第4回 マイコトキシン研究会一般講演要約

愛知県産業貿易館 (昭和51年 7 月23日)

日本におけるマイコトキシン生産アスペルギルス属数菌種の分布について

真鍋 勝・鶴田 理・田中 健治・松浦 慎治*1

M. MANABE, O. TSURUTA, K. TANAKA, and S. MATSUURA*1:
Distribution of mycotoxin-producing *Aspergillus* in Japan

Aspergillus が生産する代表的マイコトキシンとしてアフラトキシン (以下 AF と略す), ステリグマトシスチン (以下 ST と略す), オクラトキシン (以下 OC と略す) があげられる。これらのマイコトキシンを生産する菌としては多くの菌種が報告されており, たとえば AF については, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* の他に *Penicillium* や *Mucor* などの名もあがっており, また ST についても *Aspergillus* の他に *Penicillium* が多量の ST を生産することが確認されている¹⁾。本報では, 代表的マイコトキシン生産 *Aspergillus* 属として, AF については *A. flavus* Link と *A. parasiticus*, ST については *A. versicolor*, OC については *A. ochraceus* に注目して国内における分布を土壌と穀類等について調査した。

調査方法および結果

1) AF 生産 *A. flavus*, *A. parasiticus* の検索

AF 生産菌の分布に関する報告²⁻⁶⁾ から生産菌の分布は, 亜熱帯から熱帯にかけて多く存在することがわかっているが, 著者らの沖縄地域を除く国内産穀類の調査過程では, 時として *A. flavus* 菌群を分離することはあっても, AF 生産能を認める菌株は検出していない。そこで, わが国における AF 生産菌の分布を土壌について検討した。

土壌試料の採取地点は, なるべく人家から離れた交通量の少ない耕地を主としたが, 地域別の状態を知るために草地・山地などの土壌も含めた。試料数は, Fig. 1 の各都道府県の所に示したが, 位置的に離れている島部についてはそれぞれ島ごとに試料数を示した。土壌試料総数は823点である。Fig. 1 には先に報告²⁾した沖縄地域の結果も地域的分布の傾向を明らかにするために一緒に示した。

菌の分離は, それぞれ 100 ml の蒸留水を入れて滅菌した 200 ml 共栓三角フラスコ内に供試土壌 2~5 g ずつ入れ, 振盪して静置2時間ののち, 流し込み培養直前に細菌の生育を阻止するため, 静注用アクロマイシン 100 mg を 20 ml の滅菌水に溶解した溶液 1 ml ずつを加えた。こうしたそれぞれの供試土壌混液から 0.2, 0.4, 0.8, 時として 1.0 ml 以上をピペットで採り, それらを容量別にシャーレ内に入れ, ショ糖 25% 添加ツァベック寒天培地 (pH 5.3) を流し込んで混合したのち固化させ, 28°, 10日間培養の過程で生育してくる該当菌種を採取・分離する方法によった。

分離菌株の同定は, The Genus *Aspergillus* (RAPER and FENNELL, 1965) によった。

分離菌の AF 生産能の検索は, *A. flavus* 菌群に分類される菌株であっても, AF の生産能が異なるため, 分離した菌株はそれぞれ蒸米に接種し, 28°, 7日間培養して, AF 生産の有無と生産量を測定した。

AF の分析は, 先報²⁾と同様に行なった。AF 生産の有無については, 展開ずみ薄層板を長波長紫外線下

*1 農林省食品総合研究所 (東京都江東区塩浜1-4-12)
National Food Research Institute (4-2, Shiohama-1,
Koto-ku, Tokyo)

Fig. 1 各地土壌からのアフラトキシン生産菌の分離頻度 (分離土壌試料数 / 供試土壌試料数)

で標品 AF の R_f 値と蛍光色を比較したが、 R_f 値や蛍光の色調で判断し難い時は、その物質を薄層より溶出し、マススペクトルを取ることで AF の同定を行った。AF の定量は、蛍光デンストメーター（日立製作所製、反射型）により AF-B₁ のみ測定した。

全国より採取した土壌より菌を分離した結果、*A. flavus* Link は中部地方以北からはほとんど分離されず、近畿から九州（本土）の間では分離頻度（分離土壌試料数 / 供試土壌試料数）が5～10%であり、奄美大島から南部では数10%の割合で分離された。*A. parasiticus* は、四国、九州北部以北からは分離されず、九州南部以南でかなりの頻度で分離された。これらの分離菌株について AF 生産能を調べた結果、AF 生産菌を分離した土壌試料数は38点であり、その地域分布を Fig. 1

に示した。このわが国における AF 生産菌の分布の結果と年平均気温を比較すると、年平均気温 16° の等温線が生産菌分布の限界線と割に高い相関を示しており、生産菌の土壌中分布に気温が何らかのかたちで関与していることを推察した。

