イラク土壌より分離された糸状菌の毒性検索および マイコトキシン生産性

前林 行雄*¹, 堀江 義一*¹, 山崎 幹夫*¹

Y. MAEBAYASHI*¹, Y. HORIE*¹, M. YAMAZAKI*¹: Productivity of
some mycotoxins in fungi isolated from Iraqi soil

Summary

From the 20 soil samples collected at date-plantation in Iraq, 56 molds were isolated. The fungal species were *Aspergillus flavus*, *A. caespitosus*, *A. fumigatus*, *Emericella nidulans*, *E. varicolor*, *E. acristata*, *Chaetomium* spp., and the other Ascomycetes and Deuteromycetes. The lethal toxicity of ethyl acetate extracts of the moldy rice was examined by intraperitoneal injection to mice. Many of the molds were found to be toxigenic. By TLC analysis, the productivity of aflatoxin, sterigmatocystin, asteltoxin, verruculogen and fumitremorgin was confirmed on some of the isolates. A new toxic metabolite, tentatively designated as EQ-1, was isolated from *Emericella quadrilineata* strain No. 83-Ir-4-7.

著者らは、これまでに主として食品を汚染する有害糸状菌を探索し、それらより毒性代謝産物を単離してその化学構造を明らかにしてきた^{1)~3)}。近年、食品、飼料などのマイコトキシン汚染に関連して、とくに土壌中のマイコトキシン生産菌の存在が注目され、ピーナッツのアフラトキシン汚染とピーナッツ畑の土壌中のアフラトキシン生産菌との生態的研究が報告されている⁴⁾。著者らも日本国内土壌における *Aspergillus fumigatus* の分布調査およびその fumitremorgin 類の生産性について報告した⁵⁾。

今回は、イラクのデーツ（棗椰子）畑の土壌を入手する機会を得たので糸状菌を分離して、そのマイコキシンの生産性およびマウスに対する致死毒性について検索した。その結果につき報告する。

材料および方法

土壌菌の分離：イラクのバスラ市郊外のデーツ（棗椰子）畑より採取した土壌サンプルからジャガイモ・ニンジン寒天、オートミル寒天、ジャガイモ・ブドウ糖寒天培地を用いた soil plate 法にて糸状菌を分離し

た。

培養・抽出：各々の菌株をルーフラスコに入れた精白米培地に接種し、25°C で約3週間 静置培養した。接種5日後、各々のフラスコに30 ml の滅菌蒸留水を注入した。カビ米を酢酸エチルで抽出、減圧濃縮してエキスを作成した。

マイコトキシンの検索：各々の抽出エキスを TLC プレート（メルク・プレコート・シリカゲル 60）に既知マイコトキシン標品とともに展開し UV ランプ下の蛍光または 10% 硫酸を噴霧し加熱、その呈色で判定した。

毒性試験：毒性試験は5週齢の ddY 系雄マウス（体重 23~27 g）を使用した。サンプルはプロピレングリコールに溶かし、500 mg/kg 腹腔内投与した。

結果および考察

イラクの土壌 20 試料より分離した 56 株を米に培養、その抽出エキスのマイコトキシンと毒性検索の結果を Table 1, 2 に示した。

Emericella 属の菌が比較的強い毒性を示した。なかでも *E. varicolor* のエキ스가投与後数分でマウスを死亡させる強い毒性を示し、TLC 検索で asteltoxin の生産が認められた。また、*E. quadrilineata* の全株に毒性が認められ、83-Ir-4-7 株の培養抽出エ

* 千葉大学生物活性研究所（〒280 千葉市 亥鼻 1-8-1）

Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba University (Inohana 1-8-1, Chiba 280)

Table 1. Productivity of some mycotoxins in fungi isolated from Iraqi soil

Species	Strains	died/used*	Mycotoxins
<i>Emericella nidulans</i>	83-Ir-1-2	1/5	
	83-Ir-3-1	4/5	sterigmatocystin
	83-Ir-3-2	4/5	
	83-Ir-3-3	3/5	
	83-Ir-4-13	5/5	sterigmatocystin
	83-Ir-5-8	2/5	
	83-Ir-5-10	4/5	
	83-Ir-5-13	5/5	
	83-Ir-7-3	5/5	
	83-Ir-7-5	3/5	sterigmatocystin
<i>E. quadrilineata</i>	83-Ir-10-1	5/5	EQ-1
	83-Ir-4-7	5/5	EQ-1
	83-Ir-4-9	4/5	EQ-1
	83-Ir-4-10	4/5	EQ-1
	83-Ir-4-11	5/5	EQ-1
	83-Ir-4-14	2/5	EQ-1
	83-Ir-8-2	3/5	EQ-1
	83-Ir-8-5	4/5	EQ-1
<i>E. varicolor</i>	83-Ir-10-2	5/5	asteltoxin
<i>E. acristata</i>	83-Ir-7-2	5/5	
<i>E. rugulosa</i>	83-Ir-4-8	1/5	
<i>Aspergillus flavus</i>	83-Ir-6-1	—	aflatoxins B ₁ , B ₂
	83-Ir-5-4	—	aflatoxins B ₁ , B ₂
<i>A. caespitosus</i>	83-Ir-4-4	4/5	verruculogen, fumitremorgin B
	83-Ir-4-5	0/5	"
<i>A. fumigatus</i>	83-Ir-3-4	5/5	verruculogen, fumitremorgin B
	83-Ir-5-12	1/5	"
	83-Ir-9-1	—	"
	83-Ir-3-5	—	"
	83-Ir-7-4	—	"

