

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業

「国産農産物中のかび毒及びかび毒類縁体の動態解明並びに汚染の防止及び低減に関する研究」

令和４年度 最終年度報告書

課題番号	18072043
課題名	国産農産物中のかび毒及びかび毒類縁体の動態解明並びに汚染の防止及び低減に関する研究

研究実施期間	平成３０年度～令和４年度（５年間）
代表機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
研究総括者	久城 真代
研究総括者 連絡先	TEL : 029-838-8037
	FAX : 029-838-7996
	E-mail : kushirom@affrc.go.jp
共同研究機関	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 （九州沖縄農業研究センター）（基盤技術研究本部）
	宮城県古川農業試験場
	学校法人麻布獣医学園麻布大学
	国立大学法人東海国立大学機構岐阜大学
	学校法人金井学園福井工業大学

＜別紙様式 3＞最終年度報告書

1 研究目的

麦類赤かび病は、世界中で発生している麦の最重要病害であり、収量・品質低下をもたらすのみならず、かび毒（デオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)等)を子実に蓄積することがある。近年、諸外国で麦子実におけるDON配糖体が注目されているが、蓄積量の情報が少なく、類縁体を含めたかび毒の分析法の高度化が望まれている。また、麦類穀粒等、農産物中及び環境中のかび毒産生菌（DON、NIV等のトリコテセン並びにアフラトキシン(AF)）の分布実態が明らかにされていない。

このため、本研究では、以下の(i), (ii)と小課題（1., 2., 3.）

(i) 麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発

1. 麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発

1－[1] 登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析

1－[2] 麦類穀粒中のかび毒とその類縁体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発

(ii) 麦類穀粒等、農産物中及び環境中のかび毒産生菌の分布実態の解明

2. DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発

3. AF産生菌の診断方法の高度化と産生菌の分布調査

により、小麦、大麦等の主要穀物及び主要農産物中のかび毒及びかび毒類縁体（主にDON、NIV、AF）汚染実態を明らかにし、汚染を防止、抑制、低減し、安全性の高い国産農産物を安定的に供給する技術を開発することを目標とする。

その結果、

1. 行政部局によるリスク管理措置のための科学的エビデンスの提示

2. 簡易判別・検出法の現場への普及

が期待される。

2 研究内容

(1) 研究課題

小課題1) 麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発 (井上博喜・九州沖縄農業研究センター)

小麦において赤かび粒率、デオキシニバレノール (DON) の規格基準が設定されている。DONとともに共汚染が多いニバレノール (NIV) ならびにDON配糖体 (DON-3G) の分析法を確立し、子実登熟過程での消長を解析する。さらに迅速・簡便な検知法を検討する。

(実行課題(1)) 登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析

DON、NIVならびにDON-3GのLC-MS/MSでの分析法を確立し、子実の登熟過程での蓄積性を解析する。

(実行課題(2)) 麦類穀粒中のかび毒とその類縁体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発

外観健全粒でもかび毒の蓄積が見いだされることから、DON、NIVの簡便な検知法を検討する。とくにNIVの特異的抗体の取得をめざす。

小課題2) DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発 (須賀晴久・岐阜大学)

国産の麦類は、麦類赤かび病菌が産生するトリコテセン系かび毒の汚染が問題になっている。トリコテセンにはデオキシニバレノール (DON) やニバレノール (NIV)、またそれらのアセチル体が知られており、産生菌は大きく3-アセチルDON型 (3ADON型)、15-アセチルDON型 (15A DON型)、NIV型の3タイプに分けられる。これまでの調査でそれら産生タイプの国内分布に偏りがみられているが、調査数が限定的で、地域による違いの実態は把握できていない。産生タイプの診断にはPCR法が開発されているが、大規模調査には、PCR後の産物を短時間かつ簡易に分析する技術が求められる。そこで本課題ではDNAストリップを利用して、麦類赤かび病菌が産生するトリコテセンの毒素型の簡易判定が可能な方法を開発する。

小課題3) AF産生菌の診断方法の高度化と産生菌の分布調査 (矢部希見子・福井工業大学)

近年、温帯地域でも*Aspergillus nomius*や*Aspergillus tamarii*などマイナーなAF産生菌が報告されてきている。AF産生菌の診断方法 (ジクロロボスーアンモニア法 (DV-AM法)) の高度化を検討するとともに、改良DV-AM法によりAF産生菌のスクリーニングを行い、その分布を明らかにする。

(2) 達成目標

冒頭の研究目的のとおり、

- 小課題1. では、小麦・大麦の登熟過程におけるDONおよびDON配糖体の蓄積消長解析を行うための過年度データを統合的に解析し、子実粒中の蓄積消長の傾向を明らかにする。小課題2.、小課題3. では、現存の判別法よりも簡便な産生菌の診断技術を1種類以上開発する。

(3) 研究開発された成果の取扱い

小課題1のうち、蓄積性や低減技術については、学会発表や論文等により公表し実需者と共有をめざす。一方、迅速・簡便な検知法においては、DON や NIV に反応するモノクローナル抗体の作製を目指し、進捗状況を行政部局と共有しつつ知財化を検討する。

