

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	かび毒・きのこ毒の発生要因を考慮に入れたリスク評価方法の開発 (課題番号：0903) (研究期間：平成21年度～平成23年度)
主任研究者名	所属：国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 氏名：小西 良子 (研究課題番号：0903)

本研究では、米のかび毒やきのこ毒の健康影響評価に有用な知見を得るために、米かび毒の摂取形態モデルの構築、米のかび毒の一斉分析、毒性影響、スギヒラタケの食中毒病因物質を研究項目として取り上げている。

米かび毒の摂取形態モデルの構築では、まず米を対象に、アフラトキシン、オクラトキシニンA、シトリニンをハザードとし、これらかび毒の炊飯工程における減衰率を明らかにした。

米のかび毒の一斉分析では、食品に付着しているかび叢とのかび毒産生能の解析および米に汚染する可能性のあるカビ毒を特定し、LC-MS/MSを用いて、アフラトキシン、ステリグマトシステイン、オクラトキシニンA、シトリニン、パツリン、フモニシンについて、効率的な一斉分析条件を見出した。

毒性影響については、オクラトキシニンAの遺伝毒性をレポーター遺伝子導入動物を用いて解析し、オクラトキシニンAが腎髄質外帯部に限局的に遺伝毒性を発現することが示唆された。かび毒に関する以上の成果から、調理による減衰を考慮に入れた各年齢層の暴露評価およびリスク評価が簡便にできるシミュレーションシートを作成した。このシートに一斉分析などのモニタリング結果から得られた汚染量を挿入するだけで、瞬時にそれぞれのカビ毒の発がんリスクを含めたリスク評価を行うことができる。

スギヒラタケの食中毒病因物質の疑いが最も高いシアン配糖体の化学構造を明らかにし、その毒性機序を明らかにした。この結果はスギヒラタケのリスク評価に役立つとともにリスクコミュニケーションにも資するものである。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	かび毒・きのこ毒の発生要因を考慮に入れたリスク評価方法の開発 (研究期間：平成21年度～平成23年度)
主任研究者名	所属：国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 氏名：小西 良子 （研究課題番号：0903）

I 研究の全体計画

1 研究期間：平成21年～23年（3年間）

2 研究目的

本研究では、米のかび毒やきのこ毒をハザードとし、1) 米かび毒の摂取形態モデルの構築、2) 米のかび毒の一斉分析、3) 毒性影響、4) きんこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築を研究項目として、これらを考慮に入れたリスク評価手法を開発する。

本研究で開発する米のかび毒およびきのこ毒のリスク評価方法は、発生要因および摂取形態による毒性発現の解析結果を考慮に入れたもので、発生要因に不明な点が多い自然毒のリスク評価としては価値の高い評価手法となる。すなわち、今後汚染の可能性があるカビ毒、特に遺伝毒性を有するカビ毒を明らかにし、この研究で確立された方法を用い摂取量の多い食品が汚染された場合のカビ毒暴露量および健康被害影響を予測するリスク評価手法を構築することが可能となる。また波及効果としては、今後米のかび毒汚染が検出されたときのリスク評価への重要な知見となり、迅速な対応が可能となる。

きのこ毒においては、リスクコミュニケーション手法により正確に国民に提供することで中毒事故の軽減化に役立つものと期待される。

3 研究内容及び方法等

(1) 研究内容及び方法

本研究は真菌毒という分野で取り組んでいるが、かび毒ときのこ毒により研究内容及び方法が異なっている。カビ毒においては、米カビ毒の摂取形態モデルからその暴露量、リスク評価手法を構築すると同時に、高感度分析法の開発および遺伝毒性カビ毒の解明を行う。きのこ毒においては、危害物質の特定が困難であることがリスク表を行う4なり、本研究では危害物質の探索、同定、発生要因の究明を行い、リスク評価手法に貢献するものである。

1) 研究項目1：米かび毒の摂取形態モデルの構築

①個別課題名ア：かび毒の発生要因の検討

米におけるかび毒の発生にはいくつかの要因が考えられる。第一次的には圃場で発生する要因、すなわち米のかび叢とその構成比が挙げられる。第二次的には貯蔵で発生する要因、すなわち湿度や温度などの管理条件である。かび毒産生菌が着生している米を、

不適切な条件で貯蔵した場合には、かび毒汚染が起こる可能性が高いと考えられる。本研究ではまず第一次的な発生要因に着目する。かび叢は生産地の土壌菌と深い関わりがあることから、かび汚染が比較的多い輸入米を対象とし、汚染かび叢を解析することから、米のかび毒に関わる候補菌を検出し、米に汚染する可能性のあるかび毒を特定する。

②個別課題名イ：米調理食品および加工品でのかび毒の減衰とリスク評価手法の構築
米に汚染する可能性のあるかび毒の米調理食品および加工品への残存を明らかにする。さらに国民栄養調査結果をもとに、我が国の国民が主食として摂取する米および米加工品の摂取形態のモデルを構築し、減衰率を考慮した暴露評価方法をする。この方法はかび毒汚染のある米を摂取した場合のリスクを数値的に予測する手段となる。

方法としては、米および米加工品の摂取形態のモデルを、国民栄養調査結果をもとに統計的方法に基づき推定し、同時に主要な米の摂取形態における最終食品へのカビ毒（アフラトキシン、オクラトキシン A、黄変米毒）の移行を実験室レベルで検討し、米調理食品および加工品でのそれぞれのかび毒の減衰率を明らかにし、両者を考慮に入れた健康被害リスクを評価する手法を構築する。この手法により、米のアフラトキシン汚染が検出された場合、我が国の暴露量が推定できるようになる。

2) 研究項目 2：米のかび毒の分析

①個別課題名ウ：米汚染主要かび毒の高感度一斉分析法の確立

2008 年度に事故米で問題となった遺伝毒性を有するアフラトキシン B1、遺伝毒性を有すると懸念されるオクラトキシン A および黄変米毒のうち標品が入手可能なものを含めて高感度で一斉分析が可能な分析法を確立する。分析機器は、選択性の高い LC-MS/MS を用いる。各化合物について、他の分析手法（HPLC-蛍光検出等）との定量性の比較を行う。また効率的な前処理法についても検討し、少量の試料での分析の妥当性確認を行う。

②個別課題名エ：米汚染かびの組み合わせによる産生能の検討

平成 23 年度からは、初年度で得られた米のかび叢から単離したものをを用い、アフラトキシンおよび黄変米、オクラトキシン A 産生菌の組み合わせにより、どのかび毒が優位に産生されるかを検討する。方法は米培地にそれぞれの産生菌を一定の割合で摂取し、種々の温度下で経時的に検体を採取し、産生されたかび毒を LC-MS/MS を用いて分析を行う。

3) 研究項目 3：摂取形態モデルにおける毒性評価

①個別課題名オ：オクラトキシン A の発がん機序解明

オクラトキシン A を *gpt delta* ラットならびにマウスに投与して、標的臓器 DNA 中の特異的付加体を高精度 LC-MS/MS 法により、酸化的 DNA 付加体を LC-ECD 法により定量解析し、同時にレポーター遺伝子である *gpt* の突然変異頻度ならびに変異スペクトラムの解析を実施する。この実験系に対して、P450 誘導剤、抗酸化剤などの修飾効果を加え、DNA 付加体の変動と *in vivo* 変異原性の増減を指標に、オクラトキシン A が誘発す

る変異原性に対する一次的 DNA 損傷ならびに二次的 DNA 損傷の関与の優越性を評価する。

遺伝子障害に引き続き誘導され、DNA 修復あるいは細胞のアポトーシスに関わる蛋白をコードする *p53* 欠損 *gpt delta* マウスならびに酸化ストレスに応答して、プロモーター領域に抗酸化応答配列を有する酵素群の転写因子として働く蛋白をコードする *nrf2* 欠損 *gpt delta* マウスを用いて、オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対するこれら蛋白の可能性を探る。

ラット腎 2 段階発がんモデルを用いて、オクラトキシン A のイニシエーション作用を検討すると共に、誘発された腫瘍に対してマイクロダイセクション、マイクロアレイ、RT-PCR を組み合わせた網羅的遺伝子解析を実施し、オクラトキシン A 誘発腫瘍特異的な増幅あるいは抑制遺伝子群を探求し、上記実験結果と共に総括的にオクラトキシン A 発がん機序の詳細な解明を目指す。

②個別課題名カ：摂取形態モデルに基づく他の米かび毒との複合影響

「米かび毒の摂取形態モデルの構築」研究課題の成果に基づき、主要米かび毒、例えば黄変米毒、アフラトキシンとオクラトキシン A との複合影響を *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性、発がん性短期包括的試験法により検討する。

4) 研究項目 4：きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築

①個別課題名キ：実態調査と発生要因の解析

各地域におけるスギヒラタケ、ツキヨタケ等におけるシアン配糖体及び *illusin S* を分析法確立及び実態調査する。ツキヨタケに関しては遺伝子判別法を確立する。スギヒラタケの人工培養を検討する。スギヒラタケ中のシアン配糖体の構造解析をする。人工的にスギヒラタケを培養し、スギヒラタケと同時期に発生する他種の真菌との相互作用がスギヒラタケのシアン配糖体の生産能に与える影響等を調べることにより発生要因を解析する。スギヒラタケは塩漬けや加工によるシアン配糖体の変動を分析し、摂取形態によるリスクを評価する。

②個別課題名ク：摂取形態のモデル構築とその毒性発現影響

腎摘出ラットでシアンイオンの脳症毒性評価手法の確立を検討する。

4 倫理面への配慮について

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所実験動物倫理委員会の承認に基づき実施する。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置には倫理規定に十分考慮し、実験終了時、安楽死においても深麻酔下、苦痛に考慮する。

5 当初計画からの変更点

(1) 初年度の中間評価結果を踏まえた変更点

○研究項目 1「米かび毒の摂取形態モデルの構築」において、初年度の計画では、かび毒の発生要因の解析のため、我が国に流通している輸入米の通年にわたる実態調査を行う予定であったが、中間評価の結果実態調査は一年間以上必要ないという評価

をいただいたことから、次年度からは、初年度で得られた成果を基に、米への汚染の可能性があるかび毒を対象に、かび毒汚染のある米を摂取した場合のかび毒暴露量を数値的に予測することに計画を変更した。初年度で得られた結果により、米のかび毒汚染の発生要因となるかびの候補菌種を明らかにしたことで、発生要因の解析の前半部分を終了した。発生要因に関する研究は最終年度に研究項目 2「米のかび毒の分析」の個別課題「米汚染かびの組み合わせによる産生能の検討」としてさらに詳細に解析を行う予定である。

○研究項目 1「米かび毒の摂取形態モデルの構築」の個別研究「米調理食品および加工品でのかび毒の減衰」では、22 年度に、前年度評価途中であるオクラトキシン A の炊飯調理による減衰効果を明らかにする。また国民栄養調査結果を基に、米の摂取形態のモデルを構築し、これら摂取形態におけるアフラトキシンの最終食品における減衰率を明らかにする。さらにこれらのかび毒汚染米を摂取したときの暴露量を評価する方法を構築する。

○研究項目 3「摂取形態モデルにおける毒性評価」の個別研究「オクラトキシン A の発がん機序解明」においては、本年度の予定で検討中であるオクラトキシン A の *in vivo* 変異原性評価を実施する。さらに、オクラトキシン A はアポトーシスを誘発することから、*p53(-/-) gpt delta mice* を用いた *in vivo* 変異原性試験を実施し、オクラトキシン A による DNA 傷害に対するアポトーシスの役割を明らかにする。また、「米かび毒の摂取形態モデルの構築」研究課題の成果に基づき、主要米かび毒、例えば黄変米毒、アフラトキシンとオクラトキシン A との複合影響を *gpt delta* ラットを用いて評価するための基礎データを収集する。

(1) 2 年目の中間評価結果を踏まえた変更点

○研究項目 4「きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築実態調査と発生要因の解析」においては、ツキヨタケの実験計画を中止し、スギヒラタケの脳症毒性実験関連のみを来年度行う。スギヒラタケからシアン配糖体を精製・分取する。腎障害モデル動物に分取したシアン配糖体を経口投与し脳症毒性評価手法の確立を検討する。

Ⅱ 平成 21 年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

(1) 平成 21 年度の具体的目標

- 1) 米かび毒の摂取形態モデルの構築：米かび毒の摂取形態モデルの構築：流通市販輸入米の実態調査および文献調査により、米のかび叢を調査検討し、かび毒産生菌の種類を明らかにする。また、それらの菌におけるかび毒産生能に関する基礎的なデータを収集し、米のかび毒汚染の発生要因を特定する基礎データを得る。さらにオクラトキシン A の最終食品への移行を明らかにする。
- 2) 米のかび毒分析：1) 米かび毒の摂取形態モデルの構築の研究結果から、米汚染の可能性のあるかび毒を特定し、それらかび毒の一斉分析法を確立する。すでに標準品のあるかび毒に関しては、実態調査で得られたかび汚染米のかび毒汚染実態を明らかにする。
- 3) 摂取形態モデルにおける毒性評価：レポーター遺伝子導入動物を用いてオクラトキシン A の *in vivo* 変異原性を明らかにする。また、特異的 DNA 付加体の探索を実施する。
- 4) きのかび毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築：スギヒラタケのシアン化物イオンの存在状態を解析し、今年度産のスギヒラタケの実態調査を行う。またツキヨタケのイルジンの実態調査を行う。スギヒラタケのシアン化物イオンの存在状態の解析を検討する。ツキヨタケの実態調査を行う。またスギヒラタケの培養条件を検討する。

2 平成 21 年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

1) 研究項目 1：米かび毒の摂取形態モデルの構築（主任・分担：小西 良子）

本年度は、米に汚染するかび毒の発生要因となっているかびの特定を行うことを目的として、市販輸入米 20 検体のかび叢およびその産生かび毒の実態調査を行った。その結果、アフラトキシン産生菌である *Aspergillus flavus*、オクラトキシン A 産生菌である *A.ochraceus*、ステリグマトシスティン産生菌である *Aspergillus versicolor*、黄変米毒産生菌である *P.islandicum*、*P.citrinum*、パツリン産生菌である *A.clavatus* が検出された。その検出頻度は *A.flavus* および *P.islandicum* は 25 % であり、*A.versicolor* は 20 %、*A.clavatus*、*P.citrinum*、*A.ochraceus* は、それぞれ 5 % であった。さらに、かび叢より分離した *A.flavus* および *P.islandicum* には、かび毒産生能を有していることが認められた。

次に、主要なかび毒の最終食品への移行を明らかにする目的で、オクラトキシン A を対象に茹で工程におけるオクラトキシン A の水溶画分への移行を検討した。水溶性であるオクラトキシン A が茹でる工程を含む最終食品にどの程度残存するかは明らかにされていない。実験においては、茹でる工程が含まれるパスタをモデルとしてその移行を検討した。その結果、ゆでたパスタに 70 %、ゆで汁に 23 % 程度移行することが明らかになり、調理工程で減毒する現象は認められなかった。今回は小麦を原料としたパスタを用いたが、パスタの需要は特に若者層を中心に高まっており、最近では米粉を使ったパスタも普及していることから、ここで得られた知見は、最終食品でのオクラトキシン A の残存率を考慮した暴露評価において重要なデータとなると考えら

れた。

2) 研究項目 2：米のかび毒分析(分担 久城 真代)

今年度は、市販輸入米中のアフラトキシン類について分析を行った。小西分担研究者がかび叢の検出に用いた検体と同じ検体を使用した。市販輸入米試料の量が少ないことから、まず、一般的な穀類でのアフラトキシン分析法では 25 g となっている試料の量について、5 g でも抽出効率・精製効率に問題が無いか、検討を行った。その結果、添加回収試験において、有意な差が見られなかったことから、試料 5 g を分析に供することにした。今年度の市販輸入米 20 点について、アフラトキシン類の分析を行ったところ、いずれも検出限界未満であった。しかしながら、かびの一次代謝産物であるエルゴステロールが微量検出された試料があった。エルゴステロールはかび固有の化合物であるため、かびの着生率の高い検体においては、さらに精製度の高い前処理法を検討する必要があると考えられた。併行して、選択性の高い分析機器である LC-MS/MS を用いてアフラトキシン、ステリグマトシステイン、シトリニン、オクラトキシン A の分析系の検討を行った。

3) 研究項目 3：摂取形態モデルにおける毒性評価(分担 梅村 隆志)

レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いて、オクラトキシン A 5 ppm を雌雄各 5 齢に 4 あるいは 13 週間飼料に混じて自由に摂取させ、亜急性毒性試験項目と共にレポーター遺伝子 *gpt* 変異頻度解析を実施した。試験期間を通じて、雌雄共に一般状態、体重および摂餌量に変化は認められず、オクラトキシン A の良好な摂取が確認された。雄においては腎臓の実重量および相対重量の減少が認められ、雌では腎臓実重量の減少が認められた。病理組織学的検査では、腎髄質外側外帯にアポトーシス、カリオメガリー、尿細管上皮細胞の空胞変性が認められた。投与 13 週目の雄において、発がん標的臓器である腎臓における *gpt* mutation assay を実施したところ、対照群と比較し、オクラトキシン A 投与群の *gpt* 遺伝子変異頻度に変化は認められなかった。

4) 研究項目 4：きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築 (分担 亀山 浩)

今回行った研究では、今年新潟県村上市で採取したスギヒラタケ検体採取されたスギヒラタケからシアノ配糖体由来と思われるシアン化物イオンが検出された。中性糖分析の結果では、各シアノ配糖体のフラクションには Glc と Man が含まれることが確認された。しかし各フラクションには多糖等の夾雑物が存在していることが明らかになった。ツキヨタケの中毒成分である *illudin S* の LC/MS/MS による定量法を確立した。確立した方法を用いて山形県内で採取したツキヨタケ *illudin S* の含量を調査したところ、32.6~361.2 µg/g の範囲で検出された。スギヒラタケの培養条件の検討では、57 子実体中 30 子実体で複核菌糸株の分離・培養に成功した。なお、担子孢子から分離・培養を行ったものも孢子の散布密度が高く、複核菌糸株であると判断した。純粋培養株は、いずれも木材腐朽菌としては異例に生長が遅く気中菌糸もほとんどみられないコロニー形態を示すことが判明した。比較的生長速度が早いものは 10 株であった。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

かび毒に関しては、米を対象にそのかび叢とそのかび毒産生能の解析および米からのかび毒分析を行った。その結果、米のかび叢は数種存在しており、いくつかのかび毒産生菌も着生していた。発がん物質であるアフラトキシンなどを産生する可能性のあるかびも頻度高く検出され、かび毒産生能を有しているものも認められた。すなわち、米のかび毒の発生要因の一つとして、米に着生しているかび毒産生能を有するかびが高い確率で検出されることが挙げられた。発生要因であるかび菌種の候補が明らかになったことから、米に汚染する可能性があるかび毒を特定する基礎的データが得られた。

最終食品におけるかび毒の移行を明らかにするため、初年度はオクラトキシン A を対象に検討した。特に、茹で工程におけるオクラトキシン A の水溶画分への移行を検討した。小麦パスタをモデルとして検討した結果、ゆで汁には 23 % 程度しか移行しないことが明らかになり、オクラトキシン A は茹で工程では減衰はあまり期待できない可能性が示唆された。炊飯工程での米への移行は現在検討中である。

同時に、米かび叢より検出されたかび毒産生かびから汚染の可能性が推定されたかび毒を対象に、一斉分析法を検討した。これらのことからかび着生データから米に汚染するかび毒の予測を行い、一斉分析および減衰率を検討する対象を決定するための基本データを得た。

かび毒の毒性も大きなリスク評価要因であるため、未だ発がん性について決定的なエビデンスがないオクラトキシン A の発がん性に注目して毒性実験を行った。オクラトキシン A の遺伝毒性を明らかにすることは、一日耐容摂取量を設定できるか否かの重要な知見となる。本研究では、レポーター遺伝子導入動物を用いその解明を行った。腎髄質外側外帯にアポトーシス、カリオメガリー、尿細管上皮細胞の空胞変性が認められた。投与 13 週目の雄において、発がん標的臓器である腎臓における *gpt* mutation assay を実施したところ、対照群と比較し、オクラトキシン A 投与群の *gpt* 遺伝子変異頻度に変化は認められなかった。

きのこ毒に関しては、スギヒラタケにシアノ配糖体が多く含まれていることを初めて示した。この結果は、すでに危害物質として認識されている化学物質だけでなく、その配糖体などの副産物および代謝産物にも危害性があることを示唆するものである。今後は、高リスクグループなどの代謝酵素なども考慮に入れたリスク評価手法の必要性を提起した。ツキヨタケの中毒成分である *illusin S* の LC/MS/MS による定量法を確立した。確立した方法を用いてツキヨタケ中の *illusin S* の含量を調査したところ、32.6~361.2 mg/g の範囲で検出された。今後、スギヒラタケ人工培養を通してシアノ配糖体を分析し、シアノ配糖体の発生要因を解析する。

