報 文

貯蔵トウモロコシにおけるアリルイソチオシアネート蒸気暴露による
アフラトキシン蓄積制御と貯蔵性菌類の増殖への影響

(平成26年7月4日受理)

岡野清志^{1,*} 小瀬彩華¹ 高井光宏¹ 金子美佐緒¹ 西岡聖子¹ 大岡祐二¹
小田野正義¹ 関山泰司² 水上勇一² 中村信也^{1,3} 一戸正勝^{1,3}Inhibition of Aflatoxin Production and Fungal Growth
on Stored Corn by Allyl Isothiocyanate VaporKiyoshi OKANO^{1,*}, Ayaka OSE¹, Mitsuhiro TAKAI¹, Misao KANEKO¹, Chikako NISHIOKA¹,
Yuji OHZU¹, Masayoshi ODANO¹, Yasushi SEKIYAMA², Yuichi MIZUKAMI²,
Nobuya NAKAMURA^{1,3} and Masakatsu ICHINOE^{1,3}¹ Mycotoxin Research Association: 15 Daikoku Futo, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0054, Japan;² Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation: PALACE Building, 1-1 Marunouchi 1-chome,
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8251, Japan;³ Tokyo Kasei University: 1-18-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8602, Japan;

*Corresponding author

Studies were conducted to determine the effectiveness of allyl isothiocyanate (AIT) vapor treatment with a commercial mustard seed extract (Wasaouro®) in controlling aflatoxin-producing fungi on stored corn. The concentration of AIT in the closed container peaked at 54.6 ng/mL on the 14th day and remained at 21.8 ng/mL on the 42nd day. AIT inhibited visible growth of aflatoxigenic molds in unsterilized corn and in sterilized corn inoculated with various aflatoxigenic fungi. However, fungi such as *Aspergillus glaucus* group, *A. penicillioides* and *A. restrictus* were detected by means of culture methods.

(Received July 4, 2014)

Key words: アリルイソチオシアネート allyl isothiocyanate (AIT); アフラトキシン aflatoxin; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus parasiticus*; 貯蔵性菌類 storage fungi

緒 言

アリルイソチオシアネート (AIT) はワサビやカラシなどのアブラナ科植物に含まれる配糖体のシニグリンがミロシナーゼ酵素により加水分解され、生成する揮発性抗菌性物質である。既存添加物の「カラシ抽出物」は主成分としてAITを高濃度に含んでおり¹⁾、すでに製造用剤 (日持ち向上剤) として商品化されている²⁾。これらの商品は主に各種加工食品の微生物制御の目的で用いられている。

AIT蒸気による細菌、酵母、カビ類に対する抗菌性についてはInouyeら³⁾、Isshikiら⁴⁾、Sekiyaら⁵⁾により報告されている。カビ毒産生菌類である *Aspergillus flavus*,

Penicillium islandicum, *P. citrinum*, *Fusarium graminearum* などの菌類についても平板培養によるAITの最少発育阻止濃度 (MIC) は報告⁴⁾ されているが、実際の農産物を用いた系でのこれら菌類の発育抑制およびカビ毒生成の抑制効果についての報告はいまだ少ない。

われわれは、加工食品分野以外へのAIT製剤の応用の可能性について、カビ毒汚染の知られる農産物 (穀類、種実類、油糧種子、香辛料) へのAIT適用の基礎的検討の一環として、カビ毒の代表であるアフラトキシンを産生する *A. flavus*, *A. parasiticus* をトウモロコシ穀粒に接種後、常温密封条件下で保存し、経時的なAIT蒸気の濃度変化、接種菌の増殖とそれに伴うアフラトキシン (AFs) 蓄積の抑制、およびAITによる貯蔵性菌類への影響などの検討を行った。

実験方法

1. 被験農産物

フランスより輸入した2012年産イエローデントコーン

* 連絡先: mra-mycotoxin@yokohama.email.ne.jp

¹ 一般財団法人マイコトキシン検査協会: 〒230-0054 横浜市鶴見区大黒ふ頭15² 三菱化学フーズ株式会社: 〒100-8251 東京都千代田区丸の内1-1-1³ 東京家政大学: 〒173-8602 東京都板橋区加賀1-18-1

