

**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

非培養法による簡易分析法の基礎的研究

研究分担者 小西 良子 (麻布大学)
研究協力者 小林 直樹 (麻布大学)
研究協力者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者 窪崎 敦隆 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

食品を汚染するカビ毒産生菌の迅速検出法の開発を目的に、培養を行わずにカビ毒産生菌を効率よく検出する方法の開発を行った。今後モニタリングを強化していくべきカビ毒として、ステリグマトシスチン (STC) を取り上げ、STC 産生菌種を多く含む *Aspergillus section Versicolores* において、STC 産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。昨年度までに、食材に付着したカビ由来の DNA を回収し、改変型 DNA 合成酵素を用いた特異的な PCR 法により、標的菌種のみを増幅する手法を確立した。本年度は、昨年度確立した技術的基盤をもとに、STC 産生菌種を効率よく検出する系の開発を行った。まず、国内の食品および環境から *Aspergillus section Versicolores* に属する菌株を多数分離し、分子生物学的手法を用いて菌種の同定を行い、それぞれの株の STC 産生能を確認した。その結果、*Aspergillus creber* は今回分離した菌株の比較的高い割合を占め、且つ STC 産生能を持つ株の頻度が高いことから、本菌種は国内の主要な STC 産生菌種であることが明らかとなった。そこで、当該菌種のみを検出する系の開発をおこなった。また一方で、*Aspergillus sydowii* は今回分離した菌株のうち最も多くを占めたが、本菌種は STC 非産生菌種であるため、*A. sydowii* を除いた *Aspergillus section Versicolores* に属する菌種をまとめて検出することで、効率よく STC 産生菌種を検出することができると考え、それを実現する系の開発を試みた。いずれの系についても、昨年度確立した改変型 DNA 合成酵素を使用した PCR 技術を基に、*RPB2* 遺伝子上にプライマーを設計することで、目的の特定菌種のみを増幅して検出する方法を確立することができた。最後に、確立した PCR の系のうち *A. sydowii* のみを増幅させずに他の菌種を全て検出する系を用いて、玄米からの STC 産生菌の検出を試みることで、本方法の有効性を検討した。その結果、STC 汚染が確認された玄米では、全てにおいて STC 産生菌種が検出された。また、STC 未検出の玄米においても STC 産生菌種の存在が確認され、STC 産生菌の増殖前のリスクを検出することができた。以上の結果から、食品または飼料から培養を行わずに STC 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。これまでカビを検出するために行われる培養法では、結果を得るまでに 5 日から 14 日程度必要であったが、今回開発した手法では 4 時間程度で STC を産生するカビの検出が可能であり、STC 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

A. 研究目的

食品や飼料にカビ毒産生菌が存在する場合、これらの菌が増殖し、カビ毒を産生することで、食品または飼料がカビ毒により汚染されることがある。カビ毒が検出されていない食品や飼料においても、保存が不適切であった場合には、カビ毒産生菌が増殖し、汚染が生じる可能性がある。例えば、米や麦などの貯蔵穀物においては、生産時にカビ毒による汚染が検出されない場合にもカビ毒産生菌種が存在していると、貯蔵中に増殖してカビ毒が産生され、カビ毒により汚染される恐れがある。また、輸入食品においては、輸送時またはその前後で貯蔵環境が大きく変化する場合があり、輸送・貯蔵前にカビ毒が検出されない場合にも、貯蔵条件によってはカビ毒産生菌が繁殖し、カビ毒が産生される可能性がある。つまり、食品や飼料のカビ毒による汚染を真にコントロールするためには、検体に蓄積されたカビ毒を検出するだけでなく、検体中にカビ毒産生菌が存在するかどうかを調べることが非常に重要となる。

一般に、カビ毒産生菌を食品から検出するためには菌を培養する必要があり、カビの培養は5日から2週間程度の時間を要するため、迅速に検出することは困難である。そのため、食品から培養を行わずに直接カビ毒産生菌の存在を判定できる手法が求められる。そこで本研究では、培養を行わずに食品からカビ毒産生菌を直接検出できる迅速で簡便な方法を遺伝子レベルで開発することを目的とした。特に、輸入食品において今後モニタリングを強化していくべきカビ毒としてジアセトキシシルペノール(DAS)産生菌およびステリグマトシスチン(STC)産生菌に着目した。

