

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4～6年度 総合研究報告書

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 -----	8
吉成 知也	
2. オクラトキシン A の簡易分析法の検討 -----	17
服部 一夫	
3. 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及び 小麦における OTA 汚染原因菌の究明 -----	20
渡辺 麻衣子	
4. マウスにおけるモニリフォルミンの毒性試験 -----	27
渋谷 淳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	38

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 (2022～2024 年度)

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

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」を行った。研究代表者の吉成は、2022 年度と 2023 年度には、同時分析法の開発と妥当性評価を、2024 年度には、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。これらの結果より、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。研究分担者の服部は、2022 年度には ELISA キット 4 種、2023 年度にはイムノクロマトキット 6 種の市販品の性能評価を行い、2024 年度には OTA の人工汚染小麦及び大麦を用いて、機器分析法の測定値との相関を検討した。その結果、一部のキットは OTA のスクリーニングに使用可能であることが示された。研究分担者の渡辺は、2024 年度に小麦における OTA 汚染原因菌について検討を行い、貯蔵中小麦の 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を示した。

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。吉成は、2022 年度と 2023 年度に穀類中の MON の分析法を開発し、2024 年度には合計 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 は麦類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。研究分担者の渋谷は、2022 年度にマウスを用いた MON の単回投与試験を、2023 年度にはマウスを用いた MON の 28 日間反復投与による一般毒性試験を実施した。さらに 2024 年度には、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。これらの結果から、MON はマウスにおいて腎臓を標的とすることが示唆された。渡辺は、2022 年度と 2023 年度に MON 生産菌について検討した。その結果、国内に流通する小麦、ライ麦及びトウモロコシから MON 生産株を検出し、MON 産生性 *Fusarium* 属菌の汚染状況を明らかにした。

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、保管中の小麦での *Aspergillus* 属菌と *Penicillium* 属菌による OTA の汚染動態を解析する。

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、マウスを用いた毒性試験、及び MON 産生菌の分布の解析を行う。

研究方法、結果、考察、結論については、各分担研究報告書に詳細が記載してあるため、以下には概略のみ記載した。

B. 研究方法

(1) 基準値設定に係るカビ毒に関する研究

①多機能カラムを用いた DON と OTA の同時精製法

人工共汚染小麦 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、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、500 μ L を新たな 1.5 mL 容マイクロチューブに移した。精製水 500 μ L 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。

②OTA の簡易分析法の検討

3 濃度の添加回収試験により、市販の 4 種の ELISA キット、6 種のイムノクロマトキットについて、性能を評価した。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。

③OTA 生産菌の小麦上での生産条件の検討

OTA 産生性が確認された *P. verrucosum* NBRC 30181 及び *A. westerdijkiae* NIHS 3985 を用いて、加水率、温度、培養時間を変更した 4 条件で小麦培地で培養し、OTA 産生量を調べた。

(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

投与する MON は超純水に水に溶解した。雄性 Crl:CD1(ICR)マウス (5 週齢) を試験に使用した。

③穀類中の MON 生産菌の解析

国内に流通する穀物検体のうち、100 μ g/kg 以上の濃度で MON に汚染されている検体を選抜し、*Fusarium* 属菌分離実験に使用した。各穀物検体 70 粒程度を 70%エタノールで表面洗浄後、滅菌蒸留水でリンスし、得られた洗浄済み穀物の水分を除去後、DRBC 平板培地上で培養した。培養後 *Fusarium* 属コロニーを PDA 平板培地へ釣菌して培養し、単離菌株とした。それら菌株について、MON 高生産培養条件を用いて培養し、培養液中の MON を HPLC-DAD 法で検出し、各株の MON 生産性を評価した。

C. 研究結果及び考察

(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

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。9 機関の測定値から得られた DON と OTA の回収率、 RSD_r 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。次に、この同時分析法が、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、人工汚染小麦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 と OTA とともに単独で分析した際の値と同時分析法による分析値は同等であった。この結果から、本事業で開発した多機能カラムを用いた同時分析法は、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。

②OTA の簡易分析法の検討

2022 年度に ELISA キット、2023 年度にイムノクロマトキットについて、添加回収試験による性能評価を行った。良好な結果が得られた 4 キットを選抜し、2024 年度には人工汚染麦類で性能を評価した。機器分析で得られた測定値とキットによる測定値の相関係数は良好であり、いずれのキットでも 0.96 を上回った。このことから、2024 年度に性能評価を実施した 4 キットはスクリーニングに使用可能であると考えられた。

③OTA 生産菌の小麦上での生産条件の検討

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 含有量は最大となり、一方 *A. westerdijkiae* NIHS 3985 では含水率 40% で最大となった。温度 15℃ で小麦への加水率 50% で 4 週間培養した結果、*P. verrucosum* NBRC30181 と *A. westerdijkiae* NIHS 3985 の両株において、高濃度の OTA 産生性が認められた。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

単一試験室にて実施した MON の添加回収試験の結果は、いずれもクライテリアを満たしたことから、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。この分析法を用いて、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。ただ、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。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。

②MON の毒性試験

今回の雄マウスを用いた 28 日間試験では、腎臓で観察された変化に基づいて、最小毒性量（LOAEL 及び NOAEL）が決定された。すなわち、40 mg/kg 体重 MON/日 で尿細管再生が誘導され、腎臓の絶対重量の増加とともに、MON の単回投与後の尿細管壊死との関連が示唆された。MON (≥ 20 mg/kg 体重/日) も腎臓の絶対重量を増加させたが、これは近位尿細管上皮細胞の代謝活性化に関連している可能性がある。したがって、雄マウスに 28 日間反復経口投与した後の MON の LOAEL 及び NOAEL は、それぞれ 20 mg/kg 及び 10 mg/kg 体重/日であった。

③穀類中の MON 生産菌の解析

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。

D. 結論

麦類中の OTA については、厚生労働省の審議会において基準値が設定されることが 2023 年 12 月に決定された。基準値の設定と同時に公定法を通知する必要がある。本事業の一つ目のテーマ「基準値が設定されるカビ毒に関する研究」で開発した DON と OTA の同時分析法は、公定法として将来的に通知されることとなり、効率的な検査体制の構築に大きく貢献する。また、OTA については、実態調査の結果を踏まえると陰性検体が多数を占めることが予想され、迅速なスクリーニング法による効率的な検査の実施が望まれる。本研究で実施した市販の OTA 測定用キットの検討は、OTA の検査において簡易検査法の採用が可能かどうかの判断根拠となるデータを提供し、公定法の策定に大きく貢献する。二つめのテーマ「新興カビ毒 MON についての研究」が対象とする MON については、EFSA においてリスク評価が行われたものの、ヨーロッパ以外の地域における汚染実態や毒性のメカニズムに関する情報が不足しており、十分な評価がなされたとは言えない状況にある。そのため、本研究が提供する汚染実態、産生菌種や毒性に関する用量依存性等の結果は、今後 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。

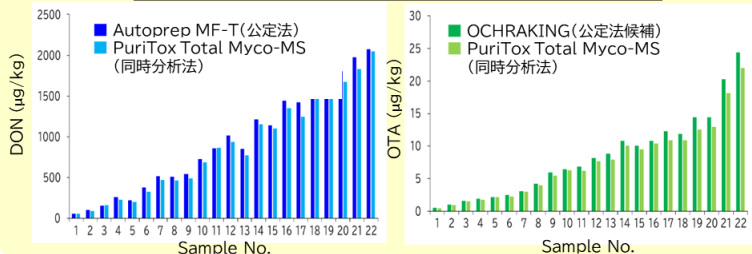
本研究の成果の概要-1

「テーマ①基準値が設定されるカビ毒に関する研究」の結果

1) デオキシニバレノールとオクラトキシンAの 同時分析法の開発

DONとOTAの人工共汚染小麦を調製し、公定法で個別に測定した場合の測定値と同時分析法の測定値を比較した。

同時分析法と個別分析法の分析値の比較結果

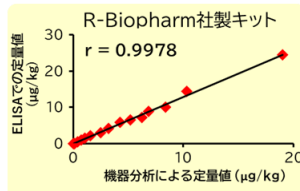


→開発した同時分析法は、公定法とほぼ同等の測定値が得られ、実用化可能なものであることが明らかとなった。

2) 市販のOTA測定用簡易迅速キットの性能評価

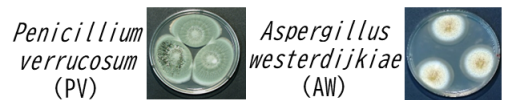
ELISA及びイムノクロマトキット2製品ずつで、OTA人工汚染麦の分析を行い、機器分析による測定値と比較した。

