Hay cube のカビ汚染ならびに *Aspergillus flavus* による aflatoxin 産生に対する阻害作用

高橋 孝則*, 尾上 洋一*, 森 實*

T. TAKAHASHI*, Y. ONOUE*, M. MORI*: Contamination by
molds and inhibitory effect of hay cube on aflatoxin
production by *Aspergillus flavus*

Summary

A survey was carried out to obtain data on the mycoflora and the occurrence of aflatoxigenic mold contamination of hay cube (cube-shaped alfalfa hay). As the mycoflora of 24 samples, *Eurotium* spp. (*Aspergillus glaucus*), *Scopulariopsis* spp., *Aspergillus flavus* and *A. versicolor* were predominant. *A. flavus* was isolated from 3 of 24 samples in colony counts per g from 1.0×10^4 to 1.0×10^7 , but aflatoxins (AF) could not be detected even on the sample which was contaminated with 1.0×10^7 cfu/g of *A. flavus*. Furthermore, inoculation test of aflatoxigenic *A. flavus* on hay cube medium or on glucose-added hay cube medium was found that growth of aflatoxigenic *A. flavus* was well without any accumulation of AF in the media. These findings were subsequently proven that addition of hay cube water extract (equivalent amounts of 2.50 g of hay cube) in 50 ml of yeast extract sucrose medium completely inhibited the AF production by aflatoxigenic *A. flavus* while this inhibitory effect was not pronounced on its mycelial growth. The pH of medium did not substantially influence the inhibitory action of hay cube.

Attempts to find similar inhibitory effect of hay cube water extract against ochratoxin A (OCT-A) production by *A. ochraceus*, sterigmatocystin (ST) production by *A. versicolor* and citrinin (CI) production by *Penicillium citrinum* were unsuccessful. Therefore, data reported here indicate that hay cube can support the production of OCT-A, ST and CI by these mycotoxigenic contaminants.

我々は、単味飼料のカビおよび aflatoxin (AF) 汚染について調査を行ってきた^{1)~4)}。今回、alfalfa (*Medicago sativa*) の乾草を角型に裁断成型した hay cube (HC) についてカビおよび AF 汚染調査を行ったところ、HC の 1 試料が AF 産生 *Aspergillus flavus* にひどく汚染されていたにもかかわらず、AF は検出されないという現象を観察した。そこで、他のマイコトキシン産生菌も加え、HC での生育とそれらのマイコトキシン産生についても阻害作用があるか、またこれらのマイコトキシンによる HC の汚染の可能性についても検討を加えたので報告する。

材料および方法

1. カビの検出、同定

調査した HC 24 試料からのカビの検出は、クロラムフェニコール (100 mg/l)-PDA 培地を用い

* 神奈川県衛生研究所 (〒241 横浜市旭区中尾町 52-2)
Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory (52-2, Nakao-cho, Asahi-ku, Yokohama 241)

た混積培養法により、同定は菌類図鑑⁵⁾によった。

2. マイコトキシン産生試験使用菌株

2-1 AF 産生菌

A. flavus HC-2-1 (AF B₁, B₂ 産生菌, HC より分離)

A. flavus 33-1 (AF B₁, B₂, G₁, G₂ 産生菌, トウガラシより分離)

A. flavus NRRL 3000 (AF B₁, B₂, G₁, G₂ 産生菌)

2-2 Ochratoxin A (OCT-A) 産生菌

A. ochraceus 14-4 (パン粉より分離)

2-3 Sterigmatocystin (ST) 産生菌

A. versicolor HC-20-4 (HC より分離)

A. versicolor M-5 (土管より分離)

2-4 Citrinin (CI) 産生菌

Penicillium citrinum 13-3 (国内産大麦より分離)

以上の菌株を使用し、マイコトキシン産生を比較検討した。

3. マイコトキシン産生試験に使用した培地

250 ml 容三角フラスコに、1) 精白米 30 g, 2) HC をはぐして切断したもの 10 g, 3) yeast extract (2%) に sucrose (20%) を加えた培地 (YES) 50 ml, 4) YES に hay cube water extract を加えた培地 (YES-HCE) 50 ml を、それぞれ個別に入れ、121°C で15分オートクレーブ滅菌して用いた。

