

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

総括研究報告書

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

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生産され、カビ毒に汚染された食品により、急性的な中毒症状や慢性的な摂取によるガンの発症などが引き起こされている。これまで厚生労働科学研究において、2001年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。

本研究事業では、3種のタイプAトリコテセン系カビ毒、ステリグマトシスチン (STC)、エンニアチン類 (ENs) 及びビューベリシン (BEA) を研究対象とした。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 (4,15-DAS) の一斉分析法を開発するために、コラボラティブスタディを実施した。妥当性が検証された分析法を用いて5食品目計148検体の調査を行った。4,15-DAS は主にハト麦加工品から、T-2 トキシンと HT-2 トキシンは主にライ麦粉、ハト麦加工品、小麦粉 (国産) 及びコーンフラワーから検出された。3種のカビ毒の同時汚染はハト麦加工品、コーンフラワー及び小麦粉 (国産) で認められた。BEA とエンニアチン A (ENA)、A1 (ENA1)、B (ENB) 及び B1 (ENB1) の一斉分析法を開発するために、コラボラティブスタディを実施した。妥当性が検証された分析法を用いて8食品目208検体の調査を行った。BEA はハト麦加工品、コーンフラワー及び小麦粉 (海外) で主に検出された。4種の ENs のうち、ENB の汚染レベルがいずれの検体においても最も高く、ライ麦粉と小麦粉 (国産) で主に検出された。STC については、米と小麦加工品を対象に5食品目144検体の調査を行った。その結果、米と小麦粉 (国産)、小麦粉 (海外)、乾そば、クッキー及びパン粉から STC が検出された。

STC の分析を迅速かつ低コストで行うために、ELISA によるスクリーニング法を開発した。0.59 ~13.34 ng/ml の範囲の STC において良好な直線性が認められ、かつ添加回収試験の結果も良好であったことから、食品を対象とした応用の可能性が示唆された。

ENs についての毒性情報を得るために、ENs 混合物のマウスを用いた28日間反復経口投与毒性試験を実施した。最高用量を20 mg/kg、公比5、溶媒対照群を含む4用量群を設定し、一般状態観察、体重、摂餌量測定、投与期間終了後の血液・血液化学検査、剖検、病理組織学検査を実施したが、高用量群の雌雄の摂餌量に若干の低値がみられたのみでその他の検査項目に ENs 混合物の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量を求めるに至る結果を得ることはできなかった。今後は *F. avenaceum* 菌培養物より単離精製した ENB 単体を用い、投与量等を再考し、28日間反復経口投与毒性試験の再試験を実施する。

## A. 研究目的

カビ毒はカビが感染した農作物中に生産され、カビ毒に汚染された食品により、急性的な中毒症状や慢性的な摂取によるガンの発症などが引き起こされている。これまで厚生労働科学研究において、2001年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。

4,15-ジアセトキシスシルペノール(4,15-DAS)については平成 28~30 年度に実施された厚生労働科学研究により分析法の確立とハト麦における汚染実態を明らかにしたり。一方、2017年に公表された JECFA の評価結果<sup>2)</sup>において T-2、HT-2 トキシンのグループ PMTDI に 4,15-DAS も組み入れられ、また 2018 年に公表された EFSA の評価結果においてはコーヒーや大豆製品といったトリコテセン系カビ毒の汚染がこれまでほとんど報告されていない食品からの検出が報告された。このような背景を受け、T-2、HT-2、4,15-DAS の一斉分析法を開発し、より広い範囲の食品を対象に調査を行う必要が考えられた。ステリグマトシスチン (STC) については、平成 28~30 年度に実施された厚生労働科学研究により分析法の確立と小麦などの主要食品における汚染実態を明らかにした<sup>1,3)</sup>。日本人におけるばく露量推定を行うために、より多くの検体を対象とした汚染調査と分析の効率を向上させるため、かつ陰性検体の多い STC と 4,15-DAS の調査を効率良く行うために簡易分析法の開発が必要と考えられた。これらの研究成果により、4,15-DAS、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの 3 種のタイプ A トリコテセンカビ毒と STC については、平成 28~30 年度に実施された厚生労働科学研究の結果<sup>1)</sup>と合わせ、6 年間の汚染調査と日本人におけるばく露量の結果が

得られ、それらは我が国における基準値策定の根拠として施策決定に直接貢献する。また、4,15-DAS と STC は JECFA 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の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。そのため日本におけるそれらカビ毒の汚染実態の結果は今後 JECFA において再評価がなされる際に活用され、国際機関への貢献が可能となる。

本研究においては 4,15-DAS と STC に加え、エンニアチン類(ENs)とビューベリシン(BEA)も研究対象に加える。ENs と BEA は新興カビ毒として近年関心が高まっており、欧州を中心に 2000~2013 年に 1 万試料を超える大規模な汚染実態調査が行われた<sup>4)</sup>。研究代表者が実施した日本に流通する小麦粉を対象とした予備調査<sup>5)</sup>においては高濃度かつ高頻度で ENs が検出されており、毒性や小麦以外の食品における汚染実態の情報の取得の必要性が高まっている。