→機器分析の結果と相関性の高い分析値が得られ、検査法として利用可能であることが明らかとなった。

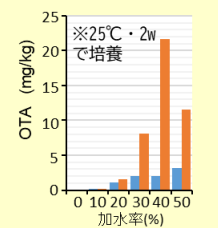


3) 小麦におけるOTA汚染機構の 解明

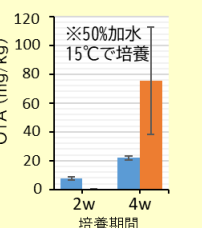
食品におけるOTA汚染の主な原因菌の2菌種を用いて、OTA産生条件を検討



①小麦への加水率の影響



②低温下における検討



貯蔵温度が低温でも、小麦の含水量が十分かつ貯蔵期間が長期の場合、両カビによるOTA汚染が生じる可能性がある。

→小麦のOTA汚染のリスク因子を明らかにした。

本研究の成果の概要-2

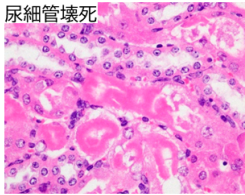
「テーマ②モニリフォルミンに関する研究」の結果

1) MONの毒性試験

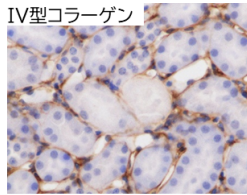
MONの腎毒性の作用機序を明らかにするために、マウスにMONを40 mg/kg単回経口投与し、6時間後の腎皮質でRNA-Seq解析、24時間後の腎臓でIV型(基底膜)コラーゲンの免疫染色を実施した。

- 6時間後では、代謝反応や外因性因子に対する応答に関連した遺伝子(*Cyp3a13*, *Cyp26b1*, *Cyp4f15* など)が上方制御された。
- 24時間後では、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。

尿細管壊死



IV型コラーゲン



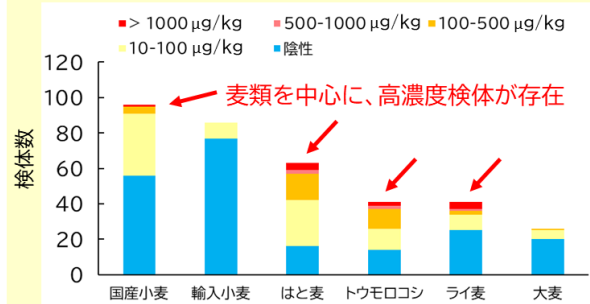
MONの腎毒性の機構は、MON又はその代謝産物が尿細管細胞を直接障害することによるものであることが示唆された。

→3年間でMONが腎毒性を有することを明らかにし、リスク管理に必要な情報の取得が完了。

2) MONの分析法の開発と汚染調査

昨年度までに開発・妥当性の検証を行った分析法を用いて、国内に流通する穀類(小麦、大麦、ライ麦、はと麦及びコーン、米)合計399検体におけるMON汚染濃度を調べた。

各穀類におけるMONの汚染濃度の分布



国産の小麦粉で1 mg/kgを超える濃度のMONが検出される検体があり、小麦製品がMONのばく露源となっている可能性が考えられた。しかし、急性毒性をもたらすレベルではないことが確認された。
→食品中のMON濃度を規制する必要があるか否の判断のための科学的根拠の取得が完了。

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、効率的な検査体制の構築に寄与するために、小麦における DON と OTA の同時分析法の開発を行った。2022～23 年度において、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。国内の 8 分析機関による多機関共同試験を実施した結果、得られたパラメーターはクライテリアを満たしたことから妥当性が確認された。さらに、2024 年度には、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、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。2023 年度に、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。2024 年度には、その分析法を用いて穀類加工品 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。

A. 研究目的

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

日本においては、リンゴジュース中のパツリン、小麦玄麦中のデオキシニバレノール (DON)、全食品中の総アフラトキシン及び乳中のアフラトキシン M₁ に対して規制が行われている。また、コーデックス規格が定められているオクラトキシン A (OTA) やフモニシンに関しては、これまでの厚生労働科学研究で汚染実態調査が行われており、それらについては食品安全委員会においてリスク評価が実施された。また、JECFA において毒性評価が行われたタイプ A トリコテセン系化合物 (T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-ジアセトキシスシルペノール)、ゼアラレノン (ZEN)、ステリグマトシスチン及びエンニアチン類についても汚染実態調査を行った。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。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。2024 年度には、人工汚染小麦を用いて、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。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、2024年度には国内流通食品の汚染実態調査を実施した。

B. 研究方法

(1) DON と OTA の同時分析法

①IAC を用いた DON と OTA の同時精製法

人工汚染試料 10 g に抽出溶媒アセトニトリル：メタノール：水 (1：1：2) 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 (49：1) 1 mL をカラムに注入し、自然落下で DON と OTA を溶出させた。溶出液が全て通過してから 5 分後、メタノール：酢酸 (49：1) 2 mL をカラムに注入した。アダプターを取り付けたシリンジでカラム担体内の溶媒を押し出した。窒素気流により溶出液を乾固後、残渣をアセトニトリル：水：酢酸 (30：70：1) 1.0 mL で溶解したものを試験溶液とした。

②MFC を用いた DON と OTA の同時精製法

人工汚染試料 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。

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：

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 μ L

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 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

④試験室間共同試験（2023 年度実施版）

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、②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

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。

⑤DON と OTA の人工共汚染小麦の調製

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碎機で破碎し、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 μ g/kg、OTA は 0.5~25 μ g/kg の濃度範囲で、計 22 検体調製した。

（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 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。

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 の同時分析法の開発

①多機関共同試験

共同試験に参加した 10 機関のうち、9 機関の

測定値を採用した。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_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 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_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人工汚染小麦による性能評価

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。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。

(2) MON の汚染実態調査

既報の方法を改良し、85%アセトニトリル水溶液で 3 回抽出を行い、抽出液を強陰イオン交換カートリッジで精製後にイオンペア剤を移動相に添加した HPLC で定量を行う方法を MON の分析に採用した。この分析法を用いて、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。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。

妥当性が確認された分析法を用いて、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 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

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。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 µg/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。

次に、この同時分析法が、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、小麦粒から汚染小麦を調製した。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 $\mu\text{g/kg}$ 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 の人工共汚染小麦について、単独の分析法と同時分析法の分析値を比較した結果、DON と OTA とともに公定法による分析値と同時分析法による分析値は同等であった。この結果から、本事業で開発した多機能カラムを用いた同時分析法は、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

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 $\mu\text{g/kg}$ ～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 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ で 15%以下、1 mg/kg で 11%以下とされている。本事業において実施した 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。

この分析法を用いて、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 $\mu\text{g/kg}$ 、最大値は 400 $\mu\text{g/kg}$ であった。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 $\mu\text{g/kg}$ で、冬小麦 61 サンプルの陽性率は 67.2%、最大濃度は 497 $\mu\text{g/kg}$ であった。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 $\mu\text{g/kg}$ 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

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。次に、こ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。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。開発した分析法の概要を別添 1 に示した。

MON の研究については、既報の方法を改良

し、5 倍量の 85%アセトニトリル水溶液による 3 回抽出を行い、陰イオン交換カートリッジで精製後に HPLC で定量する方法を開発した。分析法の性能を評価するために、麦類と米を用いて添加回収試験を行った結果、回収率は 83.7～105.2%の範囲内に収まり、良好であった。この分析法を用いて、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 の毒性も考慮に入ると、MON は日本人の健康に直ちに影響を与えるかび毒ではないと考えられた。

別添 1

多機能カラムPuriTox Total Myco-MSによる 小麦中のDONとOTAの同時精製法の概要

配布の小麦試料
(10g)

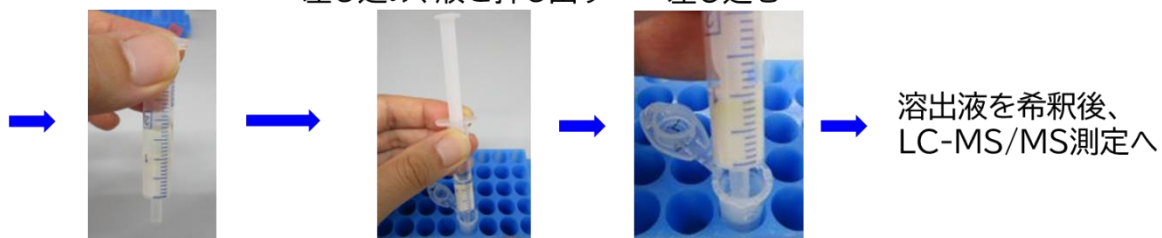
②30分間振盪(200rpm) ③10分程度静置し、
上清を分離する



④上清1.4mLを
カラムに添加する

⑤プランジャーを
カラムにゆっくり
差し込み、液を押し出す

⑥しっかりと
最後まで
差し込む



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

オクラトキシン A (OTA) は、穀類、木の実、香辛料、果実類などを汚染するカビ毒であり、小麦、大麦及びライ麦を対象にコーデックス規格が定められている。我が国でも実態調査の結果、輸入麦類等に汚染が検出されたため、食品衛生法における基準値が議論されている。