2) ST 生産 *A. versicolor* の検索

著者らは、国内産穀類に着生する菌類について検索し、ST 生産菌 *A. versicolor* が高い着生率で検出されること^{7,8)}、また茨城県下の1倉庫で保管中の玄米が ST の汚染を受けた事故について報告した⁹⁾。また宮木らは千葉・茨城地区の農家保有米から、倉田らも精米から *A. versicolor* を分離している^{10,11)}。このように各地から *A. versicolor* の存在を示す報告がなされて

いるが、全国的規模で採取した試料から *A. versicolor* を分離し、ST の生産能について検索した報告は著者の知るかぎり無い。そこで全国各地より土壌や穀類等を採取し、*A. versicolor* を分離し、ST 生産能について調査した。

試料からの菌の分離は、AF の場合と同様であるが、穀類などの粒状のものについては、表面に付着する孢子類を殺菌もしくは除去する手段として、穀粒を1%次亜塩素酸ソーダに1分間浸漬後、適量の滅菌水を用いて振盪、洗浄を10回反覆した。処理した穀粒を、シヨ糖5%、あるいは25%添加ツァベック寒天斜面培地の入った試験管1本に1粒ずつ、1試料について100~200粒を供試し、26°で培養する過程で出現する菌を分離した。

分離菌のST生産能の検索は、AFと同様に白米に

25°で3週間培養し、先に報告したガスクロマトグラフィーによる方法で分析した⁹⁾。

供試試料からの *A. versicolor* の分離頻度を農家保有穀類(貯蔵1年未満)についてみると、麦では試料416点中14点、小豆では18点中2点、もみ11点中3点、玄米32点中5点から *A. versicolor* を分離した。また4年以上倉庫に貯蔵された玄米については、試料760点中5点から *A. versicolor* を分離したが、明らかに病変米を生じた倉庫については、21倉庫中8倉庫から分離した。次に収穫直後の麦(普通品:3等)については、413点中14点から *A. versicolor* を分離した。土壌試料についても約1000点中31点から分離した。これら分離の88株の *A. versicolor* について、STの生産能を検討した結果をFig.2に示した。分離 *A. versicolor* 菌株の大部分がSTの生産能を有しており、分布も日

Fig. 2 各地土壌・穀類等より分離した *A. versicolor* のステリグマトシスチン生産能

本全体にひろがっていることがわかるが、AF生産菌の場合と逆に九州南部以南になると *A. versicolor* の分離頻度が低下すると共に ST の生産能が低下している。

3) OC 生産 *A. ochraceus* の検索

わが国における OC 生産菌である *A. ochraceus* の分離については、カビ米から分離した報告¹²⁾があり、また長崎県富江町から採取した米から OC 汚染が発見¹³⁾されている。著者らは、*A. versicolor* を分離した時、*A. ochraceus* にも注意して分離を試みたが、分離頻度は低く全体で10菌株を分離した。この分離菌株を L-phenylalanine を含む準合成培地¹²⁾に培養(27°, 16日間)して OC の生産能を検討した。OC の分析は A.O.A.C. 法に準じて行なった。定量は OC-A につい

て、薄層板上のスポットをデンストメーターにより測定した。

検討を加えた10菌株のうち、8菌株に OC-A の生産が認められ、この培養における OC-A の生産量を菌の分離地域とともに Fig. 3 に示した。*A. ochraceus* の分布については、分離菌株も少なく明確な傾向は判明しなかったが、全国的に分布しているようである。

引用文献

- 1) Ciegler, A., Kadis, S. and Ail, S. J., "Microbial Toxins, vol. 6" Academic Press, New York and London (1971).
- 2) 鶴田理, 真鍋勝, 日菌報, **16**, 190~197 (1975).
- 3) 高鳥浩介, 高橋恵子, 宇田川俊一, 倉田浩, マイコトキシン, **1**, 20~22 (1975).

Fig. 3 各地土壌・穀類等より分離した *A. ochraceus* のオクラトキシン生産能

- 4) Shank, R. C. and Wogan, G. N., *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **10**, 51~60 (1972).
- 5) Stoloff, L., Henry, S., and Francis, O. J. Jr., *J.A.O.A.C.*, **59**, 118~121 (1976).
- 6) Joffe, A. Z., *Nature*, **221**, 492~493 (1969).
- 7) 鶴田理, 真鍋勝, *日菌報*, **15**, 401~411 (1974).
- 8) 真鍋勝, 南沢正敏, 松浦慎治, *農化*, **47**(3), 209~215 (1973).
- 9) 真鍋勝, 鶴田理, *日菌報*, **16**(4), 399~405 (1975).
- 10) 宮本高明, 山崎幹夫, 堀江義一, 宇田川俊一, *食衛誌*, **11**, 373~380 (1970).
- 11) Kurata, H., Udagawa, S., Ichinoe, M., Kawasaki, Y., Takada, M., Tazawa, M., Koizumi, A., and Tanabe, H., *食衛誌*, **9**(1), 23~28 (1968).
- 12) Yamazaki, M., Maebayashi, Y., and Miyaki, K., *Appl. Microbiol.*, **20**(3), 452~454 (1970).
- 13) Uchiyama, M., Isohata, E., and Takeda, Y., *食衛誌*, **17**(1), 103~104 (1976).

