

200939028A

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

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

平成22（2010）年3月

## 目 次

### 総括研究報告書

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究 .....	1
工藤 由起子	

### 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	
工藤 由起子	

#### 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 .....	13
---------------------------	----

#### 協力研究報告書

最確数法による果実汚染真菌の定量方法 .....	59
--------------------------	----

真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究 .....	77
後藤 慶一	

細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究	
大西 貴弘	

#### 協力研究報告書

細菌の清涼飲料水の汚染に関する研究 .....	125
-------------------------	-----

#### 協力研究報告書

リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌の迅速検出法に関する研究 .....	193
---------------------------------------	-----

### 委託研究報告書

清涼飲料水からの真菌の基本的な形態及び同定に関する簡易マニュアル .....	203
高鳥 浩介	

# 総括研究報告書

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

工藤 由起子

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金(食の安心・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

総括研究報告書

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)  
研究分担者 後藤 慶一(三井農林株式会社 食品総合研究所)  
大西 貴弘(国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

研究協力者 杉山 寛治、神田 隆(静岡県環境衛生化学研究所)  
金澤 裕司(静岡市環境保健研究所)  
小澤 一弘(株式会社 中部衛生検査センター)  
増田 修一(静岡県立大学 食品栄養科学部 食品生命科学科)  
堤 史行、小沼 博隆 (東海大学海洋学部)  
小林 和子(瀬戸谷幼稚園)  
岩田 修二、徳田 一、池本 尚人(NPO 法人 ILSI Japan 食品微生物部会)  
高鳥 浩介(NPO 法人 カビ相談センター)  
渡辺 麻衣子(国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

研究要旨

現代では多様な種類の清涼飲料水が製造販売されており、それらの原料や製品の製造・保管方法、消費のされ方も多様である。このため、清涼飲料水に関する諸問題を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるために研究を行った。

(1)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

①果汁飲料の汚染カビのひとつで形態学的同定が困難である *Fusarium* 属菌の同定遺伝子指標を検討した結果、 $\beta$  チューブリン遺伝子が比較的適していた。

②真菌数の定量方法について、最確数(MPN)法を改変し寒天平板培地に塗抹する平板 MPN 法が、簡便で迅速な優れた方法であることが明らかになった。

(2)真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法、および(3)細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法

①清涼飲料水の微生物を原因とした苦情の現象を検証するために、開封のみまたは口飲みした 16 種類の清涼飲料水を静置し、飲料中での微生物の発育を解析した。開封試験では約 2 割の検体で主にカビ、口飲み試験では約 5 割で主に細菌が発育した。分離株を遺伝子工学的手法、形態観察などを併用して同定した。口飲みでは人の常在細菌である *Candida*、*Staphylococcus* など、開封では *Cladosporium* などカビが多く検出された。細菌は pH が高い飲料ほど生育良い傾向だが、カビはあらゆる飲料種で生育した。昨年苦情事例では原因微生物の約 8 割がカビであったことから、口飲みよりも開封による微生物の汚染が苦情の原因ではないかと考えられる。

②迅速に微生物量を測定するリムルス試験を清涼飲料水の細菌汚染検出に応用を試み、多くの飲料種では検体の 100 倍希釈によって阻害がなく測定できた。

## A. 研究目的

現代の生活にはペットボトルや紙容器などの多様な形態で、かつミネラルウォーター、炭酸飲料、果汁飲料など多様な清涼飲料水が製造販売されており、それらの原料や製品の製造・保管方法、加えて消費のされ方も多様である。このため、清涼飲料水に関する諸問題を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるための要点について検討し、情報を提示する事を目的とする。

平成 20 年度に地方自治体ならびに製造業者から苦情や事故に関する情報の収集を行い、その多くは開封後の事例であることが明らかになった。このため、開封および口飲みによる清涼飲料水の微生物汚染、その後の室温での長期間の保管時の微生物の増殖、汚染および増殖する微生物の種類や清涼飲料水の組み合わせなどについて実験的な情報収集と解析が必要と考えられる。

また、清涼飲料水の汚染微生物の迅速な同定によって危害の重篤性が判断でき適切な危害対応を可能にするために必要である。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。しかし形態学的手法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。また対象菌株が死滅している場合は培養が不可能である。このため近年、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、分子生物学的手法が取り入れられつつある。

さらに、真菌の食品汚染は、食品の保存性を損なわせる大きな要因のひとつであり、真菌数は品質の良さの目安となり、真菌の生育に適した保存条件では真菌の汚染量が多いほど真菌の発生性が高くまた保存期間が短くなることが考えられる。このため、汚染真菌量をできるだけ迅速に正確に測定する方法や、汚染真菌数の低い食品の製造の評価に用いる

真菌数のより正確な測定方法が必要である。加えて、細菌についても汚染を把握するための迅速な検出方法が検討する必要がある。

今年度は、[1] 汚染微生物のひとつであるカビを同定するための遺伝子指標を検討、[2]最確数法を応用した真菌の定量方法を検討、[3]真菌および [4] 細菌について開封のみおよび口飲みでの清涼飲料水中の汚染とその挙動を解析、[5]リムルス試験を応用した細菌の迅速検出の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 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

カビの一種である *Fusarium* 属菌から幅広く網羅的に種を選択して供試するため、*Fusarium* 属菌の 12 section から1~6菌種、合計 23 菌種 46 菌株を供試した。25°Cで 70 時間静置培養し菌体を SDS 法による DNA 抽出を行った。解析対象遺伝子として、18S rDNA、ITS1 領域、5.8S rDNA、26/28S rDNA D1/D2 領域および  $\beta$  チューブリン遺伝子を選択した。PCR および遺伝子塩基配列決定方法としては、PCR 反応には TaKaRa *Ex Taq* を用いた。18S rDNA、ITS1 領域、5.8S rDNA および 26/28S rDNA D1/D2 領域には過去の研究から引用したプライマーを用い、 $\beta$  チューブリン遺伝子には本研究において設計したプライマーを用いた。得られた PCR 増幅産物を用いてそれらの塩基配列決定を行った。得られた塩基配列を編集し、それぞれ 494 塩基、187 塩基、159 塩基、820 塩基または 651 塩基の配列を得た。遺伝子塩基配列の解析方法として、Mega ver. 4.1 ソフトウェアを用いてマルチプルアライメントおよび近隣結合法 (NJ 法) による系統解析を行い、系統樹の推定、全枝長の算出および同一種内・異種間での塩基配列相同率の算出を行っ

