

令和元年6月26日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05785

研究課題名(和文) 環境中のアフラトキシン産生菌及びその拮抗菌の探索と汚染制御

研究課題名(英文) Search for aflatoxigenic and atoxigenic fungi in the fields to prevent aflatoxin contamination

研究代表者

久城 真代 (KUSHIRO, Masayo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・ユニット長

研究者番号：40353932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,000,000円

研究成果の概要(和文)：国内外の協力を得て、メジャーなアフラトキシン産生菌である *Aspergillus flavus* の直接単離を実証したほか、毒素産生特性の異なる菌株の取得に成功し、DV-AM法が、特性の異なる同種の菌株の取得にも実用的に有効であることが示された。並行して、より高感度な改良DV-AM法を開発し、それを用いて国内の圃場土壌より多くのアフラトキシン産生菌を分離でき、寒冷地や圃場以外の土壌にも、産生菌が分布しているという新たな知見が得られた。安価で高感度な可視技術として、諸外国に紹介、招待講演を行ったのみならず、Mycoscience 2017公表論文により、日本菌学会にて第16回平塚賞を受賞した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DV-AM法は、アフラトキシン研究の第一人者である共同研究者の長年の研究成果に端を発する、アフラトキシン産生菌におけるアフラトキシン生合成機構の制御を基盤とした、高感度な毒素産生菌判別法であり、学術的に価値が高い。本研究により、感度がさらに高い改良DV-AM法が開発され、その適用範囲が広がったことが実証された。改良DV-AM法は、高価な機器や煩雑な技術を必要としない、シンプルかつ安価な可視判別技術として、アフラトキシンによる農産物の被害が問題となっている諸外国で普及しつつあることから、社会的意義も大きい。農作物・食品以外の方面からも関心が寄せられ、DV-AM法のデモを行い教授した。

研究成果の概要(英文)：Under the cooperation of domestic and foreign researchers, we demonstrated a direct isolation of *Aspergillus flavus*, a major aflatoxin-producing fungus and succeeded in acquisition of strains with different toxigenesis characteristic. The DV-AM method was shown to be effective for the acquisition of both aflatoxigenic and atoxigenic strains practically. In the same time, we modified the DV-AM method in sensitivity, and using this improved DV-AM method we obtained many aflatoxigenic isolates from soils samples of some cold areas and non-farming areas. As an inexpensive and highly sensitive visible technique, the DV-AM method was introduced in some invited lectures in foreign countries. By an article published in Mycoscience (2017), we won the 16th Hiratsuka Award in the Mycological Society of Japan.

研究分野：微生物制御

キーワード：かび毒産生菌 アフラトキシン DV-AM法

1. 研究開始当初の背景

自然界で最強の発がん性を持つカビ毒（マイコトキシン）であるアフラトキシンによる農作物の汚染が各地で問題となっており、世界的な気候変動によるアフラトキシン産生菌の分布域の変化も懸念されている。近年、日本の土壌からもアフラトキシン産生菌が報告されていることから、海外の研究者とも協力してアフラトキシン汚染の低減に尽力することが重要である。

2. 研究の目的

本課題実施までに、われわれは目視によるアフラトキシン産生菌の高感度簡易検出法であるジクロスボス-アンモニア法（DV-AM法）を開発し、本法が土壌中のアフラトキシン産生菌の検出にも極めて有効である可能性を見出した（Yabe et al., Appl. Microbiol. Biotech. PMID: 26300294）。本課題では、DV-AM法を基盤技術として、検出感度を向上させるとともに、日本国内およびメキシコ等汚染発生国においてアフラトキシン産生菌の分布実態を解明するとともに、バイオコントロール剤として利用可能なアフラトキシン非産生菌（拮抗菌の候補株）の単離・同定を行い、同剤のアフラトキシン汚染防御への効果の確認および利用技術の開発を行うことを目的とする。またアフラトキシン非産生菌等の性状解析を行うとともに、現実的な農産物汚染防除に対する有効性を検証することで、現場におけるアフラトキシン汚染防除につながる知見を獲得する。

