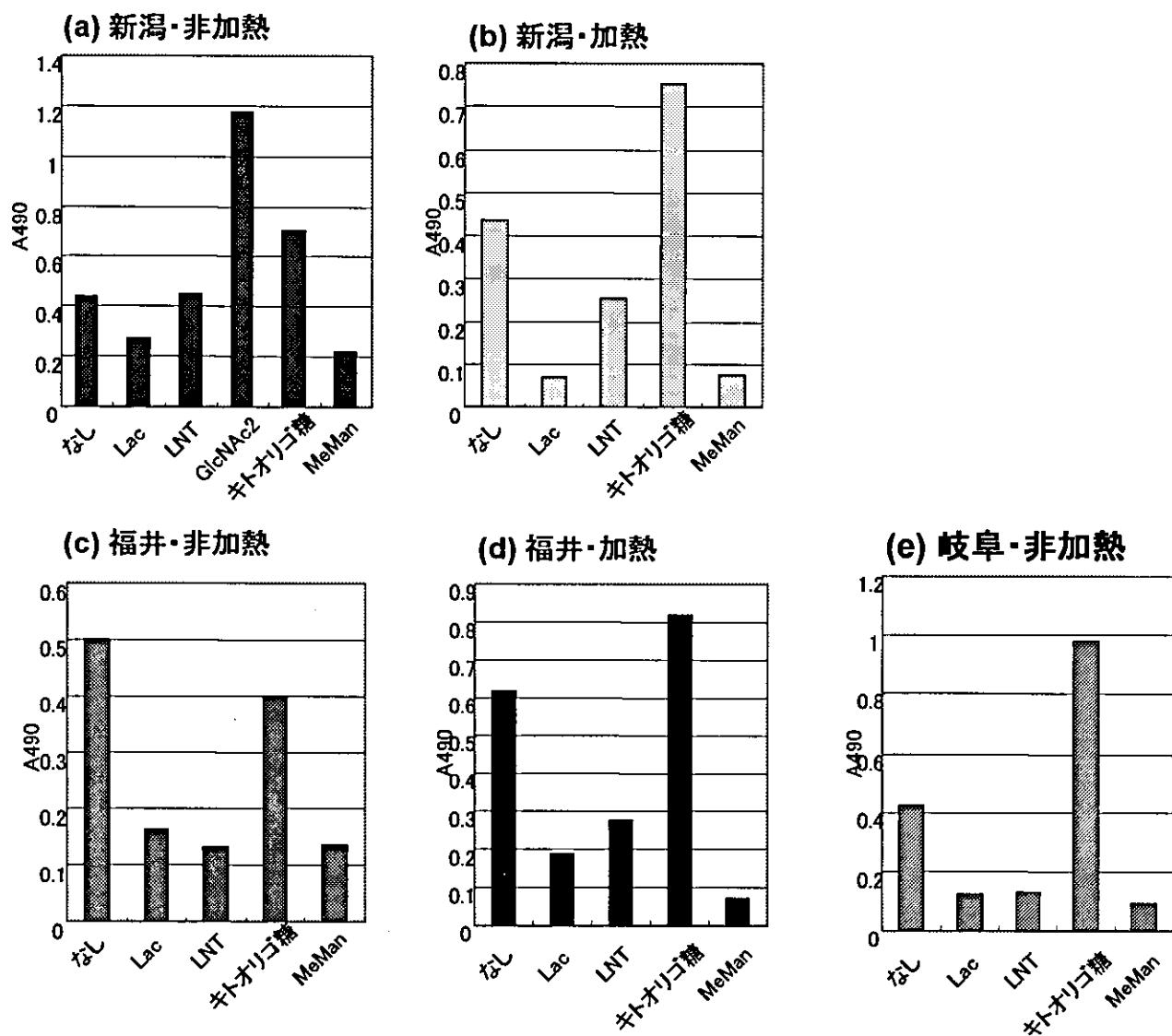
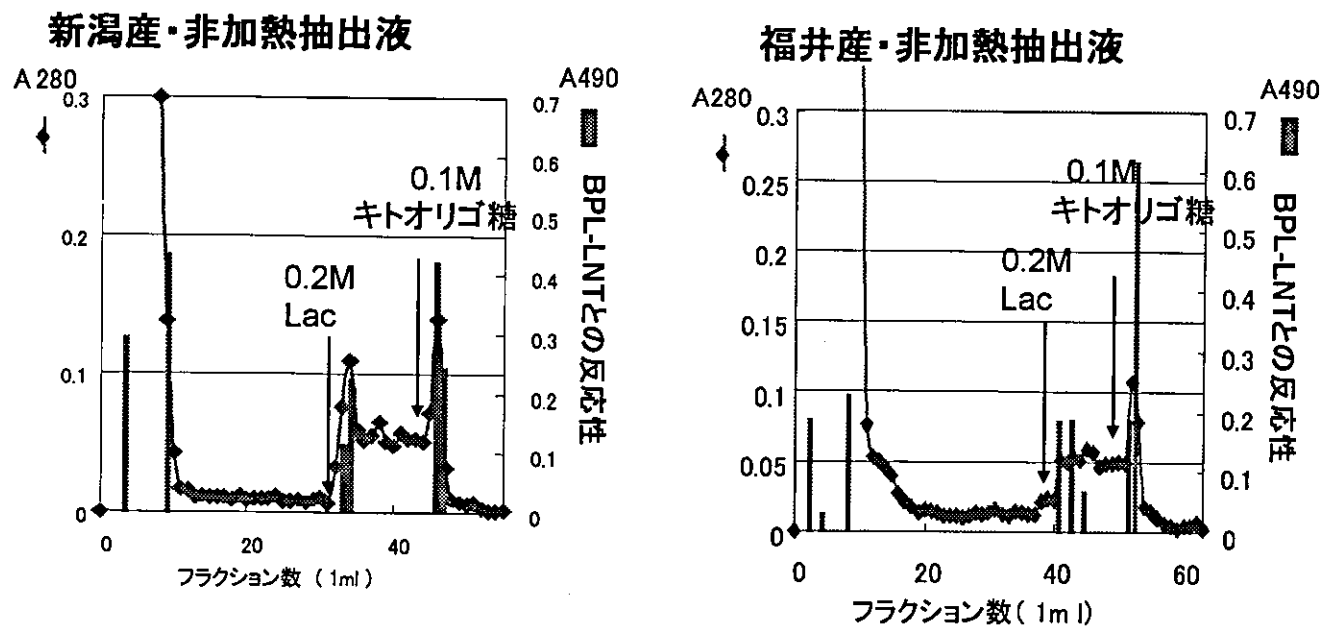