2) 研究成果の詳細

(1) 米かび毒の摂取形態モデルの構築

個別課題名ア：かび毒の発生要因の検討

流通市販輸入米のかび叢の実態調査

その検出頻度はアフラトキシン産生菌である *Aspergillus.flavus* およびルテオスカイリン、シクロクロチン産生菌である *Penicillium.islandicum* は 20 検体中 5 検体から検出された（検出頻度 25 %）。ステリグマシスティン産生菌は 20 検体中 4 検体から（検

出頻度 20 %) 、パツリン産生菌 (*A.clavatus*) 、シトリニン産生菌 (*P.citrinum*) 、オクラトキシン産生菌 (*A.ochraceus*) は、それぞれ 20 検体中 1 検体から検出された (検出頻度 5 %)。さらに、検出された *A.flavus* のアフラトキシン産生能および *P.islandicum* のルテオスカイリン産生能を測定した結果、かび毒産生に適した条件下では、両菌種ともかび毒産生能を有していることが認められた (表 1)。

表 1. 米のかび叢中のかび毒産生菌とその頻度

頻度高く検出されるかび毒産生菌		産生する可能性のあるかび毒
菌種	検出頻度*	
<i>Aspergillus.flavus</i>	25 %	アフラトキシン
<i>Penicillium.islandicum</i>	25 %	ルテオスカイリン、シクロクロロチン
<i>A.versicolor</i>	20 %	ステリグマシステイン
<i>P.citrinum</i>	5 %	シトリニン
<i>A.clavatus</i>	5 %	パツリン
<i>A.ochraceus</i>	5 %	オクラトキシン

* 試料に供した 20 検体を分母として、検出された試料の割合を算出した。

アフラトキシン産生菌である *Aspergillus flavus* とルテオスカイリン産生菌である *P.islandicum*、においてはその産生能を検討した結果 7 菌種中 1 菌種にアフラトキシン産生能が、7 菌種中 3 菌種にルテオスカイリン産生能が認められた。

個別課題名イ：米調理食品および加工品でのかび毒の減衰とリスク評価手法の構築

オクラトキシン A の茹で工程を含む調理における減衰

オクラトキシン A は米に汚染する可能性が有るかび毒の一つである。米の調理加工において、炊く、茹でる、焼くなどの調理工程があるが、水溶性であるオクラトキシン A が茹でる工程を含む調理品にどの程度残存するかは明らかにされていない。そのため、茹でる工程が含まれるパスタをモデルとして、その減衰を検討した。その結果、ゆでたパスタに 70 %、ゆで汁に 23 %程度残存することが明らかになり、オクラトキシン A は茹で工程での減衰は期待できないことが示唆された。食生活の欧米化に伴い、パスタは若い人に好まれ、その需要は年年高まっている。最近では米粉を使ったパスタも普及しており、ここで得られた知見は、最終食品でのオクラトキシン A の残存率を考慮した暴露評価において重要なデータとなる。

(2) 米のカビ毒の分析

個別課題名ウ：米汚染主要かび毒の高感度一斉分析法の確立

①米のかび毒の実態調査

今回送付されてきた市販輸入米 20 点について、アフラトキシンの分析を行うために試料の量を検討した。その結果、低レベル (1.2 ppb) のアフラトキシン添加回収試験において、試料 25 g と 5 g では有意な差が見られなかった(表 2)。試料 5 g を用いて、従来法である HPLC-蛍光検出法でアフラトキシンの分析を行ったところ、いずれも検

出限界未満であった(表 3)。しかしながら、かびの一次代謝産物であるエルゴステロールが微量検出された。エルゴステロールはかびが有する化合物であることから、前処理を検討する必要があると示唆された。また、選択性の高い分析機器である LC-MS/MS を用いてアフラトキシン、ステリグマトシステイン、シトリニン、オクラトキシンの分析系の検討を行ったところ、主要アフラトキシン類の一部に関して、HPLC-蛍光法の方で LC-MS/MS 法よりも定量限界が低い化合物が見出された。

表 2. 試料重量による回収率の違い (1.2 ppb 添加)

	試料重量 (n=3)	
	5 g	25 g
アフラトキシンB1回収率	92.9±5.3 ^a	87.8±5.8 ^a

^a 英小文字が異なる場合は有意差有り ($p<0.05$)

表 3. ミニマムアクセス米 20 点中アフラトキシン類の分析結果

かび毒	総検体数	下の濃度範囲内の検体数		
		検出限界未満	検出限界以上、定量限界未満	定量限界以上
アフラトキシンB1	20	20	0	0
アフラトキシンB2	20	20	0	0
アフラトキシンG1	20	20	0	0
アフラトキシンG2	20	20	0	0

検出限界: アフラトキシン B1 0.34 ppb, アフラトキシン B2 0.032 ppb, アフラトキシン G1 0.44 ppb, アフラトキシン G2 0.14 ppb, 定量限界: アフラトキシン B1 0.68 ppb, アフラトキシン B2 0.064 ppb, アフラトキシン G1 0.88 ppb, アフラトキシン G2 0.28 ppb.

(3) 摂取形態モデルにおける毒性評価

個別課題名オ: オクラトキシン A の発がん機序解明

レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラット雌雄各群 5 例に、発がん用量として報告されているオクラトキシン A 5 ppm を 4 週間あるいは 13 週間 CRF-1 粉末飼料に混じて自由に摂取させ、亜急性毒性試験項目と共にレポーター遺伝子 *gpt* 変異頻度解析を実施した。対照群には CRF-1 粉末飼料を自由に摂取させ、さらに陽性対照群には 20 mg/kg diethylnitrosamine (DEN) を週一回腹腔内投与した。試験期間を通じて、雌雄共に一般状態、体重および摂餌量に変化は認められず、オクラトキシン A の良好な摂取が確認された。血清生化学的検査では、腎機能パラメータである CRN が投与 4 週目の雄および 13 週目の雌において、対照群と比較し有意な高値を示したが、BUN に変化は認められなかった。臓器重量では、投与 4 および 13 週目の雄の腎実重量および相対重量の減少、雌の腎実重量の減少が認められた。病理組織学的検査では、投与 4 週目より、雌雄のオクラトキシン A 投与群の腎髄質外側外帯に尿細管上皮細胞のアポトーシス、カリオメガリーならびに空胞変性が高頻度に認められ、投与 13 週目では全例に観察された (図 1、表 4)。一方、腎皮質を含むその他の部位に著変は認められなかった。13 週目の雄の腎臓について *gpt* mutation assay を実施したところ、陽性対照群である DEN 投与群では対照群と比較し *gpt* 遺伝子変異頻度

が約 12 倍上昇し、有意な増加となったが、オクラトキシン A 投与群において変化は認められなかった。

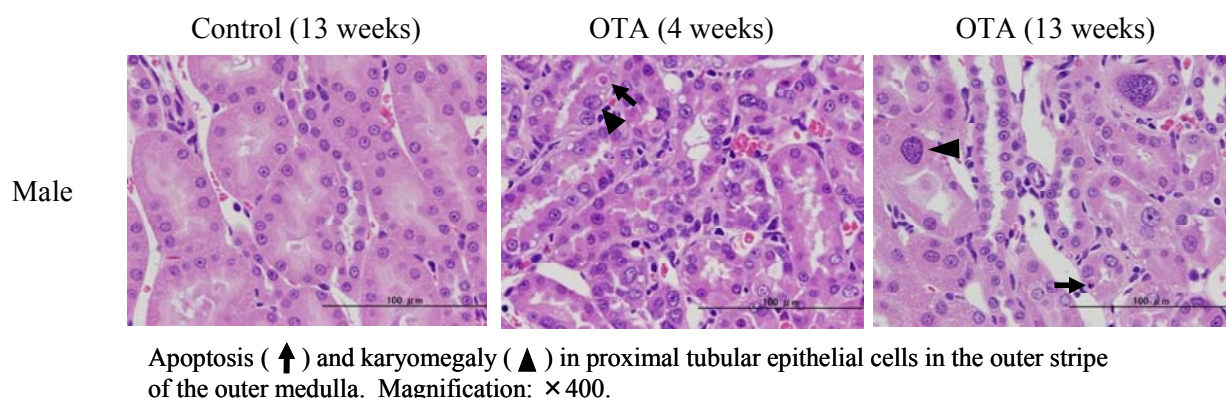


図 1. オクラトキシン A を投与した F344 *gpt* Δ ラットの腎組織学的所見

表 4. 尿細管上皮細胞のアポトーシス、カリオメガリーおよび空胞変性の発生頻度

	4 weeks				13 weeks			
	Males		Females		Males		Females	
	Control	OTA	Control	OTA	Control	OTA	Control	OTA
No. of animals examined	4	5	4	4	4	5	4	5
Apoptosis	0	5	0	4	0	5	0	5
Karyomegaly	0	5	0	4	0	5	0	5
Vacuolation	0	2	0	4	0	5	0	5

OTA:オクラトキシン A

(4) きのこと毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築

個別課題名キ：実態調査と発生要因の解析

① スギヒラタケのシアン化物イオンの存在状態解析スギヒラタケ中のシアン配糖体分析を検討したところ、新潟県で採取したスギヒラタケ 18 検体より、シアン配糖体由来と思われるシアン化物イオンを 60 $\mu\text{g/g}$ から 240 $\mu\text{g/g}$ の範囲で検出した。その後、スギヒラタケより抽出した各フラクションを、Conway cell を用いて Emulsin で酵素消化し、遊離したシアン化物イオンを NaOH に捕集することによって、スギヒラタケ中に含まれるシアン化物イオンの量を測定した。その結果、Fr. 1, 2, 3 からはシアン化物イオンのピークが確認されたが、Fr. 4 からはシアン化物イオン由来のピークが確認されなかった。しかし、Fr. 1, 2, 3 で確認されたシアン化物イオンのピークが遊離のシアン化物イオンであれば Emulsin を加えなくても 10 % H₂SO₄ による pH 変化のみでシアン化物イオンのピークが出るはずである。そこで、Fr. 1, 2, 3 で検出されたシアン化物イオンのピークが、スギヒラタケ中に含まれる遊離のシアン化物イオン由来のものかシアン配糖体由来のシアン化物イオンなのかを確認するために、Fr. 1, 2, 3 を Emulsin を用いずに 10 % H₂SO₄ に

よる pH 変化でのみシアン化物イオンの捕集を行った。Fr. 1, 2, 3 で CN^- 由来のピークが少量ではあるが確認された。このピークは、pH 変化で捕集できた遊離のシアン化物イオンのピークと、10 % H_2SO_4 によってシアノ配糖体が壊れ、配糖体由来シアン化物イオンを捕集したピークの 2 つの可能性が考えられた (図 2, 表 5)

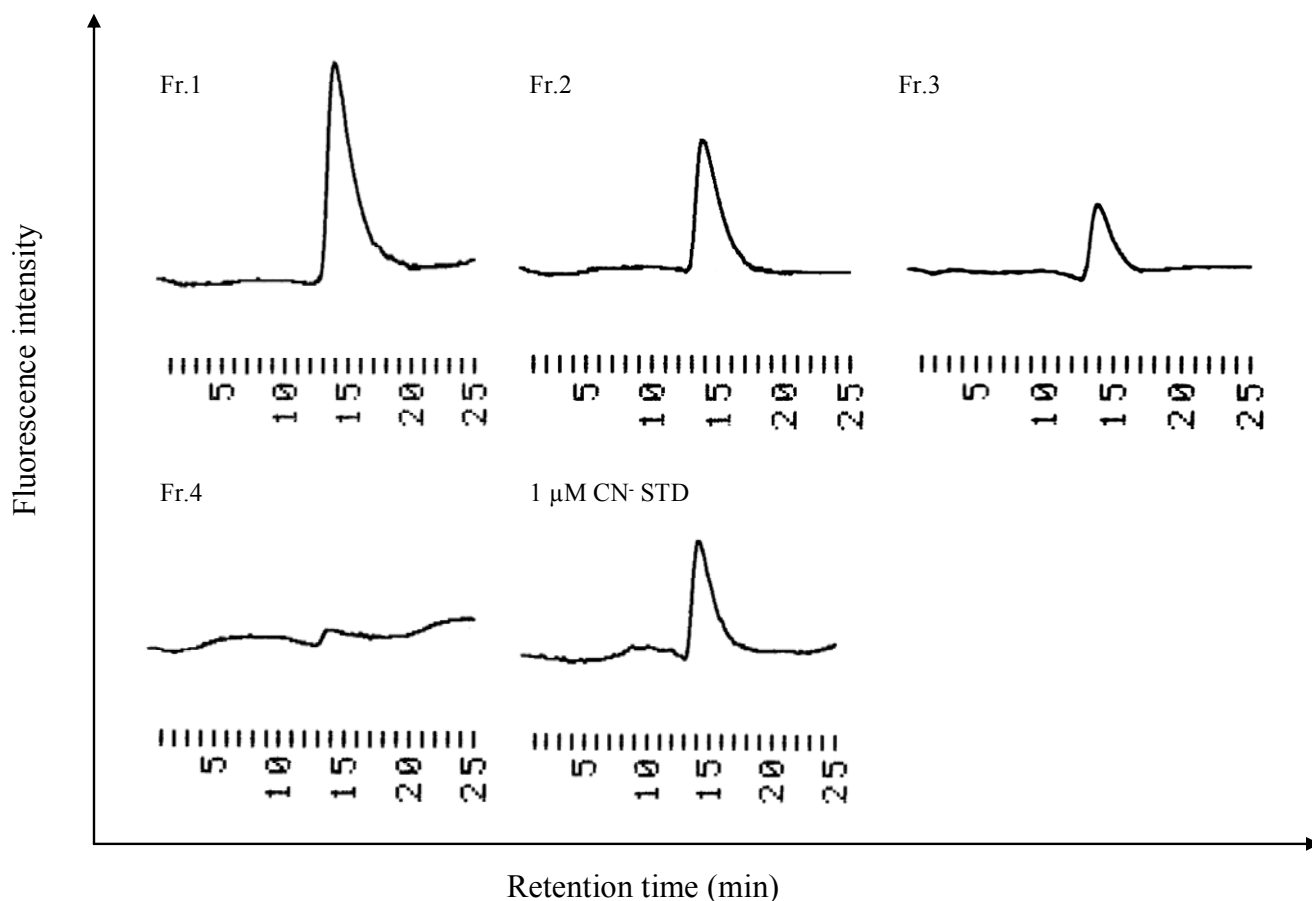


図 2. 各フラクションとシアン化物イオン標準液のクロマトグラム

表 5. 各フラクションのシアン化物イオンの濃度

	CN^- 濃度 (μM)	遊離 CN^- 濃度 (μM)	配糖体 CN^- 濃度 (μM)
Fr.1	1.95	0.24	1.71
Fr.2	1.2	0.19	1
Fr.3	0.9	0.14	0.76

② ツキヨタケの illudin S 分析法の確立と実態調査

ツキヨタケの中毒成分である illudin S の LC/MS/MS による定量法を確立した。確立した方法を用いて山形県内で採取したツキヨタケ illudin S の含量を調査した。シイタケやムキタケと間違えやすい大きさ(30 g 前後)のツキヨタケを 5 個ずつ選んで測定した。illudin S 含量は山形県西川町志津から採取した試料では 32.6~242.7 $\mu\text{g/g}$ 、山形県湯殿山では 265.7~361.2 $\mu\text{g/g}$ 、山形県羽黒では 71.5~295.2 $\mu\text{g/g}$ と大きく異なっていた。

次に山形県湯殿山で採取したツキヨタケ(2.18~120.3 g、15 個)について大きさの違いによる単位重量当たりの illudin S 含量を測定した。その結果 illudin S 含量には個体差が見られ、ツキヨタケの重量との間にはっきりとした相関は認められなかった。

③ スギヒラタケの培養条件の検討

57 子実体中 30 子実体で複核菌糸株の分離・培養に成功した。なお、担子孢子から分離・培養を行ったものも孢子の散布密度が高く、複核菌糸株であると判断した。純粋培養株は、いずれも木材腐朽菌としては異例に生長が遅く気中菌糸もほとんどみられないコロニー形態を示すことが判明した。MYA 培地で培養したものの方が PDA 培地で培養したものよりも、若干、生長が速かったが、生長速度の顕著な改善はみられず、コロニー形態の変化もみられなかった。この内、比較的生長速度が早いものは 10 株であった。なお、生長速度を指標とする限り、発生樹種による相違はみられなかった。

3) 考察及び結論

初年度は、流通市販輸入米かびの調査を行い、かび毒の発生要因であるかびを明らかにすることを目的とした。米にはアフラトキシン、オクラトキシン、シトリニン、パツリン、ステリグマシスティン、ルテオスカイリン、シクロクロロチンを産生するかび毒産生菌が検出された。米の輸出国はタイ米であったことから、熱帯・亜熱帯に生育するアスペルギルス属のかびの着生率が高かったと考えられるが、ペニシリウム属もアスペルギルス属と同様に検出された。そのうち、アフラトキシン産生菌である *Aspergillus flavus* とルテオスカイリン産生菌である *P.islandicum* においてはその産生能を検討した結果、毒素産生に適した条件下ではそれぞれ産生能が認められた。この結果から貯蔵環境、運搬条件によってはかび毒が産生される可能性もあることが示唆された。すなわち、かび毒の健康影響評価には、その発生要因である原料に着生するかび叢を掌握することが必須であることが示唆された。この調査の結果を踏まえて、米に汚染する可能性の高いかび毒を特定する基礎的データが得られ、理化学的手法によって効率的にかび毒汚染の実態把握ができると考えられた。

オクラトキシン A の減衰試験では、オクラトキシン A の水への移行を明らかにする目的で、パスタを対象に最終可食部への残存を検討した。その結果約 70 % のオクラトキシン A が残存しており、オクラトキシン A のゆで汁への移行は期待できないことが明らかになった。昨今、米粉の普及の手段として、米粉パスタの開発が行われている。また、10 代、20 代の年齢層では、主食としてパスタを摂取する傾向が見られる。そのような背景から、米の種々の摂取形態を想定して、それらの減衰率のデータを蓄積することは、我が国のより現実を反映した暴露評価に有用な知見となる。

かび毒一斉分析の予備分析としてアフラトキシンの LC/MS/MS での分析法を確立し、かび叢を分析した市販流通輸入米を用い、アフラトキシンを測定した。アフラトキシン産生かびである *Aspergillus flavus* が検出された試料においても、アフラトキシン B1 を含む主要アフラトキシン類については検出されなかった。

毒性に関しては、米汚染主要かび毒の一つで、その発がん機序に遺伝毒性ならびに非遺伝毒性メカニズムの両方の可能性が推測されているオクラトキシン A を取り上げ、リスク評価にとって重要なこの問題を解決するために reporter gene assay を中心にその発がん機序

の検討を行った。オクラトキシン A 投与に起因して髄質外側外帯の尿細管上皮細胞に種々の変化が認められたが、いずれも過去に報告されている変化と同様のものであった。オクラトキシン A の腎臓中の動態は近位尿細管に発現する有機アニオントランスポーターに依存していると考えられており、部位特異的な毒性発現にはこのトランスポーターの関与が示唆されている。投与 13 週目での雄の腎臓における *gpt* mutation assay の結果、*gpt* 遺伝子変異頻度に影響は認められなかった。しかし、オクラトキシン A の毒性影響が局所に生じていることから、腎全体から抽出した genomic DNA 内の *gpt* 遺伝子変異頻度解析では、オクラトキシン A の遺伝毒性を検出できなかった可能性も考えられた。アポトーシスならびにカリオメガリーの出現は DNA 傷害との関連性を示唆するものであり、また、オクラトキシン A によるアポトーシスは *p53* 依存性であることが報告されていることから、今後、*p53* 欠損 *gpt* delta マウスを用いた reporter gene assay を行うと共に、オクラトキシン A が引き起こす DNA 傷害に対するアポトーシスの役割について詳細な検討を行う予定である。また、引き続き雌の *gpt* mutation assay に加え、欠失変異検出系である Spi- assay も実施し、オクラトキシン A の *in vivo* 変異原性評価を総合的に行うこととする。

きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築実態調査と発生要因の解析においては下記の通りである。