昨年度は、STC産生菌種の代表菌種である *Aspergillus versicolor* を対象として、その近縁種を含む *Aspergillus* section *Versicolores* において STC 産生性菌種のみを検出する方法の技術的基盤の確立を行った。玄米を例に食材に付着したカビ由来のDNAを直接回収し、特殊な改変型DNA合成酵素を適用することで非特異的な増幅を回避しながら特定

の菌種のみをPCRにより増幅して検出する技術を確立した。

本年度は昨年度確立した技術的基盤をもとに、STC産生菌種を効率よく検出するための系の確立を目指した。

B. 研究方法

1. 供試菌株および米検体

食品および環境から分離した *Aspergillus* section *Versicolores* 株を供試した。昨年度供試した37株に加え、新たに23株を加えて合計60株を用いた(表1)。また、米は平成27年度産の国産玄米9検体および平成25年度産国産玄米4検体を用いた。平成27年度産玄米の1検体(検体番号9)および平成25年度産玄米4検体(検体番号10~13)はSTCによる汚染が検出された検体である。

2. 培養真菌からのゲノムDNA抽出

胞子をポテトデキストロース液体培地(PDB)に接種して25℃で2日間培養し、その後菌糸体を回収した。ゲノムDNAの抽出はSDS法¹⁾またはDNeasy plant mini kit(QIAGEN)を用いて添付のプロトコルに従って行った。抽出したDNAは使用するまで-20℃で保存した。

3. 分子生物学的手法による菌種同定

まず、 β -tubulin 遺伝子部分配列(377 bp)をPCRにより増幅した。PCRにはForward用プライマーとしてbt2a(5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3')、Reverse用プライマーとしてbt2b(5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3')を用いた²⁾。PCR条件は、95℃で3分間熱変性を行った後、95℃15秒、60℃45秒、72℃60秒を1サイクルとして35サイクル行い、72℃で120秒間最終伸長を行った。その後、PCR産物をエタノール沈殿により精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いてシーケンシング反応を行った。シーケンシングはABI PRISM 3100

Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて行い、塩基配列を決定した。決定した供試菌株の塩基配列を登録配列と共にアライメントした。登録配列は *Aspergillus section Versicolores* に含まれる 14 種³⁾および外群 2 種 39 株の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用した。このアライメントを基に MEGA6.0⁴⁾を用い、近隣結合法により系統樹を作成し、菌種の同定を行った。

4 . Thin-layer chromatography (TLC)による STC 産生能の確認

胞子をポテトデキストロース寒天培地 (PDA) に接種し、25 で 2 週間培養した。1-mL チップを用いてコロニーを寒天ごとくり抜き、サンプルチューブに移し、メタノール：クロロホルム (1:2) を 1 mL 加えて振盪した。得られた素抽出物を、Silica gel 60 薄層版 (Merck 社) にスポットした。メタノール：クロロホルム (2:98) を用いて展開し、366 nm の光の下でシグナルを確認した。STC 標準品 (Major Chemicals) と同じ移動度に現れるスポットを STC のシグナルと判断した。

5 . RNA polymerase 2 遺伝子部分配列の比較

Aspergillus section Versicolores に含まれる種の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードして使用し、MEGA6.0⁴⁾を用い、ClustelW によりアライメントを行った。使用した RNA polymerase 2 (RPB2) 遺伝子登録配列のアクセッション番号は、以下の通り：JN853831.1 (*A. creber*)、JN853811.1 (*A. tennesseensis*)、JN853809.1 (*A. jensenii*)、EF652178.1 (*A. versicolor sensu stricto*)、EF652214.1 (*A. tabacinus*)、JN853841.1 (*A. protuberus*)、JN853803.1 (*A. venenatus*)、JN853823.1 (*A. puulaauensis*)、EF652187.1 (*A. sydowii*)、

6 . 米付着カビ孢子からの直接 DNA 抽出

玄米 500 mg (20 粒程度) から、市販抽出キット

(NucleoSpin Soil: TaKaRa) を用い、添付のプロトコルに従い、DNA を抽出した。抽出した DNA は使用するまで -20 で保存した。

7 . 菌種特異的検出 PCR

5 . で作成したアライメントを基に、標的菌種の塩基配列がその他の菌種と異なる部分にプライマーを設計し、HiDi DNA polymerase (myPOLLS Biotec GmbH) を用い、添付のプロトコルに従って PCR を行った。

