

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。2021年度の汚染実態調査では、タイプAトリコテセン系化合物については、7食品目計181検体の調査を行った結果、きな粉、ハト麦加工品、ライ麦粉及びそば粉において3種の化合物の合算値の平均が高い傾向にあった。BEAとENsについては、9食品目216検体の調査を行った結果、BEAの汚染濃度は、ハト麦加工品、きな粉及び雑穀で、ENsの汚染濃度は、ライ麦粉と小麦粉(国産)でその他の食品目より高い傾向にあった。STCについては、8食品目199検体の調査を行った結果、玄米とそば(乾麺)における平均値がその他の食品目より高い傾向にあった。毒性試験では、マウスにおけるエンニアチンBの薬物動態試験と肝臓の遺伝子発現解析を実施した。その結果、マウスにおける高い経口バイオアベイラビリティ(85.6%)が確認された。また、肝臓の遺伝子発現解析ではシトクロームP450をコードした遺伝子を含む、多くの代謝関連遺伝子の発現がENBの経口投与によって増加することが明らかになった。簡易分析法の開発では、STCのELISA系のさらなる高感度化と標準曲線の安定化を目標とし、系の改良を行った。試料の希釈法の変更と前処理法の導入により、安定した標準曲線と汚染実態に則した50%阻害濃度を得ることができた。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ライ麦からその原因菌の探索を行った結果、国内産の検体からT-2トキシン、HT-2トキシン及び4,15-DASを同時に産生する*Fusarium sporotrichioides*、DON、3ADON及び15ADONを同時に産生する*Fusarium graminearum*及びENB産生能を有する*Fusarium avenaceum*が検出された。これらカビがライ麦における*Fusarium*トキシンの複合汚染の原因菌であることが示唆された。

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。2021年度には、①ばく露量推定のための汚染調査、②ENBの薬物動態試験、③STCのELISA系の改良と性能評価、④ハト麦とライ麦におけるカビ毒の複合汚染のリスク因子の解明を実施した。

B. 研究方法

(1) カビ毒の汚染調査

①タイプ A トリコテセン系化合物の分析法

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 の薬物代謝試験

①動物実験

群構成は溶媒対照群（5 匹）、ENB 30 mg/kg-経口投与群（10 匹）及び ENB 1 mg/kg-静脈内投与群（10 匹）の 3 群構成とした。6 週齢の雄

性マウスに ENB を経口又は尾静脈内投与し、血中 ENB 濃度測定のために各時点において血液を採取した。また、糞中 ENB 濃度測定のために、一定期間に各群 5 匹の糞を採材した。投与から 2 時間後には各群 5 匹を剖検に供し、肝臓 (約 30 mg/サンプル) を採材して遺伝子発現解析に用いた。肝臓サンプルは、直ちに液体窒素で凍結し、total RNA 抽出まで -80°C で保存した。

②血中 ENB 濃度の測定

採血は ENB 投与前及び投与から 5、30 分、2 時間後、もしくは 10 分、1、4、8、24 時間後に各群 5 匹ずつの PARTIAL サンプルングを実施した。各時点で顔面静脈にアニマルランセットを穿刺し、EDTA-2K 抗凝固処理済みの採血管を用いて、約 50-70 μL 採血した。採取した血液はチューブに移して速やかに氷冷し、遠心分離 ($9,000\times\text{g}$ 、2 分、約 4°C) して上清 (血漿) を新しいチューブに約 10-20 μL 採取した。血漿は移管まで -80°C フリーザーにて凍結保存した。

血漿は 85%アセトニトリルによる抽出及び C18 カートリッジによる精製を実施した後、高速液体クロマトグラフ-質量分析計

(LC-MS/MS) によって ENB 濃度を測定した。

③糞中 ENB 濃度測定

溶媒対照群で投与時~2 時間後、他 2 群で投与から 4 時間後~8 時間後及び 8 時間後~24 時間後の間に排泄された全ての糞を対象とした。採取した糞は重量を測定し、チューブに移して -80°C フリーザーにて凍結保存した。

抽出については、チューブに 85%アセトニトリルを添加した後、チューブ内で糞をよく破碎し、遠心後 ($9,000\times\text{g}$ 、2 分、約 4°C)、上清の試験溶液を回収した。次いで、C18 カートリッジを用いて精製し、LC-MS/MS によって ENB 濃度を測定した。

