

米の乾燥調製施設の真菌調査と分離 *Aspergillus* のかび毒産生能

須永恭之、○漆山哲生、秋元京子、朝倉健司、山田友紀子
(農水省・消安局)

【目的】

農林水産省は、安全で品質の高い国産米を消費者に供給するための取組の1つとして、自ら乾燥調製、貯蔵を行う生産者向けに、「米のカビ汚染防止のための管理ガイドライン」を策定し、その実践を促している。この中で、かびを米に付着させないための取組の1つとして施設の清掃を推奨している。しかし、土壌や米中のかびについての報告はあるものの、米の乾燥調製施設に着目した報告はなく、乾燥調製工程において米がかびに汚染される可能性の程度は不明である。そこで、施設の清掃の重要性を検証するため、生産者等の協力を得て、米の乾燥調製施設内の菌そうや真菌数の調査を行うとともに、分離された *Aspergillus* 各株のかび毒産生能も調査した。

【方法】

関東地方の6施設、九州地方の8施設において、平成25年産米の乾燥調製作業の開始前から終了後の清掃までの間に5回、それぞれ施設内の床3箇所、乾燥機の内部1-3箇所、粃すり機の内部1箇所から、検査枠(10×10 cm)内の塵埃(米くず等を含む。)を滅菌ガーゼで拭き取り、調査試料とした。試料全量と滅菌水適量を混合して試験原液を調製し、希釈平板法にてDRBC寒天培地上に塗布して25°Cで5-6日間培養し、総真菌数及び優占上位5真菌属の属別の菌数を測定した。*A. flavus*、*A. parasiticus*、*A. versicolor*等のかび毒産生菌については、CYA培地及びMEA培地で25°C及び37°Cで7日間培養して形態観察により種を確認した。この分離菌株の胞子をYES培地に接種し、25°Cで7日間培養した後、HPLC-FL法及びHPLC-UV法にて培地中に含まれるアフラトキシン(AF)又はステリグマトシスチン(STC)を分析し、かび毒産生能を確認した。

【結果及び考察】

各施設内の塵埃から *Cladosporium*、*Penicillium*、*Aspergillus* が特に高い頻度で検出され、床面からの検出率はそれぞれ92%、87%、79%であり、乾燥機内では78%、73%、53%、粃すり機内では67%、86%、49%であった。調査した14施設のうち、11施設で採取した試料から *A. flavus* 93株、14施設で採取した試料から *A. versicolor* 174株が分離され、このうち5施設の試料から分離された *A. flavus* 17株にAF産生能が、13施設の試料から分離された *A. versicolor* 82株にSTC産生能が確認された。

塵埃の量は、床面では多くても10 g/100 cm²程度であったのに対して、作業開始前の乾燥機や粃すり機では200 g/100 cm²を超える場合があった。多くの施設では、粃、玄米、わらの残存も認められた。全施設中、真菌の最大数は乾燥機及び粃すり機で9 log CFU/100 cm²であった。このような施設では、乾燥機、粃すり機を清掃すると、総真菌数が最大で3 log CFU/100 cm²程度減少した。

本調査では、地域を問わず、米の乾燥調製作業期間中を通して、施設内各所の塵埃からかび毒産生能のある *A. flavus* 及び *A. versicolor* が高頻度で検出され、乾燥調製工程で米にそのようなかびが付着する可能性が否定できないことが判明した。米の乾燥調製に用いる機械内部等の清掃には技術的な限界があるものの、塵埃が多い場合は高い滅菌効果が確認されたため、使用前後の清掃はかび及びかび毒汚染の防止、低減に有効と考えられる。

米の乾燥調製施設の真菌調査と分離Aspergillusのかび毒産生能

須永恭之、○漆山哲生、秋元京子、朝倉健司、山田友紀子
(農林水産省 消費・安全局)