3. 研究の方法

本研究では、目的を達成するために、まず日本国内及び海外カウンターパート研究者が所属するメキシコ合衆国内の国際トウモロコシ・コムギ改良センター（CIMMYT）試験圃場において土壌採取を行い、前述のDV-AM法を用いてアフラトキシン産生菌の分離を試み、分布実態の解析を行う。具体的には、各地域の圃場土壌や農作物由来の試料を採取して、土壌懸濁液を作成し、作成した土壌懸濁液をDV-入りの平板培地内で培養する。3-6日間25℃にて培養後、アンモニア処理により、菌の選別を行う。

DV-AM法では、アフラトキシン産生菌及び非産生菌を同時に得ることが可能ということが示唆されていた（研究開始時、未発表データ）ことから、バイオコントロール剤として利用可能な拮抗菌の候補株の取得をめざす。拮抗作用が期待できる菌株は、アフラトキシン産生能が有意に異なり、かつ生育速度が同等のものが望ましいと考えられる。そこで、単一培養の培地上で、各候補菌株の特性を解析する。アフラトキシン生合成遺伝子発現量はリアルタイムPCR、アフラトキシン蓄積量はHPLC-蛍光検出法にて解析する。また、成長速度については糸状菌の一次代謝産物で細胞膜成分であるエルゴステロールを指標として、HPLC-UV法にて菌体量の測定を行う。各候補菌株の中から、目的の菌株を拮抗菌として選抜する。

目的の菌株が得られない場合は、地域もしくは作物品目の異なる各地の圃場から、作物別に土壌を採取する。

可能な限り各地の異なる圃場から、複数の候補菌株を得ることをめざし、研究分担者も独立して土壌採取と候補菌株の単離を行う。

4. 研究成果

平成28年度（1年目）

立毛のトウモロコシが有る時期にメキシコの共同研究機関を訪問し、エルバタン試験圃場等から土壌を採取し、現地においてもDV-AM法を適用し、GY（グルコース-酵母）培地またはGYD（GY+デオキシコール酸）培地を用いて、アフラトキシン産生株及び非産生株のスクリーニングを行った。アフラトキシン産生株として2株が検出され、非産生株と推定される株が1株得られた。

国内の土壌については、圃場管理者等の協力を得ることができ、茨城の圃場からメジャーなアフラトキシン産生菌である *Aspergillus flavus* を直接単離することに成功した。この成果については29年度に論文化した（Mycoscience 2017）。また、沖縄サトウキビ畑3カ所の土壌27サンプルを採取し、同様の培地を用いて、DV-AM法でアフラトキシン産生と思われる陽性株及び非産生と思われる陰性株のスクリーニングを行った。全体で17株のアフラトキシン産生株が得られ、AM処理での陽性とアフラトキシン産生能を指標にしつつ、純化した。形態観察及び遺伝子配列解析から *Aspergillus pseudonomius* 及び *Aspergillus transmontanensis* が検出された。これらは、いずれもマイナーなアフラトキシン産生菌とされる。さらに、バイオコントロール剤の候補となりうるアフラトキシン非産生株のスクリーニングも併行して行い、寒天培地上、2株（アフラトキシン産生株と形態が類似しているカビ）が採取できたが、最終的にアフラトキシン産生菌のグループではないことが確認され、目的とする株ではないと推定された。以上、28年度には同種のアフラトキシン非産生株は検出されなかったことから、バイオコントロール剤の候補株の単離は29年度において、さらに採取範囲を広げて継続することとした。

28年度は多くの野外由来の陽性株が得られたことから、野外株を用いてDV-AM法に適した培地条件の検討を行った。その結果、GY培地では色調の変化が見られないが、高濃度の糖を含む培地では、色調の変化がみられる株が得られ、この結果から、ほとんど全てのアフラトキシン産生株を検出するには、高濃度糖含有培地が適していることが示唆された。29年度においては、この改良培地を用いてスクリーニングを行う予定とした。