(non-GMO) をふるい選別した後に実体顕微鏡下で破損粒、変色粒などの不良品を除去し、健全粒のみを選んで試験用トウモロコシとした。試験用トウモロコシは *A. flavus* と *A. parasiticus* の汚染がないこと、また AFs 汚染がないことをあらかじめ確認した。このトウモロコシを 121℃ で 15 分間滅菌したもの（滅菌トウモロコシ）と滅菌しないトウモロコシ（非滅菌トウモロコシ）を試験に用いた。ちなみに供試したトウモロコシの水分活性 (A_w) は 0.83 であった。

2. 被験菌

2.1 供試 AF 産生菌株

接種菌として使用した *A. flavus* (C-1) および *A. parasiticus* (C-3) はアメリカ産トウモロコシ由来の菌株で、あらかじめ 2% 酵母エキス・15% シュウクロース液体培地に培養後、AF 産生能を有することを薄層クロマトグラフィーで確認した。

2.2 接種菌調製

ポテトデキストロース寒天斜面培地に供試菌を 1 週間、25℃ で培養した後、界面活性剤を添加した滅菌希釈液を約 5 mL 加え、滅菌綿棒にて菌体表面をこすり、分生子を遊離させた後に滅菌ガーゼでろ過し、胞子懸濁原液を作製した⁶⁾。胞子懸濁液は、適宜希釈してセルカウンター（ワンセル(株)製：広島市）にて 10^5 分生子/mL になるように調製した。

3. 試料調製および保存方法

3.1 試験容器

嫌気培養用のアネロパック角形ジャー（三菱ガス化学(株)）を密封容器として使用した。容器内の隔壁部分には相対湿度調整用の塩化バリウム飽和溶液（RH 90.1%）および AIT 蒸気の放出に用いる AIT 含有製剤（ワサオーロ® VS15 L- II 三菱化学フーズ(株)製）を収納した（AIT 適用）。また容器内の AIT 蒸気の濃度を経時的に測定するため、別途ガスタイトジョイント付き容器にて同一の調製を行った。同じ条件で AIT 含有製剤の入れない容器を対照とした。

3.2 被験菌接種方法

滅菌済群と非滅菌群のそれぞれから試料トウモロコシ 30 g ずつを 4 枚のガラスシャーレ（高さ 2.5 cm、外径 9.0 cm）に量り、2 枚には各供試菌懸濁液を 1 mL ずつ接種してよく混和した。対照として 1 枚に希釈液のみ 1 mL を加えよく混和し、残りの 1 枚は未接種とした。

トウモロコシを入れたシャーレはガラスぶたに代えてガス透過性を有するポリ塩化ビニル製⁷⁾ ラップで接種菌同士の汚染を防ぐためシャーレを覆った。これら調整後の容器は 25℃ に調整した恒温器に入れ最長 42 日間保存した。

3.3 試験容器の種類と数

今回の試験に供した密封容器の条件とシャーレの数については Table 1 に示したとおりである。すなわち、AIT 製剤入り接種試験容器（AIT 適用区）7、14、28、42 日の 4 個

Table 1. Experiments to determine aflatoxin production by allyl isothiocyanate-treated corn kernels

Group	Materials	Container number	Storage period (day)	Number of test petri dishes			
				Inoculate <i>A. parasiticus</i> (1 mL)	Inoculate <i>A. flavus</i> (1 mL)	Control kernels	
						Diluent only (1 mL)	Only corn
AIT	Sterilized corn	J01	7	1	1	1	1
		J02	14	1	1	1	1
		J03	28	1	1	1	1
		J04	42	1	1	1	1
	Non-sterilized corn	J05	7	1	1	1	1
		J06	14	1	1	1	1
		J07	28	1	1	1	1
		J08	42	1	1	1	1
Without AIT	Sterilized corn	J09	7	1	1	1	1
		J10	14	1	1	1	1
		J11	28	1	1	1	1
		J12	42	1	1	1	1
	Non-sterilized corn	J13	7	1	1	1	1
		J14	14	1	1	1	1
		J15	28	1	1	1	1
		J16	42	1	1	1	1
AIT monitoring	Air	J17*	3 hr, 1,7,14,28,42	0	0	0	0
	Non-sterilized corn	J18*	3 hr, 1,7,14,28,42	0	0	3	1
	Non-sterilized corn	J19*	3 hr, 1,7,14,28,42	1	1	1	1
Without AIT monitoring	Non-sterilized corn	J20*	3 hr, 1,7,14,28,42	0	0	0	4