た。

## 2. 最確数法による果実汚染真菌の定量方法

国内産果実9種類を供試し、真菌の汚染が果実表面であることから各果実の表皮を検体とした。Chloramphenicol 添加 Potato dextrose broth (PDB)を加えて検体乳剤を作製し $10^{-6}$ まで希釈検体を作製した。塗抹培養法、平板 MPN 法および MPN 法の3種の方法にて真菌数の測定を行った。塗抹培養法では、検体乳剤および希釈検体を各5枚の Chloramphenicol 添加 potato dextrose agar (PDA)に0.1 ml ずつ塗抹した。平板 MPN 法では、検体乳剤および各段階の希釈検体を各3枚の PDA に1ml ずつ塗抹した。MPN 法では、滅菌試験管に検体乳剤および PDB を加えた。いずれも、25°C培養し2、4、7 および10 日目に真菌の生育を確認した。塗抹培養法ではコロニー数を計測し、MPN 法ではカビの菌体の浮遊や培地の濁りを確認できたものを、平板 MPN 法ではコロニーの形成を陽性とし、MPN 表を用いて MPN 値を算出した。一元配置分散分析にて有意差のあった果物および方法ごとの真菌数定量値の組合わせを Bonferroni-Dunn 検定にて解析した。

## 3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

初年度のアンケート結果ならびに文献検索情報により苦情や事例の多かった清涼飲料水16種類:緑茶飲料、烏龍茶飲料、混合茶飲料、紅茶飲料、果汁飲料(20%オレンジ)、果汁飲料(20%アップル)、野菜飲料、炭酸飲料(コーラ)、炭酸飲料(サイダー)、炭酸飲料(果汁入り)、スポーツドリンク(果汁入り)、スポーツドリンク(無果汁)、ミルク入りコーヒー飲料、ミルク入り紅茶、ニアウォーター、ミネラルウォーターを1セットとし協力機関に配布した。口飲みおよび開封試験を行った。口飲み試験では、口をつけて約半量を9~

17時の間に複数回に分けて飲み、25°Cで14日間培養した。開封試験は適当な場所で開栓し、半分を廃棄後、キャップを軽く閉め、25°Cで14日間培養した。菌数の測定については分担研究者:大西貴弘の報告書に記載した。分離株の遺伝子工学的手法による同定を、細菌は16S rDNA の Top500、真菌は26/28S rDNA の D2 領域に基づいて行った。シーケンス反後、塩基配列を決定した。各種データベースを利用して相同性解析を行った。また、真菌の同定では、形態観察(巨大集落の性状およびプレパラート標本の顕微鏡像)、生化学的性状試験も行った。細菌では相同値が99.0%に満たない場合は属名表記とし、真菌で属の推定も困難なものは最も適当と考えられる高次分類群(科、目および綱)で表記した。さらに、*Bacillus cereus* および *Staphylococcus aureus* の毒素遺伝子または産生性試験を行った。

## 4. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

分担研究者:後藤慶一の方法によって培養が行われた検体について菌数の測定を経時的に行った。検体および希釈検体を、標準寒天培地(一般生菌検出)、クロラムフェニコール加 PDA 培地(真菌検出)、XM-G 寒天培地(大腸菌群検出)に塗抹し培養した。また、カビの浮遊物が見られる場合、それを白金耳などで引っかけて分離・純化した。

## 5. リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌の迅速検出法に関する研究

緑茶飲料、烏龍茶飲料、紅茶飲料、麦茶飲料、コーヒー飲料、炭酸飲料、スポーツ飲料、野菜飲料、果汁飲料を試験に用いた。エンドトキシンの測定にはエンドスペシーを用いた。エンドトキシン標準品で検量線を作成した。各飲料を注射用水を用いて10倍段階希釈を行い、最終0.25 EU/mlになるように

エンドトキシン標準品を加えたもの(以下、エンドトキシン添加サンプル)を作成した。これらのサンプルを用いてリムルス試験を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 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

18S rDNA、ITS1 領域、5.8S rDNA、26/28S rDNA D1/D2 領域およびβチューブリン遺伝子の塩基配列を解析した結果、18S rDNA では、全枝長は 0.0490、塩基配列相同率は同一種内では 0.000~0.008、異種間では 0.000~0.039 で、遺伝的距離は小さい傾向にあり、異種であっても塩基配列が 100%一致する種も多く存在した。ITS1 領域では、全枝長は 1.2126、塩基配列相同率は同一種内では 0.000~0.019、異種間では 0.000~0.324 で、異種間の遺伝的距離は大きい傾向にあるが、異種であっても塩基配列が 100%一致する種も存在した。5.8S rDNA では、全枝長は 0.1070、塩基配列相同率は同一種内では 0.000~0.019、異種間では 0.000~0.063 で、遺伝的距離は全体的に小さい傾向にあり、異種であっても塩基配列が 100%一致する種も多く存在した。26/28S rDNA D1/D2 領域では、全枝長は 0.2048、塩基配列相同率は同一種内では 0.000~0.011、異種間では 0.000~0.089 で、遺伝的距離は今回解析した5遺伝子中で中程度に大きい、異種であっても塩基配列が 100%一致する種も存在した。βチューブリン遺伝子では、全枝長は 0.7987、塩基配列相同率は同一種内では 0.000~0.073、異種間では 0.005~0.145 で、遺伝的距離は大きい傾向にあり、また異種であっても塩基配列が 100%一致する種はなく、*Fusarium* 属菌の種の違いを識別するのに適した遺伝子であるこ