本研究事業の分担研究として、OTA の規格基準が設定されたのちに利用できるスクリーニングテストとして、迅速簡便法を検討した。現在市販されている OTA の迅速簡便法はイムノクロマト法(ラテラルフロー法)と ELISA 法の 2 種類がある。それぞれの市販品には 4~6 種類のキットがある。そこで、2022 年度は ELISA キット 4 種の市販品を対象に、小麦、大麦、ライ麦の非汚染試料を用いて、OTA の添加回収試験を行い、性能を検討した。2023 年度は、イムノクロマトキット 6 種の市販品を 2022 年度と同様に小麦、大麦、ライ麦の非汚染試料を用いて、OTA の添加回収試験を行い、性能を検討した。2024 年度は、前年度までの結果を踏まえて、良好な性能を示したものを ELISA キットとイムノクロマトキットからそれぞれ 2 種類選び、OTA の人工汚染小麦及び大麦を用いて、機器分析による測定値との相関を検討した。その結果、2024 年度で用いた 2 種の ELISA キット及び 2 種のイムノクロマトキットの測定値は、いずれも機器分析による測定値との相関係数が 0.96 以上であったことから、OTA のスクリーニング法として使用可能であると考えられた。

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、麦類、種実類、豆類を汚染し、発がん性や腎毒性を有するカビ毒である。産生菌は、*Aspergillus* 属及び *Penicillium* 属の両種である。

OTA は血清中タンパク質と結合し、体内に長時間残存することから、蓄積性のあるカビ毒として認識されている。また、畜産物への移行も報告されており、食品衛生的な対応が必要なカビ毒の 1 つである。国際的にはコーデックス規格が 2008 年に、小麦、大麦、ライ麦を対象に 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と定められている。諸外国では EU、韓国、中国などが様々な食品を対象に基準値を設定している。

日本では、2014 年に食品安全委員会から評価書が公表されており、非発がん毒性としての LOAEL は 8 $\mu\text{g}/\text{kg bw/day}$ であり、不確実係数 500 として TDI を 16 $\text{ng}/\text{kg bw}$ としている。一方、発がん性の NOAEL はラットの 2 年間発がん試験結果から 15 $\mu\text{g}/\text{kg bw/day}$ と評価し、不確実係数 1000 として 15 $\text{ng}/\text{kg/day}$ とした。JECFA では 100 $\text{ng}/\text{kg bw}$ を 1 週間の PTWI と設定している。EFSA では同じ 1 週間単位での TWI を 120 $\text{ng}/\text{kg bw}$ としている。

これらの評価をうけて、食品衛生法の規格基準が設定された場合を考慮し、スクリーニングに用いられる迅速簡便測定法を検討した。カビ毒の迅速簡便測定法は、すでに規制が行われている総アフラトキシン及びデオキシニバレノールを対象に検討されており、スクリーニングとして使用できるキットのガイドラインが通知されている。本分担研究は OTA 用の市販キットの性能を確認することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 材料

①添加回収試験に用いた麦類

LC-MS/MS で測定した結果、OTA が非検出

(0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満) の小麦、ライ麦及び大麦を研究代表者から供与された。

②人工汚染麦

研究代表者が調製した人工汚染小麦 16 検体及び大麦 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。

③ELISA キット

Neogen Veratox (Neogen 社)、Agra Quant (Romar 社)、Meizheng OTA (Meizheng 社)、RIDA SCREEN (R-Biopharm 社) の 4 種の ELISA キットを用いた。

④イムノクロマトキット

ROSA Ochratoxin Quantitative Test (Charm 社)、Ochra-Vertu TOUCH (Vicom 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 種類のキットを用いた。

(2) 麦類を用いた添加回収実験

ELISA 法及びイムノクロマト法の添加回収試験は、OTA 原液 (1 mg/L in アセトニトリル) を用いて実施した。OTA 非汚染麦類を 5 g 量とり、OTA 原液を 10 μL (最終濃度 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、25 μL (最終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、50 μL (最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 添加し、1 昼夜静置したのち、それぞれの試料とした。陰性対象としてアセトニトリル 50 μL (最終濃度 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を添加した試料を用いた。その後の抽出工程は、それぞれのキットのプロトコールに従って行った。ELISA キットの測定値からの濃度計算は、統計処理ソフト GEN 5 (Version 2.0, Biotek, Vermont, USA) を用いた。イムノクロマトキットでは、機器に付属している統計ソフトに基づいて濃度を計算した。

C. 研究結果

(1) ELISA キットの結果

2022 年時点において日本で入手可能な市販 ELISA キットを用いた。小麦、大麦、ライ麦を用いた添加回収試験により性能評価を行った。

その結果 RIDA SCREEN で回収率が最も高かった。Meizheng OTA では、大麦で回収率が 200%を超えたが、小麦、ライ麦では 100%程度の良好な結果が得られた。

(2) イムノクロマトキットの結果

2023 年時点において日本で入手可能な市販のイムノクロマトキットを用いた。小麦、大麦、ライ麦を用いた添加回収試験により性能評価を行った。定量用キット 5 種類のうち、小麦に使用できるキットは 5 種類 (3 $\mu\text{g/kg}$ を検出できるのは 4 種)、大麦に使用できるキットは 4 種類、ライ麦に使用できるキットは 2 種類 (3 $\mu\text{g/kg}$ を検出できるのは 1 種) であった。

(3) 人工汚染麦類を用いた性能検討結果

(1) 及び (2) の結果を踏まえて、スクリーニング検査に使用可能なキットを ELISA キット及びイムノクロマトキットを 2 種ずつ選択した。人工汚染麦類中の OTA 濃度は、機器分析 (HPLC 法) で測定し、その分析値とキットでの測定値の相関係数を求めた。その結果、4 キットとも相関係数は 0.96 以上であった。

D. 考察

食品衛生法での OTA の規格基準の設定に関する取り組みは進んでおり、現在厚労省での審議は終了し、最終段階の食品安全委員会の審議を待つのみとなっている。厚労省での審議では、OTA の基準値設定は妥当であり、汚染実態の結果から、規制対象は小麦及び大麦としている。この審議結果を受け、本事業では、2022 年度の ELISA キットの検討から 2 キット、2023 年度でのイムノクロマトキットの検討から 2 キットを選抜し、2024 年度には人工汚染麦類で性能を評価した。人工汚染麦類の OTA 汚染濃度との相関係数は良好であり、いずれのキットも 0.96

を上回った。このことから、2024 年度に性能評価を実施した 4 キットはスクリーニングに使用可能であると考えられた。

スクリーニングに使用する簡便迅速キットは、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最も求められるので、分析値の正確さよりも、偽陰性が出ないこと、cut off 値を保証することが重要である。OTA の場合、日本では基準値は 5 $\mu\text{g/kg}$ と設定されることから、cut off 値は 2~2.5 $\mu\text{g/kg}$ 程度が適当である。

今回検討した迅速簡便キットは、それぞれ長所、短所を有している。ELISA 法では、1 キット 96 ウェルが標準であるので、1 キット当たり 40 検体以上の測定が可能 (1 検体を 2 ウェル測定し、検量線用に 12 ウェルを使用する場合) となるが、それより少ない検体数の場合は、費用効率は下がる。一方、イムノクロマトキットでは、サンプル数が少ない生産現場や原料チェックには有効であるが、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が挙げられる。これらのことから、目的に則した迅速簡便法を用いることが推奨される。

E. 結論

2022 年度には ELISA キット、2023 年度にはイムノクロマトキットの性能評価を行った。2024 年度には、前年度までの検討で良好な結果が得られたキットを選別し、OTA 人工汚染麦類を用い、機器分析の結果との相関を調べた。その結果、2024 年度に評価した ELISA キット 2 種及びイムノクロマトキット 2 種では、いずれも相関係数が 0.96 以上であったことから、OTA のスクリーニングに使用可能と考えられた。

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

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
及び
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