1. 背景と目的

- 農林水産省は、安全で品質の高い国産米を消費者に供給するための取組の1つとして、自ら乾燥調製、貯蔵を行う生産者向けに、「米のかび汚染防止のための管理ガイドライン」を策定し、その実践を促している。「ガイドライン」では、かびを米に付着させないための取組の1つとして、乾燥調製等を行う建物や設備の清掃を推奨している。しかし、土壌や米中のかびについての報告はあるものの、米の乾燥調製施設内の菌そうについての調査報告は無く、乾燥調製工程において米がかびやかび毒に汚染される可能性の程度は不明である。
- そこで、施設等の清掃の重要性を検証するため、生産者等の協力を得て、米の乾燥調製施設から塵埃等を採取し、菌そうや真菌数の調査を行い、かび毒産生の可能性があるAspergillusが確認された場合には、Aflatoxins (AF) 及びSterigmatocystin (STC) の産生能も調査した。

2. 調査の方法

- 調査地点:** 調査協力が得られた関東地方6箇所、九州地方8箇所の米の乾燥調製施設
- 調査時期:** 平成25年産米の乾燥調製作業開始前から全作業が終了し清掃を実施するまでの間に計5回
- 試料採取方法:** 施設の床面(3箇所)、穀物乾燥機内部(1-3箇所)、粉すり機内部(1箇所)の拭き取り検査枠(10×10 cm)内の塵埃(米くず等を含む。)を滅菌ガーゼで拭き取り(図1参照)
- 試験原液の調製:** 拭き取り試料全量と滅菌水適量を混合・均一化して試験原液を調製
- 真菌調査:** DRBC寒天平板培地上に各段階の希釈液を100 µl塗布して、25°Cで5-6日間培養し、総真菌数の測定、優占上位5属の真菌属の同定及び属毎の菌数測定を行った。優占上位5属は、マクロ観察(集落の色調、組織、大きさ等)及びミクロ観察(顕微鏡下での形態観察等)を行い、観察結果を基に各種文献を参考にして同定した。また、必要に応じてPCA培地、OA培地、CLA培地を用いて観察した。
- かび毒産生菌とその産生能調査:** AF又はSTC産生の可能性があるAspergillusが検出された場合には、PDA平板培地を用いて1点接種し純化を実施し、その後、CYA培地及びMEA培地25°C及び37°Cで7日間培養して、形態観察により種を同定した。この分離菌株の胞子をYES培地に接種し、25°Cで7日間静置培養した後、HPLC-FL法及びHPLC-UV法にて培地中に含まれるAF又はSTCを分析し、かび毒産生能を確認した。
- 採取試料の菌そうの調査及びかび毒産生能の確認は、一般財団法人日本食品分析センターに委託した。



図1 米の乾燥調製施設の全景
(● 試料採取箇所の例)

3. 結果

- 真菌調査**
- 検出率は、室内環境で一般的に高頻度で観察される中湿性かびであるCladosporium、Penicillium、Aspergillusが特に高かった(表1)。
- これらの3つのかび属について、試料採取場所毎の検出率をカイ二乗検定で検定した結果、有意差が認められた(P < 0.01)。

表1 試料採取箇所毎の塵埃から分離されたかびの検出率

かび(属)	検出率(%)			かび(属)	検出率(%)		
	床	乾燥機	粉すり機		床	乾燥機	粉すり機
Absidia	1	2	2	Mucor	0	-	3
Acremonium	7.2	6.4	2	Nigrospora	7.2	9.9	2
Alternaria	7.2	6.9	6	Penicillium	87.4 ^a	73.3 ^b	86
Aspergillus	79.2 ^a	53.0 ^b	49 ^b	Rhizomyces	1	1	-
Cladosporium	92.3 ^a	78.2 ^b	67 ^b	Rhizopus	1	2	2
Curvularia	2	2	3	Scopulariopsis	1	-	2
Epicoccum	1	1	-	Syncephalastrum	4	5.4	-
Eurotium	3	1	6	Trichoderma	7.7	1	2
Fusarium	11	13	21	Wallemia	31	29	36

注釈: 調査試料数は床面試料が306点、乾燥機内試料が220点、粉すり機内試料が64点
すべての箇所検出率が1%未満のかび属、同定できなかった真菌を除く。

● 清掃による減菌の効果

- 塵埃量は、床面では多くても10 g/100 cm²程度であったが、乾燥機や粉すり機では200 g/100 cm²を超える場合があり、多くの粉、玄米、わら等の残存が認められる例があった(図2)。
- 塵埃試料に含まれる総真菌数(表2)は、ほとんどの施設において、米の乾燥調製の作業開始前で、かつ、清掃作業前に採取した試料が最も多く、清掃後に採取した試料では有意に減少(Wilcoxon符号順位検定、P < 0.01)し、特に塵埃量が多かった箇所では3log CFUを超える減菌効果があった。

