

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

カビ毒の汚染実態調査

研究分担者 吉成 知也 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

2019年度に多機関共同試験によって妥当性を検証した分析法を用いて、3種のタイプAトリコテセン系化合物、ステリグマトシスチン(STC)、ビューベリシン(BEA)及びエンニアチン類(ENs)の食品における汚染実態を調べた。タイプAトリコテセン系化合物については、6食品目計146検体の調査を行った。ハト麦加工品ときな粉において3種の化合物の同時汚染が認められた。3種の合算値の平均濃度は、きな粉の13.3 µg/kgが最も高く、次いでハト麦加工品の10.4 µg/kgであった。最大濃度はきな粉における60.5 µg/kgであった。BEAとENsについては、9食品目167検体の調査を行った。BEAの汚染レベルが高かったのはきな粉、ゴマ及びハト麦加工品で平均濃度はそれぞれ21.7 µg/kg、3.7 µg/kg及び2.7 µg/kgであった。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、この傾向は昨年度と同様であった。ライ麦粉において、エンニアチンBが約50 mg/kgと群を抜いて高濃度で検出された検体が2種認められた。STCについては、7食品目164検体の調査を行った。玄米の汚染レベルが最も高く、陽性率は75.0%で、平均濃度は0.2 µg/kg、最大濃度は1.1 µg/kgであった。小麦加工品である小麦粉(国産)、小麦粉(輸入)、そば(乾麺)、ビスケット及びスパゲッティ及びうどん(乾麺)からもSTCが検出され、そのうち汚染レベルが高かったのは、そば(乾麺)(陽性率70.0%、平均濃度0.1 µg/kg)であった。

今年度は、昨年度の結果から汚染レベルが高いと推定される食品やヨーロッパで高レベルの汚染が報告されていた食品を対象に調査を行った。次年度は、ばく露量推定を行うことを踏まえ、日本人における摂取量が多い食品を中心に調査を行う。

研究協力者	鈴木 実束 (一財) 食品分析開発センター
中島 正博 名古屋女子大学	SUNATEC
竹内 浩 三重県保健環境研究所	森田 剛史 (一財) 日本穀物検定協会
谷口 賢 名古屋市衛生研究所	下山 晃 (一財) 日本食品検査
橋口 成喜 川崎市健康安全研究所	猪之鼻 修一 (一財) 日本食品分析センター
佐藤 英子 川崎市健康安全研究所	小杉 正樹 (一財) 日本食品分析センター
福光 徹 神奈川県衛生研究所	宮崎 光代 (一財) 日本食品分析センター
藤吉 智治 (一財) 食品分析開発センター	

SUNATEC

## A. 研究目的

世界的に汚染頻度が高く、健康被害が予測されるカビ毒は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) で毒性評価が行われ、コーデックス委員会で規格策定が行われている。我が国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。

厚生労働省は、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、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 M<sub>1</sub> に対して規制を行っている。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 やフモニシンに関しては、本研究事業で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我が国における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 (4,15-DAS))、ゼアラレノン及びステリグマトシスチン (STC) についても汚染実態調査を行った。

本事業はタイプ A トリコテセン系化合物、STC 及びエンニアチン類 (ENs) を研究対象とする。タイプ A トリコテセン系化合物については、T-2 トキシンと HT-2 トキシンの汚染調査を 2010～2015 年度、4,15-DAS の汚染調査を 2016～18 年度に実施し、麦類や豆類における汚染実態を明らかにした。その一方で、2016 年 11 月に開催された JECFA において、T-2 トキシンと HT-2 トキシンのグループ PMTDI (0.06 µg/kg bw/day) に 4,15-DAS も組み入れられることが提唱され、3 種のタイプ A トリコテセン系化合物を一斉に定量分析し、リスク評価を行う必要性が生じた<sup>1)</sup>。2019 年度には、3 種のタイプ A トリコテセン系化合物の一斉分析法を開発し、多機関共同試験による妥当性の評価を行った結

果、良好な結果が得られた。開発した分析法を用いて 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。STC については、2016～18 年度に実施した研究により、分析法の確立と小麦などの食品における汚染実態を明らかにした<sup>2)</sup>。日本人におけるばく露量推定を行うために、小麦加工品など対象とした汚染調査を 2019 年度から開始した。昨年度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結果、米と小麦粉 (国産)、小麦粉 (海外)、乾ソバ、クッキー及びパン粉から STC が検出された。ENs 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、穀類加工品、ドライフルーツ、木の実、コーヒーなど幅広い食品で汚染が認められた<sup>3)</sup>。また、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においては高濃度かつ高頻度で ENs が検出されており、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<sup>4)</sup>。2019 年度には、ビューベリシン (BEA) とエンニアチン A (ENA)、A1 (ENA1)、B (ENB) 及び B1 (ENB1) の一斉分析法の性能を評価するために、多機関共同試験を実施し、良好な結果が得られた。開発した分析法を用いて 8 食品目 208 検体の調査を行った結果、BEA はハト麦加工品、コーンフラワー、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。

今年度は、昨年度に開発した分析法を用いて汚染実態調査を継続した。

## B. 研究方法

(1) タイプ A トリコテセン系化合物の分析法  
ビール以外の検体の抽出は、試料 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、汚染レベルを踏まえた濃度のカビ毒を添加し、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。

ビールについては、一晩放置して炭酸を抜いた検体 0.5 mL に精製水 2 mL を加え希釈した。アセトニトリル 2 mL と精製水 2 mL で平衡化した固相カートリッジ（Biotage 社製 ISOLUTE Myco）に希釈液全量を加え、精製水 3 mL と 5% アセトニトリル 3 mL で洗浄後、シリンジを用いてカラム内の水分を除去した。アセトニトリル 2 mL で溶出し、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。

### <LC-MS/MS の測定条件>

#### HPLC

カラム：Inertsil ODS-3

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度：40 °C

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件：0 分 A：B = 50：50

8 分 A：B = 10：90

11 分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：2 μL

#### MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：

T-2 トキシン 484 > 305, 215

HT-2 トキシン 442 > 215, 263

4,15-DAS 384 > 307, 247

### (2) STC の分析法

抽出は、試料 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、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。

### <LC-MS/MS の測定条件>

#### HPLC

カラム：InertSustain C18

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度：40 °C

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

## B メタノール

分離条件： 0分 A : B = 60 : 40

13分 A : B = 10 : 90

流速：0.2 mL/分

注入量：5  $\mu$ L

## MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：325 [M+H]<sup>+</sup>>281

### (3) BEA と ENs の汚染実態調査

ENA、ENA1、ENB、ENB1 及び BEA の抽出は、試料 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  $\mu$ g/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  $\mu$ L に精製水 800  $\mu$ L を加えて希釈し、遠心分離を行った。メタノール 3mL 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  $\mu$ 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。

### <LC-MS/MS の測定条件>

#### HPLC

カラム：Inertsil ODS-3

2.1 $\times$ 150 mm, 3  $\mu$ m

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B アセトニトリル

分離条件： 0分 A : B = 30 : 70

20分 A : B = 20 : 80

22分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：5  $\mu$ L

## MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：

ENA 699 > 210, 682

ENA1 685 > 210, 668

ENB 657 > 196, 640

ENB1 671 > 196, 654

BEA 801 > 134, 784

平均値については、検出限界値 (LOD) 未満の値は 0 に、検出限界値以上定量限界値 (LOQ) 未満の値は検出限界値に置き換えて算出した。中央値については、陽性率が 50%以上であった試料についてのみ算出した。

## C. 研究結果

### (1) 添加回収試験

#### ①タイプ A トリコテセン系化合物

ライ麦粉、きな粉及びゴマを用いた 3 種のカビ毒の添加回収試験の結果を表 1 に示した。ライ麦の 5  $\mu$ g/kg 添加群においては、3 種のカビ毒の回収率の平均値は 71.5~83.6%の範囲に収まり、標準偏差は 2.5%以下であった。50  $\mu$ g/kg 添加群においては、回収率の平均値は 72.7~88.7%の範囲に収まり、標準偏差は 1.7%以下であった。きな粉の 5  $\mu$ g/kg 添加群においては、3 種のカビ毒の回収率の平均値は 105.4~111.4%の範囲に収まり、標準偏差は 3.6%以下であった。50  $\mu$ g/kg 添加群においては、回収率の平均値は 103.2~107.1%の範囲に収まり、標準偏差は 5.3%以下であった。ゴマの 1  $\mu$ g/kg 添加群においては、3 種のカビ毒の回収率の平均値は 109.3~120.0%の範囲に収まり、標準偏差は 5.0%以下であった。5  $\mu$ g/kg 添加群においては、回収率の平均値は 109.1~111.4%の範囲に収まり、標準偏差は 6.0%以下であった。25  $\mu$ g/kg 添

加群においては、回収率の平均値は 106.5～109.4%の範囲に収まり、標準偏差は 6.0%以下であった。コーデックス委員会により作成された分析法の手順書において、100 µg/kg、10 µg/kg 及び 1 µg/kg 添加時の回収率のクライテリアはそれぞれ 80～110%、60～115%、40～120%とされている。ライ麦粉以外の食品においては、3 種のカビ毒の回収率はこのクライテリアを満たしていた。

## ②BEA と ENs

きな粉、玄米、レギュラーコーヒー、ゴマ及びドライフルーツを用いた 5 種のカビ毒の添加回収試験の結果を表 2 に示した。BEA の回収率は 92.6～111.1%の範囲内、標準偏差は 7.4%以下、ENA の回収率は 95.4～106.7%の範囲内、標準偏差は 5.4%以下、ENA1 の回収率は 97.2～108.1%の範囲内、標準偏差は 6.0%以下、ENB の回収率は 98.6～121.4%の範囲内、標準偏差は 6.7%以下、ENB1 の回収率は 94.4～114.8%の範囲内、標準偏差は 6.9%以下であった。コーデックス委員会により作成された分析法の手順書において、100 µg/kg 及び 10 µg/kg 添加時の回収率のクライテリアはそれぞれ 80～110%及び 60～115%とされている。きな粉における BEA、レギュラーコーヒーにおける ENB 及び ENB1 以外では、このクライテリアを満たしていた。

## ③STC

そば（乾麺）、玄米、小麦粉、スパゲッティ、ビスケット及びうどん（乾麺）を用いた添加回収試験の結果を表 3 に示した。0.5 µg/kg 添加群における回収率は 76.7～108.3%の範囲に収まり、標準偏差は 4.5%以下であった。5 µg/kg 添加群における回収率は 81.5～105.5%の範囲に収まり、標準偏差は 7.1%以下であった。得られた回収率は、上述したコーデックス委員会により作成された分析法の手順書に記載されたクライテリアを満たしていた。

### (2) 汚染実態調査

## ①タイプ A トリコテセン系化合物

6 食品目計 146 検体の調査を行った。結果を表 4 に示した。4,15-DAS はハト麦加工品ときな粉から検出され、陽性率はハト麦加工品で 72.7%、きな粉で 30%であった。平均値についてはハト麦加工品で 6.8 µg/kg、きな粉で 0.06 µg/kg であった。最大濃度はハト麦加工品の 22.4 µg/kg であった。

T-2 トキシンはライ麦粉、ハト麦加工品、小麦粉（国産）、小麦粉（輸入）、きな粉及びビールで検出された。陽性率については、ライ麦粉の 73.3%が最も高く、次いできな粉の 60.0%、小麦粉（国産）の 47.8%、ハト麦加工品の 36.4%が他の食品より高かった。平均濃度はきな粉の 4.5 µg/kg が最も高く、次いでハト麦加工品の 1.0 µg/kg であった。最大濃度はきな粉における 22.6 µg/kg であった。

HT-2 トキシンは T-2 トキシンと同じく、ゴマ以外の調査品目で検出された。T-2 トキシンと同様にライ麦粉ときな粉の陽性率が他の食品より高かった。きな粉の平均濃度 8.8 µg/kg が最も高く、次いでハト麦加工品の 2.6 µg/kg、小麦粉（国産）の 1.8 µg/kg、ライ麦粉の 1.4 µg/kg であった。最大濃度はきな粉における 37.8 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、平均濃度はきな粉の 13.3 µg/kg が最も高く、次いでハト麦加工品の 10.4 µg/kg であった。最大濃度はきな粉における 60.5 µg/kg であった。

## ②BEA と ENs

9 食品目 167 検体の調査を行った。結果を表 5 に示した。BEA については、玄米、小麦粉（国産）、小麦粉（輸入）、ハト麦加工品、ライ麦粉、レギュラーコーヒー、きな粉及びゴマで検出された。陽性率が最も高かったのはゴマ（80.0%）で、次いでハト麦加工品（68.2%）、きな粉（60.0%）

であった。きな粉の平均濃度 21.7 µg/kg が最も高く、次いでゴマの 3.7 µg/kg であった。最大濃度はきな粉における 101 µg/kg であった。ENs は玄米、小麦粉（国産）、小麦粉（輸入）、ライ麦粉及びきな粉で検出された。これらの食品においては、4 種の ENs のうち、ENB の汚染レベルが最も高く、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きな粉(90.0%)で、次いで小麦粉（輸入）(85.7%)、小麦粉（国産）(82.6%)、ライ麦粉（80.0%）であった。ライ麦粉の平均濃度 3321 µg/kg が最も高く、次いで小麦粉（国産）の 79.3 µg/kg であった。最大濃度はライ麦粉における 48,783 µg/kg であった。

### ③STC

7 食品目 164 検体の調査を行った。結果を表 6 に示した。玄米と小麦加工品である小麦粉（国産）、小麦粉（輸入）、そば（乾麺）、ビスケット及びスパゲッティ及びうどん（乾麺）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玄米(75.0%)で、次いでそば（乾麺）(70.0%)、小麦粉（国産）(21.7%) であった。平均濃度は、玄米の 0.2 µg/kg が最も高く、次いでそば（乾麺）の 0.1 µg/kg、小麦粉（国産）の 0.04 µg/kg であった。最大濃度は玄米における 1.1 µg/kg であった。

## D. 考察

### （1）添加回収試験

タイプ A トリコテセン系化合物の添加回収試験においては、ライ麦粉の結果でクライテリアを下回る結果が得られた。昨年度のライ麦粉の添加回収試験の結果では、クライテリアを満たしていた。昨年度と今年度では実施機関が違うことや、添加回収試験に用いたライ麦粉の種類が違うことなどが原因と考えられる。来年度も同じ試験を実施し、用いている分析法がライ麦

粉に適用できるか調べる。BEA と ENs の添加試験においても、一部の結果がクライテリアを満たさなかった。特に、レギュラーコーヒーの 10 µg/kg 添加群でクライテリアからの大きな逸脱が認められた。回収率が 120%程度となっていたことから、夾雑成分によるイオン化促進又は前に測定した検体からのキャリーオーバーなどが原因と考えられる。来年度に再度試験を実施し、分析法の適用性を調べる。STC については、これまで調査を行ってきた食品に加え、今年度から調査を開始したスパゲッティやうどん（乾麺）においても、良好な回収率が得られた。

### （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、ハト麦加工品ときな粉において 3 種の化合物の同時汚染が認められた。ライ麦粉、小麦粉（国産）、小麦粉（輸入）及びビールでは T-2 トキシンと HT-2 トキシンの同時汚染が認められた。今年度の合算値の平均値を昨年度の結果と比較すると、ライ麦粉（昨年度 2.3 µg/kg : 今年度 1.7 µg/kg）とハト麦加工品（昨年度 10.3 µg/kg : 今年度 10.4 µg/kg）は同等であったが、小麦粉（国産）（昨年度 0.3 µg/kg : 今年度 2.0 µg/kg）では差が認められた。きな粉の調査を今年度から開始したが、T-2 トキシンと HT-2 トキシンの汚染量が他の検体よりも高い結果が得られた。今年度調査を行った 10 検体のうち、9 検体が国産、1 検体が中国産であるが、T-2 トキシンと HT-2 トキシンが高い濃度で検出されたのはいずれも国産の検体であった。来年度はきな粉の調査検体数を増やし、汚染が定常的に起きているのかどうか調べる。

#### 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きな粉、ゴマ及びハト麦加工

品であった。昨年度のハト麦加工品の平均値が 22 µg/kg であったのに対し、今年度は 2.7 µg/kg と汚染レベルは低かった。きな粉とゴマは今年度から調査を実施したが、きな粉において 100 µg/kg を超えて BEA が検出された検体が認められたことから、来年度は検体数を増やして調査を行い、汚染の傾向を調べる。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、この傾向は昨年度と同様であった。小麦粉（国産）の汚染レベルは昨年度とほぼ同等であった。ライ麦粉において、ENB が約 50,000 µg/kg 検出された検体が 2 種認められたことから、平均値が非常に高くなった。昨年度には ENB が 3,000 µg/kg 検出された検体があり、ライ麦における ENs 汚染は定常化している可能性がある。

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コーヒー豆から BEA や ENs が検出されていたため、今年度はそれら食品の調査を行った。レギュラーコーヒーから低濃度の BEA が検出されたが、ドライフルーツからは BEA も ENs も検出されなかった。汚染レベルに地域差がある可能性が考えられた。

### ③STC

今年度は玄米と 6 種類の小麦加工食品の調査を行った。玄米における汚染レベルはいずれの小麦加工品よりも高かった。小麦加工品の中では、そば（乾麺）の陽性率と平均濃度が最も高いという結果は昨年度と同様であった。今年度から調査を開始したスパゲッティとうどん（乾麺）においても STC が検出されたが、汚染レベルはそば（乾麺）と比較すると非常に低かった。STC のばく露の主要な食品は米とそばである可能性が考えられた。

### E. 結論

昨年度に妥当性を評価した分析法を用いて、

汚染実態調査を行った。3 種のタイプ A トリコテセン系化合物については、ハト麦加工品ときな粉において 3 種の化合物の同時汚染が認められ、特にきな粉において、T-2 トキシンと HT-2 トキシンの汚染量が他の検体よりも高い結果が得られた。BEA については、きな粉、ゴマ及びハト麦加工品で汚染レベルが高く、特にきな粉において 100 µg/kg を超えて BEA が検出された検体が認められた。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、この傾向は昨年度と同様であった。STC については、玄米における汚染レベルが小麦加工品よりも高かった。小麦加工品の中では、そば（乾麺）の陽性率と平均濃度が最も高いという結果は昨年度と同様であった。次年度は、今年度汚染レベルが高かった食品の調査数を増やし、継続的な汚染が生じているかを調べるとともに、ばく露量推定を行い、日本人の健康に対するこれらカビ毒のリスクを評価する。

### F. 参考

- 1) World Health Organization. 2017. Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical Report Series, No. 1002:40-54.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.



