

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

産生菌の情報を応用した新興カビ毒汚染食品の探索

研究分担者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

国内に流通する食品において、モニリフォルミン (MON) の汚染が懸念されているが、日本国内における食品の MON の汚染実態調査はほとんど行われておらず、情報が非常に少ない。食品の MON 汚染リスクを詳細に評価するためには、各食品における *Fusarium* 属菌の分布やそれら菌の MON 産生性の把握が必要不可欠である。*Fusarium* 属菌における MON 産生性に関しては、これまでにいくつかの菌種で報告されているが、多くの菌種で産生性の有無についての情報が不足している。そこで本研究では、農作物自体および栽培環境由来 *Fusarium* 属菌株の MON 産生性の確認を行い、MON 汚染原因菌の分布に関する知見を収集する目的で、分離株培養液中の MON 分析法の開発、および過去の *Fusarium* 属菌分離株を利用した MON 産生菌の探索を行った。その結果、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功し、この系を用いて、日本の幅広い地域の由来株での *Fusarium subglutinans*、*Fusarium proliferatum* および *Fusarium tricinctum* での MON 産生性を確認できた。*Fusarium* 属菌は遺伝的には幅広い菌種で MON 産生性を持つことが予想されていることから、今後、今回の検討で得られた培養条件による調査を継続することによって、日本国内で流通する食品における MON 産生菌の分布実態や、MON 産生菌種と関連した食品の MON 汚染リスクを評価するための情報を蓄積し、食品検体の MON 汚染因子を解明する必要がある。

研究協力者

吉成 知也 国立医薬品食品衛生研究所
高橋 治男 国立医薬品食品衛生研究所
平山 美咲 千葉大学真菌医学研究センター
矢口 貴志 千葉大学真菌医学研究センター
伴 さやか 千葉大学真菌医学研究センター
上田 莉瑚 共立女子大学
川上 浩 共立女子大学

A. 研究目的

モニリフォルミン (MON) は、フザリウムトキシンの 1 種で四員環ジトケン構造を持つ水溶性の化合物である¹⁾。1970 年にアメリカで葉枯病のトウモロコシを食べた家畜の中毒が大発生したのを機に、J.Cole ら²⁾によって *Fusarium moniliforme* の毒性代謝物として単離された。急性致死毒性 (LD₅₀ 値) は、雄マウスで (腹腔内投与) 29.1 mg/kg、雄ラットで (経口投与) 50.0 mg/kg、幼若雄鶏で (経口投与) 4.0 mg/kg、7 日齢アヒル (経口投与) 3.7 mg/kg であり、ラットにおける急性毒性では、心筋変性と壊死以外に、肝臓、腎臓、脾臓および腸管への障害も認められた³⁾。アメリカ、フィンランド、イタリア、スロバキアなど世界の様々な地域における食品汚染が報告されており¹⁾、我が国に流通する食品においても汚染が懸念される。しかし、日本国内における食品の MON の汚染実態についての研究はほとんどなされておらず、情報が非常に少ない。

食品の MON 汚染リスクを詳細に評価するためには、各食品における *Fusarium* 属菌の分布や、それらの菌が MON 産生性を有するかの把握が必要不可欠である。*Fusarium* 属菌での MON の産生菌に関しては、これまでに、*F. verticillioides*、*F. subglutinans*、*F. sporotrichioides*、*F. culmorum*、*F. equiseti*、*F. semitectum*、*F. tricinctum*、*F. avenaceum* 等の菌種で産生性が報告されているが、多くの菌種で産生性の有無についての情報が不足している。また Watanabe ら⁴⁾は、*Fusarium* 属菌種間の系統情報および産生菌の文献情報を統合して、MON 産生性が今のところ知られていない菌種についても産生性の有無を予測したところ、MON 産生性は *Fusarium* 属菌で幅広く保持しており、農作物から多く検出される主要な菌種のうち *F. graminearum* 以外のほぼ全てで MON 産生性を持つ可能性を示唆している。しかし本文献で MON 産生性を持つと予測された菌種の半数以

上では現状予測に留まっており、今後の実証が必要である。

そこで、本年度は、農作物自体および栽培環境由来 *Fusarium* 属菌株の MON 産生性の確認を行い、MON 汚染原因菌の分布に関する知見を収集する目的で、分離株培養液中の MON 分析法の開発、および過去の *Fusarium* 属菌分離株を利用した MON 産生菌の探索を行ったので、その成果を報告する。

