

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。一つ目のテーマは、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 10 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、自然汚染検体及び人工汚染検体の分析結果のいずれにおいて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 測定用のラテラルフローキットの性能評価を行った。6 種のキットについて、添加回収試験を行った結果、3 種において OTA を測定できる可能性が示された。

二つ目のテーマは、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。昨年度開発した穀類中の MON の分析法について、単一試験室における妥当性評価を実施した。その結果、6 種の穀類において回収率の平均値は 86~105%、併行精度は 0.52~5.9%、室内精度は 2.1~9.3%の範囲内であった。これらのパラメーターは、クライテリアを満たしたことから、汚染調査に用いる性能を有することが確認された。続いて、MON 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。40 mg/kg 群の腎臓皮質における再生尿細管と肝臓における肝細胞肥大が認められたことより、MON は腎臓を毒性標的とする可能性が考えられた。10 mg/kg 群に MON の影響と考えられる変化は認められず、無毒性量は 10 mg/kg と判断された。さらに、国内に流通する穀物の MON 汚染原因菌を調べた結果、小麦から *F. avenaceum* とその近縁種、ライ麦から *F. oxysporum*、トウモロコシから *F. fujikuroi* とその近縁種が MON 産生菌として検出された。これらの結果から、日本国内で流通する穀物の MON 汚染原因菌の菌種は穀物種毎に傾向があることが明らかとなった。

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。令和 5 年 12 月の薬事・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と大麦について、当該規格に準じて基準値を設定することが了承された。今後、OTA の基準値が設定された場合、輸入検疫において 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 10.0 g に抽出溶媒 (アセトニトリル : 水 (5 : 1) にギ酸を終濃度 0.1% で添加したもの) を 50 mL を加え、振盪機を用いて 200 回/分で 30 分間往復振盪抽出した。多機能カラム (PuriTox Total Myco-MS) に抽出液 1.4 mL を加え、溶出液を回収した。溶出液 500 μ L に精製水 500 μ L を加えて良く混ぜた後、質量分析器により DON と OTA を定量した。

国内の 10 分析機関において、小麦を用いた添加回収試験用の 3 検体と汚染小麦 2 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_r) 及び室間再現性標準偏差 (RSD_R) 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

6社6種類(A~Fキット)のラテラルフローキットを購入した。OTA非汚染麦類にOTA標準品を終濃度3 µg/kg、5 µg/kg、10 µg/kgとなるよう添加した試料を各キットで測定し、回収率を算出した。

(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 5 g 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。妥当性評価については、小麦、大麦、ライ麦、はと麦、コーン及び玄米に MON 標準品を添加したものを各濃度 2 試料調製し、計 5 日間分析を行い、得られた分析値から回収率、併行精度 (RSD_F) 及び室内精度 (RSD_R) を算出した。

②マウスを用いた毒性評価

MON を注射用水で調製した被験液を 0、10、20、40 mg/kg 体重の投与量でそれぞれ 6 週齢 ICR [CrI:CD1 (ICR)] マウス (雄 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・摂水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。死亡例については発見後速やかに剖検を実施したが、採血及び臓器重量の測定は行わなかった。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産生菌の情報を応用した MON 汚染食品の探索

MON 汚染穀物を DRBC 培地に接種し、MON を産生する可能性のある *Fusarium* 属菌を分離・同定した。分離株を液体培地で培養し、産生された MON を定量分析した。穀物の種類ごとに、MON の汚染量と分離された *Fusarium* 属菌の MON 産生性を比較解析した。

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

共同試験に参加した 10 機関のうち、9 機関の結果を解析に採用した。3 種の濃度の添加試料における DON の回収率は、88~89%であった。汚染試料 No.1 と No.2 の平均濃度はそれぞれ 203 及び 736 µg/kg であった。3 種の添加試料と 2 種の汚染試料における RSD_F は 1.0~5.0%、RSD_R は 13~15%、HorRat は 0.7~0.9 の範囲内であった。3 種の濃度の添加試料における OTA の回収率は、91~96%であった。汚染試料 No.1 と No.2 の平均濃度はそれぞれ 9.8 及び 20 µg/kg であった。3 種の添加試料と 2 種の汚染試料における RSD_F は 2.6~7.3%、RSD_R は 4.3~15%、HorRat は 0.2~0.7 の範囲内であった。

