

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18590584

研究課題名（和文） 発癌性マイコトキシン汚染食品の迅速診断法の開発

研究課題名（英文） Development of assays for the rapid detection of food potentially contaminated with carcinogenic mycotoxin.

研究代表者

久米田裕子（KUMEDA YUKO）

大阪府立公衆衛生研究所・企画総務部・企画調整課

研究者番号：10250317

研究成果の概要：

食品および食品原材料から直接、真菌のアフラトキシン生合成に関与する酵素の遺伝子をマルチプレックス PCR により検出し、食品のアフラトキシン汚染を迅速簡便に診断する方法を開発した。その結果、今回収集した食品のアフラトキシン BG 汚染は 59 検体中 15 検体(25.4%)であったが、遺伝子検出法では 27 検体(45.8%)から BG 産生酵素の遺伝子が検出された。以上から、アフラトキシン BG 汚染は考えられているより広範囲の食品に発生する危険性があること、また、その原因菌としては高いアフラトキシン BG 産生能をもつ *A. parasiticus* と *A. nomius* が関与している可能性があることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	660,000	4,260,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：食品衛生

## 1. 研究開始当初の背景

カビの産生する有毒代謝産物、すなわちマイコトキシンによって引き起こされる健康被害の特徴はその慢性毒性にあり、微量で長期的な摂取と種々のマイコトキシン暴露による相乗的な毒性により、発癌の潜在的リスクは極めて大きいと考えられている。

マイコトキシンの農作物に対する自然汚染については、リスクを減じるため、アメリカ、

カナダ、EU 諸国間主導で、FAO/WHO 合同食品規約委員会によるマイコトキシンの国際規格化など国際調和が進められている。日本においても 2002 年小麦のデオキシニバレノール、2004 年パツリン等、暫定基準値あるいは基準値が次々と設定されてきた。アフラトキシンについても、現在、日本では B<sub>1</sub> の暫定基準値のみであるが、国際規格に照準を合わせ、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 値を合計した総量規制が検討されて

いる。

マイコトキシンの分析は現在、液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー質量分析計で測定されている。このような理化学検査は検出感度と定量性に優れているが、設備が必要である上に、個々のマイコトキシンにより抽出段階から検査法が異なるため、広範囲な食品に網を掛ける多検体検査には不適である。また、一部 ELISA 法が開発されているが、交差反応が多いためあまり使用されていない。

上述のように、マイコトキシンの検査の必要性は非常に高まっているが、増大する輸入食品に対し、検査数を増やすことは多大な費用と労力がかかる。

私達は DNA の濃縮法を検討し、暫定基準値以下の低濃度汚染の食品を迅速簡便に検出する方法を開発することを目指す。輸入食品原材料や加工前の農産物のチェック体制に導入できれば、定量を目的とする理化学検査の前の一次スクリーニングとして非常に有効であり、広範囲の食品の安全性確保に寄与できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、「食品中に存在するマイコトキシンはすべてそれらがマイコトキシン産生真菌に汚染された結果である」ことに注目し、食品および食品原材料から直接、真菌のマイコトキシン生合成に関与する酵素の遺伝子をマルチプレックス PCR により検出し、食品のマイコトキシン汚染を迅速簡便に診断する方法を開発する。マイコトキシンの中でも経口発癌性が最も強いアフラトキシンをターゲットにする。

- (1) 自然汚染食品からアフラトキシン BG 産生酵素の遺伝子を直接検出することを試みる。この方法はアフラトキシン総量規制のスクリーニング法に適している。広く実態調査に応用し、理化学検査を同時に実施することで、使用可能な食品の種類、検出感度、アフラトキシン量との相関を明らかにする。
- (2) アフラトキシン (AF) を産生する主要な菌は、*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* である。*A. flavus* は主にアフラトキシン B (AFB) を、後者 2 種はアフラトキシン B と G (AFBG) を産生する。食品からこれらの菌の存在を特異的に検出できる PCR 法を開発することにより、食品のアフラトキシン汚染と産生菌の関係を予測できる。