HCE は、HC 100 g に 1,000 ml の精製水を加えてホモブレンダーを用いて10分間抽出し、ガラスフィルターで濾過後、濃縮して使用した。

4. マイコトキシン産生試験接種、培養

各菌株とも約 6×10^6 の分生子を基質別培養区分別に接種した。このとき、米培地には60%量、HC培地には100%量の精製水を添加した。

米培地、HC培地での培養は、一般に行なわれているように、*A. flavus* では5日間、*A. ochraceus* では14日間、*A. versicolor*, *P. citrinum* では20日間、27°C で、また、固まらないように朝夕振盪して行った。

YESならびにYES-HCEでの培養は、*A. flavus* では7日間、*A. ochraceus* では9日間、*A. versicolor*, *P. citrinum* では12日間、27°C で静置にて行った。

5. マイコトキシンの定量

固体培地からの抽出は、CIでは塩酸にて酸性にしてから、その他では、そのままクロロホルムで行った。液体培地からの抽出は、STでは菌体だけをとり出してクロロホルムで行い、その他では菌体を除いた培養液からクロロホルムにて2回抽出した。CIでは、このときも塩酸にて酸性にしてから抽出した。

各々のマイコトキシンは抽出後、AFは公定法⁶⁾、OCT-AはAOAC法(Barley)⁷⁾、STは武田⁸⁾の方法、CIはHald and Krogh⁹⁾の方法によって定量した。

6. 菌体重量の測定

菌体をよく水洗した後、アルミニウム製の容器にとり、105°Cにて8時間乾燥した後重量を測定し、菌体重量とした。なお、*A. versicolor* の培養物については、クロロホルムにてST抽出を行った後の菌体重量を測定した。

結果および考察

1. HC のカビ汚染調査

HC のマイコフローラは Table 1 に示したように *Eurotium* spp., *Scopulariopsis* spp. が出現頻度が最も高く、24 試料の 71% より分離された。次いで、*A. flavus*, *A. versicolor* も多く分離された。

A. flavus は 3 試料から分離され、最も汚染の著しいものでは、 1.0×10^7 /g 存在した。

Bonner and Fergus¹⁰⁾ は牧草類の silage が非常にカビ汚染をうけていること、*A. flavus* が比較的よく検出されることを報告しているが、もともと牧草類のカビ汚染は一般的のようである。

Lebars¹¹⁾ は lucerne (alfalfa) を含めた乾草で、*Eurotium* spp. (*A. glaucus*), *A. versicolor*, *Scopulariopsis* spp., *Wallemia* sp., *A. ochraceus* の分離頻度が高く、また、*A. flavus*, *Penicillium* spp. も分離されたと報告している。さらに、Lacey¹²⁾ は、まぐさ中に人畜に危害をおよぼす可能性のあるカビとして、*A. flavus*, *A. versicolor* がよく分離されると報告している。また、van Warmelo¹³⁾ は、lucerne hay について、その分離菌として、*A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *Penicillium* spp. がよく出現すると述べている。鶴田¹⁴⁾ は、アメリカ、カナダ産の alfalfa のペレットについてマイコフローラを調べ、*A. flavus* が高着生率を示していることを報告している。このように、alfalfa は乾草からペレットにいたるまでカビ汚染をうけており、特に、*A. flavus* の汚染をうけている。

我々の HC のカビ汚染成績は、*Eurotium* spp. (好乾性カビ), *Scopulariopsis* spp. が多いこと、*A. flavus*, *A. versicolor* がよく分離されることなどの点で、これら種々の報告での成績と一致した。

2. *A. flavus* による HC での AF 産生

Table 2 に示したように、高度に *A. flavus* 汚染をうけていた試料 No. 2 からの分離株より無作為に抽出した 5 株について AF 産生試験を行った結果、4 株が米培地において多量の AF を産生するにもかかわらず、直接試料からは AF は検出されなかった。

そこで、HC 培地に *A. flavus* HC-2-1 を接種培養した。その結果、菌は旺盛に生育したが、AF は検出されなかった。さらに、glucose を 10% 量添加した HC 培地でも、*A. flavus* HC-2-1,

Table 1. Occurrence of fungi in hay cube (24 samples)

