別紙３

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

フードチェインを基盤とする真菌・カビ毒の定量的な微生物リスク評価・管理実現のための予測モデル開発に関する研究

研究分担者　安部　大樹　国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部研究員

研究要旨

かび毒の定量的微生物リスク評価の実施のために糸状菌の増殖および毒素産生量を予測する数理モデルが必要となる。しかし、糸状菌の予測モデルの開発のためには食品中における糸状菌の菌体量を推定する定量法が必要である。本研究はかび毒産生性の糸状菌の増殖量測定法としてリアルタイム PCR 法を提案し、糸状菌の菌体量増殖予測モデルおよびかび毒産生量予測モデルの開発手法を確立することで、フードチェインを基盤とするかび毒の定量的微生物リスク評価・管理実現に資することを目的とした。令和 7 年度は、リアルタイム PCR による菌体増殖量の定量法を確立するために、糸状菌からの効率的な DNA 抽出法の検討、プベルル酸産生糸状菌 *Penicillium adametzioides* の遺伝子特異的に増幅するリアルタイム PCR プライマーの設計と検証、および定量 PCR 法による菌体重量推定を行い、毒素産生量との関係について調査を行った。結果、尿素緩衝液とシリカゲルカラムを組み合わせた手法がアフラトキシン産生糸状菌 *Aspergillus parasiticus* およびオクラトキシン A 産生糸状菌 *P. verrucosum* から効率的に DNA を抽出することができた。また、設計されたプライマーの *P. adametzioides* への特異的反応性と、菌体増殖モデル開発のための増殖量推定への妥当性が確認された。検討した DNA 抽出法及びプライマーを用いて、アフラトキシンおよびプベルル酸産生糸状菌を 25℃で培養し菌体重量を推定および毒素産生量の変化を測定した結果、*A. parasiticus* では菌体重量は培養 4 日目に定常になり、アフラトキシンは培養 2 日目から産生が観察され、最大産生量は 558 μg/mL だった。また *P. adametzioides* では培養 3 日目で増殖限界に達し、プベルル酸は培養 3 日目から産生され、最大で 898 μg/mL のプベルル酸産生が確認された。以上の結果から主要なかび毒を産生する糸状菌について菌体量を推定する方法としてリアルタイム PCR を用いた手法が有効であることが示された。

A. 研究目的

かび毒は、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属、*Fusarium* 属等の特定の糸状菌が産生する二次代謝産物であり、人体に対して急性または慢性の毒性を示す化学物質である。主要なかび毒には、アフラトキシン、オクラトキシン A、デオキシニバレノール（DON）、ゼアラレノン、フモニシンなどがある。特に健康危害の可能性が高いと評価されたかび毒については、国内外のリスク管理機関により、最大基準値の設定やモニタリング等を通じたリスク管理が行われている。食品へのかび毒による汚染は、圃場や不適切な流通・保管過程で生じることが知られているが、現在のリスク評価は主として流通食品中の汚染実態データの蓄積に基づいて健康影響を推定しており、食品が消費されるまでの生産、

加工、保存といったフードチェイン全体の情報は十分には考慮されていない。そのため、リスク評価には膨大なサンプルと分析データを要する上、フードチェインに基づく体系的な情報が不足していることから、効率的な衛生管理や、長期化・複雑化する流通環境に対応した迅速な定量的評価が制限されている。一方で近年、リステリアや腸管出血性大腸菌などの病原性細菌を対象に、食品の保存温度・期間や、pH・水分活性などの環境情報をもとにして加工や保存中などのフードチェイン中における健康危害リスクの増減を定量的に予測・評価することで、適切なリスク管理に利用する定量的微生物リスク評価（Quantitative Microbial Risk Assessment : QMRA）が注目されている。しかし, 現状では対象のほとんどが細菌のみである。定量的微生物リスク評価の実施のためには、殺菌処理における殺菌量予測モデルや保存・流通中の増殖量予測モデルが必要である。しかし、糸状菌の増殖量予測モデルの開発には定量法における課題 [1] が問題となっている。細菌試験で一般的に用いられるコロニー計数法は多細胞生物である糸状菌による成長を表すには適しておらず、真核生物であるため生理学的状態等による発現の変動性（バラつき）が大きい。その為、これまでは糸状菌の菌体増殖量や毒素産生量の予測モデル開発は困難であった。本研究事業では菌体量の定量法としてリアルタイム PCR 法を提案し、菌体量およびかび毒産生量等の変動性を数理モデルによって補完する手法を検討することを目的とする。

令和 7 年度は食品中における糸状菌汚染の定量リアルタイム PCR 法のため、糸状菌からの効率的な DNA 抽出法の探索を行った。糸状菌は細胞膜の他にキチン、α-1,3-グルカンや β-1,3-グルカンなどの多糖類を主成分とする細胞壁を持ち、効率的な DNA 抽出のためには細胞壁を処理する必要がある。また、増殖量予測モデル作成のためには多数のデータ点が必要となるため、多くのサンプルを効率的に調製することのできる DNA 抽出法の検討を行った。またプベルル酸産生 *P. adametzioides* のリアルタイム PCR による定量法の開発のために、*P. adametzioides* の遺伝子を特異的に増幅させるリアルタイム PCR 用プライマーを開発した。加えて、増殖量およびかび毒産生特性を明らかにするため、本年度に検討を行った DNA 抽出法およびリアルタイム PCR 法を用いてアフラトキシン産生 *A. parasiticus* および *P. adametzioides* の菌体重量と各かび毒の産生量の変化を調べた。

B. 研究方法

（１）定量 PCR 法による菌体量推定のための DNA 抽出法の検討

①供試糸状菌および培養条件

アフラトキシン産生菌である *A. parasiticus* NRRL 2999 およびオクラトキシン A 産生菌である *P. verrucosum* NIHS 8819 を供試菌として用いた。それぞれの保存ストックから胞子を 0.1%ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート 1.0 mL に懸濁し調製した胞子懸濁液 10 µL をポテトデキストロース寒天培地（PDA）上に 3 箇所滴下し、25°C・7-14 日間の三点培養を行った。培養後の PDA に 0.1%ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート 5.0 mL を加えて、コンラージ棒でかき取り、胞子懸濁液を作成した。得られた胞子懸濁液は 100 µL あたり 10^2-10^3 CFU（Colony Forming Unit）となるようにポテトデキストロース液体培地（PDB）を用いて希釈し、100 µL をスクリューキャップ付きマイクロチューブに分注し、25°C・5 日間の静置培養を行った。培養後の菌体は精製水を用いて 3 回洗浄し、凍結乾燥の後に DNA 抽出まで−30°C にて保存した。胞子懸濁液から 3 反復の増菌を行い、それぞれの DNA

