

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

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んだ。一つ目のテーマは、基準値設定に係るカビ毒に関する研究で、「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」、「簡易測定キットの性能評価」及び「小麦における OTA 汚染原因菌の究明」を実施した。一昨年と昨年度に開発し、妥当性の評価を行った小麦中の DON と OTA の同時分析法について、単独の分析法との性能を比較するために、人工共汚染試料を用いた検討を行った。その結果、同時分析法で得られた分析値は、DON を公定法で、OTA を実態調査で用いられた分析法でそれぞれ分析して得られた分析値と同等であった。この結果より、開発した同時分析法は、単独の分析法の代替法として使用できることが示された。また、市販の ELISA キットとイムノクロマトキットそれぞれ 2 種について、OTA 人工汚染小麦及び大麦中の OTA 濃度を測定した値と、HPLC を用いた機器分析による測定値とを比較し、それらキットの性能を評価した。その結果、いずれのキットも OTA のスクリーニングに使用可能であることが示された。さらに、小麦における OTA 汚染原因菌の究明を行い、*Penicillium verrucosum* だけでなく、*Aspergillus westerdijkiae* も貯蔵中の小麦の OTA 汚染原因菌として留意する必要があることが明らかとなった。

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。一昨年と昨年度に開発した分析法を用いて、合計 399 検体の穀物加工品を対象とした汚染調査を実施した。その結果、MON は麦やトウモロコシ加工品から検出された。小麦は日本人の主食の一つであるため、小麦加工品が日本人の主要な MON のばく露源と考えられた。さらに、MON による腎毒性の発現機序を検討することを目的として、MON 単回投与後の腎臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析を実施した。その結果、MON はマウスの腎臓を標的とし、経口摂取された MON は、腎臓で代謝され、活性中間体や活性酸素種が腎尿細管毒性を誘発し、近位尿細管壊死を引き起こす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産生され、カビ毒に汚染された食品の摂取により急性的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。さらに、小麦における OTA 汚染原因菌を究明するために、*Penicillium* 及び *Aspergillus* 属菌を接種した小麦における OTA 汚染動態を調べる。

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 の汚染実態調査、及びマウスにおける腎毒性の発現機構の解析を行う。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に関する研究

①DON と OTA の同時分析法の開発

小麦粒 300 g にアセトニトリル 300 mL と、DON と OTA の標準品を加え、よく混合後、アセトニトリルをエバポレーターで除去した。一晚ドラフト内で静置後に粉砕機で破砕し、均一化処理したものを DON と OTA の人工共汚染試料とした。DON は 50~2,000 µg/kg、OTA は 0.5~25 µg/kg の濃度範囲で、計 22 検体調製した。それぞれの検体 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 (MFC : 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 µL に精製水 500 µL 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。

②OTA の簡易分析法の検討

研究代表者が調製した OTA 人工汚染小麦 16 検体及び人工汚染大麦 16 検体を用いて、ELISA キット 2 種とイムノクロマトキット 2 種の性能評価を実施した。

③小麦における OTA 汚染原因菌の究明

OTA 産生性が確認された *P. verrucosum* NBRC 30181 及び *A. westerdijkiae* NIHS 3985 を用いて、以下の 4 条件で小麦における OTA 産生性確認試験を行った。

- a) 100 mL 容三角フラスコに入れ、オートクレーブ滅菌後乾燥した小麦玄麦粒 5 g に対して、滅菌 DW 0.5 mL (加水率 10%)、1.0 mL (加水率 20%)、1.5 mL (加水率 30%)、2.0 mL (加水率 40%) または 2.5 mL (加水率 50%) を加えて吸水させた。ここに濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、25°C で 2 週間培養した。各加水率×各菌株の培養条件につき 1 回の実験を行った。
- b) 加水率による OTA 産生量変化の再現性を確認するため、*Penicillium* 属菌株のみ接種し実験を行った。加水率 10%、30% または 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、25°C で 2 週間培養した。各加水率につき 3 回の繰り返し実験を行った。
- c) 加水率 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、4°C、15°C または 25°C で 2 週間培養した。各培養温度×各菌株の培養条件につき 3 回の繰り返し実験を行った。
- d) 加水率 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、15°C で 2 または 4 週間培養した。各培養期間×各菌株の培養条件につき 3 回の繰り返し実験を行った。また培養期間 1 週間ごとに、小麦上の菌糸の発達度を画像記録するため写真撮影を行った。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