とが示された。

#### 2. 最確数法による果実汚染真菌の定量方法

全検体より真菌を検出した。塗抹培養法、平板 MPN 法および MPN 法における培養 10 日目での真菌数定量値を比較したところ、イチゴ以外の全検体で MPN 法が塗抹培養法および平板 MPN 法よりも平均値が低かった(表 2)。このうちメロンでは MPN 法が塗抹培養法および平板 MPN 法よりも有意に低い定量値であった(MPN 法 vs 塗抹培養法では  $p < 0.01$ 、MPN 法 vs 平板 MPN 法では  $p < 0.05$ )。しかし、イチゴでは MPN 法が塗抹培養法および平板 MPN 法よりも平均値が高かった。

#### 3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

8月から12月にわたり、総計714株の分離株を得た。分離された菌株を復元しグループ分けし399株(細菌238株、カビ76株、酵母85株)を解析対象とした。細菌および酵母は口飲み試験由来株が9割以上を占めた。開封試験では、*Bjerkandera adusta* および *Cladosporium cladosporioides* の2種、口飲み試験では *Candida albicans*、*Streptococcus salivarius*、*Staphylococcus aureus* が多く分離された菌種の上位にあった。*B. cereus* の一株は嘔吐毒素非生産性・下痢型毒素 NHE 生産株、*S. aureus* の5株が B 型、2株が C 型のエンテロトキシンを生産性であった。総合すると、口飲み試験では微生物が約5割の検体から分離され、その微生物の種類は約7割で細菌、約1割でカビ、約4割で酵母が分離された。また開封試験では微生物が約2割の検体から分離され、その微生物の種類は約2割で細菌、約8割でカビ、約1割で酵母が分離された。

#### 4. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

目視観察では、濁り、浮遊物に関しては茶

系飲料、炭酸飲料(果汁入り)、スポーツドリンク(果汁入り)で多く観察された。沈殿は茶系飲料、果汁飲料、スポーツドリンク(果汁入り)、炭酸飲料、ミルク入り飲料で多く見られた。分離はミルク入り飲料と野菜飲料で見られた。目視によるカビの観察は主に茶系飲料で見られた。ガス産生は主に野菜飲料で観察された。飲料種ごとに菌増殖の陽性率は、口飲み試験では緑茶、烏龍茶、紅茶などの茶系飲料、野菜飲料、ミルク入りコーヒ飲料、ミルク入り紅茶、ミネラルウォーターで高い陽性率が見られた。一方、果汁飲料、炭酸飲料、ニアウォーターでは陽性率は低めであった。開封試験では茶系飲料やスポーツドリンク(果汁入り)で高い陽性率が見られた。しかし、口飲み試験において高い陽性率を示したミルク入りコーヒ飲料、ミルク入り紅茶の陽性率は低かった。

#### 5. リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌の迅速検出法に関する研究

今回は9種類の飲料から各1銘柄ずつ選び、これらの飲料がリムルス反応に干渉するかどうか調べた。ほとんどの飲料で10から100倍希釈を行うことによって飲料によるリムルス反応への干渉を取り除くことができた。しかし、野菜飲料のように10,000倍希釈を行わなければ測定できない飲料種も存在した。

#### D. 考察

##### 1. 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

それぞれの遺伝子について *Fusarium* 属菌の同定の場における同定指標としての評価を行った。全枝長が比較的短かったのは18S rDNA および 5.8S rDNA、比較的長かったのは ITS1 領域および  $\beta$  チューブリン遺伝子であった。塩基配列相同率について、異種間で100%一致する種が存在しないのは

$\beta$  チューブリン遺伝子のみであった。これらの結果から、18S rDNA または 5.8S rDNA 塩基配列を指標とする場合は、菌種間の塩基配列は差異に乏しく、同定は多くの場合で困難であることが示された。また、ITS1 領域塩基配列を指標とする場合は、5つの遺伝子のうちで最も全枝長が長く遺伝子塩基配列相同性が低い、異種であっても塩基配列が100%一致する種も存在することが示され、確実に一つの種として同定を行うには不向きであるということが明らかとなった。今回解析に用いた遺伝子のうちでは *Fusarium* 属菌の同定に最も適しているということが示されたが、同定できないケースもあると考えられる。今後、新たな候補遺伝子を用い、さらに検討する予定である。また、*Fusarium* 属菌以外でも、清涼飲料水からの検出頻度が高い *Penicillium* および *Cladosporium* 属菌など形態学的指標のみでは同定が困難な真菌について、遺伝子塩基配列を指標とした同定方法についても検討したい。

##### 2. 最確数法による果実汚染真菌の定量方法

塗抹培養法、平板 MPN 法および MPN 法における培養10日目での真菌数定量値では、イチゴ以外の全検体で MPN 法が塗抹培養法および平板 MPN 法よりも平均値が低かった。これは、PDB 中で増殖した菌種中に寒天培地上よりも液体培地中で増殖に優れる菌が存在し、それらが発育したことが原因として考えられた。また、全検体において塗抹培養法と平板 MPN 法の定量値に大きな差はなかった。また、いずれの培養日数でも塗抹培養法および平板 MPN 法の定量値は、ほぼ同じ程度であった。平板 MPN 法では、寒天平板培地上の真菌の発育が確認された培地数から MPN 表を用いて定量値を算出する。このため MPN 法という統計学的手法によってより科学的な定量値が得られた。塗抹培



養法では寒天平板培地上のコロニー数の測定に時間を要するが、平板 MPN 法では寒天平板培地を観察する時間が短く、定量操作として簡便であった。また、塗抹培養法および平板 MPN 法では、生育が確認されたコロニーは小さいため菌種の推察や決定は難しかったが、真菌の測定が行えた後も引き続き培養することで菌種の同定が行えると考えられた。