今回行った研究では、スギヒラタケ中にシアン配糖体の存在を初めて明らかにした。スギヒラタケ抽出液の Fr. 1, 2, 3 からシアノ配糖体由来と思われるシアン化物イオンが検出された。しかし、各フラクションには、シアノ配糖体以外にも糖鎖などの夾雑物の存在が確認された。そこで、今後の研究では、まずシアノ配糖体が含まれていると思われる Fr. 1, 2, 3 に混在している夾雑物を取り除き、各フラクションを精製する。その後、各フラクションに含まれるシアノ配糖体の構造を NMR 及び MS を用いて決定する。ツキヨタケの中毒成分である *illudin S* の LC/MS/MS による定量法を確立した。確立した方法を用いて山形県内で採取したツキヨタケ *illudin S* の含量を調査したところ、32.6~361.2 µg/g の範囲で検出された。

なお、*illudin S* の産生には水分含量や生育する木の種類、場所、気象条件など様々な要因が考えられたが、特定することは困難であった。

スギヒラタケの培養を検討した。スギヒラタケは比較的腐朽の進んだ針葉樹の材上に発生することが知られている。このため、同菌はより分解の進んだ材の状態に近い、換言すれば真菌やバクテリアの増殖によって C/N 比の低下した環境への適応が想定される。以上のことから、同菌の生長速度を増大させるには、PDA 培地や MYA 培地に比べて C/N 比が低い培地の調製や杉材などの抽出物の添加、さらにスギヒラタケとほぼ同時期に発生する他の真菌種との対峙培養などを試みる必要があると考えられる。上記のような培養条件を詳細に検討し、スギヒラタケの成長を促進させる培養条件の検討が必要と考えられた。併せてシアン配糖体を測定することにより、培養条件とシアン配糖体の産生量の関連を解明することができると考えられる。

- 3 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（論文は添付すること）
なし

- 4 本研究を基にした学会発表の実績

なし

5 特許及び特許出願の数と概要

なし

6 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）の実績

なし

7 今後の問題点等

今年度の米のかび叢の結果から、表 1 で示されるよう黄変米毒を産生する可能性のあるかび (*P.islandicum*) が頻度高く検出された。しかしルテオスカイリン、シクロクロロチンなど、標準品がないものも多く、実態調査ができないかび毒があることが大きな問題点である。今後標準品を作製することも併行して行っていく必要があると思われる。

- アフラトキシン類について、HPLC-蛍光法の方で LC-MS/MS 法よりも定量限界が低い化合物が見出された。LC-MS/MS での一斉分析を改善するとともに、適宜他の方法を検討しながら進めたい。
- p53 欠損 gpt delta マウスを用い、オクラトキシン A によるアポトーシスと DNA 傷害との関連性を明確にする。
- かび毒に関しては、米に汚染する可能性が高いかび毒を対象に、分析法、最終食品への移行、毒性の評価を各分担者が行い、それぞれの成果を合わせて、我が国の米の摂取形態に則した暴露評価シナリオを構築する。
- スギヒラタケ中のシアン配糖体の構造解析に時間を要することが予想される。
- スギヒラタケ培養において生長速度が遅く、進行が遅れる可能性がある。
- ツキヨタケの採取時期は短く、来年度は留意したいと考えている。
- かび毒では、米に着生するかびが最も重要な発生要因と考え、初年度にかび叢の検出を行った。試料数は限られてはいたが、米を汚染する可能性のあるかび毒を産生するかびが検出された。このことから、米のかび着生状況は、かび毒の汚染を予測するために評価すべき項目であることが示唆された。きのこ毒に関しては、きのこ毒の存在状態解析をまず解析し、毒性素因本体をシアン配糖体であることを明らかにする（1 年目-2 年目）。発生要因を評価するためにスギヒラタケ培養条件を変動させ、スギヒラタケと同時期に発生する他種の真菌との相互作用がスギヒラタケのシアン配糖体の生産能に与える影響についても明らかにする。（1-3 年目）。

Ⅲ 平成 22 年度研究計画

1 平成 22 年度の具体的目標

昨年の米のかび叢の成果から、輸入米の米からオクラトキシン A、アフラトキシン、シトリニン、ルテオスカイリン、シクロクロロチン、パツリン産生菌が検出されることが明らかになった（平成 21 年度研究成果 表 1 参照）。

中間評価の結果より、研究個別課題間の統一性、見えにくいとの指摘をいただき、研究内容の見直しを行った。かび毒関係では、前年度に検出された米のかび叢で検出されたかび毒産生菌から米に汚染すると予想されるかび毒を選出し、その一斉分析を検討する。

「米かび毒の摂取形態モデルの構築」では、アフラトキシンの炊飯米および米加工品（せんべい、米粉パスタ等）への移行を添加回収試験により行う。また、国民栄養調査結果をもとに米および米加工品の摂取形態のモデルを構築し、アフラトキシンの最終食品での減衰率を考慮した暴露評価方法を開発する。またルテオスカイリン、シクロクロロチンに関しては、培養、精製を行い、標準品を作製し最終年度に行う最終食品への移行実験に資する。

毒性研究については、レポーター遺伝子導入動物を用いてオクラトキシン A の *in vivo* 変異原性を明らかにし、特異的 DNA 付加体の探索を実施する。さらに、前年度の結果を踏まえ、オクラトキシン A 誘発アポトーシス機序の解明を行い、オクラトキシン A による DNA 傷害に対するアポトーシスの役割を解明する。また、主要米かび毒の生態影響についての基礎的データを収集する。

きのこ毒では、平成 22 年度はスギヒラタケ中のシアン配糖体の詳細構造を MS 及び NMR により解析する。スギヒラタケに関しては、塩漬けや加工によるシアン配糖体の変動を調査し、摂取形態によるリスクを評価する。また昨年引き続き、スギヒラタケの子実体の人工培養の検討では、抗生物質含有 PDA 培地を用いて、子実体組織及び子実体の雑菌汚染が著しいものでは担子孢子から分離・培養の検討を行う。併せて発生要因を評価するために培養条件を変動させ、スギヒラタケと同時期に発生する他種の真菌との相互作用がスギヒラタケのシアン配糖体の生産能に与える影響についても明らかにする。平成 23 年度には腎摘出ラットや慢性腎疾患モデル動物を用いてシアンイオンあるいはシアン配糖体の脳症毒性評価手法の確立を検討する。

2 研究内容及び方法

(1) 研究項目 1：米かび毒の摂取形態モデルの構築

個別課題名イ：米調理食品および加工品でのかび毒の減衰

アフラトキシンを対象とし、炊飯や米加工品などでの減衰を検討する。米を炊く、蒸す、茹でる、焼くという調理工程での減衰を、米にアフラトキシンを添加して検討する。さらに国民栄養調査結果をもとに我が国の国民が主食として摂取する米および米加工品の摂取形態のモデルを構築し、調理工程での減衰率を考慮した暴露評価方法を開発する。すなわちアフラトキシンが米に汚染した場合、我が国で米の摂取形態における暴露量を推定できる評価法を構築する。

また初年度に得られた米のかび叢から産生される可能性のあるルテオスカイリン、

シクロクロチンを対象に、産生菌株の培養、精製を行い、実態調査の標準品および最終食品への移行実験に資する。

(2) 研究項目 2：米汚染主要かび毒の一斉分析法の確立

昨年度のかび叢の研究成果から、米に汚染する可能性があり、現在標準品が入手できるかび毒であるアフラトキシン、オクラトキシン A、ステリグマトシステイン、シトリニン、パツリンを対象に LC/MS/MS を用いた一斉分析法を前処理段階から検討する。

個別研究課題ウ：米汚染主要かび毒の一斉分析

アフラトキシン、オクラトキシン A、ステリグマトシステイン、シトリニン、パツリンの一斉分析を検討する。また効率的な前処理法についても検討し、少量の試料での分析の妥当性確認を行う。

(3) 研究項目 3：摂取形態モデルにおける毒性評価

レポーター遺伝子導入動物を用いてオクラトキシン A の *in vivo* 変異原性を明らかにし、特異的 DNA 付加体の探索を実施する。また、主要米かび毒の生態影響についての基礎的データを収集する。

個別研究課題オ：オクラトキシン A の発がん機序解明

前年度で評価途中である *in vivo* 変異原性評価を引き続き行う。具体的には、オクラトキシン A を投与した雌におけるレポーター遺伝子 *gpt* 変異頻度（点突然変異）、雌雄におけるファージ由来 *red/gam* 遺伝子変異頻度（欠失変異）ならびにそれらの変異スペクトラム解析を継続して実施する。また、標的臓器である腎臓 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine レベルを LC-ECD により、オクラトキシン A 特異的 DNA 付加体を LC-MS/MS により探索する。

オクラトキシン A の毒性影響が腎臓髄質外帯外層局所的に生じていたことから、前年度の腎全体から抽出した genomic DNA 内の *gpt* 遺伝子変異頻度解析では、オクラトキシン A の遺伝毒性を検出できなかった可能性が考えられた。これを踏まえ、本年度では、雄の *gpt delta* ラットに 5 ppm のオクラトキシン A を 4 週間餌に混じて投与し、剖検時に肉眼的に髄質外帯を採取し、髄質外帯における *gpt* 遺伝子変異頻度および *red/gam* 遺伝子変異頻度ならびにそれらの変異スペクトラム解析を行うことで、さらに詳細なオクラトキシン A の *in vivo* 変異原性の評価を実施する。

前年度の実験結果から、オクラトキシン A 投与により腎臓髄質外帯外層において DNA 傷害を示唆するアポトーシスやカリオメガリーが顕著に認められた。アポトーシスは DNA 傷害に引き続き誘導され、DNA 修復あるいは細胞のアポトーシスに関与する *p53* 蛋白質に依存した変化である可能性が考えられる。一方で、オクラトキシンが他のアポトーシス関連因子を活性化させ、*p53* 非依存的な経路によりアポトーシスを誘発した可能性も考えられる。そこで、本年度は、*p53* 遺伝子を欠損した *gpt delta* マウスを用い、オクラトキシン A が引き起こす DNA 傷害に対するアポトーシスの役割について、*gpt* 遺伝子変異頻度および *red/gam* 遺伝子変異頻度ならびにそれらの変異スペクトラム解析に加え、Real time RT-PCR 法を用いた mRNA 発現や Western blotting 法を用いたタンパク質発現の検索など詳細な解析を行う。また、オクラトキシン A は酸

化的ストレスを誘発することが報告されていることから、酸化ストレスに応答してプロモーター領域に抗酸化応答配列を有する酵素群の転写因子として働く蛋白をコードする *nrf2* を欠損した *gpt delta* マウスを用いて、オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対する酸化ストレスの役割についても同様な手法を用い、詳細な解析を行う。

個別研究課題カ：摂取形態モデルに基づく他の米かび毒との複合影響

「米かび毒の摂取形態モデルの構築」研究課題の成果に基づき、主要米かび毒、例えば黄変米毒、アフラトキシンとオクラトキシン A との複合影響を *gpt delta* ラットを用いた短期包括的試験法により検討する。本年度は、短期包括的試験を実施するための用量設定試験を同系統のラットを用いて実施する予定である。

(4) 研究項目 4：きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築実態調査と発生要因の解析

研究内容：スギヒラタケ中のシアン配糖体の詳細構造を明らかにする。ツキヨタケの *illudin S* の分析に関しては、塩漬けによる *illudin S* の変動を調査し、摂取形態によるリスクを評価する。また昨年に引き続き、スギヒラタケの子実体の人工培養の検討では、抗生物質含有 PDA 培地を用いて、子実体組織及び子実体の雑菌汚染が著しいものでは担子孢子から分離・培養の検討を行う。併せて発生要因を評価するために培養条件を変動させ、スギヒラタケと同時期に発生する他種の真菌との相互作用がスギヒラタケのシアン配糖体の生産能に与える影響についても明らかにする。

研究方法：シアン配糖体の構造を MS 及び NMR により構造を解析する。スギヒラタケのシアン配糖体の分析に関しては、一定期間塩蔵し、塩蔵前と塩蔵後のシアン配糖体の含量を調査する。スギヒラタケの子実体の人工培養は、抗生物質含有 PDA 培地を用いて、子実体組織及び子実体の雑菌汚染が著しいものでは担子孢子から分離・培養を行う。

IV. 平成 22 年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

1) 米かび毒の摂取形態モデルの構築：

今年度は、アフラトキシンの炊飯米および米加工品への移行実験を行い、国民栄養調査結果をもとに構築する米および米加工品の摂取形態のモデルを構築し、減衰率を考慮したリスク評価方法を検討する。またルテオスカイリン、シクロクロロチンに関しては、培養、精製を行い、実態調査の標準品を作成および最終食品への移行実験に資する。

2) 米のかび毒分析：

米を汚染する可能性のある主要かび毒について一斉分析法を検討する。検討した一斉分析法を用いて、米を汚染するかび菌の組み合わせによっていずれのかび毒が優位に産生されるかを解析する。

3) 摂取形態モデルにおける毒性評価：

レポーター遺伝子導入動物を用いてオクラトキシシン A の *in vivo* 変異原性を明らかにし、特異的 DNA 付加体の探索を実施する。さらに、前年度の結果を踏まえ、オクラトキシシン A 誘発アポトーシス機序の解明を行い、オクラトキシシン A による DNA 傷害に対するアポトーシスの役割を解明する。また、主要米かび毒の生態影響についての基礎的データを収集する。

4) きのかび毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築：

スギヒラタケ中のシアン配糖体の詳細構造を解析する。スギヒラタケに関しては、塩漬けや加工によるシアン配糖体の変動を調査し、摂取形態によるリスクを評価する。また昨年に引き続き、スギヒラタケの子実体の人工培養の検討では、抗生物質含有 PDA 培地を用いて、子実体組織及び子実体の雑菌汚染が著しいものでは担子孢子から分離・培養の検討を行う。併せて発生要因を評価するために培養条件を変動させ、スギヒラタケと同時期に発生する他種の真菌との相互作用がスギヒラタケのシアン配糖体の生産能に与える影響についても明らかにする。ツキヨタケの *illudin S* の分析に関しては、塩漬けによる *illudin S* の変動を調査し、摂取形態によるリスクを評価する。

2 当該年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

1) 研究項目 1：米かび毒の摂取形態モデルの構築（主任・分担：小西 良子）

個別課題イ：米調理食品および加工品でのかび毒の減衰とリスク評価手法の構築

炊飯、味噌、茹で白玉粉団子、蒸し上新粉団子による総アフラトキシンの減衰を検討した結果、うるち米およびもち米炊飯ではアフラトキシシン B1, B2 はほぼ 100 % 残存しており、アフラトキシシン G1, G2 は、78-65 % 残存していた。味噌では、1 か月熟成後アフラトキシシン B1 は 56 %, アフラトキシシン B2, G1 および G2 は 72-83 % 残存していた。白玉粉団子は茹で工程においては 5 分後にそれぞれのアフラトキシシンは残存率が 76-60 % となり、それ以後は 10 分後まで変化はなかった。上新粉団子は蒸し工程においては、30 分後まで経時的に減衰が認められたが、アフラトキシシン B1 はほとんど減衰しなかった。

これらの結果を踏まえ、主食である米および副食として摂取量の多い味噌の摂取量を基に、米がアフラトキシンに汚染されていた場合のアフラトキシン暴露量を推定する評価法を構築した。たとえば米および味噌麹が、平均で総アフラトキシン 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の汚染があった場合、我が国の国民の 50 パーセンタイルでアフラトキシン B1 の暴露量は 2.67 ng/体重 1 kg/1 日（発がんリスク：0.04 人/10 万人）となる。同様に平均で 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 汚染があった場合 1 日の暴露量は 1.33 ng/体重 1 kg/1 日（発がんリスクが 0.02 人/10 万人）、平均で 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 汚染があった場合 1 日の暴露量は 0.26 ng/体重 1 kg/1 日（発がんリスクが 0.004 人/10 万人）であると推定された。

以上の結果から、摂取量の極めて多い主食および副食が総アフラトキシンに汚染された場合には、汚染量が極めて少量であっても健康被害リスクが非常に高いことが想定された。すなわち主食となる食品においては、特に発がん性カビ毒の汚染は高感度での分析法の確立および実態調査が重要であることが強く示唆され、本研究で構築したリスク評価手法が健康被害の予測予防に有効であると考えられた。

2) 研究項目 2：米のかび毒分析（分担 久城 真代）

個別課題ウ「米汚染主要かび毒の高感度一斉分析法の確立」については、LC-MS/MS の 2 機種（API3000@国立衛研ならびに 4000Qtrap@食総研）を用いて、アフラトキシン、ステリグマトシステイン、オクラトキシン A、シトリニン、パツリン、フモニシンについて、効率的な一斉分析条件を見出すことができた。前処理については、シトリニンで回収率が低かったが、他のかび毒では良好であった。

一方、安定した共培養モデルの確立のために、再現性のある培養を試みたが、コメ培養ではデータのばらつきが大きく、次年度計画の個別課題イ「米汚染かびの組み合わせによる産生能の検討」の遂行には困難が予想された。

3) 研究項目 3：摂取形態モデルにおける毒性評価（分担 梅村 隆志）

前年度に引き続き、オクラトキシン A 投与 13 週目の腎臓における *in vivo* 変異原性評価を実施した結果、雄の *red/gam* 遺伝子変異頻度ならびに雌の *gpt* および *Spi* 遺伝子変異頻度に差は認められなかった。

オクラトキシン A は髄質外帯外層特異的な毒性発現を誘発することから、本年度ではオクラトキシン A 5 ppm を 4 週間混餌投与し、腎皮質および髄質外帯部における *in vivo* 変異原性評価を実施した。その結果、皮質部においては *gpt* および *red/gam* 遺伝子変異頻度共に対照群と比較し、差は認められなかった。一方、髄質外帯部においては、*gpt* 遺伝子変異頻度に変化は認められなかったものの、*red/gam* 遺伝子変異頻度は約 3 倍上昇し、有意な差となった。

オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対する癌抑制遺伝子 *p53* の役割を調べるために、野生型である *gpt delta* (WT) マウスおよび *p53* 欠損 *gpt delta* (*p53 KO*) マウスにオクラトキシン A を 0, 1, 5 mg/kg の用量で 4 週間強制経口投与し、標的臓器腎臓における *in vivo* 変異原性を実施した。その結果、WT および *p53 KO* マウス共に、ラット同様、腎臓髄質外帯外層部尿細管上皮細胞に、アポトーシスおよびカリオメガリーが認められ、*p53 KO* マウスでは、それら発現頻度が WT と比較し、有意な増加ある

いは増加傾向を示した。*In vivo* 変異原性評価の結果、WT マウスにおいては、*gpt* および *red/gam* 遺伝子変異頻度共に対照群と比較し、差は認められなかった。一方、*p53* KO マウスにおいては、*gpt* 遺伝子変異頻度に差は認められなかったものの、*red/gam* 遺伝子変異頻度は約 3 倍上昇し、有意な差となった。

4) 研究項目 4：きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築（分担 梶山 浩）

スギヒラタケからシアン配糖体を単離・精製し、構造解析した結果、新規物質である 2-hydroxy-2-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)-2-(3,4,5-trihydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)acetonitrile($C_{13}H_{21}NO_{11}$)であることが推定された。茹でた場合、ゆで汁の方にシアン配糖体が 65%移行することが判明した。塩蔵による加工の減衰では、茹でずに塩蔵するとシアン配糖体は残存することが示された。日本各地のスギとアカマツの枯木から分離した同菌の 15 菌株をジャガイモ抽出液・デキストロース培地 (PDA) で培養したところ、生長速度のみならずコロニー形態にも著しい変異が存在することが明らかになった。各菌株の ITS 配列による 2 種類、生長速度とシアン配糖体含有量との間にも一定の関係はみられなかった。以上のことから、スギヒラタケのシアン配糖体生産能は、菌株の系統や栄養菌糸速度との相関を示さず、各菌株毎の遺伝特性に基づくところが大きいと推察された。ツキヨタケの *illudin S* は、60~70 g 程度の個体までは含量が増加し、それ以上では重量が多くても含量は増加しないことが判明した。各部位に含まれる *illudin S* の量を見ると、傘の部分には全体の 33~43 %含まれ、柄には 19~30 %、柄と傘の間の根本の黒いシミの部分には 30~40 %含まれていた。塩蔵による加工の減衰では、切断しないで塩蔵すればより多くの *illudin S* が残存することが明らかとなった。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

本研究は、真菌毒であるカビ毒およびきのこ毒を対象に、発生要因を考慮に入れたリスク評価手法を構築することにある。カビ毒では、我が国で摂取量が極めて高い米を対象として、初年度では発生要因であるカビ叢から米への汚染の可能性のあるカビ毒としてオクラトキシン A、アフラトキシン、シトリニン、ルテオスカイリン、シクロクロチン、パツリンを推定した。中でも遺伝毒性を有するまたは疑われているカビ毒、アフラトキシン、オクラトキシン A および黄変米毒では、主食である米の汚染量とその健康被害リスクを予測する評価法を確立することは正確な暴露評価および実態調査を行う上で重要な課題である。

