催日：2024 年 10 月 23～25 日、開催場所：イタリア・Palazzo dei Congressi、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、研究分担者 渡辺麻衣子がポスター発表を行った。
6. 第 120 回日本食品衛生学会学術講演会、開催日：2024 年 11 月 7～8 日、開催場所：中部大学、概要：デオキシニバレノールの産生に対するキチン生合成阻害剤ポリオキシンの影響について、研究代表者 吉成知也が口頭発表を行った。
7. 第 120 回日本食品衛生学会学術講演会、開催日：2024 年 11 月 7～8 日、開催場所：中部大学、概要：国内流通穀類におけるモニリフォルミンの汚染実態調査の結果について、研究協力者 青木渉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

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

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又は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。それら分析法により、DON の公定法及び汚染調査で用いられた OTA の分析法でそれぞれのカビ毒を単独に分析する場合と同等の分析値が得られるかを検証するために、DON と OTA の人工共汚染小麦を調製し、分析値を比較した。その結果、イムノアフィニティーカラムを精製に用いる同時分析法については、OTA の分析値が単独で分析した場合より低い値となった。一方で、多機能カラムを精製に用いる同時分析法については、DON と OTA とともに単独で分析する場合と同等の分析値が得られた。この結果より、本事業にて開発した小麦中の DON と OTA の同時分析法は、それぞれのカビ毒を単独で分析する方法の代替法として用いることができると考えられた。

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ある。2017 年に公表された欧州食品安全機関 (EFSA) によるリスク評価の結果において、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。穀類加工品 6 種計 399 検体における MON の汚染実態を調べた結果、145 検体 (36%) から定量限界値 (10 µg/kg) 以上の MON が検出された。麦類やトウモロコシの加工品から主に検出され、1 mg/kg を超えて検出される検体も散見されたことから、MON は DON やフモニシンと同程度の汚染が生じているカビ毒であることが明らかとなった。ただ、小麦粉 (輸入) における MON の汚染レベルは、他の穀類と比較して非常に低かったことから、日本人における MON のばく露量は高くないと考えられた。

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

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。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 (MFC) 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り。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 (IAC) 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、IAC、2023 年度には、MFC 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、その妥当性を確認した。今年度は汚染検体を用いて、DON 又は OTA を公定法またはその候補により単独で分析した際

の分析値と同時分析法の分析値を比較し、代用法としての可能性を検証することとした。

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²⁾。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、2023年度には、単一試験室による分析法の妥当性評価を実施した。本年度は、その分析法を用いて流通食品の汚染実態調査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

①DON と OTA の人工共汚染試料の調製

小麦粒 300 g にアセトニトリル 300 mL と、DON と OTA の標準品を加え、よく混合後、アセトニトリルをエバポレーターで除去した。一晚ドラフト内で静置後に粉砕機で破碎し、均一化処理したものをDONとOTAの人工共汚染試料とした。DONは50～2,000 µg/kg、OTAは0.5～25 µg/kgの濃度範囲で、計22検体調製した。

②IACを用いたDONとOTAの同時精製法

人工共汚染試料10 gに抽出溶媒アセトニトリル：メタノール：水(25：25：50) 80 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。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。IAC(MaxSignal IAC 4-in-1 アフラトキシン B₁/ZEN/DON/OTA Combo：PerkinElmer社製)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(98：2) 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(98：2) 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。

③MFCを用いたDONとOTAの同時精製法

人工共汚染試料10 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) 50.0 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、MFC(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、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。

④DON の単独分析法

人工汚染試料 10 g にアセトニトリル：水（85：15）40 mL を加え、30 分間往復振盪抽出をした。振盪後の試料と抽出溶媒の混合物の一部を 50 mL 容遠心チューブに移して、遠心分離（1,710 g×5 分）をした。上清 10 mL を MFC（Autoprep MF-T 1500：レゾナック社製）に添加した。最初に溶出する 3 mL を捨て、続く 2.4 mL の溶出液を回収した。溶出液 2 mL を窒素気流により乾固し、0.5 mL のアセトニトリル：水（1：9）に溶解し、試験溶液とした。

⑤OTA の単独分析法

人工汚染試料 10 g にアセトニトリル：水（60：40）40 mL 加え、30 分間往復振盪抽出をした。振盪後の試料と抽出溶媒の混合物の一部を 50 mL 容遠心チューブに移して、遠心分離（1,710 g×5 分）をした。上清 10 mL と PBS 10 mL を混合し、ガラス繊維ろ紙でろ過して得られたろ液 8.0 mL を IAC（OCHRAKING：堀場製作所社製）に注入した。PBS 10 mL と精製水 10 mL でカラムを洗浄した。カラム内の水分をアダプターを取り付けたシリンジで除去した後、メタノール：酢酸（98：2）3 mL で OTA を溶出させた。溶出液を窒素気流で乾固し、残さをアセトニトリル：水：酢酸（30：70：1）0.5 mL で溶解した。1.5 mL 容マイクロチューブに移し、12,000 g で 5 分間遠心したものを試験溶液とした。

⑥LC-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：

PuriTox Total Myco-MS による精製の場合

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 μL

MaxSignal IAC 4-in-1、Autoprep MF-T、OCHRAKING による精製の場合

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）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（1410 g、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（Bond Elut LRC SAX

500 mg : Agilent 社製) を用いた。メタノール 2 mL、水 2mL 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 (pH 7.0) 1.5 mL で溶出したものを試験溶液とした。

<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 の同時分析法の開発

アセトニトリルに浸した小麦粒に、DON の標準品を終濃度 50~2,000 µg/kg、OTA の標準品を終濃度 0.5~25 µg/kg となるよう添加した。溶媒を除去後、粉碎したものを共汚染試料とした。計 22 種の試料それぞれについて、DON を MFC、OTA を IAC で精製し、それぞれ LC-MS/MS で定量した。図 1 に、定量値を散布図として示した。次に、一昨年と昨年度に開発した 2 種の DON と OTA の同時分析法を用いて各試料を分析した。各試料 2 検体ずつ分析し、平均を分析値とした。結果を表 1 に示した。DON について、単独分析法 (公定法) で得られた測

定値に対する同時分析法の測定値の割合は、IAC 精製で 93~120%、MFC 精製で 87~105% となった。OTA については、単独分析法 (公定法) で得られた測定値に対する同時分析法の測定値の割合は、IAC 精製で 45~91%、MFC 精製で 87~99% となった。各試料における測定値を濃度の低い順に並べた結果を図 2 に示した。

(2) MON の汚染実態調査

昨年度までに開発した分析法を用いて、日本に流通する穀類加工品 6 種計 399 検体における MON の汚染実態を調べた。分析結果を表 2 に、各検体の MON 濃度の測定値を表 3~8 に示した。全 399 検体のうち、145 検体 (36%) から定量限界値 (10 µg/kg) 以上の MON が検出された。そのうち、10~100 µg/kg の濃度範囲に含まれる検体が最も多かった (92 検体)。1,000 µg/kg を超えて MON が検出された検体数は 11 (3%) であった。最も陽性率が高かったのは、ハト麦加工品の 73%であり、次いでトウモロコシ加工品の 61%、ライ麦の 39%、小麦粉 (国産) の 37%、大麦の 23%であった。小麦粉 (輸入) と米における陽性率はそれぞれ 4%と 0%で、他の穀類加工品より低かった。ハト麦加工品及びトウモロコシ加工品において比較的高い濃度の MON が検出される傾向にあり、100~500 µg/kg の濃度範囲の MON が検出された検体の割合はそれぞれ 24%及び 22%で、1000 µg/kg を超える検体の割合はいずれも 5%であった。平均濃度については、ライ麦の 209 µg/kg が最も高く、次いでトウモロコシ加工品の 198 µg/kg、ハト麦加工品の 182 µg/kg であった。最高濃度はハト麦加工品における 3,109 µg/kg であった。小麦粉においては、国産麦由来のものと輸入麦由来のもので大きく差が認められた。平均濃度は、小麦粉 (国産) で 36 µg/kg であったのに対し、小麦粉 (輸入) では 1 µg/kg であった。

D. 考察

(1) DON と OTA の同時分析法の開発

小麦中の DON と OTA の 2 種の同時分析法について、多機関共同試験を一昨年と昨年度に実施し、妥当性を確認した。これら同時分析法が、DON の公定法や OTA の汚染調査で用いられた分析法と同等の性能を有するかを確認するために、汚染試料を用いて単独の分析法と同様の分析値が得られるかどうかを確認することとした。日本に流通する小麦粉製品から OTA に汚染された検体の入手は困難であったため、小麦粒から汚染検体を調製した。DON については基準値 1.0 mg/kg、OTA については予定されている基準値 5.0 µg/kg を中心とした濃度となるよう汚染試料を設計した。これら DON と OTA の人工汚染試料について、単独の分析法と同時分析法の分析値を比較した結果、DON については、公定法による分析値と 2 種の同時分析法による分析値は同等であった。一方で、OTA については、汚染実態調査で使用されたイムノアフィニティーカラムを用いた単独の分析法と多機能カラムを用いた同時分析法による分析値は同等であったが、イムノアフィニティーカラムを用いた同時分析法の分析値は、全体的に低い値となった。一昨年に、標準品の添加試料を用いた添加回収試験を実施した際には、イムノアフィニティーカラムを用いた同時分析法の回収率に問題は認められなかった。添加試料と汚染試料では、カビ毒の抽出効率に差がある可能性があり、イムノアフィニティーカラムを用いた同時分析法で用いる抽出溶媒は、汚染試料からの OTA の抽出には適していないと考えられた。この結果から、昨年度に開発した多機能カラムを用いた同時分析法のみが、単独の分析法と同等の分析値が得られることが明らかとなり、代替法として使用できることが示された。

(2) MON の汚染実態調査

一昨年と昨年度に開発した分析法を用いて、日本国内に流通する穀類加工品を対象とした汚染実態調査を実施した結果、麦類やトウモロコシの加工品から MON が検出された。1 mg/kg を超えて検出される検体も散見されており、MON は、DON やフモニシンと同程度の汚染が生じているカビ毒であることが明らかとなった。他の研究グループによる調査でも、小麦における MON 汚染が報告されている。例えば、2009～2011 年にノルウェーで実施された調査の結果、全ての小麦検体から MON が検出され、中央値は 88.4 µg/kg、最大値は 400 µg/kg であった³⁾。スウェーデンで 2009～2011 年に実施された別の調査では、春小麦 64 サンプルの MON の陽性率は 54.7%、最大濃度は 2,078 µg/kg で、冬小麦 61 サンプルの陽性率は 67.2%、最大濃度は 497 µg/kg であった⁴⁾。これらの結果は、我々の小麦粉（国産）の結果と類似している。一方で、小麦粉（輸入）における MON の汚染レベルは、小麦粉（国産）と比較すると非常に低かった。日本は小麦の多くを輸入に頼っていることから、MON の小麦製品からの摂取量は多くないと考えられる。また、分担研究者によって実施された、マウスにおける毒性試験の結果、MON の NOAEL は 10 mg/kg 体重/日とされた。この値より一日耐用摂取量(TDI)を 100 µg/kg 体重/日 (安全係数 100) とすると、その値を超えるためには高濃度の MON に汚染された食品を一日あたり数 kg 摂取する必要がある。よって、MON については、汚染された穀類加工品が日本国内に流通しているが、それを摂取することによって直ちに健康被害が生じる可能性は低いと考えられた。

E. 結論

一昨年と昨年度に開発し、妥当性の評価を行った小麦中の DON と OTA の同時分析法について、単独の分析法との性能を比較するために、

人工共汚染小麦を用いた検討を行った。多機能カラムを用いた同時分析法で得られた分析値は、DON を公定法で、OTA を実態調査で用いられた分析法でそれぞれ分析して得られた分析値と同等であった。この結果より、開発した同時分析法は、単独の分析法の代替法として使用できることが示された。

MON の研究については、一昨年と昨年度に開発した分析法を用いて、合計 399 検体の穀物加工品を対象とした汚染調査を実施した。MON は、小麦粉（国産）、ハト麦加工品、ライ麦、トウモロコシ加工品から主に検出された。1 mg/kg 以上の MON を含む検体は 11 検体認められた。小麦加工品は日本人の主食の一つであるため、小麦が日本人の主要な MON のばく露源と考えられる。しかし、輸入された小麦から製造された小麦粉における MON の汚染レベルは、他の穀類と比較して非常に低かった。MON の毒性も考慮に入れると、MON は日本人の健康に直ちに影響を与えるカビ毒ではないと考えられた。

correlation to specific *Fusarium* species.
Int J Food Microbiol. 2013;167(2):284–291.

F. 引用文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Uhlig S. et al. Faces of a changing climate: Semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway. Toxins. 2013;5(10):1682–1697.
- 4) Lindblad M et al. 2013. Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish wheat - Occurrence and

