

学 位 論 文 題 名

穀類及び家畜のアフラトキシン汚染と鶏幼雛消化管における
アルブミンによるアフラトキシン排除に関する研究

学位論文内容の要旨

アフラトキシンは自然界で最も発癌性の強い、肝臓毒性を有するマイコトキシンである。食品及び飼料のアフラトキシンによる汚染は公衆衛生及び家畜衛生の面で重大な問題を引き起こしている。著者はこの問題に対処するため、1) アフラトキシン産生糸状菌の検索及び同定、2) 輸入飼料及び食品のアフラトキシン汚染の現状、3) 汚染飼料から家畜に移行したアフラトキシンによる畜産物の残留汚染、及び4) アフラトキシン汚染飼料摂取家畜体内からのアフラトキシンの排除、に関する研究を行った。

アフラトキシンを産生する糸状菌はAspergillus (A.) flavus及びA. parasiticusの2種である。両者を鑑別するため、従来、分生子形成構造体の形態の相違を調べ鑑別を行っていた。この方法には、分生子形成構造体が形成されるまで培養するため時間がかかること、及び形態の相違の鑑別に技術的熟練を要するという問題がある。両糸状菌種が産生するアルカリプロテアーゼのネイティブゲルを用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動の移動度の相違によって、両者を鑑別することが可能である。ペンギンの野外感染例から分離された糸状菌株に対しその方法を試みた。野外分離糸状菌株を微量遠心チューブで培養し、酵素免疫測定法（ELISA）及び高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用い、培養液及び菌体のアフラトキシンを検出することで、アフラトキシン産生能を確認した。続いて、同糸状菌株から酵素を粗抽出し、ポリアクリアミドゲル電気泳動を行い、ゲル上のアルカリプロテアーゼ活性部位から求められる同酵素の移動度を標準株A. flavus NRRL1957及びA. parasiticus NRRL 2999のものと比較したところ、A. flavusのものと一致し、容易にA. flavusと鑑別でき

た。一方、Aspergillus属に属するA. oryzae及びA. sojaeは発酵食品製造に利用されているので、A. oryzae及びA. sojaeに属する多数の糸状菌株がアフラトキシンを産生しないことを確認することは、食品衛生上重要である。34株のA. oryzae及びA. sojaeに属する糸状菌株を微量遠心チューブで培養し、培養液及び菌体のアフラトキシンの有無をE L I S A及びH P L Cによって調べることによって、アフラトキシンを産生する株がないことを確認した。

一方、日本に輸入される食品及び飼料からアフラトキシンが頻繁に検出されている。輸入食品（ピーナッツ、アーモンド、唐辛子、胡椒、ココア豆、蕎麦、胡桃、鳩麦、大豆、ポップコーン及びピスタチオナッツ）からアフラトキシンの検出を試みたところ、E L I S Aで、これらのうち7種類の食品からアフラトキシンB₁（AFB₁）が検出された。それらのうち胡椒で6.5 ng /g と最大値を示したが、すべて10 ppb以下であった。H P L Cでは、4種類の食品からAFB₁が検出された。更に、海外で流通している食品について、インドネシア共和国のスマトラ島の市場で購入されたピーナッツ及びトウモロコシのアフラトキシン汚染状況を調べたところ、ピーナッツからE L I S Aで最大6299 ppb、H P L Cでは最大7200 ppbのAFB₁が検出され、高濃度のアフラトキシンに汚染された食品が流通していることが示唆された。それら29種の試料のE L I S A及びH P L Cによる測定値の間の相関係数を求めたところ、0.9923で有意水準P<0.001で非常に高い相関関係があることが認められた。アメリカ合衆国、中華人民共和国及びタイ王国から輸入された飼料用トウモロコシ計14検体のAFB₁をE L I S Aによって調べたところ、12検体からAFB₁が検出された。タイ王国からの2検体は、 27.27 ± 1.21 ng/g及び 31.21 ± 1.65 ng/gと日本の規制値の二倍以上のAFB₁で汚染されていた。これらの結果から、輸入時の検査によりアフラトキシン汚染食品及び飼料が国内に流通しないようにすることの重要性が示唆された。

汚染飼料から家畜に移行したアフラトキシンについて調べるため、 10.8 ± 4.1 ng/gのAFB₁で自然汚染されていた被検トウモロコシを68.2%配合した飼料を長期間給与されていた鶏群の血漿中AFB₁の検出を行った。E L I S Aで 2.3 ± 0.2 pg/ml、H P L Cで 12.3 ± 1.8 pg/mlのAFB₁が検出され

た。続いて、同鶏群の肝臓を調べたが、肝臓からは AFB_1 は検出されなかった。また、アフラトキシンによる肝障害が示唆された屠畜場の豚の肝臓の調査を行ったが、アフラトキシンは検出されなかった。

