

表1. ニワトリ・ウシ由来*C. jejuni*供試菌株のST/CC型別構成と分離履歴

由来	菌株数	CC	%	STs*	%	分離履歴**					
						ヒト臨床	ニワトリ	ウシ	その他		
ニワトリ	61	ST-21 CC	16.4	ST-4621	6.6	-	-	-	-		
				ST-4526	4.9	0/1	■	-	-		
				ST-50	4.9	128/177	■	-	-		
				ST-45 CC	16.4	ST-3727	8.2	1/1	-	-	-
						ST-679	3.3	2/2	-	-	-
						ST-45	3.3	126/319	■	-	■
				ST-845	1.6	2/5	-	-	-		
						ST-918	9.8	5/6	-	-	
				ST-48 CC	11.5	ST-453	1.6	256/305	■	-	-
						ST-51	4.9	61/94	■	-	-
				ST-443 CC	8.2	ST-440	1.6	1/2	■	-	-
						ST-4615	1.6	-	-	-	-
				ST-574 CC	8.2	ST-305	8.2	5/8	■	-	-
				ST-353 CC	6.6	ST-4616	3.3	-	-	-	-
						ST-404	1.6	2/2	-	-	-
				ST-4052	1.6	-	-	-	■	-	-
						ST-4108	4.9	1/1	-	-	-
				ST-607 CC	6.6	ST-4600	1.6	-	-	-	■
						ST-354	3.3	30/49	■	-	-
				ST-4617	1.6	-	-	-	-	-	-
						ST-461	1.6	-	■	-	-
				ST-460	1.6	5/5	-	-	-	-	
						ST-22 CC	3.3	69/88	■	■	■
Others	14.8	ST-4623	6.6	-	-	-	-				
		ST-4389	3.3	0/2	■	-	-				
ST-4618	1.6	-	-	-	-	-	-				
		ST-4620	1.6	-	-	-	-				
ST-4622	1.6	-	-	-	-	-	-				
		ST-21	7.8	192/304	■	■	■				
ウシ	51	ST-21 CC	27.5	ST-806	15.7	4/7	-	■	■		
				ST-50	3.9	128/177	■	-	-		
				ST-42 CC	19.6	40/86	■	■	■		
				ST-22 CC	9.8	67/82	■	■	■		
				ST-61 CC	7.8	78/132	■	■	■		
				ST-48 CC	7.8	12/27	-	■	■		
				ST-403 CC	3.9	2/3	-	■	-		
				ST-257 CC	2.0	98/215	■	-	-		
				ST-283 CC	5.9	1/1	-	-	-		
				Others	15.7	ST-58	15.7	-	-	■	-

*新規ST型については太字で表記した。**ヒト臨床カラムにはヒト臨床分離株として報告された数/全登録数を記載した。他カラムでは、ヒト以外の分離株を分母として個々の由来株が占める割合を%表示した。

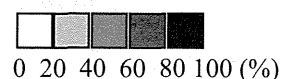


表2. 国内ヒト・動物由来*C. jejuni*供試菌株のMLSTデータ統計

遺伝子	サイズ (bp)	アレル数	G+C mol	変異率 (%)	dN/dS	Degenerate サイト数				
						-	x2	x3	x4	混合
<i>aspA</i>	477	13	34.7	51 (10.7)	0.045	45	11	5	19	10
<i>glnA</i>	477	18	34.9	18 (3.8)	0.065	15	4	1	10	0
<i>gltA</i>	402	15	34.8	12 (3.0)	0.0464	8	3	0	5	0
<i>glyA</i>	507	13	36.2	31 (6.1)	0.0574	27	8	2	14	3
<i>pgm</i>	498	23	35.7	46 (9.2)	0.0427	30	8	0	17	5
<i>tkf</i>	459	14	35.9	26 (5.7)	0.0239	22	6	2	10	4
<i>uncA</i>	489	11	38.8	73 (14.9)	0.0106	71	15	4	37	15

表3. ST-21CCに分類された*C. jejuni*株の構成

由来	株数	ST型	株数
ヒト	27	ST-50	9
		ST-8	3
		ST-21	4
		ST-1360	1
		ST-4526	7
		ST-451	1
		ST-4253	1
		ST-4614	1
		ST-4621	4
		ST-4526	3
ニワトリ	10	ST-50	3
		ST-21	4
		ST-806	8
ウシ	14	ST-50	2

表4. ST-4526型として同定された*C. jejuni*株の性状

菌株	分離年	Penner 血清型	分離地	備考
ヒト臨床分離株				
H_0002	2005	O: 2	東京都	鶏肉喫食による散発食中毒事例
H_0055	2005	O: 2	大阪府	散発事例 (原因不明)
H_0059	2005	O: 2	大阪府	散発事例 (原因不明)
H_0060	2005	O: 2	大阪府	散発事例 (原因不明)
H_0089	2006	O: 2	大阪府	鶏肉喫食による散発食中毒事例
H_0092	2006	O: 2	大阪府	散発事例(鶏肉の疑い)
H_0097	2006	O: 2	大阪府	散発事例 (原因不明)
ニワトリ由来株				
P_0016	2005	O: 2	山口県	糞便より分離
P_0017	2005	O: 2	山口県	糞便より分離
P_0053	2006	O: 2	広島県	糞便より分離

表5. ST-4526型株とNCTC11168株間で変異を示した2型分泌装置関連遺伝子

遺伝子	遺伝子産物	ORF長	変異数
Cj1471c <i>ctsE</i>	putative type II protein secretion system E protein	519	17
Cj1474c <i>ctsD</i>	putative type II protein secretion system D protein	472	6
Cj1473c <i>ctsP</i>	putative ATP/GTP-binding protein	202	3

平成 23 年度 厚労科研費「食品の安全・安心確保推進研究事業」
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研究
班

分担報告書(H22-H24 総合報告書)