## 3. 研究の方法

- (1) 使用菌株：当所保存株である AFB 産生性

*A. flavus* 10 株、AFBG 産生性 *A. flavus* 5 株、*A. parasiticus* 10 株、FP 株 5 株、*A. tamarii* 10 株、*A. bombycis* 2 株、*A. pseudotamarii* 1 株、*A. nomius* 10 株

- (2) 輸入原材料及び市販食品：AF が検出された食品 55 検体と検出されなかった食品 11 検体を試料とした。主な産地国は中国 21 検体、アメリカ 12 検体、マレーシア 5 検体、その他 9 検体で、19 検体が不明であった。
- (3) 食品及び分離菌培養液中の AF の測定：定法により HPLC 法で測定した。
- (4) 食品からの DNA 抽出法：Fast DNA SPIN Kit (Q・BIO gene) を使用した。
- (5) *norB-cypA* region をターゲットにした

PCR

- ① プライマー作製：GenBank データベース (accession number : AY371490, AY510451, AY51052, AY510453, AY510454) を参考に、プライマーを作製した。

### ② PCR の条件

PCR 反応液は TaKaRa の Z-Taq の組成に従い、反応条件は 96°C で 1 分、98°C 5 秒、65°C 5 秒、72°C 20 秒を 35 サイクル、72°C で 5 分であった。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

- (6) AFBG 産生酵素遺伝子を検出する PCR 法の開発

遺伝子 *cypA* と AFB の合成に必要な遺伝子 *ordA* をターゲットにして、multiplex PCR 法を開発した。

- ① プライマー作製：GenBank データベース (accession number : AY371490, AY510451, AY51052, AY510453, AY510454) を参考に、AFB 産生株検出のため、*ordA1F*, *ordA1R* を、AFBG 産生株検出のため、*norBc3F*, *norBc3R* のプライマーを設計した。予想される PCR 産物の大きさはそれぞれ、約 660 bp と約 300 bp である。

- ② PCR の条件：QIAGEN Multiplex PCR Kit を使用し、各プライマーは 0.2 μM に調整した。反応条件は 95°C で 15 分、94°C 30 秒、63°C 90 秒、72°C 90 秒を 40 サイクル、72°C で 10 分であった。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

- (7) *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* の種を同定する PCR 法の開発

- ① プライマー作製：上記データベースに ITS 領域のデータベースを追加して、種を同定するプライマーを設計した。予想される PCR 産物の大きさは *A. flavus* が約 440 bp、

*A. parasiticus* が約 260 bp、*A. nomius* が約 620 bp である。

② PCR の条件：上記と同じ

#### 4. 研究成果

(1) *norB-cypA* region をターゲットにした PCR：AFB 産生性 *A. flavus* と AFBG 産生性 *A. parasiticus* を使用して、*norB-cypA* region をターゲットに PCR を実施した結果、*A. flavus* は約 0.3 kb と 0.8 kb、*A. parasiticus* は約 1.8 kb の PCR 産物が得られた (図 1)。G を産生しない B 単独産生の *A. flavus* は *norB-cypA* region に 1~1.5 kb の欠損が存在することが明らかになった。この結果を利用して、AFB 産生株と AFBG 産生株を同時に検出できるプライマーを設計した。

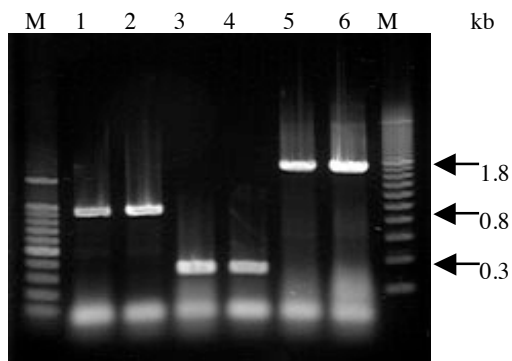


図 1. 1, *A. flavus* OPS318; 2, *A. flavus* OPS247; 3, *A. flavus* OPS223; 4, *A. flavus* OPS406; 5, *A. parasiticus* OPS165; *A. parasiticus* OPS647.