生薬類におけるアフラトキシン生産菌の分布について

宇田川 俊一*¹・倉田 浩*¹・法月 克弘*²
高島 浩介*³・中尾 美津男*³・高橋 恵子*³

S. UDAGAWA*¹, H. KURATA*¹, K. NORIZUKI*², K. TAKATORI*³, M. NAKAO*³,
and K. TAKAHASHI*³: Distribution of aflatoxin-producing fungi
in crude drugs of plant origin

最近、医薬品等のGMPに関連して生薬製剤および生薬原料の微生物汚染について実態調査を行ったところ、わが国で製造されている生薬製剤およびその原料生薬が各種の真菌類によって著しく汚染されていることが明らかにされた。生薬製剤は製造加工上、加熱滅菌処理が困難な場合が多く、また生薬原料の多くは諸外国より輸入され、その種類や性状は複雑であるところから、マイコトキシン汚染による危険性は深刻である。輸入生薬の微生物汚染が、その生産地における調製流通段階に発生しているとすれば、まずアフラトキシン(以下AFと略す)生産菌の分布の実態が菌学的に追及されなければならない。

今回は輸入植物性生薬として、甘草、大黄、麻黄、

白朮、柴胡、牡丹皮、芍薬、蒼朮、苦辛、山帰来の10種、87試料を調査対象とした。輸入国別では、中国62試料、韓国19試料、その他(タイ、パキスタン、ネパール)6試料となっている。菌分離は、1cmの大きさに細碎した試料を滅菌水で表面洗浄したのち、クロラムフェニコール添加麦芽寒天培地平板上に5個つづ並べ、1試料につき合計25個の細片を、25°、10~14日間培養し、出現菌を集め純粋分離と同定を行った。次に、*A. flavus*と同定された分離株を、ショ糖-酵母エキス-麦芽エキス液体培地(2% YES+malt extract 10 g/L)をもちい、25°、7日間静置培養して得られた培養液についてAF生産性を化学的ならびに微生物学的手法により検索した。化学的には液 1~5 μlをそのままキーゼルゲルGのTLCにより、クロロホルム-アセトン(9:1, V/V)を用いて展開し、螢光デンシトメトリーで測定した。対照AF生産菌としては、*A. parasiticus* ATCC 15517株、*A. flavus* 71-NU-48株をもちいた。

Table 1に示すように対象とした生薬類の真菌フローラは、*Aspergillus*属が主体で、87試料中の53試料に発生した*A. niger*の着生が最も著しく、また*Eurotium*(*A. glaucus*)、*A. flavus*も多数認められた。*A. niger*、*A. flavus*着生試料には接合菌類の複合汚染

*¹ 国立衛生試験所(〒158東京都世田谷区上用賀1-18-1)

National Institute of Hygienic Sciences (1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo)

*² 株式会社パピリオ研究所(〒106東京都港区南麻布3-20-10)

Research Institute, Teijin Papilio Cosmetics Co., Ltd. (3-20-10, Minamiazabu, Minato-ku, Tokyo)

*³ 食品薬品安全センター秦野研究所(〒257神奈川県秦野市落合)

Hatano Research Institute, Food & Drug Safety Center (Ochiai, Hatano-city, Kanagawa)

Table 1. Fungi growing from imported crude drugs (plant origin) cultured on malt agar-Half strength

Crude drug	No. examined samples	Fungi identified* (No. of contaminated samples)									No. sterile samples
		AF	AG	AN	M	R	CH	CL	P	T	
Glycyrrhizae Radix	19	5	3	10	1	17	2	4	11	5	
Rhei Rhizoma	14	1	7	12	2	2			6		1
Ephedrae Herba	11	3	4	6		8	3	2	6	3	
Atractylodis Rhizoma	9	6	6	7	4	6	2		6	4	
Bupleuri Radix	9	2	3	4	5	9	5		7		
Moutan Cortex	7			1							4
Paeoniae Radix	5		3	2	2		2		2		1
Atractylodis Lanceae Rhizoma	5	1	3	4		2			3		
Sophorae Radix	4	2		4	2	4		1	2	2	
Smilacis Rhizoma	4		2	3		1			2	1	
Total	87	20	31	53	16	49	14	7	45	15	6

* AF=*Aspergillus flavus*, AG=*A. glaucus* (= *Eurotium* spp.), AN=*A. niger*, M=*Mucor* spp., R=*Rhizopus* spp., CH=*Chaetomium* spp., CL=*Cladosporium* spp., P=*Penicillium* spp., T=*Trichoderma* spp.