C. 研究結果

(1) 国内に分布する *Aspergillus section Versicolores* の分離および同定

まず、国内の食品および環境から *Aspergillus section Versicolores* を多数分離し、分子生物学的手法を用いて菌種の同定を行った。昨年度に分離した 37 株に加えて、新たに 23 株について、-tubulin 遺伝子部分配列 (377 bp) を決定し、合計 60 株の配列データを得た。データベースに配列が登録されている *Aspergillus section Versicolores* の 14 菌種および外群 2 菌種 (計 28 株) と共に系統樹を作成し、菌種の同定を行った (図 1)。その結果、全ての登録配列は単系統群を形成した。それぞれの菌株が含まれるクレードの登録配列の菌種をもとに同定を行った。供試菌株には、*A. amoenus* が 1 株、*A. creber* が 12 株、*A. jensenii* が 4 株、*A. protuberus* が 2 株、*A. puulaauensis* が 1 株、*A. sydowii* が 22 株、*A. tabacinus* が 1 株、*A. tennesseensis* が 10 株、*A. venenatus* が 3 株、*A. versicolor sensu stricto* が 4 株含まれた。60 株の分離・同定を行った結果、*Aspergillus section Versicolores* に属する 14 菌種の内、10 菌種の株を得ることができた。

(2) STC 産生能

供試した 60 株について、STC 産生能を TLC により調べた (表 1)。その結果、*A. creber* の 12 株中 8

株、*A. jensenii* の4株中2株、*A. tennesseensis* 10株中4株、*A. venenatus* の3株中1株、*A. versicolor sensu stricto* の4株中3株でSTC産生能が確認された。*A. amoenus* (1株)、*A. protuberus* (2株)、*A. puulaauensis* (1株)、*A. sydowii* (22株)および*A. tabacinus* (1株)においては、STC産生株は検出されなかった。

(3) *Aspergillus creber* 特異的検出 PCR

(1)および(2)の結果より、*A. creber* は国内において分離される *Aspergillus* section *Versicolores* の中で、分離頻度が高く、且つSTC産生菌株の頻度が高い菌種であることが明らかとなった。そこで、昨年度確立した菌種特異的増幅を可能とするHiDi DNA polymeraseを用いたPCRにより、*A. creber* のみを特異的に増幅する系を検討した。

HiDi DNA polymeraseはプライマーの3'末端の1塩基の違いを認識し、完全一致しない場合は増幅効率が著しく低下する改変型DNA合成酵素であるため、データベース登録配列より、*A. creber* が他の菌種と異なる配列を探索した。*RPB2* 遺伝子において、*A. creber* に特徴的な塩基配列が見出されたため、当該配列を基に *A. creber* のみを標的とするプライマーセットを設計した(図2A)。さらに系の特異性を確認するため、*A. creber* 以外の菌種を増幅し、*A. creber* では増幅がおこらない相補的なプライマーセットの設計も行った。これらのプライマーを使用して培養菌株から抽出したゲノムDNAをテンプレートにPCRを行ったところ、前者のプライマーセットでは *A. creber* 特異的に増幅が見られ、後者のプライマーセットでは *A. creber* では増幅が起こらず、他の菌種では増幅が確認された(図2B)。これらのことから、HiDi DNA polymeraseを用いたPCRにより、国内の主要なSTC産生菌種と考えられる *A. creber* を特異的に検出することが可能であることが確認された。

(4) *Aspergillus sydowii* を除く *Aspergillus* section *Versicolores* 検出 PCR

(1)および(2)の結果より、*A. sydowii* は国内で最も高頻度に分離される *Aspergillus* section *Versicolores* であるが、STCを産生しない菌種であることが示された。そこで、*A. sydowii* を除いて残りの *Aspergillus* section *Versicolores* の菌種をまとめて検出することで効率よくSTC産生菌を検出する系を検討した。*RPB2* 遺伝子において、*A. sydowii* のみで特異的に他の菌種と配列が異なる箇所をターゲットに、*A. sydowii* 以外の菌種の塩基配列と一致するプライマーセットを設計した(図3A)。このプライマーセットを用いて、ゲノムDNAをテンプレートにPCRを行ったところ、*A. sydowii* では増幅が見られず、その他の菌種では全て目的のサイズの増幅が観察された(図3B)。また、同時に *RPB2* 遺伝子において、*Aspergillus* section *Versicolores* 14菌種すべての菌種で共通する配列をターゲットに設計したプライマーセットによりPCRを行い、*A. sydowii* を含むすべてのゲノムDNAにおいて正常にPCR反応が起こることを確認した(図3B)。以上の結果から、STC産生菌種を多く含む *Aspergillus* section *Versicolores* の中でSTC非産生菌種である *A. sydowii* 以外の菌種を特異的に増幅することが可能であることが確認された。

