

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)

総合研究報告書

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
(2019～2021 年度)

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

本研究は、3 種の新興カビ毒に対して行政的施策を講じる必要があるかを判断するためのデータの取得を目的とした。

①カビ毒の分析法の開発と汚染実態調査：タイプ A トリコテセン系化合物については、3 年間で累計 10 食品目計 477 検体、エンニアチン類 (ENs) については、累計 12 食品目 658 検体、ステリグマトシスチン (STC) については、累計 8 食品目 507 検体の調査を行った。調査結果を基に算出した日本人におけるばく露量やばく露マージンの値から、いずれの新興カビ毒も直ちに日本人の健康に影響を与える汚染レベルでは無いことが明らかになった。ただし、ライ麦、ハト麦及びきな粉における T-2 トキシンと HT-2 トキシン汚染、ライ麦における ENs 汚染、玄米における STC 汚染など、比較的高レベルの汚染が一部の食品目で認められた。

②毒性試験：エンニアチン B (ENB) 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結果、病理組織学的検査において ENB の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量は最高用量の 30 mg/kg となった。また、薬物動態試験の結果、高い経口バイオアベイラビリティ (85.6%) が確認されことから、ENB の毒性が当初の想定と比較して低い可能性があり、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。

③簡易測定法の開発：STC を対象とした ELISA 測定系については、実態調査に応用できる感度と精度を有する系の開発に成功した。T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS の 3 つを同時に測定できる ELISA を市販品から探索については、市販の 7 種の T-2 トキシン ELISA キットに使われている特異抗体が 4,15-DAS も認識するか否かを検討した結果、いずれも 4,15-DAS には交差性を示さないことがわかった。

④カビ毒の複合汚染のリスク解析：タイプ A トリコテセン系化合物の T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS の複合汚染の原因菌としては、海外産ハト麦においては *Fusarium incarnatum*、国内産ハト麦及びライ麦においては *Fusarium sporotrichioides* 及び *Fusarium armeniacum* が、それぞれ汚染の原因菌となっていた可能性が示された。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。

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年度より様々なカビ毒について日本に流通する食品における汚染実態や毒性に関する研究を行い、カビ毒に汚染された食品の摂取の低減を目的とした施策策定の科学的根拠となるデータを取得し、食の安全性確保に貢献してきた。

本研究の研究対象は、以下に述べる3種の新興カビ毒である。新興カビ毒とは、数十年前の発見当時は注目をされていなかったが、昨今の分析技術の発達により、食品における検出例が報告され、新たな食品危害物質として国際的に注目を浴びているカビ毒の総称である。本研究は、それら新興カビ毒に対して行政的施策を講じる必要があるかを判断するためのデータの取得を目的とした。

4,15-ジアセトキシシルペノール(4,15-DAS)については、2016~18年度の厚生労働科学研究により分析法の確立とハト麦における汚染実態を明らかにした。一方、2017年に公表されたJECFAの評価結果¹⁾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²⁾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った。

ステリグマトシスチン(STC)については、2016~18年度の厚生労働科学研究により分析法の確立と米や小麦などの主要食品における汚染実態を明らかにした³⁾。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

とした汚染調査を行う必要と考えられた。

エンニアチン類(ENs)とビューベリシン(BEA)は、数ある新興カビ毒の中でもその高い検出頻度から高い注目を浴びており、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⁴⁾。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⁵⁾においては、高濃度かつ高頻度でENsが検出されており、毒性や小麦以外の食品における汚染実態の情報の取得の必要性が高まっている。

これらカビ毒について、「国内流通食品を対象とした汚染実態調査」、「毒性に関する研究」及び「簡易分析法の確立」、「複合汚染のリスク因子の解明」を行った。

B. 研究方法

(1) 国内流通食品を対象とした汚染実態調査

①タイプAトリコテセン系化合物の分析法

抽出は、試料25gに抽出溶媒アセトニトリル：水(85：15)100mLを加え、30分間振盪することで行った。精製は多機能カラム(昭和電工社製Autoprep MF-T 1500)を用い、調製した試験溶液中の3種のタイプAトリコテセン化合物(T-2トキシン、HT-2トキシン、4,15-DAS)をLC-MS/MSで定量した。

②STCの分析法

抽出は、試料25gに抽出溶媒アセトニトリル：水(85：15)100mLを加え、30分間振盪することで行った。精製に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。調製した試験溶液中のSTCをLC-MS/MSで定量した。

③BEAとENsの分析法

抽出は、試料20gに抽出溶媒アセトニトリル：水(85：15)200mLを加え、30分間振盪することで行った。精製にはC18カートリッジ(Waters社製SepPak Vac C18 200mg)を用

い、調製した試験溶液中のエンニアチン 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 BEA を LC-MS/MS で定量した。