生食用の国内と畜馬肉および輸入馬肉におけるザルコシステイス汚染実態調査

研究分担者: 国立感染症研究所寄生動物部 部長 野崎智義

研究協力者: 国立感染症研究所寄生動物部 主任研究官 八木田健司

平成 2000 年頃より国内で発生が報告されはじめた原因不明下痢症は、その後の全国実態調査により生鮮魚介類とならんで馬肉がその原因食品として関連することが明らかとなった。さらに病因物質に関する研究では、既知の食中毒性細菌類、ウイルスおよび自然毒が陰性とされる中で、寄生虫学的な検索の結果、孢子虫類に分類される住肉孢子虫ザルコシステイス *Sarcocystis* がその病因物質として関与することが明らかとなった。

本研究では、生食用生鮮食品の安全性確保の観点から、生食用馬肉中に存在するザルコシステイスを分子生物学的に同定し、その手法を利用して遺伝子検査法を開発し行政面で食中毒対策への貢献を図るとともに、今後の馬肉に関する食品衛生管理の研究として馬肉内ザルコシステイスの汚染実態解明を進めた。以下、各年度で概要をまとめる。

平成 22 年度は、まず食中毒残品より検出されたザルコシステイス(形態的に *S.fayeri* と同定された)を材料に、18SrDNA を部分増幅(約 1,100bp)しそのシーケンスについて BLAST 検索を行った。その結果、馬肉サンプルより得られた *S.fayeri* シーケンスはヘラジカより検出されたザルコシステイスに最も高い相同性を示した。馬に感染するザルコシステイスに関しては登録配列が存在せず、その関係は明らかではなかった。同様の 18SrDNA を利用した PCR 系は国内 3ヶ所の地方衛生研究所の協力で実証試験 validation を行い、その性能を確認した。その結果を受けて同法は暫定検査法として厚労省より通知されている。さらに *S.fayeri* の 18SrDNA シーケンス内で探索した。*S.fayeri* 特異的配列をプライマーとして定量 PCR 系を確立し、不明下痢症事例残品の *S.fayeri* 汚染量を定量化した。また市販馬肉商品の中に残品と同程度のザルコシステイスが検出される場合があることを明らかにした。

平成 23 年度は国内で生食用にと畜処理された馬肉および国外からの生食用輸入馬肉について、*S.fayeri* 汚染調査を目的として前年度開発した定量 PCR 法により *S.fayeri* 量を調べた。国内 9ヶ所の馬肉処理を行っている畜の協力を得て、41 頭の検体を調べた。馬種は軽種馬(サラブレッド)39 頭、他にポニー、道産子各 1 頭であった。輸入馬肉に関しては横浜検疫所輸入食品・検疫検査センターにて保管(輸入後冷凍保管)した生食用冷蔵馬肉 9 検体(カナダ産)を調べた。*S.fayeri* 特異的定量 PCR の結果、国内と畜馬肉では残品同等の DNA が検出されたのは軽種馬

肉中の 1 検体のみで、その汚染は検体全体ではなく限局的と考えられた。全体として食中毒事例残品より汚染度は低いことは明らかであった。一方、輸入馬肉では 7 検体で事例残品と同等あるいはそれ以上の場合が認められた。輸入馬肉においても検体である馬肉の部分により汚染の偏りがあることが示された。

平成 24 年度は、国内で消費されるカナダ以外の外国産輸入馬肉について *S. fayeri* 汚染調査を行うとともに、検出される *S. fayeri* に関して遺伝学的相違の可能性を調べた。市販ベルギー、メキシコ、アルゼンチン、ブラジル産馬肉を購入し定量 PCR を行った結果、生食用メキシコ産馬肉、またペットフード用メキシコ産馬肉で食中毒残品同等の汚染がある場合が認められた。遺伝子型別の可能性を調べるために定量 PCR 値が高い DNA 試料について ITS1 (internal transcribed spacers 1) の検索と DNA 解析を行った。既報のプライマー等を用いた PCR で ITS1 を含む DNA 増幅は可能であったが、そのシーケンス解析についてはメキシコ産馬肉株のみ取得できた。型別は制限酵素解析で行い、メキシコ産馬肉株が日本、カナダ含めた他国産馬肉と Hpa2 および Rsa1 切断パターンで異なる以外差は認められなかった。ITS1 は同一種内変異の検出に有用な分子マーカーであるが、RFLP 解析では変異が少ないことが示唆された。各国において検出される *S. fayeri* の遺伝的均一性に関してはさらに他のマーカーを利用して検討する必要がある。

H22 年度研究図表

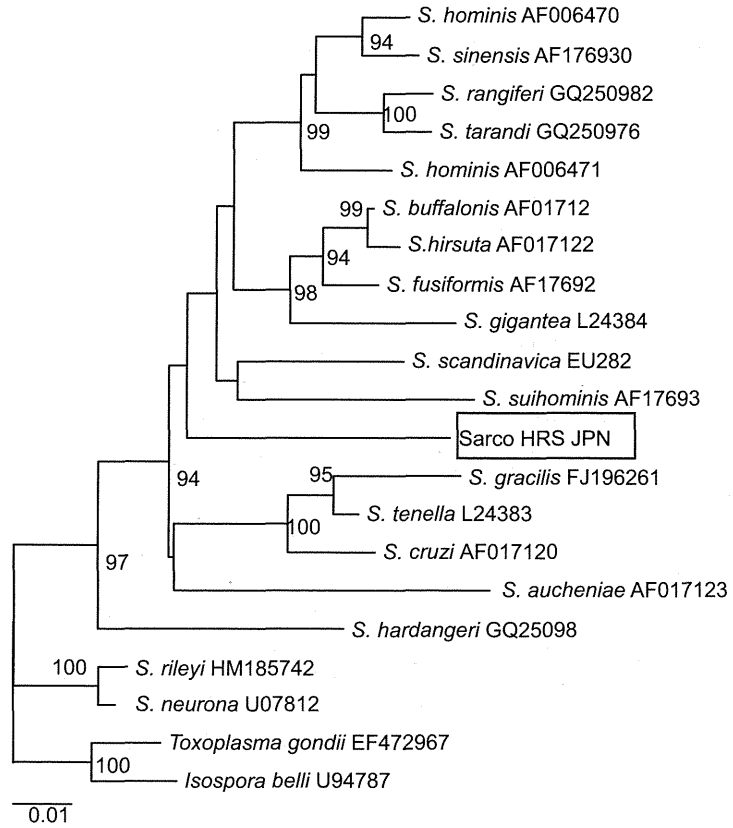


図-5、ザルコシスチス 18SrDNA シーケンスに基づく系統樹
 種名後の表示は Genbank Accession ID、NJ 法により構築、
 枝上の数字は Bootstrap 値、*Toxoplasma*、*Isospora* を out group