表2 施設内の調査時期毎の試料中の総真菌数

試料採取箇所	総真菌数 (log CFU/100cm ²)					
	作業開始前		作業実施中	作業終了後		
	清掃前	清掃後		清掃前	清掃後	
床面	5.0-7.8	4.5-6.5	4.5-6.5	3.9-6.5	3.8-6.1	
乾燥機内	4.4-9.1	3.7-6.5	4.3-7.6	5.0-8.0	3.4-6.2	
粉すり機内	3.1-8.5	3.0-6.4	3.4-7.0	0-6.9	2.2-5.5	

注釈: 床面及び穀物乾燥機の総真菌数は、各施設1-3箇所採取した試料の平均値



図2 前回使用後に設備内に放置されていた塵埃や米くず等の例
(右: 乾燥機、左: 粉すり機)

● かび毒産生菌とその産生能(表3)

- AF産生菌としてA. flavusが、STC産生菌としてA. versicolorが分離された。A. parasiticus、A. nomius、A. nidulans等は分離されなかった。
- かび毒産生菌は、地域を問わず、床面、乾燥機内、粉すり機内のいずれの箇所でも採取した塵埃からも、それぞれ検出された。
- 産生菌を接種した培地中のかび毒濃度が、定量限界(AFB₁、 AFB₂、 AFG₁、 AFG₂ 各々1 µg/kg、 STC 50 µg/kg) 以上のものをかび毒産生株と判定した。A. flavusでは93株のうち17株にAFB₁又はAFB₂産生能が、A. versicolorでは174株のうち82株にSTC産生能が認められた。

表3 塵埃からのA. flavus及びA. versicolorの分離数とそのかび毒産生能

調査地点	A. flavus			A. versicolor				
	分離数	AF産生株数	AF産生能(µg/kg)	分離数	STC産生株数	STC産生能(µg/kg)	検出箇所	
関東1	2	0	-	乾, 粉	8	2	50-110	床, 乾
関東2	0	-	-	16	10	60-440	床, 乾, 粉	
関東3	0	-	-	6	2	120-240	床, 乾	
関東4	18	13	10-720	床, 乾, 粉	15	6	60-260	床, 乾, 粉
関東5	1	0	-	床	6	3	60-120	床, 乾
関東6	3	0	-	床	4	2	90-110	床
九州1	23	0	-	床, 乾, 粉	6	2	70-270	床, 乾
九州2	1	1	35	床	27	9	60-230	床, 乾, 粉
九州3	2	1	580	床, 粉	23	13	60-350	床, 乾, 粉
九州4	12	1	300	床, 乾, 粉	12	9	60-300	床, 乾, 粉
九州5	0	-	-	18	7	50-310	床, 乾, 粉	
九州6	11	0	-	床, 乾, 粉	22	14	70-400	床, 乾, 粉
九州7	9	0	-	床, 乾	8	3	90-120	床, 乾
九州8	11	1	48	床, 乾, 粉	3	0	-	床
合計	93	17	-	174	82	-	-	

注釈: 検出箇所の“床”は床面、“乾”は穀物乾燥機内、“粉”は粉すり機内を表す。
産生能は、定量限界以上であったYES培地中のかび毒の濃度範囲である。
(AFについてはAFB₁の濃度のみを示した。)

4. 考察及び今後の予定

- 本調査によって初めて、米の乾燥調製施設内の各所の塵埃中に、施設での作業実施期間を通して、かび毒産生能があるA. flavusやA. versicolorが存在することが明らかとなった。これらのかびが米に付着した場合に、米の貯蔵条件によっては、かび毒汚染が発生する可能性がある。
- 乾燥機や粉すり機は内部構造が複雑で、塵埃除去が困難な場所があるものの、平滑な面が多いため清掃の減菌効果は高いことが確認された。乾燥調製作業前後の施設・設備の清掃は、かびの量を減らすことから、乾燥調製工程以降に生じる米のかび及びかび毒による汚染の未然防止に有効と考えられる。
- 農林水産省は、今回の知見を活用し、「ガイドライン」を充実させ、関係者と連携して生産者等に普及を図っていく。