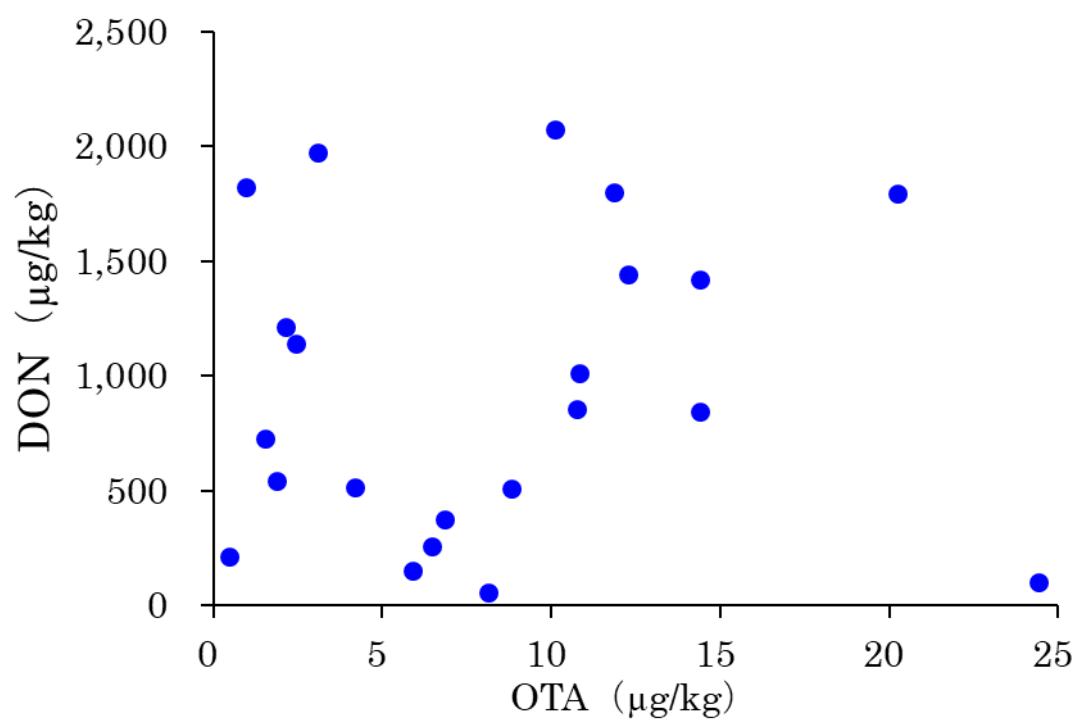


図1 人工共汚染小麦中のDONとOTAの濃度

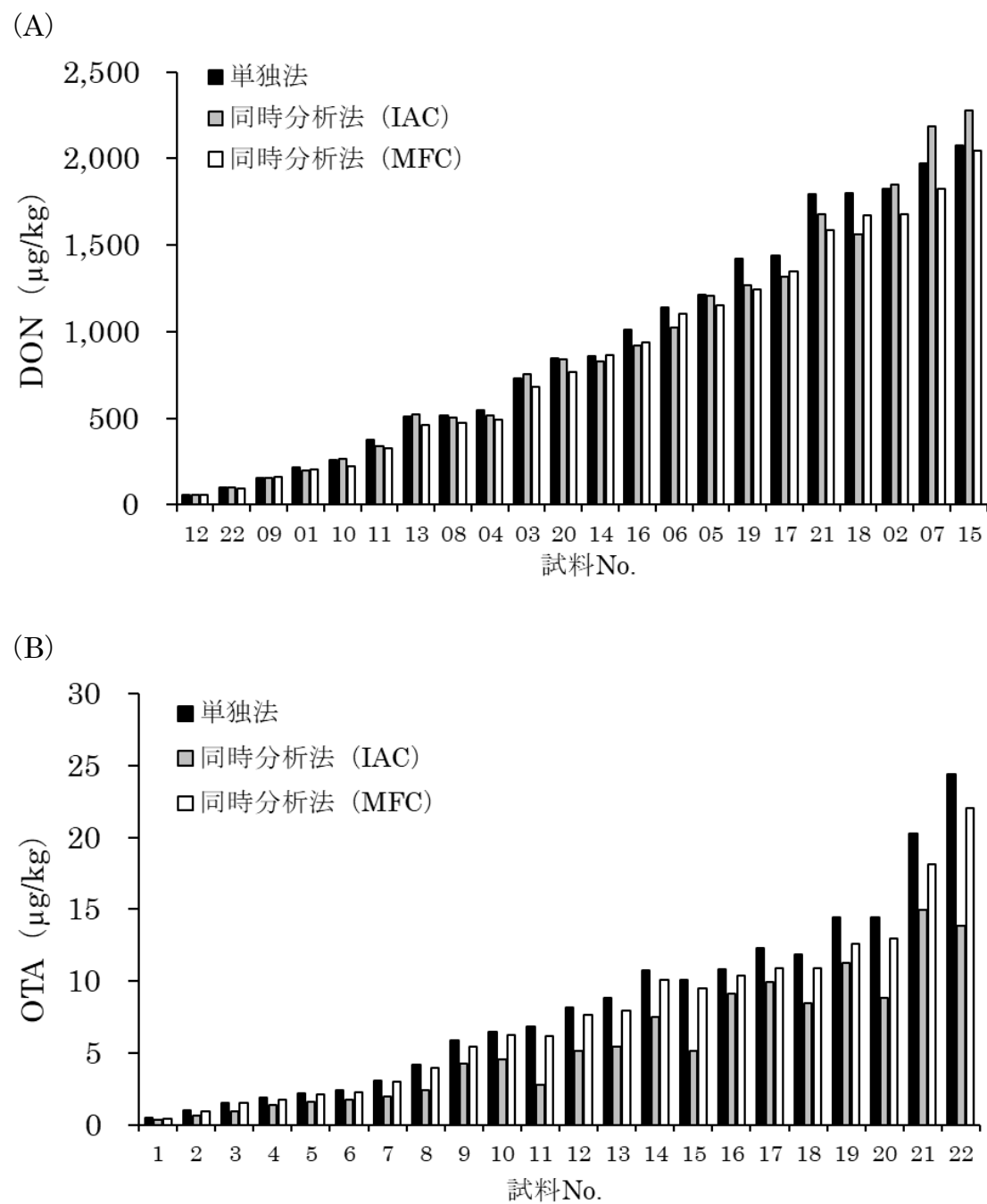


図2 単独法と同時分析法による人工共汚染小麦中の
(A) DON と (B) OTA の測定結果

表1 DON と OTA の人工汚染試料の分析結果

サンプルNo.	DON (μg/kg)			OTA (μg/kg)		
	単独分析法	同時分析法		単独分析法	同時分析法	
		IAC精製	MFC精製		IAC精製	MFC精製
01	216	196	200	0.5	0.3	0.4
02	1,824	1,849	1,679	1.0	0.6	0.9
03	728	756	683	1.5	0.9	1.5
04	544	518	490	1.9	1.4	1.7
05	1,212	1,204	1,151	2.2	1.6	2.1
06	1,139	1,021	1,100	2.4	1.7	2.3
07	1,973	2,188	1,827	3.1	1.9	3.0
08	513	506	471	4.2	2.4	4.0
09	153	157	161	5.9	4.2	5.5
10	258	264	224	6.5	4.6	6.2
11	377	341	325	6.8	2.8	6.2
12	58	56	57	8.1	5.2	7.7
13	509	522	462	8.8	5.4	7.9
14	859	830	866	10.8	7.5	10.1
15	2,075	2,274	2,046	10.1	5.1	9.5
16	1,014	920	937	10.8	9.1	10.4
17	1,441	1,314	1,346	12.3	9.9	10.9
18	1,801	1,563	1,673	11.9	8.4	10.9
19	1,420	1,267	1,245	14.4	11.3	12.6
20	848	838	768	14.4	8.8	12.9
21	1,795	1,678	1,586	20.3	14.9	18.1
22	102	96	91	24.4	13.9	22.0

表 2 MON の汚染実態調査の結果

分析対象	N	陽性検体	各濃度範囲 (μg/kg) に含まれる検体数 N (%)				平均値 (μg/kg)	最大値 (μg/kg)
			10-100	100-500	500-1,000	> 1,000		
小麦粉 (国産)	83	31 (37%)	25 (30%)	5 (6%)	0 (0%)	1 (1%)	36	1,218
小麦粉 (輸入)	91	4 (4%)	4 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1	46
大麦	26	6 (23%)	5 (19%)	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	25	473
ライ麦	41	16 (39%)	9 (22%)	2 (5%)	1 (2%)	4 (10%)	209	2,253
ハト麦加工品	86	63 (73%)	36 (42%)	21 (24%)	2 (2%)	4 (5%)	182	3,109
トウモロコシ 加工品	41	25 (61%)	13 (32%)	9 (22%)	1 (2%)	2 (5%)	198	2,370
米	31	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0	0
全体	399	145 (36%)	92 (23%)	38 (10%)	4 (1%)	11 (3%)	-	-

表3 MONの汚染レベル（小麦粉（国産））

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)	試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
33-JWF01	北海道	37	34-JWF11	北海道	20
33-JWF02	北海道	18	34-JWF12	岩手県	< 10
33-JWF03	北海道	< 10	34-JWF13	日本	< 10
33-JWF04	北海道	23	34-JWF14	日本	< 10
33-JWF05	北海道	98	34-JWF15	日本	24
33-JWF06	北海道	52	34-JWF16	北海道	< 10
33-JWF07	日本	< 10	34-JWF17	日本	< 10
33-JWF08	北海道	< 10	34-JWF18	北海道	< 10
33-JWF09	北海道	18	34-JWF19	北海道	19
33-JWF10	日本	19	34-JWF20	北海道	21
33-JWF11	日本	22	R5-Tri001	北海道	< 10
33-JWF12	日本	< 10	R5-Tri002	北海道	< 10
33-JWF13	岩手県	< 10	R5-Tri003	岩手県	< 10
33-JWF14	日本	35	R5-Tri004	石川県	< 10
33-JWF15	北海道	114	R5-Tri005	石川県	12
33-JWF16	滋賀県	< 10	R5-Tri006	北海道	390
33-JWF17	九州	< 10	R5-Tri007	北海道	168
33-JWF18	北海道	< 10	R5-Tri008	三重県	< 10
33-JWF19	北海道	198	R5-Tri009	青森県	< 10
33-JWF20	北海道	< 10	R5-Tri012	北海道	1218
34-JWF01	北海道	< 10	R5-Tri015	長野県	< 10
34-JWF02	北海道	< 10	R5-Tri016	長野県	< 10
34-JWF03	岩手県	< 10	R5-Tri018	青森県	< 10
34-JWF04	北海道	< 10	R5-Tri019	山梨県	< 10
34-JWF05	北海道	18	R5-Tri020	山梨県	< 10
34-JWF06	日本	< 10	R5-Tri021	北海道	64
34-JWF07	北海道	< 10	R5-Tri022	北海道	62
34-JWF08	日本	< 10	36-JWF01	北海道	< 10
34-JWF09	日本	< 10	36-JWF02	北海道	< 10
34-JWF10	北海道	< 10	36-JWF03	北海道	25

表 3 MON の汚染レベル（小麦粉（国産）） 続き

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
36-JWF04	北海道	< 10
36-JWF05	北海道	13
36-JWF06	長野県	< 10
36-JWF07	青森県	< 10
36-JWF08	青森県	< 10
36-JWF09	愛知県	38
36-JWF10	北海道	< 10
36-JWF11	熊本県	< 10
36-JWF12	北海道	39
36-JWF13	北海道	19
36-JWF14	鳥取県	< 10
36-JWF15	北海道	< 10
36-JWF16	和歌山県	< 10
36-JWF17	青森県	< 10
36-JWF18	北海道	12
36-JWF19	北海道	15
36-JWF20	北海道	< 10
36-JWF21	九州	< 10
36-JWF22	北海道	< 10
36-JWF23	岩手県	< 10
36-JWF24	岩手県	< 10
36-JWF25	日本	67
36-JWF26	日本	127

表 4 MON の汚染レベル (小麦粉 (輸入))

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
32-FWF01	フランス	< 10
32-FWF02	不明	< 10
32-FWF03	イタリア	< 10
32-FWF04	不明	< 10
32-FWF05	北米他	< 10
32-FWF06	北米他	< 10
32-FWF07	フランス	< 10
32-FWF08	アメリカ他	< 10
32-FWF09	北米他	< 10
32-FWF10	フランス	19
32-FWF11	カナダ、アメリカ主体	< 10
32-FWF12	北米、オーストラリア他	< 10
32-FWF13	北米他	< 10
32-FWF14	カナダ主体	< 10
32-FWF15	ドイツ	< 10
32-FWF16	北米、オーストラリア他	< 10
32-FWF17	北米、オーストラリア他	< 10
32-FWF18	カナダ	< 10
32-FWF19	カナダ	< 10
32-FWF20	北米	< 10
32-FWF21	北米	< 10
34-FWF01	オーストラリア	20
34-FWF02	オーストラリア	< 10
34-FWF03	オーストラリア	25
34-FWF04	オーストラリア	< 10
34-FWF05	カナダ他	< 10
34-FWF06	フランス	< 10
34-FWF07	フランス	< 10
34-FWF08	カナダ主体	< 10
34-FWF09	カナダ、アメリカ	< 10

表4 MONの汚染レベル（小麦粉（輸入）） 続き

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
34-FWF10	ドイツ	< 10
34-FWF11	ドイツ	< 10
34-FWF12	アメリカ	< 10
34-FWF13	インド	< 10
34-FWF14	北米	< 10
34-FWF15	アメリカ	< 10
34-FWF16	カナダ	< 10
34-FWF17	カナダ、アメリカ	< 10
34-FWF18	北米、オーストラリア他	< 10
34-FWF19	フランス、北米他	< 10
34-FWF20	北米他	< 10
35-FWF01	ドイツ	< 10
35-FWF02	ドイツ	46
35-FWF03	アメリカ	< 10
35-FWF04	イタリア	< 10
35-FWF05	アメリカ	< 10
35-FWF06	北米他	< 10
35-FWF07	アメリカ他	< 10
35-FWF08	フランス、北米他	< 10
35-FWF09	カナダ、アメリカ主体	< 10
35-FWF10	フランス	< 10
35-FWF11	北米他	< 10
35-FWF12	北米、オーストラリア他	< 10
35-FWF13	カナダ、アメリカ主体	< 10
35-FWF14	カナダ、アメリカ他	< 10
35-FWF15	北米他	< 10
35-FWF16	イタリア	< 10
35-FWF17	カナダ、アメリカ主体	< 10
35-FWF18	フランス	< 10
35-FWF19	カナダ、アメリカ	< 10

表4 MONの汚染レベル（小麦粉（輸入）） 続き

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
35-FWF20	アメリカ	< 10
35-FWF21	カナダ	< 10
35-FWF22	カナダ、アメリカ、オーストラリア	< 10
35-FWF23	カナダ、アメリカ	< 10
35-FWF24	カナダ	< 10
36-FWF01	フランス、北米他	< 10
36-FWF02	フランス	< 10
36-FWF03	アメリカ他	< 10
36-FWF04	北米他	< 10
36-FWF05	北米、オーストラリア他	< 10
36-FWF06	北米他	< 10
36-FWF07	カナダ、アメリカ主体	< 10
36-FWF08	フランス	< 10
36-FWF09	カナダ	< 10
36-FWF10	カナダ	< 10
36-FWF11	フランス	< 10
36-FWF12	カナダ又はアメリカ	< 10
36-FWF13	アメリカ	< 10
36-FWF14	オーストラリア	< 10
36-FWF15	アメリカ	< 10
36-FWF16	オーストラリア	< 10
36-FWF17	アメリカ	< 10
36-FWF18	アメリカ、カナダ	< 10
36-FWF19	カナダ、アメリカ	< 10
36-FWF20	カナダ	< 10
36-FWF21	カナダ、アメリカ、オーストラリア	< 10
36-FWF22	カナダ、アメリカ	< 10
36-FWF23	アメリカ	< 10
36-FWF24	イタリア	< 10
36-FWF25	イタリア	< 10
36-FWF26	トルコ	< 10

表 5 MON の汚染レベル (大麦)

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
R5-Hor001	アメリカ	< 10
R5-Hor002	日本	< 10
R5-Hor003	香川県	< 10
R5-Hor004	ニュージーランド	28
R5-Hor005	愛媛県、岡山県、徳島県	< 10
R5-Hor006	石川県	473
R5-Hor007	岡山県、滋賀県	< 10
R5-Hor008	熊本県	< 10
R5-Hor009	佐賀県	< 10
R5-Hor010	オーストラリア	< 10
R5-Hor011	日本	< 10
R5-Hor012	岩手県	< 10
R5-Hor013	福岡県	< 10
R5-Hor014	岡山県	< 10
R5-Hor015	青森県	< 10
R5-Hor016	熊本県	< 10
R5-Hor017	カナダ	< 10
R5-Hor018	日本	< 10
R5-Hor019	岐阜県	< 10
R5-Hor020	神奈川県	< 10
R5-Hor021	神奈川県	< 10
R5-Hor022	ニュージーランド	29
R5-Hor023	愛媛県	< 10
R5-Hor024	北海道	93
R5-Hor025	北海道	20
R5-Hor026	北海道	16

表 6 MON の汚染レベル (ライ麦)

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
R5-Sec001	ドイツ	42
R5-Sec002	アメリカ	0
R5-Sec003	アメリカ、カナダ	0
R5-Sec004	ドイツ	31
R5-Sec005	ドイツ	0
R5-Sec006	ドイツ	0
R5-Sec007	イタリア	16
R5-Sec008	ドイツ	12
R5-Sec009	北海道	1644
R5-Sec010	アメリカ	10
R5-Sec011	ドイツ	0
R5-Sec012	北海道	810
R5-Sec013	ドイツ	26
R5-Sec014	オーストラリア	0
R5-Sec015	ドイツ	0
R5-Sec016	北海道	1439
R5-Sec017	北海道	1493
R5-Sec018	北海道	2253
R5-Sec019	ドイツ	15
R5-Sec020	鳥取県	33
36-RY01	北海道	0
36-RY02	日本	486
36-RY03	日本	83
36-RY04	北海道	0
36-RY05	北海道	0
36-RY06	鳥取県	0
34-RY01	ドイツ	0
34-RY02	ドイツ	0
34-RY03	ドイツ主体	0
34-RY04	ドイツ主体	0

表 6 MON の汚染レベル（ライ麦） 続き

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
34-RY05	ドイツ主体	0
34-RY06	フランス	0
34-RY07	北海道	162
34-RY08	アメリカ	0
34-RY09	ドイツ	0
34-RY10	ドイツ	0
34-RY11	ドイツ	0
34-RY12	ドイツ	0
34-RY13	日本	0
34-RY14	オーストラリア	0
34-RY15	アメリカ	0

表 7 MON の汚染レベル (ハト麦加工品)

