

図 6-2. Population structure 解析結果の詳細 (Seropathotype D・E)

- クラスタ1
- クラスタ2
- クラスタ3
- クラスタ4
- クラスタ5
- クラスタ6
- クラスタ7

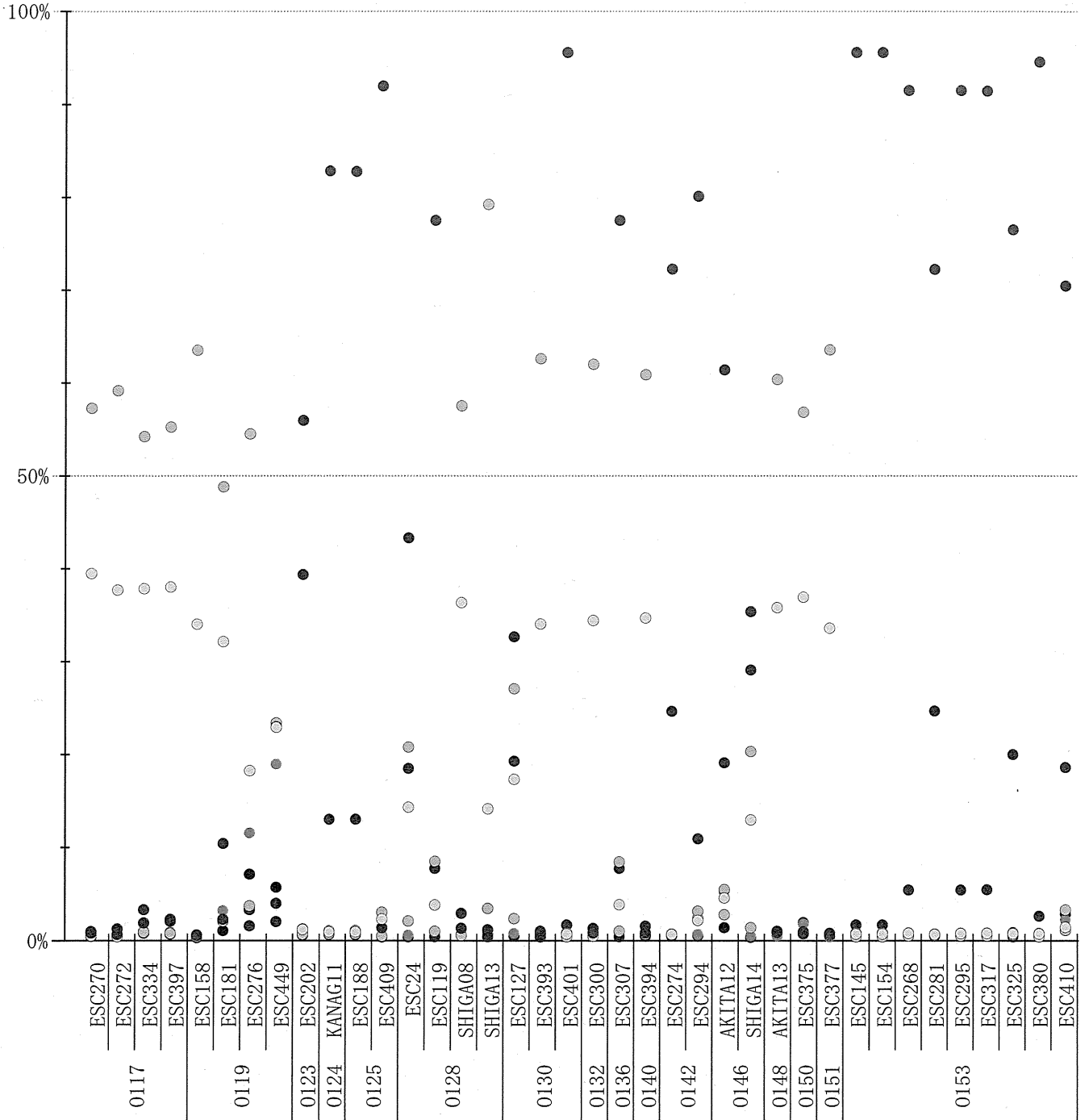


図 6-3. Population structure 解析結果の詳細 (Seropathotype D・E)

