

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 (2022～2024 年度)

カビ毒の分析法の開発と汚染実態調査

研究分担者 吉成 知也 (国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部)

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」を行った。研究代表者の吉成は、2022 年度と 2023 年度には、同時分析法の開発と妥当性評価を、2024 年度には、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。これらの結果より、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。研究分担者の服部は、2022 年度には ELISA キット 4 種、2023 年度にはイムノクロマトキット 6 種の市販品の性能評価を行い、2024 年度には OTA の人工汚染小麦及び大麦を用いて、機器分析法の測定値との相関を検討した。その結果、一部のキットは OTA のスクリーニングに使用可能であることが示された。研究分担者の渡辺は、2024 年度に小麦における OTA 汚染原因菌について検討を行い、貯蔵中小麦の 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を示した。

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。吉成は、2022 年度と 2023 年度に穀類中の MON の分析法を開発し、2024 年度には合計 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 は麦類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。研究分担者の渋谷は、2022 年度にマウスを用いた MON の単回投与試験を、2023 年度にはマウスを用いた MON の 28 日間反復投与による一般毒性試験を実施した。さらに 2024 年度には、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。これらの結果から、MON はマウスにおいて腎臓を標的とすることが示唆された。渡辺は、2022 年度と 2023 年度に MON 生産菌について検討した。その結果、国内に流通する小麦、ライ麦及びトウモロコシから MON 生産株を検出し、MON 産生性 *Fusarium* 属菌の汚染状況を明らかにした。

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性が生じ、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、保管中の小麦での *Aspergillus* 属菌と *Penicillium* 属菌による OTA の汚染動態を解析する。

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、マウスを用いた毒性試験、及び MON 産生菌の分布の解析を行う。

研究方法、結果、考察、結論については、各分担研究報告書に詳細が記載してあるため、以下には概略のみ記載した。

B. 研究方法

(1) 基準値設定に係るカビ毒に関する研究

①多機能カラムを用いた DON と OTA の同時精製法

人工共汚染小麦 10 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) 50.0 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。振盪後の試料と抽出溶媒の混合物のうち、約 40 mL を 50 mL 容遠心チューブに移して遠心分離 (1,410 g、10 分間) し、抽出液を分離した。精製には、多機能カラム (PuriTox Total Myco-MS : R-Biopharm 社製) を用いた。抽出液 1.4 mL をカラムに加え、プランジャーを外筒にゆっくりと押し込み、抽出液を樹脂に通し、溶出液を 1.5 mL 容マイクロチューブに回収した。チューブ

中の溶出液を試験管ミキサーにかけて均一にした後、500 μ L を新たな 1.5 mL 容マイクロチューブに移した。精製水 500 μ L を加えて良く混ぜた後、12,000 g で 5 分間遠心し、その上清を LC-MS/MS 測定用試験溶液とした。

②OTA の簡易分析法の検討

3 濃度の添加回収試験により、市販の 4 種の ELISA キット、6 種のイムノクロマトキットについて、性能を評価した。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。

③OTA 生産菌の小麦上での生産条件の検討

OTA 産生性が確認された *P. verrucosum* NBRC 30181 及び *A. westerdijkiae* NIHS 3985 を用いて、加水率、温度、培養時間を変更した 4 条件で小麦培地で培養し、OTA 産生量を調べた。

(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、それぞれ破砕した。破砕した試料 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

投与する MON は超純水に水に溶解した。雄性 Crl:CD1(ICR)マウス (5 週齢) を試験に使用した。

③穀類中の MON 生産菌の解析

国内に流通する穀物検体のうち、100 μ g/kg 以上の濃度で MON に汚染されている検体を選抜し、*Fusarium* 属菌分離実験に使用した。各穀物検体 70 粒程度を 70%エタノールで表面洗浄後、滅菌蒸留水でリンスし、得られた洗浄済み穀物の水分を除去後、DRBC 平板培地上で培養した。培養後 *Fusarium* 属コロニーを PDA 平板培地へ釣菌して培養し、単離菌株とした。それら菌株について、MON 高生産培養条件を用いて培養し、培養液中の MON を HPLC-DAD 法で検出し、各株の MON 生産性を評価した。