④遺伝子発現解析

ENB による代謝関連遺伝子の転写レベルの発現変化を検出するために、溶媒対照群と経口投与群の肝臓サンプルを用いて遺伝子発現解析を行った。組織試料から total RNA を抽出した後、サンプル調製を行い、配列決定には Illumina NovaSeq 6000 を用いた。溶媒対照群と比較して Fold Change (絶対値) ≥ 2 かつ p-value < 0.05 で発現量が増加または減少している遺伝子を選別し、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), version 6.8 により Gene Ontology (GO) に基づくエンリッチメント解析を行った。

(3) STC の簡易測定法の開発

96 穴プレートの各ウェルにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈したマウス抗 IgG ヤギ抗体 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 100 μL ずつ加え、 4°C で一晩静置した。抗体を除いた後、PBS に溶解した 0.4%ウシ血清アルブミン (BSA) を各ウェルに 300 μL ずつ加え、 4°C で一晩または室温で 1 時間静置した。0.4% BSA を除いた後、各ウェルに PBS に溶解した 0.2% BSA で希釈したマウス抗 AF 抗体 (100 ng/mL) を 100 μL ずつ加え、室温で 1 時間静置した。静置後 0.02%Tween 20-PBS で 1 回洗浄を行い、45 μL ずつ 0.2% BSA を各ウェルにいれ、STC 標準品を最終濃度で 0.1~30 ng/mL (6 段階) になるように 100%メタノールで 10 倍濃度に溶解したものを 5 μL ずつ加えよく攪拌した。さらに各ウェルに AFB₂-HRP (最終濃度 150 ng/mL) を 50 μL ずつ加え一時間静置し競合反応させた。その後 0.02% Tween 20-PBS で 3 回洗浄を行い、TMB Substrate Reagent を 100 μL ずつ加え、10 分間静置した。0.5 N H_2SO_4 を 100 μL ずつ加え反応を止め、マイクロプレートリーダーで 450 nm および 630 nm における吸光度を測定した。

(4) ハト麦におけるカビ毒複合汚染のリスク

解明

①試料からの *Fusarium* 属菌株の分離

Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol 寒天培地 (DRBC 寒天培地、Difco) 平板上に、供試したハト麦及びライ麦を 1 枚のプレートに 5 粒ずつ計 50 粒を置き、25°C で 7 日間培養した。この際、事前に 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。培養後、生育したコロニーを目視によって観察し、*Fusarium* 属様コロニーをポテトデキストロース寒天 (PDA、栄研化学) 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。

②分離された *Fusarium* 属菌株の同定

PDA 平板上に生育したコロニーの色調等性状を目視で観察した。さらにカーネーションリーフ・アガー培地に接種し 25°C で 7 日間培養後、プレパラートを作製して顕鏡し、孢子形状、孢子形成様式等を観察した。また、分離菌株体を 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 mL に接種し、25°C で 2 日間培養後、得られた菌体から Maxwell RSC Plant DNA Kit (プロメガ株式会社) で DNA を抽出した。これを用いて β -tubulin および EF-1 α 遺伝子の PCR 及びシーケンスを行った。得られた形態学的特徴及び遺伝子塩基配列の解析結果を参照し、菌種の同定を行った。分離株は PDA 斜面培地に接種して 25°C で 7 日間前培養し、4°C で保存した。

③分離された *Fusarium* 属菌株のトリコテセン系カビ毒産生性の検討

同定した *Fusarium* 属菌株について、トリコテセン系カビ毒の産生能を持つ菌種であった場合、タイプ A 及びタイプ B トリコテセンの産生量を調査した。前培養として角田培地に PDA 斜面培地で生育した菌体を接種して振盪培養で 25°C 1 日間培養した。この培養液を 200 mL 三角フラスコに入れた角田培地 30 mL に 100 μ L

接種し、25°C で 7 日間静置培養した。その培養液 500 μ L の酢酸エチル抽出物を 200 μ L のメタノールで溶解したものを、50%メタノールを用いて 100~10,000 倍に適宜希釈し、LC-MS/MS によって T-2 トキシン、HT-2 トキシン、4,15-DAS、DON、NIV、3ADON、15ADON 及び ENB の測定を行った。