表1 タイプAトリコテセン系化合物の添加回収試験の結果

	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回収率 (%、平均値 $\pm$ 標準偏差)		
		4,15-DAS	T-2 toxin	HT-2 toxin
ライ麦粉	5	71.9 $\pm$ 1.4	71.5 $\pm$ 0.6	83.6 $\pm$ 2.5
	50	76.0 $\pm$ 1.7	88.7 $\pm$ 0.7	72.7 $\pm$ 1.2
きな粉	5	105.4 $\pm$ 1.3	111.4 $\pm$ 2.3	107.3 $\pm$ 3.6
	50	107.1 $\pm$ 1.8	107.0 $\pm$ 2.7	103.2 $\pm$ 5.3
ごま	1	109.3 $\pm$ 1.1	114.8 $\pm$ 1.5	120.0 $\pm$ 5.0
	5	109.5 $\pm$ 0.9	109.1 $\pm$ 6.0	111.4 $\pm$ 5.7
	25	109.4 $\pm$ 2.3	106.5 $\pm$ 2.9	108.1 $\pm$ 6.0

表2 BEA と ENs の添加回収試験の結果

	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回収率 (%、平均値 $\pm$ 標準偏差)				
		BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1
きな粉	10	106.7 $\pm$ 5.1	100.1 $\pm$ 4.2	104.0 $\pm$ 6.0	108.9 $\pm$ 4.9	105.3 $\pm$ 6.9
	100	111.1 $\pm$ 4.7	106.7 $\pm$ 4.1	106.1 $\pm$ 3.2	107.8 $\pm$ 3.5	106.4 $\pm$ 4.1
玄米	10	92.6 $\pm$ 2.1	95.5 $\pm$ 2.0	97.6 $\pm$ 1.1	99.7 $\pm$ 2.8	94.4 $\pm$ 2.7
	100	93.3 $\pm$ 1.3	95.6 $\pm$ 0.6	99.9 $\pm$ 1.3	100.8 $\pm$ 1.9	99.8 $\pm$ 0.5
レギュラーコーヒー	10	102.4 $\pm$ 7.4	100.7 $\pm$ 5.4	106.8 $\pm$ 5.3	121.4 $\pm$ 1.0	114.6 $\pm$ 4.2
	100	100.4 $\pm$ 5.1	104.4 $\pm$ 4.6	108.1 $\pm$ 4.3	113.0 $\pm$ 2.8	114.8 $\pm$ 5.2
ゴマ	10	98.0 $\pm$ 2.5	95.4 $\pm$ 0.6	98.6 $\pm$ 2.9	105.2 $\pm$ 0.4	103.1 $\pm$ 2.6
	100	96.9 $\pm$ 1.2	99.9 $\pm$ 2.2	97.2 $\pm$ 2.2	102.0 $\pm$ 3.0	98.3 $\pm$ 1.5
ドライフルーツ	10	104.4 $\pm$ 2.1	102.1 $\pm$ 0.8	105.9 $\pm$ 2.9	104.8 $\pm$ 6.7	101.5 $\pm$ 4.3
	100	97.3 $\pm$ 0.4	100.0 $\pm$ 0.3	98.5 $\pm$ 1.7	98.6 $\pm$ 0.2	98.8 $\pm$ 2.0

表 3 STC の添加回収試験の結果

	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回収率 (%、平均値 $\pm$ 標準偏差)
そば (乾麺)	0.5	76.7 $\pm$ 3.8
	5	81.5 $\pm$ 7.1
玄米	0.5	100.5 $\pm$ 4.5
	5	97.8 $\pm$ 1.0
小麦粉	0.5	108.3 $\pm$ 4.1
	5	105.5 $\pm$ 6.1
スパゲッティ	0.5	101.0 $\pm$ 1.3
	5	100.1 $\pm$ 2.7
ビスケット	0.5	103.1 $\pm$ 3.0
	5	97.0 $\pm$ 1.4
うどん (乾麺)	0.5	95.8 $\pm$ 0.6
	5	96.4 $\pm$ 1.0

表4 タイプA トリコテセン系化合物の汚染調査の結果 (2020年度)

	調査数	4,15-DAS			T-2 toxin			HT-2 toxin			合算値	
		陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)
ライ麦粉	30	0	—	—	73.3	0.3	4.3	60.0	1.4	12.3	1.7	16.6
ハト麦加工品	22	72.7	6.8	22.4	36.4	1.0	6.8	36.4	2.6	33.0	10.4	39.7
小麦粉 (国産)	23	0	—	—	47.8	0.2	1.1	47.8	1.8	16.0	2.0	17.1
小麦粉 (輸入)	21	0	—	—	19.0	0.06	0.7	19.0	0.5	5.0	0.5	5.7
きな粉	10	30.0	0.06	0.3	60.0	4.5	22.6	60.0	8.8	37.8	13.3	60.5
ごま	10	0	—	—	0	—	—	0	—	—	—	—
ビール	30	0	—	—	16.7	0.03	0.2	43.3	0.2	1.4	0.3	1.6

検出限界値 : 4,15-DAS 0.02 µg/kg, T-2 toxin 0.007 µg/kg, HT-2 toxin 0.09 µg/kg

定量限界値 : 4,15-DAS 0.06 µg/kg, T-2 toxin 0.02 µg/kg, HT-2 toxin 0.3 µg/kg

表5 BEA と ENs の汚染実態 (2020 年度)

	調査数	BEA			ENA			ENA1		
		陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)
玄米	20	5.0	0.06	1.2	0	-	-	0	-	-
小麦粉 (国産)	23	34.8	0.5	2.5	8.7	0.8	14.2	65.2	3.2	12.3
小麦粉 (輸入)	21	4.8	0.06	1.3	0	-	-	9.5	0.3	3.0
ハト麦加工品	22	68.2	2.7	14.0	0	-	-	0	-	-
ライ麦粉	30	10.0	2.0	50.2	10.0	8.0	115	30.0	99.1	1468
インスタントコーヒー	10	0	-	-	0	-	-	0	-	-
レギュラーコーヒー	10	40.0	0.9	6.6	0	-	-	0	-	-
ドライフルーツ	11	0	-	-	0	-	-	0	-	-
きな粉	10	60.0	21.7	101	10.0	0.3	3.3	10.0	0.7	5.1
ゴマ	10	80.0	3.7	10.4	0	-	-	0	-	-

	調査数	ENB			ENB1			検出限界値 : BEA 0.1 µg/kg, ENA 0.1 µg/kg, ENA1 0.4 µg/kg, ENB 0.2 µg/kg, ENB1 0.3 µg/kg  定量限界値 : BEA 0.4 µg/kg, ENA 0.4 µg/kg, ENA1 1 µg/kg, ENB 0.6 µg/kg, ENB1 1 µg/kg
		陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	陽性率 (%)	平均値 (µg/kg)	最大値 (µg/kg)	
玄米	20	15.0	0.2	1.8	0	-	-	
小麦粉 (国産)	23	82.6	79.3	395.6	82.6	22.3	102	
小麦粉 (輸入)	21	85.7	7.0	22.2	81.0	2.5	7.9	
ハト麦加工品	22	0	-	-	0	-	-	
ライ麦粉	30	80.0	3321	48783	70.0	837	12589	
インスタントコーヒー	10	0	-	-	0	-	-	
レギュラーコーヒー	10	0	-	-	0	-	-	
ドライフルーツ	11	0	-	-	0	-	-	
きな粉	10	90.0	7.1	23.9	70.0	2.8	13.9	
ごま	10	0	-	-	0	-	-	

表6 STCの汚染実態(2020年度)

食品	調査数	陽性率 (%)	平均値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	最大値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
玄米	20	75.0	0.2	1.1
小麦粉(国産)	23	21.7	0.04	0.3
小麦粉(輸入)	21	4.8	0.005	0.07
そば(乾麺)	30	70.0	0.1	0.6
ビスケット	20	5.0	0.006	0.1
スパゲッティ	20	10.0	0.008	0.1
うどん(乾麺)	20	5.0	0.008	0.2
パン粉	10	0	—	—

検出限界値：0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$

定量限界値：0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$

別添-1 各試料におけるタイプ A トリコテセン系化合物の汚染濃度  
(ND は検出限界値未満、下線は検出限界値以上、定量限界値未満の値である。)

2020 年度 ライ麦粉

サンプルID	原産地	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	T-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	HT-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	合算値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-RY-1	ドイツ、カナダ主体	ND	0.1	ND	0.1
R2-RY-2	ドイツ、カナダ主体	ND	0.03	0.3	0.3
R2-RY-3	フランス	ND	0.3	1.7	2.0
R2-RY-4	ドイツ、カナダ主体	ND	0.2	0.5	0.7
R2-RY-5	北海道	ND	4.3	12.3	16.6
R2-RY-6	不明	ND	0.06	ND	0.06
R2-RY-7	不明	ND	0.08	0.3	0.4
R2-RY-8		ND	0.07	0.5	0.6
R2-RY-9	不明	ND	ND	ND	—
R2-RY-10	不明	ND	0.04	ND	0.04
R2-RY-11	不明	ND	ND	ND	—
R2-RY-12	ドイツ	ND	0.1	0.5	0.6
R2-RY-13	ドイツ	ND	ND	ND	—
R2-RY-14	国内製造	ND	0.07	ND	0.07
R2-RY-15	ドイツ	ND	ND	ND	—
R2-RY-16	ドイツ	ND	0.9	5.0	5.9
R2-RY-17	不明	ND	0.06	0.5	0.6
R2-RY-18	不明	ND	ND	ND	—
R2-RY-19	ドイツ	ND	0.1	0.6	0.7
R2-RY-20	ドイツ	ND	0.4	2.3	2.7
R2-RY-21	ドイツ	ND	0.05	0.5	0.6
R2-RY-22	ドイツ	ND	ND	<u>0.3</u>	0.3
R2-RY-23	アメリカ	ND	1.4	6.7	8.1
R2-RY-24	ドイツ	ND	ND	1.0	1.0
R2-RY-25	不明	ND	0.08	0.5	0.6
R2-RY-26	北海道	ND	1.0	3.9	4.9
R2-RY-27	ドイツ主体	ND	0.06	<u>0.3</u>	0.4
R2-RY-28	北海道	ND	1.0	2.9	3.9
R2-RY-29	フランス	ND	0.1	0.9	1.0
R2-RY-30	ドイツ主体	ND	ND	ND	—

## 2020年度 ハト麦加工品

サンプルID	原産地	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	T-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	HT-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	合算値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-HT-01	島根県	ND	ND	ND	—
R2-HT-02	栃木県	0.5	ND	ND	0.5
R2-HT-03	中国	18.5	ND	ND	18.5
R2-HT-04	タイ	18.7	ND	ND	18.7
R2-HT-05	タイ	5.8	ND	ND	5.8
R2-HT-06	島根県	ND	6.8	33.0	39.8
R2-HT-07	富山県	ND	0.3	1.3	1.6
R2-HT-08	青森県	ND	3.3	2.3	5.6
R2-HT-09	岩手県	ND	3.3	3.5	6.8
R2-HT-10	岩手県	ND	4.6	11.6	16.2
R2-HT-11	ラオス	8.8	ND	ND	8.8
R2-HT-12	韓国	17.5	ND	ND	17.5
R2-HT-13	国内	8.7	ND	ND	8.7
R2-HT-14	中国	22.4	ND	ND	22.4
R2-HT-15	岡山県	0.2	0.4	0.7	1.3
R2-HT-16	栃木県	1.2	2.2	3.3	6.7
R2-HT-17	タイ	3.1	ND	ND	3.1
R2-HT-18	中国	16.4	ND	ND	16.4
R2-HT-19	中国（福健省）	8.7	ND	ND	8.7
R2-HT-20	中国（貴州）	1.0	ND	ND	1.0
R2-HT-21	タイ	17.4	ND	ND	17.4
R2-HT-22	富山県	0.8	0.8	2.4	4.0



## 2020年度 玄米

サンプルID	原産地	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	T-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	HT-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	合算値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-RC-01	北海道	ND	ND	ND	—
R2-RC-02	秋田県	ND	ND	ND	—
R2-RC-03	国内産	ND	ND	ND	—
R2-RC-04	茨城県	ND	ND	ND	—
R2-RC-05	九州産	ND	ND	ND	—
R2-RC-06	国内産	ND	ND	ND	—
R2-RC-07	島根県	ND	ND	ND	—
R2-RC-08	千葉県	ND	ND	ND	—
R2-RC-09	新潟県	ND	ND	ND	—
R2-RC-10	福島県	ND	ND	ND	—
R2-RC-11	福島県	ND	ND	ND	—
R2-RC-12	千葉県	ND	ND	ND	—
R2-RC-13	千葉県	ND	ND	ND	—
R2-RC-14	北海道	ND	ND	ND	—
R2-RC-15	山形県	ND	ND	ND	—
R2-RC-16	秋田県	ND	ND	ND	—
R2-RC-17	秋田県	ND	ND	ND	—
R2-RC-18	国内産	ND	ND	ND	—
R2-RC-19	富山県	ND	ND	ND	—
R2-RC-20	国内産	ND	ND	ND	—

## 2020年度 小麦粉（輸入）

サンプルID	原産地	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	T-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	HT-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	合算値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-FWF01	フランス	ND	ND	ND	—
R2-FWF02	不明	ND	ND	ND	—
R2-FWF03	イタリア	ND	ND	ND	—
R2-FWF04	不明	ND	ND	ND	—
R2-FWF05	北米他	ND	ND	ND	—
R2-FWF06	北米他	ND	ND	ND	—
R2-FWF07	フランス	ND	ND	ND	—
R2-FWF08	アメリカ他	ND	ND	ND	—
R2-FWF09	北米他	ND	ND	ND	—
R2-FWF10	フランス	ND	ND	ND	—
R2-FWF11	カナダ、アメリカ主体	ND	ND	ND	—
R2-FWF12	北米、オーストラリア他	ND	ND	ND	—
R2-FWF13	北米他	ND	ND	ND	—
R2-FWF14	カナダ主体	ND	0.05	0.4	0.5
R2-FWF15	ドイツ	ND	0.3	2.4	2.7
R2-FWF16	北米、オーストラリア他	ND	ND	ND	—
R2-FWF17	北米、オーストラリア他	ND	ND	ND	—
R2-FWF18	カナダ	ND	ND	ND	—
R2-FWF19	カナダ	ND	ND	ND	—
R2-FWF20	北米産	ND	0.7	5.0	5.7
R2-FWF21	北米産	ND	0.2	1.7	1.9

## 2020年度 小麦粉（国産）

サンプルID	原産地	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	T-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	HT-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	合算値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-JWF01	岩手県	ND	ND	ND	—
R2-JWF02	北海道	ND	ND	ND	—
R2-JWF03	滋賀県	ND	ND	ND	—
R2-JWF04	国産	ND	0.4	1.2	1.6
R2-JWF05	北海道	ND	0.2	1.0	1.2
R2-JWF06	北海道	ND	ND	ND	—
R2-JWF07	福岡県	ND	ND	ND	—
R2-JWF08	北海道	ND	ND	ND	—
R2-JWF09	北海道	ND	0.1	0.6	0.7
R2-JWF10	北海道	ND	ND	ND	—
R2-JWF11	北海道	ND	ND	ND	—
R2-JWF12	北海道	ND	ND	0.4	0.4
R2-JWF13	北海道	ND	0.06	0.6	0.7
R2-JWF14	北海道	ND	1.1	16.0	17.1
R2-JWF15	北海道	ND	0.05	0.8	0.9
R2-JWF16	北海道	ND	0.2	3.2	3.4
R2-JWF17	岩手県	ND	0.5	3.8	4.3
R2-JWF18	岩手県	ND	0.05	0.2	0.3
R2-JWF19	九州産	ND	ND	ND	—
R2-JWF20	青森県	ND	0.5	4.4	4.9
R2-JWF21	青森県	ND	ND	ND	—
R2-JWF22	国産	ND	ND	ND	—
R2-JWF23	青森県	ND	1.0	8.4	9.4

## 2020年度 きな粉

サンプルID	原産国	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	T-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	HT-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	合算値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-KN01	北海道	ND	ND	ND	—
R2-KN02	中国	ND	ND	ND	—
R2-KN03	岩手県	ND	0.6	0.9	1.5
R2-KN04	国産	ND	0.5	0.4	0.9
R2-KN05	兵庫県	0.3	13.9	30.7	44.9
R2-KN06	国内産	0.2	6.7	17.5	24.4
R2-KN07	岩手県	0.07	22.6	37.8	60.5
R2-KN08	国内産	ND	0.3	0.7	1.0
R2-KN09	北海道	ND	ND	ND	—
R2-KN10	北海道	ND	ND	ND	—

## 2020年度 ごま

サンプルID	原産国	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	T-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	HT-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	合算値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-GM01	パラグアイ	ND	ND	ND	—
R2-GM02	トルコ、エジプト	ND	ND	ND	—
R2-GM03	パラグアイ	ND	ND	ND	—
R2-GM04	不明	ND	ND	ND	—
R2-GM05	不明	ND	ND	ND	—
R2-GM06	不明	ND	ND	ND	—
R2-GM07	不明	ND	ND	ND	—
R2-GM08	不明	ND	ND	ND	—
R2-GM09	不明	ND	ND	ND	—
R2-GM10	不明	ND	ND	ND	—

## 2020年度 ビール

サンプルID	4,15-DAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	T-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	HT-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	合算値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-BR01	ND	ND	ND	—
R2-BR02	ND	ND	ND	—
R2-BR03	ND	ND	ND	—
R2-BR04	ND	ND	ND	—
R2-BR05	ND	0.08	0.7	0.8
R2-BR06	ND	ND	ND	—
R2-BR07	ND	ND	0.5	0.5
R2-BR08	ND	ND	0.5	0.5
R2-BR09	ND	ND	0.6	0.6
R2-BR10	ND	ND	0.4	0.4
R2-BR11	ND	ND	ND	—
R2-BR12	ND	ND	0.3	0.3
R2-BR13	ND	ND	0.3	0.3
R2-BR14	ND	ND	ND	—
R2-BR15	ND	0.1	0.3	0.4
R2-BR16	ND	ND	ND	—
R2-BR17	ND	0.2	1.4	1.6
R2-BR18	ND	ND	ND	—
R2-BR19	ND	ND	ND	—
R2-BR20	ND	ND	0.4	0.4
R2-BR21	ND	ND	ND	—
R2-BR22	ND	ND	ND	—
R2-BR23	ND	ND	ND	—
R2-BR24	ND	ND	ND	—
R2-BR25	ND	ND	ND	—
R2-BR26	ND	ND	ND	—
R2-BR27	ND	ND	0.6	0.6
R2-BR28	ND	0.2	1.1	1.3
R2-BR29	ND	0.2	0.4	0.6
R2-BR30	ND	ND	ND	—