抽出試験に供した。

②DNA 抽出法

細胞壁の処理法として酵素消化法、プロトプラスト化法、尿素緩衝液法の 3 種類、DNA 精製法としてフェノール-クロロホルム法とシリカゲルカラム法の 2 種類を組み合わせて計 6 種類の DNA 抽出法を比較・検討した。凍結乾燥後の菌体の入ったスクリューキャップ付きマイクロチューブにタングステンカーバイドビーズ（キアゲン社製）を一つ入れ、10 秒の間隔を開けて 3200 rpm、10 秒間のビーズ破砕を 6 回行った。ビーズ破砕後、15000 *g*、10 分間の遠心分離を行い、細胞壁処理に供した。

酵素消化法を用いた細胞壁処理法では、先行研究[2,3]と LongLife Zymolyase のプロトコルを参考にした。ビーズ破砕した菌体に 0.1 M ソルビトール、0.1 M トリス塩酸緩衝液（Tris–HCl）、0.1 M エチレンジアミン四酢酸（EDTA）溶液からなるソルビトール緩衝液 400 µL と β-メルカプトエタノール 4 µL、LongLife Zymolyase（G-Biosciences 社製）40 µL を加え、37°C、900 rpm にて 1 時間の恒温振とうを行った。恒温振とう後、15000 *g*、10 分間、5°C の遠心分離を行い、上清を捨て、沈澱したペレットを DNA 精製に供した。

プロトプラスト化法を用いた細胞壁処理法では、VinoTaste Pro を用いた先行研究[4]を参考に、68 g/L VinoTaste Pro（Novonesis 社製）、0.8 M 塩化ナトリウム、0.1 M リン酸緩衝液からなる VinoTaste Pro 緩衝液 500 µL を加え、37°C、900 rpm にて 1.5 時間の恒温振とうを行った。恒温振とう後、15000 *g*、4°C、10 分間の遠心分離を行い、上清を捨て、沈澱したペレットを DNA 精製に供した。

尿素緩衝液法を用いた細胞壁処理法では、糸状菌からの長鎖 DNA の抽出を目的とした先行論文[5,6]と DNAs-ici!-F のプロトコルを参考に、破砕した乾燥菌体に DNAs-ici!-F（リーゾ社製）を 400 µL 加え、チューブローテータを用いて室温で 15 分間 9-10 rpm で転倒混和した。後述のシリカゲルカラムを用いた DNA 精製法では RNase A（100 µg/mL）を 4 µL 加え、フェノール-クロロホルム法では 20 µg/mL Proteinase K を 3 µL 添加し、60°C、900 rpm にて 15 分間の恒温振とうを行い、DNA 精製に供した。

フェノール-クロロホルム法を用いた DNA 精製では、一般的なフェノール-クロロホルム DNA 抽出法[7]を参考に、0.5 M NaCl、0.2 M Tris-HCl (pH 7.5)、0.01 M EDTA/1% SDS からなる STES 緩衝液 250 µL をペレットに加え、チューブローテータを用いて室温で 10 分間 9-10 rpm で転倒混和した。3 M 酢酸ナトリウム 37.5 µL、エタノール 750 µL を加え、ゆっくりかく拌した後 4°C、15000 rpm、5 分間遠心分離し、上清を除去した。Tris-EDTA（TE）緩衝液 500 µL を加え、再溶解した後 RNase A（20 mg/mL）を 1.25 µL を加え、37°C、30 分静置した。Proteinase K（20 mg/mL）を 3 µL 加えて 60°C、15 分、900 rpm で恒温振とうを行った。氷上で 5 分間冷却した後、フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコール（25：24：1）の混液 500 µL による洗浄と 15000 *g*、4°C、10 分間の遠心分離を 2 回繰り返し、イソプロパノール 300 µL と遠心分離による洗浄と、70%エタノールと遠心分離による洗浄を行なった。尿素緩衝液法とフェノール-クロロホルム法を組み合わせた方法では、細胞膜を処理する手順を省略し、フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコールの混液を添加する手順から行なった。70%エタノールを完全に乾燥させた後 TE 緩衝液 100 µL を加えて DNA 抽出液とした。

シリカゲルカラム法を用いた DNA 精製では、DNeasy Plant mini キット（キアゲン社製）を用いた。400 µL の AP1 緩衝液と 4 µL の RNase A（100 mg/mL） をペレットに加え、混合した後、65°C、900 rpm にて 15 分間の恒

温振とうを行った。3 M 酢酸カリウム 130 µL を溶解液に加え混合し、氷上で 5 分間静置した。尿素緩衝液法とシリカゲルカラム法を組み合わせた場合では、細胞膜の処理を行う AP1 緩衝液での処理を省略し、酢酸カリウムを加えた。20000 *g*、4°C、5 分間の遠心分離を行い、上清を QIAshredder Mini スピンカラムに加え、20000 *g*、4°C、2 分間の遠心分離を行った。通過液 450 µL を回収し、675 µL の AW1 緩衝液を加え混合した混液を 2 回に分けて 6000 *g*、1 分間の遠心分離で DNA を DNeasy Mini スピンカラムに吸着させ、AW2 緩衝液 500 µL を用いて 2 回洗浄し、20000 *g*、2 分間の遠心分離でカラム内の緩衝液を完全に除去した。AE 緩衝液 100 µL を添加し、室温で 5 分間静置した後、6000 *g*、1 分間の遠心分離で DNA を溶出し、DNA 抽出液とした。

③リアルタイム PCR による DNA 抽出量の比較

菌体からの DNA 抽出効率の比較を行うためにリアルタイム PCR 法によるサイクルタイム値（Ct 値）の比較を行った。得られた DNA 抽出液をテンプレートとして、*A. parasiticus* ではアフラトキシン生合成酵素の一つをコードする nor-1 遺伝子の一部を増幅する nortaq プライマー[8]、*P. verrucosum* ではオクラトキシン A 生合成酵素の一つをコードする otapksPN 遺伝子の一部を増幅する npstr プライマー[9,10]を用いてリアルタイム PCR を行うことで Ct 値の比較を行った。PCR 反応は SYBR Green qPCR Master Mix および QuantStudio 5 リアルタイム PCR システム（共にサーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて行った。