B. 研究方法

(1) 供試菌株

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第三室に保管されていた農作物または栽培環境由来の *Fusarium* 属菌保存株の計 28 株を供試した。

(2) 米培地での MON 産生陽性コントロール株の探索及び菌株接種方法の検討

米培地を用いて MON 産生の陽性コントロール株の探索及び菌株接種方法の検討を行った。100 mL 三角フラスコ内に米 10 g と米が浸る程度に蒸留水を入れ、綿栓をしてオートクレーブで 121°C・15 分間滅菌した。表 1 に示した *Fusarium* 属菌 5 株を potato dextrose agar (PDA 培地：化学栄研株式会社) に接種し、25°C・暗条件で 1 週間前培養を行った。培養後、コロニーが十分に生育したことを確認し、PDA 平板培地を約 1 cm 四方に切り取った培地片 (寒天培地片接種法)、またはそこから菌体をかきとって懸濁した孢子懸濁液 100 μL (孢子液接種法) を米培地に接種し、25°C・暗条件で 10 日間静置培養した。三角フラスコ内に 85%アセトニトリル水溶液を 50 mL 添加し、米培地を葉さじで砕いた。三角フラスコの内容物をすべて 50 mL チューブに移し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離後、上清 1 mL を 2 mL チューブに取り、窒素吹き付けにより乾固した。メタノール 2 mL を添加し、チューブ内をよく洗浄後、平衡化した Bond Elut SAX (Agilent SAX : Agilent Technology) に通液し、MON を

吸着させた。さらにカラムにイオンペア剤 (3.5% TBAHS 含有 0.2 M KH₂PO₄) 1.5 mL を通液して MON を溶出し、HPLC で分析した。

(3) MON 産生株の液体培養条件の検討

Potato dextrose broth (PDB 培地 : Sigma-Aldrich)、Sucrose salt asparagine 液体培地 (SSA 培地 : 組成は表 2)⁵⁾ および Czapek-dox 液体培地 (CZ 培地 : Difco) の 3 種類の液体培地の間で、MON 産生効率の比較検討を行った。MON 産生が認められた菌株を PDA 斜面培地に接種し、25°C・暗条件で 1 週間前培養を行った。121°C・15 分間オートクレーブ滅菌した液体培地のいずれか 1 種類を 200 mL 三角フラスコに 100 mL ずつ分注し、そこに前培養した *Fusarium* 菌株を寒天培地片接種法または孢子液接種法で接種し、25°C・暗条件で最長で 28 日間静置培養した。7 日間ごとに培養液を 150 µL 回収して MON 産生量を測定し、経時的に産生量を観察した。分取した培養液をメタノール 1 mL と混合し、25°C・3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。その後、平衡化した Agilent SAX カラムに通液し、カラム内を洗浄して、吸着させた MON を 1.5 mL のイオンペア剤で溶出し、HPLC で分析した。HPLC の測定条件は以下の通りとした。

HPLC : 1260 Infinity (Agilent Technology)

カラム : Intert Sustain Swift C18、4.6×

250 mm, 5 µm (GL Sciences 株式会社)

移動相 : 水、7%硫酸水素テトラブチルアンモニウム含有 0.4M リン酸二水素カリウム水溶液 (pH7.0) と アセトニトリルの混液 (92 : 1 : 8)

流速 : 1 mL/min

注入量 : 100 µL

検出波長 : 229 nm

(4) 保存株における MON 産生株の検索

(3) で得られた結果を比較し、最も MON 産生性の高かった液体培地種類および菌接種方法を組み合わせ、表 3 の *Fusarium* 属保存株計 28 菌株を接種して培養し、25°C・暗条件で 28 日間静置培養した。その後 (3) に記載の方法で抽出・精製・分析し、その結果を各菌株の MON 産生性として評価した。

C. 研究結果

(1) 米培地での MON 産生陽性コントロール株の探索及び菌株接種方法の検討

供試した 5 株の *Fusarium* 属菌株の米培地における MON 検出量を図 1 に示した。鹿児島県サトウキビ土壌由来の *F. subglutinans* IFM50097 では寒天培地接種法で 67.1 mg/kg、孢子液法で 5.2 mg/kg の MON 産生性が、沖縄県サトウキビ土壌由来の *F. proliferatum* IFM50127 では寒天培地接種法で 5.4 mg/kg の MON の産生が認められた。それら以外の菌株および接種方法の組み合わせでは MON 産生性は認められなかった。したがって、前培養した *Fusarium* 菌体の接種方法は、孢子液よりも寒天培地接種法の方が産生量は高くなること、2 株の間では *F. subglutinans* IFM50097 のほうがより MON 産生性が高いことを確認した。本検討の結果から、陽性対照として 2 菌種 2 株の MON 産生株を得ることができた。