* Collect gas *via* gas—tight joint from each container

とAIT製剤の適用なし接種試験容器（対照区）7, 14, 28, 42日の4個を減菌トウモロコシおよび非減菌トウモロコシ試験用の同数を試験用とした。またAIT蒸気濃度の変化を測定するためにAIT製剤のみを収納した容器1個, AIT製剤入り非減菌トウモロコシ入りガラスシャーレ（3枚に希釈液のみを各1 mL接種, 1枚を未接種）容器1個および非減菌トウモロコシ入りシャーレ（未接種4枚）容器1個の3種を試験用とした。

4. 容器内AIT蒸気濃度の測定

4.1 測定時期

非減菌トウモロコシのAIT適用区とAIT蒸気濃度測定の対照とした3種の容器内AIT蒸気濃度を試験初発日, 1, 7, 14, 28, 42日経過後についてそれぞれを測定した。

4.2 AIT蒸気濃度測定方法

4.2.1 標準液調製と容器内ガス濃度測定

標準品イソシアネートアリル（和光純薬工業（株）製特級）をn-ヘキサン（和光純薬工業（株）製特級）にて希釈して10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mLの濃度に調製した標準液の1 µLを各2点ずつGC-FIDに注入し, 各濃度のピーク面積を平均して検量線を作成した。AIT測定用容器のガスタイトジョイントからガスタイトシリンジを用い容器内のガス1 mLを各2点ずつ注入し, 各ピーク面積の平均をAITガス濃度とした。

4.2.2 装置

GC-FID: GC4000 (GL Sciences社製), カラム: HP-5MS (0.25 mm i. d. × 30 m, 膜厚0.25 µm, Agilent社製), カラム温度: 40°C (5 min) → 5°C/min → 85°C → 20°C/min → 200°C, 注入口温度: 200°C, 検出器温度: 200°C, 注入量: 標準液1 µL, ガス1 mL (スプリット比約1:19), カラムガス流量: 1.0 mL/min, キャリヤガス: ヘリウム

5. 目視によるカビの発育状況観察

各試験時期におけるトウモロコシ穀粒のカビ類の発育については, 菌数測定用の粉碎に先立って, ラップを装着したまま目視と実体顕微鏡下で穀粒表面の菌糸体の生育および*Aspergillus*類の胞子形成器官について観察した。

6. 菌数測定法

6.1 減菌トウモロコシにおける接種菌数測定

保存期間を経過したトウモロコシ30 gをOster Blenderにて粉碎し, その10 gを0.1%ペプトン水にて10倍段階希釈液を調製し, 各希釈液の0.5 mLを2枚のDRBC培地 (Oxoid社製) の平板表面に塗抹し25°C, 7日間培養して出現した接種菌の集落を計測し1 g当たりの菌数 (CFU) を測定した。

6.2 非減菌トウモロコシにおける接種菌数および自然着生菌数測定

保存期間を経過したトウモロコシを上記の6.1と同様に粉碎し, その10 gを量り, 希釈液を調製して各段階希釈液の0.5 mLをDRBC培地および好乾性菌類の選択培地であるDG18培地 (Oxoid社製) の平板培地に2枚ずつ表面塗抹した。ついで25°Cで7日間培養後, 接種菌およびA.

Fig. 1. Changes in concentration of allyl isothiocyanate (AIT) during storage

◆, AIT in jar (container) J17; ■, AIT+corn (with diluent) in container (J18); ▲, AIT+corn+inoculum mold in container (J19); ●, corn in container (J20)

glaucus 菌群, *A. penicillioides*, *A. restrictus*などの貯蔵性菌類を識別・菌数測定をし, 菌数は必要に応じて対数に換算した。

7. 蓄積AFsの測定

保管期間を経過し, 粉碎した試料の20 gについてAF通知分析法⁸⁾に準拠してAFB₁, B₂, G₁, G₂の各濃度を測定した。

結 果

1. 容器内AIT蒸気濃度の変化

容器内に入れたAIT製剤から保存中に放出したAIT蒸気濃度の変化について, 製剤のみを入れた (AIT適用) 容器, トウモロコシを入れた容器, AF産生菌を接種した容器のおおのにつき対照区と比較してFig. 1に示した。

