

課題 2. 微生物・マイコトキシンの汚染実態調査
およびリスク評価

研究分担者 渡辺 麻衣子

令和 5 年度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）

「昆虫食」における大規模生産等産業化に伴う安全性確保のための研究

分担研究報告書

微生物・マイコトキシンの汚染実態調査およびリスク評価

研究分担者 渡辺 麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨

国内流通昆虫食の微生物分布およびマイコトキシン汚染の実態を調査するため、今年度はこれらの検出法である培養法、分子生物学的手法、質量分析法などについての性能評価等予備検討を実施した。国内に流通するコオロギ、カイコ、ミルワーム等の昆虫食 12 製品を対象として、培養法による細菌・真菌の網羅的検出を行い、昆虫食での分布程度が高い細菌および真菌種を明らかにして試験法の絞り込みを行った。またそのうち 8 製品については、マイコトキシンの添加回収実験を行っての 7 種マイコトキシンの一斉分析法の性能評価、および寄生虫 DNA の添加回収実験を行ってのリアルタイム PCR 法の性能評価を行った。その結果、真菌では *Aspergillus* 属菌等が検出されたが、健康影響が比較的強いとされるマイコトキシンの産生菌種ではなかった。細菌では、最大で 1.2×10^8 cfu/g であった一方で非検出の製品も複数あり製品毎に生菌数に大きな差があること、今回の調査では複数製品から食中毒と関連のある大腸菌群、*Bacillus* 属菌および *Staphylococcus* 属菌が検出された。また真菌よりも細菌の生菌数が高い傾向にあることが示された。今回の調査では昆虫食製品からは動物の腸内や土壌等環境に広く存在する細菌群が多く分布したことが示され、昆虫食の喫食による食中毒を防ぐためには、他の食品同様に、養殖や加工、保存、調理等の各工程の衛生管理の重要性が示唆された。マイコトキシン分析法については、7 種マイコトキシン一斉分析法は、一斉に検出可能である利点を活かし食用昆虫におけるマイコトキシンのスクリーニングには利用できると考えられた。寄生虫のリアルタイム検出法については、供試した全ての昆虫食製品から、低濃度のクリプトスポリジウムまたはジアルジア DNA を昆虫食から検出できることを示した。次年度は今年度の研究成果から示された適した試験法を用いて、昆虫食製品から微生物およびマイコトキシンの汚染実態調査を実施する予定である。

研究協力者

大西 貴弘	国立医薬品食品衛生研究所
吉成 知也	国立医薬品食品衛生研究所
工藤 由起子	国立医薬品食品衛生研究所
清水 公德	東京理科大学
廣田 珠実	東京理科大学

A. 研究目的

近年、人口増加による食糧難や家畜の環境負荷を解決するため、栄養が豊富であり、養殖の際の環境負荷が小さい昆虫食が注目されている。国連が昆虫食を推奨し、また EU では既にコオロギ等が食品として認定され、世界的に昆虫食の流通

量は増加している。昆虫の養殖は真菌・細菌の増殖に適した温度・湿度で行われるため、昆虫食製品にこれらの微生物が混入・増殖する可能性は十分にある。また養殖環境における水や土壌から、ヒトに健康被害を及ぼす寄生虫が昆虫を汚染する可能性も想定する必要がある。これらの微生物が食用昆虫を汚染し、食中毒が起こるリスクがある。その一方で、昆虫食の微生物衛生学的安全性に関わるデータは不足しており、特に日本国内に流通する昆虫食製品を対象とした調査報告は非常に少ない。

昆虫食を含む食品上でマイコトキシン産生菌が増殖した場合に、食品はマイコトキシンの汚染される可能性がある。日本における食品中のマイコトキシンの規制については、リンゴジュース中のパツリン、小麦玄麦中のデオキシニバレノール (DON)、全食品中の総アフラトキシン (アフラトキシン B₁: AFB₁、アフラトキシン B₂: AFB₂、アフラトキシン G₁: AFG₁、アフラトキシン G₂: AFG₂) および乳中のアフラトキシン M₁ に対して規制値又は基準値が設定されている。また、2023 年 12 月に実施された薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において、オクラトキシン A (OTA) の規制に関する議論がなされ、小麦と大麦について基準値を設定することが了承された。昆虫食でも、これら 7 種のマイコトキシンの汚染実態調査を把握する意義は大きい。

昆虫食を汚染しうる寄生虫については、過去に汚染実態を報告するデータは無いことから、対象候補として、土壌や水を汚染することが知られる寄生虫から、クリプトスポリジウム、赤痢アメーバ、ジアルジア、サイクロスポーラ、トキソプラズマ、エキノコックスといった原虫類を想定した。これらの簡便な培養法は存在しないため、検出には遺伝子検査法を使用する必要がある。

そこで本研究では、国内流通昆虫食の微生物分布およびマイコトキシン汚染の実態を調査するために、今年度はこれらの検出法である培養法、

分子生物学的手法、質量分析法などについての性能評価等予備検討を実施した。

B. 研究方法

(1) 供試検体

国内に流通する昆虫食を対象とした。チャイロコメノゴミムシダマシ 2 製品、フタホシコロギ 1 製品、カイコ 3 製品、モンクロシヤチホコ 1 製品、ヨーロッパイエコロギ 2 製品、ツヤケシオオゴミムシダマシ 1 製品、コガタズメバチ 1 製品、ツムギアリ 1 製品の合計 12 製品を通販サイトにて購入した。供試した昆虫食一覧を表 1 に示した。

(2) 微生物培養法

来年度以降に昆虫食における真菌・細菌汚染実態調査の対象菌を決定するために、今年度は網羅的に分布する菌種を把握する目的で、培養法による網羅的菌検出を行った。

①汚染微生物の分離

各食用昆虫検体 25 g を 225 ml の PBS ×1 と混合し、ストマッカーを用いて 60 秒間懸濁した。これを試験原液とした。試験原液は PBS ×1 を用いて 10 倍段階希釈した後、初期検討として 12 製品中 5 種類の検体については、真菌網羅的分離の目的で dichloran rose-bengal chloramphenicol (DRBC) 培地および dichloran glycerol (DG-18) 培地、細菌網羅的分離の目的で plate count agar (PCA) 培地、pepton glucose-yeast extract agar (PGY) 培地¹⁾、violet red bile glucose agar (VRBG) 培地およびチオグリコレート寒天培地、計 6 種類の平板培地 1 枚ずつに 100 μL 塗抹した。のこりの 7 検体では初期検討結果を参照し、VRBG 培地およびチオグリコレート寒天培地を除いた 4 種類の平板培地 1 枚ずつに 100 μL 塗抹した。DRBC 培地および DG-18 培地は 25°C で 7 日間の好気培養を行った。