Fungus	Percentage of samples detected
<i>Eurotium</i> spp.	71
<i>Scopulariopsis</i> spp.	71
<i>A. flavus</i>	13 (on 3 samples)*
<i>A. versicolor</i>	13
<i>Absidia</i> spp.	8
<i>Phoma</i> spp.	8
<i>Aspergillus niger</i>	4
<i>A. terreus</i>	4
<i>Mucor</i> sp.	4
<i>Penicillium</i> sp.	4
<i>Gliomastix</i> sp.	4
<i>Mycelia Sterilia</i>	29

* Samples No. 2, No. 3 and No. 4 were contaminated by 1.0×10^7 , 3.0×10^5 and 1.0×10^4 /g of *A. flavus*, respectively.

Table 2. Contamination of *Aspergillus flavus* in hay cube sample No. 2 and aflatoxin productivity of its aflatoxigenic strains

Sample	AF* ¹	Moisture content (%)	No. of molds* ² (/g)	No. of <i>A. flavus</i> (/g)	AF* ¹ production of strains selected at random ($\mu\text{g/g}$ of rice)
No. 2	ND* ³	20.1	2.1×10^7	1.0×10^7	<i>A. flavus</i> HC-2-1 B ₁ (725), B ₂
					<i>A. flavus</i> HC-2-2 B ₁ (583), B ₂
					<i>A. flavus</i> HC-2-3 B ₁ (400), B ₂
					<i>A. flavus</i> HC-2-4 B ₁ (333), B ₂
					<i>A. flavus</i> HC-2-5 Negative

*¹ Aflatoxin; *² *A. flavus*, *A. niger* and *A. terreus* were isolated; *³ Not detected.

Fig. 1. Effect of increasing concentration of water extract of hay cube on growth and aflatoxin production per unit growth per 50 ml of yeast extract (2%)-sucrose (20%) medium by *Aspergillus flavus* HC-2-1 and *A. flavus* 33-1 incubated at 27°C for 7 days

Aflatoxin per unit growth is expressed as a percentage of aflatoxin B₁ produced per mycelial dry weight in the extract-containing sample relative to the extract-free control. Amount of AF B₁ produced in YES (control) in tests 1, 2 and 3 was 525, 845 and 875 μg per g of mycelial dry weight respectively. Each point represents the average of three cultures.

A. flavus NRRL 3000 とも旺盛に生育するが、AF は産生しなかった。

これらのことより、HC 中には、AF 産生阻害物質が存在するものと考えられた。

3. YES における *A. flavus* の AF 産生に対する HCE の影響

A. flavus 2 菌株を用いて、YES における HCE 濃度が、菌の生育、AF 産生にどのように影響するかをみた。Fig. 1 に示したように、実験 1, 2, 3 で control である YES において菌体重量あたりの AF B₁ 産生量がそれぞれ 525, 845, 875 $\mu\text{g/g}$ であったものが、3 回の実験のいずれにおいても HCE 量が増すにつれて菌の生育は良くなるが、AF B₁ 産生量は急激に減少し、2.50 g 等量/50 ml で 100% 阻害された。

この阻害は、使用 2 菌株、すなわち、AF B₁, B₂ 産生株、AF B₁, B₂, G₁, G₂ 産生株いずれにおいても認められた。

また、HCE 量が 4 g 等量/50 ml を越えると AF 産生量は再び上昇する傾向が認められた。これは、多量の HCE 添加によって、糖、蛋白質、ミネラルなどが増加し、菌の生育、AF 産生に有利に働くようになるとの理由によるものと考えられた。

いずれにしても、HCE は *A. flavus* の生育は全く阻害せず、AF 産生のみを阻害することが明らかとなった。

これらの実験で、培地の pH は、実験 2 では 6.0 で一定で、実験 1, 3 では 6.10 から 6.65 ままで変動したが、この pH 範囲では、AF 産生量に全く影響しなかった。

