

図2. 平成27年度T-2トキシンの汚染実態調査の結果

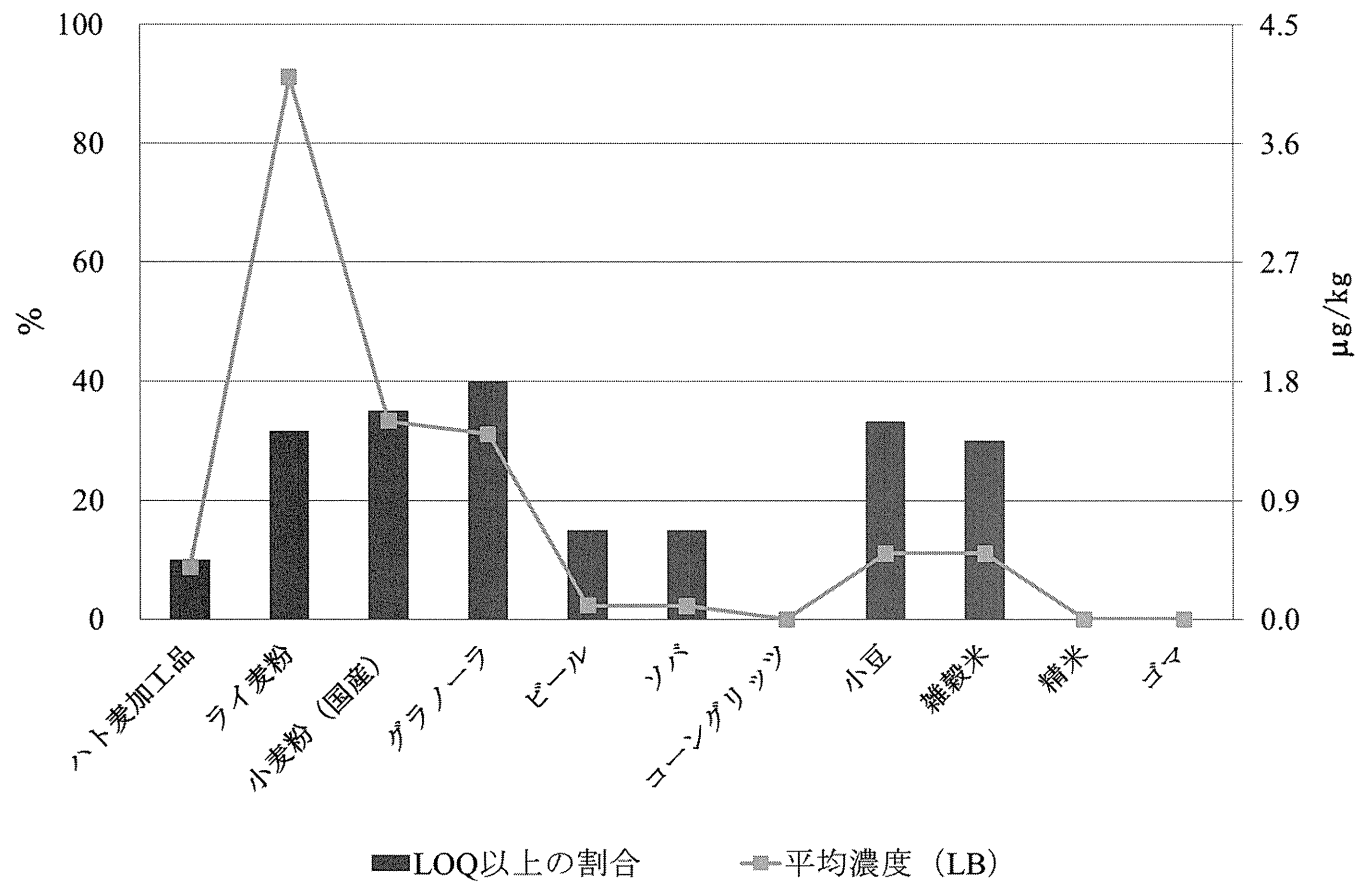


図3. 平成27年度HT-2トキシンの汚染実態調査

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)

分担研究報告書

国内流通食品における *Fusarium* 属菌の分布状況

研究分担者	渡辺 麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部
研究協力者	作田 庄平	東京大学大学院	農学生命科学研究科
	高橋 治男	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部
	吉成 知也	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部
	小西 良子	麻布大学	生命・環境科学部
	中村 和真	麻布大学	生命・環境科学部

研究要旨

近年の食品におけるカビ毒汚染調査では、小豆においてトリコテセン系マイコトキシンタイプ A の高濃度・高頻度の汚染が確認されている。しかし、小豆における汚染度が高い原因については明らかにされておらず、産生菌の分布も不明である。そこで、本研究では、食品のカビ毒汚染原因菌検出法の確立、国内流通小豆におけるフザリウムトキシン産生菌の分布についての検討、および小豆におけるカビ毒産生至適条件の検討を行った。

国産小豆および外国産小豆を用い、*Fusarium* 属菌の分離および同定を行った。また、分離株を角田培地で培養し、LC-TOFMS を用いて培地中のカビ毒産生量を定性的に評価した。さらに、本研究において分離された T-2 トキシン産生株を試験的に小豆に接種し、複数の温湿度条件下で 14 日から 60 日間培養後、T-2 および HT-2 トキシンの合計濃度をイムノクロマト法によって測定した。その結果、外国産小豆では *Fusarium* 属菌は 1 株も検出されなかった一方で、国内産小豆の *Fusarium* 属菌陽性検体率は全ての産地で 72.7-100% と高かった。各小豆検体における *Fusarium* 属菌検出状況を検討したところ、T-2 トキシンが検出された北海道産小豆 2 検体において *F. sporotrichioides* が検出され、その分離株から角田培地における T-2 トキシンの産生が確認された。その他の地域の国産小豆では、T-2 トキシン産生菌は検出されなかった。さらに、小豆における T-2 および HT-2 トキシン産生に最も適している温湿度は、20-25°C で相対湿度 95% 程度の高湿度条件であった。これらのことから、国産小豆を汚染する汚染原因菌は *F. sporotrichioides* であること、また本菌は北海道地方に多く分布し、地域間で分布の偏りが存在する可能性があること、北海道地方の小豆栽培条件が小豆の T-2 および HT-2 トキシン汚染を促進する可能性があり、摂食による健康リスクにおいて産地間に差が有ることが示唆された。

A. 研究目的

*Fusarium* 属が産生するカビ毒のうち、代表的なものとしてトリコテセン系マイコトキシン、ゼアラレノン、フモニシンが知られ、これらは総称してフザリウムトキシンとよばれる。*Fusarium*

属菌は、土壌菌類として世界中に広く分布し、草・木本植物の根、茎、枝幹、種子などに寄生し、根腐れ病、茎枯れ病、枝枯れ病、胴枯れ病、果実腐敗病の原因になる。しばしば萎凋、立枯れなど全身的な病徴に発展することも多い。*Fusarium* 属

菌の生活環をみると、土壌中には病原菌と区別できない腐生性の菌も混在しているが、カビ毒産生菌の多くは麦やトウモロコシなどの作物の栽培期に合わせて侵入し、そのまま種実の貯蔵変敗まで関与する<sup>1)</sup>。トリコテセン系マイコトキシンは、その構造によりタイプ A から D の 4 つのタイプに分類され(Fig 1)、タイプ A には、T-2 トキシンや HT-2 トキシン、ジアセトキシスシルペノール (DAS)、ネオソラニオール (NES)、タイプ B にはニバレノールやデオキシニバレノールが含まれる。トリコテセン系マイコトキシンの自然汚染は中緯度から高緯度の広範囲の地域で栽培された麦類およびトウモロコシなどの穀類を中心に世界中で頻繁に起きており、北米、ヨーロッパ、アジア、オセアニアなど、世界中で生産された穀類からの検出例が多数報告されている<sup>1,2)</sup>。トリコテセン系マイコトキシン産生菌には *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae* などが知られている<sup>1)</sup>。