PGY 培地は 25℃で 5 日間の好気培養を行った。PCA 培地および VRBG 培地は 37℃で 2 日間の好気培養を行った。チオグリコレート寒天培地は 37℃でアネロパック(三菱ガス化学株式会社)を用いて、添付の実験マニュアルに従い、2 日間の嫌気培養を行った。培養後、生菌数の計測を行った。生育したコロニー数を計測し、平板 1 枚あたりのコロニー形成単位 colony forming unit (cfu) を求めた。さらに培地に接種した希釈液の濃度から、昆虫食 1 g あたりの cfu を算出し、cfu/g の単位を用いて表わした。計測後、各培地上に形成されたコロニーについて、目視で認識できるレベルのコロニーの形態的特徴を指標として分類後、16 株を上限として各グループから網羅的に分離し、同定に供した。

②分離株の分類・同定

真菌は形態学的指標を同定に導入した。分離株コロニーを目視および実体顕微鏡にて観察し、図譜²⁾と比較して同定した。

分子生物学的指標による同定方法については、液体培養した菌体から、真菌では DNeasy mini kit (株式会社 Qiagen) を用いて、細菌では DNA 抽出にはシカジーニウス DNA 抽出試薬 ST (関東化学株式会社) を用いて、DNA を抽出した。これらをテンプレートとして、真菌では rDNA の 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S の部分塩基配列の PCR³⁾、細菌では 16s rDNA の部分塩基配列の PCR^{4,5)}を行い、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo fisher Scientific Ltd.) およびキャピラリーシーケンサー 3730 xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific Ltd.) を用いて塩基配列のシーケンスを行った。配列決定後、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースに登録された配列との相同性検索を行い、相同率を参照した。真菌では、検出菌がマイコトキシン産生菌であるか否かを検討するためより詳細に同定する必要がある。上述の相同性検索の結果分

離株が *Aspergillus* または *Penicillium* 属であった場合には β -tub 部分塩基配列を、*Fusarium* 属であった場合には EF1- α 部分塩基配列を決定し、NCBI のデータベースに登録された配列との相同性検索を行い、相同率を参照した。

(3) 質量分析法によるマイコトキシン検出法

マイコトキシンの質量分析法では、粉碎した各検体にアフラトキシン類 4 種、DON、OTA およびゼアラレノン (ZEN) の 7 種のマイコトキシンを一定量添加後、イムノアフィニティーカラムによる精製法と LC-MS/MS による検出法を組み合わせた 7 種のマイコトキシンの一斉分析法について、添加回収試験により性能評価を行った。

①検出法

破碎した検体 10 g にアセトニトリル、メタノールと水 (1 : 1 : 2) の混合液 50 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。一部を 50 mL 容のプラスチックチューブに移し、1,710 g で 10 分間遠心分離した。上清 5 mL に PBS 35 mL を加えて混合後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液 20 mL をイムノアフィニティーカラム MaxSignal IAC 4 in 1 (PerkinElmer 社製) に添加後、自然落下で通液した。精製水 3 mL を 6 回カラムに通し、洗浄後、シリンジで残存する水分を除去後、2%の酢酸を含むメタノール 3 mL でマイコトキシンを溶出した。窒素気流により溶出液を乾固した後、1%の酢酸を含む 30%アセトニトリル水溶液 1 mL に溶解後、LC-MS/MS により計 7 種のマイコトキシンを定量した。今回検出対象とした標準品の LC-MS/MS クロマトグラムを図 1 に示した。

<LC-MS/MS の測定条件>

HPLC (LC-20A シリーズ、株式会社島津製作所)

カラム : InertSustain Swift C18 HP

(GL Sciences 社製)

2.1×150 mm, 3 μ m

カラム温度：40 ° C

移動相：A 0.1%ギ酸水溶液

B 0.1%ギ酸含有アセトニトリル

分離条件：0分 A : B = 90 : 10

6分 A : B = 10 : 90

9.5分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：5 µL

MS (Triple Quad 4500 system、株式会社エービー・サイエックス) ,

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：

AFB1 313 [M+H]⁺ > 241, 213

AFB2 315 [M+H]⁺ > 287, 259

AFG1 329 [M+H]⁺ > 243, 200

AFG2 331 [M+H]⁺ > 313, 189

DON 297 [M+H]⁺ > 249, 203

OTA 404 [M+H]⁺ > 239, 102

ZEN 319 [M+H]⁺ > 283, 187

②添加回収試験

アフラトキシン 4 種 (各 500 µg/L) 、DON (100 mg/L) 、ゼアラレノン (10 mg/L) の 6 種のマイコトキシン混合アセトニトリル溶液を 50 µL ずつ添加回収試験用の検体に添加した。オクラトキシン A ストック溶液 (100 mg/L、トルエン-酢酸 98 : 2) 100 µL とアセトニトリル 900 µL を混ぜ、10 mg/L 溶液を調製した。50 µL を 1.5 mL チューブに採り、遠心濃縮器で乾燥後、1 mL のアセトニトリルに溶かし、オクラトキシン A 添加溶液 (500 µg/L) を調製した。添加回収試験用の検体に、100 µL ずつ添加した。30 分間放置し、溶媒を揮発させた後に①に記載の方法で精製を行った。また、イムノアフィニティーカラムの性能を評価するための比較対象として、精米においても同様の添加回収試験を実施した。

(4) リアルタイム PCR 法による寄生虫検出法

寄生虫の検鏡等による形態学的確認を伴わず簡便な、リアルタイム PCR 法による原虫 DNA の検出系を検討した。今年度はクリプトスポリジウムとジアルジアに対する検査方法を対象とした。

①検出法

クリプトスポリジウムとジアルジアは、遺伝子検査キットが市販されているため、これらのキットが昆虫食で利用できるか検討した。クリプトスポリジウムまたはジアルジアの市販検査キットに付属の陽性コントロールプラスミドを粉碎した検体に添加し、キットの説明書に従いここから直接 DNA を抽出した。その後これをテンプレートとして、各検出キットの説明書に従いリアルタイム PCR を行って寄生虫 DNA を検出した。使用キットは、クリプトスポリジウムの検出には Cycleave RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit (株式会社タカラバイオ) を使用した。本キットは、*Cryptosporidium parvum*、*C. hominis*、*C. meleagridis*、*C. canis*、*C. felis*、*C. muris*、*C. andersoni*、*C. baileyi*、*C. bovis*、*C. wrairi* を検出することができる。ジアルジアの検出には Cycleave RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit (株式会社タカラバイオ) を使用した。本キットは、*Giardia lamblia*、*Giardia psittaci*、*Giardia microti* を検出することができる。DNA の抽出には、QIAamp DNA mini kit (株式会社 QIAGEN) を使用した。