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
33-HT01	岩手県	13
33-HT02	富山県	23
33-HT03	栃木県	64
33-HT04	タイ	208
33-HT06	福岡県	109
33-HT07	栃木県	180
33-HT08	島根県	12
33-HT09	中国	51
33-HT10	タイ	40
33-HT11	中国	29
33-HT12	岩手県	< 10
33-HT13	島根県	79
33-HT14	青森県	< 10
33-HT15	岩手県	< 10
33-HT16	岡山県	153
33-HT17	青森県	< 10
33-HT18	中国	286
33-HT19	タイ	< 10
33-HT20	宮崎県	10
33-HT21	タイ	< 10
33-HT22	岩手県	15
33-HT23	大分県	96
33-HT24	中国	186
33-HT25	ラオス	93
33-HT26	タイ	< 10
34-HT01	岩手県	< 10
34-HT02	栃木県	90
34-HT03	栃木県	22
34-HT04	中国	23
34-HT06	島根県	35

表 7 MON の汚染レベル（ハト麦加工品） 続き

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
34-HT07	中国	514
34-HT08	日本	439
34-HT09	日本	2395
34-HT10	富山県	550
34-HT11	中国	232
34-HT12	岩手県	11
34-HT13	島根県	109
34-HT14	島根県	73
34-HT15	ラオス	85
34-HT16	タイ	< 10
34-HT17	富山県	42
34-HT18	日本	18
34-HT19	島根県	271
34-HT20	岩手県	21
R5-Coi001	栃木県	32
R5-Coi002	岩手県	23
R5-Coi003	栃木県	103
R5-Coi004	富山県又は栃木県	3109
R5-Coi005	青森県	< 10
R5-Coi006	岡山県	298
R5-Coi007	中国	11
R5-Coi008	中国	1569
R5-Coi009	タイ	372
R5-Coi010	岩手県	14
R5-Coi011	島根県	93
R5-Coi012	中国	87
R5-Coi013	栃木県	160
R5-Coi014	タイ	26
R5-Coi015	鳥取県	< 10
R5-Coi016	タイ	< 10

表 7 MON の汚染レベル（ハト麦加工品） 続き

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
R5-Coi017	岩手県	< 10
R5-Coi018	岩手県	35
R5-Coi019	山形県	20
R5-Coi020	中国	460
R5-Coi021	日本	67
R5-Coi022	タイ	< 10
R5-Coi023	富山県	< 10
R5-Coi024	岩手県	166
36-HT01	栃木県	< 10
36-HT02	福岡県	247
36-HT03	栃木県	< 10
36-HT04	日本	156
36-HT05	日本	156
36-HT06	日本	67
36-HT07	岡山県	27
36-HT08	日本	1124
36-HT09	富山県又は栃木県	37
36-HT10	青森県	< 10
36-HT11	富山県	454
36-HT12	北海道	< 10
36-HT13	北海道	< 10
36-HT14	岩手県	< 10
36-HT15	鳥取県	103
36-HT16	富山県	74
36-HT17	栃木県	< 10
36-HT18	石川県	< 10

表 8 MON の汚染レベル（トウモロコシ加工品）

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
R5-Zea001	アメリカ	0
R5-Zea002	アメリカ	24
R5-Zea003	長野県・山梨県	0
R5-Zea004	アメリカ	316
R5-Zea005	アメリカ	2370
R5-Zea006	アメリカ	0
R5-Zea007	アメリカ	49
R5-Zea008	栃木県	163
R5-Zea009	山形県	46
R5-Zea010	山梨県	34
R5-Zea011	山梨県	571
R5-Zea012	北海道	0
R5-Zea013	オーストラリア	0
R5-Zea014	中国	0
R5-Zea015	アメリカ	0
R5-Zea016	ブラジル	0
R5-Zea017	アメリカ	0
R5-Zea018	北海道	87
R5-Zea019	埼玉県	2066
R5-Zea020	熊本県	353
R5-Zea021	中国	0
36-Corn01	北海道	0
36-Corn02	アメリカ	270
36-Corn03	アメリカ	0
36-Corn04	アメリカ	204
36-Corn05	メキシコ	78
36-Corn06	山梨県	22
36-Corn07	アメリカ	155
36-Corn08	新潟県	0
36-Corn09	北海道	0

表 8 MON の汚染レベル（トウモロコシ加工品） 続き

試料ID	産地	MON濃度 ($\mu\text{g/kg}$)
36-Corn10	日本	0
36-Corn11	インド	458
36-Corn12	アメリカ	42
36-Corn13	長野県	19
36-Corn14	埼玉県	110
36-Corn15	北海道	17
36-Corn16	北海道	17
36-Corn17	イタリア	63
36-Corn18	日本	0
36-Corn19	愛媛県	95
36-Corn20	山梨県	480

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

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

本分担研究では、国内で販売されているオクラトキシン A (OTA) 測定用の迅速簡便測定法キットを入手し、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否かの評価を行うことを目的としている。迅速簡便測定法キットとしては、ELISA 法およびイムノクロマト (ラテラルフロー) 法が汎用性がある。現在、日本国内で市販されている ELISA キットには、Neogen Veratox (Neogen 社)、Agra Quant (Romar 社)、Meizheng OTA (Meizheng 社)、RIDASCREEN (R-Biopharm 社) の 4 種があり、イムノクロマトキットには 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 種がある。一昨年および昨年の評価結果を基に、今年度は ELISA キットとして Meizheng OTA (Meizheng 社)、RIDASCREEN (R-Biopharm 社) を、イムノクロマトキットとして ROSA Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社)、Ochra-Vertu TOUCH (Vicam 社) を用いて、人工汚染小麦および大麦を用いた評価試験を行った。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。

人工汚染麦中の OTA の濃度は、イムノアフィニティーカラムによる精製後に HPLC で分析して測定した。小麦は $<0.1 \sim 24.4 \mu\text{g/kg}$ 、大麦は $<0.1 \sim 17.8 \mu\text{g/kg}$ の濃度範囲であった。それぞれのキットとの相関係数は小麦では、Meizheng OTA: 0.9895、Rida screen: 0.9978、Rosa Ochratoxin Quantitative Test: 0.9854、Ochra-Vertu TOUCH: 0.9854 であり、大麦では Meizheng OTA: 0.9614、Rida screen: 0.9945、Ochratoxin Quantitative Test: 0.9873、Ochra-Vertu TOUCH: 0.9659 であった。これらの結果から、試験に供したキットの測定値と機器分析法による測定値との相関性がいずれも 0.90 以上であったため、スクリーニングに使用できると考えられた。

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* 属の両種が産生するカビ毒であり、発がん性や腎毒性を有する。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評価されている。汚染は麦類、種実類、豆類などにみられるが、飼料を経由して畜産物へ移行することから、畜産物加工品に対しても食品衛生的な対応が重要である。国際的にはコーデックス規格が 2008 年に、小麦、大麦、ライ麦を対象にそれぞれ 5 µg/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 のリスク評価書が食品安全委員会から 2014 年に出されている¹⁾。その後、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、小麦、大麦を対象に基準値を策定することが決定された。我が国のカビ毒の基準値はいままで総アフラトキシン、デオキシニバレノール、アフラトキシン M₁、パツリンにおいて設定されているが、そのなかで総アフラトキシンおよびデオキシニバレノールに対しては、理化学的な検査法を行う前に、簡便迅速なスクリーニング法として「小麦中のデオキシニバレノール試験法について」²⁾および「トウモロコシ中のアフラトキシンの試験法について」³⁾が通知されており、サンプル数の増量や機器分析の費用のコストカットに寄与している。

そこで、OTA に対しても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 ELISA 測定キットおよびイムノクロマト（ラテラルフロー）測定キットの評価を行った。本課題は 3 年間継続して行っており、一年目は ELISA 測定キットの評価、二年目はイムノクロマト測定キットの評価、本年度

は人工汚染試料を用いての機器分析値と両測定キットの相関性を評価した。

B. 研究方法

（１）材料

１）麦類

研究代表者が調製した OTA 人工汚染小麦 16 検体および人工汚染大麦 16 検体を用いた。汚染濃度は知らされていない状態で測定を行った。

２）ELISA キット

令和 4 年度の分担研究において、4 種の ELISA キットを添加回収試験により評価を行い、その結果から小麦、大麦を対象に回収率が高かった Meizheng OTA (Meizheng 社) および RIDA SCREEN (R-Biopharm 社) の 2 種を用いた。測定方法は各キットの説明書に従った。

３）イムノクロマトキット

令和 5 年度の分担研究において、6 種のイムノクロマトキット添加回収試験により評価を行い、その結果から小麦、大麦を対象に回収率が高かった ROSA Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社)、Ochra-Vertu TOUCH (Vicom 社) の 2 種類のキットを用いた。測定方法は各キットの説明書に従った。

（２）抽出操作

１）Meizheng OTA

60%メタノールを用いた。ELISA に供するサンプルはさらに PBS 等で希釈をするので、最終希釈率は 1/20 となる。

２）RIDA SCREEN

専用抽出液がキットについており、組成に関しては不明である。ELISA に供するサンプルはさらに付属の洗浄液で希釈をするので、最終希釈率は 1/10 となる。

３）ROSA Ochratoxin Quantitative Test

70%メタノールを試料 10 g に対して 20 mL 加え、約 2 分間振とうした後に遠心操作を行い、上清 100 μ L 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。

4) Ochra-Vertu TOUCH

専用のカップに量り取った試料 5 g にアクアプレミックス 25 mL を加え、バートゥー PREP ミキサーにセットして 30 秒間振とうし、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。

C. 結果

(1) 簡易測定キットと機器分析の測定値の比較

1) 小麦

ELISA キットで測定した小麦の結果を図 1 に示した。RIDASCREEN では、相関係数は 0.9978 であった。測定値は、機器分析の値より全体的に低めに出る傾向があった。機器分析の値が 0.1 μ g/kg 以下の検体においては、0.04~0.12 μ g/kg の値となり、検出限界である 0.3 μ g/kg より下であった。一方、Meizheng OTA では、相関係数は 0.9895 であり、全体的に高めに出る傾向があった。機器分析の値が 0.1 μ g/kg 以下の検体においては、0.77~0.92 μ g/kg の値となり、検出限界である 1.0 μ g/kg を下回っていた。また偽陰性は認められなかった。

イムノクロマトキットの結果を図 2、キットの写真を図 5 に示した。Charm 社のキットでは、相関係数は 0.9854 であった。全体的に機器分析の値より高めに出る傾向があった。Vicam 社のキットでは、機器分析の値との相関係数は 0.9854 で Charm 社と同じ値であった。本キットでの測定値は低めに出る傾向があった。いずれのキットとも検出限界は 2 μ g/kg であるが、それより低い濃度の

検体に対しても測定値が出ることがあったが、偽陰性は両キットとも認められなかった。

2) 大麦

ELISA キットで測定した大麦の結果を図 3 に示した。RIDASCREEN では、相関係数は 0.9945 であった。小麦と同様に、ELISA の測定値は機器分析の値より低めに出る傾向があった。機器分析の値が 0.1 μ g/kg 以下の検体において、本キットでは 0.12~0.23 μ g/kg の値を示したが、いずれも本キットの検出限界である 0.3 μ g/kg より低い値であったため、擬陽性ではないと考えられた。偽陰性の検体はなかった。一方、Meizheng OTA では相関係数は 0.9614 であり、今回性能評価を行った ELISA 及び IC キットの中で一番低い値であった。測定値は高めに出る傾向であった。機器分析の値が 0.1 μ g/kg 以下の検体においては、1.01~2.20 μ g/kg を示した。検出限界が 1.0 μ g/kg であることから、擬陽性が出やすいキットであると考えられた。しかし偽陰性は認められなかった。

イムノクロマトキットの結果は図 4 に示した。Charm 社のキットでは、相関係数は 0.9873 であった。全体的に機器分析の値より高めに出る傾向があった。機器分析の値が 0.1 μ g/kg 以下の検体においては、すべて 0.0 μ g/kg であった。

Vicam 社のキットでは、機器分析の値との相関係数は 0.9659 であった。小麦での傾向とほぼ同じく HPLC の値より高い値を示す場合と低い値を示す場合があり、一定の傾向は見いだせなかった。HPLC 値が 0.1 μ g/kg 以下の検体においては、0.10~5.00 μ g/kg を示しており、擬陽性が出やすいと考えられた。

いずれのキットとも検出限界は 2 μ g/kg であり、偽陰性は両キットとも認められなかつ

た。

D. 考察

小麦および大麦を対象に OTA の基準値が設置されることを考慮し、本年度の人工汚染試料を用いた検討ではライ麦を除いた小麦と大麦を用いた。その結果、本研究で評価した ELISA キット 2 種およびイムノクロマトキット 2 種は、機器分析の測定値と良好な相関係数を示した。このことから、Meizheng OTA および RIDA SCREEN の ELISA キットと ROSA Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社) および Ochra-Vertu TOUCH (Vicam 社) は、スクリーニングに用いる迅速簡便キットとして使用可能であると考えられた。

本事業において、イムノクロマトキットおよび ELISA キットの性能評価を実施したが、実際にスクリーニングに用いる場合には室内または室間バリデーションをする必要がある。ELISA キットのバリデーションの手引書⁴⁾においては、室間精度は 25%であることから、イムノクロマトキットも含めて OTA のスクリーニングとして用いる場合には 25-50%の不確かさを考慮すべきと考えられた。すなわちカットオフ値は、基準値が 5 $\mu\text{g/kg}$ の場合、2.5 $\mu\text{g/kg}$ が適切と考えられた。それぞれのキットの検出限界は表 1 に示したように、クロマトキットでは ROSA Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社) および Ochra-Vertu TOUCH (Vicam 社) で 2 $\mu\text{g/kg}$ 、ELISA キットでは Meizheng OTA が 1 $\mu\text{g/kg}$ 、RIDA Screen (R-Biopharm 社) で 0.3 $\mu\text{g/kg}$ であり、提案したカットオフ値を下回っていた。

E. 結論

本研究では、国内で販売されている OTA 測定用の迅速簡便測定法キットを入手し、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否かの評価を行うことを目的とした。最終年度では、初年度ならびに次年度で得られた成果をもとに ELISA キット 2 種、イムノクロマトキット 2 種を選び、OTA 人工汚染小麦及び大麦中の OTA 濃度を測定した値と、HPLC を用いた機器分析による測定値と比較し、それらキットの性能を評価した。その結果、ELISA キット 2 種、イムノクロマトキット 2 種とも良好な相関係数を示した。これらの結果から、最終年度の検討に用いたキットは、どのキットも OTA の迅速簡便なスクリーニングに使用可能であると考えられた。

F. 参考文献

- 1) かび毒評価書「オクラトキシン A」
<https://www.fsc.go.jp/fscis/evaluationDocument/show/kya200903190ks>
(2025.3.10 アクセス)
- 2) 小麦中のデオキシニバレノール試験法について
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tc6212&dataType=1&pageNo=1
(2025.3.24 アクセス)
- 3) トウモロコシ中のアフラトキシンの試験法について
<https://www.nihs.go.jp/dmb/kabi/cornafla.pdf>
(2025.3.24 アクセス)
- 4) Abbott M. et al. Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. J. AOAC Int., 93, 442-450 (2010)

Sample No.	RIDA Screen (μg/kg)	Meizheng OTA (μg/kg)	HPLC (μg/kg)
W1	3.24	5.41	4.20
W2	6.86	11.10	8.83
W3	10.33	16.98	14.42
W4	1.56	3.27	2.16
W5	2.51	3.05	3.08
W6	8.41	13.95	10.10
W7	5.22	8.64	6.46
W8	1.08	2.47	1.54
W9	19.01	24.59	24.40
W10	0.72	1.80	0.98
W15	0.39	1.33	0.49
W16	4.26	8.27	5.90
W23	0.04	0.92	< 0.1
W24	0.12	0.87	< 0.1
W25	0.08	0.77	< 0.1
W26	6.27	9.56	7.27