種々の植物あるいは、これらに含有される物質による *A. flavus* あるいは *A. parasiticus* の AF 産生阻害については、methylxanthine¹⁵⁾, carrot root extract¹⁶⁾, carrot seed oil¹⁷⁾, onion extract¹⁸⁾, white potatoes¹⁹⁾, cinnamon^{20), 21)}, black and white pepper²²⁾ などについて報告されている。また、その他の化学物質の阻害についての報告も多い。しかしながら、これらの阻害のほとんどが、AF 産生菌の生育を阻害し、その結果として AF 産生が阻害されるものであって、菌の生育は阻害せずに、AF 産生のみを阻害するものについての報告は少ない。植物体成分については、carrot root extract¹⁶⁾ あるいは carrot seed extract の主成分であるところの terpinene および limonene¹⁷⁾ についての報告程度がみられるにすぎない。しかしながら、これに加えて種々の化学物質について 2, 3 の報告がされている。Lee ら²³⁾ によると barium が、Hsieh²⁴⁾ によると有機リン殺虫剤である dichlorvos が、あるいは Davis and Diener²⁵⁾ によると *p*-aminobenzoic acid, potassium sulfite, potassium fluoride が同様に、AF 阻害効果は示すが、菌の生育には影響を与えないとされている。

種々の植物体からの抽出物の AF 産生 100% 阻害の最少等量についてみると次のようである。すなわち、Batt¹⁷⁾ は carrot root からのクロロホルム抽出物は 100 g 等量/25 ml で 99% 以上の AF 産生阻害を示すと報告している。Swaminathan¹⁹⁾ は、white potatoes からの酢酸エチル抽出物は 40 g 等量/50 ml で 100% 生育阻害、AF 産生阻害を示すと述べている。さらに、Bullerman²⁰⁾, Morozumi²¹⁾ による cinnamon のクロロホルム抽出物、アルコール抽出物あるいは摩砕 cinnamon の 100% 阻害最少等量より換算すると、cinnamon は 5~10 g 等量/50 ml で 100% の生育阻害および AF 産生阻害を示すことになる。

これらの報告での植物体からの抽出物に比べて、HC は、その水分含量が約 10% であることを差し引いても、2.50 g/50 ml とはるかに少量で、しかも水抽出物で、AF 産生を 100% 阻害するといえる。

4. YES-HCE における *A. flavus* の AF 産生阻害に対する pH の影響

HCE の AF 産生阻害が pH に影響されるかどうかをみた。Fig. 2 に示したように、各々の pH において、*A. flavus* の生育は YES-HCE の方が control である YES よりも良好であった。pH 3.0~8.0 までの YES-HCE で 50 ml あたりに生育した菌体重量あたりの AF B₁ 量は、それぞれの pH での control である YES の、それぞれ 3, 4, 9, 8, 2, 1% であった。

この実験では、pH 5.0 ならびに 6.0 での AF B₁ 産生率がやや高くなっているが、Fig. 1 の実験において pH 6 付近で 2.50 g 等量/50 ml で 100% 阻害したことを考え合わせると、pH 3.0~8.0 の範囲では、AF 産生はほぼ変わらず、HCE の AF 産生阻害は pH に依存しないといえた。これは、carrot root extract¹⁶⁾ の阻害が pH 依存性で、pH 3.5~4.0 では 100% 阻害するものが、4.5 では 80% 以下、5.0 では 30% 以下になることと比較して大きな違いであった。

5. YES における *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *P. citrinum* によるマイコトキシン産生に対する HCE の影響

Fig. 2. Effect of initial pH level of yeast extract (2%)-sucrose (20%) medium containing water extract from 4.33 g equivalent hay cube per 50 ml on growth and aflatoxin production per unit growth by *Aspergillus flavus* 33-1 incubated at 27°C for 7 days

Aflatoxin per unit growth is expressed as a percentage of aflatoxin B₁ per mycelial dry weight in the extract-containing sample relative to the control at each initial pH tested. Each point represents the average of three cultures.

Table 3. Mycotoxin production by *Aspergillus ochraceus*, *A. versicolor* and *Penicillium citrinum* in YES and YES-HCE

Strain	Mycotoxin production* ³ (μg/50 ml)					
	YES* ¹			YES-HCE* ²		
	OCT-A* ⁴	ST* ⁵	CI* ⁶	OCT-A	ST	CI
<i>A. ochraceus</i> 14-4	5,560			22,200		
<i>A. versicolor</i> HC-20-4		50.8			65.8	
<i>A. versicolor</i> M-5		107.0			60.0	
<i>P. citrinum</i> 13-3			41.0			43.3

*¹ Yeast extract (2%)-sucrose (20%) medium, pH 6.1; *² YES added hay cube extract equivalent to 4.33 g per 50 ml, pH 6.1; *³ Each value is the average of three cultures; *⁴ Ochratoxin A; *⁵ Sterigmatocystin; *⁶ Citrinin.

