

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

国内流通食品に検出されるカビ毒に対する安全性確保の方策の確立に資する研究

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産生され、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る。これまで厚生労働科学研究において、平成 13 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。

本研究事業は、カビ毒に関して二つのテーマに取り組む。一つ目のテーマが基準値設定に係るカビ毒の分析法に関する研究で、オクラトキシン A (OTA) とデオキシニバレノール (DON) の同時分析法の開発を行った。小麦からの抽出液を多機能イムノアフィニティーカラムで精製し、LC-MS/MS で両カビ毒の定量を行う分析法を考案した。その分析法の妥当性を評価するために、国内の 8 分析機関による多機関共同試験を実施した結果、添加回収試験と自然汚染検体の分析結果のいずれも事前に設定したクライテリアを満たした。さらに、小麦、ライ麦及び大麦中の OTA 測定用の ELISA キットの性能評価を行った。4 種のキットについて、添加回収試験を行った結果、そのうち 2 種が小麦中の OTA スクリーニングに適応性の高いキットであることが確認された。

二つ目のテーマが新興カビ毒として国際的に注目を浴びているモニリフォルミン (MON) に関する研究である。まずは、食品中の MON の汚染実態調査を行うための分析法の開発を行った。5 倍量の 85%アセトニトリル水溶液による 3 回抽出を行い、陰イオン交換カートリッジで精製後に HPLC で定量する方法を採用し、その性能評価のために、麦類と米を用いて添加回収試験を行った結果、回収率は 83.7~105.2%の範囲内に収まり、良好であった。この分析法を用い、来年度以降汚染実態調査を実施する。続いて、マウスにおける毒性試験を実施した結果、単回投与試験においては高用量群で死亡例や腎臓の尿細管の壊死が、14 日間の反復投与試験においても再生尿細管がみられるといった腎臓への影響が認められた。これらの結果より、MON はマウスに対して急性の致死毒性と腎毒性を示すことが明らかとなった。さらに、産生菌の情報を応用した MON 汚染食品の探索を行うための第一段階として、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系を確立した。その系を用いて保存株の MON 産生性を調べた結果、日本の様々な地域で分離された *Fusarium* 属菌において MON 産生性が確認された。

## A. 研究目的

カビ毒は、カビが感染した農作物中に産生され、カビ毒に汚染された食品の摂取により急性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る。これまで厚生労働科学研究において、平成 13 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。

デオキシニバレノール (DON) は、主に穀類に検出されるカビ毒で、食品中の健康危害物質として国際的に認知されており、多くの国・地域で規制が行われている。我が国においては、令和 3 年 7 月に小麦 (玄麦) 中の DON に対して規格基準が設定された。オクラトキシン A (OTA) は、麦類、種実類、豆類を汚染するカビ毒で、発がん性や腎毒性を有することが知られている。平成 26 年の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において、基準値設定の議論がなされ、コーデックス委員会で基準が定められている小麦等について、当該規格に準じて基準値を検討することが了承されている。今後、OTA の基準値が設定された場合、輸入検査において DON に加え OTA の検査も実施する必要が生じ、現場の負担の増加が懸念されている。そこで本研究においては、小麦における DON と OTA の同時分析法の開発と多機関共同試験を実施し、妥当性の確認された DON と OTA の同時分析法を開発し、公定法の候補として提唱する。また、OTA の効率的な検査のためのスクリーニング法の検討を合わせて実施し、公定法として採用可能かを判断するデータを得る。

一方で、近年新興カビ毒と呼ばれる新たな概念が提唱されている。発見は数十年前であり、当時は健康危害物質として認知されていなかった

たものの、近年の分析法の発展によって食品を汚染していることが明らかになってきたカビ毒の総称である。モニリフォルミン (MON) は、新興カビ毒に分類される化合物で、平成 29 年に公表された欧州食品安全機関 (EFSA) の評価結果において、実験動物に対して致死毒性を示すこと、様々な穀類に検出されることが公表され、国際的な関心が高まっており、さらなる情報の収集が望まれている。そこで本研究においては、MON の日本人の健康に対するリスクはどの程度見込まれるかを判断し、将来的に規格基準を設定する必要があるかを議論する根拠となるデータを得るために、食品中の MON の分析法の開発、マウスにおける毒性評価、MON 汚染の原因となる因子の解明を行う。本研究が研究対象とするカビ毒の化学構造を図 1 に示した。