(5) 玄米におけるSTC産生菌の検出

(4)で検討した *A. sydowii* 以外の菌種を特異的に増幅するPCRの系を用い、玄米からのSTC産生菌の検出を行った。STCによる汚染が確認された玄米5検体とSTCが検出されていない玄米8検体に付着するカビからDNAを抽出し、PCRを行った。

その結果、STCが検出された玄米については全てにおいて目的サイズの増幅産物が確認された。また、STCが未検出の玄米についても、8検体中7検体で増幅産物が確認された。

D. 考察

本研究では、食品においてモニタリングを強化し

ていくべきと考えられているカビ毒のひとつである STC に着目し、STC 産生菌種を多数含む *Aspergillus section Versicolores* において、STC 産生菌種のみを食品から直接検出する方法の開発を試みた。平成 28 年度に、玄米を例に食材に付着したカビ由来の DNA を回収し、非特異的な増幅を回避しながら特定の菌種のみを PCR により増幅して検出する技術を確立した。本年度は、この技術的基盤をもとに、効率よく STC 産生菌種を検出する PCR の系の確立を試みた。

まず、国内に分布する *Aspergillus section Versicolores* 60 株を分離・同定したところ、*Aspergillus sydowii* が最も高い頻度で分離され、次いで *A. creber* が多く分離された。*A. sydowii* は STC 非産生菌種とされているが⁵⁾、本研究においても、いずれの株も STC 産生能は認められなかった(表 1)。一方で、*A. creber* においては、12 株中 8 株で STC 産生能が確認され、国内の主要な STC 産生菌種であることが示された。

以上のことから、STC 産生菌種を効率的に検出する方法として以下の二つの系を検討した。

- A) 国内の主要な STC 産生菌種と考えられる *A. creber* を特異的に検出する系
- B) 国内で検出頻度が高い STC 非産生菌種である *A. sydowii* を除き、*Aspergillus section Versicolores* の他菌種をまとめて検出することで効率的に STC 産生菌種を検出する系

いずれの系についても、昨年度確立した改変型 DNA 合成酵素 (HiDi DNA polymerase) を使用した PCR 技術を基に、*RPB2* 遺伝子上にプライマーを設計することで、目的の特定菌種のみを増幅して検出する方法を確立することができた。

最後に、確立した PCR の系の内 B) の系を用いて、玄米からの STC 産生菌の検出を試みることで、本方法の有効性を検討した。玄米は平成 25 年度産または平成 27 年度産の国産玄米 13 検体を使用した。これらの検体については STC 汚染濃度の測定をすでに行

っており、5 検体について汚染が確認されている。昨年度確立した食品に付着するカビからの効率的な DNA 抽出法によりゲノム DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。STC が検出された玄米検体では全てにおいて目的サイズの増幅産物が得られ、STC 産生菌種による汚染が認められた(図 4)。一方で、STC 未検出の玄米検体においても 8 検体中 7 検体で目的サイズの増幅産物が見られた。これは、*Aspergillus section Versicolores* 内の STC 非産生菌種による汚染を検出している可能性が考えられるが、STC 産生にいたらない少数の STC 産生菌種を検出している可能性が高い。本検出系は STC 産生菌の増殖前のリスクを検出することが可能と考える。

E. 結論

以上の結果から、食品または飼料に付着したカビ由来の DNA を回収し、培養を行わずに PCR によって STC 産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。これまで STC を産生するカビを検出するために行われる培養法では、5 日から 14 日程度必要であったが、今回開発した手法では 4 時間程度で検出が可能であり、STC 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

F. 参考文献

- 1) Watanabe M, Lee K, Goto K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y: Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. *Journal of Food Protection* (2010) 73: 1077–1084
- 2) Glass NL and Donaldson GC: Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Microbiology*

(1994) 61: 1323-1330

Safety in press (†筆頭著者同等貢献者)