このような背景を踏まえ、2019 年度には、①多機関共同試験により、タイプ A トリコテセン系化合物 3 種の一斉分析法と ENs 5 種の一斉分析法の妥当性の評価、②ENs、STC 及びタイプ A トリコテセン系化合物の汚染調査の予備検討、③ステリグマトシスチンの迅速簡易測定法の開発、④毒性試験に用いるためのエンニアチン B の大量調製、⑤マウスを用いたエンニアチン複合体の毒性試験を実施した。

## B. 研究方法

### 1) カビ毒の汚染調査

(1) タイプ A トリコテセン系化合物の分析法  
試料(ライ麦粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、小麦粉(国産及び海外)) 25 g に抽出溶媒アセトニトリル:水(85:15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。添加回収試験の場合は、それぞれの食品の中で汚染がないものを選び、5 µg/kg 又は 50 µg/kg となるようカビ

毒を添加し、暗所に 1 時間放置した後に抽出を行った。遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離した。

精製は多機能カラム (昭和電工社製 Autoprep MF-T 1500) を用いた。抽出液約 10 mL をカラムに入れ、最初の流出液 3 mL は捨て、次いで流出する約 2.4 mL を試験管に採った。その溶出液から 2.0 mL を別の試験管に正確にとり、窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル : 水 (1 : 9) 0.5 mL で溶解したものを試験溶液とした。試験溶液中のカビ毒を LC-MS/MS により定量した。

ビールについては、試料 0.5 mL を水で希釈後、固相カートリッジによる精製を行った。

## (2) STC の分析法

抽出は、試料 (米、小麦粉 (国産及び海外)、乾そば、クッキー及びパン粉) 25 g に抽出溶媒アセトニトリル : 水 (85 : 15) 100 mL を加え、30 分間振盪することで行った。添加回収試験の場合は STC の標準溶液を添加し (終濃度 0.5 又は 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、暗所に 1 時間放置した後に抽出を行った。遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離した。

精製はイムノアフィニティーカラム (IAC、堀場製作所社製 AFLAKING) を用いた。抽出液 5.0 mL をピペッターで 50 mL のメスフラスコにとり、PBS で 50 mL にメスアップした後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。インスタントコーヒーについては、抽出液 1.0 mL をピペッターで 100 mL のメスフラスコにとり、PBS で 100 mL にメスアップした。希釈液 20 mL を IAC に添加し、PBS 10 mL と蒸留水 10 mL で洗浄後、アセトニトリル 3 mL で溶出した。溶出液を窒素気流により乾固後、残渣をアセトニトリル 0.5 mL で溶解後、さらに蒸留水 0.5 mL を加えてから混合したものを試験溶液とした。試験溶液中のカビ毒を LC-MS/MS により定量した。

## (3) BEA と ENs の汚染実態調査

エンニアチン A (ENA)、エンニアチン A1 (ENA1)、エンニアチン B (ENB)、エンニアチン B1 (ENB1) 及びビューベリシン (BEA) の抽出は、試料 (米、小麦粉 (国産及び海外)、ハト麦加工品、ライ麦粉、コーヒー、コーンフラワー、大麦及びそば粉) 20 g に抽出溶媒アセトニトリル : 水 (85 : 15) 200 mL を加え、30 分間振盪することで行った。添加回収試験の場合は試料中のカビ毒濃度が 25、100 又は 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  となるよう標準品を添加し、暗所に 1 時間放置した後に抽出を行った。遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離した。

抽出液 400  $\mu\text{L}$  に精製水 800  $\mu\text{L}$  を加えて希釈し、遠心分離を行った。メタノール 3 mL と精製水 3 mL で平衡化した C18 カートリッジ (Waters 社製 SepPak Vac C18 200 mg) に希釈液 900  $\mu\text{L}$  を供した後、10%アセトニトリル水溶液 3 mL と 50%アセトニトリル水溶液 3 mL で洗浄後、90%アセトニトリル水溶液 1.5 mL で溶出したものを試験溶液とした。試験溶液中のカビ毒を LC-MS/MS により定量した。

## (4) コラボラティブスタディ

### ①タイプ A トリコテセン系化合物

国内の 8 分析機関において、3 種のカビ毒の最終サンプル濃度が 5 又は 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  となるよう調製した小麦粉の分析を実施した。

### ②BEA と ENs

国内の 8 分析機関において、5 種のカビ毒の最終サンプル濃度が 25、100 又は 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  となるよう調製した小麦玄麦と自然汚染小麦粉 2 種の分析を実施した。

### ③クライテリア

コラボラティブスタディのクライテリアは、Codex 委員会が定める性能基準を参考に設定し

た。回収率のクライテリアは、タイプ A トリコテセン系化合物の 5 µg/kg 添加群で 60-115%、50 µg/kg 添加群で 80-110%、BEA と ENs の 25 µg/kg、100 µg/kg 及び 500 µg/kg 添加群では 80-110%とした。HorRat 値のクライテリアは 2 以下であることとした。