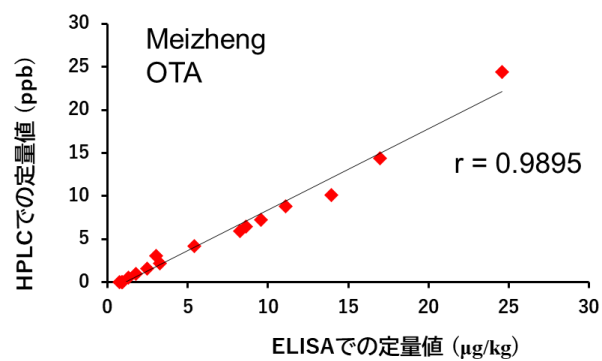
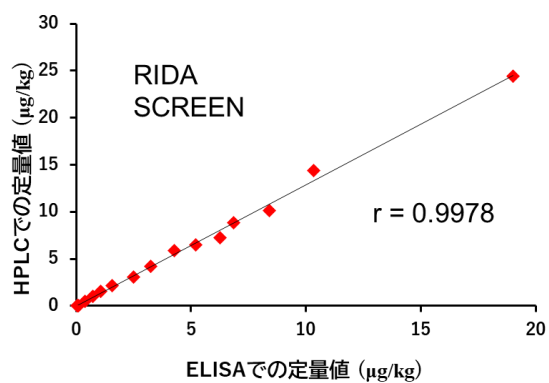


図1 2種のELISAキットによる人工汚染小麦の分析結果

Sample No.	Charm 社製 ($\mu\text{g/kg}$)	Vicam 社製 ($\mu\text{g/kg}$)	HPLC ($\mu\text{g/kg}$)
W1	4.55	2.10	4.20
W2	9.55	9.00	8.83
W3	13.00	12.20	14.42
W4	2.25	3.50	2.16
W5	3.45	2.50	3.08
W6	9.30	10.10	10.10
W7	7.05	4.90	6.46
W8	2.10	1.4	1.54
W9	18.50	22.60	24.40
W10	0.60	0.00	0.98
W15	0.65	0.00	0.49
W16	6.30	3.20	5.90
W23	0.50	1.00	< 0.1
W24	0.00	0.00	< 0.1
W25	0.00	0.60	< 0.1
W26	5.75	6.60	7.27

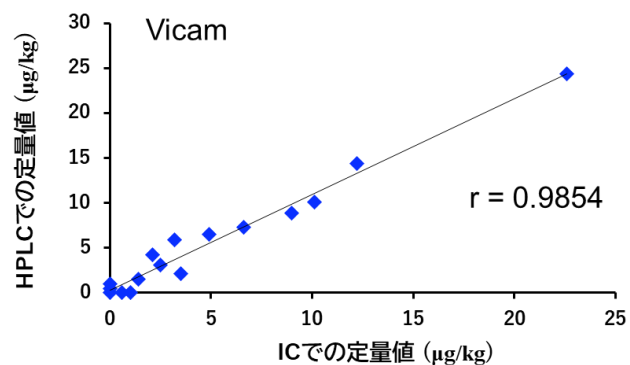
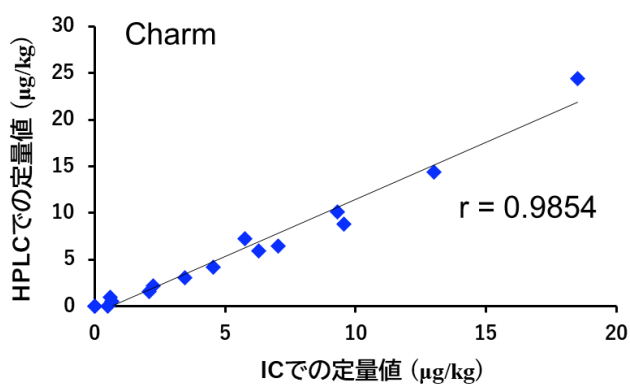


図 2 2 種のイムノクロマトキットによる人工汚染小麦の分析結果

Sample No.	RIDA Screen (μg/kg)	Meizenheg OTA (μg/kg)	HPLC (μg/kg)
B1	1.10	2.39	1.33
B2	1.97	3.75	2.64
B3	2.01	3.54	3.32
B4	2.69	3.90	3.81
B9	3.87	7.54	5.10
B10	6.17	10.22	7.40
B11	7.37	11.39	11.03
B12	10.31	12.04	15.96
B13	4.76	8.80	6.60
B14	6.80	12.04	8.98
B15	8.70	13.19	13.79
B16	12.19	18.33	17.77
B17	0.19	1.01	< 0.1
B18	0.15	1.52	< 0.1
B19	0.23	2.20	< 0.1
B20	0.12	1.51	< 0.1

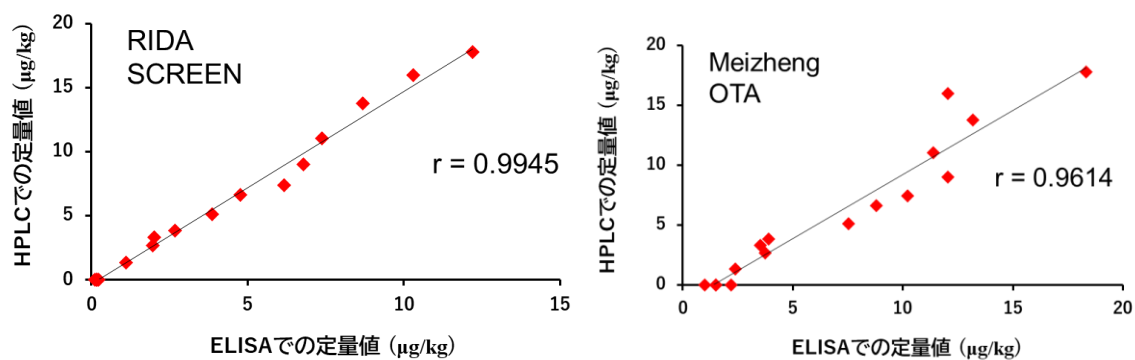


図3 2種のELISAキットによる人工汚染大麦の分析結果

Sample No.	Charm 社製 ($\mu\text{g/kg}$)	Vicam 社製 ($\mu\text{g/kg}$)	HPLC ($\mu\text{g/kg}$)
B1	2.85	2.70	1.33
B2	3.35	3.00	2.64
B3	4.35	3.10	3.32
B4	4.70	3.90	3.81
B9	5.45	3.90	5.10
B10	7.60	6.90	7.40
B11	9.75	10.30	11.03
B12	14.50	16.00	15.96
B13	7.10	6.00	6.60
B14	9.95	10.10	8.98
B15	13.00	14.60	13.79
B16	14.50	15.80	17.77
B17	0.00	0.70	< 0.1
B18	0.00	0.10	< 0.1
B19	0.00	2.20	< 0.1
B20	0.00	5.00	< 0.1

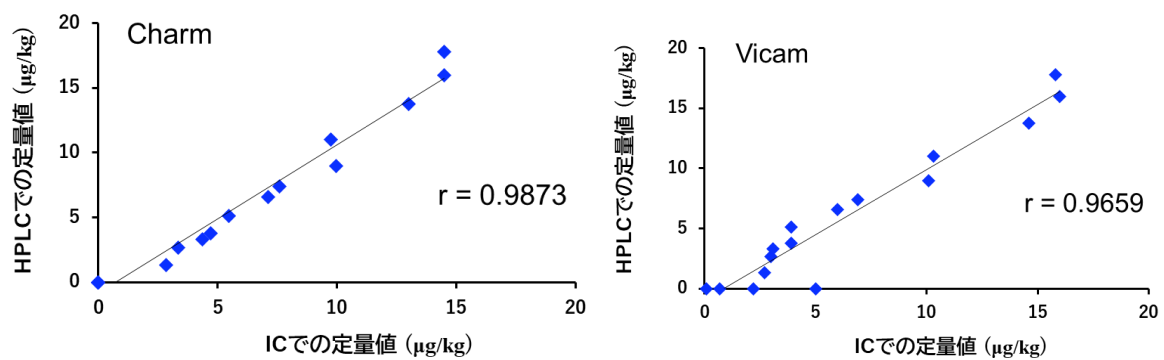


図 4 2 種のイムノクロマトキットによる人工汚染大麦の分析結果

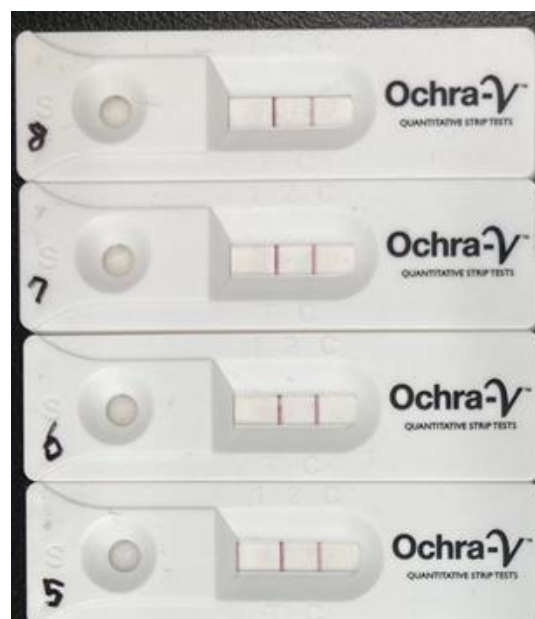


図5 イムノクロマトキット（左：Charm 社製、右：Vicom 社製）の写真

表 1 各キットの概要

キットの種類	イムノクロマトキット		ELISA キット	
キット名	ROSA Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社製)	Ochra-Vertu TOUCH (Vicam 社製)	Meizheng OTA (Meizheng 社製)	RIDA SCREEN (R-Biopharm 社製)
測定範囲	0～30 µg/kg	0～30 µg/kg	1.0～30 µg/kg	0.3～30 µg/kg
検出限界	2 µg/kg	2 µg/kg	1 µg/kg	0.3 µg/kg
検出機器	Charm EZ-M system 定量分析	VERTU TOUCH Reader 定量分析	ELISA reader 定量分析	ELISA reader 定量分析
対象試料	小麦、大麦、ライ麦など	コーン、大麦、小麦など	コーン、大麦、小麦など	コーン、大麦、小麦など
測定時間	約 35 分	約 20 分	45・60 分	45・60 分
試料	5 g	5 g	5 g	5 g
備考	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ので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小麦の抽出液は黄色となる。 ②大麦の抽出液は白濁し、抗原液を入れても変わらず。	小麦と大麦の抽出液はやや茶色となり、Conjugate 液を入れても変化なし

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

分担研究報告書

小麦における OTA 汚染原因菌の究明

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

近年、諸外国で食用となる主要穀物からのオクラトキシン A (OTA) の検出事例の報告が相次いでいる。我が国では 2023 年に麦類中の OTA に対して基準値を策定することが決定された。麦類では *Penicillium verrucosum* が主要な OTA 汚染原因菌として知られているが、過去に OTA 産生性を有する *Aspergillus ochraceus* または *Aspergillus westerdijkiae* が国内外の小麦から単離されていることから、これら *Aspergillus* 属菌についても、保管中の小麦が本菌に汚染された場合の OTA の汚染動態を把握する必要がある。そこで、OTA 産生性が確認された *P. verrucosum* NBRC30181 および *A. westerdijkiae* NIHS 3985 の各 1 菌株をそれぞれ小麦粒へ接種し、培養条件（小麦への加水率、培養温度または培養期間）による小麦中の OTA 含有量の変化を調べた。温度 25℃で 2 週間培養した結果、*P. verrucosum* NBRC30181 を接種した小麦では加水率が高くなるに従い OTA 含有量も上昇し、今回検討した範囲での最大含水量 50%で OTA 含有量は最大の 3,122 µg/kg となり、*A. westerdijkiae* NIHS 3985 では最大値は含水率 40%で 11,580 µg/kg となった。温度 15℃で小麦への加水率 50%、2 または 4 週間培養した結果、*P. verrucosum* NBRC30181 を接種した小麦中の OTA 濃度は平均 743 µg/kg または 2,202 µg/kg、*A. westerdijkiae* NIHS 3985 では平均 21 µg/kg または 7,558 µg/kg であった。これらの結果から、*A. westerdijkiae* に汚染された小麦がある程度の水分を含有した状態で長期保存された場合、室温より低温の貯蔵環境下でも *A. westerdijkiae* による高度な OTA 汚染が発生する可能性があることを確認した。貯蔵中の小麦の OTA 汚染原因菌として、*P. verrucosum* だけでなく *A. westerdijkiae* にも留意する必要があることが示され、今後リスク管理を行う必要のあるカビの情報を提供した。

研究協力者

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
青木 渉 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

オクラトキシン A (OTA : 図 1) は世界中で様々な食品での検出例の報告頻度が高いカビ毒の 1 つである。OTA は小麦や大麦などの穀類や、

コーヒー豆やワイン、ココア、香辛料等の様々な食品から検出される¹⁾。ラットを用いた実験により非遺伝毒性発がん物質であることが認められており、IARC (国際がん研究機関) はグループ 2B「ヒトに対して発がん性の可能性がある」に分類した²⁾。その一方で、コーデックス委員会は 2008 年に小麦、大麦、ライ麦について OTA の最大基準値を 5 µg/kg に設定した³⁾。

我が国では小麦の9割を北米などからの輸入に依存しているが、北米では麦類中の OTA 汚染についていくつかの調査結果が報告されている。アメリカ国内で行われた調査では、2012 年から 2013 年の 2 年間にかけて 6 州から収集された小麦、大麦 262 検体中 32 検体から OTA が検出され、平均汚染濃度は 1.06–47.28 $\mu\text{g/kg}$ 、最大汚染濃度は 185.24 $\mu\text{g/kg}$ であった⁴⁾。また、2010 年から 2012 年の 3 年間にかけて行われたカナダ産の出荷・輸出用小麦における調査結果では、輸出小麦 1907 検体中 736 検体から OTA が検出され、平均汚染濃度は 1.56–3.19 $\mu\text{g/kg}$ であった⁵⁾。一方で、日本国内の 2005 年から 2009 年の 5 年間にかけての OTA 汚染実態調査では、国産小麦において 500 検体中 1 検体から最大 0.7 $\mu\text{g/kg}$ の OTA が検出され、輸入小麦では 782 検体中 329 検体から最大 5.2 $\mu\text{g/kg}$ の OTA が検出された⁶⁾。以上の状況等を勘案し、小麦および大麦中の OTA に基準値を設定することが決定された。

麦類の OTA 汚染の原因菌としては *Penicillium verrucosum* が知られている。*P. verrucosum* は温帯から寒冷地の小麦の代表的な OTA 汚染原因菌として知られ、発育最適温度帯は 25–30°C とされている⁷⁾。北米では、収穫後の小麦を保管するサイロにて本菌が高頻度で検出され、サイロに保管されている小麦のうち、上部の開閉口の付近もしくはサイロ内部の小麦残渣から多くの *Penicillium* 属菌胞子と OTA が検出されるとの報告がある⁸⁾。一方で、*A. ochraceus* および *A. westerdijkiae* は主に果実、コーヒーや大豆などの農産物の OTA 汚染原因菌として広く知られるが⁹⁾、2008 年にアルジェリア流通小麦からも OTA 産生性 *A. ochraceus* が単離された¹⁰⁾。加えて、日本国内では小麦粉から *A. ochraceus* が検出された記録が存在することから¹¹⁾、日本国内で *Aspergillus* 属の菌類が主要穀

物である小麦を汚染する可能性についても排除することはできないと言える。

そこで本研究では、国内で消費される主要穀物である小麦上での、*Penicillium* および *Aspergillus* 属菌の OTA 汚染動態に関する知見を得ることを目的として、両菌を小麦へ接種して培養し、それらの OTA 産生性について検討を行った。