（２）*P. adametzioides* の菌体量推定のためのリアルタイム PCR 用のプライマーの探索

①供試糸状菌とリアルタイム PCR 条件

プベルル酸産生菌である *P. adametzioides* 5 菌株（NIHS8776、NIHS8943、NIHS9627、NIHS9629、NIHS9814）と *P. adametzioides* 以外の *Penicillium* 属糸状菌 10 菌株（*P. verrucosum* NIHS8819、*P. lilacinoechinulatum* NBRC6108、*P. cyclopinum* NBRC6240、*P. caseifulvum* NBRC7733、*P. brocae* NIHS8908、NIHS9500、NIHS9509、*P. viticola* NIHS8855、*P. adametzii* NIHS9761、*P. corylophilum* NIHS9512）を用いた。（１）―①と同様に胞子懸濁液を作成した。得られた胞子懸濁液 100 µL と PDB 1.0 mL をスクリューキャップ付きマイクロチューブに分注し、1200 rpm で 25°C・1 晩の振とう培養を行った。培養後の菌体を精製水と遠心分離を用いて 3 回洗浄し、凍結乾燥を行い前述の（１）―②の尿素緩衝液法とシリカゲルカラム法を組み合わせた抽出法で DNA を抽出した。予め得られていた DNA 配列を元に、*P. adametzioides* の β-チューブリンを特異的に増幅するリアルタイム PCR プライマーを 3 種類設計し、（１）―③と同様にリアルタイム PCR を行い、増幅曲線の確認とともに，増幅産物を 2%アガロース S（ニッポンジーン社製）ゲル中で電気泳動することでそれぞれのプライマーの増幅特異性を確認した。

②菌体量推定のための DNA 抽出

①で増幅が確認できた PCR プライマーについて、リアルタイム PCR を用いて菌体重量の推定を行うことが可能かを検証するため、DNA 抽出を行う菌体の重量と検量線の相関分析および検量線の作成を行った。①と同様に作成した *P. adametzioides* NIHS8776 の胞子懸濁液 1.0 mL を PDB 20 mL の入った滅菌済みの 125 mL 容三角フラスコに加え、25°C・1 日間の振とう培養を行った。培養後の菌体を精製水と遠心分離を用いて 3 回洗浄し、精製水で多段階希釈を行い、凍結乾燥を行った。乾燥菌体の重量を測定した後、①と同様の手順で DNA 抽出とリアルタイム PCR 反応を行い、菌体重量と Ct 値の検量線を作成した。

（３）毒素産生培養実験

①供試糸状菌と培養条件

初年度は増殖量と毒素産生が安定する菌種と培養条件を用いて増殖挙動を確認した。アフラトキシン産生菌である *A. parasiticus* NRRL 2999 およびプベルル酸産生菌である *P. adametzioides* NIHS8776 を供試菌として用いた。①と同様に作成した胞子懸濁液を 100 μL あたり 10^2-10^3 CFU となるように PDB で希釈し、500 μL をスクリューキャップ付きマイクロチューブに分注し、25°C で *A. parasiticus* では 10 日間まで、*P. adametzioides* では 7 日間までの静置培養を行い、1 日おきに菌体重量と PDB 中の毒素産生量を測定した。培養後の PDB に滅菌した精製水 500 μL を加え、かく拌した後、4°C、15000 rpm、10 分間遠心分離を行い、上清 500 μL を毒素産生量測定用検体とした。沈澱した菌体はさらに精製水と遠心分離で 3 回洗浄し、凍結乾燥後 DNA 抽出まで−30°C にて保存した。

遠心分離した上清 500 μL に酢酸エチル 500 μL を加え、激しく混合後、15000 rpm で 2 分間の遠心分離を行い、酢酸エチル層を回収した。プベルル酸抽出では酢酸エチル添加前に 6 M 塩酸を 50 μL 添加混合した。混合・遠心分離と酢酸エチル層の回収を計 2 回繰り返し、酢酸エチル層を窒素気流で乾固し、残さに HPLC 注入液 125 μL を添加後、ソニケーターを用いて残さを溶解させた後、激しく混和した。アフラトキシンの測定では精製水とアセトニトリル (50 : 50) の混液を、プベルル酸の測定では、0.01%のトリフルオロ酢酸を含む精製、アセトニトリル (70:30) の混液を HPLC 注入液とした。12,000 *g* で 5 分間遠心分離後、その上清を HPLC 分析に供した。

前述の（１）―②の尿素緩衝液法とシリカゲルカラム法を組み合わせた抽出法で DNA を抽出し、リアルタイム PCR 反応を行い、得られた Ct 値から菌体重量を推定した。プライマーには *A. parasiticus* では nortaq[8] 、*P. adametzioides* では Padamtubb2 を使用した。

②検量線の作成

前述の（２）―②と同様に 25°C・1 日間の振とう培養を行った菌体を精製水と遠心分離を用いて 3 回洗浄し、精製水で多段階希釈を行い、凍結乾燥を行った。乾燥菌体の重量を測定した後、①と同様の手順で DNA 抽出とリアルタイム PCR 反応を行い、菌体重量と Ct 値の検量線を作成した。

③HPLC の測定条件

アフラトキシン産生量測定の場合

カラム：Inertsil ODS-3
　　4.6×250 mm、5 μm
カラム温度：40°C
移動相：A　精製水
　　B　メタノール
分離条件：
0 分　A : B = 50 : 50 リニアーグラジエント
15 分　A : B = 30 : 70 20 分まで保持してから初期条件に戻す。
流速：1.0 mL/分
注入量：10 μL
検出波長：365 nm

プベルル酸産生量測定の場合

カラム：YMC-Triart C18
　　4.6×250 mm、5 μm
カラム温度：40°C
移動相：A　0.1% トリフルオロ酢酸水
　　B　アセトニトリル
分離条件：
0 分　A : B = 90 : 10 2 分まで保持
2 分　A : B = 90 : 10 リニアーグラジエント
27 分　A : B = 20 : 80 32 分まで保持してから初期条件に戻す。
流速：1.0 mL/分
注入量：10 μL
検出波長：358 nm