⑥ 図-4 阻害糖存在下でのスギヒラタケ抽出液と BPL-LNT との結合性



⑥ 図-5 スギヒラタケレクチンの LNT カラムを用いるアフィニティークロマトグラフィー

Ⅱ．分担研究報告書

3．カビ毒の分析

分担研究者 小西 良子

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担研究報告書

カビ毒の分析

分担研究者 小西良子

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部 第4室室長

研究要旨

本年度秋以降、東北・北陸地方を中心に発生している急性脳症の原因究明にあたり、発症への関与が疑われているスギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*) について、付着あるいは着生している主要なカビの分離、ならびにスギヒラタケのカビ毒汚染を調べた。その結果、*Trichoderma* 属菌と *Cladobotryum* 属菌が分離された。カビ毒汚染に関しては、供試したスギヒラタケ6検体のうち2検体から免疫毒性のあるトリコセセン系マイコトキシンが検出された。また、腎毒性のあるシトリニンと免疫学的検出法では同様に反応する物質が6検体のうち5検体から検出されたが、確認試験の結果シトリニンではなかった。今後はシトリニン類似物質の同定とその毒性および急性脳症との因果関係を検討する必要がある。

分担研究者

小西良子

国立医薬品食品衛生研究所衛生
微生物部 第4室室長

研究協力者

酒井綾子

国立医薬品食品衛生研究所衛生
微生物部 第3室室長

杉浦義紹

神戸市環境保健研究所
食品化学部副部長

児玉幸夫

国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 動物管理室室長

A. 研究目的

2004年秋から発生している急性脳症の患者数は数十人にのぼり、死者も出ている。そのため原因解明が急がれるが、現在のところ原因物質としてのカビが産生するカビ毒に関する情報はほとんどない。さらに発症した年は台風の来襲が多かったこと