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

7 食品目計 181 検体の調査を行った。4,15-DAS は、小麦粉 (国産)、ハト麦加工品、きな粉、そば粉及びゴマから検出され、陽性率については、ハト麦加工品の 35% が最も高く、それ以外の食品ではいずれも 20% 未満であった。平均値については、ハト麦加工品の 3.1 μ g/kg が最も高く、次いできな粉の 0.05 μ g/kg であった。最大濃度は、ハト麦加工品における 16.1 μ g/kg であった。

T-2 トキシンは、小麦粉 (輸入)、小麦粉 (国産)、ライ麦粉、ハト麦加工品、きな粉、そば粉及びあんこから検出された。陽性率については、そば粉の 90% が最も高く、次いできな粉の 73%、ライ麦粉の 57% であり、その他の食品では 30% 以下であった。平均濃度はきな粉の 2.1 μ g/kg が最も高く、次いでハト麦加工品の 1.4 μ g/kg であった。最大濃度はきな粉における 32.0 μ g/kg であった。

HT-2 トキシンは、T-2 トキシンと同じ食品種から検出された。ライ麦粉の陽性率 73% が最も高く、次いでそば粉で 70%、きな粉で 67%、あんこで 33% であり、その他の食品では 30% 以下であった。きな粉の平均濃度 5.2 μ g/kg が最も高く、次いでライ麦粉で 2.7 μ g/kg、ハト麦加工品で 1.9 μ g/kg であった最大濃度はきな粉における 62.4 μ g/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 7.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでハト麦加工品の 6.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、ライ麦粉の 3.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、そば粉の 2.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、小麦粉、ゴマやあんこよりも高い傾向にあった。最大濃度はきな粉における 95.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

②BEA と ENs

9 食品目 216 検体の調査を行った。BEA については、小麦粉（国産）、小麦粉（輸入）、ライ麦粉、ハト麦加工品、米、そば粉、雑穀、きな粉及びゴマから検出された。陽性率が最も高かったのはハト麦加工品の 92.3%で、次いできな粉で 60.0%であり、その他の食品では 40%以下であった。きな粉の平均濃度 9.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでハト麦加工品で 6.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、雑穀で 4.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、ゴマの 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度は、ハト麦加工品における 62.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。ENs は小麦粉（国産）、小麦粉（輸入）、ライ麦粉、ハト麦加工品、米、そば粉、雑穀、きな粉及びコーヒー豆から検出された。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小麦粉（国産）（95%）で、次いでライ麦粉（80%）、小麦粉（輸入）（70%）、きな粉（55%）で、その他の食品目では 15%以下であった。ライ麦粉の平均濃度 254.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いで小麦粉（国産）の 58.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、その他の食品目より高い傾向にあった。最大濃度は、ライ麦粉における 3,697 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

③STC

8 食品目 199 検体の調査を行った。米と小麦加工品である小麦粉（国産）、そば（乾麺）、ビスケット、スパゲッティ、うどん（乾麺）、食パン及びインスタントラーメンから STC が検出された。陽性率が最も高かったのは玄米（95%）で、次いでそば（乾麺）（83%）であり、その他の食品目では 50%以下であった。平均濃度については、玄米の 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が最も高く、次いでそ

ば（乾麺）の 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。最大濃度は、玄米における 5.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

（2）ENB の薬物代謝試験

①ENB の薬物動態

糞中の ENB 濃度については、経口投与群において、ENB 投与量の平均 5.26%の ENB が検出された。尾静脈内投与群ではごく微量の ENB が検出されるのみであった。各時点の平均濃度に基づいて、薬物動態パラメータを算出した。経口投与群において、 C_{max} は 1024 ng/mL 、 t_{max} は投与後 1 時間、AUC は 6008 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ と算出された。尾静脈内投与群における AUC は 234 $\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ と算出された。投与用量は経口投与群が 30 mg/kg 、尾静脈内投与群が 1 mg/kg であるが、線形動態に従い、AUC が投与量に比例して増加すると仮定した場合、バイオアベイラビリティは 85.6%と推定された。