過去に世界で発生した、トリコテセン系マイコトキシンの摂取によるヒトまたは家畜での食中毒事例としては、以下のものが挙げられる。1940年代に旧ソビエト連邦のシベリアで ATA 症 (alimentary toxic aleukia : 食中毒性無白血球症) により患者の 30~80%が死亡した<sup>3)</sup>。この原因となった穀物から *Fusarium sporotrichioides* が検出され、産生される毒性画分の主要素が T-2 トキシンであること、T-2 トキシンを投与したサルが同様の症状を示したことから T-2 トキシンが原因物質と推定されている<sup>1)</sup>。インドのカシミール地方では 1987 年、カビに汚染された小麦粉から作ったパンを摂取したために中毒が発生した。この原因となった小麦粉からデオキシニバレノール、ニバレノール、T-2 トキシン、アセチルデオキシニバレノールが検出されている。我が国でも、1949年と1965年に北海道で、1946年および1955年に東京で中毒が発生し、トリコテセン系マイコトキシンが原因と考えられている<sup>1,4)</sup>。ゼアラレノン産生菌としては *Fusarium culmorum*<sup>5)</sup>などが知られている。以上のようなカビ毒を産生する *Fusarium* 属菌は食品衛生学上重要なカビであり、また菌種によって産生するカビ毒が異なるため、種レベルの同定が重要となる<sup>6)</sup>。我が国において

はこれまで、*Fusarium graminearum* や *Fusarium oxysporum* については、農作物や圃場における地域別分布状況が調査されているが<sup>7,8)</sup>、ある特定の地域や作物を対象としており、*Fusarium* 属菌分布の全体像は調査されていない。また、近年実施された流通食品のフザリウムトキシン汚染実態調査では、国産の小豆において、T-2 トキシン、HT-2 トキシン等が国産の小麦や大麦に比べての高濃度・高頻度の汚染が報告されている<sup>9,10)</sup>。小豆の一大産地は北海道十勝地方であり、全体の約 8 割を占めている<sup>11)</sup>。しかし、小豆の栽培・貯蔵においてどのような温湿度条件でカビ毒が産生されやすいかは知られていない。小豆における *Fusarium* 属菌について、生産地の地域別に質的・量的な分布の差異を比較検討することで、*Fusarium* 属菌の生態やカビ毒産生性と関連した、*Fusarium* 属菌の汚染によるリスクを明らかにする必要がある。そこで本研究では、国産品を中心とする小豆について、*Fusarium* 属菌の検出を試み、国内流通小豆における生産地ごとの *Fusarium* 属菌の分布状況および検出された菌株のカビ毒産生性を調査し検討した。

## B. 研究方法

### (1) 供試検体

事前にカビ毒を測定した国産小豆 35 検体 (平成 24 年度産 9 検体, 平成 25 年度産 3 検体, 平成 26 年度産 22 検体)、対照として外国産小豆 4 検体を供試した。詳細は Table 1, Fig. 2 に示した。

### (2) 食品からの菌株分離

食品から菌株を分離する際には、Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Ager (DRBC:OXOID, イギリス) 培地、および Potato Dextrose Agar (PDA : 栄研化学株式会社, 東京都) 培地を使用した。これらの寒天培地には Chloramphenicol (Cloramphenicol:和光純薬工業会社, 大阪府) を 100mg/L の割合で添加した。小豆検体は全粒のまま、70%エタノールで 30 秒間洗浄し、即座に純水で 30 秒間洗浄することによって、食品表面に付着した真菌を殺菌した。滅菌ろ紙上に検体を置き余分な水分を除去した後、培養に供した。DRBC 平板上に小豆の 5 粒ずつ置き、合計 100 粒

を 25°C で 7 日間培養した (Fig. 3). 培養後, 発育したコロニーを目視によって観察し, *Fusarium* 属菌様のコロニー性状を示すことを確認した菌体を PDA 平板培地に釣菌して分離した後, 25°C で 1~2 週間培養した. 得られた分離菌株を PDA 斜面培地に接種し, 25°C で 1~2 週間培養した後, 8°C で保存した.

### (3) 分離菌株の同定

*Fusarium* 属菌では, 複数の菌種が混合感染している場合があるため, 正確に純培養するため, 同定前に単孢子分離<sup>12)</sup>を行った. 分離株をカーネーションリーフ寒天 (CLA) 培地に接種し, 25°C で 14 日間培養した. 培養後孢子形成が確認された CLA 寒天培地に滅菌 PBS を 1ml 加え, 孢子懸濁液を作製した. 適当な濃度に希釈した孢子懸濁液の希釈液を 2% 寒天平板上に 50  $\mu$ L または 100  $\mu$ L 塗布し, 25°C で 12~24 時間培養した. 培養後, 実体顕微鏡を用いて寒天平板を観察し, 発根が確認された 1 孢子を PDA 平板上に釣菌し, 25°C 7 日間培養した (Fig. 4). 培養後, 得られたコロニーを PDA 斜面培地に接種して 25°C 7 日間培養し, 8°C で保存した. 菌株の同定は, 以下に示す形態学的同定手法と分子生物学的同定手法を併用して行った.

#### ① 形態学的同定法

PDA 平板上のコロニー性状, およびプレパラートの顕微鏡観察像を指標として行った. PDA 培地に PDA 斜面培地上のコロニーを接種し, 25°C で 7 日間培養した. 培養後, 寒天平板上に発育したコロニーの表裏の色や菌糸の性状を目視で観察した. また, *Fusarium* 属菌は, PDA 培地上では孢子形成能に乏しい場合がしばしばある. CLA 培地は *Fusarium* 属菌の孢子形成を促進することから, 分離株を CLA 培地にも接種し, 25°C で 14 日間培養し, 形成された孢子形状および孢子形成様式を顕微鏡で観察した. これらの形態学的指標を用いて, Nelson らの方法<sup>12)</sup>を参照し, 同定を行った.

#### ② 分子生物学的同定法

染色体 DNA の抽出法として, PDA 斜面培地上のコロニーを 2.0 ml マイクロチューブに入れた Potato Dextrose Broth (PDB: Becton, Dickinson and Company, USA) 1ml に接種後, 25°C で 1

晩培養した. 培養後, 4°C, 15,000 rpm で 10 分間遠心分離にかけ, 上澄み液を取り除き, 菌体のみを得た. 菌体からの DNA 抽出はシカジーナス DNA 抽出試薬 (関東化学, 東京都) または, SDS 抽出法<sup>13)</sup>を用いて行った.

$\beta$ -tubulin<sup>14)</sup>の塩基配列を決定した. PCR 反応は, TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社, 滋賀県) を用い, 添付の実験マニュアルに従って行った. この際フォワードプライマーとして Btu-F\_F01 (5'-CAGACCGGTCAGTGCGTAA-3') を, リバープライマーとして Btu-F\_R01 (5'-TTGGGGTTCGAACATCTGCT-3') を用いた. 反応条件は, 94°C · 3 分で熱変成させた後, 94°C · 30 秒, 60°C · 40 秒, 72°C · 50 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い, 最後に 72°C · 5 分の伸長反応を行った. この後, アガロースゲル電気泳動によって遺伝子増幅の有無を確認した. PCR 産物は, ExoSPO-IT (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社, 東京都) の純水 5 倍希釈液を用い, 添付の実験マニュアルに従って行った. シークエンス反応は, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社, USA) を用い, 添付の実験マニュアルに従って行った. この際, プライマーとして Btu\_F-F01 または Btu\_F-R01 を用いた. 反応条件は 96°C · 60 秒で熱変性させたあと, 96°C · 10 秒, 50°C · 5 秒, 60°C · 240 秒を 1 サイクルとして 25 サイクルの反応を行った. シークエンス反応物の精製は, Applied Biosystems 社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る方法によって行った. 精製後, Applied Biosystems 3730 XL genetic analyzer (Applied Biosystems 社) によって塩基配列を決定した.