①国内流通穀類加工品を対象とした汚染調査

小売店から穀類加工品 6 種計 399 検体を収集

し、それぞれ破碎した。破碎した試料 5 g にアセトニトリル：水 (85 : 15) 25 mL を加え、15 分間振盪することで抽出を行った。遠心分離 (470 g、10 分間) により抽出液を分離し、三角フラスコに回収した。沈殿にアセトニトリル：水 (85 : 15) 25 mL を加え、同じ抽出操作を行った。再度、沈殿にアセトニトリル：水 (85 : 15) 25 mL を加え、抽出操作後に遠心分離 (1410 g、10 分間) により抽出液を分離し、計 3 回の抽出液を合わせた。抽出液 22.5 mL をガラス容器に移し、窒素気流により乾固後、2 mL のメタノールに懸濁した。抽出液からの MON の精製には強陰イオン交換 (SAX) カートリッジ (Bond Elut LRC SAX 500 mg : Agilent 社製) を用いた。メタノール 2 mL、水 2 mL 及び 0.1M リン酸水溶液 2 mL で平衡した SAX カートリッジにメタノール懸濁液を全量添加した。ガラス溶液をメタノール 2 mL で洗浄後、洗浄液をカラムに添加した。0.1M リン酸水溶液 2 mL と 10% アセトニトリル水溶液 2 mL でカートリッジを洗浄後、減圧してカラム内に残留する液体を除去した。3.5% 硫酸水素テトラブチルアンモニウム含有 0.2M リン酸二水素カリウム水溶液 (pH 7.0) 1.5 mL で溶出したものを試験溶液とした。HPLC により、試験溶液中の MON を定量した。

②マウスを用いた MON の腎毒性機序の解明

5 週齢の雄マウスを試験に用いた。群構成は溶媒対照群 (6 匹) 及び MON 40 mg/kg-投与群 (12 匹) の 2 群構成とした。溶媒は Milli-Q 水を用いた。実験期間中は一般状態の観察を行い、投与から 6 時間後に各群 6 匹を剖検し、腎臓を採材して重量を測定した後、半割して一方を組織学的検査に、もう一方を遺伝子発現解析に供した。

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

アセトニトリルに浸した小麦粒に、DON の標準品を終濃度 50～2,000 µg/kg、OTA の標準品を終濃度 0.5～25 µg/kg となるよう添加した。溶媒を除去後、粉碎したものを共汚染試料とした。計 22 種の試料それぞれについて、DON を MFC、OTA をイムノアフィニティーカラム (IAC) で精製し、それぞれ LC-MS/MS で定量した。次に、一昨年と昨年度に開発した 2 種の DON と OTA の同時分析法を用いて各試料を分析した。各試料 2 検体ずつ分析し、平均を分析値とした。DON について、単独分析法 (公定法) で得られた測定値に対する同時分析法の測定値の割合は、IAC 精製で 93～120%、MFC 精製で 87～105% となった。OTA については、単独分析法 (公定法) で得られた測定値に対する同時分析法の測定値の割合は、IAC 精製で 45～91%、MFC 精製で 87～99% となった。

②OTA の簡易分析法の検討

2 種の ELISA キットによる人工汚染小麦及び大麦の分析値と機器分析による測定値の相関係数は、0.9614～0.9978 の範囲内であった。一方、2 種のイムノクロマトキットによる人工汚染小麦の分析値と機器分析による測定値の相関係数は、0.9659～0.9873 の範囲内であった。

③小麦における OTA 汚染原因菌の究明

培養条件 (3) -a) の結果では、*P. verrucosum* 株を接種した小麦では、加水率が高くなるにつれて OTA 含有量も上昇し、加水率 50% で最大濃度 3,122 µg/kg を示した。*A. westerdijkiae* 株を接種した小麦では、加水率 40% で OTA 含有量の最大値を示し、21,691 µg/kg であった。また、加水率 10% の小麦においては *P. verrucosum* 株または *A. westerdijkiae* 株のどちらを接種した場合にも OTA が検出された (149 µg/kg または 162 µg/kg)。培養条件 (3) -b) で 3 回繰り返し実験を行った結果は、加水率 10%、30% 及び 50% での培養後の OTA 平均濃度はそれぞれ 9 µg/kg、2,521

