

図38 苦情事例パターン集計での清涼飲料水の種類と微生物の種類のご組合せ(ILSI・全清飲)

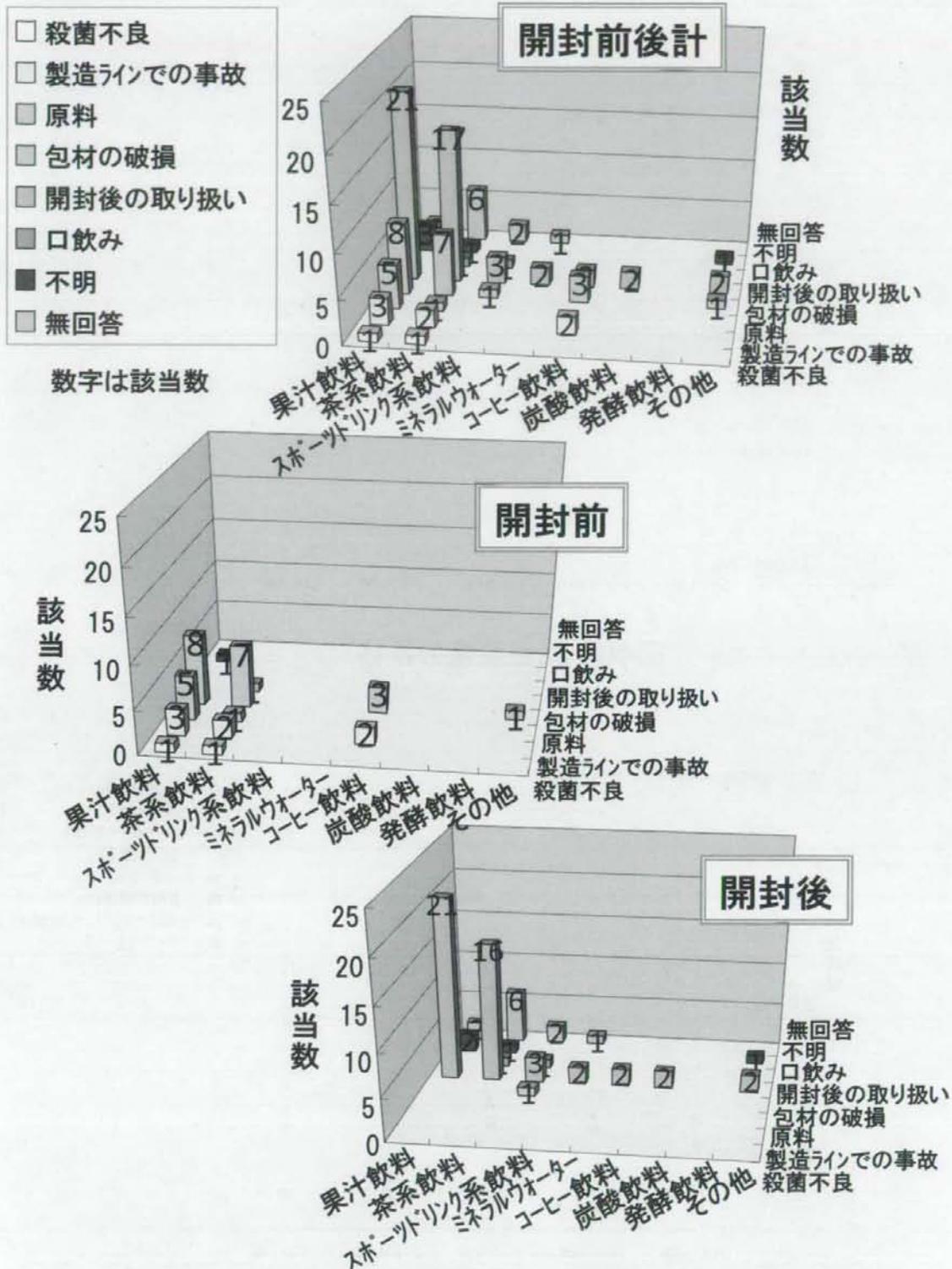


図39 苦情事例パターン集計での清涼飲料水の種類と微生物汚染の原因の組合せ(ILSI・全清飲)