- 3) Jurjevic Z, Peterson SW and Horn BW: *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus* (2012) 3: 759–795
- 4) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S: MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* (2013) 30: 2725–2729
- 5) Frisvad JC and Thrane U: Chapter 4 Mycotoxin production by food-borne fungi. Introduction to food-borne fungi. Somson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O, eds. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures (1995) 251–260
- 6) Jurjevic Z, Peterson SW, Solfrizzo M and Peraica M. Sterigmatocystin production by nine newly described *Aspergillus* species in section *Versicolores* grown on two different media. *Mycotoxin Res* (2013) 29: 141–145
- Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J and Sugita-Konishi, Y: Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Safety*, in press.
- Shiratori, N†, Kobayashi, N†, Tulayakul, P, Sugiura, Y, Takino, M, Endo, O and Sugita-Konishi Y: Occurrence of *Penicillium brocae* and *Penicillium citreonigrum*, related to mutagenic and toxic metabolites, respectively, in commercially available rice grains of Thailand. *Toxins* (2017) 9: E194 (†筆頭著者同等貢献者)

【学会発表】

G. 研究業績

【論文発表】

- Onami J†, Watanabe M†, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kamata Y Takahashi H, Kawakami H, Terajima J: Study on Fumonisin-productivity of *Aspergillus* from Foods and Environment. *Food*
- 1) Watanabe M, Suzuki Y, Takahashi H, Yoshinari T, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Goto K and Terajima J: Comparative study including fumonisin production on the phylogenetic tree of kuro-koji molds and their relatives isolated from Japanese fermented foods. *UJNR* (2017, 5, Washington DC)
- 2) Kobayashi N, Kubasaki A, Shiratori N, Watanabe M, Terajima J and Sugita-Konishi Y: Classification and sterigmatocystin-production of *Aspergillus* section *Versicolores* from Japanese foods and environments. *UJNR* (2017, 5, Washington DC)

- 3) 窪崎敦隆、小林直樹、高橋治男、吉成知也、高鳥浩介、寺嶋淳、小西良子、渡辺麻衣子。高度識別型 **DNA** 合成酵素を用いた玄米汚染真菌の検出。第 **44** 回日本防菌防黴学会 (**2017, 9**, 大阪)

- 4) 小林直樹、窪崎敦隆、渡辺麻衣子、小沼ルミ、上原さとみ、高橋由美、矢内美幸、寺嶋淳、高橋治男、高鳥浩介、小西良子。 ***Aspergillus section Versicolores*** におけるステリグマトシスチン産生菌種の分子生物学的検出方法の開発。日本マイコトキシン学会第 **80** 回学術講演会 (**2017, 7**, 東京)

- 5) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子。国内で分離された *Apergillus ochraceus* の再同定とその OTA 産生性。日本マイコトキシン学会第 **81** 回学術講演会 (**2018, 1**, 東京)

- 6) 窪田祐恵、尾畑瑠衣、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子。野菜由来乳酸菌のアフラトキシン類への結合能と胃内環境での挙動。日本マイコトキシン学会第 **81** 回学術講演会 (**2018, 1**, 東京)

- 7) 尾畑瑠衣、窪田祐恵、内藤千秋、大仲賢二、石崎直人、小林直樹、小西良子。アフラトキシン結合能を有する野菜由来乳酸菌の探索と消化液での安定性に関する研究。日本食品衛生学会第 **113** 回学術講演会 (**2017, 11**, 東京)

- 8) 小林直樹、藤江雄大、鹿嶋直哉、渡辺麻衣子、小西良子。 ***Aspergillus ochraceus sensu lato*** における OTA 産生と OTA 生合成関連遺伝子の保有状況。日本食品衛生学会第 **113** 回学術講演会 (**2017, 11**, 東京)

表 1 . 供試菌株の同定結果と STC 産生性.