遺伝子塩基配列の解析は, 以下の手順によって行った. 得られたシークエンスデータは, ATGC (ゼネティックス社, 東京都) を用いてマルチプルアライメントを行い, rDNA の部分塩基配列を得た. 得られた塩基配列は, National Center for Biotechnology Information (NCBI) で提供している Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用い, GenBank 登録配列との相同性検索を行った. この検索結果を参照し, 菌種の同定を行った.

#### (4) 液体培地培養法によるマイコトキシン産生性の確認

単孢子分離を行い純培養した分離株を用いて、トリコテセン系マイコトキシンタイプAに属するT-2トキシン，HT-2トキシン，ジアセトキシスシルペノール(DAS)，ネオソラニノール(NES)の産生性を確認するための培養および培養液のLC-TOF/MSによる分析を行った (Fig. 5)。最初に，前培養を行った。Potato Dextrose Broth (PDB:Becton,Dickinson and Company, USA) に Chloramphenicol を 100mg/L の割合で添加した培養液を遠沈管に 15ml~20ml ずつ分注し，前培養に用いた。ここに PDA 斜面培地上の菌体を接種後，25℃で 3 日間振とう培養した。その後，トリコテセン系マイコトキシンの産生に適していることが報告されている角田培地<sup>14)</sup> (水 1 L に対し，硝酸ナトリウム 2g，リン酸水素二カリウム 1 g，塩化カリウム 0.5 g，硫酸マグネシウム 0.5 g，酵母エキス 2.5g，ポリペプトン 5g，スクロース 50 g) を本培養に用いた。角田培地を 200ml 三角フラスコに 100ml ずつ分注し，ここに前培養液を 100 $\mu$ L ずつ接種し，25℃で 7 日間静置培養した。培養後，1.5ml 容マイクロチューブに培養液 500  $\mu$ l と等量の酢酸エチルを加え，激しく攪拌し，遠心分離した。上清の酢酸エチル層を回収し，同様の操作を繰り返して抽出を行った。2 回の酢酸エチル抽出液を合わせて，窒素流下乾固した。乾固物に 100  $\mu$ l のアセトニトリルを加えて超音波処理によって懸濁後，900  $\mu$ l の蒸留水を加えてよく混ぜた。遠心分離後，上清を分析に用いた。

#### (5) 小豆培養法によるマイコトキシン産生性の確認

(4)の実験において最も T-2 トキシンの産生性が高かった分離株を用いて，培養の温湿度条件を変更した場合に小豆における T-2 トキシン産生性の変化を確認するための比較実験を行った。用いた培養条件は，温度 5℃・湿度 65%，15℃・65%，15℃・95%，20-25℃・95%，20-25℃・78%の計 5 条件である。培養に用いた小豆は，LC-MS/MS による分析で T-2 トキシンの自然汚染がないことを確認した後，ガス滅菌を行い，実験に供した。

滅菌した直径 12 cm ガラスシャーレ内に，金槌で軽く粉碎した滅菌小豆を 100 g 入れた。培養物は各条件について 2 回繰り返した。最初に前培養として，PDA 平板培地に分離株を接種し 25℃7 日間培養した。その後，菌叢の先端部分をコルクボーラーで寒天ごと打ち抜き，この寒天片をガラスシャーレ内の小豆に接種し，上述の各温湿度条件で 2 週間から 60 日間静置培養を行った。2 週間または 60 日間培養後，小豆を 50 g 取り出し，ミキサーで完全に粉碎した。粉碎物を 5 g 分取し，二倍量の 70%メタノールと振り混ぜて遠心分離後，メタノール層を採取し，マイコトキシン抽出液とした。抽出液は，イムノクロマト法を利用した測定キット (ROSA T2/TH2 quantitative test for feed and grain; Charm Sciences Inc., USA) を用いて T-2 トキシンの産生性を定量した。測定方法は，添付の説明書に従って行った。

### C. 研究結果

#### (1) 輸入および国産小豆における *Fusarium* 属菌陽性検体率

輸入および国産小豆における *Fusarium* 属菌陽性検体率を Table2-(1)に示した。輸入小豆では供試した 4 検体中 0 検体 (0%)，国産小豆では供試した 35 検体中 29 検体 (82.9%) において *Fusarium* 属菌が陽性となった。これらの *Fusarium* 属菌陽性検体率を比較したところ，国産小豆の陽性率は輸入小豆よりも有意 ( $p < 0.01$ ) に高く，国産小豆は輸入小豆と比較して *Fusarium* 属菌に汚染されていることが示唆された。

国産小豆について，各産地別に *Fusarium* 属菌が 1 株以上検出された検体の割合 (陽性検体率) を Table2-(2)に示した。北海道地方産では供試した 17 検体中 15 検体 (88.2%)，東北/関東/中部地方産では 3 検体中 3 検体 (100%)，近畿/中国地方産では 11 検体中 8 検体 (72.7%)，および九州地方産では 4 検体中 4 検体 (100%) において，*Fusarium* 属菌が陽性となった。4 つの産地の間で差は無く，全ての産地において国産小豆の *Fusarium* 属菌汚染発生検体の頻度は経常的に高い水準にある傾向があったことが明らかとなった。

各収穫年度において，*Fusarium* 属菌陽性検体

率を Table2-(3)に示した。2012 年度産では供試した 13 検体中 8 検体 (61.5%)、2013 年度産では 3 検体中 3 検体 (100.0%)、および 2014 年度産では 23 検体中 18 検体 (78.3%) において *Fusarium* 属菌が陽性となった。これらの *Fusarium* 属菌陽性検体率を比較したところ、有意差は無く、国産小豆の *Fusarium* 属菌汚染頻度は 3 年間を通じて高い水準にあった傾向が示された。

白・赤小豆における *Fusarium* 属菌陽性検体率を Table2-(4)に示した。白小豆では供試した 3 検体中 2 検体 (66.6%)、赤小豆では供試した 36 検体中 27 検体 (75.0%) において *Fusarium* 属菌が陽性となった。これらの *Fusarium* 属菌陽性検体率を比較したところ、有意差は無く、本研究において供試した白小豆と赤小豆検体の間では、*Fusarium* 属菌に対する感受性は同等に高いことが示された。

## (2) 国産小豆における *Fusarium* 属菌陽性粒率の比較

各供試検体における *Fusarium* 属菌陽性粒率を Fig. 6 に示した。最も高い陽性粒率であった供試検体は、近畿・中国地方産 27\_AD19 の 37%であり、続いて北海道産 27\_AD16 の 26%であった。4 つの産地における陽性粒率の傾向を比較すると、北海道および近畿・中国地方において *Fusarium* 属菌陽性粒率が 25%以上を示したのは 2 検体あり、*Fusarium* 属菌に高率に汚染されていた検体は複数確認された。東北・関東・中部地方、九州地方においては、北海道および近畿・中国地方で確認された程度と同等に高率な *Fusarium* 属菌汚染濃度を記録した検体は確認されなかった。

## (3) 検出された *Fusarium* 属菌の菌種と *Fusarium* 属菌優占率

各小豆検体から検出された *Fusarium* 属菌種を Table 3 に示した。さらに、産地別の菌種内訳 (*Fusarium* 属菌優占率) を Fig. 7 に示した。検出された菌種は、北海道では *Gibberella fujikuroi* species complex (GFSC) (Fig. 10) および *Fusarium equiseti/incarnatum* species complex (FIESC) (Fig. 11) の合計が 64%を占め、また *Fusarium sporotrichioides* (Fig. 12) が 11%と

比較的高い割合を示した。東北・関東・中部地方および近畿・中国地方では FIESC がそれぞれ 80%、91%を占めた。九州地方では *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) (Fig. 13) および FIESC の合計が 80%を占めた。北海道とその他の地方を比較すると、北海道では *F. sporotrichioides* が 3 検体合計 15 粒から検出されたが、他地方では 1 粒からも検出されなかった。また、北海道では *F. avenaceum* (Fig. 14)、*F. chlamydosporum* (Fig. 15)、*F. camptoceras* (Fig. 16) といった菌種も検出されたが、他産地では 1 粒からも検出されず、北海道に特異的な特徴として多様な *Fusarium* 属菌が検出されることが確認された。各小豆検体における *F. sporotrichioides* の検出状況とフザリウムトキシン検出状況 (Table 3) とを比較すると、T-2 および HT-2 トキシンが検出され、さらに当該検体から *F. sporotrichioides* が検出されたのは、北海道産 2 検体であった。