アフラトキシンの畜産物汚染を防止するため、汚染飼料に含まれるアフラトキシンの無毒化が必要で、そのために強力な物理化学的処理を行うと飼料中の栄養分も大きく損なわれる。活性炭やケイ酸アルミニウムをアフラトキシンの吸着剤として用い、それらを汚染飼料と一緒に給与し、消化管内でアフラトキシンを吸着させ、その吸収を抑制しようと、最近試みられている。著者は、アルブミンが血液中の AFB_1 の主要な担体であることに着目し、牛血清アルブミン (BSA) を用い、一方、実験動物として、免疫グロブリンなどの高分子を消化管から吸収しない 1 日齢の鶏幼雛を用い、BSA を AFB_1 と同時に経口投与した場合の AFB_1 による肝障害に及ぼす影響について調べた。肝障害の指標として、血漿中イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) 活性と、血漿及び肝臓の AFB_1 濃度、更に肝臓における細胆管の増生、肝細胞の空胞化及び壊死を用いた。 AFB_1 +BSA 投与群では対照群とくらべ ICDH 活性に有意差が生じなかったのに対し、 AFB_1 単独投与群では ICDH 活性が有意に上昇した。血漿及び肝臓中の AFB_1 濃度は AFB_1 +BSA 投与群では AFB_1 単独投与群にくらべ低い値を示し、組織変化も AFB_1 +BSA 投与群の方が AFB_1 単独投与群とくらべ弱い傾向を示した。それぞれの血中薬物濃度下面積を比較することによって、 AFB_1 +BSA 投与群では吸収された AFB_1 の量が AFB_1 単独投与群よりも少ないことが示唆された。これは、1 日齢の鶏幼雛では、消化管内で巨大分子を吸収しないので、BSA が消化管内で同時投与された AFB_1 の一部と結合し、吸収されることなく排泄されることによるものと考えられた。また、アフラトキシンの吸着剤としてケイ酸アルミニウムの同時投与を行ったところ、BSA 投与実験と同様な結果が得られ、1 日齢の雛を用いた本実験モデルはアフラトキシン結合性高分子物質や吸着剤を用いることにより、アフラトキシンの消化管における吸収を抑制する、アフラトキシンの家畜の体内からの排除技術を開発する上で重要だと考えられた。

以上のように、著者は本研究で、アフラトキシンの汚染状況を把握し、更に家畜へのアフラトキシンの残留を防ぐ方法の開発を行い、人のアフラトキシンに対する安全性を確保する上で、貴重な知見を得る事ができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 教 授 佐 藤 文 昭
副 査 教 授 喜 田 宏
副 査 助 教 授 高 島 郁 夫

学 位 論 文 題 名

穀類及び家畜のアフラトキシン汚染と鶏幼雛消化管における アルブミンによるアフラトキシン排除に関する研究

アフラトキシンは自然界で最も発癌性の強い、肝毒性を有するマイコトキシンで、食品および飼料の当該トキシンによる汚染は公衆衛生、家畜衛生上重要な問題である。

輸入食品の安全性を確認するため、新規に開発した高感度ELISA法でアフラトキシンの検出を試みたところ、7種類の食品からアフラトキシン B₁ (AFB₁) が検出されたが、すべて基準値の10ppb以下であった。一方、インドネシア共和国のスマトラ島の市場で得たピーナッツからは最大6299ppbが検出され、現地ではAFB₁で高濃度に汚染された食品が流通していることが示された。アメリカ合衆国、中華人民共和国及びタイ王国から輸入された飼料用トウモロコシ計14検体中、12検体からAFB₁が検出され、タイ王国からの2検体は、日本の規制値の二倍以上のAFB₁で汚染されていることが分かり、輸入時の検査の強化の必要性が示された。また、AFB₁混入食で自然汚染されていた鶏群の血漿中からもAFB₁を高感度に検出することが出来た。1日齢の鶏幼雛を用い、BSAをAFB₁と同時に経口投与したところ、肝障害のマーカーとなる生化学的、病理学的パラメータには、AFB₁+BSA投与群では無投与対照群と比べ有意差がなかったのに対し、AFB₁単独投与群では有意な差を示した。血中薬物濃度下面積は、AFB₁+BSA投与群の方がAFB₁単独投与群よりも小さいことが示された。これらの結果は、巨大分子を吸収出来ない1日齢の鶏幼雛では、BSAが消化管内で同時投与されたAFB₁の一部と結合し、吸収されることなく排泄されるためと考えられた。さらに、同じ発想で、吸着剤としてケイ酸アルミニウム(AS)の同時投与を行ったところ、BSA投与同様、AFB₁による肝臓障害が抑制された。

以上のように、本研究で平野氏は鋭敏で再現性の良いアフラトキシン検出法を確立し、これを用いて輸入食品、飼料、並びに、東南アジアの流通食品のアフラトキシン汚染状

況を調査し、一部に基準値以上の高濃度の汚染が存在することを指摘し、さらに家畜へのアフラトキシンの残留を防ぐ方法の開発に関する研究を行い、ヒトのアフラトキシンに対する安全性を確保する上で貴重な知見を提供した。よって、審査員一同は平野孝一氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。