µg/kg 及び 3,801 µg/kg となった。培養条件 (3) -c) の結果では、加水率 50% の条件下では、両菌株で小麦中の OTA 含有量は 25℃ 培養時に最大値を示し、平均濃度はそれぞれ 8,548 µg/kg 及び 57,482 µg/kg、最大濃度はそれぞれ 10,150 µg/kg 及び 109,871 µg/kg であった。15℃ の培養時でも、*P. verrucosum* 株では最大 895 µg/kg の濃度で、*A. westerdijkiae* 株では最大 38 µg/kg で、OTA 産生性が確認された。培養温度 4℃ では、いずれの菌株でも OTA 産生は確認されなかった。培養条件 (3) -d) では、培養温度 15℃ 加水率 50% の条件下では、接種したいずれの菌株でも小麦中の OTA 含有量は 2 週間培養後に比べて 4 週間後のほうが高く、培養 4 週間後の小麦中 OTA 濃度は、*P. verrucosum* 株では平均 2,202 µg/kg 及び最大 2,371 µg/kg、*A. westerdijkiae* 株では平均 7,558 µg/kg 及び最大 12,791 µg/kg であり、条件 (3) -c) で培養した実験区の結果と比べると、培養期間を 4 週間に延長すれば、15℃ でも、特に *A. westerdijkiae* 株で比較的高い OTA 産生性を示すようになることが確認された。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

①国内流通穀類加工品を対象とした汚染調査

昨年度までに開発した分析法を用いて、日本に流通する穀類加工品 6 種計 399 検体における MON の汚染実態を調べた。全 399 検体のうち、145 検体 (36%) から定量限界値 (10 µg/kg) 以上の MON が検出された。そのうち、10～100 µg/kg の濃度範囲に含まれる検体が最も多かった (92 検体)。1,000 µg/kg を超えて MON が検出された検体数は 11 (3%) であった。最も陽性率が高かったのは、ハト麦加工品の 73% であり、次いでトウモロコシ加工品の 61%、ライ麦の 39%、小麦粉 (国産) の 37%、大麦の 23% であった。小麦粉 (輸入) と米における陽性率はそれぞれ 4% と 0% で、他の穀類加工品より低かった。

②マウスを用いた MON の腎毒性機序の解明

RNA-Seq 解析の結果においては、MON 投与群では、溶媒対照群と比較して、397 遺伝子の発現が増加し、321 遺伝子の発現が減少した。遺伝子オントロジーに基づく機能アノテーション解析により、MON を 40 mg/kg 体重で単回経口投与した 6 時間後に発現が有意に増加した遺伝子は、多くの機能グループを形成していることが明らかになった。免疫組織化学的解析の結果においては、MON 投与群で認められた壊死尿細管において IV 型 collagen 陽性を示す基底膜が観察された。

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 2 種の同時分析法について、多機関共同試験を一昨年と昨年度に実施し、妥当性を確認した。これら同時分析法が、DON の公定法や OTA の汚染調査で用いられた分析法と同等の性能を有するかを確認するために、人工汚染試料を用いて単独の分析法と同様の分析値が得られるかどうかを確認した。単独の分析法と同時分析法の分析値を比較した結果、DON については、公定法による分析値と 2 種の同時分析法による分析値は同等であった。一方で、OTA については、汚染実態調査で使用された IAC を用いた単独の分析法と MFC を用いた同時分析法による分析値は同等であったが、IAC を用いた同時分析法の分析値は、全体的に低い値となった。この結果から、昨年度に開発した MFC を用いた同時分析法のみが、単独の分析法と同等の分析値が得られることが明らかとなり、代替法として使用できることが示された。

OTA の簡易分析法については、人工汚染試料を用いた検討を実施した。その結果、ELISA キット 2 種及びイムノクロマトキット 2 種は、機

器分析の測定値と良好な相関係数を示した。このことから、これらキットはスクリーニングに用いる迅速簡便キットとして使用可能であると考えられた。

OTA 産生性を有する 2 種の菌株をそれぞれ接種・培養後の小麦において、2 週間培養後では *P. verrucosum* NBRC 30181 は *A. westerdijkiae* NIHS 3985 よりも OTA を多く産生したが、4 週間培養後には、*A. westerdijkiae* NIHS 3985 を接種した小麦の方が OTA 含有量は高くなった。このことから、15℃という室温より低い条件下でも、*A. westerdijkiae* は、小麦の保管期間が 4 週間以上と長期にわたった場合には、小麦における主要な OTA 汚染原因菌として知られる *P. verrucosum* と同程度の OTA 汚染原因菌となり得る可能性が示唆された。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