B. 研究方法

(1) *Penicillium* および *Aspergillus* 属菌株の収集

小麦へ接種する OTA 産生菌株の探索：OTA 自然汚染小麦粉 (Charm Sciences) を購入し、1 g を Dichloran-Rose Bengal-Chloramphenicol agar (DRBC agar: Difco, Becton, Dickinson and company) 培地へ均一になるように散布し、7 日間 25°C で培養した。形成されたコロニーを実体顕微鏡下で観察し、*Penicillium* 属様コロニーを Potato Dextrose Agar (PDA: パールコアポテトデキストロース寒天培地, 栄研科学) 培地へ釣菌して、7 日間 25°C で培養し単離株を作製した。加えて、OTA 産生性を持つことが確認済みの *Penicillium verrucosum* NBRC 30181 株 (図 2a,b) を入手し、これも小麦への接種試験に用いる候補菌株として供試した。*Aspergillus* 属菌については、今回供試した小麦検体からは得られなかったことから、OTA 高産生株であることをあらかじめ確認している国立衛研衛生微生物部保存株の *A. westerdijkiae* NIHS 3985 (図 2c,d) を供試することとした。

OTA 自然汚染小麦粉より単離した *Penicillium* 属菌株は、分子系統解析による同定を行った。DNA 抽出は DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用い、添付のマニュアルに従って実施した。各菌株の β -tubulin 遺伝子 (β -tub) の部分塩基配列を決定した。PCR は TaKaRa EX Taq (タカ

ラ株式会社)を用い、プライマーセット bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC -3') および bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC -3') で遺伝子領域を増幅した。得られた PCR 産物を精製後、BigDye Terminator v.3.1 (ThermoFisher Scientific) を用いてサイクルシーケンス反応を実施した。シーケンスサンプルのキャピラリーシーケンスは、最終反応物を Hi-Di formamide (ThermoFisher Scientific) へ溶解後、3730xl DNAanalyzer (ThermoFisher Scientific)を用いて実施した。得られたデータの解析およびアセンブリは解析ソフトウェア ATGC (株式会社日本サーバ)を用いて実施した。得られた各株の β -tub 塩基配列データを用いて、分子系統解析を行った。既報¹²⁾に示された *Penicillium* 属内の系統関係を参照して、*Penicillium* 属菌種の β -tub 塩基配列を Genbank からダウンロードして収集しリファレンス配列とした。それらの配列とともに本研究で決定した単離株の β -tub 塩基配列を Clustal W を用いてマルチプルアライメントし、それを指標として MEGA X¹³⁾を用い近隣結合法による分子系統解析を行った。その結果得られた各単離株とリファレンス株との系統関係を参照し、同定を行った。

(2) OTA 産生株の検索

OTA 自然汚染小麦粉より単離した *Penicillium* 属菌株、*P. verrucosum* NBRC 30181 および *A. westerdijkiae* 菌株を PDA 培地に接種し、25°C で 5 日間培養した。形成したコロニーから胞子を掻き取り、100 mL 容三角フラスコに入れた Yeast extract sucrose (YES) 液体培地 10 mL に接種し、7 日間 25°C で静置培養した。培養終了後、培養液全量を 50 mL 容遠沈管へ回収し、等量の酢酸エチルを加えて激しく攪拌した。3000×g で遠心後上層をナスフラスコに回収し、ロータリ

ーエバポレーターで濃縮乾固後、1 mL のメタノールを加えて溶解した。1.5 mL のプラスチックチューブに移し、遠心エバポレーターで乾固後、酢酸エチル 30 μ L へ再溶解して分析サンプル液とした。薄層クロマトグラフィー (TLC) 用プレート (Aluminium TLC plate silica gel coated ; Merck) へ、分析サンプル液および陽性対象として OTA 溶液 50 mg/L を 2 μ L ずつスポットした。その後ヘキサン : 酢酸エチル : 酢酸 (2 : 1 + 10% 酢酸) により展開し、風乾した後、254 nm の UV 照射下でスポットの有無を確認した。Rf 値 = 0.6 でスポットが出現した場合に OTA 陽性と判定した。

(3) 小麦玄麦粒でのカビの OTA 産生性確認試験

(2) にて確認した供試菌株の中で OTA 産生性が最も高かった *Penicillium* 属菌株および *A. westerdijkiae* NIHS 3985 株を PDA 培地に接種した。25°C で 5 日間培養後、形成されたコロニーから綿棒を用いて胞子を掻き取って、0.01% Tween80 水溶液へ懸濁して胞子懸濁液を作製した。胞子懸濁液中の胞子濃度は、血球計算盤 (C-CHIP, DHC-N01 ; フィンガルリンク株式会社) を用いて胞子数を計測し、10 胞子/ μ L となるように調整して、使用まで 4°C で保管した。

小麦玄麦粒 5 g を 100 mL 容三角フラスコに加え、121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌し、65°C で一晚乾燥したものを培養基質として、以下の a) -d) の 4 実験区の各条件にしたがって培養した。

<胞子接種小麦の培養条件>

a) 100 mL 容三角フラスコに入れ、オートクレーブ滅菌後乾燥した小麦玄麦粒 5 g に対して、滅菌 DW 0.5 mL (加水率 10%)、1.0 mL (加水率 20%)、1.5 mL (加水率 30%)、2.0 mL (加

水率 40%) または 2.5 mL (加水率 50%) を加えて吸水させた。ここに濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、25°C で 2 週間培養した。各加水率×各菌株の培養条件につき 1 回の実験を行った。

- b) 加水率による OTA 産生量変化の再現性を確認するため、*Penicillium* 属菌株のみ接種し実験を行った。加水率 10%、30% または 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、25°C で 2 週間培養した。各加水率につき 3 回の繰り返し実験を行った。
- c) 加水率 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、4°C、15°C または 25°C で 2 週間培養した。各培養温度×各菌株の培養条件につき 3 回の繰り返し実験を行った。
- d) 加水率 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、15°C で 2 または 4 週間培養した。各培養期間×各菌株の培養条件につき 3 回の繰り返し実験を行った。また培養期間 1 週間ごとに、小麦上の菌糸の発達度を画像記録するため写真撮影を行った。

(4) OTA の定量分析

培養が終了した小麦粒へメタノール：水 (3 : 1) 50 mL を加え、すり鉢で破碎抽出した。破碎物はろ過して共雑物を除去し、ろ液の 300 μ L を 1.5 mL マイクロチューブへ分取した。遠心エバポレーターで乾固した後、精製水 300 μ L で懸濁した。これに等量の酢酸エチルを加え、12,000×g で 5 分間遠心し、上清の 200 μ L を回収、これを 2 回繰り返し 400 μ L の抽出液を得た。抽出液は窒素乾固で完全に酢酸エチルを除去し、アセトニトリル：水：酢酸 (30 : 70 : 1) 300 μ L で再溶解し、さらに同液で 100 倍または 1600 倍で希釈し、12,000×g で 5 分間遠心したものを分析サンプル液とした。分析サンプル液は以下の LC-MS/MS 条件で分析を行った。

<LC-MS/MS の測定条件>

HPLC

カラム : InterSustain Swift C18 HP

2.1×150 mm, 3 μ m

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

単離条件 : 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 μ L

MS

イオン化 : ESI positive

モニタリングイオン :

OTA 404 [M+H]⁺ > 239, 102

C. 研究結果

OTA 自然汚染小麦粉から、ONWF-P1~P7 の 7 株の *Penicillium* 属菌株が単離された。これら単離株の β -tub 塩基配列に基づく分子系統樹を図 3 に、YES 液体培地の培養液の TLC 分析像を図 4 に示した。今回 OTA 汚染小麦粉検体から単離した *Penicillium* 菌株では、ONWF-P1 の 1 株を除く 6 株について、OTA 産生性を有することが知られる *P. viridicatum* または *P. verrucosum* に近縁である可能性が否定されなかったため、これらの全菌株を用いて YES 液体培地での OTA 産生性確認試験を行った。その結果、それらの菌株全てにおいて OTA 産生性は確認されなかった。続いて、*P. verrucosum* NBRC 30181 および *A. westerdijkiae* NIHS 3985 を用いて同様の OTA 産生性確認試験を行ったところ、十分な OTA 産生性が確認できた (図 5)。以上のことから、この後で実施する小麦玄麦粒での OTA 産生確認試験は、*P. verrucosum* NBRC 30181 およ

び *A. westerdijkiae* NIHS 3985 の 2 菌株を用いて実施することとした。

OTA 産生株 2 菌株のいずれかを接種し、研究方法に記載の条件 (3) -a) で培養した結果を図 6 に示した。*P. verrucosum* 株を接種した小麦では、加水率が高くなるにつれて OTA 含有量も上昇し加水率 50% で最大濃度 3,122 $\mu\text{g/kg}$ を示した。*A. westerdijkiae* 株を接種した小麦では、加水率 40% で OTA 含有量の最大値を示し、21,691 $\mu\text{g/kg}$ であった。また、加水率 10% の小麦においては *P. verrucosum* 株または *A. westerdijkiae* 株のどちらを接種した場合にも OTA が検出された (149 $\mu\text{g/kg}$ または 162 $\mu\text{g/kg}$)。 *P. verrucosum* NBRC 30181 を接種し条件 (3) -b) で 3 回繰り返し実験を行った結果は、加水率 10%、30% および 50% での培養後の OTA 平均濃度はそれぞれ 9 $\mu\text{g/kg}$ 、2,521 $\mu\text{g/kg}$ および 3,801 $\mu\text{g/kg}$ となり (図 7)、培養条件 (3) -a) の実験区で示された *P. verrucosum* 株での加水率と小麦中 OTA 含有量の関係の再現性が確認された。OTA 産生株 2 菌株のいずれかを接種し、条件 (3) -c) で培養した結果を図 8 に示した。加水率 50% の条件下では、両菌株で小麦中の OTA 含有量は 25°C 培養時に最大値を示し、平均濃度はそれぞれ 8,548 $\mu\text{g/kg}$ および 57,482 $\mu\text{g/kg}$ 、最大濃度はそれぞれ 10,150 $\mu\text{g/kg}$ および 109,871 $\mu\text{g/kg}$ であった。15°C の培養時でも、*P. verrucosum* 株では最大 895 $\mu\text{g/kg}$ の濃度で、*A. westerdijkiae* 株では最大 38 $\mu\text{g/kg}$ で、OTA 産生性が確認された。培養温度 4°C では、いずれの菌株でも OTA 産生は確認されなかった。OTA 産生株 2 菌株のいずれかを接種し、条件 (3) -d) で培養した結果を図 9 に示した。培養温度 15°C 加水率 50% の条件下では、接種したいずれの菌株でも小麦中の OTA 含有量は 2 週間培養後に比べて 4 週間後のほうが高く、培養 4 週間後の小麦中 OTA 濃度は、*P. verrucosum* 株では平均 2,202 $\mu\text{g/kg}$ お

よび最大 2,371 $\mu\text{g/kg}$ 、*A. westerdijkiae* 株では平均 7,558 $\mu\text{g/kg}$ および最大 12,791 $\mu\text{g/kg}$ であり、条件 (3) -c) で培養した実験区の結果と比べると、培養期間を 4 週間に延長すれば、15°C でも、特に *A. westerdijkiae* 株で比較的高い OTA 産生性を示すようになることが確認された。また、条件 (3) -d) での培養時に、培養 1 週間ごとに小麦表面でのカビ発育度合いを目視観察し、比較した (図 10)。その結果、*P. verrucosum* NBRC 30181 を接種した小麦では培養 1 週間目で白色の菌糸が確認されたが、*A. westerdijkiae* NIHS 3985 では菌糸は認められず 2 週間目で確認された。したがって、15°C の培養下では、今回使用した *A. westerdijkiae* 株は *P. verrucosum* 株よりも発育が遅く、菌体の発育程度は図 9 で示した OTA 産生程度の経時的推移と同様の傾向を示すことを確認できた。

D. 考察

これまでに、*P. verrucosum* および *A. westerdijkiae* における温度や水分要求性と OTA 産生性との関連について、いくつかの報告がある。Rao ら (2013)¹⁴⁾は、CYA 培地を用いて *P. verrucosum* を 5°C から 40°C の間で培養し、OTA 産生量を測定して、15°C が OTA 産生可能な最低温度であること、25°C で最大値を取ることを報告した。また、Gil-Serna ら (2015)¹⁵⁾は、複数株の *A. westerdijkiae* を用いて各種食品成分を配合した寒天培地上で培養実験を行い、各菌株の OTA 産生性は、培養温度 20°C よりも 24 または 28°C のほうが高く、培地の水分活性値 (aw) は 0.928 よりも 0.964 または 0.995 のほうが高いことを示した。また Akbar ら (2020)¹⁶⁾は、複数株の *A. westerdijkiae* を用いてコーヒー成分を配合した寒天培地で温度 25 または 28°C で培養実験を行い、培地の aw は 0.90 または 0.99 よりも 0.95 または 0.98 のほうが OTA 産生性は高い

ことを示した。本研究では小麦中の水分活性値を測定していないため、水分要求性についてはこれらの結果との直接的な比較はできないが、本研究の条件（3）－a）から c）での実験区の結果（図 6-8）は、供試した 2 菌種 2 菌株での 15℃以上で OTA 産生性があること、および比較的高い水分含有量でより高い OTA 産生性があることを示しており、これらの既報の結果と一致した。また、条件（3）－a）で培養した結果（図 6）では、今回接種実験に用いた 2 菌株においては、乾燥小麦重量の 10%以上の比率で加水すると OTA 産生が生じており、*P. verrucosum* および *A. westerdijkiae* が小麦を汚染した場合、OTA 汚染が生じるためには一定の水分の条件および温度条件を同時に満たす必要があることが確認された。

条件（3）－d）で培養した結果（図 9）において、両菌株をそれぞれ接種・培養後の小麦の OTA 含有量は、2 週間培養後では *P. verrucosum* NBRC 30181 は *A. westerdijkiae* NIHS 3985 よりも産生量が多かったが、4 週間培養後には、*A. westerdijkiae* NIHS 3985 を接種した小麦のほうが OTA 含有量は高くなった。このことから、15℃という室温より低い条件下でも、*A. westerdijkiae* は、小麦の保管期間が 4 週間以上と長期にわたった場合には、小麦における主要な OTA 汚染原因菌として知られる *P. verrucosum* と同程度の OTA 汚染原因菌となり得る可能性が示唆された。加えて、低温保管であっても保存庫の床に残留した小麦粒を放置することで *P. verrucosum* による OTA 汚染が発生することが報告されていることから⁸⁾、残留物の放置期間をできる限り短期間にするすることで、OTA 汚染原因菌の孢子飛散の抑制による小麦の OTA 汚染リスクを減少させることができると考えられた。

今回使用した 2 菌種 2 菌株の OTA 産生性について、Aldred ら（2008）¹⁷⁾は、*P. verrucosum* および *A. westerdijkiae* 孢子を小麦粒へ接種して 15℃培養温度で 28 日間培養を行い、それぞれ最大 121.8 または 94.5 µg/kg の OTA が検出された。今回の検討では、同様の培養温度・期間で、これら 2 菌種による OTA 産生濃度は最大で *P. verrucosum* 株では 2,371 µg/kg、*A. westerdijkiae* 株では 12,791 µg/kg となり、既報の産生量と比較して相当に高い産生量を示した。このことは、同菌種内でも菌株による産生能の強さが異なることや、培養実験時の小麦の水分量が異なることなどに関連したものと考えられる。そのため、今後も多くの菌株で OTA 産生性を確認し、情報を収集する必要があると考えられた。

今年度の検討の結果から、日本国内流通小麦での OTA 汚染のメカニズムとリスクの所在を実験的に確認した。今後は、気候変動などと共に、国内で流通する小麦の原産国や保管状況が変化していく可能性がある。そのため、国内流通小麦の OTA 汚染状況も変化する可能性が考えられ、OTA 汚染実態と OTA 汚染原因菌に関する情報収集を継続していく必要があると考えられた。

E. 結論

室温より低温の 15℃でも小麦への加水量が多く、4 週間培養した結果、*A. westerdijkiae* も *P. verrucosum* と同程度以上の OTA 産生性を示すことを確認した。このことから、*A. westerdijkiae* に汚染された小麦がある程度の水分を含有した状態で長期保存された場合、室温より低温の貯蔵環境下でも *A. westerdijkiae* による高度な OTA 汚染が発生する可能性がある。貯蔵中の小麦の OTA 汚染原因菌として、*P. verrucosum* だけでなく *A. westerdijkiae* にも留意する必要があることが示された。