C. 研究結果

（１）定量 PCR 法による菌体量推定のための DNA 抽出法の検討

リアルタイム PCR による Ct 値の比較の結果を図 1 に示す。*A. parasiticus* を対象とした試験では尿素緩衝液とシリカゲルカラム法を組み合わせた DNA 抽出法が Ct 値が 23.7±0.7 と最も低く、続いて尿素緩衝液とフェノール-クロロホルム法を組み合わせた DNA 抽出法で Ct 値が 24.7±0.07 であった。また、*P. verrucosum* を対象とした試験では、尿素緩衝液とフェノール-クロロホルム法を組み合わせた DNA 抽出法が Ct 値が 18.5±0.3 と最も低く、続いて尿素緩衝液とシリカゲルカラム法を組み合わせた DNA 抽出法で Ct 値が 19.4±0.09 であった。*A. parasiticus* および *P. verrucosum* を対象とした両方の試験で尿素緩衝液を用いた方法が最も Ct 値が低くなり、抽出効率および検出感度が高くなる結果であった。また、尿素緩衝液とシリカゲルカラム法を組み合わせた DNA 抽出法の作業時間が最も短く、プロトプラスト化法とフェノール-クロロホルム法を組み合わせた手順では 5 時間ほど要する作業量を 1.5 時間ほどで完遂した。これらの結果から、これまで一般的であった細胞壁を酵素で消化する方法より、尿素緩衝液を用いた抽出法が迅速・簡便にリアルタイム PCR のテンプレートとして適したゲノム DNA 調製可能であることが明らかとなった。

（２）*P. adametzioides* の菌体量推定のためのリアルタイム PCR 用のプライマーの探索

P. adametzioides の β-チューブリンの DNA 配列を元に *P. adametzioides* の DNA を増幅させるリアルタイム PCR 用のプライマーセット（Padamtubb1、Padamtubb2 および Padamtubb3）を作成し、検証を行った。リアルタイム PCR の結果、Padamtubb1 および Padamtubb2 のプライマーセットで *P. adametzioides* の β-チューブリンの部分塩基配列を特異的に増幅させる結果が確認された。Padamtubb3 のプライマーセットでは、検証に用いた *Penicillium* 属糸状菌全てで増幅が確認された。PCR 反応後の増幅産物をアガロースゲルで電気泳動した結果を図２に示す。増幅産物の大きさは Padamtubb1、Padamtubb2 および Padamtubb3 のいずれでも 100 塩基対ほどであった。 Padamtubb1 および Padamtubb2 のプライマーセットでは、β-チューブリン配列の近縁な *P. brocae*、*P. adametzii*、*P. lilacinoechinulatum* の DNA を増幅しなかった。これらのプライマーセットを用いることで *P. adametzioides* を特異的に検出し、菌体量を定量することができると考えられる。

また、菌体重量とリアルタイム PCR による Ct 値の関係と検量線を図３に示す。0.1 mg 付近の菌体重量測定における変動性が原因で決定係数は 0.63-0.66 となった。菌体重量における二乗平均平方根誤差は全てのプライマーセットで 0.38 log mg となり、予測モデル開発のための重量推定の手段としては十分な精度を示した。以上の結果から、*P. adametzioides* の DNA テンプレートを特異的に増幅し、予測モデル開発のための菌体重量の推定方法を開発することができた。

（３）毒素産生培養実験

（１）および（２）で検討した定量 PCR 法を用いてアフラトキシン産生糸状菌 *A. paraciticus* とプベルル酸産生糸状菌 *P. adametzioides* の菌体増殖量と毒素産生量の変化を測定した。*A. paraciticus* の菌体重量推定のための検量線を図 4 に示す。決定係数は 0.85、二乗平均平方根誤差は 0.11 となり、良好な検量線が作成された。25°C において PDB で 10 日間培養した時の *A. parasiticus* の菌体量増殖の様子を図５に示す。菌体重量は培養 4 日目に増殖限界に達した。アフラトキシン G_1（AFG_1）

の産生量が最も多く、次いでアフラトキシン B_1（AFB_1）、アフラトキシン G_2（AFG_2）、アフラトキシン B_2（AFB_2）であった。アフラトキシンの産生は培養 2 日目から確認され、培養 9 日目には 558 μg/mL の総アフラトキシン産生濃度が確認された。25°C という増殖に適した条件では、培養初期の段階からアフラトキシンが産生される危険性が再確認された。また、25°C において PDB で 7 日間培養した時の *P. adametzioides* の菌体量増殖の様子を図 6 に示す。25°C において *P. adametzioides* は培養 3 日目に増殖限界に達し、培養 7 日目まで菌体量を維持した。プベルル酸の産生は培養 3 日目から確認され、培養 5 日目に最大産生量 898 μg/mL、培養日数 5 日目から 7 日目の間ではプベルル酸濃度 600 μg/mL から 900 μg/mL で定常に達した。菌体重量が増殖限界に達する前からアフラトキシンの産生が確認された *A. parasiticus* とは異なり、*P. adametzioides* では菌体重量が増殖限界に達する培養 3 日目からプベルル酸の産生が確認された。本年度の研究で検証した糸状菌の菌体増殖量の測定法は菌体量と毒素産生量の関係を明らかにし、毒素産生量の予測モデルを構築する上で非常に重要な知見となる。糸状菌の産生するかび毒の定量的微生物リスク評価・管理の実施に資する基盤的知見が得られた。

次年度は、各種糸状菌とかび毒について温度による増殖挙動と毒素産生挙動への影響を測定し、それぞれの温度における予測モデルと環境要因を考慮した二次モデルの開発を行う。

D. 結論

菌体増殖量予測モデル開発のための菌体量定量を目的としたリアルタイム PCR 法に最適なテンプレート DNA を得る方法は、尿素誘導変性を利用した尿素緩衝液法とシリカゲルカラムを組み合わせた手法が効率的な DNA 抽出法であることを示した。また、プベルル酸産生糸状菌である *P. adametzioides* の DNA を特異的に増幅させる定量 PCR プライマーの設計、検証を行った。検討した定量 PCR 法によって、菌体重量の増殖挙動を推定し、毒素産生の挙動を明らかにした。これらの成果はかび毒の定量的微生物リスク管理に資する菌体増殖量および毒素産生量予測モデル開発のための定量法として応用が期待できる。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