別添-2 各試料における BEA と ENs の汚染濃度

2020 年度 玄米

サンプルID	原産地	BEA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-RC01	北海道	ND	ND	ND	1.2	ND
R2-RC02	秋田県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC03	国内産	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC04	茨城県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC05	九州産	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC06	国内産	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC07	島根県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC08	千葉県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC09	新潟県	1.2	ND	ND	ND	ND
R2-RC10	福島県	ND	ND	ND	1.8	ND
R2-RC11	福島県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC12	千葉県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC13	千葉県	ND	ND	ND	1.1	ND
R2-RC14	北海道	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC15	山形県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC16	秋田県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC17	秋田県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC18	国内産	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC19	富山県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RC20	国内産	ND	ND	ND	ND	ND

## 2020年度 小麦粉（国産）

サンプルID	原産地	BEA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-JWF01	岩手県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-JWF02	北海道	ND	ND	6.8	168.4	47.3
R2-JWF03	滋賀県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-JWF04	国産	ND	ND	1.4	30.6	8.2
R2-JWF05	北海道	1.2	ND	3.4	115.7	29.9
R2-JWF06	北海道	0.8	ND	1.8	54.0	14.4
R2-JWF07	福岡県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-JWF08	北海道	ND	ND	3.7	89.6	26.7
R2-JWF09	北海道	0.7	ND	11.1	289.3	84.3
R2-JWF10	北海道	ND	ND	2.2	72.9	18.2
R2-JWF11	北海道	0.4	ND	ND	6.0	2.2
R2-JWF12	北海道	ND	ND	3.6	83.7	26.1
R2-JWF13	北海道	ND	ND	2.2	74.7	18.9
R2-JWF14	北海道	1.5	ND	12.3	395.6	102.2
R2-JWF15	北海道	1.1	ND	2.6	80.5	21.3
R2-JWF16	北海道	1.3	ND	7.6	201.9	60.1
R2-JWF17	岩手県	ND	ND	1.2	2.6	1.7
R2-JWF18	岩手県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-JWF19	九州産	ND	ND	ND	3.9	2.3
R2-JWF20	青森県	1.2	3.9	5.1	59.4	20.0
R2-JWF21	青森県	ND	ND	ND	14.5	4.5
R2-JWF22	国産	ND	ND	ND	31.0	8.3
R2-JWF23	青森県	2.5	14.2	8.3	50.5	17.3



## 2020年度 小麦粉（輸入）

サンプルID	原産地	BEA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-FWF01	フランス	ND	ND	ND	6.2	2.9
R2-FWF02	不明	ND	ND	ND	ND	ND
R2-FWF03	イタリア	ND	ND	ND	6.7	2.8
R2-FWF04	不明	ND	ND	1.0	6.7	3.1
R2-FWF05	北米他	ND	ND	ND	4.1	1.2
R2-FWF06	北米他	ND	ND	ND	3.8	0.9
R2-FWF07	フランス	ND	ND	0.5	4.5	2.2
R2-FWF08	アメリカ他	ND	ND	ND	ND	ND
R2-FWF09	北米他	ND	ND	ND	6.1	1.9
R2-FWF10	フランス	ND	ND	1.6	17.8	6.1
R2-FWF11	カナダ、アメリカ主体	ND	ND	ND	11.2	2.8
R2-FWF12	北米、オーストラリア他	ND	ND	ND	8.2	2.4
R2-FWF13	北米他	ND	ND	ND	9.8	2.3
R2-FWF14	カナダ主体	ND	ND	ND	13.4	3.6
R2-FWF15	ドイツ	ND	ND	3.0	10.5	7.9
R2-FWF16	北米、オーストラリア他	ND	ND	ND	3.8	1.5
R2-FWF17	北米、オーストラリア他	ND	ND	ND	5.5	1.4
R2-FWF18	カナダ	ND	ND	ND	22.2	6.4
R2-FWF19	カナダ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-FWF20	北米産	1.3	ND	ND	2.1	1.2
R2-FWF21	北米産	ND	ND	ND	4.5	1.6

## 2020年度 ハト麦加工品

サンプルID	原産地	BEA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-HT01	島根県	3.0	ND	ND	ND	ND
R2-HT02	栃木県	ND	ND	ND	ND	ND
R2-HT03	中国	ND	ND	ND	ND	ND
R2-HT04	タイ	1.2	ND	ND	ND	ND
R2-HT05	タイ	1.7	ND	ND	ND	ND
R2-HT06	島根県	2.2	ND	ND	ND	ND
R2-HT07	富山県	1.7	ND	ND	ND	ND
R2-HT08	青森県	1.7	ND	ND	ND	ND
R2-HT09	岩手県	1.7	ND	ND	ND	ND
R2-HT10	岩手県	1.7	ND	ND	ND	ND
R2-HT11	ラオス	2.3	ND	ND	ND	ND
R2-HT12	韓国	2.8	ND	ND	ND	ND
R2-HT13	国内	ND	ND	ND	ND	ND
R2-HT14	中国	1.6	ND	ND	ND	ND
R2-HT15	岡山県	4.1	ND	ND	ND	ND
R2-HT16	栃木県	14.0	ND	ND	ND	ND
R2-HT17	タイ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-HT18	中国	ND	ND	ND	ND	ND
R2-HT19	中国 (福健省)	12.4	ND	ND	ND	ND
R2-HT20	中国 (貴州)	ND	ND	ND	ND	ND
R2-HT21	タイ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-HT22	富山県	7.6	ND	ND	ND	ND

## 2020年度 ライ麦粉

サンプルID	原産地	BEA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-RY01	ドイツ、カナダ主体	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RY02	ドイツ、カナダ主体	ND	ND	ND	4.5	1.2
R2-RY03	フランス	ND	ND	5.4	136.3	42.2
R2-RY04	ドイツ、カナダ主体	ND	ND	ND	15.8	3.8
R2-RY05	北海道	4.3	25.1	59.1	1822	453.6
R2-RY06	不明	ND	ND	ND	2.1	1.1
R2-RY07	不明	ND	ND	ND	2.5	0.8
R2-RY08		ND	ND	ND	8.0	3.0
R2-RY09	不明	ND	ND	ND	1.8	0.7
R2-RY10	不明	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RY11	不明	ND	ND	ND	3.1	1.3
R2-RY12	ドイツ	ND	ND	ND	13.9	4.0
R2-RY13	ドイツ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RY14	国内製造	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RY15	ドイツ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RY16	ドイツ	ND	ND	5.8	74.2	25.3
R2-RY17	不明	ND	ND	ND	13.9	4.2
R2-RY18	不明	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RY19	ドイツ	ND	ND	ND	11.2	4.3
R2-RY20	ドイツ	ND	ND	6.3	82.3	30.1
R2-RY21	ドイツ	ND	ND	ND	6.5	2.5
R2-RY22	ドイツ	ND	ND	ND	2.8	1.7
R2-RY23	アメリカ	ND	ND	5.8	32.1	18.0
R2-RY24	ドイツ	ND	ND	2.4	36.8	11.7
R2-RY25	不明	ND	ND	<u>1.0</u>	11.8	3.9
R2-RY26	北海道	5.2	98.9	1416	48538	11903
R2-RY27	ドイツ主体	ND	ND	ND	6	2
R2-RY28	北海道	50.2	115.3	1468	48783	12589
R2-RY29	フランス	ND	ND	4.2	20.4	12.7
R2-RY30	ドイツ主体	ND	ND	ND	2.9	<u>0.8</u>

2020年度 レギュラーコーヒー

サンプルID	原産国	BEA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-RCF01	コロンビア、ブラジル	0.8	ND	ND	ND	ND
R2-RCF02	グアテマラ、コロンビア	6.6	ND	ND	ND	ND
R2-RCF03	グアテマラ、ブラジル	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RCF04	エチオピア	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RCF05	コロンビア、ブラジル、ハワイコナ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RCF06	ブラジル、コロンビア、他	1.0	ND	ND	ND	ND
R2-RCF07	エチオピア、ブラジル、他	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RCF08	タンザニア、コロンビア、他	ND	ND	ND	ND	ND
R2-RCF09	コロンビア、ブラジル、他	0.7	ND	ND	ND	ND
R2-RCF10		ND	ND	ND	ND	ND

## 2020年度 ドライフルーツ

サンプルID	原産地	BEA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-DF01	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-DF02	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-DF03	トルコ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-DF04	中国	ND	ND	ND	ND	ND
R2-DF05	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-DF06	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-DF07	オーストラリア	ND	ND	ND	ND	ND
R2-DF08	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-DF09	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND
R2-DF10		ND	ND	ND	ND	ND
R2-DF11	アメリカ	ND	ND	ND	ND	ND

## 2020年度 きな粉

サンプルID	原産国	BEA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-KN01	北海道	ND	ND	ND	17.8	3.9
R2-KN02	中国	ND	ND	0.8	7.5	2.9
R2-KN03	岩手県	1.5	ND	ND	2.7	1.1
R2-KN04	国産	1.3	ND	ND	2.9	0.9
R2-KN05	兵庫県	93.8	ND	0.8	5.8	2.5
R2-KN06	国内産	101.5	3.3	5.1	23.9	13.9
R2-KN07	岩手県	9.0	ND	0.4	3.7	1.2
R2-KN08	国内産	10.2	ND	ND	4.9	1.4
R2-KN09	北海道	ND	ND	ND	1.6	0.5
R2-KN10	北海道	ND	ND	ND	ND	ND

## 2020 年度 ゴマ

サンプルID	原産国	BEA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENA1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ENB1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-GM01	パラグアイ	10.4	ND	ND	ND	ND
R2-GM02	トルコ、エジプト	ND	ND	ND	ND	ND
R2-GM03	パラグアイ	3.8	ND	ND	ND	ND
R2-GM04	不明	6.4	ND	ND	ND	ND
R2-GM05	不明	8.3	ND	ND	ND	ND
R2-GM06	不明	1.4	ND	ND	ND	ND
R2-GM07	不明	1.9	ND	ND	ND	ND
R2-GM08	不明	ND	ND	ND	ND	ND
R2-GM09	不明	1.0	ND	ND	ND	ND
R2-GM10	不明	4.3	ND	ND	ND	ND

別添-3 各試料における STC の汚染濃度

2020 年度 玄米

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-RC01	北海道	ND
R2-RC02	秋田県	0.14
R2-RC03	国内産	<u>0.04</u>
R2-RC04	茨城県	0.94
R2-RC05	九州産	0.11
R2-RC06	国内産	<u>0.04</u>
R2-RC07	島根県	0.10
R2-RC08	千葉県	0.30
R2-RC09	新潟県	1.07
R2-RC10	福島県	0.14
R2-RC11	福島県	0.16
R2-RC12	千葉県	0.12
R2-RC13	千葉県	0.13
R2-RC14	北海道	ND
R2-RC15	山形県	0.11
R2-RC16	秋田県	<u>0.04</u>
R2-RC17	秋田県	0.05
R2-RC18	国内産	0.09
R2-RC19	富山県	0.26
R2-RC20	国内産	0.65



## 2020年度 小麦粉（国産）

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-JWF01	岩手県	ND
R2-JWF02	北海道	ND
R2-JWF03	滋賀県	ND
R2-JWF04	国産	ND
R2-JWF05	北海道	ND
R2-JWF06	北海道	ND
R2-JWF07	福岡県	ND
R2-JWF08	北海道	ND
R2-JWF09	北海道	ND
R2-JWF10	北海道	ND
R2-JWF11	北海道	ND
R2-JWF12	北海道	ND
R2-JWF13	北海道	ND
R2-JWF14	北海道	0.07
R2-JWF15	北海道	<u>0.02</u>
R2-JWF16	北海道	0.08
R2-JWF17	岩手県	0.09
R2-JWF18	岩手県	ND
R2-JWF19	九州産	ND
R2-JWF20	青森県	0.34
R2-JWF21	青森県	ND
R2-JWF22	国産	0.24
R2-JWF23	青森県	ND

## 2020年度 小麦粉（輸入）

サンプルID	原産地	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-FWF01	フランス	<u>0.03</u>
R2-FWF02	不明	0.07
R2-FWF03	イタリア	ND
R2-FWF04	不明	ND
R2-FWF05	北米他	ND
R2-FWF06	北米他	ND
R2-FWF07	フランス	ND
R2-FWF08	アメリカ他	ND
R2-FWF09	北米他	<u>0.03</u>
R2-FWF10	フランス	<u>0.03</u>
R2-FWF11	カナダ、アメリカ主体	ND
R2-FWF12	北米、オーストラリア他	ND
R2-FWF13	北米他	ND
R2-FWF14	カナダ主体	ND
R2-FWF15	ドイツ	ND
R2-FWF16	北米、オーストラリア他	ND
R2-FWF17	北米、オーストラリア他	ND
R2-FWF18	カナダ	ND
R2-FWF19	カナダ	ND
R2-FWF20	北米産	ND
R2-FWF21	北米産	ND

2020年度 そば（乾麺）

サンプルID	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-SB01	0.39
R2-SB02	0.31
R2-SB03	0.53
R2-SB04	0.09
R2-SB05	0.08
R2-SB06	0.07
R2-SB07	0.09
R2-SB08	0.09
R2-SB09	<u>0.02</u>
R2-SB10	0.08
R2-SB11	ND
R2-SB12	0.20
R2-SB13	ND
R2-SB14	0.57
R2-SB15	0.15
R2-SB16	ND
R2-SB17	0.13
R2-SB18	0.21
R2-SB19	0.31
R2-SB20	ND
R2-SB21	0.30
R2-SB22	ND
R2-SB23	<u>0.02</u>
R2-SB24	<u>0.05</u>
R2-SB25	0.05
R2-SB26	ND
R2-SB27	ND
R2-SB28	0.34
R2-SB29	0.13
R2-SB30	0.06

2020年度 ビスケット

サンプルID	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-BS01	ND
R2-BS02	ND
R2-BS03	ND
R2-BS04	<u>0.04</u>
R2-BS05	ND
R2-BS06	ND
R2-BS07	ND
R2-BS08	ND
R2-BS09	ND
R2-BS10	ND
R2-BS11	ND
R2-BS12	ND
R2-BS13	ND
R2-BS14	ND
R2-BS15	ND
R2-BS16	ND
R2-BS17	ND
R2-BS18	0.13
R2-BS19	ND
R2-BS20	ND

2020年度 スパゲッティ

サンプルID	原産国	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-SP01	イタリア	ND
R2-SP02	イタリア	ND
R2-SP03		ND
R2-SP04	イタリア	ND
R2-SP05	イタリア	ND
R2-SP06	ギリシャ	ND
R2-SP07	ギリシャ	<u>0.02</u>
R2-SP08	ギリシャ	ND
R2-SP09	イタリア	0.10
R2-SP10	イタリア	0.05
R2-SP11	イタリア	ND
R2-SP12	イタリア	ND
R2-SP13	イタリア	ND
R2-SP14	北海道	ND
R2-SP15		ND
R2-SP16		ND
R2-SP17		ND
R2-SP18	イタリア	ND
R2-SP19	イタリア	ND
R2-SP20		ND

2020年度 うどん（乾麺）

サンプルID	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-UD01	ND
R2-UD02	ND
R2-UD03	<u>0.05</u>
R2-UD04	ND
R2-UD05	ND
R2-UD06	ND
R2-UD07	ND
R2-UD08	0.16
R2-UD09	ND
R2-UD10	ND
R2-UD11	ND
R2-UD12	ND
R2-UD13	<u>0.04</u>
R2-UD14	ND
R2-UD15	ND
R2-UD16	ND
R2-UD17	ND
R2-UD18	ND
R2-UD19	ND
R2-UD20	<u>0.05</u>

2020年度 パン粉

サンプルID	STC ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
R2-PF01	ND
R2-PF02	ND
R2-PF03	<u>0.03</u>
R2-PF04	<u>0.02</u>
R2-PF05	<u>0.04</u>
R2-PF06	<u>0.03</u>
R2-PF07	ND
R2-PF08	<u>0.03</u>
R2-PF09	ND
R2-PF10	ND

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

分担研究課題：毒性試験（エンニアチン B のマウス反復投与毒性試験）

分担研究者 渋谷 淳（東京農工大学大学院）

**研究要旨**

日本国内流通食品に検出される新興カビ毒の安全性確保に関する研究の一端として、エンニアチン類についての毒性情報を得る為、エンニアチン B 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 30 mg/kg、公比 2、溶媒対照群を含む 4 用量群を設定し、一般状態観察、体重、摂餌量測定、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ところ、エンニアチン B 投与群で摂餌量の変化や RBC 値の低値、BUN 値の高値、腎臓絶対重量の高値が認められた。しかしながら、病理組織学的検査においてエンニアチン B の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量は 30 mg/kg となった。今後はマウスにおけるエンニアチン B の薬物動態試験を実施する予定である。



## A. 研究目的

カビ毒はカビが感染した農作物中に生産され、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がん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。

エンニアチン類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。日本に流通する小麦粉を対象とした予備調査（Food Addit Contam Part A, 33, 1620-26, 2016）においては高濃度かつ高頻度でエンニアチン類が検出されており、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。

EFSAが公表した、マウスを用いたエンニアチンBの42日間の反復投与試験

（Maranghi et al., EFSA, 2018）では、公比10を設定し0.18, 1.8, 18 mg/kg/日の用量で強制経口投与試験を実施し、無毒性量が求められている。しかし、公比が大きいかつ用量依存性の乏しいデータが多く、より正確な無毒性量を求めるためにはガイドラインに沿った一般毒性試験の実施が必要であると考えられた。

昨年度には再現性の確保に重点をおいてエンニアチン類混合物（B、B1、A1）の28日間反復経口投与試験を実施したが、投与に起因する変化として、高用量群（20 mg/kg）の雌雄の摂餌量に若干の低値がみられるのみであった。42日間反復投与試験と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、エンニアチン類の確かな毒性情報を得るには再試験が必要である

と考えられた。そこで、本年度にはマウスを用いたエンニアチンB単体の28日間反復経口投与毒性試験を実施し、エンニアチン類の無毒性量等、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。

## B. 研究方法

### （1）動物実験

5週齢の雌雄マウス（ICR [CrI:CD1 (ICR)])を日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センターより購入し、1週間の馴化後実験に用いた。バリア動物室のプラスチックケージにて、12時間の明暗サイクル、室温23±3°C、湿度50±20%の制御環境下で個別に飼育した。実験期間中は固形飼料CRF-1（γ線滅菌：オリエンタル酵母工業株式会社）と水道水を自由摂取させた。