④ばく露量推定

摂取量は、2005～2007 年に実施された食品摂取量・摂取頻度調査の結果を用いた。対象食品から小麦加工品 139 種を選抜した。Crystal Ball ((株) 構造計画研究所) を用いてモデルの探索を行った。タイプ A トリコテセン系化合物の汚染量は、2019～2021 年度に収集した小麦粉 (国産) 72 件と小麦粉 (輸入) 66 件の結果を用い、4,15-DAS、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの分析値を合算した。3 種のカビ毒の合算値と摂取量の分布を掛け合わせ (試行回数 100000)、ばく露量を求めた。ENs の汚染量は、2019～2021 年度に収集した小麦粉 (国産) 94 件と小麦粉 (輸入) 66 件の結果を用い、ENA、ENA1、ENB 及び ENB1 の分析値を合算した。ENs 濃度と摂取量の分布を掛け合わせ (試行回数 100000)、ばく露量を求めた。STC の汚染量は、2016～2021 年度に収集した小麦粉 (国産) 144 件と小麦粉 (輸入) 127 件の結果を用いた。STC 濃度と摂取量の分布を掛け合わせ (試行回数 100000)、ばく露量を求めた。

(2) 毒性に関する研究

①ENs 混合物を用いた動物試験

ENs 混合物 (B : B1 : A1 = 4 : 4 : 1) をジメチルスルホキシド添加コーン油で調製した被験液を 0、0.8、4、20 mg/kg 体重の投与量でそれぞれ 6 週齢 ICR [CrI:CD1 (ICR)] マウス (雌雄各 10 匹/群) に 28 日間反復経口投与した。投与期間中は一般状態の観察及び体重、摂餌量の測定を実施した。投与期間終了後、剖検時に血液を採取し、血液学検査と血液化学検査を実施した。剖検では外表及び全ての器官、組織を詳細に観察した。所定の臓器を採取し重

量測定後、固定し、パラフィン包埋した。各臓器のヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色標本を作製し、鏡検した。

②ENB の毒性試験

ENB をジメチルスルホキシド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。

③ENB の薬物動態試験

ENB は、終濃度 6% のジメチルスルホキシドに、経口投与群ではコーン油、静脈内投与群では生理食塩水に混じて調製した。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。血漿及び糞中の ENB は、精製後に LC-MS/MS によって濃度を測定した。

(3) 簡易分析法の確立

①STC ELISA の開発

96 穴プレートの各ウェルにマウス抗 IgG ヤギ抗体をコーティングした後、0.4% ウシ血清アルブミン (BSA) でブロッキングを行った。洗浄後 0.2% BSA で希釈したマウス抗 AF 抗体を加え、室温で反応させ洗浄した。45 μ L の 0.2% BSA をあらかじめ入れた各ウェルに 100% メタノールで溶解した標準品および試料を 5 μ L

加えよく攪拌した。すぐにアフラトキシン B2-HRP を 50 μ L ずつ加え競合反応させた。洗浄後、TMB Substrate Reagent により発色させ、0.5 NH_2SO_4 により反応を止めた。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。

②4,15-DAS を認識する ELISA キットの探索

市販の 7 種類の ELISA キットを購入し、それぞれのキットに添付されている各カビ毒標準品の濃度を参考に、その 1000 倍濃度までの 4,15-DAS 溶液を実験に用いた。ELISA の操作は、各メーカーの説明書に従って行った。

（4）複合汚染のリスク因子の解明

①ハト麦及びライ麦試料からの *Fusarium* 属菌株の分離

Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol 寒天培地（DRBC 寒天培地）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。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）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、カーネーションリーフ・アガー培地に生育した菌体のプレパレート観察像を形態学的同定指標とした。さらに分子生物学的同定指標として、分離株菌体を少量培養し、DNA を抽出後、 β -tubulin 及び EF-1 α 遺伝子のシーケンスを行った。

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

前培養液を 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。培養液の酢酸エチル抽出物中の T-2 トキシン、HT-2 トキシン、4,15-DAS、デオキシニバレノール（DON）、ニバレノール（NIV）、

アセチル化 DON 及び ENB 量を LC-MS/MS で調べた。

C. 研究結果

（1）国内流通食品を対象とした汚染実態調査

①タイプ A トリコテセン系化合物

3 年間で累計 10 食品目計 477 検体の調査を行った。4,15-DAS は、主にハト麦加工品及びコーンフラワーから、T-2 トキシンは、主にきな粉、ハト麦及びそば粉から、HT-2 トキシンは、主にきな粉、ハト麦加工品及びライ麦粉から検出された。