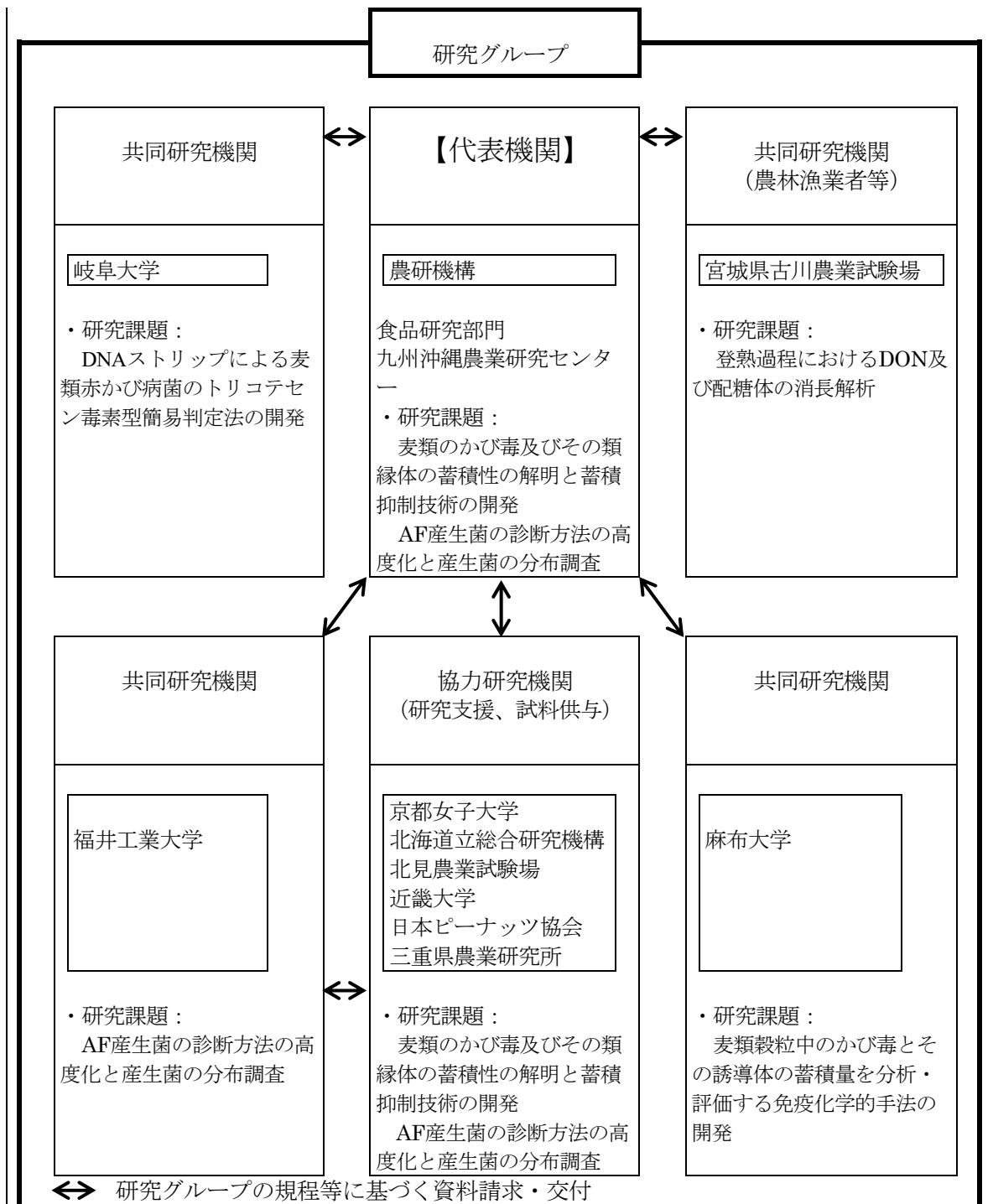
小課題2及び小課題3については、共同研究機関、研究協力機関等と協力し、圃場等で使用可能なかび毒産生菌の検出・判定法について知財化を検討し、可能であればキット化などを行う。ただし本研究課題で得られるかび毒産生菌の分布や動態についての知見は、有害化学物質に関わるものであることから、行政部局と相談しながら、慎重に進める。

(4) 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	H30	H31	R2	R3	R4	機関	研究室
1. 麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発 (1) 登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析	登熟過程の麦粒サンプリングならびにDON及び配糖体等の分析					農研機構九冲農研 宮城県古川農試 農研機構食品研究部門	生産環境研究領域 作物環境部 食品安全研究領域
	国産麦類で分析法の妥当性確認						
	データ解析と検証						
(2) 麦類穀粒中のかび毒とその誘導体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発	抗原の調製					麻布大学	食品衛生学研究室 食品安全科学研究所 薬理学研究室
	抗体の取得						
	免疫測定法開発とその検証						
2. DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発	プライマー設計・PCR条件検討					岐阜大学	研究推進・社会連携機構
	DNAストリップ作成・PCR産物と反応条件の最適化						
	診断法の高度化						
3. AF産生菌の診断方法の高度化と産生菌の分布調査	AF産生菌の分布調査とデータの取りまとめ					福井工業大学	環境食品応用化学科
						農研機構食品研究部門	食品化学ハザードユニット

(5) 研究体制

全ての参画機関が連携し、試料の共有、分析・判別法の検証を行った。



(6) 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者	エフォート (%)
	機関	研究室		
研究開発責任者	農研機構・食品研究部門	食品安全・信頼グループ	◎ 久城真代	20
1. 麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積制御技術の開発	農研機構・九州沖縄農業研究センター	作物・野菜栽培グループ	○ 井上博喜 (前任者 宮坂篤2018.8～2020.3)	20
(1) 登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析	宮城県古川農業試験場	作物環境部	△ 宮野法近 狐塚慶子 (2022.4～ (前任者 高城拓未2019.4～2022.3) (前々任者 櫻田史彦2018.8～2019.3)	15 5
	農研機構・九州沖縄農業研究センター	作物・野菜栽培グループ	△ 井上博喜 (2019.4～) 宮坂篤(2018.8～2020.3)	前出
		生理活性物質分析ユニット	△ 中川博之	30
	農研機構・高度分析研究センター	食品安全・信頼グループ	古川智宏 (2020.4～)	15
	農研機構・食品研究部門	食品安全・信頼グループ	鈴木忠宏 (2022.4～)	15
(2) 麦類穀粒中のかび毒とその類縁体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発	麻布大学	食品衛生学研究室 食品安全科学研究室 薬理学研究室	△ 三宅司郎 小林直樹 福山朋季 (2019.4～)	20 20 10
		公衆衛生学第一研究室	杉田和俊 (2019.8～)	10
2. DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発	岐阜大学	研究推進・社会連携機構	○ 須賀晴久 林 将大	15 10
3. AF産生菌の診断方法の高度化と産生菌の分布調査	福井工業大学	環境食品応用化学科	○ 矢部希見子	20
	農研機構・食品研究部門	食品安全・信頼グループ	久城真代	前出

(注1) 研究総括者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

(7) 各年度の研究費

平成30年度	20,000,000円
令和 元年度	17,560,000円
令和 2年度	15,277,000円
令和 3年度	13,291,000円
令和 4年度	11,962,000円

