市販食品における有毒糸状菌の増殖と 毒素産生性について

(昭和 52 年 3 月 14 日受理)

一言 広^{*1} 諸 角 聖^{*1} 和宇慶朝昭^{*1}
坂井千三^{*1} 倉田 浩^{*2}

Mycotoxin Production of Fungi on Commercial Foods

Hiroshi HITOKOTO^{*1}, Satoshi MOROZUMI^{*1}, Tomoaki WAUKE^{*1},
Senzo SAKAI^{*1} and Hiroshi KURATA^{*2}

(^{*1}Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 24-1, 3-chome,
Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo; ^{*2}National Institute of Hygienic
Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

Mycotoxin production was investigated in 27 kinds of commercial foods artificially inoculated with following representative toxigenic fungi, i. e., aflatoxin-producing strain of *Aspergillus parasiticus* NRRL-3000, sterigmatocystin-producing strain of *A. versicolor* I-20-b, ochratoxin A-producing strain of *A. ochraceus* 10-21-N, and *Fusarium* toxin-producing strain of *Fusarium solani* F-135.

It was observed that among vegetables and food products tested, dried sweet potato and salami sausage were favorable substrates for the production of several kinds of mycotoxins and dried persimon was favorable for sterigmatocystin production. Pepper, roasted coffee bean and cinnamon bark were not susceptible to mycotoxin contamination under the moistend condition.

Substances contained in a chloroform extract of cinnamon and pepper inhibited the growth of the four toxigenic fungi. These results indicate that cinnamon and pepper might contain inhibitory materials.

(Received March 14, 1977)

緒 言

近年、諸外国における農産物の mycotoxin による自然汚染例の報告は枚挙にいとまがない。

我が国において現在市販されている多種多様な食品の多くが諸外国からの輸入品である。それらの食品のうち、現在 mycotoxin 汚染が問題とされている食品類については多くの検査機関が多大の経費と労力をかけて検査を実施している。とはいえ、その他の食品については

mycotoxin に関する安全性の面では種々の危険に脅かされている。

このような観点から、いかなる種類の食品が mycotoxin 汚染の危険の大きい食品であるかということを、は握ることができれば、今後 mycotoxin 汚染調査を必要とする食品の種類を限定することが可能となり、検査能率ならびに各種食品の安全性の向上、ひいては mycotoxin 汚染の防除対策を推進する上での一助となろう。

そこで、我々は都内市販の各種食品に毒性カビを接種し、その発育と毒素産生の有無を確かめることにより、

^{*1} 東京都立衛生研究所：東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*2} 国立衛生試験所：東京都世田谷区上用賀 1-18-1

各食品が mycotoxin により汚染される可能性の評価を行った。用いた食品は店舗、家庭内などにおける二次汚染の可能性を考慮して、比較的保存性が高いとされている乾燥食品を対象として選んだ。

実験方法

1. 供試菌株

種々の市販食品の上で mycotoxin を産生するか否かを検討するために用いた毒素産生株は次の4株である。

afatoxin 産生株: *Aspergillus parasiticus* NRRL-3000, sterigmatocystin 産生株: *A. versicolor* I-20-b (煮干し由来株), ochratoxin A 産生株: *A. ochraceus* 10-21n (空気由来株) および T-2 および diacetoxyscirpenol (DAS) 産生株: *Fusarium solani* F-135 (大豆由来株)。

2. 食品の水分含量の補正

接種菌の発育および毒素産生用基質として実験に用いた食品は27品目である。これらはいずれも都内で市販されていたもので、1974年11月から1975年2月までの間に購入したものである。食品の種類と購入時の水分含量は Table 1 に示した。菌の接種に先立ち、Scheme 1 に示したように、食品の水分含量を Condition A~C の3段階に補正した。

Condition A: 27品目の食品のすべてを、水分の添加および滅菌処理を行うことなく、上記接種菌を接種した。

Condition B: 各種食品成分の毒性カビに対する影響を検討する目的で各食品に以下の方法でカビの発育に十分と思われる水分を添加した。すなわち、粉状食品については滅菌蒸留水を加えて最終総水分含量が40%となるように調整した。その他の22品目については、滅菌蒸留水中に4時間浸せきした後、余分の水分を滅菌ろ紙上で除去した。その結果は Table 1 に示した。なお、とうもろこし、小豆、乾燥スライスにんにくおよびシナモンの4品目では水分の吸収が悪く、いずれも25~40%であるが、これらはその水分含量のまま実験に供した。これらの食品はカビの接種に先立ち、121°, 15分間高圧滅菌した。