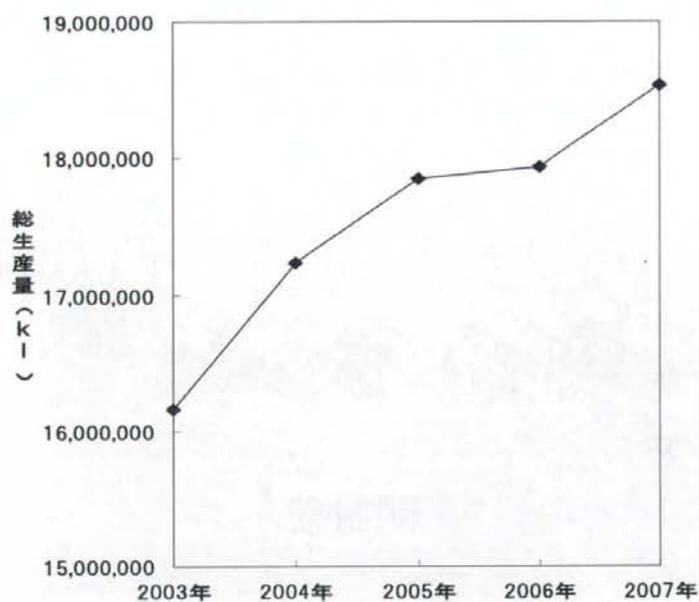


図40 総生産量の推移

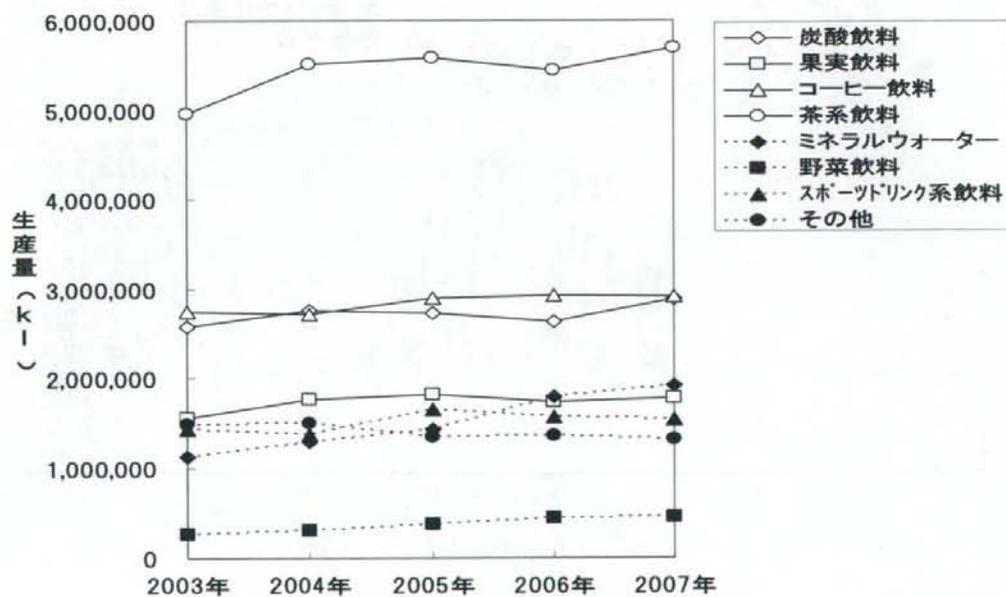


図41 品目別生産量の推移

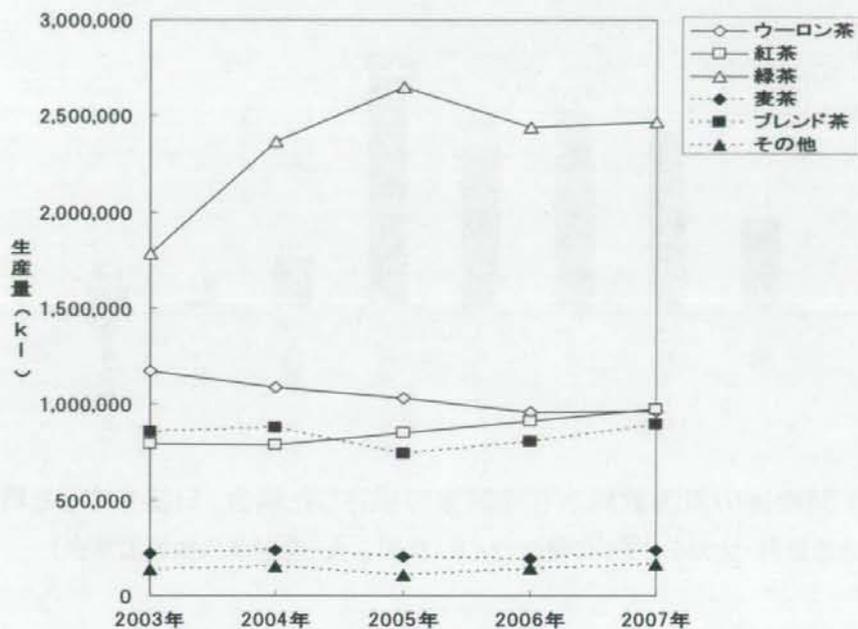


図42 茶系飲料生産量の内訳

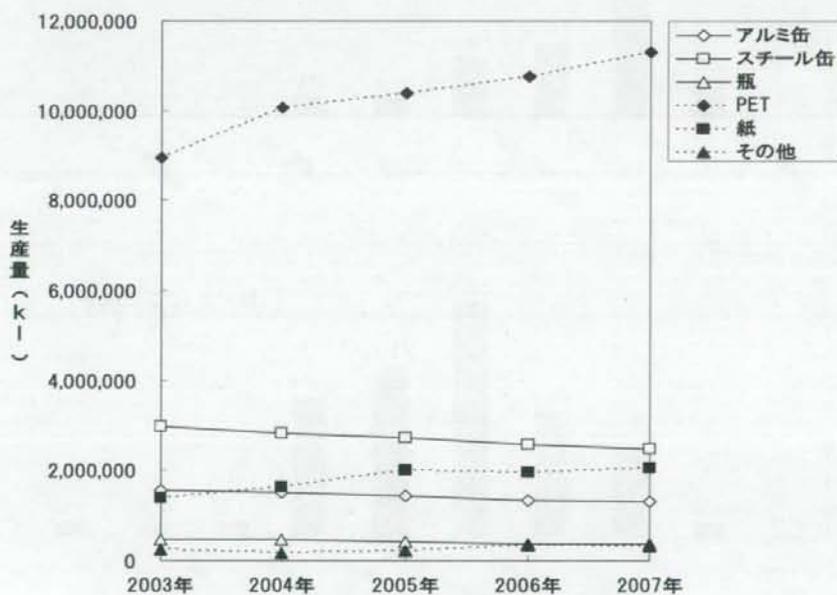


図43 容器別生産量の推移

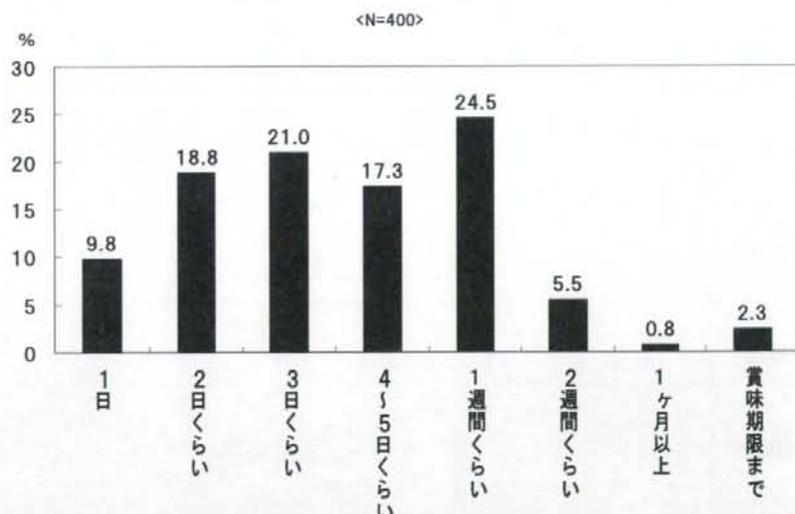


図44 開栓後の清涼飲料水を冷蔵庫で保存した場合、日持ちすると思う期間
(清涼飲料・ソフトドリンクの情報サイト 社団法人 全国清涼飲料工業会)