## 2) STC の迅速簡易測定法の開発

### (1) 直接競合 ELISA

96 穴プレートの各ウェルにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈したマウス抗 IgG ヤギ抗体を 100 µL ずつ加え、4°C で一晩静置することでコーティングを行った。抗体を除いた後、PBS に溶解した 0.4% ウシ血清アルブミン (BSA) を各ウェルに 300 µL ずつ加え、4°C で一晩または室温で 1 時間静置することでブロッキングを行った。0.4% BSA を除いた後、各ウェルに PBS に溶解した 0.2% BSA で希釈したマウス抗アフラトキシン (AF) 抗体 (MoAb2-3、100 ng/mL) を 100 µL ずつ加え、室温で 1 時間静置した。静置後、PBS で希釈した 0.02% Tween 20 で 1 回洗浄を行った。STC 標準品を 10% メタノールで 10.7 pg/mL ~ 500 ng/mL (7 段階) に希釈し、サンプルとして用いた。希釈した標準品またはサンプルを AflatoxinB<sub>1</sub>-Horse Radish Peroxidase conjugate (AFB<sub>1</sub>-HRP、最終濃度、2.5 µg/mL) と試験管で同量混合し、混合液を各ウェルに 100 µL ずつ加え 1 時間静置し競合反応させた。その後 0.02% Tween 20 in PBS で 3 回洗浄を行い、TMB Substrate Reagent を 100 µL ずつ加え、10 分間静置した。0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 100 µL ずつ加え反応を止め、マイクロプレートリーダーで 450 nm における吸光度を測定した。

### (2) 添加回収試験

添加量は 100 µg/kg (最終サンプル濃度 10 µg/kg)、36 µg/kg (最終サンプル濃度 3.6 µg/kg) および 10 µg/kg (最終サンプル濃度 1.0 µg/kg)

の 3 種類を作成した。50 mL 遠沈管に、粉碎した STC 非汚染の玄米試料 10 g を秤量し、10 µg/kg 添加サンプルには STC 標準品 (10 µg/mL) 100 µL、3.6 µg/kg 添加サンプルには STC 標準品 (5 µg/mL) 72 µL、1.0 µg/kg 添加サンプルには STC 標準品 (1 µg/mL) 100 µL を添加し、室温で 1 時間放置した。その後 90% メタノールを 20 mL およびガラスビーズ 1 個を加え、振とう機で 30 分間強く振とうした。320 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を抽出液とした。これを希釈し、10% メタノールサンプル原液とし、含まれる STC を ELISA で測定した。

## 3) エンニアチン B の大量調製

### (1) ENs 生産菌の探索及び同定

*Fusarium* 属菌のうち、文献調査から、*Fusarium acuminatum* または *Fusarium avenaceum* で ENs を高濃度に産生することを把握した。そこで、当部で過去に分離収集した菌株ストックから、12 株の *F. acuminatum* または *F. avenaceum* を凍結保存株から復元し、培養による ENs 産生確認および同定に供することとした。

ENs 産生を確認するために、角田液体培地に菌株を接種し、6 日間 25°C で静置培養した。培養後、培養液を 90% アセトニトリルで 1/10000 倍希釈し、LC-MS/MS で ENs 量を測定した。

コロニーの色等性状を目視で観察、およびプレパレートを作製しての生物顕微鏡観察によって孢子形状、孢子形成様式等を判定し、菌種を推定した。β-tubulin 遺伝子の PCR およびシーケンスを行った。得られた遺伝子塩基配列について、NCBI データベースを用いた BLAST サーチにより菌種を推定した。以上の形態学および分子生物学的解析結果を総合し、菌種の同定を行った。

## (2) ENB の精製

*F. avenaceum* KFU-28 株をもち米培地で培養し、85%アセトニトリル水溶液 200 mL を加え、抽出を行った。濃縮後、酢酸エチルで液々抽出した。固相カートリッジによる粗精製後、逆相 HPLC により ENB のピークを分取した。さらに再結晶により、ENB を精製した。

## 4) エンニアチンのマウス反復投与毒性試験

ENs 混合物 (ENB:ENB1:ENA1=4:4:1) を dimethyl sulfoxide 加コーン油で調製した被験液を 0、0.8、4、20 mg/kg 体重の投与量でそれぞれ 6 週齢 ICR [CrI:CD1 (ICR)] マウス (雌雄各 10 匹/群) に 28 日間反復経口投与した。投与期間中は一般状態の観察及び体重、摂餌量の測定を実施した。投与期間終了後、剖検時に血液を採取し、血液学検査と血液化学検査を実施した。剖検では外表及び全ての器官、組織を詳細に観察した。所定の臓器を採取し重量測定後、固定し、パラフィン包埋した。各臓器のヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色標本作製し、鏡検した。

## C. 研究結果

### 1) カビ毒の汚染調査

#### (1) コラボラティブスタディ

##### ①タイプ A トリコテセン系化合物

4,15-DAS、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの回収率は 101~111%、併行相対標準偏差は 1.6~7.7%、室間再現性標準偏差は 5.3~8.2%、HorRat 値は 0.2~0.3 の範囲に収まった。