エンニアチンBをdimethyl sulfoxide添加コーン油で調製した被験液を0、7.5、15、30 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。群構成表をTable 1に示す。投与期間中は一般状態の観察及び体重、摂餌量の測定を実施した。投与期間終了後、剖検時に血液を採取し、血液学検査と血液生化学検査を実施した。剖検では外表及び全ての器官、組織を詳細に観察した。所定の臓器を採取し重量測定後、固定し、パラフィン包埋した。各臓器のヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色標本を作製し、鏡検した。

### （2）一般状態の観察

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

### (3) 体重測定

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

### (4) 摂餌量測定

投与 1、4 及び 7 日、以降は 7 日ごとに毎週 1 回実施した。全動物について 07:00~12:30 の間に給餌量/残餌量を測定した。投与開始日の測定は前日からの 1 日量、投与 4 及び 7 日は 3 日間の累積摂取量、その後は 7 日ごとに 7 日間の累積摂取量に基づいて、1 匹当たりの 1 日摂餌量を算出した。

### (5) 血液学検査

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

### (6) 血液生化学検査

血液学検査用試料の採取後に残った血液（約 0.4 mL）をヘパリン加試験管（キャピジェクト II ヘパリンリチウム：テルモ株式会社）に移し、遠心分離（3,100 rpm、1,690 ×g、12 分間）し、得られた血漿について Table 3 に記載の項目及び方法により検査した。

### (7) 剖検、器官重量測定

全ての動物を採血後腹大動脈切断により放血致死させ、外表及び全ての器官/組織を詳細に観察した。Table 4 に示す器官の重量（絶対重

量）を測定するとともに、剖検時の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

### (8) 病理組織学検査

全ての動物について、Table 4 に示した対象器官/組織をリン酸緩衝 10%ホルマリン液で固定した。ただし、眼球及び視神経はリン酸緩衝 3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン液で固定、精巣及び精巣上体はブアン液で固定後、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で保存した。全ての動物の検査対象器官/組織についてパラフィン包埋し、H・E 染色標本を作製した。作製した全ての H・E 染色標本について鏡検を実施した。

### (9) 統計解析

計量データ（体重/体重増加量、摂餌量、血液学検査、血液化学検査及び器官重量）について SAS Release 9.1.3（SAS Institute Inc.）を用いて溶媒対照群と各被験物質投与群との間で検定を行った。Bartlett 検定で等分散性を確認した後、Dunnett の検定あるいは Steel の検定を行った。

### (10) 倫理面への配慮

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

## C. 研究結果

### (1) 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。

### (2) 体重の変化

いずれの群においても投与期間中の体重に有意な変化は認められなかった (Table 5)。

### (3) 摂餌量の変化

雄では投与 1 日の高用量群、投与 14 日の低・高用量群、投与 21 日の中・高用量群、投与 28 日の高用量群に対照群と比較し高値がみられた。雌では投与 14 日の低用量群、投与 21 日の低用量群、投与 28 日の低・高用量群に対照群と比較し低値がみられた (Table 5)。

### (4) 血液学検査結果

雄では高用量群に RBC 値の低値が認められた。雌で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 (Table 6)。

### (5) 血液生化学検査

雄では高用量群に BUN 値の高値が認められた。雌で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 (Table 7)。

### (6) 剖検 (肉眼所見)

計画剖検では低用量群の雄 1 例 (動物番号: 2002) に精巣の白色巣、低用量群の雌 1 例 (動物番号: 2103) に肝臓の白色巣、中用量群の雄 1 例 (動物番号: 3003) に膝関節の隆起巣、高用量群の雄 1 例 (動物番号: 4004) に精巣の小型化がみられた (Table 8)。

### (7) 器官重量測定結果

高用量群の雄の腎臓絶対重量が対照群と比較

し高値を示した。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 (Table 9)。

### (8) 病理組織学検査結果

計画剖検例のいずれの群にも諸臓器に偶発性の変化がみられたが、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 (Table 10)。計画剖検時に低用量群の雄 1 例にみられた精巣の白色巣は精液瘤、低用量群の雌 1 例にみられた肝臓の白色巣は壊死、中用量群の雄 1 例にみられた膝関節の隆起巣は仮骨形成、高用量群の雄 1 例にみられた精巣の小型化は精細管の変性/萎縮であった。

## D. 考察

エンニアチン B の 42 日間反復投与毒性試験 (Maranghi et al., EFSA, 2018) において、18 mg/kg 群で有意な体重増加抑制が観察されている。また、昨年度に実施したエンニアチン類混合物 (エンニアチン B : エンニアチン B1 : エンニアチン A1 = 4 : 4 : 1) を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験では、投与に起因した変化として高用量群 (20 mg/kg) の雌雄の摂餌量に若干の低値がみられた。本試験では、上記 2 試験との投与期間や被験物質の違いを考慮して投与量が設定された。本試験では被験物質の影響と考えられる変化として、摂餌量の変化や RBC 値の低値、BUN 値の高値、腎臓絶対重量の高値が認められた。しかしながら、剖検時に血液学及び血液生化学検査結果と符号する肉眼所見は得られず、また病理組織学的検査においても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。以上より、エンニアチン B のマウスを用いた 28 日間反復投与を最高用量 30 mg/kg の用量で実施した結果、最小毒性量は求めることが出来ず、無毒性量は 30 mg/kg という結果となった。エンニアチン B はブロイラ

一での経口投与後の吸収性が低いことが文献的に示唆されており、マウス 28 日間毒性試験での明らかな毒性が検出されない理由と考えられた。エンニアチンは肝臓のシトクローム P450 を介して代謝される。そこで 2021 年度は、マウスにおけるエンニアチン B の薬物動態試験を実施する予定である。

## E. 健康危機情報

特になし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Okano, H., Okamura, T., Takahashi, Y., Takashima, K., Ojira, R., Tang, Q., Jin, M., Kikuchi, S., Ogawa, B., Yoshida, T., Yoshinari, T., Shibutani, M.: A 28-

day repeated oral dose toxicity study of enniatin complex in mice. J. Toxicol. Sci. (in press).

### 2. 学会発表

該当なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

Table 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
溶媒 対照群	0	0	5	雄	10	1001~1010
				雌	10	1101~1110
低用量群	7.5	1.5	5	雄	10	2001~2010
				雌	10	2101~2110
中用量群	15	3	5	雄	10	3001~3010
				雌	10	3101~3110
高用量群	30	6	5	雄	10	4001~4010
				雌	10	4101~4110

Table 2. 血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

検査項目	測定方法	単位
赤血球数 (RBC)	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>4</sup> (E4)/μL
ヘモグロビン濃度 (HGB)	シアンメトヘモグロビン変法 <sup>a)</sup>	g/dL
ヘマトクリット値 (HCT)	RBC 及び MCV から算出 <sup>a)</sup>	%
平均赤血球容積 (MCV)	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	fL
平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)	RBC 及び HGB から算出 <sup>a)</sup>	pg
平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)	HGB 及び HCT から算出 <sup>a)</sup>	g/dL
赤血球容積分布幅 (RDW)	赤血球容積ヒストグラムの標準偏差と MCV から算出 <sup>a)</sup>	%
網赤血球数 (Retic)	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>9</sup> (E9)/L
血小板数 (PLT)	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>4</sup> (E4)/μL
白血球数 (WBC)	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>2</sup> (E2)/μL
白血球分類 <sup>注</sup>	フローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>2</sup> (E2)/μL
使用測定機器		
a) : 総合血液学検査装置 アドヴィア 120 又は 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.)		
注 : リンパ球 (LYMP)、好中球 (NEUT)、好酸球 (EOS)、好塩基球 (BASO)、単球 (MONO) 及び大型非染色球 (LUC)		

Table 3. 血液生化学検査の項目、測定法及び使用機器など

検査項目	測定方法	単位
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	UV-rate 法 <sup>a)</sup>	IU/L
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	UV-rate 法 <sup>a)</sup>	IU/L
乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)	UV-rate 法 <sup>a)</sup>	IU/L
アルカリホスファターゼ (ALP)	Bessey-Lowry 法 <sup>a)</sup>	IU/L
トリグリセライド (TG)	LPL-GK-GPO-POD 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
グルコース (GLU)	グルコースデヒドロゲナーゼ法 <sup>a)</sup>	mg/dL
尿素窒素 (BUN)	Urease-LEDH 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
クレアチニン (CRNN)	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase- POD 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
総タンパク質 (TP)	Biuret 法 <sup>a)</sup>	g/dL
アルブミン (ALB)	BCG 法 <sup>a)</sup>	g/dL
A/G 比 (A/G)	総タンパク質及びアルブミンから算出	
使用測定機器		
<sup>a)</sup> : 臨床化学自動分析装置 TBA-120FR 形 (キャノンメディカルシステムズ株式会社)		

Table 4. 病理学検査対象器官/組織

組 織	H・E 標本作製	重量測定
大脳	√	√ (脳として)
小脳	√	
脊髄 (胸部)	√	
坐骨神経	√*	
眼球	√	
視神経	√	
ハーダー腺	√	
下垂体	√	
甲状腺	√	
上皮小体	√**	
副腎	√	
胸腺	√	√
脾臓	√	√
顎下リンパ節	√*	
腸間膜リンパ節	√	
心臓	√	√
胸大動脈	√	
気管	√	
肺 (気管支を含む)	√	√
舌	√	
食道	√	
胃	√	
十二指腸	√	
空腸	√	
回腸 (パイエル板を含む)	√	
盲腸	√	
結腸	√	
直腸	√	
顎下腺	√	
舌下腺	√	
肝臓	√	√ (肝臓として)
胆嚢	√	
膵臓	√	
腎臓	√	√
膀胱	√	
精巣/卵巣	√/√	√/√
精巣上体/子宮	√/√	√/√
前立腺/膣	√/√	
精嚢 (凝固腺を含む)	√	
乳腺 (鼠径部、雌のみ)	√*	
胸骨 (骨髄を含む)	√	
大腿骨 (膝関節及び骨髄を含む)	√*	
大腿部骨格筋	√*	
皮膚 (鼠径部)	√*	



組 織	H・E 標本作製	重量測定
肉眼的異常部位	√	
喉頭		(保存のみ)
鼻腔		(保存のみ)
個体識別部 (耳標を装着した耳介)		(保存のみ)

各項目該当ある場合は√で示す。

\*：両側を摘出し、片側を標本作製する（他の両側性器官は両側を鏡検）。

#：上皮小体は微小な器官であるため両側の標本作製を試みる。各群 80%以上の動物で片側（左を優先）の鏡検が可能と判断される場合、標本の再作製は行わない。

Table 5. 体重・摂餌量の変化

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (Control)	7.5	15	30
<b>Males</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)	Day 1	28.8 ± 1.5 <sup>a</sup>	29.0 ± 1.3	28.8 ± 1.1	29.0 ± 1.0
	Day 4	29.5 ± 1.6	30.1 ± 1.7	29.1 ± 1.2	29.7 ± 1.0
	Day 7	30.2 ± 1.5	31.4 ± 1.9	30.0 ± 1.1	30.4 ± 1.2
	Day 14	31.0 ± 1.5	32.4 ± 2.4	31.3 ± 1.4	31.6 ± 1.1
	Day 21	31.7 ± 2.0	33.0 ± 2.3	32.5 ± 1.6	32.8 ± 1.5
	Day 28	32.4 ± 2.1	34.0 ± 2.5	33.2 ± 1.5	33.6 ± 1.8
	Food consumption (g/animal/day)	Day 1	4.5 ± 0.6	4.7 ± 0.5	4.9 ± 0.5
Day 4		4.4 ± 0.4	4.6 ± 0.5	4.3 ± 0.4	4.6 ± 0.5
Day 7		4.1 ± 0.5	4.5 ± 0.5	4.3 ± 0.6	4.6 ± 0.3
Day 14		3.9 ± 0.2	4.3 ± 0.4*	4.3 ± 0.4	4.4 ± 0.2*
Day 21		3.8 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.4**	4.4 ± 0.3**
Day 28		4.0 ± 0.3	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.5 ± 0.4*
<b>Females</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight (g)	Day 1	23.1 ± 1.3	23.2 ± 1.7	23.0 ± 1.8	23.1 ± 0.9
	Day 4	23.4 ± 1.2	23.3 ± 1.6	23.4 ± 1.5	23.4 ± 1.2
	Day 7	23.9 ± 1.2	23.4 ± 1.5	23.8 ± 1.8	24.3 ± 1.0
	Day 14	25.0 ± 1.4	24.2 ± 1.5	25.2 ± 1.8	25.2 ± 1.3
	Day 21	26.0 ± 1.7	25.4 ± 1.0	26.0 ± 1.8	26.0 ± 1.4
	Day 28	26.6 ± 2.1	26.0 ± 1.3	26.7 ± 1.9	26.7 ± 1.5
	Food consumption (g/animal/day)	Day 1	4.3 ± 0.6	3.9 ± 0.8	3.9 ± 0.5
Day 4		3.9 ± 0.4	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.3
Day 7		4.0 ± 0.4	3.6 ± 0.5	3.9 ± 0.6	3.8 ± 0.5
Day 14		4.3 ± 0.4	3.7 ± 0.3**	4.0 ± 0.3	4.0 ± 0.2
Day 21		4.5 ± 0.6	3.8 ± 0.3**	4.1 ± 0.4	4.1 ± 0.3
Day 28		4.6 ± 0.5	4.0 ± 0.3**	4.3 ± 0.4	4.1 ± 0.4*

<sup>a</sup> Mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Table 6. 血液学検査結果

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (Control)	7.5	15	30
<b>Males</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
RBC ( $10^4/\mu\text{L}$ )		928 $\pm$ 38 <sup>a</sup>	913 $\pm$ 35	912 $\pm$ 60	880 $\pm$ 32*
Hemoglobin (g/dL)		14.3 $\pm$ 0.7	14.2 $\pm$ 0.5	13.9 $\pm$ 0.7	13.7 $\pm$ 0.6
Hematocrit (%)		47.3 $\pm$ 2.1	46.8 $\pm$ 1.5	46.3 $\pm$ 1.9	45.6 $\pm$ 1.6
MCV (fL)		51.0 $\pm$ 0.7	51.3 $\pm$ 1.1	50.9 $\pm$ 2.4	51.9 $\pm$ 1.3
MCH (pg)		15.4 $\pm$ 0.3	15.6 $\pm$ 0.4	15.3 $\pm$ 0.7	15.6 $\pm$ 0.4
MCHC (g/dL)		30.2 $\pm$ 0.4	30.4 $\pm$ 0.3	30.0 $\pm$ 0.4	30.1 $\pm$ 0.5
RDW (%)		12.2 $\pm$ 0.4	12.3 $\pm$ 0.4	12.5 $\pm$ 0.7	12.5 $\pm$ 0.4
Reticulocytes ( $10^9/\text{L}$ )		318.3 $\pm$ 35.6	325.3 $\pm$ 32.0	332.9 $\pm$ 41.0	330.4 $\pm$ 30.9
Platelets ( $10^4/\mu\text{L}$ )		121.5 $\pm$ 10.0	124.1 $\pm$ 14.4	118.5 $\pm$ 11.0	117.4 $\pm$ 11.9
WBC ( $10^2/\mu\text{L}$ )		42.7 $\pm$ 14.6	57.4 $\pm$ 24.8	55.0 $\pm$ 22.3	51.5 $\pm$ 23.3
Differential leukocyte counts ( $10^2/\mu\text{L}$ )					
Lymphocytes		32.6 $\pm$ 13.0	45 $\pm$ 21.4	38.5 $\pm$ 16.4	41.0 $\pm$ 18.8
Neutrophils		7.6 $\pm$ 2.1	9.4 $\pm$ 3.6	13.3 $\pm$ 12.1	7.7 $\pm$ 3.6
Eosinophils		1.4 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 0.8
Basophils		0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1
Monocytes		0.9 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.5
Large unstained cells		0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.3
<b>Females</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
RBC ( $10^4/\mu\text{L}$ )		936 $\pm$ 57	903 $\pm$ 27	929 $\pm$ 52	921 $\pm$ 37
Hemoglobin (g/dL)		14.9 $\pm$ 0.7	14.4 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 0.7	14.6 $\pm$ 0.4
Hematocrit (%)		48.9 $\pm$ 1.9	47.4 $\pm$ 1.5	48.1 $\pm$ 2.4	48.1 $\pm$ 1.4
MCV (fL)		52.3 $\pm$ 1.7	52.5 $\pm$ 0.9	51.9 $\pm$ 0.7	52.2 $\pm$ 1.3
MCH (pg)		15.9 $\pm$ 0.5	16.0 $\pm$ 0.4	15.7 $\pm$ 0.4	15.9 $\pm$ 0.5
MCHC (g/dL)		30.4 $\pm$ 0.5	30.5 $\pm$ 0.5	30.3 $\pm$ 0.5	30.5 $\pm$ 0.6
RDW (%)		13.1 $\pm$ 0.5	13.1 $\pm$ 0.5	12.9 $\pm$ 0.4	13.0 $\pm$ 0.5
Reticulocytes ( $10^9/\text{L}$ )		363.3 $\pm$ 47.8	362.8 $\pm$ 70.9	337.0 $\pm$ 64.6	358.6 $\pm$ 45.4
Platelets ( $10^4/\mu\text{L}$ )		101.0 $\pm$ 12.0	101.1 $\pm$ 8.2	107.2 $\pm$ 16.9	109.1 $\pm$ 8.8
WBC ( $10^2/\mu\text{L}$ )		53.7 $\pm$ 12.0	44.9 $\pm$ 12.7	44.3 $\pm$ 14.5	43.4 $\pm$ 6.4
Differential leukocyte counts ( $10^2/\mu\text{L}$ )					
Lymphocytes		41.8 $\pm$ 11.0	35.3 $\pm$ 10.8	35.2 $\pm$ 12.0	33.3 $\pm$ 4.9
Neutrophils		8.9 $\pm$ 2.9	6.9 $\pm$ 2.4	6.6 $\pm$ 3.0	7.5 $\pm$ 1.8
Eosinophils		1.7 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.4
Basophils		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1
Monocytes		0.9 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.5
Large unstained cells		0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Abbreviations: MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; RBC, red blood cell count; RDW, red blood cell distribution width; WBC, white blood cell count.