* 500 mg/kg, intraperitoneal administration

Table 2. Lethal toxicity of AcOEt extracts to mice

Species	Strains	died/used*	Species	Strains	died/used*
<i>Chaetomium gracile</i>	83-Ir-4-12	1/3	<i>Podospora</i> sp.	83-Ir-6-3	2/3
<i>C. megalocarpum</i>	83-Ir-5-2	3/3	<i>Ascodesmis</i> sp.	83-Ir-9-5	3/3
	83-Ir-5-4	3/3	<i>Gymnoascus</i> sp.	83-Ir-sheep	2/3
<i>C. murorum</i>	83-Ir-5-1	—	<i>Microascus</i> sp.	83-Ir-6-4	3/3
<i>Chaetomium</i> sp.	83-Ir-5-15	3/3	<i>Thermoascus</i> sp.	83-Ir-2	5/5
	83-Ir-2-2	1/3	<i>Melanocarpus albomyces</i>	83-Ir-37°C	3/3
	83-Ir-37°C	—			
	83-Ir-D-1	—	<i>Lasioboloidium orbiculoides</i>	83-Ir-7-8	2/3
<i>Corynascus sepedonium</i>	83-Ir-5-6	2/2			
	83-Ir-1-1	3/3	<i>Khuskia oryzae</i>	83-Ir-2-3	2/3
	83-Ir-2-13	1/3	<i>Trichurus spiralis</i>	83-Ir-2-12	3/3
<i>Chaetomidium fumeti</i>	83-Ir-2-8	2/3	<i>T. dendrocephalus</i>	83-Ir-1-8	2/3
<i>Ascotricha bosei</i>	83-Ir-6-1	2/3		84-Ir-18-1	2/3
	83-Ir-5-14	1/3		84-Ir-18	1/3

* 500 mg/kg, intraperitoneal administration

Table 3. Physicochemical properties of EQ-1

colorless prisms, mp 243–245°C (dec.)

Tests for elements: N(+), S(+), halogen (–)

IR KBr cm^{-1} : 3420, 1728, 1683, 1608, 1515, 1273

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ nm(ϵ): 246 (12700), 261 (11300), 284.5 (6300)

Mass m/z : 534 (M^+), 516, 288, 271, 289, 152

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 δ_{H} : 7.90 (1H, d, $J=2.5$), 7.79 (1H, dd, $J_1=8.9$, $J_2=1.8$), 7.79 (1H, s), 7.07 (1H, dd, $J_1=7.0$, $J_2=2.4$), 7.05 (1H, d, $J=7.9$), 6.94 (1H, d, $J=7.9$), 6.91 (1H, d, $J=1.2$), 6.39 (1H, s), 6.34 (1H, dd, $J_1=8.6$, $J_2=2.4$), 5.70 (1H, dd, $J_1=7.3$, $J_2=2.4$), 5.52 (1H, d, $J=1.2$), 5.42 (1H, d, $J=12.2$), 4.99 (1H, s), 4.96–4.88 (2H), 4.85 (1H, d, $J=13.2$), 4.01 (3H, s), 3.42 (3H, s)

Fig. 1. Isolation of toxic metabolites from *E. quadrilineata* strain No. 83-Ir-4-7

*1 Wako gel C-200, 500 g

*2 250 mg/kg, i. p.

*3 Kieselgel F₂₅₄ type 60, hexane-acetone (1:1)

*4 100 mg/kg, i. p.

キスから Fig. 1 のようにカラムクロマト preparative TLC によって EQ-1 と仮称する毒性物質を単離した。EQ-1 の物理化学的性質を Table 3 に示す。EQ-1 は N, S を含みその化学構造について検討中であるが, NMR スペクトルデータなどから複雑な構造が予想されている。

TLC 検索の結果, 2 株の *Aspergillus flavus* に aflatoxins B₁, B₂, *A. caespitosus*, *A. fumigatus* 全株に verruculogen, fumitremorgin B の生産が認められた。他に今までに成分研究が報告されていない

Corynascus sepedonium, *Microascus* sp., *Thermoascus* sp., *Melanocarpus albomyces*, *Trichurus spiralis*, *T. dendrocephalus* などに毒性が認められた。

イラクの土壌より分離した菌は今まで検索を行なった国内の土壌菌と比較して毒性株の出現頻度は明らかに高く, また TLC 検索で aflatoxin をはじめ sterigmatocystin, asteltoxin, fumitremorgin など種々のマイコトキシンの生産性が高頻度にみられた。さらに今まで比較的強い毒性を示した菌のなかには化学的研究の行なわれていないものが含まれており, 今後新しいマイコトキシンの分離が推測される。

謝 辞

土壌試料を提供して下さったイラク・バスラ大学の S.K. Abdullah 博士, 分離菌の一部について同定いただいた国立衛生試験所真菌室長 宇田川俊一博士に感謝致します。

引用文献

- 1) Yamazaki, M., Fujimoto, H., Kawasaki, T.: Chem. Pharm. Bull., **28**, 245 (1980).
- 2) Yamazaki, M., Okuyama, E., Kobayashi, M., Inoue, H.: Tetrahedron Lett., **22**, 135 (1981).
- 3) Yamazaki, M., Maebayashi, Y.: Chem. Pharm. Bull., **30**, 514 (1982).
- 4) Joffe, A. Z.: Mycologia, **60**, 904 (1968).
- 5) Horie, Y., Yamazaki, M.: Trans. mycol. Soc. Japan, **22**, 113 (1981).