本研究では、国内に流通する農産物を汚染するカビ毒として、モニリフォルミン (MON) およびオクラトキシン A (OTA) を選定し、これらの生産菌の情報を応用した効率的な汚染食品の探索に資する研究を実施した。MON については、日本国内流通食品での MON 生産菌に関する情報が非常に少なく、菌種ごとの MON 生産能の有無や、これを調査するためのアッセイ系の確立が必要とされている。そこで令和 4 年度は、高効率 MON 生産の液体培養法の開発、および *Fusarium* 属菌保存株での MON 生産株の探索を行った。その結果、SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功し、この系を用いて、国内分離 *F. subglutinans*、*F. proliferatum* および *F. tricinctum* での MON 生産性を確認できた。令和 5 年度は、高濃度 MON 汚染穀物検体から *Fusarium* 属菌を分離し、前年度に確立した SSA 培養による培養液中の MON の定量を行った。その結果、国内に流通する主要穀物の小麦から *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* とその近縁種を、それぞれ MON 生産株として検出した。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、MON は特定の *Fusarium* 属菌種の系統が生産する可能性が示唆された。今後、国内流通穀物における MON 生産性 *Fusarium* 属菌の汚染状況の把握を進め、食品の MON 汚染リスク評価のための情報を蓄積することができると期待される。OTA については、麦類では *Penicillium verrucosum* が主要な汚染原因菌として知られるが、過去に OTA 生産性 *Aspergillus* 属菌の報告もあることから、保管中の小麦での *Aspergillus* 属菌の OTA 汚染動態を把握する必要がある。そこで令和 6 年度は、*P. verrucosum* および *A. westerdijkiae* の OTA 生産株各 1 株をそれぞれ小麦へ接種し、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 OTA 産生量の変化を調査した。その結果、培養温度 25℃では、*P. verrucosum* では加水率の増加に従い OTA 産生量も上昇し、*A. westerdijkiae* では含水率 40%で最大となった。温度 15℃・小麦加水率 50%・4 週間の培養では、*P. verrucosum* で平均濃度 2,202 µg/kg、*A. westerdijkiae* で平均濃度 7,558 µg/kg の OTA 生産が確認された。したがって、*A. westerdijkiae* の汚染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、OTA の汚染リスクに関する新たな知見を提供した。

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
高橋 治男 国立医薬品食品衛生研究所
清水 公德 東京理科大学
平山 美咲 東京理科大学
千葉大学真菌医学研究
センター
矢口 貴志 千葉大学真菌医学研究
センター
伴 さやか 千葉大学真菌医学研究
センター
上田 莉瑚 共立女子大学
川上 浩 共立女子大学

A. 研究目的

新興カビ毒のうち、MON については、アメリカ、フィンランド、イタリア、スロバキアなど世界各地での食品汚染が報告されており、我が国に流通する食品においても汚染が懸念されている。EFSA においてリスク評価が行われたものの、ヨーロッパ以外の地域における汚染実態や毒性のメカニズムに関する情報が不足しており、十分な評価がなされたとはいえない状況にある。日本国内における食品の MON の汚染実態調査はほとんど行われておらず、情報が非常に少ない。食品の MON 汚染リスクを詳細に評価するためには、食品の種類ごとにどういった *Fusarium* 属菌が分布しており、それらは MON 生産能を持つかということの把握が必要不可欠であるが、多くの菌種で生産能の有無についての情報が不足している。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 生産能を再評価する必要がある。

OTA 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。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。我が国では小麦の 9 割を北米とオーストラリアからの輸入に依存している。北米では麦類中の OTA 汚染実態調査についていくつかの調査結果が報告され、平均汚染濃度は 1.06–47.28 µg/kg、最大汚染濃度は 185.24 µg/kg であった。日本国内で流通する小麦についての調査では、国産品 500 検体中 1 検体から最大 0.7 µg/kg の OTA が検出され、輸入品では 782 検体中 329 検体から検出され、最大値は 5.2 µg/kg であった。以上の状況等を勘案し、2023 年に国内では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。*Penicillium verrucosum* は、小麦の代表的な OTA 汚染原因菌として知られている。北米では収穫後の小麦を保管するサイロにて高頻度で検出され、サイロ上部の開閉口付近の小麦残渣から高濃度の OTA が検出されたとの報告がある。一方で、アルジェリアの流通小麦からも OTA 生産性 *A. ochraceus* が単離されたことから、*P. verrucosum* 同様、保管中の小麦での *Aspergillus* 属菌の OTA 汚染動態を把握する必要がある。そこで、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 生産条件等、OTA 汚染動態に関する知見を得ることとした。

本研究では、カビ毒の生産菌の情報を収集し、それを応用して効率的な汚染食品の探索を行う目的で、MON および OTA 生産菌に関する検討を実施した。

B. 研究方法

(1) MON 高生産培養条件の検討

MON 生産性を評価するための培養条件の検討: 衛生微生物部第三室に保管されていた *Fusarium* 属菌 5 株を Potato dextrose agar (PDA 培地: 栄研化学) に接種した。1 週間前培養を行い、培養後、コロニーが十分に生育したことを確認した。PDA 平板培地を約 1 cm 四方に切り取った培地片 (寒天培地片接種法)、またはそこから菌体をかきとって懸濁した孢子懸濁液 100 μ L (孢子液接種法) を米培地に接種し、25°C・暗条件で 10 日間静置培養した。培養後、米培地を砕いて 85%アセトニトリル水溶液で抽出後、窒素乾固し、メタノールに溶解後、平衡化した Bond Elut SAX (Agilent SAX: Agilent Technology) で精製し HPLC で分析した。

MON 高生産の培養条件の検討: 以下の 3 種の液体培地で菌を培養し、培養液中の MON 濃度を比較した; Potato dextrose broth (PDB 培地: Sigma-Aldrich)、Sucrose salt asparagine 液体培地 (SSA 培地) および Czapek-dox 液体培地 (CZ 培地: Difco) を用いた。MON 生産陽性コントロール株を PDA 培地で前培養を行った後、液体培地のいずれか 1 種類を三角フラスコに分注し、そこに前培養した *Fusarium* 菌株を寒天培地片接種法または孢子液接種法で接種し、25°C・暗条件で最長で 28 日間静置培養した。7 日間ごとに培養液を 150 μ L 回収して、MON 生産量を測定し、経時的に産生量を観察した。分取した培養液中の MON 濃度を HPLC で定量した。この検討において最も MON 産生性の高かった液体培地種および菌接種方法を組み合わせ、衛生微生物部第三室に保管されていた農作物または栽培環境由来の *Fusarium* 属保存株計 28 菌株を接種して培養した。その後で上述の方法と同様に

抽出・精製・分析し、その結果を各菌株の MON 産生能とした。

(2) MON 高生産株の探索

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 の穀物検体のうち、HPLC 分析で MON 汚染量が 100 μ g/kg 以上であった検体を選抜し、*Fusarium* 属菌分離実験に使用した。各穀物検体 70 粒程度を 70%エタノールで表面洗浄後、滅菌蒸留水でリンスし、得られた洗浄済み穀物の水分を除去後、DRBC 平板培地上で培養した。培養後 *Fusarium* 属コロニーを PDA 平板培地へ釣菌して培養し、単離菌株とした。

単離した *Fusarium* 属菌株の分子系統解析による同定: 菌体から DNA 抽出し、各菌株の elongation factor-1 alpha 遺伝子 (*EF-1 α*) の部分塩基配列を決定した。プライマーセット EF1: 5'-ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC -3'および EF2new: 5'-GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT -3'による PCR で *EF-1 α* 部分配列を増幅した。BigDye Terminator v.3.1 を用いてサイクルシーケンス反応およびキャピラリーシーケンスを実施した。得られたローデータの解析およびアセンブリ後、*EF-1 α* 塩基配列データを用いて分子系統解析を行い、その株間系統関係を参照し、同定を行った。

単離した 163 株の MON 汚染穀物由来 *Fusarium* 属菌株について、B (1) の検討結果から明らかとなった MON 高生産培養条件を用いて培養し、培養液中の MON を上述の HPLC-DAD 法で検出し、各株の MON 生産性を評価した。

(3) OTA 生産菌の小麦上での生産条件の

検討

OTA 産生性が確認された *P. verrucosum* NBRC 30181 および *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。

C. 研究結果

(1) MON 高生産培養条件の検討

供試菌株の MON 検出量は、鹿児島県サトウキビ土壌由来の *F. subglutinans* IFM50097 では寒天培地接種法で 67.1

mg/kg、孢子液法で 5.2 mg/kg の MON 産生性が、沖縄県サトウキビ土壌由来の *F. proliferatum* IFM50127 では寒天培地接種法で 5.4 mg/kg の MON の産生が認められた。したがって、前培養した *Fusarium* 菌体の接種方法は、孢子液よりも寒天培地接種法の方が生産量は高くなることが明らかとなった。陽性コントロールとして 2 株の MON 生産株を得た。

3 種の液体培地での MON 生産量を比較したところ、CZ 培地と PDB 培地ではいずれも培養液中の MON は非検出であった。SSA 培地では、*F. subglutinans* IFM50097 および *F. proliferatum* IFM50127 で MON 産生性が認められた。これら 2 株の培養液中の培養期間の長さとも MON 産生量の線形近似をとったところ、その決定係数はそれぞれ $R^2 = 0.9932$ または $R^2 = 0.9881$ となり、近似性が高かった。以上のことから、少なくとも 28 日間の培養期間内では時間に比例して MON 産生量が増加することが確認された。

