

食品衛生基準科学研究費補助金
(食品安全科学研究事業)

分担研究報告書

小麦における OTA 汚染原因菌の究明

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

近年、諸外国で食用となる主要穀物からのオクラトキシン A (OTA) の検出事例の報告が相次いでいる。我が国では 2023 年に麦類中の OTA に対して基準値を策定することが決定された。麦類では *Penicillium verrucosum* が主要な OTA 汚染原因菌として知られているが、過去に OTA 産生性を有する *Aspergillus ochraceus* または *Aspergillus westerdijkiae* が国内外の小麦から単離されていることから、これら *Aspergillus* 属菌についても、保管中の小麦が本菌に汚染された場合の OTA の汚染動態を把握する必要がある。そこで、OTA 産生性が確認された *P. verrucosum* NBRC30181 および *A. westerdijkiae* NIHS 3985 の各 1 菌株をそれぞれ小麦粒へ接種し、培養条件（小麦への加水率、培養温度または培養期間）による小麦中の OTA 含有量の変化を調べた。温度 25℃で 2 週間培養した結果、*P. verrucosum* NBRC30181 を接種した小麦では加水率が高くなるに従い OTA 含有量も上昇し、今回検討した範囲での最大含水量 50%で OTA 含有量は最大の 3,122 µg/kg となり、*A. westerdijkiae* NIHS 3985 では最大値は含水率 40%で 11,580 µg/kg となった。温度 15℃で小麦への加水率 50%、2 または 4 週間培養した結果、*P. verrucosum* NBRC30181 を接種した小麦中の OTA 濃度は平均 743 µg/kg または 2,202 µg/kg、*A. westerdijkiae* NIHS 3985 では平均 21 µg/kg または 7,558 µg/kg であった。これらの結果から、*A. westerdijkiae* に汚染された小麦がある程度の水分を含有した状態で長期保存された場合、室温より低温の貯蔵環境下でも *A. westerdijkiae* による高度な OTA 汚染が発生する可能性があることを確認した。貯蔵中の小麦の OTA 汚染原因菌として、*P. verrucosum* だけでなく *A. westerdijkiae* にも留意する必要があることが示され、今後リスク管理を行う必要のあるカビの情報を提供した。

研究協力者

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
青木 渉 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

オクラトキシン A (OTA : 図 1) は世界中で様々な食品での検出例の報告頻度が高いカビ毒の 1 つである。OTA は小麦や大麦などの穀類や、

コーヒー豆やワイン、ココア、香辛料等の様々な食品から検出される¹⁾。ラットを用いた実験により非遺伝毒性発がん物質であることが認められており、IARC (国際がん研究機関) はグループ 2B「ヒトに対して発がん性の可能性がある」に分類した²⁾。その一方で、コーデックス委員会は 2008 年に小麦、大麦、ライ麦について OTA の最大基準値を 5 µg/kg に設定した³⁾。

我が国では小麦の9割を北米などからの輸入に依存しているが、北米では麦類中の OTA 汚染についていくつかの調査結果が報告されている。アメリカ国内で行われた調査では、2012 年から 2013 年の 2 年間にかけて 6 州から収集された小麦、大麦 262 検体中 32 検体から OTA が検出され、平均汚染濃度は 1.06–47.28 $\mu\text{g/kg}$ 、最大汚染濃度は 185.24 $\mu\text{g/kg}$ であった⁴⁾。また、2010 年から 2012 年の 3 年間にかけて行われたカナダ産の出荷・輸出用小麦における調査結果では、輸出小麦 1907 検体中 736 検体から OTA が検出され、平均汚染濃度は 1.56–3.19 $\mu\text{g/kg}$ であった⁵⁾。一方で、日本国内の 2005 年から 2009 年の 5 年間にかけての OTA 汚染実態調査では、国産小麦において 500 検体中 1 検体から最大 0.7 $\mu\text{g/kg}$ の OTA が検出され、輸入小麦では 782 検体中 329 検体から最大 5.2 $\mu\text{g/kg}$ の OTA が検出された⁶⁾。以上の状況等を勘案し、小麦および大麦中の OTA に基準値を設定することが決定された。

麦類の OTA 汚染の原因菌としては *Penicillium verrucosum* が知られている。*P. verrucosum* は温帯から寒冷地の小麦の代表的な OTA 汚染原因菌として知られ、発育最適温度帯は 25–30°C とされている⁷⁾。北米では、収穫後の小麦を保管するサイロにて本菌が高頻度で検出され、サイロに保管されている小麦のうち、上部の開閉口の付近もしくはサイロ内部の小麦残渣から多くの *Penicillium* 属菌胞子と OTA が検出されるとの報告がある⁸⁾。一方で、*A. ochraceus* および *A. westerdijkiae* は主に果実、コーヒーや大豆などの農産物の OTA 汚染原因菌として広く知られるが⁹⁾、2008 年にアルジェリア流通小麦からも OTA 産生性 *A. ochraceus* が単離された¹⁰⁾。加えて、日本国内では小麦粉から *A. ochraceus* が検出された記録が存在することから¹¹⁾、日本国内で *Aspergillus* 属の菌類が主要穀

物である小麦を汚染する可能性についても排除することはできないと言える。

そこで本研究では、国内で消費される主要穀物である小麦上での、*Penicillium* および *Aspergillus* 属菌の OTA 汚染動態に関する知見を得ることを目的として、両菌を小麦へ接種して培養し、それらの OTA 産生性について検討を行った。

B. 研究方法

(1) *Penicillium* および *Aspergillus* 属菌株の収集

小麦へ接種する OTA 産生菌株の探索：OTA 自然汚染小麦粉（Charm Sciences）を購入し、1 g を Dichloran-Rose Bengal-Chloramphenicol agar（DRBC agar: Difco, Becton, Dickinson and company）培地へ均一になるように散布し、7 日間 25°C で培養した。形成されたコロニーを実体顕微鏡下で観察し、*Penicillium* 属様コロニーを Potato Dextrose Agar（PDA：パールコアポテトデキストロース寒天培地，栄研科学）培地へ釣菌して、7 日間 25°C で培養し単離株を作製した。加えて、OTA 産生性を持つことが確認済みの *Penicillium verrucosum* NBRC 30181 株（図 2a,b）を入手し、これも小麦への接種試験に用いる候補菌株として供試した。*Aspergillus* 属菌については、今回供試した小麦検体からは得られなかったことから、OTA 高産生株であることをあらかじめ確認している国立衛研衛生微生物部保存株の *A. westerdijkiae* NIHS 3985（図 2c,d）を供試することとした。

