農家の自家製みそおよびしょう油に着生する 有害糸状菌の検索について

(昭和 45 年 6 月 9 日 受理)

山崎 幹夫* 堀江 義一* 藤本 治宏*
鈴木 重紀* 榊原 洋子* 宮木 高明*

On the Toxigenic Fungi Contaminating Home-made Miso and Soy Sauce.

Mikio YAMAZAKI*, Yoshikazu HORIE*, Haruhiro FUJIMOTO*,
Shigetoshi SUZUKI*, Yoko SAKAKIBARA* and Komei MIYAKI*

(*Department of Mycological Sciences, Institute of Food Microbiology,
Chiba University, 3-9-1, Izumi-cho, Narashino, Chiba)

The investigation on the toxigenic fungi contaminating home-made miso and soy sauce was carried out. A strongly toxic strain of *Aspergillus ochraceus* and two toxic strains of *Penicillium cyclopium* were found as a result of the investigation in which 46 samples of miso and 11 samples of soy sauce collected in Tohoku district were examined. The production of ochratoxin A in *Aspergillus ochraceus* was recognized by thin layer chromatography and the toxicity bioassay with chicken embryo and mouse.

(Received June 9, 1970)

緒 言

Aspergillus flavus によって産生される aflatoxin¹⁾の強い毒性および発癌性が発見されて以来、食品に着生する有害かびの問題が強く注目されるようになった。当然わが国の発酵工業生産物に対する調査研究も行なわれたが、現在まで、わが国の発酵食品に利用されるこうじ菌より aflatoxin が分離されたという報告はない²⁾。しかし最近、倉田ら³⁾は長野県佐久市付近で採取した自家製みそより、aflatoxin 産生能を有する *Aspergillus flavus* 1 株を分離したことを報告している。

今回、われわれは東北地方の農家において自家醸造されたみそ 46 検体、しょう油 11 検体を採集し、着生するカビの分布、および毒性を調べた結果、毒性の強い *Aspergillus ochraceus* 1 株を分離し、本株における ochratoxin A 産生能を確認したほか、マウスおよび鶏胚に対して毒性を有する *Penicillium cyclopium* 2 株を認めたので報告する。

実験材料および方法

1. 試料: 主として東北地方の農家に貯蔵された自家醸造みそおよびしょう油を 1969 年 6 月に採集し冷蔵

* 千葉大学腐敗研究所有害真菌研究部 習志市泉町 3-9-1.

醸 造 年	検 体 数	
	み そ	しょう油
昭和 34 年	3	2
35 年	0	0
36 年	6	2
37 年	1	1
38 年	5	0
39 年	4	4
40 年	3	0
41 年	13	1
42 年	8	0
43 年	0	0
44 年	3	1
合 計	46	11

保存したのち、1970 年 1~2 月に検査を実施した。

2. 菌の分離: みそ、しょう油ともに 10g を秤取り、0.02% 滅菌寒天溶液 40 ml 中にまぜ、ガラスビーズとともに振ってよく溶かす。その 1 ml をとり、さらに 0.05% 滅菌寒天溶液によって 10 倍に希釈した溶液の 1

ml をシャーレに流し, かたまりかけた下記組成の malt 加塩寒天培地 20 ml とまぜ, 25°で10日間培養を行なった。

Malt 加塩寒天培地
malt extr. 20.0 g
食 塩 75.0 g
寒 天 20.0 g
蒸留水 1000 ml

生育した菌集落からクロラムフェニコールを添加した potato dextrose agar 斜面培地に釣菌分離した。同定にあたっては, Czapek 寒天, 20% sucrose 添加 Czapek 寒天, malt extr. 寒天などを用い, Raper および Thom⁴⁾, Raper および Fennell⁵⁾ 等による 記載を参照した。

3. 分離菌の培養および抽出エキスの製作: 500 ml の Erlenmeyer フラスコに精白米 50 g 水 25 ml を入れ, 高圧滅菌 (120°, 20 分間) の後 malt 寒天斜面培地に前培養した菌を接種, 27°にて9日間時々振とうしながら静置培養した。培養終了後各フラスコにクロロホルム 250 ml ずつを加え, 振とうして抽出, 溶媒を酢酸エチルに変え, さらに 300 ml ずつ2~3回の振とう抽出を行ない, 抽出液を合わせ, 低温下溶媒を除去して抽出エキスを得た。