3 研究成果の概要

(1) 主な成果

1) 成果の内容

小課題1－実行課題（1）：「登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析」

複数年間にわたる栽培試験ならびにLC-MS/MS測定により、以下の知見を得た。

- ・ 麦類赤かび病のかび毒を抑制するには、化学農薬による防除が有効であり、大麦では1回より2回、小麦では2回より3回防除の実施で発病穂率を抑制することが重要である。
- ・ 大麦（はるか二条）では、小麦（ミナミノカオリ）に比べて、かび毒中におけるD3G（DONの配糖体）、3AD（DONのアセチル化体）の割合が高い。
- ・ 化学農薬による防除により、DON、NIVだけでなく、D3G、3ADの低減も図る事が可能である。
- ・ 2019～2020年にかけて宮城および熊本で実施した小麦・大麦の赤かび病の防除試験の結果をメタアナリシスで統合した結果、発病穂率およびかび毒蓄積濃度において、無処理区と防除区の間で有意差があった。化学農薬による防除によって、発病穂率が約36%低減でき、かび毒濃度も約4500 μ g/kg低減できると予測出来た。

小課題1－実行課題（2）：「麦類穀粒中のかび毒とその類縁体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発」

DONに対して特異性の高い抗DONモノクローナル抗体のみならず、NIVに対して高い特異性を有する抗NIVモノクローナル抗体を世界に先駆けて作出した。

小課題2：「DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発」

DNAストリップを利用してムギ類赤かび病菌の菌種とトリコテセン毒素型を簡易に判定するための方法、また、ムギ類赤かび病菌を分離するための新たな培地としてFG21を開発した。

小課題3：「AF生産菌の診断方法の高度化と生産菌の分布調査」

DV-AM法に用いる培地の改良により診断方法を高度化し、動態・分布に関する新規の知見を得た。

- ・ DOCを利用したDV-AM法は、土壌を含め様々な試料中のAF生産菌の検出に有効である。
- ・ AF生産菌は日本全国の土壌に広く分布する。
- ・ 昆虫や食品流通がAF生産菌の動態に関与する。

2) 成果の活用

小課題1－実行課題（1）：普及に移す技術（宮城県）としてHP掲載により全国的に情報提供する予定。

小課題1－実行課題（2）：麻布大学から特許出願（海外へもPCT出願）抗体を用いた免疫測定法や免疫センサーに応用し、実施許諾をめざす。

小課題2：国内のムギ類赤かび病菌について、菌種やトリコテセン毒素型の地域によ

る違いや、年次による違いの調査に活用される。

小課題3：DOCを利用したDV-AM法の国内外への普及を行う。

(2) 各研究課題の成果

1) 小課題名：麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発

小課題1－実行課題(1)：登熟過程におけるDON及び配糖体の消長解析

(ア) 研究目標

小麦及び大麦において、穀類中に蓄積しうるデオキシニバレノール (DON)、ニバレノール (NIV) 等のトリコセセン系かび毒とそれらのアセチル体、配糖体 (DON-3-グルコシド (D3G) 等) のような類縁体について、子実の成育ステージでの蓄積量を解析し、麦の品種等の遺伝的要因や、栽培体系等の環境的要因が、類縁体を含めたかび毒の蓄積性に及ぼす影響を調べる。

(イ) 研究内容

小麦、大麦の主要品種を試験圃場に栽培し、赤かび病菌の接種と薬剤散布処理を行い、開花後日数別に収穫し、かび毒の濃度が異なるサンプルを作出、農研機構及び参画機関へ提供した。また、開花後日数別、防除時期別のかび毒濃度の推移を確認した。

(ウ) 研究結果

宮城県古川農試での試験

- ・大麦 (ミノリムギ) のDON, NIVは実際の収穫期となる開花後40, 50日では2回防除 (1回+10) が最も低かった (図1)。
- ・夏黄金のDON, NIVは実際の収穫期となる開花後40, 50日では50日の方がやや低くなり、2回防除と3回防除では僅かではあるが3回防除の方が濃度は低くなった (図2)。
- ・開花25日前後の赤かび病発病率とかび毒の濃度との間に正の相関が見られた (図3, 4)。
- ・麦類赤かび病のかび毒を抑制するには、化学農薬による防除が有効であり、大麦では1回より2回、小麦では2回より3回防除の実施で発病率を抑制することが重要である。

熊本県九沖農研での試験

- ・小麦 (ミナミノカオリ) および大麦 (はるか二条) のかび毒およびその類縁体の濃度を測定したところ、大麦 (はるか二条) では、全かび毒量に対するDONの配糖体 (D3G) の割合が小麦 (ミナミノカオリ) よりも高かった (図5)。
- ・小麦 (ミナミノカオリ) においては、DONのアセチル化体 (3AD) は少ない一方で、大麦 (はるか二条) では全かび毒量のうち7~10%程度を占めていた (図5)。
- ・小麦 (ミナミノカオリ) および大麦 (はるか二条) に対して化学農薬による防除を2回実施したところ、かび毒濃度は大きく減少し、DON類縁体 (D3G, 3AD) についても同様に減少した (図5)。
- ・2019~2020年における宮城県および熊本県での小麦・大麦の赤かび病の発病試験をメタアナリシスで統合して解析した。無処理区と処理区 (化学農薬による防除有) において、有意差が認められ、処理区においては、無処理区の発病率の36%まで減少していた (図6)。
- ・上記と同様に、2019~2020年における熊本県での小麦・大麦のかび毒蓄積量 (DON, NIV, D3G, 3ADの合計) をメタアナリシスで解析した。無処理区と処理区 (化学農薬による防除有) において、有意差が認められ、処理区においては、無処理区のかび毒濃度より4500 μ g/kg減少していた (図7)。
- ・2022年単年の試験では、農薬の種類により、かび毒蓄積量に若干の差が認められた (図8)。