OTA 自然汚染小麦粉より単離した *Penicillium* 属菌株は、分子系統解析による同定を行った。DNA 抽出は DNeasy Plant Mini Kit（Qiagen）を用い、添付のマニュアルに従って実施した。各菌株の β -tubulin 遺伝子（ β -*tub*）の部分塩基配列を決定した。PCR は TaKaRa EX Taq（タカ

ラ株式会社)を用い、プライマーセット bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC -3') および bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC -3') で遺伝子領域を増幅した。得られた PCR 産物を精製後、BigDye Terminator v.3.1 (ThermoFisher Scientific) を用いてサイクルシーケンス反応を実施した。シーケンスサンプルのキャピラリーシーケンスは、最終反応物を Hi-Di formamide (ThermoFisher Scientific) へ溶解後、3730xl DNAanalyzer (ThermoFisher Scientific)を用いて実施した。得られたデータの解析およびアセンブリは解析ソフトウェア ATGC (株式会社日本サーバ)を用いて実施した。得られた各株の β -tub 塩基配列データを用いて、分子系統解析を行った。既報¹²⁾に示された *Penicillium* 属内の系統関係を参照して、*Penicillium* 属菌種の β -tub 塩基配列を Genbank からダウンロードして収集しリファレンス配列とした。それらの配列とともに本研究で決定した単離株の β -tub 塩基配列を Clustal W を用いてマルチプルアライメントし、それを指標として MEGA X¹³⁾を用い近隣結合法による分子系統解析を行った。その結果得られた各単離株とリファレンス株との系統関係を参照し、同定を行った。

(2) OTA 産生株の検索

OTA 自然汚染小麦粉より単離した *Penicillium* 属菌株、*P. verrucosum* NBRC 30181 および *A. westerdijkiae* 菌株を PDA 培地に接種し、25°C で 5 日間培養した。形成したコロニーから胞子を掻き取り、100 mL 容三角フラスコに入れた Yeast extract sucrose (YES) 液体培地 10 mL に接種し、7 日間 25°C で静置培養した。培養終了後、培養液全量を 50 mL 容遠沈管へ回収し、等量の酢酸エチルを加えて激しく攪拌した。3000×g で遠心後上層をナスフラスコに回収し、ロータリ

ーエバポレーターで濃縮乾固後、1 mL のメタノールを加えて溶解した。1.5 mL のプラスチックチューブに移し、遠心エバポレーターで乾固後、酢酸エチル 30 μ L へ再溶解して分析サンプル液とした。薄層クロマトグラフィー (TLC) 用プレート (Aluminium TLC plate silica gel coated; Merck) へ、分析サンプル液および陽性対象として OTA 溶液 50 mg/L を 2 μ L ずつスポットした。その後ヘキサン：酢酸エチル：酢酸 (2：1+10% 酢酸) により展開し、風乾した後、254 nm の UV 照射下でスポットの有無を確認した。Rf 値 = 0.6 でスポットが出現した場合に OTA 陽性と判定した。

(3) 小麦玄麦粒でのカビの OTA 産生性確認試験

(2) にて確認した供試菌株の中で OTA 産生性が最も高かった *Penicillium* 属菌株および *A. westerdijkiae* NIHS 3985 株を PDA 培地に接種した。25°C で 5 日間培養後、形成されたコロニーから綿棒を用いて胞子を掻き取って、0.01% Tween80 水溶液へ懸濁して胞子懸濁液を作製した。胞子懸濁液中の胞子濃度は、血球計算盤 (C-CHIP, DHC-N01; フィンガルリンク株式会社) を用いて胞子数を計測し、10 胞子/ μ L となるように調整して、使用まで 4°C で保管した。

小麦玄麦粒 5 g を 100 mL 容三角フラスコに加え、121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌し、65°C で一晚乾燥したものを培養基質として、以下の a) -d) の 4 実験区の各条件にしたがって培養した。

<胞子接種小麦の培養条件>

a) 100 mL 容三角フラスコに入れ、オートクレーブ滅菌後乾燥した小麦玄麦粒 5 g に対して、滅菌 DW 0.5 mL (加水率 10%)、1.0 mL (加水率 20%)、1.5 mL (加水率 30%)、2.0 mL (加

水率 40%) または 2.5 mL (加水率 50%) を加えて吸水させた。ここに濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、25°C で 2 週間培養した。各加水率×各菌株の培養条件につき 1 回の実験を行った。

- b) 加水率による OTA 産生量変化の再現性を確認するため、*Penicillium* 属菌株のみ接種し実験を行った。加水率 10%、30% または 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、25°C で 2 週間培養した。各加水率につき 3 回の繰り返し実験を行った。
- c) 加水率 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、4°C、15°C または 25°C で 2 週間培養した。各培養温度×各菌株の培養条件につき 3 回の繰り返し実験を行った。
- d) 加水率 50% の小麦 5 g に濃度調整した孢子懸濁液 100 μ L を接種し、15°C で 2 または 4 週間培養した。各培養期間×各菌株の培養条件につき 3 回の繰り返し実験を行った。また培養期間 1 週間ごとに、小麦上の菌糸の発達度を画像記録するため写真撮影を行った。

(4) OTA の定量分析

培養が終了した小麦粒へメタノール：水 (3 : 1) 50 mL を加え、すり鉢で破碎抽出した。破碎物はろ過して共雑物を除去し、ろ液の 300 μ L を 1.5 mL マイクロチューブへ分取した。遠心エバポレーターで乾固した後、精製水 300 μ L で懸濁した。これに等量の酢酸エチルを加え、12,000×g で 5 分間遠心し、上清の 200 μ L を回収、これを 2 回繰り返し 400 μ L の抽出液を得た。抽出液は窒素乾固で完全に酢酸エチルを除去し、アセトニトリル：水：酢酸 (30 : 70 : 1) 300 μ L で再溶解し、さらに同液で 100 倍または 1600 倍で希釈し、12,000×g で 5 分間遠心したものを分析サンプル液とした。分析サンプル液は以下の LC-MS/MS 条件で分析を行った。

<LC-MS/MS の測定条件>

HPLC

カラム : InterSustain Swift C18 HP

2.1×150 mm, 3 μ m

カラム温度 : 40°C

移動相 : A 0.1%ギ酸水溶液

B 0.1%ギ酸含有アセトニトリル

単離条件 : 0 分 A : B = 90 : 10

6 分 A : B = 10 : 90

9.5 分まで保持

流速 : 0.2 mL/分

注入量 : 5 μ L

MS

イオン化 : ESI positive

モニタリングイオン :