②添加回収試験

昆虫食検体 300 mg に QIAamp DNA mini kit 付属の Buffer ATL 2.16 mL および Proteinase K 240 µL を加え、検体懸濁液とした。ハチやコオロギは足や針などを含まないように検体を採取した。検体懸濁液を 2 mL チューブに 200 µL ずつ分注した (検体 25 mg/チューブ)。各チューブに $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^5$ copy の陽性コントロールプラスミド

(検出キットに付属)を添加した。その後、56℃、2時間加熱し、検体を溶解し、1,000rpm、5分間の遠心処理を行い、上精を回収した。回収した上精から、QIAamp DNA mini kit の説明書に従い DNA を抽出した。抽出した DNA 溶液 5 μ L を用い、各検出キットの説明書に従い寄生虫 DNA を検出した。検出結果から、昆虫食検体を用いた場合の各キットの検出感度を求めた。

C. 研究結果

(1) 微生物培養法

各昆虫食製品の cfu を算出した結果を図 2 に示した。細菌では、一般細菌数はミルワームで最も多く 1.2×10^8 cfu/g、ツムギアリで非検出であった。昆虫食では、製品毎に生菌数に大きな差があり、真菌よりも細菌の生菌数が高い傾向にあることが示された。

PGY 培地および PCA 培地で分離した細菌 242 株の同定を行った結果を図 3 および図 4 に、VRBG 培地およびチオグリコレート寒天培地で分離した細菌の同定結果を図 5 および図 6 に示した。今回の調査では 5 製品から食中毒と関連のある大腸菌群が検出された。また、*Staphylococcus* 属菌は PCA 培地および PGY 培地で検出された細菌全体の 36.4% を占めており、*Bacillus* 属菌は PCA 培地および PGY 培地で検出された細菌全体の 10.0% を占めていた。PGY 培地で検出された個々の検体における細菌叢では、ヨーロッパエコオロギ 1 製品で *Bacillus* 属菌が、カイコ 1 製品で *Staphylococcus* 属菌が 100% を占めており高率に検出された。一部の製品からは、16S rDNA 塩基配列の相同性を指標とした範囲で *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) および *Bacillus cereus* (セレウス菌) と推定される菌株が単離された。大腸菌群は、PCA 培地および PGY 培地で検出された細菌全体の 13.2% を占めていたが多くの食中毒事例の無い大腸菌群の属であった。しかし中には食中毒事例のある大腸

菌群として、16S rDNA 部分塩基配列の相同性検索結果に基づく範囲で *Cronobacter sakazakii*、*Enterobacter cloacae* および *Escherichia coli* と推定される菌株が検出された。食中毒事例のあるこれらの種の細菌類を含めた大腸菌群は、健康なヒトや動物の腸管内や土壌等環境中に広く分布することが知られ、通常、農作物や畜産物から検出されることもあり、これらの食品と同等の結果であると言える。

DG-18 培地および DRBC 培地で単離した真菌 78 株の rDNA 部分塩基配列に基づいた同定を行った結果を図 7 および図 8 に示した。今回検出された酵母は単離された真菌全体の 72% を占めた。また、マイコトキシン産生菌種を含む *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属および *Fusarium* 属はミルワームやコガタスズメバチから計 4 株検出された。これらの分離株を種レベルまで同定した結果、*Aspergillus chevalieri*、*Fusarium oxysporum*、*Penicilium spinulosum* および *Penicilium olsowii* と同定され、これらは毒性の強いマイコトキシン産生性は知られていない菌種であることを把握した(表 2)。

(2) 質量分析法によるマイコトキシン検出法

食用昆虫 8 検体と精米について、アフラトキシン 4 種 : それぞれ 2.5 μ g/kg、DON : 500 μ g/kg、OTA : 5 μ g/kg、ZEN : 50 μ g/kg となるよう標準品を添加した試料から、マイコトキシンの抽出を行った。抽出液をイムノアフィニティーカラムで精製後、LC-MS/MS により 7 種のマイコトキシンを一斉に定量し、回収率を算出した(表 3)。食用昆虫 8 試料における AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、DON、OTA および ZEN の回収率は、それぞれ 39~60%、41~58%、26~57%、23~54%、72~103%、48~78% および 47~78% の範囲内であった。また、標準品のクロマトグラムから各マイコトキシンの S/N を得て、S/N=10 に相当する濃度を算出

し、試料中の濃度に換算した値を定量限界値とした（表 4）。

(3) リアルタイム PCR 法による寄生虫検出法

多くの検体で、クリプトスポリジウム、ジアルジアともに検出限界は 2×10^2 copy/25 mg 検体であった（表 5）。23-003 および 23-007 のクリプトスポリジウムの検出限界は 2×10^3 copy/25 mg 検体であった。23-004 のクリプトスポリジウムの検出感度は 2×10^4 copy/25 mg 検体であった。

D. 考察

真菌および細菌の検出結果については、昆虫食製品毎に生菌数には大きな違いがあること、また真菌よりも細菌の生菌数が高い傾向にあることが示された。さらに、真菌では酵母、細菌では大腸菌群、*Bacillus* 属菌および *Staphylococcus* 属菌が多く分布していたことが明らかとなった。これらには食中毒の原因となり得る菌種も含まれるが、環境中に普遍的に存在する微生物であり、他の食品からも検出される事例は多いことから、それらと比べて特段昆虫食で注意が必要という状況ではなく、昆虫食の喫食による細菌性食中毒防止のために、他の食品同様に、養殖や加工、保存、調理等の各工程の衛生管理の重要性が示唆された。次年度以降は、食中毒関連菌として、真菌では *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属および *Fusarium* 属菌、細菌では大腸菌群、*Bacillus* 属菌および *Staphylococcus* 属菌に着目し、汚染実態調査を実施する予定である。

マイコトキシンの検出法については、Codex の Procedural Manual における回収率のクライテリアは、分析対象の濃度が 10 $\mu\text{g/kg}$ で 60~115%、100 $\mu\text{g/kg}$ ~10 mg/kg で 80~110%とされている。アフラトキシン 4 種と OTA については 10 $\mu\text{g/kg}$ のクライテリアを参考にとすると、アフラトキシン 4 種では 8 試料全てで、OTA では 3 試料で回収率下限を下回った。DON と ZEN については 100

