

令和6年度 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

分担研究報告書

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（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

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、昨年度の調査結果を受けて、培養法、分子生物学的手法、質量分析法を用いて、引き続き分析法の改良を行い、さらに、真菌・細菌・マイコトキシンについては、流通製品での汚染の実態調査を行った。真菌・細菌の分布実態については、31 昆虫食製品の調査を行った。その結果、今回供試した検体においては *Bacillus* 属が、非加熱製品では生菌の *Staphylococcus* 属菌および真菌が、比較的高頻度・高濃度で分布することが確認された。特に黄色ブドウ球菌やセレウス菌等の汚染リスクに留意する必要がある。また昆虫食製品の培養によらない迅速・簡便な細菌叢把握手法として、NGS 法が有用であることを確認した。マイコトキシンの分析については、昨年度検討した分析法を改良後、35 製品の調査を行った結果、2 製品からアフラトキシン B₁ が、4 製品からデオキシニバレノールが検出された。寄生虫の検出法については、リアルタイム PCR 法を用いて、ほとんどの昆虫食から赤痢アメーバおよびフォーラーネグレリアを低濃度でも検出することが可能であることを示した。しかし、今回、トキソプラズマ検出法については、トキソプラズマとその近縁原虫の DNA が陰性の昆虫食検体の入手が難しかったため、検討した検出法の評価が不可能であった。しかしフォーラーネグレリアおよびトキソプラズマまたはその関連種の製品への混入が示唆された。乾燥状態または冷凍状態の昆虫食中でこれらの原虫が感染性を有したまま残存するか、または関連原虫がヒトに健康影響を及ぼす種であるのかは不明であり、今後の原虫の分類や毒性に関する情報収集が必要である。昆虫食の喫食による真菌・細菌・寄生虫の汚染を原因とした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。

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
西角 光平	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

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。

A. 研究目的

コオロギやミルワームを中心とした昆虫食は、既に食品として認定された国も多く、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

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、小麦と大麦でのオクラトキシン A (OTA) の基準値設定が了承された。そのため、昆虫食においてこれらマイコトキシンの汚染実態を把握する意義は大きい。

昆虫食を汚染す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、土壌や水を汚染することが知られる寄生虫の汚染を想定し、汚染実態調査を実施する。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、今年度は、昨年度の調査結果を受けて、培養法、分子生物学的手法、質量分析法を用いて、引き続き分析法の改良を行い、さらに、真菌・細菌・マイコトキシンについては、流通製品での汚染の実態調査を行った。

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。オケラ 1 製品、コオロギ 12 製品、ワーム 2 製品、カイコ 3 製品、ハエ 2 製品、バッタ 3 製品、カメムシ 1 製品、ハチ 5 製品、アリ 1 製品、セミ 1 製品の合計 31 製品を市場で購入し収集した。そのうち 20 製品は加熱乾燥、10 製品は非加熱冷凍、1 製品は缶詰であった。これらは真菌・細菌培養検出法およびマイコトキシン分析に供試し、これら

の詳細の一覧を表 1 に示した。また、これらの供試検体とは別に、アリ 1 製品、コオロギ 2 製品、カイコ 2 製品、ワーム 2 製品、ハチ 1 製品の合計 8 製品を市場で購入して収集し、次世代シーケンスによるアンプリコンシーケンス解析での網羅的な細菌叢解析 (NGS 法) および寄生虫のリアルタイム検出法開発に供試した。これらの詳細の一覧を表 2 に示した。

(2) 真菌・細菌の検出

昨年度の調査結果を参照し、流通昆虫食から検出された細菌叢の中で、食中毒菌として重要性が高く、かつ検出される可能性が高い細菌群を選択し、*Stachylococcus* 属菌 (黄色ブドウ球菌を含む) および *Bacillus* 属菌 (セレウス菌を含む) の汚染実態を調査した。

① 培養法による汚染菌の分離

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。*Bacillus* 属菌については、芽胞形成菌のため、栄養体を死滅させ芽胞体のみの菌数を測定するため、試験原液をストマッカー袋に入れ 75 °C で 30 分間加熱した液の 2 種類を区別して、菌分離実験に供した。試験原液は PBS ×1 を用いて 10 倍段階希釈した後、検出対照菌の種類に応じた選択培地に塗抹した。真菌検出の目的で Dichloran

Rose-Bengal Chloramphenicol (DRBC) 寒天培地および Dichloran-Glycerol (DG-18) 寒天培地、*Stachylococcus* 属菌検出の目的で Baird-Parker 寒天培地¹⁾、*Bacillus* 属菌検出の目的で NaCl Glycine Kim and Goepfert

(NGKG) 寒天培地¹⁾、計 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 DG18 培地は 25 °C で 7 日間の好気培養を行った。Baird-Parker 寒天培地は 37 °C で 2 日間の好気培養を行った。NGKG 寒天培地は、非加

熱試験原液と加熱試験原液それぞれを塗抹後、32℃で1日間の好気培養を行った。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1gあたりのcfuを算出し、cfu/gの単位を用いて表わした。

②分離株の分類・同定

真菌の分類については、DRBC培地およびDG18培地上に形成されたコロニーの形態学的指標によって分類した。コロニーを目視および実体顕微鏡にて観察し、糸状菌と酵母に区別して計測した。さらに、糸状菌についてはその中でも分析対象マイコトキシン7種(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、DON、OTAおよびゼアラレノン(ZEN))それぞれの産生菌が含まれる *Aspergillus* section *Flavi*、*Aspergillus* section *Circumdati* および *Fusarium* 属菌のいずれかであるかを判定した。

細菌の分類については、NGKG寒天培地に生育したコロニーのうち *Bacillus* 属菌以外のコロニーも生育している可能性を考慮し、最大20株を無作為に選び、グラム染色後に顕微鏡観察で桿菌のみを *Bacillus* 属菌と判断し、その割合を培地全体の生菌数に掛け合わせることで、*Bacillus* 属菌のcfuを算出した。同様に、Baird-Parker寒天培地に生育したコロニーのうち、*Staphylococcus* 属菌以外のコロニーも生育している可能性を考慮し、最大20株を無作為に選び、グラム染色後に顕微鏡観察で球菌のみを *Staphylococcus* 属菌と判断し、その割合を培地全体の生菌数に掛け合わせることで、*Staphylococcus* 属菌のcfuを算出した。