(2) MON 産生株の液体培養条件の検討

CZ 培地と PDB 培地では、いずれも SSA 培地での培養像と比較して菌体の生育性は著しく低く、培養液中の MON は非検出であった。SSA 培地において MON 産生が認められた 2 株の培養液の HPLC クロマトグラム、および培養液中の MON 検出濃度の経時変化を図 2 に示した。*F. subglutinans* IFM50097 では培養 7 日目で 1.8 mg/kg、14 日目で 8.1 mg/kg、21 日目で 18.1

mg/kg、28 日目で 26 mg/kg の MON 産生が認められた。*F. proliferatum* IFM50127 では培養 7 日目で 1.7 mg/kg、培養 14 日目で 5.2 mg/kg、培養 21 日目で 10.9 mg/kg、培養 28 日目で 16.7 mg/kg の MON の産生が認められた。これら経時的な MON 産生量データの線形近似をとったところ、その決定係数はそれぞれ $R^2=0.9932$ または $R^2=0.9881$ となり (図 2)、近似性が高かった。以上のことから、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする人工培地でのアッセイ系の確立に成功したこと、また少なくとも 28 日間の培養期間内では時間に比例して MON 産生量が増加することが確認された。

(3) 保存株における MON 産生株の検索

今回の検討で供試した *Fusarium* 属菌 28 株を用いての SSA 培地での 3 週間または 6 週間培養後での培養液中の MON 検出濃度を表 3 に示した。今回供試した 28 株中では、6 週間の培養期間終了後までに、沖縄県サトウキビ畑土壌由来の *F. proliferatum* IFM50127、北海道小麦畑土壌由来の *F. tricinctum* IFM50055 および沖縄県土壌由来の *F. suglutinans* TSY0645 の 3 株が MON 産生性を有した。これに (2) の検討で MON 産生性を示した鹿児島県サトウキビ畑土壌由来の *F. suglutinans* IFM50097 を加え、国内流通食品では、現状では少なくとも、鹿児島県および沖縄県産サトウキビや北海道産小麦で MON 汚染の可能性が有り、さらに MON 産生菌は北海道から沖縄県まで国内に広く分布する可能性があると考えられた。上記 4 株以外の菌種ではいずれも MON の産生は認められなかった。

D. 考察

今回の検討で、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功した。この系を使用して、鹿児島県および沖縄県に分布する *F. subglutinans* や *F.*

proliferatum、および北海道に分布する *F. tricinctum* で MON の産生性が確認されたことから、産生株は国内では北海道から沖縄までの広い気候帯に分布し、少なくとも鹿児島県や沖縄県産サトウキビおよび北海道産小麦は MON による汚染のリスクがあることが確認された。今回供試した菌種のうち上述 3 菌種以外では、MON 産生性を持たない菌種の可能性もあるが、過去の研究から、*Fusarium* 属菌は遺伝的には幅広い菌種で MON 産生性を持つことが予想されている⁴⁾。本研究では 1 菌種につき 1~2 株しか調査していないため、さらに多菌株を調査し、多くの地域の分離源に由来する上述 3 菌種以外の菌種での MON 産生性の評価を継続する必要があると考えられた。

MON を産生させる人工培地での培養には、SSA 培地での寒天片接種法による培養法が最適であり、28 日間では培養期間に比例して MON 産生量が増加することが認められた。このことから、少なくとも今回の検討での培養日数の上限期間内では、SSA 培地ですでにできるだけ長期間の培養を行うことで、より感度の高い MON 産生性確認実験ができることが示された。今回の検討で得られた培養条件による調査を継続することによって、日本国内で流通する食品における MON 産生菌の分布実態やこれから生じる食品の MON 汚染リスクを評価するための情報を蓄積することによって、食品検体の MON 汚染因子を解明していく予定である。