今年度のカビ毒の研究成果から、アフラトキシンが米に汚染した場合には、規制値の 10 分の 1 程度の汚染濃度でも (1 $\mu\text{g/kg}$) 50 パーセントイルでアフラトキシン B1 の暴露量は 2.67 ng/体重 1 kg/1 日（発がんリスク：0.04 人/10 万人）と推定される結果を得た。この結果から、アフラトキシンを含む遺伝毒性カビ毒および発がん性カビ毒の米汚染は、現状規制値以下の汚染でもその健康被害リスクは非常に高いことが明らかになった。そのため高感度の分析法を確立し、低レベルの汚染を検出できる実態調査を行っていく必要があることが示唆された。

分析法としては、少なくともアフラトキシン、オクラトキシン A および黄変米毒が高感度で一斉分析できることが必要である。今年度の分析法の検討の結果、LC-MS/MS を用いて、アフラトキシン、ステリグマトシステイン、オクラトキシン A、シトリニン、パツリン、フモニシンについて、効率的な一斉分析条件を見出すことができた。

次に遺伝毒性が危惧されているオクラトキシン A を対象に遺伝毒性試験を行った。オクラトキシン A は髄質外帯外層特異的な毒性発現を誘発することから、本年度では、腎皮質および髄質外帯部における *in vivo* 変異原性評価を実施した。その結果、皮質部においては *gpt* および *red/gam* 遺伝子変異頻度共に対照群と比較し差は認められなかったが、髄質外帯部においては、*gpt* 遺伝子変異頻度に変化は認められなかったものの *red/gam* 遺伝子変異頻度は約 3 倍上昇し、有意な差となった。

つぎにオクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対する癌抑制遺伝子 *p53* の役割を調べた結果、野生型 (WT) および *p53* 欠損 (*p53* KO) マウス共に、ラット同様、腎臓髄質外帯外層部尿細管上皮細胞にアポトーシスおよびカリオメガリーが認められ、*p53* KO マウスでは、それら発現頻度が WT と比較し、有意な増加あるいは増加傾向を示した。*In vivo* 変異原性評価の結果、WT マウスにおいては、*gpt* および *red/gam* 遺伝子変異頻度共に対照群と比較し差は認められなかった。一方、*p53* KO マウスにおいては、*gpt* 遺伝子変異頻度に差は認められなかったものの、*red/gam* 遺伝子変異頻度は約 3 倍上昇し、有意な差となった。以上の結果から、オクラトキシン A に遺伝毒性がある可能性が強く示唆された。

きのこ毒を対象とした研究から、スギヒラタケからシアン配糖体を単離・精製し、構造解析した結果、新規物質である 2-hydroxy-2-((2S,3S,4S,5S)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)acetonitrile($C_{13}H_{21}NO_{11}$)であることが推定された。茹でた場合、ゆで汁の方にシアン配糖体が 65 %移行することが判明した。塩蔵による加工の減衰では、茹でずに塩蔵するとシアン配糖体は残存することが示された。また、発生要因を検討した結果、スギヒラタケのシアン配糖体生産能は、菌株の系統や栄養菌糸速度との相関を示さず、各菌株毎の遺伝特性に基づくところが大きいと推察された。ツキヨタケの *illudin S* は、60~70 g 程度の個体までは含量が増加し、それ以上では重量が多くても含量は増加しないことが判明した。各部位に含まれる *illudin S* の量を見ると、傘の部分には全体の 33~43 %含まれ、柄には 19~30 %、柄と傘の間の根本の黒いシミの部分には 30~40 %含まれていた。塩蔵による加工の減衰では、切断しないで塩蔵すればより多くの *illudin S* が残存することが明らかとなった。これらの結果から、きのこ毒の危害物質の特定および発生要因と含有量の知見が得られ、きのこ毒のリスク評価手法に大きく貢献する。

2) 研究成果の詳細

1) 米かび毒の摂取形態モデルの構築

個別課題イ：米調理食品および加工品でのかび毒の減衰とリスク評価手法の構築

①かび毒の最終食品への移行

(i) 炊飯

炊飯によるアフラトキシン残存率を表 1 に示した。添加 1 では最終濃度 アフラトキシン B1 : 2.5 ng、アフラトキシン B2 : 0.3125 ng、アフラトキシン G1 : 1.875 ng、アフラトキシン G2 : 0.3125 ng を添加し、添加 2 ではその 2 倍量の総アフラトキシンを添加した。うるち米ではアフラトキシン B1 は 96 %、アフラトキシン B2 は 93-94 %、アフラトキシン G グループは 65 %であった。総アフラトキシンとしては 82 %が残存していた。もち米では、アフラトキシン B1 は 100 %、アフラトキシン B2 は 86-89 %、アフラトキシン G1 は 80 %、アフラトキシン G2 は 77%であった。総アフラトキシンとしては 89-91 %が残存していた。炊飯においてはアミラーゼ処理の有無により測定値に変化はなかったことから、アミラーゼ未処理の結果を採用した。

以上の結果から、アフラトキシン B1 はうるち米およびもち米において残存率が高く米に汚染したほとんどのアフラトキシンが摂取されることが明らかになった。一方アフラトキシン G グループはアフラトキシン B グループと比較すると減衰しやすいといえる。

表 1. うるち米およびもち米の炊飯による各アフラトキシンの残存率

		残存率(%)				
		B1	B2	G1	G2	総 AFL.
うるち米	添加 1	96.2±4.6	94.0±5.2	65.5±2.5	65.7±2.8	82.3±3.4
	添加 2	96.7±3.9	93.0±4.7	64.0±3.9	65.1±4.2	81.9±3.7
もち米	添加 1	100.7±4.5	89.0±8.8	78.6±2.5	76.0±3.8	89.3±3.4
	添加 2	103.9±3.5	86.5±0.9	80.0±1.3	77.1±4.2	91.3±2.4

(ii) 味噌

麴の原料は米であることから、摂取量の多い米加工品として味噌を選択した。米にアフラトキシンが汚染した場合麴にも残存することから、アフラトキシン添加麴を用いて、1 か月熟成味噌を実験室レベルで作成した。アフラトキシン B1 は他のアフラトキシンと比較して最も残存率が低くなり、約 52-56 %になった。アフラトキシン B2, G1, G2 は 63-83 %の残存率であった(表 2)。

表 2. 味噌 1 か月熟成における各アフラトキシンの残存率

	残存率 (%)				
	B1	B2	G1	G2	総 AFL.
添加 1	56.3±3.0	83.1±12.2	72.8±10.9	80.4±2.3	64.0±3.3
添加 2	51.9±6.7	70.6±6.6	63.7±5.6	75.5±4.8	59.6±6.0

(iii) 茹で工程および蒸し工程でのアフラトキシンの減衰

米粉である上新粉を用いて団子を作成し、茹でる、蒸す工程において、アフラトキシンがどのように減衰するかを検討した。図 1 は、茹で工程での残存率を示したものであるが、茹で時間 5 分までは経時的に減衰する。しかし 5 分以上茹でてでもそれ以上の減衰は認められなかった。最終的には茹で時間 10 分でアフラトキシン B1 68 %、アフラトキシン B2 77 %、アフラトキシン G1 59 %、アフラトキシン G2 62 %、総アフラトキシン 65 %であった。

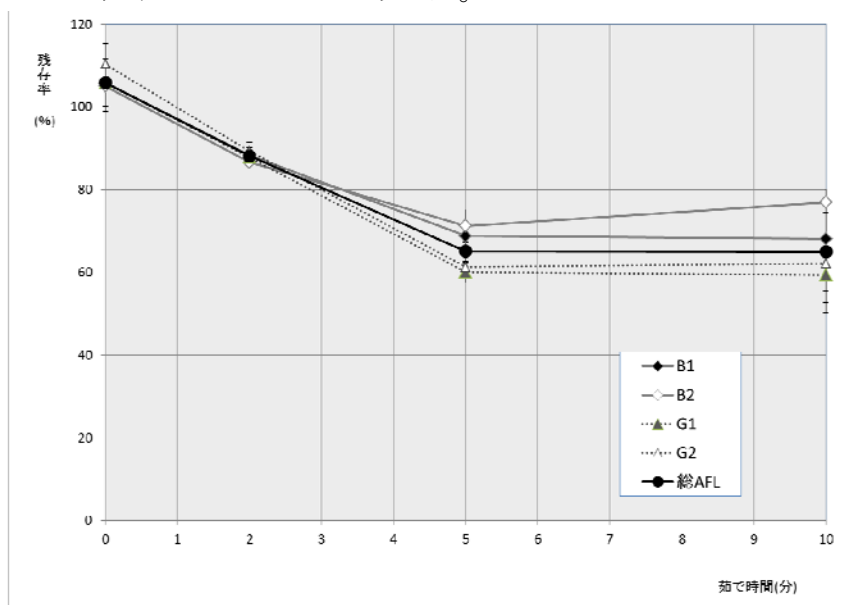


図 1. 米の茹で工程によるアフラトキシン残存率

図 2 は、蒸し工程における残存率を示したものである。最大 30 分間蒸し工程をおこなったが、アフラトキシン B1 以外はわずかながら経時的に減衰が認められ、アフラトキシン G2>G1>B2 の順で減衰率が高かった。最終的には蒸し時間 30 分でアフラトキシン B1 98 %、アフラトキシン B2 94 %、アフラトキシン G1 80 %、アフラトキシン G2 75 %、総アフラトキシン 89 %であった。

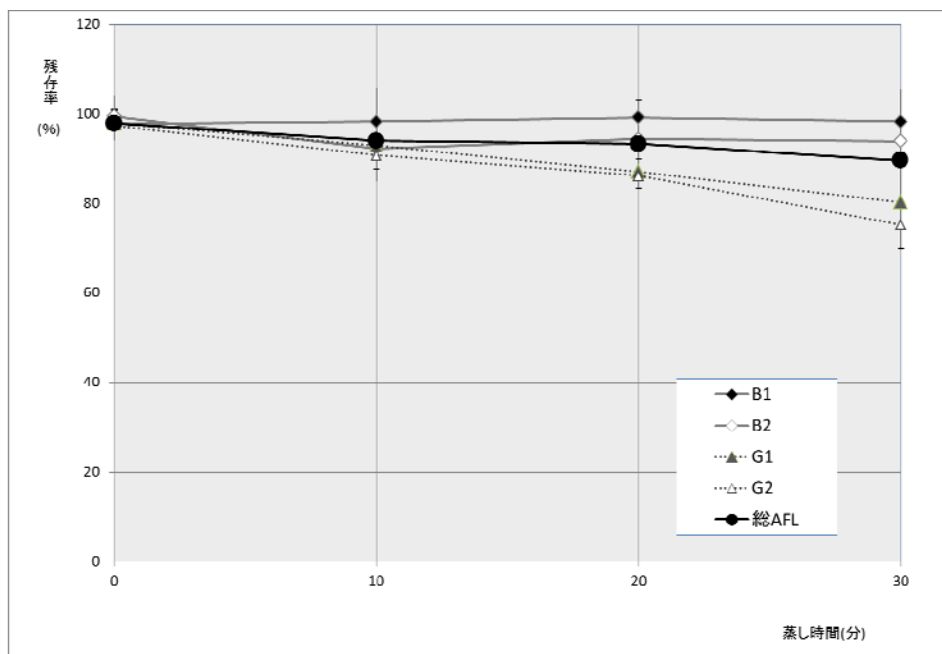


図 2. 蒸し工程におけるアフラトキシンの残存率

① 標準品のないかび毒の作成

シクロクロロチンは *P.islandicum* の菌体外毒素であり、培養液中に分泌される。そのため、今年度は予備精製として 2L 培養を行った。培養液を濾過したのち、アセトンで数回抽出し、活性炭カラムにより精製を行った。アセトン抽出画分にシクロクロロチンが認められ、確認試験を TOF-MS により行った。

② 米類および味噌類の摂取量および推定汚染量によるシナリオの作成と暴露量推定

我が国で最も摂取量の多い食品は米である。米のアフラトキシンの規制値管理は、HPLC-蛍光分析器で行う通知法により行われている。通知法での規制値は $10 \mu\text{g/kg}$ であり、定量限界は各アフラトキシン $1 \mu\text{g/kg}$ と定められている。検出限界は、測定機の性能に依存するところが多いが、おおむね $0.1 \mu\text{g/kg}$ である。

本研究において、まず摂取量の多い米および味噌の我が国の摂取量を全人口対象にパーセンタイルで分類し、調理中のアフラトキシン減衰率を考慮した米および味噌の摂取量を推定した。この推定摂取量に、仮定された総アフラトキシンの汚染量を挿入することによりアフラトキシン B1 の暴露量および発がんリスクを推定することができる方法を確認した。

表 3 に、本研究で確立した手法を用いて、米および味噌が $0.1 \mu\text{g/kg}$ から $1 \mu\text{g/kg}$ の総アフラトキシンの汚染されていると仮定された時のアフラトキシン B1 の暴露量を推定した結果を示した。平均的摂取量の目安として 50 パーセンタイルに着目すると、アフラトキシン B1 暴露量は一日体重 1kg あたり $0.3 \sim 2.67 \text{ ng}$ となった。また、この数値から、JECFA の発がん予測式を当てはめて 10 万人当たりの発がんリスクを推定すると、表 4 で示すように $0.003 \sim 0.03$ 人/10 万人となった。

表3 米および味噌の仮定平均汚染とアフラトキシンB1暴露量															
平均汚染濃度	10%タイル	20%タイル	30%タイル	40%タイル	50%タイル	60%タイル	70%タイル	80%タイル	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
総AF1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1.115178	1.581339	1.944253	2.297586	2.674604	3.109094	3.651171	4.40801	5.746323	7.195894	8.79	11.17111	13.20438	16.27825	18.84259
総AF0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.557589	0.79067	0.972126	1.148793	1.337302	1.554547	1.825585	2.204005	2.873162	3.597947	4.395	5.585554	6.602189	8.139125	9.421296
総AF0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.111518	0.158134	0.194425	0.229759	0.26746	0.310909	0.365117	0.440801	0.574632	0.719589	0.879	1.117111	1.320438	1.627825	1.884259

表4 総アフラトキシン汚染量と発がん性の関係〔発がん人口・10万人〕															
平均汚染濃度	10%タイル	20%タイル	30%タイル	40%タイル	50%タイル	60%タイル	70%タイル	80%タイル	90%タイル	95%タイル	97.5%タイル	99%タイル	99.5%タイル	99.8%タイル	99.9%タイル
総AF1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.016326	0.023151	0.028464	0.033637	0.039156	0.045517	0.053453	0.064533	0.084126	0.105348	0.128686	0.163545	0.193312	0.238314	0.275856
総AF0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.008163	0.011575	0.014232	0.016818	0.019578	0.022759	0.026727	0.032267	0.042063	0.052674	0.064343	0.081773	0.096656	0.119157	0.137928
総AF0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.001633	0.002315	0.002846	0.003364	0.003916	0.004552	0.005345	0.006453	0.008413	0.010535	0.012869	0.016355	0.019331	0.023831	0.027586

2) 米のカビ毒の分析

個別課題ウ：米汚染主要かび毒の高感度一斉分析法の確立

昨年度の実態調査において輸入タイ米 20 点から単離された菌叢（かび毒産生菌である *Aspergillus* 属菌ならびに *Penicillium* 属菌）の情報に基づいて、LC-MS/MS による一斉分析法の分析種に入れるかび毒を選定した。選定したのは、アフラトキシン、ステリグマトシスチン、オクラトキシン A、シトリニン、パツリンの 5 種類であり、良好な分離分析条件を見出すことができた。いっぽう近年諸外国において、日本の醸造に使われる黒麹菌と近縁の *Aspergillus niger* によるフモニシン産生の報告が出ていることから、国産 *A. niger* のフモニシン産生についても調査するため、フモニシンも加えた 6 種類のかび毒の一斉分析系を検討し、これらの効率的な一斉分析条件（パツリンのみネガティブモードでの測定となっているが、保持時間の差を利用したネガティブ/ポジティブモードの切り替えにより、一回の測定で全分子種の測定が可能）を見出すことができた（表 5）。

表 5. MS/MS 測定条件と保持時間

Mycotoxin	Precursor ion	Product ion	Declustering Potential	Collision Energy	保持時間
アフラトキシンB1	313	241.1	131	51	11.4
アフラトキシンB2	315.2	287.1	101	41	10.6
アフラトキシンG1	329.1	243	106	37	10.7
アフラトキシンG2	330.9	189	76	59	9.9
ステリグマトシスチン	325	310.2	44	35	16.5
オクラトキシンA	404	239.1	24	22	15.9
シトリニン	251	233	66	23	12.8
パツリン	152.8	108.8	-21	-12	4.1
フモニシンB1	722.5	334.1	131	53	10.2
フモニシンB2	706.4	336.1	106	51	11.8

しかしながら、一部のかび毒で HPLC-FL（蛍光）法による検出限界のほうが高い分子種（表 6. グレー部分）が有ること、イオン化抑制のために定量性に問題が生じることが多いことから、LC-MS/MS 法による分析は、スクリーニングならびに半定量に用いることにし、陽性試料が見出された際には、個別定量分析に供することが現実的と思われる。

表 6. 検出限界の比較

	検出限界 (ppb)		
	LC-MS/MS		HPLC-FL
	API3000	4000Qtrap	(誘導体化)
Mycotoxin			
アフラトキシンB1	2.0	0.25	0.34
アフラトキシンB2	2.5	0.67	0.032
アフラトキシンG1	1.0	0.20	0.44
アフラトキシンG2	4.0	1.3	0.14
ステリグマトシステイン	62		
オクラトキシンA	5.4		
シトリニン	6.3		
パツリン	1.3		
フモニシンB1	77		
フモニシンB2	35		

個別分析における定量値の妥当性確認を、添加回収試験ならびに、fapas (Fera, UK) の技能試験参加により行った。Analyte が試験項目に入っているかび毒はアフラトキシン、オクラトキシン A、パツリン、フモニシンのみであり、ステリグマトシステイン、シトリニンについては入手できない。入手できる 4 種について技能試験に参加したが、いずれもマトリクスはコメではないためマトリクスの違いによる差が問題であったものの、回収率による補正を行うことで、上記 4 種類のかび毒については妥当性のある分析値を出すことができた。しかしながら昨年度試料による補正は外れ値となることが有ったことから、昨年度試料の安定性に問題がある可能性が示唆された。fapas では昨年度試料を余剰試料として分析値の保証期間を付けて販売しているが、保証期間内であっても値を過信すべきではないであろう。いっぽう Analyte が試験項目に入っていないかび毒であるシトリニンは、回収率が低く、より効率的な前処理法が必要と思われる (表 7. グレー部分)。

表 7. 妥当性確認試験

Mycotoxin	回収率*	技能試験の z-score **		
		実測値	回収率による補正值	昨年度試料による補正值
アフラトキシンB1	Accept	Accept	Accept	>2
アフラトキシンB2	Accept	Accept	Accept	Accept
アフラトキシンG1	Accept	Accept	Accept	Accept
アフラトキシンG2	Accept	Accept	Accept	<-2
ステリグマトシステイン	Accept	not tested	not tested	not tested
オクラトキシンA	Accept	<-2	Accept	<-2
シトリニン	<25%	not tested	not tested	not tested
パツリン	Accept	Accept	Accept	not tested
フモニシンB1	Accept	Accept	Accept	not tested
フモニシンB2	Accept	Accept	Accept	not tested

* Accept は、回収率が 70-120 % の範囲

** Accept は、技能試験の z-score の絶対値が 2 以内

また、昨年度 *Aspergillus flavus* と *Penicillium citrinum* の共存が見られた試料があったことから、次年度に上記 2 種類のかび毒産生菌の共存下におけるかび毒産生の動態解析について予備試験を行った。各種条件設定下で再現性のある培養を試みたが、コメ培養ではデータのばらつきが大きく、次年度計画の個別課題イ「米汚染かびの組み合わせによる産生能の検討」の遂行には困難が予想された。

3) 摂取形態モデルにおける毒性評価

個別課題名オ： オクラトキシン A の発がん機序解明

前年度に引き続き、発がん用量として報告されているオクラトキシン A 5 ppm を 13 週間 CRF-1 粉末飼料に混じて自由に摂取させ、腎臓における *in vivo* 変異原性評価を実施した結果、雄の *red/gam* 遺伝子変異頻度ならびに雌の *gpt* および *red/gam* 遺伝子変異頻度に差は認められなかった。