OTA 404 [M+H]⁺ > 239, 102

C. 研究結果

OTA 自然汚染小麦粉から、ONWF-P1~P7 の 7 株の *Penicillium* 属菌株が単離された。これら単離株の β -tub 塩基配列に基づく分子系統樹を図 3 に、YES 液体培地の培養液の TLC 分析像を図 4 に示した。今回 OTA 汚染小麦粉検体から単離した *Penicillium* 菌株では、ONWF-P1 の 1 株を除く 6 株について、OTA 産生性を有することが知られる *P. viridicatum* または *P. verrucosum* に近縁である可能性が否定されなかったため、これらの全菌株を用いて YES 液体培地での OTA 産生性確認試験を行った。その結果、それらの菌株全てにおいて OTA 産生性は確認されなかった。続いて、*P. verrucosum* NBRC 30181 および *A. westerdijkiae* NIHS 3985 を用いて同様の OTA 産生性確認試験を行ったところ、十分な OTA 産生性が確認できた (図 5)。以上のことから、この後で実施する小麦玄麦粒での OTA 産生確認試験は、*P. verrucosum* NBRC 30181 およ

び *A. westerdijkiae* NIHS 3985 の 2 菌株を用いて実施することとした。

OTA 産生株 2 菌株のいずれかを接種し、研究方法に記載の条件 (3) -a) で培養した結果を図 6 に示した。*P. verrucosum* 株を接種した小麦では、加水率が高くなるにつれて OTA 含有量も上昇し加水率 50% で最大濃度 3,122 $\mu\text{g/kg}$ を示した。*A. westerdijkiae* 株を接種した小麦では、加水率 40% で OTA 含有量の最大値を示し、21,691 $\mu\text{g/kg}$ であった。また、加水率 10% の小麦においては *P. verrucosum* 株または *A. westerdijkiae* 株のどちらを接種した場合にも OTA が検出された (149 $\mu\text{g/kg}$ または 162 $\mu\text{g/kg}$)。 *P. verrucosum* NBRC 30181 を接種し条件 (3) -b) で 3 回繰り返し実験を行った結果は、加水率 10%、30% および 50% での培養後の OTA 平均濃度はそれぞれ 9 $\mu\text{g/kg}$ 、2,521 $\mu\text{g/kg}$ および 3,801 $\mu\text{g/kg}$ となり (図 7)、培養条件 (3) -a) の実験区で示された *P. verrucosum* 株での加水率と小麦中 OTA 含有量の関係の再現性が確認された。OTA 産生株 2 菌株のいずれかを接種し、条件 (3) -c) で培養した結果を図 8 に示した。加水率 50% の条件下では、両菌株で小麦中の OTA 含有量は 25°C 培養時に最大値を示し、平均濃度はそれぞれ 8,548 $\mu\text{g/kg}$ および 57,482 $\mu\text{g/kg}$ 、最大濃度はそれぞれ 10,150 $\mu\text{g/kg}$ および 109,871 $\mu\text{g/kg}$ であった。15°C の培養時でも、*P. verrucosum* 株では最大 895 $\mu\text{g/kg}$ の濃度で、*A. westerdijkiae* 株では最大 38 $\mu\text{g/kg}$ で、OTA 産生性が確認された。培養温度 4°C では、いずれの菌株でも OTA 産生は確認されなかった。OTA 産生株 2 菌株のいずれかを接種し、条件 (3) -d) で培養した結果を図 9 に示した。培養温度 15°C 加水率 50% の条件下では、接種したいずれの菌株でも小麦中の OTA 含有量は 2 週間培養後に比べて 4 週間後のほうが高く、培養 4 週間後の小麦中 OTA 濃度は、*P. verrucosum* 株では平均 2,202 $\mu\text{g/kg}$ お

よび最大 2,371 $\mu\text{g/kg}$ 、*A. westerdijkiae* 株では平均 7,558 $\mu\text{g/kg}$ および最大 12,791 $\mu\text{g/kg}$ であり、条件 (3) -c) で培養した実験区の結果と比べると、培養期間を 4 週間に延長すれば、15°C でも、特に *A. westerdijkiae* 株で比較的高い OTA 産生性を示すようになることが確認された。また、条件 (3) -d) での培養時に、培養 1 週間ごとに小麦表面でのカビ発育度合いを目視観察し、比較した (図 10)。その結果、*P. verrucosum* NBRC 30181 を接種した小麦では培養 1 週間目で白色の菌糸が確認されたが、*A. westerdijkiae* NIHS 3985 では菌糸は認められず 2 週間目で確認された。したがって、15°C の培養下では、今回使用した *A. westerdijkiae* 株は *P. verrucosum* 株よりも発育が遅く、菌体の発育程度は図 9 で示した OTA 産生程度の経時的推移と同様の傾向を示すことを確認できた。

D. 考察

これまでに、*P. verrucosum* および *A. westerdijkiae* における温度や水分要求性と OTA 産生性との関連について、いくつかの報告がある。Rao ら (2013)¹⁴⁾は、CYA 培地を用いて *P. verrucosum* を 5°C から 40°C の間で培養し、OTA 産生量を測定して、15°C が OTA 産生可能な最低温度であること、25°C で最大値を取ることを報告した。また、Gil-Serna ら (2015)¹⁵⁾は、複数株の *A. westerdijkiae* を用いて各種食品成分を配合した寒天培地上で培養実験を行い、各菌株の OTA 産生性は、培養温度 20°C よりも 24 または 28°C のほうが高く、培地の水分活性値 (aw) は 0.928 よりも 0.964 または 0.995 のほうが高いことを示した。また Akbar ら (2020)¹⁶⁾は、複数株の *A. westerdijkiae* を用いてコーヒー成分を配合した寒天培地で温度 25 または 28°C で培養実験を行い、培地の aw は 0.90 または 0.99 よりも 0.95 または 0.98 のほうが OTA 産生性は高い

ことを示した。本研究では小麦中の水分活性値を測定していないため、水分要求性についてはこれらの結果との直接的な比較はできないが、本研究の条件（3）－a）から c）での実験区の結果（図 6-8）は、供試した 2 菌種 2 菌株での 15℃以上で OTA 産生性があること、および比較的高い水分含有量でより高い OTA 産生性があることを示しており、これらの既報の結果と一致した。また、条件（3）－a）で培養した結果（図 6）では、今回接種実験に用いた 2 菌株においては、乾燥小麦重量の 10%以上の比率で加水すると OTA 産生が生じており、*P. verrucosum* および *A. westerdijkiae* が小麦を汚染した場合、OTA 汚染が生じるためには一定の水分の条件および温度条件を同時に満たす必要があることが確認された。