F. 参考文献

- 1) 田端節子, 飯田憲司, 木村圭介, ら. 2008. 各種市販食品中のオクラトキシン A, B およびシトリニンの汚染実態調査. 食品衛生学会誌, 49 : 111–115.
- 2) Tao, Y., Xie S., Xu F., et al. 2018. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. Food and Chemical Toxicity, 112:320–331.
- 3) Codex. 2013. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Ochratoxin A contamination in Coffee. CAC/RCP 72-2013.
- 4) Kuruc, J.A., Schwarz, P., Wolf-Hall C. 2015. Ochratoxin A in Stored U.S. Barley and Wheat. Journal of Food Protection, 78:597–601.
- 5) Tittlemier, S.A., Roscoe, M., Blagden, R., Kobialka, C. 2014. Occurrence of ochratoxin A in Canadian wheat shipments, 2010–12. Food Additives & Contaminants: Part A, 31:910–916.
- 6) 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課. 2023. 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会資料, 資料 1 : 食品中のオクラトキシン A の規格基準の設定について.
- 7) Larsen, T.O., Svendsen, A., Smedsgaard, J. 2001. Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. Applied and Environmental microbiology, 67:3630–3635.
- 8) Limay-Rios, V., Miller, J.D., Schaafsma, A.W. 2017. Occurrence of *Penicillium verrucosum*, ochratoxin A, ochratoxin B and citrinin in onfarm stored winter wheat from the Canadian Great Lakes Region. Plos One, 12: e0181239.
- 9) Frisvad, J.C., Frank, J.M., Hubranken, J.A., et al. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Studies in Mycology, 50:23–43.
- 10) Riba, A., Makrane, S., Mathieu, F., et al. 2008. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. International Journal of Food Microbiology, 122: 85–92.
- 11) 小笠原和夫, 赤城幾代, 砂川紘之, ら. 1976. 食品の有害カビによる汚染に関する研究 (第 I 報) 穀粉類について. 北海道立衛生研究所報, 25 : 67–73.
- 12) Houbranken, J., Kocsubé, S., Visagie, C.M., et al. 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. Studies in Mycology, 95:5–169.
- 13) Kumar, S., Stecher, G., Li, M., et al. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Molecular Biology and Evolution. 2018. 35(6):1547-1549.
- 14) Rao, V.K., Ramana, M.V., Girisham S., Redd, S.M. 2013. Culture media and factors influencing ochratoxin A production by two species of *Penicillium* isolated from poultry feeds. National Academy Science Letter, 36:101–110.
- 15) Gil-Serna, J., Patiño, B., Gonzalez-Jaen, M.T., Vazquez, C. 2015. *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. Food microbiology, 46:168–175.
- 16) Akbar, A., Medina, A., Magan, N. 2020. Resilience of *Aspergillus westerdijkiae* strains to interacting climate-related abiotic factors: effects on growth and ochratoxin A production on coffee-based medium and in stored coffee. Microorganisms, 8:1268.
- 17) Aldred, D., Cairns-Fuller V., Magan, N. 2008. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth

and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *A. westerdijkiae* on wheat grain. Journal of Stored Products Research, 44:341–346.

G. 研究業績

【論文発表】

該当なし

【学会発表】

- 1) Maiko Watanabe, Wataru Aoki, Yukiko Hara-Kudo, Takahiro Ohnishi, Tomoya Yoshinari. Distribution of moniliformin producing fusaria on grains in Japanese markets. The 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS2024), 2024.10.23-25, 2024.
- 2) Maiko Watanabe, Takahiro Ohnishi, Tomoya Yoshinari. Taxonomic study of moniliformin producing molds in the genus *Fusarium* derived from grains in Japanese retail stores. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms "Approaches for risk analysis and food safety" in 56th UJNR. 2024.09.
- 3) 青木 渉, 吉成知也, 工藤由起子, 渡辺麻衣子. 国内流通穀物におけるモニリフォルミン汚染実態調査. 第120回食品衛生学会学術講演会. 2024.11.7-8.

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

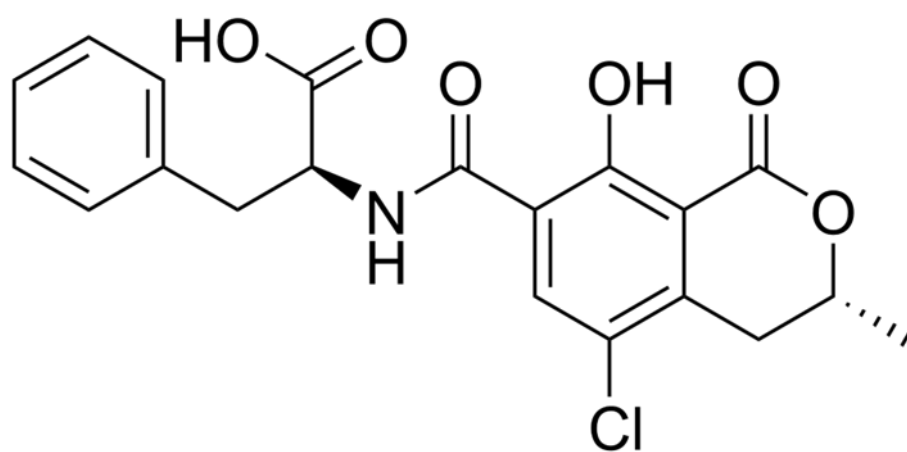


図1. オクラトキシンAの化学構造式

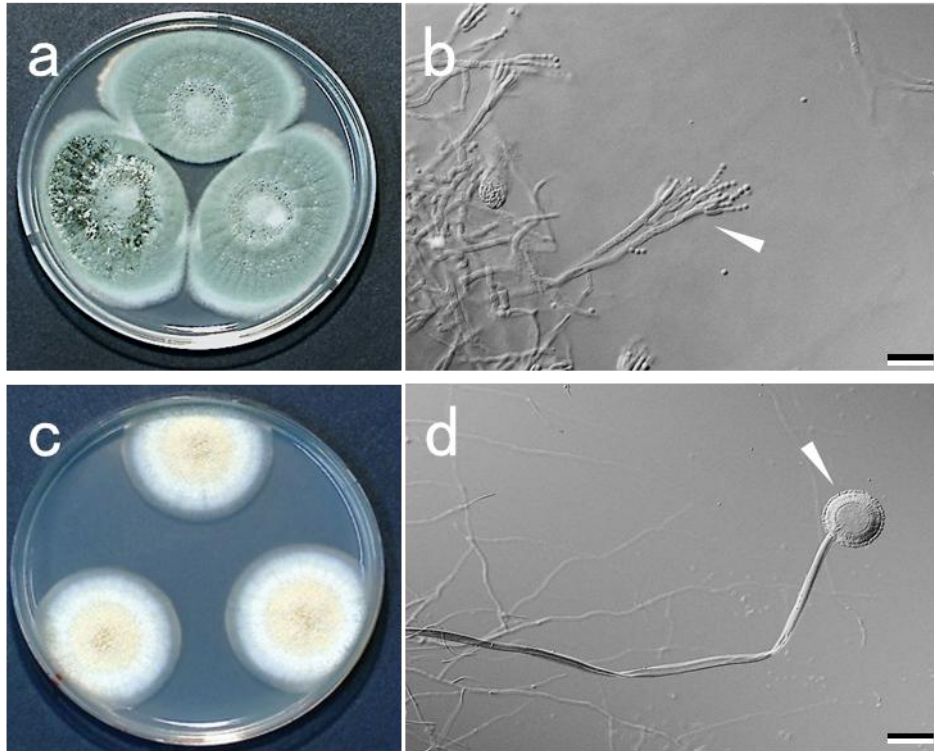


図2. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株
と *A. westerdijkiae* NIHS 3985株のコロ
ニー性状および顕微鏡像

a) NBRC 301081のPDA培地上のコロニー性状（培養5日目）。b) NBRC 30181のペニシリの形態（白矢印）。c) NIHS 3985のPDA培地上でのコロニー性状（培養5日目）。d) NIHS 3985のアスペルジラの形態。b)およびd)のバーは20 μm を示す。

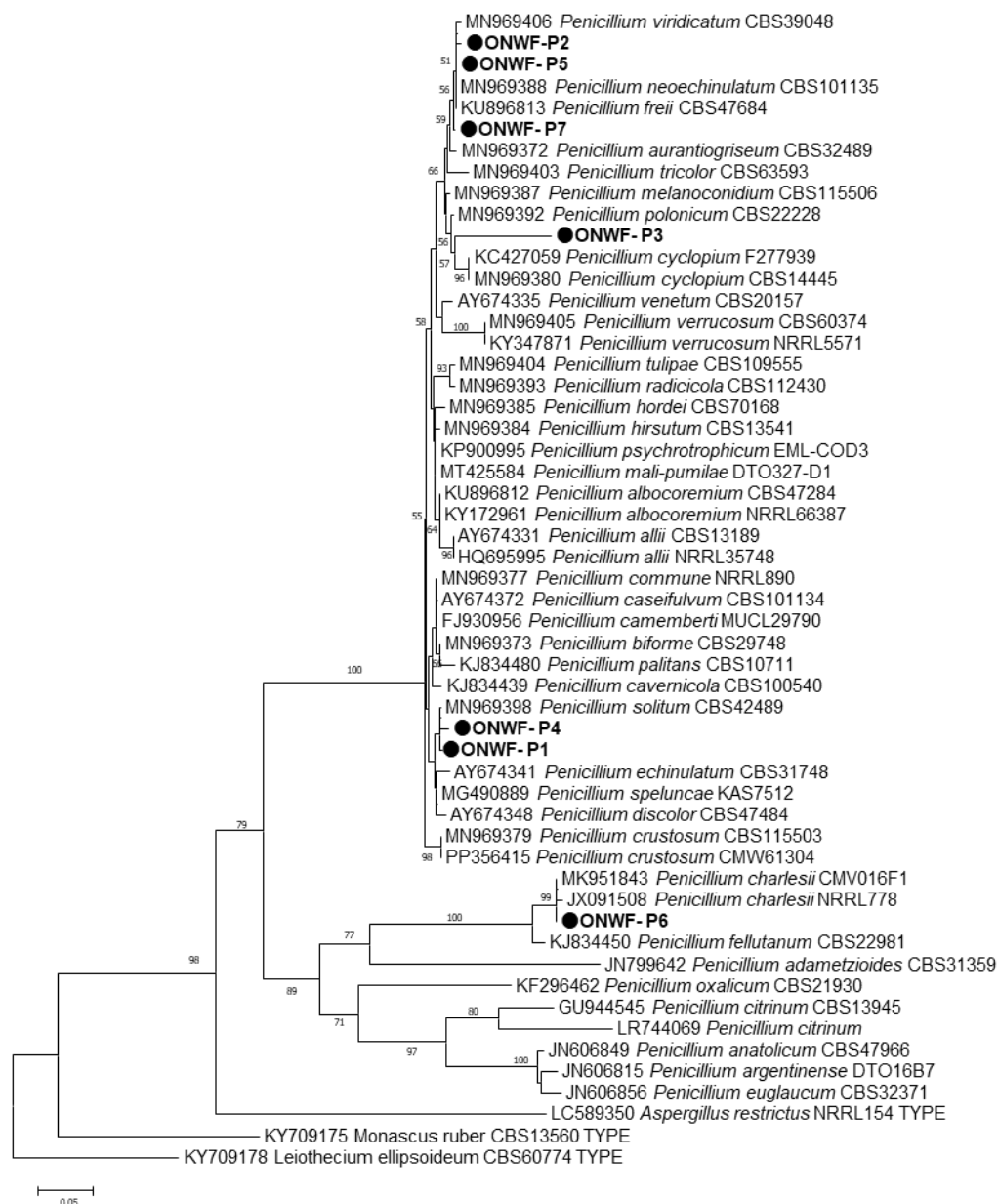


図3. オクラトキシンA自然汚染小麦粉から単離された*Penicillium*属菌株の分子系統樹

β -tubulin遺伝子塩基配列を指標とし、近隣結合法を用いて構築した。Houbranken et al. 2020に示された*Penicillium*属内種間の系統関係を参照して、*Penicillium*属菌種の β -tub塩基配列をGenbankからダウンロードして収集しリファレンス配列とした。本研究で得た単離株は菌株名に●を付した。各クレードの単系統性を支持するBP値は50%以上の値のみ示した。

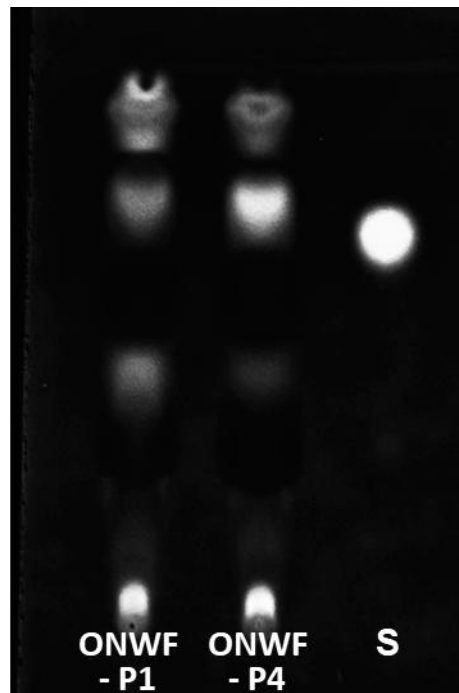


図4. オクラトキシンA自然汚染小麦由来*Penicillium*属菌株の培養液のTLC展開像

OTAと移動距離が類似した化合物が確認された2菌株のTLC展開像を示した。YES液体培地に菌を接種し、5日間培養後、培養物の抽出物をTLCで展開した。S; オクラトキシンA標準品 50 mg/L。

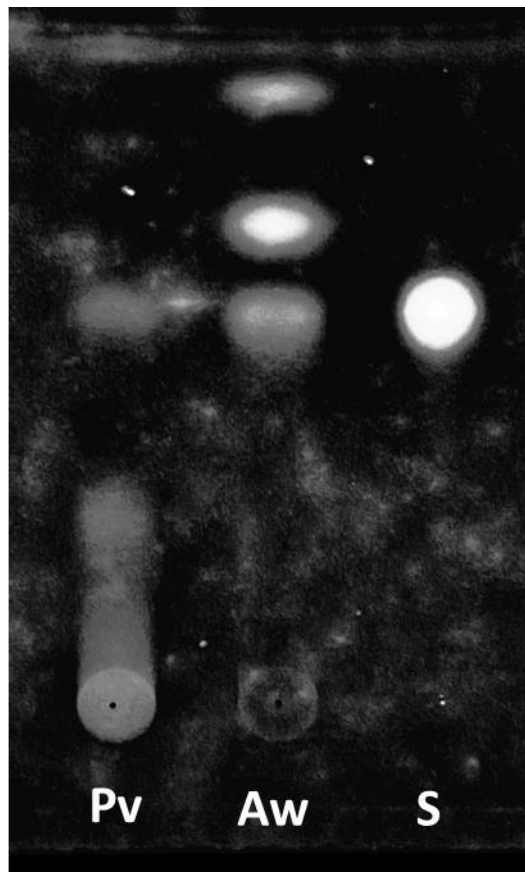


図5. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株および
Aspergillus westerdijkiae NIHS 3985株の培養物の
TLC展開像

YES液体培地に菌を接種し、5日間培養後、培養物の抽出物をTLCで展開した。

Pv; *P. verrucosum* NHL 6478、Aw; *A. westerdijkiae* NIHS 3985、S; オクラトキシンA標準品 50 mg/L。

