

報 文

茨城県および千葉県内の畑土壌における *Aspergillus flavus*
および *A. parasiticus* の分布調査斉藤 道彦[§], 岡崎 博, 田中 健治, 久城 真代

食品総合研究所

Distribution of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in field soils
from Ibaraki and Chiba PrefecturesMichihiko Saito[§], Hiroshi Okazaki, Kenji Tanaka and Masayo Kushiro

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

The distribution of aflatoxin-producing fungi in Ibaraki and Chiba Prefectures, Japan, was investigated. *Aspergillus flavus* was isolated from 22.4 % and 27.0 % of the field soils sampled from Ibaraki and Chiba, respectively. *A. parasiticus* was isolated from a soil sample in Ibaraki. Among the isolates, 9 strains of *A. flavus* and an isolate of *A. parasiticus* produced aflatoxins.

アフラトキシンは *Aspergillus flavus* Link および *A. parasiticus* Spear などの糸状菌により産生されるマイコトキシンであり、強い毒性と発癌性を有している。これらの糸状菌がトウモロコシ、ラッカセイ、ナッツ類などの農産物上で繁殖した場合にはアフラトキシン汚染の原因となることがある^{1) 2)}。

アフラトキシン産生菌の一次汚染源は圃場の土壌中にあるとみなされるため³⁾, *A. flvus* および *A. parasiticus* の分布に関して多くの研究が行われ、熱帯および亜熱帯地域の土壌中における生息密度が特に高いことが明らかになっている^{4) 5) 6)}。また、農産物のアフラトキシン汚染と土壌中における *A. flavus* 菌数との関係、*A. flavus* の系統および地理的分布など生態学的研究が行われている^{7) 8) 9) 10) 11) 12)}。

わが国において最初に大規模に行われたアフラトキシン産生菌の分布調査では^{13) 14)}, *A. flavus* の分離頻

度は九州、沖縄など南西部で高く、アフラトキシン産生株の分布の限界線と年平均気温の等温線がかなり高い相関を示しているとされた。その後も、九州¹⁵⁾や沖縄県¹⁶⁾における *A. flavus* および *A. parasiticus* のアフラトキシン産生株の検出が報告された。これに対して、Takahashi¹⁷⁾ 神奈川県内の圃場の調査において *A. flavus* のアフラトキシン産生株を分離し、Ito and Goto¹⁸⁾ は静岡県の茶園土壌からアフラトキシンを産生する *A. flavus* group 菌を分離した。このようにアフラトキシン産生を示す *A. flavus* が関東地域でも分離されたことから、アフラトキシン産生株の分布は、1970 年代の調査よりもさらに広がっていることが推測される。

本研究において、千葉県および茨城県内の畑土壌およびビニルハウス（以下ハウス）内の土壌中におけるアフラトキシン産生菌の分布調査の結果、これらの地

2007 年 11 月 20 日受付, 2007 年 12 月 4 日受理

[§]連絡先 (Corresponding author): mssaito@affrc.go.jp

域の畑土壌中にも *A. flavus* および *A. parasiticus* が分布することが確認されたので報告する。

実験方法

本報告は 1988 年から 1991 年にかけて、茨城県および千葉県の畑土壌について行われた調査ならびに 2005 年に茨城県の畑土壌について行った調査の結果をまとめたものである。

土壌試料

土壌試料は、1988～1991 年の調査では、茨城県および千葉県内の畑から合わせて 91 点を採取した。1990～1991 年には畑 59 点に加えてハウス内からも 51 点を採取した。なお、ハウス内の土壌については、それらに隣接する圃場の土壌も採取して比較した。

2005 年の茨城県内の調査では、1988～1991 年の調査地に含まれていなかった一地域の畑土壌 25 点について調べた。

土壌試料におけるアフラトキシン産生菌の分離

土壌試料中のアフラトキシン産生菌の分離は希釈平板法によって行った。

1988～1991 年の調査では、土壌試料 30 g を 100 ml の滅菌水に加え、30 分間、数回手で振り混ぜてけん濁し、けん濁液 1 ml をさらに 49 ml の滅菌水に加えてけん濁した。この希釈けん濁液を 5 枚のペトリ皿に 1 ml ずつ取り、溶融培地を注いで混合し固化させた。培地の組成は、麦芽寒天 (Difco) 45 g, NaCl 30 g, クロラムフェニコール 30 mg, ローズベンガル 30 mg, 6-ジクロロ-4-ニトロアニリン 1 mg および 1,000 ml の脱イオン水である。なお、本培地は *A. flavus* の分生子形成が良好で *A. flavus* の分離に適している培地である。