Condition C: Condition B で接種菌の発育および毒素産生のいずれかが認められなかった食品では、その条件でなお水分が不足しているか、もしくは接種菌の発育ないし毒素産生を抑制する因子が含まれている可能性があると考えた。そこで、各食品を粉碎した後蒸留水に添加し、10%浮遊液とした。これらの試料は121°, 15分間高圧滅菌した後実験に供した。この操作により、さらに多量の水分を添加すると同時に食品中に存在するかもしれない抑制因子の作用を弱められるのではないかと考えた。

上記3種 (Condition A~C) の処理を施した食品はいずれも 10 g を秤取し (乾燥芋のような大型の試料は指

Table 1. Kinds of Foodstuff and Their Moisture Content

Food	Moisture content (%)	
	Water not added	After immersed in water for 4 hr
Dried sweet potato	34.0	78.6
Salami sausage	18.0	40.0
Corn	13.1	34.0
Dried buckwheat noodle	13.2	40.0
Dried noodle	12.2	40.0
Dried slice radish	19.2	83.0
Soy bean	11.8	57.4
Sesame seed	4.0	40.0
Dried gourd shavings	27.4	80.0
Tangle	12.0	84.8
Azuki bean	14.0	26.2
Red pepper	13.0	69.2
Japanese pepper seed	13.2	64.6
Flakes of dried bonito	18.2	40.0
Dried persimmon	46.6	50.1
Dried mysid	28.0	70.5
Dried small sardine	10.0	40.0
Dried purple laver	6.0	40.0
Skim milk powder	5.0	40.0
Green tea leaf	8.8	40.0
Dried shrimp	21.5	71.0
Pepper	15.0	40.0
Roasted coffee bean	5.6	59.2
Mustard powder	7.0	40.0
Curry powder	14.8	40.0
Dried slice green garlic	22.8	26.3
Cinnamon bark	13.2	37.0

頭大に刻んだ後) 100 ml 容の滅菌三角フラスコに入れ使用した。

3. 糸状菌の接種ならびに培養

各接種菌はあらかじめ25°, 7日間 potato dextrose agar (PDA) 斜面を用いて培養後、形成された菌体および胞子の1白金耳量を各試料に接種した。菌の接種を終えた試料は十分振とうした後 Scheme 1 に示したように25°で静置培養を行った。培養日数は接種菌の種類と処理方法により、それぞれ異なった日数を選んだ。すなわち、Condition A についてはすべて30日間、また Condition B および C については、*A. parasiticus* および *A. ochraceus* 接種群では8日および12日間、*A. versicolor* 接種群では12日および18日間、また *F. solani* 接種群では20日および30日間それぞれ培養を行った。培養終了後、接種菌の発育の有無は肉眼および実体顕微鏡

を用いて判定した。また、発育の認められた食品については115°, 10分間高圧滅菌した後、産生毒素の有無を以下に示した方法により検討した。

4. 毒素の抽出ならびに測定

aflatoxin, sterigmatocystin および *Fusarium* toxin の抽出、精製および毒素の確認については直井ら¹⁾の記載に従って行った。すなわち aflatoxin の場合は酸性アルミナおよびキーゼルゲル G を、sterigmatocystin の場合はフロリジルおよびキーゼルゲル G のカラムをそれぞれ用いて、また *Fusarium* toxin についてはキーゼルゲル G のみのカラムを用いて clean up した後、TLC を用いて測定した。

ochratoxin A については武田ら⁴⁾の記載に従って行い、clean up にはキーゼルゲル G のカラムを用いた。

5. 食品の水分含量の測定

食品の水分含量は Kett 赤外線水分計 F-1A 型(ケッ ト科学研究所製)を用いて測定した。

6. 食品中の糸状菌発育阻害物質の検討

供試食品の中から、幾つかを選び菌の発育に及ぼす影響を調べた。すなわちそれらの食品各 5 g にクロロホルム 10 ml を加え、warring blender (日本精機(株)製)を用い、3,000 rpm 5分間破碎し、クロロホルム層を分離後濃縮乾固した。これをさらに、dimethyl sulfoxide (DMSO) 5 ml に再溶解した。その 1 ml を 50° に保温しておいた PDA 10 ml に加え、ペトリ皿内に傾斜させて流入し、凝固させた。これを水平にした後、さらに