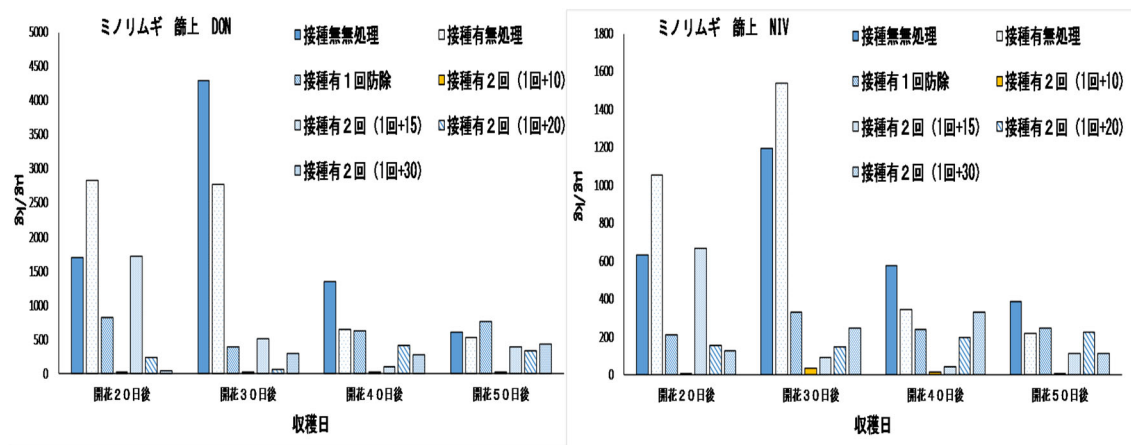


図1 宮城県古川農試で栽培したミノリムギのかび毒（DON, NIV）の推移

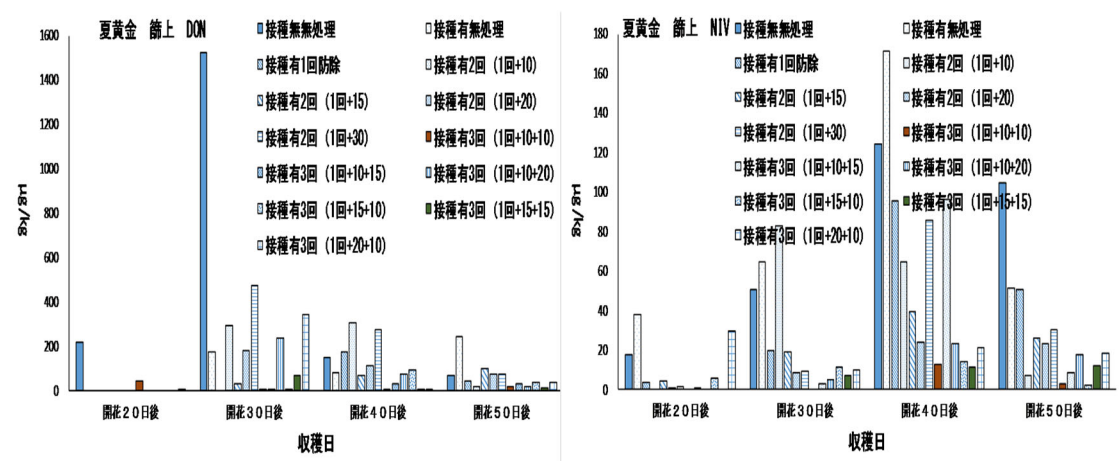


図2 宮城県古川農試で栽培した夏黄金のかび毒（DON, NIV）の推移

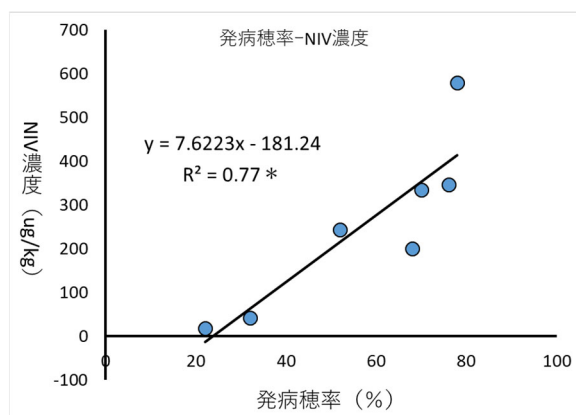


図3 ミノリムギの開花25日後発病率と開花40日後採取サンプルのNIV濃度

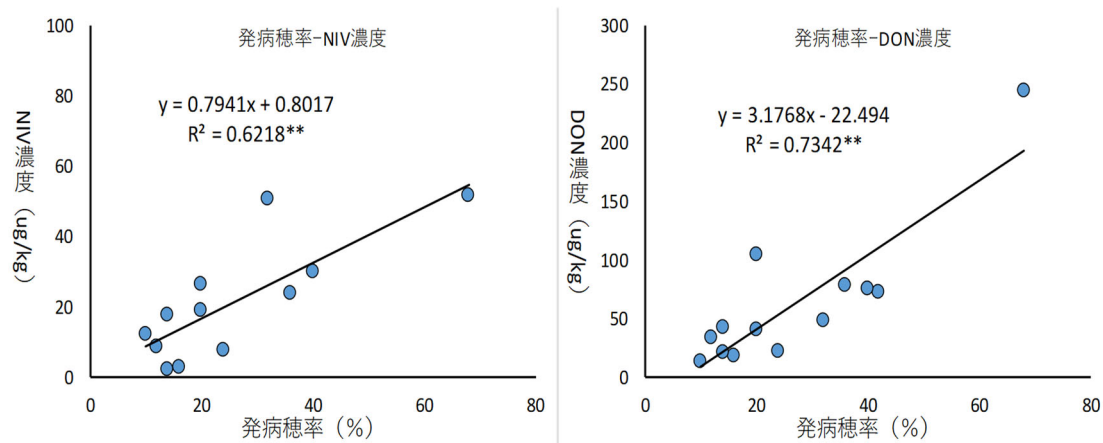


図4 夏黄金の開花26日後発病穂率と開花50日後採取サンプルのNIV, DON濃度

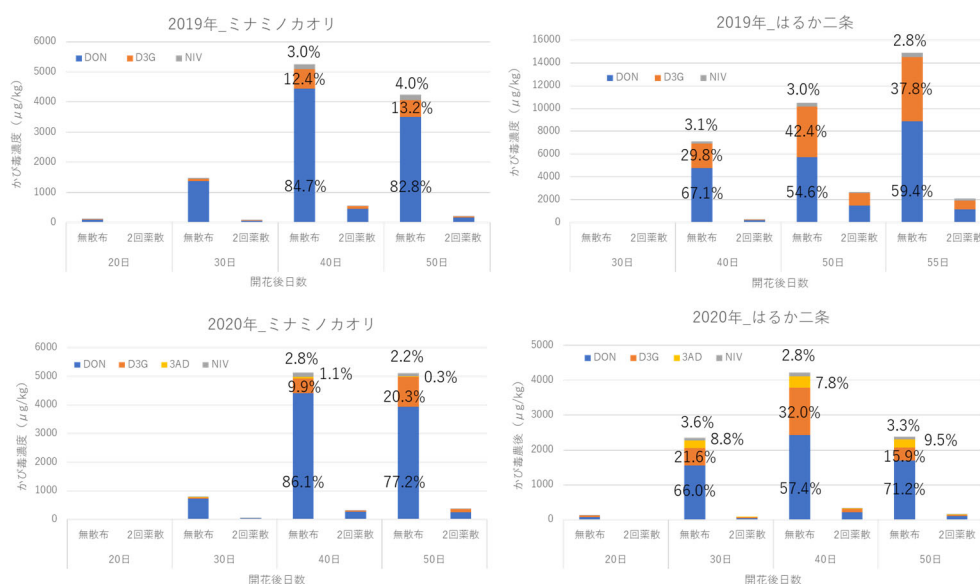


図5 熊本県九沖農研で栽培した小麦（ミナミノカオリ）および大麦（はるか二条）の登熟過程におけるかび毒濃度の推移