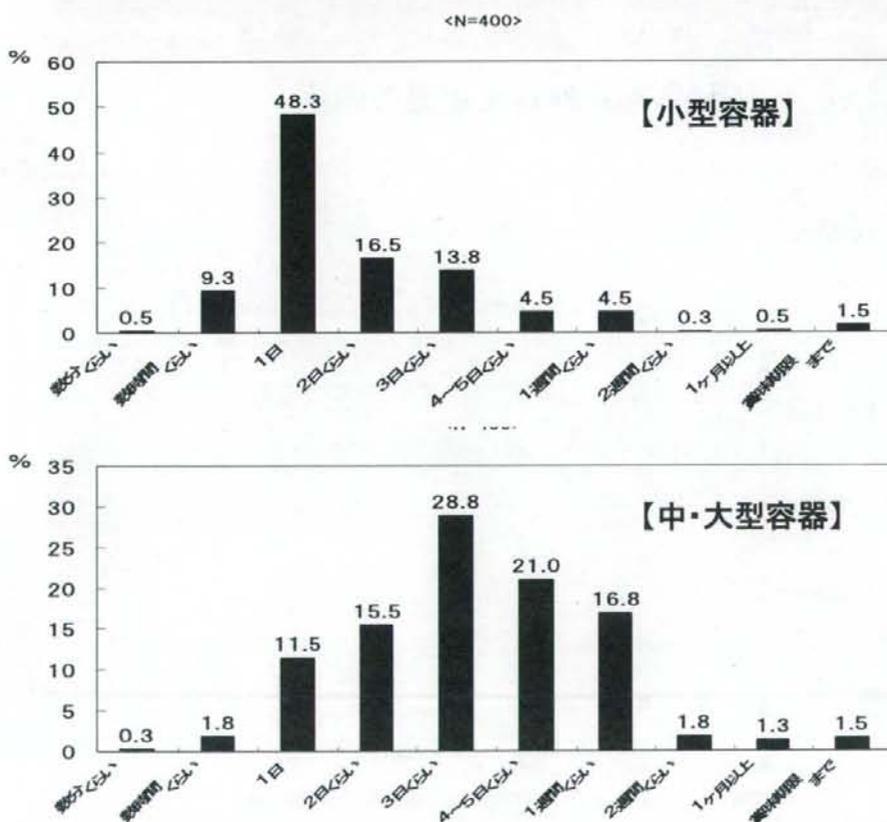


図45 開栓後は「すぐにお飲みください」「冷蔵庫に保管し、お早めにお飲みください」の期間(清涼飲料・ソフトドリンクの情報サイト 社団法人 全国清涼飲料工業会)

表1 アンケート回答自治体名

自治体名及び所属	自治体名及び所属
北海道保健福祉部保健医療局 食品衛生課	長野県衛生部 食品・生活衛生課 食品衛生係
札幌市保健福祉局保健所食の安全推進課	岐阜県健康福祉部生活衛生課
旭川市保健所衛生検査課食品保健係	岐阜市保健所 食品衛生課
小樽市保健所生活衛生課	静岡県 厚生部食品衛生室
函館市 市立函館保健所生活衛生課	静岡市保健所食品衛生課
青森県健康福祉部保健衛生課	浜松市保健所 健康医療部 生活衛生課
青森市健康福祉部青森市保健所生活衛生課	愛知県健康福祉部健康担当局生活衛生課
岩手県 花巻保健所	名古屋市長健康福祉局健康部食品衛生課食品衛生係
一関保健所	豊田市保健所 保健衛生課
宮古保健所	豊橋市保健所生活衛生課食品安全グループ
宮城県環境生活部 食と暮らしの安全推進課	岡崎市保健所生活衛生課
秋田市保健所 衛生検査課 食品衛生担当	三重県健康福祉部 健康危機管理室
山形県総務部危機管理室食品安全対策課	滋賀県健康福祉部生活衛生課 食の安全推進室
福島県保健福祉部食品生活衛生課	京都府健康福祉部 生活衛生課
いわき市保健所生活衛生課	京都市保健福祉局保健衛生推進室生活衛生課
栃木県保健福祉部生活衛生課食品衛生担当	大阪市健康福祉局健康推進部生活衛生担当
宇都宮市保健所 生活衛生課	堺市保健所 食品衛生課
群馬県衛生食品課監視指導係	高槻市保健所 保健衛生課
埼玉県保健医療部食品安全課	神戸市保健福祉局健康部生活衛生課
さいたま市 保健福祉局保健部生活衛生課	姫路市保健所 衛生課
川越市保健所 食品・環境衛生課	尼崎市保健所生活衛生課
千葉県健康福祉部衛生指導課食品安全対策室	西宮市保健所 食品衛生グループ
千葉市保健福祉局健康部生活衛生課	奈良県福祉部健康安全局食品・生活安全課
船橋市保健所衛生指導課 食品担当	奈良市保健所生活衛生課
東京都 福祉保健局健康安全部食品監視課	和歌山県 海南保健所
東京都千代田区保健福祉部生活衛生課食品衛生	岩出保健所
東京都港区みなと保健所 生活衛生課	和歌山市保健所 生活保健課
東京都新宿区保健所衛生課食品保健係	鳥取県生活環境部くらしの安心推進課
東京都墨田区福祉保健部保健衛生担当生活衛生課	岡山県保健福祉部生活衛生課 食の安全推進班
東京都江東区保健所 生活衛生課	倉敷市保健所 生活衛生課
東京都品川区児童保健事業部健康課	広島県健康福祉局保健医療部生活衛生課
東京都目黒区保健所生活衛生課	広島市健康福祉局保健部食品保健課
東京都世田谷区世田谷保健所生活保健課	福山市保健所 生活衛生課
東京都渋谷区福祉保健部生活衛生課食品衛生係	山口県生活衛生課 食の安心・安全推進班
東京都中野区保健所 生活衛生分野	下関市保健部生活衛生課
東京都豊島区池袋保健所 生活衛生課	徳島県 徳島保健所
東京都北区保健所 生活衛生課生活衛生係	吉野川保健所
東京都荒川区健康部生活衛生課食品衛生係	阿南保健所
東京都板橋区保健所	三好保健所
東京都練馬区保健所 生活衛生課 食品衛生主査	香川県健康福祉部生活衛生課
東京都足立区足立保健所生活衛生課食品監視係	高松市保健所 生活衛生課
東京都葛飾区保健所生活衛生課	愛媛県保健福祉部健康衛生局業務衛生課
東京都江戸川区江戸川保健所 生活衛生課食品調整係	松山市保健福祉部生活衛生課
神奈川県保健福祉部生活衛生課 食の安全推進班	福岡県保健医療介護部保健衛生課
横浜市保健所 食品衛生課 食品監視係	福岡市保健福祉局生活衛生部食品安全推進課
川崎市健康福祉局 保健医療部 生活衛生課	北九州市保健福祉局保健衛生課
横須賀市保健所生活衛生課食品保健担当	久留米市保健所 衛生対策課
相模原市健康福祉局保健所 生活衛生課	大牟田市保健福祉部生活衛生課
藤沢市保健福祉部 保健所 生活衛生課	長崎県 県民生活部 生活衛生課
新潟県福祉保健部生活衛生課 食の安全・安心推進係	佐世保市保健所生活衛生課食品衛生係
新潟市保健所食品・環境衛生課	宮崎県福祉保健部衛生管理課 食品衛生担当
富山県厚生部生活衛生課	宮崎市保健所 衛生環境課 主任技師
石川県健康福祉部薬事衛生課	鹿児島保健福祉部生活衛生課
金沢市保健所衛生指導課	沖縄県福祉保健部業務衛生課
山梨県福祉保健部衛生業務課	