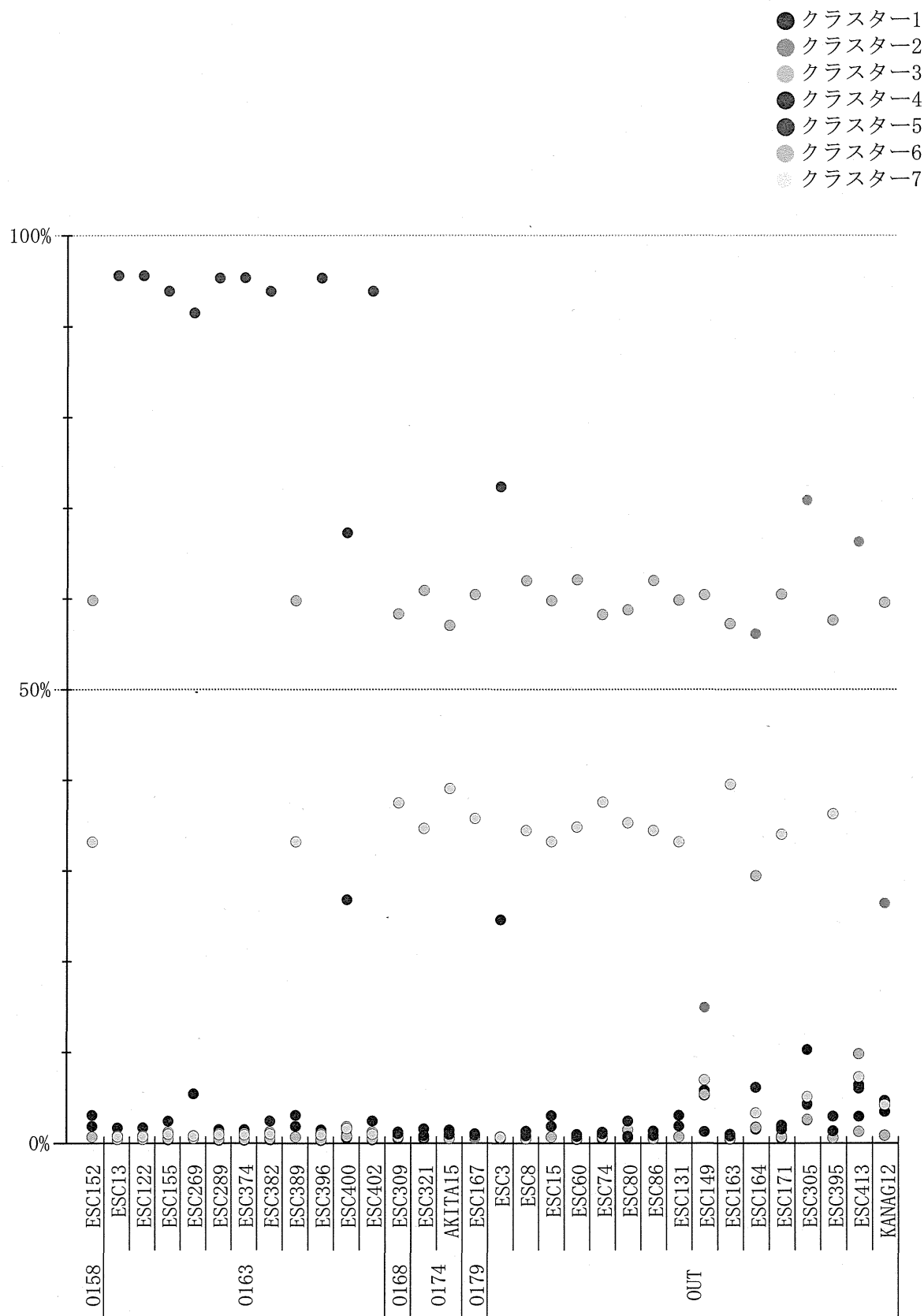


図 6-4. Population structure 解析結果の詳細 (Seropathotype D・E)

平成 24 年度 厚生労働省 食品の安心・安全確保推進研究事業
食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築

分担研究報告書

「細菌の分子疫学に関する基礎研究」

研究分担者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	寺嶋 淳	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	林 賢一	滋賀県衛生科学センター	

研究要旨：本研究班では、多様化・広域化している食品流通に対して、食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するため、公衆衛生上重要な有害微生物に関する科学的知見を集約し、各関連機関の間で効率的かつ効果的な情報共有システムの構築を目指している。その中で、本分担研究においては、主としてヒトからの食中毒細菌を対象にライブラリーシステムの構築を図ることを目的とする。また、より効果的な分子疫学解析手法の開発・検討も本分担研究の目的の一つである。本年度は昨年度に引き続き、サルモネラの病原因子パネルに基づくライブラリーの検討を行った。

A. 研究目的

2011 年厚生労働省食中毒統計における細菌性食中毒の患者総数は 10,948 名（前年比 +26%）であった。このうち、28%にあたる 3,068 名（同+24%）がサルモネラによるものであった。サルモネラ食中毒は 1990 年代と比較して減少しているが、上記データはいまなお本菌が公衆衛生上の重要な位置を占めていることを示している。サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれるが、中でも *Salmonella enterica* serovar Enteritidis（*S. Enteritidis*、以下 SE）による患者数は 1990 年代に急増し、現在もなお血清型別での検出頻度で第一位を占めている。

SE 以外にヒトからの分離頻度が高い血清型としては Typhimurium、Infantis などがあり、

とくに Infantis は鶏肉から高頻度に分離される。また SE は鶏卵あるいは鶏肉などの食品（加工品）が主たる感染源となっている。

このように、サルモネラに関しては本菌感染と食品の結びつきが大変強く、ヒトのライブラリーシステムを整備することで、食品由来のサルモネラとの照合を図りやすくすることが本研究の目的である。

本研究では、上記目的のための指標の検索、およびライブラリーの構築を目指す。

B. 研究方法

サルモネラには多くの病原因子あるいは病原因子と推測されている産物をコードする遺伝子が報告されている。Huehn ら（AEM, 2009, 75, 1011-1020.）は血清型 4:d:-株に着目し、

Salmonella Pathogenicity Island 等の病原因子などを指標としたマイクロアレイを行い、菌株特異的な病原因子レパートリーの抽出を行った。本研究では、上記に挙げられた病原因子等および、Pathogenicity Island データベース (PAI) 等を参考に、指標となりうる 69 種類の遺伝子を選択し、それに対応する PCR プライマーを設計し、PCR による (病原) 因子パネルの作成を試みた。PCR は 1 反応あたり 2-3 遺伝子を検出するマルチプレックス PCR で行った。

C. 研究結果および考察

表 1 に今回標的とした遺伝子群を表す。*invA* など SPI に含まれる代表的な遺伝子のほか、SGI1 (Salmonella Genomic Island-1) など耐性遺伝子群にかかわる遺伝子、プロフェージ、線毛などの遺伝子も含まれた。

およそ 30 血清型からなる 150 株について、上記方法により試験した。陽性・陰性を電気泳動で判定し、陽性を 1、陰性を 0 として Bionumerics ソフトウェアに取り込み、クラスター解析を行った。結果を図 1 に示す。

invA などの主要な SPI に含まれる遺伝子は全ての株に共通に保有されていた。亜種 IV に属す株では *sseC* などが欠けており、最も離れたグループを形成した。

Enteritidis、Saintpaul など複数株試験した血清型の大半は、血清型ごとにクラスターを形成したが、中には Agona のように、少し離れた位置にくるものもあった。これらの血清型についてはより多くの菌株を試験し、典型的なグループを見出していく必要があると考えられる。

Infantis も血清型特異的なクラスターを形成した。Infantis のクラスターには、*irp2* 遺伝子の有無によって分けられる 2 つのグループの存在が示唆された (図 2)。Irp2 (iron regulated protein) は、エルシニアで Versiniabactin というシデロフォアを合成する遺伝子群に含まれていたものであり、鉄獲得に関連している。

D. 結論

病原因子パネルの検討を行い、いくつかの血清型については特異的なクラスターを形成することが示唆された。また、Infantis には 2 つのグループが存在することが示唆された。今後、さらにライブラリーを拡充することで、新たな指標が得られることが期待される。

