

図4 真菌による苦情・事故食品の月別発生件数と気温・降水量

事例の多かった食品について苦情の月別発生件数を図5に示した。ほとんどの食品で、全事例の月別発生件数と似たような年内変化を示したが、「野菜果実と野菜果実加工品」では、冬期における苦情が比較的多かった。これは、秋に収穫・加工されて主に冬期に食される干しいも、干し柿、甘栗などで苦情が多かったことによる。

4. 検出真菌

目視、検鏡、培養いずれかの方法によって真菌の存在が確認された苦情食品 921 件のうち、約半数の 493 件 (54%) で真菌の同定が行われていた。これらの事例について、検出真菌を集計した。1つの食品から複数の真菌が検出された例が相当数あり、それぞれの真菌を1件として数えた。

表2に苦情食品から検出された真菌と検

出頻度を示した。*Penicillium* 属、*Aspergillus* 属および関連菌類、*Cladosporium* 属の検出頻度が突出して高く、それぞれ 34%、28%、27%を占めた。加工食品と嗜好飲料が苦情食品の主体であったので、加工工程中や流通過程あるいは消費者の手に渡り開封された後に、環境由来の二次汚染を受けた事例が多いと考えられるが⁴⁾、これらの属は、食品工場を含めて環境中に広く分布しており、種々の調査で環境汚染カビの主要菌として報告されている^{1,6,7)}。*Alternaria* 属は、同様の調査で上記3属に次ぐ頻度で検出されることが多いが、この集計結果からみると、真菌汚染食品に関する苦情の原因菌となることは少ないようである。アフラトキシン産生能のある株が懸念される *Aspergillus flavus* も一部で検出されていた。

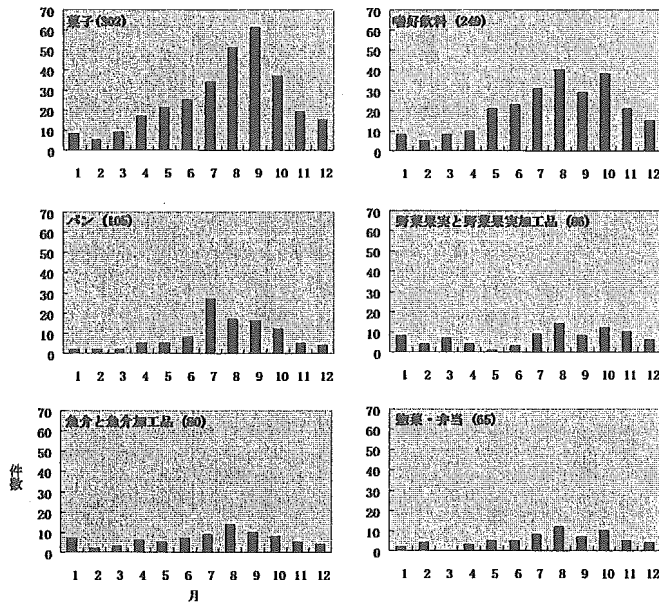


図5 食品の種類別苦情・事故発生件数の年内変化 ()内は件数

図1の分類で事例の多かった食品について食品別の検出真菌を表3に示した。*Wallemia*属は、検出事例17件中、13件が菓子から検出された。残る4件も、すべて加工食品からであった。嗜好飲料では、*Aspergillus*属の検出頻度が下がり、一般的に食品からの検出頻度が低い種々の真菌の頻度が少しずつ増加していた。また、パンで、*Aspergillus niger*の検出頻度が高い(36%)のが目立った。諸角らによる東京

都内における食品の苦情事例についての報告では、*A. niger*は、パンにおける主要起因菌とはなっていない^{1,3)}。一方、高鳥らによる製パン・製菓工場のカビ汚染についての報告では、製造環境から*A. niger*がかなり高い頻度で検出されている⁶⁾。パンにおける*A. niger*の高頻度の検出は、今回の調査によって初めて示されたものであり、今後*A. niger*のパン付着汚染性を確認する必要がある。

表2 苦情・事故食品から検出された真菌

菌	検出食品数	頻度
カビ		
<i>Aspergillus</i>	139	28
<i>A. candidus</i>	1	0
<i>A. clavatus</i>	1	0
<i>A. flavus</i>	7	1
<i>A. niger</i>	31	6
<i>A. restrictus</i>	16	3
<i>A. ustus</i>	1	0
<i>A. versicolor</i>	3	1
<i>Aspergillus spp</i>	50	10
<i>Emericella</i>	1	0
<i>Eurotium</i>	24	5
<i>Neosartorya</i>	4	1
<i>Penicillium</i>	170	34
<i>Cladosporium</i>	135	27
<i>Mucor</i>	19	4
<i>Aureobasidium</i>	18	4
<i>Wallemia</i>	17	3
<i>Rhizopus</i>	16	3
<i>Fusarium</i>	13	3
<i>Alternaria</i>	12	2
<i>Acremonium</i>	9	2
<i>Phoma</i>	7	1
<i>Arthrimum</i>	5	1
<i>Paecilomyces</i>	5	1
<i>Geotrichum</i>	3	1
<i>Monillia</i>	3	1
<i>Absidia</i>	2	0
<i>Exophiala</i>	2	0
<i>Pestalotiopsis</i>	2	0
<i>Trichoderma</i>	2	0
<i>Ulocladium</i>	2	0
<i>Botrytis</i>	1	0
<i>Circinella</i>	1	0
<i>Curvularia</i>	1	0
<i>Cylindrocarpon</i>	1	0
<i>Nigrospora</i>	1	0
<i>Scopulariopsis</i>	1	0
<i>Trichophyton</i>	1	0
<i>Trichothecium</i>	1	0
酵母		
<i>Candida</i>	24	5
<i>Rhodotorula</i>	13	3
<i>Pichia</i>	8	2
<i>Saccharomyces</i>	5	1
<i>Hansenula</i>	3	1
<i>Trichosporon</i>	2	0
<i>Cryptococcus</i>	1	0
<i>Endomyces</i>	1	0
<i>Kloeckera</i>	1	0
<i>Trichosporonoides</i>	1	0
<i>Zygosaccharomyces</i>	1	0
放線菌	2	0

表3. 食品の種類別に集計した検出真菌種

分類	菓子		嗜好飲料		パン		野菜果実と 畜産農加工品		魚介と魚介加工品		乳製品	
	件数	頻度(%)	件数	頻度	件数	頻度	件数	頻度	件数	頻度	件数	頻度
Mold												
<i>Aspergillus</i>	37	22	25	15	27	47	22	35	4	13	1	3
<i>A. candidus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. clavatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. flavus</i>	1	1	1	1	2	4	2	3	0	0	0	0
<i>A. niger</i>	5	3	5	3	15	26	6	10	0	0	0	0
<i>A. restrictus</i>	8	5	2	1	0	0	2	3	1	3	0	0
<i>A. ustus</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. versicolor</i>	0	0	1	1	1	2	1	2	0	0	0	0
<i>Aspergillus spp</i>	19	11	8	5	6	11	5	8	2	7	0	0
<i>Eurotium</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eurotium</i>	4	2	2	1	3	5	6	10	1	3	1	3
<i>Neosartorya</i>	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium</i>	43	25	32	19	11	19	19	31	11	37	18	51
<i>Cladosporium</i>	40	23	42	25	11	19	6	10	6	20	4	11
<i>Mucor</i>	4	2	5	3	0	0	1	2	3	10	1	3
<i>Aureobasidium</i>	4	2	8	5	0	0	0	0	2	7	1	3
<i>Wallemia</i>	13	8	0	0	0	0	2	3	1	3	0	0
<i>Fusarium</i>	2	1	4	2	2	4	3	5	0	0	1	3
<i>Fusarium</i>	3	2	5	3	0	0	1	2	0	0	0	0
<i>Alternaria</i>	3	2	3	2	1	2	4	6	0	0	0	0
<i>Acromonium</i>	1	1	7	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phoma</i>	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	2	6
<i>Arthrospira</i>	1	1	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pezizomyces</i>	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gastrophysa</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3
<i>Marasmius</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ascidia</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Exophiala</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pestalotiopsis</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichoderma</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ustilidium</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Others</i>	2	1	2	1	2	4	1	2	0	0	0	0
Yeast												
<i>Candida</i>	4	2	7	4	1	2	1	2	2	7	1	3
<i>Rhodotorula</i>	4	2	5	3	0	0	0	0	0	0	2	6
<i>Pichia</i>	2	1	1	1	0	0	0	0	1	3	0	0
<i>Saccharomyces</i>	1	1	1	1	0	0	1	2	0	0	1	3
<i>Hansenula</i>	1	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
<i>Trichosporon</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Others</i>	1	1	0	0	1	2	1	2	0	0	0	0
Actinomycetes												
<i>Actinomycetes</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
計	172	100	167	100	57	100	82	100	30	100	35	100

