

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。汚染実態調査では、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検体の調査を行い、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。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)であった。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、小麦加工品からもSTCが検出された。毒性試験では、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結果、無毒性量は30 mg/kgとなった。簡易分析法の開発では、市販のT-2トキシシンELISA kitに使われている抗体が4,15-ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) も認識するか否かを市販T-2トキシシンELISA kit3種で検討を行った結果、いずれも交差性を示さなかった。複合汚染のリスク解明については、カビ毒汚染レベルの高いハト麦からその原因菌の探索を行った結果、輸入ハト麦においてはアフラトキシシン、STCおよび4,15-DAS汚染リスクが高く、国内産ハトムギはフザリウム属真菌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。

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-ジアセトキシシルペノール(4,15-DAS)については2016~18年の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。一方、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、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3年間の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。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トリコテセン系カビ毒とSTCについては2016~18年の結果と合わせ、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。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(Food Addit Contam Part A,33,1620-26,2016)においては高濃度かつ高頻度でENsが検出されており、毒性や小麦粉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ENs5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、③STC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。2020年度には、①妥当性を評価した分析法を用いてタイプAトリコテセン化合物、ENs及びSTCの汚染調査、②精製エンニアチンBを用いたマウス28日間反復経口投与毒性試験、③4,15-DASを認識する市販ELISAキットの探索、④ハト麦におけるカビ毒複合汚染のリスク解明を行った。

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
各試料(ライ麦粉、ハト麦加工品、小麦粉(国

産及び輸入)、きな粉、ゴマ及びビール) 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。

②STC の分析法

抽出は、各試料 (玄米、小麦粉 (国産及び輸入)、ハト麦加工品、ライ麦粉、インスタントコーヒー、レギュラーコーヒー、ドライフルーツ、きな粉及びゴマ) 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 µg/kg)、暗所に 1 時間放置した後抽出を行った。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。

③BEA 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、各試料 (玄米、小麦粉 (国産及び輸入)、そば (乾麺)、ビスケット、スパゲッティ、うどん (乾麺) 及びパン粉) 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 µg/kg となるよう標準品を添加し、暗所に 1 時間放置した後抽出を行った。遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離した。

抽出液 400 µL に精製水 800 µL 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 µL 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。

(2) ENB の毒性試験

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。昨年度にカビ培養物から精製した ENB を DMSO 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。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。

（3）4,15-DAS を測定可能な ELISA キットの探索

Max Signal T-2 ELISA kit

（PerkinElmer 社）、RIDA SCREEN T-2 ELISA kit (R-Biopharm 社) 及び AgraQuant T-2 Toxin ELISA test (Romer 社) の 3 種類を使用した。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。ELISA キットによる測定は、各メーカーの説明書に従って行った。

（4）ハト麦におけるカビ毒複合汚染のリスク解明

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 検体を購入した。ハトムギから複合汚染の原因菌を分離するために、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°C で 7 日間培養した。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°C で 1~2 週間培養した。PDA 平板培地上に生育した菌体を 2 ml 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）1.5 ml に接種し、48 時間 30°C 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（プロメガ株式会社製）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。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。

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。

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) カビ毒の汚染調査

①タイプ A トリコテセン系化合物

6 食品目 (ライ麦粉、ハト麦加工品、小麦粉 (国産及び輸入)、きな粉、ゴマ及びビール) 計 146 検体の調査を行った。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。平均濃度は、きな粉の 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 (玄米、小麦粉 (国産及び輸入)、ハト麦加工品、ライ麦粉、インスタントコーヒー、

レギュラーコーヒー、ドライフルーツ、きな粉及びゴマ) 167 検体の調査を行った。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。平均濃度は、きな粉の 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。平均濃度は、ライ麦粉の 3,321 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 (玄米、小麦粉 (国産及び輸入)、そば (乾麺)、ビスケット、スパゲッティ、うどん (乾麺) 及びパン粉) 164 検体の調査を行った。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。

(2) ENB の毒性試験

一般状態の観察と体重については、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。摂餌量の変化については、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日の高用量群に对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・高用量群に对照群と比較し低値がみられた。血液学検査の結果については、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。血液化学検査については、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。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。器官重量の測定結果については、高用量群の雄の腎臓絶対重量が对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。病理組織学検査の結果については、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。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。

（3）4,15-DASを測定可能なELISAキットの探索

Max Signal T-2 ELISA kitの結果については、付属の標準品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結果、吸光度に変化はなかった。RIDA SCREEN T-2 ELISA kitでは、付属の標準品の濃度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 Toxin ELISA testでは、付属の標準品の濃度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、交差性はなかったと判断した。