一昨年と昨年度に開発した分析法を用いて、日本国内に流通する穀類加工品を対象とした汚染実態調査を実施した結果、麦類やトウモロコシの加工品から MON が検出された。1 mg/kg を超えて検出される検体も散見されており、MON は、DON やフモニシンと同程度の汚染が生じているカビ毒であることが明らかとなった。小麦粉（輸入）における MON の汚染レベルは、小麦粉（国産）と比較すると非常に低かった。日本は小麦の多くを輸入に頼っていることから、MON の小麦製品からの摂取量は多くないと考えられる。また、分担研究者によって実施された、マウスにおける毒性試験の結果、MON の NOAEL は 10 mg/kg 体重/日とされた。この値より一日耐用摂取量（TDI）を 100 µg/kg 体重/日（安全係数 100）とすると、その値を超えるためには高濃度の MON に汚染された食品を一日あたり数 kg 摂取する必要がある。よって、MON については、汚染された穀類加工品が日本国内に流通しているが、それを摂取すること

によって直ちに健康被害が生じる可能性は低いと考えられた。

また、昨年度までに見出した MON の腎毒性について、40 mg/kg 体重の MON 単回投与後の遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析によってその発現機序を検討した。免疫組織化学的解析の結果、壊死した尿細管における尿細管再生に不可欠な IV 型 collagen の基底膜の免疫反応性は、MON の単回投与後も保持されていた。この再生能力の主要な決定因子は、尿細管基底膜の維持であり、これは低灌流由来の虚血性傷害後よりも、毒性由来の傷害後の方で保持され易いことが知られている。これらの所見から、マウスに MON を反復投与した後の近位尿細管再生は、代謝活性化により誘発された MON 毒性により、反復投与初期に急性尿細管壊死が生じた後遺症である可能性が示唆された。

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

一昨年と昨年度に開発し、妥当性の評価を行った小麦中の DON と OTA の同時分析法について、単独の分析法との性能を比較するために、人工共汚染小麦を用いた検討を行った。多機能カラムを用いた同時分析法で得られた分析値は、DON を公定法で、OTA を実態調査で用いられた分析法でそれぞれ分析して得られた分析値と同等であった。この結果より、開発した同時分析法は、単独の分析法の代替法として使用できることが示された。

また、国内で販売されている OTA 測定用の迅速簡便測定法キットを入手し、小麦及び大麦中の OTA のスクリーニングに適用可能か調べた。初年度ならびに次年度で得られた成果をもとに、ELISA キット 2 種、イムノクロマトキット 2 種を選び、OTA 人工汚染小麦及び大麦中の OTA

濃度を測定した値と、HPLC を用いた機器分析による測定値と比較し、それらキットの性能を評価した。その結果、ELISA キット 2 種、イムノクロマトキット 2 種とも良好な相関係数を示した。これらの結果から、最終年度の検討に用いたキットは、どのキットも OTA の迅速簡便なスクリーニングに使用可能であると考えられた。

さらに、小麦における OTA 汚染原因菌についての解析の結果、室温より低温の 15℃においても、小麦への加水量が多く、4 週間培養した結果、*A. westerdijkiae* も *P. verrucosum* と同程度以上の OTA 産生性を示すことを確認した。このことから、*A. westerdijkiae* に汚染された小麦がある程度の水分を含有した状態で長期保存された場合、室温より低温の貯蔵環境下でも *A. westerdijkiae* による高度な OTA 汚染が発生する可能性がある。貯蔵中の小麦の OTA 汚染原因菌として、*P. verrucosum* だけでなく *A. westerdijkiae* にも留意する必要があることが示された。

(2) 新興カビ毒 MON に関する研究

一昨年と昨年度に開発した分析法を用いて、合計 399 検体の穀物加工品を対象とした汚染調査を実施した。MON は、小麦粉（国産）、ハト麦加工品、ライ麦、トウモロコシ加工品から主に検出された。1 mg/kg 以上の MON を含む検体は 11 検体認められた。小麦は日本人の主食の一つであるため、小麦加工品が日本人の主要な MON のばく露源と考えられる。しかし、輸入された小麦から製造された小麦粉における MON の汚染レベルは、他の穀類と比較して非常に低かった。MON の毒性も考慮に入れると、MON は日本人の健康に直ちに影響を与えるカビ毒ではないと考えられた。