が生じ、とくに *Rhizopus* 属の発生が著明であった。*A. flavus* 菌群として分離された菌株を同定した結果では、いずれも *A. flavus* で、*A. parasiticus* その他に所属する菌種は発見されなかった。フローラの構成からみて、セルロース分解性の強い *Chaetomium*, *Trichoderma* は薬用植物栽培末期～調製初期に発生したものが残ったものと考えられ、次に収穫後の調製流通段階では、生薬原料が高含水量となり、*A. niger*, *A. flavus*, 接合菌類などの好湿菌が発生し、最後に乾

燥過程で *Eurotium* が着生するようになったものと推察される。一方、穀類に多い *Fusarium* は比較の少ない結果を示した。また、品目別では大黄、牡丹皮、芍薬が真菌の発生少なく、とくに牡丹皮では真菌が全く検出されない試料が多かった。

以上の結果から、*A. flavus* の存在は輸入生薬の真菌汚染として特徴的であると考えられたため、さらに Fig. 1 のようにその出現率を比較した。試料数の少ない品目もあるので、結論的にはいえないが、白朮、苦参、麻黄、甘草、柴胡などが *A. flavus* 着生の点で注目され、全試料平均の *A. flavus* 出現率は23%を示したことから考察すれば、生薬類の一部が輸入食品なみに *A. flavus* 汚染をうけているといえよう。対象とした生薬品目は、大部分植物の地下部(根または根茎)を利用したものであり、食品における輸入落花生の場合と生態環境が類似している。すなわち、環境汚染源としては収穫時における栽培地土壌の付着混入が問題であろう。著者らの研究によれば、東南アジアの土壌試料156点について *A. flavus* の分布を調べたところ、27試料(17%)に *A. flavus* が分離された¹⁾。今後、輸入国における薬用植物の栽培環境および収穫時の調製流通状況が明らかにされれば、汚染原因の究明もできると思われる。

次に分離された *A. flavus* 15株について AF 生産性を検索した結果、パキスタン産麻黄より分離された2株について B₁ がそれぞれ 4.1, 6.4 ppm 測定された

Fig. 1. Occurrence of *A. flavus* in samples of imported crude drugs (plant origin)

(Gグループは生産されなかった). この数値は対照として用いた ATCC 15517 株の B₁ 16.6, B₂ 0.4, G₁ 54.0, G₂ 0.7 ppm, 71-NU-48 株の B₁ 16.7, B₂ 0.9, G₁ 42.9, G₂ 1.0 ppm と比較すると生産力は明らかに劣るが, AF 生産性としては必ずしも低いものではない. したがって, AF 生産株の出現率は低かったが, 今後各種の植物性生薬類について AF 生産株の分布を検索する必要性を認めた.

生薬の種類, 生産地と AF 生産菌の分布との関係については更に広汎な検索を必要とする. また, それぞれの生薬を基質として AF が生産されるかどうか確認

すること, もし生産されるとすれば生薬試料から直接 AF の分析法の確立, 生薬からの AF 生産菌や AF の除去対策の開発などについても重要な今後の課題であるといえよう.

引用文献

- 1) 齊藤守編: "東南アジアにおける疾患の病因究明を目的とした食品汚染性かび毒ならびに植物毒の研究調査報告", p. 85 (1976), 東大医科学研究所東南アジアかび毒調査隊.

油彩画上に発育するカビについて

角田 廣・岸 菊子・富沢 秀文*1

H. TSUNODA, K. KISHI, and H. TOMIZAWA*1: Studies on the molds growing on oil paintings

群馬県立近代美術館, 所蔵の油彩画で所蔵年数10年程度で黒えのぐの部位にカビ汚染が著しい. 他の色素えのぐの部には汚染が見当らない. 主成分は炭素であって変性のしにくいものの上にカビ汚染があるので, 将来は防黴剤を考えなければならない. 1905年に寺田春武氏は油絵の科学と題して, その汚染黴*2が *P. glaucum*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *Phoma arten*, *Mucor* の発生によると報告し, その発育条件は湿気によると記され, 防黴剤としては PCP 系のものがよいとされている. 我々は環境衛生の立場から考えても納得のゆく防黴剤を見出すために, えのぐに発育する菌分布を調べた.

材料の採取及び培養

同上美術館の所蔵画複製の際にカビの存在する部位を一部掻取り, 滅菌試験管におさめ, 培養により出現菌を分類した.

培地は Czapek-Yeast エキス寒天培地を用いたが, ショ糖量 5% では発育が遅く, 変形集落を形成するの

で, 培養にはショ糖を30%加え, 好滲透圧培地となし分離培養を行なった.

採取した画名は使徒習作, 鳥, ひしめく群像, あえぐ群像, Slam lords rich on our misery (いずれも福沢一郎氏作), 風景 (トライオン氏作) の6点で, これらよりカビを分離した.

分離菌の同定分類

使徒習作: a 株は集落はじゅうたん状で reddish yellow, 裏が reddish yellow, *Sterigmatocystis* で conidia は平滑であるので *A. versicolor* と決定した.

b 株は集落は短羊毛状で grayish green, 裏は light greenish gray, primary sterigmata, conidia に小刺があるので *A. fumigatus* と決定した.

風景 (トライオン): a 株は集落はじゅうたん状で dull green, 裏は dull yellow, *Asymetrica-Lanata* に入るので *P. commune* と決定した.

b 株は集落は粗じゅうたん状で light greenish gray, 裏は放射状の yellow orange 異色帯を形成し, *Monoverticillata* に属するので *P. multicolor* と決定した.