②RNA-Seq 解析

経口投与群では、溶媒対照群と比較して、553 遺伝子の発現が増加した。発現が増加した遺伝子の GO term に基づいたエンリッチメント解析では、有機物、窒素化合物及び薬物等に対する反応や、代謝プロセスの制御に関連した GO が濃縮された。発現が増加した遺伝子群には、シトクローム P450 をコードする遺伝子が多く含まれていた（*Cyp1b1*、*Cyp2a5*、*Cyp2b10*、*Cyp2a12*、*Cyp7a1*、*Cyp21a1*、*Cyp26a1*）。

（3）STC の簡易測定法の開発

玄米で添加回収試験を行った回収率の平均と標準偏差は 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ STC 添加では 103.8 \pm 11.1%、6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ STC 添加では 91.7 \pm 17.5%、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ STC 添加では 117.6 \pm 17.5%といずれも 90%以上という高水準を示した。汚染玄米を用いた測定結果では 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 付近の汚染米でも

LC-MS/MS での測定値とほぼ同等であり、5.67 µg/kg の汚染濃度の玄米ではやや高めに出たものの、スクリーニングとしては充分信頼性のおける結果が得られることがわかった。小麦粉では自然汚染試料がなかったことから、添加回収率のみの測定であったが、6 回の試験の回収率の平均値と標準偏差は 2 µg/kg STC 添加では 85.4±26.4%、6 µg/kg STC 添加では 91.8±16.0%、20 µg/kg STC 添加では 106.7±8.2%であった。

(4) ハト麦とライ麦におけるカビ毒複合汚染のリスク解明

タイプ A トリコテセン系化合物の検出量が多かった又は特徴的であったハトムギ 7 検体及びライムギ 3 検体を用いて *Fusarium* 属菌の分離を試みた。その結果、ハトムギからは計 42 株、ライムギからは計 30 株の *Fusarium* 属菌がそれぞれ分離された。これらの分離株を培養し、培養液中の T-2 トキシン、HT-2 トキシン、4,15-DAS、DON、NIV、3ADON、15ADON 及び ENB を測定し、いずれか 1 種類以上のカビ毒の産生性が認められた分離株については、同定を行った。輸入ハト麦からはタイプ A トリコテセン系化合物の産生菌の *Fusarium incarnatum* のみが 2 株検出され、これらの株は 4,15-DAS の産生性のみを有した。国内産ハト麦からはタイプ A トリコテセン系化合物の産生菌の *Fusarium armeniacum*、*Fusarium sporotrichioides* 及び *F. incarnatum* が検出され、*F. armeniacum* は T-2 トキシン及び 4,15-DAS を、*F. sporotrichioides* は T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS をそれぞれ同時に産生した。*F. incarnatum* は T-2 トキシン又は 4,15-DAS のどちらかのみを産生する菌株が検出された。タイプ B トリコテセン系化合物及び ENB の産生能を有する菌株は分離されなかった。ライ麦試料では、国内産の 1 検体から

のみ *Fusarium* 属菌を分離することができた。タイプ A トリコテセン系化合物の産生菌の *F. sporotrichioides* が 8 株検出され、これらの株は T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS を同時に産生した。またタイプ B トリコテセン系化合物の産生菌の *Fusarium graminearum* が 2 株検出され、これらの株は DON、3ADON 及び 15ADON を同時に産生した。さらに ENB 産生能を有する *F. avenaceum* が 9 株検出された。

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

3 年間通じて調査を行った食品目のうち、ライ麦粉とハト麦加工品で 3 種の化合物合算値が高い傾向にあった。2019、2020 及び 2021 年度におけるライ麦粉での合算値の平均は、2.3、1.7 及び 3.3 µg/kg、ハト麦加工品では、10.3、10.4 及び 6.3 µg/kg と 3 年間を通じて汚染が認められた。小麦粉については、3 年間を通じて国産品の方が輸入品よりも汚染レベルが高く、国産品における合算値の平均は、0.3、2.0 及び 0.5 µg/kg、輸入品では 0.04、0.5 及び 0.3 µg/kg と推移した。小麦加工品よりもライ麦粉やハト麦加工品における汚染レベルが高いものの、日本人における摂取量については、小麦加工品の方が圧倒的に多いことから、ばく露量の推定は小麦粉の結果を用いて行うこととした。昨年度から調査を開始したきな粉については、今年度も汚染が認められ、今年度の検体の合算値の平均値は、ライ麦粉やハト麦加工品を上回っていた。きな粉の摂取量も小麦加工品と比較すると極めて少ないが、子供から大人まで幅広い年齢層により直接消費される食品であることから、高濃度汚染検体による突発的な食中毒事故の発生の懸念がある。そのため、今後もタイプ A トリコテセン系化合物汚染の調査を行っていく必要があると考える。一方で、今年度から調査を開始し