使用したAIT製剤のワサオーロ®VS15 L- II は, AITを含浸させたセルロースビーズを分包した製剤でAIT蒸気の放出期間は約1か月に設計されている。

AIT濃度測定は, x軸を標準液濃度としy軸にそのピーク面積とした。回帰線は $y = 769x - 2841$ で相関係数は $r = 0.999$ であった。定量限界は2 ng/mLであった。AIT製剤のみを入れた場合の容器内AIT濃度は7日目の87.5 ng/mLをピークとし徐々に減少したが, 保存終了時の42日目でも45.4 ng/mLを維持していた。一方, トウモロコシを入れた容器内のAIT濃度はAIT製剤のみを入れた容器の約1/2程度となり, 14日目の49.2 ng/mLをピークとし徐々に減少した。カビ接種区では14日目の54.6 ng/mLをピークとし42日目で21.8 ng/mLまで減少した。容器を開けた直後はカラシ臭が僅かにあったがすぐに消え, トウモロコシへのカラシ臭の残存もなかった。

Table 2. Inhibition of aflatoxin formation and growth of inoculated *Aspergillus parasiticus* on sterilized corn by allyl isothiocyanate vapor

Storage period (day)	Container number	Condition	Visible growth of fungi	<i>A. parasiticus</i> growth CFU/g	Aflatoxin (ng/g)			
					B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Control			—	—	ND	ND	ND	ND
Initial			—	1.0×10^2	0.6	ND	0.3	0.1
7	J01	AIT	—	2.0×10^2	0.5	ND	0.2	ND
	J09	without AIT	+	9.0×10^2	4.3	0.2	22.6	1.3
14	J02	AIT	—	2.0×10^2	0.5	ND	0.2	0.1
	J10	without AIT	+	1.1×10^4	327	34.6	3,540	461
28	J03	AIT	—	—	0.6	ND	0.3	0.1
	J11	without AIT	+	2.7×10^6	2,120	434	32,400	867
42	J04	AIT	—	—	0.4	ND	0.1	ND
	J12	without AIT	+	2.8×10^5	1,450	148	23,400	8,470

Visible growth of inoculated fungi: — no growth, + growth, *A. parasiticus* —: less than 10^1 CFU/g; ND: Aflatoxin detection limit 0.1 ng/g

Table 3. Inhibition of aflatoxin formation and growth of inoculated *Aspergillus flavus* on sterilized corn by allyl isothiocyanate vapor

Storage period (day)	Container number	Condition	Visible growth of fungi	<i>A. flavus</i> growth CFU/g	Aflatoxin (ng/g)			
					B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Control			—	—	ND	ND	ND	ND
Initial			—	3.2×10^3	0.4	0.1	ND	ND
7	J01	AIT	—	1.0×10^2	0.4	ND	ND	ND
	J09	without AIT	+	4.0×10^3	0.3	ND	ND	ND
14	J02	AIT	—	—	0.3	ND	ND	ND
	J10	without AIT	+	2.6×10^5	386	34.7	ND	ND
28	J03	AIT	—	—	0.4	ND	ND	ND
	J11	without AIT	+	2.1×10^6	1110	185	ND	ND
42	J04	AIT	—	—	0.3	ND	ND	ND
	J12	without AIT	+	6.2×10^6	945	169	ND	ND

Visible growth of inoculated fungi: — no growth, + growth *A. flavus* —: less than 10^1 CFU/g; ND: Aflatoxin detection limit 0.1 ng/g

2. AF産生菌を接種した滅菌トウモロコシのカビ発育とAFs蓄積抑制効果

2.1 *A. parasiticus*接種試験

*A. parasiticus*菌株の分生子懸濁液を接種した滅菌トウモロコシについて、AIT適用区とAITを適用していない対照区における接種菌の発育およびAFsの蓄積に対するAITの影響を調べた結果をTable 2に示した。

この接種試験で用いた懸濁液1 mL中の分生子数は 3.6×10^5 個で、AFs濃度はB₁ 27.7 ng, B₂ 0.7 ng, G₁ 7.9 ng, G₂ 0.2 ngであった。

2.1.1 目視による菌糸等の発育

Table 2に示したように対照区では接種菌の菌糸体が7日目から見られ、14日目以降には豊富な胞子形成が見られた。これに伴い検出菌数も 10^3 から 10^5 CFU/gレベルに増加した。一方、AIT適用区では42日目まで菌体の発育は目視では見られず、14日目まで検出した菌数の 10^2 CFU/gは接種菌が残存したもので以降の発育は認めら