E. 研究発表等

H. Izumiya, J. Terajima, S. Yamamoto, M. Ohnishi, H. Watanabe, A. Kai, T. Kurazono, M. Taguchi, T. Asai, M. Akiba, Y. Matsumoto, and Y. Tamura: Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emerg. Infect. Dis.* (in press)

F. 知的財産権の出願・登録状況 なし

mp01	mp02	mp03	mp04	mp05	mp06	mp07	mp08	mp09	mp10	mp11	mp12	mp13	mp14	mp15	mp16
sefC	hlyE	sopB	prpZ	irp2	stfE	SGI1	stdB	viaB	gtrC	sodC1	siif(spi4_R)gipA	fimA	sopE1	stjB	
ruhM	staA	sugR	pefA	gp36	uidA	safA	msgA	sfaS	bim2	rrtT	ST64b	pefB	gtrA16	xylE	artA
pagI	STY3280gtrA17	gtrB	allR												
mp17	mp18	mp19	mp20	mp21	mp22	mp23	mp24	mp25	mp26	mp27	mp28	mp29	mp30	mp31	mp32
sopE2	stgA	steB	stcC	bcfC	stiC	safC	lpfD	STY3343invAh	allB	prot6E	gogB	stkC	SPI15	mg:C	
narP	invA	Fels-2	cdtB	K88	spiC	pltA	gpiA	spvB	STM2697sefA	tcfA	sseC	agfA	csgA	STM4595	

表 1. 試験に使用した、病原性に関連する遺伝子および病原性に関連が疑われる遺伝子。設計したマルチプレックス PCR (mp 番号) ごとに分かれている。invAh は invA と同じ遺伝子でプライマーが異なる。

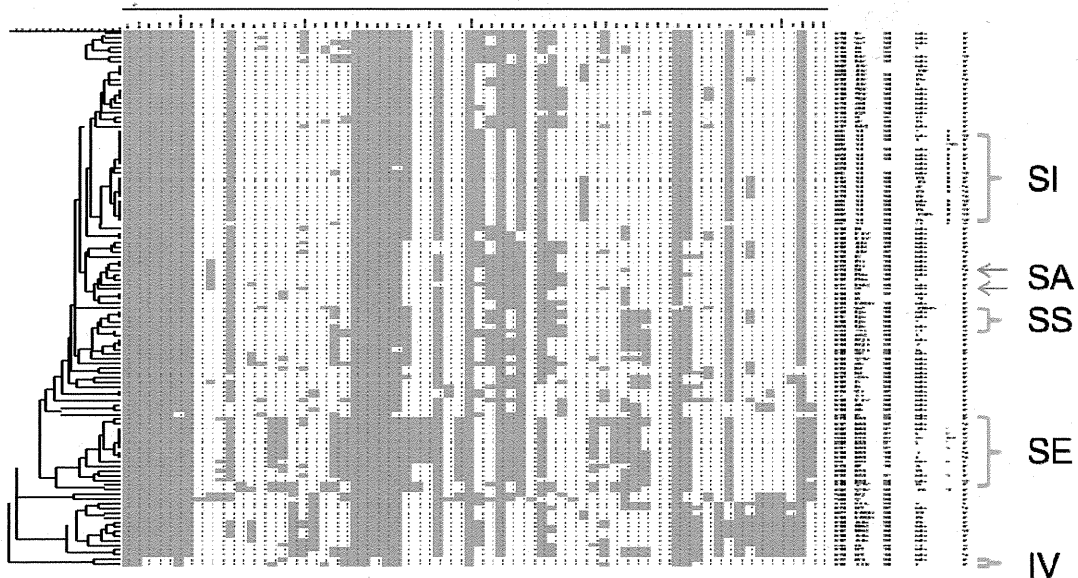


図 1. 因子パネルの結果に基づくクラスター解析。

SI、Infantis。SA、Agona。SS、Saintpaul。SE、Enteritidis。IV、亜種 IV を表す。

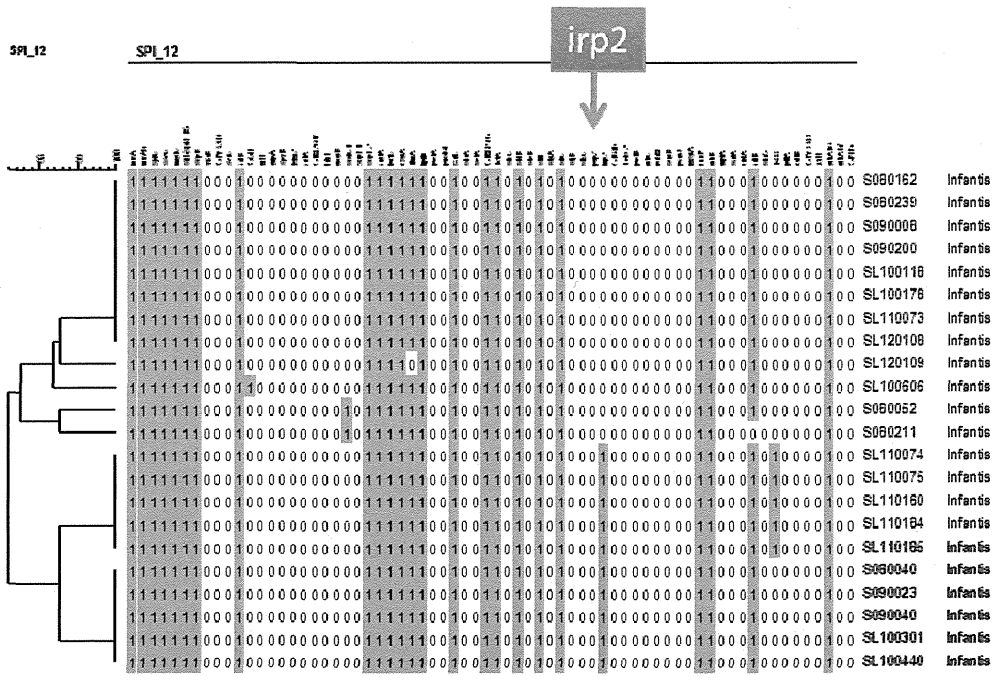


図 2. 因子パネルの結果に基づくクラスター解析。

図 1 の *Infantis* の部分をまとめたものを表す。Irp2, iron regulated protein 2.