③アンプリコンシーケンス解析による網羅的細菌叢解析

B-(1)-①で上述の試験原液の10mLを遠沈管に入れ、9000rpmで10分間遠心分離し、得られた沈殿物からTakara NucleoSpin Soilを用いてDNA抽出を行った。このDNAを鋳型として細菌16S rDNA V3V4領域を標的としたアンプリコンライブラリ作製を行った。1stPCRでは、プライマーセットは、1st_PCR_V3V4f_MIX (341f) : ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-CCTACGGGNGGCWGCAG および 1st_PCR_V3V4r_MIX(805r) : GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-GACTACHVGGGTATCTAATCCを、PCR酵素はTks Gflex DNA Polymeraseを用いた。得られたPCR産物をAMPureBeadsで精製後、Nextera XT index kitを用いてIllumina社シーケンサー用のインデックスおよびアダプター配列を付加し、Miseqでシーケンスを行った。得られたリードについて、アダプター除去後、リード内の全塩基がQ値10以上となるようにトリムおよびフィルタし、リード配列を得た。そこからパイプラインQiime2上でDADA2を用いてリードの代表配列を取得した。これら配列に対してblastによって細菌属のアサインメントを行い、その結果を昆虫製品検体ごとに集計して、各細菌属の存在比率を算出した。

(3) 質量分析法によるマイコトキシンの検出

2023年度には、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、AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、DON、OTAおよびZEN、以上7種のマイコトキシンの一斉分析法の性能評価を実施した。今年度は、その分析法を用いて市販の昆虫食35検体中のマイコトキシンの分析を行った。また、一部のマイコトキシンの回収率を向上させるために、抽出溶媒の組成を変更したため、添加回収試験を今年度も実施した。

①7種のマイコトキシンの検出法

破砕した検体 6 g を 50 mL 容のプラスチックチューブに量りとり、アセトニトリル-水 (80 : 20) 30 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。1,710 g で 10 分間遠心分離した後、上清 5 mL を回収し、PBS 35 mL を加えて混合し、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、自然落下で通過した。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した。2%の酢酸を含むメタノール 3 mL による溶出液を回収し、窒素気流により乾固後、1%の酢酸を含む 30%アセトニトリル水溶液 1 mL に溶解した。LC-MS/MS により計 7 種のマイコトキシンを定量した。

<LC-MS/MS の測定条件>

HPLC (LC-20A シリーズ、島津製作所)

カラム : InertSustain Swift C18 HP

(GL Sciences 社製)

2.1×150 mm, 3 μm

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 システム、ABSciex)

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

ゼアラレノン (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)、ZEN (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 30 μL ずつ添加回収試験用の検体に添加した。OTA 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、60 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。

③DON 汚染の確認試験

破砕した検体 2.5 g を 50 mL 容のプラスチックチューブに量りとり、蒸留水 20 mL を加え、30 分間振盪攪拌した。1,710 g で 10 分間遠心分離後、上清 10 mL を回収し、PBS 20 mL を加えて希釈し、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液 12 mL をイムノアフィニティーカラム (DON-NIV WB、VICAM 社製) に添加し、PBS 10 mL により洗浄後、さらに、精製水 10 mL で洗浄した。メタノール 0.5 mL とアセトニトリル 1.5 mL による溶出液を回収し、窒素気流により乾固した。残渣を 500 μL のアセトニトリル-水 (1 : 9) に溶解し、試験溶液とした。DON の定量は、①に記載の方法で行った。

④AFB₁ 汚染の確認試験

破砕した検体 5 g を 50 mL 容のプラスチックチューブに量りとり、アセトニトリル-水 (80 : 20) 20 mL を加え、30 分間振盪抽出を行った。

1,710 gで10分間遠心分離した後、上清 5 mL を回収し、PBS 20 mL を加えて混合し、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液 10 mL をイムノアフィニティーカラム(アフラキング、堀場製作所社製)に添加後、自然落下で通液した。PBS 10 mL により洗浄後、さらに精製水 10 mL で洗浄した。シリンジで残存する水分を除去後、アセトニトリル 3 mL による溶出液を回収し、窒素気流により乾固した。残渣を 1%のギ酸を含む 50%アセトニトリル水溶液 1 mL に溶解し、試験溶液とした。AFB₁ の定量は、①に記載の方法で行った。

(4) リアルタイム PCR 法による寄生虫検出

ヒト危害性の原虫類の汚染を想定し、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。今年度は赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*)、フォーラーネグレリア (*Naegleria fowleri*) に対する検査方法を対象とした。

① リアルタイム PCR 検出法

赤痢アメーバ、トキソプラズマ、フォーラーネグレリアの検出に使用した PCR プライマーは既報^{2,4)}を参考し、検出条件、試薬等を最適化した。最終的な検出方法を図 1-3 に示す。いずれの方法もネステッド PCR で、反応 1 の反応液を用いて反応 2 を行なった。

② DNA 添加回収試験

粉碎し均一にした昆虫食検体 170 mg に QIAamp DNA mini kit 付属の Buffer ATL 1.26 mL および Proteinase K 140 μ L を加え、検体懸濁液とした。その後、チューブを 56°C、2 時間加熱し、検体を溶解し、1,000 rpm、5 分間の遠心処理を行い、上清を回収した。上清を 200 μ L ずつ分注し、既知の濃度の陽性コントロール DNA を添加した。その後、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、図 1-3 に従い、各寄生虫 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検出法の検出感度を求めた。陽性コントロール DNA は各寄生虫の DNA 抽出液で、長崎大学熱帯医学研究所から分与いただいた。

C. 研究結果

(1) 真菌・細菌の検出

①培養法による汚染菌の検出

真菌・細菌では昆虫食 31 製品から培養試験を行い、17 製品 (検出率 54.8%) から

Bacillus 属菌を検出し、最高濃度は栄養体では 24-017 コガタスズメバチで 5.8 log cfu/g、芽胞体で 24-009 イエバエの 4.2 log cfu/g であった