表2 過去5年間に寄せられた微生物による清涼飲料水の苦情件数（自治体回答：Q1）

発生状況	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年	総計
開封前	8	21	19	21	28	97
開封後	27	59	50	52	89	277
不明	6	11	4		2	23
その他	1	1	3		2	7
総計	42	92	76	73	121	404

（表3は次頁）

表4 清涼飲料水の微生物を原因とした苦情に対応するために必要な情報（ILSI:Q11）

必要とする情報の内容	回答企業数
細菌やカビ・酵母などの微生物による腐敗情報	
必要	4
微生物の情報(種類・性質など)	2
開封前と開封後における生産状況の差など	1
健康被害	1
小計	4
無回答	2
回答企業数合計(重複なし)	6
細菌やカビ・酵母などの微生物自体の毒性情報	
必要	4
健康被害について(毒性)	2
カビ毒の情報	1
具体的事項の記載なし	1
小計	4
無回答	2
回答企業数合計(重複なし)	6
マイコトキシンなど微生物が産生する毒素の健康影響情報	
必要	5
健康被害について(毒性)	4
具体的事項の記載なし	1
小計	5
無回答	1
回答企業数合計(重複なし)	6
その他	
必要	1
海外の情報	1
小計	1
無回答	5
回答企業数合計(重複なし)	6

表3 清涼飲料水の微生物を原因とした苦情に対応するために必要な情報（自治体：Q11）

必要とする情報の内容	回答自治体数
細菌やカビ・酵母などの微生物による腐敗情報	
必要	82
微生物の情報(種類・性質など)	15
味・匂い・色・外見等の変化	13
事例集・写真集	10
検査方法(同定・定量など)	5
防止方法	2
具体的事項の記載なし	51
小計(複数回答あり)	96
無回答	27
回答自治体数合計(重複なし)	109
細菌やカビ・酵母などの微生物自体の毒性情報	
必要	81
健康被害について(毒性)	17
事例集・写真集	8
具体的事項の記載なし	63
小計(複数回答あり)	88
無回答	28
回答自治体数合計(重複なし)	109
マイコキシンなど微生物が産生する毒素の健康影響情報	
必要	68
健康被害について(毒性)	13
微生物の種類と毒素の特徴	4
事例集・写真集	3
具体的事項の記載なし	52
小計(複数回答あり)	72
無回答	41
回答自治体数合計(重複なし)	109
その他	
必要	21
事例集・写真集	7
苦情に至った原因(製造・流通・消費者の取り扱いのどの段階かも含めて)	5
微生物の情報(種類・性質など)	4
味・匂い・色・外見等の変化	3
流通過程での発生防止対策	3
混入防止対策	2
苦情が寄せられた清涼飲料水の分類	2
健康被害	2
汚染を受けた場合の経時変化データ	1
検査方法(同定・定量など)	1
開封前の苦情か、開封後の苦情か	1
微生物による副産物	1
未開封ペットボトルに関する微生物の汚染状況	1
具体的事項の記載なし	1
小計(複数回答あり)	34
無回答	88
回答自治体数合計(重複なし)	109

表5 清涼飲料水の微生物を原因とした苦情・事故について、必要な取り組み (ILSI:Q12)

・開栓後の微生物変敗による健康被害についての一派的な説明ができる考え方
お客様への説明の観点から有用
・開封後の微生物汚染クレームを減らすために、開封後の取り扱い方法(温度や保存状態)
賞味期限などを、例えば飲料の種類に応じて試験データをもとに大枠で規定してしまう。
それを一般消費者にも公開し、飲料に生育する微生物に対して正しい知識を持ってもらう。
・流通や物流に対する取り扱い方法の啓蒙
・衝撃に強い容器開発
・開封後保管中に生えたカビ等の写真の情報公開
・開封後の飲用期間(目安)表示の推進
・迅速分析法
・死菌に対する分析法
・個々の組織で有している腐敗情報について1年毎の取りまとめやその公開など。
民間からは出しにくい、すべての企業(関連する)から提出させるような取り組みであれば、
情報は得られるかもしれない。それをもって製造する側にも消費する側にも正しい安全・安心の
意識を持ってもらえるのでは。