真菌検出用に使用した培地の記載があった事例を調べると、ポテト・デキストロース寒天培地 (PDA) が単独で使われている事例が多く、好乾性菌用の培地を併用している事例は少数であった。このため、*Wallemia* 属、*Eurotium* 属、*Aspergillus restrictus* といった好乾性菌を検出できなかった可能性があり、実際の好乾性菌による食品汚染は、この表よりも高いと考えられる。事実、諸角らによる調査では、*Wallemia* 属、*Eurotium* 属、*A. restrictus* は、菓子から、それぞれ 29%、27%、12% の高頻度で検出されているが^{1,3)}、この調査における菓子からの検出頻度は、それぞれ 11%、3%、12% にすぎなかった。試験・検査機関に余力があるならば、M40Y 寒天培地や MY20 寒天培地、ジクロラン・18% グリセリン寒天培地 (DG-18A) などの好乾性菌用培地の 1 つを併用することで真菌検出率や同定率を上げることができると考えられる。

5. 健康被害

全事例 1096 件のうち真菌による苦情食品を喫食した事例は、480 件 (44%)、喫食

しなかった事例は、472 件 (43%)、喫食したかどうか記載がない事例は、144 件 (13%) であった。苦情者は、不快感などの軽い症状も含めると、喫食した事例のうち 18% (84 件、全体の 8%) で何らかの症状を訴えた。苦情者の訴えによる症状とその件数を表 4 に示した。複数回答のため、1 事例で複数の症状をあげたものはそれぞれを 1 件として集計した。症状の主なものは、下痢、腹痛、悪心、嘔吐、発熱、不快感、舌・口・唇のしびれなどであった。有症事例の中に、他の微生物についての検査を実施した事例が 19 件あった。その中に黄色ブドウ球菌を検出した事例が 1 件あったが、他には食中毒菌や大腸菌、大腸菌群を検出したものはなかった。なお、健康被害については、苦情者・相談者の訴えを集計したものである。医師の診察をうけた事例はあったが、医師の診断に基づいて集計したのではない。

健康被害の月別発生件数を図 6 に示した。苦情食品全体の月別発生件数のようなはつきりとした特徴を示さなかったが、夏から秋にかけて発生が多い傾向があった。

表4 真菌汚染食品を喫食したことによる健康被害の症状

症状	件数
下痢	42
腹痛	18
悪心	12
嘔吐	11
発熱	6
不快感	6
舌・口・唇ののしびれ	6
頭痛	3
顔面紅潮	2
湿疹	2
軟便	2
胸焼け	2
めまい	2
胃が張った感じ	1
悪寒	1
体のこわばり	1
げっぷ	1
口中ひりひり感	1
舌のびりびり感	1
食欲不振	1
咳	1
手足のしびれ	1
動悸	1
のどや舌のつぶつぶ	1
不安神経症（妊娠中）	1
酩酊状態	1
有症	1
合計	128

