

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05509

研究課題名(和文) 食品異物及びカビ伝播の原因となる食菌性昆虫はカビ毒産生能を亢進する

研究課題名(英文) Fungivorous insects that cause Fungi transmission affect mycotoxin Production Capacity ?

研究代表者

小西 良子 (KONISHI, YOSHIKO)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10195761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食菌性昆虫は食品工場などカビの温床となる施設でしばしば大発生することから、一般衛生管理プログラムにおいて重要な管理ポイントとされている。近年食品製造工場などで、体長1～2mmの食菌性昆虫の発生が社会問題となっている。そこで食菌性昆虫のカビ毒産生菌の産生能への影響の検討と効果的な防止策の基礎的研究を目的とした。本研究の成果として食菌性昆虫は、虫体内に共存細菌(放線菌)を持っており、ある種のカビの発育およびカビ毒産生を抑制することが明らかになった。また、カビ嗜好性の特徴から、殺虫剤を使わずに対象となる虫を収集して駆除する手法への応用が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いままでは食菌性昆虫は、カビの媒介者としての認識しかされていなかったが、本研究では、食菌性昆虫の継代飼育により、食菌性昆虫によるカビの嗜好性および共存細菌の存在が与えるカビ毒産生能への影響を明らかにし、新しいペストコントロールに応用するものである。食菌性昆虫には、虫体に共存する細菌(放線菌)の存在が見出され、この細菌がある種のカビには増殖を阻害し、カビ毒産生菌の産生能を抑制する作用を有することを見出した。また、昆虫のカビへの嗜好性も視覚的、臭覚的な要因で決まっていることも示唆された。これらの成果から殺虫剤を使わずに対象となる虫を収集して駆除する、SDGsに貢献する手法への応用が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Fungivorous insects are often found in storage tanks and other facilities where fungi grows. They often occur in large numbers in such places, and are therefore considered an important control point in general pest control programs. In recent years, outbreaks of the insects such as brown beetles (1-2 mm in length) have become a hygiene problem in food manufacturing plants. The objective of this study was to conduct basic research for effective prevention of the insects and to clarify the effect of the insects on the capacity of the fungi producing mycotoxin. This study indicates that these insects, which are a problem for food safety as food pests, have coexisting bacteria in their bodies, which inhibit the growth of certain fungi and the production of mycotoxins. These capacities could be applied as an inhibitor. Also, the findings that characterized the fungus preference could be applied to tools for new pest control without the use of insecticides.

研究分野：食品衛生学

キーワード：食菌性昆虫 ヒメマキムシ チャタテムシ カビ毒 カビ 放線菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食菌性昆虫はカビを栄養源とし環境中に棲息しており、貯蔵槽、貯蔵倉庫、食品工場などカビの温床となる施設でしばしば大発生することから、一般衛生管理プログラムにおいて重要な管理ポイントとされている。近年食品製造工場、食品倉庫や流通コンテナなどにおいて、体長1~2mmの褐色微小種であるヒメマキムシ類、チャタテムシ目などの食菌性昆虫の発生が、食品中の異物混入を引き起こすなど社会問題となっている。これら食菌性昆虫を含む食品害虫の食品衛生学的研究から、それらの多くがカビを体表や体内に保有しており、環境へのカビの伝播者を担っていると考えられている。先行研究から食菌性昆虫の餌となる環境中のカビは、*Cladosporium* 属など普遍的に存在するものから二次代謝産物としてカビ毒を産生する種である *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属および *Fusarium* 属も含まれることが明らかになっている。とくに食品害虫とカビ毒産生菌については、食品害虫に付着したカビ毒産生菌のカビ毒産生能が、環境に生息していた時より高まっている可能性を示唆する報告があるが、不明な点が多い。

2. 研究の目的

食菌性昆虫によるハザードの効果的な防止策のための基礎的研究と虫体に食餌として摂食されるプロセスによるカビ毒産生能への影響を明らかにすることを目的とした。本研究ではヒラタチャタテムシ(図1)およびヒメマキムシを食菌性昆虫のモデルとして用いた。研究項目としては以下の3つの項目を立てて行った。

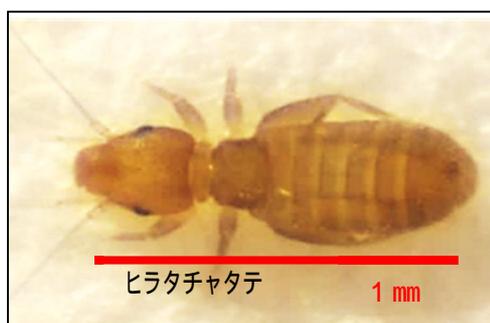


図1. ヒラタチャタテムシ

(1) 虫体表および体内でのカビの動態メカニズムの解明 カビを栄養源とするチャタテムシの消化管内の環境、消化酵素、虫体の共存細菌によりカビがどのような影響を受けるかを検討した。また、ヒメマキムシ虫体の共存細菌を分離し、同定を行った。カビ嗜好性に関する研究 効果的な防止策の構築に活用する目的で、