鳥及びひしめく群像: この2画よりは, 集落粗じゅうたん状, grayish green, 裏が dull yellow green,

*1 群馬大学教育学部 (〒371前橋市荒牧) Gunma Univ.

*2 *A.*: *Aspergillus* の略, *P.*: *Penicillium* の略

A. versicolor *A. fumigatus* *P. commune* *P. multicolor* *A. athecus* *A. cristatus*

Fig. 1. 洋画から分離した6種のカビ形態

vesicle の 1/2 より上に sterigmata を形成し, conidia の大きさは $6\sim 8\times 5\sim 6\mu$ で刺があり, *A. glaucus* group 中の *A. athecus* に入る. いまだ子嚢胞子を形成しない.

あえぐ群像及び slam lands rich.: この2画は *A. athecus* と他に集落は花紋状, 短羊毛状, dark green, 裏は dark green, 白の絞り状, vesicle の 1/2 より上に sterigmata 着生, conidia $3\sim 4\times 2\sim 3.5\mu$ で刺があり, *A. cristatus* に入る.

以上の通り, 使徒習作からは *A. versicolor* と *A. fumigatus* の2種, 風景からは *P. commune* と *P. multicolor* の2種, 鳥, ひしめく群像, あえぐ群像, slam lords rich. からは *A. athecus*, あえぐ群像及び slam lords rich. から *A. cristatus* が分離出来, 6画から *Aspergillus* に属するもの4種, *Penicillium* に属するもの2種を得たが, これらはいずれも好滲透圧菌で乾燥した物に寄生発育するので館内の空気調整だけでは防止はむりであろう.

Penicillium paraherquei の生産するマイコトキシンについて

芳沢 宅実*¹・諸岡 信一*¹・宇田川俊一*²

T. YOSHIZAWA*¹, N. MOROOKA*¹, and S. UDAGAWA*²:

Mycotoxins produced by *Penicillium paraherquei*

著者らは空中浮遊菌の毒物生産性を検索しているが, これまでに *Aspergillus awamori* No. 203 より malformin A を単離し, その毒性を明らかにしてきた¹⁾. その後, 高知市内の空中浮遊菌よりマウスに對しけいれん性を有する *P. paraherquei* Abe ex G. Smith を認めた. 本菌のマイコトキシン生産に関しては, 現在までに penicillic acid が確認されているのみで²⁾, けいれん性物質 (tremorgen) の報告は見当らない. 本報では tremorgen の単離・同定, ならびに *P. paraherquei* 保存株のマイコトキシン生産性について述べる.

材料および方法

供試菌株: 1971年高知市の空中より分離した *P. paraherquei* No. 0312, および1971年ニューギニアの農産物より分離した *P. paraherquei* 10株 (国立衛生試験所保存株) を用いた. 培養は0.5% ペプトン添加 Czapek-Dox 液体培地で28°, 10~12日間行った.

Tremorgen の単離: *P. paraherquei* No. 0312 の風

乾菌体のクロロホルム抽出物をシリカゲルカラムクロマト (溶媒系: CHCl_3 -MeOH, 97:3) で2回精製してえた粗結晶をベンゼン再結して純品をえた.

マイコトキシン生産性の検討: Table 1 に示す11株を上記の条件下で培養し, 培養液は活性炭吸着後, メタノール脱着して粗抽出物をえ, 菌体は風乾してからクロロホルムを用いて抽出物をえた. それぞれの毒性は雄マウス (体重20~30 g) に腹腔投与し, けいれん性の有無と致死作用により判定した.

Tremorgen の検出はキーゼルゲン GF₂₅₄ プレート (溶媒系: CH_2Cl_2 -アセトン, 95:5) により, R_f 値および20% H_2SO_4 噴霧後, UV 照射下で螢光スポットから判定した. ペニシリン酸はトルエン-酢エチル酸 (5:4:1) で展開後, アニスアルデヒド- H_2SO_4 加熱発色により検出した.

結果と考察

P. paraherquei No. 0312 より単離した tremorgen は, mp. 234~235° (分解), TLC 上単一スポット (CH_2Cl_2 -アセトン/95:5, 0.56; エチルエーテル, 0.31) を示した. 各種スペクトル分析の結果は, 既知物質 verruculogen とよく一致した. ddy 雄マウスに對する腹腔投与時の LD_{50} 値は 6.3 mg/kg, けいれん発現の最少有効量は 0.9 mg/kg であった. これらの事実から本毒物は verruculogen (Fig. 1) と決定された³⁾. 本

*¹ 香川大学農学部食品学科 (〒761-07 香川県木田郡三木町池戸)

Faculty of Agriculture, Kagawa University (Miki-cho, Kagawa, 761-07)

*² 国立衛生試験所 (〒158 東京都世田谷区上用賀1丁目)

National Institute of Hygienic Sciences (Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo 158)