##### ②BEA と ENs

5 種のカビ毒の回収率は 92~100%、併行相対標準偏差は 2.1~4.5%、室間再現性標準偏差は 9.3~15.3%、HorRat 値は 0.33~0.84 の範囲に収まった。自然汚染検体における ENA1、ENB 及び ENB1 の併行相対標準偏差は 2.4~5.7%、

室間再現性標準偏差は 6.2~12.9%、HorRat 値は 0.24~0.46 の範囲に収まった。

## (2) 汚染実態調査

### ①タイプ A トリコテセン系化合物

5 食品目計 148 検体の調査を行った。4,15-DAS はコーンフラワー、ハト麦加工品及び小麦粉 (国産) から検出され、陽性率はコーンフラワーの 66.7%が最も高く、次いでハト麦加工品で 60%であった。平均値についてはハト麦加工品の 3.2 µg/kg が最も高かった。最大濃度はハト麦加工品の 20.0 µg/kg であった。コーンフラワーと小麦粉 (国産) における陽性検体の濃度は全て 1 µg/kg 未満であった。

T-2 トキシンはライ麦粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、小麦粉 (国産) 及びビールで検出された。ハト麦加工品とライ麦粉の陽性率がそれぞれ 86.7%及び 86.2%で他の食品より高かった。平均濃度はハト麦加工品の 3.5 µg/kg が最も高く、次いでライ麦粉の 1.9 µg/kg であった。最大濃度はハト麦加工品における 19.9 µg/kg であった。

HT-2 トキシンは全ての調査品目で検出された。T-2 トキシンと同様にハト麦加工品とライ麦加工品の陽性率が他の食品より高かった。ハト麦加工品の平均濃度 3.6 µg/kg が最も高く、次いでライ麦粉の 0.4 µg/kg、コーンフラワーの 0.3 µg/kg であった。最大濃度はハト麦加工品における 27.0 µg/kg であった。

3 種のタイプ A トリコテセン系化合物の合算値について、平均濃度はハト麦加工品の 10.3 µg/kg が最も高く、次いでライ麦粉の 2.3 µg/kg であった。最大濃度はハト麦加工品における 48.2 µg/kg であった。

### ②BEA と ENs

8 食品目 208 検体の調査を行った。BEA については、小麦粉 (国産)、小麦粉 (海外)、ハト

麦加工品、ライ麦粉、コーンフラワー、大麦及びそば粉で検出された。陽性率が最も高かったのはハト麦加工品（80%）で、次いでコーンフラワー（76%）、小麦粉（海外）（60%）であった。ハト麦加工品の平均濃度 22  $\mu\text{g}/\text{kg}$  が最も高く、次いでコーンフラワーの 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。最大濃度はハト麦加工品における 128  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。ENs は米、小麦粉（国産）、小麦粉（海外）、ライ麦粉及び大麦で検出された。4 種の ENs のうち、ENB の汚染レベルがいずれの検体においても最も高く、次いで ENB1、ENA1、ENA の順であった。ENB の陽性率が最も高かったのはライ麦粉（93%）で、次いで小麦粉（国産）（73%）、小麦粉（海外）（72%）であった。ライ麦粉の平均濃度 68  $\mu\text{g}/\text{kg}$  が最も高く、次いで小麦粉（国産）の 55  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。最大濃度はライ麦粉における 2845  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。

### ③STC

5 食品目 144 検体の調査を行った。米における陽性率は 45%で、平均濃度は 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大濃度は 0.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。小麦加工品である小麦粉（国産）、小麦粉（海外）、乾そば、クッキー及びパン粉から STC が検出された。そのうち陽性率が最も高かったのは乾そば（57%）で次いで小麦粉（国産）（31%）であった。乾そばの平均濃度 0.09  $\mu\text{g}/\text{kg}$  が最も高く、次いで小麦粉（国産）の 0.07  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。最大濃度は小麦粉（国産）における 1.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。

## 2) STC の迅速簡易測定法の開発

### (1) 直接競合 ELISA の確立

STC 測定に最適な MoAb2-3 及び AFB<sub>1</sub>-HRP の濃度はチェッカーボード滴定によって評価し、MoAb2-3 濃度は、100 ng/mL を、AFB<sub>1</sub>-HRP については 5.0 ng/mL を最適濃度とした（最終濃度 2.5 ng/mL）。確立した ELISA の cut off 値は、STC に汚染されていない玄米 5 種類につい

て ELISA を行い、その測定結果の平均+標準偏差値とした。その結果 cut off 値は 0.59  $\mu\text{g}/\text{kg}$  となった。

### (2) 妥当性評価

玄米 10 g に対して添加濃度 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  における回収率は 96.00 $\pm$ 18.26%、添加濃度 3.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  では 88.33  $\pm$  8.50%、添加濃度 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  では 90.3  $\pm$ 9.04 %であった。いずれも 85 %以上を示し、1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の濃度で測定可能であることが明らかになった。また、STC の標準曲線から、直線性のある範囲は cut off 値を考慮に入れて 0.59~13.34  $\mu\text{g}/\text{kg}$  とした。