### 3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

口飲み試験では細菌と酵母が大多数を占めた。高頻度に検出された *Streptococcus* は口腔常在菌で、*Candida* や *Staphylococcus* はヒト常在菌としてよく知られている。*Enterobacter* をはじめとする大腸菌群、*Kocuria* や *Micrococcus* もヒトの常在菌である。ヒトからよく分離される微生物が口飲み試験で高頻度に検出されることから、主たる口飲みにおける微生物腐敗は、口あるいはその周辺に常在する微生物が清涼飲料水中に混入して発生すると考えられた。開封試験に比べて検出される菌種は纏まるものの、一度しか検出されない菌種も少なくなく、常在菌に混じって偶然居合わせた微生物が混入して微生物腐敗を起こす可能性も相応にあることが示唆された。開封試験ではカビが分離株の約8割を占めた。これは、環境中に漂っているカビの胞子が開封時に混入する確率が細菌や酵母が混入する確率よりも高いことが示唆される。よく検出された微生物のうち、*Cladosporium* と *Penicillium* は住環境によく見られるカビであるが、*Bjerkandera* や *Trametes* についてはいずれも木材腐朽菌として知られている。

遺伝子に基づく同定では正誤はともかくとして何らかの結果が得られるのに対し、形態観察を行った真菌株の約半数は特徴的な形

質が観察されない、あるいは文献や適切な標本がないなどの理由で同定が困難であった。一方で、今回用いた遺伝子指標では菌種を絞り込めなかった菌株において、より正確に同定することが可能な菌種もあった。pH と分離株数は明瞭な相関を示した。細菌については、pH の上昇に伴い、直線的に分離株数も上昇した。一方、真菌は、カビ、酵母の区分に関わらず、pH5 付近に分布した。果汁飲料、野菜飲料、炭酸飲料およびスポーツドリンクでは主に *Candida* (酵母) が、次いで *Staphylococcus* がランキングした。それ以外の飲料(野菜飲料とニアウォーターを除く)では *Streptococcus* と *Staphylococcus* が高頻度に検出された。特徴的なのは、茶系飲料では大腸菌群がランキングしているのに対し、他の清涼飲料水では低頻度となっていることである(ミルク入り飲料では比較的少ない)。栄養源あるいは混在微生物との何らかの関係があると推察される。

*S. aureus* や *B. cereus* といった食中毒を引き起こす菌種が検出され、一部の菌株が毒素を生産することが明らかとなった。飲料業界や消費者に対して飲用方法を啓発していくことは食中毒予防のためにも重要なことである。

### 4. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

茶系飲料において濁り、浮遊物、カビが多く観察されたのは飲料が透明のため発見が容易であったためであろうと思われる。そのため他の飲料でも同様の変化が生じている可能性はある。ミルク入り飲料で分離の現象が高率に発生しているが、微生物によるタンパク分解によるものと考えられる。ガス産生は野菜飲料で他の飲料と比べて高濃度のタンパク質、糖分や繊維質などが含まれ、これらからガスを産生する微生物が発育した可能性

が考えられる。

微生物の良好な発育は飲用の翌日でも見られるため、消費者に開封後の保存の注意を呼びかける必要があると思われる。また、開封だけでも微生物汚染が発生することも消費者に啓発する必要があると思われる。口飲みすることによって細菌の分離数が高くなるのは、おそらく口腔内細菌が分離されるためであると思われる。一方、開封試験で真菌の陽性率が高くなるのは環境中の真菌が高率に分離されたためと考えられる。

昨年度、本研究班では『清涼飲料水における微生物を原因とする苦情の調査』を行い、全国の地方自治体や製造業団体から清涼飲料水における微生物を原因とした苦情事例についての情報を収集した。その結果、飲料の開封後の苦情事例では自治体からの情報では約 9 割、製造業団体からの情報でも約 7 割がカビであった。今年度の研究では、口飲みでは、微生物が分離された検体のうち細菌が約 7 割、カビが約 1 割、酵母が約 4 割であったが、開封試験では細菌が約 1 割、カビが約 8 割、酵母が約 1 割を占めた。このことから、昨年度の調査における苦情事例には直接口飲みはせずに、コップなどに注いで飲用した事例が多く含まれているのではないかと考えられる。開封しただけでも飲料水の容器内に環境からの微生物、特にカビが混入することについて消費者への情報提供によって広く認識されることが必要と考えられる。

昨年度の調査で開封後の苦情があった清涼飲料水は果汁飲料と茶系飲料が全体の約 7 割を占めていた。しかし、今回の研究では果汁飲料の陽性率は他の飲料と比較して非常に低くなった。昨年度の調査と今回の結果との間でこのような違いが生じた原因の一つとして、果汁飲料は紙パックでの販売が多

いためではないかと思われる。社団法人全国清涼飲料工業会の統計によれば、果汁飲料の容器別生産割合は紙パックが 35.2%と PET ボトルの 41.1%に次いで多い。緑茶飲料では PET ボトルの 85.4%に対して紙パックは 2.9%にすぎない。そのため、昨年度の調査では紙パック入り果汁飲料の苦情事例数は紙パック入り茶系飲料の約 5 倍と多くなっている。紙パックでは中身が見えないため微生物がかなり増殖してからでない気づかないことが多く、特に大容量の紙パックでは飲み切るまでに数日間を要する場合があるため、その間に微生物が増殖しやすくなると思われる。今年度の口飲み・開封試験の結果から果汁飲料中での微生物の発育は他の飲料と比較して良くないが、開封後長期間保管する傾向のある紙パック入り製品の割合が多い果汁飲料は、開封後すぐに飲みきってしまう他の飲料に比べて苦情として報告され易くなるのではないかと考えられる。反対に今年度の試験のようにすべての飲料間で条件を揃えた場合、pH が低く微生物の発育しにくい果汁飲料は他の飲料と比較して陽性率が低くなってしまふものと思われる。

#### 5. リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌の迅速検出法に関する研究

多くの飲料種で 10 から 100 倍希釈を行うことによって反応干渉因子の影響を取り除くことができ、リムルス反応を測定することができた。リムルス試験によるエンドトキシンの検出限界はおおよそ 1 pg/ml であるため、この程度の希釈倍率ならば十分細菌汚染を検出できるものと考えられる。しかし、野菜飲料、果汁飲料、紅茶飲料については干渉因子の影響を取り除く方法を考える必要性が認められた。