E. 結論

本研究の結果から、*Fusarium* 属菌の MON 産生性をスクリーニングする SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功した。この系を用いて、北海道、鹿児島および沖縄県由来株での MON 産生性を確認できた。*Fusarium* 属菌は遺伝的には幅広い菌種で MON 産生性を持つことが予想されていることから、今後、今回の検討で得られた培養条

件による調査を継続することによって、日本国内で流通する食品における MON 産生菌の分布実態やこれから生じる食品の MON 汚染リスクを評価するための情報を蓄積し、食品検体の MON 汚染因子を解明する必要がある。

F. 参考文献

- 1) Gruber-Dorninger C. *et al.* Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *J. Agric. Food Chem.* 2017;65:7052-7070.
- 2) Cole R. J. *et al.* Toxin from *Fusarium moniliforme*: Effects on Plants and Animals. *Science.* 1973;179:4080.
- 3) 駒田旦ら. フザリウムー分類と生態・防除. 初版. 1973. 全国農村教育協会.東京.
- 4) Watanabe M. *et al.* Utility of the phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin-producing potential. *Food Add Contam Part A.* 2013;30: 1370–1381.
- 5) 諸角聖ら.トリコテセン系カビ毒産生用合成培地の検討. *食品と微生物.* 1988;5: 131-136.

G. 研究業績

【学会発表】

- 1) Misaki Hirayama, Maiko Watanabe, Sayaka Ban, Takashi Yaguchi, Yukiko Hara-Kudo, Tomoya Yoshinari. Development of an analytical method for emerging mycotoxin produced by *Fusarium* spp. isolated from rye. *Asian Mycological Congress 2021.* 2022. 8. 3-5. Thailand (ハイブリッド開催)
- 2) Maiko Watanabe, Misaki Hirayama, Sayaka Ban, Takashi Yaguchi, Kiminori Shimizu, Haruo Takahashi, Yukiko

Hara-Kudo, Tomoya Yoshinari. Occurrence of mycotoxins and distribution of trichothecene-producing *Fusarium* spp. in Job's tears products in Japanese retail foods. *International Symposium of Mycotoxicology 2022.* 2022. 9. 6-9. Thailand (ハイブリッド開催)

- 3) 渡辺麻衣子. 形態観察と遺伝子指標両方を用いた同定の実際. 日本防菌防黴学会第 49 回年次大会, シンポジウム 7 カビ試験法. 2022. 9. 26-27.
- 4) 伊藤紫野、山田修、水谷治、橋本一浩、川上裕司、後藤慶一、清水公德、高橋治男、工藤由起子、渡辺麻衣子. 黒麹菌とその近縁菌のカビ毒産生性及び遺伝子型別に関する研究. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 2022. 11. 10-11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

表 1. 米培地での MON 産生陽性コントロール株の探索に用いた菌株一覧

菌株番号	分離原試料 の産地	分離原	菌種
IFM50023	青森県	小麦土壌	<i>Fusarium equiseti</i>
IFM50097	奄美大島	サトウキビ土壌	<i>Fusarium subglutinans</i>
IFM50127	沖縄県	サトウキビ土壌	<i>Fusarium proliferatum</i>
33HT-01-02	岩手県	ハト麦	<i>Fusarium incarnatum</i>
33HT-01-24	岩手県	ハト麦	<i>Fusarium sporotrichiodes</i>

表 2. 蒸留水 1L あたりの sucrose salt asparagine 培地の組成

化学物質	含有量 (g/L)
Sucrose	200
Asparagine	10
Ca-panthothenate	0.01
NaNO ₃	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1
KH ₂ PO ₄	0.75
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.001
CuSO ₄ · 7H ₂ O	0.001
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.0001
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.001
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.001
Na ₂ B ₄ O ₇	0.001