表 1 鶏肉の部位別の *Campylobacter* 汚染状況

部位	検体数	陽性数 (%)			
		<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni+coli</i>
モモ	49	31(63.3)	23(46.9)	5(10.2)	3(6.1)
ムネ	36	29(80.6)	24(66.7)	1(2.8)	4(11.1)
ササミ	12	9(75.0)	9(75.0)	0	0
その他	3	2(66.7)	2(66.7)	0	0
計	100	71(71.0)	65(65.0)	13(13.0)	7(7.0)

表 2 鶏肉の産地の地域別の *Campylobacter* 汚染状況

地域	検体数	陽性数			
		<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni+coli</i>
北海道・東北	32	24(75.0)	21(65.6)	2(6.3)	1(3.1)
近畿	17	14(82.4)	10(58.8)	2(11.8)	2(11.8)
四国・九州	32	20(62.5)	16(50.0)	1(3.1)	3(9.4)
国産	19	13(68.4)	11(57.9)	1(5.3)	1(5.3)

表 3 国産鶏肉類における *Campylobacter* 汚染状況

種類	検査数	菌種			文献
		<i>C. jejuni/coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	
鶏肉	9	6 (66.7)			1
肝	56	29 (51.8)			
砂肝	9	6 (66.7)			
モモ	27	7 (25.9)			6
手羽	23	5 (21.7)			
肝	23	11 (47.8)			
ひき肉	12	2 (16.7)			
ムネ	11	3 (27.3)			
ササミ	10	1 (10.0)			
皮	6	1 (16.7)			
砂肝	6	3 (50.0)			
心臓	5	1 (20.0)			
生鶏肉	9	9 (100)			7
刺身	13	7 (53.8)			
たたき	34	9 (26.5)			
モモ	10	6 (60.0)			10
モモ肉 (夏期)	17	16 (94.1)			11
モモ肉 (秋期)	19	11 (57.9)			
鶏肉	73	54 (74.0)			21
国産チルド	36	30 (83.3)			23
国産冷凍	4	2 (50.0)			
市販鶏肉	33	19 (57.6)			24
モモ	4	2 (50.0)			25
肝	33	26 (78.8)			
手羽先	32	27 (84.4)			
鶏肉	30	8 (26.7)			26
ひき肉	325	68 (21.0)			
砂肝	11	4 (36.4)			
たたき	79	9 (11.4)			
鶏刺し	29	3 (10.3)			
ササミ	24	6 (25.0)			27
肝・心	24	13 (54.2)			
砂肝	24	19 (79.2)			
鶏肉	65	16 (24.6)			28
ムネ	13	5 (38.5)			30
モモ	32	8 (25.0)			
ササミ	4	2 (50.0)			
手羽	1	1 (100)			

表 3 続き

種類	検査数	菌種			文献
		<i>C. jejuni/coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	
生肉	31		21 (67.7)	6 (19.4)	2
冷凍	6		2 (33.3)	2 (33.3)	
ひき肉	60		12 (20.0)		1 3
市販鶏肉	66		37 (56.1)		1 4
鶏肉	73		52 (71.2)		2 2
モモ	31		23 (74.2)	5 (16.1)	3 1
ムネ	48		29 (60.4)	1 (2.1)	
手羽先	4		2 (50.0)	1 (25.0)	
ササミ	27		13 (48.1)	2 (7.4)	
肝	48		40 (83.3)	10 (20.8)	
砂肝	48		41 (85.4)	4 (8.3)	

表 4 国産鶏肉類の *Campylobacter* 汚染状況及び汚染菌量

検体	検体数	<i>C. jejuni/coli</i>	菌量 (MPN/100g)				文献
			10	10 ²	10 ³	>10 ³	
ひき肉 ^a	16	5 (31.3)	2	1	2 ^c		3
手羽 ^a	16	7 (43.8)	3	1	3 ^c		
鶏肉	35	17 (48.6)	1	9	4	3	4
皮つき肉 ^b	36	19 (52.8)	4	9	6 ^c		5
肝 ^b	34	17 (50.0)	3	3	11 ^c		
砂肝 ^b	35	20 (57.1)	1	11	8 ^c		
鶏肉	26	23 (88.5)	10	5	7	1	8
カット鶏肉	24	18 (75.0)	2	5	8	3	9
鶏肉	30	18 (60.0)	2	9	7		
肝	13	6 (46.2)	1	1	3	1	
砂肝	12	6 (50.0)	1	2	2	1	
ムネ	3	3	2	0	3		1 2
モモ	3	3	0	2	1		
砂肝	3	3	2	1	0		
鶏肉	55	43 (78.2)	14	11	8	10	1 5
ムネ	40	21 (52.5)	3	10	6	2	1 6
モモ	39	24 (61.5)	4	7	8	5	
手羽先	21	4 (19.0)	4				
肝 (MPN 法) ^b	56	35 (62.5)			2	33	1 7
肝 (塗抹法) ^b	56	37 (66.1)			1	36	
ムネ	10	10 (100)	5	2	3		1 8
モモ	10	8 (80.0)	0	5	3		
手羽先	10	9 (90.0)	2	3	4		
ムネ	50	41 (82.0)	14	15	11	1	1 9
モモ	40	26 (65.0)	5	12	6	3	
手羽先	38	29 (76.3)	10	10	9	0	
鶏肉	50	48 (96.0)	8	19	18	3	2 0
鶏肉 ^b	11	6 (54.5)		5	1 ^c		2 9
肝 ^b	11	10 (91.0)		2	8 ^c		

a: CFU/25g

b: CFU/100g に換算

c: $\geq 10^3$

厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)

真菌リスクプロファイルの作成および新規真菌分類法の確立 分担研究報告書

研究分担者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
研究協力者 高橋 治男 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
久米田裕子 大阪府公衆衛生研究所
千葉 隆司 東京都健康安全研究センター
橋本レイコ 千葉県衛生研究所