から、カビの大量発生が危惧され、通常ではスギヒラタケに寄生しないカビが発生した可能性も考えられた。

そこで本研究では、全国各地のスギヒラタケ試料から代表的なものを選び、付着・着生しているカビの分離・同定を行うと共にスギヒラタケのカビ毒汚染を検討した。

B. 研究方法

1) カビの分離および形態学的同定
① 秋田県、広島県および山形県産のスギヒラタケは、空の滅菌シャーレに入れ（無培地培養法）またはポテトデキストロース寒天（PDA）培地上に置き（PDA培地直接培養法）、25℃で7～10日間培養した。培養開始3日目より実体顕微鏡下で観察し、スギヒラタケ子実体上またはPDA培地上に出現したカビが釣菌可能な大きさに生育するのを待って、新しいPDA培地平板へ分離した。25℃で培養して純培養であることを確認し、形態観察による同定と遺伝子配列に基づく同定に供した。

② 兵庫県産スギヒラタケは、無培地

培養法により 25℃で培養し、子実体上に出現したカビを実体顕微鏡下で注意しながら釣菌した。

2) DNA によるカビの同定

カビを培養した培地から滅菌した楊枝で寒天ごと菌体を掻き取り、Fast DNA Kit に付属の 2mL チューブに移して所定の菌体溶解液を加え、手順書の指示通りにカビの DNA を抽出した。得られた DNA を 10 ng/mL に調製し、ITS1 (5'-TCCG TAGGTGAACCTGCGG-3') および ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3') プライマーを用いて PCR 増幅を行い、アガー電気泳動より増幅した 2 本鎖 DNA (Product size 620bp) を回収、精製した後、ダイナミック ET ターミネーターサイクル シーケンシング Kit を用いて、Forward 側 (ITS1)、Reverse 側 (ITS4) の DNA 配列をそれぞれ蛍光色素でラベルした 1 本鎖 DNA を調製した。未反応の試薬等は Auto Seq G-50 を用いて除去後、精製した DNA 溶液は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて遺伝子配列を解析した。得られた Forward 側、Reverse 側の遺伝子配列を重ね合わせて、両プライマー間の DNA 配列を解読してインターネット上にある BLAST サイトより、その DNA 配列と合致する真菌を検索して同定を行った。

3) カビ毒の分析

カビの同定結果から分離された *Trichoderma* 属菌が産生すると想定されるトリコテセン系カビ毒の分析を LC/MS で行った。主要なカビ毒 6 種類 (トータルアフラトキシン、T-2 トキシン、デオキシニバレノール、シトリニン、オクラトキシン A、フモニシン) は酵素免疫測定 (ELISA) キットにより測定した。なお、ELISA 法により陽性と判定されたカビ毒に関しては LC/MS/MS で確認試験を行った。

トリコテセン系カビ毒は以下の方法で分析した。

< 試薬および機器 >

8 種のトリコテセン系マイコトキシン標準品 (ニバレノール、デオキ

シニバレノール、フザレノン X (FX), 3-アセチルデオキシニバレノール (3-Acetyl DON)、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、トリコテシン、トリコテコロンはシグマ社製を用いた。前処理として使用した多機能固相抽出カラムは、Multi Sep #226 Romer 社製を用いた。LC/MS 分析に用いた試薬はすべて HPLC グレードを使用した。

LC/MS 機器として

LC: Shimadzu LC-2010C_{HT}

MS: Shimadzu LCMS-2010A

を用いた。

< LC の条件 >

カラム: Shimadzu Shim-Pack VP-ODS (150 mm×2 mm)

移動相: A ; メタノール

B ; 5 mM 酢酸アンモニウム

10 % A/B - (5 min) - 10 %

A/B - (15 min) - 100 % A/B

- (10 min) - 100 % A/B -

(30 min) - 10 % A/B

流速: 0.1 ml/min

カラムオープン温度: 40 °C

注入量: 10 µl

< MS の条件 >

イオン化は 大気圧光イオン化 (APPI) 法で行った。条件は下記の通りである。

a) プロープ電圧: 0 V

b) プロープ温度: 200 °C

c) ネブライザーガス: 2.5 L/min

d) 乾燥ガス: 0 MPa

e) CDL 電圧: 5 V

f) CDL 温度: 150 °C

g) ブロックヒーター温度: 150 °C

h) Q-Array DC: 5 V

i) Q-Array RF: 150 V

j) ドーパント: 10 µl/min (アセトンを使用)