れなかった。

2.1.2 AFsの蓄積

対照区では7日目からの菌体の増殖とともにAFsの蓄積が認められ、14日目以降G₁の蓄積が増大した。42日目におけるAFsの減少は分解現象によるものと推定された。一方、AIT適用区ではAFsの増加は認められず、接種菌液由来とする1.0 ng/g未満の微量なAFsの検出が見られたにすぎなかった。

2.2 *A. flavus*接種試験

*A. flavus*菌株の分生子懸濁液を接種した滅菌トウモロコシについて、*A. parasiticus*と同様にAIT適用区と対照区での接種菌の発育およびAFs蓄積に対する影響を検討した結果をTable 3に示した。

接種試験で用いた懸濁液1 mL中の分生子数は 4.8×10^5 個で、AFs濃度はAFB₁ 18.3 ng, B₂ 0.7 ngであった。

2.2.1 目視による菌糸等の発育

対照区では7日目から菌の増殖が見られ、14日目以降に

Table 4. Inhibition of aflatoxin production and growth of inoculated fungi and naturally occurring fungi in corn by allyl isothiocyanate vapor

Inoculated fungi	Storage period (day)	AFs production		Visible growth		Inoculum CFU/g*		<i>Aspergillus glaucus</i> CFU/g*	
		Without AIT	AIT	Without AIT	AIT	Without AIT	AIT	Without AIT	AIT
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Initial	ND	ND	—	—	2.0×10^2	2.0×10^2	—	—
	7	ND	ND	+	—	—	2.0×10^2	—	6.8×10^3
	14	ND	ND	++	—	—	—	3.6×10^5	1.0×10^2
	28	ND	ND	++	—	—	—	2.1×10^5	4.8×10^3
	42	ND	ND	++	—	—	—	8.0×10^6	4.0×10^4
<i>Aspergillus flavus</i>	Initial	ND	ND	—	—	1.0×10^2	1.0×10^2	4.4×10^3	4.4×10^3
	7	ND	ND	+	—	—	1.2×10^3	2.0×10^3	1.2×10^3
	14	ND	ND	++	—	—	—	2.2×10^5	2.0×10^3
	28	ND	ND	++	—	—	—	6.8×10^4	9.5×10^4
	42	ND	ND	++	—	—	—	9.0×10^5	8.0×10^4

Without AIT, container number: 7 (J13), 14 (J14), 28 (J15), 42 (J16)

AIT, container number: 7 (J05), 14 (J06), 28 (J07), 42 (J08)

ND: AFs production, Total AFs detection limit 0.4 ng/g, Visible growth of fungi: — no growth, + limited growth, ++ growth

Inoculum CFU/g: AF producing fungi counts, — less than 10^1 CFU/g, *A. glaucus* CFU/g: — less than 10^1 CFU/g

* CFU/g detected in DRBC medium

は豊富な孢子形成が認められた。また、検出菌数も 10^5 から 10^6 CFU/g レベルに増加した。

一方、AIT 適用区では42日目まで発育は目視では認められず、菌数も7日目に検出した残存接種菌由来の 1.0×10^2 CFU/g 以降、増殖は認められなかった。

2.2.2 AFsの蓄積

対照区では7日目から菌体の増殖が始まり、14日目から AFB₁、B₂の蓄積が認められ *A. parasiticus* より遅れて増加したが、42日目にはAFsの減少が見られた。一方、AIT 適用区ではAFsの増加は認められず、接種菌液由来とする 0.5 ng/g 未満の微量なAFsの検出をみたのみであった。

3. 非滅菌トウモロコシにおける接種菌の発育抑制効果ならびに貯蔵性菌類に対する影響

農産物へのAIT製剤の利用を想定して行った予備試験で、貯蔵されたトウモロコシにAF産生菌を接種してAIT製剤を適用した場合に接種菌が発育せず、AFs蓄積の増加も認められなかったにもかかわらず一部の貯蔵性菌類が生残したことから、貯蔵時等における着生カビの増殖を想定してAIT製剤による接種菌および貯蔵性菌類の増殖抑制を検証する目的で以下の実験を行った。