## B. 研究方法

(1) 基準値設定に係るカビ毒の分析法に関する研究

### ①DON と OTA の同時分析法の開発

小麦破砕物 25 g に抽出溶媒 (水、アセトニトリル及びメタノール混合比 2 : 1 : 1) 200 mL を加え、振盪抽出した。抽出物の一部 (約 40 mL) を 50 mL 容遠心チューブに移して遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) し、上清を抽出液とした。抽出液 10.0 mL を 50 mL 容のメスフラスコにとり、標線までリン酸緩衝液を加え良く混合した。ガラス繊維ろ紙でろ過後、ろ液 20.0 mL をイムノアフィニティーカラム (IAC) に注入した。カラムを精製水 3 mL で 6 回洗浄後、溶出液 (メタノール及び酢酸混合比 98:2) 3 mL でカビ毒を溶出した。溶出液を乾固後、HPLC 注入液 (水、アセトニトリル及び酢酸混合比 70:30:1) 1.0 mL にて再溶解後、質量分析器により DON と OTA を定量した。

国内の 8 分析機関において、小麦を用いた添

加回収試験用の2検体(DON 200 µg/kgとOTA 1 µg/kg及びDON 1,000µg/kgとOTA 5 µg/kg)と自然汚染小麦3検体を配布し、上述の分析法に従ってDONとOTAの定量を行った。得られた定量値から回収率、併行相対標準偏差(RSD<sub>r</sub>)及び室間再現性標準偏差(RSD<sub>R</sub>)を算出し、AOACが公表するガイドラインに記載されたクライテリアを満たすかどうかを評価した。

## ②OTAの簡易分析法の検討

OTA非汚染の小麦、ライ麦又は大麦の破砕物に、OTA標準品を終濃度2、5又は10 µg/kgとなるよう添加した検体を調製した。4種のOTA測定用のELISAキット(NEOGEN Corporation社製Veratox ochratoxin A, Romer Labs社製AgraQuant Ochratoxin ELISA test、Meizheng社製ToxinFast Grains and Feed Mycotoxin Ochratoxin A ELISA Test Kit及びr-Biopharm社製RIDA screen Ochratoxin A)について、それぞれのキットのプロトコールに従い、添加検体からのOTAの抽出及び検出を行い、回収率を算出し、キットの性能評価を行った。

## (2) 新興カビ毒MONに関する研究

### ①穀類を対象とした分析法の開発

穀類破砕物5gに対し、抽出溶媒(アセトニトリル及び水混合比85:15)25 mLによる抽出を3回行った。抽出液22.5 mLを窒素気流により乾固後、メタノールに懸濁し、平衡化した陰イオン交換カートリッジに負荷した。カートリッジを洗浄後、イオンペア剤を用いてMONを溶出した。イオンペア剤を添加した移動相を用いたHPLC法により、溶出液中のMONを定量した。MON非汚染の小麦、ライ麦、ハト麦、玄米及びコーンに、終濃度50、300又は2,000 µg/kgとなるようMONを添加した検体を用いた添加回収試験により、分析法の性能を評価した。

### ②マウスを用いた毒性評価

ICRマウスを用いた単回投与試験については、MONを20、40及び80 mg/kg体重の用量で、各群5匹のマウスに経口投与を行い、急性な毒性を観察した。14日間反復投与試験については、急性毒性試験の結果を参考にして、MONを0、20及び40 mg/kg体重の用量で各群3匹のマウスに経口投与を行った。投与期間中は、一般状態、体重、摂餌量の測定を行い、投与期間終了後には、血液検査、器官重量の測定、病理組織学的検査(肝臓、脾臓、腎臓、肺、副腎、胸腺、心臓、胃、腸管、精巣、脳、骨髄)を実施した。

