報 文

赤カビ自然罹病麦中の毒性物質に関する研究

(昭和 47 年 3 月 6 日受理)

諸 岡 信 一* 裏 辻 憲 昭*
 芳 沢 宅 実* 山 本 弘 幸*

Studies on the Toxic Substances in Barley Infected with *Fusarium* spp.

Nobuichi MOROOKA, Noriaki URATSUJI, Takumi YOSHIZAWA
 and Hiroyuki YAMAMOTO

(Faculty of Agriculture, Kagawa University; Ikenobe, Miki-cho,
 Kita-gun, Kagawa-ken)

Using the procedure employed for the separation of fusarenol and nivalenol, toxic substances were separated from cereal grains infected with *Fusarium* in the crop field of Kagawa-ken in 1970. Production of the toxic substances in culture filtrates of the isolated strain was also determined. The results are summarized as follows:

(1) *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. were isolated from moldy grains of barley and wheat. *Fusarium roseum* or related species were found to be a majority of casual fungi.

(2) Moldy grains mainly contained "Rd-toxin", mp. 149.5-151°C, and nivalenol, mp. 224-226°C, both toxic to mice and protozoa and the former was considered as a newly found mycotoxin having a scirpene nucleus.

(3) Phytotoxic butenolide, mp. 115-117°C, hardly detectable in the grains, and Rd-toxin were separated from culture filtrates of the isolated *Fusarium roseum* strain, whereas nivalenol was not detected.

(Received March 6, 1972)

I. はじめに

著者らは昭和38年西日本で大発生した赤カビ被害麦の毒性の研究¹⁾に着手して以来、分離株 *F. nivale* の人工カビ米および合成培地より、セスキテルペン系のマイコトキシンである nivalenol^{2,3)}, fusarenol⁴⁾, fusarenol-X⁵⁾ を単離し、それらの化学構造の決定^{2,3,6)}, ならびに生理活性の検討⁷⁾を行ってきた。

従来のマイコトキシンの研究は分離株の培養によってえられる物質に関するものが多く、被害穀のものに含まれている毒性物質に関する研究は少ない⁸⁾。

著者らは赤カビ罹病麦中の毒性物質を究明する目的で、昭和45年春の長雨によって香川県で大発生した赤カ

ビ被害麦から毒性物質の分離を行なった。また被害麦より主要寄生菌を分離し、その合成培養液中に産生される毒性物質と被害麦中の毒性物質の理化学的性状ならびに毒性について比較検討した。

その結果、赤カビ自然罹病大麦および分離株 *Fusarium roseum* の培養液より、新しいセスキテルペン系の毒性物質を分離したので報告する。

II. 実験方法および結果

1) ほ場における赤カビ被害状況の調査

昭和45年に香川県下で大発生した赤カビ病による麦類の被害実態を知るために、被害の中心地であった三豊郡の各地域(流岡, 大野原, 池之尻, 財田, 観音寺および坂本)および被害の比較的軽微であった木田郡三木町の

* 香川大学農学部: 香川県木田郡三木町池戸

Table 1. Rate of Deterioration of Infected Barley and Wheat Grains with Field Fungi

Habitat grade of grain ^{a)}	Barley					Wheat	
	Miki	Nagareoka ^{b)}	Ohnohara ^{b)}	Ikenoshiri ^{b)}	Saida ^{b)}	Miki	Sakamoto ^{b)}
0	56.7%	5.2%	19.0%	15.8%	28.5%	81.3%	52.0%
1	29.1	45.1	39.7	46.3	38.6	16.1	30.2
2	8.1	12.5	12.9	14.2	17.3	1.1	9.8
3	4.0	14.8	8.4	7.1	6.8	1.2	5.0
4	2.1	22.4	20.0	16.6	8.8	0.3	3.0
damage, % (2+3+4)	14.2	49.7	41.3	37.9	32.9	2.6	17.8

- a) grade of grain: 0; no-infected, 1; an embryo was damaged,
2; mycelia spread partially on a surface of grain,
3; mycelia spread almost all over the surface,
4; ripening poor and mycelia spread almost all over the surface.