②BEA と ENs

3 年間で累計 12 食品目 658 検体の調査を行った。BEA は、主にきな粉、ハト麦加工品、コーンフラワー、雑穀及びゴマから、ENs は、主にライ麦粉及び小麦粉（国産）から検出された。

③STC

3 年間で累計 8 食品目 507 検体の調査を行った。玄米及びそば（乾麺）で主に検出された。

④ばく露量推定

日本人における小麦加工品からのタイプ A トリコテセン化合物の全年齢における 95%ile 値は 1.50~1.55、1~6 歳における 95%ile 値は 3.92~4.02 であった。

日本人における小麦加工品からの ENs ばく露量の全年齢における 95%ile 値は 81.3~82.5、1~6 歳における 95%ile 値は 211.5~221.3 であった。ENs 平均摂取量からばく露マージン（MOE）を算出した結果、全年齢では 1,330,000~1,370,000 で、1~6 歳では 528,000~550,000 であった。

③STC

日本人における小麦加工品から STC ばく露量の全年齢における 95%ile 値は 0.08~0.11、平均値は 0.02~0.04 ng/kg 体重/日であった。日本人の STC 平均摂取量から MOE を算出した結果、4,000,000~8,000,000 であった。

(2) 毒性に関する研究

① ENs 混合物を用いた動物試験

高用量群の雌雄の摂餌量に若干の低値がみられたのみでその他の検査項目に ENs の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量を求めるに至る結果を得ることはできなかった。

② ENB の毒性試験

ENB 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が、病理組織学的検査において ENB 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。

③ ENB の薬物動態試験

経口投与群において、Cmax は 1024 ng/mL、tmax は投与後 1 時間、AUC は 6008 ng・hr/mL と算出された。尾静脈内投与群における AUC は 234 ng・hr/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。RNA-Seq 解析では、経口投与群で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。

(3) 簡易分析法の確立

① STC ELISA の開発

STC の標準品及び試料の溶解メタノールの濃度を工夫することで、安定して 1.2~1.5 ng/mL の IC₅₀ が得られるようになった。また、Autoprep MF-A 多機能カラムを前処理に用いることで、ELISA 測定を妨害する物質を取り除くことができた。添加回収試験では、玄米と小麦粉でいずれも 90% 以上の平均回収率が得られた。

② 4,15-DAS の ELISA

7 社の T-2 又は T-2/HT-2 用の ELISA キットを用いて 4,15-DAS との交差性を検討したが、いずれのキットにおいても交差性は認められなかった。

(4) 複合汚染のリスク因子の解明

ハト麦及びライ麦試料から分離された *Fusarium* 属菌種のカビ毒産生性を調べた。国産ハト麦試料から分離された計 3 株の *F. sporotrichioides* と 1 株の *F. armeniacum* の培養液からは、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS が検出された。輸入ハト麦試料から分離された菌のうち、1 株の *F. incarnatum* のみが 4,15-DAS を産生した。ライムギ試料では、国内産の 1 試料からのみ *Fusarium* 属菌を分離することができた。*F. sporotrichioides* が 8 株検出され、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 *F. 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) 国内流通食品を対象とした汚染実態調査

① タイプ A トリコテセン系化合物

1~6 歳及び全年齢における 95 パーセントイル値は、それぞれ 3.92~4.02 及び 1.50~1.55 ng/kg 体重/日であった。JECFA が設定したグループ PMTDI 60ng/kg 体重/日を下回っていたことから、日本人において、T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-DAS による健康被害の懸念は小さいと考えられた。

② BEA と ENs

実態調査の結果を基に行ったばく露量推定の結果、全年齢における MOE は 1,330,000~1,370,000、1~6 歳では 528,000~550,000 であ

った。これら値が 10,000 を超えていたことから、ENs による日本人の健康への懸念は低いと考えられた。

③STC

汚染実態調査の結果を踏まえ、小麦加工品からの日本人における STC のばく露量を推定した結果、平均的な日本人におけるばく露量は 0.02~0.04 ng/kg 体重/日となった。平均的な日本人における STC の MOE は 10,000 を上回っており、健康に対する影響は少ないと考えられる。