Table 7. 血液生化学検査結果

	Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
	0 (control)	7.5	15	30
<b>Males</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Total protein (g/dL)	4.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.02	5.0 ± 0.2	4.8 ± 0.1
Albumin (g/dL)	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.2 ± 0.1
A/G ratio	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.1
AST (IU/L)	39 ± 6	46 ± 11	42 ± 10	39 ± 7
ALT (IU/L)	29 ± 5	39 ± 19	31 ± 5	31 ± 13
LDH (IU/L)	175 ± 65	196 ± 40	199 ± 64	194 ± 54
ALP (IU/L)	216 ± 59	229 ± 56	209 ± 58	256 ± 57
Triglyceride (mg/dL)	80 ± 24	94 ± 28	76 ± 37	101 ± 19
Glucose (mg/dL)	204 ± 16	207 ± 22	202 ± 22	202 ± 28
BUN (mg/dL)	22 ± 3	25 ± 5	26 ± 3	26 ± 5*
Creatinine (mg/dL)	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.02
<b>Females</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Total protein (g/dL)	5.0 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2
A/G ratio	2.7 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.3*	2.7 ± 0.2
AST (IU/L)	47 ± 7	47 ± 10	46 ± 12	49 ± 9
ALT (IU/L)	26 ± 4	28 ± 9	26 ± 8	31 ± 11
LDH (IU/L)	157 ± 53	163 ± 56	161 ± 50	145 ± 39
ALP (IU/L)	310 ± 67	337 ± 77	283 ± 46	327 ± 86
Triglyceride (mg/dL)	78 ± 29	66 ± 12	82 ± 30	76 ± 32
Glucose (mg/dL)	178 ± 21	180 ± 11	172 ± 17	174 ± 18
BUN (mg/dL)	22 ± 4	22 ± 2	21 ± 3	20 ± 3
Creatinine (mg/dL)	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.02

<sup>a</sup> Mean ± SD.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

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

Table 8. 剖検所見：肉眼所見

		Dose of Enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (control)	7.5	15	30
Males					
	No. of animals examined	10	10	10	10
All tissues					
	Not remarkable	10 <sup>a</sup>	9	9	9
Testes					
	Focus, white	0	1	0	0
	Small	0	0	0	1
Knee joint					
	Focus, raised	0	0	1	0
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
All tissues					
	Not remarkable	9	10	10	10
Liver					
	Focus, white	1	0	0	0

<sup>a</sup>The number of animals with lesions.

Table 9. 剖検時器官重量

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (Control)	7.5	15	30
<b>Males</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight	(g)	32.8 ± 2.2 <sup>a</sup>	34.4 ± 2.6	33.6 ± 1.7	34.0 ± 1.9
Brain	(mg)	476 ± 16	476 ± 32	477 ± 27	470 ± 30
	(mg/100g BW)	1460 ± 109	1391 ± 119	1425 ± 122	1385 ± 99
Thymus	(mg)	37 ± 7	44 ± 13	38 ± 6	41 ± 8
	(mg/100g BW)	113 ± 19	130 ± 41	114 ± 15	121 ± 26
Heart	(mg)	153 ± 31	151 ± 15	153 ± 10	152 ± 10
	(mg/100g BW)	465 ± 68	441 ± 34	458 ± 38	449 ± 24
Lungs	(mg)	169 ± 11	177 ± 14	178 ± 13	177 ± 10
	(mg/100g BW)	517 ± 36	515 ± 36	531 ± 31	522 ± 25
Liver	(g)	1.75 ± 0.11	1.86 ± 0.19	1.88 ± 0.21	1.90 ± 0.13
	(g/100g BW)	5.33 ± 0.30	5.39 ± 0.27	5.59 ± 0.49	5.59 ± 0.31
Spleen	(mg)	81 ± 13	91 ± 18	92 ± 18	96 ± 12
	(mg/100g BW)	247 ± 26	264 ± 41	273 ± 43	282 ± 34
Kidneys	(mg)	430 ± 30	471 ± 45	470 ± 33	487 ± 62*
	(mg/100g BW)	1315 ± 101	1372 ± 89	1401 ± 132	1435 ± 170
Testes	(mg)	231 ± 23	239 ± 30	241 ± 29	209 ± 60
	(mg/100g BW)	705 ± 53	698 ± 95	716 ± 70	615 ± 173
Epididymides	(mg)	88 ± 8	88 ± 4	85 ± 6	86 ± 9
	(mg/100g BW)	268 ± 17	257 ± 21	254 ± 17	255 ± 28
<b>Females</b>					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Body weight	(g)	26.6 ± 2.2	26.5 ± 1.5	27.2 ± 1.7	26.5 ± 1.5
Brain	(mg)	475 ± 28	479 ± 27	471 ± 24	474 ± 35
	(mg/100g BW)	1791 ± 124	1811 ± 81	1734 ± 73	1791 ± 99
Thymus	(mg)	52 ± 14	59 ± 9	50 ± 7	46 ± 9
	(mg/100g BW)	193 ± 46	221 ± 34	186 ± 30	175 ± 33
Heart	(mg)	131 ± 15	121 ± 10	129 ± 13	129 ± 14
	(mg/100g BW)	494 ± 58	456 ± 23	476 ± 46	487 ± 43
Lungs	(mg)	165 ± 10	169 ± 14	170 ± 16	165 ± 15
	(mg/100g BW)	621 ± 35	636 ± 28	623 ± 34	621 ± 35
Liver	(g)	1.46 ± 0.18	1.45 ± 0.14	1.47 ± 0.10	1.42 ± 0.18
	(g/100g BW)	5.47 ± 0.33	5.48 ± 0.38	5.41 ± 0.24	5.34 ± 0.50
Spleen	(mg)	100 ± 15	113 ± 17	101 ± 11	100 ± 17
	(mg/100g BW)	374 ± 43	426 ± 55*	370 ± 36	375 ± 48
Kidneys	(mg)	343 ± 37	320 ± 20	333 ± 44	329 ± 27
	(mg/100g BW)	1287 ± 74	1207 ± 49	1222 ± 100	1244 ± 113
Ovaries	(mg)	12.0 ± 2.9	10.0 ± 2.7	9.8 ± 2.2	11.8 ± 4.5
	(mg/100g BW)	45.2 ± 11.1	37.6 ± 8.4	35.9 ± 7.8	44.0 ± 15.0
Uterus	(mg)	141 ± 40	143 ± 35	150 ± 40	148 ± 40
	(mg/100g BW)	524 ± 111	539 ± 123	556 ± 159	558 ± 140

<sup>a</sup> Mean ± SD.

Abbreviations: BW, body weight.

\**P* < 0.05, significantly different from the 0 mg/kg vehicle controls by Dunnett's test or Steel's test.

Table 10. 病理組織学検査

		Dose of enniatin B (mg/kg/day)			
		0 (Control)	7.5	15	30
Males (End of administration)					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Eye					
	Retinal rosettes	1	0	0	0
	minimal	1	0	0	0
Glandular stomach					
	Dilatation, gland	0	1	0	0
	minimal	0	1	0	0
Kidney					
	Basophilia, tubule	0	1	1	1
	minimal	0	1	1	1
	Cyst	0	0	1	0
	minimal	0	0	1	0
	Mineralization, intraluminal	1	0	1	2
	minimal	1	0	1	2
Liver					
	Necrosis, focal	0	0	1	1
	minimal	0	0	1	1
Testis					
	Spermatocele	0	2 <sup>b</sup>	0	0
	minimal	0	2	0	0
	Degeneration/atrophy, tubule	0	0	0	1 <sup>b</sup>
	mild	0	0	0	1
Bone, femur (knee joint)					
	Callus	0	0	1 <sup>b</sup>	0
	moderate	0	0	1	0
Females					
	No. of animals examined	10	10	10	10
Eye					
	Retinal rosettes	0	1	0	0
	minimal	0	1	0	0
Harderian gland					
	Infiltrate, mixed inflammatory cell	1	0	0	0
	minimal	1	0	0	0
Kidney					
	Basophilia, tubule	1	0	1	0
	minimal	1	0	1	0
	Mineralization, intraluminal	1	1	1	0
	minimal	1	1	1	0
	Dilation, tubule	0	0	1	0
	minimal	0	0	1	0
	Microabscess	0	0	0	1
	minimal	0	0	0	1
Liver					
	Infiltrate, mixed, inflammatory cell	1	3	1	1
	minimal	1	2	1	1
	mild	0	1	0	0
	Necrosis	0	1 <sup>b</sup>	0	0
	moderate	0	1	0	0

<sup>a</sup> The number of animals with findings.

<sup>b</sup> Lesions with gross findings.

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

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

市販 ELISA kit による 4,15-DAS の迅速簡易測定法の検討

研究分担者 小西良子 (東京農業大学)

研究要旨

4,15-ジアセトキシスシルペノール (4,15-DAS) は、2016 年の JECFA においてリスク評価され、T-2 トキシン、HT-2 トキシンおよび 4,15-DAS をグループとして TDI を設定することとなった。このことから、4,15-DAS についても迅速簡易測定法の開発が望まれる。

現在のところ、T-2 トキシンを対象とした迅速簡易測定法 (ELISA 法) は開発され、いくつかのメーカーから市販されている。しかし、4,15-DAS を対象としたものは市販されていない。T-2 トキシンと 4,15-DAS は同じトリコテセン系カビ毒タイプ A に分類されており、構造に類似性が高い。そのため、抗原構造が共通な部位があると考えられ、市販の T-2 トキシン ELISA kit に使われている抗体が 4,15-DAS も認識するか否かを市販 T-2 トキシン ELISA kit 3 種で検討を行った。また、4,15-DAS と共汚染が多いデオキシニバレノール (DON) を対象とする ELISA kit が 4,15-DAS を認識する恐れがないかを調べるため、市販の DON 用 ELISA kit 2 種類を用いて、交差反応の有無を検討した。

その結果、市販の T-2 トキシン ELISA kit 3 種類および DON 用 ELISA kit 2 種類とも、4,15-DAS には交差性を示さなかった。今後は、国外で販売されている T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンを認識する ELISA kit を入手して検討する予定である。



## A. 研究目的

トリコテセン系マイコトキシンは、フザリウム属菌が産生するカビ毒で、日本をはじめ、温帯地域に多く生息する。このカビ毒は、その構造の違いからタイプ A からタイプ D まで分類されている。タイプ A は 8 位に置換基がないか、水酸基またはエステル結合が存在しているもので T-2 トキシン (T-2)、HT-2 トキシン (HT-2)、4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS)、ネオソラニオールが属する。タイプ B は 8 位がカルボニルになっているものでデオキシニバレノール (DON) およびニバレノール (NIV) が属する。タイプ C は、7、8 位がエポキシドになっているものでクロトシンなどが属する。タイプ D は 4 位と 15 位の間に大員環構造をとっているもので、サトラトキシン、ロリジンなどが属する。主に穀類に汚染するカビ毒はタイプ A およびタイプ B である。

タイプ A とタイプ B の毒性を比較するとタイプ A の毒性はタイプ B に比べて高いとされている。ヒトの食中毒事例においても DON や NIV の汚染によって引き起こされるいわゆる赤カビ中毒では下痢嘔吐が主症状で死者はいないが、T-2 汚染が原因とされる場合には ATA 症と呼ばれる白血球減少や放射線障害様症状が現れ、致死率も高い。

近年の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）の研究から、北海道地域で T-2、HT-2 が豆類から検出されることが明らかになった。また 2010 年代に EFSA が実施した EU での汚染実態調査においても T-2、HT-2 の汚染が少なからず検出され、国内外で T-2 および HT-2 の汚染が注目され始めている。2016 年の JECFA においては、4,15-DAS の毒性評価が行われた。その結果、4,15-DAS は、単独での毒性関係の情報が少ないことから、JECFA は T-2、HT-2 および 4,15-DAS の 3

つのカビ毒を一つのグループとして、グループ TDI 0.06 µg/kg を設定した。これらの結果を受けて、世界的動向としては、タイプ A のトリコテセン系マイコトキシンをグループとして測定するようにシフトしていくことが考えられる。現在測定法としては LC-MS/MS による同時分析法が開発されているが、高価な装置と技術が必要なため、迅速簡便な測定法の開発が望まれている。

そこで我々は免疫学的測定法である ELISA に着目し、現在市販されている T-2 の ELISA kit で 4,15-DAS が測定できないかを検討した。T-2 用 ELISA kit は、T-2 を認識する抗体が試料中の T-2 と結合して、その結合物を酵素反応で検出するメカニズムになっている。市販されている kit では、それぞれのメーカーが独自の抗体を開発しているが、T-2 のどの部位を認識しているのかは不明である。構造的に見て、T-2 と 4,15-DAS は 2 位から 7 位までの構造が同じであることから、この部位を認識しているとすれば、4,15-DAS も認識することが考えられる（図 1）。

次に、日本では DON のスクリーニング法として ELISA が公定法となっているが、市販の DON 用 ELISA kit において、構造の類似性から、4,15-DAS も認識する可能性が考えられた（図 1）。各メーカーが出している交差性のデータには 4,15-DAS が測定されていないケースも多いため、本研究で市販の DON 用 ELISA kit における 4,15-DAS の交差性も検討した。

## B. 研究方法

### 1. 使用した ELISA kit

#### 1-1.T-2 ELISA kit

Max Signal T-2 ELISA kit (PerkinElmer 社)、RIDA SCREEN T-2 ELISA kit (R-Biopharm 社) および AgraQuant (Romer 社) の 3 種類を使用した。

## 1-2. DON ELISA kit

Max Signal DON ELISA kit (PerkinElmer 社) および RIDASCREEN DON ELISA kit (R-Biopharm 社) の 2 種類を使用した。

## 1-3. 4,15-DAS の添加濃度

4,15-DAS は、Sigma-Aldrich 社から購入し、1mg の 4,15-DAS をアセトニトリルで溶解し、stock solution とした。市販の ELISA kit に添付されている各カビ毒の標準品の濃度を参考に、その 1000 倍濃度までの溶液を実験に用いた。その際、適量の stock solution を窒素乾固したのち、各メーカーが用いている buffer により順次希釈した。

## 1-4. ELISA の手順

ELISA の操作方法は、各メーカーの説明書に従って行った。それぞれのメーカーにより手法が異なっており、T-2 用 ELISA の手順は表 1 に、DON 用 ELISA の手順は表 2 に挙げた。

## C. 研究結果

### 1. T-2 用 ELISA kit による 4,15-DAS の交差性

図 2 に 3 社の T-2 用 ELISA における T-2 を用いた検量線および 4,15-DAS を用いた検量線を示した。Max Signal では、付属されている標準品 0, 1, 5, 10, 25, 50 ppb の濃度と同じ濃度および 100, 250, 500, 5000 ppb の 4,15-DAS 溶液を用いて説明書通りの反応を行った。その結果、0 から 5000 ppb まで吸光度に変化がなかった。RIDASCREEN T-2 kit では、付属されている標準品の濃度 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 ppb に加え 10, 100, 1000, 5000 ppb の 4,15-DAS 溶液を用いて反応させた。その結果、4,15-DAS 濃度 100 ppb 以上において T-2 換算で 12 から 17 ppb 相当の発色がみられたものの用量依存性は認められなかった。AgraQuant T-2 kit では、付属されている標準品の濃度 0, 20, 50, 150, 500 ppb に加え

100, 200, 1500, 5000 ppb の 4,15-DAS 溶液を用いて反応させた。その結果、4,15-DAS 濃度 100 ppb において T-2 換算で 20 ppb 程度の発色が認められたが、用量依存性はなく 1 用量のみの反応であったことから、交差性はなかったものと判断した。

### 2. DON ELISA kit による 4,15-DAS の交差性

図 3 に DON 用 ELISA kit を用いた場合の 4,15-DAS の交差性の測定結果を示した。Max Signal DON kit では付属されている標準品の濃度 0, 7.5, 15, 30, 60, 120 ppb に加えて 250, 500, 1000, 5000 ppb の 4,15-DAS 溶液を用いた。その結果、吸光度は 4,15-DAS 濃度 0 から 5000 ppb まで変化しなかったため、交差性はないと判断した。RIDASCREEN DON kit では付属されている標準品 0, 4, 11, 33, 100 ppb の濃度に加えて 300, 1000, 5000 ppb の 4,15-DAS を用いて測定を行った。その結果 Max Signal DON kit と同様、0 から 5000 ppb まで吸光度の変化が見られなかったことから、交差性はないと判断した。

## D. 考察

JECFA の提唱したグループ PMTDI を参考に基準値が設定された場合、この 3 種のカビ毒を同時に測定することが必要となる。特に、簡易で迅速な測定法を考えると、ELISA 法が候補となる。現在日本で購入できる ELISA kit として市販されている製品はアフラトキシン、オクラトキシン A、デオキシニバレノール、フモニシン、ゼアラレノン、T-2 を対象としたものであるが、その中でグループ TDI の対象になっているのは T-2 である。そこで、3 種類の T-2 用 ELISA kit について、4,15-DAS を測定できるかを検証した。表 3 に 3 種類の ELISA kit の比較を示したが、RIDASCREEN kit では、2 位にアセチル基がついているアセチル T-2 に対して非常に高い交差性を有しているが、4 位だけが T-2 と異なる HT-2 との交差性は 5%

と非常に低い (図1)。このことから RIDA SCREEN kit に使われている抗体は 4 位の アセチル基を認識している可能性が高いと考えられた。しかし実験結果より 4 位にアセチル基をもつ 4,15-DAS への交差性はほとんどないと考えられた。Max Signal および AgraQuant では HT-2 との交差性は 0.1% および 0% であったことから、1 位から 6 位の構造を認識していると考えられた。しかし、4,15-DAS に対する交差性はほとんどなかったことから、これらの kit に含まれている抗体は、4,15-DAS と T-2 に共通する構造を認識しないことがわかった。これらの結果から、市販の T-2 用 ELISA kit を用いて HT-2 および 4,15-DAS の 3 つのカビ毒を同時に認識することはできないことが明らかになった。そして 3 種のカビ毒が共通する部位を認識する抗体を作成すれば、3 種検出 ELISA は可能であると考えられた。最近、日本国内では市販されていないが、RIDA SCREEN および AgraQuant のシリーズでは T-2 と HT-2 が同時に測定できる kit が開発されたことから、その kit に使われている抗体は 4,15-DAS とともに共通する部分を認識する可能性は捨てきれない。この可能性を来年度確認する予定である。

次に DON と 4,15-DAS の類似性から、DON 用 ELISA kit に含まれている抗体が 4,15-DAS を認識する可能性について検討した。表 4 に Max Signal、RIDASCREEN および AgraQuant の比較を挙げた。実際に本研究で測定したのは Max Signal と RIDASCREEN の 2 種類であったが、AgraQuant DON ELISA kit は論文として報告されていたことから、比較に加えた。T-2 との交差性は RIDASCREEN kit で 1% 認められたものの、Max Signal kit では 0.1% と低く、AgraQuant kit では 0% であった。本実験結果からいずれの DON 用 ELISA Kit も 4,15-DAS との交差性が認められなかった。このことから、DON の市販 ELISA kit

には、たとえ試料に T-2, 4,15-DAS 等のタイプ A トリコテセン系カビ毒が混入していても測定値に影響を受けないことが明らかになった。

## E. 結論

2017 年に公表された JECFA の評価結果において T-2、HT-2 トキシンのグループ PMTDI に 4,15-DAS も組み入れられたことから、T-2、HT-2、4,15-DAS の一斉分析法の簡便、迅速法の開発を試みた。現在市販で購入できる T-2 を対象にした ELISA kit を用いて 4,15-DAS の交差性を見ることで、市販 ELISA が活用できる可能性を検討した。しかしながら、3 種類の ELISA kit とともに 4,15-DAS との交差性は認められなかった。

一方、DON のスクリーニング法として通知法となっている ELISA 法に用いられる市販 ELISA kit を用いて、4,15-DAS との交差性を測定した。これは、試料に 4,15-DAS を含むタイプ A トリコテセン系カビ毒が DON と共汚染していた場合の影響を検討したものであるが、現在市販されている DON ELISA kit では、4,15-DAS を含むタイプ A トリコテセン系カビ毒への交差性を示すものはなかったことがわかった。

## 参考文献

- 1) Yoshinari, T., Takeuchi, H., Aoyama K., Taniguchi, M., Hashiguchi, S., Kai, S., Nakajima M., Tabata, S., Ogiso, M, Sato, T., Akiyama, Y., Tanaka, T., Ishiuguro, E. Sugita-Konishi, Y., Occurrence of Four Fusarium Mycotoxins, Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2 Toxin, and HT-2 Toxin, in Wheat, Barley, and Japanese Retail Food. *J. Food Prot.*, 2014 Nov; 77(11): 1940-6
- 2) EFSA, Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin *Human*

and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin EFSA J 201715(8):e04972. doi: 10.2903/j.efsa.2017.