(図 4-a)。8 製品 (検出率 25.8%) から

Staphylococcus 属菌を検出し、最高濃度は 24-017 コガタスズメバチで 6.5 log cfu/g であった

(図 4-b)。8 製品 (検出率 25.8%) から真菌を検出し、糸状菌と酵母の合計の最高濃度は

24-021 オオスズメバチで 6.8 log cfu/g であった (図 5)。

さらに、昆虫食製品を、非加熱冷凍製品と加熱乾燥製品とに分類し、それぞれの群での傾向を比較したところ、*Bacillus* 属菌では非加熱冷凍製品で 14 中 8 製品 (57.1%)、加熱乾燥製品で 16 中 9 製品 (56.3%) から検出された。*Staphylococcus* 属菌では非加熱冷凍製品で 14 中 6 製品 (42.9%)、加熱乾燥製品で 16 中 2 製品 (12.5%) から検出された。真菌では非加熱冷凍製品で 14 中 7 製品 (50.0%)、加熱乾燥製品で 16 中 1 製品 (6.3%) から検出された。したがって、*Bacillus* 属菌でのみ、加熱乾燥製品と非加熱冷凍製品で生菌の検出率が同等の傾向が見られた。

③アンプリコンシーケンス解析による網羅的細菌叢解析

今年度、昆虫食 6 製品のアンプリコンシーケンス解析を実施し、その結果を図 6 に示した。NGS 法では、供試した 6 検体中 4 検体で、全検出細菌のうち約 30%~50%を *Lactococcus* 属(乳酸菌)・エンテロバクター科に属する細菌群(動物の腸内細菌)が占めていたことを確認した。*Streptococcus* 属(ツムギアリ・カイコ)、*Bacillus* 属(ツムギアリとコガタスズメバチを除くサンプル)、*Acinetobacter* 属(全サンプル)など、食中毒原因菌種を含む属が多く含まれていた。また、得られた結果は、昨年度実施した、同一検体の培養法による菌叢解析結果(図 7)と比較した。細菌の属の数は、NGS 法では培養法よりも多く認識でき、難培養性の菌や死滅菌などの培養法では検出できなかった食中毒菌の分布が確認できた。ただし NGS 法で得られた結果は定量的なデータではないことに留意する必要がある。NGS 法では、培養法で生菌が非検出となった昆虫食製品 23-001、23-002 および 23-009 でも菌が検出でき、それぞれ *Streptococcus* 属菌、*Pediococcus* 属菌、*Entomoplasma* 属菌が占有的に分布していたことが明らかとなった。培養法で生菌が検出できていた 23-003、23-006 および 23-007 については、培養法で占有的に分布していたことを把握していた、それぞれ *Bacillus* 属菌、*Lactococcus* 属菌および *Staphylococcus* 属菌も、比較的高比率で検出され、培養法と矛盾はなかった。なお *Staphylococcus* 属菌については図 6 中では Others に含めたが、今回検出された全リードのうち 23-006 では 1.3%、23-007 では 3.2%の比率で、検出できた。

(2) 質量分析法によるマイコトキシン検出

食用昆虫 8 検体について、アフラトキシン 4 種:それぞれ 2.5 µg/kg、DON: 500 µg/kg、OTA: 5 µg/kg、ZEN: 50 µg/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 31.7~65.9%、47.1~58.2%、42.5~62.2%、49.4~65.6%、93.1~123.3%、46.8~75.3%および 53.5~103.9%の範囲内であった。この分析法を用いて、食用昆虫 35 検体を分析した結果、検体 24-028(タイ産のカイコの蛹)および 24-040(タイ産のカイコ成虫)から AFB₁がそれぞれ 0.6 および 0.2 µg/kg 検出された。また、検体 24-002、005、026 及び 027(いずれもタイ産のコオロギ)から DON が 7~19 µg/kg の濃度範囲で検出された(表 4)。なお、様々な食用昆虫を分析した結果、バックグラウンドのシグナルが認められた検体が存在したため、各マイコトキシンの検出限界値は、それらシグナルの影響を無視できる濃度に設定した。また、AFB₁又は DON が検出された検体について、確認のためにそれぞれのマイコトキシン精製のイムノアフィニティーカラムを用いた分析を行った(表 5)。その結果、いずれの検体においても 7 種のマイコトキシン同時分析法による定量値とほぼ同等の定量値が得られた。

(3) リアルタイム PCR 法による寄生虫検出法

DNA 添加回収試験を実施した結果を表 6 に示した。赤痢アメーバを検出する場合、検体 1g あたり 0.3~33.3 ng DNA 以上の検出感度であった。一方、フォーラーネグレリアでは、23-001、23-003 および 23-006 は添加した DNA を検出することができたが、それ以外の 3 検体では、DNA 非添加の陰性コントロール検体でも陽性となり(表 6)、添加した DNA の回収効率を評価できなかった。この際増幅した PCR 産物が真にフォーラーネグレリアの DNA 由来であるのか、または非特異的増幅による擬陽性であるのかを判断するため、PCR 産物のシーケンスを行い、NCBI

のデータベース登録配列に対して BLAST 検索を実施したところ、フォーレーネグレリアの登録配列と一致した。トキソプラズマでも、全検体同様の結果となったため（表 6）、PCR 増副産物のシーケンスを行ったところ、原虫アピコンプレックス門に分類される未同定生物の登録配列と一致した。

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。細菌では、*Bacillus* 属菌および *Staphylococcus* 属菌の生菌が多く分布していたことが明らかとなった。特に *Bacillus* 属菌については、加熱乾燥製品からも高頻度・高濃度で生菌が検出された。セレウス菌を含む *Bacillus* 属菌は芽胞体を形成し耐熱性があるため、加工後の製品にも残存しやすい可能性が考えられた。これらは環境中に普遍的に存在し、食中毒の原因となるセレウス菌や黄色ブドウ球菌も含まれる。昆虫食の喫食による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。今回、非加熱冷凍製品と加熱乾燥製品両方で製品の入手が可能だった昆虫種はコオロギのみで、製品数が少なかったため、昆虫の種類別に微生物の検出率を比較することはできなかったが、非加熱冷凍製品の中ではハチ類で比較的真菌の検出濃度・頻度が高い傾向が見られたことから（図 4）、昆虫種類でも微生物の検出傾向が異なる可能性があると考えられた。今後は、非加熱冷凍製品と加熱加工製品、昆虫種類のどちらがより微生物汚染のリスクに影響を及ぼすかを詳細に評価するため、同一の昆虫種類においてサンプルの加工程度を変えた検体群を入手し、比較検討する必要がある。さらに、従来の培養法と NGS 法によって得た細菌叢解析結果を比較したところ、NGS 法の結果が培養法