グラフ中のパーセント（%）は各かび毒（DON、D3G、3AD、NIV）の占める比率

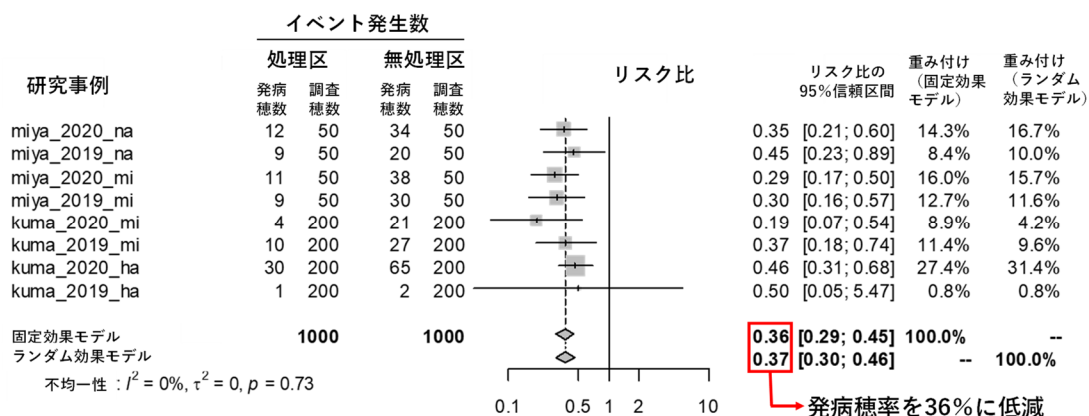


図6. 2019 (R1) ~2020 (R2) 年の宮城、熊本における大麦・小麦の赤かび病「発病穂率」でのメタアナリシス

miya_xxxx_na: 【試験地】宮城県、【品種】夏黄金
 miya_xxxx_mi: 【試験地】宮城県、【品種】ミノリムギ
 kuma_xxxx_mi: 【試験地】熊本県、【品種】ミナミノカオリ
 kuma_xxxx_ha: 【試験地】熊本県、【品種】はるか二条
 xxxxは試験年。
 処理区は農薬による防除あり、無処理区は防除なし

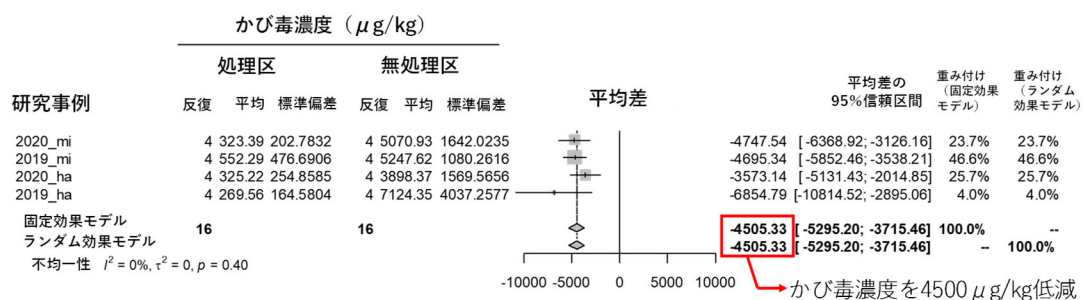
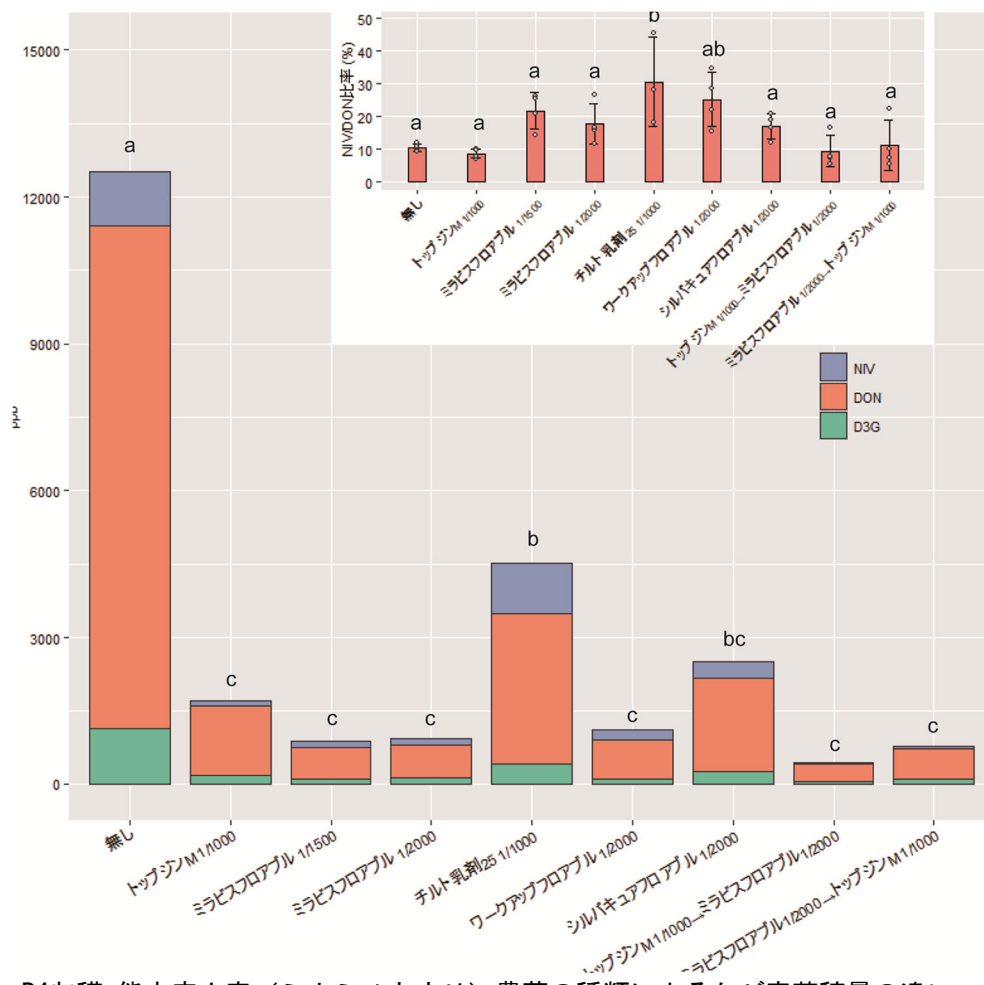