$\mu\text{g/kg}$ ~10 mg/kg のクライテリアを参考にとすると、DON では 2 試料で、ZEN では 8 試料全てで回収率の下限を下回った。一方で、精米においては 7 種のマイコトキシンの回収率はクライテリアの範囲内に収まった。今回精製に用いたイムノアフィニティーカラムの適用は、穀類、ナッツ、飼料となっている。食用昆虫には一般的な穀類や飼料とは異なる夾雑物質が含まれており、それらがマイコトキシンと抗体の結合を阻害した可能性などが考えられた。定量限界値については、各マイコトキシンの規制値又は基準値{総アフラトキシン：10 $\mu\text{g/kg}$ 、DON：1 mg/kg、OTA (Codex 規格)：5 $\mu\text{g/kg}$ }と比較すると十分に小さいことから、回収率が 20~60%であったとしても法律上問題となるレベルのマイコトキシンが混入しているかどうかは判断できる。これらのことから、今回開発した分析法は、アフラトキシン類や ZEN について十分な回収率が得られなかったが、DON と OTA については比較的良好であると言え、7 種のマイコトキシンを一斉に検出可能である利点を活かした食用昆虫におけるマイコトキシンのスクリーニングには利用できると考えられた。次年度以降はこの一斉分析法を用い、食用昆虫におけるマイコトキシンの汚染実態調査する予定である。

寄生虫の検出法については、今回は、市販キットを用い昆虫食中のクリプトスポリジウムとジアルジア DNA の検出を試みた。両キットとも水中の寄生虫の検出用であったが、昆虫食のように非常に多くの夾雑物を含む検体からも、寄生虫 DNA を高感度に検出することができた。クリプトスポリジウムは、検出限界 2×10^2 copy/25 mg ~ 2×10^4 copy/25 mg で検出することができた。ジアルジアは、 2×10^2 copy/25 mg ~ 2×10^3 copy/25 mg で検出することができた。クリプトスポリジウム 1 オーストの copy 数は約 18,000 であり⁶⁾、ジアルジアのシスト 1 個あたりの copy 数は約 1,600 であると考えられている^{A)}。これらのこと

から、今回の方法では理論上、クリプトスポリジウムは検体 25 mg あたり 0.01~1.3 個 (1g あたり 0.4 ~52 個) のオーシストを検出することができると考えられた。ジアルジアは、検体 25 mg あたり 0.13 個~1.25 個 (1g あたり 5.2 個~52 個) のシストを検出することができると考えられた。次年度以降は、サンプリングプランを作成し、本検査法を用いて、昆虫食中のクリプトスポリジウムとジアルジアの汚染状況を調査したい。また、本研究で対象とした他の寄生虫の検査法を確立する予定である。

E. 結論

今回の調査では、昆虫食製品からは動物の腸内や土壌等の環境中に広く存在する細菌群および酵母群が多く分布したことが示されたが、それらは他の食品からも検出される事例は多いことから、特段昆虫食で注意が必要という状況ではなく、他の食品同様に、一部の食中毒菌の汚染リスクに留意し、昆虫食の喫食による食中毒を防ぐため、養殖や加工、保存、調理等の各工程の衛生管理が重要であることが示唆された。次年度以降は、今年度汚染があることが明らかとなった食中毒関連菌について、昆虫食製品中の汚染実態調査を実施する予定である。また、昆虫食分析に適用するため、日本において規制が行われているマイコトキシン分析法としてイムノアフィニティークラムによる精製法と LC-MS/MS による検出法を組み合わせた 7 種のマイコトキシンの一斉分析法の性能評価を行った結果、本法は一斉に検出可能である利点を活かし、食用昆虫におけるマイコトキシンのスクリーニングには利用できると考えられた。次年度以降はこの一斉分析法を用い、昆虫食製品におけるマイコトキシンの汚染実態調査する予定である。さらに、市販キットを用いて、昆虫食からクリプトスポリジウムとジアルジア検出法の性能評価を行った結果、本法は昆虫食からこれらの原虫を低濃度でも検出することが

可能であった。次年度以降は、本検査法を用いての昆虫食製品中のクリプトスポリジウムおよびジアルジアの汚染実態調査、および他の寄生虫の検査法確立を行う予定である。

F. 参考文献

- 1) 上水試験方法 2020 年版. 日本水道協会, 2021
- 2) Samson RA, Hoekster ES, Frisvad JC, 2004. Introduction to food and airborne fungi seventh edition. ASM Press, Washington.
- 3) 大楠清文, 江崎孝行, 2009. 分子系統解析に基づいた細菌の分類と同定. *Sysmex Journal Web* Vol. 10 No.2.
- 4) White, TJ., Bruns, T., Lee, S., et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Edited by: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. White TJ: Academic Press. pp. 315-322 (1990)
- 5) O'Donnell, K. *Fusarium and its near relatives*, in *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, ed. by Reynolds DR and Taylor JW. CAB International, Wallingford, UK. pp. 225-233 (1993).
- 6) 平成 23 年度厚生労働科学研究「水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究」クリプトスポリジウム等検査における遺伝子検査法の定量に関する検討.

G. 研究業績

【論文発表】

該当なし

【学会発表】

廣田珠実, 渡辺麻衣子, 清水公德, 工藤由起子, 志田(齊藤)静夏. 国内流通昆虫食における微生物分布実態調査. 日本マイコトキシン学会第 90 回学術講演会.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

表 1. 本研究で供試した昆虫食一覧

検体	昆虫名(学名)	昆虫名(和名)	製品の状態	販売前
				加熱の有無
in02	<i>Tenebrio molitor</i>	チャイロコメノゴミムシダマシ	冷凍	無
in03	<i>Glyllus bimaculatus</i>	フタホシコオロギ	冷凍	無
in04	<i>Bombyx mori</i>	カイコ	冷凍	無
in05	<i>Phalera flavesceus</i>	モンクロシャチホコ	冷凍	無
23-001	<i>Bombyx mori</i>	カイコ	姿のまま乾燥	有
23-002	<i>Tenebrio molitor</i>	チャイロコメノゴミムシダマシ	姿のまま乾燥	有
23-003	<i>Acheta domestica</i>	ヨーロッパイエコオロギ	粉末、乾燥	有
23-004	<i>Acheta domestica</i>	ヨーロッパイエコオロギ	冷凍	無
23-005	<i>Bombyx mori</i>	カイコ	冷凍	無
23-006	<i>Zophobas atratus</i>	ツヤケシオオゴミムシダマシ	冷凍	無
23-007	<i>Vespa analis insularis</i>	コガタスズメバチ	冷凍	無
23-009	<i>Oecophylla smaragdina</i>	ツムギアリ	冷凍	不明