表-1、残品ならびに市販品に関する定量 PCR の結果

馬肉 ID	各馬肉検体における DNA 試料番号				
	1	2	3	4	5
0201	1.1x10 ⁶	1.7x10 ⁶	2.0x10 ⁶	ND	ND
0401	1.1x10 ⁷	1.3x10 ⁷	6.2x10 ⁶	ND	ND
ref 1	4.0x10 ⁵	5.8x10 ⁵	5.4x10 ⁵	ND	ND
ref 2	1.9x10 ⁶	8.3x10 ⁵	5.4x10 ⁵	ND	ND
ref 3	4.6x10 ⁵	4.2x10 ⁵	1.2x10 ⁵	ND	ND
ref 4	1.3x10 ⁴	3.5x10 ³	4.9x10 ³	1.5x10 ⁴	4.3x10 ³
ref 5	1.3x10 ⁴	3.6x10 ³	5.7x10 ⁵	2.7x10 ⁴	2.4x10 ³

表中の数値の単位はコピー数/g 肉重量、ND は検査なし

H23 年度研究図表

表-3. 喫食残品中のザルコシスティス量に基づく汚染度スコア

汚染分類		copy/μl	copy/g 肉重量
1	検出限界以下	< 1	< 1,700
2	検出/定量限界以下	1~9	1,700 ~ 1.5 x 10 ⁴
3	検出/定量	10 ~ 149	1.7 x 10 ⁴ ~ 2.5 x 10 ⁵
4	検出/定量	150 ~ 699	2.6 x 10 ⁵ ~ 1.2 x 10 ⁶
5	検出/定量(残品同等)	700 ~ 4,000	1.2 x 10 ⁶ ~ 6.8 x 10 ⁶
6	検出/定量(残品以上)	4,000 <	6.8 x 10 ⁶ <

表-4. 喫食残品中のザルコシスティス量に基づく検体馬肉の汚染度評価結果

と畜場	検体番号	DNA 試料別汚染分類				
A	1	1	2	2	2	3
	2	1	2	2	2	3
	3	1	2	2	2	3
	4	2	2	2	2	2
	5	1	1	2	2	2
B	1	2	2	2	2	3
	2	2	2	2	3	3
	3	2	2	2	3	3
	4	2	2	2	2	2
	5	2	2	2	2	3
C	1	2	2	3	3	4
	2	2	3	3	3	3
	3	2	3	3	3	3
	4	1	2	3	3	3
	5	2	2	2	2	2
	6	2	2	2	2	2
D	1	1	1	1	1	2
	2	2	2	2	2	2
	3	1	1	2	2	2
	4	1	2	2	2	2
	5	1	2	2	2	2
E	1	2	2	2	2	3
	2	2	2	2	2	3
	3	2	2	2	3	3
	4	2	2	2	2	2
	5	2	2	2	2	3
F	1	1	2	2	2	2
	2	1	1	1	2	3
	3	1	1	1	1	1
	4	1	1	2	2	2
	5	1	1	1	2	2
G	1	1	1	1	2	2
	2	2	3	3	3	4
	3	1	1	1	2	2
	4	1	1	2	2	3
	5	1	1	2	2	2
H	1	2	2	3	3	3
	2	2	2	3	3	6
	3	3	3	3	3	4
	4	2	3	3	3	4
	5	1	2	3	3	3
Canada	1	3	3	3	4	5
	2	2	3	3	5	6
	3	3	3	5	5	6
	4	4	4	5	5	6
	5	1	1	1	2	2
	6	5	5	6	6	6
	7	1	3	3	4	5
	8	4	6	6	6	6
	9	3	3	3	3	4

表-1、カナダ以外の生産国からの輸入馬肉における *S. fayeri* の定量 PCR 測定結果

検査馬肉	定量 PCR 測定値(コピー数/ml)				
	1	2	3	4	5
ベルギー産食用馬肉	2.5	2.6	55.2	136.0	179.4
メキシコ産食用馬肉	0.7	7.7	162.4	1394.5	9249.8
アルゼンチン産食用馬肉	UD	UD	1.0	2.0	26.9
メキシコ産ペット用馬肉	184.1	783.8	995.3	1851.7	2930.4
ブラジル産ペット用馬肉	0.6	1.7	58.0	102.6	352.0

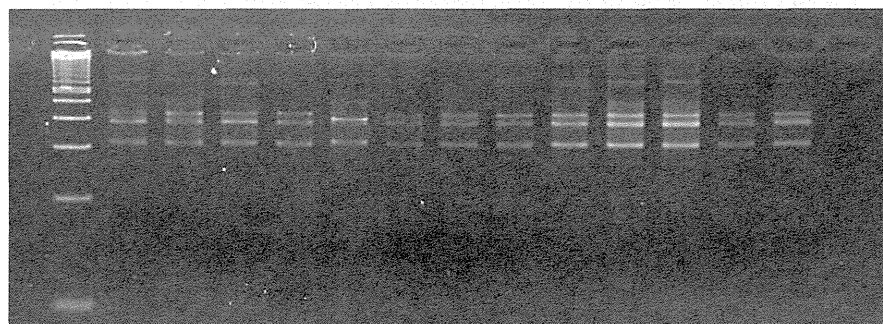


図-4、Hpa2 を用いた ITS-1 領域の制限酵素解析結果

- | | |
|-----------------|-------------|
| 1. 国内軽種馬1 | 7. 国内事例残品1 |
| 2. ベルギー(馬刺) | 8. 国内事例残品2 |
| 3. メキシコ(馬刺) | 9. 国内事例残品3 |
| 4. アルゼンチン(馬刺) | 10. 国内事例残品4 |
| 5. メキシコ(ペットフード) | 11. 国内事例残品5 |
| 6. ブラジル(ドッグフード) | 12. 国内事例残品6 |
| | 13. 国内事例残品7 |