保存株 28 種を SSA 培地に寒天培地接種法で接種して培養し、MON 生産量を確認した。その結果、6 週間の培養期間終了後までに、沖縄県サトウキビ畑土壌由来の *F. proliferatum* IFM50127、北海道小麦畑土壌由来の *F. tricinctum* IFM50055 および沖縄県土壌由来の *F. subglutinans* TSY0645 の 3 株が MON 産生性を有した。これら以外の菌種ではいずれも MON の生産は認められなかった。

(2) MON 高生産株の検索

100 μ g/kg 以上の濃度で MON に汚染されている 16 検体の穀物を培養し、分子系統解析と形態観察によって種同定を行った。その結果、計 169 株 14 菌種を検出した。これらのうち、MON 産生性を示した菌株は実験に

供試した全 163 株中 83 株あり、菌種毎の培養液中の MON 濃度平均値および MON 産生陽性株の比率は、*F. fujikuroi* (83.9 mg/L, 62/65)、*F. annulatum* (21.5 mg/L, 4/8)、*F. temperatum* (1.0 mg/L, 3/5)、*F. subglutinans* (1.8 mg/L, 1/2)、*F. andiyazi* (39.9 mg/L, 2/2)、*F. oxysporum* (165.9 mg/L, 1/1)、*F. nisikadoi* (88.1 mg/L, 1/1)、*F. avenaceum* (6.4 mg/L, 8/9) および *Fusarium* sp.1 (25.4 mg/L, 3/3) であり、9 種で MON 産生性が確認された。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。

(3) OTA 生産菌の小麦上での生産条件の検討

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 µg/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 µg/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 µg/kg または 162 µg/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% および 50% での培養後の OTA 平均濃度はそれぞれ 9 µg/kg、2,521 µg/kg および 3,801 µg/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℃ 培養時に最大値を示し、平均濃度はそれぞれ 8,548 µg/kg および 57,482 µg/kg、最大濃度はそれぞれ 10,150 µg/kg および 109,871 µg/kg であった。15℃ の培養時でも、*P. verrucosum* 株では最大 895 µg/kg の濃度で、*A. westerdijkiae* 株では最大 38 µg/kg で、OTA 産生性が確認された。培養温度 4℃ 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℃ 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 µg/kg および最大 2,371 µg/kg、*A. westerdijkiae* 株では平均 7,558 µg/kg および最大 12,791 µg/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℃ 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。

D. 考察

(1) MON 高生産培養条件の検討

今回の検討によりで、*Fusarium* 属菌の MON 産生能をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功した。この系を使用して、複数の国内分離株から MON の産生性が確認されたことから、産生株は国内では北海道から沖縄までの広い気候帯に分布し、少なくとも鹿児島県や沖縄県産サトウキビおよび北海道産小麦は MON による汚染のリスクがあることが確認された。今回の検討で得られた培養条件による調査を継続することによって、日本国内で流通する食品における MON 産生菌の分布実態を明らかにする。

(2) MON 高生産株の検索

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*、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。本研究では、*F. fujikuroi* では 300 mg/kg 以上の高濃度 MON 産生菌株の存在が確認されたことから、*F. fujikuroi* とその近縁種は国内でのトウモロコシの主な MON 汚染原因菌である可能性が考えられた。さらに、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。本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。

(3) OTA 生産菌の小麦上での生産条件の検討

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。

E. 結論

本研究の結果から、*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。

また、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℃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. 研究業績

【学会発表】

- 1) Misaki Hirayama, Maiko Watanabe, Sayaka Ban, Takashi Yaguchi, Yukiko Hara-Kudo, Tomoya Yoshinari. Development of an analytical method for emerging mycotoxin produced by *Fusarium* spp. isolated from rye. Asian Mycological Congress 2022.
- 2) Maiko Watanabe, Misaki Hirayama, Sayaka Ban, Takashi Yaguchi, Kiminori Shimizu, Haruo Takahashi, Yukiko Hara-Kudo, Tomoya Yoshinari. Occurrence of mycotoxins and distribution of trichothecene-producing *Fusarium* spp.

- in Job's tears products in Japanese retail foods. International Symposium of Mycotoxicology 2022.
- 3) 渡辺麻衣子. 形態観察と遺伝子指標両方を用いた同定の実際. 日本防菌防黴学会第49回年次大会, シンポジウム 7 カビ試験法. 2022 年度
- 4) 渡辺麻衣子、吉成知也、青木渉、清水公德、伴さやか、矢口貴志、工藤由起子. 国内流通ハトムギにおけるカビ毒汚染実態およびカビ毒産生性 *Fusarium* 属菌の分布調査. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 2023 年
- 5) 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 年度
- 6) 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ォ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 年度
- 7) 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).
- 8) 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.
- 9) 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 年度
- G. 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

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

マウスにおけるモニリフォルミンの毒性試験

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為、2022 年度にマウスを用いた MON の単回投与試験を実施した。その結果、0、20、40、80 mg/kg 体重の単回経口投与をしたところ、MON は 40 mg/kg 以上で腎臓の近位尿細管壊死を誘発し、LD₅₀ の値は 68.1 mg/kg 体重と推定された。2023 年度には、マウスを用いた MON の 28 日間反復投与による一般毒性試験を実施した。その結果、0、10、20、40 mg/kg 体重/日の経口投与において、MON は 40 mg/kg で心臓の絶対重量を増加させたが、病理組織学的変化は見られなかった。対照的に、40 mg/kg の MON は、肝臓の絶対重量の増加を伴う小葉中心性の肝細胞肥大を誘発した。さらに、MON は用量依存的に 20 mg/kg 以上で腎臓の絶対重量を増加させ、40 mg/kg で腎尿細管再生の発生頻度が増加した。そこで 2024 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 体重の用量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では、MON 投与によって誘発された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 はマウスにおいて腎臓を標的とすることが示唆された。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。腎臓の変化に基づき、雄マウスを用いた 28 日間の経口毒性試験における MON の無毒性量 (NOAEL) は 10 mg/kg 体重/日と決定された。

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きた。また、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。それらの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 et al., 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)においては、これらの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(NOEL)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。令和4年度はマウスを用いた MON の単回投与試験及び14日間反復投与試験、令和5年度は28日間反復試験を実施した。これらの結果、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ため、令和6年度は MON による腎毒性の発現機序について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

(1) 化学物質と動物

化学合成された MON は、Chemspace (Riga, Latvia) から購入した。MON は水に溶解し、InertSep C2 カートリッジ (GL サイエンス株式会社、東京) を通し、残留化学試薬を除去した後、エバポレーターで乾燥させて精製した。雄性 Crl:CD1(ICR)マウス (5 週齢) は、Jackson Laboratory Japan, Inc. (横浜) より購入し、試験期間中、室温 23±2°C、相対湿度 55±15%、12 時間明期/12 時間暗期のサイクルという制御された条件下で飼育した。予備動物実験 (急性毒性試験及び14日間毒性試験) 及び実験2の急性毒性試験の動物は、紙製敷料を備えたポリカーボネート製ケージで3匹または4匹/ケージ飼育し、実験1の28日間毒性試験の動物は、紙製敷料を備えたポリカーボネート製ケージで個別飼育し、動物実験期間中、すべての動物に飲料水 (フィルターろ過した水道水) とペレット状の基礎飼料 (CRF-1; オリエンタル酵母工業株式会社、東京) を自由に摂取させた。

(2) 動物実験

①予備動物実験

28日間反復毒性試験におけるMONの最高経口投与量を決定するため、東京農工大学でMONの急性毒性試験及び14日間毒性試験の予備動物実験を行った。単回経口投与による急性毒性試験では、MONを超純水に溶解し、MON濃度を16 mg/mLに調整した投与用試験液を調製した。1週間の馴化後、動物を層別無作為化により体重に基づいて4群に割り付け(N=5/群)、試験液を0(溶媒対照)、20、40、80 mg/kg 体重/日の用量で単回経口投与した。投与中及び投与後(投与前及び投与直後、投与10時間後まで1~2時間毎、投与24時間後)に動物の死亡及び一般状態を含む臨床徴候をモニターした。投与翌日、動物はイソフルランによる深麻酔下で腹部大動脈から採血して安楽死させ、病理組織学的検査のために剖検した。14日間の反復投与試験では、投与用のMONの試験溶液を超純水で8 mg/mLの濃度に調製した。1週間の馴化後、体重に基づいて3群に割り付けた動物(N=3/群)に、0(溶媒対照)、20、40 mg/kg 体重/日の用量で14日間、試験溶液を連日経口投与した。高用量レベルは急性毒性試験の試験結果を参考に決定した。動物の死亡及び全身状態を含む臨床徴候を、毎日の投与時(投与前及び投与直後)に確認した。動物は剖検まで週3回、体重と摂餌量を測定した。最終投与の翌日、動物はイソフルランによる深麻酔下で腹部大動脈から採血して安楽死させ、全身臓器／組織の病理組織学的評価のために剖検した。