#### E. 結論

### 1. 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

形態学的同定が困難であることが知られる *Fusarium* 属菌について、適切に同定できる遺伝子指標を特定することを目的として、23 菌種 46 菌株を用い、複数遺伝子の塩基配列を決定し、それらの系統解析を行った。解析の対象遺伝子として、18S rDNA、ITS1 領域、5.8S rDNA、26/28S rDNA D1/D2 領域および  $\beta$  チュープリン遺伝子選択し、得られた塩基配列を各遺伝子に分け、近隣結合法による系統解析を行った。解析結果を比較したところ、*Fusarium* 属菌同定のための指標としては  $\beta$  チュープリン遺伝子が比較的適しているということが明らかとなった。

### 2. 最確数法による果実汚染真菌の定量方法

本研究の結果から、平板 MPN 法は4日間の培養によって統計学的な数値として高い定量値が得られ、また定量操作が簡便であることから、優れた迅速な真菌定量方法であることが明らかになった。

### 3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

口飲み試験ではヒトに常在する *Candida*、*Staphylococcus* および *Streptococcus* が約4割で、残りは多様な菌種であった。開封試験ではカビが約8割であった。主要菌種以外の菌種についてはヒトの常在菌でない菌種が多く、偶然混入したものと考えられた。pH4未満の酸性飲料では *Staphylococcus* がよく分離された。pHが中性に近づくにつれて細菌の分離株数は増加したが、真菌では pH5 付近で最も分離頻度は高かった。それぞれの微生物の生育 pH 域を鑑みれば、この傾向は妥当な結果であった。今後、腐敗微生物が混入した際のリスク(腐敗までの日数、保存条件、健康被害など)について更なる追加調査を行い、その事実に基づいた飲料業界

や消費者へ提言が期待される。

### 4. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

(1) 口飲みを行うとコップに注いでから飲用する場合よりも、微生物に汚染する可能性が高くなった。(2) 飲用の翌日でも微生物は高率に発育した。(3) 口飲み試験では主に細菌が、開封試験では主に真菌が原因微生物となった。(4) 細菌の発育は飲料の Brix より pH に大きく影響を受けた。(5) 真菌の発育は飲料の pH、Brix にあまり影響を受けず、広範な飲料に適応できる可能性が示唆された。(6) ミネラルウォーターは細菌の発育は良好であったが、目視変化に乏しかった。

今後、これらの結果を元にして消費者への注意の喚起を行う必要があると思われる。また、微生物の清涼飲料水中の動態をさらに詳しく解析するために、今後接種試験を行いたい。

### 5. リムルス試験を用いた清涼飲料水中の細菌の迅速検出法に関する研究

今回の結果から多くの飲料種で10倍から100倍希釈することにより、飲料中の反応干渉因子を取り除くことができ、リムルス反応を測定することができた。リムルス試験によるエンドキシンの検出限界は約1 pg/mlなので、この程度のサンプルの希釈なら細菌汚染を検出するのに十分な感度を維持できると思われる。次年度ではさらに多くの銘柄の試験を行いデータを実証させると共に、エンドキシン量と菌数との相関の検討を行い、最終的に生菌を用いた添加回収試験を行う予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Watanabe, M., Tsutsumi, F., Lee, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori,

- K., Hara-Kudo, Y. and Konuma, H. Enumeration methods for fungal contaminants in fruits by the most probable number method. 投稿中.
- Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y. Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. J. Food Prot. 印刷中.
- 小沼ルミ、渡辺麻衣子、工藤由起子、小西良子、高鳥浩介、一戸正勝. 炭素源資化性分析を用いた環境汚染糸状菌の同定および同定精度の向上. 防菌防黴. 印刷中.
- Watanabe, M., Masaki, H., Mori, T., Tutiya, T., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., and Takatori, K. Inactivation effects on yeasts and molds in mineral water by UV irradiation and ozone treatment. J. Food Prot. 印刷中.
- Iibuchi, R., Hara-Kudo, Y., Hasegawa, A. and Kumagai, S. Survival of Salmonella on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. J. Food Prot. 印刷中.
- 小沼ルミ、渡辺麻衣子、工藤由起子、小西良子、瓦田研介、高鳥浩介. 糸状菌の流動パラフィン重層法による長期保存後の生存性. 防菌防黴. 38: 75-80, 2010.
- Ohnishi, T., Muroi, M. and Tanamoto, K. Soluble MD-2 and soluble CD14 inhibit the growth of both gram positive and gram negative bacteria. Microbiology and Immunology. 54: 74-80, 2010.
- 工藤由起子、後藤慶一、尾上洋一、渡辺麻衣子、李謙一、熊谷進、小西良子、大西貴弘. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情事例の解析. 食品衛生学雑誌. 50: 315-320, 2009.
- 後藤慶一. 食品から分離された Alicyclobacillus acidoterrestris の種内遺伝的集団に関する研究. IFO Res. Commum. 23: 5-13, 2009.
- Sakamoto, M., Takagaki, A., Matsumoto, K., Kato, Y., Goto, K. and Benno, Y. Butyricimonas synergistica gen. nov., sp. nov. and Butyricimonas virosa sp. nov., butyric acid-producing bacteria in the family 'Porphyromonadaceae' isolated from rat faeces, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 1748-1753, 2009.
- Sahin, N., Portillo, M. C., Kato, Y. and Schumann, P. Description of Oxalicibacterium horti sp. nov. and Oxalicibacterium faecigallarum sp. nov., new aerobic, yellow-pigmented, oxalotrophic bacteria, FEMS Microbiol. Lett. 296: 198-202, 2009.
- 藤田理英子、後藤慶一、池本尚人、古畑勝則. Alicyclobacillus 属細菌検出用培地の評価. 果汁協会報. 607: 1-7, 2009.
- Furuhata, K., Kato, Y., Goto, K., Hara, M. and Fukuyama, M. Diversity of heterotrophic bacteria isolated from biofilm samples and cell surface hydrophobicity. J. Gen. Appl. Microbiol. 55: 69-74, 2009.
- 後藤慶一. DNA 塩基配列を用いたカビ・酵母の同定. モダンメディア. 55: 237-242, 2009.
- 天野憲一、斉藤志保子、八柳潤、三澤尚明、大西貴弘. Campylobacter jejuni LPS と疾患とのかかわり合い. エンドトキシン研究. 11: 23-25, 2009.
- 大西貴弘. グリコシル化によるエンドトキシン認識分子の活性調節. エンドトキシン研