3) JECFA 83 回報告書

<http://www.fao.org/documents/card/en/c/feb0d3a7-cb80-4dd6-a03a-403bd20d0db4/>

- 
- 4) Tangni, E.K. , Motte, J.C., Callebaut, A. , Pussemier, L., Cross-reactivity of antibodies in some commercial

deoxynivalenol test kits against some fusariotoxins. J Agric Food Chem., 2010 58(24):12625-33.

F. 健康危機情報  
特になし

G. 研究発表  
1. 論文発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
1. 特許取得  
なし

表1 T-2 トキシン KITの操作手順

	RIDA	ROMER
Max Signal	RIDA	ROMER
1. 各濃度の標準液と各濃度のDAS溶液を、50 $\mu$ lずつ適宜のウエルに滴下する。	1. 各濃度の標準液と各濃度のDAS溶液を、50 $\mu$ lずつ適宜のウエルに滴下する。	1. 200 $\mu$ l酵素複合体を、抗体をコーティングしていないウエルに滴下する。
2. 抗体Mix液を、100 $\mu$ lずつ、全てのウエルに滴下する。	2. 酵素複合体を、50 $\mu$ lずつ、全てのウエルの滴下する。	2. 各濃度の標準液と各濃度のDAS溶液を、100 $\mu$ lずつ1のウエルに滴下する。
3. 10分間、室温（20～25℃）インキュベート	3. 抗体液を、50 $\mu$ lずつ、全てのウエルに滴下しMixする。	3. 2の液を100 $\mu$ lずつ、抗体をコーティングしているウエルに滴下する。
4. TMB発色基質を、100 $\mu$ lずつ、全てのウエルに滴下し1分間よくMixする。	4. 1時間、室温（20～25℃）インキュベート	4. 15分間、暗所（アルミホイル）、室温（20～25℃）インキュベート
5. 5分間、暗所（アルミホイル）・室温（20～25℃）インキュベート	5. 基質液50 $\mu$ lと発色液50 $\mu$ lを、全てのウエルに滴下しよくMixする。	5. 基質を100 $\mu$ lずつ、全ての抗体ウエルに滴下しよくMixする。
6. 反応停止液を、100 $\mu$ lずつ、全てのウエルに滴下し、よくMixする。	6. 30分間、暗所（アルミホイル）・室温（20～25℃）インキュベート	6. 5分間、暗所（アルミホイル）、室温（20～25℃）インキュベート
7. 吸光度（波長450nm・副波長630nm）を測定する。	7. 反応停止液を、100 $\mu$ lずつ、全てのウエルに滴下し、よくMixする。	7. 反応停止液を100 $\mu$ lずつ、全ての抗体ウエルに滴下しよくMixする。
	8. 吸光度（波長450nm・副波長630nm）を測定する。	8. 吸光度（波長450nm・副波長630nm）を測定する。

表 2 DON KITの操作手順

Max Signal	RIDA
1. 各濃度の標準液と各濃度のDAS溶液を、100 $\mu$ lずつ適宜のウエルに滴下する。	1. 各濃度の標準液と各濃度のDAS溶液を、50 $\mu$ lずつ適宜のウエルに滴下する。
2. Don-HRP conjugateを、50 $\mu$ lずつ、全てのウエルに滴下し1分間よくMixする。	2. 酵素複合体を、50 $\mu$ lずつ、全てのウエルの滴下する。
3. 10分間、室温（20～25 $^{\circ}$ C）インキュベート	3. 抗体液を、50 $\mu$ lずつ、全てのウエルに滴下しMixする。
4. TMB発色基質を、100 $\mu$ lずつ、全てのウエルに滴下し1分間よくMixする。	4. 30分間、室温（20～25 $^{\circ}$ C）インキュベート
5. 5分間、暗所（アルミホイル）・室温（20～25 $^{\circ}$ C）インキュベート	5. 発色基質液100 $\mu$ lを、全てのウエルに滴下しよくMixする。
6. 反応停止液を、100 $\mu$ lずつ、全てのウエルに滴下し、よくMixする。	6. 15分間、暗所（アルミホイル）・室温（20～25 $^{\circ}$ C）インキュベート
7. 吸光度（波長450nm・副波長630nm）を測定する。	7. 反応停止液を、100 $\mu$ lずつ、全てのウエルに滴下し、よくMixする。
	8. 吸光度（波長450nm・副波長630nm）を測定する。

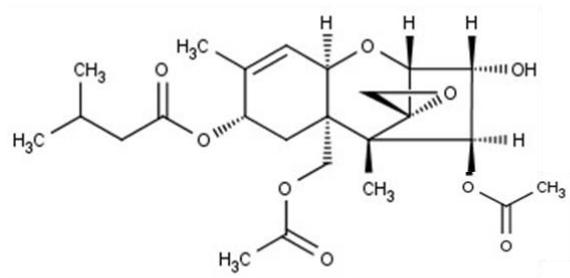
表3. T-2 ELISA KITにおける交差性

ELISA Kit	MaxSignal	RIDASCREEN	AgraQuant*
測定範囲	7.5-120 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3.7 – 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	250- 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$
適合食品	穀類	穀類	穀類
HT-2との交差性	0.10%	1%	0%
アセチルT-2 との交差性	ND	114%	ND
DASとの交差性	なし	なし	なし

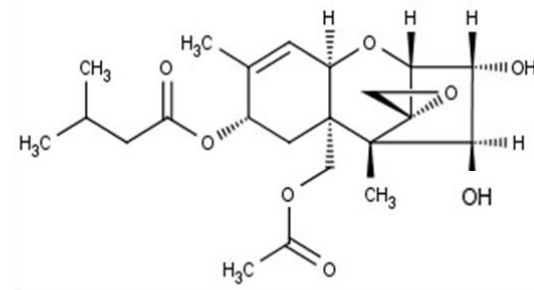
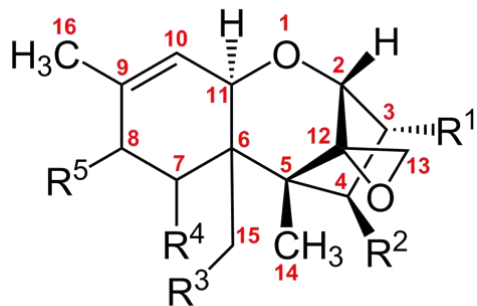
表4. DON ELISA KITにおける交差性

ELISA Kit	MaxSignal	RIDASCREEN	AgraQuant*
測定範囲	7.5-120 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3.7 – 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	250- 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$
適合食品	穀類	穀類	穀類
T-2との交差性	0.10%	1%	0%
DASとの交差性	なし	なし	なし

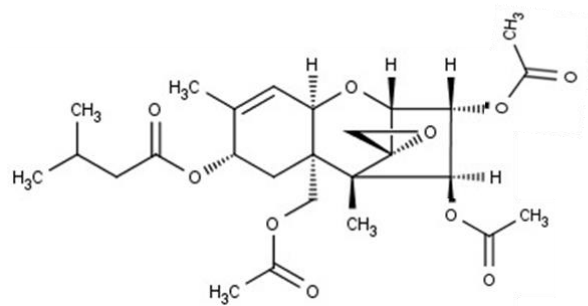




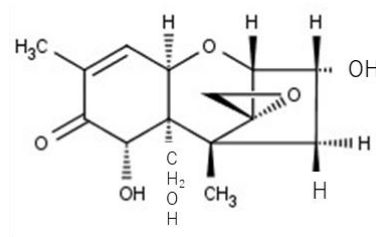
T-2 トキシン



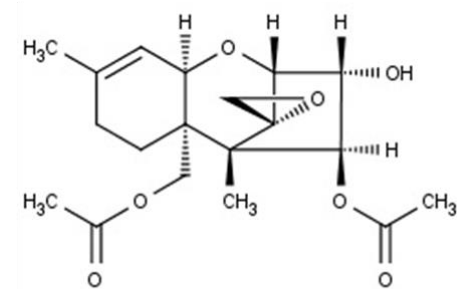
HT-2 トキシン



アセチルT-2 トキシン



DON



4, 15-DAS

図 1. T-2 トキシン、アセチル T-2 トキシン、HT-2 トキシン、DON 及び 4,15-DAS の構造

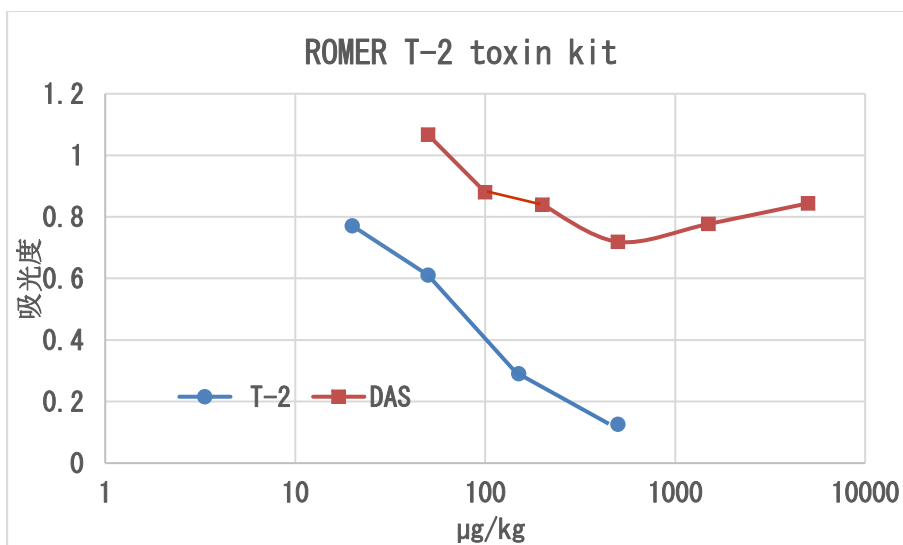
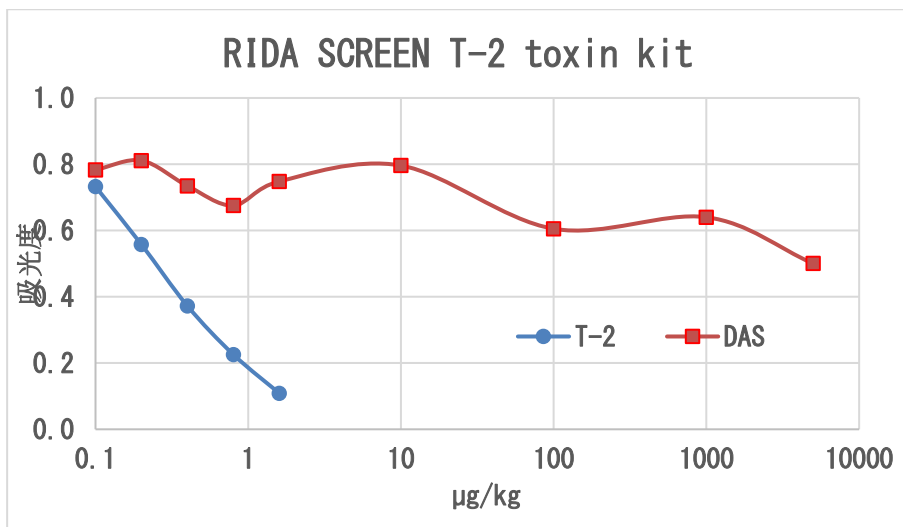
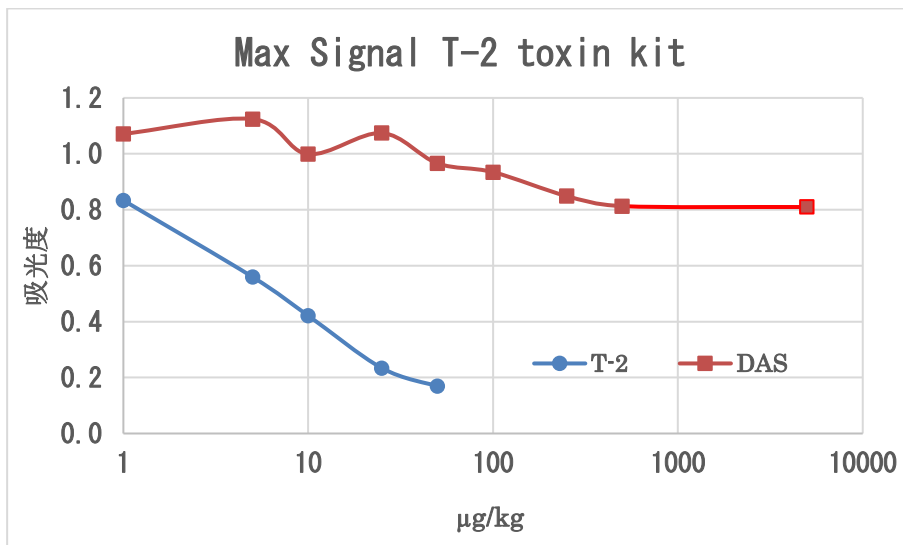


図2. T-2 トキシン用 ELISA kit における交差性パターン

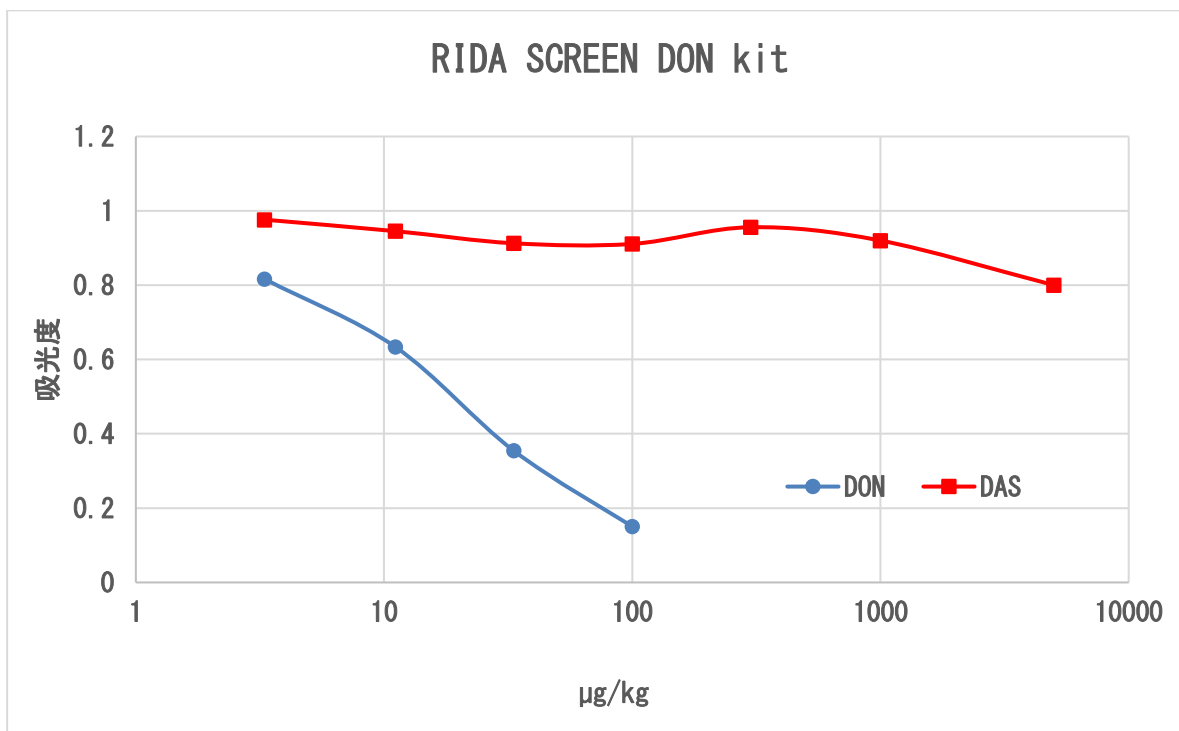
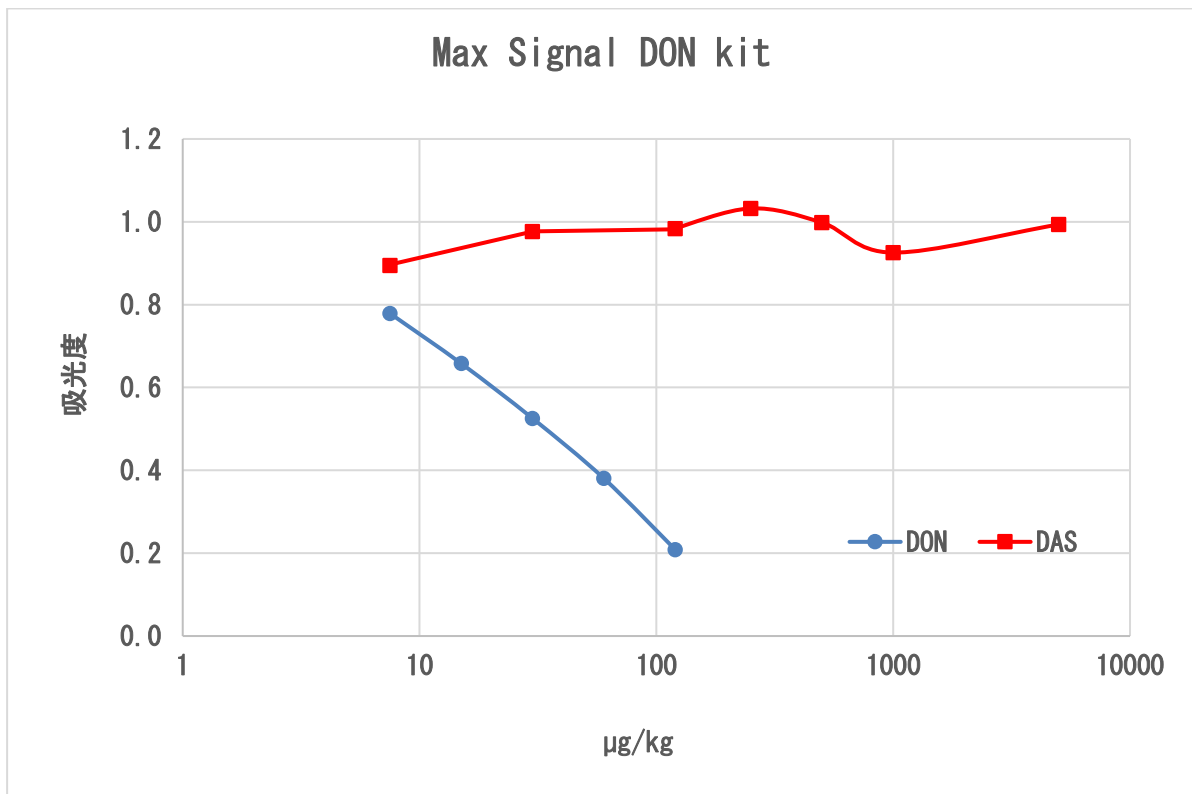