< トリコテセン系カビ毒の抽出精製 >

スギヒラタケ 25g を 100 ml のアセトニトリル: 水 (85:15) で抽出し、その抽出液を多機能カラムで精製したのち、LC/MS で分析した。

< 酵素免疫測定法 >

主要なカビ毒 6 種類 (トータルアフラトキシン、T-2 トキシン、デオ

キシニバレノール、シトリニン、オクラトキシシン A、フモニシン) は酵素免疫測定 (ELISA) キット (RIDASCREEN FAST シリーズ、r-biophom 社) で測定した。

＜オクラトキシシン A およびシトリニンの確認試験＞

ELISA 法で陽性となった試料の確認試験は、オクラトキシシン A およびシトリニンの標準品 (シグマ社製) とともに、LC/MS/MS を用いて SIM モードで行った。

C. 結果

1) カビの分離および同定

本研究に供したスギヒラタケの産地、分離方法並びに同定結果を表 1 に示した。培養によって子実体に発生したカビの実体顕微鏡写真とそれぞれの子実体から分離した菌株の PDA 培地平板純培養 (巨大培養) の写真を図 1 と図 2 に示した。

無培地培養法では、*Trichoderma* に類似した白色系のカビ *Cladobotryum* (*C. varium* および *C. dendroides*) が 3 検体の子実体から分離された (図 1)。これらの菌株は、PDA 培地へ接種して培養すると *Trichoderma* とは全く形態を異にした (図 2)。同じく、無培地培養法で秋田産スギヒラタケの子実体から *Trichoderma harzianum* が分離されたが (図 1, 2)、他県の検体 (6 検体) には無培地培養法で *Trichoderma* が分離されたものはなかった。

PDA 培地直接培養法を実施した 6 検体のうち 4 検体から *Trichoderma* (*T. harzianum*、*T. hamatum* および *T. polysporum*) が分離された。

Cladobotryum、*Trichoderma* 属菌以外に *Mucor*、*Penicillium*、*Fusarium* 属菌などが分離されたが、菌種の地域性は認められなかった (表 1)。

2) カビ毒の分析

カビ毒の分析に供したスギヒラタケの検体は、生で冷凍保存され、比較的保存状態のよかったものから岐阜 1 点、石川 1 点、福井 2 点、茨城 1 点、京都 1 点の計 6 点を選んだ。トリコテセン系カビ毒 8 種類を

LC/MS で一斉分析した結果、福井の検体のうち 1 点からフザレノン X が 100 ng/g 相当、茨城の検体からトリコテロン 55 ng/g 相当が検出された (表 2)。

次に食品汚染が問題となるカビ毒のうち主要な 6 種類のカビ毒に関して ELISA 法を用いて検出を行った。その結果、茨城の検体からオクラトキシシン A が 6.4 ng/g 相当検出された。シトリニンは 6 検体中 5 検体から検出され、いずれも 20 ng/g 以上であった。しかし、陽性検体を用いて LC/MS/MS で確認試験を行ったところ、いずれの検体からもオクラトキシシン A およびシトリニンは検出されなかった (表 3)。これらの結果から、一部のスギヒラタケにはトリコテセン系カビ毒が含まれていることが明らかになった。また、オクラトキシシン A とシトリニンは、確認試験では検出されなかったものの、これらのカビ毒と同様の免疫学的交差反応を有するものが存在することが示唆された。

D. 考察

本研究では、カビの分離は、無培地培養法と PDA 培地直接培養法で行った。無培地培養法は、スギヒラタケに着生しているカビ (もう少し厳密に言うと、スギヒラタケに着生または付着していてスギヒラタケを基質として発育し得るカビ) を分離することができる方法である。一方、PDA 培地直接培養法では、もっと広く、すなわちスギヒラタケに着生しているカビだけでなく、スギヒラタケが生育している環境に存在しているためにスギヒラタケに付着しているカビ (胞子を含む) をも分離することができる。

無培地培養法においては、*Cladobotryum* (teleomorph ; Hyphomyces) 属菌が優位に検出され、*Trichoderma* 属菌は 7 検体のうち 1 検体からしか検出されなかった。PDA 培地直接培養法においては *Trichoderma* 属菌が 6 検体中 4 検体から検出された。以上のことからス