②実験1

MONの28日間反復経口投与毒性試験は、(株)ボゾリサーチセンターで実施した。1週間の馴化後、体重に基づいて3群に割り付けた動物(N

=10/群)に、試験液(超純水に8 mg MON/mL)を0(溶媒対照)、10、20、40 mg/kg 体重/日の用量で28日間、連日経口投与した。最高用量レベルは予備動物実験の試験結果を参考に決定した。毎日の投与中(投与前、投与直後、投与1~3時間後)及び剖検日の剖検前に臨床徴候をモニターした。投与1週目は週3回、その後は週1回、体重、摂餌量、摂水量を測定した。最終投与の翌日、動物の体重を測定し、血液学及び血液生化学検査のため、一晚絶食させずにイソフルランによる深麻酔下で後大静脈から血液サンプルを採取した。その後、動物は予備動物実験と同様に直ちに安楽死させ、病理組織学的評価のために剖検した。

③実験2

MONによる腎毒性のメカニズムを検討するため、MONの急性毒性試験の動物実験を東京農工大学で実施した。1週間の馴化後、体重に基づいて2群に割り当てた動物(溶媒対照群:N=6、MON投与群:N=12)に、超純水(溶媒対照群)または40 mg/kg 体重 MON/日の試験溶液(超純水中に8 mg MON/mL)を単回経口投与した。

投与6時間後の剖検で、溶媒対照群の全動物及びMON投与群から無作為に選んだ6匹の動物を、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血して安楽死させ、左右の腎臓の重量を測定し、遺伝子発現解析及び病理組織学的検査のために採取した。摘出された腎臓は中央で長軸に垂直に2片に切断した。左右一対の組織片を、60%(v/v)メタノール、30%(v/v)クロロホルム、10%(v/v)氷酢酸からなるメタカーン溶液中で、4°Cで2時間固定し、遺伝子発現解析のために既述の方法に従って処理した(Shibutani et al., 2000)。もう1セットの組織片は、4%(w/v)パラホルムアルデヒド(PFA)、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で4°C、一晚固定

し、病理組織学的検査を行った。投与 24 時間後の剖検で、MON 投与群の残り 6 匹を予備動物実験と同様に安楽死させ、左右の腎臓の重量を測定、採取し、病理組織学的及び免疫組織化学的検索のために一晚 PFA 緩衝液で固定した。

病理組織学検査

予備動物実験及び実験 1 では、すべての動物を安楽死させ、予定された剖検時に完全な剖検を行った。実験 1 では摘出した脳、胸腺、心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体を組織固定前に秤量した。剖検時に肉眼的変化を記録し、肉眼的に観察された異常部位は、他に採取した臓器・組織と同様に採取した。死亡が確認された動物は直ちに剖検したが、摘出臓器の重量は測定しなかった。

予備動物実験では、大脳、小脳、顎下リンパ節、胸腺、心臓、気管支を含む肺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、大腿骨、及び肉眼的に異常な部分を、死亡した動物を含むすべての動物で解剖した。

実験 1 では、死亡した動物を含むすべての動物から、眼球、ハーダー腺、大脳、小脳、脊髄（胸部）、下垂体、顎下腺、舌下腺、顎下リンパ節、上皮小体を含む甲状腺、胸腺、心臓、大動脈（胸部）、気管、気管支を含む肺、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、パイエル板を含む回腸、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、脾臓、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、副腎、精巣、精巣上体、凝固腺を含む精嚢、前立腺、骨格筋、坐骨神経、胸骨、大腿骨、皮膚（鼠径部）、および異常部位を摘出した。眼球、精巣、精巣上体以外の臓器及び組織は、中性緩衝 10%ホルマリン（pH7.4）で固定した。視神経を含む眼球は、2.5%ホルマリン、3.0%グルタルアルデヒド緩衝液で固定した。精巣と精巣上体組織はまず

Bouin 溶液で固定し、次に 10%緩衝ホルマリン液で固定した。固定後、臓器と組織をパラフィン包埋し、4 μm の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い、病理組織学的検査を行った。

血液学及び血液生化学的解析（実験 1）

剖検時に採取した血液サンプル（N=7 または 10/群）を用いて、血液学的解析は ADVIA 2120i（Siemens Healthcare Diagnostics Inc., East Walpole, MA, USA）、血液生化学的解析は TBATM-120FR（Canon Medical Systems Corp.）を用いて実施した。血液学的検査では、赤血球数（ $10^4/\mu\text{L}$ ；フローサイトメトリー法）、ヘモグロビン濃度（g/dL；改変シアノメトログロビン法）、ヘマトクリット（%）、平均赤血球容積（fL；フローサイトメトリー法）、平均赤血球ヘモグロビン（pg）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（g/dL）、赤血球分布幅（%）、網状赤血球数（ $10^9/\text{L}$ ；フローサイトメトリー法）、血小板数（ $10^4/\mu\text{L}$ ；フローサイトメトリー法）、白血球数（ $10^2/\mu\text{L}$ ；フローサイトメトリー法）、微分白血球数（ $10^2/\mu\text{L}$ ；フローサイトメトリー法）を解析した。血液生化学検査では、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（IU/L；UV-rate 法）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（IU/L；UV-rate 法）、乳酸脱水素酵素（IU/L；UV-rate 法）、アルカリホスファターゼ（IU/L；Bessey-Lowry 法）、トリグリセリド（mg/dL；LPL-GK-GPO-POD 法）、グルコース（mg/dL；グルコースデヒドロゲナーゼ法）、血中尿素窒素（mg/dL；ウレアーゼ-LEDH 法）、クレアチニン（mg/dL；クレアチナーゼ-クレアチナーゼ-サルコシンオキシダーゼ-POD 法）、総蛋白（g/dL；ビウレットテスト）、アルブミン（g/dL；BCG 法）、アルブミン/グロブリン比を解析した。死亡動物は検査しなかった。

腎臓の免疫組織化学分析（実験 2）

実験 2 で採取した PFA 緩衝液固定腎組織片から、切断面に平行な 3 mm スライスを作製し、PFA 緩衝液で一晩固定した後、パラフィン包埋し、3 μ m の薄切片を作成し、免疫組織化学的染色に供した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化処理[10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)中、121°Cで 10 分間オートクレーブ処理]、内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害（絶対メタノール中 0.3% H_2O_2 処理、室温で 30 分間）、非特異的抗体結合のブロッキング（PBS 中 1.5%正常ヤギ血清処理、室温で 30 分間）を行った。切片を IV 型 collagen 抗体に対する一次抗体（ウサギポリクローナル、100 倍希釈；Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA）と 4°Cで一晩インキュベートした後、Vectastain[®] Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc, Burlingame)に含まれる二次抗体溶液及びアビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体溶液とそれぞれ室温で30分間インキュベートした。抗原特異的免疫反応性の発色は、発色剤 3,3'-diaminobenzidine (同仁堂) を用いて行い、核をヘマトキシリンで対比染色した。一次抗体を含まない溶液を用いて 1 切片をインキュベートして免疫組織化学の陰性対照として免疫反応性の欠如を確認した。

腎皮質の RNA シーケンシング (RNA-seq) 解析（実験 2）

RNA-seq 解析は、溶媒対照に対する MON 単回投与 6 時間後の腎臓におけるトランスクリプトームプロファイリングのために実施した。メタカーン固定した腎組織片から、内径 1 mm の生検パンチ装置（貝印、関市）を用いて皮質組織を採取するために、切断面に平行な 2 mm のスライスを作製した。採取した組織は、total RNA 抽出まで-80°Cで保存した。RNeasy Mini kit (QIAGEN; N=6/グループ、1 サンプルとし

てプール)を用いて全 RNA を抽出した。各群で、各動物から 800 ng の total RNA サンプルを分注し、RNA-seq 解析用に各群 6 匹のプールサンプルを作成した。TruSeq stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina, Inc.) を用いて total RNA サンプルから調製したフラグメントライブラリーを、NovaSeq 6000 装置 (Illumina, Inc.) を用いて、既報の方法 (Ojiro et al., 2023) に従って配列決定した。得られた配列は修飾、トリミング、アセンブルし、Genome Reference Consortium が提供する参照ゲノム *Musculus mm10* にマッピングした。その後、リードカウントデータを正規化し、Fold Change, edgeR による exactTest を用いて、各比較ペアについて統計解析を行った。有意な結果は、 $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 2$ 及び exactTest P 値 <0.05 の条件下で、溶媒対照と比較して選択した。DAVID 解析ツール (Huang et al., 2009a,b) を、差次的発現遺伝子の遺伝子オントロジー濃縮解析に使用した。