条件（3）－d）で培養した結果（図 9）において、両菌株をそれぞれ接種・培養後の小麦の OTA 含有量は、2 週間培養後では *P. verrucosum* NBRC 30181 は *A. westerdijkiae* NIHS 3985 よりも産生量が多かったが、4 週間培養後には、*A. westerdijkiae* NIHS 3985 を接種した小麦のほうが OTA 含有量は高くなった。このことから、15℃という室温より低い条件下でも、*A. westerdijkiae* は、小麦の保管期間が 4 週間以上と長期にわたった場合には、小麦における主要な OTA 汚染原因菌として知られる *P. verrucosum* と同程度の OTA 汚染原因菌となり得る可能性が示唆された。加えて、低温保管であっても保存庫の床に残留した小麦粒を放置することで *P. verrucosum* による OTA 汚染が発生することが報告されていることから⁸⁾、残留物の放置期間をできる限り短期間にするすることで、OTA 汚染原因菌の孢子飛散の抑制による小麦の OTA 汚染リスクを減少させることができると考えられた。

今回使用した 2 菌種 2 菌株の OTA 産生性について、Aldred ら（2008）¹⁷⁾は、*P. verrucosum* および *A. westerdijkiae* 孢子を小麦粒へ接種して 15℃培養温度で 28 日間培養を行い、それぞれ最大 121.8 または 94.5 µg/kg の OTA が検出された。今回の検討では、同様の培養温度・期間で、これら 2 菌種による OTA 産生濃度は最大で *P. verrucosum* 株では 2,371 µg/kg、*A. westerdijkiae* 株では 12,791 µg/kg となり、既報の産生量と比較して相当に高い産生量を示した。このことは、同菌種内でも菌株による産生能の強さが異なることや、培養実験時の小麦の水分量が異なることなどに関連したものと考えられる。そのため、今後も多くの菌株で OTA 産生性を確認し、情報を収集する必要があると考えられた。

今年度の検討の結果から、日本国内流通小麦での OTA 汚染のメカニズムとリスクの所在を実験的に確認した。今後は、気候変動などと共に、国内で流通する小麦の原産国や保管状況が変化していく可能性がある。そのため、国内流通小麦の OTA 汚染状況も変化する可能性が考えられ、OTA 汚染実態と OTA 汚染原因菌に関する情報収集を継続していく必要があると考えられた。

E. 結論

室温より低温の 15℃でも小麦への加水量が多く、4 週間培養した結果、*A. westerdijkiae* も *P. verrucosum* と同程度以上の OTA 産生性を示すことを確認した。このことから、*A. westerdijkiae* に汚染された小麦がある程度の水分を含有した状態で長期保存された場合、室温より低温の貯蔵環境下でも *A. westerdijkiae* による高度な OTA 汚染が発生する可能性がある。貯蔵中の小麦の OTA 汚染原因菌として、*P. verrucosum* だけでなく *A. westerdijkiae* にも留意する必要があることが示された。

F. 参考文献

- 1) 田端節子, 飯田憲司, 木村圭介, ら. 2008. 各種市販食品中のオクラトキシン A, B およびシトリニンの汚染実態調査. 食品衛生学会誌, 49 : 111–115.
- 2) Tao, Y., Xie S., Xu F., et al. 2018. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. Food and Chemical Toxicity, 112:320–331.
- 3) Codex. 2013. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Ochratoxin A contamination in Coffee. CAC/RCP 72-2013.
- 4) Kuruc, J.A., Schwarz, P., Wolf-Hall C. 2015. Ochratoxin A in Stored U.S. Barley and Wheat. Journal of Food Protection, 78:597–601.
- 5) Tittlemier, S.A., Roscoe, M., Blagden, R., Kobialka, C. 2014. Occurrence of ochratoxin A in Canadian wheat shipments, 2010–12. Food Additives & Contaminants: Part A, 31:910–916.
- 6) 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課. 2023. 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会資料, 資料 1 : 食品中のオクラトキシン A の規格基準の設定について.
- 7) Larsen, T.O., Svendsen, A., Smedsgaard, J. 2001. Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. Applied and Environmental microbiology, 67:3630–3635.
- 8) Limay-Rios, V., Miller, J.D., Schaafsma, A.W. 2017. Occurrence of *Penicillium verrucosum*, ochratoxin A, ochratoxin B and citrinin in onfarm stored winter wheat from the Canadian Great Lakes Region. Plos One, 12: e0181239.
- 9) Frisvad, J.C., Frank, J.M., Hubranken, J.A., et al. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Studies in Mycology, 50:23–43.
- 10) Riba, A., Makrane, S., Mathieu, F., et al. 2008. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. International Journal of Food Microbiology, 122: 85–92.
- 11) 小笠原和夫, 赤城幾代, 砂川紘之, ら. 1976. 食品の有害カビによる汚染に関する研究 (第 I 報) 穀粉類について. 北海道立衛生研究所報, 25 : 67–73.
- 12) Houbranken, J., Kocsubé, S., Visagie, C.M., et al. 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. Studies in Mycology, 95:5–169.
- 13) Kumar, S., Stecher, G., Li, M., et al. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Molecular Biology and Evolution. 2018. 35(6):1547-1549.
- 14) Rao, V.K., Ramana, M.V., Girisham S., Redd, S.M. 2013. Culture media and factors influencing ochratoxin A production by two species of *Penicillium* isolated from poultry feeds. National Academy Science Letter, 36:101–110.
- 15) Gil-Serna, J., Patiño, B., Gonzalez-Jaen, M.T., Vazquez, C. 2015. *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. Food microbiology, 46:168–175.
- 16) Akbar, A., Medina, A., Magan, N. 2020. Resilience of *Aspergillus westerdijkiae* strains to interacting climate-related abiotic factors: effects on growth and ochratoxin A production on coffee-based medium and in stored coffee. Microorganisms, 8:1268.
- 17) Aldred, D., Cairns-Fuller V., Magan, N. 2008. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth

and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *A. westerdijkiae* on wheat grain. Journal of Stored Products Research, 44:341–346.

G. 研究業績

【論文発表】

該当なし

【学会発表】

- 1) Maiko Watanabe, Wataru Aoki, Yukiko Hara-Kudo, Takahiro Ohnishi, Tomoya Yoshinari. Distribution of moniliformin producing fusaria on grains in Japanese markets. The 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS2024), 2024.10.23-25, 2024.
- 2) Maiko Watanabe, Takahiro Ohnishi, Tomoya Yoshinari. Taxonomic study of moniliformin producing molds in the genus *Fusarium* derived from grains in Japanese retail stores. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms "Approaches for risk analysis and food safety" in 56th UJNR. 2024.09.
- 3) 青木 渉, 吉成知也, 工藤由起子, 渡辺麻衣子. 国内流通穀物におけるモニリフォルミン汚染実態調査. 第120回食品衛生学会学術講演会. 2024.11.7-8.