病理組織学的検索の結果から、オクラトキシン A 投与により腎臓髄質外帯外層に局所的な毒性発現が認められた。従って、前年度の腎全体から抽出した genomic DNA を用いた *gpt* および *red/gam* 遺伝子変異頻度解析では、オクラトキシン A の遺伝毒性を検出できなかった可能性が考えられた。そこで、本年度では、雄の *gpt delta* ラット各群 5 例に、オクラトキシン A 5 ppm を 4 週間 CRF-1 粉末飼料に混じて投与し、剖検時に肉眼的に毒性非標的部位である皮質および毒性標的部位である髄質外帯外層を含む髄質外帯部を採取し、各部位における *in vivo* 変異原性評価を実施した。その結果、皮質部においては *gpt* および *red/gam* 遺伝子変異頻度共に対照群と比較し、差は認められなかった。一方、毒性標的部位を含む腎臓髄質外帯部においては、*gpt* 遺伝子変異頻度に差は認められなかったものの、*red/gam* 遺伝子変異頻度は約 3 倍上昇し、有意な差となった。

前年度の実験結果から、オクラトキシン A はラットの毒性標的部位において、カリオメガリーと共にアポトーシスを誘発することがわかった。そこで、オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対する癌抑制遺伝子 *p53* の役割を調べるために、雄の野生型である *gpt delta* (WT) マウスおよび *p53* 欠損 *gpt delta* (*p53 KO*) マウス各群 5 例に、0.1 M NaHCO₃ 溶液に溶解させたオクラトキシン A を 0、1、5 mg/kg の用量で 4 週間強制経口投与し、標的臓器腎臓における病理組織学的検索、*in vivo* 変異原性ならびに分子病理学的解析を実施した。その結果、WT マウスにおいて、投与 2 週目より 5 mg/kg 投与群で有意な体重低値が認められ、一方、*p53 KO* マウスにおいては、4 週目において体重低値が認められた。WT および *p53 KO* マウスの 5 mg/kg において、腎重量の有意な減少が認められた。腎臓病理組織学的検索の結果、WT および *p53 KO* マウス共に、ラット同様、腎臓髄質外帯外層部尿細管上皮細胞に、アポトーシスおよびカリオメガリーが認められた。さらに、*p53 KO* マウスでは、それら発現頻度が WT と比較し、有意な増加あるいは増加傾向を示した。腎臓における *In vivo* 変異原性評価の結果、WT マウスでは、*gpt* および *red/gam* 遺伝子変異頻度共に対照群と比較し、差は認められなかった。一方、*p53 KO* マウスでは、*gpt* 遺伝子変異頻度に差は認められなかったものの、*red/gam* 遺伝子変異頻度は約 3 倍上昇し、有意な差となった。

4) きのこと毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築

個別課題名キ：実態調査と発生要因の解析

①スギヒラタケのシアン化物イオンの存在状態解析

スギヒラタケからシアン配糖体を単離・精製し、構造解析した結果、新規物質である 2-hydroxy-2-((2S,3S,4S,5S)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-(3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)acetonitrile(C₁₃H₂₁NO₁₁)であることが推定された。現在、さらに構造解析をすすめており最終確認を行っている。茹でた場合、ゆで汁の方にシアン配糖体が 65 %移行することが判明した。塩蔵による加工の減衰では、茹でずに塩蔵するとシアン配糖体は残存することが示された（表 8）。

表 8. 塩蔵したスギヒラタケ中のシアン配糖体の分析

	塩蔵前(μg)	茹で汁(μg)	1か月後(ng)	2か月後(ng)	3か月後(ng)
茹でた後に塩蔵	1.456	0.944	0.036	0.052	0.047
茹でずに塩蔵	1.456	—	0.092	0.197	0.174

②スギヒラタケの培養条件の検討

昨年度分離・培養したスギヒラタケ 30 菌株の内、比較的生長の速かった 5 菌株について液体培地で生物量（乾燥菌糸体量）を指標として検討した結果、既報でスギヒラタケの培養に適すると報告のあった甘酒培地、ニンジン抽出液を含む培地に比較して、ジャガイモ抽出液・デキストロース培地（PD 培地；天然培地）、次いで太田氏培地（合成培地）、麦芽エキス・酵母エキス培地（MY 培地；MY 培地）が培養に適することが判明した。スギヒラタケは、他のきのこの通例に較べて菌株間で生物量に顕著な変異がみられる特徴を有していた。太田培地を用いた液体培養し、シアン配糖体の含有量を調査した結果、スギヒラタケは栄養菌糸レベルでシアン配糖体を含有することが判明した。しかし、その菌糸体内含有量は菌株差が顕著であった（表 9）。供試菌株のシアン含有量は、シアン配糖体の生産菌として知られる他種きのここと較べて同等あるいはそれ以上であった（表 9）。

昨年度分離・培養したスギヒラタケ菌株を、ITS rDNA を用いた系統解析の結果、既報のようにスギヒラタケは少なくとも 2 隠蔽分類群（A 群及び B 群）に分別されることが再確認された。同分類群の相違と栄養生長速度、栄養菌糸体のシアン配糖体の含有量の間には明確な関連はみられず、発生地域や発生樹種による相違も特定できなかった（表 10）。A 群及び B 群と栄養菌糸レベルでのシアン配糖体含有量との間には一定の関係はみられなかった。以上のことからスギヒラタケのシアン配糖体の生産能の差は、生息地、分類群、生長速度には依存せず、これらの要因とは関連のない個々の菌株のシアン配糖体の生産に関わる遺伝特性が主因となっているものと推察される。

表 9. 担子菌のシアン配糖体含有量

菌 種	菌株番号	検 体	乾燥重量(g)	Total CN (μM)(N=2) 平均	Total CN	菌体1 g中CN量 (mg)	
スギヒラタケ	CHU0006	栄養菌糸体	1.09	0.94	0.72	0.83	0.002
スギヒラタケ	CHU0006	培 地	—	0.63	0.71	0.67	0.002
スギヒラタケ	CHU0011	栄養菌糸体	0.69	7.51	6.73	7.12	0.019
スギヒラタケ	CHU0022	栄養菌糸体	1.12	53.6	53.6	53.6	0.139
スギヒラタケ	CHU0023	栄養菌糸体	0.69	2.08	1.93	2.01	0.005
スギヒラタケ	CHU0035	栄養菌糸体	0.21	0.75	0.59	0.67	0.002
ツキヨタケ	NBRC104980	栄養菌糸体	1.79	4.26	0.8	2.53	0.007
スナハマガマノホタケ	NBRC104266	栄養菌糸体	0.026	0.24	—*	0.12	0.0003
コガネタケ	NBRC30379	栄養菌糸体	0.54	0.16	0.76	0.46	0.001
オオイチョウタケ	NBRC33146	栄養菌糸体	0.26	0.27	0.22	0.25	0.001
スギヒラタケ	NBRC30334	栄養菌糸体	0.52	0.22	0.14	0.18	0.0005
スギヒラタケ	NBRC30384	栄養菌糸体	0.60	14.7	15.3	15.0	0.039
ムラサキシメジ	NBRC30380	栄養菌糸体	0.47	1.03	1.09	1.06	0.003
ムラサキシメジ	NBRC30139	栄養菌糸体	0.18	1.08	0.99	1.04	0.003
スギヒラタケ		子実体**	1.89	2.09	2.32	2.21	0.006

*NBRC104266は検体量が少なかつたため N=1で測定、** 福井県で採集

太田氏培地を用いて25℃、暗培養

表 10. スギヒラタケ栄養菌糸体のシアン配糖体含有量と隠蔽分類群、生長量との関係

No.	菌 株	ITS グループ	CN (mg/g 乾燥 菌糸体)	相対生長量 (PDA medium)
1	CHU0006	B	0.002	++
2	CHU0011	B	0.019	+++++
3	CHU0022	未培養	0.139	+ / ++
4	CHU0023	B	0.005	+ / ++
5	CHU0035	A	0.002	+
6	NBRC30334	A	0.0005	+++++
7	NBRC30384	B	0.039	+++++

③ツキヨタケの illudin S 分析法の確立と実態調査

山形県内に自生していた様々な大きさのツキヨタケについて illudin S の含量を検討した。鶴岡市田麦俣（湯殿山）から採取した大きさの異なるツキヨタケ 30 個(2.18 ~ 120.3 g)を用いて定量した。今回使用したツキヨタケは 20~30 g の個体が最も多かったが、この範囲で見ると菌体全体に含まれる illudin S の総量は、2~23 mg であり、個体差が大きいと考えられる。さらに、個体重量が 60 g と 95 g のキノコで illudin S の量が 2 mg のもの、65 g で 32 mg のもの、120 g で 38 mg のものがあり、バラツキがある。しかし、今回の検討範囲で重量と illudin S の含量の傾向を見ると 60~70 g 程度の個体までは含量が増加し、それ以上では重量が多くても含量は増加しないと考えられる。これはツキヨタケが成長するに従い illudin S は増えていくが、ある程度まで成長すると illudin S を生成しないことなどが考えられる。しかし、illudin S 含量の大小は水分含量や生えている木の種類、場所、温度等の気象条件など様々な要因が考えられ、今後、何らかの方法で条件を一定にして検討するという取り組みが必要である。

ツキヨタケの柄の根本（石突）の部分に黒紫色部分(通称：黒いシミ)があり、ここに毒性があるので、これを除けば中毒しないという言い伝えがある。そこでツキヨタケを傘の部分、柄の部分、黒いシミのある部分に分けて illudin S 含量を調べた。その結果、単位重量あたりの illudin S 含量は黒いシミの部分が最も多く、次が柄の部分で、傘の部分が最も少なかった（表 11）。また、グラムあたりの含量ではなく、各部位に含まれる illudin S の量を見ると、傘の部分には全体の 33～43 %含まれ、柄には 19～30 %、黒いシミの部分には 30～40 %含まれていた。黒いシミを含めた柄には 56～67 %含まれている。従って、柄を除けば菌体全体の illudin S の半分以上が除けることになるが、傘にも 40 %程度含まれているので、柄やシミの部分を除けば中毒がないとは言えないことになる。

表 11. ツキヨタケの傘、柄、黒紫食部分の Illudin S の分析

Sample No.	Concentrations (μg/g)		
	pileus(傘)	stipe(柄)	black spot(黒紫色部分)
1	195.6	392.1	837.2
2	336.2	650.2	1026.2
3	451.5	1028.3	1890.0
4	184.1	483.7	1133.9
mean±S.D.	291.8±126.9	638.6±280.9	1221.8±462.0

ツキヨタケを塩蔵して食べていたという情報があるが、逆に塩蔵したツキヨタケでも中毒を起こしたという事例がある。そこで、採取したツキヨタケを用いて塩蔵品を作製し、illudin S の消長を検討した（一定期間塩漬けた後に流水で 24 時間塩抜きを行った後定量した）。はじめに、菌体を細かく刻んで塩漬けたものについて、1 週間後、1 月後、2 月後の含有率（塩蔵前を 100 %とする）を調べてみた。その結果、1 週間後には 0.3 %、1 月後には 0.04 %、2 月後は 0.00 %であった。実際にはキノコを細切して塩蔵することはないが、塩蔵前の均一な菌体がなければ illudin S の減少が不明確になるため細切を行った。しかし、細切により菌体の細胞が破壊され illudin S が溶出しやすくなることが考えられた。そこで、1 個体を均等に半分にし（傘から柄まで縦に切る）、両者の illudin S 含量がほぼ等しいことを確認し、一方を塩蔵し、一方は塩蔵前の illudin S 含量（100 %）を測定した。その結果、1 週間後には 0.28 %、1 月後には 0.64 %、2 月後は 0.34 %であり、細切したものよりは残留することが分かった。このことから、切った場合 illudin S が溶出することは間違いないと考えられる。そこで、菌体を切断しない方法を検討した。塩漬けるためほぼ同じ大きさのツキヨタケ約 50 個を混合し、一部を塩蔵前の測定試料とし、残りを塩漬けた。その結果、1 週間後には 2.13 %、1 月後には 1.17 %残存していた。切断しないで塩蔵すればより多くの illudin S が残存することが明らかとなった。この量が、人の中毒と関連するかどうか

はまだ明確ではないが今後の検討課題である。

3) 考察及び結論

食品汚染カビ毒には、アフラトキシン、オクラトキシン A、ステリグマトシステイン、黄変米毒、フモニシンなど発がん性が報告されている化合物が多く存在するが、特にその中でもアフラトキシンは遺伝毒性があることで、国際ガン研究機構 (IARC) でヒトに発がん性があると評価されている。アフラトキシン産生菌は主に熱帯地方に生息し、穀類、豆類、香辛料などを汚染する。アフラトキシン産生菌は、至適条件下では 2-3 日で毒素を産生することが知られている。

アフラトキシンの実態汚染状況、毒性機序および発がんリスクについては、我が国でもすでにリスク評価が行われている。我が国でアフラトキシンの汚染が確認されている食品は落花生、木の実、香辛料、カカオ、ハトムギなど摂取量の低い食品に限られており、発がんリスクは極めて低いものとなっている。また米類の汚染は検出限界以下 ($0.1 \mu\text{g/kg}$) と報告されている。

通常の見積評価では、検出限界以下の食品群は評価の対象としないため、我が国のアフラトキシン B1 暴露量は 90 パーセントタイルからしか数値が出ないほど低い値となっている。しかしながら、東南アジア、中国、中近東、ブラジル、アフリカにおいては米にアフラトキシン汚染があることが多く報告されており、昨年度行ったミニマムアクセス米のカビ叢の実態調査からもアフラトキシン産生菌が 25 % の頻度で検出されている。

そのため米がアフラトキシンのような遺伝毒性を有するカビ毒に汚染される可能性は否定できるものではないため、本研究で確立した米を対象としたカビ毒リスク評価手法は、健康被害のリスクを予測予防するために重要な役割を果たすと考える。

本研究では、米および副食の味噌がアフラトキシンに汚染された場合の 50 パーセントタイルの国民の暴露量を想定してみた。その結果、総アフラトキシンの平均汚染が $1 \mu\text{g/kg}$ であった場合 (規制値は $10 \mu\text{g/kg}$)、アフラトキシン B1 の暴露量は $2.67 \text{ ng/体重 } 1 \text{ kg/1 日}$ (発がんリスク: 0.04 人/10 万人) となる。食品安全委員会によるカビ毒評価書「総アフラトキシン」によると、現状では 90 パーセントタイルの国民のアフラトキシン B1 の暴露量は $0.002 \text{ ng/体重 } 1 \text{ kg/1 日}$ (発がんリスク: 0.00003 人/10 万人) とされている。現状ではもちろんリスクは極めて少ないといえるが、今回の結果から主食となる食品がカビ毒で汚染された場合、たとえ規制値の 10 分の 1 であっても発がんリスクが急激に高くなることが想定できた。すなわち、本研究により、発がん性をリスクとする遺伝毒性を有するカビ毒の場合、規制値管理に使用されている分析法では充分ではなく高感度の分析法およびそれを用いた実態調査が必要とされることが強く示唆された。

高感度一斉分析法としてアフラトキシン、ステリグマトシステイン、オクラトキシン A、シトリニン、パツリン、フモニシンについて、LC-MS/MS による効率的な一斉分析条件を見出すことができた。しかし定量に関して、黄変米毒素であるシトリニンの前処理について改善が必要である。

オクラトキシン A はげっ歯類に対して、腎臓髄質外帯外層部に含まれる近位尿細管 S3 セグメントを標的とする腎毒性・発がん物質として知られており、同部位から腎癌

の発生も報告されている。オクラトキシン A は近位尿細管に発現する有機アニオントランスポーターを介して S3 セグメントへ蓄積するとの報告があり、この腎臓内での動態が部位特異性を示す原因であると考えられる。腎皮質部を含むその他の部位には著変が認められなかった事実からも、その部位特異性は非常に強いと考えられ、従来の腎全体から抽出した genomic DNA を用いた *in vivo* 変異原性評価ではオクラトキシン A の遺伝毒性を捉えることが出来なかった可能性が考えられた。この部位特異性を考慮した *in vivo* 変異原性評価の結果、標的部位を含む髄質外帯部において *red/gam* 遺伝子変異頻度の有意な上昇が認められたことから、オクラトキシン A は発がん標的部位において欠失変異を誘導する可能性が示され、オクラトキシン A の腎発がん機序に遺伝毒性メカニズムの関与が強く示唆された。今後、腎皮質および髄質外帯部における cDNA マイクロアレイ法を用いた網羅的分子病理学的解析を実施する予定である。

オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対する癌抑制遺伝子 *p53* の役割を調べた実験において、WT マウスでは *gpt* および *red/gam* 遺伝子変異頻度の有意な差は認められなかったが、*p53* KO マウスでは *red/gam* 遺伝子変異頻度の約 3 倍有意な上昇が認められた。従って、オクラトキシン A により誘発される *in vivo* 変異原性に対し、*p53* が抑制的に機能していることが示唆された。オクラトキシン A は細胞増殖活性亢進に加え、細胞周期 G2/M arrest を引き起こすために核内倍加が誘発され、その結果カリオメガリーが形成されると考えられている。従って、本実験において認められた *p53* KO マウスにおけるオクラトキシン A 誘発カリオメガリーの発現頻度のさらなる増加は、*p53* を介した細胞周期チェックポイント制御の破綻により引き起こされた可能性が考えられた。一方、オクラトキシン A 誘発アポトーシスは *p53* 非依存的なメカニズムで生じている可能性が示唆された。今後、さらに詳細な分子病理学的解析を行い、*p53* の役割を明確にし、ラットでの研究成果も踏まえて総合的にオクラトキシン A の発がん機序の解明を目指す予定である。

きのこ毒においてはスギヒラタケから脳症原因物質の可能性のある新規物質である 2-hydroxy-2-((2*S*,3*S*,4*S*,5*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-2-(3,4,5-trihydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)acetonitrile (C₁₃H₂₁NO₁₁) を見出した。塩蔵による加工の減衰では、茹でずに塩蔵するとシアン配糖体は残存することが示された。スギヒラタケのシアン配糖体生産能は、菌株の系統や栄養菌糸速度との相関を示さず、各菌株毎の遺伝特性に基づくところが大きいと推察された。ツキヨタケの各部位に含まれる illudin S の量は、傘の部分には全体の 33~43 % 含まれ、柄には 19~30 %、柄と傘の間の根本の黒いシミの部分には 30~40 % 含まれていた。塩蔵による加工の減衰では、切断しないで塩蔵すればより多くの illudin S が残存することが明らかとなった。

3 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（論文は添付すること）

- 1) Mizutani, K., Mochizuki, N., Suga, K., Nagatomo, Y., Kumagai S., Sugita-Konishi, Y. Quantitative determination of Cyclochlorotine in rice by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Jpn.J. Food Chem.Safety* Submitted.
- 2) Akira Suzuki, Hoang Pham Nguyen Duc, Kosuke Nakamura, Hiroshi Akiyama

and Yoshimasa Kasahara, Remarkable growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*, *Jpn.J. Food Chem.Safety* submitted

4 本研究を基にした学会発表の実績

1. 第 37 回日本トキシコロジー学会 (2010.6. 沖縄)
2. International Union of Toxicology 2010 (2010.7. スペイン、バルセロナ)
3. 第 27 回日本毒性病理学会 (2011.1. 大阪)
4. 久城真代、斉藤道彦「国産 *Aspergillus niger* の各種寒天培地でのフモニシン産生性の検討」日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会、2011 年 1 月 7 日、タワーホール船堀
5. Akira Suzuki, Hoang Duc Pham Nguyen, Kosuke Nakamura, Hiroshi Akiyama and Yoshimasa Kasahara, Growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*, The 6th Meeting of East Asia for Mushroom Science 2020, Gyeongju TEMF Hotel, Republic of Korea, November 12-15, 2010 (Organized by The Korean Society of Mushroom Sciences, Japanese Society of Mushroom Science and Biotechnology, and Eible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences)

5 特許及び特許出願の数と概要

なし

6 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）の実績

なし

7 今後の問題点等

- 3 年目に検討している黄変米毒の 1 種であるシクロクロロチンの大量精製に困難である場合は、市販の標準品がある黄変米毒シトリニンを使用する予定である。
- 安定した共培養モデルの確立のために、再現性のある培養が困難であったことから、次年度計画の個別課題イ「米汚染かびの組み合わせによる産生能の検討」の遂行には困難が予想された。そのため次年度計画の個別課題イ「米汚染かびの組み合わせによる産生能の検討」については計画を変更し、個別課題アで検討中であるシトリニンの効率的な前処理法を開発するために「黄変米毒素を含むコメ標準物質の作成」を行いたいと考えている。
- スギヒラタケの人工培養では、成長が遅いため子実体まで成長させてからのシアン配糖体の分析が困難であるが、栄養菌糸体でも産生されることが明らかになったので、栄養菌糸体レベルにおける分析で検討する。