要旨

国立試験研究機関と地方衛生研究所などの間で、ネットワークシステムを介して食の安全に危害を及ぼすカビのリスクプロファイルを共有し、ヒトへの健康危害を防止することを目的とする。そこで、以下の項目について検討を行った。

1. 食品中の有害カビを対象にしたライブラリーシステム等構築
2. 分子系統関係を利用した*Fusarium*属菌のマイコトキシン産生能の推定
3. 黒コウジカビのカビ毒産生性

1については、危害カビに関する最新の情報を集めたリスクプロファイル集10菌種分を作成し、昨年度構築した厚生省食中毒調査支援システム (NESFD) にアップロードを行った。また、地方試験研究機関真菌担当の参加希望者を募り、「食品中のカビリスクプロファイル集」評価会を開催したところ、同定技術の向上につながったとの評価を得た。2については、特定のマイコトキシンの産生性がこれまで確認されていなかった菌種について、*Fusarium*属菌の分子系統解析による分類および分子系統関係を元にしたマイコトキシン産生能有無の推定を行った。その結果、従来マイコトキシン産生性が明らかにされていなかった数菌種について、潜在的な産生能有無が示唆された。3については、醸造用株を含む複数菌種の黒コウジカビを用い、水浸漬白米で培養してフモニシン類およびオクラトキシン類の産生性を検討した。その結果、全ての醸造用株ではいずれのカビ毒産生性も認められなかったが、非醸造用株である*A. niger*分離株では、株によりフモニシンB2およびオクラトキシンAの産生性が認められた。さらに、蔗糖を添加した培地ではフモニシンの産生量は上昇したことから、糖濃度を高めた*A. niger*汚染食品におけるフモニシン汚染には注意を要することが示唆された。また、*A. niger*は、食品製造に広く利用されていることから、今後、安全性の確認が重要と言える。

A. 研究目的

1. 食品中の有害カビを対象にしたライブラリーシステム等構築

カビ発生による苦情食品の検査が増大する中で、前年度の地方衛研へのアンケート調査により、国立試験研究機関と地方衛生研究所などの間における食の安全に危害を及ぼすカビの情報を、効率的に共有するリスクプロファイルとネットワークシステムを構築する必要性が明らかになった。今年度は、①危害カビに関する最新の情報を集めたリスクプロファイル集を作成する、②作成したプロファイル集を公開する、③実際の食品汚染カビを同定する場合のプロファイル集の有用性を評価する、以上を目的とした。

2. 分子系統関係を利用した *Fusarium* 属菌のマイコトキシン産生能の推定

Fusarium 属菌はマイコトキシンの産生菌として知られ、過去、日本を含む世界各地で、トリコテセン類やフモニシン類に代表される *Fusarium* ト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。過去に致死性の急性食中毒の原因となった事例もあることから、食品衛生学上重要な真菌である。

系統学的に近縁な生物は互いに遺伝的背景も類似し、遺伝的類似性は形質の類似性にもつながると考えられることから、分子生物学的に *Fusarium* 属菌を的確に分類・同定を行えば、食品からの分離株のマイコトキシン産生性を予測することができ、マイコトキシン汚染を予防することに役立つと考えられる。本手法

は、生物の系統関係を利用した毒素産生性推定手法を “phylotoxigenic relationships” に基づく解析と呼ぶことがある。本研究では、特定のマイコトキシンの産生性がこれまで確認されていなかった菌種について、潜在的な産生能の有無を推定することを目的として、“phylotoxigenic relationships” に基づく解析を行い、*Fusarium* 属菌の分子系統解析による分類およびマイコトキシン産生能有無の推定を行った。

3. 黒コウジカビのカビ毒産生性

黒コウジカビは、クエン酸などの発酵生産、食品工業に使用されるカビとして、極めて重要である。菌学的には、最近の研究で種の複合体、*Aspergillus niger* complex と考えられており、この複合体の中には、焼酎の醸造に用いられる醸造菌も含まれている。これらは *A. niger* と形質的に共通点が多く、過去の研究においては *A. niger* に包括されていることも多い。近年、*A. niger* において、オクラトキシン類、フモニシン類と、相次いでカビ毒産生性が報告された。本事業における昨年度までの調査研究で、醸造株ではカビ毒産生が認められないのに対し、環境や食品からの分離した黒コウジカビでは、カビ毒産生が認められる傾向にあることが示された。今年度は、多数の菌株においてもこれが認められるか否かを確認することを目的として、複数の醸造株や土壌分離株についてカビ毒産生性を調べるとともに、泡盛の醸造に用いられる黒麹菌のタイプ種とされる *Aspergillus inuii* に加え、*A. niger* のタイプ種についてもそれらのカビ毒産生性を検討

した。

B. 研究方法

1. 食品中の有害カビを対象にしたライブラリーシステム等構築

①ネットワークのリファレンスセンターである国立衛研、地域拠点である大阪府、東京都、千葉県の各地方衛研の協力研究者の間で討論を行い、カビ毒産生性、食品からの検出頻度などを考慮して、今年度のリスクプロファイル個票作成対象菌種を10菌種選定した。記載項目としては、カビの集落写真、顕微鏡写真、毒素産生・食品の自然汚染の有無、生理学的特徴・分布域・生育環境、侵害を受けやすい食品、以上の4点とした。これらのリスクプロファイルを作成した。②厚労省食中毒調査支援システム (NESFD) でのネットワークシステム「食品中のカビリスクプロファイル集」にアップロードした。③地方試験研究機関真菌担当の参加希望者を募り、「食品中のカビリスクプロファイル集」評価会を開催した。リスクプロファイル集を参照しながら、実際にカビ汚染食品からの菌株分離および同定を試みる実技を中心に行った。

2. 分子系統関係を利用した *Fusarium* 属菌のマイコトキシン産生能の推定

トリコテセン類を産生する菌種およびその近縁菌種を対象として、*Fusarium* 属菌16菌種32菌株を供試した。これらの菌株について、rDNAクラスター領域、 β -tubulin 遺伝子および elongation factor 1 α 遺伝子塩基配列を、シーケンスの決