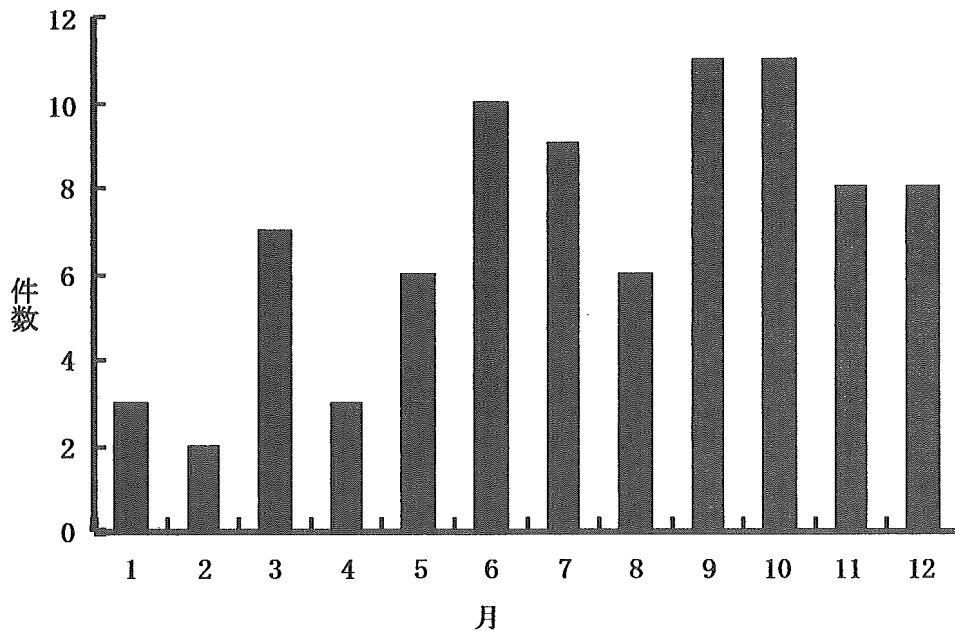


図6 有症事例の月別発生件数

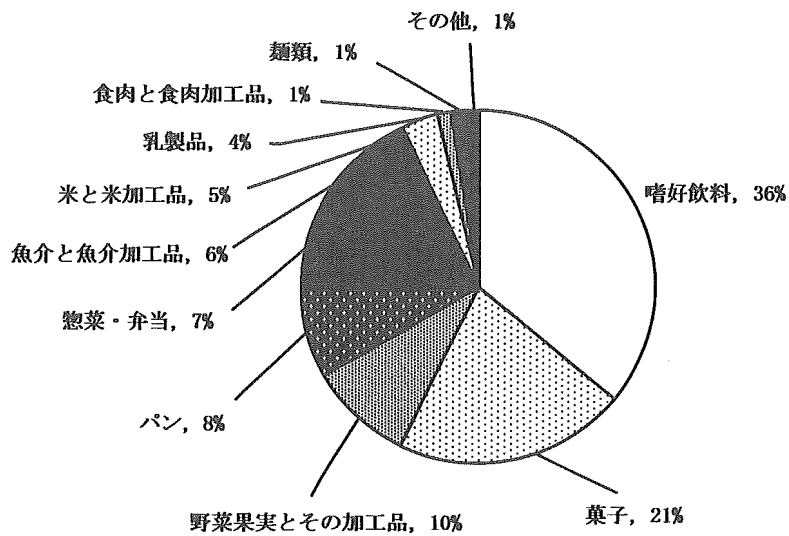


図7 有症事例の食品

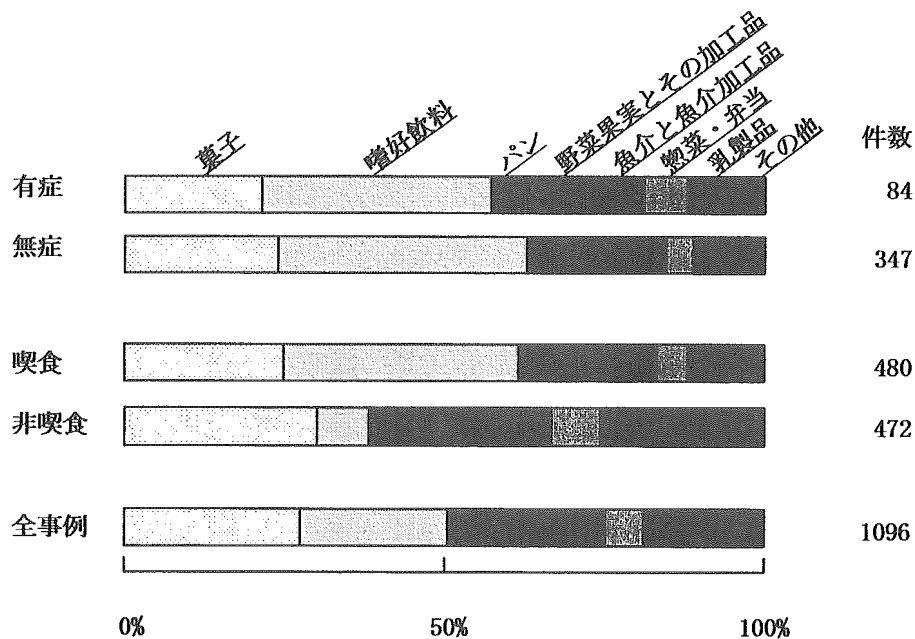


図8 各事例に占める各種食品の割合

健康被害をもたらした苦情食品を食品の種類別に分類して(図7)、苦情食品全体の分類(図1)と比較してみると、菓子と嗜

好飲料の順序が逆転していることが分かった。その原因を探るために、全事例(1096件)、喫食したもの(480件)としなかった

もの(472件),健康被害があったもの(84件)となかったもの(347件),それぞれを食品の種類別に分類した(図8)。全事例については,喫食したものとしなかったものは,ほぼ同数であった。一方,嗜好飲料では,喫食したものの174件に対して喫食しなかったもの38件で,喫食した事例が圧倒的に多かった。つまり,他の食品と異なり,嗜好飲料の場合は,真菌の発生に気づかず

に飲んでしまう割合が大きいため,結果として健康被害を起こした食品に占める嗜好飲料の割合が大きくなったと考えられた。

健康被害があった食品の38例と健康被害がなかった食品の178例で検出真菌の同定が実施されていた。両者の間で検出真菌種や各真菌の検出頻度に特記すべき違いは認められなかった(表5)。

表5 有症例と無症例の汚染食品から検出された真菌の比較

菌	有症例		無症例	
	汚染食品数	汚染率	汚染食品数	汚染率
カビ				
<i>Aspergillus</i>	11	13	48	14
<i>A. flavus</i>	0	0	3	1
<i>A. niger</i>	2	2	14	4
<i>A. restrictus</i>	2	2	7	2
<i>A. versicolor</i>	0	0	1	0
<i>Aspergillus spp</i>	5	6	13	4
<i>Eurotium</i>	2	2	8	2
<i>Neosartorya</i>	0	0	2	1
<i>Penicillium</i>	10	12	52	15
<i>Cladosporium</i>	10	12	50	14
<i>Aureobasidium</i>	1	1	6	2
<i>Wallemia</i>	1	1	6	2
<i>Rhizopus</i>	2	2	6	2
<i>Mucor</i>	2	2	5	1
<i>Alternaria</i>	1	1	4	1
<i>Arthrimum</i>	0	0	4	1
<i>Paecilomyces</i>	0	0	4	1
<i>Acremonium</i>	1	1	3	1
<i>Fusarium</i>	3	4	3	1
<i>Geotrichum</i>	0	0	2	1
<i>Ulocladium</i>	0	0	2	1
<i>Absidia</i>	1	1	1	0
<i>Circinella</i>	0	0	1	0
<i>Monillia</i>	0	0	1	0
<i>Nigrospora</i>	0	0	1	0
<i>Phoma</i>	1	1	1	0
<i>Scopulariopsis</i>	0	0	1	0
<i>Trichoderma</i>	0	0	1	0
<i>Trichothecium</i>	0	0	1	0
<i>Cylindrocarpon</i>	1	1	0	0
酵母				
<i>Candida</i>	1	1	8	2
<i>Pichia</i>	0	0	5	1
<i>Rhodotorula</i>	0	0	3	1
<i>Kloeckera</i>	0	0	1	0
<i>Zygosaccharomyces</i>	0	0	1	0
<i>Saccharomyces</i>	1	1	0	0
放線菌	0	0	1	0

6. 汚染の原因

真菌発生に至った事故原因については,自由記入欄への記入であったために,製造

所や販売店の調査,落下菌数の測定,同一ロット品の検査等を行った結果に基づく確度の高いものがある一方,単なる推定で記

入されたと考えられるものがあり、回答の具体性や確度、詳細さに違いがあった。また、用語の使用にも違いがあった。それらをしてできる範囲でまとめると、製造段階に原因があったとされた事例では、製造装置の欠陥や故障によるシール不良をあげたものが最も多く、次いで製造所全体の衛生管理不良、原材料の汚染の持ち込み、製造装置や器具の殺菌・消毒・洗浄不良、不適切な製造方法、品質保持期限の設定または表示の不備などが多かった。流通・販売段階に原因があったとされた例では、気密性の喪失（ピンホールの発生、スコア・プルトップ部の損傷、栓・巻き締め部の損傷）が突出しており、他に温度管理の不備、商品管理の不備（廃棄予定品の販売、先入れ先出しの不徹底）、品質保持期限切れなどが主なものであった。消費段階での原因としては、開封後の取扱や保存方法が不適切であったと推定された事例が多かった。

今回の調査の対象となった事例の中に真菌を検出しなかった食品 140 件があった。そのうち、52 件は、異物 (45 件)、異臭 (6 件) または味の異常 (1 件) として処理されていた。異物の内訳は、器具機械の汚れの付着 (11 件)、正常成分の析出 (8 件)、材料の一部 (9 件)、焦げ (7 件)、その他 (10 件) であった。異臭は、食品特有の臭いであって異常ではないもの (3 件)、餌からの臭い移り (2 件)、鮮度保持剤 (アルコール) の臭い (1 件) であった。味の異常を訴えた事例 (1 件) については、その食品特有の味であるとの結論であった。

D. 結論

全国から寄せられた事例 1096 件の解析から、1) 真菌による食品の苦情は、菓子、嗜好飲料で多く、加工食品と飲料でその 90% 以上を占めること、2) 夏に多く発生し、冬に少ないが、食品に対する信頼性が失われるような社会的要因があると一時的に増加することがあること、3) 苦情食品

から検出される真菌は、*Penicillium* 属、*Aspergillus* 属、*Cladosporium* 属が多いこと、4) 苦情食品のうちパンでは *Aspergillus niger* が最も検出頻度の高い真菌であること、5) *Wallemia* 属は、苦情食品のうち菓子から多く検出されること、6) 喫食した事例の 18% (84 件) で何らかの健康被害の訴えがあること、7) 嗜好飲料では真菌の発生に気づかずに飲んでしまう割合が高く、このため健康被害をもたらした苦情食品に占める嗜好飲料の割合も高くなることなどが分かった。この調査は、全国的な規模で実施され、1000 件を超える事例を収集することができた。種々の事項について数値化できたところにこの調査研究の意義があると考えられる。