また、MON による腎毒性の発現機序を検討することを目的として、MON 単回投与後の腎臓における遺伝子発現解析と免疫組織化学的解析を実施した。その結果、MON はマウスの腎

臓を標的とし、経口摂取された MON は腎臓で代謝され、活性中間体や活性酸素種が腎尿細管毒性を誘発し、近位尿細管壊死を引き起こす可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究業績

【論文発表】

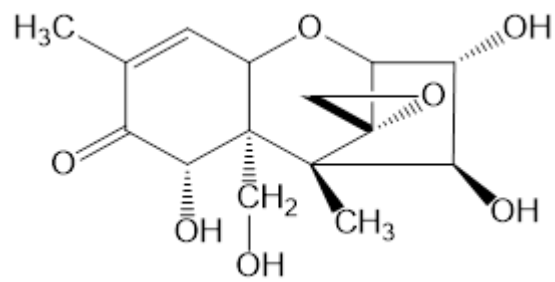
1. Ojio R, Zou X, Yamagata H, Ebizuka Y, Kobayashi M, Kigata T, Tang Q, Yoshida T, Yoshinari T, Shibutani M.: Emerging mycotoxin moniliformin induces renal tubular necrosis after oral exposure in mice. Food Chem. Toxicol. 2025:199:115336.

【学会発表】

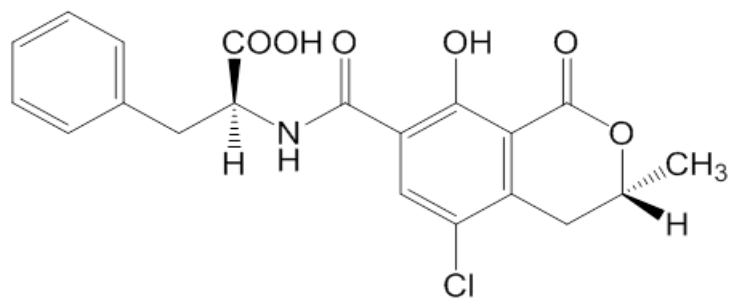
1. 日本マイコトキシン学会 50 周年記念第 91 回学術講演会、開催日：2024 年 8 月 26～27 日、開催場所：栃木県・ライトキューブ宇都宮、概要：小麦中のデオキシニバレノールとオクラトキシン A の一斉分析法の開発について、研究代表者 吉成知也が口頭発表を行った。
2. 第 45 回日本食品微生物学会学術総会、開催日：2024 年 9 月 5～6 日、開催場所：青森県・青森市文化会館、概要：新興カビ毒モニリフォルミン汚染穀物中の原因菌探索について、研究分担者 渡辺麻衣子が口頭発表を行った。
3. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms "Approaches for risk analysis and food safety" in 56th UJNR、開催日：2024 年 9 月 16～17 日、開催場所：東京都・星陵会館、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、研究分担者 渡辺麻衣子が口頭発表を行った。

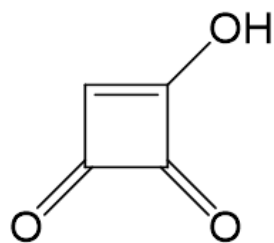
4. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms "Approaches for risk analysis and food safety" in 56th UJNR、開催日：2024 年 9 月 16～17 日、開催場所：東京都・星陵会館、概要：新興カビ毒の分析法の開発と汚染実態について、研究代表者 吉成知也が口頭発表を行った。
5. The 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS2024)、開催日：2024 年 10 月 23～25 日、開催場所：イタリア・Palazzo dei Congressi、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、研究分担者 渡辺麻衣子がポスター発表を行った。
6. 第 120 回日本食品衛生学会学術講演会、開催日：2024 年 11 月 7～8 日、開催場所：中部大学、概要：デオキシニバレノールの産生に対するキチン生合成阻害剤ポリオキシンの影響について、研究代表者 吉成知也が口頭発表を行った。
7. 第 120 回日本食品衛生学会学術講演会、開催日：2024 年 11 月 7～8 日、開催場所：中部大学、概要：国内流通穀類におけるモニリフォルミンの汚染実態調査の結果について、研究協力者 青木渉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