チャタテムシの好むカビの種類と特徴をあきらかにし、(1)で同定した共存細菌が嗜好性の高いカビを含む環境カビの生存に与える影響を検討した。

(2) 共存細菌のカビ毒産生能への影響 (1)で同定した細菌が、昆虫が摂食対象とするカビ毒産生菌の産生能へどのような影響を与えるのかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 動態メカニズムのモデルとして、カビ毒産生能を有する *Aspergillus versicolor* を用いた。*A. versicolor* は Potato Dextrose Agar (PDA) 培地で1週間培養し、一定量を採取した。次に培養した *A. versicolor* を滅菌麵棒で採取し孢子懸濁液 1.0 ml に懸濁した後 0.1 ml 採取し、pH10.1 の溶液で室温(約 23)で 2、4、18 時間それぞれ反応させた。セルラーゼ反応は、前培養した *A. versicolor* を滅菌麵棒で採取し、孢子懸濁液 1.0 ml で懸濁をした後 0.1 ml 採取しセルラーゼ溶液(富士フィルム和光純薬) 1.0 ml を加えた。その後振とう恒温槽 水温 30 で 1、2、4 時間それぞれ反応させた。それぞれ上清を除いたのち、PBS に再懸濁し *A. versicolor* の生存率を検討した。対照として各検体を反応させていない *A. versicolor* を用いた。

共存細菌の分離同定においては、飼育していたヒメマキムシの幼虫および成虫 5 頭ずつを PBS を含むチューブに入れ、バイオマッシャーで1分間すり潰し、懸濁液全量を抗微生物培地平板(ダイゴ:日本製薬)で 25 ± 1 で 7 日間培養した。培養後、検出された菌を National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) により 16S rRNA 領域のヌクレオチド配列相同性に基づいて同定した。

(2) ヒラタチャタテムシは、「株式会社 ピアブル」から購入した。飼育と繁殖は飽和食塩水を入れたケース(ポリプロピレン 外寸W 20.0×L 13.6×H 6.8 cm, 体積1850 cm³) で湿度70%-99%, 26.0 に設定したインキュベーターで調湿および飼育を行った。カビの嗜好試験に用いる供試菌株、*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium cladosporioides* の4種は、千葉県習志野市にある食品製造施設内の環境中から採取をした。種の同定は形態的特徴及びBLASTを使用した。各菌をそれぞれ Potato Dextrose Agar (PDA) 培地に滅

菌したる紙ディスク [THIN 8 mm(ADVANTEC)] を5枚置いた上から塗抹し7日間、 25 ± 1 で培養した。ヒラタチャタテムシのカビに対しての視覚的及び嗅覚的な嗜好性を調べるために比較的狭い同一空間に種の異なるカビを置く手法を行った。直径9 cmの円形アリーナを有する装置を作製し4種のカビディスク(カビを培養したる紙ディスク)と

control (滅菌したる紙ディスク)を同じ円形アリーナ内に置いた(図2)

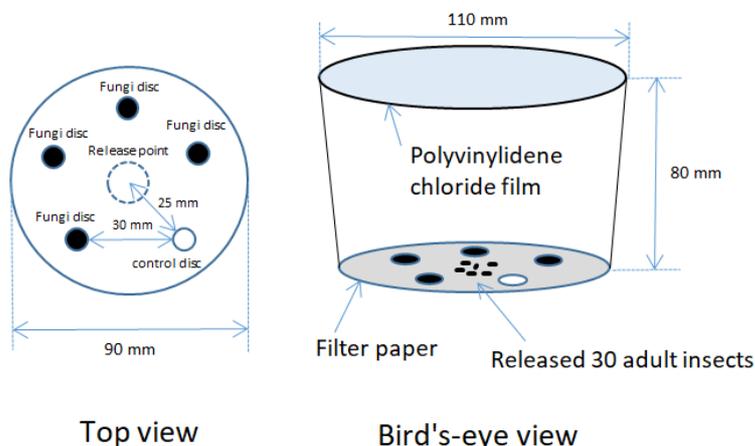


図2. 嗜好性実験のデバイス

食性嗜好性の評価は、4種類のカビディスクに集まる虫の数を測定して行い、虫の数が多きものを嗜好性が高いカビと評価した。同時にそれぞれのカビの形態的・光学的特徴および嗅物質についても測定した。