たあんこの汚染レベルは、他の食品目よりも低かった。2010～2015 年度に実施されたフザリウムトキシンの汚染調査の結果において、小豆ではハト麦加工品を上回る T-2 トキシンと HT-2 トキシンの汚染が認められていた。小豆の加工品であるあんこでそれらカビ毒の汚染レベルが低かった原因は、加工過程による減衰又は小豆のカビ毒汚染の年次変動と推定される。4,15-DAS については、2021 年度まで 6 年間通して汚染調査を行ったが、ハト麦加工品以外で汚染レベルの高い食品目は認められなかった。2018 年に EFSA が公開した評価書において、ヨーロッパにおける 4,15-DAS の汚染調査結果がとりまとめられているが、汚染レベルが高い食品目は、一部の地方の小麦、ソルガムやオーツ麦と限られていた⁵⁾。幅広い食品目から検出される T-2 トキシン、HT-2 トキシンとは汚染原因菌や汚染が生じる環境が大きく異なると考えらえる。

②BEA と ENs

BEA については、コーヒー豆以外の食品目から検出され、その中でも特にきな粉、ハト麦加工品、雑穀及びゴマの汚染レベルが高かった。雑穀の中では、黒米と赤米で汚染が認められた。ただ、主食である小麦や米における汚染レベルは、ENs よりも非常に低いことから、日本人の健康に対する影響を考える上で ENs の方が重要と考えられた。小麦粉やライ麦粉では ENs の汚染が、ハト麦加工品やきな粉では BEA の汚染レベルの方が高いことから、BEA と ENs の汚染原因菌や汚染が生じる環境は異なると考えられた。ENs についても BEA と同様に様々な食品目からの検出が認められたが、特に小麦粉(国産)とライ麦粉において汚染レベルが高かった。ライ麦粉の方が小麦粉よりも汚染レベルは高いが、日本人における摂取量は小麦加工品の方が圧倒的に多いことから、ばく露量推定は小麦粉の結果を用いることとした。昨年度のライ麦粉

検体において、ENB が約 50,000 µg/kg 検出された検体が 2 件認められた。今年度の検体では約 4,000、1,500 及び 1,000 µg/kg 検出された検体がそれぞれ 1 件認められた。これらは全て北海道産であることから、ENs の高汚染が生じる環境が定常的に存在していると考えられた。

ヨーロッパで実施された汚染調査では、コーヒー豆から BEA や高濃度の ENs が検出されていたため、今年度にコーヒー豆の調査を実施したが、いずれのカビ毒も検出されなかった。コーヒー豆における BEA や ENs の汚染は限られた地域における現象である可能性が考えられた。

③STC

2019 年度及び 2020 年度に続き、玄米と小麦加工品を対象に調査を行った。玄米において、5.7 µg/kg とこれまでの調査の結果と比較して非常に高い値の検体が認められた。小麦加工品の中では、そば(乾麺)の汚染レベルが小麦粉よりも高く、この傾向は 3 年間続いた。スパゲッティにおいて、うどん(乾麺)やインスタントラーメンでは認められなかった高い濃度(0.8 µg/kg)で汚染が生じている検体が認められた。スパゲッティの原料であるデュラム小麦で STC 汚染が生じている可能性が考えられた。STC の汚染調査は 2016 年度より行っており、玄米からは毎年高頻度で STC が検出されたが、精米からは検出限界以上の濃度で検出された検体は認められなかった。玄米の摂取量は、精米と比較すると非常に低いいため、STC の日本人におけるばく露量推定には考慮にいれず、小麦加工品のみで推定することとした。