参考文献

- 1) 諸角 聖 “有害微生物管理技術、第 I 巻” 芝崎 勲監修、東京、フジテクノシステム、2000、p.9-25. (ISBN 4-938555-78-6)
- 2) 一言 広、諸角 聖、和宇慶朝昭：苦情食品における真菌の食品損傷と喫食事故。食品と微生物、4、149-155 (1987)。
- 3) 諸角 聖：食品製造におけるカビ汚染防止対策。防菌防黴、25、355-361 (1997)。
- 4) 坪内春夫：カビによる苦情食品。名古屋市衛研報、41、40-44 (1995)。
- 5) 宇田川俊一、田端節子、中里光男 “食品安全性セミナー 5：マイコトキシン” 細貝祐太郎、松本昌雄監修、東京、中央法規、2002、p.9-65。
- 6) 高鳥浩介：大槻 勇、大槻 武、市川 栄一、食品工場を汚染するカビ；1. 製パン・製菓工場のカビ汚染について。防菌防黴、7、1-8、(1979)。
- 7) 高鳥浩介、石井喜一、大槻 勇：食品工場を汚染するカビ；2. 魚肉ねり製品工場。防菌防黴、9、55-60 (1981)。

II. 国産玄米の真菌調査と検出された *Penicillium islandicum* の毒素産生能

A. 研究目的

穀類は、長期間貯蔵されうる食品である。一方で、多くの真菌にとってよい基質でもある。このため、穀類は、栽培中の真菌による病害に始まって圃場の土壌に由来する真菌やより乾燥した環境を好む貯蔵性真菌など、置かれた環境に応じて多様な真菌の着生を許す。栽培、収穫、乾燥、貯蔵、流通等の段階で適切に管理されなければ、真菌を発生し、真菌汚染による品質の劣化を起こすばかりでなく、真菌の種類によってはマイコトキシンを蓄積する危険性もある。

我が国では昭和 29 年に輸入米に着生していたカビによる黄変米騒動があり、その後外国でアフラトキシンの強力な毒性が報告されたこともあって、カビ毒に対する認識が高まった。米の真菌フローラは過去に輸入米を中心に調査され、国産米についても報告されている。最近では、米の低温貯蔵が進み、貯蔵米の真菌フローラは、常温貯蔵とは変化していることが考えられる。また、収穫時の乾燥方法も天日乾燥にかわって火力乾燥が主体になっている。しかしながら、最近の米の真菌フローラの実態について我々が利用できるデータとして誌上等で公表されているものは見あたらない。

そこで、国内消費の大部分を占める国産米について着生真菌の調査を行った。また、黄変米の起因菌の一種であって国内産穀類からは検出される頻度の低い *Penicillium islandicum* によって汚染されていた検体があったので、分離した株のマイコトキシン産生能を試験した。

B. 研究方法

1. 試料および真菌検査の時期

備蓄米

国内 15 県で平成 13 年に生産され、各県の食糧事務所が管理する倉庫に貯蔵されていた玄米の分与を受けて検体とした。北海道・東北地方産 2 検体、関東・信越・北陸地方産 7 検体、東海・近畿・中国地方産 3 検体、四国・九州地方産 3 検体であった。真菌検査は、平成 15 年 4～6 月に実施したが、玄米としての保存期間は、おおむね 1 年半であった。

前年産米

平成 14 年産玄米：生産地の明らかな玄米を各地で購入して検体とした。北海道・東北地方産 31 検体、関東・信越・北陸地方産 36 検体、東海・近畿・中国地方産 22 検体、四国・九州地方産 11 検体、合計 100 検体であった。真菌検査は、平成 15 年 4～6 月に実施した。したがって、玄米としての保存期間は、約半年であった。

平成 15 年産玄米：生産地の明らかな玄米 64 検体を主に東京都内で購入した。北海道・東北地方産 20 検体、関東・信越・北陸地方産 26 検体、東海・近畿・中国地方産 14 検体、四国・九州地方産 4 検体であった。平成 16 年 3～6 月に真菌検査を実施した。

新米

生産地の明らかな平成 16 年産玄米 20 検体を主に東京都内で購入した。北海道・東北地方産 7 検体、関東・信越・北陸地方産 10 検体、東海・近畿・中国地方産 1 検体、四国・九州地方産 2 検体であった。平成 16 年 10、11 月に検査を実施した。

2. 真菌検査

培養を開始する前に玄米を滅菌蒸留水で洗浄して表面に付着している真菌を除去した。軽く風乾してクロラムフェニコール添

加ポテト・デキストロース寒天 (PDA) 培地及び M40Y 寒天 (M40YA) 培地平板上に 1 枚当たり 5 粒を置き、25°C で 7 日間培養した。1 検体につき PDA 培地と M40YA 培地でそれぞれ 50 粒を培養し、カビ、酵母の出現した粒の計数と形態観察によるカビの同定を行った。Fusarium の同定は、PDA 斜面培地に分離後、備蓄米と平成 14 年産米についてはカーネーション・リーフ・寒天培養によって行った。平成 15 年産米と平成 16 年産米 (新米) については、遺伝子シーケンシング法によった。すなわち、MicroSeq キット (Applied Biosystems) を用いて D2 r DNA 領域の DNA シーケンシングを行い、NCBI が提供する Web サイトで GenBank+EMBL+DDBJ+PDB の塩基配列データベースを BLAST 検索した。

3. 毒素産生能

3.1. 培養および菌体抽出液の調製

P. islandicum 対照菌株として著者らが家畜飼料より分離した *P. islandicum* TSY283 を用いた。TSY283 および米から分離した *P. islandicum* をツァペック酵母エキス寒天培地を用いて 25°C で 1 週間培養した。培養物を 50°C で 2 日間乾燥後、ア

セトンを加えて 10 分間超音波処理を行った。15,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を以下の試験に用いた。

3.2. ルテオスカイリンの確認

培養抽出液の薄層クロマトグラフィー (TLC) を上野らの方法に従って実施した。すなわち、シリカゲルプレート (Kieselgel 60, Merck) を 0.25 mol/L シュウ酸—メタノール溶液でコーティングしたのち、120°C で 30 分間活性化し、培養抽出液をスポットしてアセトン：n-ヘキサン：水 (4:2:1) の混合液で展開した。TLC プレートより R_F 値がルテオスカイリンの文献値 (0.40) とほぼ一致する橙黄色の画分を分取してアセトンで溶出した。ここで得た TLC 溶出液について、液体クロマトグラフィー／飛行時間型質量分析 (LC/TOF-MS)、液体クロマトグラフィー／イオントラップ型質量分析 (LC/ion trap MS) および液体クロマトグラフィー (HPLC) を実施して、ルテオスカイリンの存在を確認した。LC/TOF-MS および LC/ion trap MS の装置および測定条件を表 6 に示した。HPLC は、Waters 2690 シリーズを用い、検出を 430 nm における吸光度によった以外は、LC/TOF-MS および LC/ion trap MS と同じ条件で実施した。

表 6. ルテオスカイリンの確認に用いた LC/TOF-MS と LC/Ion Trap MS の条件

LC	
Model: Agilent 1100	
Column: Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (150 mm, 2.1 mm, 5 μm)	
Mobile phase: A, AcCN; B, 0.1% CH ₃ COOH; 45%A/55%B	
Flow rate: 0.2 ml/min	
Oven temp: 40°C	
Sample size: 10 μl	
TOF-MS	Ion trap MS
Model: Agilent 1100 TOF	Model: Agilent 1100 Ion Trap
Ionization: ESI positive, negative	Ionization: ESI positive, negative
Scan Range: m/z=100-1000	Scan Range: m/z=100-600
Nebulizer gas: N ₂ (50 psi)	Nebulizer gas: N ₂ (50 psi)
Drying gas: N ₂ (9 l/min, 350°C)	Drying gas: N ₂ (10 l/min, 350°C)
Fragmentor: 100 V	Fragmentor: 130 V
Reference mass: m/z=121.0510	ICC target: 400,000 cps
m/z=922.0097	Accumulation time: 100 msec