E. 結論

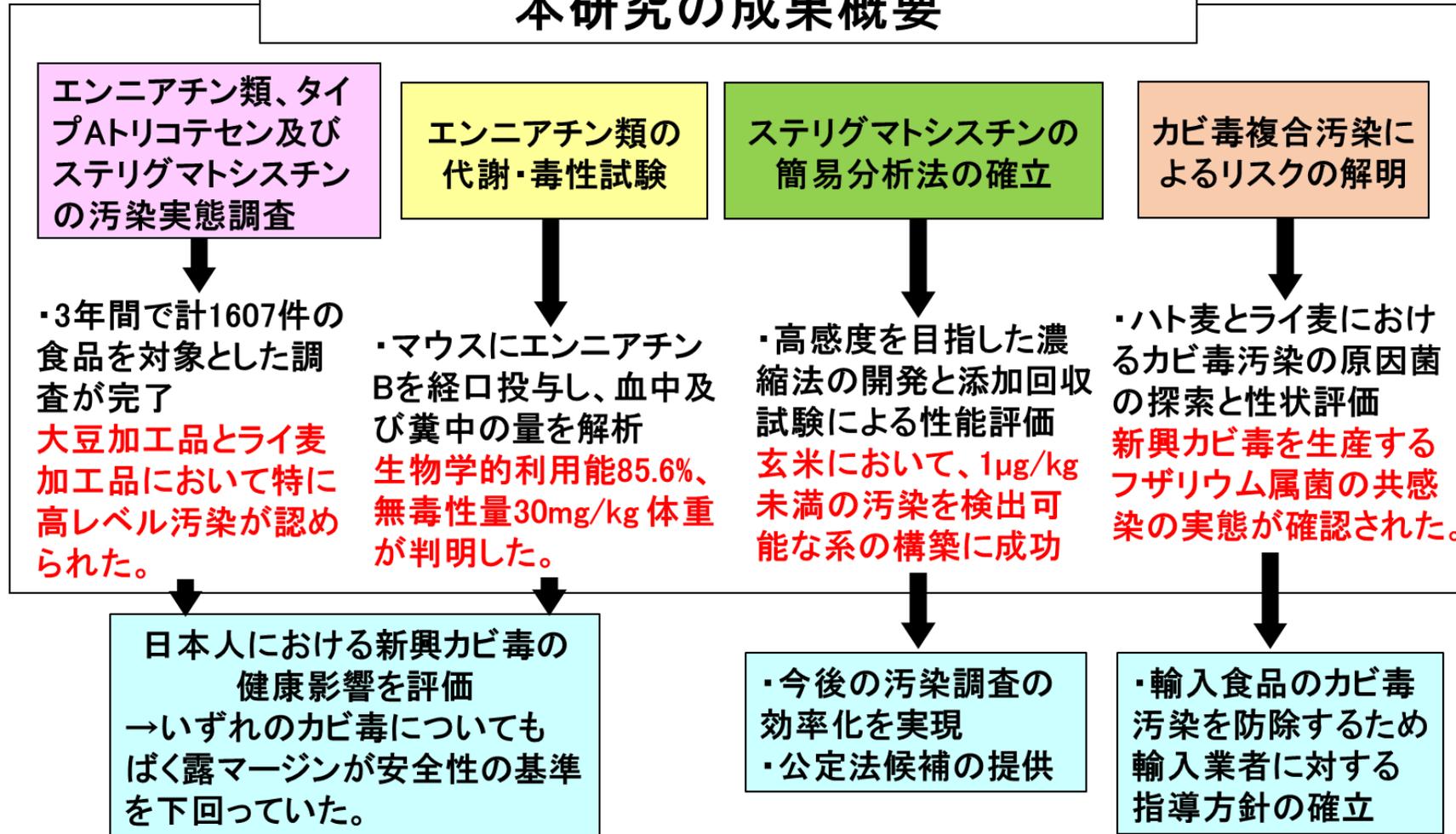
カビ毒の汚染実態調査については、分析法の確立と目標数の汚染調査が完了した。これら結果から、ばく露量を推定し、日本人の健康に与える影響の評価を達成した。毒性試験については、これまで毒性・代謝に関する情報が不足しており、リスクが全く不明であった ENs について、マウスにおいては体内に吸収されるものの、強い毒性は発揮しないという新たな知見を取得した。この結果と汚染調査の結果を合わせ、健康リスクを明らかにすることを達成した。簡易試験法の開発については、STC が高頻度で検出される玄米と小麦において、日本において流通する検体の汚染レベルを調べることのできる感度（カットオフ値 1µg/kg 程度）を有する簡易分析法の確立に成功した。

F. 参考

- 1) World Health Organization. 2017. Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical Report Series, No. 1002:40-54.
- 2) European Food Safety Authority. 2018. Risk to human and animal health related to the presence of 4,15 - diacetoxyscirpenol in food and feed. EFSA Journal 16(8):5367.

- 3) Yoshinari et al. Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. Food Addit Contam Part A. 2019, 36(9):1404-1410.
- 4) European Food Safety Authority. 2014. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. EFSA Journal. 12(8):3802.
- 5) Yoshinari T., et al. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat flour and corn grits on the Japanese market, and their co-contamination with type B trichothecene mycotoxins. Food Addit Contam Part A. 2016, 33(10):1620-162.

本研究の成果概要



厚生労働省のカビ毒行政の施策の方針決定の根拠となるデータを提供した。