HC からマイコトキシン産生菌として, *A. flavus* と同様に, *A. versicolor* も分離された. 他方, Lebars¹¹⁾, van Warmelo¹³⁾ によると, lucerne から, これらのカビの他に *A. ochraceus*, *Penicillium* spp. がよく分離されるという. そこで, 汚染の機会が多いということを考慮して, HCE がこれらのカビのマイコトキシン産生に対して阻害作用があるかを, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *P. citrinum* を用いて検討した.

その結果, Table 3 に示したように, *A. ochraceus* 14-4 は, YES-HCE での方が良く生育し, YES に比べて4倍もの OCT-A を産生した. このように, HCE は OCT-A 産生に対して大きな増強効果を示した.

宮木ら²⁶⁾ は, 1%-L-phenylalanine の添加によって OCT-A 産生が増強され, L-phenylalanine が OCT-A の生合成に関与していると報告しているが, HCE による増強効果は, 単に培地中の炭

Table 4. Mycotoxin production by *Aspergillus ochraceus*, *A. versicolor* and *Penicillium citrinum* on rice and hay cube

Strain	Mycotoxin production ($\mu\text{g/g}$)					
	Rice			Hay cube		
	OCT-A ^{*1}	ST ^{*2}	CI ^{*3}	OCT-A	ST	CI
<i>A. ochraceus</i> 14-4	2,000			2.25		
<i>A. versicolor</i> HC-20-4		9.78			Trace	
<i>P. citrinum</i> 13-3			700			0.30

^{*1} Ochratoxin A; ^{*2} Sterigmatocystin; ^{*3} Citrinin.

素源、窒素源、ミネラルなどの総体的な増加よりも、L-phenylalanine 含量が増加していることに起因するのかも知れない。

これに対して、*A. versicolor* HC-20-4 では YES-HCE で ST 産生量がやや増えるが、*A. versicolor* M-5 では逆に減少した。このことから、*A. versicolor* は HCE によって ST 産生に顕著な影響はうけず、また、生育にも影響を受けないことが明らかとなった。

さらに、*P. citrinum* 13-3 では生育、CI 産生とも、HCE 添加による影響は認められなかった。

このように、HCE は AF 産生にのみ阻害効果を示すのに対し、他の OCT-A, ST, CI などのマイコトキシン産生阻害を全く示さないことが明らかとなった。

6. *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *P. citrinum* の HC 培地でのマイコトキシン産生

A. ochraceus, *A. versicolor*, *P. citrinum* が、はたして HC に生育し、マイコトキシンを産生するか否かを知るため、これらを HC 培地に接種培養し、それぞれのマイコトキシン産生をみた。

Table 4 に示したように、*A. ochraceus* 14-4 は、HC 培地で $2.25 \mu\text{g/g}$ と米培地での産生量の 0.1% 量の OCT-A を産生した。

A. versicolor HC-20-4 は痕跡程度の ST を、さらに、*P. citrinum* 13-3 は $0.30 \mu\text{g/g}$ と米培地での産生量の 0.04% の CI を産生した。

このように、HC は、*A. ochraceus*, *A. versicolor*, *P. citrinum* の OCT-A, ST, CI の産生基質になりうることが明らかとなった。また、米培地に比べ、HC 上での OCT-A, ST, CI の産生量は、著しく低いこともわかった。

ま と め

1. HC の汚染菌として、*Eurotium* spp., *Scopulariopsis* spp. のほか、*A. flavus*, *A. versicolor* の検出頻度が高かった。

試料の中には g あたり約 10^7 と高度に *A. flavus* に汚染されているにもかかわらず、AF が検出されないという 1 試料が認められた。

2. AF 産生 *A. flavus* を HC 培地あるいは glucose 添加 HC 培地に接種培養したところ、良く生育するが、AF 産生は認められなかった。HC には AF 産生阻害作用のあることがわかった。

3. AF B₁, B₂ 産生 *A. flavus*, AF B₁, B₂, G₁, G₂ 産生 *A. flavus* いずれにおいても、HCE は 2.50 g 等量/50 ml・YES で、生育は阻害せずに、AF 産生のみを 100% 阻害することが明らかとなった。この阻害は pH に依存するものではなかった。