ギヒラタケに *Trichoderma* 属菌が着生・生育している確率は小さいが、スギヒラタケの生育する環境中には *Trichoderma* 属菌は、広く分布していることが考えられた。

Trichoderma は、セルロース分解酵素を産生するため、セルロース含量の多い植物に着生することで知られている。シイタケではホダ木に寄生した *Trichoderma* がシイタケの菌糸の生長を妨害する事例が報告されている。なお、供試したスギヒラタケのうち3検体から分離された *Cladobotyrum* は有性世代 *Hyphomyces* が知られている菌種で、*C. varium* はアミヒラタケ (*Polyporus squamosus*)、*C. dendroides* はベニタケ (*Russula* sp.) の菌寄生体菌 (*Mycoparasite*) であることが報告されている。今回の研究から、本邦で *Cladobotyrum* がスギヒラタケの菌寄生体菌となっていることが推測された。急性脳症の原因究明にあたっては、今後これらの毒素産生性についても調査研究を行う必要があると考えられる。

また、*Trichoderma* 属菌は、トリコテセン系カビ毒を産生する可能性が考えられている。トリコテセン系カビ毒はトリコテセン骨格と呼ばれる C-12, 13 にエポキシ環、C-9, 10 に二重結合を有する特徴的な4環構造を有しており、主な毒性としては免疫毒性が挙げられる。今年度カビ毒の分析に供した6検体のうち、1検体からフザレノン X が、1検体からトリコテロンがそれぞれ検出された。いずれも汚染量は低レベルであったが、スギヒラタケにトリコテセン系カビ毒が汚染する可能性があることが示唆された。スギヒラタケにおけるトリコテセン系カビ毒の蓄積の経路については、寄生していた倒木等で *Trichoderma* 属菌が繁殖して産生されたトリコテセンがスギヒラタケに吸収された可能性も考えられるが、他の菌種による産生の可能性も含めてさらに検討する必要がある。

さらに主要なカビ毒6種類を ELISA 法にて分析した結果、オクラ

トキシン A が1検体から、シトリニンが5検体から検出された。しかし LC/MS/MS を用いた確認試験では、これらの物質の分子量と標準品のオクラトキシン A またはシトリニンとの一致は見られなかった。すなわち、オクラトキシン A およびシトリニンそのものの汚染はなかったが、これらのカビ毒と化学構造の類似した物質が存在している可能性が示唆された。オクラトキシン A およびシトリニンはともに腎毒性があり、両者には相乗作用が報告されていることから、今回検出された類似物質においても同様の毒性を有する可能性は十分に考えられる。

今後は、これらの物質と患者の摂食検体での有無を確認し、物質の同定およびその毒性、さらに急性脳症との関連性を検討する必要がある。また今回検討しなかったが、きのこに汚染報告例がある環状ペプタイド系カビ毒についても検討の必要性があると思われる。

E. まとめ

スギヒラタケに付着・着生しているカビの分離・同定では、秋田、広島、山形、兵庫で採取されたスギヒラタケ7検体を用いた。無培地培養法で *Cladobotyrum* 属菌が3検体から、*Trichoderma* 属菌が1検体から分離され、これらのカビが着生していた可能性が示された。また、スギヒラタケが生育している環境中には、*Trichoderma* 属菌が広く分布している可能性が示唆された。

カビ毒の分析は、全国各地から収集されたスギヒラタケ検体のうち、生で冷凍保存され、比較的保存状態のよかったものから6検体を選び、カビ毒汚染の調査を行った。まず、スギヒラタケから分離同定された *Trichoderma* が産生すると考えられるトリコテセン系カビ毒が2検体から、オクラトキシン A と同様な免疫学的交差反応をもつものが1検体から、シトリニンと同様な免疫学的交差反応をもつものが5検体から検出された。今後はこれらの物質の詳細