（4）ハト麦におけるカビ毒複合汚染のリスク解明

21検体のハト麦に含まれるカビ毒濃度を測定し、アフラトキシン、トリコテセン系カビ毒及びENsの複合汚染が認められた8検体を用いて真菌分離を試みた。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β-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、いずれのハト麦試料からも検出されなかった。

本研究においてハト麦試料から分離された*Fusarium*属菌のうち、輸入ハト麦からは、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。国産ハト麦からは、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。分離された株を角田液体培地で培養し、カビ毒の生産能を調べた。国産ハト麦試料から分離された計 3 株の *F. sporotrichioides* 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)を生産した。また、国産ハト麦試料から分離された *F. armeniacum* は、T-2 トキシン 150 mg/kg、HT-2 トキシン 2.6 mg/kg および 4,15-DAS 7.6 mg/kg を生産した。輸入ハト麦試料から分離された 1 株の *F. incarnatum* が 4,15-DAS (2.2 mg/kg) を生産した。

D. 考察

(1) カビ毒の汚染調査

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 mg/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 mg/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。

（２）ENB の毒性試験

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。

（３）4,15-DAS を測定可能な ELISA キットの探索

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 とも 4,15-DAS との交差性は認められなかった。

（４）ハト麦におけるカビ毒複合汚染のリスク解明

輸入品のハト麦からは *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 トリコテセン類については、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 トリコテセンのうち 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 トリコテセンであっても 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。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。これらのカビによるハト麦感染が、カビ毒複合汚染のリスクを高める原因であると考えられた。

E. 結論

カビ毒汚染調査については、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。ヨーロッパで汚染が報告された食品からは必ずしもカビ毒は検出されなかった。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。ENB の毒性評価については、明確な毒性は確認できなかった。ENB はプロイラー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。ENs は肝臓のシトクローム P450 を介して代謝される。そこで次年度は、マウスにおける ENB の薬物動態試験を実施する。簡易測定系の確立については、市販の T-2 トキシン ELISA kit3 種類は 4,15-DAS には交差性を示さなかった。次年度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 の検討と、STC の高感度 ELISA 系の確立を行う。ハト麦におけるカビ毒複合汚染のリスクについては、輸入品の検体からアフラトキシン生産能を有する *Aspergillus* 属菌とトリコテセン系カビ毒生産能を有する *Fusarium* 属菌が検出され、これらのカビによる感染がカビ毒の複合汚染の原因であることが明らかになった。次年度は、カビ毒の複合汚染が頻繁にみられるライ麦を対象とした試験を行う。

F. 参考文献

- 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.
- 5) 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.
- 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.

G. 研究業績

【学会発表】

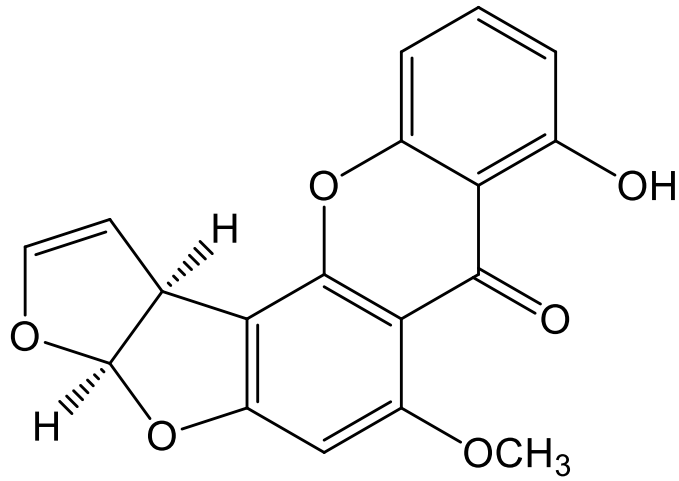
- 1) 第 57 回全国衛生化学技術協議会年会学会名、2020 年 11 月 9-10 日、紙上開催「食品中の 4,15-ジアセトキシスシルペノールの分析法の検討及び汚染実態調査」
- 2) 日本マイコトキシン学会第 86 回学術講演会、2021 年 1 月 8 日、オンライン、「厚生労働省における食品中のマイコトキシンの規制と公定法について」
- 3) 第 46 回日本毒性学会学術年会、2019 年 6