(2) ENB の薬物代謝試験

薬物代謝試験の結果では、マウスにおける高い経口バイオアベイラビリティ(85.6%)が確認された。経口投与群の糞中には ENB が検出されたが、ENB 投与量の平均 5.3%であった。また、肝臓の遺伝子発現解析ではシトクローム

P450 をコードした遺伝子を含む、多くの代謝関連遺伝子の発現が ENB の経口投与によって増加することが明らかになった。したがって、ENB がマウスの経口投与によって十分に吸収され、肝臓における代謝を受けた可能性が示唆された。全身循環前の代謝（presystemic metabolism）の存在や ATP Binding Cassette トランスポーターの発現が吸収に影響を与えることから、ENB は個体及び動物種ごとに異なる複雑な動態を示す可能性があることが指摘されている。本試験と相反して、ブロイラーにおける ENB の経口投与後の低い吸収性が報告されているが、上記のような種差や生体内変化の違いが影響している可能性が考えられる。

（3）STC の簡易測定法の開発

本研究の初年度に開発した STC 用 ELISA では、測定可能範囲は 0.59~13.34 ng/mL であり、IC₅₀ は 2.3 ng/mL であった。今年度改良した結果、測定可能範囲は 0.1~10.0 ng/mL、IC₅₀ は 1.2 ng/mL となり、より高感度の系を確立することができた。汚染実態調査で検出された試料を使った実態調査への応用においても、1.17 µg/kg の STC 汚染玄米から ELISA で検出されたことは実用化に向けて大きな進歩である。

前処理については先行研究において、QuEChERS 法を用いて前処理法が用いられた。本研究では、QuEChERS より工程数の少ない Autoprep MF-A 多機能カラム法を用いて良好な結果が得られた。STC は 85%アセトニトリルで抽出するが、ウェルに添加するときには 10%メタノール溶液を使用することから玄米、小麦粉の成分が混入する可能性は非常に高い。Autoprep MF-A 多機能カラムは、試料の 85%アセトニトリル抽出液から AF を選択する one step カラムとして開発されたものである。STC の精製にも有効であること、玄米、小麦粉の不純物の除去にも使用できることは、本研究で初

めて実証された。

（4）ハト麦、ライ麦におけるカビ毒複合汚染のリスク解明

タイプ A トリコテセン系化合物である T-2 トキシン、HT-2 トキシン、4,15-DAS の複合汚染の原因菌は、海外産ハト麦においては *F. incarnatum*、国内産ハト麦及びライ麦においては *F. sporotrichioides* 及び *F. armeniacum* である可能性が示された。ハト麦においては 2 年間の調査によって年をまたいでの再現性があることも確認された。ハト麦、ライ麦試料中のタイプ A トリコテセン系化合物の汚染プロファイルの差異と、これらの検出された *Fusarium* 属菌の種類は関連していると考えられ、この菌種の違いがそれぞれの穀類の *Fusarium* トキシン汚染のリスク因子の一端となっている可能性が示唆された。

E. 結論

実態調査に関して、タイプ A トリコテセン系化合物については、7 食品目計 181 検体の調査を行った結果、小麦粉（国産）、ハト麦加工品、ライ麦粉、きな粉及びそば粉における汚染レベルが高い傾向にあった。BEA と ENs については、9 食品目 216 検体の調査を行った結果、BEA はハト麦加工品、ENs は小麦粉とライ麦粉で汚染が主に認められ、検出される食品目が異なっていた。特に北海道産のライ麦粉において mg/kg オーダーで ENB が検出される検体が認められ、ENs の高汚染が起きる環境が日本に存在することが明らかになった。STC については、7 食品目 164 検体の調査を行った結果、玄米とそば粉において、他の食品目より高い汚染が認められた。日本人における各食品目の摂取量を踏まえ、3 年間で得られた小麦粉の汚染調査結果を用いて、日本人におけるタイプ A トリコテセン化合物、ENs 及び STC のばく露量を推定

することとした。

ENsの毒性に関して、2019年度にはENs混合物(B、B1、A1)の、2020年度にはENB単体の28日間反復経口投与試験を実施したが、いずれも明らかな毒性は検出されなかった。本年度の結果から、マウスでは経口投与によりENBが十分に吸収されることが明らかになったことから、ENBの毒性が当初の想定と比較して低い可能性がある。以上より、ENBは経口投与により吸収されるものの、一般毒性は今回用いた用量より高い用量で出現するものと考えられた。