図 3. DON 用 ELISA kit における交差性パターン

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

国内流通ハトムギ製品におけるカビ毒複合汚染のリスク因子の解明

研究分担者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

21 検体の国内流通ハトムギを購入し、アフラトキシン (AF)、ステリグマトシスチン (STC) およびフザリウムトキシンの分析、およびカビ毒汚染量が高かった検体からの *Aspergillus* 属・*Fusarium* 属菌の分離・同定を行った。さらに、分離株のカビ毒産生性を調査するため、液体培養および米培養を行い、その培養物中の AF、STC およびトリコテセン系カビ毒の分析を行った。その結果、輸入ハトムギ 11 検体からは、100%の検出率で定量限界以上の STC (最大 6.24  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) および 4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) (最大 22.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) が検出され、検出量の平均値は国産品と比較して有意に高かった (STC ;  $p=3.7\text{E-}04$ , 4,15-DAS ;  $p=4.0\text{E-}05$ )。国産ハトムギ 10 検体からは、100%の検出率で定量限界以上の DON-3-グルコシド (最大 21.80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) が、90.0%の検出率で定量限界以上の T-2 トキシン (最大 6.76  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) が、90.0%の検出率で定量限界以上の HT-2 トキシン (最大 32.98  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) がそれぞれ検出され、検出量の平均値は輸入品と比較して高い傾向にあった (DON-3-グルコシド ;  $p=0.047$ , T-2 トキシン ;  $p=0.005$ , HT-2 トキシン ;  $p=0.071$ )。カビ毒汚染量調査の結果、検出量が多かったハトムギ検体のうち輸入品および国産品 4 検体ずつを選抜し、*Aspergillus* および *Fusarium* 属菌の分離、および分離株のトリコテセン類産生性を検討した。その結果、輸入品からは *F. incarnatum* の 1 株のみで 4,15-DAS 産生を確認したのに対して、国産品からは 2 検体から *F. sporotrichioides* または *F. armeniacum* が計 4 株分離され、T-2 トキシン (液体培地中で 149.8-368.0  $\text{mg}/\text{kg}$ )、HT-2 トキシン (液体培地中で 2.6-22.8  $\text{mg}/\text{kg}$ ) および 4,15-DAS (液体培地中で 1.6-8.1  $\text{mg}/\text{kg}$ ) の産生が確認された。また同一の 2 検体それぞれから *Fusarium graminearum* が 1 株ずつ分離され、分離株を米培地で培養した場合に DON (160 または 316  $\text{mg}/\text{kg}$ ) および 3-AcDON (492 または 656  $\text{mg}/\text{kg}$ ) の産生が確認された。以上のことから、国内に流通する輸入ハトムギは AF、STC および 4,15-DAS 汚染リスクが高く、国内産ハトムギは *F. sporotrichioides*、*F. armeniacum* または *F. graminearum* が産生するトリコテセン類の複合汚染リスクが高いことが示唆された。

研究協力者

平山 美咲 東京理科大学

吉成 知也 国立医薬品食品衛生研究所

高橋 治男 国立医薬品食品衛生研究所

清水 公德 東京理科大学

## A. 研究目的

タイプ A トリコテセン化合物は新興カビ毒として近年関心が高まっており、2016年FAO/WHO 合同食品規格委員会では、T-2/HT-2 トキシンのグループ PMTDI 0.06 µg/kg 体重/日に4,15-ジアセトキシシルペノール(4,15-DAS)も含めるとされたり。国内流通食品における3種の化合物の複合汚染のリスク因子の解明が急務である。

これらのカビ毒は *Fusarium* 属菌の複数菌種が産生することが知られるが、産生すると報告された菌種は一部異なる。主な産生菌種はそれぞれ、T-2 トキシンのように HT-2 トキシンのように *Fusarium sporotrichioides*、*Fusarium langsethiae*、*Fusarium poae*、*Fusarium armeniacum*、*Fusarium equiseti* など、4,15-DAS では *F. equiseti*、*F. sporotrichioides*、*F. armeniacum*、*F. langsethiae*、*F. poae*、*Fusarium sambucinum* などである。*F. sporotrichioides*、*F. langsethiae*、*F. poae*、*F. armeniacum*、*F. equiseti* はこれらの共通した産生菌である一方で、*F. incarnatum* および *F. sambucinum* は4,15-DASを産生するが、T-2 トキシンのように HT-2 トキシンの産生性は報告はほとんど無い<sup>2,3)</sup>。それぞれの菌種は、寄生する植物種や分布する地域の気候や地理的条件、それぞれのカビ毒の産生性などが異なることから、これらのカビ毒の汚染を受けた食品から汚染の原因となった産生菌を分離して、分離株の同定を行い、産生するタイプ A トリコテセンの種類、および産生性の強度を調査することによって、どういった食品で複合汚染や高濃度汚染が起こりやすいのかを把握し、詳細な複合汚染のリスク因子を解明することが可能となる。

そこで、本年度は、昨年度までの実態調査の成果から国内流通製品がタイプ A トリコテセン類に汚染していることが明らかとなっているハトムギを対象として、*Fusarium* 属菌の分離効率を

高めるため、あらかじめタイプ A トリコテセン類に汚染されたことを確認したハトムギ試料を用い、トリコテセン類に加えて、フザリウムトキシンのようにトリコテセン類との複合汚染が予測されるエンニアチン類(ENs) およびビューベリチン(BEA)、および穀類における高濃度汚染がしばしばみられるアフラトキシン(AF) およびステリグマトシスチン(STC)の汚染調査を行い、その結果汚染レベルが高かった試料から *Fusarium* 属および *Aspergillus* 属菌を分離し、分離株の同定およびカビ毒産生性を調査したので、これを報告する。

## B. 研究方法

### (1) タイプ A トリコテセン類に汚染されたハトムギ試料の探索

国内の小売店から、輸入品ハトムギ 11 検体および国産品ハトムギ 10 検体の計 21 検体を購入して収集した。産地の内訳は以下の通りであった；輸入品は、韓国産 1 検体、中国産 5 検体、ラオス産 1 検体およびタイ産 4 検体。国産品は青森県産 1 検体、岩手県産 2 検体、栃木県産 2 検体、富山県産 2 検体、岡山県産 1 検体、島根県産 2 検体。収集した粒状のハトムギをミキサーで粉碎し、粉末状にした。この粉末をカビ毒の分析に用いた。

ハトムギ試料中のアフラトキシンの測定は以下の通り実施した。ハトムギ 7.5 g にアセトニトリル：水(85：15) 30 mL を加え、30分振盪し抽出液を得た。これをイムノアフィニティーカラム(IAC；AFLAKING、堀場製作所)を用いて精製した。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。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 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。

LC-MS/MS の測定条件は以下の通りとした；

#### HPLC

カラム：InertSustain C18

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件：0分 A : B = 60 : 40

13分 A : B = 10 : 90

流速：0.2 mL/分

注入量：10 μL

#### MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：325 [M+H]<sup>+</sup>281

ハトムギ試料中の ENs 類の測定は以下の通り実施した。測定対象をエンニアチン 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) および BEA とした。ハトムギ 2.5 g にアセトニトリル：水 (85 : 15) 25 mL を加え、30 分間振盪し抽出液を得た。この抽出液 400 μL に精製水 800 μL を加えて希釈し、遠心分離を行った。この希釈液 900 μL をメタノール 3 mL と精製水 3 mL で平衡化した C18 カートリッジ (SepPak Vac C18 200 mg、Waters 社) で精製した後、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 ENs および BEA を LC-MS/MS により定量した。LC-MS/MS の測定条件は以下の通りとした；

#### HPLC

カラム：Inertsil ODS-3

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B アセトニトリル

分離条件：0分 A : B = 30 : 70

20分 A : B = 20 : 80

22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：

ENA 699>210、682

ENA1 685>210、668

ENB 657>196、640

ENB1 671>196、654

BEA 801>134、784

ハトムギ試料中のトリコセテン類の測定は以下の通り実施した。ハトムギ 7.5 g に 85%アセトニトリル 30 mL を加え、30 分振盪し抽出液を得た。この抽出液約 10 mL を多機能カラム (昭和電工社製 AutoprepMF-T 1500) を用いて精製した。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 を別の試験管に分取し、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。試験溶液中のタイプ A トリコセテン類を LC-MS/MS により定量した。LC-MS/MS の測定条件は以下の通りとした；

#### HPLC

カラム：Inertsil ODS-3

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件：0分 A : B = 50 : 50

8分 A : B = 10 : 90

11分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：2 μL

#### MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：

T-2 トキシシン 484>305、215

HT-2 トキシシン 442>215、187

4,15-DAS 657>307、247

ハトムギ試料中のタイプBトリコセテン系カビ毒の測定は以下の通り実施した。ハトムギ5gに水20mLを加え30分間振盪し抽出液を得た。上清5mLにPBS25mLを加え、希釈後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液12mLをイムノアフィニティーカラムDON NIV WBに通した後、PBS10mLおよびD.W.10mLで洗浄した。カビ毒をメタノール0.5mLおよびアセトニトリル1.5mLで溶出し窒素乾固を行った後、残渣を0.5mLの10%アセトニトリルに溶解し、試験溶液とした。試験溶液中のカビ毒はLC-MS/MSを用いて測定した。LC-MS/MSの測定条件は以下の通りとした；

#### HPLC

カラム：Inertsil ODS-3

2.1×150 mm, 3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A 2 mmol/L 酢酸アンモニウム

B メタノール

分離条件：0分 A : B = 95 : 5

8分 A : B = 10 : 90

10分まで保持

注入量：5 μL

#### (2) ハトムギ試料からの *Aspergillus* および *Fusarium* 属菌株の分離

ハトムギから菌株を分離する際には、DRBC平板上に、供試したハトムギを1枚のプレートに5粒ずつ置き、25℃で7日間培養した。この際、70%エタノールで30秒間洗浄し、食品表面に付着した真菌を除いてから培養に供した。全32-HT04と32-HT06においては各100粒、それ以外の検体では50粒ずつ培地に置いた。培養後、発育したコロニーを目視によって観察し、観

察された *Fusarium* 属と *Aspergillus* 属のコロニーをPDA平板培地に釣菌して分離した後、25℃で1~2週間培養した。

#### (3) 分離された *Aspergillus* および *Fusarium* 属菌株の同定

*Fusarium* 属菌分離株の同定実験の流れ図を図1に示した。PDA斜面培地に接種し、25℃で7日間前培養した。その後、ポテトデキストロース寒天(PDA)平板およびカーネーションリーフ・アガー培地に接種し25℃で7日間培養した。これらに生育したコロニーの色等性状を目視で観察、およびプレパラ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。さらに、PDA平板培地上に生育した菌体を2mlマイクロチューブに入れたポテトデキストロース液体培地(PDB)1.5mlに接種し、48時間30℃で静置培養した。その後、得られた菌体について、Maxwell RSC Plant DNA Kit(プロメガ株式会社)を用いて、DNAを抽出した。得られたDNAを鋳型としてβ-tubulin遺伝子のPCRおよびシーケンスを行った。この際使用したPCRプライマーは、*Aspergillus* 属菌同定用としてBt-2a(5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3')およびBt-2b(5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3')<sup>4)</sup>、*Fusarium* 属菌同定用としてBtu\_F-F01(5'-CAGACCGGTCAGTGCGTAA-3')およびBtu\_F-R01(5'-TTGGGGGTCGAA CATCTGCT-3')<sup>5)</sup>をそれぞれ用いた。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。

#### (4) 分離された *Fusarium* 属菌株のフザリウムトキシシン産生性の検討

(3)で同定した *Fusarium* 属株について、トリ

コテセン類産生能を持つ菌種であった場合に、角田培地にて振盪培養を 25°Cにて 1 日行い、静置培養を 25°Cにて 7 日間行った。また、分離株がタイプ B トリコテセン産生菌種であった場合には、さらに米培養を行った。角田液体培地で *Fusarium* 属分離株を 25°C一晩で前培養した、米 10g に 3 mL の水を加えオートクレーブ処理をしたフラスコに、前培養液を加え 25°Cで 2 週間培養した。その培養物に 85%アセトニトリル 40 mL を加え混合して得た抽出物を、50% メタノールを用いて 1,000 倍希釈し、LC-MS/MS にて測定を行った。

#### (5)分離された *Aspergillus* 属菌のアフラトキシン産生性の検討

(3)で *Aspergillus* 属菌と同定された株菌について、PDB 培地を用いて 4 日間 32°Cで静置培養した。培養液をフィルターろ過し、そのろ液を試料液として薄層クロマトグラフィーにてアフラトキシン産生能を確認した。展開溶媒は、クロロホルム：アセトン：ヘキサン (85：15：15) を用いた。

### C. 研究結果

#### (1) ハトムギ試料中のカビ毒検出量の評価

今回供試したハトムギ試料中のカビ毒分析の結果を表 1 に示した。輸入ハトムギ 11 検体からは、100%の検出率で定量限界以上の STC (0.02-1.74 µg/kg) および 4,15-DAS (1.01-22.44 µg/kg) が検出され、検出量の平均値は国産品と比較して有意に高かった (STC ;  $p=3.7E-04$ 、4,15-DAS ;  $p=4.0E-05$ )。国産ハトムギ 10 検体からは、100%の検出率で検出限界値以上の DON-3-グルコシド (0.28~21.80 µg/kg) が、90.0%の検出率で定量限界以上の T-2 トキシン (定量下限値~6.76 µg/kg) が、90.0%の検出率で検出限界値以上の HT-2 トキシン (0.10~32.98 µg/kg) がそれぞれ検出され、検出量の平均値は輸入品と比較して高

い傾向にあった (DON-3-グルコシド ;  $p=0.047$ 、T-2 トキシン ;  $p=0.005$ 、HT-2 トキシン ;  $p=0.071$ )。

#### (2) ハトムギ試料から分離された *Fusarium* 属菌の同定

ハトムギ試料中のカビ毒分析の結果を参照し (表 1)、アフラトキシン、トリコテセン系カビ毒及びエンニアチン類の検出量が多かった、または特徴的であった 8 検体、32-HT03、32-HT04、32-HT06、32-HT09、32-HT10、32-HT-12、32-HT16、32-HT19 から真菌分離を試みた。その結果、合計で *Aspergillus* 属菌 5 株および *Fusarium* 属菌 35 株が分離された。*Aspergillus* 属菌を同定したところ、すべての株は *A. flavus* または *A. oryzae* と同定された。本研究で用いた遺伝子マーカー  $\beta$ -tubulin では *A. flavus* または *A. oryzae* の識別はできないが、本研究ではここまでの同定にとどめた。STC の産生菌である *Aspergillus versicolor* は、いずれのハトムギ試料からも検出されなかった。

本研究においてハトムギ試料から分離された *Fusarium* 属菌のうち、トリコテセン類産生菌種の一覧を表 2 に、フモニシン類産生菌種の一覧を表 3 に示した。輸入ハトムギからは、トリコテセン類産生菌として *F. incarnatum* のみが、フモニシン類産生菌として *Fusarium verticillioides* のみが検出された。国産ハトムギからは、トリコテセン類産生菌として *F. incarnatum*、*F. armeniacum*、*F. sporotrichioides* および *Fusarium graminearum* が、フモニシン類産生菌として *Fusarium fujikuroi*、*Fusarium annlatum*、*Fusarium oxysporum* および *Fusarium proliferatum* が検出された。輸入ハトムギと比べ、国産ハトムギでは菌種の多様性がみられた。*Fusarium* 属菌における各菌種の形態学的特徴を図 2 に示した。



### (3) ハトムギ試料から分離された *Fusarium* 属菌のカビ毒産生性の評価

本研究において分離された株の角田液体培地における各種カビ毒の検出結果を表 2 に示した。国産ハトムギ試料 32-HT06 から分離された計 3 株の *F. sporotrichioides* からはそれぞれ T-2 トキシン (最大 368 mg/kg)、HT-2 トキシン (最大 22.8 mg/kg)、および 4,15-DAS (最大 8.1 mg/kg) が検出された。また、国産ハトムギ試料 32-HT10 から分離された 1 株の *F. armeniacum* からは、T-2 トキシン 152.1 mg/kg、HT-2 トキシン 2.6mg/kg、および 4,15-DAS 7.8 mg/kg が検出された。

輸入ハトムギ試料からは、32-HT04 から分離された 1 株の *F. incarnatum* のみがトリコセシン類を産生 (DAS、2.2 mg/kg) した。DON の前駆体である 3-AcDON の産生性については、分離株 32-HT10-04 は角田培地の培養では 15.5 mg/kg の 3-AcDON の産生が確認されたところ、この株を米培養に供したところ、DON (316 mg/kg) および 3-AcDON (492 mg/kg) の産生が確認でき、これらの産生性が高まったことが確認された。同様のことを分離株 32-HT06-12 でも確認した (表 2)。このことから、米培養では、角田液体培地での培養と比較して、DON および 3-AcDON の産生性を向上させることが確認された。