C. 研究結果及び考察

(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

多機能カラムを用いた DON と OTA の同時分析法について、試験室間共同試験により妥当性の評価を行った。9 機関の測定値から得られた DON と OTA の回収率、 RSD_r 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。次に、この同時分析法が、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、人工汚染小麦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 と OTA とともに単独で分析した際の値と同時分析法による分析値は同等であった。この結果から、本事業で開発した多機能カラムを用いた同時分析法は、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。

②OTA の簡易分析法の検討

2022 年度に ELISA キット、2023 年度にイムノクロマトキットについて、添加回収試験による性能評価を行った。良好な結果が得られた 4 キットを選抜し、2024 年度には人工汚染麦類で性能を評価した。機器分析で得られた測定値とキットによる測定値の相関係数は良好であり、いずれのキットでも 0.96 を上回った。このことから、2024 年度に性能評価を実施した 4 キットはスクリーニングに使用可能であると考えられた。

③OTA 生産菌の小麦上での生産条件の検討

温度 25℃ で 2 週間培養した結果、*P. verrucosum* NBRC30181 を接種した小麦では加水率が高くなるに従い OTA 含有量も上昇し、今回検討した範囲での最大含水量 50% で OTA 含有量は最大となり、一方 *A. westerdijkiae* NIHS 3985 では含水率 40% で最大となった。温度 15℃ で小麦への加水率 50% で 4 週間培養した結果、*P. verrucosum* NBRC30181 と *A. westerdijkiae* NIHS 3985 の両株において、高濃度の OTA 産生性が認められた。これらの結果から、*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ことを確認した。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

①国内流通穀類加工品を対象とした汚染調査

単一試験室にて実施した MON の添加回収試験の結果は、いずれもクライテリアを満たしたことから、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。この分析法を用いて、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。ただ、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。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。

②MON の毒性試験

今回の雄マウスを用いた 28 日間試験では、腎臓で観察された変化に基づいて、最小毒性量（LOAEL 及び NOAEL）が決定された。すなわち、40 mg/kg 体重 MON/日 で尿細管再生が誘導され、腎臓の絶対重量の増加とともに、MON の単回投与後の尿細管壊死との関連が示唆された。MON (≥ 20 mg/kg 体重/日) も腎臓の絶対重量を増加させたが、これは近位尿細管上皮細胞の代謝活性化に関連している可能性がある。したがって、雄マウスに 28 日間反復経口投与した後の MON の LOAEL 及び NOAEL は、それぞれ 20 mg/kg 及び 10 mg/kg 体重/日であった。

③穀類中の MON 生産菌の解析

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。

D. 結論

麦類中の OTA については、厚生労働省の審議会において基準値が設定されることが 2023 年 12 月に決定された。基準値の設定と同時に公定法を通知する必要がある。本事業の一つ目のテーマ「基準値が設定されるカビ毒に関する研究」で開発した DON と OTA の同時分析法は、公定法として将来的に通知されることとなり、効率的な検査体制の構築に大きく貢献する。また、OTA については、実態調査の結果を踏まえると陰性検体が多数を占めることが予想され、迅速なスクリーニング法による効率的な検査の実施が望まれる。本研究で実施した市販の OTA 測定用キットの検討は、OTA の検査において簡易検査法の採用が可能かどうかの判断根拠となるデータを提供し、公定法の策定に大きく貢献する。二つめのテーマ「新興カビ毒 MON についての研究」が対象とする MON については、EFSA においてリスク評価が行われたものの、ヨーロッパ以外の地域における汚染実態や毒性のメカニズムに関する情報が不足しており、十分な評価がなされたとは言えない状況にある。そのため、本研究が提供する汚染実態、産生菌種や毒性に関する用量依存性等の結果は、今後 JECFA においてリスク評価がなされる際に活用され、国際機関へ貢献するとともに、日本においてリスク管理を行う必要性を議論するための根拠デ