(1) で同定した共存細菌のカビへの影響を見るため、12ウェルのマイクロプレートに、単離した2菌株の培養液を入れ、それぞれ4種類のカビ(*A. tubingensis*, *A. flavus*, *P. chrysogenum*, *C. cladosporioides*)の孢子液と共培養を行った。コントロールとして、孢子懸濁液を加え、各ウェルの培養液に発育したカビの発育面積から発育率(カビ発育面積/ウェル面積:%)を計測し、発育阻止については、発育率から4段階で評価を行った。

(3) 共存細菌のうち、成虫から分離された放線菌(*S. olivaceus*)を用い、カビ毒産生菌 *A. versicolor* と共培養を5か月間行った。25cm²の細胞培養用のフラスコ内に *A. versicolor* をMEブロス(麦芽浸出液液体培地)を用い25 で培養した。同時に *S. olivaceus* をSCDブロスで培養し、*A. versicolor* を培養している細胞培養用のフラスコ内に1:1(v/v)の割合で加え1か月培養を繰り返し5か月間行った。1か月ごとに培地を収集し、*A. versicolor* は継代培養したうえで、新しく培養した *S. olivaceus* を加えた。培地収集で得られた培養上清を遠心し、85%アセトニトリルで抽出後、窒素乾固し検体とした。対照としては、*S. olivaceus* 非共存下で培養した菌体抽出物を用いた。抽出液に含まれるカビ毒(ステリグマトシスティン、STC)はHPLC(Shimadzu)で、代謝産物はLC/QTOFシステム(Agilent 6546)により測定した。

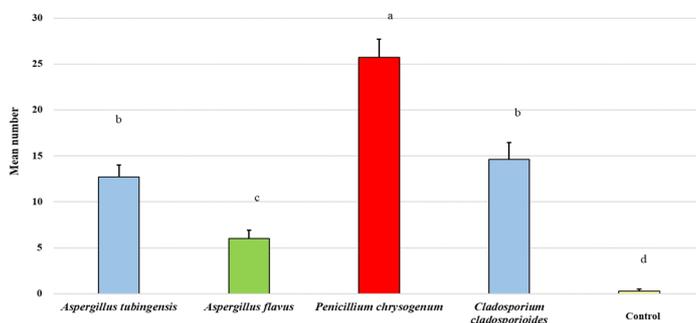
4. 研究成果

(1) 昆虫の胃内のpHが10付近であることから、模擬胃液を作成した。pH10.1の弱アルカリ性のモデル胃液を用いた実験では対照と比べ、*A. versicolor* の生存率が減少したが18時間反応後では175.5%増加した。昆虫の消化酵素であるセルラーゼ溶液を用いた実験では、対照と比べ生存率が減少した。これらの結果により胃液においてはカビの死滅は起こらず、消化酵素において減少することがわかったが、完全に死滅することなく生存菌体を糞とともに排出している可能性があると考えられた。また、虫体の共存細菌として分離された菌株は、*Streptomyces olivaceus* または *S. pacum* と同定された。

(2) 嗜好性が最も高いカビは *Penicillium* 属であった(図3)。このカビの特性として虫の体高よりも低く、虫の口器よりも低い位置で密に発育するピロード状コロニーを形成することが嗜好性に関与していると考えられた。さらに *P. chrysogenum* が産生した臭気物質も嗜好性に関与していると考えられたため、実験に用いた4種類のカビの臭気物質をGC/MSで測定した結果、35種類の臭気物質が検出された。嗜好性が最も高かった *P. chrysogenum* から検出された臭気物質は9種類であったが、このうち1,5-octadien-3-olと2,6,10-trimethyldodecaneは、*P. chrysogenum* のみから検出された。このことから2種の臭気物質がヒラタチャタテムシの誘引物質の候補であることが示唆された。これらのことから、チャタテムシはカビ毒産生菌である *P. chrysogenum* を好んで食べることが明らかになり、殺虫剤などを使わない駆除手法への応用が可能となった。*S. olivaceus* の上記の4種に対する発育阻止作用では、*C. cladosporioides* および *A. tubingensis* に対して原液および10倍希釈において顕著な発育阻止活性が見られた。

これらの結果から、虫が摂食する4種のカビのうち2菌種には発育阻止活性があることが明らかになった。

(3) 食菌性昆虫の共存細菌である *S. olivaceus* をカビ毒産生菌 *A. versicolor* とを5か月間共培養した結果、図4で示すように最初の3か月間は放線菌が共存する条件と共存しない条件でのカビ毒 (STC) の量は変わらなかったが、