V. 平成 23 年度研究計画

1 当該年度の目標

最終年度として、真菌毒（カビ毒およびきのこ毒）のリスク評価方法を確立することを目指す。

米かび毒の摂取形態モデルの構築では、米に汚染するカビの細菌叢を調べることにより、米に汚染が予想されるカビ毒を特定し、その中で遺伝毒性を有するまたは疑われるカビ毒について、その摂取形態を考慮した暴露評価法を構築した。この暴露評価法は、米を汚染するこれらのカビ毒の発がんに対する MOE 等のリスク評価に貢献する。

米汚染主要かび毒の一斉分析法の確立では米におけるカビ毒の分析法を検討しており、米かび毒の摂取形態モデルの構築において微量汚染でも健康被害に大きな影響を及ぼすことが示唆されたカビ毒を対象に、高感度一斉分析法を確立する。

摂取形態モデルに基づく毒性影響においては、オクラトキシン A に遺伝毒性があることが本研究による示唆されており、現在食品安全委員会において行われているオクラトキシン A のリスク評価に、大きな貢献を果たしている。

きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築においては、きのこの食中毒として多数の患者を出したスギヒラダケのハザードアイデンティフィケーションを行い、原因物質の特定、構造決定を行った。さらにその毒性を解明することにより、いままで不明であったスギヒラダケの原因物質があきらかになるとともに、そのリスク評価、国民へのリスクコミュニケーションに資する。

各項目の目標は下記の通りである。

研究項目：米かび毒の摂取形態モデルの構築

昨年度確立した主食におけるカビ毒汚染による健康被害のリスク評価手法を用い、最終年では発がん性が危惧されているカビ毒シクロクロロチンまたはシトリニンを対象に炊飯、米加工品による減衰率の検討および暴露量の推定を行う。最終年度として、米に汚染する可能性のある遺伝毒性および発がん性カビ毒の健康被害予測リスク評価法を構築する。

研究項目：米汚染主要かび毒の一斉分析法の確立

本年度確立した LC-MS/MS による一斉分析法のうちアフラトキシン類の一部で検出限界がより低くなるよう検討する。またシトリニンの前処理法について改善をはかる。

研究項目：摂取形態モデルに基づく毒性影響

前年度に引き続き、ラットの実験において、腎皮質部および髄質外帯部における cDNA マイクロアレイ法による網羅的な遺伝子解析を実施し、それぞれの部位における遺伝子発現を比較し、オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に関与する遺伝子群の同定を試みる。また、オクラトキシン A 特異的 DNA 付加体の探索を実施する。また、特異的 DNA 付加体の探索を継続して実施する。オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対する癌抑制遺伝子 *p53* の役割を明確にするために、*p53* 欠損 *gpt delta* マウスならびにその野生型間で *p53* 関連遺伝子あるいはタンパク発現を比較解析し、ラットならびにマウスの全ての実験結果から、総合的にオクラトキシン A 腎発がん機序の分子病理学的解明を目指す。また、主要米かび毒、例えば腎発がん性が疑われる黄変米毒

(シトリニン) とオクラトキシン A との複合影響を *gpt delta* ラットを用いた短期包括的試験法により検討するための生態影響についての基礎的データを収集する。

研究項目：きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築

スギヒラタケからシアン配糖体を精製・分取する。腎障害モデル動物に分取したシアン配糖体を経口投与し脳症毒性評価手法の確立を検討する。

2 研究内容及び方法

1) 研究項目 1：米かび毒の摂取形態モデルの構築

① 個別課題イ：米調理食品および加工品でのかび毒の減衰とリスク評価手法の構築
シクロクロロチンまたはシトリニンを対象とし、炊飯や米加工品などでの減衰を検討する。米を炊く、蒸す、茹でる、焼くという調理工程での減衰を、米にシクロクロロチンまたはシトリニンを添加して検討する。さらに国民栄養調査結果をもとに我が国の国民が主食として摂取する米および米加工品の摂取形態のモデルを構築し、調理工程での減衰率を考慮した暴露評価方法を開発する。すなわちシクロクロロチンまたはシトリニンが米に汚染した場合、我が国で米の摂取形態における暴露量を推定できる評価法を構築する。

2) 研究項目 2：米汚染主要かび毒の一斉分析法の確立

① 個別課題名ア：米汚染主要かび毒の一斉分析法の確立

2008 年秋の事故米の転売事件で問題となったのはアフラトキシン類のうちそれまで規制対象であったアフラトキシン B1 のみであるが、トータルアフラトキシンで規制が敷かれることから、今年度までの LC-MS/MS 測定で検出限界がやや高かったアフラトキシン B2 とアフラトキシン G2 について、検出条件を検討する。また検出前の前処理で、低回収率であったシトリニンについて現在の液液分配法を改善する。

② 個別課題名イ：黄変米毒素を含むコメ標準物質の作成

黄変米毒素のうちシトリニンを産生する菌 *Penicillium citrinum* が初年度の実態調査で検出されたことから、シトリニンを含むコメ標準物質を作成する。米培地に *P. citrinum* を接種し、菌体と培地の混合物を滅菌したのち、ブランクのコメで希釈し、均一にシトリニンを含む試料を調製する。

3) 研究項目 3：摂取形態モデルにおける毒性評価

① 個別研究課題名：オクラトキシン A の発がん機序解明

・ 前年度で解析途中であるラット腎皮質および髄質外帯部における分子病理学的解析を引き続き行う。具体的には、前年度の実験で得られたオクラトキシン A を投与した *gpt delta* ラットの腎皮質および髄質外帯部を用い、各部位における cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現の比較解析を行い、オクラトキシン A により誘発される *in vivo* 変異原性に関与する遺伝子群を同定する。

・ 前年度の *p53* 欠損 *gpt delta* マウスを用いた実験結果から、オクラトキシン A により誘発される *in vivo* 変異原性に対し、*p53* が抑制的に機能していることが示唆された。これを踏まえ、本年度では、上述のラットでの cDNA マイクロアレイ法による解析結果を参考に、*p53* 関連遺伝子ならびにタンパク発現を real time RT-PCR 法や western blot 法などの手法を用いて比較解析し、オクラトキシン A が誘発する *in vivo* 変異原性

への *p53* 関与の仕組みを解明し、ラットにおけるデータと共にオクラトキシン A の腎発がん機序の全容解明を目指す。

② 個別研究課題名：摂取形態モデルに基づく他の米かび毒との複合影響

「米かび毒の摂取形態モデルの構築」研究課題の成果に基づき、主要米かび毒、例えば腎発がん性が疑われる黄変米毒（シトリニン）とオクラトキシン A との複合影響を *gpt delta* ラットを用いて検討する。本年度は、シトリニン単独の影響を検討するための用量設定試験を同系統のラットを用いて実施する予定である。

4) 研究項目 4：きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築実態調査と発生要因の解析

① 個別研究項目名 きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築

個別課題名：摂取形態のモデル構築とその毒性発現影響

スギヒラタケからシアンイオン産生分析を指標にして、シアン配糖体を分取・精製する。慢性腎不全動物へ精製されたシアン配糖体を経口投与して、シアン配糖体からの代謝産物であると予想されるシアン化物イオンとチオシアン酸イオンの血中動態評価手法と脳症毒性評価手法の確立を検討する。

慢性腎不全動物としては、5/6 腎摘出慢性腎不全ラット、あるいはアデニン・シスプラチン等の薬物誘発投与腎不全ラットを用いる。脳症判定としては、行動薬理学的所見のビデオ観察及び解剖後に脳を摘出し病理学的観察を行う。血液を単離後、アルカリ処理し、シアン配糖体からの代謝産物であると予想されるシアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの血中動態を追跡する。その他、腎不全の血清学的指標についても可能な限り分析する。

慢性腎不全動物実験は分担実験者（亀山浩）が受託試験機関に出向き、その機関の協力により行う。毒性試験を外部の機関で実施する理由として、一般的に慢性腎不全モデル動物を用いる場合、その実験系を立ち上げるだけでも数ヶ月はかかり、その系統や種をかえることは、非常な困難を伴うことが予想される。慢性腎不全動物試験の受託試験機関では漫然腎不全モデル動物を用いた実験の背景データが妥当な範囲の評価などが可能になる。またシアン配糖体の分取・精製には時間がかかる上、貴重であり、複数回の毒性試験は行うことは困難である。従って信頼性、再現性に関してバリデーションがされている機関と共同で行うことで、効率的に最小限の実験で安定したデータを取得することが考えられるため、外部の機関と協力して実施する予定である。

VI.平成 23 年度研究成果報告

1 当該年度の目標

1) 米かび毒の摂取形態モデルの構築

昨年度確立した主食におけるカビ毒汚染による健康被害のリスク評価手法を用い、最終年では発がん性が危惧されているカビ毒シトリニンを対象に炊飯による減衰率の検討および暴露量の推定を行う。最終年度として、米に汚染する可能性のある遺伝毒性および発がん性カビ毒の健康被害予測リスク評価法を構築する。

2) 米のカビ毒の分析

米を汚染する可能性のある主要かび毒について一斉分析法を検討する。LC-MS/MS による一斉分析法のうちアフラトキシン類の一部で検出限界がより低くなるよう検討する。またシトリニンの前処理法について改善をはかる。

3) 摂取形態モデルにおける毒性評価

前年度に引き続き、ラットの実験において、腎皮質部および髄質外帯部における cDNA マイクロアレイ法による網羅的な遺伝子解析を実施し、それぞれの部位における遺伝子発現を比較し、オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に関与する遺伝子群の同定を試みる。オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対する癌抑制遺伝子 *p53* の役割を明確にするために、*p53* 欠損 *gpt delta* マウスならびにその野生型間で *p53* 関連遺伝子あるいはタンパク発現を比較解析し、ラットならびにマウスの全ての実験結果から、総合的にオクラトキシン A 腎発がん機序の分子病理学的解明を目指す。

4) きのこと毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築実態調査と発生要因の解析

スギヒラタケからシアン配糖体を精製・分取する。腎障害モデル動物に分取したシアン配糖体を経口投与し脳症毒性評価手法の確立を検討する。

2 当該年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果

1) 研究項目 1：米かび毒の摂取形態モデルの構築（主任・分担：小西 良子）

個別課題名イ：米調理食品および加工品でのかび毒の減衰とリスク評価手法の構築

シトリニンを対象とし、炊飯や米加工品などでの減衰を検討した。最も摂取量の多い炊飯という調理工程での減衰を、米にシトリニンを添加して検討した。また、初年度からの課題であったオクラトキシン A の炊飯による残存率も測定した。

さらに最終成果として、国民栄養調査結果をもとに我が国の国民が主食として摂取する米および米加工品の摂取形態のモデルを構築し、調理工程での減衰率を考慮した暴露評価方法と評価シートを開発した。すなわちアフラトキシン、オクラトキシン A、黄変米毒（シトリニン）が米に汚染した場合、我が国で米の摂取形態における暴露量を推定できる評価シートを開発構築した。なおその他の黄変米毒であるシクロクロロチンについては、分析に必要な量は精製できたものの減衰率の検討に必要な量は得られなかった。ルテオスカイリンに関しては、*Penicillium islandicum* からの培養、精製方法を確立した。

2) 研究項目 2：米のかび毒の分析

個別課題ウ：米汚染主要かび毒の高感度一斉分析法の確立

一般的な穀類でのアフラトキシン分析法では 25 g となっている試料の量について、

5 g でも抽出効率・精製効率に問題が無いか、検討を行った。その結果、添加回収試験において、有意な差が見られなかったことから、試料 5 g を分析に供することにした。輸入米 20 点について、HPLC-蛍光検出法でアフラトキシン類の分析を行ったところ、いずれも検出限界未満であったが、かびの一次代謝産物が微量検出された試料が有り、併行して選択性の高い分析機器である LC-MS/MS を用いて分析系の検討を行った。

LC-MS/MS による一斉分析法の分析種に入れるかび毒として、アフラトキシン、ステリグマトシステイン、オクラトキシン A、シトリニン、パツリン、フモニシン、シクロクロチンの 7 種類を選定し、良好な分離分析条件を検討し、これらの効率的な一斉分析条件を見出すことができた。

3) 研究項目 3：摂取形態モデルにおける毒性評価

個別研究課題名：オクラトキシン A の発がん機序解明

オクラトキシン A の毒性・発がん性に対する腎臓の部位特異性に着目し、オクラトキシン A 5 ppm を 4 週間混餌投与し、腎皮質および髄質外帯部における網羅的遺伝子発現解析手法により、OTA 投与により発現変動する遺伝子を両部位間で比較し、OTA 発がん過程早期に係る遺伝子群の同定を試みた。その結果、皮質部では変化は認められず髄質外帯部においてのみ、DNA 二重鎖切断修復に関わる遺伝子 (Chek1、Rad18、Brip1、Brcc3 等) の発現変動が認められ、OTA は DNA 二重鎖切断を引き起こし、その修復過程あるいは修復不全により遺伝子欠失変異を誘発している可能性が示唆された。

前年度に引き続き、オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対する癌抑制遺伝子 *p53* の役割を調べるために、野生型である *gpt delta* マウス (WT) および *p53* ホモ欠損 *gpt delta* マウス (*p53* KO) にオクラトキシン A を 0、1、5 mg/kg の用量で 4 週間強制経口投与した実験で採取した腎臓を用い、腎組織中の *p53* タンパク質発現解析を実施した。その結果、WT の 5 mg/kg 投与群において、*p53* タンパク質発現の増加が認められた。前年度の結果も踏まえ、オクラトキシン A が誘発する *in vivo* 変異原性に対し、*p53* が抑制的に寄与していることが示唆された。

4) 研究項目 4：きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築実態調査と発生要因の解析

スギヒラタケからシアンイオン産生分析を指標にして、シアン配糖体を分取、精製した。慢性腎不全動物へ精製されたシアン配糖体を経口投与して、シアン配糖体からの代謝産物であるシアン化物イオン、チオシアン酸イオンの血中動態評価手法と脳症毒性評価手法の検討を行った。行動薬理学的所見としては、高用量投与群の 1 例において被験物質投与後 1 時間目で腹臥位が見られたが、2 時間目までに回復した。他の個体では一般状態に変化はみられなかった。また、病理学的検査を実施したが、心臓、肺及び腎臓の石灰や、腎臓の尿細管に 2,8-dihydroxyadenine(DHA)結晶沈着等の慢性腎不全の続発性あるいは二次的变化はみられたものの被験物質に起因した明らかな変化はみられなかった。また、脳においても被験物質に起因した明らかな変化はみられなかった。

血中及び脳中でのシアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの血中動態について

分析を行った。シアン化物イオンに関しては、被験物質経口投与後から投与前を差し引いた血中濃度の増加量は、対照群と比べて被験物質投与群で高値を示した。また、高用量投与群は低用量投与群と比べて高い値を示した。チオシアン酸イオンに関しては、被験物質経口投与後から投与前を差し引いた血中濃度の増加量は、対照群と比べて被験物質投与群で高値を示し、その値は投与濃度依存的に増加した。一方、解剖時の脳中のシアン化物イオンは検出限界以下だったが、解剖時の脳中のチオシアン酸イオンに関しては、対照群と比べて被験物質投与群で高値を示し、その値は投与濃度依存的に増加した。

以上のことから、スギヒラタケ由来シアン配糖体画分を慢性腎不全動物に経口投与すると、スギヒラタケ由来シアン配糖体が腸管で加水分解されて、シアン化物イオンが遊離し、生体内解毒酵素であるロダニースによりチオシアン酸イオンに代謝されることが示唆された。また、血中に増加したチオシアン酸イオンが脳に移行して蓄積することが示唆された。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

本研究事業は、最終年度として米に汚染するカビ毒のリスク評価方法の確立とスギヒラタケキノコの食中毒病因物質の特定に焦点を当てた自然毒のリスク評価を行った。

米に汚染するカビ毒では、初年度に明らかにした米に汚染する可能性の高いカビ毒から、遺伝毒性および発がん性が強く懸念されるアフラトキシン、オクラトキシン A および黄変米毒（シトリニン）を取り上げ、これらの米汚染により、我が国の国民がどの程度発がんリスクが高まるかを評価するシミュレーションシートを作成した。シミュレーションシートには、最も汎用な米の摂取形態である炊飯によるカビ毒の減衰を考慮に入れる必要があるため、アフラトキシン、オクラトキシン A およびシトリニンの炊飯による減衰率を実験的に求めた。なお、近年若者のパスタの摂取量が増えていることから、小麦のオクラトキシン A も危害物質として加え、パスタ調理による減衰率も測定した。今年度はもち米およびうるち米を対象に炊飯による黄変米毒（シトリニン）の残存率を検討した。またうるち米を対象にオクラトキシン A の残存を検討した。うるち米では 70-75 %、もち米では 76-79% のシトリニンが残存することがあきらかになった。オクラトキシン A のうるち米炊飯後の残存率は、84 %であった。

米のカビ毒汚染のモニタリングに供する分析法を開発しているが、今年度は本研究事業で標準品精製を行った黄変米毒であるシクロクロロチンを加え、スクリーニング法として有用なアフラトキシン、ステリグマトシスティン、オクラトキシン A、シトリニン、パツリン、シクロクロロチンについて、効率的な一斉分析条件を確立した。また、本分析法を用いて実態調査を行った結果、現在のところこれらカビ毒の米汚染は認められなかった。

次にオクラトキシン A の遺伝毒性の有無を明らかにすることは評価方法の選択に重要な知見となるため、本研究で遺伝毒性試験を行った。その結果、皮質部では変化は認められず髄質外帯部においてのみ、DNA 二重鎖切断修復に関わる遺伝子（Chek1、Rad18、Brip1、Brcc3 等）の発現変動が認められ、オクラトキシン A は DNA 二重鎖切断を引き起こし、その修復過程あるいは修復不全により遺伝子欠失変異を誘発している可能性が示唆された。

また、オクラトキシン A が誘発する *in vivo* 変異原性に対し、がん抑制遺伝子 *p53* が抑制的に寄与していることが示唆された。

スギヒラタケの食中毒病因物質の特定に関する研究においては、昨年に最も病原因子としての可能性が高い化合物としてシアン配糖体を特定し、その構造を明らかにしている。本年度はその毒性を明らかにして、病原因子である科学的データを示した。すなわち、特定されたシアン配糖体を分取、精製し、慢性腎不全動物へ精製されたシアン配糖体を経口投与して、シアン配糖体からの代謝産物であるシアン化物イオン、チオシアン酸イオンの血中動態評価手法と脳症毒性評価手法の検討を行った。行動薬理学的所見では高用量投与群に腹臥位が見られた。病理学的検査では明らかな変化はみられなかった。また、脳においても明らかな変化はみられなかった。しかし、

血中及び脳中でのシアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの血中動態および脳中のチオシアン酸イオンに関しては、対照群と比べて被験物質投与群で高値を示した。

このことから、スギヒラタケ由来シアン配糖体画分を慢性腎不全動物に経口投与すると、スギヒラタケ由来シアン配糖体が腸管で加水分解されて、シアン化物イオンが遊離し、生体内解毒酵素であるロダニースによりチオシアン酸イオンに代謝されることが示唆された。また、血中に増加したチオシアン酸イオンが脳に移行して蓄積することが示唆された。これらの研究成果から、リスク評価に必須であるスギヒラタケのハザードの特定とその毒性メカニズムが明らかになった。

2) 研究成果の詳細

研究項目 1：米かび毒の摂取形態モデルの構築

個別課題イ：米調理食品および加工品でのかび毒の減衰とリスク評価手法の構築

(1) シトリニンおよびオクラトキシン A の炊飯による減衰

シトリニンの炊飯による残存率を表 1 および表 2 に示した。spike1 では最終濃度最終濃度 25 ng/mL を添加し、spike 2 ではその 2 倍量のシトリニンを添加した。うるち米では低濃度添加では $75.5 \pm 4.6\%$ が炊飯後残存していた。添加量が 2 倍になった場合には $70.5 \pm 5.2\%$ が残存していた。もち米では低濃度添加では $75.7 \pm 2.0\%$ 、2 倍濃度では $78.7 \pm 2.3\%$ が残存していた。

表 1. うるち米中のシトリニンの炊飯による残存率

	標準液	標準液	Citrinin 定量値	回収率	残存率
試料区分	添加量	添加タイミング ^a	(ng/mL)	(%)	(%)
添加回収	25ng/mL	炊飯後	20.52	82.1	
		標準偏差	0.49	1.9	
spike1	25ng/mL	炊飯前	15.51	62.0	75.5
		標準偏差	0.94	3.8	4.6
spike2	50ng/mL	炊飯前	28.94	57.9	70.5
	50ng/mL	標準偏差	2.13	4.3	5.2

表 2. もち米中のシトリニンの炊飯による残存率

	標準液	標準液	Citrinin 定量値	回収率	残存率
試料区分	添加量	添加タイミング	(ng/mL)	(%)	(%)
添加回収	25ng/mL	炊飯後	19.634	78.5	
		標準偏差	1.05	4.2	
spike1	25ng/mL	炊飯前	14.86	59.4	75.7
		標準偏差	0.39	1.5	2.0
spike2	50ng/mL	炊飯前	30.92	61.8	78.8
	50ng/mL	標準偏差	0.91	1.8	2.3

以上の結果から、シトリニンはうるち米およびもち米において残存率が高く、調理後も汚染しているシトリニンのほとんどが食されることが明らかになった。なお、うるち米中の汚染が低濃度である場合には、30 %近く減衰する可能性があることも示された。

表 3 にはうるち米中のオクラトキシン A の炊飯による残存率を示した。初年度から懸案になっていた実験を行った。その結果、炊飯による残存率は 83.3 ± 4.1 % であり、その減衰は期待できないことが明らかとなった。残存率の求め方として、陽性対象を炊飯後にオクラトキシン A を加えた時の濃度を 100 % と設定した。

表 3. うるち米中のオクラトキシン A の炊飯による残存率

試料		オクラトキシン A	残存率
		(ng/mL)	(%)
炊飯後オクラトキシン A 添加	平均値	4.290	100
	標準偏差	0.38	
炊飯前オクラトキシン A 添加	平均値 $\pm$ S.D.	3.590	83.8
	標準偏差	0.17	4.1

(i) 標準品のないかび毒の作成

ルテオスカイリンは *P.islandicum* の菌体内毒素であり、培養菌体内に蓄積される。そのため、今年度は精製を目的として 10 L 培養を行い、菌体を収集した。アセトンで数回抽出し、活性炭カラムにより精製を行った。その後ブタノール精製を繰り返した結果、アセトン抽出画分に少量のルテオスカイリンが認められたが、大量精製には至らなかった。

(ii) 米類の摂取量および推定汚染量によるシナリオの作成と暴露量推定

我が国での米、パスタの摂取量および本研究で得られた調理による減衰率を元に、米に汚染する可能性がある遺伝毒性カビ毒および発がん性カビ毒のリスク評価が簡便にできるシミュレーションシートを作成した（表 4）。

食品名には、1-6 歳（玄米）、1-6 歳（白米）、1-6 歳（パスタ）、7-14 歳（玄米）、7-14 歳（白米）、7-14 歳（パスタ）、15-19 歳（玄米）、15-19 歳（白米）、15-19 歳（パスタ）、20 歳以

上（玄米）、20 歳以上（白米）、20 歳以上（パスタ）より選べるようにした。
カビ毒名は、アフラトキシン B1、オクラトキシン A、シトリニンから選べるようにした。
汚染割合は、実態調査の結果のカビ毒汚染量を挿入する。これらの数値を選択または挿入することにより、精米・調理による減衰を考慮に入れた暴露量および発がん人数さらにベンチマークドーズが設定されている場合には MOE が、一日耐容摂取量が設定されている場合には耐容摂取量割合が表示される。

表 4. 米および穀類中のカビ毒のリスク評価シミュレーションシート

シミュレーションシート

2012.3.21 ver.