刊行雑誌等

八木田健司、ザルコシスティス総論、病原微生物検出情報、33(6):11-12,2012

八木田健司、食品による寄生動物感染③原虫感染症(1) ザルコシスティス・クドア、防菌防黴、40(11):705-714, 2012

八木田健司、寄生虫、知って防ごう食中毒、食と健康、665、10-18、2012

山崎 浩、森嶋康之、八木田健司、食肉・野生動物の生食と寄生虫症、公衆衛生、76, 30-36, 2012

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 総合研究報告書

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
橋本ルイコ 千葉県衛生研究所
陰地 義樹 奈良県保健環境研究センター
浅野 勝佳 奈良県保健環境研究センター

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. 遺伝子塩基配列解析による同定・カビ毒産生能推定に関する研究
3. 黒コウジカビのカビ毒産生能の検討

1については、地方試験研究機関を対象にアンケートを実施し、現時点で必要な情報は何かを明らかにした。また、リファレンスセンターおよび地方拠点機関を設定し、ネットワークを形成した。危害カビに関するリスクプロファイル集を作成し、これを厚労省食中毒調査支援システム(NESFD)上に公開した。さらに、地方試験研究機関真菌担当の参加希望者を対象に「食品中のカビリスクプロファイル集」評価会を開催し、試験業務において技術向上に役立つとの評価を得た。2については、ヒトに有害性を持つ真菌のDNA抽出効率検討、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、および分子系統解析を利用した*Fusarium*属菌のカビ毒産生能推定に関する研究を行い、*Fusarium*属菌を始めとする真菌の同定・カビ毒産生能推定において新規の手法を開発することができた。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の産生性を検討し、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。*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ということが示された。

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、カビ発生により苦情食品として地方衛研での検査依頼が増加し、その情報が蓄積されている。一方、近年、地方衛研におけるカビの検査担当者の退職などにより、検査体制の弱体化の傾向にある。この様な状況の中で、国立試験研究機関と地方衛生研究所などの間で食の安全に危害を及ぼすカビの情報を、効率的かつ効果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し、ヒトへの健康被害を防止することを目的として研究を行った。

2. 真菌の遺伝子塩基配列解析による同定・カビ毒産生能推定に関する研究

カビの同定方法は、これまで形態学的手法が主であったが、形態学的差異を識別するのに経験が求められるうえ、時間を要することから、近年、簡便性・迅速性・客観性に優れた分子生物学的手法はカビの分野でも汎用されてきている。そこで、過去に日本を含む世界各地で、ヒトおよび家畜の中毒事故を起こした事例が多く、食品衛生学上重要な真菌である *Fusarium* 属菌を中心として、真菌の遺伝子塩基配列解析による同定手法の開発、およびこの結果得られた菌種間の系統関係を応用した“phylotoxigenic relationships”解析によるカビ毒産生能推定、以上を目的とした研究を行った。

3. 黒コウジカビのカビ毒産生能の検討

黒コウジカビは、食品汚染カビとして最も普遍的に認められるカビの一つである一方で、クエン酸生産や醸造などの発酵生産、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、ここに含まれる菌種は *A. niger* と形質的に共通点が多く識別が難しいため、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、フモニシン類のカビ毒産生性が相次いで報告された。そこで、醸造株および食品由来株を含む非醸造株について、フモニシンの産生の検討を加えた。

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

以下の4つの手法によって研究を行った。①各地方自治体試験研究機関（地研）に苦情食品由来カビ検査体制のアンケートを送付し、検査体制の実態やリスクプロファイルなどやネットワーク形成について要望についての調査を行い、その結果をまとめた。②ネットワークシステムのリファレンスセンターおよび地域拠点を設定し、ネットワークを構築した。③カビ毒産生性、食品からの検出頻度などを考慮して26菌種を選定し、リスクプロファイル個票を作成した。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。

③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。④地研から参加希望者を募り、「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. 真菌の遺伝子塩基配列解析による同定・カビ毒産生能推定に関する研究

以下の3つの手法によって研究を行った。①真菌からのDNA抽出方法の比較検討を行った。ヒトに危害性を持つ真菌4菌株 *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium proliferatum*, *Candida albicans*, *Malassezia furfur* を供試し、CTAB法およびDNeasy Plant Tissue Kit法を用い、さらにそれぞれの方法と菌体のビーズ破砕法の併用の有無について、比較検討した。また、得られたDNA抽出物の精製度と高分子度合いを、吸光度比率、DNA抽出物を鋳型としたPCRでの増幅の有無、アガロースゲル電気泳動像で検討した。

② *Fusarium* 属菌に対して遺伝子塩基配列の相同性（ホモロジー）による同定に適した遺伝子マーカーの特定を行った。18S rDNA, 28S rDNA D1/D2 領域, β -tubulin 遺伝子（ β -tub）およびアミノアジピン酸還元酵素遺伝子（*lys2*）の塩基配列を用いて、分離株の同定およびその同定精度比較を行った。リファレンス配列データベース用菌株として46菌株、同定対象菌株として7菌株について、GenBankデータベースから各遺伝子の塩基配列

のダウンロードおよびシーケンスを行って収集し、ホモロジーによる同定の精度比較を行った。

③ *Fusarium* 属菌のトリコテセン類を産生する菌種およびその近縁菌種32菌株について、産生性が不明な供試菌種の phylogenetic relationships 解析によるマイコトキシン産生能の有無の推定を行った。これらの菌株のrDNA, クラスタ領域, β -tub および elongation factor α 遺伝子塩基配列を用いて系統解析を行い、系統樹を構築した。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), ビューベリチン (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過去の文献を参照して確認し、マイコトキシン産生性マトリックスを作成した。