10 ml の PDA を流入し凝固させて平板とした。

接種菌の接種は抽出物濃度の傾斜面の中央に 1 白金耳量を画線塗抹した。対照用培地は DMSO を用いて同様の平板を作り使用した。培養は 25°, 10~20 日間行い、菌の発育を肉眼的に観察した。

実験結果

各種食品における毒素産生菌の発育および毒素産生

Condition A の食品において、*A. parasiticus* はサラミソーセージ(水分含量18.0%)および乾燥芋(34.0%)の上で発育と aflatoxin B₁ の産生を示した。*A. versicolor* はサラミソーセージ、乾燥芋および干し柿(46.6%)の上で発育と sterigmatocystin の産生を、また *A. ochraceus* はサラミソーセージおよび乾燥芋の上で発育と ochratoxin A の産生をそれぞれ示した。しかし、*F. solani* は用いたいずれの食品においても発育および毒素産生を示さなかった (Fig. 1-A)。

Condition B の食品において、*A. parasiticus* は27品目中、乾燥芋、とうもろこし、干うどんなど22品目で発育し、そのうちの10品目で aflatoxin B₁ を産生した。その成績を Fig. 1-B に示した。*A. versicolor* 接種群では20/27品目で発育が認められ、そのうちの12品目で sterigmatocystin の産生が認められた。*A. ochraceus* 接種群では大豆などの21品目において菌の発育が認められ、そのうちの15品目で ochratoxin A の産生が認められた。*F. solani* 接種群では干そばなど16品目において発育が認められたにもかかわらず毒素産生は7品目に

note: A, No water added
B, Immersed in water for 4 hr
C, Used as 10% suspension,
■ Growth(+), Toxin(+). ■ Growth(+), Toxin(-). ■ Growth(-), Toxin(-).

Fig. 1. Mycotoxin production in commercial foods having different moisture contents

Fig. 2. Fungal growth inhibition by cinnamon extract

Fig. 3. Fungal growth inhibition by pepper seed extract

いて認められたにすぎなかった。

Condition C における各接種菌の発育および毒素産生は Fig. 1-C に示したようである。すなわち、*A. parasiticus* 接種群では乾燥スライスにんにくおよびシナモンを除く3品目において新たに菌の発育が認められ、干し柿で新たに aflatoxin の産生が認められた。*A. versicolor* 接種群ではかんぴょうなど6品目で発育が、煮干しなど7品目において sterigmatocystin の産生がそれぞれ認められた。*A. ochraceus* 接種群では辛子粉、カレー粉、こしょうおよび炒りコーヒー豆で新たに菌の発育が、干そばなど4品目において ochratoxin A の産生がそれぞれ認められた。*F. solani* 接種群では煮干しなど6品目で発育のみが、サラミソーセージおよび干し柿で発育と T-2 および DAS の産生がそれぞれ認められた。しかし、このように食品を10%水浮遊液とした条件（水分含量90%以上）においても、なお17品目で接種した菌のいずれかが毒素を産生しなかった。さらに、辛子粉において *F. solani* の、乾燥スライスにんにくでは *A. parasiticus* および *F. solani* の、シナモンにおいては全株の発育が認められなかった。

食品中の糸状菌発育阻害物質

上記の実験において接種菌の発育が比較的悪かった12品目の食品を対象として、それらの食品のクロロホルム抽出物の各毒素産生菌に対する発育阻害効果を調べた。その結果、シナモンおよびこしょうから得た抽出物は4種の毒素産生菌の発育を阻害する作用を示した。また、これら2種の抽出画分のうち、シナモン由来画分は Fig.