表 2. 検出された真菌株の同定結果

サンプル	培地	種名	主な分布域
in02	DRBC	<i>Fusarium oxysporum</i>	食品、植物、土壌環境など
in03	DG-18	<i>Aspergillus chevalieri</i>	麴、海洋
23-007	DRBC	<i>Penicilium spinulosum</i> または	穀物や小麦、肉などの食品
23-007	DRBC	<i>Penicilium citreosulfuratum</i>	サフランなどの植物
23-007	DRBC	<i>Penicilium olsowii</i>	トマト、ブドウなどの果実

表 3. 食用昆虫を用いた添加回収試験における 7 種のマイコトキシンの回収率

検体名	各カビ毒の回収率（平均値±標準偏差、%）						
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	DON	OTA	ZEN
23-001	60 ± 6.6	53 ± 6.9	50 ± 6.9	43 ± 7.4	89 ± 7.5	48 ± 11.7	48 ± 3.4
23-002	54 ± 3.2	58 ± 2.9	57 ± 1.0	54 ± 2.0	103 ± 0.80	65 ± 1.1	62 ± 1.1
23-003	46 ± 0.74	46 ± 1.5	50 ± 1.0	47 ± 2.1	95 ± 1.2	61 ± 1.5	47 ± 1.2
23-004	47 ± 2.1	41 ± 1.9	42 ± 1.7	33 ± 3.7	90 ± 1.0	69 ± 1.4	47 ± 0.53
23-005	39 ± 1.2	42 ± 1.9	26 ± 3.5	23 ± 1.5	72 ± 1.5	51 ± 3.4	66 ± 1.8
23-006	52 ± 1.3	48 ± 2.4	45 ± 0.88	42 ± 3.7	87 ± 1.8	73 ± 0.65	51 ± 2.3
23-007	58 ± 2.7	44 ± 1.4	44 ± 1.7	48 ± 0.44	73 ± 2.6	78 ± 0.12	76 ± 2.6
23-009	59 ± 0.41	58 ± 1.5	55 ± 2.2	47 ± 2.7	91 ± 3.6	56 ± 1.2	78 ± 2.1
精米	75 ± 1.9	73 ± 5.2	72 ± 6.5	75 ± 5.8	99 ± 5.1	74 ± 6.9	96 ± 1.4

表 4. 7 種のマイコトキシンの定量限界値

カビ毒	定量限界値 (µg/kg)
AFB ₁	0.03
AFB ₂	0.05
AFG ₁	0.04
AFG ₂	0.2
DON	1
OTA	0.02
ZEN	1

表 5. 昆虫食中の寄生虫 DNA の検出感度

検出感度 (copy数/25 mg検体)	検体名							
	23-001	23-002	23-003	23-004	23-005	23-006	23-007	23-009
Cryptosporidium	2×10^2	2×10^3	2×10^3	2×10^4	2×10^2	2×10^2	2×10^3	2×10^2
Giardia	2×10^2	2×10^2	2×10^2	2×10^3	2×10^2	2×10^2	2×10^2	2×10^2

