

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

国内流通穀物におけるカビ毒複合汚染のリスク因子の解明
及び
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

本研究では、国内に流通する農産物を汚染するカビ毒として、モニリフォルミン (MON) およびオクラトキシン A (OTA) を選定し、これらの生産菌の情報を応用した効率的な汚染食品の探索に資する研究を実施した。MON については、日本国内流通食品での MON 生産菌に関する情報が非常に少なく、菌種ごとの MON 生産能の有無や、これを調査するためのアッセイ系の確立が必要とされている。そこで令和 4 年度は、高効率 MON 生産の液体培養法の開発、および *Fusarium* 属菌保存株での MON 生産株の探索を行った。その結果、SSA 培地でのアッセイ系の確立に成功し、この系を用いて、国内分離 *F. subglutinans*、*F. proliferatum* および *F. tricinctum* での MON 生産性を確認できた。令和 5 年度は、高濃度 MON 汚染穀物検体から *Fusarium* 属菌を分離し、前年度に確立した SSA 培養による培養液中の MON の定量を行った。その結果、国内に流通する主要穀物の小麦から *F. avenaceum* とその近縁種、ライ麦から *F. oxysporum*、トウモロコシから *F. fujikuroi* とその近縁種を、それぞれ MON 生産株として検出した。これらの結果から、日本国内で流通する穀物の MON 汚染原因菌の菌種は穀物種毎に傾向があること、MON は特定の *Fusarium* 属菌種の系統が生産する可能性が示唆された。今後、国内流通穀物における MON 生産性 *Fusarium* 属菌の汚染状況の把握を進め、食品の MON 汚染リスク評価のための情報を蓄積することができると期待される。OTA については、麦類では *Penicillium verrucosum* が主要な汚染原因菌として知られるが、過去に OTA 生産性 *Aspergillus* 属菌の報告もあることから、保管中の小麦での *Aspergillus* 属菌の OTA 汚染動態を把握する必要がある。そこで令和 6 年度は、*P. verrucosum* および *A. westerdijkiae* の OTA 生産株各 1 株をそれぞれ小麦へ接種し、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 OTA 産生量の変化を調査した。その結果、培養温度 25°C では、*P. verrucosum* では加水率の増加に従い OTA 産生量も上昇し、*A. westerdijkiae* では含水率 40% で最大となった。温度 15°C・小麦加水率 50%・4 週間の培養では、*P. verrucosum* で平均濃度 2,202 μg/kg、*A. westerdijkiae* で平均濃度 7,558 μg/kg の OTA 生産が確認された。したがって、*A. westerdijkiae* の汚染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、OTA の汚染リスクに関する新たな知見を提供した。

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
高橋 治男	国立医薬品食品衛生研究所
清水 公徳	東京理科大学
平山 美咲	東京理科大学 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

新興カビ毒のうち、MONについて、アメリカ、フィンランド、イタリア、スロバキアなど世界各地での食品汚染が報告されており、我が国に流通する食品においても汚染が懸念されている。EFSAにおいてリスク評価が行われたものの、ヨーロッパ以外の地域における汚染実態や毒性のメカニズムに関する情報が不足しており、十分な評価がなされたとは言えない状況にある。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、食品の種類ごとにどういった*Fusarium*属菌が分布しており、それらはMON生産能を持つかということの把握が必要不可欠であるが、多くの菌種で生産能の有無についての情報が不足している。さらに*Fusarium*属では近年、種が細分化される傾向にあり、菌名の再編成等が多くなされていることから、現在の分類体系によって認識される各菌種において、改めてMON生産能を再評価する必要がある。