## 3) エンニアチン B の大量調製

### (1) ENs 生産菌の探索及び同定

ENs 生産菌候補 12 株のうち、6 株で ENB の生産が認められ、その中でも KFU-28 株と YF016-B 株に高い生産能が認められた。KFU-28 株と YF016-B 株を米培地で培養し、抽出液中の ENB 量を測定した。その結果、KFU-28 株は米 1 g あたり約 3 mg の ENB を生産したが、YF016-B 株では ENB の生産が認められなかった。そのため、ENB の大量調製には KFU-28 株を用いることとした。KFU-28 株の形態学および分子生物学的同定を行ったところ、巨大分子の湾曲が大きく、小型分子がほとんど形成されていないという特徴が観察された。また、 $\beta$ -tubulin 遺伝子塩基配列の BLAST サーチの結果から、*F. avenaceum* と推定された。これらの結果を総合し、本株は *F. avenaceum* と同定された。

### (2) ENB の精製

1 本あたり米 50 g を入れた 15 本の培養器で KFU-28 株を 11 日間培養し、ENB を生産させた。85%アセトニトリルを加え、培養物を破碎後、抽出液を濾別した。抽出液を乾固後、飽和

炭酸水素ナトリウム水溶液と酢酸エチルで液々分配を行い、酢酸エチル層に ENB を回収した。酢酸エチル層を濃縮し、黒色の油状物質 12.3 g を得た。油状物質を C2 オープンカートリッジで分画し、ENB が含まれる 80%アセトニトリル水溶液溶出画分を得た。溶出画分を濃縮し、茶色の油状物質 9.7 g を得た。逆相 HPLC により、ENB に相当するピークを分取した。分取した画分を濃縮し、ENB 2.6 g を得た。混入している茶色の色素を除くために再結晶を行い、精製 ENB 2 g を得た。精製した ENB の純度を HPLC により確認した結果、98%以上の純度を有していた。

#### 4) エンニアチンのマウス反復投与毒性試験

摂餌量について、雄では投与 4 日の中・高用量群、投与 14 日の高用量群に対照群と比較し低値がみられた。雌では投与 4、14、21 日の高用量群に対照群と比較し低値がみられた。

投与期間中の体重、体重増加量共にいずれの群にも有意な変化は認められなかった。

血液学検査と血液化学検査においては、いずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった。

器官重量については、中用量群の雄の脳絶対重量が対照群と比較し低値を示した。その他の臓器の絶対重量や相対重量に有意な変化は認められなかった。

病理組織学検査の結果においては、計画剖検例のいずれの群にも諸臓器に偶発性的な変化がみられたが、被験物質の投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。

## D. 考察

### 1) カビ毒の汚染調査

#### (1) コラボラティブスタディ

タイプ A トリコテセン系化合物については 2 種類の濃度の添加回収試験、BEA と ENs につ

いては 3 種類の濃度の添加回収試験と 2 種類の自然汚染検体の分析を行った。いずれのカビ毒の定量値についても Cochran 検定で外れ値と判定されたものはなく、評価に必要な有効試験室数 8 が確保できた。検討を行った 8 種のカビ毒について、回収率と HorRat 値はいずれも設定したクライテリアを満たしたことから、今回実施したコラボラティブスタディの結果は良好であると考えられた。

## (2) 汚染実態調査

### ①タイプ A トリコテセン系化合物

今年度調査した検体のうち、ハト麦加工品、コーンフラワー及び小麦粉（国産）において 3 種の化合物の同時汚染が認められた。ライ麦粉とビールでは T-2 トキシンと HT-2 トキシンの同時汚染が認められた。ライ麦粉とハト麦加工品において特に汚染レベルが高く、これら 2 品目については継続的に調査を行っていく必要があると考えられる。また、国産の小麦粉の方が海外の小麦粉よりも汚染レベルが高いことから、その他の国産農作物においてもタイプ A トリコテセン系化合物が検出される可能性がある。次年度以降は国産農作物の調査数を増やすこととする。

### ②BEA と ENs

今年度調査した食品のうち、BEA の汚染レベルが高かったのはハト麦加工品とコーンフラワー、ENs の汚染レベルが高かったのはライ麦粉と小麦粉（国産）であり、BEA と ENs で汚染が認められる食品が明確に分かれていた。BEA と ENs は化学構造は類似しているが、生産する菌種が異なる。それぞれの生産菌の生息域や感染しやすい農作物の違いが原因と考えられる。今回調査した食品では麦類の汚染レベルが高かったが、ヨーロッパで実施された汚染調査ではドライフルーツや木の実、コーヒー豆からも