2012 年度から 2014 年度産小豆における産年次別の *Fusarium* 属菌優占率を Fig. 8 に示した。2012 年度では、FIESC および *F. oxysporum* が計 77% を占めた。2013 年度では、*F. sporotrichioides* および FGSC が計 68% を占めた。2014 年度では GFSC および FIESC が計 82% を占めた。各小豆検体における *F. sporotrichioides* の検出状況とフザリウムトキシン検出状況 (Table 3) とを比較した。2012 年度産の 13 検体のうち、T-2 または HT-2 トキシンは 10 検体で確認されたが、*F. sporotrichioides* は 1 粒からも検出されなかった。フザリウムトキシン検出状況 (Table 3) では、供試 3 検体のうち、26\_AD02 においてトリコテセン系マイコトキシンタイプ A の高汚染が確認された。2014 年度産の 23 検体のうち、27-AD\_13、14、19 のように ZEN が検出された検体は確認されたが、トリコテセン系マイコトキシンの高汚染検体は確認されなかった。これらのことから、本研究に供試した小豆検体においては、産年によって検出される *Fusarium* 属菌に異なる傾向が見られた。

白小豆 (25-AD\_13、26-AD\_02 および 26-AD\_03) における検出された *Fusarium* 属菌優占率を Fig. 9 に示した。FIESC および *F. sporotrichioides* が

81%を占めた。Table 3 から、供試した白小豆においてトリコテセン系マイコトキシンタイプ A の高汚染が確認され、検出された *Fusarium* 属菌優占率においても、品種（赤小豆・白小豆）によって検出される *Fusarium* 属菌に異なる傾向が見られた。

#### (4) 国産小豆から分離された *Fusarium incarnatum/equiseti* species complex のトリコテセン系マイコトキシンタイプ A の産生性

2012 年度国産小豆から分離された計 15 株の *Fusarium incarnatum/equiseti* species complex (FIESC) の角田培地におけるカビ毒産生性を Table 4 に示した。供試した 15 株のうち各マイコトキシンの産生性が確認されたのは、DAS では 7 株 (46.7%)、NES では 3 株 (20.0%) であり、T-2 トキシン、HT-2 トキシンの産生性が確認された株は 1 株もなく、DAS および NES を産生するが、T-2 および HT-2 トキシンは産生せず、本菌種は T-2 および HT-2 トキシンの産生能を持たないということが示唆され、その後の産年次の小豆検体では、本菌種を用いての T-2 および HT-2 トキシン産生能は試験しないことにした。

#### (5) 国産小豆から分離された *F. sporotrichioides* のトリコテセン系マイコトキシンタイプ A の産生性

国産小豆から分離された計 15 株の *F. sporotrichioides* の角田培地におけるカビ毒産生性を Table 5 に示した。北海道産白小豆 26-AD\_02 からは 12 株が検出され、そのうち、各マイコトキシンの産生性が確認された株数は、T-2 トキシンが 9 株、DAS が 6 株であった。北海道産赤小豆 27-AD\_01 からは 2 株が検出され、そのうち各マイコトキシンの産生性が確認された株数は、T-2 トキシンが 2 株、DAS が 2 株、NES が 2 株であった。北海道産赤小豆 27-AD\_02 からは 1 株が検出され、ZEN、T-2 トキシン、DAS および NES のいずれの産生性も確認されなかった。すなわち、これら 15 株のうち各マイコトキシンの産生性が確認されたのは、T-2 トキシンでは 11 株 (73.3%)、DAS では 8 株 (53.3%)、NES では 2 株 (13.3%) であり、HT-2 トキシンの産生性が確認された株

は 1 株もなく、T-2 トキシンおよび DAS を産生する株の頻度は高い傾向にあった。国産小豆 3 検体から検出された計 15 株の *F. sporotrichioides* において、本研究で検討した 4 種類のマイコトキシンの産生性の有無に関して有意差はなかったが、*F. sporotrichioides* のマイコトキシン産生性の分離株間での相違があることが示唆された。

#### (6) 分離菌株の小豆における各温湿度条件での T-2 および HT-2 トキシン産生性

(5) の実験において、T-2 トキシン産生性が高いことを確認した 26-AD\_02 からの分離株 *F. sporotrichioides* を用いた。小豆における各温湿度条件での T-2 トキシン産生性を Table 6 に示した。*F. sporotrichioides* を接種し培養後の小豆中の T-2 および HT-2 トキシン合計濃度は、培養 14 日目では、気温 5°C/相対湿度 65% で培養後は 0.45 ppm、15°C/65% で培養後は 0 ppm、15°C/95% で培養後は 1.2 ppm、20-25°C/78% で培養後は 0.75 ppm、20-25°C/95% で培養後は 8.95 ppm であった。同じ菌接種小豆の培養をさらに継続し、培養 60 日目では、5°C/65% で培養後は 0.45 ppm、15°C/65% で培養後は 0.25 ppm、15°C/95% で培養後は 0.1 ppm、20-25°C/78% で培養後は 0 ppm、20-25°C/95% で培養後は 0 ppm であった。本研究で検討した温湿度 5 条件では、培養 14 日目における 20-25°C/95% での産生性が最も高く、産生性が確認されなかった条件は、培養 14 日目における 15°C/65%、培養 60 日目における 20-25°C/78% および 20-25°C/95% であった。

したがって、温湿度条件の変動によって *F. sporotrichioides* の T-2、HT-2 トキシン産生性に相違が生じ、また高湿度条件において T-2 トキシン産生性が高まる可能性が示唆された。

## D. 考察

国内に流通する小豆における *Fusarium* 属菌の分布の違いを明らかにするために、各収穫年度別、輸入・国産別、および白小豆・赤小豆別に、*Fusarium* 属菌の陽性検体率および陽性粒率、および検体を汚染する *Fusarium* 属菌の優占菌を比較した。

その結果、国産小豆の *Fusarium* 属菌陽性検体



率は輸入小豆よりも有意 ( $p < 0.01$ ) に高く、国産小豆は輸入小豆と比較して *Fusarium* 属菌に汚染されていることが示唆された (Table 2-(1)). その理由の一つとして、国内と海外で栽培される小豆の栽培種の違いによる小豆含有成分の差が考えられる。北海道地方では、主な栽培種としてエリモシヨウズが普及している<sup>15)</sup>。一方で、中国における主な栽培種は天津小豆である<sup>16)</sup>。エリモシヨウズと天津小豆を比較すると、天津小豆では”渋”と呼ばれるタンニンおよびサポニンなどの含有量が多く<sup>15)</sup>、これらの成分の影響によって、植物病原菌である *Fusarium* 属菌の発育が抑制された<sup>17)</sup>と考えられる。しかしながら、カナダなど北米では主としてエリモシヨウズが栽培されており<sup>16)</sup>、カナダ産小豆のフザリウムトキシンと *Fusarium* 属菌汚染が少なかった理由としては考えにくく、栽培種以外の要因の関与も考えられた。本邦では農作物へのポストハーベスト農薬の使用は禁止されているが、アメリカ、中国をはじめ外国産作物では許可されており、農作物に用いる農薬使用量は全体的に国産品と比べて多い傾向があることが知られる。実際に、中国産の緑茶においてメタミドホス等の残留農薬が検出された事例がある<sup>18)</sup>。栽培中に使用した農薬またはポストハーベスト農薬の影響から、植物病原菌である *Fusarium* 属菌の感染・増殖が抑えられた可能性が考えられた。しかし、各国の農作物における農薬の使用量等については情報が不足し不明な点が多い。今後、供試検体の残留農薬を計測する等、国外産および国内産小豆における使用農薬に関する情報を収集し、*Fusarium* 属菌の分布との関連性を検討していく必要が考えられた。