学会発表

・「リアルタイム PCR による菌体量推定のための糸状菌 DNA 抽出方法の検討」安部大樹、吉成知也、大西貴弘．日本マイコトキシン学会第 94 回学術講演会、（2026 年 1 月、相模原市）

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 参考

1) Dantigny P. Relevant issues in predictive mycology. Curr Opin Food Sci 2016; 11: 29–33.
2) Sánchez B, Rodríguez M, Casado EM, Martín A, Córdoba JJ. Development of an efficient fungal DNA extraction method to be used in random amplified polymorphic DNA–PCR analysis to differentiate cyclopiazonic acid mold producers. J Food Prot 2008; 71: 2497–503.
3) Arquiza JMRA, Hunter J. The use of real-time PCR to study Penicillium chrysogenum growth kinetics on solid food at different water activities. Int J Food Microbiol 2014; 187: 50–6.

4) Coca-Ruiz V, Cabrera-Gómez N, Collado IG, Aleu J. Improved protoplast production protocol for fungal transformations mediated by CRISPR/Cas9 in Botrytis cinerea non-sporulating isolates. Plants 2024; 13: 1754.
5) Futagami T, Mori K, Kadooka C, et al. Chromosome-level genome sequence of Aspergillus puulaauensis MK2, a fungus isolated from a dead hard tick. Microbiol Resour Announc 2021; 10: 10.1128/mra.00372-21.
6) Kadooka C, Mori K, Okutsu K, et al. Chromosome-level genome sequence of Aspergillus chevalieri M1, isolated from Katsuobushi. Microbiol Resour Announc 2021; 10: 10.1128/mra.00385-21.
7) Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. CSHL Press, 2001.
8) Mayer Z, Fa̋rber P, Geisen R. Monitoring the production of aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of nor-1 mRNA. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 1154–8.
9) Rodríguez A, Rodríguez M, Andrade MJ, Córdoba JJ. Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. Int J Food Microbiol 2012; 155: 10–8.
10) Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI, Justesen AF, Córdoba JJ. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. Int J Food Microbiol 2011; 149: 226–35.