4. 毒性の検索: 抽出エキスをプロピレングリコール (PG) に溶解させ, 10 mg/0.1 ml PG のエキスがマウス一匹あたりに投与されるように濃度を調製, ddys 系雄マウス (5 週令, 平均体重 23 g) に腹腔内注射により投与した。毒性の判定は24, 48, 96時間および7日後の致死率および体重変化の観察によった。また高い致死率の得られた場合には剖検を実施した。

鶏胚による毒性検定にはエキスの投与量が 1000 µg/0.2 ml PG/egg になるように濃度を調製した試料液を受精5日後の卵黄のう内に注射し, 24, 48 時間後の致死率およびふ化率を観察した。

結 果

1. 菌分布: 全試料のうち, 菌着生の見られなかった試料はみそにはなく, しょう油に2例認められた。また yeast のみが分離され, ほかに菌を分離出来なかった試料はみそに19, しょう油に3例を数えた。発現菌種は少なく, *Aspergillus* 6種15株, *Penicillium* 4種17株, のほか *Candida* 2株, *Mucor* 1 株, *Cladosporium* 4 株, *Mycelia sterilia* 2 株, *Penicillium* と思われる未同定株1株を数えたに過ぎない。(Table 1)

2. 毒性: 分離された菌株のうち, とくに aflatoxin 産生の恐れのある *Asp. oryzae* および *Asp. flavus* のすべてと, 文献上マイコトキシン産生の可能性を有する菌株については精白米に培養した菌体の酢酸エチル抽出エキスを作製し, マウスおよび鶏胚に対する毒性を検討した (Table 2)。その結果, *Asp. oryzae*, *Asp. flavus*

Table 1. Population of *Aspergillus* and *Penicillium* in Home-made Miso and Soy Sauce.

Species	Miso	Soy Sauce	Total
<i>Aspergillus versicolor</i>	4	2	6
<i>oryzae</i>	3	1	4
<i>flavus</i>	1	0	1
<i>ochraceus</i>	0	1	1
<i>repens</i>	1	0	1
<i>umbrosus</i>	1	0	1
<i>penicilloides</i>	1	0	1
<i>Penicillium puberulum</i>	6	2	8
<i>cyclopium</i>	5	0	5
<i>viridicatum</i>	2	0	2
<i>janthinellum</i>	2	0	2

Table 2. Results in Toxicity Bioassay.

Species	No. of strain	No. of toxic strain*	
		to mice (ip)	to chicken embryos
<i>Asp. flavus</i>	4	0	0
<i>ochraceus</i>	1	1	1
<i>Pen. cyclopium</i>	3	2	2
<i>janthinellum</i>	1	0	0
<i>viridicatum</i>	1	0	0

* The toxic strains observed were defined as the strain which indicated mortality over 50% in 96 hours after dosage.

には毒性を有する例が見られなかった。しかし *Asp. ochraceus* はマウス, 鶏胚共に強い毒性を示し, マウスではエキス 10mg/0.1 ml PG/マウスの投与後12時間で供試マウスの全てを斃死させ, 鶏胚においても 1000 µg/egg 投与後 48 時間で 11/14, 96 時間で全卵の斃死を見た。この株からはつぎに述べる化学検索により ochratoxin A の産生が認められた。また *Pen. cyclopium* は貯蔵穀類に広く分布し, 成分としてラット, あひるひなに対して毒性を有する cyclopiazonic acid を産生することが報告されているが⁶⁾, 我々の検索においても検索3株のうち2株が, マウス, 鶏胚に対して毒性を示した。マウスにおける剖検では各例共に腹膜炎の症状が観察された。*Pen. janthinellum* と *Pen. viridicatum* については各1株を毒性検索に供試したがいずれも強い毒性を示さなかった。ただし, 両例共に鶏胚に対し, 48時間以後において徐々に死亡例が出現し, 7日を経過した段階においてはいずれも50%をこえる致死率を示した事が注目されよう。ふ化率は *Pen. janthinellum* で1/13,