定またはNCBIのデータベース GenBank からダウンロードすることによって収集した。本研究においてシーケンスを決定した菌株は、*F. semitectum* MAFF 236386, *F. camptoceras* CBS 193.65, *F. culmorum* MAFF 236454, *F. culmorum* IFM 50210, *F. crookwellense* MAFF 101144, *F. crookwellense* NBRC 32585, *F. longipes* IFM 50036, *F. scirpi* CBS 448.84 であった。ダウンロードした塩基配列の Accession ナンバーは、AB586983、AB586988-586992、AB586999-05、AB587015、AB587016、AB587019-587021、AB587024-587026、AB587036、AB587038-587040、AB587047-587053、AB587063、AB587064、AB587067-587069、AB587072-587078、AB674263、AB674264、AB674267-674270、AB674277-674282、AB674292、AB674293、AB674296-AB674298、AB674301-674304、EU008509、EU008531、EU490248、EU490226 であった。これらの配列を用いて、ML法による *Fusarium* 属菌の系統推定を行った。また、各供試菌種について、トリコテセンタイプ A・タイプ B (TriA、TriB)、ゼアラレノン (ZEN)、モニリフォルミン (MON)、ビユーベリチン (BEA) およびエンニアチン (ENN) の6種類のマイコトキシン産生性について文献を参照¹⁻¹⁶⁾して確認し、マイコトキシン産生性マトリックスを作成した。その後、同マトリックスを指標とし、得られた分子系統樹の樹形を利用して、MP法によって *Fusarium* 属菌各リネージの共通祖先および産生性が不明な供試菌種のマイコトキシン産生能の有無を推定した。

3. 黒コウジカビのカビ毒産生性

黒コウジカビのうち、タイプ種として *A. inui* IFM60735 および *A. niger* IFM 55890、タイプ種以外では、泡盛醸造利用株として *A. inui* 2株および *A. foetidus* 3株の合計5株、非醸造用株として中部日本の果樹園畑土壌から分離した *A. niger* 5株、以上の合計12菌株について検討した。培地は、製麴を想定し、水浸漬白米を用いた。培養温度および時間は、本研究事業における H22 年度の研究結果を参照した。抽出溶媒として、フモニン類の場合にはメタノール：水（3：1）を、オクラトキシン類の場合にはアセトリル：水（3：1）を用いた。抽出後、そのろ液を試験液とし、LC/MS/MSを用いて分析を行った。

C. 研究結果および考察

1. 食品中の有害カビを対象にしたライブラリーシステム等構築

①カビ毒産生性、食品からの検出頻度などを考慮して、10菌種を対象にリスクプロファイル個票を成した（図1-10）。また、カビ培養に必要な培地処方一覧、およびカビ分離・同定実験での注意も添付した（表1-1、表1-2、図11）。②①で作成したリスクプロファイル集について、NESFD システムを利用した「食品中のカビリスクプロファイル集」にアップロードした。③「食品中のカビリスクプロファイル集」評価会では、リスクプロファイル集を参照しながら食品由来カビを同定したところ、同定技術が向上したという評価を得た。

2. 分子系統関係を利用した *Fusarium* 属菌のマイコトキシン産生能の推定

Fusarium 属菌の分子系統樹を図12に示した。分子系統解析の結果、供試した16菌種はクレード1および2に分かれ、この分類は従来認識されるトリコテセン類の産生性の有無と概ね一致した。トリコテセン類の産生性が確認されている菌種が多く入るクレード1は、さらにサブクレード a～d に分かれた。マイコトキシン産生性マトリックスを表2に示した。このマトリックスをもとに、図12の分子系統関係を利用してマイコトキシン産生能有無の推定を行った（図13-18）。その結果、*Fusarium* 属菌の進化の歴史において、産生能の獲得・喪失が起こった頻度が最も高かったものは TriA で、最も頻度が低かったものは MON および ZEN であり、マイコトキシンの種類間で獲得・喪失の起こり易さに差が認められた。また、獲得・喪失の起こり易さには、上記の菌種クレード間でも差が認められた。よって、遺伝的変異等、産生能の獲得・喪失に関わる要素の変化し易さは、各マイコトキシンおよび各 *Fusarium* 属菌リネージで差が有り、*Fusarium* 属菌の進化の間、一定ではなかったことが明らかとなった。さらに、従来マイコトキシン産生性が明らかにされていなかった *F. camptoceras*, *F. scirpi*, *F. longipes* 等の菌種について、潜在的な産生能の有無が示唆された（図13-18）。

3. 黒コウジカビのカビ毒産生性

結果を表3に示した。焼酎醸造株は、そのタイプ種とされる *A. inui* を含め、

これまでの結果と同様に、フモニシン、オクラトキシンの産生性は認められなかった。醸造株と *A. niger* は系統的に極めて近縁であるが、近年の分子生物学的な手法による遺伝子解析では、両者は系統的に異なるとの報告あることから、醸造株は酵素力などの形質を重視した淘汰の繰り返しにより作出されたもので、カビ毒産生能を喪失した可能性もある。

一方、*A. niger* 分離株では、株によりオクラトキシシン A、あるいはフモニシン B2 の産生が認められた。蔗糖を添加し浸透圧を高めた CY20S 培地では、コメ（白米）培地よりフモニシンの産生量は上昇し、これまでの報告と一致した。糖添加は、食品の微生物制御に、一般的に用いられることから、糖濃度を高めた *A. niger* 汚染食品におけるフモニシン汚染は、注意を要することを示唆した。また、*A. niger* のタイプ種もフモニシン産生を有していた。*A. niger* は、クエン酸やアミラーゼを含む酵素剤の製造など食品製造に広く利用されている。食品工業利用株にカビ毒産生性が認められたとの海外の報告もあることから、今後、安全性の確認が重要と言える。

D. 結論

リスクプロファイル作成対象カビとして、今年度は10菌種を対象にリスクプロファイル個票を成した。NESFD に構築済みの「食品中のカビリスクプロファイル集」に、リスクプロファイル個票を始めとした情報のアップロードを行った。リスクプロファイル集の使用感を評価したところ、地方自治体試験検査機関カビ担

当者から同定技術の向上を感じたという評価を得た。さらに、分子系統関係を利用した *Fusarium* 属菌のマイコトキシシン産生能の推定、および醸造用黒コウジカビのカビ毒産生能についての検討を行った。今後、本研究で得られた研究結果のアップロードを中心としてライブラリーシステムの内容を充実させていくとともに、NESFD の周知を行って、これの積極的な活用を促進していく必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 渡辺麻衣子, 小沼ルミ, 米澤隆弘, 瓦田研介, 小西良子, 鎌田洋一. 遺伝子塩基配列を指標とした食品由来 *Fusarium* 属分離株の同定. 日本食品微生物学雑誌. 29, 221-229, 2012.