### (4) ハトムギ試料から分離された *Aspergillus* 属菌の同定カビ毒産生性の評価

分離株の培養液を用いて TLC によりアフラトキシン産生性を検査した結果、輸入ハトムギ 32-HT03 および 32-HT04 由来の 1 株ずつ計 2 株から、AFB1 の産生を確認した。形態観察の結果からも矛盾は無かったことから *A. flavus* と同定した。

## D. 考察

輸入品のハトムギからは *Aspergillus* トキシンが、国産品からは *Fusarium* トキシンが多く検出される傾向にあり、中でも、輸入品からは STC が、国産品からは DON-3-グルコシド、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの検出量が高い傾向にあることが示された。さらに、タイプ A トリコセシン類については、4,15-DAS だけが国産品と比較して輸入品から有意に高い濃度で検出された。タイプ A トリコセシンのうち 4,15-DAS だけが他のカビ毒と検出傾向が異なったことから、同じタイプ A トリコセシンであっても T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンとは汚染原因菌が異なることが示唆された。以上のことから、ハトムギの産地ごとに、カビ毒の汚染プロファイルが異なることが明確に示された。

カビ毒の汚染原因菌については、今回検討したハトムギ試料のうち、32-HT03 および 32-HT04 からは AF 産生株が、32-HT06 および 32-HT10 からは T-2 トキシン、HT-2 トキシン、4,15-DAS および DON 産生株が、32-HT04 からは 4,15-DAS 産生株が分離でき、これらのハトムギ試料はすべてこれらのカビ毒による汚染を受けていたため、これらの分離株が汚染の原因菌である可能性が高いと考えられた。しかし一方で、今回供試した検体からは、T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンを産生せず 4,15-DAS だけを高産生する株は分離されず、タイ産の 32-HT04 からの 1 株で、4,15-DAS のみを 2.2 mg/kg の濃度で産生する *F. incarnatum* が分離された。過去の研究において *Fusarium sambucinum*、*Fusarium venenatum* および *F. incarnatum* では産生量は少ないものの 4,15-DAS だけを産生する菌株の過去の報告は少ないが、報告がある<sup>2,3)</sup>。本研究の結果から、これらの菌種、特に *F. incarnatum* が輸入ハトムギの 4,15-DAS 汚染原因菌の候補であると考え、今後、輸入品からの汚染原因菌分離を目指しての検討を継続する必要がある。この際、以下のことを考慮に入れ検討する。国産ハト

ムギからも *F. incarnatum* は複数株分離されたが DAS の産生性は確認されなかった。このことから、海外と国内での *F. incarnatum* は系統の違いによって毒素産生性が異なる可能性が考えられ、輸入品・国産品由来株を多数収集し菌株の分子系統分類を実施する必要がある。または、3-AcDON のケースと同様に、今回の分離株も異なる培養条件で培養すれば 4,15-DAS の産生を確認できる可能性があり、角田培地・25℃以外の培養条件での DAS 産生性を検討する必要がある。

今回、輸入ハトムギ試料からは、4,15-DAS、DON、NIV、BEA といった複数種類のフザリウムトキシンが 10 mg/kg 以上の濃度で検出されたにもかかわらず、分離できた *Fusarium* 属菌は *F. incarnatum* および *F. verticillioides* のみであった (表 2 および 3)。このことから、収穫から販売に至るまでの間の保管等の条件により、菌が死滅していた可能性が考えられた。今後はサンプル入手の条件を検討し、これらのカビ毒の汚染原因菌を分離し明らかにする必要がある。さらに今回は、輸入ハトムギからは T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンはほとんど検出されなかった。この産地間の違いは、ハトムギだけの特性であるのか、または他の穀類を中心にした農作物に共通の産地の地理的条件によるものであるのか、いずれであるのかを検討する必要がある。このことを明らかにするためには、ハトムギ以外の穀類について、ハトムギと同様にアジア圏のみで生産される品目および北米等異なる気候条件でも生産される穀類それぞれの、タイプ A トリコテセン汚染状況を、文献調査および分析による実態調査によって検討する必要がある。

#### E. 結論

本研究の結果から、国内に流通するハトムギ製品の *Aspergillus* 属菌の分布、*Fusarium* 属菌の分布、およびトリコテセン系カビ毒の汚染リスクにおいては、主に産地に起因したと思われる偏り

が存在することが明らかとなった。T-2 トキシン、HT-2 トキシン、および 4,15-DAS は、同じタイプ A トリコテセン類であり、主な産生菌である *F. sporotrichioides*、*F. poae*、*F. langsethiae* 等が 3 者を産生することが広く知られることから、3 者のタイプ A トリコテセン類の複合汚染のケースが多く食品で確認されている。このことから、これらの合計値でのリスク評価を実施する国も多い。しかし今回、これら 3 者はハトムギにおいては汚染の状況が異なり、汚染原因菌も異なることが示唆されたことから、ハトムギにおけるタイプ A トリコテセン類の汚染メカニズムを解明することの意義は大きいと考えられた。今後、ハトムギ製品から受けるヒトのフザリウムトキシンの摂取リスクに注視しつつ、より多検体を供試した検討を継続する必要がある。さらにはこの偏りが生じる原因とメカニズムを解明し、汚染を軽減させるための研究を実施する必要がある。

#### F. 参考文献

- 1) World Health Organization & Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2017. Evaluation of certain contaminants in food: eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series; 1002*, pp. 41-55.
- 2) Marasas, W.F.O., Nelson, E.P, Toussoun, T.A. 1984. *Toxigenic Fusarium Species*. The Pennsylvania State University Press. USA.
- 3) Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Oxford, UK.
- 4) Glass, N.L., Donaldson, G.C. 1995. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1323-1303.

5) Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., et al. 2011. Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. *J. Food Sci.* 91:2500-2504.

#### G. 研究業績

##### 【論文発表】

1) A New Protocol for Detection of *Aspergillus* Section *Versicolores* Using a High Discrimination Polymerase. A. Kubosaki, N. Kobayashi, M. Watanabe, T. Yoshinari, K. Takatori, Y. Kikuchi, Y. Hara-Kudo, J. Terajima, Y. Sugita-Konishi. *Biocontrol Science*. *Biocontrol Science*. 25:113-118, 2020.

2) Discrimination between edible and poisonous mushrooms among Japanese *Entoloma sarcopum* and related-species based on phylogenetic analysis and insertion/deletion patterns of nucleotide sequences of cytochrome oxidase 1 gene. W. Aoki, M. Watanabe, M. Watanabe, N. Kobayashi, J. Terajima, Y. Sugita-Konishi, K. Kondo, Y. Hara-Kudo. *Genes and Genetic Systems*. *Genes and Genetic System*. 95:133-139, 2020.

##### 【学会発表】

1) CO1 遺伝子塩基配列における挿入/欠失パターンおよび系統解析に基づく日本国内に分布する *Entoloma sarcopum* とその近縁種の食用および毒キノコの識別. 青木渉、渡辺麻衣子、渡邊雅樹、小林直樹、寺嶋淳、小西良子、近藤一成、工藤由起子. 日本食品衛生学会 第116回学術講演会. 2021.11. ウェブ開催.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

表 1 供試した国内流通ハトムギ一覽およびカビ毒の汚染状況

試料No.	原産地	検出されたカビ毒 (µg/kg)												
		STC	AFB1	DON	NIV	D3G	N3G	DAS	HT-2	T-2	BEA	ENAI	ENB	ENBI
海外産ハトムギ														
32-HT03	中国	0.33	1.81	ND	46.17	ND	ND	18.47	ND	ND	ND	1.06	ND	ND
32-HT04	タイ	1.74	6.24	ND	54.30	ND	3.52	18.66	ND	ND	1.18	ND	ND	ND
32-HT05	タイ	1.24	1.12	19.38	24.11	ND	ND	5.76	ND	ND	1.72	ND	ND	ND
32-HT11	ラオス	0.63	0.08	ND	11.76	ND	ND	8.84	ND	ND	2.26	ND	<u>0.77</u>	<u>1.37</u>
32-HT12	韓国	1.55	0.14	ND	45.50	ND	ND	17.48	ND	ND	2.77	ND	ND	<u>0.62</u>
32-HT14	中国	1.07	0.52	ND	105.36	ND	9.68	22.44	ND	ND	1.59	ND	ND	ND
32-HT17	タイ	0.30	0.16	ND	10.19	ND	ND	3.13	ND	ND	ND	ND	<u>1.20</u>	<u>1.12</u>
32-HT18	中国	1.71	0.10	ND	46.70	ND	3.26	16.41	ND	ND	1.02	ND	ND	ND
32-HT19	中国	0.07	0.07	177.82	282.34	1.27	4.85	8.70	ND	<u>0.01*</u>	12.36	ND	3.72	<u>1.48</u>
32-HT20	中国	0.02	ND	ND	29.73	ND	ND	1.01	ND	ND	0.80	ND	ND	ND
32-HT21	タイ	1.28	0.11	ND	15.84	ND	ND	17.37	ND	ND	0.86	ND	ND	ND
検出率		100	90.9	18.2	100	9.1	36.4	100	0	9.1	90.9	9.9	27.2	36.4
最小値		0.02	ND	ND	10.19	ND	ND	1.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND
最大値		1.74	6.24	177.82	282.34	1.27	9.68	22.44	ND	0.01	12.36	0.57	3.72	1.48
平均値±SD		0.90±0.65	0.94±1.85	17.93±53.35	61.09±78.14	0.12±0.38	1.94±3.15	12.57±7.27	—	—	2.33±3.41	0.05±0.17	0.52±1.14	0.42±0.61
国内産ハトムギ														
32-HT01	島根県	0.02	<u>0.01</u>	<u>0.73</u>	4.08	1.90	ND	0.06	<u>0.10</u>	0.04	3.02	ND	<u>0.75</u>	<u>0.91</u>
32-HT02	栃木県	0.01	ND	1.97	17.42	<u>0.60</u>	7.75	0.50	ND	ND	0.80	ND	ND	ND
32-HT06	島根県	<u>0.01</u>	<u>0.01</u>	159.29	69.04	21.80	12.23	<u>0.04</u>	32.98	6.76	2.18	<u>0.81</u>	<u>1.60</u>	<u>1.57</u>
32-HT07	富山県	ND	ND	3.85	15.93	1.04	4.32	0.06	1.26	0.27	1.74	ND	ND	ND
32-HT08	青森県	<u>0.01</u>	<u>0.01</u>	11.67	8.87	5.36	<u>1.57</u>	0.06	2.31	3.29	1.68	ND	ND	<u>0.67</u>
32-HT09	岩手県	0.01	ND	65.02	21.36	5.23	<u>2.20</u>	<u>0.02</u>	3.49	3.34	1.70	ND	ND	<u>0.66</u>
32-HT10	岩手県	0.02	<u>0.01</u>	8.38	2.96	4.40	ND	ND	11.64	4.56	1.75	<u>0.62</u>	<u>1.04</u>	<u>1.07</u>
32-HT15	岡山県	0.02	<u>0.01</u>	<u>0.63</u>	1.36	<u>0.28</u>	ND	0.20	0.71	0.40	4.15	ND	ND	ND
32-HT16	栃木県	<u>0.01</u>	ND	20.41	46.19	1.57	10.20	1.25	3.31	2.20	14.00	ND	ND	<u>0.74</u>
32-HT22	富山県	0.01	ND	2.87	54.67	<u>0.45</u>	13.89	0.85	2.44	0.82	7.60	ND	ND	ND
検出率		90.0	50.0	100	100	100	70.0	90.0	90.0	90.0	100	20.0	30.0	60.0
最小値		ND	ND	<u>0.63</u>	1.36	<u>0.28</u>	ND	ND	ND	ND	0.28	ND	ND	ND
最大値		0.48	0.01	159.29	69.04	21.80	13.89	8.67	32.98	6.76	14.00	0.81	1.60	1.57
平均値±SD		0.01±0.01	0.00±0.00	27.48±50.22	24.19±23.94	4.26±6.47	5.22±5.38	0.30±0.43	5.82±10.11	2.17±2.29	3.86±4.06	0.14±0.30	0.34±0.58	0.56±0.55

\* 下線は、検出限界値以上、定量限界値未満の参考値を示す。

表2 タイプAトリコテセン類産生菌種の分離株のカビ毒産生性一覧

菌株番号	分離源ハトムギ 検体番号	分離源ハトムギ 産地	分離株同定結果	角田培地 (mg/kg)						米培養 (mg/kg)	
				T-2	HT-2	DAS	DON	NIV	3-ACDON	DON	3-ACDON
32-HT04-06	32-HT04	タイ	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT04-09	32-HT04	タイ	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT04-16	32-HT04	タイ	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	2.2	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-10	32-HT06	島根	<i>Fusarium spotrichioides</i>	368	20.5	8.1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-12	32-HT06	島根	<i>Fusarium boothii</i> または <i>Fusarium graminearum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	160	656
32-HT06-18	32-HT06	島根	<i>Fusarium spotrichioides</i>	257.3	22.8	1.6	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-21	32-HT06	島根	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-22	32-HT06	島根	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-23	32-HT06	島根	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-23	32-HT06	島根	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-25	32-HT06	島根	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT06-28	32-HT06	島根	<i>Fusarium spotrichioides</i>	149.8	5.2	3.9	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT10-04	32-HT10	岩手	<i>Fusarium boothii</i> または <i>Fusarium graminearum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	15.5	316	492
32-HT10-07	32-HT10	岩手	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT10-10	32-HT10	岩手	<i>Fusarium armeniacum</i>	152.1	2.6	7.8	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT10-11	32-HT10	岩手	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT10-12	32-HT10	岩手	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT16-01	32-HT16	栃木	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT16-03	32-HT16	栃木	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT16-04	32-HT16	栃木	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT16-05	32-HT16	栃木	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT16-06	32-HT16	栃木	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT
32-HT19-01	32-HT19	中国	<i>Fusarium incarnatum</i>	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT

表 3 フモニシン類産生菌種の分離株一覧

菌株番号	分離源ハトムギ 検体番号	分離源ハトムギ 産地	分離株同定結果
32-HT04-13	32-HT04	タイ	<i>Fusarium verticillioides</i>
32-HT06-08	32-HT06	島根	<i>Fusarium fujikuroi</i> または <i>Fusarium proliferatum</i>
32-HT06-16	32-HT06	島根	<i>Fusarium fujikuroi</i> または <i>Fusarium proliferatum</i>
32-HT06-24	32-HT06	島根	<i>Fusarium fujikuroi</i> または <i>Fusarium proliferatum</i>
32-HT06-26	32-HT06	島根	<i>Fusarium fujikuroi</i> または <i>Fusarium proliferatum</i>
32-HT06-27	32-HT06	島根	<i>Fusarium fujikuroi</i> または <i>Fusarium proliferatum</i>
32-HT09-02	32-HT09	岩手	<i>Fusarium annlatum</i>
32-HT09-03	32-HT09	岩手	<i>Fusarium oxysporum</i>
32-HT09-04	32-HT09	岩手	<i>Fusarium fujikuroi</i> または <i>Fusarium proliferatum</i>
32-HT16-02	32-HT16	栃木	<i>Fusarium fujikuroi</i> または <i>Fusarium proliferatum</i>
32-HT16-07	32-HT16	栃木	<i>Fusarium fujikuroi</i> または <i>Fusarium proliferatum</i>
32-HT16-08	32-HT16	栃木	<i>Fusarium fujikuroi</i> または <i>Fusarium proliferatum</i>

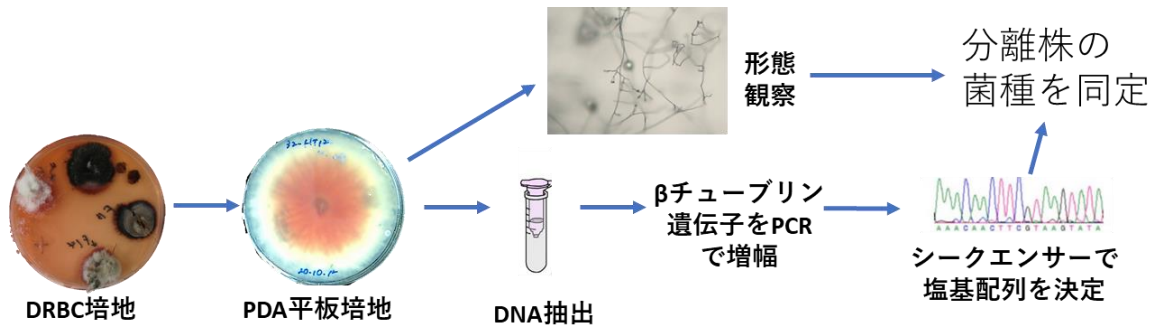


図1 *Fusarium* 属菌分離株の同定実験の流れ図

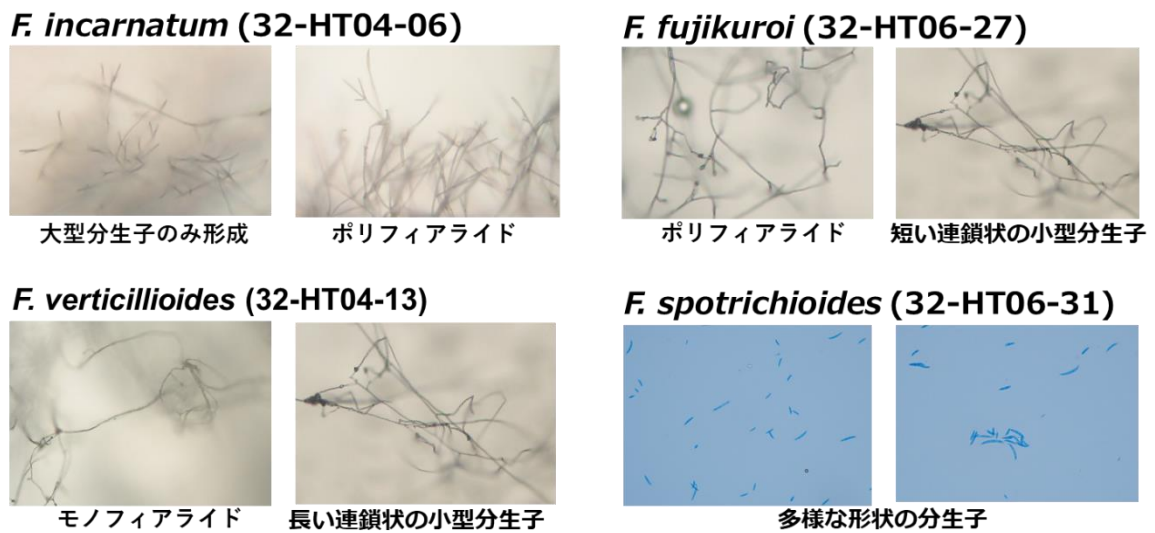


図2 分離された *Fusarium* 属菌の形態学的特徴