3. 黒コウジカビのカビ毒産生能の検討

チトクロームbの遺伝子配列により正確に同定された黒コウジカビについて、醸造用株10菌株 (*A. awamori*, *A. inui*, *A. foetidus*, *A. kawachi*) および非醸造用株14菌株 (*A. foetidus*, *A. niger*) 以上の合計24菌株について検討した。非醸造用株については、うち2株は食品由来株である。白米20gに水を15ml加えた培地を滅菌して調製した培地に接種し、25°Cで1週間培養した。培養後、メタノール：水（3：1）を加え、さらにポリトロンでホモジュネートし、抽出後、その濾液を試験液とした。それらの試験液について、LC/MS/MSでフモニ

シンB1・B2およびオクラトキシンAの分析を行った。

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

①77の地研を対照にアンケート配布を配布し、74機関（約96%）から回答をえた。各地研からの結果について集約を行ったところ、現状の問題点・要改善点が明らかとなった。②ネットワークシステムのリファレンスセンターを国立衛研、地域拠点を大阪府、東京都、千葉県の各地方衛研の真菌担当者に設定し、ネットワークを構築した。③26菌種（表1）のリスクプロファイル個票を作成した。その一例を図1に示した。カビによる苦情食品の検査法、カビの形態学的構造についての用語集、カビのライフサイクルの説明、食品別・分離原別索引、カビ培養に使用する培地一覧、およびカビ分離・同定実験での注意（図2～6、表2,3）、および③ 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」を構築した。②で作成したリスクプロファイル集をここにアップロードした。④「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. 真菌の遺伝子塩基配列解析による同定・カビ毒産生能推定に関する研究

① DNA 抽出収量を比較したところ、CTAB法とビーズ破碎の併用法では、菌体1gあたり454.1～2217.8 μg が抽出で

き、大量のDNA抽出が可能であることを示した。また、DNeasy Plant Tissue Kitとビーズ破碎の併用法では菌体1gあたり13.4～16.5 μg で、CTAB法とビーズ破碎の併用法と比較すると全ての菌種においてDNA抽出効率は著しく低かった（表4）。また、得られたDNA抽出物の精製度および高分子DNAの占める割合を検討したところ、いずれの菌種においても十分な精製度（表4）および比較的高分子DNAの占める割合が多いことが示された。すなわち、真菌からの大量かつ高品質なDNAの抽出に適した方法は、CTAB法とビーズ破碎の併用法であることが示された。

②食品由来分離株の同定結果を表5に示した。18S rDNAでは、供試した分離株の全てにおいて同定が不可能であった。28S rDNA D1/D2領域では、2菌株については1菌種に候補を絞ることが可能であったが、その他の5分離株については同定が不可能であった。β-tubおよびlys2では、全ての分離株で塩基配列ホモロジーを指標とした同定が可能であった。これら2遺伝子領域の塩基置換速度は早く、今回供試した近縁な菌種間の差異を識別するのに十分な塩基配列特異性が蓄積していたものと考えられた。よって、4つの遺伝子のうち、*Fusarium*属菌の分離株同定に相当であるのはβ-tubおよびlys2であることが示された。

③本検討において作成した*Fusarium*属菌の分子系統樹およびマイコトキシン産生性マトリックスをもとにphylogenetic relationships解析を行い、マイコトキシン産生能有無の推定を行った（図

7)。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、菌種系統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*属菌系統間で差があり、*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7)。これらの菌種が食品を汚染した場合には注意が必要である。

3. 黒コウジカビのカビ毒産生能の検討

醸造株と非醸造株での比較結果を表6に示した。醸造株では、全ての菌株においてフモニシンB₂、オクラトキシンAの産生性は認められなかった。醸造株はこれらのカビ毒を産生しない安全な菌種であることが示された。一方、非醸造株では、株によりオクラトキシンA、あるいはフモニシンB₂の産生が認められた。

*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、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。また、フモニシンB₂産生株には食品由来株が含まれていた。さらに、蔗糖を

添加し浸透圧を高めたCY20S培地で同様の検討をおこなったところ、コメ培地よりフモニシンB₂の産生量は上昇したことが示された(表7)。糖添加は、一般的に食品の微生物制御に用いられる。よって本検討の結果から、このカビによる汚染食品、特に糖添加食品ではフモニシン汚染の可能性があり、今後注意をはらう必要があることを示唆した。

D. 結論

地研真菌担当者を対象にしたアンケート調査により明らかとなった問題点を参考にし、ネットワークシステムを構築、およびその中心となるリファレンスセンターと地域拠点機関を設けた。また、リスクプロファイル作成対象カビとして26菌種を選び、リスクプロファイル個票を作成した。NESFDに「食品中のカビリスクプロファイル集」のネットワークシステムを構築し、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。さらに、真菌の遺伝子塩基配列解析による同定・カビ毒産生能推定に関する研究、および黒コウジカビのカビ毒産生能の検討を行った。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、システム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) M. Watanabe, K. Lee, K. Goto, S. Kumagai, Y. Sugita-Konishi, Y. Hara-Kud

- o, 2010. Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. *Journal of Food Protection*, 73, 1077-1084, 2010.
- 2) 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.
- 3) 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, et al. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. IUMS 2011. Sapporo, Hokkaido, Japan. 2011.9.
- 2) M. Watanabe, T. Yonezawa, et al. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. 45th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, United State-Japan cooperative program on Development & Utilization of Natural Resource. Tokyo, Japan. 2012.3.
- 3) 渡辺麻衣子, 小沼ルミ, 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. 第32回日本食品微生物学会学術総会, 東京, 2011.10
- 4) M. Watanabe, T. Yonezawa, et al. Application of phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species to the prediction about the potential mycotoxin-productivity. MycoRed 2012 (2012.6) (Ottawa)
- 5) 渡辺麻衣子, 米澤隆弘ら. *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一. 日本マイコトキシン学会第71回学術講演会 (2012.7) (那覇)
- 6) 渡辺麻衣子, 北山真弓ら. 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. 日本食品微生物学会第33回学術総会 (2012.10) (福岡)
- 7) 渡辺麻衣子, 大波純一ら. *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)