| 菌種 | 株番号 | 由来 | STC 産生能 | |
|------------------------|--------------------|------------|------------|---|
| <i>A. amoenus</i> | NIHS6481 | ハウスダスト | - | |
| <i>A. creber</i> | FSSN0002 | トリュフ(缶詰) | - | |
| | NIHS0585 | 馬の毛 | - | |
| | NIHS0586 | ハウスダスト | + | |
| | NIHS1302 | ブドウ | + | |
| | NIHS2991 | 室内空気 | + | |
| | NIHS3057 | 室内空気 | + | |
| | NIHS4459 | 環境 | + | |
| | NIHS6467 | ハウスダスト | + | |
| | NIHS6718 | ベッド | + | |
| | NIHS6806 | ココア粉末 | - | |
| | Tokyo-AV-54 | オリーブオイル | + | |
| | Tokyo-AV-63 | Barley tea | - | |
| | <i>A. jensenii</i> | NIHS3160 | 室内空気 | + |
| | | NIHS3253 | 室内付着 | - |
| NIHS6501 | | ハウスダスト | - | |
| Tokyo-AV-19 | | 精白きびもち | + | |
| <i>A. protuberus</i> | NIHS6474 | ハウスダスト | - | |
| | NIHS6482 | ハウスダスト | - | |
| <i>A. puulaauensis</i> | NIHS0581 | ビニールクロス | - | |
| <i>A. sydowii</i> | NIHS0733 | 生薬 | - | |
| | NIHS1013 | 寒天 | - | |
| | NIHS3261 | 外気 | - | |
| | NIHS3404 | 外気 | - | |
| | NIHS3941 | 室内空気 | - | |
| | NIHS4021 | 室内空気 | - | |
| | NIHS4095 | 室内付着 | - | |
| | NIHS6261 | 精米 | - | |
| | NIHS6265 | 精米 | - | |
| | NIHS6469 | ハウスダスト | - | |
| | NIHS6472 | ハウスダスト | - | |
| | NIHS6478 | ハウスダスト | - | |
| | NIHS6479 | ハウスダスト | - | |

| | | |
|-------------|----------|---|
| NIHS6497 | ハウスダスト | - |
| NIHS6498 | ハウスダスト | - |
| NIHS6499 | ハウスダスト | - |
| NIHS6801 | ピーナッツ | - |
| NIHS6802 | ピーナッツ | - |
| NIHS6803 | 飲料 | - |
| NIHS6804 | ココナッツオイル | - |
| Tokyo-AV-58 | 干しイチジク | - |
| Tokyo-AV-60 | 麦茶 | - |

表 1 . 供試菌株の同定結果と STC 産生性. (つづき)

| 菌種 | 株番号 | 由来 | STC 産生能 |
|---------------------------------------|-------------|--------------|------------|
| <i>A. tabacinus</i> | NIHS0587 | セロファン | - |
| <i>A. tennesseensis</i> | NIHS6259 | 精米 | - |
| | NIHS6262 | 精米 | + |
| | NIHS6270 | 精米 | + |
| | NIHS6466 | ハウスダスト | - |
| | NIHS6480 | ハウスダスト | - |
| | NIHS6805 | レモンジュース | - |
| | NIHS6807 | ココア粉末 | - |
| | Tokyo-AV-15 | 大豆 | + |
| | Tokyo-AV-16 | 茶葉(ジャスミンティー) | + |
| Tokyo-AV-55 | ターメリック | - | |
| <i>A. venenatus</i> | NIHS3237 | 室内付着 | - |
| | NIHS6808 | 大豆 | + |
| | NS270272 | 玄米 | - |
| <i>A. versicolor</i> sensu stricto | NIHS0093 | 玄米 | + |
| | NIHS2500 | 玄米 | + |
| | NIHS6264 | 精米 | + |
| | Tokyo-AV-57 | 冷麺 | - |