また、国産小豆における *Fusarium* 属菌陽性検体率を産地別に比較したところ、北海道、東北/関東/中部、近畿/中国、九州地方の間で差は無く、国産小豆で *Fusarium* 属菌汚染が発生する頻度は経常的に高い水準にある傾向にあることが明らかとなった (Table 2-(2)). 小豆に活着している *Fusarium* 属菌の本邦における網羅的な分布を明らかにするために、北海道、東北・関東・中部、近畿・中国および九州地方の *Fusarium* 属菌陽性粒率および検出された *Fusarium* 属菌の優占率を比較検討した。 *Fusarium* 属菌陽性粒率では、4

つの地域間で有意な差は無かったが、陽性粒率が10%以上を示す検体が北海道および近畿・中国地方においてのみ複数検体確認され (Fig. 6)、これら2つの地域産の小豆は他の地域と比較して高濃度に *Fusarium* 属菌に汚染されている傾向があることが確認された。しかし、*Fusarium* 属菌の優占率をみると、北海道地方では T-2 および HT-2 トキシン産生菌である *F. sporotrichioides* が11%の割合で検出されたが、その他の地方では *F. sporotrichioides* は検出されず、*Fusarium* 属菌陽性粒率が北海道地方同様に高かった近畿・中国地方では FIESC が91%と非常に高率に検出され (Fig. 7)、菌種の地理的分布には偏りがある傾向にあることが確認された。また、供試検体から検出されたフザリウムトキシンの汚染原因菌を明らかにするため、各供試検体から検出されたフザリウムトキシンと *Fusarium* 属菌の検出状況を比較し (Table 3)、小豆産地別に検討すると、T-2 トキシンが高濃度に検出された検体において *F. sporotrichioides* が検出されたのは北海道地方産小豆のみで確認され、その他の地方産小豆では T-2 トキシン産生菌は検出されず、T-2 トキシンの検出濃度も低かった。さらに、本研究において北海道産小豆から分離された *F. sporotrichioides* から、液体培地および小豆に接種した場合に HT-2 トキシンまたは T-2 トキシンの産生性が確認され (Table 5 および 6)、一方で北海道地方以外で高頻度に検出された、少数ながら過去に T-2 トキシン産生性の報告がある FIESC からは、HT-2 トキシンおよび T-2 トキシン産生性は全く確認されず (Table 4)、*F. sporotrichioides* が北海道産小豆の HT-2 トキシンおよび T-2 トキシン高濃度汚染の原因菌であることが強く示唆された。したがって、国内流通小豆においては、*Fusarium* 属菌の地理的分布に産地特異性がある可能性があり、さらにはこの特異性が、T-2 および HT-2 トキシン汚染濃度にも産地間で差異を生じさせる原因となる可能性が考えられた。これらのことから、国内流通小豆においては、産地によってトリコセシン系マイコトキシンタイプ A、特に T-2 トキシンの汚染リスクが異なることが示唆された。この偏りが生じる理由としては、産地間での気候や真菌を含む生物の自然生態などの違いの影響と考えられ、要因

について今後の検討が必要である。

また、本研究において検討を行った 2012 から 2014 年度にかけて、国産小豆の *Fusarium* 属菌汚染発生検体の頻度は経常的に高い水準にある傾向があった (Table 2-(3)) もの、収穫年度によって検出された菌種の優占率が異なる傾向にあることが示された (Fig. 8)。2012 年度産においてはトリコテセン系マイコトキシンタイプ A の高汚染が確認された検体においても、*F. sporotrichioides* は検出されておらず、*Fusarium* 属菌自体が 1 株も検出されていない小豆検体も複数存在した (Table 3)。産年次によって検出された菌種の傾向が異なった理由として、小豆検体の収穫から菌分離実験に供するまでの間に水分活性が低下したことが挙げられる。2012 年度産小豆検体から真菌分離実験を行った時期は、収穫後半年以上後であり、2013 年および 2014 年度産においては収穫後 3 カ月以内であった。*F. sporotrichioides* は低温を好み、相対湿度 88% が最適条件であることが知られる<sup>19)</sup>。そのため、2012 年度の供試検体では、収穫後保管中に、水分活性が低下し、高水分活性条件下を好んで発育する *F. sporotrichioides* が死滅したために分離ができなかったと考えられた。しかし 2014 年度産小豆に関しては、2013 年度産小豆と同様に、収穫期後、真菌分離実験は 4 カ月以内に行ったことから、*Fusarium* 属菌の死滅による影響は比較的少なかったと思われ、これとは別の要因の関与もあると考えられた。

そこで、小豆を含む他の農作物について、*Fusarium* 属菌分布の年次変動について考察した。本邦において小麦から検出された FGSC の分布に年次変動があることが確認されている<sup>20)</sup>。また、多種類の農作物において実施されたフザリウムトキシン汚染実態調査において、各種マイコトキシンの検出傾向には年次変動があることが示されており<sup>10)</sup>、これらの農作物を汚染する *Fusarium* 属菌の菌種や菌量にも年次変動があると考えられた。したがって、本研究における菌叢の年次変動は、多くの農作物で生じている状況と同様、自然変動によるものと十分に考えられる。

また、小豆品種間における *Fusarium* 属菌の分布の差異を明らかにするために、赤小豆・白小豆の *Fusarium* 属菌陽性検体率、陽性粒率および

*Fusarium* 属菌の優占率を比較検討した。本研究において供試した白小豆と赤小豆検体の間では、*Fusarium* 属菌陽性検体率および陽性粒率は同様に高く (Table 2-(4) および Fig. 6)、*Fusarium* 属菌に対する感受性は同等に高いことが示されたが、*Fusarium* 属菌の優占率においては、白小豆では *F. sporotrichioides* が 24% の割合で検出され (Fig. 9)、それらの T-2 トキシン産生性は分離菌株のうち 75% と高率に確認された (Table 5)。さらに、白小豆 3 検体中 1 検体で、全供試検体中で最も高い 121.1 ppb の HT-2 トキシン汚染が確認されている (Table 3)。これらのことから、白小豆は赤小豆と比較してトリコテセン系マイコトキシンタイプ A 産生菌とそのフザリウムトキシンに汚染されやすい傾向にある可能性が考えられ、小豆品種間においてこれらの汚染リスクに差があることが示唆された。この差異が生じた理由の大きな要因の一つとして、小豆種皮の色素に含まれるアントシアニンの関与が考えられる<sup>23)</sup>。アントシアニンはフラボノイドの一種で、色調は赤紫色を呈する。白小豆の色素成分は明らかにされていないが、白色や黄白色の品種が多いことから、アントシアニンは含まれていないと考えられている<sup>24)</sup>。一方、近年では品種改良によりアントシアニンを含む黒トマトや紫トマトなどの開発が進んでいる。紫トマトは、普通のトマトと比較してカビが生えにくく、腐敗しにくいという結果が報告されており、これは、アントシアニンが持つ抗酸化作用がカビを抑制し、軟化を防いでいるためと考えられている<sup>24)</sup>。以上のことから、アントシアニンを持たない白小豆はカビに対する抵抗性が低い品種であり、本研究における品種間の差違は、アントシアニンの含有の有無が一つの要因となったと考えられた。カビに対する抵抗性は、カビ毒産生菌への感染に続くカビ毒汚染と大きく関与することから、小豆における高濃度フザリウムトキシン汚染と深くかわる可能性があり、今後は、小豆におけるアントシアニンのカビ発育抑制に関する有効性を検証していく必要があると考えられた。

小豆の栽培時・倉庫保管時の温湿度条件は HT-2 トキシンまたは T-2 トキシン産生性に影響を及ぼすか否かを検討するために、分離菌株を小豆に接種し、各温湿度条件で培養した場合の HT-2 トキ