②OTAの簡易分析法の検討

小麦を用いた添加回収試験の結果においては、A キットの回収率は 3、5、10 µg/kg 添加試料で 100% 以上であった。B キットの回収率は、10 µg/kg 添加試料で 73% であったが、それ以外の濃度では 50% 以下であった。D キットでは、3 µg/kg 添加試料は陰性となったが、5、10 µg/kg 添加試料では 70% 以上の回収率であった。E キットは 3、5、10 µg/kg 添加試料全てで 100% に近い良好な回収率であった。F キットでは低濃度では回収率は高くなり、高濃度では低くなる傾向が見ら

れたが、全ての濃度で70%以上であった。

定性的ラテラルフローキットであるCキットでは、3 µg/kgでは陰性、5、10 µg/kgで陽性となった。

(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、300及び2,000 µg/kg添加した小麦における回収率の平均値は、それぞれ94、101及び99%であった。大麦、ライ麦、ハト麦、コーン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

一般状態について、投与2日目に高用量群の3例に自発運動の減少がみられ、うち2動物は同日に、1動物は投与3日目に死亡した。また、投与3日目に高用量群の1例に自発運動の減少がみられた。病理組織学検査の結果、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た。40 mg/kg投与群で皮質深部を中心に再生尿細管が認められ、その発生率と重症度が有意な増加を示した。また、40 mg/kg投与群の1例で皮質深部に近位尿細管の壊死が認められた。40 mg/kg投与群では肝臓に小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、severityが有意な増加を示した。死亡例では、右心房及び右心室における内腔の拡張と壁の菲薄化、腎臓皮質全域における尿細管壊死が確認された。

③ 産生菌の情報を応用した MON 汚染食品の探索

計169株14菌種がMON汚染穀類より分離された。そのうち、MON産生性を示した菌株は83株であった。それらの種は、*F. fujikuroi*、*F. annulatum*、*F. temperatum*、*F. subglutinans*、*F. andiyazi*、*F. oxysporum*、*F. nisikadoi*、*F. avenaceum*及び*Fusarium* sp.1の9種であっ

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

DONとOTAの同時分析法の開発については、9機関の測定値から得られたDONとOTAの回収率、RSD_F及びRSD_Rは、5種類の試料いずれにおいても事前に設定したクライテリアを満たしたことから、多機能カラムを用いたDONとOTAの同時分析法の妥当性が確認された。

OTAの簡易分析法については、現時点で入手可能な市販ラテラルフローキット6種の性能評価を行った結果、3種のキットについて、OTAの測定に使用できる可能性が示された。一方、OTAの基準値5 µg/kgを踏まえると、カットオフ値は2 µg/kg~2.5 µg/kg程度が適当である。検討したキットのうち、この範囲にカットオフ値を設定したスクリーニングが可能と考えられるものは2種類、さらに良好な回収率が得られたものはそのうち1種類であった。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

分析法の開発については、実施した単一試験室によるMONの分析法の妥当性評価の結果は、いずれも事前に設定したクライテリアを満たした。よって、開発した分析法は、6種の穀類中のMONの汚染実態調査に用いることが可能な性能を有すると考えられた。

毒性試験については、最高用量40 mg/kg、公比2で3段階の用量の投与群構成とした28日間反復投与毒性試験を実施した。MON投与の影響と考えられる変化として、20 mg/kg群以上で腎臓絶対重量が高値を示し、40 mg/kg群で腎臓皮質に再生尿細管が認められた。昨年度に実施したMONの単回投与試験では腎臓皮質に急性尿細管壊死が認められており、本試験における再生尿細管はこれに対する反応性変化と考え

られた。以上より、マウスにおいて MON は腎臓を毒性標的とする可能性が示唆された。

MON 汚染原因菌の探索によって、MON に高濃度汚染された穀物がどのような *Fusarium* 属菌に感染しているか、その実態が明らかとなった。これら穀物の MON 汚染原因菌の情報を元に、国内に流通する穀物における *Fusarium* 属菌の汚染状況を把握することで、MON 汚染のリスク評価に関する知見を蓄積することができた。

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カラムで精製し、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 10 分析機関による試験室間共同試験を実施した。その結果、添加回収試験と汚染試料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。

6 種類の市販ラテラルフローキットを用いて、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。カットオフ値が設定可能で、小麦及び大麦に使用でき、かつ回収率が 70%以上のものは 1 種類のみであった。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

MON の分析法については、単一試験室による妥当性評価を実施した結果、汚染実態調査に用いることが出来る性能を有することが確認された。

マウスにおける毒性試験を実施した結果、MON は腎臓を毒性標的とする可能性が示唆された。20 mg/kg 群においては腎臓に統計学的に有意な発生率と重症度を示す病理組織学変化は