食品名	カビ毒名	汚染割合 (ng/g)	曝露量	発ガン人数 (10万人あたり)	MOE	耐容摂取量割合
-----	------	----------------	-----	--------------------	-----	---------

0.1

研究項目 2：米のかび毒の分析

個別課題ウ：米汚染主要かび毒の高感度一斉分析法の確立

流通市販輸入米（タイ国産）米 20 点について、アフラトキシンの分析を行うために試料の量を検討した。その結果、低レベル（1.2 ppb）のアフラトキシン添加回収試験において、試料 25 g と 5 g では有意な差が見られなかった（表 5）。試料 5 g を用いて、従来法である HPLC-蛍光検出法でアフラトキシンの分析を行ったところ、いずれも検出限界未満であった（表 6）。しかしながら、かびの一次代謝産物が微量検出され、かびの付着が疑われる試料が有った。また、選択性の高い分析機器である LC-MS/MS を用いて分析系の検討を行ったところ、主要アフラトキシン類の一部に関して、HPLC-蛍光検出法のほうで LC-MS/MS 法よりも定量限界が低い化合物が見出された。

LC-MS/MS の 2 機種（API3000@国立衛研または 4000Qtrap@食総研）を用いて、アフラトキシン、ステリグマトシステイン、オクラトキシン A、シトリニン、パツリン、フモニシンについて、効率的な一斉分析条件を検討した。さらに、黄変米毒として問題となる可能性のあるシクロクロロチンの標品を入手し、検出条件を検討し、これらの効率的な一斉分析条件を見出すことができた（表 7）。

しかしながら、一部のかび毒で HPLC-FL（蛍光）法による検出限界のほうで低い分子種（表 4. グレー部分）が有ること、イオン化抑制のために定量性に問題が生じることが多いことから、LC-MS/MS 法による分析は、スクリーニングならびに半定量に用いることにし、陽性試料が見出された際には、個別定量分析に供することが現実的と思われる。

添加回収試験により単一試験室における分析法の妥当性確認を行った結果、アフラトキシン、ステリグマトシステイン、オクラトキシン A、パツリン、フモニシンについて良好な回収率（70-120%の範囲内）が得られた。黄変米毒素であるシトリニンについても、抽出法の改善により安定した高い回収率を得ることができた（表 8）。

表 5. 試料重量による回収率の違い (1.2 ppb 添加)

	試料重量 (n=3)	
	5 g	25 g
アフラトキシンB1回収率	92.9±5.3 ^a	87.8±5.8 ^a

^a 英小文字が異なる場合は有意差有り ($p<0.05$)

表 6. 流通市販輸入米 20 点中アフラトキシン類の分析結果

かび毒	総検体数	下の濃度範囲内の検体数		
		検出限界未満	検出限界以上、定量限界未満	定量限界以上
アフラトキシンB1	20	20	0	0
アフラトキシンB2	20	20	0	0
アフラトキシンG1	20	20	0	0
アフラトキシンG2	20	20	0	0

検出限界: アフラトキシン B1 0.34 ppb, アフラトキシン B2 0.032 ppb, アフラトキシン G1 0.44 ppb, アフラトキシン G2 0.14 ppb, 定量限界: アフラトキシン B1 0.68 ppb, アフラトキシン B2 0.064 ppb, アフラトキシン G1 0.88 ppb, アフラトキシン G2 0.28 ppb.

表 7. MS/MS 測定条件と保持時間

かび毒	Precursor ion	Product ion	Declustering Potential	Collision Energy	保持時間
アフラトキシンB1	313	241.1	131	51	11.4
アフラトキシンB2	315.2	287.1	101	41	10.6
アフラトキシンG1	329.1	243	106	37	10.7
アフラトキシンG2	330.9	189	76	59	9.9
ステリグマトシステイン	325	310.2	44	35	16.5
オクラトキシンA	404	239.1	24	22	15.9
シトリニン	251	233	66	23	12.8
パツリン	152.8	108.8	-21	-12	4.1
フモニシンB1	722.5	334.1	131	53	10.2
フモニシンB2	706.4	336.1	106	51	11.8
シクロクロロチン	572.2	106.2	101	51	9.3

表 8. 検出限界の比較

	検出限界 (ppb)		
	LC-MS/MS		HPLC-FL
かび毒	API3000	4000Qtrap	(誘導体化)
アフラトキシンB1	2.0	0.25	0.34
アフラトキシンB2	2.5	0.67	0.032
アフラトキシンG1	1.0	0.20	0.44
アフラトキシンG2	4.0	1.3	0.14
ステリグマトシステイン	62		
オクラトキシンA	5.4		
シトリニン	6.3		
パツリン	1.3		
フモニシンB1	77		
フモニシンB2	35		

表 9. シトリニンの添加回収試験結果

	添加濃度 (ng/g)	繰り返し	回収率 (%)	繰り返し精度 (%)	定量下限 (ng/g)
マトリクス					
玄米	40.0	3	84.1	1.9	7.6
ジャスミンライス	40.0	3	98.7	4.2	7.6
タイ米	40.0	3	94.7	4.5	7.6
タイ餅米	40.0	3	88.0	2.5	7.6

研究項目 3：摂取形態モデルにおける毒性評価

個別研究課題名：オクラトキシン A の発がん機序解明

前年度同様、雄の *gpt delta* ラット各群 5 例に、オクラトキシン A 5 ppm を 4 週間 CRF-1 粉末飼料に混じて投与し、剖検時に肉眼的に発がん非標的部位である皮質および発がん標的部位である髄質外帯外層を含む髄質外帯部を採取した。対照群には CRF-1 粉末飼料を自由に摂取させた。腎皮質および髄質外帯部における cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、その一部の遺伝子については real time RT-PCR による mRNA レベルの検索も行った。その結果、腎皮質及び髄質外帯部における網羅的遺伝子発現解析では、皮質部で 1796 個、髄質外帯部で 1726 個の発現変動遺伝子を検出した ($P < 0.05$, fold change ≥ 1.5)。その内、皮質部では変化は認められず髄質外帯部においてのみ発現増加が認められた遺伝子として、DNA 二重鎖切断の修復に関わる (*Chek1*, *Rad18*, *Brip1*, *Brcc3* 等)、細胞周期促進に関わる (*Cyclin E1*, *A2*, *B1* 等)、DNA 損傷応答を介した G2/M arrest 誘発に関わる (*Chek1*, *Wee1*)、Bcl-2 family (*Bak1*, *Bik*)、癌抑制遺伝子 *p53* に関わる (*Phlda3* 等) 遺伝子群が抽出された (Table 10~12)。これら遺伝子の多くは real time RT-PCR 法においても mRNA レベルの有意な発現増加が確認された。(Figure 1~3)。

前年度までに、オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対する癌抑制遺伝子 *p53* の役割を調べるために、雄の野生型である *gpt delta* マウス (WT) および *p53* ホモ欠

損 *gpt delta* マウス (*p53* KO) 各群 5 例に、0.1 M NaHCO₃ 溶液に溶解させたオクラトキシン A を 0、1、5 mg/kg の用量で 4 週間強制経口投与し、*in vivo* 変異原性評価を実施した。その結果、*p53* KO の 5 mg/kg 投与群において *red/gam* 遺伝子変異頻度は約 3 倍上昇し、有意な差となった。本年度では、上記の網羅的遺伝子発現解析の結果に基づき、western blot 法により腎組織中の *p53* タンパク質の発現解析を実施した。その結果、WT の 5 mg/kg 投与群において、*p53* タンパク質発現の有意な増加が認められた (Figure4)。P53 KO マウスにおいては、*p53* タンパク質の発現は認められなかった。

Figure 1 DNA double strand break-related genes in the renal cortex (COR) and outer medulla (OM)

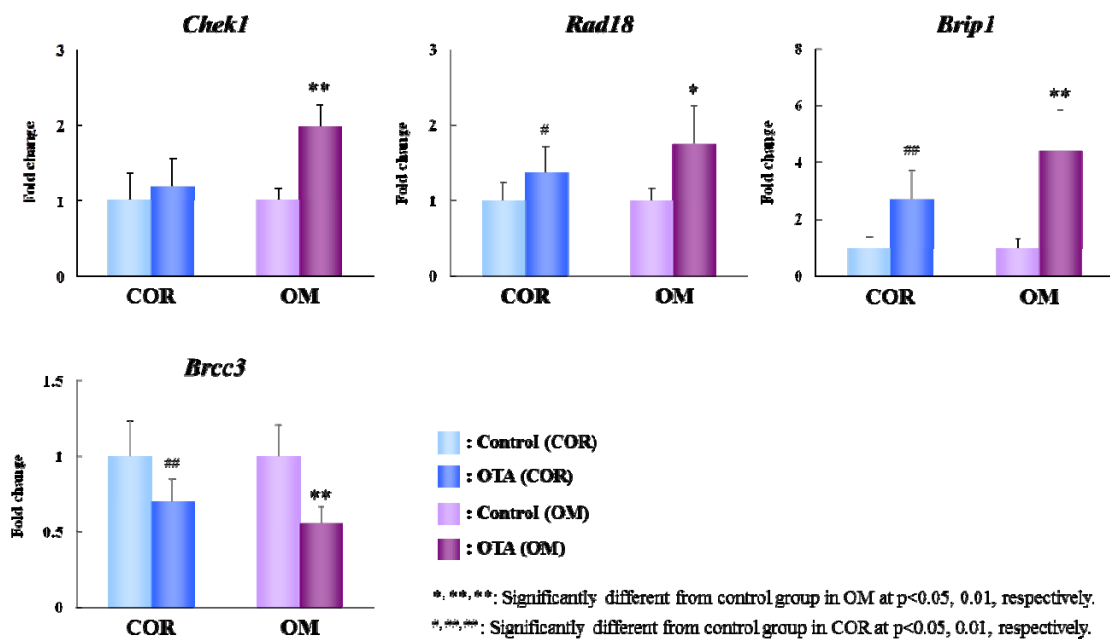
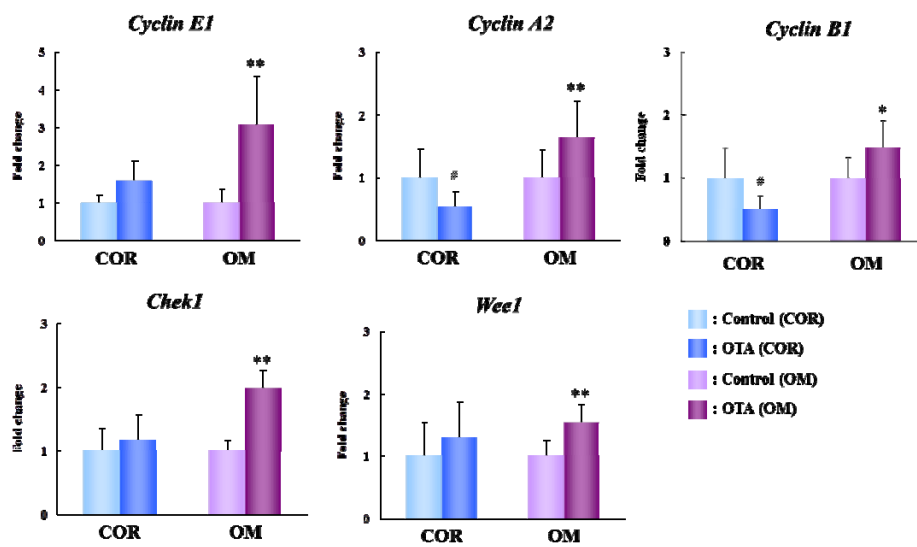


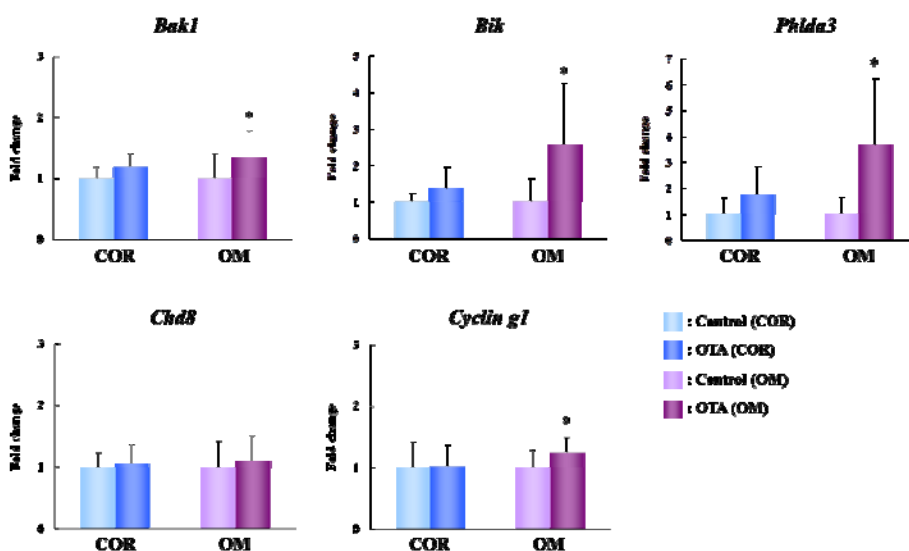
Figure 2 Cell cycle-related genes in the renal cortex (COR) and outer medulla (OM)



[#]: Significantly different from control group in COR at $p < 0.05$.

^{*}, ^{**}: Significantly different from Control group in OM at $p < 0.05$, 0.01, respectively.

Figure 3 Bcl-2 family and p53-related genes in the renal cortex (COR) and outer medulla (OM)



^{*}: Significantly different from control group in OM at $p < 0.05$.

Figure 4 The expression of p53 protein in the renal cortex (COR) and outer medulla (OM)

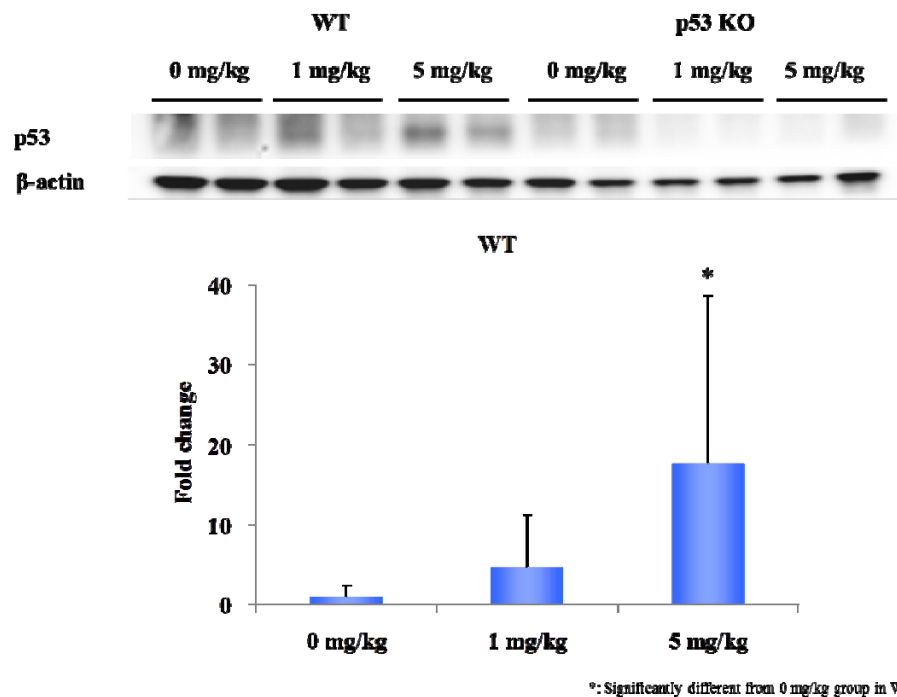


Table 10 DNA damage and repair-related genes modulated by OTA in the renal outer medulla (OM)

Function	EnrrezGeneID	GeneSymbol	Fold change ^a	Regulation	GeneName
DNA double strand break repair	25332	<i>Mgat</i>	1.60	up	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
	140583	<i>Chk1</i>	2.69	up	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
	305000	<i>Exo1</i>	1.50	up	Exonuclease 1
	362412	<i>Rad18</i>	2.39	up	RAD18 homolog (S. cerevisiae)
	316344	<i>Rev1</i>	1.65	up	REV1 homolog (S. cerevisiae)
	500247	<i>Aptf</i>	1.56	up	Agrafin and FSKP like factor
	500987	<i>H2afv</i>	1.54	up	H2A histone family, member X
	360388	<i>Brip1</i>	2.19	up	BRCA1 interacting protein C-terminal helix 1
	316794	<i>Brec3</i>	1.68	down	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3
	64576	<i>Ptpv</i>	3.44	up	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, V
p53 associated factor	363989	<i>Ptthb3</i>	2.50	up	Fleckstein homology-like domain, family A, member 3
	65027	<i>Cdh8</i>	1.88	up	Chromodomain helicase DNA binding protein 8
	25498	<i>Npas1</i>	1.50	up	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
	25405	<i>Ccng1</i>	1.65	up	Cyclin G1
	283508	<i>Rchy1</i>	2.26	down	Ring finger and CHEY zinc finger domain containing 1
	140583	<i>Chk1</i>	2.69	up	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
DNA damage checkpoint regulation	316794	<i>Brec3</i>	1.68	down	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3
	64576	<i>Ptpv</i>	3.44	up	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, V
	25405	<i>Ccng1</i>	1.65	up	Cyclin G1

^a: Statistically significance represented by $P < 0.05$.