表 3. *Fusarium* 属保存菌株の SSA 培養液中の MON 産生量

菌株番号	分離原試料 の産地	分離原	菌種	MON 産生量 (mg/L)	
				3 週間	6 週間
1. IFM50127	沖縄県	サトウキビ土壌	<i>Fusarium proliferatum</i>	9.2	8.7
2. IFM50003	秋田県	小麦土壌	<i>Fusarium acuminatum</i>	< 0.2	< 0.2
3. IFM50012	岩手県	小麦土壌	<i>Fusarium avenaceum</i>	< 0.2	< 0.2
4. IFM50013	岩手県	小麦土壌	<i>Fusarium oxysporum</i>	< 0.2	< 0.2
5. IFM50031	青森県	小麦土壌	<i>Fusarium equiseti</i>	< 0.2	< 0.2
6. IFM50036	青森県	小麦土壌	<i>Fusarium longipes</i>	< 0.2	< 0.2
7. IFM50051	北海道	小麦土壌	<i>Fusarium sambucinum</i>	< 0.2	< 0.2
8. IFM50055	北海道	小麦土壌	<i>Fusarium tricinctum</i>	3.6	3.6
9. IFM50097	鹿児島県	サトウキビ土壌	<i>Fusarium subglutinans</i>	< 0.2	< 0.2
10. TSY0339	千葉県	マスクメロン	<i>Fusarium avenaceum</i>	< 0.2	< 0.2
11. TSY0529	不明	茶畑土壌	<i>Fusarium acuminatum</i>	< 0.2	< 0.2
12. TSY0548	沖縄県	土壌	<i>Fusarium camptoceras</i>	< 0.2	< 0.2
13. TSY0552	小笠原	土壌	<i>Fusarium equiseti</i>	< 0.2	< 0.2
14. TSY0645	沖縄県	土壌	<i>Fusarium subglutinans</i>	< 0.2	56.1
15. TSY0664	不明	玄米	<i>Fusarium verticillioides</i>	< 0.2	< 0.2
16. TSY0717	国内	麦	<i>Fusarium</i> sp.	< 0.2	< 0.2
17. TSY0743	不明	生薬シャクヤク	<i>Fusarium poae</i>	< 0.2	< 0.2
18. TSY0769	不明	カムカム果汁	<i>Fusarium</i> sp.	< 0.2	< 0.2
19. TSY0955	愛知県	備蓄米	<i>Fusarium graminearum</i>	< 0.2	< 0.2
20. NS0030	不明	リンゴ	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	< 0.2	< 0.2
21. NS0115	福島県	モモ	<i>Fusarium proliferatum</i>	< 0.2	< 0.2
22. NS0185	長野県	ブドウ	<i>Fusarium proliferatum</i>	< 0.2	< 0.2
23. 33Ry-25-05	北海道	ライ麦	<i>Fusarium avenaceum</i>	< 0.2	< 0.2
24. 33Ry-25-13	北海道	ライ麦	<i>Fusarium sporotrichiodes</i>	< 0.2	< 0.2
25. 33HT-01-02	岩手県	ハト麦	<i>Fusarium incamatum</i>	< 0.2	< 0.2
26. 33HT-01-24	岩手県	ハト麦	<i>Fusarium sporotrichiodes</i>	< 0.2	< 0.2
27. 33HT-01-31	岩手県	ハト麦	<i>Fusarium armeniacum</i>	< 0.2	< 0.2
28. 33HT-10-07	タイ	ハト麦	<i>Fusarium incamatum</i>	< 0.2	< 0.2