図7. 2019 (R1) ~2020年の熊本における大麦・小麦の「かび毒濃度」のメタアナリシス

xxxx_mi: 【試験地】熊本県、【品種】ミナミノカオリ
 xxxx_ha: 【試験地】熊本県、【品種】はるか二条
 xxxxは試験年。
 かび毒濃度は、DON、D3G、NIVの合計。
 処理区は農薬による防除あり、無処理区は防除なし



8. R4収穫 熊本産小麦（ミナミノカオリ）農薬の種類によるかび毒蓄積量の違い

（エ）研究成果の活用における留意点

- ・今回の試験は平成30年から令和4年にかけて、宮城県大崎市の古川農業試験場内圃場および熊本県合志市の九州沖縄農業研究センター内圃場で実施されたものである。
- ・使用した品種は、宮城県では大麦が「ミノリムギ」、小麦が「夏黄金」、熊本県では大麦が「はるか二条」、小麦が「ミナミノカオリ」である。
- ・使用した薬剤は、宮城県ではテブコナゾール剤（商品名シルバキュアフロアブル、2000倍、150L/10a）、熊本県ではチオファネートメチル水和剤（商品名トップジンM水和剤、1000倍、150L/10a）である。
- ・宮城県では播種が概ね10月後半、収穫は翌年6～7月、播種量は8kg/10aで実施した。熊本県では、11月下旬播種、翌年5～6月収穫、播種量は約3kg/10aであった。試験は出穂前に赤かび病菌を培養したトウモロコシ粒を条間に散布して接種を行い、灌水チューブによる散水を行って、発病を促した。

（オ）研究目標の達成に当たっての問題点

今回、当初目的としたデオキシニバレノール（DON）、ニバレノール（NIV）等のトリコセセン系かび毒とそれらのアセチル体や配糖体（3-アセチルデオキシニバレノール（3AD）、DON-3-グルコシド（D3G）等）の動態は麦種毎に概ね把握できた。また、麦類の

かび毒抑制のため、化学農薬を用いた防除が有効であることが明らかになった。しかし、小麦および大麦におけるかび毒種毎の蓄積性の品種間差や、使用する薬剤によるかび毒種毎の蓄積性の差は十分検討できなかった。生産現場へ普及するためには、これらのデータを併せて提示する必要があると考えられた。

2) 小課題名：麦類のかび毒及びその類縁体の蓄積性の解明と蓄積抑制技術の開発

小課題1－実行課題（2）：麦類穀粒中のかび毒とその類縁体の蓄積量を分析・評価する免疫化学的手法の開発

（ア）研究目標

現時点で国産農産物に適用可能なNIVを認識できる抗体が無いことから、DON、NIV、類縁体を別個に、もしくは共通のトリコセン骨格を認識できる抗体の作製をめざす。抗体を得た後は、反応特性を確認して免疫測定法や免疫センサーに応用し、麦類穀粒中のかび毒分析法開発を進める。

（イ）研究内容

低分子化合物のDON、NIV、およびその類縁体は、いわゆるハプテンであり、リンカーなどを經由してタンパク質と結合することにより抗体の産生能が生じる。ところが、DONはリンカーを結合可能なOH基がその構造中に3ヶ所、NIVは4ヶ所存在し、選択的な導入が困難と考えられた。その後、DONやNIVの7位のOH基は、立体障害によって反応に寄与しないことが判明した。その結果、DONの場合は、リンカー分子をDONと等モルで反応させると2ヶ所のOH基のどちらかへメジャーに入り、そのリンカー位置に対する抗体が作製可能と理解された。したがって、NIVに対する抗体を作製するには、3位、4位、15位のいずれかのOH基へ選択的にリンカーを導入すれば良いと考えられる。そこで、DON、NIV、および3-アセチルDON（3-AC-DON）に対する選択的なリンカーの導入を各々試み、いずれにおいても選択的な導入と抗体の作製に成功した。特にNIVについては、作製した抗体を用いて直接競合ELISA（代表的な免疫測定法）を構築し、小麦や大麦を汚染しているNIVの測定に適用した。構築した直接競合ELISAは、LC-MS/MSの結果と比較することで、実際に小麦や大麦中のNIVを検出できることを見出した。