- b) heavily damaged area with field fungi.

Table 2. Detection Rate of Fungi from Barley and Wheat Grains of Various Grades

Habitat grade of grain ^{a)}	Barley							Wheat	
	Miki-I ^{b)}	Miki-II	Nagare- oka	Ohno- hara	Ikeno- shiri	Saida	Kannonji ^{b)}	Miki ^{b)}	Sakamoto ^{b)}
0	13%	2%	2%	2%	4%	4%	8%	13%	5%
1	23	8	2	2	0	6	13	10	0
2	53	66	46	50	50	58	75	58	50
3	73	84	58	60	68	70	80	58	50
4	53	86	48	56	66	72	75	68	55

A hundred grains of each grade were cultured on Martin medium.

The table shows the rate of grains, from which the colony of fungi was observed on the medium

- a) grade of grain: see Table 1.

- b) Eighty grains of each grade were tested.

収穫期のは場から、立穂の状態ではサンプリングを行ない、穂、穎、粒の各部位における病徴の観察および被害状況を調査した。Table 1 は各地域より任意に採取した穂における罹病粒の割合を罹病度別に示す。罹病度2~4の麦粒を被害粒とみなすと、三木地域の大麦および小麦の被害率（全粒中の被害粒の割合）はそれぞれ14.2%および2.6%であったが、被害の著しかった三豊郡の各地域ではそれぞれ32.9~49.7%および17.8%であった。

2) 寄生菌の分離と分類

被害麦に寄生するカビ類の分離は、地域別、罹病度別の麦粒より、それぞれ100粒（ただし三木と観音寺は80粒）を無作為抽出し、0.1%塩化第二水銀溶液とエタノールの同量混液に5秒間浸漬して表面殺菌した後、Martin 平板培地を用いて分離培養した。Table 2 は各試料について、カビの存在が認められた粒の割合を罹病

度別に示す。地域間に差は認められなかったが、各試料とも罹病度2~4では半数を越える麦粒より、カビが分離された。

この方法によって分離した菌株は、*Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, 不明菌等に大略分別された。各試料から分離されたコロニー数をTable 3に示す。被害麦から分離された菌株の中では*Fusarium*の分離頻度が高く、とくに罹病度の高い麦粒ほどこの傾向は顕著であった。したがって、今回の香川県下における被害麦の主要寄生菌株は*Fusarium*であることが証明された。また*Fusarium*属として分離された21株は、Snyder and Hansen の分類法にしたがうと、*Fusarium roseum* またはそれに近縁の菌株と推定された（徳島県立農大・石井 博氏の同定に依る）。

Table 3. The Number of Fungi Isolated from Infected Barley and Wheat Grains

Grade of grains ^{a)}	Fungal species ^{b)}	Barley							Wheat	
		Miki-I	Miki-II	Nagare-oka	Ohno-hara	Ikeno-shiri	Saida	Kannonji	Miki	Sakamoto
0	<i>Fus.</i>	—	—	2	—	—	2	2	—	—
	<i>Alt.</i>	6	2	—	—	2	—	—	6	—
	<i>Asp.</i>	2	—	—	—	—	2	2	4	4
	<i>Pen.</i>	2	—	—	2	2	—	—	—	—
	non.	—	—	—	—	—	—	2	—	—
1	<i>Fus.</i>	—	—	2	—	—	—	4	—	—
	<i>Alt.</i>	6	2	—	2	—	4	4	6	—
	<i>Asp.</i>	6	4	—	—	—	2	—	2	—
	<i>Pen.</i>	6	2	—	—	—	—	—	—	—
	non.	—	—	—	—	—	—	2	—	—
2	<i>Fus.</i>	36	56	40	44	46	52	60	36	36
	<i>Alt.</i>	2	2	6	4	2	—	—	2	—
	<i>Asp.</i>	4	6	2	2	4	2	—	4	4
	<i>Pen.</i>	—	4	—	—	—	4	—	2	—
	non.	—	—	—	—	—	—	—	2	—
3	<i>Fus.</i>	54	64	54	64	60	66	64	40	40
	<i>Alt.</i>	2	4	2	—	8	—	—	2	—
	<i>Asp.</i>	2	12	4	2	—	4	—	2	—
	<i>Pen.</i>	—	16	—	—	4	—	—	2	—
	non.	—	—	—	—	10	—	—	—	—
4	<i>Fus.</i>	40	74	46	54	56	70	58	48	44
	<i>Alt.</i>	2	6	—	2	2	—	2	2	—
	<i>Asp.</i>	—	4	2	—	4	4	—	4	—
	<i>Pen.</i>	—	4	—	—	2	—	—	—	—
	non.	—	2	—	—	2	—	—	—	—