BEA や ENs が検出されている。次年度以降はヨーロッパの調査結果を参考に、対象を広げた調査を行う。

### ③STC

今年度は4種類の小麦加工食品の調査を行ったが、小麦粉、乾そば、クッキー及びパン粉のいずれからでもSTCが検出された。特に乾そばでは小麦粉(国産)よりも陽性率と平均値が高かった。今回調査を行っていない小麦加工品にも小麦由来と推定されるSTCが混入している可能性があり、日本人におけるSTCのばく露量を算出するためには様々な小麦加工品を検査する必要性が考えられた。また、米においてもSTCが小麦粉と同等のレベルで検出された。ばく露量を算出する際には米も考慮に入れる必要があると考えられる。

#### 2) STCの迅速簡易測定法の開発

本研究で開発したSTC用ELISAでは、測定可能範囲は0.59~13.34 ng/mLであった(IC<sub>50</sub> 2.3 ng/mL)。既に開発されているSTC用のELISAとして、Kongらは感度の高いモノクローナル抗体を用いて、穀類製品であるシリアルに含まれるSTCの分析を行う間接競合ELISAを報告している<sup>6)</sup>。また、直接競合ELISAとしてはOplatowska-Stachowiakらが米、トウモロコシ、及び小麦を対象としたELISAを報告している<sup>7)</sup>。これらのELISAのIC<sub>50</sub>値は0.092-0.64 ng/mLであり、本研究で開発したELISAのIC<sub>50</sub>値はやや高い傾向にあったが、実態調査で検出されている汚染量をカバーするには十分であると考えられた。国産米では現在AFの汚染は確認されていないので、本ELISAはSTCのスクリーニングに有効であると考えられるが、本研究で用いた特異抗体は抗AF抗体であることから、AFとSTCの両方を検出できるため、両者が汚染している食品に対しては、STC

のみの検出ができないという欠点もある。今後両者が汚染する食品を対象にする場合は、STCのみを検出できるモノクローナル抗体を作成し、本研究で構築した方法でSTC特異的ELISAを開発することが望まれる。

#### 3) エンニアチンのマウス反復投与毒性試験

Maranghiにより実施されたENBの42日間反復投与毒性試験<sup>8)</sup>では、エンニアチンの影響と考えられる変化として雌に胸腺、子宮、脾臓の組織形態学的な変化、雄に十二指腸腸上皮細胞の空胞化や脳酸化ストレス量の増加が観察されており、その変化を以て本実験の投与量が設定された。しかし、本試験では被験物質の影響と考えられる変化として摂餌量の低値が認められたものの、病理組織学的検査をはじめとするその他の検査項目に被験物質の影響を示唆する明らかな変化は認められなかった。本試験はENsの混合物(ENB:ENB1:ENA1=4:4:1)を用いており、投与期間の違いはあるものの被験物質の違いが結果に影響した可能性が示唆された。なお、投与期間中に死亡した高用量群の1例は剖検及び病理組織学検査の結果、上腕部からの出血が死因と考えられた。しかし、計画剖検では他の生存動物に出血性の変化を示す所見は認められず、当該動物の死因は被験物質投与に起因したものではなく、何らかの事故による上腕部の外傷によるものと考えられた。ENsの確かな毒性情報を得るには再試験が必要であると考えられ、今後はENB単体を用いた28日間反復経口投与毒性試験を実施する予定である。

#### E. 結論

小麦中に含まれる3種のタイプAトリコセシン系化合物とBEAとENsについて、分析法の妥当性を確認するために多機関共同試験を行った。いずれの分析法についても回収率とHorRat値はクライテリアを満たし、良好な結果が得ら



れた。これら分析法はライ麦やハト麦、コーンフラワーなどの食品にも適用可能であることを添加回収試験によって確認した。タイプ A トリコテセン系化合物の汚染調査の結果、ライ麦粉とハト麦加工品で汚染レベルが高かった。BEA はハト麦加工品とコーンフラワーにおいて、ENs はライ麦粉と小麦粉（国産）において主に汚染が認められた。STC は小麦粉のみならず、クッキーなどの加工品においても汚染が認められた。次年度以降は海外で実施された調査結果を参考に、より対象を広げた調査を実施する。また、簡易試験法については、米を対象とした ELISA 法を確立した。今後はカビ毒汚染調査で用いる検体について、LC-MS/MS 法と ELISA 法の両方で STC を測定し、定量値の相関を調べ、簡易試験法としての有効性を評価する必要がある。マウスを用いた毒性試験については、ヨーロッパで実施された試験で認められた変化は認められなかった。次年度は精製した ENB をより高濃度で投与し、毒性を評価する。

#### F. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業「国際的に問題となる食品中のかび毒の安全性確保に関する研究に関する研究」平成 28 年度から平成 31 年度総合・分担研究報告書（研究代表者 小西良子）
- 2) World Health Organization. 2017. Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical Report Series, No. 1002:40–54.
- 3) Yoshinari T, et al. Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. Food Addit Contam Part A. 2019, 36(9):1404-1410.
- 4) European Food Safety Authority. 2014.

Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. EFSA Journal. 12(8):3802.