(2) AFBG 産生酵素遺伝子を検出する PCR 法：

AF 産生菌株で PCR 条件を検討した後、AF 汚染食品から DNA を抽出し、直接 PCR 法を実施した (図 2)。AFB 産生に必要な酵素遺伝子 *ordA* が検出された場合は 660 bp に、AFBG 産生に必要な酵素遺伝子 *norB* が検出された場合は 330 bp にバンドがみられた。

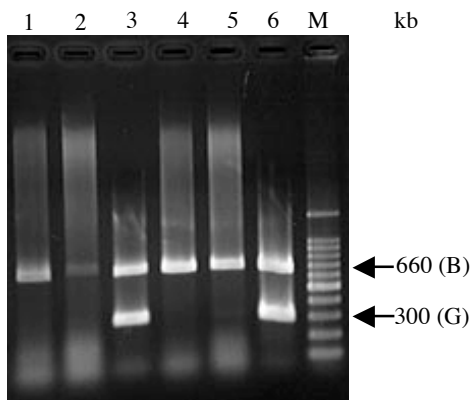


図 2. 1, 白コショウ; 2, ターメリック; 3, パプリカ; 4, ピスタチオ; 5, ナツメグ; 6, ピーナッツ

(3) *flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* の種

を同定する PCR 法：

保有菌株を使用して、PCR 条件を検討した後、AF 汚染食品から DNA を抽出し、直接 PCR 法を実施した (図 3A, 3B)。59 検体中 4 検体から *A. nomius* のバンド (620 bp) が検出されたため、個別の PCR を行い、塩基配列を調べた。その結果、*A. nomius* の遺伝子であることが確認できた。

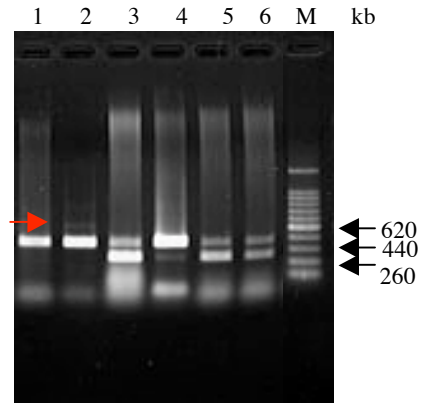


図 3A. 1, コーンフラワー; 2, 白コショウ; 3, ピーナッツ; 4, ピーナッツ; 5, ピーナッツ; 6, ピーナッツ

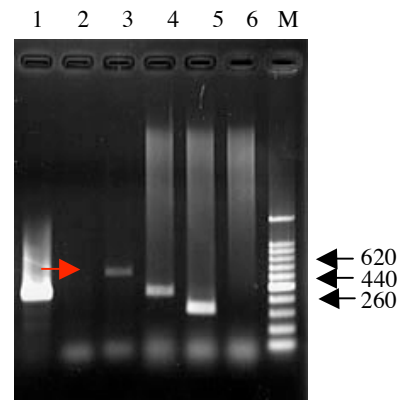


図 3B. 1, *A. flavus* (*A. flavus*); 2, 白コショウ (*A. parasiticus*); 3, 白コショウ (*A. nomius*); 4, 白コショウ (*A. flavus*); 5, ピーナッツ (*A. parasiticus*); 6, ピーナッツ (*A. nomius*)  
\* ( ) 内はプライマー

(3) AF 汚染食品の実態調査への応用

AF が検出された市販食品及び食品原材料 55 検体と検出されなかった食品 11 検体について、AF 汚染濃度の測定、AF 産生酵素遺伝子を検出する PCR 法、産生菌の種を検出する PCR 法、培養試験、分離菌の AF 産生性を調べた。