Table 11 Cell cycle-related genes modulated by OTA in the renal outer medulla (OM)

Function	EntrezGeneID	GeneSymbol	Fold change ^{a)}	Regulation	GeneName
Regulation of G1 phase	81889	<i>Tgfb2</i>	3.89	up	transforming growth factor, beta 2
	363498	<i>Bex2</i>	1.78	up	brain expressed X-linked 2
Regulation of G1/S phase	362817	<i>Cdk2</i>	1.51	up	cyclin dependent kinase 2
	23729	<i>Ccne1</i>	2.69	up	cyclin E1
	114494	<i>Ccna2</i>	4.33	up	cyclin A2
	29340	<i>Inhba</i>	3.88	up	inhibin beta-A
	24245	<i>Casck2b</i>	2.35	up	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta
	148583	<i>Chk1</i>	2.69	up	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
Regulation of G2/M phase	25405	<i>Ceng1</i>	1.65	up	Cyclin G1
	114494	<i>Ccna2</i>	4.33	up	cyclin A2
	308937	<i>Wee1</i>	1.65	up	wee 1 homolog (S. pombe)
	287686	<i>Sept4</i>	1.98	down	Septin 4
	291441	<i>Ska2</i>	2.54	up	spindle and kinetochore associated complex subunit 1
Regulation of M phase	287598	<i>Ska2</i>	1.56	up	spindle and kinetochore associated complex subunit 2
	296368	<i>Ube2c</i>	2.57	up	ubiquitin-conjugating enzyme E2C
	29214	<i>Tubb5</i>	2.56	up	tubulin, beta 5
	25515	<i>Pik1</i>	2.29	up	pika-like kinase 1 (Drosophila)
	25283	<i>Ccnb1</i>	1.53	up	cyclin B1

^{a)}: Statistically significance represented by $P < 0.05$.

Table 12 Apoptosis-related genes modulated by OTA in the renal outer medulla (OM)

Function	EntrezGeneID	GeneSymbol	Fold change ^{a)}	Regulation	GeneName
Bcl-2 family (pro-apoptotic)	116502	<i>Bak1</i>	1.67	up	BCL2-antagonist/killer 1
	114496	<i>Bik</i>	2.31	up	BCL2 interacting killer (apoptosis inducing)
Apoptosis regulation mediated p53 response	363989	<i>Phfda3</i>	2.90	up	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 3
	65027	<i>Chd8</i>	1.88	up	Chromodomain helicase DNA binding protein 8
	25498	<i>Npm1</i>	1.50	up	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
	25405	<i>Ceng1</i>	1.65	up	Cyclin G1
	25405	<i>Zmat3</i>	1.83	up	zinc finger, matrix type 3

^{a)}: Statistically significance represented by $P < 0.05$.

研究項目 4：きのこ毒の発生要因解析と摂取形態モデルの構築

(1) 行動薬理学的所見 スギヒラタケ由来シアン配糖体画分の高用量投与群の 1 例で投与後 1 時間目に腹臥位がみられたが、2 時間目までに回復した。他の個体では一般状態に変化はみられなかった。病理学的観察 被験物質経口投与後 24 時間に解剖し、病理組織学的検査を実施したところ、心臓、肺及び腎臓に石灰化、腎臓の尿細管に 2,8-dihydroxyadenine(DHA)結晶沈着等、慢性腎不全の続発性あるいは二次的变化はみられたものの、被験物質に起因した明らかな変化はみられなかった。また、対照群及び被験物質投与群の脳、小脳、いずれの部位についても、神経細胞、神経線維、グリア等に形態学的な異常は認められなかった。従って、高用量投与群でみられた一過性の一般状態の詳細な原因は、本試験での検査項目においては基質的变化がみられなかったため不明であった。以上のことから、アデニン腎障害動物へのスギヒラタケ由来シアン配糖体画分の投与は一過性の一般状態を引き起こす可能性が示唆された。

(2) シアン化物イオン及びチオシアン酸イオンの分析 血中のシアン化物イオンに関しては、被験物質経口投与前から経口投与後を差し引いた血中濃度の増加量は、対照群と比べて被験物質投与群で高値を示した。また、高用量投与群は低用量投与群と比べて高い値を示した。(Table 13 及び Fig.5)また、血中のチオシアン酸イオンに関しては、被験物質経口投与前から経口投与後を差し引いた血中濃度の増加量は、対照群と比べて被験物質投与群で濃度依存的に高値を示し、その値は投与濃度依存的に増加した。(Table 14 及び Fig. 6)一方、解剖時の脳中のシアン化物イオンは検出限界以下だったが、解剖時の脳中のチオシアン酸イオンにおいては、対照群と比べて被験物質投与群で高値を示し、その値は濃度依存的に高い値を示した。(Table 15 及び Fig. 7)

Table 13. 全血中のシアン化物イオン分析

Sample No.	全血投与前 (μM)	全血投与後6～8時間 (μM)	全血解剖時 (μM)	投与後-投与前 (μM)	剖検時-投与前 (μM)
1101	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1102	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1103	8.75	8.75	8.33	0	-0.42
1201	3.13	6.25	4.38	3.13	1.25
1202	2.81	3.02	2.50	0.21	-0.31
1203	2.08	2.50	2.29	0.42	0.21
1301	2.08	5.83	2.50	3.75	0.42
1302	N.D.	8.13	N.D.	1.63	N.D.
1303	N.D.	4.38	2.08	0.88	0.42

*Sample No : 1101-1103 Control, 1201-1203 Low-dose, 1301-1303 High-dose

Fig. 5 全血中のシアン化物イオンの分析 (投与前-投与後)

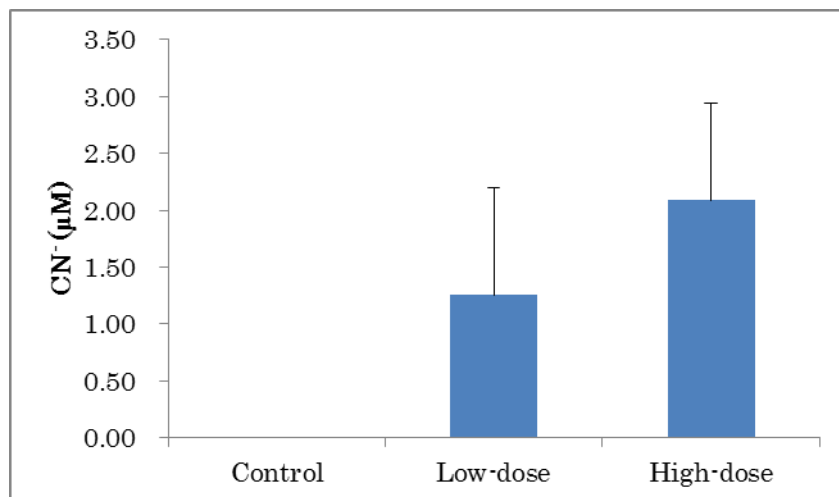


Table14. 全血中のチオシアン酸イオン分析

Sample No.	全血投与前 (μM)	全血投与後6~8時間 (μM)	全血解剖時 (μM)	投与後-投与前 (μM)	剖検時-投与前 (μM)
1101	3.80	3.11	3.35	-0.69	-0.45
1102	2.44	1.96	2.77	-0.47	0.34
1103	3.44	3.26	4.14	0.02	0.90
1201	3.23	4.62	5.47	0.47	1.32
1202	4.14	2.23	2.76	0.93	1.46
1203	1.31	2.55	2.95	1.21	1.61
1301	5.49	11.88	13.22	6.40	7.74
1302	2.99	10.01	10.84	7.02	7.85
1303	1.53	6.91	7.76	5.37	6.22

* Sample No 1101-1103 Control, 1201-1203 Low-dose, 1301-1303 High-dose

Fig.

6 全血中のチオシアン酸イオンの分析 (投与前-投与後)

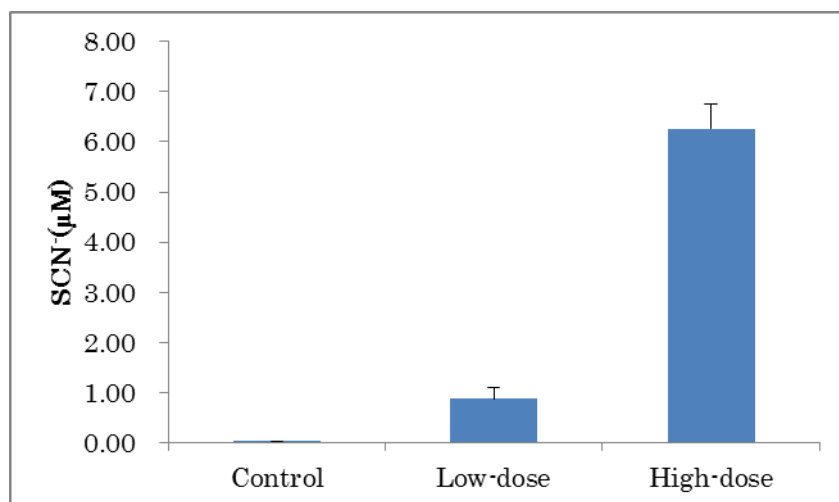
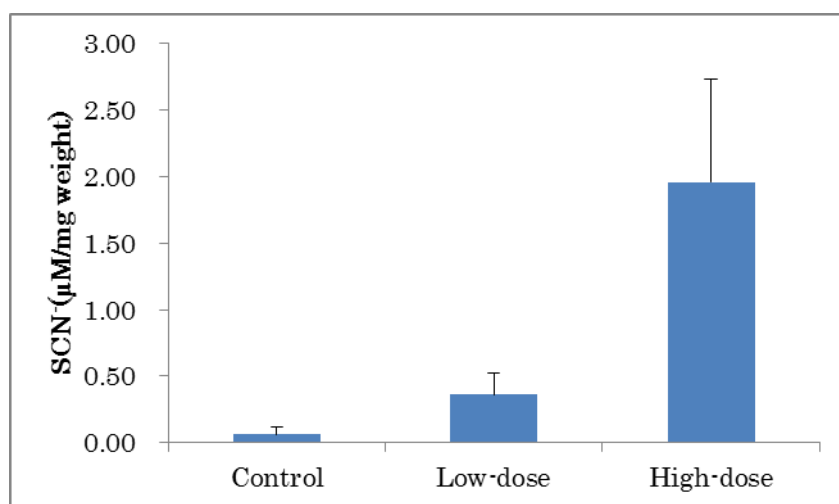


Table 15. 脳中のチオシアン酸イオン分析

Sample No.	使用重量(mg)	SCN ⁻ (μ M)	SCN ⁻ (μ M/mg weight)
1101	544.3	0	0
1102	293	0.053	0.182
1103	—	—	—
1201	171	0.114	0.664
1202	303.7	0.030	0.099
1203	224.8	0.072	0.320
1301	156	0.542	3.472
1302	70.1	0.102	1.458
1303	351.6	0.333	0.948

*Sample No : 1101-1103 Control, 1201-1203 Low-dose, 1301-1303 High-dose

Fig. 7 脳中のチオシアン酸イオンの分析（投与前-投与後）



3 考察及び結論

食品汚染カビ毒に対する基準値は、国内外で決められているが、主食となる食品が規制対象となっている基準は 2010 年にコーデックス基準となったオクラトキシン A が最初であると思われる。ヨーロッパでは、麦類を主食としているため、麦類のオクラトキシン A の基準値が設定された。総アフラトキシンの基準値の場合、コーデックスでは落花生や木の実を対象に設けられているが、一部の地域で主食となるトウモロコシに対しての基準は設けられていない。この最大の理由としては、主食を対象とした場合にはその摂取量の多さから基準値を低く設定する必要があることが推定される。

我が国では、主食として米と小麦が考えられる。米に汚染する可能性がある発がん性カビ毒としては、総アフラトキシン、オクラトキシン A、黄変米毒（シトリニン、シクロクロチン、ルテオスカイリン）が我々の今までの成果から考えられている。小麦においてはオクラトキシン A、トリコテセン系カビ毒が汚染の可能性が高いが、その中で発がん性が認められているのはオクラトキシン A である。これらのカビ毒に対する我が国での基準値設定状況は、総アフラトキシンは全食品に対して定められているが、オクラトキシン A

および黄変米毒においては、未だ基準値は決められていない。今のところ、幸いなことに我が国に流通している米には、総アフラトキシン、オクラトキシン A、黄変米毒の汚染は検出されていない。しかしながら、世界的に温暖化、気候変動等の理由により農作物へのカビ毒汚染が懸念されており、将来的にも汚染がないという保証はない。現に昨年に、流通米ではなかったが国産米からアフラトキシンの汚染が検出された事例があった。また昨年度の我々の成果において、総アフラトキシンの現在の規制値 10 µg/kg を米に適応した場合、摂取量が他の食品と比べ多いことからその暴露量は高くなり、発がんリスクが飛躍的に上がることを報告している。そのため、主食とされる食品のカビ毒汚染を実態調査でモニタリングをし、その結果から即座にリスク評価ができるリスク評価法、シミュレーションシートを開発しておけば、もし輸入米などでこれらカビ毒の汚染が明らかになったときに瞬時にしてリスク評価ができ、基準値設定などの対応が可能となる。

本事業では、3 年間の成果として、米の総アフラトキシン、オクラトキシン A、シトリニンおよび小麦中のオクラトキシン A を対象に調理による減衰を考慮に入れた、各年齢層の暴露評価およびリスク評価が簡便にできるシミュレーションシートを作成した。このシートに米およびパスタ中の汚染量を挿入するだけで、瞬時にリスク評価を行うことができる。

なお、シトリニンに関しては毒性評価研究が乏しい為、現時点ではリスク評価数値 MOE 等が表示されていないが、今後の諸外国の研究により明らかになれば即に改訂できる。オクラトキシン A に関しては、現時点では我々が本研究で明らかとした遺伝毒性を考慮に入れると MOE がそのリスク評価として適当であるが、国際基準ではいまだ一週間耐容摂取量で評価されていることから、両方を表示することとした。

同時にモニタリングのためのアフラトキシン、ステリグマトシスチン、オクラトキシン A、シトリニン、パツリン、フモニシン、シクロクロチンの LC-MS/MS による効率的な一斉分析条件を見出すことができた。定量に関して、黄変米毒素であるシトリニンの抽出法の改善により、回収率を向上させることができた。

オクラトキシン A の遺伝毒性実験では、発がん標的部位において DNA 二重鎖切断の修復関連遺伝子の変動が顕著であったこと、オクラトキシン A は DNA 鎖切断を引き起こすことが報告されていること、また、遺伝子欠失変異は DNA 二重鎖切断の修復過程あるいは修復不全により引き起こされることが報告されていることから、オクラトキシン A は何らかのメカニズムにより DNA 二重鎖切断を引き起こし、その修復過程あるいは修復不全により遺伝子欠失変異を引き起こしている可能性が考えられた。また、cell cycle の促進に関与する遺伝子の発現増加が認められたことから、オクラトキシン A の細胞増殖活性の亢進も腎発がんに寄与するものと考えられた。

DNA 損傷応答チェックポイント制御に関与する遺伝子 Chk1、シグナル伝達において Chk1 の下流にある Wee1 の遺伝子発現増加が認められたことから、G2/M arrest チェックポイント制御機構が誘導されている可能性が考えられた。オクラトキシン A は G2/M arrest を誘発することが報告されている。また、DNA 鎖切断を介した Chk1 タンパク質（遺伝子名：Chk1）の活性化は G2/M arrest を引き起こし、ployploidy/aneuploidy を誘発することが報告されていることから、オクラトキシン A は DNA 損傷を介した G2/M arrest 機構によりカリオメガリーが形成されている可能性が考えられた。Bcl-2 ファミリーに属し、

pro-apoptotic 作用を有する Bik は DNA 損傷直接的にあるいは *p53* を介して活性化され、ミトコンドリア pathway を通じてアポトーシスを誘発することが報告されている。オクラトキシン A はミトコンドリア pathway を通じてアポトーシスを引き起こすことが報告されていることから、オクラトキシン A は一部で DNA 損傷 direct に Bik を活性化し、ミトコンドリア pathway を通じて、アポトーシスが誘発されている可能性が考えられた。また、*p53* によりその発現が制御される *Phlda3* の発現上昇が認められたことから、*p53* により、Bik が活性化されている可能性、また、*p53* が中心となってアポトーシスを誘発している可能性も考えられた。さらに、*p53* はオクラトキシン A 誘発遺伝子変異あるいは cell cycle の制御に何らかの影響を及ぼしている可能性も考えられた。

オクラトキシン A 誘発 *in vivo* 変異原性に対する癌抑制遺伝子 *p53* の役割を調べた実験において、*p53* KO における *red/gam* 遺伝子変異頻度の上昇が認められた(前年度の結果より)。本年度では、腎組織中の *p53* タンパク質発現を western blot 法により検索した結果、WT において *p53* のタンパク質発現の増加が認められ、オクラトキシン A による *p53* の活性化が示唆された。従って、オクラトキシン A により誘発される *in vivo* 変異原性に対し、*p53* が抑制的に機能していることが示唆された。以上、平成 21~23 年度の研究成果より、オクラトキシン A の腎発がん機序に対する遺伝毒性メカニズムの関与が明らかとなった。

自然毒のリスク評価方法の開発では、スギヒラタケの食中毒病因物質の疑いが最も高いシアン配糖体の化学構造を昨年度までに明らかにしたが、今年度は慢性腎不全動物であるアデニン誘発性腎不全ラットを用いて毒性実験を行い、その毒性機序を明らかにした。すなわちスギヒラタケ由来シアン配糖体が腸管で加水分解されて、シアン化物イオンが遊離し、生体内解毒酵素であるロダニースによりチオシアン酸イオンに代謝されることが示唆された。また、血中に増加したチオシアン酸イオンが脳に移行して蓄積することが示唆された。これらの成果は、スギヒラタケのリスク評価に役立つとともにリスクコミュニケーションにも資するものである。

4 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

- 1) Masayo Kushiro, Hiroyuki Nakagawa, Hitoshi Nagashima, Michihiko Saito. Fumonisin B2 production on agar media by *Aspergillus niger* of Japanese origin. *Mycotoxins* 2(61), 47-52.
- 2) Masayo Kushiro, Hatsuo Saitoh, Yoshitsugu Sugiura, Takayuki Aoki, Shin-ichi Kawamoto, Toyozo Sato. Experimental infection of *Fusarium proliferatum* in *Oryza sativa* plants; fumonisin B1 production and survival rate in grains. *International Journal of Food Microbiology* (in press).
- 3) Hibi D, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Watanabe M, Sugita-Konishi Y, Yanai T, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T. Site-Specific In Vivo Mutagenicity in the Kidney of gpt Delta Rats Given a Carcinogenic Dose of Ochratoxin A. *Toxicological Sciences*. 2011. 122(2), 406-414.
- 4) Akira Suzuki, Hoang Pham Nguyen Duc, Kosuke Nakamura, Hiroshi Akiyama and Yoshimasa Kasahara, Remarkable growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*, *Jpn.J. Food Chem.Safety*, 18, 18-24 (2011).
- 5) Asako Watanabe-Ishitsuka, Hiroshi Akiyama, Kazunari Kondo, Saemi Obitsu, Nobuo Kawahara, Reiko Teshima, and Yukihiro Goda, Determination of cyanogenic glycoside linamarin in cassava flour using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Jpn.J. Food Chem.Safety*, in press

(2011).

5 本研究を基にした学会発表の実績

- 1) 久城真代、斉藤道彦「国産 *Aspergillus niger* の各種寒天培地でのフモニシン産生性の検討」日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会、2011 年 1 月 7 日、タワーホール船堀
- 2) Hibi D, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Watanabe M, Sugita-Konishi Y, Yanai T, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T. 第 28 回 日本毒性病理学会 (2012.2. 東京)
- 3) Akira Suzuki, Hoang Duc Pham Nguyen, Kosuke Nakamura, Hiroshi Akiyama and Yoshimasa Kasahara, Growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*, The 6th Meeting of East Asia for Mushroom Science 2020, Gyeongju TEMF Hotel, Republic of Korea, November 12-15, 2010 (Organized by The Korean Society of Mushroom Sciences, Japanese Society of Mushroom Science and Biotechnology, and Eible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences)

6 特許及び特許出願の数と概要

なし

7 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）の実績

米および穀類中のカビ毒のリスク評価シミュレーションシートを作成した。

8 今後の問題点等

- 1) オクラトキシン A の腎発がん機序に遺伝毒性メカニズムが関与することが明らかとなった。また、その遺伝子変異誘発機序として DNA 二重鎖切断が示唆されたが、その詳細なメカニズムについては明らかとはならなかった。今後、ヒトの食に対する安全性を担保する上で、オクラトキシン A の遺伝子変異誘発機序を解明する必要があると考えられた。
- 2) シクロクロロチンの不安定さが露呈したため、適切な保存条件の検討が必要である。
- 3) 腎障害患者へのスギヒラタケ由来シアン配糖体摂取により、血中及び脳中のチオシアン酸イオン濃度が蓄積させることが示唆された。今後、蓄積されたチオシアン酸イオンと急性脳症との関係を解明する必要があると考えられた。