2) M. Watanabe, T. Yonezawa, Y. Sugita-Konishi and Y. Kamata. Utility of the phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin producing potential. Food additives and contaminants. In press.

2. 学会発表

1) M. Watanabe, T. Yonezawa, Y. Sugita-Konishi and Y. Kamata. Application of phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species to the prediction about the potential mycotoxin-productivity. MycoRed 2012 (2012.6) (Ottawa)

2) 渡辺麻衣子, 米澤隆弘, 小西良子, 鎌田洋一. *Fusarium* 属菌のマイコトキシ

- ン産生能を推定する一分子系統解析の有用性—。日本マイコトキシン学会第71回学術講演会 (2012.7) (那覇)
- 3) 食品由来 *Aspergillus niger* のフモニシン類産生性スクリーニング手法についての検討。渡辺麻衣子, 北山真弓, 吉成知也, 橋本ルイコ, 川上 浩, 高橋治男, 小西良子, 鎌田洋一。日本食品微生物学会第33回学術総会 (2012.10) (福岡)
- 4) 渡辺麻衣子, 大波純一, 足立淳, 小西良子, 鎌田洋一。 *Fusarium proliferatum* ゲノム中の転移因子探索のためのドラフトゲノム解析。第7回第7回日本ゲノム微生物学会年会 (2013.3) (長浜)
3. 参考文献
- 1) Bosch U, Mirocha CJ. 1992. Toxin production by *Fusarium* species from sugar beets and natural occurrence of zearalenone in beets and beet fibers. *Appl Environmental Microbiol.* 58:3233-3239.
- 2) Chelkowsk J, Zawadzki M, Zawadzki P, Logrieco A, Bottalico A. 1990. Moniliformin production by *Fusarium* species. *Mycotoxin Res.* 6:41-45.
- 3) Gupta S, Krasnoff SB, Underwood NL, Renwick JA, Roberts DW. 1990. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathologia* 115:185-189.
- 4) Herrmann M, Zocher R, Haese A. 1996. Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue. *Appl Environ Microbiol.* 62:393-398.
- 5) Lee US, Jang HS, Tanaka T, Toyasaki N, Sugiura Y, Oh YJ, Cho CM, Ueno Y. 1986. Mycological survey of Korean cereals and production of mycotoxins by *Fusarium* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 52:1258-1260.
- 6) Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 1 edn.: Blackwell.
- 7) Logrieco A, Moretti A, Castella G, Kostecky M, Golinski P, Ritieni A, Chelkowski J. 1998. Beauvericin production by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 64:3084-3088.
- 8) Logrieco A, Rizzo A, Ferracane R, Ritieni A. 2002. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Appl Environ Microbiol.* 68:82-85.
- 9) Marasas WFO, Nelson PE, Toussoun TA. 1984. *Toxigenic Fusarium Species* University Park: The Pennsylvania State University Press.
- 10) Nicholson P, Simpson DR, Wilson AH, Chandler E, Thomsett M. 2004. Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. *Eur J Plant Pathol.* 110:503-514.
- 11) Rabie CJ, Marasas WF, Thiel PG, Lubben A, Vleggaar R. 1982. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa

- a. *Appl Environ Microbiol.* 43:517-521.
- 12) Scott PM, Abbas HK, Mirocha CJ, Lawrence GA, Weber D. 1987. Formation of moniliformin by *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium culmorum*. *Appl Environ Microbiol.* 53:196-197.
- 13) Thrane U, Adler A, Clasen PE, Galvano F, Langseth W, Lew H, Logrieco A, Nielsen KF, Ritieni A. 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *Int J Food Microbiol.* 95:257-266.
- 14) Turner AS, Lees AK, Rezanoor HN, Nicholson P. 1998. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathol.* 47:278-288.
- 15) Wing N, Bryden WL, Lauren DR, Burgess LW. 1993. Toxigenicity of *Fusarium* species and subspecies in section *Gibbosum* from different regions of Australia. *Mycol. Res.* 97:1441-1446
- 16) Yli-Mattila T. 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *J Plant Pathol.* 92:7-18.