①スクリーニング法としての応用

表 1 に示したように、総 AF 濃度が 1.0-20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  で 13 検体 12 検体、20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で 15 検体中 14 検体が AF 遺伝子陽性となり、スク

リーニング法として使用可能であると考えられた。しかし、総 AF 濃度 0.1-1.0 µg/kg の低濃度汚染では 20 検体 14 検体しか陽性とならず、0.1µg/kg の検出限界値以下では逆に 4 検体陽性となった。このように、非常に低濃度汚染では結果が一致しない理由として、菌株により AF 産生能が異なるため菌量と AF 量は厳密には一致しないこと、食品加工時に加わる熱に対して DNA より AF の方が強いことが考えられた。

表 2 は食品別の検出数を示している。このように、たいていの食品に応用可能であったが、ナツメグだけは 3/6 と検出率が低かった。また、ピーナッツバター 5 検体とローストピーナッツ 2 検体は AF 高濃度汚染であっても遺伝子は全く検出されず、理由として、高加熱処理がなされているためと考えられる。ナツメグ以外の食品に AF 産生菌の胞子を添加し、本 PCR 法の感度を測定した結果、約 10<sup>4</sup>cfu/g であった。培養試験での *A. flavus* の菌数は 10 cfu/g から多くても 10<sup>3</sup> cfu/g レベルであったことから、カビは死滅しても DNA は残存していることがわかった。

表 1. 食品の AF 汚染量と遺伝子検出法との比較

AF汚染濃度 (µg/kg)	試料数	汚染AFグループ	AF汚染試料数	AF産生酵素遺伝子	培養試験		種鑑別PCR	
					分離菌の種	検出試料数	種	試料数
<0.1	11	B	0	3	<i>A. flavus</i>	0	Afのみ	7
		BG	0	1	<i>A. parasiticus</i>	0	Af+Ap Af+An	0 0
0.1-1.0	20	B	20	6	<i>A. flavus</i>	5	Afのみ	15
		BG	0	8	<i>A. parasiticus</i>	0	Af+Ap Af+An	2 2
1.0-20.0	13	B	7	4	<i>A. flavus</i>	8	Afのみ	5
		BG	6	8	<i>A. parasiticus</i>	2	Af+Ap Af+An	6 1
20.0<	15	B	6	4	<i>A. flavus</i>	6	Afのみ	7
		BG	9	10	<i>A. parasiticus</i>	4	Af+Ap Af+An	6 1

(Af, *A. flavus*; Ap, *A. parasiticus*; An, *A. nomius*)

### ③ AF 汚染実態調査の結果

今回調査した食品の AFBG 汚染は 59 検体中 15 検体 (25.4%) であったが、遺伝子検出法では 45.8% から BG 産生酵素の遺伝子が検出

された(表 2)。食品別ではターメリックとピスタチオ以外のすべての食品から検出されている。また、表 1 より、AF 汚染濃度別の BG 汚染の比率を見ると、すべての濃度で実際測定された試料数より BG 遺伝子が検出された試料数の方が多かった。特に、0.1-1.0 µg/kg の試料ではすべて AFB しか検出されなかったが、BG 遺伝子が検出された試料が 8 検体あった。AF は生合成の過程で、AFB から AFG に変換されるため AFG 濃度は AFB 濃度より低いことが多く、非常に低濃度であれば AFG 検出は困難となる。以上から、AFBG 汚染はピーナッツはもとより、考えられているより広範囲の食品に発生する危険性があることが示唆された。

AFBG を産生する主な菌は、*A. parasiticus* と *A. nomius* とアフリカや西南アジアに生息する小型菌核を形成する *A. flavus* である。今回、種特異的 PCR 法で調べた結果、BG 遺伝子検出法で陽性であった 27 検体中、14 検体が *A. parasiticus* 遺伝子陽性であった。また、4 検体から *A. nomius* の遺伝子も検出された。