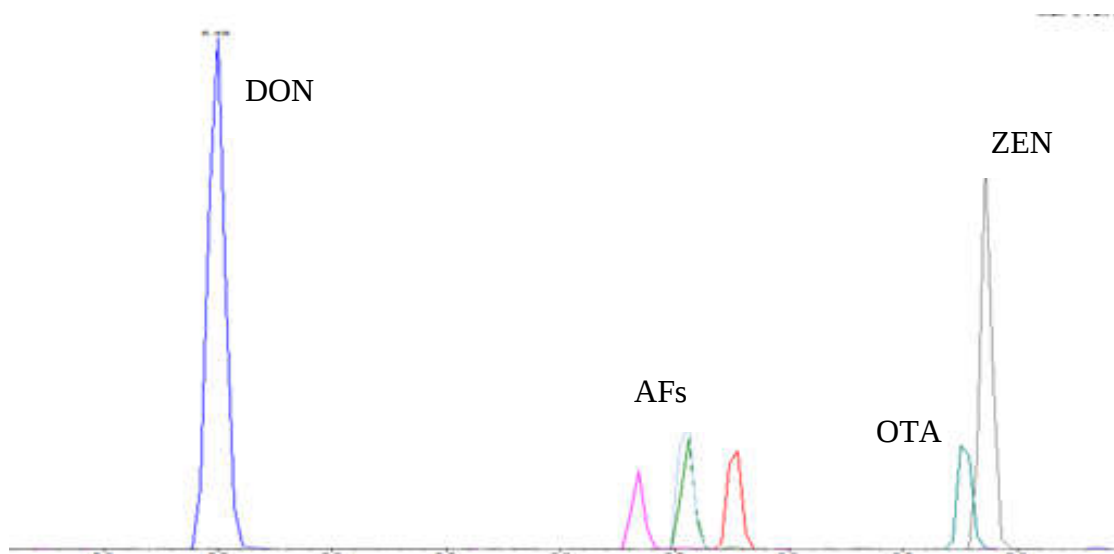


図 1. 検出対象とした標準品の LC-MS/MS クロマトグラム

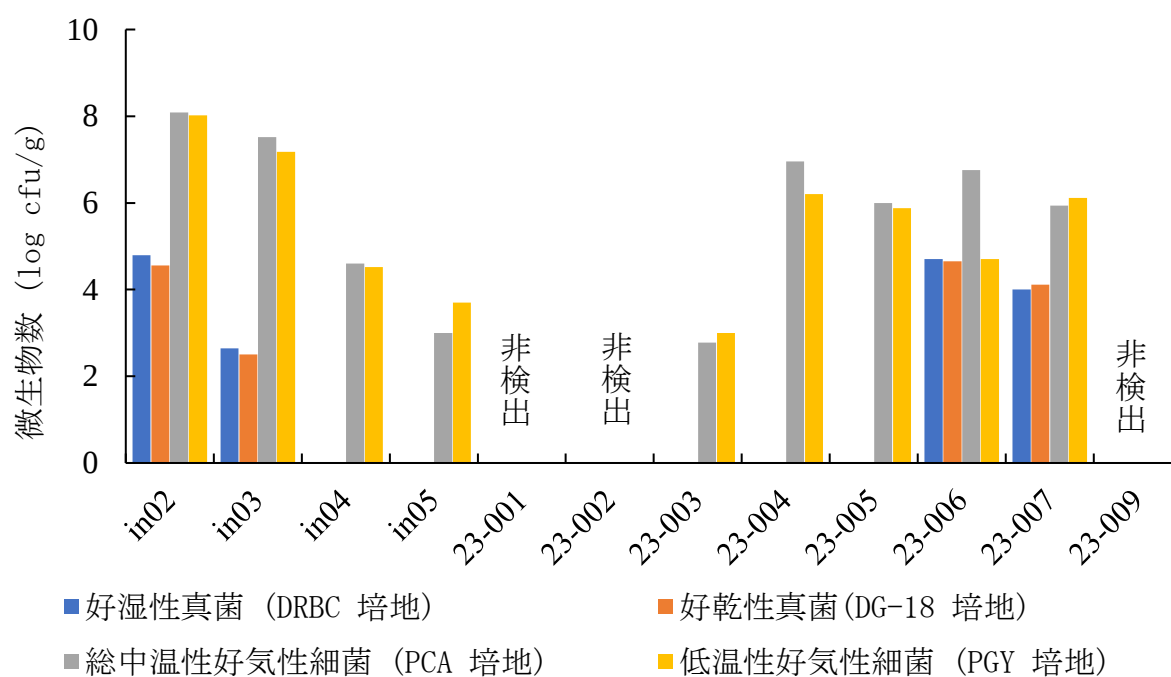
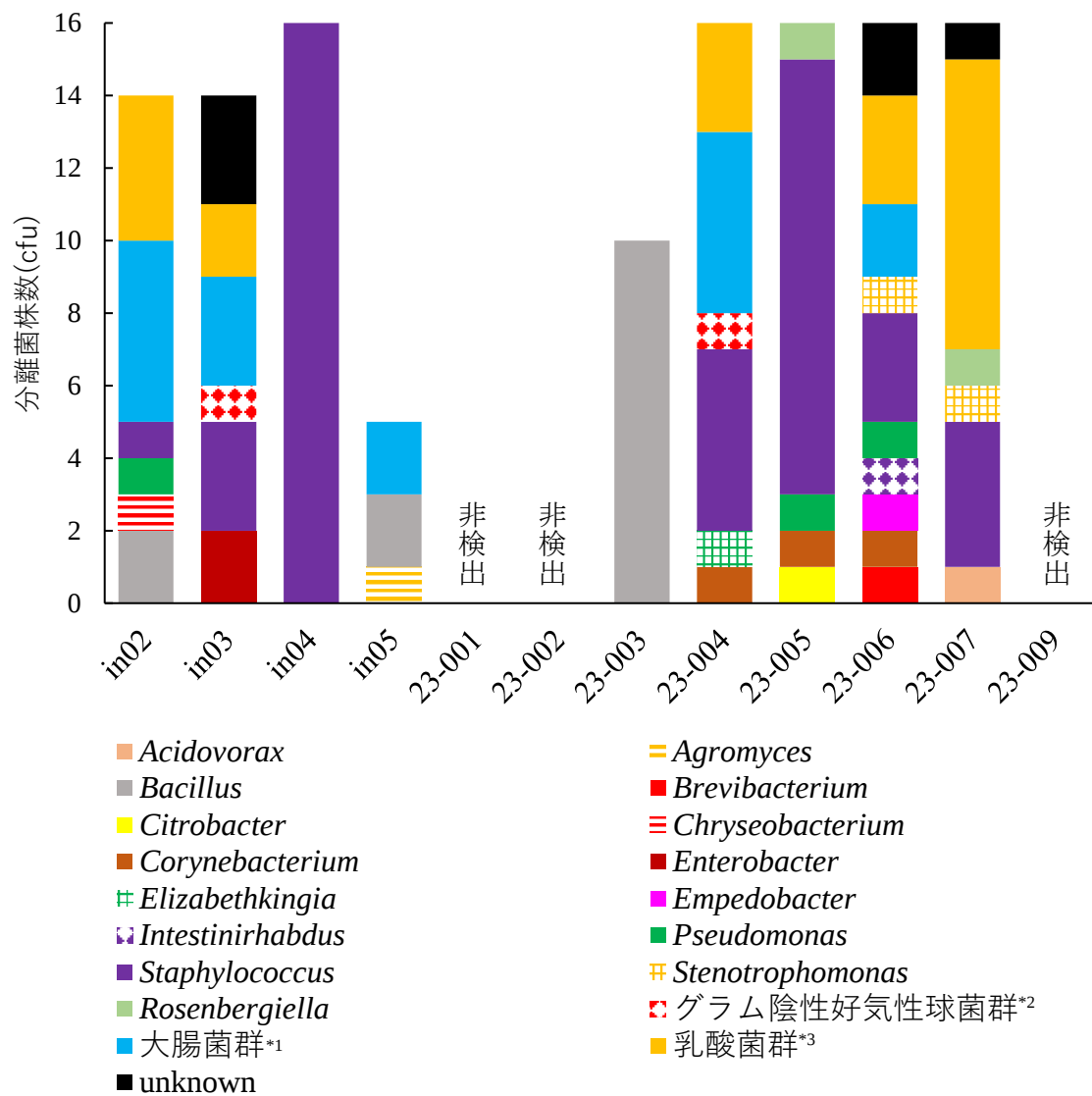