の結果と矛盾せず、また培養法では菌非検出であった製品からも、菌叢把握が可能であったことが示された。このことから、昆虫食製品の培養によらない迅速・簡便な細菌叢把握手法として、NGS 法が有用であることを確認した。来年度以降は、生化学性状・遺伝子塩基配列を指標としてこれら分離株の同定を実施し食中毒菌として重要なセレウス菌・黄色ブドウ球菌の存在を確認すること、またそれらの毒素産生性を確認し、より詳細に昆虫食製品のリスクを評価する予定である。

マイコトキシンの検出については、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 µg/kg で 60~115%、100 µg/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 µg/kg のクライテリアを参考にすると、一部の検体において回収率の下限を下回った。DON と ZEN については 100 µg/kg~10 mg/kg のクライテリアを参考にすると、DON では 1 試料で回収率の上限を上回り、ZEN では 8 試料中 4 試料で回収率の下限を下回った。添加回収試験に用いた試料は昨年度と異なるが、抽出溶媒の組成を変更することにより、DON と ZEN で回収率が改善する傾向が認められた。この分析法を用い、食用昆虫におけるマイコトキシンの汚染実態を調べた結果、2 検体から AFB₁、4 検体から DON が検出された。AFB₁ の検出濃度については、全食品に対して設定されている規制値（4 種のアフラトキシンの総和 10 µg/kg）を下回っていた。また、DON の検出濃度については、小麦に設定されている基準値（1.0 mg/kg）を大きく下回っていたことから、これらマイコトキシンが検出された昆虫食製品を摂取したとしても、直ちに健康に影響が生じることはないと考えられた。昆虫食にマイコトキシン汚染が生じるメカニズムは不明であるが、昆虫の飼育に用いられた餌に混入していたマイコトキシンが昆虫に残存したことや、飼育中の昆虫にかびが感染してマイコトキシンを

昆虫内に産生したこと等が考えられる。来年度も汚染調査を行い、昆虫食において汚染が生じているマイコトキシンを明らかにする。

赤痢アメーバに関しては、検体 23-004（ヨーロッパエコオロギ）の検出感度が悪かったが、食品からの原虫の検出を考えた場合、それ以外の検体に関しては十分な感度を有していると考えられた。フォーラーネグレリアおよびトキソプラズマに関しては、DNA 非添加の陰性コントロール検体でも陽性となり（表 6）、添加した DNA の回収効率を評価できなかった。このことについて、考察するため、PCR 増幅産物のシーケンスを行い配列解析したところ、フォーラーネグレリアおよびトキソプラズマを含むアピコンプレックス門原虫の登録配列と一致した。今回は 110 bp の遺伝子塩基配列を解析したに留まったため、配列の種特異性が十分でなく、増幅した DNA が厳密なフォーラーネグレリアやトキソプラズマ由来であったかの判断はできないと考えるが、少なくとも、フォーラーネグレリアやトキソプラズマ、または PCR プライマーを設計した rRNA 遺伝子塩基配列 110 bp 上は違いを認識できないこれら原虫との関連種が、実際に昆虫食製品に混入していた可能性が高いと考えられた。フォーラーネグレリアおよびトキソプラズマの確からしい検出法を構築するには、これらの原虫の分類に関する情報を収集し、プライマー設計を工夫するなど、方法のさらなる改良が必要と考えられた。今回、昆虫食から検出されたフォーラーネグレリアまたはトキソプラズマとその関連種が、乾燥状態、あるいは冷凍状態の昆虫食中で感染性を有したまま残存するか、あるいは関連原虫がヒトに健康影響を及ぼす種であるのかは不明であるが、昆虫食には他にも未知の原虫が含まれていると予想され、昆虫食の取り扱いの際には、細心の注意を払い、喫食する際には十分な加熱を行うことが必要であると考えられた。来年度は、これまで構築

したリアルタイム PCR 検査法を用いての昆虫食製品中の汚染実態調査を行う予定である。

E. 結論

今回の調査では、31 昆虫食製品の調査を行った。その結果、これらにおいて *Bacillus* 属が、一部の非加熱製品からは生菌の *Staphylococcus* 属菌および真菌が、比較的高頻度・高濃度で分布したことが確認された。黄色ブドウ球菌やセレウス菌等の汚染リスクに留意する必要がある。また昆虫食製品の培養によらない迅速・簡便な細菌叢把握手法として、NGS 法が有用であることを確認した。来年度は、実際に昆虫食製品から分離された黄色ブドウ球菌およびセレウス菌株における毒素産生性について評価する予定である。また、マイコトキシンの分析については、昨年度検討した分析法を改良後、35 製品の調査を行った。その結果、2 製品から AFB₁ が、4 製品から DON が検出され、昆虫食においてマイコトキシン汚染が生じている実態が明らかとなった。来年度も調査を継続し、食用昆虫を汚染するマイコトキシンを明らかにする。さらに、寄生虫の検出法については、リアルタイム PCR 法を用いて、ほとんどの昆虫食から赤痢アメーバおよびフォーラーネグレリアを低濃度でも検出することが可能であることを示した。しかし、今回、トキソプラズマ検出法については、トキソプラズマとその近縁原虫の DNA が陰性の昆虫食検体の入手が難しかったため、検討した検出法の評価が不可能であった。今回検出されたフォーラーネグレリアおよびトキソプラズマまたはその近縁原虫が、乾燥状態、あるいは冷凍状態の昆虫食中で感染性を有したまま残存するか、あるいは近縁原虫がヒトに健康影響を及ぼす種であるのかは不明であるが、昆虫食には他にも未知の原虫が含まれていると予想され、さらなる種の確認実験およびヒトへの毒性に関する情報収集が必要である。来年度は、これまで構築したリアルタイム PCR 検査法を用いて

の昆虫食製品中の汚染実態調査を行う予定である。

昆虫食の喫食による真菌・細菌・寄生虫の汚染を原因とした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。

F. 参考文献

- 1) 鵜飼良平. 食品衛生検査指針微生物編 改定第2版, 2018 公益社団法人日本食品衛生協会 pp_324-329, 363-371.
- 2) Haque, R. et al. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36, 449-452.
- 3) 浅井ら. トキソプラズマ脳炎の PCR 検査法, *脳神経科学*, 2013, 53, 1194-1195
- 4) Rebecca, C. et al. The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples

by nested PCR, *Parasitol. Res.*, 2004, 93, 211–217.