な検討をおこない、急性脳症との関連性を究明するとともに、他のカビ毒に関しても分析を行う必要がある。

F. 研究成果

特になし

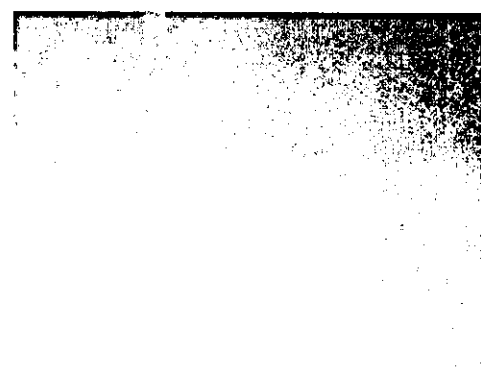
G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

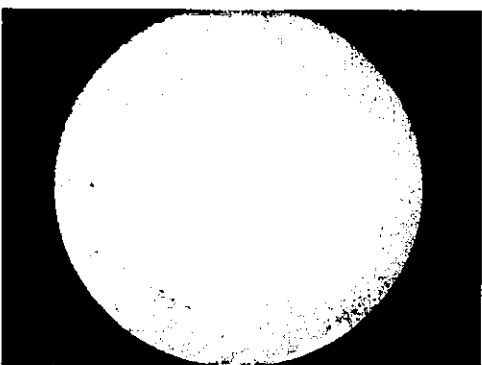
菌株番号01



菌株番号11



菌株番号41



菌株番号42

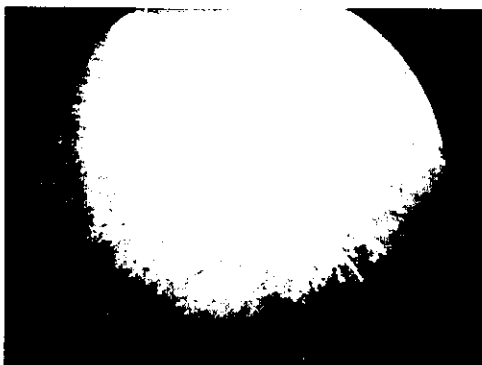
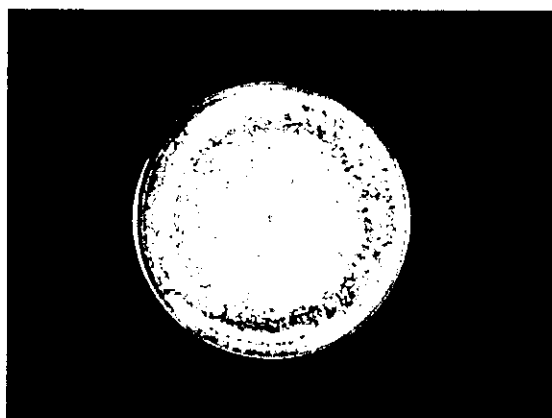
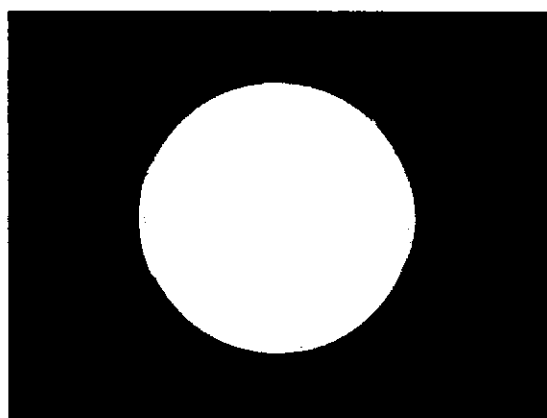