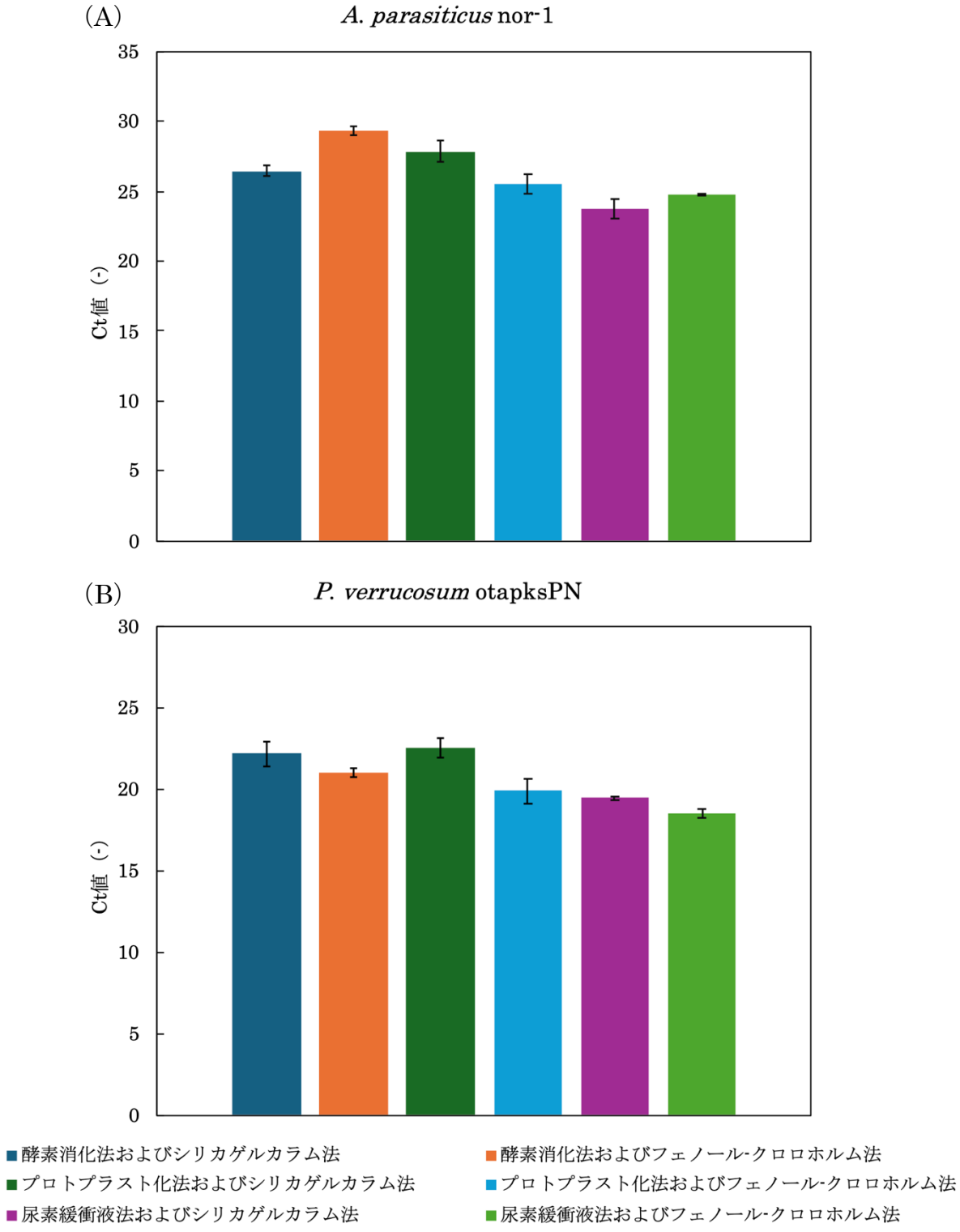


図１　リアルタイム PCR 法のための糸状菌からの各種 DNA 抽出法の比較検討

（A）*A. parasiticus*、（B）*P. verrucosum*

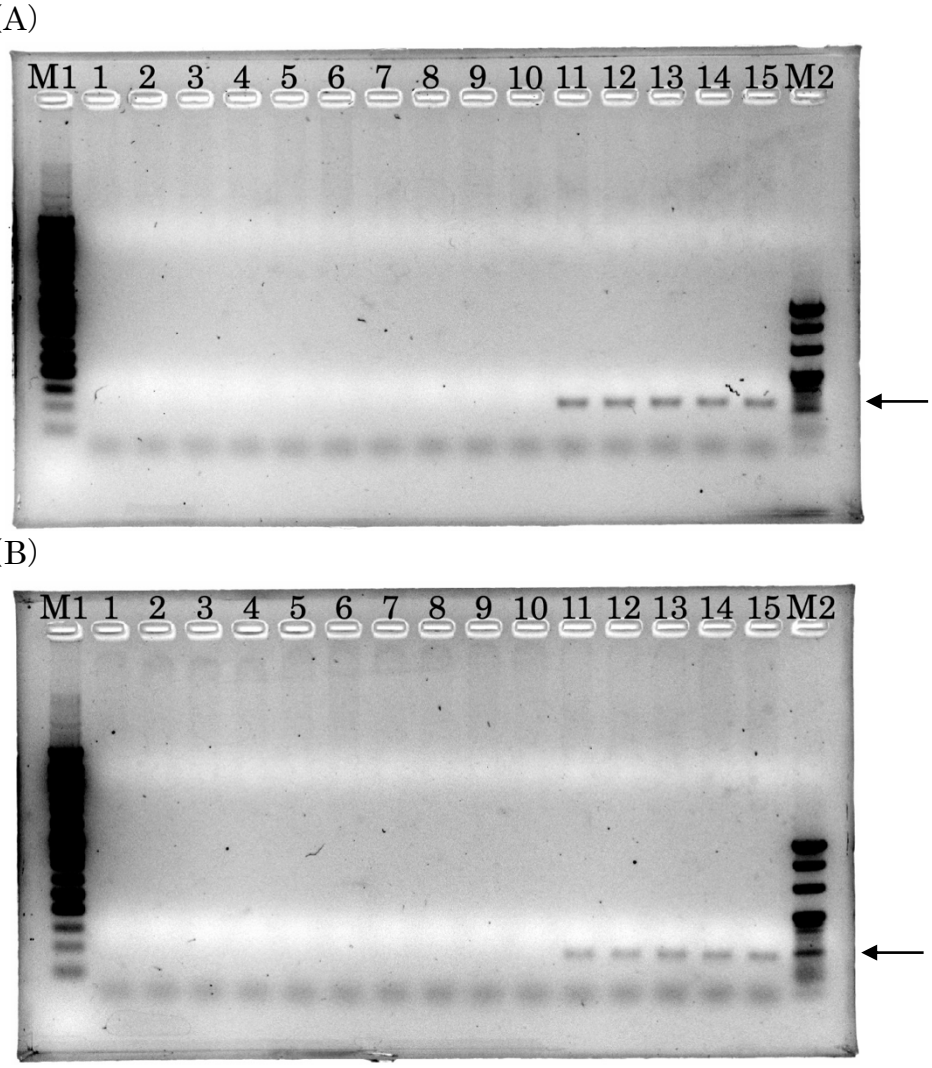


図２　*P. adametzioides* の特異的リアルタイム PCR プライマーの検討

（A）Padamtubb1 プライマー、（B）Padamtubb2 プライマー

M1：50 bp DNA Ladder（ニッポンジーン社製）
1：*P. verrucosum* NIHS8819
2：*P. lilacinoechinulatum* NBRC6108
3：*P. cyclopinum* NBRC6240
4：*P. caseifulvum* NBRC7733
5：*P. brocae* NIHS8908
6：*P. viticola* NIHS8855
7：*P. adametzii* NIHS9761
8：*P. brocae* NIHS9500
9：*P. brocae* NIHS9509
10：*P. corylophilum* NIHS9512
11：*P. adametzioides* NIHS8943
12：*P. adametzioides* NIHS9814
13：*P. adametzioides* NIHS9627
14：*P. adametzioides* NIHS9629
15：*P. adametzioides* NIHS8776
M2：20 bp DNA Ladder（タカラバイオ社製）

（C）

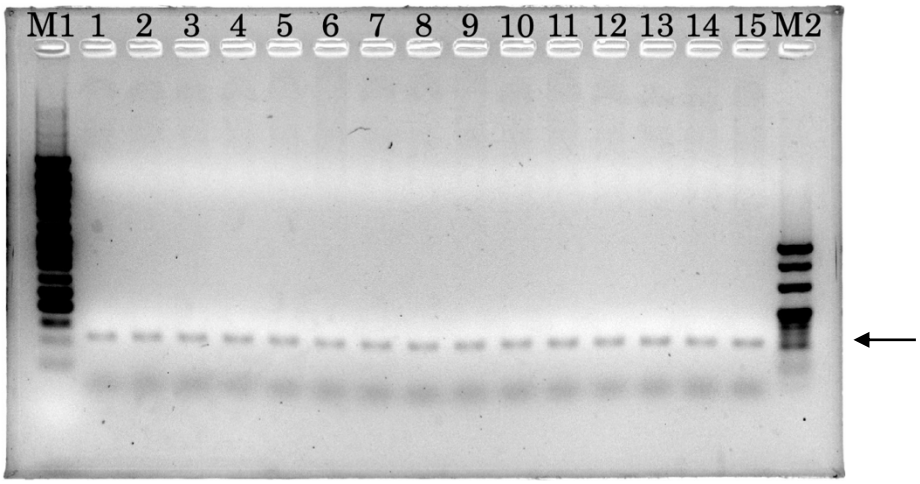


図２　*P. adametzioides* の特異的リアルタイム PCR プライマーの検討（つづき）

（C）Padamtubb3 プライマー

M1：50 bp DNA Ladder（ニッポンジーン社製）
1：*P. verrucosum* NIHS8819
2：*P. lilacinoechinulatum* NBRC6108
3：*P. cyclopinum* NBRC6240
4：*P. caseifulvum* NBRC7733
5：*P. brocae* NIHS8908
6：*P. viticola* NIHS8855
7：*P. adametzii* NIHS9761
8：*P. brocae* NIHS9500
9：*P. brocae* NIHS9509
10：*P. corylophilum* NIHS9512
11：*P. adametzioides* NIHS8943
12：*P. adametzioides* NIHS9814
13：*P. adametzioides* NIHS9627
14：*P. adametzioides* NIHS9629
15：*P. adametzioides* NIHS8776
M2：20 bp DNA Ladder（タカラバイオ社製）