統計解析

数値データは平均値 $\pm$ SD で示した。統計学的比較は、溶媒対照群と各 MON 群との間で以下のように行った：分散の均一性は Levene の検定によって評価した。分散が均質な場合は、データの比較に Dunnett の検定法を採用して統計学的有意差を比較した。分散が有意なデータについては、Bonferroni 補正を加えた Aspin-Welch の t 検定を用いて統計学的有意差を比較した。2 群間の差の比較では、Levene 検定法で分散が均一であれば Student の t 検定法を、そうでなければ Aspin-Welch の t 検定法を適用した。病理組織所見のカテゴリーデータについては、発生頻度の比較は Fisher の直接確率法を、重症度の比較は Mann-Whitney の U 検定法を用いた。すべての統計解析には IBM SPSS Statistics ソフトウェア (ver.25 ; IBM

Corporation, Armonk, NY, USA) を使用し、 P 値 < 0.05 を統計的に有意とみなした。

(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上を承を得て適切に動物実験を実施した。

C. 研究結果

(1) 予備動物実験における急性毒性試験

①臨床徴候

急性毒性試験では、動物に MON を 0 (溶媒対照)、20、40、80 mg/kg 体重/日の単回用量で経口投与した。40 mg/kg 体重群の 1 匹及び 80 mg/kg 体重群の全匹が、投与後 1 時間目で自発運動の低下を示した。これらの動物のうち、40 mg/kg 体重群の 1 匹は投与 2 時間後に回復した。80 mg/kg 体重群の 1 匹は投与 2 時間後に死亡した。この時点で、80 mg/kg 体重群の 3 匹は瀕死状態となり、剖検のため速やかに安楽死させた。80 mg/kg 体重群の 1 匹は投与 3 時間後に回復した。従って、実験終了までの生存匹数は、溶媒対照群、20、40 及び 80 mg/kg 体重群で、それぞれ 5、5、5 及び 1 であった。MON の LD_{50} 値は 68.1 mg/kg 体重であった。

②肉眼所見及び病理組織学的データ

80 mg/kg 体重群で死亡または瀕死状態のため安楽死処置の対象となった 4 匹のうち、瀕死の 1 匹は剖検時に左心房の拡張が認められた。試験期間を全うした動物では、80 mg/kg 体重群で 1 匹が生存し、腸うっ血が認められた。病理組織学的変化については、40 と 80 mg/kg 体重群で腎皮質に近位尿細管の限局性壊死が散在性に認められた。しかし、この尿細管病変の発生頻度及び重症度は、これらの群では溶媒対照群と比較して統計学的な差を認めなかった。その他の病変も散発的に観察されたが、いずれの投与群においても発生頻度に溶媒対照群と比較して有意差は認められなかった。また、80 mg/kg 体重投与群で死亡が確認された動物または瀕死状態のため安楽死処置の対象となった動物では、心臓、肺、肝臓、顎下リンパ節及び腸間膜リンパ節に病理組織学的変化が認められた。

14 日間反復経口投与毒性試験 (予備動物実験) 動物実験中のデータ

14 日間反復投与試験では、0 (溶媒対照)、20、40 mg/kg 体重/日の用量で MON を 14 日間連日経口投与した。その結果、すべての動物に異常な臨床症状は認められなかった。いずれの MON 投与群でも、投与期間中に体重に有意な変化は見られなかった。統計的比較は実施できなかったが、MON 投与群では投与期間中の摂餌量に明らかな変化は見られなかった。

肉眼所見及び病理組織学的変化

すべての動物で、肉眼所見に変化は見られなかった。病理組織学的変化については、40 mg/kg 体重群で腎臓の巢状尿細管再生が検出され、その発生頻度と重症度が有意に増加した。その他の病変も散発的に検出されたが、いずれの投与群においても発生頻度に有意な変化は認められなかった。

(2) 実験 1

①動物実験中のデータ

実験 1 では、0 (溶媒対照)、10、20、40 mg/kg 体重/日の用量で MON を 28 日間連日経口投与した。その結果、40 mg/kg 体重群では 3 匹の動物に自発運動の低下がみられ、うち 2 匹は投与 2 日目に死亡し、もう 1 匹は投与 3 日目に死亡した。この群の 1 匹も投与 3 日目に自発運動が低下したが、その後回復した。したがって、生存匹数は溶媒対照群、10、20 及び 40 mg/kg 体重群でそれぞれ 10、10、10 及び 7 匹であった。投与 28 日目の体重及び摂餌量は 40 mg/kg 体重群で有意に増加した。摂水量はどの MON 投与群でも有意な変動を示さなかった。

②血液学及び血液生化学データ

血液学的には、20 mg/kg 体重群でヘモグロビン濃度が有意に減少したが、赤血球分布幅が有意に増加した。血液生化学的には、いずれの MON 投与群においても、どのパラメータにも統計学的に有意な変化は見られなかった。

③剖検時の肉眼所見及び臓器重量の変化

すべての動物で肉眼所見に変化は見られなかった。臓器重量の変化については、脾臓の絶対重量が 20 mg/kg 体重群で増加した。腎臓の絶対重量は 20 及び 40 mg/kg 体重群で増加した。心臓と肝臓の絶対重量は 40 mg/kg 体重群で増加した。MON を投与したいずれの群でも、その他の臓器・組織の絶対重量または相対重量に統計的に有意な変化は認められなかった。

④病理組織学的変化

腎皮質における限局的な尿細管再生はどの群でも検出されたが、40 mg/kg 体重群では、この所見の発生頻度と重症度が統計学的に有意に増加した。肝細胞の小葉中心性肥大は 40

mg/kg 体重群で検出され、その重症度は有意に増加した。その他の病変も散発的に検出されたが、どの MON 投与群でも発生頻度に統計的に有意な変化は見られなかった。40 mg/kg 体重群で死亡が確認された動物では、腎臓、心臓、肝臓、脾臓、顎下リンパ節、大腿骨に病理組織学的病変が認められた。

(3) 実験 2

①臨床徴候

実験 2 では、動物に MON を 0 (溶媒対照) または 40 mg/kg 体重の単回用量を経口投与した。実験期間中、MON 投与群では臨床徴候に変化は見られなかった。

②組織病理学的及び免疫組織化学的变化

MON の単回投与から 24 時間後に、腎皮質の近位尿細管の巣状壊死が、6 例中 2 例でみられた。これらの動物では、MON の単回投与後、壊死した尿細管に IV 型 collagen に免疫反応性を示す基底膜の保持がみられた。

③RNA-seq 解析

合計 397 個の遺伝子が MON 曝露後に転写レベルの上昇を示した [$\log_2$ (倍率変化) ≥ 2 、溶媒対照と比較して $P < 0.05$]。合計 321 遺伝子が MON 曝露後に転写レベルの減少を示した [$\log_2$ (倍率変化) ≤ -2 、溶媒対照と比較して $P < 0.05$]。

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、40 mg/kg 体重の MON を単回経口投与した 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には、外部刺激に対する応答 (*Ces1g*、*Cyp26b1*、*Plxna3*、*Ren1*、*Rest*)、細胞移動 (*Egr1*、*Plxna3*、*Rnd1*)、免疫系プロセスの制御 (*Cyp26b1*、

P4htm, *Tnfrsf13b*)、脂質結合 (*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、及びテルペノイド代謝プロセス (*Cyp26b1*, *Cyp3a13* 及び *Ttr*)、ステロイド代謝プロセス (*Ces1g*, *Cyp26b1*, *Cyp3a13*, *Egr1*, *Hsd17b14*, 及び *Rest*)、同一タンパク質結合 (*Apobec2*)、及び細胞外領域 (*Gpx7*) が見出された。

D. 考察

本研究では、MON のリスク評価の基礎となる一般的な毒性プロファイルを得るため、雄マウスを用いた MON の急性及び亜急性毒性を検討した。0、20、40、80 mg/kg 体重を単回経口投与した急性毒性試験では、40 mg/kg 体重以上の MON が腎皮質の近位尿細管壊死を誘発したが、その発生頻度や重症度は溶媒対照と比較して統計的に有意な差を示さなかった。MON の用量を 0、20、40 mg/kg 体重/日と設定して実施した 14 日間の予備的毒性試験では、40 mg/kg 体重/日までの用量で、明らかな臨床所見や、体重及び摂餌量に変化は見られなかったが、腎尿細管再生は 40 mg/kg 体重/日で誘導された。そこで、0、10、20、40 mg/kg 体重/日の反復経口用量を設定し、28 日間の亜急性毒性試験を実施したところ、40 mg/kg 体重/日 MON で心臓の絶対重量が増加したが、病理組織学的検査では心臓に明らかな変化は認めなかった。さらに、20 mg/kg 体重/日以上 の MON で用量依存的な腎臓絶対重量の増加を認め、40 mg/kg 体重/日の MON で腎皮質の近位尿細管再生の発生頻度が増加した。これらの結果から、MON はマウスへの経口投与により腎近位尿細管を標的とする可能性が示唆された。この種の腎毒性は、家禽類で以前に報告された腎毒性 (Harvey et al., 1997 ; Ledoux et al., 2003 ; Morris et al., 1999) と本質的に類似している可能性がある。MON による腎毒性メカ