ペトリ皿を 25℃ で 5 日間培養したのち、出現したコロニーのうち分生子の色調などから *A. flavus* と思われるコロニーを数えるとともに、土壌試料あたり 3 個ないしは 3 個以下の場合には全コロニーを、また 3 個以上の場合には、そのうちの 3 個のコロニーを選んで、同定およびアフラトキシン産生性を調べた。

2005 年の調査では、土壌試料 10 g を 90 ml の滅菌水でけん濁し、けん濁液の 10 倍希釈液 1 ml を DYSG 培地¹⁹⁾ で 7 日間まで培養して、生育してきた *A. flavus* および *A. parasiticus* を分離した。

分離菌株の同定は、Raper and Fennell²⁰⁾ および Klich and Pitt の分類書によった。

分離菌株のアフラトキシン産生性試験

1988～1991 年の調査では、*A. flavus* 分離株を 300 ml の三角フラスコを用いて、150 ml の YES 培地（酵母エキス (Difco) 20 g, ショ糖 200 g および脱イオン水 1,000 ml）で 25℃、7 日間静置培養したのち、培養液 100 ml を等量のクロロホルムで抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、その 50 ml を Kamimura et al.²²⁾ の方法を多少改変した方法により Florisil カラムで精製した。溶出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、その残渣を 2 ml のベンゼン-アセトニトリル (98: 2, v/v) に溶かし、薄層クロマトグラフィーで分析した。抽出液はシリカゲル薄相プレート (Merck: Art. 5721) に塗布しトルエン-酢酸エチル-90 % ギ酸 (60: 10: 1, v/v/v) で展開したのち、TLC スキャナー（島津製作所製 CS-920 型）を用いて定量した。

2005 年の調査では、アフラトキシンの分析は Yabe et al.²³⁾ のチップ培養法に準じて菌株の培養および抽出を行った。

すなわち、0.01 % の Tween 80 水溶液 10 ml で調製した供試菌株の胞子けん濁液 10 μ l を先端に少量のシリコンウールを詰め、パラフィルムで閉じた 1 ml 容のピペットマンチップ中の YES 液培地 (240 μ l) に加え、28℃、7 日間培養した。培養後、チップ先端のパラフィルムを取り除き、2 ml 容の遠心用プラスチックチューブに入れ、2,000 rpm、20 秒間遠心分離した。遠心ろ過により、遠心用チューブに移った培養液 100 μ l に等量のクロロホルムを加え、ミキサーで振とう混合したのち、2,000 rpm、20 秒間遠心分離した。このクロロホルム層を 10 ml 容のガラス製遠心チューブに移し、窒素ガスを吹き付けてクロロホルムを除き抽出物を得た。得られた抽出物を二つに分け、定性および定量分析に供した。

薄層クロマトグラフィーによる定性分析は、上述の方法と同様に Merck 製シリカゲル薄層プレートを用いて行った。定量分析は、抽出物を無水トリフルオロ酢酸で TFA 化し、高速液体クロマトグラフ (Agilent 製 1100 Series 型) を用い、蛍光検出器（励起波長 330 nm, 蛍光波長 450 nm）で検出した。カラムは関東化学製 Lichrospher RP-18(e), 移動相は 52 % メタノール, 流速 0.5 ml/min, カラム温度は室温の条件で

表1 畑およびビニルハウス内土壌における *Aspergillus flavus* および *A. parasiticus* の分布

調査年	県	土壌 試料数	<i>A. flavus</i> 検出 試料数	<i>A. parasiticus</i> 検出試料数
1988～1989	茨城	56	7	ND**
	千葉	35	4	ND
1990～1991	茨城	56(29)*	13(8)	ND
	千葉	54(22)	20(13)	ND
2005	茨城	25	10	1

*() 内はビニルハウス；**Not detected.

表2 土壌試料からのアフラトキシン産生性 *Aspergillus flavus* および *A. parasiticus* 菌株の検出

調査年	県	アフラトキシン 産生菌検出 試料数	アフラトキシン産生性菌株 検出試料数	
			<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
1988-1990	茨城	20	4	ND*
	千葉	24	4	ND
2005	茨城	10	1	ND

*Not detected.