### ③産生菌の情報を応用したMON汚染食品の探索

Potato dextrose broth (PDB培地: Sigma-Aldrich)、Sucrose salt asparagine液体培地(SSA培地)およびCzapek-dox液体培地(CZ培地:Difco)の3種類の液体培地で、MON産生性の比較検討を行った。MON産生性を有する可能性のある菌株をPDA斜面培地に接種し、25°C・暗条件で1週間前培養を行った。それぞれの液体培地を200 mL三角フラスコに100 mLずつ分注し、そこに前培養した*Fusarium*菌株を接種し、25°C・暗条件で最長で28日間静置培養した。7日間ごとに培養液を150 µL回収してMON産生量を測定し、経時的に産生量を観察した。分取した培養液をメタノール1 mLと混合し、25°C・3,000 rpmで5分間遠心分離した。その後、平衡化したAgilent SAXカラムに通液し、カラム内を洗浄して、吸着させたMONを1.5 mLのイオンペア剤で溶出し、HPLCで分析した。

最もMON産生量の高かった培地を用い、*Fusarium*属保存株計28菌株を接種して培養し、25°C・暗条件で28日間静置培養した。その後培養液中のMONを定量分析し、各菌株のMON産生性として評価した。

## C. 研究結果

(1) 基準値設定に係るカビ毒の分析法に関する研究

### ①DON と OTA の同時分析法の開発

DON と OTA を同時に精製可能な市販の固相カラムと IAC を入手し、DON と OTA の標準品を添加した小麦検体を用いた添加回収試験を行い、性能評価を行った。その結果、Perkin Elmer 社製の MaxSignal 4in1+のみで良好な結果が得られたことから、今回開発する同時分析法における精製カラムとして採用した。さらに、回収率を向上させるため、抽出溶媒の検討を行い、メタノール:アセトニトリル:水(混合比 1:1:2)の混液が、DON と OTA の抽出に最適であることを見出した。開発した分析法の妥当性を評価するために、国内の 8 分析機関の協力を得て、多機関共同試験による妥当性の評価を行った。その結果、添加回収試験においては、DON の回収率は 97.0~98.3%の範囲内、OTA の回収率は 83.8~90.3%の範囲内であった。また、DON 濃度 209.9、435.6 及び 1540.3 µg/kg、OTA 濃度 2.5、7.4 及び 15.0 µg/kg のそれぞれ 3 濃度の自然汚染小麦を用いた試験においては、室間再現性標準偏差は 12.2~31.0%の範囲内であった。

### ②オクラトキシン A の簡易分析法の検討

3 濃度 (2、5、10 µg/kg) の OTA を添加した検体を用いてそれぞれのキットの回収率を調べた結果、r-Biopharm 社製キットで最も良好な結果が得られ、小麦、ライ麦及び大麦とも 3 種の添加濃度における回収率は、88-127%の範囲内であった。次に良好な結果が得られたのが Meizheng 社製キットで、大麦における回収率はやや高めであったが、小麦とライ麦では 3 種の添加濃度における回収率は、94-150%の範囲内であった。小麦における回収率は、Neogen 社製キットで 35-69%、Meizheng 社製キットでは

126-150%、r-Biopharm 社製キットで 87-127%の範囲内であった。Romer Labs 社製キットでは、妨害物質のためか発色ができなかった。

### (2) 新興カビ毒 MON に関する研究

#### ①穀類を対象とした分析法の開発

開発した分析法の性能を評価するために、麦類と米を用いて添加回収試験を行った。その結果、MON を 50 又は 300 µg/kg 添加した小麦における回収率の平均値は、それぞれ 104.2 又は 105.2%であった。ライ麦、ハト麦、玄米及び玄米を用いた添加回収試験においても同様の回収率が得られた。

#### ②マウスを用いた毒性試験

単回投与試験においては、投与後 1~2 時間に 80 mg/kg 投与群の 1 例で死亡、3 例で瀕死状態が認められ、概略の LD<sub>50</sub> 値は 68.1 mg/kg であった。病理組織学的検査の結果、40 mg/kg 投与群の 3 例及び 80 mg/kg 投与群の 2 例で皮質深部を中心とした近位尿細管の壊死、80 mg/kg 投与群の 3 例でうっ血といった被験物質の投与に起因すると考えられる変化が腎臓に認められた。