平成 29 年度（2 年目）-平成 30 年度（3 年目）

前年に引き続きトウモロコシ栽培期にメキシコの共同研究機関を訪問し、各地のトウモロコシ試験圃場から土壌を採取した。土壌の一部を用いて現地にて協力者と実験を行い、アフラトキシン産生菌ならびに非産生菌のスクリーニングを行った。亜熱帯に属する地域の試験圃場土壌より、2 度スクリーニングを行い、*Aspergillus* 属と思われる菌株 4 株（化学分析により毒素産生陽性 2 株ならびに陰性 2 株）を選抜・分離することができた。産生株と非産生株を 1 株ずつ形態解析及び分子遺伝学的解析に供した結果、これらは両者ともに目標の *Aspergillus flavus* グループの菌株（毒素産生性のみ異なる）であり、それぞれ MEX-A19-13（B タイプアフラトキシン産生）ならびに MEX-A19-2nd-5（アフラトキシン非産生）と命名した。以上により、計画通り、同種（*Aspergillus flavus*）に属しかつ毒素産生特性の異なる 2 株の取得に成功し、DV-AM 法が、特性の異なる同種の菌株の直接分離にも実用的に有効であることが示された。

MEX-A19-13 は、国内分離の *A. flavus* 菌株である HA9-S1-1（ジーンバンク寄託：MAFF 111859, つくばソルガム試験圃場土壌由来, Mycoscience 2017）ならびに国内分離の *A. pseudonomius* 菌株である OKI-12（MAFF 111900, 沖縄さとうきび圃場土壌由来, JSM Mycotoxins 2018）と、糖に対する応答性が異なるという興味深い特性を示した。

MEX-A19-13 と MEX-A19-2nd-5 については論文化を行い（Toxins 263, 2018）、日本・メキシコの研究者が興味を持っていることから、日墨でのシェアについても検討したが、CBD 関連の手続き（メキシコ合衆国からの PIC, MAT 取得）に時間を要するため共有は断念し、カウンターパートに技術移転しメキシコで展開することとした。

平成 30 年度（3 年目）-

土壌など多様な微生物を含む環境試料からアフラトキシン産生菌を優先的に選択するため、DV-AM 法で用いる寒天培地の糖、界面活性剤と抗生剤の組成と濃度の更なる最適化を検討し、改良 DV-AM 法として論文化した（Toxins 519, 2018）。

メキシコ・トウモロコシ圃場で分離された *Aspergillus flavus* 菌株の成果から、DV-AM 法により、同一の環境からアフラトキシン産生菌と非産生菌が同時に取得可能であることが証明されたことから、メキシコのカウンターパートが、メキシコ国内のアフラトキシン汚染がやや高い地域にて改良 DV-AM 法を用いたスクリーニングを続けており、バイオコントロール剤（トウモロコシ圃場における拮抗菌を用いたアフラトキシン汚染低減）の効果の検証に着手している。

国内では、改良 DV-AM 法を用いて圃場土壌より多くのアフラトキシン産生菌を分離することが出来たのみならず、寒冷地や圃場以外の土壌にも、アフラトキシン産生菌が分布しているという新たな知見が得られた。

さらに昨年マイナーなアフラトキシン産生菌である *A. pseudonomius* 菌株である OKI-12（MAFF 111900, JSM Mycotoxins 2018 に公表済み）を分離できた国内の沖縄さとうきび圃場土壌より、異なった毒素産生スペクトラムを有した別種の菌株を分離することができた。現在、菌種の同定を行っており、同定後に論文化する予定である。

これまで本研究で得られた *A. flavus* 菌株である HA9-S1-1（ジーンバンク寄託：MAFF 111859, つくばソルガム試験圃場土壌由来, Mycoscience 2017 に公表済）等の菌株について、糖に対する応答性の違いを引き続き解析している。