- 5) Yoshinari T., et al. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat flour and corn grits on the Japanese market, and their co-contamination with type B trichothecene mycotoxins. Food Addit Contam Part A. 2016, 33(10):1620-162.
- 6) Kong D. et al. Development of indirect competitive ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of sterigmatocystin in cereal products. Food and Agricultural Immunology. 2017, 28(2):260-273.
- 7) Oplatowska-Stachowiak M. et al., Development and in-house validation of a rapid and simple to use ELISA for the detection and measurement of the mycotoxin sterigmatocystin. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2018, 410(12):3017–3023.
- 8) Maranghi F., et al. *In vivo* toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins. Combined approach to study in vivo toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENNB). EFSA Supporting Publications. 2018, 15(5):1406E.

#### G. 研究業績

##### 【論文発表】

- 1) Yoshinari T, et al. Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. Food Addit Contam Part A. 2019;36(9):1404-1410.

- 2) Kobayashi N, et al. Microflora of Mycotoxigenic Fungi in Rice Grains in Kyushu Region of Japan and Their Changes during Storage under non-Controlled Conditions. *Biocontrol Sci.* 2019;24(3):161-166.
- 3) Kubosaki A, et al. A New Protocol for Detection of *Aspergillus* Section *Versicolores* Using a High Discrimination Polymerase. *Biocontrol Sci.*, submitted.
- 4) Nakajima K, et al. Developmental exposure of mice to T-2 toxin increases astrocytes and hippocampal neural stem cells expressing metallothionein. *Neurotox. Res.* 2019;35(3):668–683.
- 5) Nakajima K. et al. Developmental exposure to diacetoxyscirpenol reversibly disrupts hippocampal neurogenesis by inducing oxidative cellular injury and suppressed differentiation of granule cell lineages in mice. *Food Chem. Toxicol.* 2020, 136:111046.

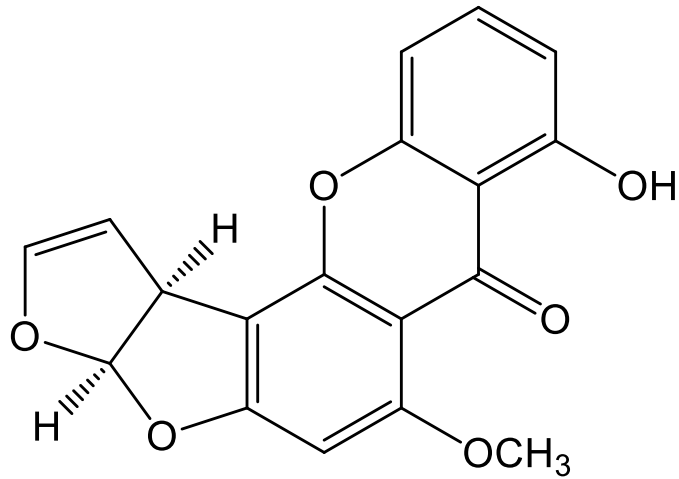
るスクリーニング法の開発」

#### H. 健康危険情報

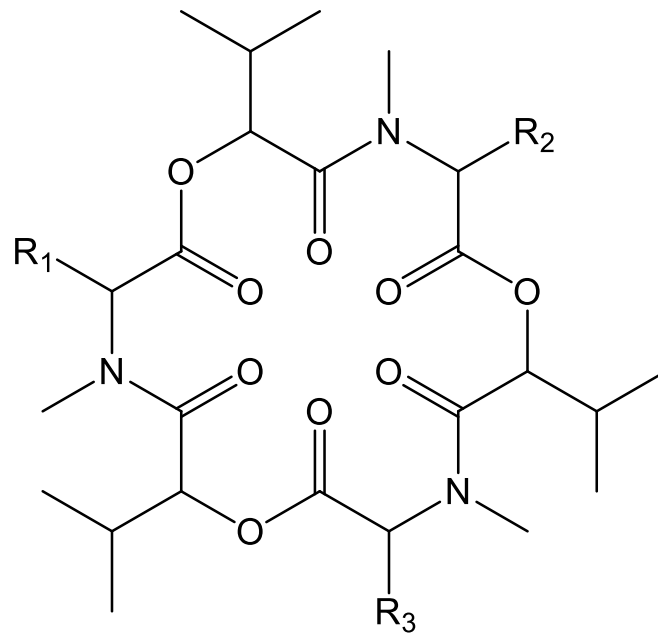
なし

#### 【学会発表】

- 1) 第 115 回日本食品衛生学会学術講演会、2019 年 10 月 3～4 日、東京、ポスター発表「食品中のステリグマトシスチンの分析法の検討及び汚染実態調査」
- 2) 第 35 回日本毒性病理学会学術集会、2019 年 1 月 31 日-2 月 1 日、東京、ポスター発表「ステリグマトシスチンのラット発達期曝露による海馬歯状回における神経新生に対する影響」
- 3) 第 46 回日本毒性学会学術年会、2019 年 6 月 26～28 日、徳島、ポスター発表「海馬神経新生に着目したかび毒の発達神経毒性」
- 4) 第 83 回日本マイコトキシン学会学術講演会、2019 年 1 月 11 日、神奈川、ポスター発表「ステリグマトシスチンの ELISA によ