（ウ）研究結果

本研究を実施するにあたっては、まずリンカーを導入するためのDONとNIVが必要だった。しかし、これらのかび毒は構造が複雑で化学合成が困難だったため、DONあるいはNIVを産生するかびを培養し、その培養物からの調製を試みた。*Fusarium*属菌株29株を入手し、押し麦を用いた固形培地を用いて20℃で2週間静置培養することで、DONを産生する*F. graminearum*の一株とNIVを産生する*F. kyushuense*の一株を見出した。（以下詳述：具体的な結果については、NIVを例に記載）

次に、培養物からDON、およびNIVの精製を試みた。NIVを固形の培養物(900 g)から蒸留水(4.5 L)で水抽出し、ダイアイオンHP-20 (300 mL)に吸着させた。蒸留水で洗浄後にメタノール(450 mL)で溶出させた。エバポレーターで濃縮し、酢酸エチル：メタノール(8:1, 3 mL)に懸濁後、以下のカラムに用いるシリカゲル(1 mL; シリカゲル 60, 粒径0.063-0.200 mm)を加えて、超音波中で分散させ吸着させた。そのスラリーをシリカゲルカラム(200 mm, 内径30 mm)にかけて精製した。溶出面分をエバポレーターで濃縮乾固し、5%アセトニトリル(1 mL)で溶解して冷蔵庫で一晩冷やすことによりNIVを析出さ

せ単離した。同様にDONを単離した。

単離したNIV (20 mg)、グルタル酸無水物 (23 mg) を用いて、15位へのグルタル酸の選択的な導入を試みた。DMSO (1 mL) とクロロフォルム (10 mL) の混合液中でNIV、グルタル酸無水物、4-ジメチルアミノピリジン (2.4 mg) を加えて、25°Cで3時間攪拌し、1%酢酸で抽出した。分取HPLCに掛けて、15-グルタリルNIV (15-Glt-NIV, 2 mg) を調製し、NMRで構造を確認した。同様に、15-Glt-DONと3-AC-15-Glt-DONを調製した。

調製した各リンカー導入化合物を用いて、所定の方法で各々マウスモノクローナル抗体を作製した。その結果、直接競合ELISAにおいてDONと15-AC-DONとに特異的に反応する抗体 (50%阻害濃度 (IC_{50} 値) : DON 40 ng/mL, 15-AC-DON 16 ng/mL)、NIVと特異的に反応する抗体 (IC_{50} 値: NIV 36 ng/mL およびNIV 3.1 ng/mL)、3-AC-DONと特異的に反応する抗体 (IC_{50} 値: 3-AC-DON 30 ng/mL) を作製できた。

作製したモノクローナル抗体のうち、NIVと3.1 ng/mLの IC_{50} 値で反応した抗体を用いて、改めて直接競合ELISAを構築した。その基本性能は、測定範囲が0.7-14 ng/mL、小麦への添加回収試験が (1.0 μ g/g添加: 回収率 98%, 0.1 μ g/g添加: 回収率 90%)、大麦の場合が (1.0 μ g/g添加: 回収率 106%, 0.1 μ g/g添加: 回収率 98%) と良好な結果を示した。そこで実試料 (小麦と大麦) の測定を試み、LC-MS/MSのデータと比較した。現在までに小麦は18試料を測定し、 $y=1.2x+0.003$, $R^2=0.91$ と良好な相関性の結果を得た。一方、大麦は17試料を測定し、 $y=0.78x+0.12$, $R^2=0.66$ と小麦と比較してばらつきを認めるものの正に相関する結果を得た。

(全研究期間を通しての小課題の総括的な研究結果を記載する。)

(エ) 研究成果の活用における留意点

研究成果は、麻布大学から特許出願 (海外へもPCT出願) した。したがって、産業利用に際しては、本特許が利用可能である。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

本実行課題における目標は、達成した。

3) 小課題2 : DNAストリップによる麦類赤かび病菌のトリコテセン毒素型簡易判定法の開発

(ア) 研究目標

国産の麦類は、ムギ類赤かび病菌が産生するトリコテセン系かび毒の汚染が問題になっている。トリコテセンにはデオキシニバレノール (DON) やニバレノール (NIV)、またそれらのアセチル化体が知られており、産生菌は大きく3-アセチルDON型 (3ADON型)、15-アセチルDON型 (15ADON型)、NIV型の3型に分けられる。ムギ類赤かび病菌では菌種と毒素型の診断としてマルチプレックスPCR後の産物をアガロースゲル電気泳動に供試する方法がとられているが、大規模調査のためには、より効率的にムギ類赤かび病菌を分離し、簡易に菌種と毒素型を分析する技術が求められる。本課題ではムギ類赤かび病菌を効率的に分離するための培地及びアガロースゲル電気泳動に替わる簡易な菌種と毒素型の判定技術としてDNAストリップの開発を目標とした。

(イ) 研究内容

トリコテセン毒素型判定のための、また、菌種判定のためのPCR用プライマーをデザインし、あらかじめ菌種とトリコテセン毒素型が判明しているムギ類赤かび病菌を用いてマルチプレックスPCRで機能するものを探した。その結果、機能すると判断されたプ

ライマーについて、PCR増幅産物をDNAストリップで検出できるようにプライマーの末端にタグを付加した。それらのプライマーにより、あらかじめ菌種とトリコテセン毒素型が判明していたムギ類赤かび病菌を用い、菌種とトリコテセン毒素型を正しく判定するためのマルチプレックスPCR及びDNAストリップ分析の条件を見出した。ここではマルチプレックスPCRに用いるムギ類赤かび病菌のDNAについて、培地上の現れたムギ類赤かび病菌コロニーの菌糸から直接、簡易に抽出する方法も確立した。更にムギ類赤かび病菌分離用培地を開発し、実際の麦試料からムギ類赤かび病菌のコロニーを分離し、DNAストリップによりそれぞれのコロニーの菌種とトリコテセン毒素型を判定する実証試験を行った。