トウモロコシのアフラトキシン汚染防除のためにケニアの研究者に手法を紹介したほか、香辛料のアフラトキシン汚染が問題となっているミャンマーの研究者にも紹介し、安価で高感度な可視技術として手法の普及を着実に進めている。また、ブラジルロンドリーナ州立大学を訪問し、DV-AM 法及びアフラトキシン研究について研究者間で情報交換を行うとともに、大学院生を対象として特別講演を行った。

< 概要 >

国内外の協力を得て、メジャーなアフラトキシン産生菌である *Aspergillus flavus* の直接単離が実証されたほか、毒素産生特性の異なる菌株の取得に成功し、DV-AM 法が、特性の異なる同種の菌株の取得にも実用的に有効であることが示された。並行して、より高感度化した改良 DV-AM 法を開発し、それを用いて国内の圃場土壌より多くのアフラトキシン産生菌を分離でき、寒冷地や圃場以外の土壌にも、アフラトキシン産生菌が分布しているという新たな知見が得られた。安価で高感度な可視技術として、世界各地で招待講演を行ったのみならず、Mycoscience 2017 公表論文により、日本菌学会にて第 16 回平塚賞を受賞した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Yin Min Htun, Hiroyuki Nakagawa, Masayo Kushiro, Extraction and purification of aflatoxins in bagasse for HPLC fluorescence determination. Journal of Environmental & Analytical Toxicology, 9, 2019, in press 査読有

Yohei Hareyama, Masayo Kushiro, Yoshiharu Fujii. Comparative effects of allyl and methyl isothiocyanates on aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus*. JSM Mycotoxins 69(2), 2019, in press (Advance Online Publication; <https://doi.org/10.2520/myco.69-2-3>) 査読有

Chaw Nu Nu Aye, Hiroyuki Nakagawa, Masayo Kushiro. Occurrence of aflatoxins in processed chili pepper sold in Myanmar. JSM Mycotoxins 9-13, 69(1), 2019. <http://doi.org/10.2520/myco.69-1-4> 査読有

Kimiko Yabe, Haruna Ozaki, Takuya Maruyama, Keisuke Hayashi, Yuki Matto, Marika Ishizaka, Takeru Makita, Syun-ya Noma, Kousuke Fujiwara, Masayo Kushiro. Improvement of the culture medium for the dichlorvos-ammonia (DV-AM) method to selectively detect aflatoxigenic fungi in soil. Toxins 519, 10, 2018. doi:10.3390/toxins10120519 査読有

Masayo Kushiro, Hidemi Hatabayashi, Kimiko Yabe, Alexander Loladze. Detection of aflatoxigenic and atoxigenic Mexican *Aspergillus* strains by the dichlorvos-ammonia (DV-AM) method. Toxins 263, 10, 2018. doi:10.3390/toxins10070263 査読有

Chaw Nu Nu Aye, Yoshitsugu Sugiura, Masayo Kushiro. Screening of aflatoxigenic fungi from Thai rice. Bulletin of the NARO Food Research, 1-8(2) 2018. 査読有

久城真代, 矢部希見子 培養による毒素産生型アスペルギルス属かびの検出法-ジクロロボス-アンモニア蒸気法(DV-AM法) ニューフードインダストリー 21-27, 60(3), 2018. 査読無

Masayo Kushiro, Hidemi Hatabayashi, Hiroyuki Nakagawa, Kimiko Yabe. Isolation of minor aflatoxigenic fungi using dichlorvos-ammonia (DV-AM) method. JSM Mycotoxins 13-18, 68(1), 2018. 査読有

Hiroyuki Nakagawa, Xinyao He, Yosuke Matsuo, Pawan K. Singh, Masayo Kushiro. Analysis of the masked metabolite of deoxynivalenol and *Fusarium* resistance in CIMMYT wheat germplasm. Toxins 238, 9, 2017. doi:10.3390/toxins9080238 査読有