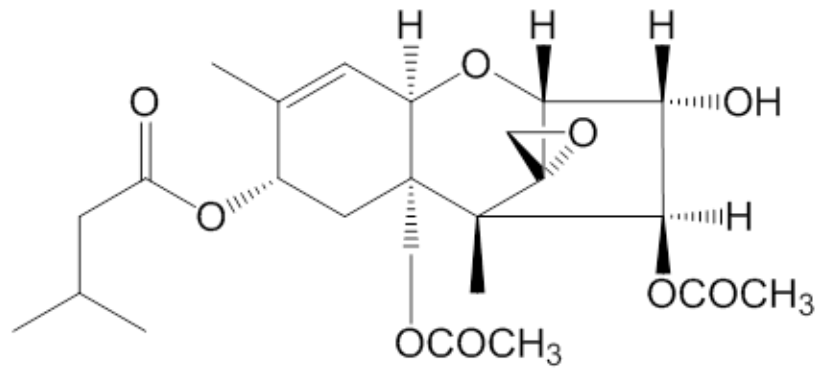


ステリグマトシスチン

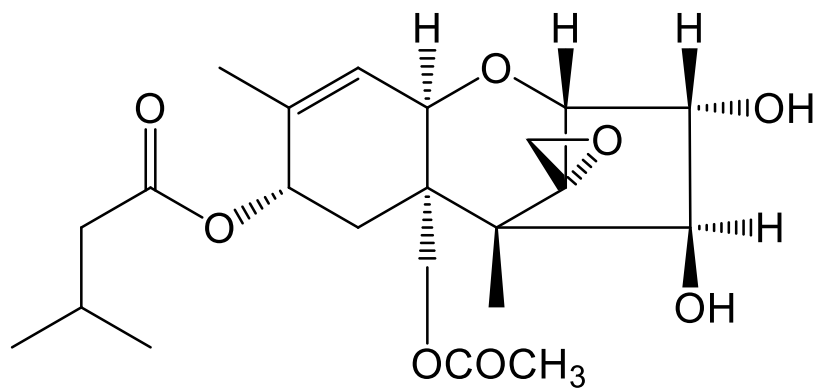


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
ビューベリシン	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
エンニアチンA	-CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
エンニアチンA <sub>1</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
エンニアチンB	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
エンニアチンB <sub>1</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

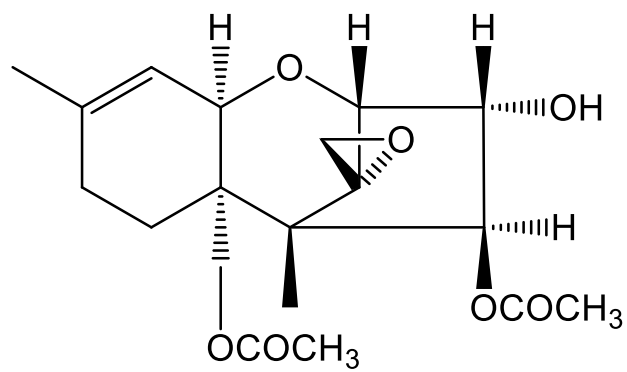
図 1 本研究が対象とするカビ毒の化学構造



T-2 トキシシン



HT-2 トキシシン



4,15-ジアセトキシシルペノール

図1 本研究が対象とするカビ毒の化学構造 (続き)

表1 国際機関によってリスク評価が実施されたカビ毒の一覧

JECFA	EFSA	日本	CODEX
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 総アフラトキシン (落花生)</li> <li>・ アフラトキシンM1</li> <li>・ T-2/HT-2トキシン</li> <li>・ ゼアラレノン</li> <li>・ パツリン</li> <li>・ 総アフラトキシン (木の实)</li> <li>・ オクラトキシンA</li> <li>・ DON</li> <li>・ フモニシン</li> <li>・ ステリグマトシスチン</li> <li>・ 4,15-DAS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ DON</li> <li>・ マスクドDON</li> <li>・ フモニシン</li> <li>・ オクラトキシンA</li> <li>・ アフラトキシンM1</li> <li>・ T-2/HT-2トキシン</li> <li>・ ゼアラレノン</li> <li>・ ビューベリシン</li> <li>・ エンニアチン類</li> <li>・ NIV</li> <li>・ アルタナリオール</li> <li>・ ステリグマトシスチン</li> <li>・ モリニフォルミン</li> <li>・ モディファイド フモニシン</li> <li>・ 4,15-DAS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 総アフラトキシン</li> <li>・ アフラトキシンM1</li> <li>・ パツリン</li> <li>・ オクラトキシンA</li> <li>・ DON</li> <li>・ NIV</li> <li>・ フモニシン</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 総アフラトキシン (落花生)</li> <li>・ アフラトキシンM1</li> <li>・ パツリン</li> <li>・ 総アフラトキシン (木の实)</li> <li>・ オクラトキシンA</li> <li>・ DON</li> <li>・ フモニシン</li> </ul>