C. 研究結果

1. 真菌検出粒率

真菌が検出された米粒の割合（真菌検出粒率）に関する検体の頻度分布を新米，前年産米（平成 14 年産米），備蓄米に分けて図 9～11 に示した。新米は，真菌検出粒率の高い検体が多かった。特に，PDA 培地を好む菌の着生率が高い検体が多かった（図 9）。前年産米では，PDA 培地でも M40YA 培地でも，真菌検出粒率が 1～10% の検体が最も多く，真菌検出粒率 20% 以下の検体が大半であり，真菌検出粒率が 80% を超えた検体は，PDA 培地で 1%，M40YA 培地で 8% にすぎなかった（図 10）。前年産米のうち平成 15 年産米のデータの掲載は省略したが，酵母の検出率が全体に高く，PDA 培地における真菌検出粒率に関する検体の分布が幾分高検出率側にシフトしていた他は，ほぼ同様の分布を示した。一方，備蓄米では，PDA 培地における真菌検出粒率は，20% 以下の検体が大半であったが，M40YA 培地における真菌検出粒率が 90% 以上である検体が全体の半数を越えた（図 11）。PDA 培地は，一般真菌用培地であり，

好湿性～中湿性の真菌をよく検出する。M40YA 培地は，好乾性菌をよく検出する培地である。備蓄米では，好乾性菌類による汚染が進行した検体が多いことがわかった。

2. 真菌フローラ

表 7 に検出・同定した真菌，その真菌を検出した検体の割合（検出検体率），その真菌を検出した粒の割合（検出粒率）の範囲と中央値を示した。新米では，*Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Epicoccum* を検出した検体が多く，それぞれ，85%，65%，50%，50%，45% の検体から検出された。前年産米では，*Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* を検出した検体が多く，平成 14 年産米と平成 15 年産米の平均で，それぞれ 52%，41%，36%，34% の検体から検出された。一方，備蓄米では，*Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium* 属の菌を検出した検体が多く，それぞれ 93%，73%，47% から検出された。酵母は，新米で 95%，前年産米と備蓄米で約 60% の検体から検出された。

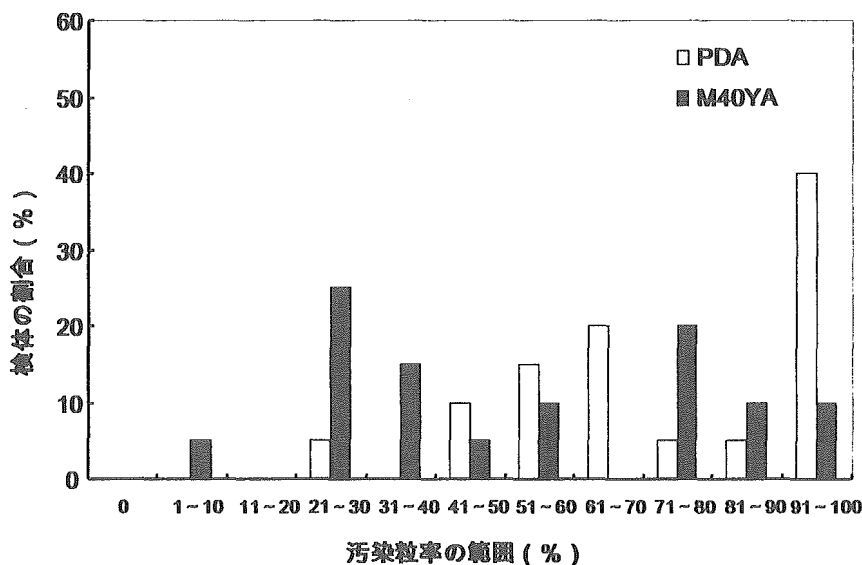


図 9. 汚染粒率に関する検体の分布—新米 (H16年産米)

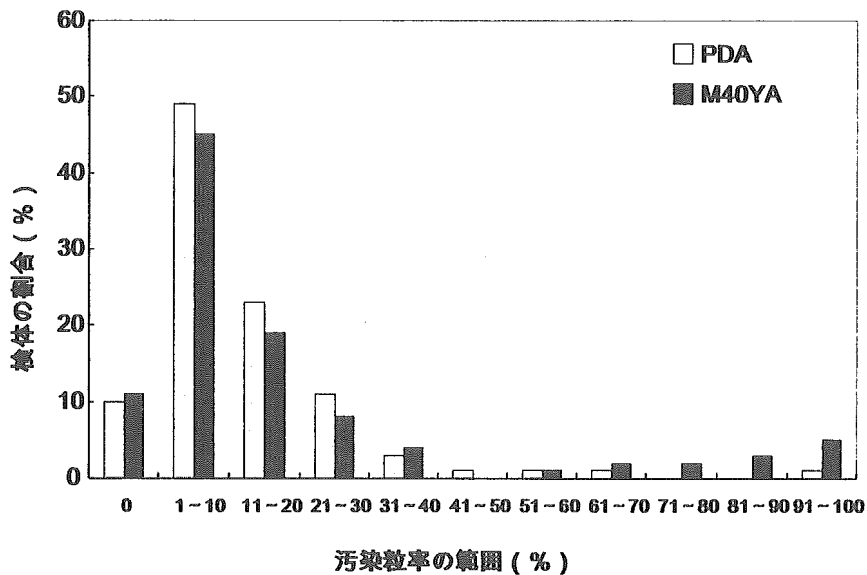


図10. 汚染粒率に関する検体の分布—前年産米 (H14年産玄米)

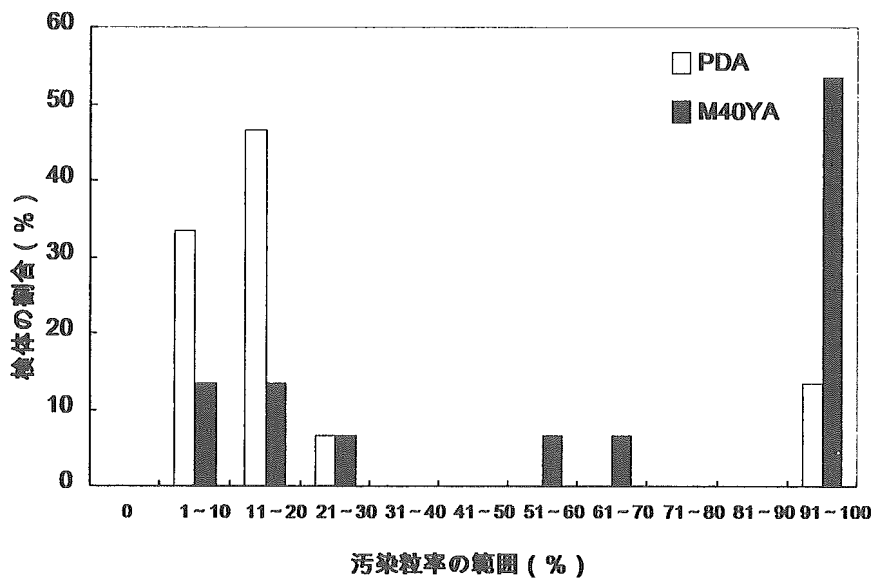


図11. 汚染粒率に関する検体の分布—備蓄米 (H13年産玄米)

表7. 国産玄米から検出された主要な真菌

菌名	新米 (H16年産)		前年産米 (H15年産)		前年産米 (H14年産)		備蓄米 (H13年産)					
	検体 保存期間	2ヶ月以内 検出検体率 ^a (%)	20	0	0	33	2・28(9)	2・12(2)	34	2・80(4)	93	2・100(44)
Molds												
<i>Aspergillus</i>												
<i>A. flavus</i>												
<i>A. ochraceus</i>												
<i>A. restrictus</i>												
<i>A. versicolor</i>												
<i>Penicillium</i>												
<i>P. islandicum</i>												
<i>Acremonium</i>												
<i>Alternaria</i>												
<i>Arthrinium</i>												
<i>Chaetomium</i>												
<i>Cladosporium</i>												
<i>Curvularia</i>												
<i>Drechslera</i>												
<i>Epicoccum</i>												
<i>Eurotium</i>												
<i>Fusarium</i>												
<i>Nigrospora</i>												
<i>Paecilomyces</i>												
<i>Phoma</i>												
<i>Wallemia</i>												
Miscellaneous molds												
Unidentified molds ^c												
Yeasts												