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

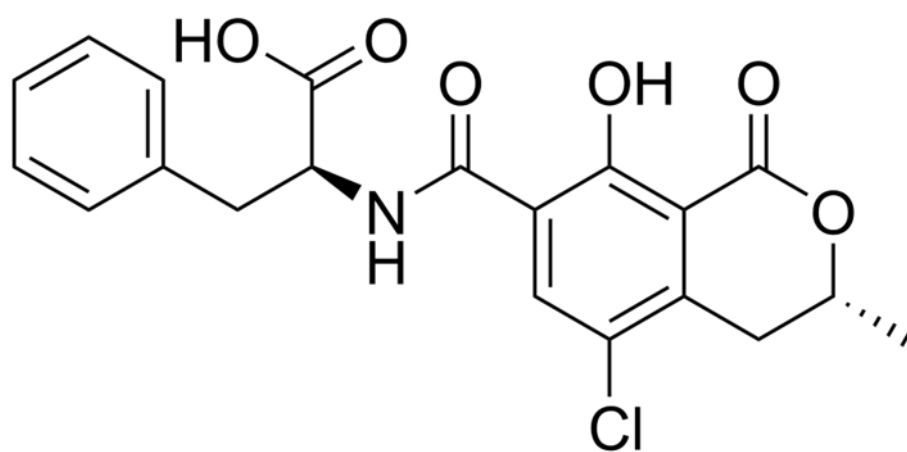


図1. オクラトキシンAの化学構造式

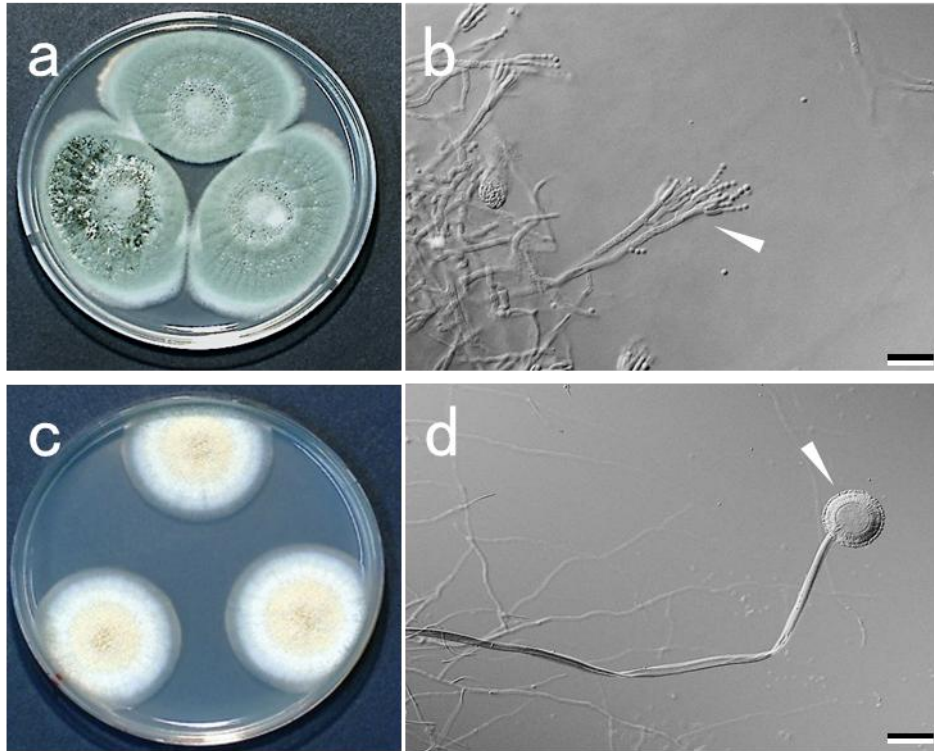


図2. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株
と *A. westerdijkiae* NIHS 3985株のコロ
ニー性状および顕微鏡像

a) NBRC 301081のPDA培地上のコロニー性状（培養5日目）。b) NBRC 30181のペニシリの形態（白矢印）。c) NIHS 3985のPDA培地上でのコロニー性状（培養5日目）。d) NIHS 3985のアスペルジラの形態。b)およびd)のバーは20 μm を示す。