- 究. 12: 39-43, 2009.
- 大西貴弘、室井正志、棚元憲一. MyD88 非依存性経路におけるTLR4二量体形成の役割. エンドトキシン研究. 12: 72-74, 2009.
- Ui, J., Kondo, K., Sawada, T. and Hara-Kudo, Y. Survival of foodborne pathogens in grain products and effect of catechins. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 50:126-130, 2009.
- Nemoto, J., Sugawara, C., Akahane, K., Hashimoto, K., Kojima, T., Ikedo, M., Konuma, H., Hara-Kudo, Y. Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the Loop-mediated isothermal amplification. J. Food Prot. 72: 748-754, 2009.
- 野田裕之, 千須和美母衣, 金子通治, 尾上洋一, 高鳥浩介, 工藤由起子. ブラックタイガーエビに接種した *Salmonella Weltevreden* 及び *S. Senftenberg* の生残性. 食品衛生学雑誌. 50: 86-90, 2009.
- Toyota-Hanatani, Y., Ekawa, T., Ohta, H., Igimi, S., Hara-Kudo, Y., Sasai, K. and Baba, E. An assessment on inactivated-*Salmonella enteritidis* vaccine treatment in the layer flocks with regard to public health. Appl. Environ. Microbiol. 75:1005-1010, 2009.
- Hidaka, A., Hokyō, T., Arikawa, K., Fujiwara, S., Ogasawara, J., Hase, A., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y. Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli*. J. Appl. Microbiol. 106:410-420, 2009.
- Hara-Kudo, Y. and Takatori, K. Microbial quality of liquid egg and *Salmonella* infection status in Japan. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 50: 34-40, 2009.
2. 学会発表
- 渡辺麻衣子、正木宏幸、森 哲也、土屋 禎、小沼博隆、工藤由起子、小西良子、高鳥浩介. ミネラルウォーター中の酵母およびカビに対する紫外線照射およびオゾン処理による殺菌効果. 第36回日本防菌防黴学会年次大会. 2009.9. 大阪.
- 小沼ルミ、渡辺麻衣子、工藤由起子、小西良子、瓦田研介、高鳥浩介. 流動パラフィン重層法による糸状菌の長期保存に関する検討. 第36回日本防菌防黴学会年次大会. 2009.9. 大阪.
- 渡辺麻衣子、李 謙一、後藤慶一、熊谷 進、小西良子、工藤由起子. 食品汚染にかかわる真菌からの迅速な大量 DNA 抽出方法. 日本食品衛生学会第98回学術講演会. 2009.10. 函館.
- 大西貴弘、後藤慶一、尾上洋一、渡辺麻衣子、小西良子、工藤由起子. 清涼飲料水における微生物を原因とする苦情事例の解析. 日本食品衛生学会第98回学術講演会. 2009.10. 函館.
- 李 謙一、渡辺麻衣子、小西良子、工藤由起子、熊谷 進. チーズスターターカビ *Penicillium camemberti* による腸管出血性大腸菌の増殖促進効果. 第30回日本食品微生物学会総会. 2009. 10. 東京.
- 渡辺麻衣子、李 謙一、後藤慶一、熊谷 進、小西良子、工藤由起子. 真菌からの迅速な大量 DNA 抽出のための物理的抽出法、化学的抽出法および市販キットの比較検討. 日本マイコトキシン学会第67回学術講演会. 2010.01. 東京.
- 李 謙一、渡辺麻衣子、小西良子、工藤由起子、熊谷 進. チーズ製造モデルにおける *Penicillium camemberti* による腸管出

血性大腸菌の増殖促進作用. 第 149 回  
日本獣医学会学術集会. 2010. 03. 東  
京.

後藤慶一、餅田薫、加藤裕子、藤田理英子、  
西堀綾子、松本幸平. 食品から分離され  
た Alicyclobacillus 属細菌の種内遺伝的  
集団と性状に関する研究、日本清涼飲料  
研究会第 19 回研究発表会. 2009.

大西貴弘、後藤慶一、尾上洋一、渡辺麻衣  
子、小西良子、工藤由起子. 清涼飲料  
水における微生物を原因とする苦情事例  
の解析. 第 98 回日本食品衛生学会.  
2009. 10.

大西貴弘、宮原美知子、工藤由起子、鎌田  
洋一、小沼博隆、高鳥浩介、尾上洋一、  
小西良子. 我が国における過去 10 年間  
の食品中食中毒菌汚染実態調査. 第 30  
回日本食品微生物学会. 2009. 10.

# 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

工藤 由起子

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金(食の安心・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

*Fusarium* 属菌は、清涼飲料水の原料となる農産物の汚染菌やマイコトキシン産生菌として食品衛生学上重要な真菌である一方で、胞子の形態、分生子形成様式、集落の性状などの微細な特徴を指標とした形態学的同定が困難であることが知られている。近年、遺伝子塩基配列の解析をはじめとした分子生物学的同定に関する研究が進行しているが、*Fusarium* 属菌の同定に適した指標は明らかにされていない。そこで本研究では、*Fusarium* 属菌を適切に同定できる遺伝子指標を特定することを目的として、複数遺伝子の塩基配列の系統解析を行った。解析の対象菌種としては、現在広く用いられている形態学的指標による分類体系を参照して *Fusarium* 属菌全体から網羅的に種を選択し、計 23 菌種を用いた。供試菌株として標準株またはこれに準じた同定の確実な菌株を収集し、合計 46 菌株を用いた。全ての供試菌株について、単胞子分離法による再分離を行い、これらを培養して得た菌体を DNA 抽出に供した。解析の対象遺伝子として、18S rRNA などリボソーム関連遺伝子およびβ チューブリン遺伝子を選択し、塩基配列を決定した。得られた塩基配列を各遺伝子に分け、近隣結合法による系統解析を行った。解析結果を比較したところ、*Fusarium* 属菌同定のための遺伝子指標としてはβ チューブリン遺伝子が最も適しているということが明らかとなった。