^a 各々の真菌が検出された検体数のパーセント

^b 各々の真菌が検出された米粒数のパーセントの最小値と最大値。()内は、中央値。一部の真菌はどちらか一方の培地を特に好み、他方の培地では全く検出されないか検出されても検出率が下がるので、真菌検出粒数は、実際の着生真菌数を反映させるためにPDA培地とM40YA培地で得られた検出粒率のうち大きい方を採用した。

^c 検出されたが、通常の培地では孢子を形成しないため同定できなかった種々のカビをまとめた。検出粒数に基づき集計で全体の約30~40%を占める。一般にこれらのカビの多くは植物病原菌であると考えられている。

マイコトキシン産生能を有する株の存在が知られている *P. islandicum* を、前年産米（平成 14 年産）1 検体（検出検体率、1%）と備蓄米 2 検体（13%）から分離した。このうち備蓄米の 1 検体で、この菌の着生が進行しており、PDA 培地で検出粒率 82%を示した。*P. islandicum* を分離した 3 検体は、それぞれ別々の地域で生産された玄米である。*P. islandicum* に高度に汚染されていた備蓄米が貯蔵されていた県内で生産された検体は、全部で 14 あったが、他には *P. islandicum* を検出したものはなかった。

株によってはアフラトキシンを産生する可能性がある *Aspergillus flavus* が前年産米（平成 14 年産）の 5 検体（5%）と備蓄米の 2 検体（13%）から検出されたが、検出粒率は、低かった（それぞれ 2~4%と 4~8%）。他に、マイコトキシン関連真菌として、*A. ochraceus*, *A. versicolor*, *Fusarium* 等を検出した。このうち *A. versicolor* と *A. ochraceus* につ

いては検出粒率の高い検体があった。また、*A. versicolor* については、新米、前年産米、備蓄米すべての検体群にこれが検出された検体が存在し、全体の 16%の検体から検出された。

3. 生産地による差

日本を 4 つのブロックに分けて産地による真菌着生の差異を検体数が最も多かった平成 14 年産の前年産米で検討した。ブロック I: 北海道・東北地方、ブロック II: 関東・信越・北陸地方、ブロック III: 東海・近畿・中国地方、ブロック IV: 四国・九州地方に分けた。真菌着生粒率は、北から順に 8.5%, 18.0%, 20.5%, 22.3%であり、南に行くほど高かった（図 12）。また、この傾向は、*Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium* 属の菌で顕著であった（図 13）。平成 15 年産の前年産米には、産地の偏りがあったが、ほぼ同様の傾向があった。新米と備蓄米については、検体数が少なく産地も偏っていたためこの解析は行っていない。

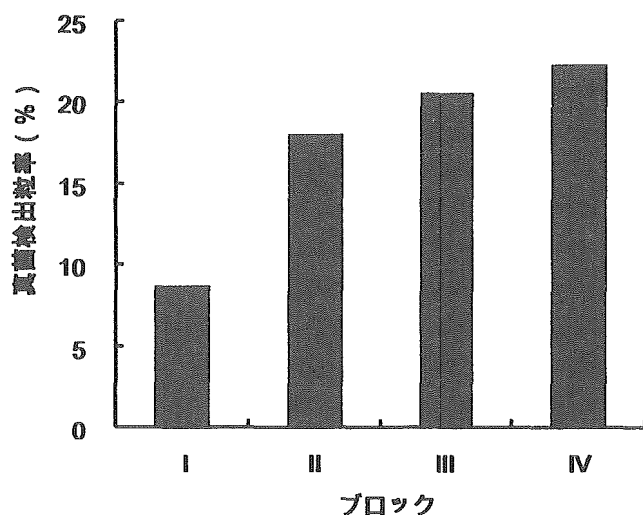


図12. 真菌検出粒率の地域差

ブロック I : 北海道・東北地方
 ブロック II : 関東・信越・北陸地方
 ブロック III : 東海・近畿・中国地方
 ブロック IV : 四国・九州地方

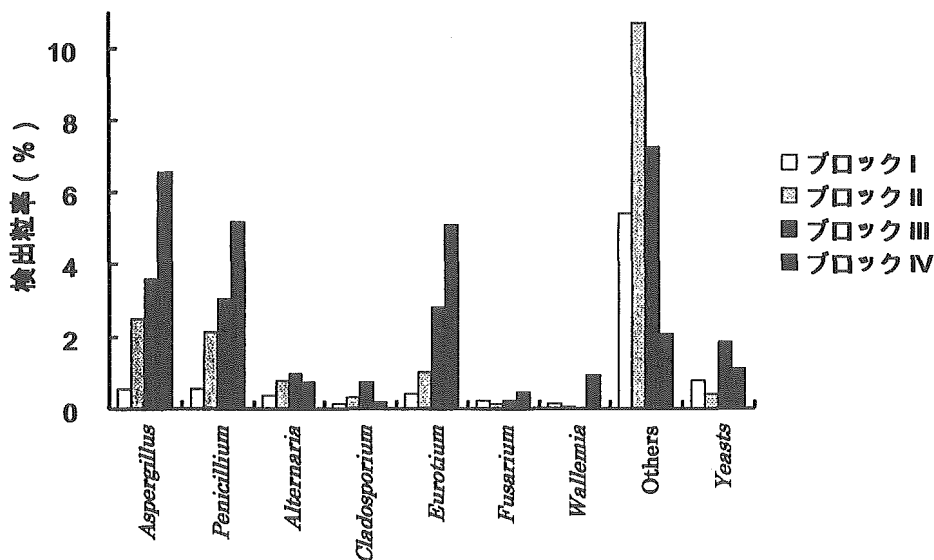


図13. 各種真菌の検出粒率の地域差

4. *P. islandicum* の毒素産生能

P. islandicum は、熱帯産の米からよく検出されるが、国産米から検出されることは稀であるとされている。今回の調査では、3検体から検出され、そのうちの1検体では検出粒率も高かった。そこで、3検体から分離した *P. islandicum* の毒素産生能を試験した。*P. islandicum* の主要な毒成分としては、ルテオスカイリンとシクロクロチン (=イスランジトキシン) が知られているが、今回は毒素産生能の指標としてルテオスカイリン産生能を試験した。

P. islandicum の菌体抽出液について上野らの方法に従って TLC を行ったところ、 R_F 値 0.41 に橙黄色のスポットが認められた。この R_F 値はルテオスカイリンの文献値 (0.40) とほぼ一致している。また、このスポットは、*P. islandicum* に特異的で、同時に TLC を実施した *P. citrinum* TSY222, *P. aurantiogriseum* TSY271 および *P. expansum* TSY277 の培養抽出液には検出されなかった (図 14)。そこで、*P. islandicum* の培養抽出液について分取

TLC を実施し、 R_F 値 0.41 を示す橙黄色画分をアセトンで溶出した。ここで得られた TLC 溶出液のうち、*P. islandicum* 対照菌である *P. islandicum* TSY283 培養物由来の溶出液について LC/TOF-MS および LC/ion trap MS を実施したところ、HPLC で 8.5 分の保持時間を与えるピークがルテオスカイリンであると同定された。すなわち、LC/TOF-MS によりこのピークの精密質量を測定した結果、正イオンモードで観察されたプロトン化分子イオン; $(M+H)^+$ は $m/z=575.1182$ であり、ルテオスカイリンのプロトン化分子イオンの精密質量 ($m/z=575.1184$) との相対質量誤差は 0.35 ppm であった。また負イオンモードで観察された脱プロトン化分子イオン; $(M-H)^-$ の精密質量 ($m/z=573.1038$) との相対質量誤差は 1.31 ppm であった (図 15.a,b)。さらに LC/ion trap MS を用いて分子関連イオン (プロトン化及び脱プロトン化分子イオン) をプリカーサーイオンとした MS/MS スペクトルを測定した結果、正、負イオンモード共に中性分子の脱離として水分子が 1~3