a) grade of grain: see Table 1.

b) Isolated fungi from cultured grains shown in Table 2 were classified into five species, i. e., *Fusarium* (*Fus.*), *Alternaria* (*Alt.*), *Aspergillus* (*Asp.*), *Penicillium* (*Pen.*) and not identified species (non.).

The table shows that heavily damaged grains were almost infected with *Fusarium* species.

3) 毒性菌株のスクリーニング

分離された *Fusarium* 21株を2%ペプトン添加ツェベック液体培地で、20°, 21日間遮光静置培養し、培養液を活性炭に吸着後、メタノールで脱着して得た粗毒物質について毒性試験を行なった。毒性試験はマウス(*dd Y*系, 4週令雄, 平均体重15g)の腹腔注射法と、原虫 *Tetrahymena pyriformis* (以下 *T. p.* と略記)の増殖阻止試験の両法によった。毒性の判定は、マウスでは2週間以内の斃死数, *T. p.* では全死滅時間の比較によった (Table 4).

マウスに対して毒性の高い株は No. 103, 106 および

117株であり, *T. p.* に対して強い毒性を示した株は No. 110, 117 および 118 株であった。マウスと *T. p.* に対する毒性は必ずしも一致しなかったが、両者に比較的強い毒性を示した No. 117 株を代表的な毒性株として選定した。

4) 毒性物質の分離

① 自然罹病大麦から毒性物質の分離 (Fig. 1)

観音寺地区より収集した被害大麦の試料 I および II (それぞれの被害率は92%, 83%), 三木地区の被害大麦の試料 III (被害率38%) をそれぞれ粉にひき、*n*-ヘキサンで可溶性成分を抽出除去し、水を加えて膨潤後、水と

Table 4. Toxicity of Crude Toxins Produced on Pepton-Czapek Solutions by Isolated Strains from Infected Barley or Wheat

Sample				Yield	Toxicity														
strain No.	species	origin	habitat		mouse*			<i>Tetrahymena pyriformis</i> **											
					20 mg	10 mg	5 mg	2 mg/ml					1 mg/ml						
								0.5 (hr)	1	2	4	8	16	1 (hr)	2	4	8	16	
101	<i>Fusarium spp.</i>	barley	Miki	0.497	0/3	—	—							●					○
102	"	"	"	0.930	3/3	0/3	—							○					○
103	"	"	"	0.703	3/3	1/3	0/3							●					○
104	"	wheat	"	0.468	0/3	—	—							○					○
105	"	"	"	1.327	0/3	—	—							○					○
106	"	"	"	0.509	3/3	2/3	0/3							●					○
107	"	"	"	1.352	0/3	—	—							●					○
108	"	"	"	0.507	0/3	—	—							○					○
109	"	barley	Nagareoka	0.671	0/3	—	—							●					○
110	"	"	"	0.656	0/3	—	—	●							●				
111	"	"	"	0.665	0/3	—	—							○					○
112	"	"	"	0.460	2/3	0/3	—							●					○
113	"	"	Ikenoshiri	0.752	2/3	0/3	—							○					○
114	"	"	Ohonohara	0.702	0/3	—	—			●									○
115	"	"	"	0.579	0/3	—	—							○					○
116	"	"	Saida	0.531	0/3	—	—							○					○
117	"	"	"	0.587	3/3	1/3	0/3		●										●
118	"	"	"	0.533	0/3	—	—	●							●				
119	"	"	Kannonji	0.464	0/3	—	—					●					●		
120	"	"	"	0.498	0/3	—	—							●					○
121	"	"	"	0.815	0/3	—	—							○					○

* Death rate of tested mice

** Time-course of the effect of the crude toxins on *Tetrahymena pyriformis*

○.....survival; ●.....dead cell.