Table 1. Mycotoxins from *Penicillium paraherquei*

	Mice toxicity (ip)		penicillic acid	verruculogen
	Filtrate*	Mycelium**		
KU-0424 (NHL-6127)	0/3(+)**	1/3(++)***		++
KU-0425 (70-NU-5)	2/3	0/3	++	tr.
KU-0426 (70-NU-6)	0/3	2/3(++)		++
KU-0427 (70-NU-7)	0/3	2/3(++)		+
KU-0428 (71-NU-5)	0/3	1/3(++)		++
KU-0429 (71-NU-6)	1/3	1/3(++)	+	++
KU-0430 (71-NU-7)	0/3	3/3(++)	+	++
KU-0431 (71-NU-8)	0/3	0/3(++)		++
KU-0432 (71-NU-9)	0/3	0/3(++)		++
KU-0433 (71-NU-17)	0/3	2/3(++)		++
KU-0312	1/3	0/3(++)	++	++

* 70 mg/mouse was administered. ** 50 mg/mouse was administered. *** Typical tremor was observed.

物質は既に *P. verruculosum*⁴⁾, *A. caespitosus*⁵⁾ より分離されているが, *P. paraherquei* の生産性に関しては本報告が最初である。

一方, 本菌の verruculogen 生産が特定の株に限定されるかどうか, verruculogen 関連物質の有無, また penicillic acid 生産との関連について検討したところ (Table 1), 毒性に程度の差こそあれ, すべての保存株の菌体抽出物から verruculogen が検出された。他の tremorgen は認められなかったが, 穀粒等の他の培養基での生産性については未検討であるので関連物質の存在は現在のところ否定できない。また0425, 0429, 0430および0312株の培養液抽出物からは, いずれも penicillic acid が検出され, これらの菌株は2種類のマイコトキシンを同時生産する。以上の生物学的, 化学的検索の結果から判断して, *P. paraherquei* の主要

マイコトキシンは verruculogen と penicillic acid と考えられる。

また, 一般の *Penicillium* がいわゆる北方型の分布であるのに対し, 本菌はむしろ南方型を示し, 環太平洋地域の食品から特徴的に分離されるとの指摘は⁶⁾, この地域の本菌によるマイコトキシン汚染を考えていく上で注目すべきであろう。

本研究を行なうにあたり, 御協力下さった千葉大学生物活性研究所山崎幹夫教授ならびに理化学研究所辰野高司博士に深謝致します。

引用文献

- 1) Yoshizawa, T., Tsuchiya, Y., Morooka, N., Sawada, Y.: Agr. Biol. Chem., **39**, 1325 (1975).
- 2) Umeda, M., Yamashita, T., Saito, M., Sekita, S., Takahashi, C., Yoshihira, K., Natori, S., Kurata, H., Udagawa, S.: Japan. J. Exp. Med., **44**, 83 (1974).
- 3) Yoshizawa, T., Morooka, N., Sawada, Y., Udagawa, S.: Appl. Environ. Microbiol., in press (1976).
- 4) Fagos, J., Lokensgard, D., Clardy, J., Cole, R. J., Kirksey, J. W.: J. Am. Chem. Soc., **96**, 6785 (1974).
- 5) Schroeder, H. W., Cole, R. J., Hein, H. Jr., Kirksey, J. W.: Appl. Microbiol., **29**, 857 (1975).
- 6) Udagawa, S., Takada, M.: Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo, **16**, 317 (1973); 宇田川俊一: マイコトキシン, **2**, 10 (1976).

Fig. 1. Structure of verruculogen produced by *P. paraherquei* (chemical shift, δ , ppm in CDCl_3)

マイコトキシンの微生物に対する突然変異原性

長尾美奈子*¹・本田 雅子*¹・浜崎 敏*²・名取 信策*³・上野 芳夫*⁴
山崎 幹夫*⁵・清野 祐子*¹・矢作多貴江*¹・杉村 隆*¹

M. NAGAO*¹, M. HONDA*¹, T. HAMASAKI*², S. NATORI*³, Y. UENO*⁴,
M. YAMASAKI*⁵, Y. SEINO*¹, T. YAHAGI*¹, and T. SUGIMURA*¹:

Mutagenicities of mycotoxins on *Salmonella*

発癌物質を微生物を用いて検出する方法が最近広く用いられている。我々の研究室で、約400種の化学物質についてその突然変異原性を検べた。癌原性の既に報告されているもの140化合物のうち121(87%)のものに突然変異原性が認められた。また非癌原性と報告されているもの69種のうち50(73%)は突然変異原性が認められなかった。この様に癌原性と突然変異原性には、かなり高い相関関係が認められる。同様な結果が McCann ら¹⁾によっても報告されている。

この方法を用いて、精製され、構造の明らかにされたマイコトキシンを含む、カビの生産物について突然変異原性を検べた。

実験方法と材料

微生物：サルモネラ菌 TA100 及び TA98 を用いた。これらはヒスチジン要求性菌で、薬剤耐性因子 PKM 101 を持つ。これらはカリフォルニア大学 Ames 教授より分与された。