14 日間反復投与試験においては、腎臓に被験物質の投与に起因すると考えられる変化が認められ、20 mg/kg 投与群の 1 例及び 40 mg/kg 投与群の全例で皮質深部を中心に再生尿細管が認められた。

#### ③産生菌の情報を応用した MON 汚染食品の探索

CZ 培地と PDB 培地では、いずれも SSA 培地での培養像と比較して菌体の生育性は著しく低く、培養液中の MON は非検出であった。SSA 培地で培養した *F. subglutinans* IFM50097 では培養 7 日目で 1.8 mg/kg、14 日目で 8.1 mg/kg、21 日目で 18.1 mg/kg、28 日目で 26 mg/kg の MON 産生が認められた。*F. proliferatum* IFM50127 では培養 7 日目で 1.7 mg/kg、培養 14 日目で 5.2 mg/kg、培養 21 日目で 10.9 mg/kg、

培養 28 日目で 16.7 mg/kg の MON の産生が認められた。

保存していた *Fusarium* 属菌 28 株を SSA 培地で 3 週間または 6 週間培養し、培養液中の MON 産生量を調べた。今回供試した 28 株中では、6 週間の培養期間終了後までに、沖縄県サトウキビ畑土壌由来の *F. proliferatum* IFM50127、北海道小麦畑土壌由来の *F. tricinctum* IFM50055 および沖縄県土壌由来の *F. suglutinans* TSY0645 の 3 株が MON 産生性を有した。これら 4 株以外の菌種ではいずれも MON の産生は認められなかった。

#### D. 考察

(1) 基準値設定に係るカビ毒の分析法に関する研究

小麦中の DON と OTA の同時分析法の開発について、多機関共同試験の結果で得られたパラメーターは、全て AOAC が公表するクライテリアを満たしていたことから、妥当性が示された。ただ、今回開発したイムノアフィニティーカラムを用いた精製法は、カラムの価格が高いことや操作が煩雑といった欠点がある。次年度は、安価で精製操作が容易な多機能カラムを使用した分析法を開発し、妥当性を検証することとする。

OTA を対象にして、現時点において日本で入手可能な市販 ELISA キット 4 種を用いて、その適応性を検討した。そのために、OTA 非汚染大麦、小麦、ライ麦を用いた添加回収試験を行い、回収率を評価した Cut off 値を 2 µg/kg と想定し、各製品の結果を評価すると、2 種のキットはスクリーニングに適さないと考えられた。1 種のキットでは、大麦における回収率は高い値であったが、小麦、ライ麦では許容範囲であった。もう 1 種のキットでは、3 種の麦類いずれにおいても回収率は 85%以上であり、想定 cut off 値で安定した測定が可能と考えられた。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

穀類中の MON の分析法について検討を行った。これまでの報告では、抽出には水又はアセトニトリル水溶液、精製には陰イオン交換カートリッジや多機能カラムを用いた方法が主に用いられている。定量は、HPLC 又は質量分析器が用いられるが、移動相にイオンペア剤やランタン、分離カラムに HILIC カラムを用いることにより、MON の保持を高める工夫が成されている。これらの報告を参考にし、分析法の検討を行った結果、抽出には 85%アセトニトリル水溶液を用いることとした。水による抽出では、水溶性の成分が多く抽出され、MON の精製が困難となった。また、抽出を 3 回行うことで、回収率が大きく向上した。精製には陰イオン交換カートリッジを用い、HPLC にはイオンペア剤を加えて、C18 カラムを分離に用いた。HILIC カラムでは、ピーク形状が悪く、再現性のある保持時間が得られなかった。添加回収試験による性能評価により、良好な結果が得られたことから、来年度以降はこの分析法を用いて汚染実態調査を実施する。