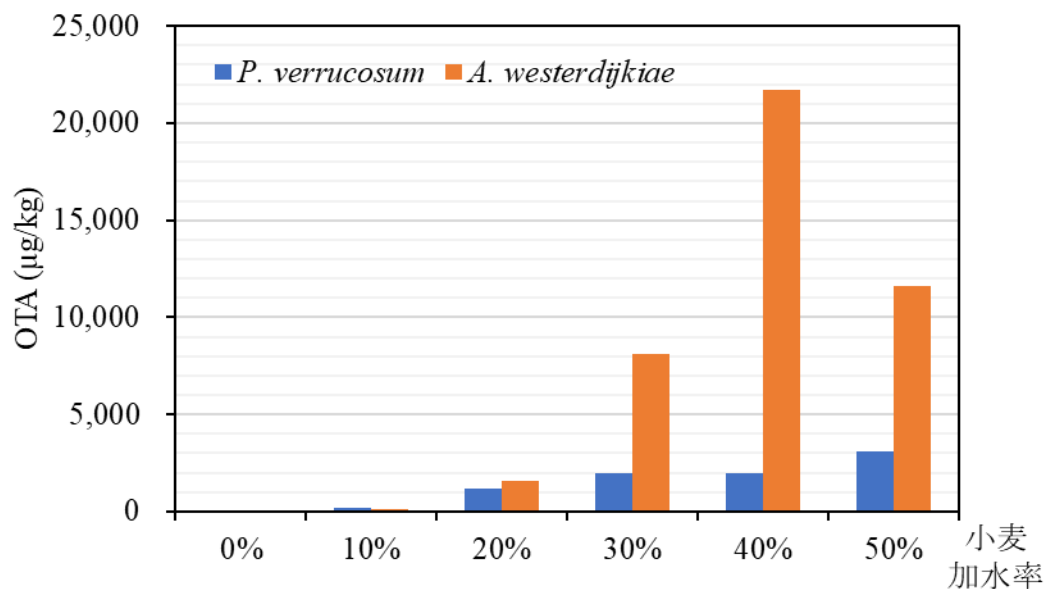


図6. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株および
Aspergillus westerdijkiae NIHS 3985株を接種した
小麦培養物でのOTA含有量の変化

小麦への加水率を10～50%で設定し、培養温度25℃、培養期間2週間での培養後の小麦におけるオクラトキシンAの検出濃度を示す。1培養条件につき1回の実験を実施した。

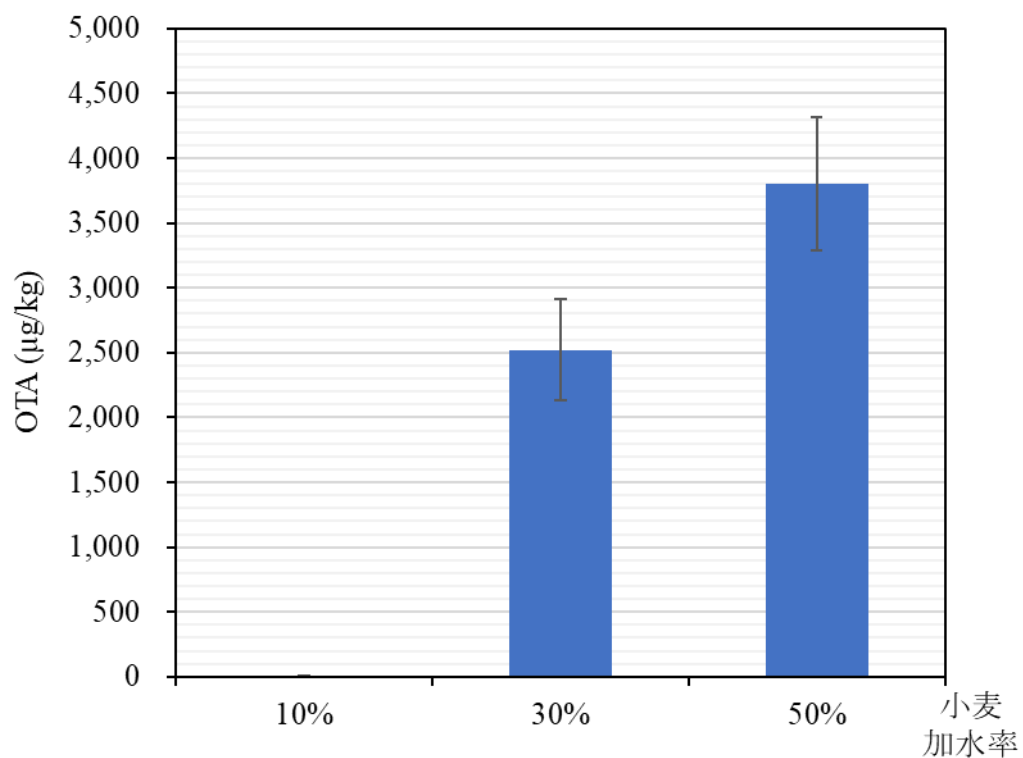


図7. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株を接種した小麦培養物でのOTA含有量の変化

小麦への加水率を10～50%で設定し、培養温度25℃、培養期間2週間での培養後の小麦におけるオクラトキシンAの検出濃度を示す。1培養条件につき3回の繰り返し実験を実施した。

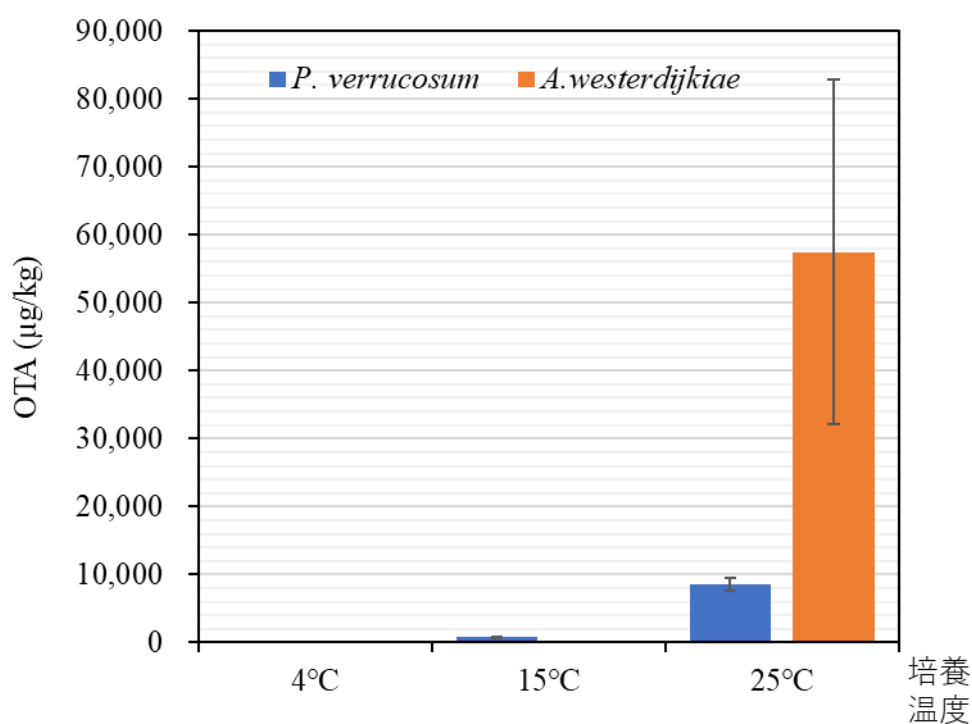


図8. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株および *Aspergillus westerdijkiae* NIHS 3985株を接種した小麦培養物でのOTA含有量の変化

培養温度を4、15または25°Cで設定し、加水率50%、培養期間2週間での培養後小麦におけるオクラトキシシンAの検出濃度を示す。1培養条件につき3回の繰り返し実験を実施した。

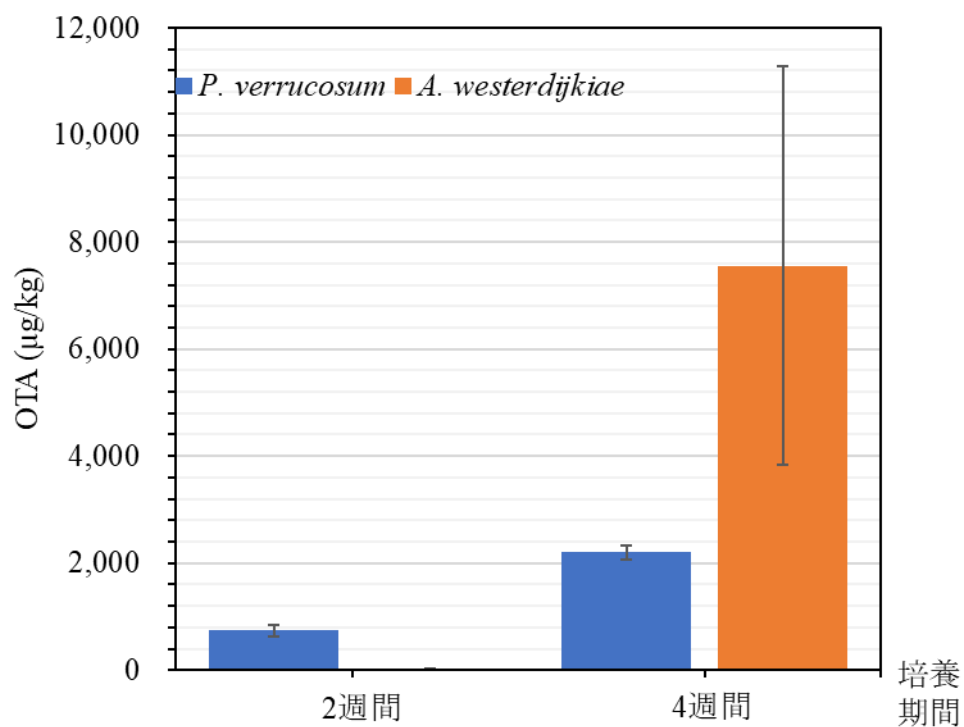
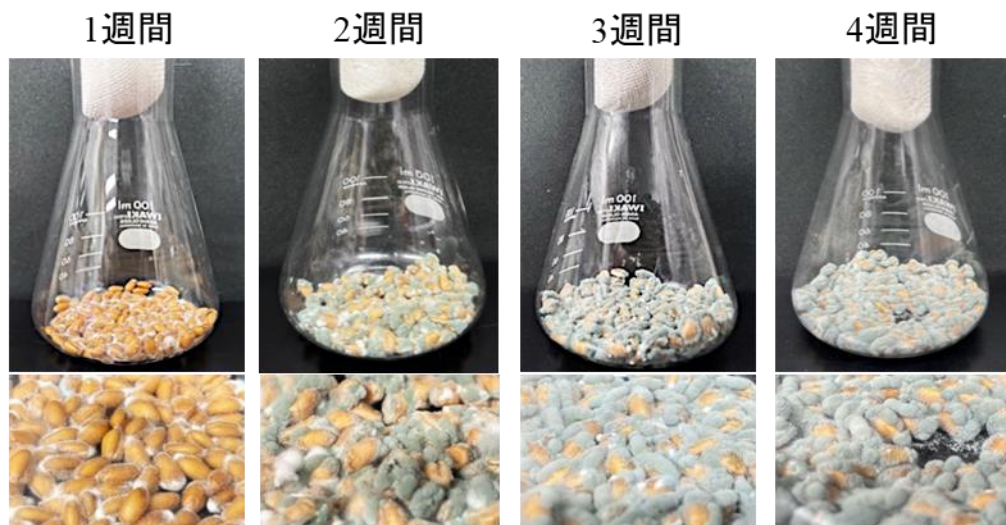


図9. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株および
Aspergillus westerdijkiae NIHS 3985株を接種した
小麦培養物でのOTA含有量の変化

培養温度を15℃で設定し、加水率50%、培養期間2
または4週間での培養後小麦におけるオクラトキシ
ンAの検出濃度を示す。1培養条件につき3回の繰り
返し実験を実施した。

a. *Penicillium verrucosum* NBRC 301081



b. *Aspergillus westerdijkiae* NIHS 3985

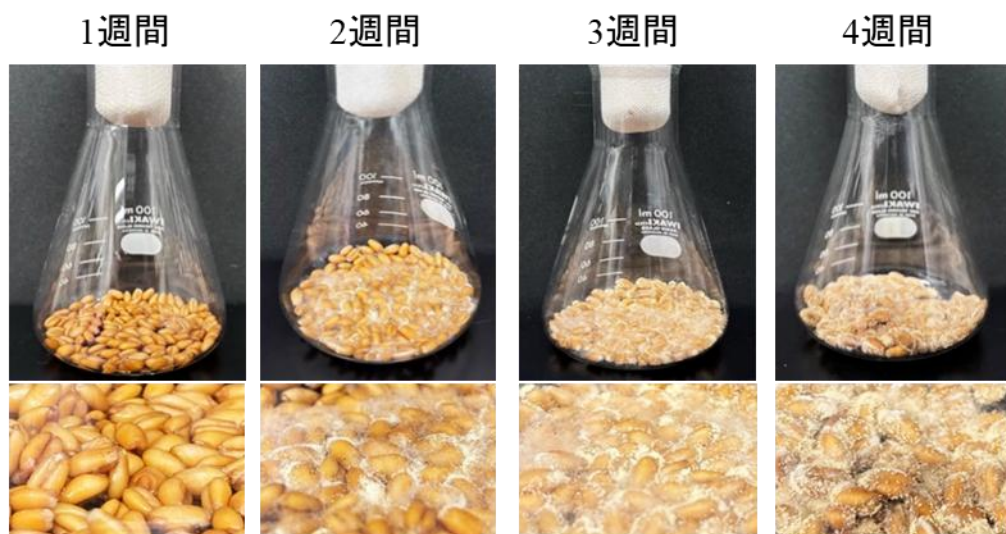


図10. *Penicillium verrucosum* NBRC 301081株および
Aspergillus westerdijkiae NIHS 3985株を接種した
小麦培養物での菌体発育の経時的変化

培養温度を15℃で設定し、加水率50%、培養期間最大4週間で小麦における菌体発育程度を経時的に比較した。写真上部；培養容器全体、写真下部；培養小麦の拡大図。

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

分担研究報告書

毒性試験 (マウスにおけるモニリフォルミンの腎毒性機序解明試験)

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に、令和 4 年度及び 5 年度にマウスを用いた MON の単回投与試験と一般毒性試験をそれぞれ実施したところ、腎臓にそれぞれ尿細管壊死と再生尿細管が誘発された。そこで令和 6 年度では、MON による腎毒性の発現機序を検討することを目的として、MON 単回投与後の腎臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析を実施した。MON を 40 mg/kg 体重で単回投与した後の腎皮質における RNA シーケンシング解析により、*Cyp3a13*、*Cyp26b1*、*Cyp4f15* などの代謝反応関連遺伝子、及び酸化ストレス関連遺伝子 *Gpx7* の発現が上昇することが明らかになった。IV 型 collagen に対する免疫組織化学的解析では、MON 投与による壊死尿細管において基底膜の保持が確認された。これらの結果は、MON はマウスの腎臓を標的とし、経口摂取された MON は、腎臓で代謝され、活性中間体や活性酸素種が腎尿細管毒性を誘発し、近位尿細管壊死を引き起こす可能性が示唆された。

A. 研究目的

カビ毒はカビが感染した農作物中に生産され、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いる。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述の 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軽微な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、マウスにおける MON の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。昨年度までにマウスを用いた MON の単回投与試験、14 日間反復投与試験、及び 28 日間反復試験を実施したところ、単回投与試験では腎臓皮質深部における急性尿細管壊死、14 日間及び 28 日間反復投与試験では同部位における再生尿細管が認められ、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。今年度は MON による腎毒性の発現機序を検討することを目的とし、MON 単回投与後の腎臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析を実施した。

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。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。

群構成は溶媒対照群 (6 匹) 及び MON 40 mg/kg-投与群 (12 匹) の 2 群構成とした。溶

媒は Milli-Q 水を用いた。実験期間中は一般状態の観察を行い、投与から 6 時間後に各群 6 匹を剖検し、腎臓を採材して重量を測定した後、半割して一方を組織学的検査に、もう一方を遺伝子発現解析に供した。投与から 24 時間後に MON 投与群の残りの 6 匹を剖検し、腎臓を採材して重量を測定した後、半割して一方を組織学的検査に、もう一方を免疫組織化学的解析に供した。