シンまたは T-2 トキシン産生量を比較検討した。その結果、最も HT-2 トキシンまたは T-2 トキシン産生性が高かった条件は 20・25℃/95%、産生性が確認されなかった条件は 15℃/65℃であった (Table 6)。温度条件では低温 (5℃)を含む 3 条件すべてから T-2 トキシンおよび HT-2 トキシン産生性が確認されたが、95%と高湿度条件であれば 20℃から 25℃の温度条件のほうが産生性はより高くなる傾向が示された。小豆の最適発育温度は 20℃から 25℃とされており<sup>25)</sup>、国産小豆の一大産地である北海道十勝地方の小豆栽培時の平均相対湿度は 78.7%である<sup>21)</sup>。よって、北海道地方の小豆栽培環境においては HT-2 トキシンまたは T-2 トキシンの汚染リスクが有り、降雨などにより高湿度条件になった際は更に汚染リスクが高くなることが示唆された。また、小豆の倉庫保管は 5℃から 15℃、相対湿度 65%から 70%の間で行われている<sup>26)</sup>。本研究の結果から、低温・低湿度保管時においても T-2 トキシン汚染リスクはあり、95%程度の高湿度条件にさらされた場合には更に汚染リスクが高くなることが示唆された。また、培養 60 日目において T-2 トキシンおよび HT-2 トキシンの汚染量が減少される可能性が示唆された。この要因としては、培養中において菌株が均一に発育しなかった可能性や、小豆の含有成分によって T-2 および HT-2 トキシンが別の配糖体 (マスクドマイコトキシン) となった可能性が考えられた。マスクドマイコトキシンは、生体内に取り込まれると腸内細菌等によってカビ毒を遊離するという報告があることから、食品衛生学上問題となっている<sup>27)</sup>。そのため今後は、配糖体の分析や n 数を増やした更なる検討が必要であることが考えられた。これらのことから、北海道産小豆の栽培時に HT-2 トキシンおよび T-2 トキシン産生性の *F. sporotrichioides* の感染を受ける可能性が有り、HT-2 トキシンおよび T-2 トキシンの汚染リスクを軽減させるためには、保管時には低温を保っていたとしても相対湿度 65%未満に保っておく必要があることが明らかとなった。

なお、本研究では *F. sporotrichioides* 分離株からの HT-2 トキシンの産生性は確認されなかった (Table 5) が、小麦から検出された *F. sporotrichioides* で人工培地において HT-2 トキシ

ンの産生性が確認されたという報告が複数ある<sup>1,28)</sup>。さらに、小麦に *F. sporotrichioides* を接種し、15℃で 7 日間培養すると T-2 トキシンよりも HT-2 トキシンが産生されたという報告があり<sup>29)</sup>、培地成分を変更する、または小麦等の植物体に接種して培養した場合に HT-2 トキシン産生性を発揮する可能性があると考えられた。これらのことから、今回の培養条件では HT-2 トキシン産生性は確認されなかったが、今後、HT-2 トキシン産生に適した培養条件を検討すれば、HT-2 トキシン汚染についても知見が得られることが期待された。小豆検体から検出された *F. sporotrichioides* および FIESC の DAS および NES の産生性についても検討した結果、両方の菌種においてもそれぞれ DAS が約 5 割の菌株で、また NES が約 1~2 割の菌株で、産生性が確認された (Table 4 および 5)。2012 年および 2013 年度産小豆検体の一部においては DAS および NES の汚染実態調査が実施され、16 検体中 2 検体から DAS が、1 検体から NES が、低濃度ながらも検出された (Table 3)。したがって、国内流通小豆ではトリコテセン系マイコトキシンタイプ A のうち DAS および NES の高濃度汚染も発生するリスクはあると考えられ、今後は DAS および NES の汚染実態調査を継続していく必要があると考えられた。

## E. 結論

フザリウムトキシンに高濃度で汚染されていることが知られる輸入および国産小豆について、フザリウムトキシン汚染の原因菌の特定を目的として、フザリウムトキシンおよび *Fusarium* 属菌の汚染状況、分離株のフザリウムトキシン産生性を同時に検討した。その結果、国内に流通する小豆の *Fusarium* 属菌の分布、および HT-2 トキシンまたは T-2 トキシンを中心としたフザリウムトキシンの汚染リスクにおいては、輸入・国内産の違い、産地、産年次、小豆品種に起因したと思われる偏りが存在することが明らかとなった。今後、小豆から受けるヒトのフザリウムトキシンの摂取リスクに注視しつつ、より多検体を供試した検討を継続する必要がある。さらにはこの偏りが生じる原因とメカニズムを解明し、汚染を軽減させるための研究を実施する必要があると考えられた。

## 参考文献

- 1) 宇田川俊一, 田端節子, 中里光男. (2002) マイコトキシン. 中央法規. 31-38
- 2) 西内巧, 木村真, 佐藤和弘 (2015) ムギ類赤かび病菌が産生するトリコテセン系かび毒の植物における作用機構と低減化へのアプローチ. マイコトキシン. 65:143-147
- 3) 熊谷進. (2008) カビ毒の毒性:未解決の課題. マイコトキシン. 58:15-21
- 4) 芳澤宅實. (2003) トリコテセン系マイコトキシンによるヒトの中毒事例. マイコトキシン. 53:Vol. 2:113-118
- 5) Sugiura, Y. (2000) Cereals and zearalenone-producing *Fusarium* species. *JSM Mycotoxins*. 50:125-128
- 6) 斎藤初雄. (2009) フザリウムトキシン (フザリウム毒素). 微生物遺伝資源利用マニュアル. 25
- 7) 一戸 正勝, 高鳥 浩介, 倉田 浩. (1973) オオムギ, コムギ穀粒における糸状菌分布. 菌叢研究所研究報告. 10: 627-636.
- 8) 勝部 和則. (1999) 日本産 *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* 菌糸和合性群の地理的分布および圃場内個体群構造. 日本植物病理学会報. 65:563-568
- 9) Yoshinari, T., Takeuchi, H., Aoyama, K., et al. (2014) Occurrence of four *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 toxin, and HT-2 toxin, in wheat, barley, and Japanese retail food. *Journal of Food Protection*. 77(11):1940-6.
- 10) 局博一ら. (2013) 食品汚染カビ毒の実態調査ならびに生体毒性影響に関する研究. 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), 平成 22 年度~24 年度 総合研究報告書. 1-19.
- 11) 農林水産省. 昨況調査. (2015) 確報 (統計表一覧) (2015 年 12 月 21 日アクセス) [http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_kome/#r](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/#r)
- 12) Marasas, W. F. O, Nelson, E. Paul., T. A Toussoun. (1984) *Toxigenic Fusarium Species*. The Pennsylvania State University Press. United States of America.
- 13) Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., et al. (2010) Rapid and Effective DNA Extraction Method with Bead Grinding for a Large Amount of Fungal DNA. *Journal of Food Protection*. 73:6:1077-1084.
- 14) Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., et al. (2011) Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. *J Sci Food*. 13:2500-4
- 15) 北海道立中央農業試験場. (2000) 小豆のタンニン含量の変動要因と食味 (渋味) に及ぼす影響. 平成 12 年度北海道農業試験会議資料. 1-19
- 16) 北海道立中央農業試験場 独立行政法人農業生物資源研究所. (2004) DNA 分析による小豆品種の識別. (2015 年 12 月 21 日アクセス) [http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna\\_manual/san05.pdf](http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna_manual/san05.pdf)
- 17) Tanaka, T., Ueda, N., Shinohara, H., et al. (1996) C-Glycosidic Ellagitannin Metabolites in the Heartwood of Japanese Chestnut Tree (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.). *Chem. Pharm. Bull.*, 44:2236-2242
- 18) 神奈川県衛生研究所. (2003) 食品汚染物残留調査結果 (平成 14 年度) 研究報告. (2015 年 12 月 21 日アクセス) [http://www.eiken.pref.kanagawa.jp/004\\_chousa/04\\_research/files/33\\_d\\_03.pdf](http://www.eiken.pref.kanagawa.jp/004_chousa/04_research/files/33_d_03.pdf)
- 19) Domsch, K., H., und Gams, W.: Pilze (1970) Domsch, K. H., und Gams, W.: Pilze aus Agrarböden. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1970. 217 Seiten, 140 Abbildungen. Ganzleinen DM 48. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 125:261
- 20) Suga, H., Karugia, G., W, Ward., T, et al. (2008) Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology*. 98:159-166.
- 21) 国土交通省. 気象庁. (2015) 過去の気象データ検索 (2015 年 12 月 21 日アクセス) [http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php?prec\\_no=51&block\\_no=47636](http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php?prec_no=51&block_no=47636)