3.1 非滅菌トウモロコシにおけるAF産生接種菌の発育とAF蓄積抑制効果および検出した貯蔵菌類に対する影響

非滅菌トウモロコシを用いAIT適用区と対照区の各保存期間におけるAF産生菌のAFs蓄積とカビ類の発育の影響を目視による発育の観察とDRBC培地と好乾性菌類選択培地のDG18培地を併用して培養試験を行った。

DRBC培地による菌数測定の結果をTable 4に示した。接種したAF産生菌の *A. parasiticus* の懸濁液 1 mL 中の分生子数は 2.2×10^5 個で、AFs濃度は AFB₁ 1.5 ng, B₂ 0.0 ng, G₁ 2.2 ng, G₂ 0.1 ng であった。*A. flavus* の懸濁液 1 mL 中

の分生子数は 1.2×10^5 個で、AFs濃度は AFB₁ 1.7 ng, B₂ 0.1 ng であった。

AIT適用区は、目視によるカビの発育は認められず、対照区のみ目視によるトウモロコシ表面にカビの増殖が認められた。発育したカビ集落は、形態観察と培養試験により貯蔵性菌類の *A. glaucus* 菌群であることを確認した。

一方、対照のAIT非適用区では実体顕微鏡による観察でトウモロコシ表面に *A. penicillioideis*, *A. restrictus* の特徴的な発育を認めた。

Table 4に示したように接種したAF産生菌は、対照区では7日以降の検出はなく、AIT適用区では14日以降の検出はなかった。AIT適用区のみならず対照区においても接種菌の発育は認められなかったことからAFsの蓄積もなく、接種菌を由来とする 0.4 ng/g 未満の微量なAFsの検出が見られたにすぎなかった。

培養試験で検出された *A. glaucus* 菌群は、AIT適用区では対照区と比べ菌数に若干の減少が認められた。

培養試験はDRBC培地とDG18培地とを併用して行ったが、DRBC培地では *A. glaucus* 菌群以外の貯蔵性菌類は検出できず、主にDG18培地で検出したのは好乾性貯蔵菌の、DRBC培地でも検出した *A. glaucus* 菌群と *A. penicillioideis* と *A. restrictus* であった。それぞれの菌数測定を行い、AIT蒸気による影響を接種菌ごとに時間経過による減少傾向を見るためにCFU/gを対数に変換してFig. 2およびFig. 3に示した。

DG18培地で検出した接種菌の菌数はAIT適用区、対照区ともにDRBC培地による結果と同様で *A. parasiticus* は7日目まで 10^2 CFU/g 検出し、*A. flavus* は14日まで 10^3 CFU/g を検出した以降、検出されなかった。

貯蔵性菌類の保存期間におけるAIT蒸気に対する影響は、接種菌の種類とはかわりなく同様の抑制効果を認め

Fig. 2. Growth of naturally occurring fungi in corn, with and without AIT in a closed container

(White symbols: AIT, Black symbols: without AIT) inoculum *Aspergillus parasiticus* Container number: ◇, □, △, ○ (J05, J06, J07, J08); ◆, ■, ▲, ● (J13, J14, J15, J16)
 ◆ Inoculum *A. parasiticus*
 ■ *A. glaucus*
 ▲ *A. penicillioideus*
 ● *A. restrictus*
 ◇ AIT inoculum *A. glaucus*
 □ AIT *A. glaucus*
 △ AIT *A. penicillioideus*
 ○ AIT *A. restrictus*

た。

DG18培地を用いて検出した *A. glaucus* 菌群の増殖の傾向は、DRBC培地を用いた場合と同様で、対照区の 10^6 CFU/gと比べてAIT適用区の 10^5 CFU/gは若干の減少を認めた。

A. penicillioideus は、対照区では 10^2 から 10^6 CFU/gまで増殖したが、AIT適用区では 10^2 から 10^4 CFU/gまでの菌数の検出にとどまり、対照区よりも明らかに減少を認めた。

一方、*A. restrictus* の対照区では 10^3 から 10^6 CFU/gまで増殖したがAIT適用区では初発菌のほか、*A. parasiticus* を接種した試験区において28日目に 10^3 CFU/g 検出した以外はほとんど検出されず、強い抑制効果が見られた。