分析した。

実験結果および考察

土壌中のアフラトキシン産生菌の分布

1988～1991年および2005年の両調査において、千葉県および茨城県の畑ならびにハウス内の土壌から *A. flavus* が検出され、2005年には *A. flavus* および *A. parasiticus* が検出された。

アフラトキシン産生菌の検出頻度を調査年度別にみると(表1)、1988～1989年の調査では、土壌試料79点中 *A. flavus* が11試料から検出され、畑に加えて、ハウス内の土壌についても調査した1990～1991年においては畑土壌59試料のうち33点から、ハウス内土壌51点のうち21点から *A. flavus* が分離された。すなわち、1988～1989年の調査では茨城および千葉各県の土壌試料からの検出率はそれぞれ12.5%および11.4%、1990～1991年の調査では、試料全体でみると茨城県23.2%、千葉県37.0%であった。このうちハウス内の試料についてみると、茨城県27.6%、千葉県59.1%と、ハウス内土壌での検出率が高い傾向が見られた。

2005年の茨城県内の25点の土壌試料では10試料

から *A. flavus* が分離されたが、そのうちの1試料からは *A. flavus* とともに *A. parasiticus* も分離された。

A. flavus および *A. parasiticus* 分離菌株のアフラトキシン産生性

1989～1991年の調査において、分離された *A. flavus* 101菌株のアフラトキシン産生性を調べた結果、茨城および千葉県の土壌試料からアフラトキシン産生株8菌株が検出され、2005年の調査において茨城県内の畑土壌から分離された *A. flavus* および *A. parasiticus* 各1菌株がアフラトキシンを産生した(表2)。1989～1991年に分離された8菌株のうち6株はアフラトキシンB₁およびB₂を産生し、2菌株はこれに加えてGグループのアフラトキシンも産生した。また、2005年に分離された *A. flavus* はB₁およびB₂、*A. parasiticus* ではB₁、B₂、G₁およびG₂のアフラトキシン産生が認められた(表3)。

以上の結果から、分離頻度は低いながらも、茨城および千葉県内の畑土壌中にもアフラトキシン産生性の *A. flavus* および *A. parasiticus* が分布していることが明らかになった。

わが国において最初に広範囲に行われた土壌中のアフラトキシン産生菌の分布に関する研究結果から、*A.*

表 3 *Aspergillus flavus* および *A. parasiticus* 分離菌株のアフラトキシン産生性

菌株	アフラトキシン産生量 (ng/ml)			
	B ¹	B ²	G ¹	G ²
<i>A. flavus</i>				
C-1-6	1,280	75	ND*	ND
I-2-8	34	3	ND	ND
I-4-6	66	3	ND	ND
C-6-15	8,959	359	ND	ND
C-6-17	14,300	488	ND	ND
C-8-26	1,107	51	5	11
C-8-32	352	10	ND	ND
I-9-33	12	ND	ND	ND
Tu-302	5,500	500	ND	ND
<i>A. parasiticus</i>				
Tu-243	10,100	900	88,000	9,600

*Not detected.

flavus の分布は年平均気温 16℃付近に境界線があるのではないかと報告¹⁴⁾されて以来、年平均気温がこれよりも低い茨城県など北関東の土壌中にはアフラトキシンを産生する *A. flavus* および *A. parasiticus* は分布しないのではないかと考えられてきた。しかしながら、2004 年の Takahashi¹⁵⁾ の神奈川県内の畑土壌からの *A. flavus* の分離報告に続いて、本研究においても茨城および千葉県内の土壌中に *A. flavus* および分離頻度は低いながらも *A. parasiticus* が分布することが確認されたことから、以前の調査では試料数が少ないなどの理由で検出されなかつたことも考えられるが、分布が年平均気温 16℃以下の地域にも広がりつつあるとも推測される。

現在まで、国産農産物におけるアフラトキシンの自然汚染例の報告はほとんど見られないが、初期の調査時よりも分布地域の広がりが見られることや、東南アジアなどアフラトキシン汚染が高頻度で生じている熱帯地域からの農産物輸入の増加、長期的にみればいわゆる地球温暖化によって、アフラトキシン産生性菌株の生息密度が上昇して行くことも考えられるため、今後とも分布域や生息菌数の調査が必要と思われる。

要 約

アフラトキシン産生菌 *Aspergillus flavus* および *A. parasiticus* の茨城県および千葉県内の畑土壌における分布を調査した結果、茨城県では調査土壌の 22.4 %、

千葉県では 27.0 %から *A. flavus* が分離され、*A. parasiticus* が茨城県内の土壌 1 試料から分離された。分離菌株のアフラトキシン産生について調べた結果、*A. flavus* 9 菌株および *A. parasiticus* 1 菌株がアフラトキシンを産生した。