- 22) 勝部 和則. (2001) ホウレンソウ萎ちよう病に関する研究. 岩手県農業研究センター研究報告 2:1-60
- 23) 遠藤 繁. (1997) 製麺適性に関する小麦粉成分. 日本食生活学会誌. 8:32-35
- 24) Zhang, Y., Butelli, E., Stefano. R., et al. (2013)  
Anthocyanins Double the Shelf Life of Tomatoes by Delaying Overripening and Reducing Susceptibility to Gray Mold. *Current Biology*, 23(12):1094-1100
- 25) 堀江武. (2004) 作物栽培の基礎(農学基礎セミナー). 農山漁村文化協会.
- 26) 株式会社流通システム研究センター. (2004) 新版 農作物の輸送と貯蔵の実用マニュアル.
- 27) 中川博之. (2015) マスクドマイコトキシンの概要と現状について. (2016年2月17日アクセス)  
<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kai20151022ks1&fileId=320>
- 28) Bocarov, S., Jacevic, V., Resanovic, R. D, et al. (2007) Optimization of laboratory conditions for biosynthesis of type a Trichothecenes. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*. 632. 4:57. 044:497
- 29) Nazari, L., Pattori, E., , Terzi, V., , Morcia, C., et al. (2014) Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides*. *Food Microbiology*. 39:1-96

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 櫻井啓太、半井李果、志垣敬祐、杉浦義紹、本田三緒子、宮原彩花、吉成知也、小林直樹、小西良子. 貯蔵した九州産玄米の真菌フローラ変化とカビ毒産生について. 日本マイコトキシ

学会第 79 回学術講演会. 2015.07.

- 2) 吉本優里、渡辺麻衣子、吉成知也、高橋治男、小西良子、寺嶋 淳. 輸入小麦におけるフザリウムトキシシン産生菌の分布に関する研究. 日本マイコトキシシン学会第 79 回学術講演会. 2015.07.

- 3) 橋本ルイコ、中川博之、橋本一浩、小田尚幸、川上裕司、渡辺麻衣子、北岡洋平、陰地義樹、横山耕治、高橋治男. 本邦ワイナリーから分離されたフモニシン産生 *Fusarium* 属菌の性状と接種試験. 日本マイコトキシシン学会第 79 回学術講演会. 2015.07.

- 4) Maiko Watanabe. Study on distribution of trichothecens-producing *Fusarium* isolated from adzuki beans. 50th Session of the Joint UJNR Panel on Toxic Microorganisms. Tokyo, 2016. 01.

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許所得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

Table 1. Tested samples of adzuki beans

Sample No.	Variety of adzuki bean	Production area	Harvest year	Condition of adzuki bean	
1	25-AD_09	Red adzuki	Yamagata Pre.	2012	Marketed product
2	25-AD_10	Red adzuki	Kumamoto Pre.	2012	Marketed product
3	25-AD_11	Red adzuki	China	2012	Marketed product
4	25-AD_12	Red adzuki	Canada	2012	Marketed product
5	25-AD_13	White adzuki	Hokkaido	2012	Marketed product
6	25-AD_14	Red adzuki	Hokkaido	2012	Marketed product
7	25-AD_15	Red adzuki	China	2012	Marketed product
8	25-AD_16	Red adzuki	Hokkaido	2012	Marketed product
9	25-AD_18	Red adzuki	Hokkaido	2012	Marketed product
10	25-AD_19	Red adzuki	Hokkaido	2012	Marketed product
11	25-AD_20	Red adzuki	Canada	2012	Marketed product
12	25-AD_21	Red adzuki	Chiba Pre.	2012	Marketed product
13	25-AD_22	Red adzuki	Kumamoto Pre.	2012	Marketed product
14	26-AD_01	Red adzuki	Hokkaido	2013	Marketed product
15	26-AD_02	White adzuki	Hokkaido	2014	Marketed product
16	26-AD_03	White adzuki	Okayama Pre.	2014	Marketed product
17	27-AD_01	Red adzuki	Hokkaido	2014	Marketed product
18	27-AD_03	Red adzuki	Hokkaido	2014	Marketed product
19	27-AD_04	Red adzuki	Hokkaido	2014	Marketed product
20	27-AD_06	Red adzuki	Nagano Pre.	2014	Marketed product
21	27-AD_12	Red adzuki	Okayama Pre.	2014	Marketed product
22	27-AD_13	Red adzuki	Hyogo Pre.	2014	Marketed product
23	27-AD_14	Red adzuki	Hokkaido	2014	Marketed product
24	27-AD_15	Red adzuki	Hokkaido	2014	Marketed product
25	27-AD_16	Red adzuki	Hokkaido	2014	Marketed product
26	27-AD_17	Red adzuki	Oita Pre.	2014	Marketed product
27	27-AD_18	Red adzuki	Oita Pre.	2014	Marketed product
28	27-AD_19	Red adzuki	Hyogo Pre.	2014	Marketed product
29	27-AD_02	Red adzuki	Hokkaido	2014	Marketed product
30	27-AD_20	Red adzuki	Hyogo Pre.	2014	Marketed product
31	27-AD_21	Red adzuki	Hyogo Pre.	2014	Marketed product
32	27-AD_22	Red adzuki	Kyoto Pre.	2014	Marketed product
33	27-AD_23	Red adzuki	Hyogo Pre.	2014	Marketed product
34	27-AD_24	Red adzuki	Hyogo Pre.	2014	Marketed product
35	27-AD_25	Red adzuki	Kyoto Pre.	2014	Marketed product
36	27-AD_26	Red adzuki	Hyogo Pre.	2014	Marketed product
37	27-AD_27	Red adzuki	Hokkaido	2014	Non-marketed, non-selected <sup>*1</sup>
38	27-AD_28	Red adzuki	Hokkaido	2014	Non-marketed, selected <sup>*2</sup> , good condition <sup>*3</sup>
39	27-AD_29	Red adzuki	Hokkaido	2014	Non-marketed, selected, bad condition <sup>*4</sup>

<sup>\*1</sup>Before selection of beans by machines.

<sup>\*2</sup>After selection of beans by machines.

<sup>\*3</sup>Conforming beans after selection.

<sup>\*4</sup>Rejected beans after selection.

Table2. Positive sample rate of *Fusarium* spp.

(1) Imported/domestic adzuki beans

Origin	Sample number	Number of positive sample (%)
Imported	4	0( 0.0%)
Domestic	35	29(82.9%)

P<0.01

(2) Production areas of adzuki beans

Production area	Sample number	Number of positive sample (%)
Hokkaido	17	15(88.2%)
Tohoku/Kanto /Cyubu	3	3( 100%)
Kinki/Cyugoku	11	8(72.7%)
Kyusyu	4	4( 100%)

(3) Harvested years of adzuki beans

Harvested year	Sample number	Number of positive sample (%)
2012	13	8(61.5%)
2013	3	3(100%)
2014	23	18(78.3%)

(4) White/red adzuki beans

Origin	Sample number	Number of positive sample (%)
White adzuki	3	2(66.6%)
Red adzuki	36	27(75.0%)

Table 3. Concentration levels of *Fusarium* toxins and *Fusarium* isolates in tested samples of adzuki beans