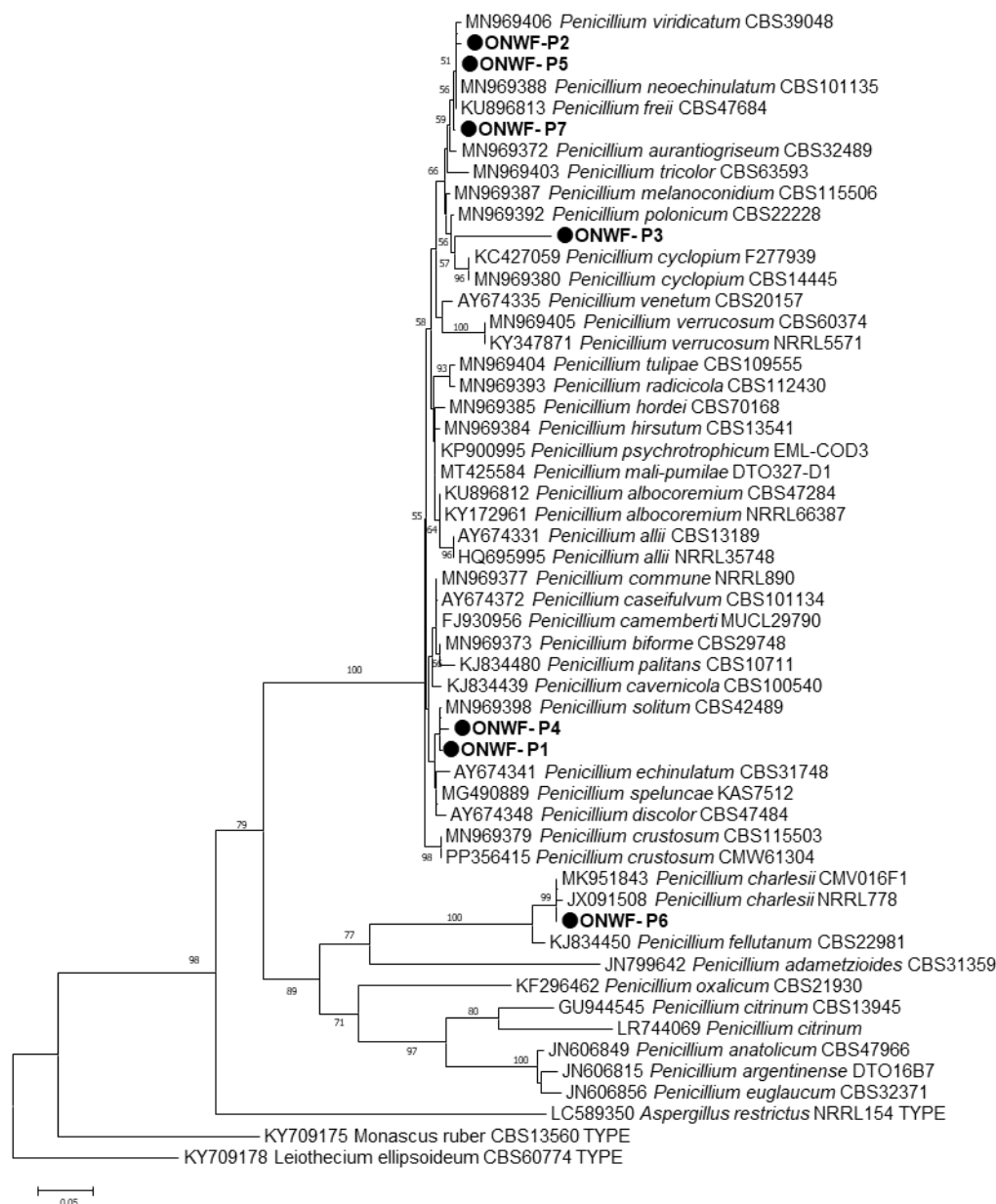


図3. オクラトキシンA自然汚染小麦粉から単離された*Penicillium*属菌株の分子系統樹

β -tubulin遺伝子塩基配列を指標とし、近隣結合法を用いて構築した。Houbranken et al. 2020に示された*Penicillium*属内種間の系統関係を参照して、*Penicillium*属菌種の β -tub塩基配列をGenbankからダウンロードして収集しリファレンス配列とした。本研究で得た単離株は菌株名に●を付した。各クレードの単系統性を支持するBP値は50%以上の値のみ示した。

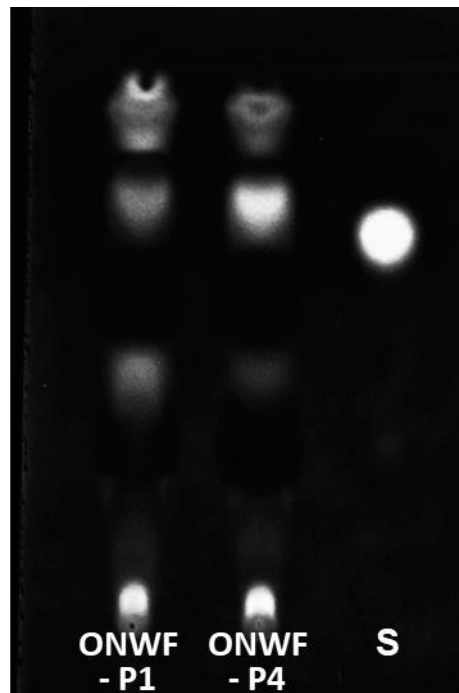


図4. オクラトキシンA自然汚染小麦由来*Penicillium*属菌株の培養液のTLC展開像

OTAと移動距離が類似した化合物が確認された2菌株のTLC展開像を示した。YES液体培地に菌を接種し、5日間培養後、培養物の抽出物をTLCで展開した。S; オクラトキシンA標準品 50 mg/L。

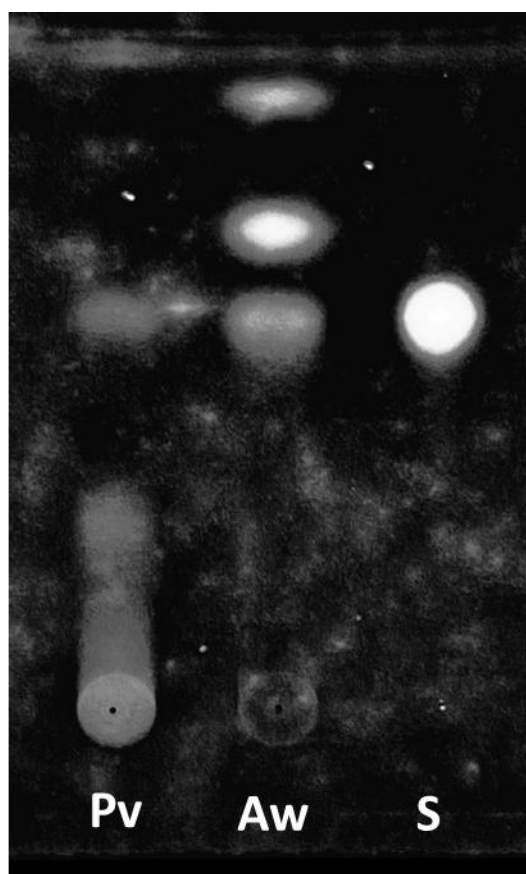


図5. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株および
Aspergillus westerdijkiae NIHS 3985株の培養物の
TLC展開像

YES液体培地に菌を接種し、5日間培養後、培養物の抽出物をTLCで展開した。

Pv; *P. verrucosum* NHL 6478、Aw; *A. westerdijkiae* NIHS 3985、S; オクラトキシンA標準品 50 mg/L。

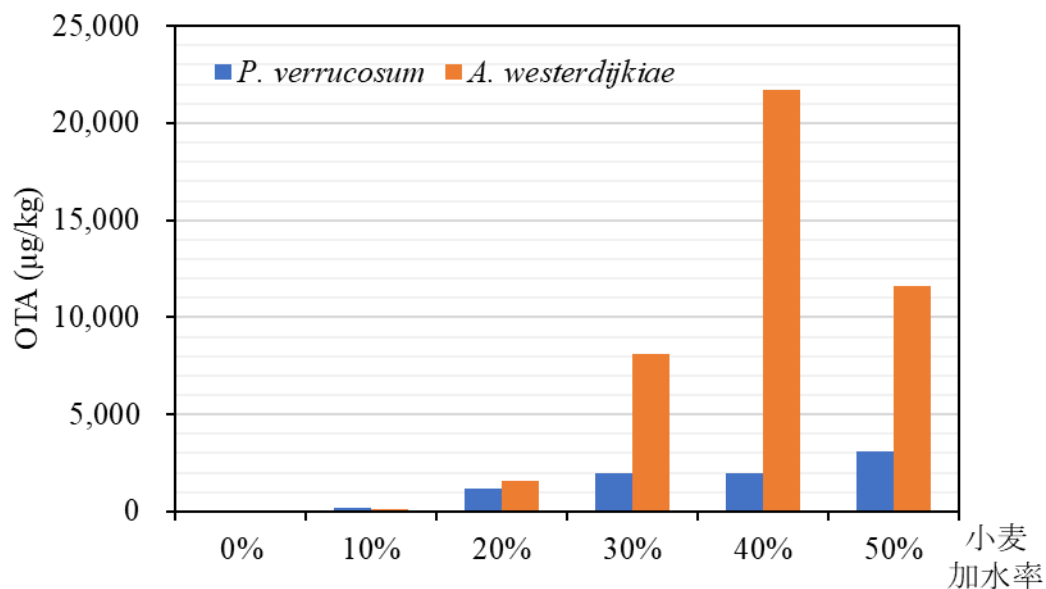


図6. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株および
Aspergillus westerdijkiae NIHS 3985株を接種した
小麦培養物でのOTA含有量の変化