Masayo Kushiro, Hidemi Hatabayashi, Hiroyuki Nakagawa, Kimiko Yabe. Improvement of mobile phase in thin-layer chromatography for aflatoxins and analysis of the effect of dichlorvos in aflatoxigenic fungi. JSM Mycotoxins 5-6, 67, 2017. <http://doi.org/10.2520/myco.67-1-5> 査読有

Masayo Kushiro, Hidemi Hatabayashi, Yazhi Zheng, Kimiko Yabe. Application of newly-developed dichlorvos-ammonia (DV-AM) method to direct isolation of aflatoxigenic fungi from field soils. Mycoscience 85-94, 58, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2016.10.002> 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

山本侑加, 角屋直暉, 館大樹, 矢部希見子. ジクロロボス-アンモニア(DV-AM)法を用いた複数地域におけるアフラトキシン生産菌のスクリーニング. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会. 2019 年 1 月、川崎

西脇瑛舜, 湯下実穂, 山田悠貴, 矢部希見子. ジクロロボス-アンモニア(DV-AM)法を用いた養蜂場におけるアフラトキシン生産菌の検出. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会.

2019年1月、川崎

Kimiko Yabe, Masayo Kushiro. The dichlorvos-ammonia method for visible detection of aflatoxigenic fungi from environments. 3rd World Biotechnology Congress (招待講演) (国際学会) 2018年12月

矢部希見子, 尾寄春菜, 丸山拓也, 林敬祐, 松任佑機, 石坂麻里香, 牧田健, 野間竣陽, 藤原幸祐, 久城真代. アフラトキシン生産菌検出法「ジクロロボス-アンモニア (DV-AM) 法」の培地条件の改良. 日本マイコトキシン学会第82回学術講演会. 2018年8月、帯広

久城真代. 培養による毒素産生型アスペルギルス属菌判別法の高度化. 公益財団法人飯島藤十郎記念食品科学振興財団第29回学術講演会(招待講演) 2017年11月、山崎製パン総合クリエイションセンター

http://www.iijima-kinenzaidan.or.jp/pdf/2017achievement_2.pdf

久城真代, 畑林秀美, 中川博之, 矢部希見子. ジクロロボス-アンモニア (DV-AM) 法によるマイナーなアフラトキシン生産菌の同定. 日本マイコトキシン学会第81回学術講演会. 2018年1月、葛飾

Chaw Nu Nu Aye, Yoshitsugu Sugiura, Masayo Kushiro. Screening of aflatoxigenic fungi and toxin analysis in chili pepper. 日本マイコトキシン学会第81回学術講演会. 2018年1月、葛飾

久城真代, 畑林秀美, 鄭雅志, 矢部希見子. 高感度可視検出法「DV-AM法」による圃場土壌からのアフラトキシン生産菌の分離. 日本マイコトキシン学会第79回学術講演会. 2016年7月、つくば

矢部希見子, 畑林秀美, 池羽田昌文, 鄭雅志, 久城真代. アフラトキシン生産菌の高感度可視検出法「ジクロロボス-アンモニア (DV-AM) 法」の開発. 日本マイコトキシン学会第79回学術講演会. 2016年7月、つくば

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

食品研究部門 食品安全研究領域 食品化学ハザードユニット

<http://www.naro.affrc.go.jp/nfri-neo/introduction/chart/0402/index.html>

福井工業大学 情報科学科 環境・食品科学科

<http://www.fukui-ut.ac.jp/ut/subject/environment/>

CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center)

<https://www.cimmyt.org/>

表彰

第16回日本菌学会平塚賞 2019. 5.25

Mycoscience 2017 公表論文が授賞対象となり、5/25 日本菌学会@秋田県立大にて平塚賞を受賞した。

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：矢部 希見子

ローマ字氏名：YABE, Kimiko

所属研究機関名：福井工業大学

部局名：環境情報学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：70158054

(2)研究協力者

研究協力者氏名：アレクサンダー ロラツ

ローマ字氏名：LOLADZE, Alexander

メキシコ 国際トウモロコシ・小麦改良センター(CIMMYT)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。