ータとしても活用され、行政施策に直接貢献する。

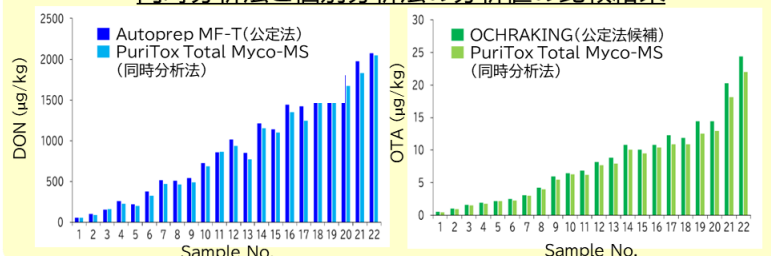
本研究の成果の概要-1

「テーマ①基準値が設定されるカビ毒に関する研究」の結果

1) デオキシニバレノールとオクラトキシンAの 同時分析法の開発

DONとOTAの人工共汚染小麦を調製し、公定法で個別に測定した場合の測定値と同時分析法の測定値を比較した。

同時分析法と個別分析法の分析値の比較結果

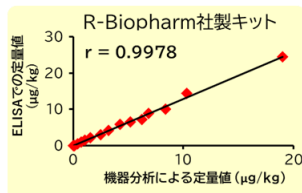


→開発した同時分析法は、公定法とほぼ同等の測定値が得られ、実用化可能なものであることが明らかとなった。

2) 市販のOTA測定用簡易迅速キットの性能評価

ELISA及びイムノクロマトキット2製品ずつで、OTA人工汚染麦の分析を行い、機器分析による測定値と比較した。

→機器分析の結果と相関性の高い分析値が得られ、検査法として利用可能であることが明らかとなった。

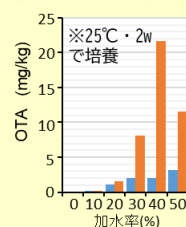


3) 小麦におけるOTA汚染機構の 解明

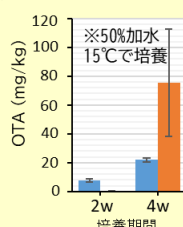
食品におけるOTA汚染の主な原因菌の2菌種を用いて、OTA産生条件を検討



①小麦への加水率の影響



②低温下における検討



■ *P. verrucosum* ■ *A. westerdijkiae*

貯蔵温度が低温でも、小麦の含水量が十分かつ貯蔵期間が長期の場合、両カビによるOTA汚染が生じる可能性がある。

→小麦のOTA汚染のリスク因子を明らかにした。

本研究の成果の概要-2

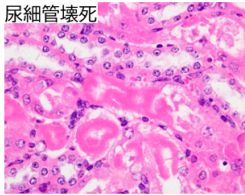
「テーマ②モニリフォルミンに関する研究」の結果

1) MONの毒性試験

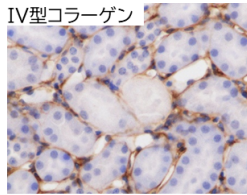
MONの腎毒性の作用機序を明らかにするために、マウスにMONを40 mg/kg単回経口投与し、6時間後の腎皮質でRNA-Seq解析、24時間後の腎臓でIV型(基底膜)コラーゲンの免疫染色を実施した。

- 6時間後では、代謝反応や外因性因子に対する応答に関連した遺伝子(*Cyp3a13*, *Cyp26b1*, *Cyp4f15* など)が上方制御された。
- 24時間後では、MON投与による壊死尿細管において基底膜の保持が確認された。

尿細管壊死



IV型コラーゲン



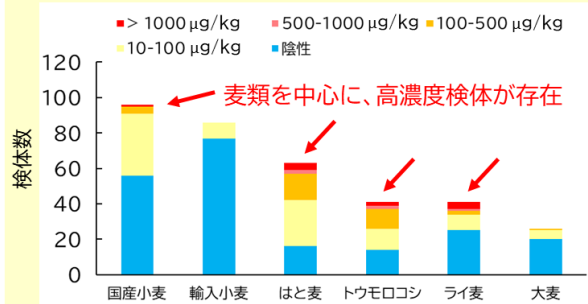
MONの腎毒性の機構は、MON又はその代謝産物が尿細管細胞を直接障害することによるものであることが示唆された。

→3年間でMONが腎毒性を有することを明らかにし、リスク管理に必要な情報の取得が完了。

2) MONの分析法の開発と汚染調査

昨年度までに開発・妥当性の検証を行った分析法を用いて、国内に流通する穀類(小麦、大麦、ライ麦、はと麦及びコーン、米)合計399検体におけるMON汚染濃度を調べた。

各穀類におけるMONの汚染濃度の分布



国産の小麦粉で1 mg/kgを超える濃度のMONが検出される検体があり、小麦製品がMONのばく露源となっている可能性が考えられた。しかし、急性毒性をもたらすレベルではないことが確認された。

→食品中のMON濃度を規制する必要があるか否の判断のための科学的根拠の取得が完了。