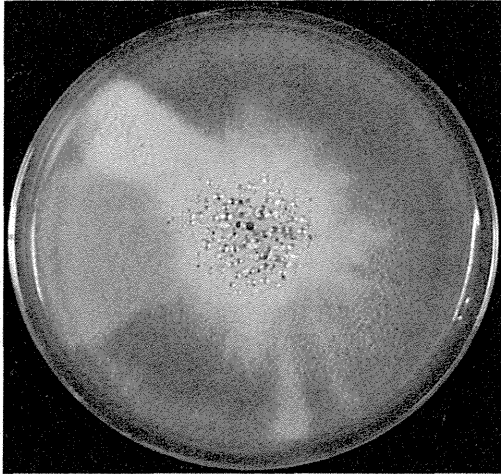
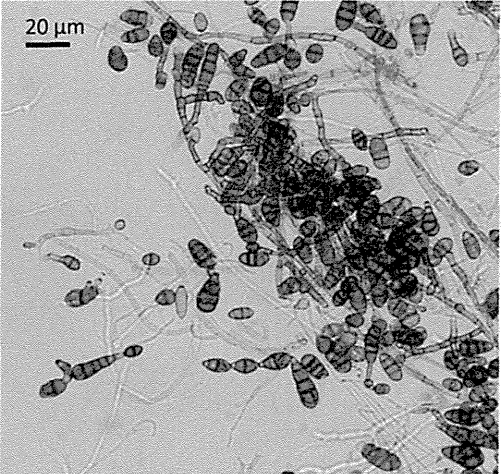
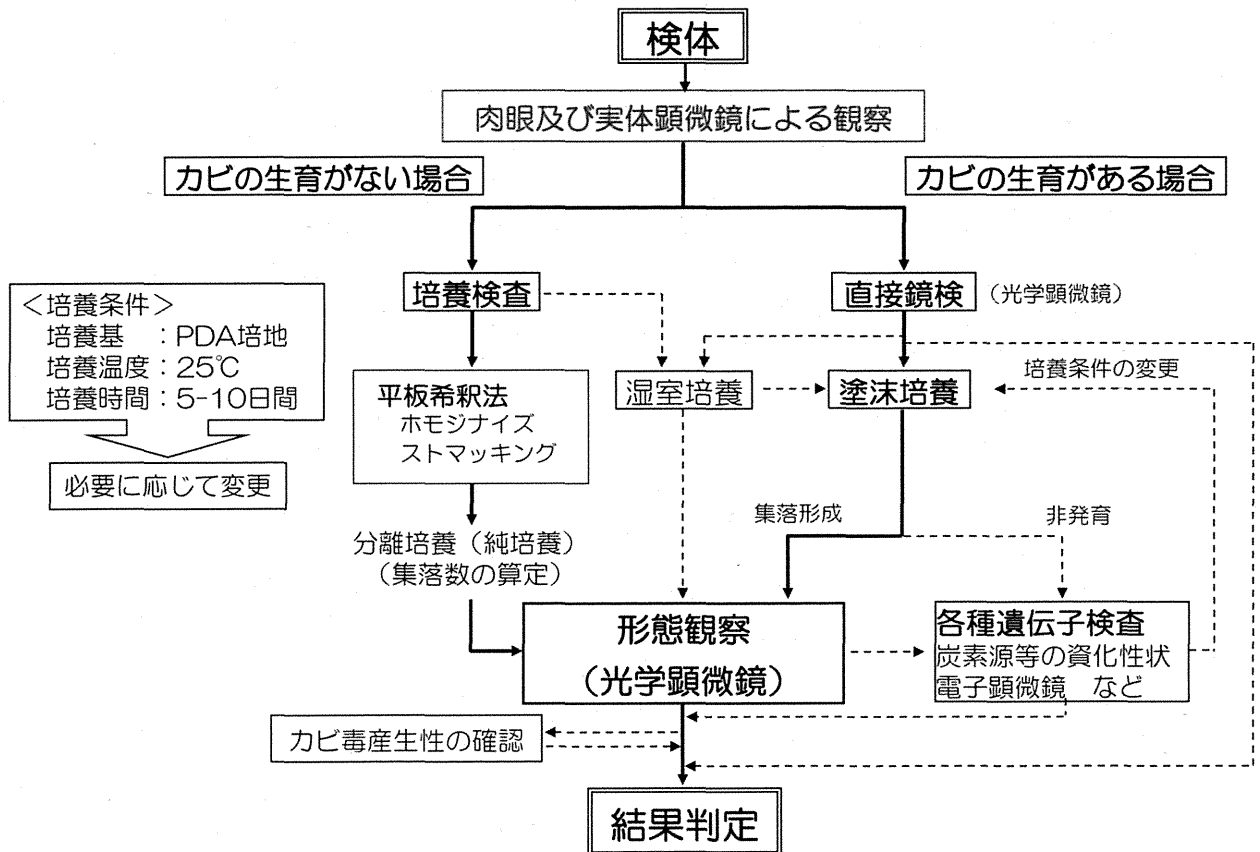
菌種名		備考(和名など)	No. AL-1
属名	アルタナリア (<i>Alternaria</i>)	種名	アルタナータ (<i>alternata</i>)
コロニー写真 (PDA培地)		光学顕微鏡写真	
			
25°C、11日間培養			
形態学的特徴 初め灰白色、後にほとんど黒色のコロニーを形成し、培地上に伸びる気性菌糸は旺盛となる。分生子は、分生子柄から、単一あるいは複数個生じる。形態は、こん棒型あるいはラケット型で、数個の隔壁を有する。多細胞からなり、しばしば数珠状に連鎖する。オリーブ褐色～淡黄褐色。分生子が離脱した分生子柄には、1～数個の離脱痕がみとめられる。		生理学的特徴 中温菌。ナシ、トマトなど広範な植物に対して病原性を有する他、メラニン様の色素をつくり、黒すす病菌としても樹木、特に常緑樹に分布する。直射日光に対して耐性がある。	
カビ毒産生性 テヌアゾン酸の他、比較的弱い毒性を有するアルタナリオールなどをつくとされている。稀にフモニシンをつくる株がある。		地理的分布、生息環境、汚染食品 世界的に分布する。植物病原菌として、トマトをはじめとする生鮮果実や多くの作物を侵害するほか、植物性基質の腐生菌としても存在するため、極めて多くの農産物に分布する。また、空中浮遊菌としても、普遍的に存在する。	
カビ毒による食品の自然汚染例 海外ではリンゴ、ヒマワリ種子などにテヌアゾン酸やアルタナリオールの汚染例が報告されているが、わが国では、これまで知られていない。この他、罹病した植物を動物の餌として与えると、動物の健康を害することがある。		備考 近年、分類体系が見直され、近接種の <i>A. tenuissima</i> と区別される流れにある。	