表 2. 食品別の AF 汚染数と遺伝子検出法との比較

	試料数	AF汚染試料数		AF産生酵素遺伝子検出試料数		培養試験 (AF産生株検出試料数)	
		Bグループ	BGグループ	B	BG	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
アーモンド	6	2	2	2	1	2(0/2)	1(1/1)
赤唐辛子	2	2	0	1	1	0	0
黒ごま	2	1	0	1	1	1(1/1)	0
コーンフラワー	8	6	1	1	5	6(3/6)	0
白コショウ	8	6	1	2	6	2(0/2)	0
ターメリック	2	2	0	2	0	0	0
ナツメグ	7	5	1	2	1	3(1/3)	0
ハトムギ	3	1	1	0	3	2(0/2)	0
パプリカ	2	1	0	0	1	0	0
ピーナッツ	14	3	9	3	8	2(0/2)	6(6/6)
ピスタチオ	5	4	0	3	0	2(2/2)	0
合計	59	33	15	17	27	20	7
	(100%)	(55.9%)	(25.4%)	(28.8%)	(45.8%)	(45.8%)	(11.9%)

*A. parasiticus* はピーナッツと親和性がありピーナッツ畑土壌中の *A. parasiticus* が感染して AFBG 汚染をおこす。そのためピーナッツから *A. parasiticus* が分離されることが多

い。しかし、他の市販食品では AFBG が検出された食品であっても *A. parasiticus* が分離されることはほとんどなく、AFBG 汚染の原因菌の分布については不明であった。*A. nomius* も同様で、食品からの分離報告は非常に少ない。

今回、*A. parasiticus* の遺伝子はアーモンド、コーンフラワー、パプリカ、ピーナッツから検出された。*A. nomius* の遺伝子は3検体が白コショウ（マレーシア産2検体、不明1検体）、1検体が中国産のハトムギであった。*A. nomius* は分離報告が少ないため、AFBG 汚染の原因菌として注目されたことはほとんどない。しかし、白コショウから高率に *A. nomius* の遺伝子が検出されたことから、考えられているよりは広く土壌に定着し、AFBG の食品汚染に関与している可能性が示唆された。

培養試験で分離された菌株はほとんどが *A. flavus* で、*A. parasiticus* が分離されたのはピーナッツ以外ではアーモンド1検体のみであった。培養試験で *A. flavus* 以外の種が分離されにくい理由としては、*A. flavus* が優勢種であり形成する孢子数が圧倒的に多いため他種の菌はその中に埋もれて検出できないと考えられる。分離された *A. flavus* の中で AF 産生株は比較的少なかった。分離された *A. parasiticus* の菌株はすべて高い AFBG 産生性を示した。

以上より、食品の AFBG 汚染には高い AFBG 産生能をもつ *A. parasiticus* と *A. nomius* が広く関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- (1) 久米田裕子：食品のカビ毒汚染の現状、食品工業, 52, 20-25 (2009) 査読無
- (2) 横山耕治、川上裕司、陰地義樹、久米田裕子、高橋治男：ぶどう園等における section *Nigri* の分布と分離株のオクラトキシン産生性、Mycotoxins, Vol. 58(2), 143-149, 2008. 査読有
- (3) 岡野清志、富田常義、久米田裕子、松丸恵子、一戸正勝：輸入落花生におけるアフラトキシン BG 群汚染とその原因菌類としての *Aspergillus* section *Flavi* について、Mycotoxins, Vol. 58(2), 107-114, 2008. 査読有
- (4) 久米田裕子：カビ検査を考える、日本食