2 および Fig. 3 に示したようにこしょう由来画分に比べ強い阻害効果を示した。

考 察

種々の新しいカビ毒が次々と報告されつつある現在、いかなる種類の食品が、いかなる条件のもとで、いかなる毒素により汚染されるかという問題は食品衛生上重要な課題であるにもかかわらず、その解明は極めて困難であると考えられる。

近年、食品のカビ汚染に関する報告のうち、検出した毒性カビが由来食品に発育し毒素を産生するか否かについても併せて検討した報告が多く見られるようになってきた^{5)~20)}。特に肉⁷⁾、ピーカン¹⁷⁾、小麦¹⁸⁾、そば粉¹⁸⁾、ゴマ¹⁵⁾および玄米¹⁶⁾は分離菌の mycotoxin 産生に良好な基質となることが報告されている。

著者らは今回の実験において、接種菌が発育し毒素を産生しうる食品の種類は各接種菌の間で異なることを認めた。

すなわち、食品を10%水浮遊液とした条件における各接種菌の発育と毒素産生についてみると、*A. parasiticus* では合計27品目の食品中25品目に発育が、またそのうちの11品目に毒素産生がみられた。*A. versicolor* では26/27品目に発育が、そのうちの16品目に毒素産生が、*A. ochraceus* では25品目に発育が、そのうち19の品目に毒素産生が、*F. solani* では24品目に発育が、9品目に毒素産生がそれぞれみられた。このような各菌株間における発育あるいは毒素産生の認められた食品数の相違は、各菌株間で発育あるいは毒素産生に必要な栄養要求

の相違があること、各食品の栄養源に質的・量的な差があることなどを示している。また、カビの発育に十分と考えられる水分を添加してもなお一部の食品において菌の発育は認められたにもかかわらず産生毒素は検出できなかった点、および同一食品において各種接種菌の毒素産生にも相違が認められたなどの事実は、仮りにそれらの毒素は実は非産生ではなく、たまたま著者らの測定法では検出限界以下であったかも知れないという危険性を考慮に入れても、なお汚染菌が発育または毒素を産生しうる食品は汚染菌の種類によってそれぞれ異なることを裏付けている。

さらに、水分無添加の状態 (Condition A) で接種菌の発育と毒素産生の認められた乾燥芋、サラミソーセージおよび干し柿は市販のままの状態でもカビおよび mycotoxin 汚染の危険が考えられ、ピーナッツにおける aflatoxin 汚染と同様、特に注意を要する食品と思われる。

しかし反対に、10%水浮遊液 (Condition C) とした状態においてもなお全く接種菌の発育が認められなかったシナモンおよび毒素産生の認められなかったこしょうおよび炒りコーヒー豆はそれぞれカビによる汚染または mycotoxin による汚染を受けにくい食品であるといえよう。

以上の点から、本法はこれまで自然汚染例にのみ頼っていた「mycotoxin 汚染の恐れのある食品の発見」に有用な方法の一つであると考えられ、ここで危険とみなされた食品についてはカビの防除対策を優先して検討しなければならぬと考える。

一方、岡崎²¹⁾~²⁶⁾らは高等植物1300種以上について、その抗菌作用を検討しシナモン成分中のシナモン油、クローブ成分中のオイゲノールなどは強い抗カビ作用を示したと述べている。また、Bullerman⁹⁾はシナモンには *A. parasiticus* および *A. flavus* の発育と毒素産生を阻害する作用があると報告している。著者らも今回の実験において、シナモンおよびこしょうから得たクロロホルム抽出画分中に4種の mycotoxin 産生菌に対する発育阻害因子が存在することを認めた。

これらの点から、防腐・防カビ剤としての食品添加物に対する規制の厳しい現在、Frazier²⁷⁾もすでにその著書の中で香辛料成分の食品保存料としての可能性を示唆しているように、それに代る天然防カビ物質として、あるいは mycotoxin 汚染を防止する物質として今後このような食品に由来する物質の開発を試みることも意義が大きいと考える。