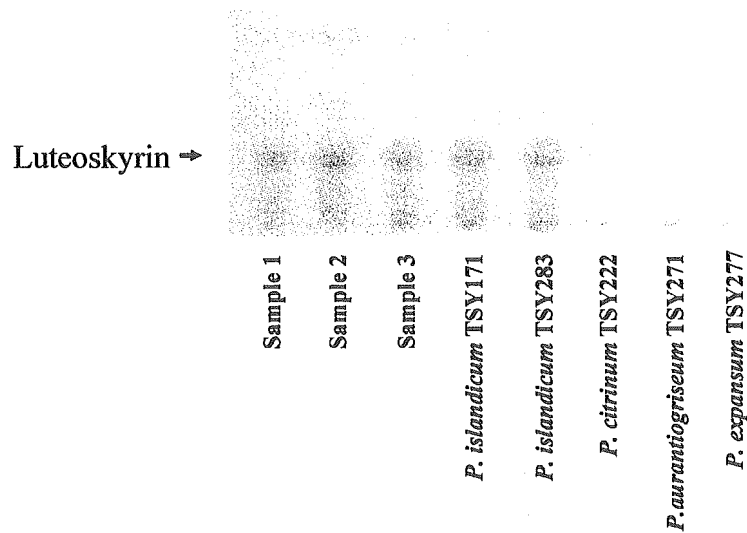


図14. *P. islandicum* 培養抽出液のTLCクロマトグラム

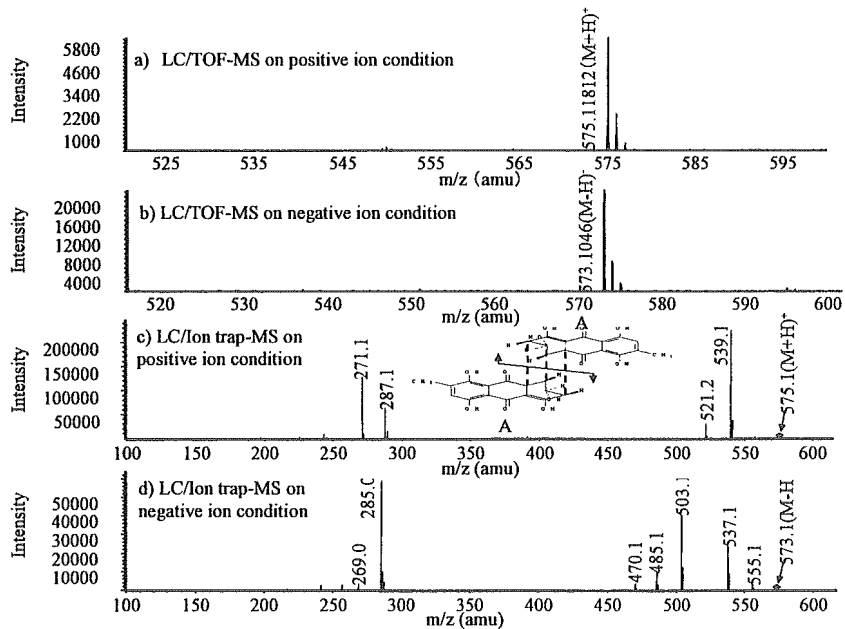


図15. *P. islandicum* TSY 283によって産生されたルテオスカイリンのLC/TOF-MSとLC/ion trap-MSのスペクトル

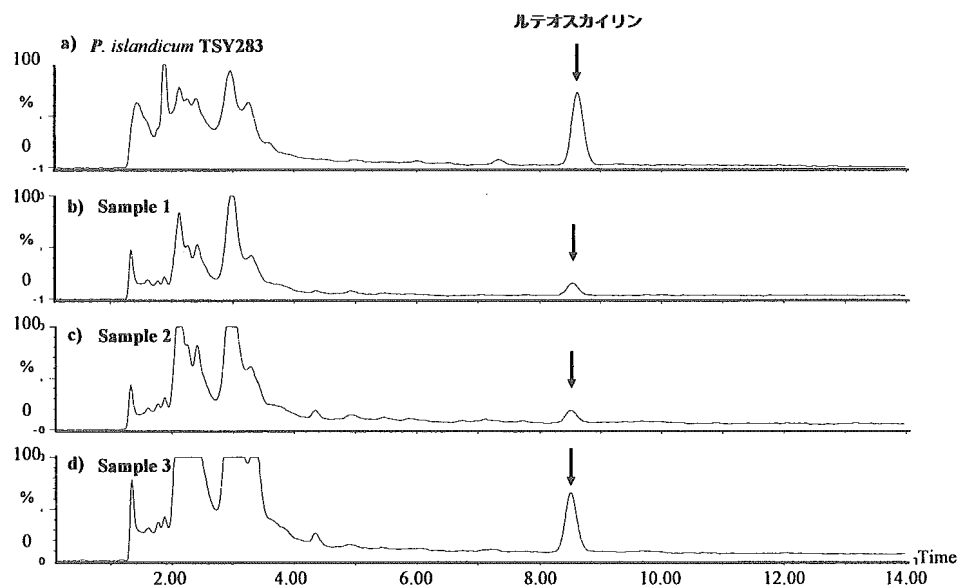


図16. 国産玄米より分離された*P. islandicum*によって産生されたルテオスカイリンを含むTLC画分のHPLCクロマトグラム

個脱離したイオン(正イオン: $m/z=539, 521$ と負イオン: $m/z=555, 537$)及び図 15 に示した構造式の A 骨格由来のイオン(正イオン: $m/z=287, 271$ と負イオン: $m/z=285$)が観察された(図 15.c, d) .

次に、検体より分離した *P. islandicum* 3 株の培養抽出液から得た TLC 溶出液について HPLC を実施した。図 16 に示したように、検体から分離した菌株から得た TLC 溶出液には、*P. islandicum* TSY283 から得た TLC 溶出液において LC/TOF-MS および LC/ion trap MS によってルテオスカイリンであることが確認されたピークに相当するピークが認められ、国産米より分離した *P. islandicum* 3 株は、いずれもルテオスカイリンを産生することが明らかになった。

D. 考察

備蓄米には、好乾性菌の着生が進んだも

のが多かった。一般に収穫直後の穀類では、好湿性の圃場性カビである *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* が真菌フローラ の中心を占めるが、貯蔵に伴って *Aspergillus*, *Penicillium* などの中湿性カビへ、さらには *Aspergillus restrictus*, *Eurotium* などの好乾性貯蔵カビへと推移していくことが知られている。我々の結果も、同様の真菌フローラの変遷を示した。

今回の調査で *P. islandicum* の着生が 3 検体に認められ、うち 1 検体では汚染が進行していたので、*P. islandicum* について過去の報告を調べた。1950 年代の輸入米真菌調査では、この菌の寄生率(着生粒率) 1.5% 以上の米が全検体の 13% あったことが報告されている。国産米からは、1960 年代の調査で市販精白米 219 検体のうち 1 検体から、また、地域的な調査ではあるが、農家保有精白米 376 検体のうち 5 検体から、農家保有玄米 258 検体のうち 8 検体から検出されている。*A. flavus* は、調査や地域によって国産米から検出された例があるが、今