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。

病理組織学検査

被験液投与 6 及び 24 時間後の半割した腎臓をリン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド液で固定した。標準の手順でパラフィン包埋して H・E 染色標本を作製し、鏡検を実施した。

遺伝子発現解析

MON による代謝関連遺伝子の転写レベルの発現変化を検出するために、溶媒対照群と MON 投与群の腎臓サンプルを用いて遺伝子発現解析を実施した。メタカーン固定した腎臓から、Fig. 1 に示すように皮質組織を採材し、RNeasy Mini キット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA は、RNA-Seq 解析 (N=6/グループ、1 サンプルとしてプール) に使用した。TruSeq stranded mRNA LT Sample Prep Kit (イルミナ株式会社) を用いて、メーカーのプロトコルに従ってサンプル調製を行い、配列決定には Illumina NovaSeq 6000 を用いた。溶媒対照群と比較して Fold Change (絶対値) ≥ 2 かつ P-value < 0.05 で発現量が増加または減少してい

る遺伝子を選別し、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) により Gene Ontology に基づく機能アノテーション解析を行った。

免疫組織化学的解析

壊死尿細管における基底膜の有無を確認するために、一次抗体として IV 型 collagen (1:100 希釈; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; Cat. No. PA1-28534) を用いた。抗原性賦活化処理として、クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 121°C, 10 分の条件で熱処理を加えた。一次抗体の添加前に 0.3% 過酸化水素を含むメタノール中に 30 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。シグナル検出は Vectastain® Elite ABC kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を用い、3,3'-diaminobenzidine/過酸化水素を用いて可視化した後、ヘマトキシリンで対比染色を施し、鏡検に供した。

統計解析

計量データについて溶媒対照群と MON 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、Dunnett の検定あるいは Bonferroni 補正を用いた Aspin-Welch の *t* 検定を行った。統計解析には IBMSPSS Statistics ver. 25 (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 (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

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。

腎臓重量

いずれの群においても変化は認められなかった (Table 1)。

病理組織学検査結果

被験液投与 6 時間後では、溶媒対照群と MON 投与群のいずれにおいても明らかな病理組織学変化は認められなかった。MON 投与 24 時間後では、2 例の皮質に尿細管壊死が認められた (Fig. 2)。

RNA-Seq 解析データ

MON 投与群では、溶媒対照群と比較して、397 遺伝子の発現が増加し、321 遺伝子の発現が減少した。遺伝子オントロジーに基づく機能アノテーション解析により、MON を 40 mg/kg 体重で単回経口投与した 6 時間後に発現が有意に増加した遺伝子は、多くの機能グループを形成していることが明らかになった。腎皮質で発現が増加した代表的な遺伝子クラスターは、外部刺激に対する応答、すなわち、*Ces1g*、*Cyp26b1*、*Plxna3*、*Ren1*、*Rest*、細胞移動、すなわち、*Egr1*、*Plxna3*、*Rnd1*、免疫系プロセスの制御、すなわち、*Cyp26b1*、*P4htm*、*Tnfrsf13b*、脂質結合、すなわち、*Cyp4f15*；レチノイド代謝プロセス、ジテルペノイド代謝プロセス、およびテルペノイド代謝プロセス、

すなわち *Cyp26b1*、*Cyp3a13*、および *Ttr*；ステロイド代謝プロセス、すなわち *Ces1g*、*Cyp26b1*、*Cyp3a13*、*Egr1*、*Hsd17b14*、および *Rest*；同一タンパク質結合、すなわち *Apobec2*；および細胞外領域、すなわち *Gpx7* が含まれていた (Table 2)。発現が減少した遺伝子群に、特徴的な遺伝子は含まれていなかった。

免疫組織化学的解析結果

MON 投与群で認められた壊死尿細管において IV 型 collagen 陽性を示す基底膜が観察された (Fig. 2)。

D. 考察

MON の急性経口毒性試験では、40 mg/kg 体重以上の MON を投与されたマウスの腎皮質に、局所的な近位尿細管壊死が散見された。80 mg/kg 体重の MON を単回投与したところ、5 匹中 4 匹に死亡または瀕死がみられたことから、MON の毒性による急性心不全の誘発が示唆された。急性心不全は、急性尿細管壊死または腎皮質壊死を引き起こすことが知られている (Di Lullo et al., 2017)。しかし、全身循環障害に起因するこれらのタイプの尿細管壊死は、尿細管基底膜の破壊の有無にかかわらず、近位尿細管の不規則な壊死 (急性尿細管壊死) または両側皮質の全部または一部の壊死 (腎皮質壊死) をもたらす可能性がある (Cianciolo and Mohr, 2015)。したがって、本研究における MON 投与後の局所的尿細管壊死の分布における散在パターンは、有効循環血量の低下に起因する虚血性の尿細管壊死とは区別される。さらに、14 日間及び 28 日間の反復経口投与毒性試験では、40 mg/kg 体重 MON/日の投与により、腎皮質における尿細管再生の発生頻度の増加が認められた。しかし、これらの試験では、尿細管基底膜の破壊による尿細管再生不全の結果を示唆する線維化変化は認められな

かった。

今年度は、昨年度までに見出した MON の腎毒性について、40 mg/kg 体重の MON 単回投与後の遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析によってその発現機序を検討した。免疫組織化学的解析の結果、壊死した尿細管における尿細管再生に不可欠な IV 型 collagen の基底膜の免疫反応性は、MON の単回投与後も保持されていた。この再生能力の主要な決定因子は、尿細管基底膜の維持であり、これは低灌流由来の虚血性傷害後よりも、毒性由来の傷害後の方で保持され易いことが知られている (Breshears and Confer, 2016)。これらの所見から、マウスに MON を反復投与した後の近位尿細管再生は、代謝活性化により誘発された MON 毒性により、反復投与初期に急性尿細管壊死が生じた後遺症である可能性が示唆された。

MON 投与から 6 時間後の腎臓における遺伝子発現解析では、*Cyp3a13*、*Cyp26b1*、*Cyp4f15* などの代謝反応に関連する遺伝子や酸化ストレスに関連する *Gpx7* が発現増加を示した。シトクロム P450 (CYP) は様々なカビ毒の生体内変換に寄与することが知られている。カビ毒とその代謝物が細胞内に蓄積すると酸化ストレスが生じ、多くの重要な細胞プロセスに影響を及ぼす (Wen et al., 2016)。マウス肝臓では、CYP3A13 はアフラトキシン B₁ の生物活性化を触媒する重要な酵素であり、反応性で求電子性のエキソアフラトキシン B₁-8,9-エポキシドを生成する (Yanagimoto et al., 1994)。CYP26B₁ はオールトランス-レチノイン酸のクリアランスに関与し (Isoherranen and Zhong, 2019)、CYP4F15 はアラキドン酸カスケードにおいて重要な CYP4F サブファミリーのメンバーである (Kalsotra and Strobel, 2006)。*Gpx7* にコードされるグルタチオンペルオキシダーゼ 7 は、様々なストレスに応答してジスルフ

イド結合をシャットリングすることにより、その相互作用タンパク質にシグナルを伝達するストレスセンサー／伝達物質として機能する（Chen et al., 2016）。MON の代謝に関与する CYP はまだ特定されていないが、腎尿細管で MON が代謝される際に生成される活性中間代謝物や活性酸素種による毒性が、MON 投与により誘発される近位尿細管壊死の原因である可能性がある。また、昨年実施した 28 日間の試験では、40 mg/kg 体重 MON/日を投与したマウスで、肝臓の絶対重量の増加とともに、中心小葉肝細胞の肥大が観察された。多くの有害物質は、数日間の連続投与により、肝臓のミクロソームで CYP を含む代謝酵素の産生を誘導することが知られている（Amacher et al., 1998）。したがって、経口投与された MON は、肝細胞だけでなく、近位尿細管上皮細胞でも代謝される可能性があり、活性中間体や活性酸素種が尿細管毒性を引き起こすかもしれない。

E. 結論

MON を 40 mg/kg 体重 単回投与した後の腎皮質における網羅的遺伝子発現解析により、代謝反応関連遺伝子、及び酸化ストレス関連遺伝子の発現上昇が明らかになった。IV 型 collagen に対する免疫組織化学的解析の結果、MON 投与による壊死尿細管において基底膜の保持が確認された。これらの結果から、

MON がマウスの腎臓を標的とし、経口摂取された MON は、腎臓で代謝され、活性中間体や活性酸素種が腎尿細管毒性を誘発し、近位尿細管壊死を引き起こす可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ojira, R., Zou, X., Yamagata, H., Ebizuka, Y., Kobayashi, M., Kigata, T., Tang, Q., Yoshida, T., Tomoya Yoshinari, T., Shibutani, M.: Emerging mycotoxin moniliformin induces renal tubular necrosis after oral exposure in mice. Food Chem. Toxicol. 19:115336, 2025.

2. 学会発表

該当なし

H. 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

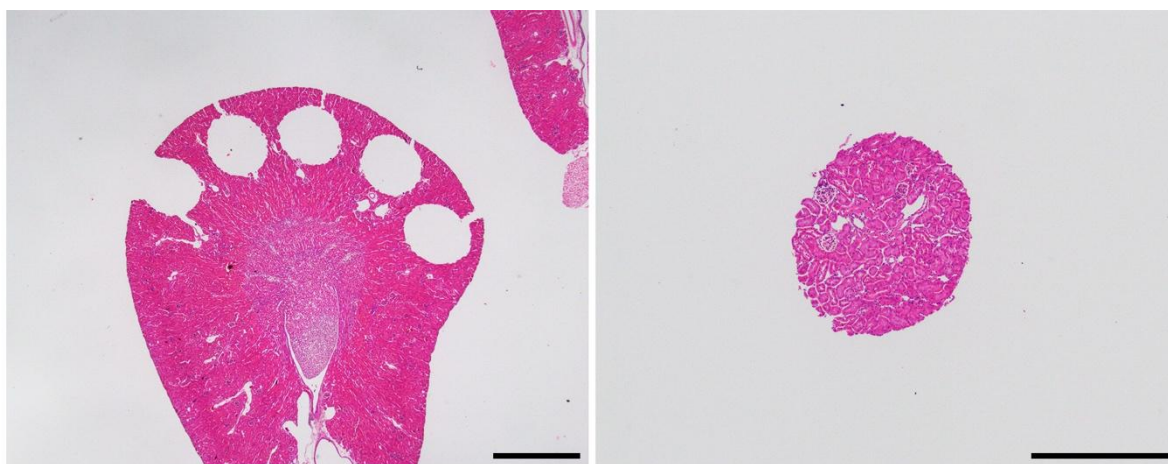


Fig. 1

ヘマトキシリン・エオジンで染色した解剖後の腎臓。遺伝子発現解析のための腎皮質のサンプリングは、パンチ生検器具装置を用いて行った。

左図: 拡大率 $\times 12.5$ (bar = 1 mm)。右図: 拡大率 $\times 40$ (bar = 500 μm)

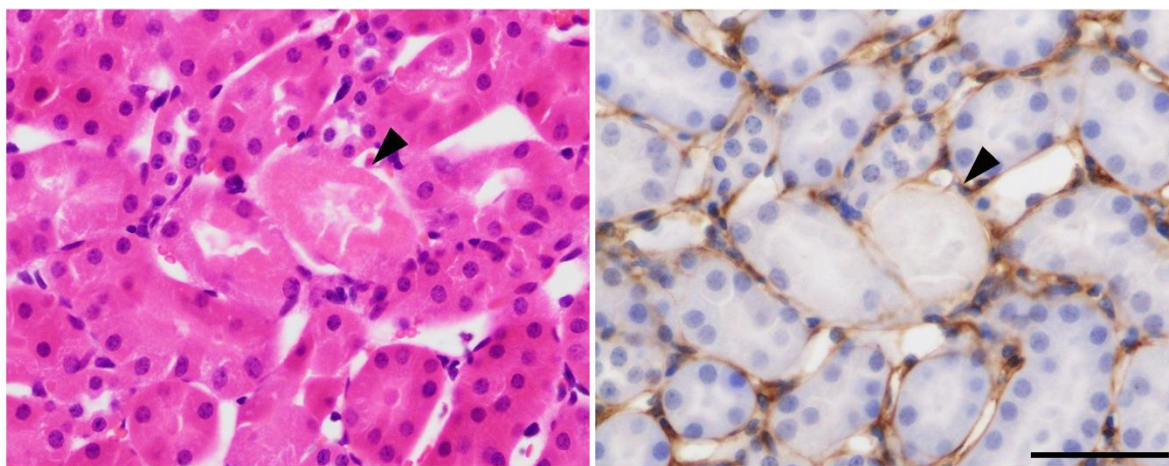


Fig. 2

MON を単回経口投与したマウス腎臓の壊死を示す尿細管の代表的な画像。左のパネル：ヘマトキシリン・エオジン染色、右パネル：コラーゲン 4 の免疫反応性。矢印は壊死した尿細管を示す。拡大率 $\times 400$ (バー = $50\mu\text{m}$)

Table 1

CD1(ICR)雄マウスに MON を単回経口投与した後の腎臓重量

After dosing	Vehicle controls			MON-treatment groups					
	6 h			6 h			24 h		
No. of animals examined	6			6			6		
Kidney weight ^a (g)	0.45	±	0.05	0.43	±	0.04	0.47	±	0.03

MON : moniliformin.

^a Mean ± SD.

Table 2

MON 単回経口投与後の CD1(ICR)雄マウスの腎臓において、発現量が増加した代謝反応に関連した遺伝子のリスト

Gene symbol	Description	log ₂ (fold-change)	P-value
Response to external stimulus			
<i>Ces1g</i>	Carboxylesterase 1G	2.406	< 0.001
<i>Cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	2.767	< 0.001
<i>Plxna3</i>	Plexin A3	2.497	0.001
<i>Ren1</i>	Renin 1 structural	2.924	< 0.001
<i>Rest</i>	RE1-silencing transcription factor	2.709	< 0.001
Cell migration			
<i>Egr1</i>	Early growth response 1	2.311	< 0.001
<i>Plxna3</i>	Plexin A3	2.497	0.001
<i>Rnd1</i>	Rho family GTPase 1	4.227	< 0.001
Regulation of immune system process			
<i>Cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	2.767	< 0.001
<i>P4htm</i>	Prolyl 4-hydroxylase, transmembrane (endoplasmic reticulum)	2.497	0.002
<i>Tnfrsf13b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b	2.215	0.025
Lipid binding			
<i>Cyp4f15</i>	Cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 15	2.311	0.007
Retinoid metabolic process, diterpenoid metabolic process, terpenoid metabolic process			
<i>Cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	2.767	< 0.001
<i>Cyp3a13</i>	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13	2.469	< 0.001
<i>Ttr</i>	Transthyretin	34.555	< 0.001
Steroid metabolic process			
<i>Ces1g</i>	Carboxylesterase 1G	2.406	< 0.001
<i>Cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	2.767	< 0.001
<i>Cyp3a13</i>	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13	2.469	< 0.001
<i>Egr1</i>	Early growth response 1	2.311	< 0.001
<i>Hsd17b14</i>	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14	4.663	< 0.001
<i>Rest</i>	RE1-silencing transcription factor	2.709	< 0.001
Identical protein binding			
<i>Apobec2</i>	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 2	7.384	< 0.001
Extracellular region			
<i>Gpx7</i>	Glutathione peroxidase 7	2.037	0.008

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
Ojiro, R., Zou, X., Yamagata, H., Ebizuka, Y., Kobayashi, M., Kigata, T., Tang, Q., Yoshida, T., Tomoya Yoshinari, T., Shibutani, M.:	Emerging mycotoxin moniliformin induces renal tubular necrosis after oral exposure in mice.	Food Chem. Toxicol.	19	115336	2025

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☒	☐		☐
	☐	☒	☐		☐
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）	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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6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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:利益相反ポリシー)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		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）	☐ ☒	☐		☐
	☐ ☐	☐		☐
	☐ ☐	☐		☐
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：)	☐ ☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。