G. 研究業績

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. 本研究で真菌・細菌培養およびマイコトキシン分析に供試した昆虫食一覧

検体番号	昆虫種名（和名） または不確かな種名	昆虫種名（学名）	製品の 状態	加熱の 有無
24-001	オケラ	<i>Gryllotalpa orientalis</i>	乾燥	加熱
24-002	ヨーロッパイエコオロギ	<i>Acheta domesticus</i>	乾燥	加熱
24-003	ジャマイカンコオロギ	<i>Gryllus assimilis</i>	乾燥	加熱
24-004	ヨーロッパイエコオロギ	<i>Acheta domesticus</i>	乾燥	加熱
24-005	ヨーロッパイエコオロギ	<i>Acheta domesticus</i>	乾燥	記載なし
24-006	カイコ	<i>Bombyx mori</i>	冷凍	非加熱
24-007	ツヤケシオオゴミムシダマシ	<i>Zophobas morio</i>	乾燥	加熱
24-008	タケツトガ	<i>Omphisa fuscidentalis</i>	乾燥	加熱
24-009	イエバエ	<i>Musca domestica</i>	冷凍	非加熱
24-010	イエバエ	<i>Musca domestica</i>	冷凍	非加熱
24-011	フタホシコオロギ	<i>Gryllus bimaculatus</i>	冷凍	非加熱
24-012	オオコオロギ	不明	乾燥	加熱
24-013	フタホシコオロギ	<i>Gryllus bimaculatus</i>	乾燥	加熱
24-014	ジャマイカンコオロギ	<i>Gryllus assimilis</i>	乾燥	加熱
24-015	ワタリバッタ	不明	乾燥	加熱
24-016	カメムシ	不明	乾燥	加熱
24-017	コガタスズメバチ	<i>Vespa analis</i>	冷凍	非加熱
24-018	キイロスズメバチ	<i>Vespa simillima</i>	冷凍	非加熱
24-019	キイロスズメバチ	<i>Vespa simillima</i>	冷凍	非加熱
24-020	オオスズメバチ	<i>Vespa mandarinia</i>	冷凍	非加熱
24-021	オオスズメバチ	<i>Vespa mandarinia</i>	冷凍	非加熱
24-022	バッタ（非ワタリバッタ）	不明	乾燥	加熱
24-023	ジャマイカンコオロギ	<i>Gryllus assimilis</i>	乾燥	加熱
24-024	タイワンオオコオロギ	<i>Brachytrupes portentosus</i>	乾燥	加熱
24-025	バッタ	不明	乾燥	加熱
24-026	ヨーロッパイエコオロギ	<i>Acheta domesticus</i>	乾燥	記載なし
24-027	フタホシコオロギ	<i>Gryllus bimaculatus</i>	乾燥	加熱
24-028	カイコ	<i>Bombyx mori</i>	乾燥	加熱
24-029	ツムギアリ	<i>Oecophylla smaragdina</i>	缶詰	缶詰
24-030	スジアカクマゼミ	<i>Cryptotympana atrata</i>	乾燥	加熱
24-031	カイコ	<i>Bombyx mori</i>	冷凍	非加熱

表 2. 本研究で細菌叢 NGS 解析および寄生虫リアルタイム PCR 法分析に供試した
昆虫食一覧

検体番号	昆虫種名（和名）	昆虫種名（学名）	製品の 状態	加熱の 有無
23-001	<i>Bombyx mori</i>	カイコ	乾燥	有
23-002	<i>Tenebrio molitor</i>	チャイロコメノゴミムシダマシ	乾燥	有
23-003	<i>Acheta domestica</i>	ヨーロッパイエコオロギ	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</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	記載無し

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 (昆虫種)	各マイコトキシンの回収率 (%、平均値±標準偏差)											
	AFB ₁		AFB ₂		AFG ₁		AFG ₂		DON		OTA	
24-005 (ヨーロッパ イエコオロギ)	65.9	± 3.1	57.7	± 1.2	58.9	± 2.6	65.6	± 2.0	123.3	± 4.2	65.4	± 3.4
24-006 (蚕の成虫)	52.3	± 2.4	50.5	± 1.7	45.4	± 2.5	49.4	± 4.1	103.6	± 3.2	69.4	± 3.8
24-007 (スーパーワーム)	51.4	± 3.1	47.1	± 3.2	51.8	± 3.5	56.8	± 2.5	100.1	± 8.8	46.8	± 5.7
24-009 (イエバエの幼虫)	61.9	± 2.7	52.8	± 1.2	57.4	± 1.3	61.1	± 2.3	109.0	± 1.5	75.3	± 7.3
24-015 (ワタリバッタ)	53.6	± 1.8	54.6	± 1.9	62.2	± 4.0	56.5	± 4.4	104.8	± 1.9	53.6	± 2.0
24-017 (スズメバチ)	64.6	± 2.4	54.4	± 1.6	42.5	± 0.5	52.6	± 2.5	93.1	± 2.0	68.7	± 4.8
24-029 (ツムギアリの卵)	31.7	± 3.6	57.0	± 2.9	57.2	± 3.3	61.3	± 6.6	96.6	± 3.1	63.6	± 4.6
24-031 (蚕の蛹)	58.6	± 1.8	58.2	± 2.7	46.4	± 4.5	53.9	± 1.8	98.0	± 1.3	63.8	± 4.6

表 4. 2024 年度の食用昆虫検体におけるマイコトキシンの汚染実態

検体番号	マイコトキシン濃度 (μg/kg)						
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	DON	OTA	ZEN
25-001	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-002	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	19	< 0.2	< 5
25-003	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-004	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-005	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	12	< 0.2	< 5
25-006	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-007	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-008	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-009	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-010	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-011	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-012	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-013	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-014	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-015	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-016	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-017	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-018	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-019	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-020	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-021	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-022	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-023	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-024	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-025	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-026	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	7	< 0.2	< 5
25-027	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	12	< 0.2	< 5
25-028	0.6	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-029	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-030	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-031	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-032	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-036	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-040	0.2	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5
25-041	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 5	< 0.2	< 5