OTA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。ヨ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。我が国では小麦の9割を北米とオーストラリアからの輸入に依存している。北米では麦類中のOTA汚染実態調査についていくつかの調査結果が報告され、平均汚染濃度は1.06–47.28 µg/kg、最大汚染濃度は185.24 µg/kgであった。日本国内で流通する小麦についての調査では、国産品500検体中1検体から最大0.7 µg/kgのOTAが検出され、輸入品では782検体中329検体から検出され、最大値は5.2 µg/kgであった。以上の状況等を勘案し、2023年に国内では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。*Penicillium verrucosum*は、小麦の代表的なOTA汚染原因菌として知られている。北米では収穫後の小麦を保管するサイロにて高頻度で検出され、サイロ上部の開閉口付近の小麦残渣から高濃度のOTAが検出されたとの報告がある。一方で、アルジェリアの流通小麦からもOTA生産性*A. ochraceus*が単離されたことから、*P. verrucosum*同様、保管中の小麦での*Aspergillus*属菌のOTA汚染動態を把握する必要がある。そこで、国内で消費される主要穀物である小麦での、*Penicillium*および*Aspergillus*属菌のOTA生産条件等、OTA汚染動態に関する知見を得ることとした。

本研究では、カビ毒の生産菌の情報を収集し、それを応用して効率的な汚染食品の探索を行う目的で、MONおよびOTA生産菌に関する検討を実施した。

B. 研究方法

(1) MON 高生産培養条件の検討

MON 生産性を評価するための培養条件の検討：衛生微生物部第三室に保管されていた *Fusarium* 属菌 5 株を Potato dextrose agar (PDA 培地：栄研化学) に接種した。1 週間前培養を行い、培養後、コロニーが十分に生育したことを確認した。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て懸濁した胞子懸濁液 100 μ L (胞子液接種法) を米培地に接種し、25°C・暗条件で 10 日間静置培養した。培養後、米培地を碎いて 85%アセトニトリル水溶液で抽出後、窒素乾固し、メタノールに溶解後、平衡化した Bond Elut SAX (Agilent SAX : Agilent Technology) で精製し HPLC で分析した。

MON 高生産の培養条件の検討：以下の 3 種の液体培地で菌を培養し、培養液中の MON 濃度を比較した； Potato dextrose broth (PDB 培地:Sigma-Aldrich)、Sucrose salt asparagine 液体培地 (SSA 培地) および Czapek-dox 液体培地 (CZ 培地 : Difco) を用いた。MON 生産陽性コントロール株を PDA 培地で前培養を行った後、液体培地のいずれか 1 種類を三角フラスコに分注し、そこに前培養した *Fusarium* 菌株を寒天培地片接種法または胞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 μ L 回収して、MON 生産量を測定し、経時的に産生量を観察した。分取した培養液中の MON 濃度を HPLC で定量した。この検討において最も MON 産生性の高かった液体培地種および菌接種方法を組み合わせ、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* 属保存株計 28 菌株を接種して培養した。その後で上述の方法と同様に

抽出・精製・分析し、その結果を各菌株の MON 産生能とした。

(2) MON 高生産株の探索

国内のスーパーマーケットやオンラインショップで販売されている小麦、大麦、ハト麦、ライ麦、トウモロコシを含む計 109 の穀物検体のうち、HPLC 分析で MON 汚染量が 100 μ g/kg 以上であった検体を選抜し、*Fusarium* 属菌分離実験に使用した。各穀物検体 70 粒程度を 70%エタノールで表面洗浄後、滅菌蒸留水でリシスし、得られた洗浄済み穀物の水分を除去後、DRBC 平板培地上で培養した。培養後 *Fusarium* 属コロニーを PDA 平板培地へ釣菌して培養し、単離菌株とした。

単離した *Fusarium* 属菌株の分子系統解析による同定：菌体から DNA 抽出し、各菌株の elongation factor-1 alpha 遺伝子 (*EF-1 α*) の部分塩基配列を決定した。プライマーセット EF1 : 5'- ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC -3' および EF2new : 5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT -3' による PCR で *EF-1 α* 部分配列を增幅した。BigDye Terminator v.3.1 を用いてサイクルシークンス反応およびキャピラリーシーケンスを実施した。得られたローデータの解析およびアセンブリ後、*EF-1 α* 塩基配列データを用いて分子系統解析を行い、その株間系統関係を参照し、同定を行った。