Sample No.	Concentration (ppb)					<i>Fusarium</i> species (number of isolates)	
	ZEN	T-2	HT-2	DAS	NES		
1	25-AD_09	37.45	0.32	0.85	ND	ND	FIESC <sup>*3</sup> (1)
2	25-AD_10	2.63	0.29	ND <sup>*1</sup>	ND	ND	FIESC (2) <i>F. proliferatum</i> (2)
3	25-AD_11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	25-AD_12	4.35	ND	1.21	ND	ND	ND
5	25-AD_13	103.3	0.43	1.17	ND	ND	ND
6	25-AD_14	60.51	4.24	7.32	0.62	0.18	FIESC (4) <i>F. oxysporum</i> (1)
7	25-AD_15	1.42	0.35	0.45	ND	ND	ND
8	25-AD_16	55.12	0.77	1.48	ND	ND	GFSC <sup>*4</sup> (1) <i>Fusarium</i> sp. (1)
9	25-AD_18	40.78	0.28	0.77	ND	ND	<i>F. oxysporum</i> (2) <i>F. avenaceum</i> (1) <i>F. camptoceras</i> (1)
10	25-AD_19	84.09	0.96	102.6	ND	ND	<i>F. oxysporum</i> (4) FIESC (4) <i>Fusarium</i> sp. (1)
11	25-AD_20	0.82	0.25	0.53	ND	ND	ND
12	25-AD_21	ND	ND	ND	ND	ND	FIESC (1)
13	25-AD_22	ND	ND	ND	ND	ND	FIESC (1)
14	26-AD_01	53.7	ND	ND	ND	ND	<i>F. chlamyosporum</i> (2)
15	26-AD_02	41.08	24.08	122.7	0.68	ND	FIESC (6) <i>F. sporotrichioides</i> (12) FGSC <sup>*5</sup> (7) <i>F. camptoceras</i> (1)
16	26-AD_03	3.14	ND	ND	ND	ND	FIESC (23) FGSC (2)
17	27-AD_01	3.40	0.53	2.04	NT <sup>*2</sup>	NT	GFSC (3) <i>F. sporotrichioides</i> (2) FIESC (1) <i>F. avenaceum</i> (1)
18	27-AD_03	16.16	0.39	ND	NT	NT	FGSC (3) GFSC (3) FIESC (4) <i>F. avenaceum</i> (2)

\*<sup>1</sup>Not detected. \*<sup>2</sup>Not tested.

\*<sup>3</sup>*Fusarium incarnatum/equiseti* species complex.

\*<sup>4</sup>*Gibbelleria fujikuroi* species complex.

\*<sup>5</sup>*Fusarium graminearum* species complex.



Table 3 continued. Concentration levels of *Fusarium* toxins and *Fusarium* isolates in tested samples of adzuki beans

Sample No.	Concentration (ppb)					<i>Fusarium</i> species (number of isolates)	
	ZEN	T-2	HT-2	DAS	NES		
19	27-AD_04	ND	0.40	1.17	NT	NT	FIESC (3) GFSC (3)
20	27-AD_06	ND	ND	ND	NT	NT	FIESC (2) GFSC (1)
21	27-AD_12	33.6	ND	ND	NT	NT	FGSC (4) FIESC (4)
22	27-AD_13	22.55	0.41	0.44	NT	NT	FIESC (13)
23	27-AD_14	41.07	2.26	0.65	NT	NT	FIESC (11) FGSC (5) GFSC (4) <i>F.avenaceum</i> (1)
24	27-AD_15	2.35	ND	ND	NT	NT	FIESC (1) GFSC (1)
25	27-AD_16	13.13	1.05	5.13	NT	NT	GFSC (23) FGSC (3)
26	27-AD_17	ND	ND	ND	NT	NT	FIESC (1) <i>Fusarium</i> sp. (1)
27	27-AD_18	16.46	ND	0.50	NT	NT	FGSC (7) FIESC (1)
28	27-AD_19	67.67	ND	ND	NT	NT	FIESC (36) GFSC (1)
29	27-AD_02	4.93	ND	ND	NT	NT	FIESC (1) GFSC (1) <i>F. sporotrichioides</i> (1)
30	27-AD_20	ND	ND	ND	NT	NT	FIESC (4)
31	27-AD_21	0.83	ND	ND	NT	NT	ND
32	27-AD_22	ND	ND	ND	NT	NT	ND
33	27-AD_23	ND	ND	ND	NT	NT	FIESC (5)
34	27-AD_24	ND	ND	ND	NT	NT	FIESC (1) GFSC (1)
35	27-AD_25	0.56	ND	ND	NT	NT	ND
36	27-AD_26	ND	ND	ND	NT	NT	ND
37	27-AD_27	NT	NT	NT	NT	NT	ND
38	27-AD_28	NT	NT	NT	NT	NT	GFSC (1)
39	27-AD_29	NT	NT	NT	NT	NT	GFSC (11) FIESC (6)

\*<sup>3</sup>*Fusarium incarnatum/equiseti* species complex.

\*<sup>4</sup>*Gibbelleria fujikuroi* species complex.

\*<sup>5</sup>*Fusarium graminearum* species complex.

Table 4. Mycotoxin-productivity of *Fusarium incarnatum/equiseti* species complex isolated from domestic adzuki beans in liquid medium.

Sample No.	Variety of adzuki bean	Production area	Positive rate of mycotoxin-productive strain			
			T-2	HT-2	DAS	NES
25-AD_09	Red adzuki	Yamagata Pref.	0/1	0/1	0/1	0/1
25-AD_10	Red adzuki	Kumamoto Pref.	0/2	0/2	2/2	2/2
25-AD_14	Red adzuki	Hokkaido	0/5	0/5	1/5	0/5
25-AD_19	Red adzuki	Hokkaido	0/5	0/5	3/5	0/5
25-AD_21	Red adzuki	Chiba Pref.	0/1	0/1	0/1	0/1
25-AD_22	Red adzuki	Kumamoto Pref.	0/1	0/1	0/1	0/1
Total			0/15	0/15	7/15	3/15

Table 5. Mycotoxin-productivity of *Fusarium sporotrichides* isolated from domestic adzuki beans in liquid medium

Sample No.	Variety of adzuki bean	Production area	Positive rate of mycotoxin-productive strain			
			T-2	HT-2	DAS	NES
26-AD_02	White adzuki	Hokkaido	9/12	0/12	6/12	0/12
27-AD_01	Red adzuki	Hokkaido	2/2	0/2	2/2	2/2
27-AD_02	Red adzuki	Hokkaido	0/1	0/1	0/1	0/1
Total			11/15	0/15	8/15	2/15

Table 6. Total concentration of T-2+HT-2 toxin-productivity of *Fusarium sporotrichioides* on whole adzuki beans.

Cultural condition on aduki beans		Concentration of T-2+HT-2 toxin (ppm)
5°C, 65%	14 days	0.45
	60 days	0.45
15°C, 65%	14 days	0
	60 days	0.25
15°C, 95%	14 days	1.2
	60 days	0.1
20-25°C, 78%	14 days	0.75
	60 days	0
20-25°C, 95%	14 days	8.95
	60 days	0

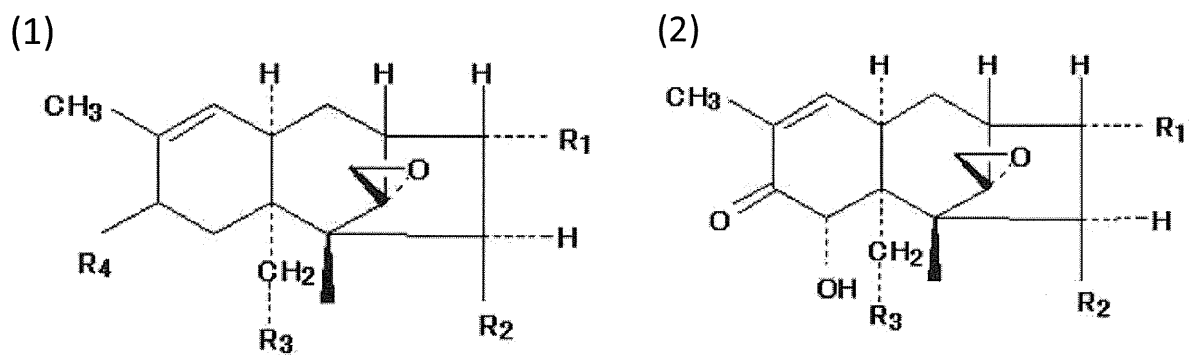


Fig 1. Chemical structures of trichothecenes

(1) Type A trichothecene, (2) Type B trichothecene.