表 5. マイコトキシンが検出された検体における確認試験の結果

1) AFB₁ 汚染の確認

検体番号	AFB ₁ ($\mu\text{g/kg}$)
25-028	0.9
24-040	0.2

2) DON 汚染の確認

検体番号	DON ($\mu\text{g/kg}$)
24-002	10
24-005	7
24-026	7
24-027	9

表 6. 昆虫食中の寄生虫 DNA の検出感度

検体名	検出感度 (ng/検体 1g)		
	赤痢アメーバ	フォーラーネグレリア	トキソプラズマ
23-001	0.3	33.3	測定不能*
23-002	0.3	測定不能*	測定不能*
23-003	3.3	3.3	測定不能*
23-004	33.3	測定不能*	測定不能*
23-005	0.3	測定不能*	測定不能*
23-006	0.3	3.3	測定不能*
23-007	0.3	測定不能*	測定不能*
23-009	3.3	測定不能*	測定不能*

*陰性コントロール検体でも陽性の結果となったため、添加回収試験を行えなかった。

PCR1

- 反応液

KOD One PCR Master Mix Blue	25 μ L
E1 (50 μ M)	0.3 μ L
E2 (50 μ M)	0.3 μ L
Template	5.0 μ L
H ₂ O	19.4 μ L

- プログラム

98°C 10 sec
43°C 5 sec
68°C 10 sec ×40

PCR2 サーマルサイクラーの設定を 25 μ L から 50 μ L に変更すること

- 反応液

KOD One PCR Master Mix Blue	25 μ L
EH1 (50 μ M)	0.3 μ L
EH2 (50 μ M)	0.3 μ L
PCR1 の反応液	5.0 μ L
H ₂ O	19.4 μ L

- プログラム

98°C 10 sec
62°C 5 sec
68°C 10 sec ×40

- プライマー

E1 : 5'-TTTGTATTAGTACAAA-3'
E2 : 5'-GTA(A/G)TATTGATATACT-3'
EH1 : 5'-AATGGCCAATTCATTCAATG-3'
EH2 : 5'-TTTAGAAACAATGCTTCTCT-3'

- 判定

反応 2 後の電気泳動で 900 bp の DNA 断片が得られれば陽性とする。

図 1. 赤痢アメーバー検出用 PCR 条件

PCR1

- 反応液

KOD One PCR Master Mix Blue	25 μ L
Toxoplasma1-F (50 μ M)	0.6 μ L
Toxoplasma1-R (50 μ M)	0.6 μ L
Template	5.0 μ L
H ₂ O	18.8 μ L

- プログラム

98°C 10 sec

42°C 5 sec

68°C 10 sec × 40

PCR2

- 反応液

KOD One PCR Master Mix Blue	25 μ L
Toxoplasma2-F (50 μ M)	0.6 μ L
Toxoplasma2-R (50 μ M)	0.6 μ L
PCR1 の反応液	5.0 μ L
H ₂ O	18.8 μ L

- プログラム

98°C 10 sec

42°C 5 sec

68°C 10 sec × 40

- プライマー

Toxoplasma1-F : 5'-CCATGCATGTCTAAGTATAAGC-3'

Toxoplasma1-R : 5'-GTTACCCGTCCTGCCCAC-3'

Toxoplasma2-F : 5'-CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC-3'

Toxoplasma2-R : 5'-TGCCACGGTAGTCCAATAC-3'

- 判定

反応 2 後の電気泳動で 290 bp の DNA 断片が得られれば陽性とする。

図 2. トキソプラズマ検出用 PCR 条件

PCR1

- 反応液

KOD One PCR Master Mix Blue	25 μ L
Negleria1-F (50 μ M)	0.6 μ L
Negleria1-R (50 μ M)	0.6 μ L
Template	5.0 μ L
H ₂ O	8.8 μ L

- プログラム

98°C 10 sec
65°C 5 sec
68°C 10 sec × 40

PCR2

- 反応液

KOD One PCR Master Mix Blue	25 μ L
Negleria2-F (50 μ M)	0.6 μ L
Negleria2-R (50 μ M)	0.6 μ L
PCR1 の反応液	5.0 μ L
H ₂ O	8.8 μ L

- プログラム

98°C 10 sec
55°C 5 sec
68°C 10 sec × 40

- プライマー

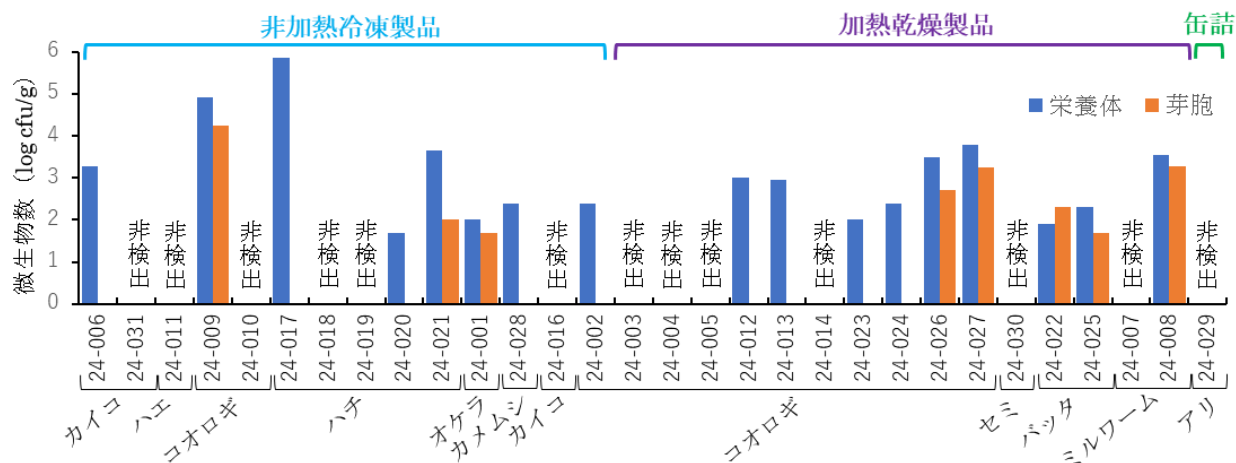
Negleria1-F : 5'-TCTAGAGATCCAACCAATGG-3'
Negleria1-R : 5'-ATTCTATTCACTCCACAATCC-3'
Negleria2-F : 5'-GTACATTGTTTTTATTAATTTCC-3'
Negleria2-R : 5'-GTCTTTGTGAAAACATCACC-3'

- 判定

反応 2 後の電気泳動で 110 bp の DNA 断片が得られれば陽性とする。

図 3. フォーラーネグレリア検出用 PCR 条件

b. *Bacillus* 属菌数 (NGKG 培地上のグラム陽性桿菌数)



a. *Staphylococcus* 属菌数 (Baird-Parker 培地上のグラム陽性球菌数)