図1 リスクプロファイル個票



※具体的な手順については、食品衛生検査指針 微生物編 2004 (第3章 真菌)等を参照のこと

図2 カビによる苦情食品の検査法

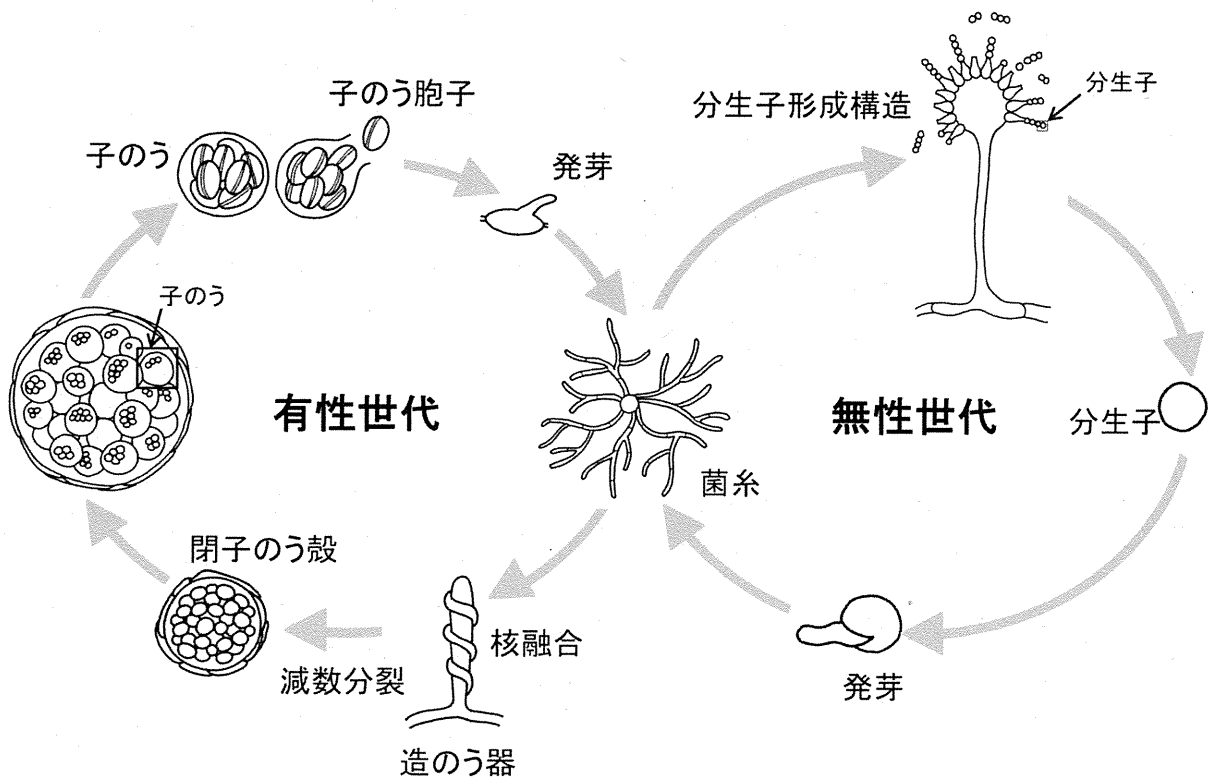
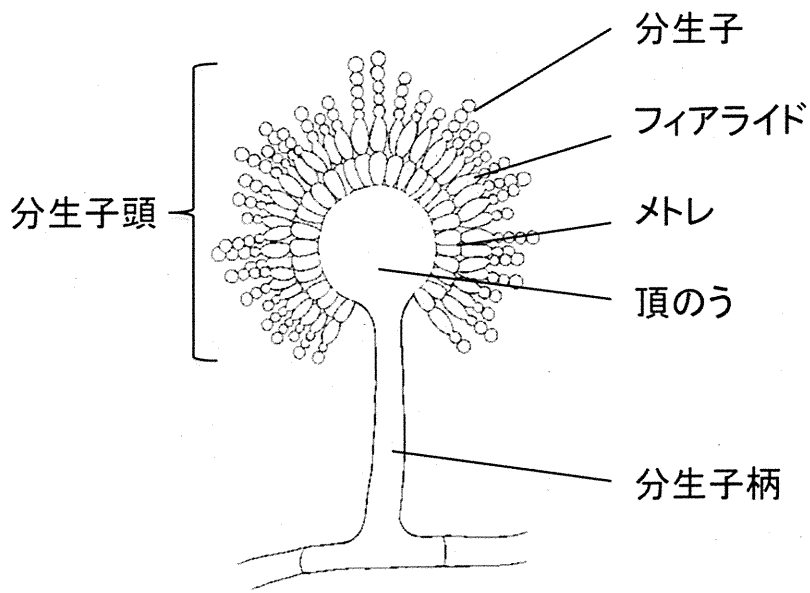
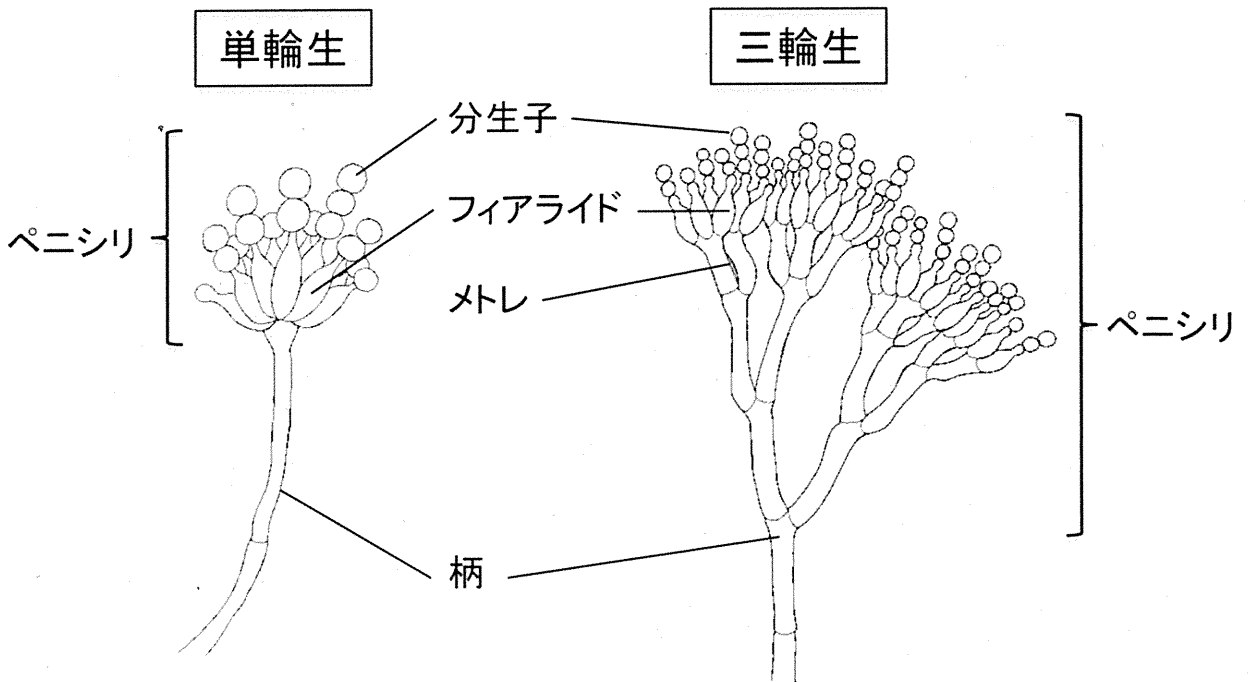