突然変異テスト：検体を dimethyl sulfoxide 100 μ l に溶解し、S-9 Mix またはリン酸緩衝液 0.5 ml、菌の

培養液 0.1 ml を加え、37°で20分 incubate 後、プレートに撒き、2日間37°で培養する。ヒスチジン非要求性突然変異コロニー数を検べる。

S-9 Mix の調整：PCB を投与したラットの肝 9,000×g 上清を S-9 として用いた²⁾。S-9 Mix 0.5 ml は 50 μ moles リン酸ナトリウム (pH 7.4), 4 μ moles 塩化マグネシウム, 16.5 μ moles 塩化カリ, 2.5 μ moles ATP 及び glucose-6-phosphate, 2 μ moles NADH 及び NADPH, 0.15 ml の S-9 分画を含む。

結果及び考察

突然変異原性の結果を、癌原性の報告と共に Table 1 に示す。

Aflatoxins についてはこれまでに報告があるが^{1,3)} それらと良く一致し、突然変異性の発現には S-9 Mix を必要とする。Aflatoxin B₁ が最も強い突然変異性を示し、G₁ がこれに次ぐ。Dihydro 体である B₂, G₂ は突然変異原性の発現には高濃度を必要とする。B₂ は 50 μ g/plate で 2,000個のヒスチジン非要求性コロニーが得られる。これは一般の化学発癌物質の突然変異原性と比較すると、かなり活性の高い部類に属するものである。

Aflatoxin B₁ の構造の一部に相当するモノフラン環とクマリン環を有する bergapten, sphondin (植物由来) は弱いながら活性を示す。この様に、微生物による突然変異テストは、ある化合物の活性基を調べるのにも適した方法である。

Sterigmatocystin は S-9 Mix 存在下で強い突然変異原性がみとめられるが (1000 個/ μ g), 非存在下でもかなり高い突然変異コロニーがみとめられる (500 個/10 μ g)。

Sterigmatocystin の合成誘導体である O-acetylsterigmatocystin, O-methylsterigmatocystin も S-9 Mix

*¹ 国立がんセンター研究所(東京都中央区築地5-1-1)
National Cancer Center Research Institute (5-1-1,
Tukiji, Chuo-ku, Tokyo)

*² 鳥取大学農学部(鳥取市湖山町)
Faculty of Agriculture, Tottori University (Kozan-
machi, Totori)

*³ 国立衛生試験所(東京都世田谷区上用賀1)
National Institute of Hygienic Sciences (1-18-1,
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo)

*⁴ 東京理科大学(東京都新宿区市ヶ谷船河原12)
Tokyo University of Science (12-Funakawara,
Ichi-gaya, Shinjuku-ku, Tokyo)

*⁵ 千葉大学生物活性研究所(習志野市泉町)
Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba
University (Izumi-machi, Narashino, Chiba)

存在下で強い突然変異性が認められる。これらの dihydro 誘導体の突然変異性は, parental compound と比較して弱い。また, versicolorin についても同様の結果を得た。すなわち dihydro 誘導体 versicolorin B

は versicolorin A よりも高い濃度で活性を示す。Bisdihydro-furan 環が活性と関係があることはこれまでの報告と一致する⁴⁾。Sterigmatocystin は bisfuranoid 環と xanthone 環からなるが, xanthone 環のみからな

Table 1. カビ生産物の微生物に対する突然変異原性

Compound	Mutagenicity		Carcinogenicity
	+S-9Mix	-S-9Mix	
Aflatoxin B ₁	+	—	+
B ₂	+	—	+
G ₁	+	—	+
G ₂	+	—	?
o-Acetylsterigmatocystin	+	—	+
L-Alanyl-2-(1,1-demethyl-allyl)-L-tryptophan anhydride	—	—	?
L-Alanyl-L-tryptophan anhydride	—	—	?
Averufin	—	—	?
Chaetoglobosin A	—	+	?
Citrinin	—	—	+
Cytochalasin B	—	—	?
Demethylsterigmatocystin	+	+	?
Diacetoxyscirpenol	—	—	?
6,8-Dimethylversicolorin A	+	—	?
6,8-Dimethylversicolorin B	+	—	?
Emerin	—	—	?
Emericellin	—	—	?
Fusarenon-X	—	+	?
Griseofulvin	—	—	+
Luteoskyrin	—	—	+
5-Methoxysterigmatocystin	+	+	?
Mycophenolic acid	—	—	?
Ochratoxin A	—	—	?
Parasiticolide A	—	—	?
Patulin	—	—	+
Penicillic acid	—	—	+
PR-toxin	+	+	?
Rubratoxin B	—	—	?
Sterigmatin	+	+	?
Sterigmatocystin	+	+	+
Sydowinin B	—	—	?
Sydowinol	—	—	?
Sydowic acid	—	—	?
Terphenyllin	—	—	?
Versicolorin A	+	+	?
Versicolorin B	+	—	?
Xanthoascidin	—	—	?
Xanthocillin X	—	—	?