4. HCE は *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *P. citrinum* の OCT-A, ST, CI 産生を全く阻害せず, また, HC はこれらマイコトキシンの産生基質となりうるということがわかったが, 米培地に比べて, この HC 上での産生量は著しく少なかった。

引用文献

- 1) 森 實, 高橋孝則, 尾上洋一, 高橋武夫: 日獣会誌, **30**, 19 (1977).
- 2) 森 實, 高橋孝則, 尾上洋一, 高橋武夫: 日獣会誌, **30**, 84 (1977).
- 3) 森 實, 高橋孝則, 尾上洋一: “昭和52年度厚生省食品衛生調査研究費による「カビおよびカビ毒に関する研究」年次報告 昭和53年3月” p. 21 (1978).
- 4) 森 實, 高橋孝則, 尾上洋一: “昭和53年度厚生省食品衛生調査研究費による天然有害物質研究 年次報告「カビおよびカビ毒に関する研究」, 「各種食品に存在する青酸化合物に関する調査研究」. 昭和54年3月” p. 13 (1979).
- 5) 宇田川俊一, 椿 啓介, 堀江義一, 三浦宏一郎, 箕浦久兵衛, 山崎幹夫, 横山竜夫, 渡辺昌平: “菌類図鑑(上, 下)” (1978), 講談社.
- 6) 厚生省環境衛生局監修: “食品衛生検査指針 I 検査法別” p. 198 (1973), 日本食品衛生協会.
- 7) Horwitz, W. (Editor): “Official Methods of Analysis of the Assoc. Off. Anal. Chem., 13th edition” p. 428 (1980), Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- 8) 武田由比子, 五十畑悦子, 天野立爾, 田辺弘也, 倉田 浩: 食衛誌, **15**, 363 (1974).
- 9) Hald, B., Krogh, P.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **56**, 1440 (1973).
- 10) Bonner, R.D., Fergus, C.L.: Mycologia, **51**, 855 (1959).
- 11) Lebars, J.: Rev. Mycol., **40**, 347 (1976).
- 12) Lacey, J.: Trans. Br. mycol. Soc., **65**, 171 (1975).
- 13) Van Warmelo, K.T.: Onderstepoort J. Vet. Res., **34**, 439 (1967).
- 14) 鶴田 理: “飼料用穀類等の備蓄に関する研究” p. 13 (1980), 農林水産省技術会議事務局.
- 15) Buchanan, R.L., Fletcher, A.M.: J. Food Sci., **43**, 654 (1978).
- 16) Batt, C., Solberg, M., Ceponis, M.: J. Food Sci., **45**, 1210 (1980).
- 17) Batt, C., Solberg, M., Ceponis, M.: J. Food Sci., **48**, 762 (1983).
- 18) Sharma, A., Tewari, G.M., Shrikhande, A.J., Padwal-Desai, S.R., Bandyopadhyay, C.: J. Food Sci., **44**, 1545 (1979).
- 19) Swaminathan, B., Koehler, P.E.: J. Food Sci., **41**, 313 (1976).
- 20) Bullerman, L.B.: J. Food Sci., **39**, 1163 (1974).
- 21) Morozumi, S.: Appl. Environment. Microbiol., **36**, 577 (1978).
- 22) Madhyastha, M.S., Bhat, R.V.: Appl. Environment. Microbiol., **48**, 376 (1984).
- 23) Lee, H.G.H., Townsley, P.M., Walden, C.C.: J. Food Sci., **31**, 432 (1966).
- 24) Hsieh, D.P.H.: J. Agr. Food Chem., **21**, 468 (1973).
- 25) Davis, N.D., Diener, U.L.: Appl. Environment. Microbiol., **15**, 1517 (1967).
- 26) 宮木高明, 前林行雄, 山崎幹夫: 千葉大学腐敗研究所報告, **23**, 41 (1970).