品微生物学会雑誌, 25, 66-69, 2008. 査読有

- (5) 久米田裕子：カビの産生する有毒二次代謝産物：マイコトキシン、アニテックス、研成社, 20, 11-15, 2008. 査読無
- (6) Kumeda Yuko. 2007. A simple genetic method for identification of mycotoxigenic fungi - Development of heteroduplex panel analysis and its field application -. Mycotoxins 58: 29-40. 査読有
- (7) Kumeda, Y., Asao, T., Takahashi, H. and Ichinoe, M. 2007. Predominant distribution of a new genotype within *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus nomius* in sugarcane field soil in Asia. New strategies for mycotoxin research in Asia. (Proceeding of International Symposium on Mycotoxicology in Bangkok 2006) : 15-20. 査読有
- (8) 久米田裕子、高鳥浩介：室内環境とカビー最近の話題からー I. 環境性カビ、(財)ビル管理教育センター、No. 119, 6-10 (2007) 査読無
- (9) 久米田裕子、高鳥浩介：カビと食品衛生、特定非営利活動法人 国際生命科学研究機構 (ILSI Japan) No. 89, 50-55 (2007) 査読無
- (10) 高鳥浩介、久米田裕子：マイコトキシン、獣医畜産新報 JVM, vol. 60, 293-298 (2007) 査読無
- (11) Kumeda Y. 2006. Fungal identification with molecular biological techniques -Heteroduplex panel analysis for identification of *Aspergillus* section *Flavi* species-. Mycotoxins 56: 77-84. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 久米田裕子他 4 名：高松塚古墳壁画の仮設修理施設における環境カビ調査(1)、日本防菌防黴学会第 35 回年次大会、静岡、2008 年 9 月 11 日
- (2) Kumeda Y.：Molecular identification and characterization of B and G aflatoxin-producing fungi that inhabit sugarcane fields in Japan. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Changchun, China, Jul 29, 2008.
- (3) 久米田裕子：食品とカビーなぜカビが問題となるかー、衛生微生物技術協

- 議会第 29 回研究会、2008 年 6 月 25 日
- (4) 久米田裕子：シンポジウム 2「食品と有害カビ」カビ検査を考える，第 28 回日本食品微生物学会、東京、2007 年 9 月 27 日
  - (5) 久米田裕子：分子生物学的手法を用いたカビの簡便な同定法 Heteroduplex analysis の確立とその応用，第 62 回日本マイコトキシン学会、神戸、2007 年 9 月 6 日
  - (6) Kumeda, Y., Asao, T., Takahashi, H., Ichinoe, M. Predominant distribution of a new genotype within *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus nomius* in sugarcane field soil in Asia. International Symposium on Mycotoxicology in Bangkok, Dec 13, 2006.
  - (7) 久米田裕子：カビ同定—迅速法と遺伝子解析はどこまで可能か—，第 33 回日本防菌防黴学会、東京、2006 年 5 月 31 日

〔図書〕（計 3 件）

- (1) 久米田裕子：第 3 章カビ、最新細菌・カビ・酵母図鑑（高鳥浩介、五十君静信 監修）、技術情報協会、129-194（2007）
- (2) 久米田裕子、高鳥浩介：C 真菌・カビ毒 1. アスペルギルス 2. ペニシリウム 3. フザリウム 4. その他の真菌、食中毒予防必携 第 2 版、(社) 日本食品衛生協会、246-256（2007）
- (3) 高鳥 浩介、諸角 聖、杉浦 義紹、相原真紀、高橋治男、高橋 淳子、小西良子、森田和矢、久米田裕子：第 6 章 カビによる食品苦情事例、関連資料；食品・施設 カビ対策ガイドブック(社) 日本食品衛生協会 2007 年

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久米田裕子 (KUMEDA YUKO)

大阪府立公衆衛生研究所・企画総務部・企画調整課・主任研究員

研究者番号：10250317

### (2) 研究分担者

浅尾 努 (ASAO TSUTOMU)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・細菌課・主任研究員

研究者番号：00250316

### (3) 研究協力者

田端節子 (TABATA SETSUKO)

東京都健康安全研究センター・食品化学部・食品成分研究科・主任研究員