る sydownin B⁵⁾, sydownin⁵⁾, emericellin⁶⁾ にはいず
れも突然変異原性は認められなかった。

Chaetoglobosin A⁷⁾ は S-9 Mix 非存在下で陽性であ
ったが、類似構造を持つ cytochalasin B は陰性であ
った。これは chaetoglobosin A が epoxy 基を持つ為と
思われる。PR-toxin も epoxy 基を持つが、S-9Mix な
しで陽性であった。Fusarenon-X は S-9Mix 非存在
下で陽性であったが、同じ trichothecane 化合物
diacetoxyscirpenol は陰性であった。

癌原性の示されていて、突然変異性陰性であった
penicillic acid, patulin, luteoskyrin, citrinin については
更に微生物突然変異テスト方法の改良が必要と思われ
る。

Aflatoxins を御分与下さいました栗飯原氏に深謝致
します。

引用文献

- 1) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B. N.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 5135 (1975).
- 2) Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E.: Mutat. Res., **31**, 347 (1975).
- 3) Wong, J. J., Hsieh, D. P.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **73**, 2241 (1976).
- 4) 寺尾清: マイコトキシン, **1**, 6 (1975).
- 5) Hamasaki, T., Sato, Y., Hatsuda, Y.: Agr. Biol. Chem., **39**, 2341 (1975).
- 6) Ishida, M., Hamasaki, T., Hatsuda, Y.: Agr. Biol. Chem., **39**, 2181 (1975).
- 7) Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., Kuwano, H.: Tetrahedron Lett., 2109 (1973).

モルモットにおける Sterigmatocystin の感受性

馬淵 基樹・直江 史郎・袖本 幸男・柴田 和紀
増田 弘毅・宮田 慶子・榎本 真^{*1}

M. MABUCHI, S. NAOE, S. SODEMOTO, K. SHIBATA, H. MASUDA, K. MIYATA,
and M. ENOMOTO^{*1}: Sensitivity of sterigmatocystin in guinea pigs

肝癌をはじめそれに関連ある肝病変の発生要因およ
び病変像について、マイコトキシンに関心がもたれて
いる。今回我々はラット肝に発癌性を示す sterig-
matocystin をモルモットに投与し、急性及び亜急性の
障害を検索した。

動物: Hartley 系モルモット、雄、体重 340 g 前後、
投与方法: sterigmatocystin 16 及び 40 mg/kg を olive
oil に懸濁し腹腔内に投与後 24, 48 時間の所見につい
てアフラトキシン 1.4 mg/kg を比較、別に、100 及び
300 ppm を含む CG-3 飼料を 4 週間投与 (全量各々 80
及び 240 mg/匹)、2, 5, 8 及び、2, 5, 6 週の斃死例、
27 週の生検例について病理組織学的に検討した。

結果及び考察: 急性例では、アフラトキシン B₁ 投
与例に小葉中間帯壊死が観察された。ちなみに Butler

の実験成績 (溶媒, DMF) では中心性壊死が認めら
れている。

Sterigmatocystin 適用例では肝小葉に巣状の壊死が
散在し、胆管の増生傾向が認められた。また小葉内
には核分裂像も散見された。

亜急性例では 300 ppm 投与群の体重減少が目立っ
た。100 ppm 投与例では Disse 腔の開大によると考
えられる肝細胞索間の著明な拡張がみられた。また
Butler¹⁾ の所見と一致し、グ氏鞘域リンパ管の拡張が
著明であった。同様のリンパ管拡張は腸間膜リンパ節
洞、脾の髄索、副腎中のリンパ管にもみられ、心の間
質にも組織液のうっ帯が観察された。これらは斃列例
に特に目立ち死直前期においては体液循環系に特有の
病態を示すと考えられる。さらに 300 ppm 適用例で
は小葉内に肝細胞の壊死像も散見されたが、5 週後で
は胆管増生及び肝細胞索の乱れを伴った。Paget²⁾ は
モルモットに観察される同様の变化を “exudative
hepatitis” と名付けおそらく食餌性因子によると指摘

^{*1} 聖マリアンナ医大第 2 病理、同大学病院中検病理
(〒213 川崎市高津区菅生 2095)
Department of Pathology, St. Marianna University
(Sugao, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213)

した。

27週後、300 ppm 例に肝細胞の一種の dysplasia と考えられる核の多形性を伴う “Megalocytes” の出現を認めた。われわれは diethylnitrosamine 投与により肝細胞癌を発生したモルモットの中間病像中にも同様の变化を認めたが³⁾、Uganda におけるヒト肝癌の前癌病変として Anthony⁴⁾ の指摘している所見に似ている点は興味深い。

要約：モルモットにおける sterigmatocystin の急性、亜急性病変は肝細胞壊死の分布程度、脈管系の障害像

などの点で aflatoxin B₁ によるものとやや異なる点を指摘した。また半年間の適用例に前癌病変と考えられる肝細胞の “Dysplasia” を認めたことは注目される。

引用文献

- 1) Butler, W. H.: Br. J. Can., **17**, 699 (1963).
- 2) Paget, G. E.: J. Path. Bact., **67**, 393 (1954).
- 3) 高橋惇, 大森義仁, 馬淵基樹, 袖本幸男, 榎本真:
J. Toxicol. Sci., **1**, 108 (1976).
- 4) Anthony, P. P.: J. Path., **110**, 37 (1973).