図1 スギヒラタケ子実体上に発生、生育したカビ



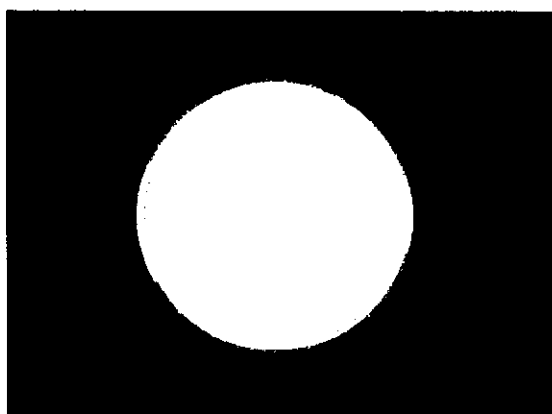
菌株番号01

Trichoderma harzianum



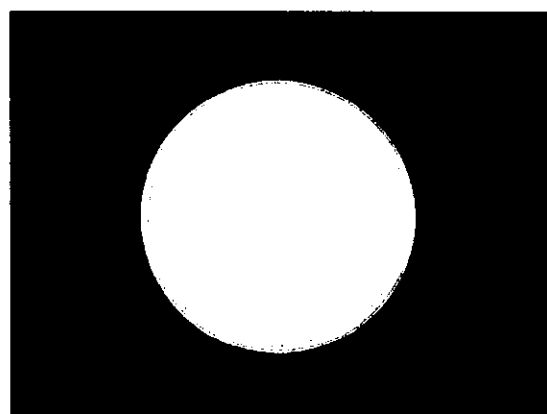
菌株番号11

Cladobotryum dendroides



菌株番号41

Cladobotryum varium



菌株番号42

Cladobotryum varium

図2 スギヒラタケから分離されたカビの巨大培養
(PDA, 25°C, 9日間)

表1 秋田・広島・山形・兵庫産 スギヒラタケに付着・寄生していたかびの分離および同定

検体番号	産地	培養法	菌株番号	形態観察による同定	DNA解析による同定
1	秋田	無培地培養	01	<i>Trichoderma harzianum</i>	
			02	<i>T. harzianum</i>	
			03	<i>Trichoderma sp.</i>	
2	広島	PDA培地直接培養	11		<i>Cladobotryum dendroides</i> (teleomorph: <i>Hyphomyces rosellus</i>)
3	広島	無培地培養	(検出せず)		
		PDA培地直接培養	(検出せず)		
		無培地培養	21	unknown	<i>Trichoderma polysporum</i> (teleomorph: <i>Hypocrea pachybasioides</i>)
4	広島	PDA培地直接培養	22	<i>T. hamatum & T. harzianum</i>	
		無培地培養	(検出せず)		
		PDA培地直接培養	31	<i>T. harzianum</i>	
5	山形	無培地培養	32	<i>T. harzianum</i>	
		PDA培地直接培養	33	<i>Mucor sp.</i>	<i>Mucor indicus</i>
		無培地培養	34	<i>T. harzianum</i>	
6	秋田	無培地培養	42	<i>Cladobotryum sp.</i>	<i>Cladobotryum varium</i> (teleomorph: <i>Hyphomyces aurantius</i>)
		PDA培地直接培養	41 *	<i>Cladobotryum sp.</i>	<i>C. varium</i>
		無培地培養	43	<i>T. harzianum</i>	
7	兵庫	無培地培養	(検出せず)		
		PDA培地直接培養	(検出せず)		
		無培地培養	50	<i>Cladobotryum sp.</i>	<i>Cladobotryum varium</i>
8	山形	無培地培養	51	<i>Fusarium sp.</i>	
		PDA培地直接培養	52	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>
		無培地培養	53	<i>Mucor sp.</i>	<i>Mucor indicus</i>
9	秋田	無培地培養	54		<i>C. dendroides</i>
		PDA培地直接培養			
		無培地培養			

*この菌は、PDA培地上ではなくスギヒラタケ子実体上に出現、生育した。

表 2

スギヒラタケ中のトリコテセン系カビ毒

	origin	FX(ng/g)	trichotecin	trichotecolon (ng/g)	Nivalenol	Deoxynivalenol(DON)	T-2 Toxin	HT-2 Toxin	3-Acetyl DON
1	GIFU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ISHIKAWA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	FUKUI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	IBARAKI	ND	ND	55	ND	ND	ND	ND	ND
5	FUKUI	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	KYOTO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

表 3 スギヒラタケ中の主要なカビ毒

Mycotoxin	Analytical Method	Aflatoxin	Fumonishin	Deoxynivalenol	T-2 toxin	OTA(ng/g)		Citrinin(ng/g)	
		ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	LC/MSMS	ELISA	LC/MSMS
1	GIFU	ND	ND	ND	ND	<5		21.3	-
2	ISHIKAWA	ND	ND	ND	ND	<5		92.2	-
3	FUKUI	ND	ND	ND	ND	<5		30.4	-
4	IBARAKI	ND	ND	ND	ND	6.4	-	33.9	-
5	FUKUI	ND	ND	ND	ND	<5		23.9	-
6	KYOTO	ND	ND	ND	ND	<5		<15	