毒性試験については、単回投与試験の結果で求められた LD<sub>50</sub> 値は 68.1 mg/kg であり、過去に 0、10、20、40 及び 80 mg/kg の投与量で実施されたマウスを用いた MON の単回経口投与毒性試験における LD<sub>50</sub> 値 47.6 mg/kg と概ね一致した結果が得られた。引き続いて実施された 14 日間反復投与試験では、単回投与試験の結果を基に 40 mg/kg を最高用量として設定して、動物試験を実施した。MON 投与の影響と考えられる変化として、単回投与試験では腎臓の皮質深部を中心とした近位尿細管の急性尿細管壊死が認められ、これに対する反応性変化として、14 日間反復投与試験では再生尿細管が認められたものと考えられた。マウスにおける MON の毒性標的臓器は、腎臓である可能性が示唆さ

れたが、単回投与毒性試験で認められた急性尿細管壊死が MON 投与後の全身性ショック時の有効循環血量の低下に起因する虚血性の皮質壊死に相当するのか、あるいは、MON の腎尿細管における代謝の際生じる活性中間代謝産物等の毒性に起因するかどうかについては、今後検討をする必要がある。

産生菌の情報を応用した新興カビ毒汚染食品の探索については、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功した。さらに、この系を使用して、鹿児島県および沖縄県に分布する *F. subglutinans* や *F. proliferatum* および北海道に分布する *F. tricinctum* で MON の産生性が確認されたことから、産生株は国内では北海道から沖縄までの広い気候帯に分布し、少なくとも鹿児島県や沖縄県産サトウキビおよび北海道産小麦は MON による汚染のリスクがあることが確認された。

## E. 結論

(1) 基準値設定に係るカビ毒の分析法に関する研究

小麦からの抽出液を多機能イムノアフィニティークラムで精製し、LC-MS/MS で定量を行う DON と OTA の同時分析法を開発した。その分析法の妥当性を評価するために、国内の 8 分析機関による多機関共同試験を実施した。その結果、添加回収試験と自然汚染検体の分析結果のいずれも事前に設定したクライテリアを満たした。以上より、開発した分析法は、小麦中の DON と OTA の同時分析に使用可能であることが示された。

4 種類の市販 ELISA キットを用いて、大麦、小麦、ライ麦を用いた添加回収試験を行い、その適応性を検討した。その結果、2 種類のキットについて、小麦への適応性が示された。今後は、自然汚染麦類を用いて LC-MS/MS による分

析値との相関性を明らかにして、スクリーニングテストに取り入れることが可能かを明らかにしていく必要がある。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

穀類中の MON の分析法を開発した。単一試験室による添加回収試験で性能を評価した結果、いずれの食品種における回収率も事前に設定したクライテリアを満たした。この結果より、開発した分析法は MON の汚染実態調査に用いることが可能と考えられた。

マウスにおける毒性試験を実施した結果、単回投与試験においては高用量群で死亡例や腎臓の尿細管の壊死が、14 日間の反復投与試験においても再生尿細管がみられるといった腎臓への影響が認められた。これらの結果より、MON はマウスに対して急性の致死毒性と腎毒性を示すことが明らかとなった。

食品における MON 汚染の原因を解明するための第一段階として、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系を確立した。今後、この系を用いた調査を継続することによって、日本国内で流通する食品における MON 産生菌の分布実態に関する情報を蓄積し、食品に MON 汚染をもたらす因子を解明する。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究業績

### 【論文発表】

1. Yoshinari T, Watanabe M, Hara-Kudo Y. Cross-genus inhibitory activity of polyoxins against aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and fumonisin production by *Fusarium fujikuroi*. FEMS Microbiol Lett. 2022;369(1):fnac048.

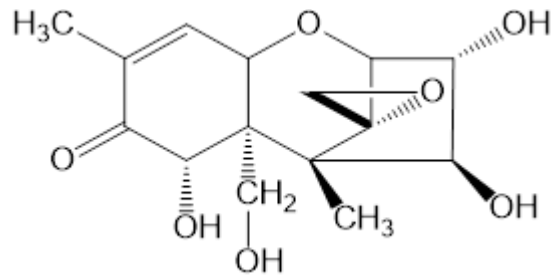
2. Uchiyama Y, Yamazaki D, Kobayashi N, Kanda Y, Sugita-Konishi Y. Electrophysiological effect of citreoviridin on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2022;63:210-217.