表6 加熱殺菌以外の殺菌・除菌方法についての製造基準の必要性 (ILSI:Q13)

殺菌方法	要・不要	回答企業数
オゾン処理	ぜひ必要	0
	あったほうが良い	1
	どちらでも良い	3
	なくても良い	1
	不要	1
	計	6
膜処理	ぜひ必要	1
	あったほうが良い	1
	どちらでも良い	2
	なくても良い	1
	不要	1
	計	6
UV照射	ぜひ必要	0
	あったほうが良い	2
	どちらでも良い	2
	なくても良い	1
	不要	1
	計	6

表7 日本ミネラルウォーター協会によるミネラルウォーター製造方法に関する調査結果(2003年)

製造方法	内容	製造方法
加熱殺菌方法	加熱殺菌のみ	3
	ろ過+加熱殺菌	15
	ろ過+紫外線+加熱殺菌	2
	ろ過+紫外線+オゾン+加熱殺菌	1
	計	21
ろ過除菌	ろ過除菌のみ	7
	紫外線+ろ過	1
	紫外線+オゾン+ろ過	2
	計	10
紫外線殺菌のみ		1
	合計	32

調査回答企業数:31社32製造方法(1社:2製造方法)

【注1】 加熱殺菌と併用している「ろ過」は微粒子の除去目的のみなのか、微粒子除去とろ過除菌ともに目的としているのかは不明。

【注2】 加熱殺菌を伴わない「ろ過」は、ろ過除菌とした。この場合、ろ過のみはろ過除菌が明確であるが、紫外線等の併用の場合、いずれが除菌・殺菌の主体なのかは不明。

分 担 研 究 報 告 書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための
微生物同定方法の確立

協力研究報告書

真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

工藤 由起子

平成 20 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

研究代表者 工藤 由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

研究分担者 工藤 由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

研究要旨

これまで、真菌の DNA 抽出法について数多くの研究がなされてきたが、多くは酵母や少数種のカビの胞子を用いた検討であり、多種のカビの菌糸体を用いての報告は存在せず、菌糸体からの効率的な DNA 抽出方法に関する検討が望まれる。そこで本研究では、食品衛生学上重要な酵母 3 種およびカビ 14 種を対象とし、液体培養で得た細胞を用いて、各種 DNA 抽出方法の効率比較を行った。抽出方法には、2 種の市販キット、SDS 法、CTAB 法、および塩化ベンジル法を選択し、さらにこれら 5 方法とビーズを用いた細胞破碎併用の有無も検討し、合計 10 通りのプロトコルいずれかを用いた抽出での DNA 収量を比較した。本研究で使用した真菌のほぼ全てにおいて、SDS 法、CTAB 法、塩化ベンジル法のいずれかを使用した場合には、2 種の市販キットと比較してビーズ破碎の有無にかかわらず高い DNA 収量の平均値を示す傾向があった。さらに、SDS 法とビーズ破碎併用プロトコルを使用した場合、全 17 種中 11 種（64.7%）において他のプロトコルよりも有意に高い抽出効率を得られ、これは SDS/CTAB/塩化ベンジル法のいずれかを用いたプロトコルの中で最も高い割合であった。以上のことから、真菌細胞から効率の良い DNA 抽出を行うためには、種を問わず、液体培養で大量の細胞を簡便に得て、最初に試行する抽出法として SDS 法とビーズ破碎併用プロトコルを選択するべきであるということが示唆された。

協力研究者

渡辺 麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所

後藤 慶一 三井農林株式会社 食品総合研究所

A. 研究目的

真菌は食品の発酵に用いられるなど有用である一方、腐敗や健康危害に関与するため、食品衛生学上重要な微生物である。近年、食の安全に対する注目の高まりにつれて、カビの食品における苦情件数は上昇傾向にあり、食品から分離した真菌の迅速・簡便な同定方法に対する需要が高まっている。真菌の同定方法は、従来は形態学的観察に頼った方法が主流であったが、特徴を見出すのに特別な熟練技術が求められることに加え、培養が必要で時間がかかる。そこで、分子生物学的手法の持つ簡便性・迅速性・客観性が注目され、食品や環境中からの分離株の同定や毒素遺伝子の検出などといった目的で、遺伝子塩基配列やPCR増幅産物のバンドパターンの解析などが導入されており、分子生物学的手法は真菌分野でも広く取り入れられつつある。その結果、形態学的手法のみでは同定が困難であった菌株について、分子生物学的手法を取り入れたことによって同定が可能となった例もいくつか報告されている(7, 9)。このような理由で、真菌分野でも分子生物学的手法の重要性が増してきている。

真菌はその細胞構成成分の特徴からDNA抽出が比較的困難であることが知

られ、過去、多くのDNA抽出法が検討されてきた(2, 13, 16)が、多くは酵母を重点的に検討した内容であり、様々な糸状菌を用いての検討はいまだになされていない。真菌は多様な細胞構成成分を持つ(1, 10, 12)ため、分類群によっては抽出効率が著しく異なる可能性があり、広く検討する必要がある。また、DNA抽出法を検討した過去の研究においては、それらの多くが寒天平板に接種し培養したコロニーから胞子を収集してDNAを抽出する方法を採用している(3, 4, 8)。迅速にある一定量以上のDNAを得て検査に供するには、液体培地を使用して菌糸体を収集したほうが必要量の真菌細胞を得ることができ、培養方法として簡便であり、菌糸体からの効率的な抽出方法の検討が望まれる。