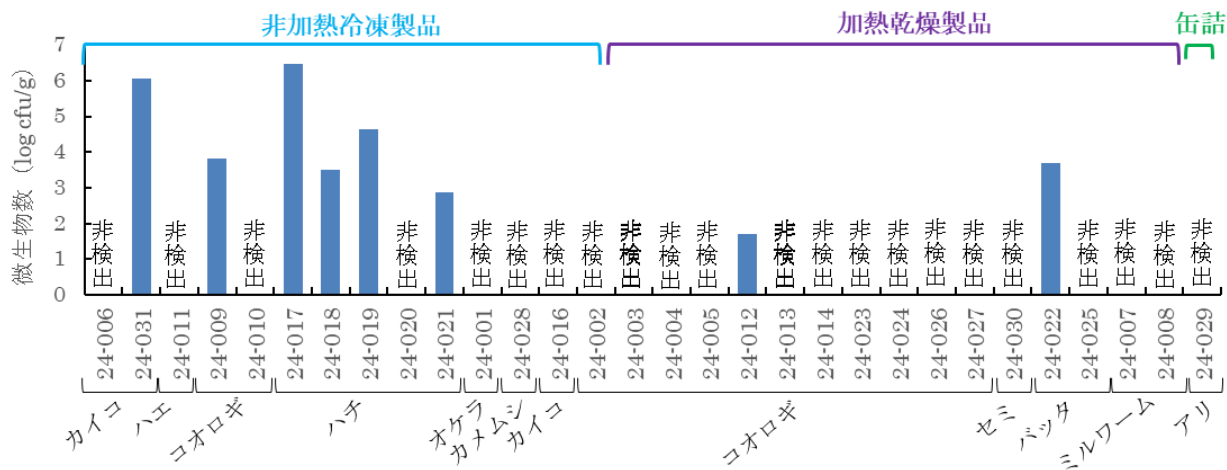


図 4. 培養法で検出した昆虫食製品の *Bacillus* 属および *Staphylococcus* 属生菌数の比較

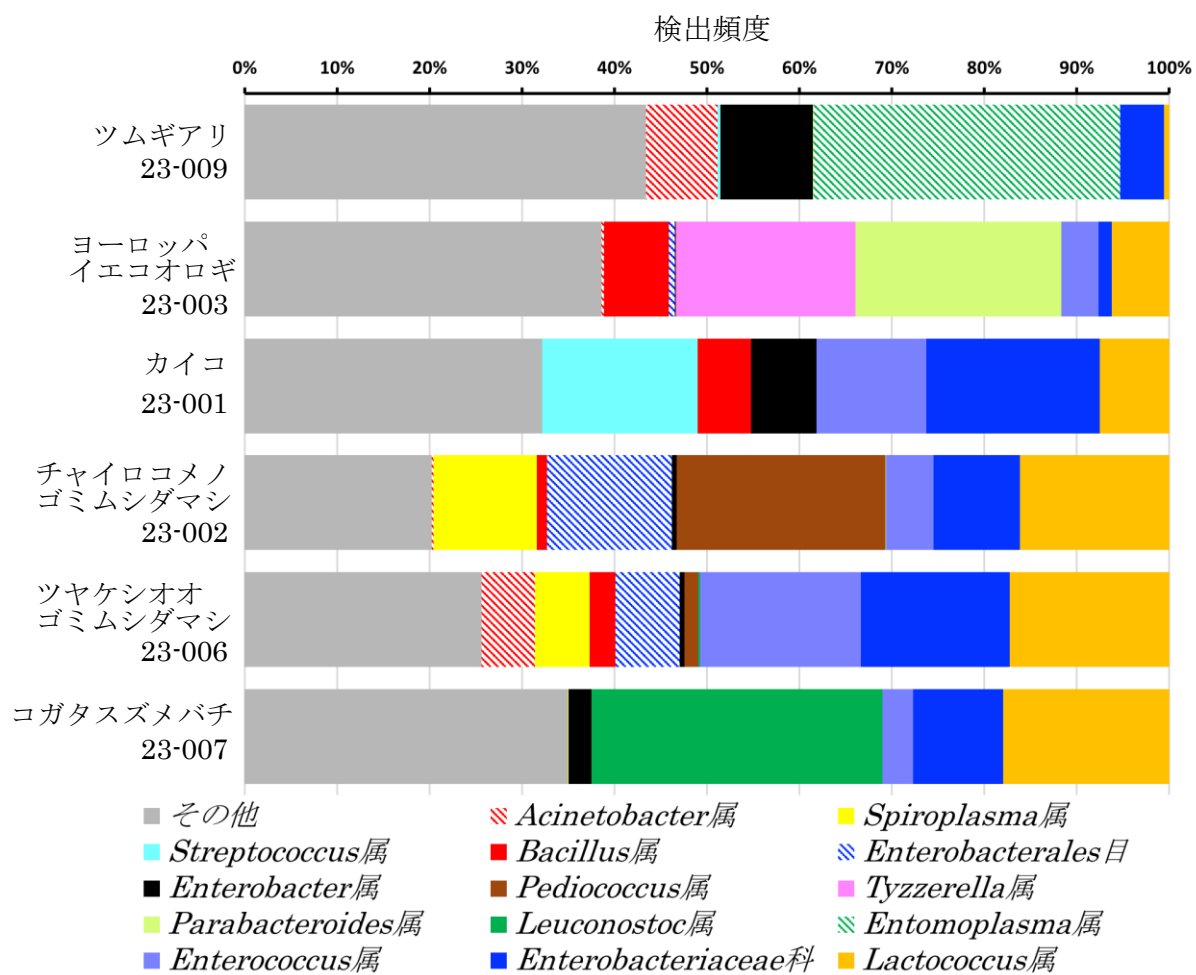


図 5. NGS 法で検出した昆虫食製品の細菌叢の比較

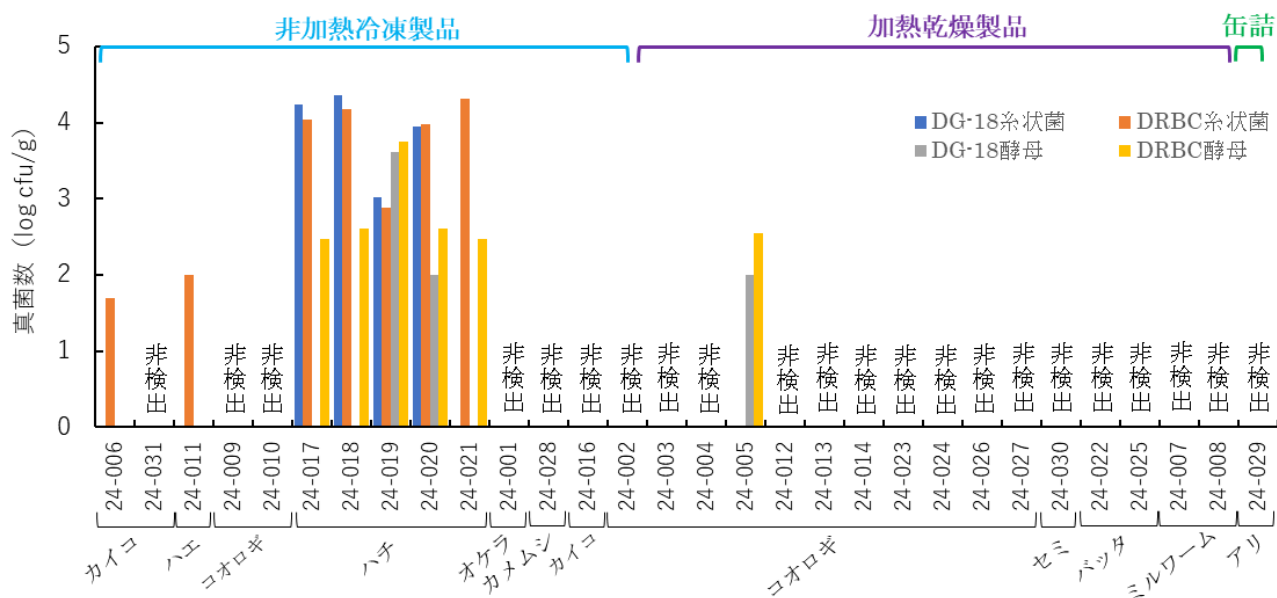
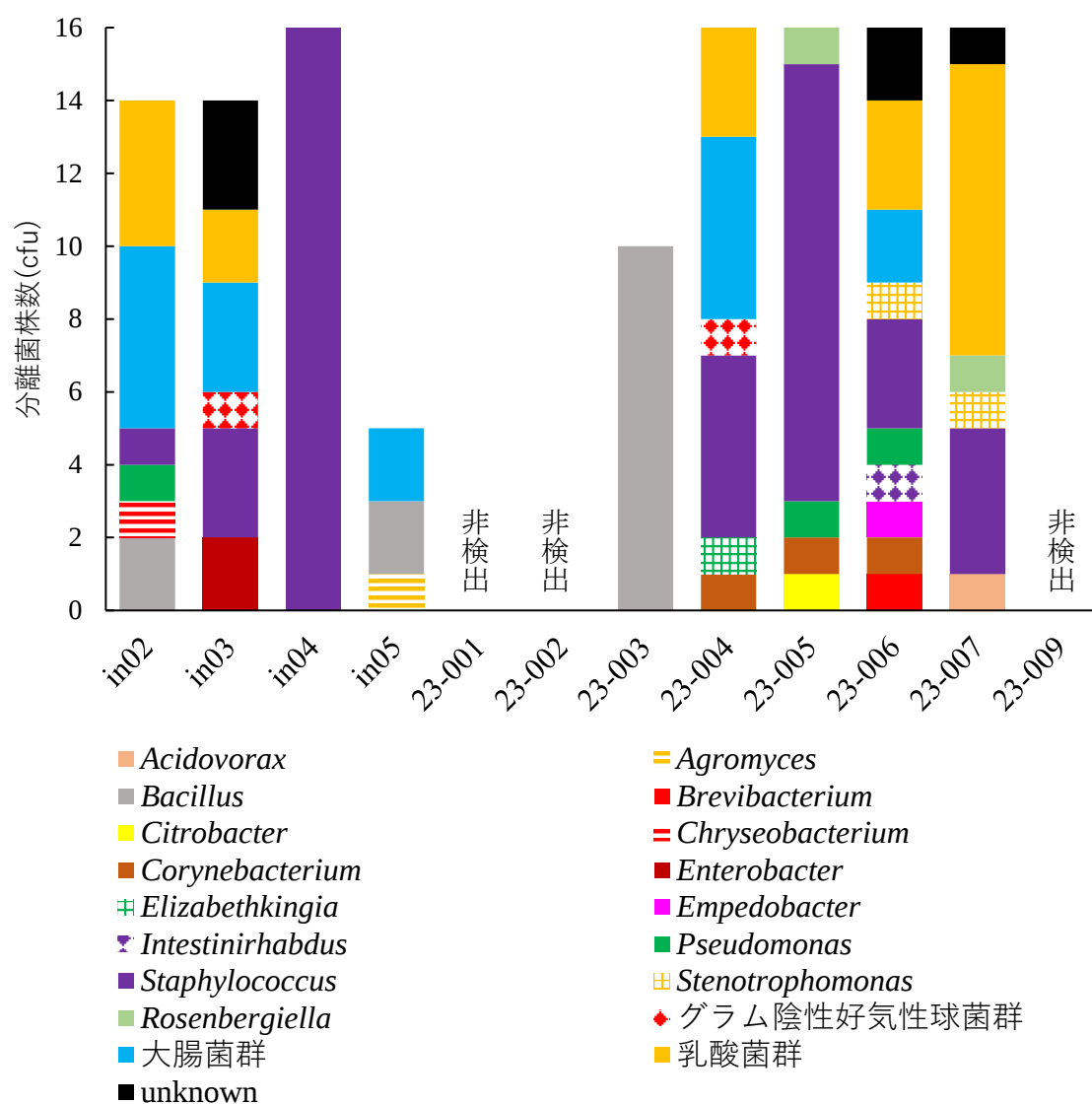


図 6. 培養法で検出した昆虫食製品の好湿性真菌および好乾性真菌の真菌生菌数の比較

好湿性真菌は DRBC 寒天培地で、好乾性真菌は DG-18 寒天培地で培養し、生菌数を測定した。24-009、24-010、24-021、24-001、24-007、24-008、24-029 の 5 検体では DG-18 培地を用いた計測は実施しなかった。



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

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

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

図 7. 培養法で検出した昆虫食製品の細菌属の比較