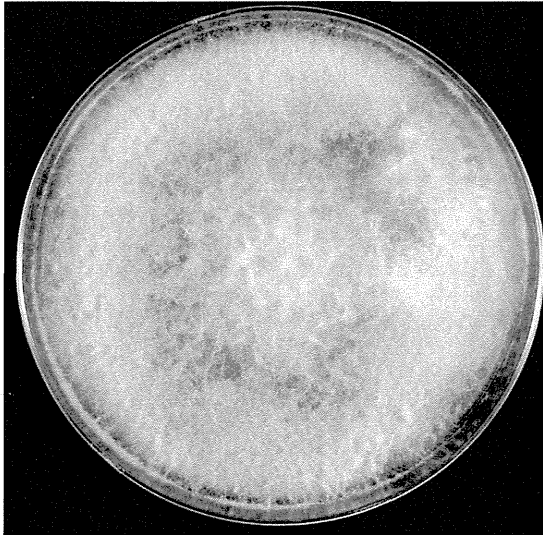
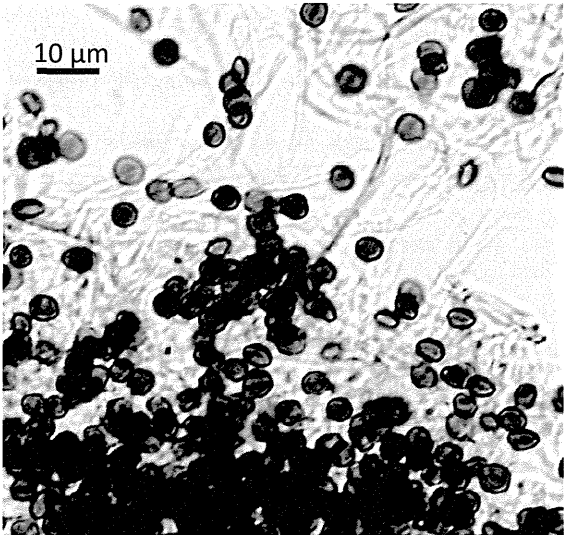
菌種名		備考(和名など)	No.
属名	アースリニウム (<i>Arthrinium</i>)	アースリナム菌	AR-1
		種名	sp.
集落写真 (PDA培地)		光学顕微鏡写真	
 <p>25°C、12日間培養</p>			
<i>Arthrinium phaeospermum</i>			
形態学的特徴 PDA培地での生育は速く、菌糸の発育が良い。菌糸の色は 発育初期では白色、後に灰白色となる。培地裏面は淡黄色～褐色。気中菌糸中または寒天培地表面に、暗褐色の分生子塊を形成する。 淡褐色～暗褐色のレンズ型の分生子を産生する。赤道面は無色。		生理学的特徴 発育温度: 耐冷性で、5°C以上で発育可能。37°Cでは発育しない。最適発育温度は25°C前後。	
カビ毒産生性 カビ毒産生性は報告されていない。		地理的分布、生息環境、汚染食品 世界中の土壌や植物などに分布する。穀類、マメ類、ナッツ類などから検出される。 <i>A. phaeospermum</i> は、分生子が耐熱性を持つことが知られており、リンゴ果汁、めんつゆ等加工食品からの検出も報告される。	
カビ毒による食品の自然汚染例		備考 誤同定されるカビとして分生子が類似した <i>Nigrosporium</i> 属菌があるが、これの分生子は黒色となる。 <i>Arthrinium</i> 属菌は黒色とはならない。	

図1 リスクプロファイル個票 (AR-1)

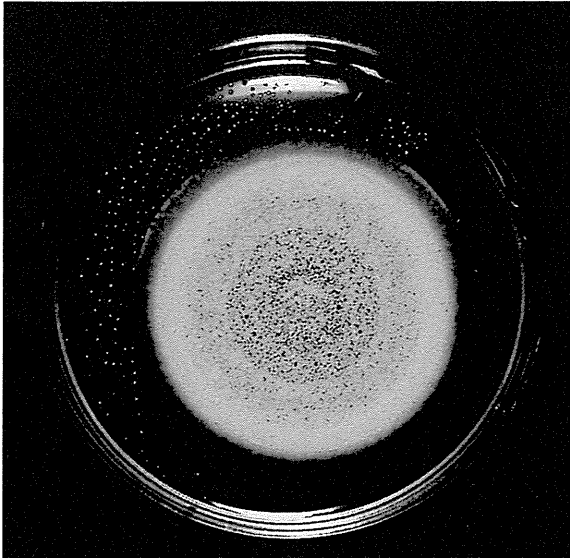
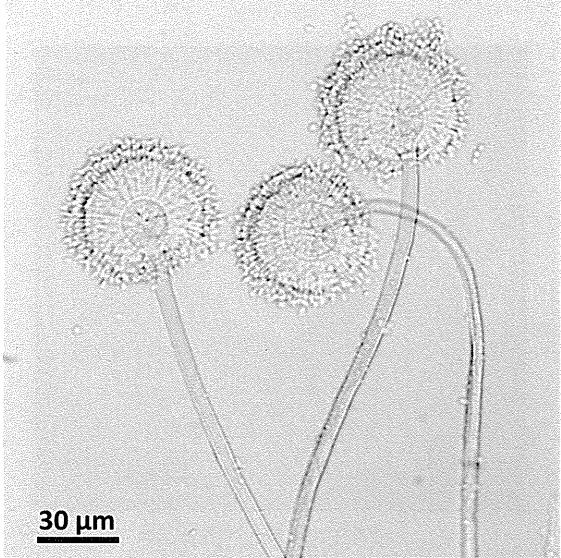
菌種名		備考(和名など)	No.
属名	アスペルギルス (<i>Aspergillus</i>)	種名	オクラセウス群
集落写真 (PDA培地)		光学顕微鏡写真	
 <p>25°C、7日間培養</p>		 <p>30 μm</p>	
<p>形態学的特徴</p> <p>PDA培地上での集落は黄色～黄褐色。</p> <p>分生子頭では、ほぼ球形の頂のう(直径、約25-50 μm)上のほとんど全面にフィアライドが形成され、その先端から分生子が放射状・連鎖的に無性的につくられる。フィアライドと頂のうの間にメレを有する、いわゆる複列(2段)の大型分生子頭からなる。分生子は、垂球形、球形～楕円形で、直径、2～3.5 μm、表面は活面～粗面となる。</p> <p>アスペルギルス属の形態構造については、関連資料「カビの形態学的構造」を参照のこと。</p>		<p>生理学的特徴</p> <p>発育の最適温度は24-31°Cで、8°Cおよび41°Cでは発育しない。必要な最小水分活性値は、25°Cで0.77と、比較的乾燥した条件下でも発育が可能である。</p>	
<p>カビ毒産生性</p> <p>腎臓毒性を有するオクラトキシンAを産生する。</p>		<p>地理的分布、生息環境、汚染食品</p> <p>本邦温暖域に広く分布していると考えられる。汚染食品としては、コーヒー豆、大豆などの豆類やトウモロコシなどの穀類の他、鰹節などの乾物やチーズなどの畜産物まで対象となる。国内の貯蔵米からも分離される。近年、衛生害虫がキャリアになっているとの報告がある。</p>	
<p>カビ毒による食品の自然汚染例</p> <p>生コーヒー豆におけるオクラトキシン汚染の主要原因菌の1種とされる。本邦での本菌群によるオクラトキシン汚染は、まだ、知られていない。</p>		<p>備考</p> <p>近年、分類体系が改訂され、<i>A. westerdijkiae</i> や <i>A. steynii</i> などの新種が記載された。pH3～10の間での発育は良好とされるが、pH2.2では緩慢となる。<i>A. westerdijkiae</i>、<i>A. steynii</i> は、共に37°Cでは発育できない。</p>	

図2 リスクプロファイル個票 (AS-4)