図3 カビのライフサイクル



アスペルギルスの形態学的構造



ペニシリウムの形態学的構造

図4 カビの形態学的構造

ア行						
汚水	CL-1					
カ行						
菓子類	AS-3					
果実 (乾燥)	AS-2					
果実 (生鮮)	AL-1	AS-2	AU-1	CL-1	FU-1	MU-1
	PE-2	PE-3	RH-1	TR-1		
壁	CL-1					
紙	CL-1					
かんきつ類	PE-3					
乾燥した食品 (基質)	AS-3	EU-1				
キノコ	TR-1					
空中	AL-1	CL-1				
コーヒー豆 (生)	AS-2	PE-1				
香辛料	AS-1	AS-2	EU-1	PE-1	PE-2	RH-1
工業製品	CL-1					
高糖・高塩性食品	WA-1					
穀類	AS-1	AS-2	AS-3	EU-1	FU-1	MU-1
	PE-1	PE-3	RH-1	TR-1	WA-1	
穀類 (乾燥)	AS-3	EU-1	CL-1	WA-1		
穀類 (種実)	EU-1					
穀類加工品	AS-3	EU-1	PE-1			
昆布類	EU-1					
サ行						
サラミ (ソーセージ)	AS-3					
シイタケ	TR-1					
室内環境	PE-2	WA-1				
ジャガイモ	PH-1					
ジャム	WA-1					
ジュース (加工)	AU-1					
食肉	MU-1					
食肉加工品	PE-1	PE-2	PE-3	RH-1		
常緑樹	AU-1					
醸造工場	AU-1					
植物性基質	AL-1	PH-1				
食品 (広範な)	AU-1					
食品工場内	CL-1					
飼料	CL-1					
繊維	CL-1	TR-1				
タ行						
畳	CL-1					
チーズ	MU-1	PE-2	PE-3			
直射日光下	AS-2					
貯蔵玄米	AS-1	WA-1				
貯蔵食品	CL-1					
貯蔵農産物	WA-1					
チルド	CL-1					
低温環境 (チルド)	CL-1	PH-1				

図5-1 カビの食品別、分離原別索引①

タ行							
低温流通食品	MU-1						
天井	CL-1						
低水分活性食品	WA-1						
佃煮	WA-1						
動物	PE-3	WA-1					
土壌 (菌)	AS-3	CL-1	PE-2	PE-3	PH-1	TR-1	
	WA-1						
トマト	AL-1	PH-1					
塗料	PH-1						
ナ行							
ナシ	PE-3						
ナッツ類	AS-1	AS-2	EU-1	MU-1	PE-1	RH-1	
乳製品農産物 (広範な)	MU-1	RH-1	AS-2	PE-1	PE-3	TR-1	
	AL-1	AS-1					
ハ行							
ハウスダスト	AS-3	EU-1	PE-3	WA-1			
バター	PH-1						
発酵食品	RH-1						
パン	AS-2						
ビーフジャーキー	AS-3						
皮革	CL-1						
ヒト	PE-3	WA-1					
干物	AS-3	PE-1					
干し魚	PE-1						
マ行							
マーガリン	PE-2						
マーマレード	WA-1						
豆類	EU-1	PE-1	PE-3	TR-1			
ミネラルウォーター	PE-2						
木材	TR-1						
モモ	PE-3						
ヤ行							
野菜	AS-2	CL-1	FU-1	MU-1	PE-2	RH-1	
	TR-1						
油剤	CL-1						
油糧種子	AS-1						
ヨーグルト	MU-1						
洋菓子	EU-1						
羊糞	WA-1						
羊毛	PH-1						
ラ行							
落花生	AS-1						
リンゴ	PE-3						
レーズン	AS-2						
冷蔵庫内	CL-1						
冷凍・冷蔵食品	AU-1	PE-1	PE-3	PH-1			
ワ行							
和菓子	EU-1						

図5-2 カビの食品別、分離原別索引②