単離した 163 株の MON 汚染穀物由来 *Fusarium* 属菌株について、B (1) の検討結果から明らかとなった MON 高生産培養条件を用いて培養し、培養液中の MON を上述の HPLC-DAD 法で検出し、各株の MON 生産性を評価した。

(3) OTA 生産菌の小麦上での生産条件の

検討

OTA 產生性が確認された *P. verrucosum* NBRC 30181 および *A. westerdijkiae* NIHS 3985 を用いて、以下の 4 条件で小麦における OTA 產生性確認試験を行った。

- 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胞子懸濁液 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 產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 に濃度調整した胞子懸濁液 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 に濃度調整した胞子懸濁液 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 に濃度調整した胞子懸濁液 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。

C. 研究結果

(1) MON 高生産培養条件の検討

供試菌株の MON 検出量は、鹿児島県サトウキビ土壤由来の *F. subglutinans* IFM50097 では寒天培地接種法で 67.1

mg/kg、胞子液法で 5.2 mg/kg の MON 產生性が、沖縄県サトウキビ土壤由来の *F. proliferatum* IFM50127 では寒天培地接種法で 5.4 mg/kg の MON の產生が認められた。したがって、前培養した *Fusarium* 菌体の接種方法は、胞子液よりも寒天培地接種法の方が生産量は高くなることが明らかとなった。陽性コントロールとして 2 株の MON 生産株を得た。

3 種の液体培地での MON 生産量を比較したところ、CZ 培地と PDB 培地ではいずれも培養液中の MON は非検出であった。SSA 培地では、*F. subglutinans* IFM50097 および *F. proliferatum* IFM50127 で MON 產生性が認められた。これら 2 株の培養液中の培養期間の長さと MON 產生量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、近似性が高かった。以上のことから、少なくとも 28 日間の培養期間内では時間に比例して MON 產生量が増加することが確認された。

保存株 28 種を SSA 培地に寒天培地接種法で接種して培養し、MON 生産量を確認した。その結果、6 週間の培養期間終了後までに、沖縄県サトウキビ畑土壤由来の *F. proliferatum* IFM50127、北海道小麦畑土壤由来の *F. tricinctum* IFM50055 および沖縄県土壤由来の *F. suglutinans* TSY0645 の 3 株が MON 產生性を有した。これら以外の菌種ではいずれも MON の生産は認められなかった。

(2) MON 高生産株の検索

100 μ g/kg 以上の濃度で MON に汚染されている 16 植体の穀物を培養し、分子系統解析と形態観察によって種同定を行った。その結果、計 169 株 14 菌種を検出した。これらのうち、MON 產生性を示した菌株は実験に

供試した全 163 株中 83 株あり、菌種毎の培養液中の MON 濃度平均値および MON 產生陽性株の比率は、*F. fujikuroi* (83.9 mg/L, 62/65)、*F. annulatum* (21.5 mg/L, 4/8)、*F. temperatum* (1.0 mg/L, 3/5)、*F. subglutinans* (1.8 mg/L, 1/2)、*F. andiyazi* (39.9 mg/L, 2/2)、*F. oxysporum* (165.9 mg/L, 1/1)、*F. nisikadoi* (88.1 mg/L, 1/1)、*F. avenaceum* (6.4 mg/L, 8/9) および *Fusarium* sp.1 (25.4 mg/L, 3/3) であり、9 種で MON 產生性が確認された。MON 產生性陽性株の比率については種によって差がある傾向が見られた。また、最も MON を產生性が高かった菌株は *F. fujikuroi* の Zea020-29 株で、359 mg/L の濃度で検出された。*F. verticillioides*、*F. luffae*、*F. poae*、*F. equiseti* および *F. graminearum* は供試したすべての分離株で MON 產生性が確認されなかった。