要 約

市販の27品目の乾燥食品に4種の mycotoxin 産生菌をそれぞれ接種することにより、カビの発育と毒素産生の有無を検討し、以下の結論を得た。

1. 乾燥芋およびサラミソーセージは共に市販のまま

の状態では aflatoxin, ochratoxin A および sterigmatocystin 産生菌により汚染された場合にはそれらの mycotoxin による汚染を受けやすい食品であり、干し柿は sterigmatocystin による汚染を受けやすい食品であることが分かった。

2. こしょうおよび炒りコーヒー豆では過剰の水分を添加した場合にも全接種菌は毒素産生を示さなかった。また、シナモンにおいては全接種菌の発育は全く認められなかった。この成績から、これらの3品目は mycotoxin 汚染を受けにくい食品であることが明らかとなった。

3. その他の食品は水分含量の程度によって、いずれかの mycotoxin による汚染を受ける危険性のあることが示唆された。

4. シナモンおよびこしょうから得たクロロホルム抽出画分は4種の毒素産生菌の発育を抑制した。

文 献

- 1) 直井家寿太, 風間栄治, 小川仁志, 斎藤和夫, 江口良子, 志村公子, 友松俊夫, 木村康夫: 東京衛研年報, **22**, 169 (1971).
- 2) 直井家寿太, 小川仁志, 風間栄治, 斎藤和夫, 志村公子, 木村康夫: 同上, **24**, 207 (1972).
- 3) 直井家寿太, 風間栄治, 斎藤和夫, 小川仁志, 志村公子, 木村康夫: 同上, **25**, 203 (1974).
- 4) 武田由比子, 五十畑悦子, 天野立爾, 田辺弘也, 一戸正勝, 熊田広子, 宇田川俊一, 倉田 浩: 食衛誌, **14**, 669 (1973).
- 5) Austwick, P.K.C., Ayest, G.: Chem. Ind. (London), **2**, 55 (1963).
- 6) Buchanan, J.R., Sommer, N.F., Fortlage, J.R.: Appl. Microbiol., **30**, 238 (1975).
- 7) Bullerman, L.B., Hartman, P.A., Ayres, J.C.: *ibid.*, **18**, 714 (1969).
- 8) Bullerman, L.B.: J. Food Sci., **39**, 1163 (1974).
- 9) Burmeister, H.R.: Appl. Microbiol., **21**, 739 (1971).
- 10) Diener, U.L., Davis, N.D.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **44**, 259 (1967).
- 11) Diener, U.L., Davis, N.D.: Trop. Sci., **10**, 22 (1968).
- 12) 一言 広, 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 善養寺 浩: 東京衛研年報, **24**, 41 (1972).
- 13) 一言 広, 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 善養寺 浩, 倉田 浩, 一戸正勝: 食衛誌, **14**, 364 (1973).
- 14) 一言 広, 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 坂井千三, 善養寺 浩: 東京衛研年報, **25**, 17 (1974).
- 15) 一言 広, 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 坂井千三, 善養寺 浩: 同上, **26-1**, 30 (1975).
- 16) 倉田 浩, 坂部フミ, 田中しず子, 栗飯原景昭:

- 菌叢研究所研究報告, **10**, 647 (1973).
- 17) Lillard, H. S., Hanlin, R. T., Lillard, D. A.: Appl. Microbiol., **19**, 128 (1970).
- 18) Lillehoj, E. B., Garcia, W. J., Lambrow, M.: *ibid.*, **28**, 763 (1974).
- 19) Shindler, A. F., Nesheim, S.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **53**, 89 (1970).
- 20) Trenk, H. L., Butz, M. E., Chu, F. S.: Appl. Microbiol., **21**, 1032 (1971).
- 21) 岡崎寛蔵, 大島壮一: 薬誌, **71**, 1335 (1951).
- 22) 岡崎寛蔵, 河口達二: 同上, **72**, 561 (1952).
- 23) 岡崎寛蔵, 大島壮一: 同上, **72**, 564 (1952).
- 24) 岡崎寛蔵, 大島壮一: 同上, **72**, 1131 (1952).
- 25) 岡崎寛蔵, 大島壮一: 同上, **73**, 344 (1953).
- 26) 岡崎寛蔵, 大島壮一: 同上, **73**, 690 (1953).
- 27) Frazier, W. C.: "Food Microbiology" 2nd ed. McGraw-hill Book Co., New York (1967).