#### 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

微生物の食品汚染を制御するためには、汚染微生物を正確に同定してそれらの生態を把握し、汚染経路に対策を講じることが重要である。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。しかし形態学的手法による同定は、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。また対象菌株が死滅している場合は培養が不可能であるために同定が極めて困難となる。そこで近年、真菌同定の場において、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、分子生物学的手法が取り入れられつつある。PCR



増幅産物のパターンや遺伝子塩基配列の解析などを利用した、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利用されており、形態学的手法のみでは同定が不可能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り同定が可能となった例(4)や、毒素の抽出を行うことなく毒素産生能を潜在的に持つ菌株を検出できた例(10)も多数報告されている。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。真菌の同定の場においては、同定指標として、菌種間の系統関係とよく相関するという報告がある rRNA 遺伝子 (rDNA) 塩基配列 (14) や、 $\beta$  チューブリン遺伝子 (3) などが用いられている。しかし、これらの遺伝子塩基配列の解析による同定は、ある特定の分類群においては種レベルまでの同定が可能であることが示されているものの、別の分類群に適用した場合は、データベース上で利用可能な塩基配列登録数が十分でなく比較が不可能、また塩基配列の差異が近縁種を識別するには十分でないなどの問題が残されており、それぞれの分類群についてその遺伝子塩基配列が適した塩基置換率を保持しているか否かを評価し、同定のために適した遺伝子指標が特定される必要がある。

*Fusarium* 属菌は、植物の病原体や土壌微生物(7、9)として広く分布する真菌である。*F. oxysporum* や *F. solani* の感染による清涼飲料水の原料となるキャベツ、トマト、セロリ、カボチャ、ニンジン、バナナおよびメロンなどの病害がよく知られている。また、その他の *Fusarium* 属

菌についても病害との因果関係は不明であるものの清涼飲料水の原料を含めた多くの青果物からしばしば検出されることが知られ(5)、青果物の汚染菌としても重要であり、市販の清涼飲料水に微生物汚染による腐敗・変敗事故が発生した場合にはその原因となりうる可能性も高い。また、*Fusarium* 属菌はマイコキシンの産生菌としても知られ、過去、日本を含む世界各地で、trichothecene 系化合物や zearalenone に代表される *Fusarium* 属菌産生マイコキシンに汚染された食品または飼料を摂食したことによるヒトおよび家畜の中毒事故が報告されている(6)。以上の観点から、*Fusarium* 属菌は衛生学上大変重要な真菌である。*Fusarium* 属菌についても、前述のように孢子の形態、孢子形成様式、寒天培地上の集落の性状など主に形態学的指標を用いた方法によって同定が行われてきたが、これら形態学的手法による同定が特に困難であることが知られている。その理由として、*Fusarium* 属菌は分類学的に近縁な系統が多数存在しそれらの系統がそれぞれ別種として認識されていること、それにもかかわらず他属菌と比較して種内の変異性が著しく大きいことなどが挙げられる。さらに、植物病原体の分類指標として重要であるとみなされている寄生宿主特異性について、場合によってはひとつの菌種が多種類の寄生宿主を持つ、あるいは逆にひとつの植物が多種類の *Fusarium* 属菌から侵されることもある、という生態学的特徴を持つことなども同定を困難にする要因として考えられている (9)。

そこで近年、*Fusarium* 属菌の分類・

同定の場合においても、遺伝子塩基配列の解析をはじめとした分子生物学的手法が取り入れられつつある。他属菌の場合と同様に rDNA や  $\beta$  チューブリン遺伝子などが用いられ、従来ひとつの種であるとみなされてきた *Fusarium graminearum* が species complex を形成していることが明らかとなり、本 complex に含まれる種の中に系統特異的な塩基配列があることが示された。また、rDNA や  $\beta$  チューブリン遺伝子に存在する種特異的な塩基配列を利用して、形態学的に差異が識別しにくい種の間で種判別が可能な PCR プライマーセットの開発を行ったとの報告もある(1)。しかし、過去の研究では、*Fusarium* 属菌全体を幅広く網羅した研究はほとんど無く、近縁なグループ内での解析が主である。幅広い *Fusarium* 属菌を同定できる指標を検索するためには、*Fusarium* 属菌全体から網羅的にサンプリングを行い、複数遺伝子の塩基置換速度を比較し、それぞれの遺伝子の塩基置換速度が同定に相当か否かを評価する必要がある。そこで本研究では、*Fusarium* 属菌を正確に同定できる遺伝子指標を特定することを目的として、複数遺伝子の塩基配列の系統解析を行い、塩基置換速度の評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

現在広く用いられている形態学的指標による分類体系(8)を参照すると、*Fusarium* 属菌は 12 section (Arachnites、Arthrosporiella、Discolor、Elegans、Eupionnotes、Gibbosum、

Lateritium、Liseola、Martiella and Ventricosum、Roseum、Spicarioides および Sporotrichiella) (図1-12)に分類される。*Fusarium* 属菌から幅広く網羅的に種を選択するため、これら全 12 section について1~6菌種を選択し、合計 23 菌種を用いた(表1)。Section: Sporotrichiella および Liseola に関しては、マイコトキシン産生株が数多く含まれる食品衛生学上重要なグループであるため、3または6種と幅広く種を選択し、詳細な系統解析を試みることにした。それぞれの菌種について1~3菌株ずつの標準株またはこれに準じた同定の確実な菌株を収集した。よって、12 section、23 菌種、46 菌株を供試した。