そこで本研究では、食品衛生学上問題となることが多い糸状菌に特に注目して研究対象種を決定し、それらを液体培地で培養して菌体を得、PCRのみならず大量のDNAを必要とするような分子生物学の実験にも最適なDNA抽出法を明らかにする目的で各種方法の効率比較を行ったので、この結果を報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

本研究では、3種の酵母および14種のカビを用いた (Table 1 ; *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Byssoschlamys fulva*, *Emericella nidulans*, *Fusarium subglutinans*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum*, *Talaromyces bacillisporus*, *Trichoderma viride*, *Absidia corymbifera*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus stolonifer*, *Syncephalastrum racemosum*)。これらの種は、食品衛生学上重要であること、さらに形態学的・分子系統学的に網羅的なサンプリングを行うことを判断基準として選択した (5, 6, 11)。用いた菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門 (National Institute of Technology and Evaluation, Biological Resource Center; NBRC, Chiba, Japan) または千葉大学真菌医学研究センター (Medical Mycology Research center, Chiba University, Chiba, Japan) から入手した。用いた17菌株のポテトデキストロース寒天平板 (PDA; 栄研化学, 東京)における巨大培養のコロニー形態、および分類学的な特徴を Fig. 1 から 17 に示した。

2. 供試検体の作成方法

全ての菌株は、PDA 斜面培地を用いて 25°C で 7 日間前培養した後、形成された菌糸体および胞子を複数本の 1,000 ml 三角フラスコに入れた各々 400 ml のポテトデキストロース液体培地 (PDB, Difco Laboratories, Franklin Lake, U.S.A.) に接種し、25°C で 65 から 70 時間振盪培養した。培養物のうち、酵母細胞または酵母様細胞 (*S. cerevisiae*, *C. neoformans*, *R. rubra*, *G. candidum*) の増殖によって懸濁した液体培地については、6,000 × g で 10 分間遠心分離を行い (TOMY MX-301, 株式会社トミー精工, 東京)、ペレット状に沈殿した細胞を採集した。菌糸体が浮遊している液体培地については、菌体をメンブレンフィルター上に採取して可能な限り水分を絞り取る処理を行い採集した (Fig. 18)。*B. fulva* については、培養液中に浮遊胞子による懸濁細胞と菌糸体が共存しており、上述の両採取方法を用いて両方の細胞を収集した。得られた真菌細胞を 100 mg ずつに分割したものを検体とし、マイクロチューブに入れて使用するまで -80°C で冷凍保存した。

3. DNA 抽出方法

本研究では、3種類の非酵素的反応による抽出方法、および2種類の市販キットを用いた酵素反応による抽出方

法、計5通りの化学的抽出方法を用いた。前者には Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 法 (13)、Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) 法 (2)、塩化ベンジル法(16)、後者には Gen とるくん high recovery (酵母用;タカラバイオ株式会社、滋賀)、DNeasy Plant Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) が含まれる。さらに、これら化学的抽出方法との併用で、物理的抽出方法としてビーズによる細胞破碎も行った。すなわち、5種の化学的抽出方法各々についてビーズ破碎の併用の有無を検討し、総計10通りの抽出プロトコルを用いてDNA抽出実験を行った (Fig. 18)。ビーズによる細胞破碎は、過去、真菌の孢子や酵母細胞を用いたDNA抽出においてしばしば用いられる方法である (3, 4)。本研究では、各マイクロチューブに直径0.5 mmのジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカー (安井器械株式会社, 大阪) を用いて2,500 rpm、0°Cで1分間の細胞破碎を行った。

SDS法については、Tapia-Tussellらの方法(13)に若干の改変を加え行った。SDSは陰イオン界面活性剤の一種で、蛋白質を可溶化する作用によってDNA抽出を容易にする。100 mgの菌体が入った各マイクロチューブに800 µlの

lysing buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0.3% SDS) を加え、ボルテックスミキサー Automatic mixer S-100 (タイテック株式会社, 埼玉) を用いて攪拌し十分に細胞を懸濁した後、これを65°Cで30分間数回上下反転させながら反応させた。得られた細胞溶解液に等量のフェノール/クロロホルム (1:1) を加えて20分間上下反転させながら十分に攪拌し、15,682×g、室温で10分間遠心分離した後、水層を新たなマイクロチューブに移した。ここに15 µlのRNase A (10 mg/ml, Novagen, Darmstadt, Germany)を加え、37°Cで3時間反応させた。反応後、さらに等量のクロロホルムを加えて20分間上下反転させながら十分に攪拌し、15,682×g・室温で10分間遠心分離して、精製されたDNAを含む水層を得た。これに、得られた水層の2倍量の冷却したイソプロパノールおよび5 M NaClを適量加えてDNAを沈殿させた後、沈殿物を500 µlの70%エタノールでリンスし、真空乾燥機で乾燥させてDNA塊を得た。これを100 µlのTris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解させ、使用するまで4°Cで保存した。

CTAB法については、Coffrothらの方法(2)に若干の改変を加え行った。

CTAB は陽イオン界面活性剤である。100 mg の菌体が入った各マイクロチューブに 800 μ l の CTAB buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 0.2% 2-mercaptoethanol) を加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に細胞を懸濁した。これに続く細胞溶解、RNA 分解処理、DNA 精製、および DNA 溶液の作製の各ステップは、上述の SDS 法と同様の条件で行った。

塩化ベンゼン法については、Zhu らの方法 (16) に従って行った。塩化ベンゼンは有機溶液の一種で、細胞壁構成成分の多糖類に作用して細胞壁を破壊し、さらにフェノールと同様にタンパクや細胞壁分解物を取り除くことによって DNA を精製する働きを持つ。100 mg の菌体が入った各マイクロチューブに 500 μ l の抽出バッファー (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM EDTA)、100 μ l の 10% SDS、および 300 μ l の塩化ベンジルを加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に細胞を懸濁した後、Bio Shaker M・BR-022 (タイテック株式会社) を用いて 50°C で 30 分間、攪拌しながら反応させた。さらに 300 μ l の 3 M NaOAc pH 5.0 を加え、氷上で 15 分間静置して冷却した。その後、6,000 \times g、4°C で 15 分間遠心分離して得られた上