(3) OTA 生産菌の小麦上での生産条件の検討

培養条件 (3) - a) の結果では、*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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ または 162 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。培養条件 (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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2,521 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および 3,801 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となつた。培養条件 (3) - c) の結果では、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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および 57,482 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大濃度はそれぞれ 10,150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および 109,871 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。15°C の培養時でも、*P. verrucosum* 株では最大 895 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度で、*A. westerdijkiae* 株では最大 38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、OTA 產生性が確認された。培養温度 4°C では、いずれの菌株でも OTA 產生は確認されなかった。培養条件 (3) - d) では、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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および最大 2,371 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、*A. westerdijkiae* 株では平均 7,558 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および最大 12,791 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 產生性を示すようになることが確認された。

D. 考察

(1) MON 高生産培養条件の検討

今回の検討によりで、*Fusarium* 属菌の MON 產生能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、複数の国内分離株から MON の產生性が確認されたことから、產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 產生菌の分布実態を明らかにする。

(2) MON 高生産株の検索

各種 MON 汚染穀物から分離された MON 產生株を穀物の MON 汚染原因菌として考えた場合、その菌種は、小麦では *F. avenaceum*、ライ麦では *F. oxysporum*、トウモロコシでは *F. fujikuroi*, *F. annulatum*, *F. temperatum* , *F. andiyazi* , *F. subglutinans* および *F. nisikadai* であり、穀物によって MON 產生菌種は異なる傾向が見られた。本研究では、*F. fujikuroi* では 300 mg/kg 以上の高濃度 MON 產生菌株の存在が確認されたことから、*F. fujikuroi* とその近縁種は国内でのトウモロコシの主な MON 汚染原因菌である可能性が考えられた。さらに、本菌の検出頻度の高い穀物は他の農産物に比べて MON 汚染リスクが高いと考えられた。本検討によって判明した穀物の MON 汚染原因菌の情報を元に、国内に流通する穀物における *Fusarium* 属菌の汚染状況を把握することで、MON 汚染のリスク評価に関する知見を蓄積することができた。

(3) OTA 生産菌の小麦上での生産条件の検討

OTA 產生性を有する 2 種の菌株をそれぞれ接種・培養後的小麦の OTA 含有量は、2 週間培養後では *P. verrucosum* NBRC 30181 は *A. westerdijkiae* NIHS 3985 よりも產生量が多かったが、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°C 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。

E. 結論

本研究の結果から、*Fusarium* 属における幅広い菌種が MON 產生性を持つとされる従来からの知見とは異なり、MON は特定の系統が產生する可能性が考えられた。今回判明した汚染原因菌の情報を元に、国内に流通する穀物における *Fusarium* 属菌の汚染状況を把握することで、MON 汚染のリスク評価に関する知見を蓄積することができた。

また、小麦における OTA 汚染原因菌についての解析の結果、室温より低温の 15°C 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 產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. 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 2022.
- 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.
- 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 年度
- 4) 渡辺麻衣子、吉成知也、青木渉、清水公徳、伴さやか、矢口貴志、工藤由起子. 国内流通ハトムギにおけるカビ毒汚染実態およびカビ毒産生性 *Fusarium* 属菌の分布調査. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 2023 年
- 5) 青木渉、吉成知也、工藤由起子、渡辺麻衣子. 新興カビ毒モニリフォルミン汚染穀物中の原因菌探索. 第 119 回食品衛生学会学術講演会. 2023 年度
- 6) 青木渉、吉成知也、工藤由起子、渡辺麻衣子. *Fusarium* 属におけるカビ毒モニリフォルミン産生能評価法の検討. 日本マイコトキシン学会第 90 回学術講演会. 2024 年度
- 7) 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).
- 8) 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.
- 9) 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 年度

G. 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