同量のエタノールを加えて得た浸出液を濃縮乾固の後、再び水に溶解して不溶物をろ別してから、活性炭に吸着、ついでメタノールで脱着した溶出液を濃縮乾固して粗毒物質を得た。これをキーゼルゲルカラムクロマトグラフィー（メルク製、粒子径 0.08 mm 以下、溶媒系；クロロホルム：メタノール/97：3 および 5：1）で分画して、毒性試験に供試した。その結果、いずれの試料からもマウスおよび T.p. に対して毒性を有する 2 つの画分 *d* および *f* をえた (Fig. 1, Table 5 参照)。Table 5 は試料Ⅲにおける各画分の収量と毒性を示す。毒性画分 *d* および *f* の収量は、試料麦 1 kg 当りそれぞれ 62.3 mg, 71.5 mg であり、マウスに対する毒性はいずれも 1 mg/マウス (i. p. 投与) で 1/3 死亡した。

これら 2 つの毒性画分のうち、*d* 画分の主成分は TLC 上（メルク製キーゼルゲル G, 0.25 mm プレート）で、

標品の fusarenon および nivalenol と同様の硫酸呈色をするが、その *Rf* 値は展開溶媒、酢酸エチル-トルエン (3：1) で 0.21, 同じくクロロホルム-メタノール (97：3) では 0.09 であり、標品の *Rf* 値 (fusarenon : 0.31, 0.19; nivalenol : 0.08, 0.01) とは明らかに異なる値を示し、2 つの標品の中間に位置した。この物質はさきのキーゼルゲルカラムクロマトグラフィーおよび TLC によって精製をくりかえして融点 149.5-151° (酢酸エチル-石油エーテル再結) の結晶として単離した。これを“Rd-トキシン”と仮称する。

f 画分の TLC では、標品の nivalenol と硫酸呈色物の色調および *Rf* 値ともによく一致するスポットが認められ、その精製単離物は融点 224-226° (メタノール再結, UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$: 219 m μ) を示し、赤外吸収スペクトルも標品とまったく一致することから (Fig. 2), nivalenol

Table 5. Toxicity and Yield of Fractions Separated from Moldy Barley by Kieselgel Column Chromatography

Sample		Yield mg/kg of barley	Toxicity																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
frac.	tube		mouse*		<i>Tetrahymena pyriformis</i> **																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
			2mg	1mg	1.0 mg/ml					0.5 mg/ml					0.25 mg/ml																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
					0.5 (hr)	1	1.5	2	3	0.5 (hr)	1	1.5	2	3	4	5	1 (hr)	1.5	2	3	5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
No.	No.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													

* Death rate of tested mice

** Time-course of the effect of fractionated materials on *Tetrahymena pyriformis*.

○……survival; ●……dead cell.

と同定された。

② 分離株 *Fusarium roseum* の産生する毒性物質の分離

分離毒性株 No. 117 株を 2% ペプトン添加ツァベック液体培地で 20°, 21 日間遮光静置培養し、菌蓋をろ別後、ろ液を活性炭に吸着、ついでメタノール脱着して得た粗毒物質を①と同様にキーゼルゲルカラムクロマトグラフィーで Fig. 3 のように分画して、毒性試験に供試した。その結果 (Table 6)、マウスに毒性を示した画分は No. 3, 4 および 5 であった。このうち、T.p. 毒性のもっとも強い画分である No. 4 から、カラムクロマトグラフィーと TLC によって 3 成分が単離された。これら 3 成分の TLC (メルク製キーゼルゲル G, 0.25 mm プレート) での *R_f* 値 (展開溶媒: 酢酸エチル: トルエン/3:1) は、それぞれ 0.21, 0.14 および 0.05 であり、培養液 1 L 当りの収量はそれぞれ 0.5 mg, 1.5 mg および 9.0 mg であった。