清を新たなマイクロチューブに移し、イソプロパノール沈殿を行った。この沈殿物を 800 μ l の滅菌精製水に溶解し、15 μ l の RNase A を加え、37°C で 3 時間反応させた。これに続くクロロホルムまたはイソプロパノールを用いた DNA 精製、および DNA 溶液の作製の各ステップは、上述の SDS 法と同様の条件で行った。

Gen とるくんを用いた DNA 抽出については、添付の説明書に記された方法に若干の変更を加え行った。solution A と B には細胞溶解酵素が含まれる。溶解反応後に加えられる Solution C による塩析で、蛋白質や多糖類など核酸以外の細胞構成成分は取り除かれる。得られた細胞溶解液についてイソプロパノール沈殿によって DNA を沈殿させた後、最終的に TE バッファーにて DNA を溶解させるより前に、キットの使用のみでは除去が不十分であった RNA を分解するため RNase を作用させるステップを加えた。DNA 沈殿物を 800 μ l の滅菌水に溶解し、ここに 15 μ l の RNase A を加えて 37°C で 3 時間反応させた。これに続くクロロホルムまたはイソプロパノールによる DNA 精製、および DNA 溶液の作製の各ステップは、上述の SDS 法と同様の条件で行った。

DNeasy Plant Tissue Kit を用いた DNA

抽出については、添付の説明書に従って行った。API バッファーに含まれる酵素による細胞溶解液は、シリカメンブレンカラムによって精製される。シリカメンブレンは DNA と選択的に結合し、その他の細胞挟雑物を透過する。さらに洗浄バッファーによってメンブレンを洗浄することによって、細胞挟雑物や残留酵素などの不純成分を取り除く。最終的に 200 μ l の溶解バッファーによって DNA はメンブレンから溶出する。

全 10 プロトコルによる DNA 抽出実験は、同一菌株から作成された検体を用いて 3 回繰り返し行われた。

4. DNA の収量と精製度の評価方法

抽出された DNA については、NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, U.S.A.)を用いて濃度を測定した。また、精製度は測定した OD230 nm、OD260 nm、および OD280 nm の波長から算出することによって評価した。OD260 nm/OD230 nm または OD260 nm/OD280 nm から、多糖類含量に対する DNA 含量または蛋白質含量に対する DNA 含量が得られる。さらに、DNA 精製度が分子生物学的実験における使用に十分であることを確認するため、本研究で得られた全ての DNA 溶液を鋳型とし

て PCR を行った。PCR プライマーとして、全ての酵母と子囊菌に属するカビに対してはフォワードプライマー FF1 (5'-GTT AAA AAG CTC GTA GTT GAA C -3') とリバースプライマー FR1 (5'-CTC TCA ATC TGT CAA TCC TTA TT-3') を用い、接合菌に属するカビに対してはフォワードプライマー P1 (5'-ATC TGG TTG ATC CTG CCA-3') とリバースプライマー Fun-R1 (5'-TTG TTA CGA CTT TTA CTT CCT CT-3') を用いた。これらのプライマーは過去の研究において 18SrRNA 遺伝子のうちそれぞれ別個の部分配列を増幅するためにデザインされ、P1/Fun-R1 は 1730 bp (14)、FF1/FR1 は 630 bp (*B. fulva* のみこれよりも長い塩基配列を持つ PCR 産物が得られた。18SrRNA 遺伝子中に挿入配列があると考えられる) (15) の断片を増幅する。18SrRNA は遺伝子塩基配列に基づいた分子分類学的研究に広く用いられる遺伝子の一つである。PCR 反応試薬としては TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社) を用いた。反応液の組成は添付の説明書に従い、1 反応あたり 10 \times PCR Buffer 5 μ l、2 mM dNTP mixture 4 ml、15 μ M フォワードプライマー溶液 1 μ l、15 μ M リバースプライマー溶液 1 μ l、Ex Taq 0.25 μ l、100 ng/ μ l DNA 溶液 4 μ l とし、さらに全量

50 μ l となるように滅菌精製水を加えた。PCR 反応はサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Fostercity, U.S.A) を用いて行った。PCR の反応条件は、95°C・3分間で熱変性させた後、95°C・1分間、52°C・1分間、72°C・2分間を1サイクルとした 33 サイクルの反応を行い、この後に 72°C・5分間の伸長反応を行った。PCR 増幅産物は 1.5% (wt/vol) アガロースゲル (Agarose L03 "Takara", タカラバイオ株式会社) と Tris-Borate-EDTA バッファー (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA・2Na) を用いたアガロースゲル電気泳動によって分離した後エチレンブロマイドで染色し、紫外線下で DNA 増幅バンドの有無を確認した。

C. 結果

10 通りの抽出プロトコルのいずれかを用いて菌体 100 mg から抽出した DNA 量を菌株 1g あたりから得られた DNA 収量に換算し、3回の繰返し抽出実験で得られた値の幅として Table 2 に示した。最低値は 2.6 μ g/g、最高値は 5717.5 μ g/g となり、液体培養で得られたほぼ菌糸体のみで構成された検体からでも全ての菌種からの DNA 抽出は可能であることが示された。3回の繰

返し実験で得られた値の種ごとの平均値を Fig. 19 から 21 に示した。また、SDS 法、CTAB 法、塩化ベンジル法のいずれか (SDS/CTAB/塩化ベンジル法) を用いた DNA 抽出では、3回の繰返し実験の平均値を Gen とるくんまたは DNeasy Plant Tissue Kit (Gen とるくん/Plant Kit) と比較すると、ほぼ全ての種において前者 3 方法の抽出効率は高い傾向が見られた。