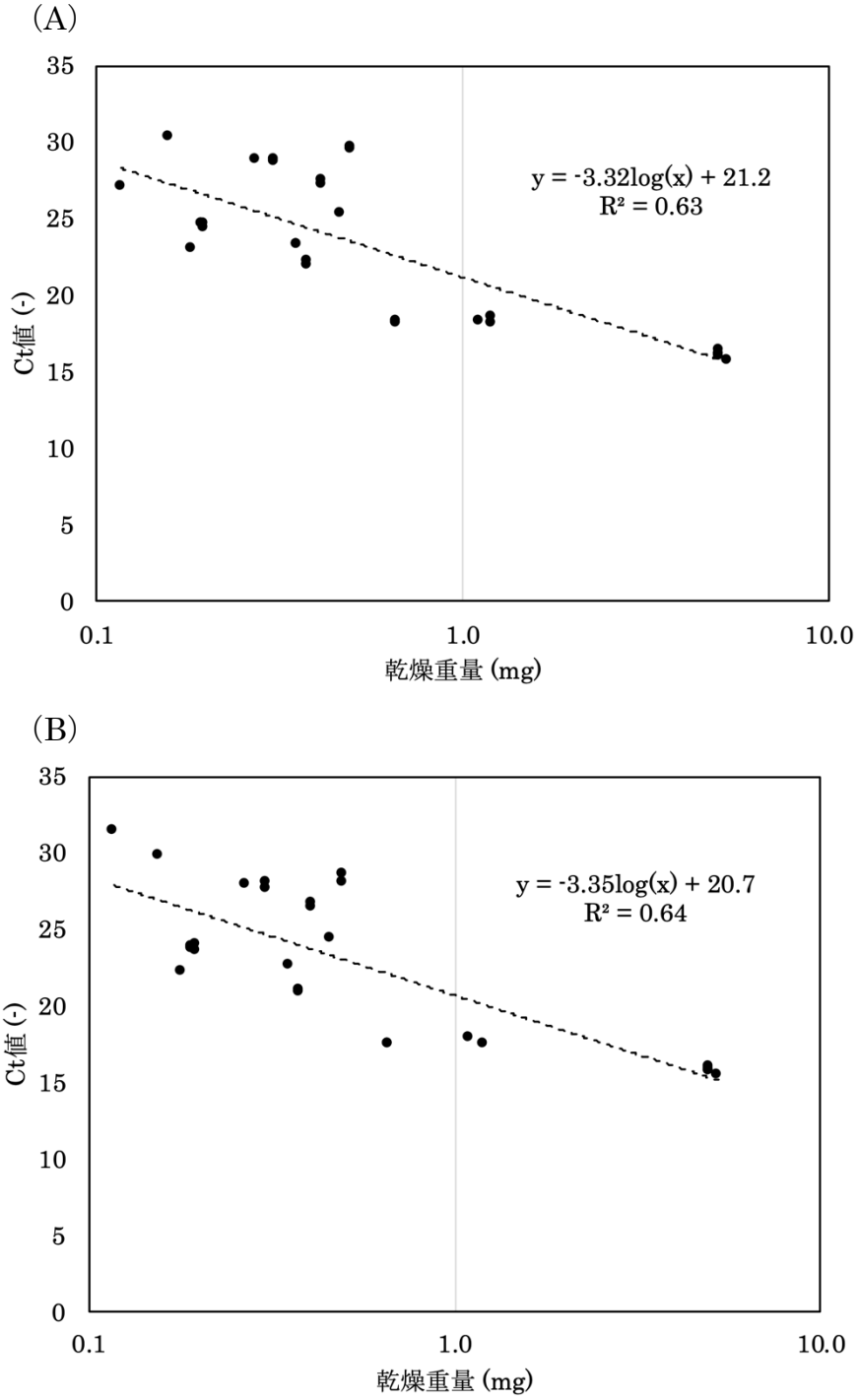


図３　*P. adametzioides* 培養菌体の乾燥重量と抽出 DNA のリアルタイム PCR による Ct 値の関係

（A）Padamtubb1 プライマー、（B）Padamtubb2 プライマー

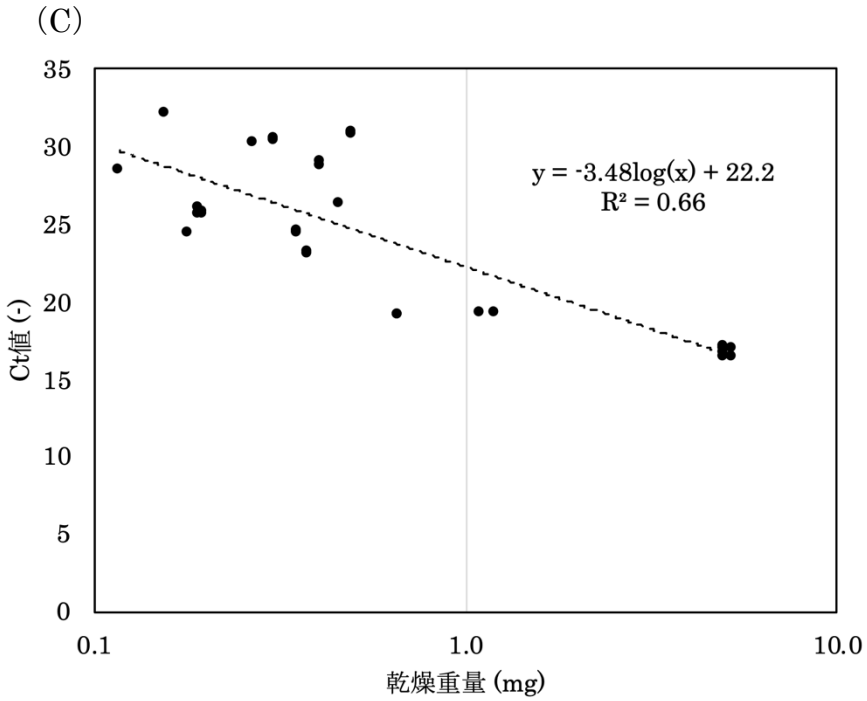


図３　*P. adametzioides* 培養菌体の乾燥重量と抽出 DNA のリアルタイム PCR による Ct 値の関係（つづき）

（C）Padamtubb3 プライマー