### 2. 供試菌体の作製方法

*Fusarium* 属菌は、分離された菌株であっても複数種が混在する場合もあり、さらにその集落の性状上混在が認識しにくいいため、研究に供するにあたっては孢子1個を単離する「単孢子分離培養」を欠くことはできない(9)。本研究においても、供試した全菌株を対象に単孢子分離法による再分離を行った。これにあたり、*Fusarium* 属菌は真菌の培養において汎用される寒天平板培地では孢子を形成しにくいいため、孢子を多数採集するためにカーネーションリーフ・アガー (CLA) (9)による培養を行った(図13、14)。本研究で行った単孢子分離法(図15)の詳細は以下の通りである。最初に、potato dextrose agar (PDA; 栄研化学、東京)に菌体を接種し25°Cで10~14日間前培養を行った。次に、直径5.5 cmの小さな滅菌シャーレに作製したCLAに菌体を接種し、可視光下に置き25°C

で14日間培養した。その後、形成された分生子座または菌糸から分生子を採取し、PBSに懸濁した。分生子懸濁液をスライドグラスに滴下して光学顕微鏡下で観察し、顕微鏡の10×10倍の視野あたり分生子数1-5個の濃度になるようにPBSを用いてけん濁液を希釈した。この分生子希釈液150から300 μlを2%寒天平板に塗抹し、25℃で12から24時間培養した。その後、実体顕微鏡下の観察により菌糸の伸長を開始している分生子を選択し、分生子1個を単離して1枚のPDAに接種して、さらに25℃で10~14日間培養した。以上のようにして、供試菌株1株につき少なくとも4株の単孢子分離株を作製した。PDA上に形成された単孢子分離株の集落性状が異なり、元株における複数種の混在が疑われた場合は、同一性状を示す菌株が2株以上分離できるまで繰り返し単孢子分離を行った。これらの単孢子分離菌株を用いて並行して培養を行い、DNA抽出に供する菌体を作製した。その際、本研究の昨年度の成果から明らかになった真菌からの効率の良いDNA抽出法についての検討結果を参照し、液体培養によって迅速に培養菌体を得て、抽出に供した。マイクロチューブに入れた potato dextrose broth (PDB; Difco, U.S.A.) 1ml に菌体を接種し25℃で70時間静置培養した。その後、これを遠心分離(15,000×g、10 min、4℃)にかけ、上清を除去した。得られた菌体はDNA抽出に供するまで-80℃で凍結保存した。

### 3. 染色体 DNA 抽出方法

染色体 DNA 抽出には、本研究の昨

年度の成果から明らかになった真菌からの効率の良い染色体 DNA 抽出法についての検討結果を参照し、SDS 法による DNA 抽出を行った(図 15)が、この際に若干の改変を加えた。最初に、菌体が入った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) および 15 μl の RNase A (10 mg/ml, Novagen, Darmstadt, Germany)を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌し十分に細胞を懸濁した後、65℃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を1時間室温で静置した。その後、ここ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、15,000×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。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、15,000×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5M 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℃で保存した。

### 4. PCR および塩基配列決定

本研究では、解析対象遺伝子として18S rDNA、ITS1 領域、5.8S rDNA、26/28S rDNA D1/D2 領域およびβ チュ

ーブリン遺伝子を選択し、PCRによる遺伝子増幅およびそれらの塩基配列を決定した。

1) 18S rDNA、ITS1 領域、5.8S rDNA および 26/28S rDNA D1/D2 領域

18S rDNA、ITS1 領域、5.8S rDNA および 26/28S rDNA D1/D2 領域の PCR 反応およびシーケンス反応には過去の研究 (11、17) から引用したプライマー (表2) を用いた。ITS1 領域、5.8S rDNA および 26/28S rDNA D1/D2 領域については、ITS1 領域から 26/28S rDNA D1/D2 領域にかけて連結した1つの PCR 増幅産物を得て、これを鋳型としたシーケンス反応を行って塩基配列を決定することとした。遺伝子増幅には、前述の PCR 用プライマー、抽出後適当な濃度に調整した染色体 DNA および TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ、大津) を用いて行った。PCR 反応液は TaKaRa Ex Taq 添付の実験マニュアルに従って調整した。PCR の反応条件は、95°C・3 分で熱変性させた後、95°C・30 秒、72°C・40 秒、52°C・90 秒を1サイクルとし、35 サイクルの反応を行った。反応産物の精製は ExoSAP-IT (GE ヘルスケア・ジャパン、東京) を用い、添付の実験マニュアルに従って行った。シーケンス反応には、前述のシーケンス用プライマー、精製した PCR 反応産物および BigDye Terminators v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、U.S.A.) を用いて行った。シーケンス反応液は BigDye Terminators v 3.1 Cycle Sequencing Kit 添付の実験マニュアルに従って調整した。シーケンス反応条件は、95°C・30 秒で熱変性させた後、

96°C・10 秒、50°C・5 秒、60°C・240 秒を1サイクルとし、25 サイクルの反応を行った。反応産物の精製は Applied

Biosystems が公開している簡易実験マニュアルに従い、エタノール/EDTA/酢酸ナトリウムを用いた方法によって行った。シーケンス反応産物の電気泳動は Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) を用いて行った。電気泳動後、得られた塩基配列は、ATGC ver. 6.0 (ゼネティックス、東京) および GENETYX ver. 7.0 (ゼネティックス) を用いて編集した。18S rDNA では得られた2個の部分塩基配列を、ITS1 領域から 26/28S rDNA D1/D2 領域にかけては得られた3個の塩基配列を編集し、それぞれ 494 塩基または約 1,200 塩基の塩基配列を得た。その後、ITS1 領域から 26/28S rDNA D1/D2 領域にかけては、1つの塩基配列から、ITS1 領域、5.8S rDNA および 26/28S rDNA D1/D2 領域の3区分の遺伝子塩基配列の抽出を行い、それぞれ 187 塩基、159 塩基または 820 塩基の塩基配列を得た。

2)  $\beta$  チューブリン遺伝子のシーケンス  
 $\beta$  チューブリン遺伝子の増幅およびシーケンス反応には本研究において設計した PCR 用およびシーケンス反应用プライマー (表2) を用いた。プライマー設計の際には、*Fusarium* 属菌において汎用性の高いプライマー塩基配列とするため、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の GenBank から得られる *Fusarium* 属菌の登録配列を幅広く選抜し、それらについて ATGC ver. 6.0 を用いてマルチプルアライメントを行い、保存性の高い領域