小麦への加水率を10～50%で設定し、培養温度25℃、培養期間2週間での培養後の小麦におけるオクラトキシンAの検出濃度を示す。1培養条件につき1回の実験を実施した。

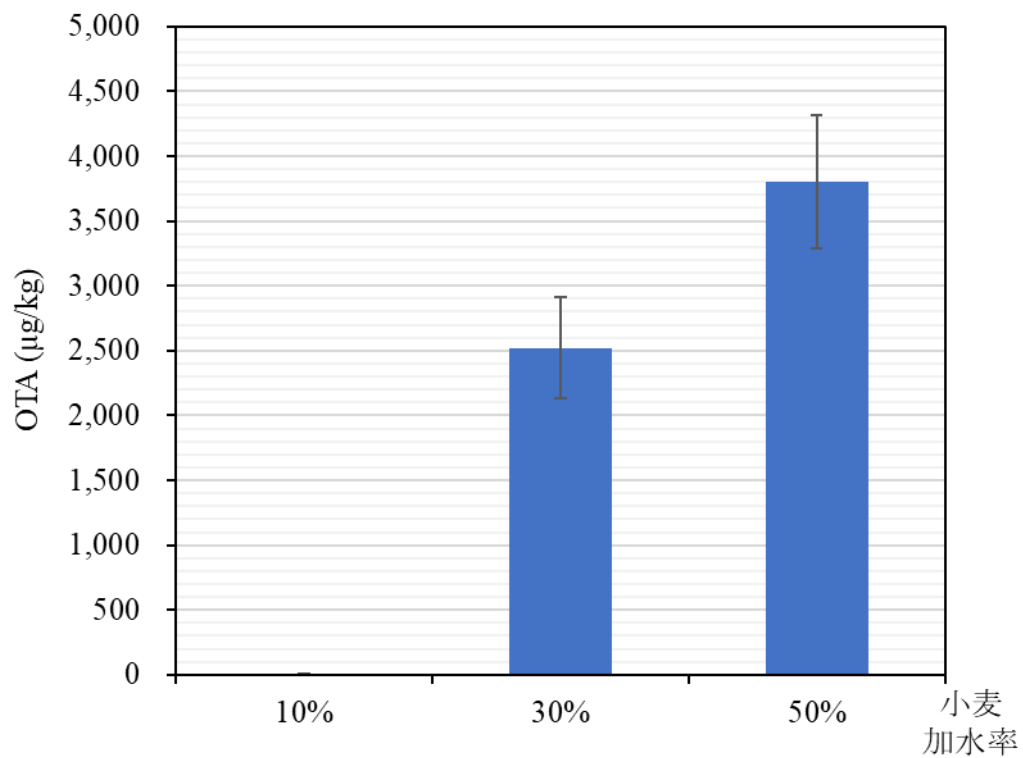


図7. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株を接種した小麦培養物でのOTA含有量の変化

小麦への加水率を10～50%で設定し、培養温度25℃、培養期間2週間での培養後の小麦におけるオクラトキシンAの検出濃度を示す。1培養条件につき3回の繰り返し実験を実施した。

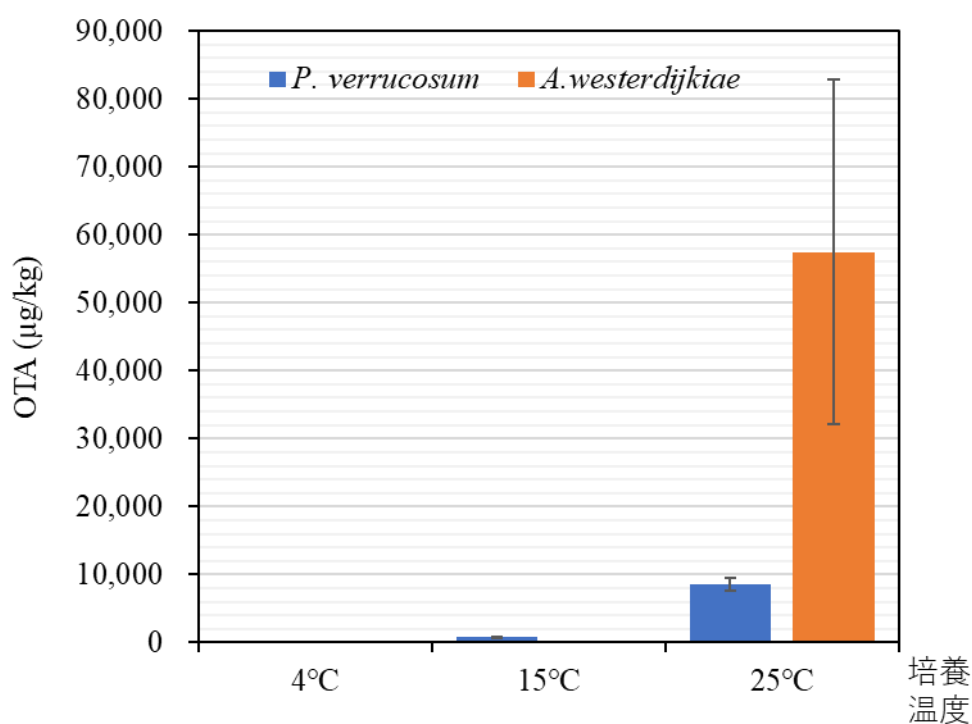


図8. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株および *Aspergillus westerdijkiae* NIHS 3985株を接種した小麦培養物でのOTA含有量の変化

培養温度を4、15または25°Cで設定し、加水率50%、培養期間2週間での培養後小麦におけるオクラトキシンAの検出濃度を示す。1培養条件につき3回の繰り返し実験を実施した。