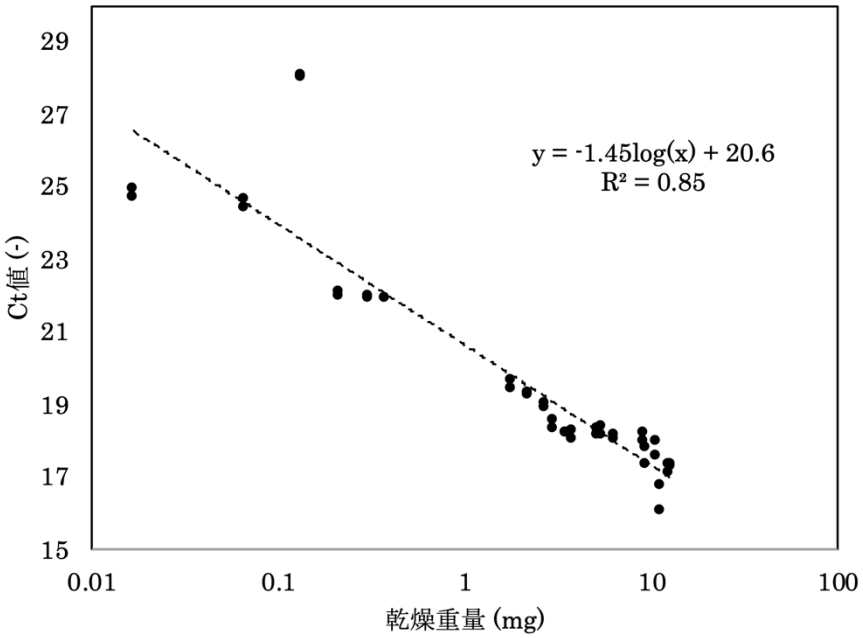


図４　*A. parasiticus* 培養菌体の乾燥重量と抽出 DNA のリアルタイム PCR による Ct 値の関係

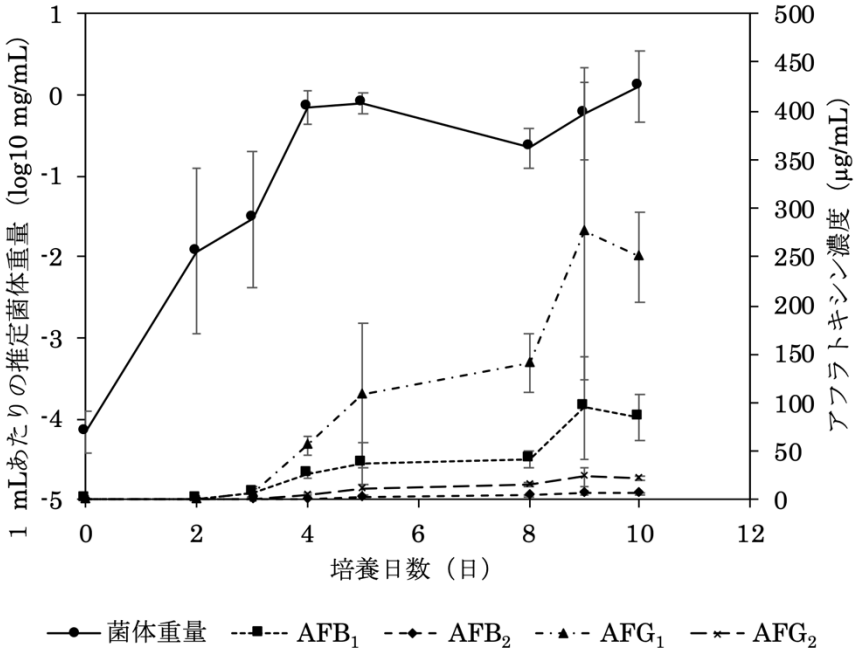


図５　定量 PCR による 1 mL あたりの *A. parasiticus* 培養菌体の推定重量と各アフラトキシン産生濃度の変化

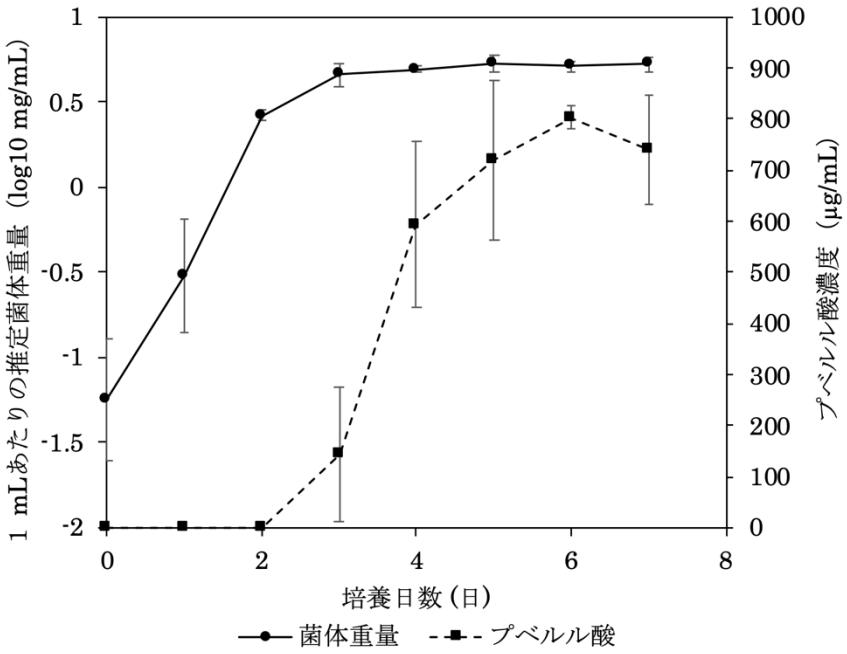


図６　定量 PCR による 1 mL あたりの *P. adametzioides* 培養菌体の推定重量とプベルル酸産生濃度の変化