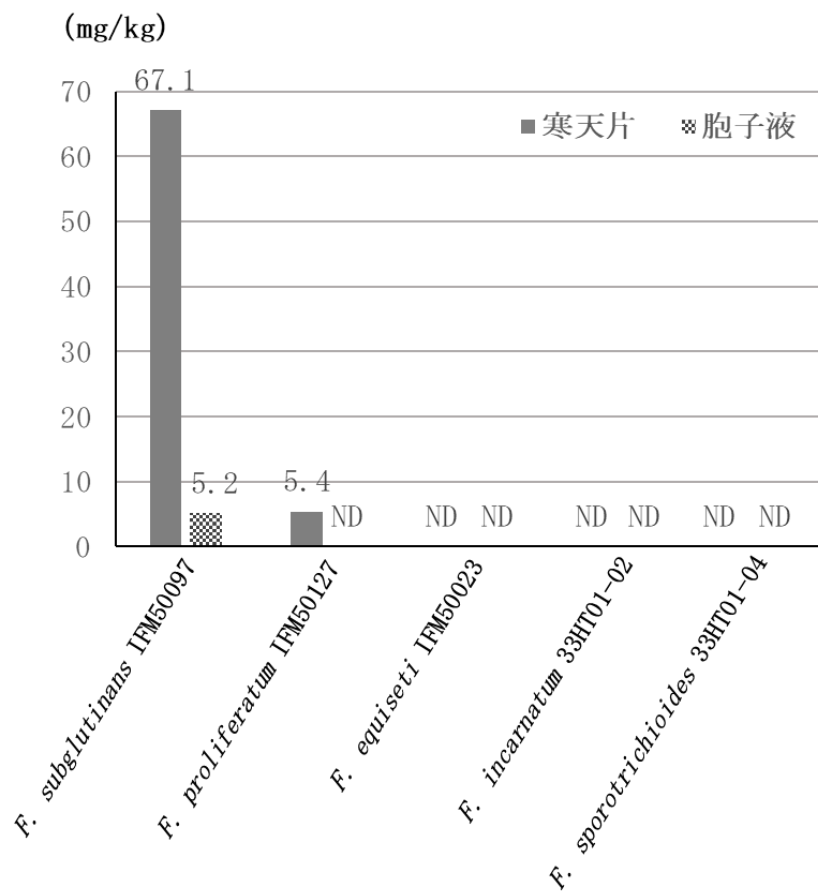
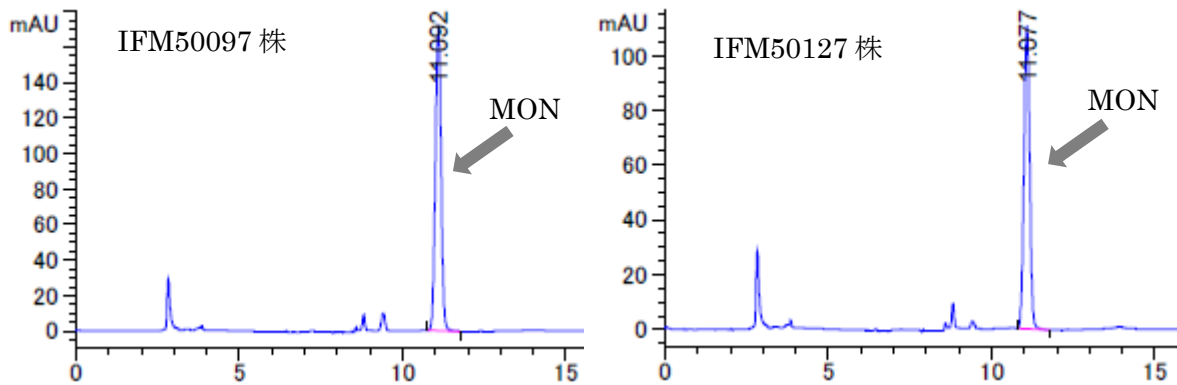
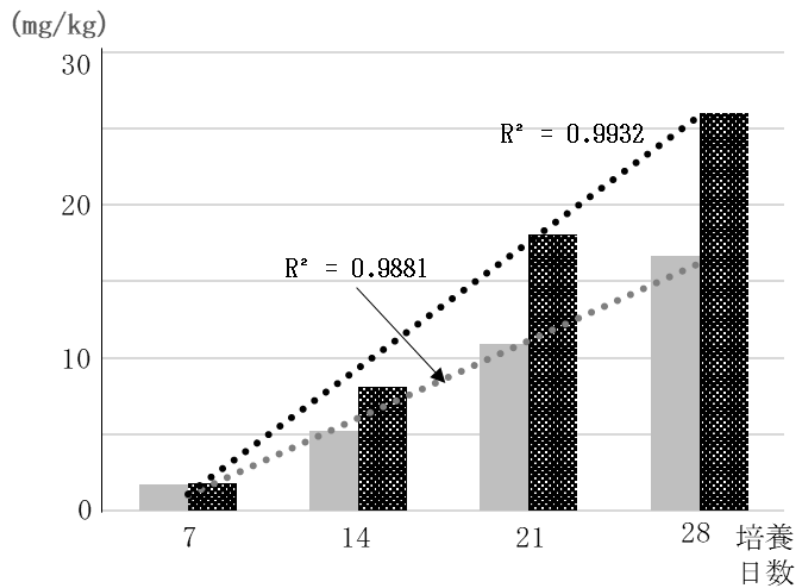


図 1. 米培地での MON 産生量の比較

A) 培養液から精製した MON の HPLC クロマトグラム



B) *Fusarium* 属菌株培養液中の MON 産生量の推移



- IFM50127 国産サトウキビ土壌由来 *F. proliferatum*
- ▨ IFM50097 国産サトウキビ由来 *F. subglutinans*

図 2. SSA 培地での MON 産生量の比較