STCの簡易測定法に関して、本年度改良したELISA法は、測定可能範囲は0.1~10.0 ng/mLであり、IC₅₀は1.2 ng/mLであった。玄米、小麦粉とも2.0 µg/kg以上では90%以上(小麦粉85%以上)の回収率を示し、汚染玄米を用いた測定でもLC-MS/MSとの相関性が取れていることが明らかになった。このことから、国産玄米および小麦粉のSTC汚染食品のスクリーニングには充分に対応できる方法であると考えられた。

ライ麦、ハト麦におけるカビ毒の複合汚染のリスク因子については、生産地によって、*Aspergillus*トキシン及び*Fusarium*トキシンの汚染状況、及び汚染原因菌の種類に偏りが存在することが明らかとなった。今後、これら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. 研究業績

【論文発表】

1) Takashima, K., Nakajima, K., Shimizu, S., Ojira, R., Tang, Q., Okano, H., Takahashi, Y., Ozawa, S., Jin, M., Yoshinari, T., Yoshida, T., Sugita-Konishi, Y., Shibutani, M.: Disruption of postnatal neurogenesis and adult-stage suppression of synaptic plasticity in the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to sterigmatocystin

in rats. *Toxicol. Lett.* 2021;349:69–83.

2) 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.* 2021;46(4):157-165.

3) Hashimoto K, Kawakami Y, Hashimoto R, Kitaoka Y, Onji Y, Oda H, Watanabe M, Takahashi H, Yokoyama K. Distribution of *Aspergillus section Nigri* at shochu fermenting places in Japan. *Journal of the Air & Waste Management Association.* 2021;24:1-8.

【学会発表】

1) 第117回日本食品衛生学会学術講演会、2021年10月26日~11月9日「市販ELISA kitによるタイプAトリコテセン系カビ毒の迅速簡易測定法の検討について」

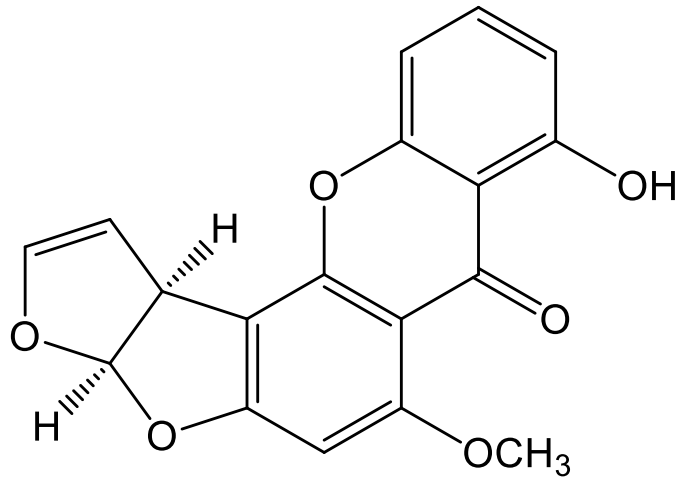
2) 第58回全国衛生化学技術協議会年会、2021年11月25日~26日「食品中のタイプAトリコテセン系カビ毒の同時分析法の妥当性の検証及び汚染実態調査について」