#### 【学会発表】

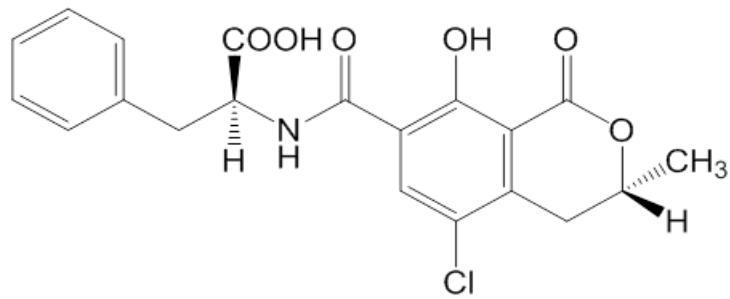
1. 日本毒性学会第 49 回学術年会、開催日：2022 年 6 月 30 日-7 月 2 日、開催場所:札幌、概要：マウスを用いたエンニアチン B の薬物動態試験及び 28 日間反復経口投与毒性試験という演題名で、エンニアチンの血中動態と毒性の関連性について、研究分担者渋谷淳を中心に発表を行った。
2. Asian Mycological Congress 2021、開催日：2022 年 8 月 3-5 日、開催場所、タイ（ハイブリッド）、概要：Development of an analytical method for emerging mycotoxin produced by *Fusarium* spp. isolated from rye という演題名で、新興カビ毒の分析法について、研究代表者吉成知也を中心に発表を行った。
3. International Symposium of Mycotoxicology 2022、開催日：2022 年 9 月 6-9 日、開催場所、タイ（オンライン）、概要：Occurrence of emerging mycotoxins in retail foods in Japan という演題名で、新興カビ毒の日本に流通する食品における汚染実態について、研究代表者吉成知也が発表を行った。
4. International Symposium of Mycotoxicology 2022、開催日：2022 年 9 月 6-9 日、開催場所、タイ（オンライン）、概要：Occurrence of mycotoxins and distribution of trichothecene-producing *Fusarium* spp. In Job's tears products in Japanese retail foods という演題名で、は

と麦におけるカビとカビ毒の汚染実態について、研究分担者渡辺麻衣子が発表を行った。

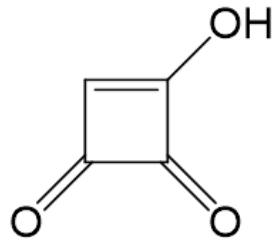
5. 日本防菌防黴学会第 49 回年次大会、開催日：2022 年 9 月 26-27 日、開催場所:東京、概要：形態観察と遺伝子指標両方を用いた同定の実際という演題名で、カビの同定法について、研究分担者渡辺麻衣子が発表を行った。
6. 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会、2022 年 11 月 10-11 日、開催場所：長崎、概要：環状デプシペプチド系カビ毒の分析法の開発と汚染実態調査という題名で、厚生労働科学研究で行ったエンニアチン類の研究について、研究代表者吉成知也が発表を行った。
7. 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会、2022 年 11 月 10-11 日、開催場所：長崎、概要：黒麹菌とその近縁菌のカビ毒産生性及び遺伝子型別に関する研究という演題名で、発酵食品に分布するカビ毒産生菌の分類及びカビ毒産生性について、研究分担者渡辺麻衣子が中心となり発表を行った。
8. 日本マイコトキシン学会第 88 回学術講演会、2023 年 1 月 6 日、開催場所：つくば、概要：タイプ A トリコテセン系カビ毒イソベルカロールの食品における汚染実態と生合成機構の解析という演題名で、新興カビ毒の汚染実態について、研究代表者吉成知也が中心となり発表を行った。



デオキシニバレノール



オクラトキシン A



モニリフォルミン

図 1 本研究が対象とするカビ毒の化学構造