そこで、10 プロトコルいずれかを用いた DNA 収量について、種ごとに全ての 2 プロトコルの組み合わせを抽出し有意差検定を行ったところ、以下のよう結果が得られた。接合菌に属するカビでは、SDS/CTAB/塩化ベンジル法のほとんどは、Gen とるくん/Plant kit と比較して有意に抽出効率が高かった。子囊菌に属するカビでは、*A. niger* 以外の種において、SDS/CTAB/塩化ベンジル法の多くは、Gen とるくん/Plant kit と比較して有意に抽出効率が高かった。種ごとに詳細に見てみると、*F. subglutinans* と *P. expansum* では SDS 法のみが Gen とるくん/Plant Kit と比較して抽出効率が有意に高い、また *B. cinerea* と *T. viride* では SDS 法および CTAB 法のみが Gen とるくん/Plant Kit と比較して抽出効率が有意に高いといった特徴が見られた。*A. niger* において

のみ、全てのプロトコルの間に抽出効率の有意差は生じなかった。酵母では、SDS/CTAB/塩化ベンジル法のいくつかは、Gen とるくん/ Plant Kit と比較して有意に抽出効率が高かった。種ごとに詳細に見てみると、*C. neoformans* では CTAB 法および塩化ベンジル法のみが DNeasy Plant Tissue Kit と比較して抽出効率が有意に高いということ、*S. cerevisiae* では SDS 法のみが Gen とるくん/ Plant Kit と比較して抽出効率が有意に高いということ、*R. rubra* では CTAB 法のみが DNeasy Plant Tissue Kit と比較して抽出効率が有意に高いという特徴が見られた。

さらに、SDS/CTAB/塩化ベンジル法のうちのいずれかとビーズ破碎の有無を組み合わせた合計6通りのプロトコルの間で行った有意差検定の結果を種ごとに解析した。その結果、ある1つのプロトコルを用いた場合に他の5プロトコルと比較して有意に高い抽出効率を得られた種の割合は、SDS 法とビーズ破碎の併用法では全 17 種中 11 種；64.7%、SDS 法ビーズ破碎無しでは全 17 種中 5 種；29.4%、CTAB 法とビーズ破碎の併用法では全 17 種中 6 種；35.3%、CTAB 法ビーズ破碎無しでは全 17 種中 3 種；17.6%、塩化ベンゼン法とビーズ破碎の併用法では全 17 種中 4

種；23.5%、塩化ベンゼン法ビーズ破碎無しでは全 17 種中 1 種；5.9%となり、SDS 法とビーズ破碎の併用法が最も多くの種に対して効率良く DNA を抽出できるプロトコルであることが明らかとなった。よって、幅広い種の真菌に対して効率よく DNA が抽出できる可能性が最も高いプロトコルは、SDS 法とビーズ破碎の併用法であることが示唆された。

また、いずれのプロトコルを用いた場合に高い抽出効率を得られる傾向にあるのかということ进行分类ごとに詳細に明らかにするために、17 菌種を酵母・子囊菌に属するカビ・接合菌に属するカビの3群に分け、SDS/CTAB/塩化ベンジル法のうちのいずれかとビーズ破碎の有無を組み合わせた合計6通りのプロトコルについて、3回の繰返し実験によって得られた値の平均値を比較した (Fig. 19-21)。酵母では、*S. cerevisiae* から高い DNA 抽出効率を得られ、これと比較して *R. rubra* からは低い抽出効率しか得られない傾向が見られたが、*R. rubra* で3回の繰返し実験の平均値を比較すると、塩化ベンジル法とビーズ破碎を併用した場合に抽出効率上昇が見られた。*S. cerevisiae* および *C. neoformans* では SDS 法および CTAB 法を用いた場合に比較的高い抽出効率

が得られた (Table 2, Fig. 19)。子囊菌に属するカビでは、全体的にばらつきは大きいものの、SDS 法ビーズとビーズ破碎の併用法においてのみ、全ての菌種において DNA 収量平均値が菌体 1 g あたり 1000 μg を上回っていることが確認され、本方法を使用すれば、ほぼ菌糸体のみから構成される検体からでも安定して高い抽出効率が得られることが示唆された (Table 2, Fig. 20)。 *R. stonifer* を除く接合菌類に属するカビでは、ビーズ破碎の有無にかかわらず、SDS 法または CTAB 法を使用した場合に塩化ベンジル法と比較して有意に高い抽出効率が得られた (Table 2, Fig. 21)。 *R. stonifer* では、いずれの方法を用いても平均して菌体 1 g あたり 1000 μg 以上の DNA は得られず、抽出効率は他の接合菌類と比較して著しく低かったが、CTAB 法とビーズ破碎の併用法を用いた場合に、SDS 法または塩化ベンジル法とビーズ破碎の併用法を用いた場合よりも比較的高い DNA 抽出効率が得られる傾向が見られた (Table 2, Fig. 21)。

また、得られた DNA 抽出物の精製度を確認するために、分光高度計を用いて測定した波長 230 nm、260 nm および 280 nm の吸光度から 260 nm/230 nm と 260 nm/280 nm の比率を算出し、菌

種ごとおよびプロトコルごとに3回の繰返し実験で得られた比率の間で平均値を算出した。SDS/CTAB/塩化ベンジル法によって得られた抽出産物の精製度に着目すると、260 nm/230 nm について十分な精製度が得られている目安とされる 1.0 より低いものは、平均値全 170 のうち 1 (0.6%)、260 nm/280 nm について目安とされる 1.8 より低いものは全 170 のうち 10 (5.9%) であった (詳細略)。これによって、全体として良い精製度の産物が得られていたということが示された。

さらに DNA 抽出物の精製度を確認するために、得られた全ての DNA 抽出物を鋳型として PCR を行った (Fig. 22-27)。3回の繰返し実験のうち、増幅産物が得られた DNA 抽出物数を菌種ごとに集計した。 *E. nidulans*、 *A. corymbifera*、および *S. racemosum* 以外の全ての菌株・プロトコルから得られた DNA 抽出物について、これらを鋳型にした PCR によって遺伝子増幅が確認された。上記3種に関しては、遺伝子増幅が確認されなかった DNA 抽出物を含み、その検体数は各菌種 18 検体ずつにおいて、 *E. nidulans* で 4 検体 (Fig. 24)、 *A. corymbifera* で 8 検体 (Fig. 26)、 *S. racemosum* (Fig. 27) で 7 検体であった。