図 2. 食用昆虫サンプル 1 g あたりの生菌数

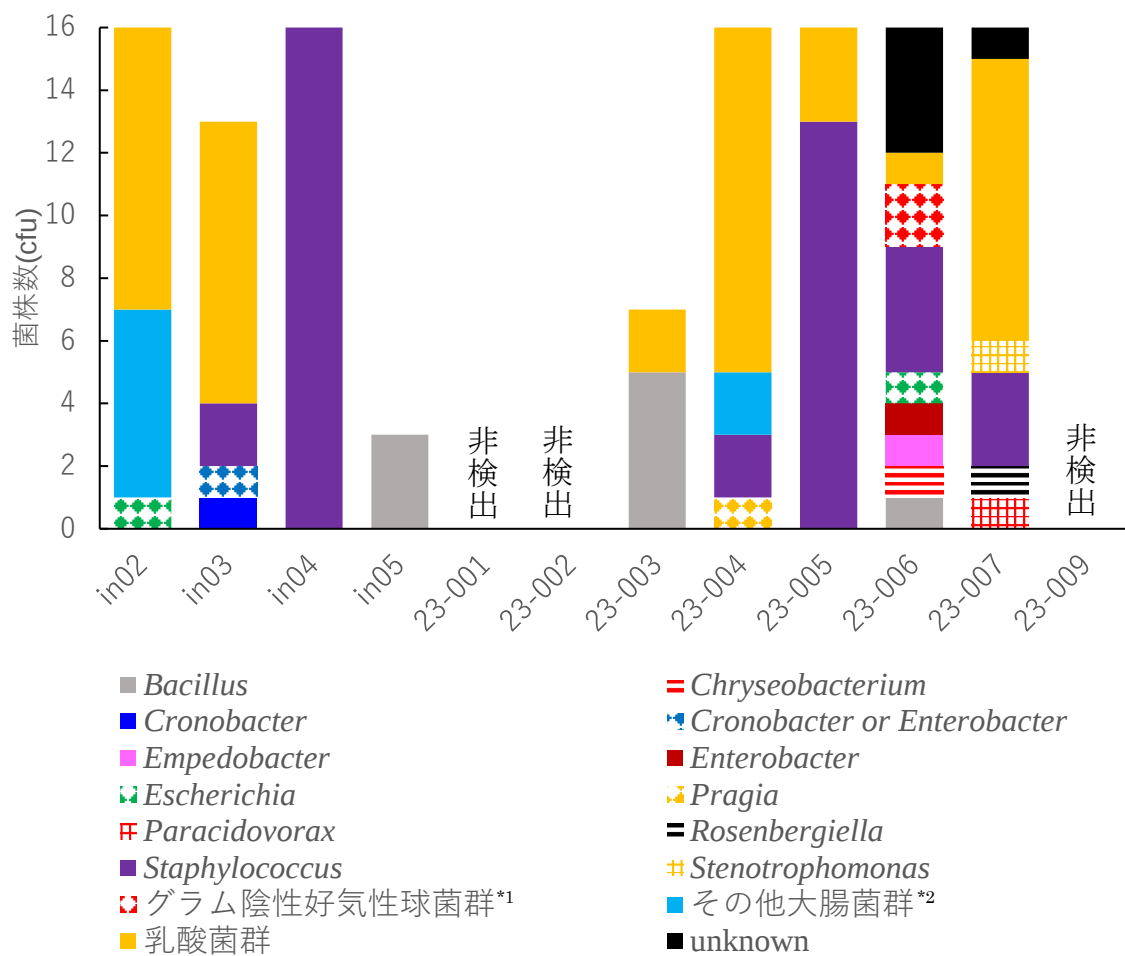


*1 Cronobacter 属、Enterobacter 属、Escherichia 属、Hafnia 属、Klebsiella 属、Kluyvera 属、Serratia 属、Pantoea 属

*2 Acinetobacter 属、Moraxella 属（食中毒事例は無し）

*3 Enterococcus 属、Pediococcus 属、Lactococcus 属、Latilactobacillus 属、Leuconostoc 属、Weissella 属

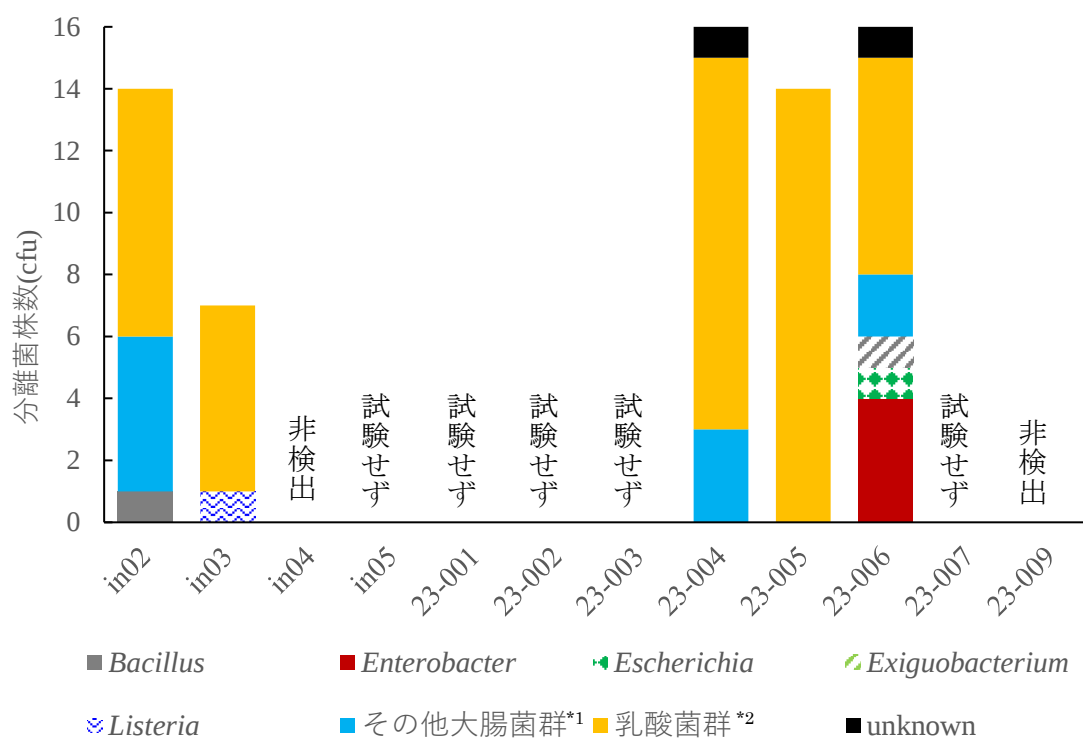
図 3. PGY 培地にて検出された細菌属



*1 *Enterococcus* 属、*Pediococcus* 属、*Lactococcus* 属、*Latilactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属