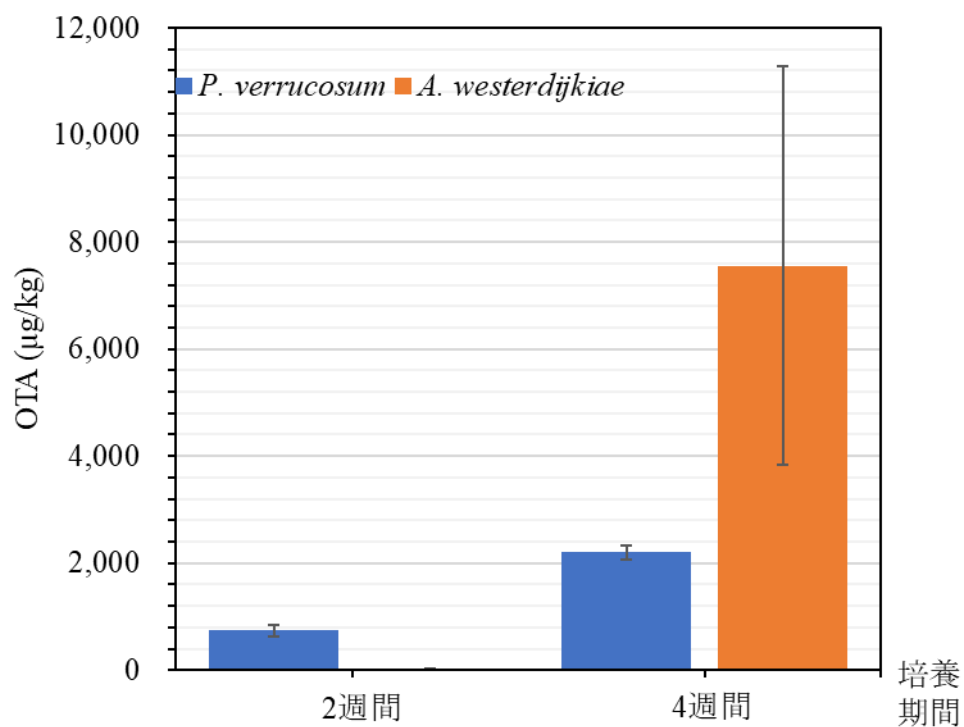
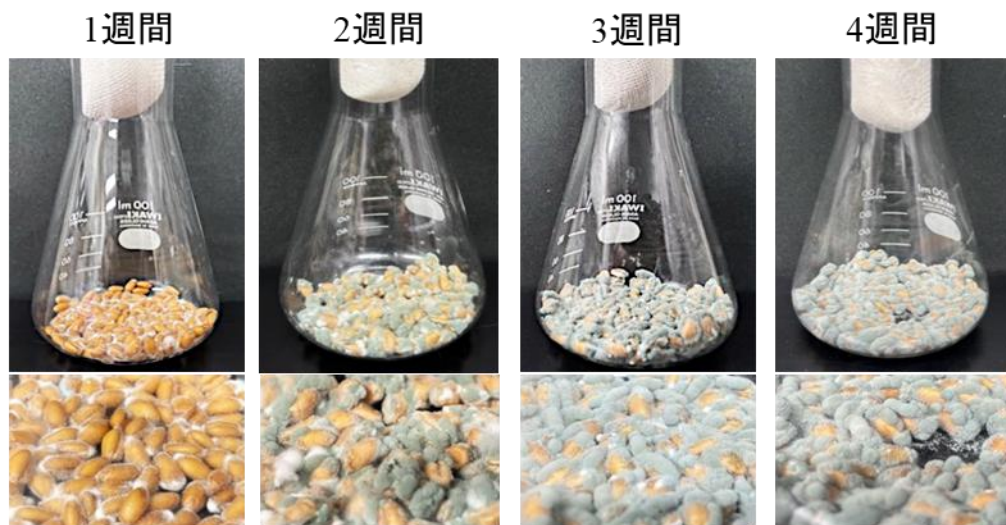


図9. *Penicillium verrucosum* NBRC 30181株および
Aspergillus westerdijkiae NIHS 3985株を接種した
小麦培養物でのOTA含有量の変化

培養温度を15℃で設定し、加水率50%、培養期間2
または4週間での培養後小麦におけるオクラトキシ
ンAの検出濃度を示す。1培養条件につき3回の繰り
返し実験を実施した。

a. *Penicillium verrucosum* NBRC 301081



b. *Aspergillus westerdijkiae* NIHS 3985

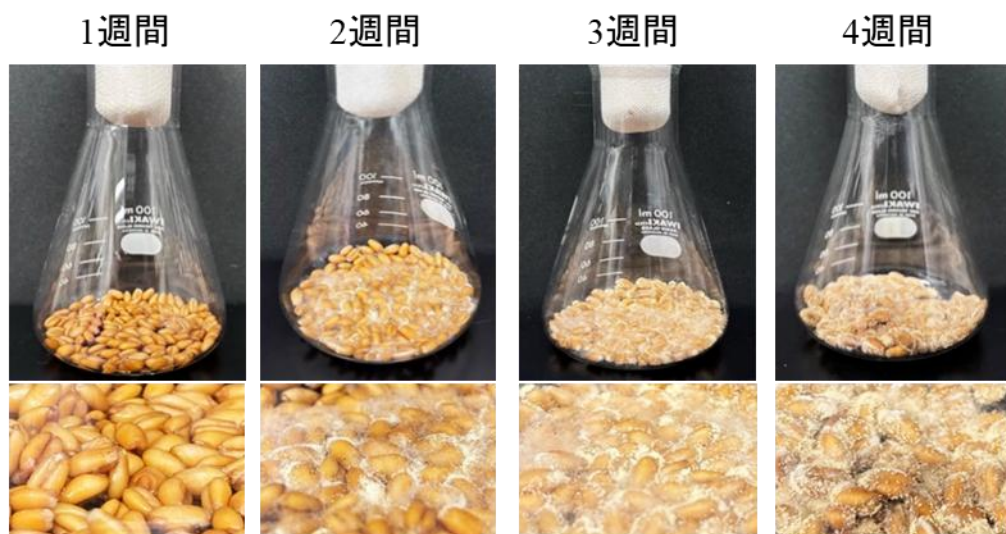


図10. *Penicillium verrucosum* NBRC 301081株および
Aspergillus westerdijkiae NIHS 3985株を接種した
小麦培養物での菌体発育の経時的変化

培養温度を15℃で設定し、加水率50%、培養期間最大4週間で小麦における菌体発育程度を経時的に比較した。写真上部；培養容器全体、写真下部；培養小麦の拡大図。