* Steel-Dwass test による多重比較 ($P < 0.05$, $n = 10$) * Error bar : SE

図3. チャタテムシのカビ嗜好性

4か月以降は放線菌が共存すると有意にSTC量が低下した。このことから、放線菌はカビ毒産生抑制作用があることが示唆された。この抑制作用がSTC変換酵素を阻害して起こっているかを検討するため、放線菌共存下の5か月目の菌体内の代謝物から、STCの生合成における中間体を探索した。AverufinとVersicolorin AおよびVersicolorin Bが放線菌共存の有無にかかわらず検出された。しかし、両者に産生量に有意差は見られなかった。また、中間体ではない代謝物として、被検検体に特有の物質は24成分、対照検体に特有な物質は27成分検出されたが、同定までに至らなかった。これらのことから、放線菌のカビ毒産生能を低下させるメカニズムは、STCの生合成に関する酵素を阻害するものではないことが示唆された。今後中間体以外の代謝産物の同定を行う必要がある。

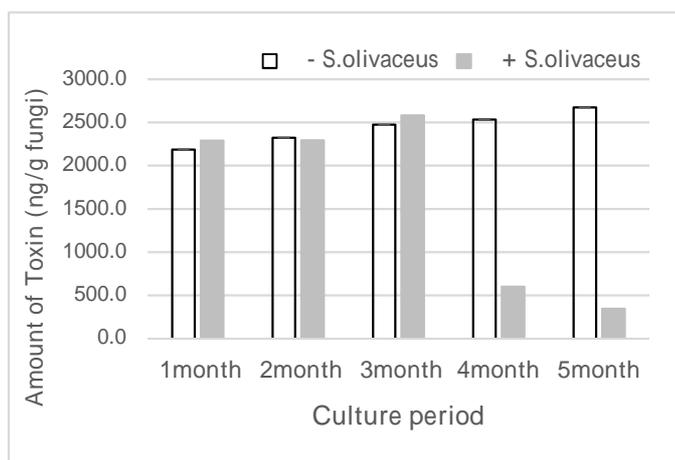


図4. 放線菌と *A. versicolor* の共培養下の毒素産生

以上の研究の成果から、2つの新しい知見が得られた。1つは食品害虫として食品衛生上問題となる食菌性昆虫は、虫体内に共存細菌を持っており、これらはある種のカビの発育およびカビ毒の産生を抑制していることが明らかになったことである。これらのシステムは、昆虫自身を守るために備わっている可能性が高いが、昆虫に共存している細菌が抗カビ毒産生作用を有している知見は今後のカビ毒産生菌の抑制物質として応用できるであろう。もう一つは、食菌性昆虫のカビ嗜好性の特徴を明らかにしたことである。この知見によって、殺虫剤を使わずに対象となる虫を収集して駆除する手法への応用が可能になる。

<引用文献>

Kawakami Y et al., Mycotoxins, 57, p47-56, 2007

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 M.Yoshinami, R.Machida, N.Kobayashi, Y.Sugita-Konishi K.Furuhata	4. 巻 88
2. 論文標題 Multifaceted fungal characteristics determining the fungal feeding preferences of the psocid, <i>Liposcelis bostrychophila badonnel</i> (Psocoptera: Liposcelidae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Stored Products Research	6. 最初と最後の頁 101659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jspr.2020.101659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 T.Okano,N. Kobayashi ,K. Izawa , T.Yoshinari , Y.Sugita-Konishi .	4. 巻 12
2. 論文標題 Whole Genome Analysis Revealed the Genes Responsible for Citreoviridin Biosynthesis in <i>Penicillium citreonigrum</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12020125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 A.Kubosaki, N.Kobayashi, M.Watanabe, T.Yoshinari, K.Takatori, Y.Kikuchi, Y.Hara-Kudo, J.Terajima, Y.Sugita-Konishi	4. 巻 25
2. 論文標題 A New Protocol for the Detection of Sterigmatocystin-producing <i>Aspergillus Section Versicolores</i> Using a High Discrimination Polymerase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biocontrol Sci.,	6. 最初と最後の頁 113-118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4265/bio.25.113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林直樹、町田陸也、吉浪誠、小西良子
2. 発表標題 食品害虫チャタテムシのカビに対する嗜好性について
3. 学会等名 日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 吉浪誠
2. 発表標題 食菌性昆虫と環境汚染カビについての研究
3. 学会等名 第48回カビ毒研究連絡会（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 吉浪誠
2. 発表標題 カビと食菌害虫（チャタテムシ）
3. 学会等名 一般社団法人食品微生物科学協会 第9回事例研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小林 直樹 (KOBAYASHI NAOKI) (90447558)	麻布大学・生命・環境科学部・准教授 (32701)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	吉浪 誠 (Yoshinami Makoto)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------