回の結果と同様いずれの場合も検出粒率は低い(1~4%)。また、輸入米から分離された *A. flavus* にアフラトキシン産生能を認めた報告はあるが、国産米から分離された *A. flavus* は、培養によってアフラトキシンを産生しなかったと報告されている。今回の調査で検出検体率、検出粒率が比較的高かったマイコトキシン関連真菌に、*A. versicolor* と *A. ochraceus* とがある。この2つの菌は、それぞれステリグマトシスチンとオクラトキシンAの産生菌として知られており、特に *A. versicolor* は、貯蔵米でステリグマトシスチンの自然汚染を起こした例がある。昭和40年代の国産米調査における *A. versicolor* と *A. ochraceus* の着生状況は、ほぼ今回と同程度であり、当時と比べて改善の状況は認められない。

Fusarium は、トリコセセン系を始めとして多様なマイコトキシンを産生する。特に、トウモロコシ、ムギ類の赤カビ病は有名で、この病気に冒された穀粒からは、デオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)、T-2トキシン等が高濃度で検出される。最近、外国で米からもDONが検出されたという報告があり、国産米のDON、NIVによる汚染実態が調査された。その結果124検体を調査して4検体にDON、15検体にNIVが検出されている。真菌検査によって *Fusarium* による汚染状況を調べることは、*Fusarium* 毒素の存在を予測する上で有効であると考えられる。今回の調査結果は、*Fusarium* は貯蔵によって衰退することを示しており、*Fusarium* の検出を目的とした真菌検査は、収穫後早い時期に実施する必要があると考えられる。

昭和40年産国産精白米の真菌フローラの調査では、真菌発生頻度と検体収集地域との間には関連は認められなかったと報告されているが、今回の調査で真菌着生粒率は、米の産地が南になるほど高くなる傾向にあった。

第二次世界大戦後、エジプトから日本へ輸入された米に発生していた黄変米から原因菌として *P. islandicum* が分離・同定され、この菌の主要な毒性物質としてルテオスカ

イリンとシクロクロチンが特定された。*P. islandicum* は、産生する色素によって3タイプに型別分類できるという報告があり、それによるとルテオスカイリンは、エジプト米より分離された株が属するタイプだけが産生するとされている。国産の米や小麦粉から検出された *P. islandicum* の毒素産生能について、マウスやHeLa細胞を用いた毒性試験が実施され、培養液に強い毒性があることが報告されているが、毒性物質を確認する化学的な証拠は示されていない。今回、我々は、LC/TOF-MSとLCを用いて国産米から分離した *P. islandicum* 3株の菌体培養物中にルテオスカイリンが存在することを確認した。著者らの調べた限りでは、国産の穀物より分離された *P. islandicum* のルテオスカイリン産生能を化学的に確認したのは、この報告が初めてである。

今回は、収集した検体が少量であったため、玄米検体中にルテオスカイリンが蓄積していたかどうかを確認することはできなかった。また、現在のところ *P. islandicum* 毒素の食品からの分析法は確立されていない。この研究で培養物中のルテオスカイリンを確認するために用いた方法は、今後食品中のルテオスカイリン定量法を確立する際にモデルとすることができると考える。

E. 結論

今回の調査によってマイコトキシン関連真菌が着生している国産玄米があることが明らかになった。*A. versicolor*、*A. ochraceus* 等のマイコトキシン関連真菌の着生状況は、昭和40年代の調査と比べて改善されていなかった。*A. versicolor* はステリグマトシスチンを、*A. ochraceus* はオクラトキシンを産生する菌として知られている。加えて今回の調査では *P. islandicum* を高い検出粒数をもって検出した検体があった。分離された *P. islandicum* にはいずれもルテオスカイリン産生能があることが明らかになった。また、新米からは、多様なマ

イコトキシンを産生する可能性がある *Fusarium* が高頻度で検出された。以上のことから、国産米のマイコトキシン汚染に関する安全性を図る上では、ステリグマトシスチン、オクラトキシン A、ルテオスカイリン、*Fusarium* 毒素等を分析の対象にするのが有効であると考えられる。*Fusarium* の検出を目的とする真菌検査は、収穫後早い時期に実施する必要があることが示された。また、今回の調査結果は、国産米について有害な真菌による汚染防除の対策を立てる必要があることを示していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 酒井綾子, 川上久美子, 高鳥浩介, 齋藤行生: 真菌汚染による苦情食品とその喫食による健康被害. 食品衛生学雑誌, **45**, 201-206 (2004).
- 2) 酒井綾子, 田中宏輝, 小西良子, 花澤 良, 太田利子, 中原徳之, 関口将二, 押田絵美, 滝埜昌彦, 一戸正勝, 吉川邦衛, 芳澤宅實, 高鳥浩介: 国産玄米の真菌調査と検出された *Penicillium islandicum* の毒素産生能. 食品衛生学雑誌, 投稿中.

2. 学会発表

- 1) 酒井綾子, 川上久美子, 高鳥浩介, 齋藤行生: 苦情・事故食品からみた真菌による食品汚染. 日本食品衛生学会第 86 回学術講演会 (2003.10).
- 2) 酒井綾子, 花澤良, 中原徳之, 関口将二, 小西良子, 吉川邦衛, 一戸正勝, 芳澤宅實, 高鳥浩介: 国産米の真菌汚染: 備蓄玄米 (平成 13 年産) と前年産玄米 (平成 14 年産) の平成 15 年初夏における比較. 第 55 回マイコトキシン研究会学術講演会
- 3) 酒井綾子, 田中宏輝, 小西良子, 花澤 良, 太田利子, 中原徳之, 関口将二, 押田絵美, 高鳥浩介, 吉川邦衛, 一戸正勝, 芳澤宅實, : 国産玄米の真菌調査と

Penicillium islandicum の検出について, 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会 (2004.11).

謝辞

苦情・事故食品についての調査は、次の各氏と機関並びに他の多くの方々のご協力により実現しました：山口敬治，北海道立衛生研究所；大友良光，青森県環境保健センター；佐野 健，秋田県衛生科学研究所；斎藤紀行，宮城県保健環境センター；齋藤卓哉，仙台市衛生研究所；須釜久美子，福島県衛生研究所；不二崎順二，新潟県保健環境科学研究所；富田律子，栃木県保健環境センター；森田幸雄，群馬県衛生環境研究所；大塚佳代子，埼玉県衛生研究所；高橋治男，千葉県衛生研究所；秋元 徹，千葉市環境保健研究所；秋谷正人，杉並区衛生試験所；北爪晴恵，横浜市衛生研究所；野田裕之，山梨県衛生公害研究所；和田正道，長野県衛生公害研究所；有田世乃，静岡県環境衛生科学研究所；北條罔生，静岡市衛生試験所；小粥敏弘，浜松市保健環境研究所；松澤留美子，富山県厚生部食品生活衛生課；平松礼司，愛知県衛生研究所；深尾敏夫，岐阜市衛生試験所；杉山 明，三重県科学技術振興センター；高木眞司，滋賀県立衛生環境センター；久米田裕子，大阪府立公衆衛生研究所；山内昌弘，堺市衛生研究所；島田邦夫，兵庫県立健康環境科学研究センター；杉浦義紹，神戸市環境保健研究所；高 美恵子，姫路市環境衛生研究所；平山照雄，尼崎市立衛生研究所；竹部久勝，奈良県保健環境研究センター；太田裕元，

和歌山市衛生研究所；河本秀一，広島市衛生研究所；西田知子，山口県環境保健研究センター；中岡秀仁，福岡県保健福祉部生活衛生課；真鍋和義，福岡市保健環境研究所；藤田景清，北九州市環境科学研究所；森永康裕，佐賀県衛生薬業センター；田栗利紹，長崎県衛生公害研究所；久高 潤，沖

縄県衛生環境研究所。皆様に深く感謝致します。

P. islandicum 培養物からのルテオスカイリン分析を実施していただいた国立医薬品食品衛生研究所，小西良子博士，田中宏輝研究員並びに横河アナリティカルシステムズ，滝埜昌彦博士に深く感謝致します。