考 察

1. トウモロコシへの吸着による容器内のAIT濃度の変化

Fig. 1に示した密封容器内のAIT濃度がトウモロコシを入れた状態で減少した現象については、Sekiyamaら²⁾、一色・徳岡⁹⁾がAIT蒸気下に食品を置くとその表面にAITが吸着することを認めており、トウモロコシを入れた容器内のAIT濃度がAITのみを入れた濃度の1/2程度の50 ng/mL前後であったことはトウモロコシの表面にAITの一部が吸着されたことが示唆された。

試験に供したAIT製剤は蒸気が1か月にわたり徐々に放出されるように設計された徐放性の製品であり、今回の試験系における容器内のAIT濃度の実測値と、Isschikiら⁴⁾が密封したガラスシャーレで平板培養をした供試菌として

Fig. 3. Growth of naturally occurring fungi in corn, with and without AIT in a closed container

(White symbols: AIT, Black symbols: without AIT) inoculum *Aspergillus flavus* Container number: ◇, □, △, ○ (J05, J06, J07, J08); ◆, ■, ▲, ● (J13, J14, J15, J16)
 ◆ Inoculum *A. flavus*
 ■ *A. glaucus*
 ▲ *A. penicillioideus*
 ● *A. restrictus*
 ◇ AIT inoculum *A. glaucus*
 □ AIT *A. glaucus*
 △ AIT *A. penicillioideus*
 ○ AIT *A. restrictus*

A. flavus 菌株を用いたAITの最少生育阻止濃度 (MIC) の37 ng/mL⁴⁾ と今回のトウモロコシを用いた試験と抑制濃度が近似しており同等の効果であったことを認めた。

2. 滅菌トウモロコシおよび非滅菌トウモロコシに接種したAF産生菌の発育抑制効果

代表的なAF産生菌である *A. parasiticus*, *A. flavus* を接種した滅菌トウモロコシおよび非滅菌トウモロコシにおける発育抑制は、滅菌トウモロコシのAIT適用区では表面に付着した分生子等がAITにより発育抑制されたが、非滅菌トウモロコシにおける対照区のAF産生菌の発育抑制は、貯蔵性菌類として着生している *A. glaucus* 菌群などの増殖による菌同士の競合からくる抑制と考えられ、またAIT適用区における接種菌の発育抑制は、AITによる抑制とAITに抵抗性を示す貯蔵性菌類との競合による抑制の両方が考えられた。

3. AITのトウモロコシに自然感染した貯蔵性菌類に対する増殖抑制

非滅菌トウモロコシから検出した貯蔵性菌類の *A. glaucus* 菌と *A. penicillioideus*, *A. restrictus* に対するAITの抑制効果は一定でなく菌の種類により差異があることが認められた。Tsurutaら¹⁰⁾、Fennellら¹¹⁾はトウモロコシ穀粒が健全粒であればカビの侵入を阻止する働きを自ら持つと報告している。すなわち、Tsurutaら¹⁰⁾はトウモロコシ穀粒の *Eurotium chevalieri* (*A. glaucus* 菌群) 等のカビの侵入経路は果皮と胚の間隙から入り、Tip cap (尖帽部) から侵入し表層部分のHilar layer (ハイラー層) を通過し

内部の胚芽に広がると報告している。それに対し同じ貯蔵性菌の *A. restrictus* の感染は異なり、Hilar layer で胚芽への侵入が阻止されると報告している。また、Fennell ら¹¹⁾ は *A. flavus* についてトウモロコシの Hilar layer と Tip cap との間隙に菌核を作るが胚の内部への侵入は阻止されたと報告している。一方、Takahashi ら¹²⁾ は *A. restrictus* について玄米粒への内部侵入について、菌糸は胚芽部と隣接するアリューロン細胞までは侵入するがデンプン胚乳までは侵入しないと報告している。

今回の試験結果から AIT による *A. restrictus* への強い増殖抑制はこの菌が内部に侵入しにくい表在性の菌であったために効果があったと考えられ、*A. glaucus* 菌群については内部に侵入しやすい性状のために AIT に抵抗したことが示唆された。

しかし、今回検出した *A. penicilliioides* についてはトウモロコシ穀粒への侵入について文献上の情報がなく、結果から *A. glaucus* 菌群と *A. restrictus* とは異なる増殖抑制が考えられた。