*2 *Hafnia* 属、*Klebsiella* 属、*Kluyvera* 属、*Serratia* 属、*Pantoea* 属

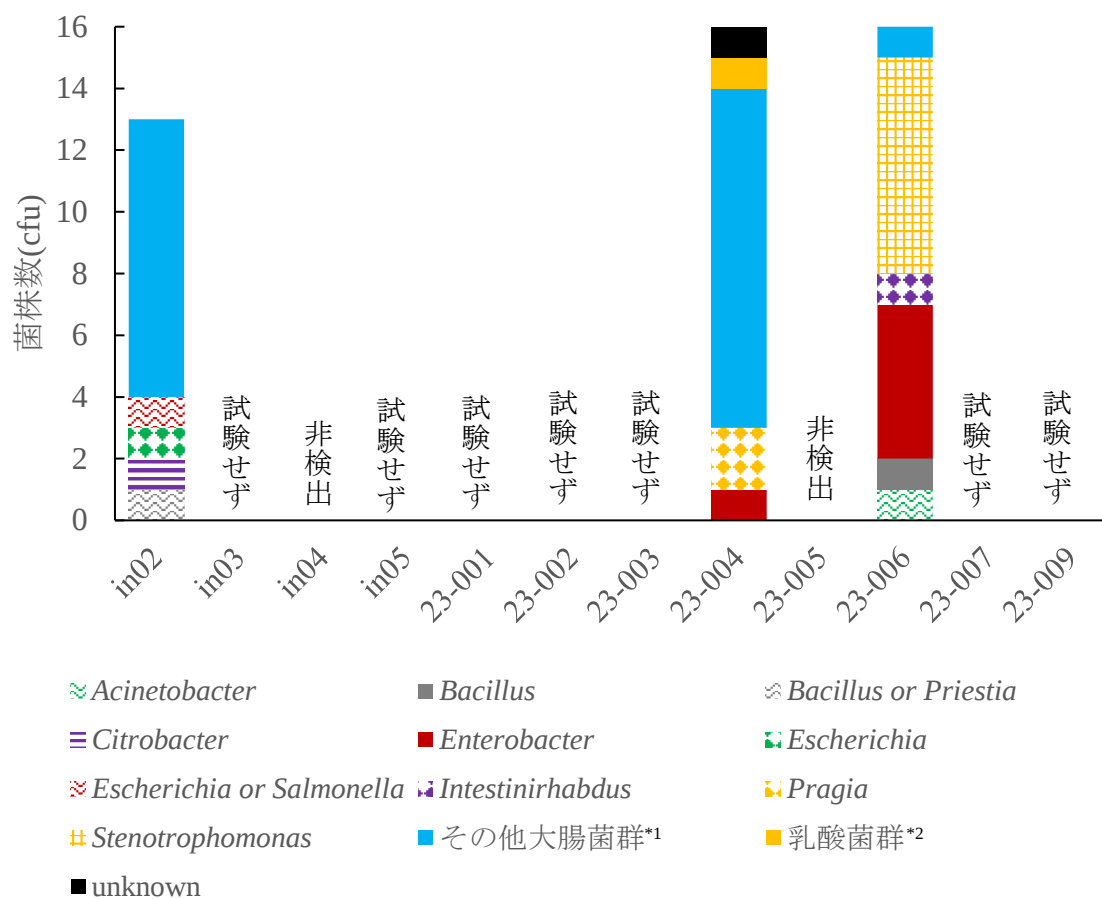
図 4. PCA 培地にて検出された細菌属



*¹Hafnia 属、Klebsiella 属、Kluyvera 属、Serratia 属、Pantoea 属

*²Enterococcus 属、Pediococcus 属、Lactococcus 属、Latilactobacillus 属、Leuconostoc 属、Weissella 属

図 5. チオグリコレート寒天培地にて検出された細菌属



*1Hafnia 属、Klebsiella 属、Kluyvera 属、Serratia 属、Pantoea 属

*2Enterococcus 属、Pediococcus 属、Lactococcus 属、Latilactobacillus 属、Leuconostoc 属、Weissella 属

図 6. VRBG 培地にて検出された真菌の属

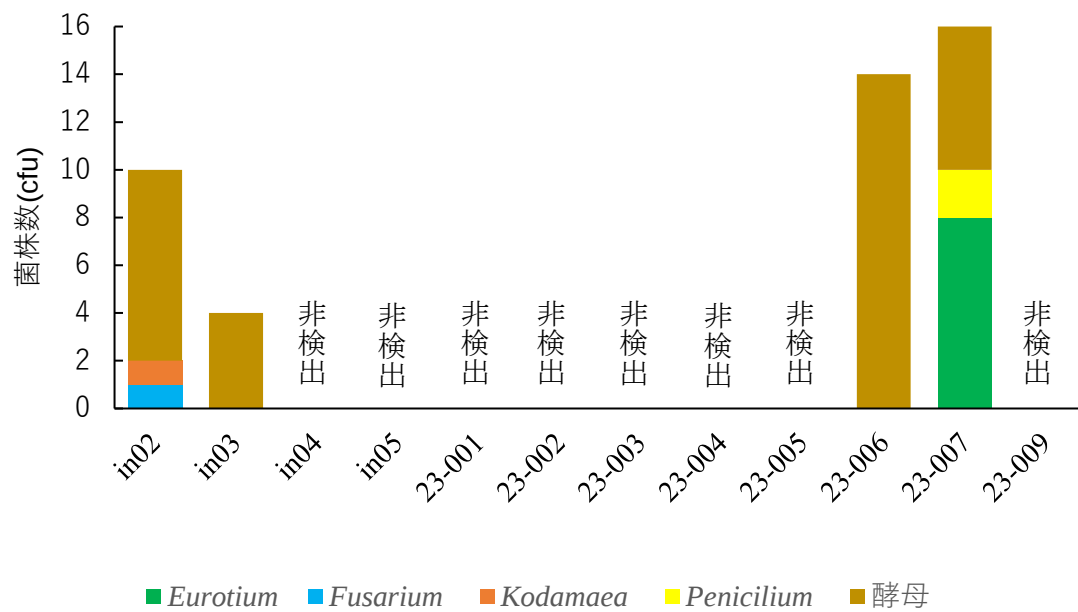


図 7. DRBC 培地にて検出された真菌属

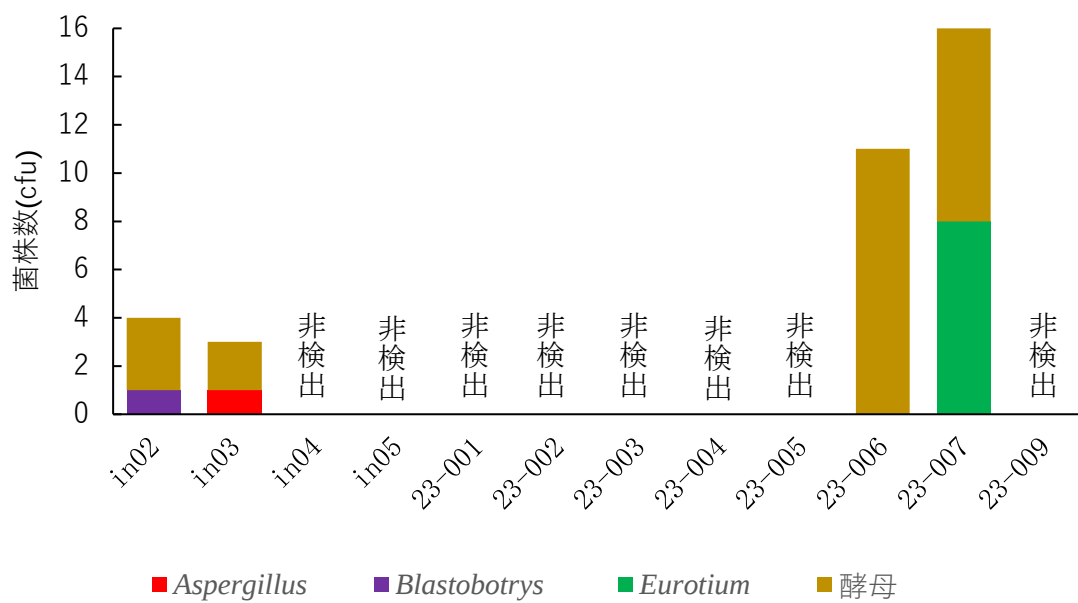


図 8. DG-18 培地にて検出された真菌属