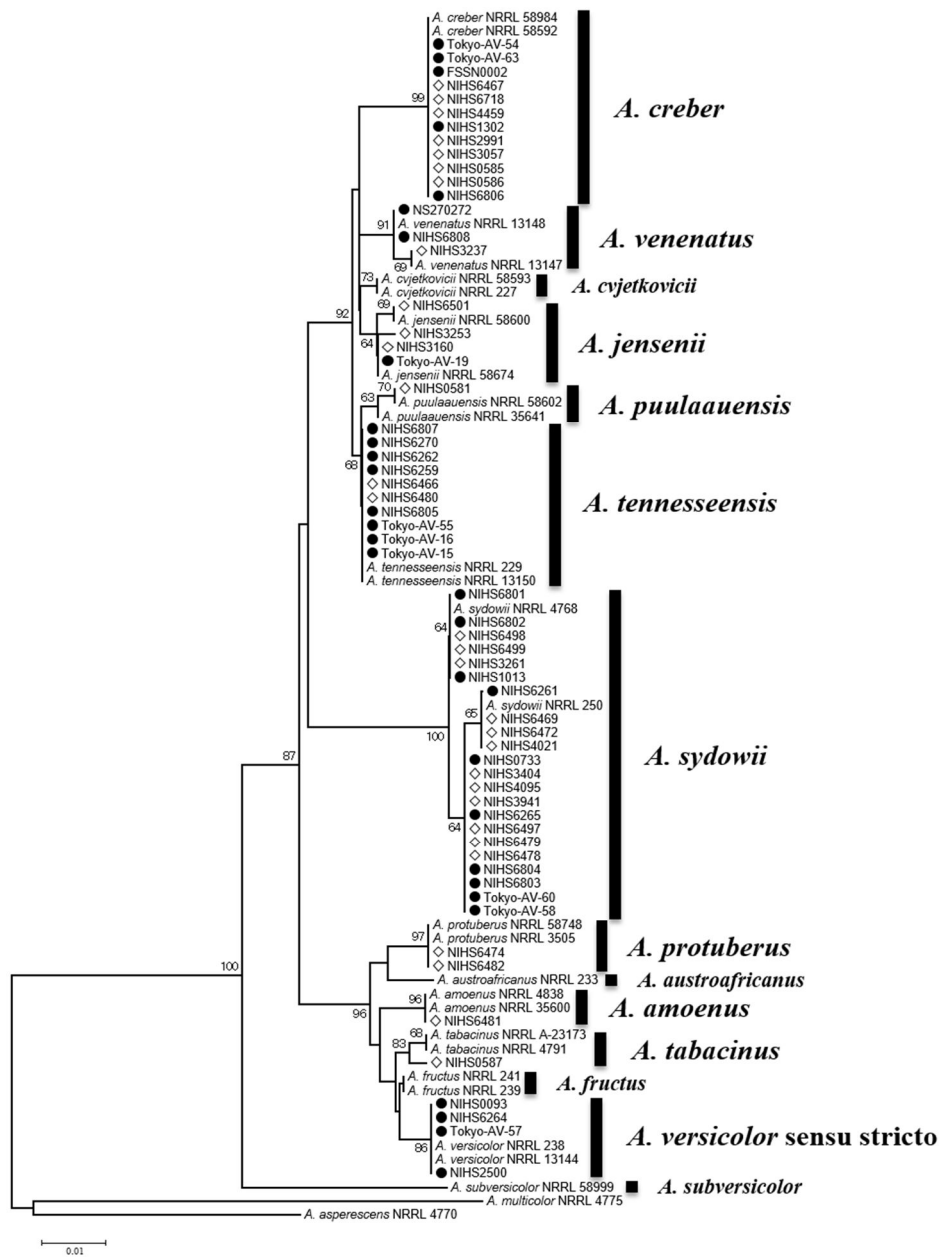
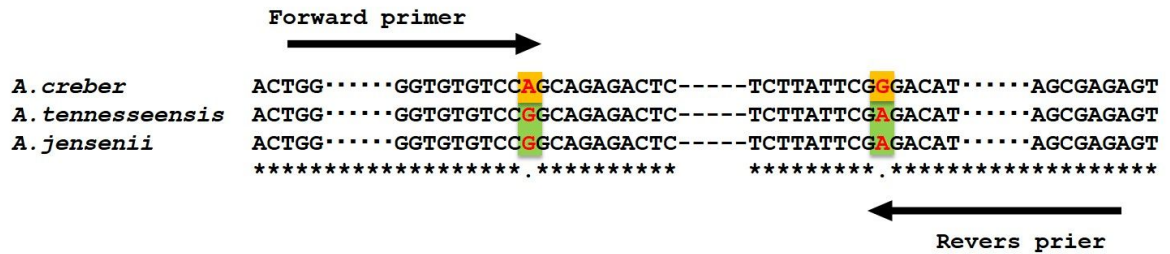


図 1. 8-tubulin 遺伝子部分配列による系統樹

供試菌株 60 株の配列データとデータベース登録配列から 39 配列データを使用して近隣結合法 (NJ 法) により系統樹を作成した。各枝状の数字はブートストラップ確立を示している。● : 食品由来株、○ : 環境由来株

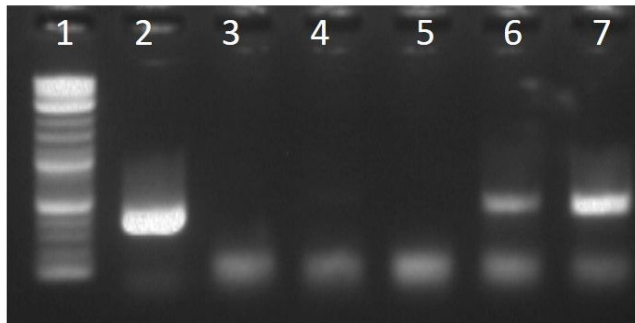
A.