以上のことから貯蔵トウモロコシに対する AIT 蒸気による菌類の増殖抑制効果は、菌の種類により異なり、トウモロコシの主として内部まで存在している *A. glaucus* 菌群など内在性菌類 (internal fungi) に対しては抑制効果が弱く、*A. restrictus*, *A. penicilliioides* など主に表層部に存在している表在性菌類 (external fungi, surface fungi) については強い抑制効果が見られた。

Blanchard-Hanlin¹³⁾ はナッツ類のパカンに対してプロピレンオキサイドによるカビ等の増殖抑制効果に関し、内在性菌と表在性菌について効果に差異を認めている。

これまでの知見から、今回の一連の試験において接種菌として AF 産生菌を用いたが接種方法からみて、分生子等が表面に付着した状態であったことから AIT 蒸気の影響を強く受けたと考えられる。

ま と め

近年干ばつによる農産物の不作が増加しており、農産物の未成熟や昆虫等による加害を招いている。これらからカビおよびカビ毒汚染の原因となることが懸念されている。

本研究ではカビが増殖するのに十分な条件下で AIT 含有製剤がトウモロコシに自然感染したカビ毒産生菌を含む菌類の増殖を抑制することを明らかにした。

AIT 製剤の利用は設置方法を工夫することにより貯蔵農産物等を多くのカビの事故から守り、カビ毒による汚染など経済的損失を少なくすることが可能であると考えられる。

文 献

- 1) Uematsu, Y., Hirata, K., Suzuki, K., Iida, K., Ueda, T., Kamata, K. Determination of isothiocyanates and related compounds in mustard extract and horseradish extract used as natural food additives. Food Hyg. Soc. Jpn., **43**(1), 10–17 (2002).
- 2) 関山泰司, 揮発性抗菌物質 (AIT) による食品保存技術. Bokin Bobai., **38**(9), 617–625 (2010).
- 3) Inouye, S., Goi, H., Miyauchi, K., Muraki, S., Ogiwara, M., Iwanami, Y. Inhibitory effect of volatile constituents of plants on the proliferation of bacteria. J. Antibact. Antifung. Agents, **11**, 609–615 (1983).
- 4) Isshiki, K., Tokuoka, K., Mori, R., Chiba, S. Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. Biosci. Biotechnol. Biochem., **56**, 1476–1477 (1992).
- 5) Sekiyama, Y., Mizukami, Y., Takeda, A., Oosono, M., Nishimura, T. Effect of mustard extract vapor fungi and spore-forming bacteria. J. Antibact. Antifung. Agents, **24**, 171–178 (1996).
- 6) Johnsson, P., Lindblad, M., Thim, A. M., Jonsson, N., Vargas, E. A., Medeiros, N. L., Brabet, C., Quaresma, de Araujo, M., Olsen, M. Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. World Mycotoxin Journal, **1**(2), 127–137 (2008).
- 7) Sekiyama, Y., Mizukami, Y., Takeda, A. Corrosiveness of allyl isothiocyanate towards metals, rubbers and plastics and ability of allyl isothiocyanate vapor to permeate plastic films. J. Food Hyg. Soc. Jpn., **36**, 375–382 (1995).
- 8) 厚生労働省医薬品局食品安全部長通知「総アフラトキシンの試験法について」(食安発0816第2号平成23年8月16日付)
- 9) 一色賢司, 徳岡敬子, アリルイソチオシアネートによる食品の健全性確保. Jpn. J. Food Microbiol., **10**, 1–6 (1993).
- 10) Tsuruta, O., Gohara, S., Saito, M. Scanning electron microscopic observations of fungal invasion of corn kernels. Trans. mycol. Soc. Japan, **22**, 121–126 (1981).
- 11) Fennell, D. I., Bothast, R. J., Lillehoj, E. B., Peterson, R. E. Bright greenish-yellow fluorescence and associated fungi in white corn naturally contaminated with aflatoxin. Cereal Chem., **50**, 404–414 (1973).
- 12) Takahashi, H., Yazaki, H., Manabe, M., Matsuura, S. Scanning electron microscopic observation of invasion of brown and milled rice kernels with *Eurotium rubrum*, *Aspergillus restrictus* and *A. versicolor*. Trans. mycol. Soc. Japan, **28**, 43–48 (1987).
- 13) Blanchard, B. O., Hanlin, R. T. Effect of propylene oxide treatment on the microflora of Pecans. Appl. Microbiol., **26**, 768–772 (1973).