3) 日本マイコトキシン学会第87回学術講演会、2022年1月7日「ライ麦から分離されたフザリウム属菌が生産する新興カビ毒の同定及び分析法の開発について」

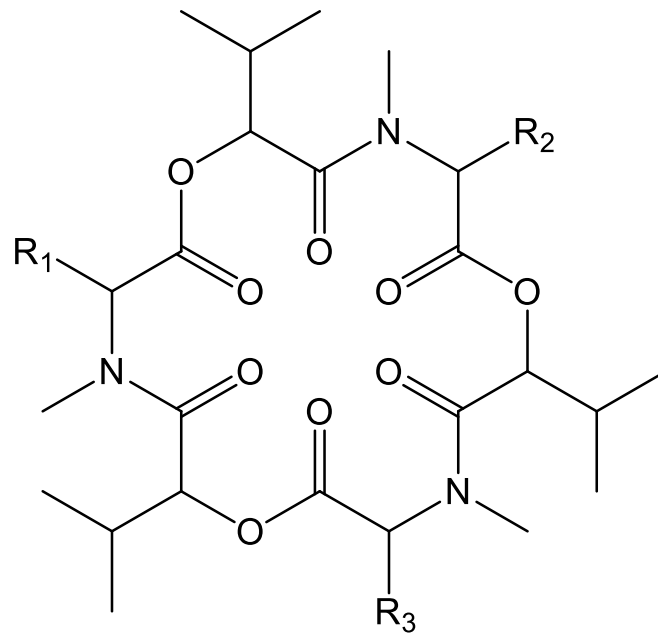
4) 日本マイコトキシン学会第87回学術講演会、2022年1月7日「国内流通ハトムギにおけるカビ毒汚染実態およびトリコテセン系カビ毒産生*Fusarium*属菌の分布調査について」

G. 健康危険情報

なし

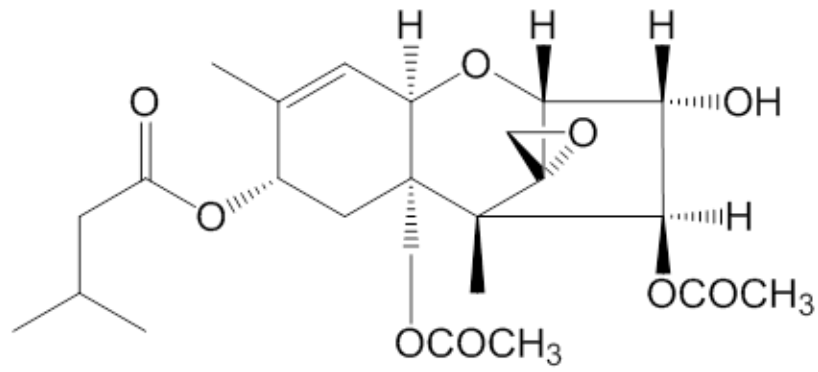


ステリグマトシスチン

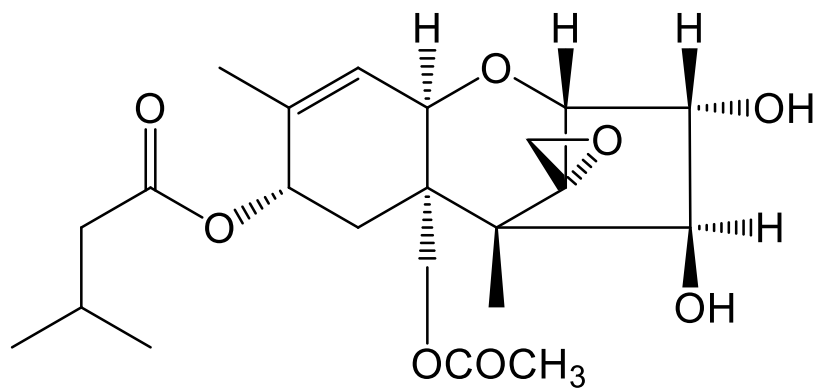


	R ₁	R ₂	R ₃
ビューベリシン	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅
エンニアチンA	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
エンニアチンA ₁	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
エンニアチンB	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
エンニアチンB ₁	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃

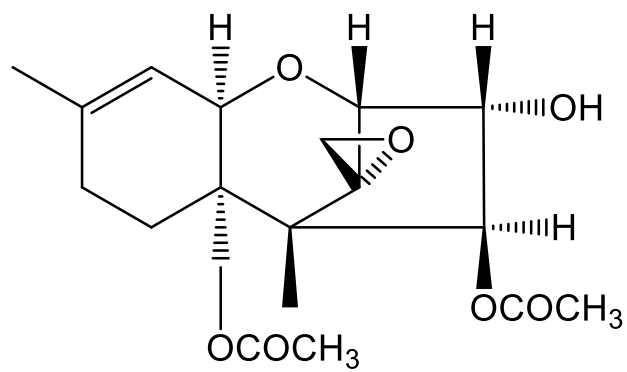
図 1 本研究が対象とするカビ毒の化学構造



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)