B.

Primer set: creber_only-F/R other-F/R

DNA: M cr te je cr te je



DNA

cr: *A. creber*

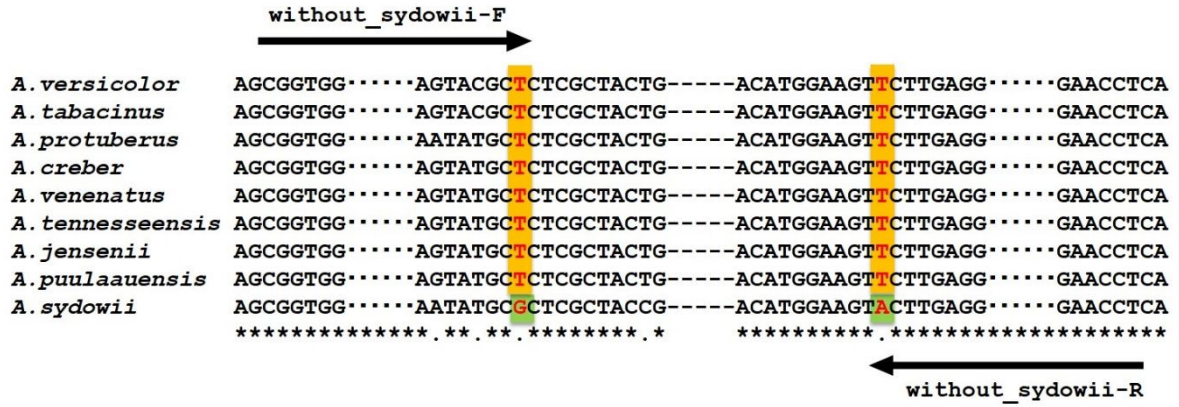
te: *A. tennesseensis*

je: *A. jensenii*

図 2. *Aspergillus creber* 特異的検出用 Primer の検討

A. *RPB2* 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニーリング部位。
B. HiDi DNA polymerase を用いた PCR の結果。

A.



B.

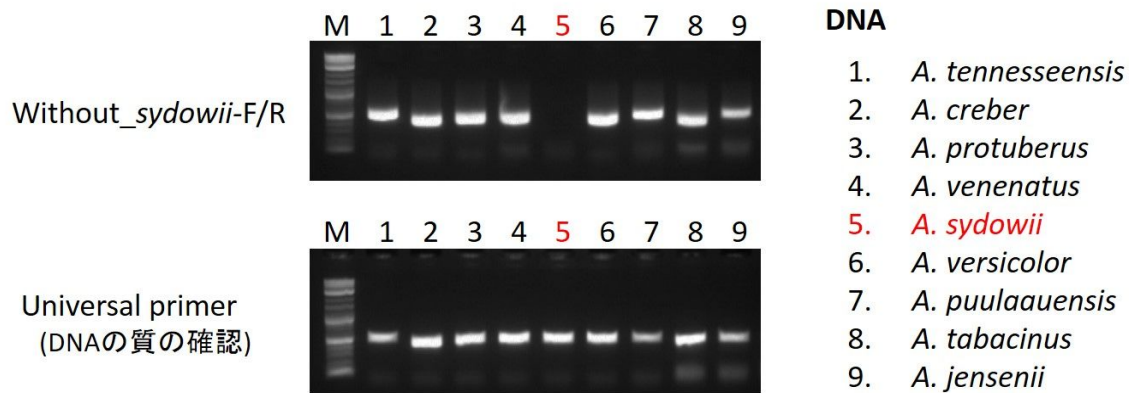


図 3. *Aspergillus sydownii* を除く菌種検出用 Primer の検討

A. *RPB2* 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニーリング部位。B. HiDi DNA polymerase を用いた PCR の結果。

| | 玄米検体 | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|------|----|----|----|----|----|----|----|----|------|------|------|------|------|
| | NC | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| STC濃度 (μg/kg) | — | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.03 |
| | | | | | | | | | | | | | | |

図 4 . 玄米付着カビからの抽出 DNA における *Aspergillus sydowii* を除く *Aspergillus section Versicolores* の検出

検体 1 ~ 9:平成 27 年度産国産玄米、検体 10 ~ 13:平成 25 年度産国産玄米。NC: negative control (陰性対照)、ND: Not detected