Pen. viridicatum では 3/13 であった。

3. 代謝産物の検索: *Asp. oryzae*, *Asp. flavus* における aflatoxin, *Asp. ochraceus* における ochratoxin の検索は薄層クロマトグラフィーによった。Merck のシリカゲルプレート No. 5724 (0.25 mm) を用い、aflatoxin については CHCl_3 -MeOH (24:1), ochratoxin については benzene-MeOH-EtOAc (15:3:1) の溶媒系を用い、それぞれ標品と共に展開検索した結果、aflatoxin は検出されず、ochratoxin A が *Asp. ochraceus* のエキスより検出された。*Pen. cyclopium* については cyclopiazonic acid の検索を行なったが、TLC による検索においては本物質は検出されず、ほかに FeCl_3 に呈色するフェノール性物質の存在を認めたが、毒性の本体については確認されていない。

考 察

先に述べたように、わが国で大きな比重を占める発酵食品の生産に利用されるこうじ菌については、すでに広範な調査研究が行なわれ、問題となるべきマイコトキシンの生産菌は認められなかったことが報告されている。今回われわれが取りあげた自家醸造みそおよびしょう油は、現在ではかなりその製造の少なくなっていることは事実であるが、なお東北地方の一部農家においてはよく醸造利用されているものである。検索した 57 検体より分離された菌種は比較的少なく、*Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida* 属等がほとんどであり、菌数も少なかった。しかし毒性検索においては、*Asp. ochraceus*, *Pen. cyclopium* 等に強い毒性を示すものが発見され、とくに *Asp. ochraceus* から ochratoxin A の産生が認められたことは注目に値しよう。ochratoxin A はラットに対しては 20~22 mg/kg⁷⁾、マウスに対しては 45.2 mg/kg⁸⁾、鶏胚に対しては 18.8 µg/egg⁸⁾ の LD₅₀ 値を有する南アフリカで発見されたマイコトキシンであり⁹⁾、われわれは米着生菌¹⁰⁾に、名取らは小豆、こしょう粉末からの分離菌¹¹⁾に、ochratoxin 生産性の *Asp. ochraceus* を発見しているが、生産菌がしょう油より分

離されたのは初めてである。なお自家醸造みそおよびしょう油に関する着生有害糸状菌についてはさらに多数の試料についての検索を続行中であり、結果については統報したい。

謝 辞

試料の採取につき御援助いただいた宮城県衛生部環境衛生課、試料を提供された農家の方々に感謝いたします。また本研究の実施にあたり有益な御助言をいただいた国立衛生試験所倉田 浩、宇田川俊一両博士に深く感謝の意を表します。本研究の一部は厚生省がん研究助成金によってのこを合わせ感謝する。

文 献

- 1) B. F. Nesbitt, J. O'Kelly, K. Sargeant and A. Sheridan: *Nature* **195**, 1062 (1962).
- 2) 横塚 保, 佐々木正興, 他 3 名: *日農化誌*, **41**, 32 (1967) および引用文献。
- 3) 倉田 浩, 宇田川俊一, 他 4 名: 第 17 回食品衛生学会学術講演会要旨 (1969 年 5 月, 東京)。
- 4) K. B. Raper, C. Thom: "A Manual of the *Penicillia*" (1949) Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 5) K. B. Raper, D. L. Fennell: "The Genus *Aspergillus*" (1965), Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 6) C. W. Holzapfel: *Tetrahedron* **24**, 210 (1968).
- 7) I. F. H. Purchase, J. J. Theron: *Fd. Cosmet. Toxicol.* **6**, 479 (1968).
- 8) M. Yamazaki, S. Suzuki, et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 投稿中。
- 9) K. J. van der Merwe, P. S. Steyr, et al.: *Nature* **205**, 1112 (1965).
- 10) M. Yamazaki, Y. Maebayashi, K. Miyaki: *Appl. Microbiol.* **20**, 452 (1970).
- 11) S. Natori et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 投稿中。(私信による)。