R_f 値 0.21 の成分は TLC 上での挙動から、自然罹病麦より分離された Rd-トキシンと同一物質と考えられた。他の 2 成分はいずれも硫酸発色し難く、20% リンモ

リブデン酸エタノール溶液によって検出しうるが、このうち *R_f* 値 0.14 の物質は、融点 115~117° (クロロホルム-ベンゼン再結)、質量分析 (*M⁺*=141) と元素分析の結果から、その分子式は $C_6H_7NO_3$ であり、赤外吸収スペクトルおよび核磁気共鳴スペクトルの結果は、Yates ら⁹⁾によって *F. tricinctum* から分離された butenolide と同一物質であることを示した。

③ 新セスキテルペン系マイコトキシン (Rd-トキシン) に関する知見

自然罹病大麦およびそれからの分離株 *F. roseum* の培養ろ液より単離した Rd-トキシンは、分離過程での挙動および TLC 上での硫酸発色反応、さらに各種スペクトル分析の結果から、fusarenon, nivalenol に近縁の scirpene 系化合物と推定された。すなわち、Rd-トキシンの紫外外部吸収は $\lambda_{\max}^{EtOH}$: 218 mμ, 赤外吸収スペクトルは -OH (3400 cm^{-1}), $>C=C-$ (1680 cm^{-1}) の

存在を示し、アセチル基に由来する吸収帯は認められなかった (Fig. 4)。一方、質量分析によると Rd-トキシ

Fig. 1. Procedure for separating toxic substances from moldy barley

Fig. 4. Infrared spectrum of Rd-toxin isolated from moldy barley (KBr pellet)

Fig. 5. Mass spectrum of Rd-toxin isolated from moldy barley

要寄生菌は *Fusarium roseum* またはそれに近縁の菌株と考えられた。

(2) 赤カビ自然罹病大麦に含まれる主要毒性物質は Rd トキシンおよび nivalenol の 2 成分であった。このうち、Rd-トキシンは新しい scirpene 系マイコトキシンと考えられた。

(3) 分離株 *F. roseum* の培養ろ液からは Rd-トキシン、および自然罹病大麦には存在しなかった *butenolide* が分離された。一方、罹病麦中に認められた nivalenol は産生されなかった。

終りに本研究を行なうにあたりご援助を賜った理化学研究所辰野高司博士、徳島県立農大石井 博氏ならびに本学植物病学教室谷 利一助教授に深謝致します。

なお本報の要旨は日本食品衛生学会第22回学術講演会(昭和46年10月)において発表した。

文 献

- 1) 角田 広, 戸矢崎紀紘, 諸岡信一, 中野尚子, 吉山秀夫, 大久保 薫, 磯田政憲: 農林省食糧研究所報告 **23**, 89 (1968).
- 2) 辰野高司, 諸岡信一, 斎藤 守, 榎本 真, 梅田

誠, 大久保 薫, 角田 広: 日本薬理学会誌 **62**, 26 (1966).

- 3) Tatsuno, T., Fujimoto, Y. and Morita, Y.: Tetrahedron Letters 2823 (1969).
- 4) Morooka, N., Tatsuno, T.: Proceedings of the First U.S.-Japan Conference on Toxic Micro-Organisms, "Toxic Substances (*Fusarion* and Nivalenol) Produced by *Fusarium nivale*", p. 114 (1970), UJNR Joint Panels on Toxic Micro-organisms and U.S.D.I., Washington, D. C.
- 5) Ueno, Y., Ueno, I., Tatsuno, T., Ohokubo, K., Tsunoda, H.: *Experientia* **25**, 1062 (1969).
- 6) 諸岡信一, 中野尚子, 中沢 敏, 角田 広: 日農化誌, **45**, 151 (1971).
- 7) Nakano, N.: *Japan. J. Med. Sci. Biol.* **21**, 351 (1968).
- 8) 諸岡信一: 日本農芸化学会主催シンポジウム『食品と公害』講演要旨集 p. 39, (1970) 福岡.
- 9) Yates, S. G., Tookey, H. L., Ellis, J. J.: *Phytochem.* **7**, 139 (1968).