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」

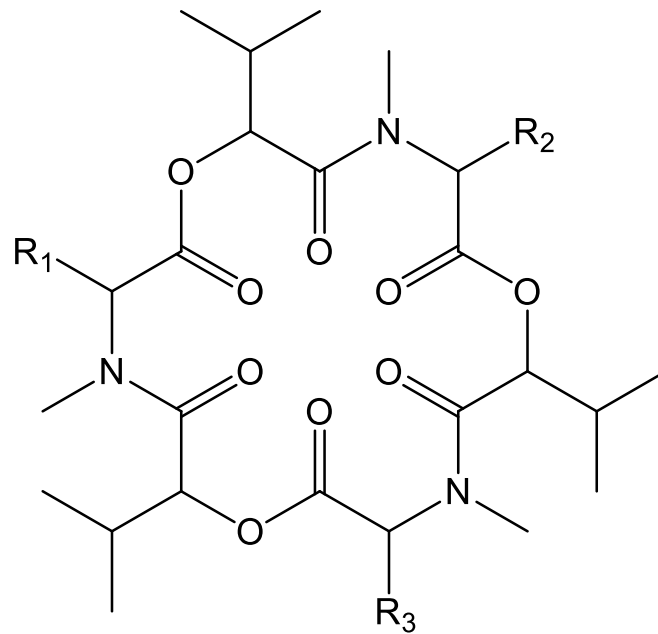
- 4) 第 83 回日本マイコトキシソ学会学術講演会、2019 年 1 月 11 日、神奈川、ポスター発表「ステリグマトシチンの ELISA によるスクリーニング法の開発」

H. 健康危険情報

なし

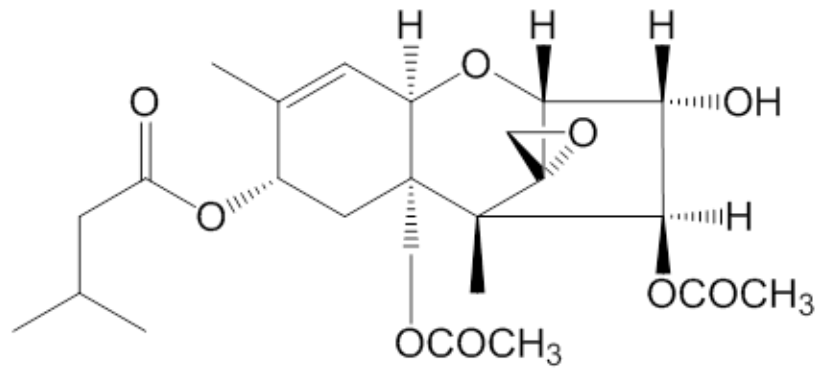


ステリグマトシスチン

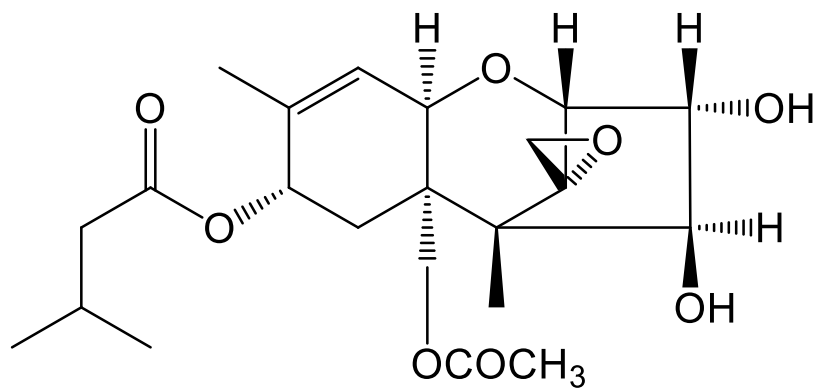


	R ₁	R ₂	R ₃
ビューベリシン	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅
エンニアチンA	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
エンニアチンA ₁	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
エンニアチンB	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
エンニアチンB ₁	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃

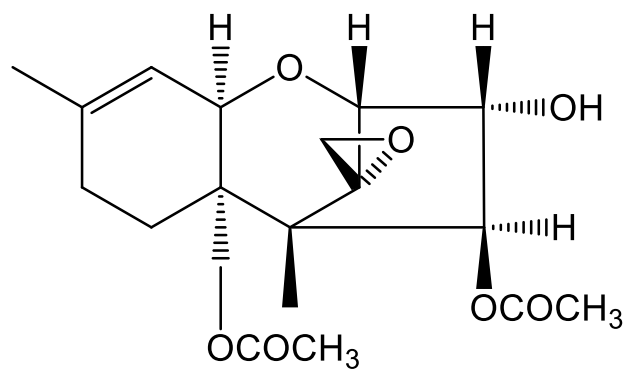
図 1 本研究が対象とするカビ毒の化学構造



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