認められなかったが、絶対重量の高値が認められており、本試験の条件下における無毒性量は 10 mg/kg と判断された。

日本国内で流通する穀物の MON 汚染原因菌の探索を行った結果、MON 汚染をもたらす菌種は穀物種毎に傾向があり、小麦及び大麦では *F. avenaceum*、ライ麦では *F. oxysporum*、トウモロコシは *F. fujikuroi* とその近縁種及び *F. nisikadoii* であることを明らかにした。また *Fusarium* 属における幅広い菌種が MON 産生性を持つとされる従来からの知見とは異なり、MON は特定の系統が産生する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

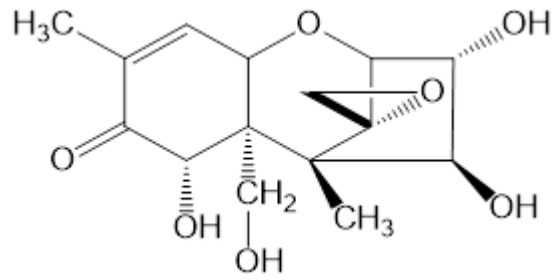
G. 研究業績

【論文発表】

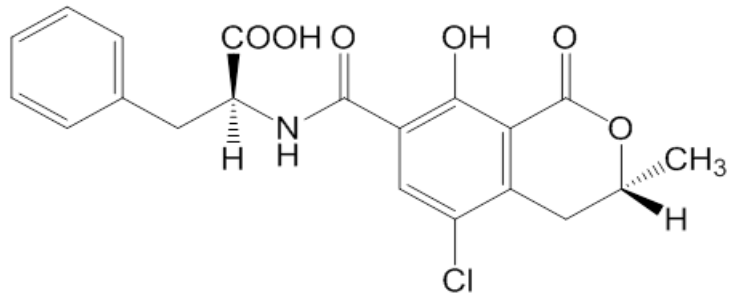
1. Yoshinari T, Sugita-Konishi Y, Sato E, Takeuchi H, Taniguchi M, Fukumitsu T, Shimoyama A, Nakamura A, Murayama S, Owaki S, Miyake S, Hara-Kudo Y.: Survey and risk assessment of aflatoxins and sterigmatocystin in Japanese staple food items and the evaluation of an in-house ELISA technique for rapid screening. Food Control 2024;157:110154.
2. Ojiro R, Okano H, Ozawa S, Yamagata H, Zou X, Tang Q, Jin M, Sasaki K, Yoshida T, Yoshinari, T, Shibutani M.: Pharmacokinetics and 28-day repeated-dose toxicity of enniatin B after oral administration in mice. Food Chem. Toxicol. 2023;177:113814.

【学会発表】

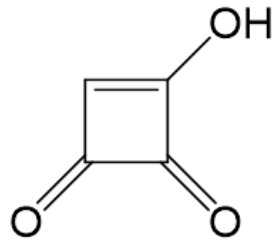
1. 日本マイコトキシン学会第 89 回学術講演会、開催日：2023 年 8 月 18 日、開催場所：金沢大学、概要：小麦中のデオキシニバレノールとオクラトキシン A の一斉分析法の開発について、研究代表者吉成知也が口頭発表を行った。
2. 第 119 回日本食品衛生学会学術講演会、開催日：2023 年 10 月 12～13 日、開催場所：タワーホール船堀、概要：新興カビ毒モニリフォルミン汚染穀物中の原因菌探索について、研究協力者青木渉が口頭発表を行った。
3. 第 119 回日本食品衛生学会学術講演会、開催日：2023 年 10 月 12～13 日、開催場所：タワーホール船堀、概要：食品中の新興カビ毒モニリフォルミンの分析法の開発について、研究代表者吉成知也が口頭発表を行った。
4. 日本マイコトキシン学会第 90 回学術講演会、開催日：2024 年 1 月 10 日、開催場所：東京農業大学、概要：*Fusarium* 属におけるカビ毒モニリフォルミン産生能評価法の検討について、研究協力者青木渉が口頭発表を行った。
5. 日本農芸化学会 2024 年度東京大会、開催日：2024 年 3 月 24～27 日、開催場所：東京農業大学、概要：*Fusarium* 属真菌によるタイプ A トリコテセン系カビ毒の産生に対する抗真菌剤の影響について、研究代表者吉成知也が口頭発表を行った。
6. 日本薬学会第 144 年会、開催日：2024 年 3 月 28～31 日、開催場所：パシフィコ横浜、概要：マイコトキシンの規制と試験法について、研究代表者吉成知也が口頭発表を行った。



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