参考文献

- 1) Detroy, R. W., Lillehoj, E. B., Ciegler, A., Aflatoxin and related compounds. In "Microbial Toxins, Vol. VI Fungal Toxins", eds. Ciegler, A., Kadis, S., Ajl, S. J., (Academic Press), pp. 3-178 (1971).
- 2) Heathcote, J. G., Hibbert, J. R., "Aflatoxins: Chemical and Biological Aspects", (Elsevier), pp. 1-212 (1978).
- 3) Diener, U. L. Cole, R. J., Sanders, T. H., Payne, G. A., Louise, S. L., Klich, M. A., Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*, *Ann. Rev. Phytopathol.*, **25**, 249-270 (1987).
- 4) 真鍋 勝, 鶴田 理, 後藤哲久, 松浦慎治, マイコトキシン生産菌群の分布に関する研究 (第 4 報) 東南アジア地域に生息するアスペルギルス属のマイコトキシン生産能について, 食総研報, **33**, 49-56 (1978).
- 5) Manabe, M. and Tsuruta, O., Geographical distribution of aflatoxin-producing fungi in Southeast Asia, *JARQ*, **12**, 224-227 (1978).
- 6) Tsuruta, O., Goto, T., Saito, M., Siriacha, P., Panawas, K. and Buangsuwon, D., The distribution of *Aspergillus flavus* in Thailand soils - An examination in rainy season (August-September, 1985) -, *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.*, **23**, 59-61 (1986).
- 7) Saito, M., Kawasugi, S., Siriacha, P., Tsuruta, O., Buangsuwon, D., Goto, T. and Manabe, M., Panawas, K., Distribution of *Aspergillus flavus* in the maize fields and drying facilities in Thailand: An examination in dry season (January-February, 1986), *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.*, **24**, 35-39 (1986).
- 8) Saito, M., Tsuruta, O., Siriacha, P., Kawasugi, S., Manabe, M. and Tsuruta, O., Distribution and aflatoxin productivity of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand, *Proc. Jpn.*

- Assoc. Mycotoxicol.*, **24**, 41-46 (1986).
- 9) Horn, B. W., Greene, R. L., and Dorner, J. W., Effect of corn and peanut cultivation on soil populations of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in southwestern Georgia, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2472-2475 (1995).
 - 10) Wicklow, D. T., McAlpin, C. E., Platis, C. E., Characterization of the *Aspergillus flavus* population within an Illinois maize field, *Mycol. Res.*, **102**, 263-268 (1998).
 - 11) Abbas, H. K., Zablotowicz, R. M. and Locke, M. A., Spatial variability of *Aspergillus flavus* populations under different crops and corn grain, *Can. J. Bot.*, **82**, 1768-1775 (2004).
 - 12) Jaime-Garcia, R. and Cotty, P. J., *Aspergillus flavus* in soils and corncobs in south Texas: Implications for management of aflatoxins in corn-cotton rotations, *Plant Dis.*, **88**, 1366-1371 (2004).
 - 13) 鶴田 理, 真鍋 勝, 沖縄県におけるアフラトキシン生産菌群の分布について, 日菌報, **16**, 190-197 (1975)
 - 14) 真鍋 勝, 鶴田 理, 田中健治, 松浦慎治, 本邦土壤中のアフラトキシン生産菌群の分布, 日菌報, **17**, 436-444 (1976).
 - 15) Okazaki, H., Saito, M., Tsuruta, O., Population levels of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in field soils in two areas of Kyushu district, *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **58**, 208-213 (1992).
 - 16) Takahashi, H., Kamimura, H. and Ichinoe, M., Distribution of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in sugarcane fields in the southernmost islands of Japan, *J. Food Prot.* **67**, 90-95 (2004).
 - 17) Takahashi, T., Distribution and characteristics of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* in the soil in Kanagawa Prefecture, central Japan, *Mycopathologia*, **121**, 169-173 (1993).
 - 18) Ito, Y. and Goto, T., *Aspergillus flavus* group fungi isolated from Japanese tea fields, *Mycotoxins*, **40**, 52-55 (1994).
 - 19) Frisvad, J. C., Filtenborg, O., Lund, F. and Thrane, U., New selective media for the detection of toxigenic fungi in cereal products, meat and cheese, In "Modern Methods in Food Mycology", (Elsevier), pp. 45-47 (1992).
 - 20) Raper, K. B. and Fennell, D. I., "The Genus *Aspergillus*", (The Williams & Wilkins Co.), pp. 1-686 (1965).
 - 21) Klich, M. A. and Pitt, J. I., "Identification of Common *Aspergillus* Species", (CBS), pp. 1-116 (2002).
 - 22) Kamimura, H., Nishijima, M., Yasuda, K., Ushijima, H., Tabata, S., Matsumoto, S. and Nishima, T., Simple, rapid cleanup method for analysis of aflatoxins and comparison with various methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**, 458-461 (1985).
 - 23) Yabe, K., Ando, Y., Ito, M. and Terakado, N., Simple method for screening aflatoxin-producing molds by UV photography, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 230-234 (1987).