ニズムを検討するために実施した腎皮質の RNA-seq 解析により、40 mg/kg 体重の MON を単回経口投与した後、*Cyp3a13*, *Cyp26b1*, *Cyp4f15* などの代謝反応関連遺伝子が発現上昇することが判明した。さらに、今回の 28 日間の試験で、40 mg/kg 体重の MON は絶対肝重量を増加させ、小葉中心性肝細胞肥大を誘発した。小葉中心性肝細胞肥大は、生体異物の反復投与後に起こる適応的变化であり、代謝／解毒に関与するミクロソームの増加をもたらす (Maronpot et al., 2010)。したがって、今回の研究結果は、近位尿細管上皮細胞及び肝細胞における MON の代謝活性化が、尿細管毒性に関与している可能性を示唆している。

MON の重篤な急性毒性を示唆する研究もある。例えば、MON の経口 LD₅₀ 値は、1 日齢の鶏で 5.4 mg/kg 体重、雌の Sprague-Dawley 及び Wister ラットで 18.5 mg/kg 体重と報告されている (Abbas et al., 1990; Burmeister et al., 1979)。雄の Sprague-Dawley ラットを用いた別の研究では、MON の LD₅₀ カットオフ値は 25 mg/kg 体重であったと報告されている (Jonsson et al., 2013)。対照的に、雄性マウスを用いた急性経口毒性試験では、MON の LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg 体重であり、MON による急性毒性に対して、マウスはニワトリやラットよりも感受性が低いことが示唆された。過去にマウスに対して MON を 0、10、20、40、80 mg/kg 体重単回投与した急性毒性試験では、LD₅₀ 値は 47.6 mg/kg 体重と報告されており (Burmeister et al., 1980)、今回の結果と概ね一致している。MON 以外のフザリウムマイコトキシンのマウスにおける急性毒性、すなわち T-2 トキシン、デオキシニバレノール、ゼアラレノンの経口 LD₅₀ 値がそれぞれ 10.5、78、> 2000 mg/kg 体重であることを考慮すると (Forsell et al., 1987; National Toxicology Program, 1982; Ueno, 1984)、MON はマウスに

においてデオキシニバレノールに匹敵する急性毒性を示す可能性が見出された。

前述した通り、MON は主に心臓を標的とした毒性を示すものと考えられている (Fraeyman et al., 2017)。ラットに MON を 12 週間経口投与した亜慢性毒性試験では、心筋の変性、壊死、線維化などの心臓の病理組織学的変化が報告されている (Kriek et al., 1977)。我々は、28 日間の試験において、40 mg/kg 体重/日の MON を投与したマウスで心臓の絶対重量が増加した。40 mg/kg 体重群の 10 例中 3 例が最初の投与期間中に死亡したことから、MON が急性心不全を引き起こした可能性があると考えられた。しかし、病理組織学的解析では、MON 投与 28 日後に心臓に明らかな病理組織学的変化は見られなかったが、死亡が確認された 3 匹の動物のうち 2 匹は、右心房室領域が著しく拡張した。さらに、本試験における MON の単回投与では、心臓に病理組織学的変化は認めていない。ラットでは、MON は単回経口投与後も、28 日間の反復経口投与後も、病理組織学的変化が見出されていない (Jonsson et al., 2015, 2013)。これらの結果から、マウスに MON を最大 28 日間投与した急性・亜急性毒性試験では、心臓の病理組織学的変化を引き起こさない程度の心臓のインパルス伝導系や心筋の機能異常が誘発される可能性が示唆された。摘出した心臓に MON を灌流すると心筋収縮力が低下することが報告されており、ラットに MON を静脈注射すると心室性不整脈が誘発されることも報告されている (Fan et al., 1991)。従って、今回の 28 日間反復投与試験で認められた心臓の絶対重量の増加は、心筋収縮能が低下していることを示唆している。

本研究の 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、近位尿細管上皮の限局性壊死

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状態がみられたことから、前述のとおり、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) をもたらしことが知られている (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、これらのタイプの腎臓に対する低灌流由来の虚血性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。実際、本研究で認められた壊死尿細管における尿細管再生に不可欠な IV 型コラーゲンの基底膜の免疫反応性は、MON の単回投与後も維持されていた。この再生能力の主要な決定因子は尿細管基底膜の生存能力であり、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より一貫して保持されることが示されている (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可能性が示唆される。

本研究の 28 日間の試験では、20 mg/kg 体重以上の MON/日で、腎臓の絶対重量が用量依存的に増加した。ラットに経口投与した際の

MON の生体内運命を解析した研究では、経口投与された MON のほぼ 42%が尿中に、わずか 1%未満が糞便中に検出されている (Jonsson et al., 2013)。一方、投与された MON の残りの約 60%の運命は不明なままである (Jonsson et al., 2013)。これらの知見は、経口投与後に一次尿中に排泄された MON は、生体内変換及び代謝のために近位尿細管上皮に再吸収される可能性がある、という前述の仮説を支持するものである。さらに、本研究における RNA-seq 解析により、MON の単回経口投与は、マウス腎皮質における代謝応答関連遺伝子 (*Cyp3a13*, *Cyp26b1*, *Cyp4f15*) 及び酸化ストレス関連遺伝子 (*Gpx7*) を発現上昇させることが明らかになった。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ことが知られている (Wen et al., 2016)。マウスの肝臓において、CYP3A13 はアフラトキシン B₁ の代謝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ィド結合をシャットリングすることにより、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 は未だ特定されていないが、見出された遺伝子発現変化は、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を示している。また、28 日間の試験では、40 mg/kg 体重/日の MON を投与したマウスで、肝臓の絶対重量の増加とともに、小葉中心性の肝細胞肥大が観察された。多くの有害化合物は、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、肝臓でも代謝を受けた可能性が示唆される。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した可能性が示唆される。

今回のマウスを用いた MON の 28 日間投与試験でも、20 mg/kg 体重/日の投与により、血中のヘモグロビン値の低下、赤血球分布の高値、脾臓の絶対重量の増加が認められた。しかし、これらの変化は投与用量に依存した変化ではなく、病理組織学的検査でも骨髓や脾臓を含む造血器官に明らかな変化は認められなかったことから、この試験で認められた造血器関連の変化は MON による毒性学的な変化との関連性は低いことが示唆された。

今回の雄マウスを用いた 28 日間試験では、腎臓で観察された変化に基づいて、最小毒性量 (LOAEL 及び NOAEL) が決定された。すなわち、40 mg/kg 体重 MON/日で尿細管再生が誘導され、腎臓の絶対重量の増加とともに、MON の単回投与後の尿細管壊死との関連が示唆された。MON (≥20 mg/kg 体重/日) も腎臓の絶対重量を増加させたが、これは近位尿細管上皮細胞の代謝活性化に関連している可能性がある。したがって、雄マウスに 28 日間反復経口投与した後の MON の LOAEL 及び NOAEL は、それぞれ 20 mg/kg 及び 10 mg/kg 体重/日であった。

E. 結論

本試験の結果、MON の単回経口投与による急性毒性試験では、40 mg/kg 体重以上で腎近位尿細管壊死が誘発され、雄マウスにおける経口 LD₅₀ 値は 68.1 mg/kg 体重と決定された。雄マウスを用いた 28 日間の反復経口投与毒性試験では、MON は心臓の病理組織学的変化を伴うことなく、心臓の絶対重量を増加させた。さらに、MON の反復経口投与は、肝臓の絶対重量の増加を伴う肝細胞肥大を誘発した。さらに、MON は腎皮質の尿細管再生を誘導し、腎臓の絶対重量を増加させた。MON の単回投与により、腎皮質における代謝反応関連遺伝子が上昇したことを考慮すると、経口投与された MON が肝細胞及び近位尿細管上皮細胞で代謝され、活性中間体または活性酸素種が尿細管毒性を引き起こす可能性が示唆された。腎臓で観察された変化から、28 日間の反復経口投与後の MON の NOAEL は、雄マウスで 10 mg/kg 体重/日と決定された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

本文中の引用文献は、この論文内に記述している。

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

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, Yamagata a H, Zou X, Tang Q, Jin M, Sasaki K, Yoshida T, Yoshi 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
Ojiro, R., Zou, X., Yamagata, H., Ebi zuka, Y., Kobayash i, M., Kigata, T., Tang, Q., Yoshida, T., Tomoya Yoshi inari, T., Shibutani, M.:	Emerging mycotoxin moniliformin induces renal tubular necro sis after oral exposu re in mice.	Food Chem. T oxicol.	19	115336	2025