(ウ) 研究結果

DNAストリップの開発

3ADON型、15ADON型、NIV型を識別するために利用されているマルチプレックスPCR用のプライマーに、DNAストリップを利用できるようにするためのタグを付加した。あらかじめトリコテセン毒素型が分かっているムギ類赤かび病菌株を用いてタグ化プライマーがPCRで機能するかを調べたところ、*Tri3*遺伝子を標的としたマルチプレックスPCR用プライマー(Starkey *et al* 2007) (表1)が機能することが分かった。更に、国内の主要なムギ類赤かび病菌の菌種、*Fusarium graminearum* sensu stricto (s. str.) と *Fusarium asiaticum*のPCRによる識別を目的に、両菌種の全ゲノム塩基配列情報(Walkowiak *et al* 2016)を利用してそれぞれの菌種にのみ存在する遺伝子を標的とするPCR用プライマーをデザインした。それら菌種判定用プライマーについてはDNAストリップ上での反応がトリコテセン毒素型判定用のプライマーと競合しないようなタグを付加した。あらかじめ菌種が分かっているムギ類赤かび病菌株を用いてタグ化プライマーが菌種判定用のマルチプレックスPCRとして機能するかを調べたところ、*F. graminearum* s. str. についてはアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子(*FGSG17538*)、*F. asiaticum*については非リボソームペプチド合成酵素遺伝子(*APS1*)を標的としたプライマーセットがマルチプレックスPCRで機能すると分かった(表1)。あらかじめトリコテセン毒素型と菌種が分かっていた菌株シリーズは、これらを使用したマルチプレックスPCR及びそれに続くDNAストリップ検出により正しく判定できることが確認された(表2、図1) (Suga *et al* 2022)。ここではこれまでムギ類赤かび病菌として国内例がほとんどない菌種の *Fusarium vorosii*も用いたが、DNAストリップにおける菌種判定については陰性反応であった(図1)。

表1 DNAストリップによるトリコテセン毒素型及び菌種判定のためのPCR用プライマー

	プライマー	塩基配列5'-----3' (ビオチン及びタグはDNAストリップ検出用修飾)	増幅されるDNAの サイズ(bp)	備考
トリコテセン毒素型判定用マルチプライマーセット	3CON	ビオチン-TGGCAAGACTGGTTCAC		毒素型共通R ^{a)}
	3D15A	タグX-ACTGACCCAAAGCTGCCATC	610	15ADONのF ^{b)}
	3D3A	タグY-CGCATTGGCTAACACATG	243	3ADONのF
	3NA	タグZ-GTGCACAGAATATACGAGC	840	NIVのF
菌種判定用マルチプライマーセット	HS1039	ビオチン-GCAGCCAGGCCATATTCAGT	317	<i>F. graminearum</i> s.str.のR
	HS976	タグW-CAAGTCAAGTCTTCCACCGT		<i>F. graminearum</i> s.str.のF
	HS1035	ビオチン-GTGGGCCGTACATGTTGA	332	<i>F. asiaticum</i> のR
	HS974	タグV-GCTGGCATGGTTGATATGGG		<i>F. asiaticum</i> のF

a) RはReverse プライマーのこと。

b) FはForward プライマーのこと。

表2 使用菌株

菌種	トリコテセン毒素型	菌株 ^{a)}	菌株略称 ^{b)}
<i>F. graminearum</i> s. str.	3ADON	0101020株	Fg 3A DON
	15ADON	0201201株	Fg 15A DON
<i>F. asiaticum</i>	3ADON	0244004株	Fa 3A DON
	NIV	0239005株	Fa NIV
	15ADON	0343747株	Fa 15A DON
<i>F. varosii</i>	15ADON	0301112株	Fv 15A DON

a) Suga *et al* (2008) で菌種とトリコテセン毒素型が判明していた菌株。

b) 図1におけるサンプル名。Fg、Fa、Fvは菌種。3A DONは青、15A DONは赤、NIVは緑で示した。

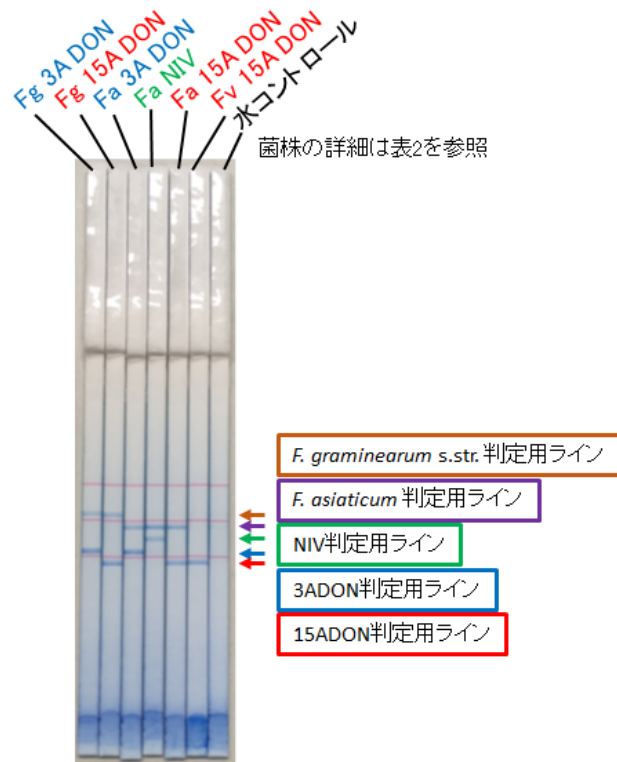


図1 DNAストリップによる菌種とトリコテセン毒素型判定結果

菌体からの簡易DNA抽出法

DNAストリップで菌種とトリコテセン毒素型を分析するには菌コロニーのDNAが必要となるため、寒天培地上で増殖したコロニーの菌糸塊から簡易にDNAを抽出する方法を検討した。菌糸塊をカネカ簡易DNA抽出 Kit Version 2(カネカ社)の抽出液に浸して熱をかけるだけのメーカーの説明書に従った抽出法で得たDNA溶液では安定したマルチプレックスPCRの増幅が起きなかった。そこで抽出時に小ネジを2つ入れて短時間のボルテックスで菌糸塊を破碎するようにしたところ、得られたDNA溶液で安定したマルチプレックスPCRの増幅が起きようになった(Suga *et al* 2022)。

ムギ類赤かび病菌分離用培地の開発

DNAストリップを使用した大規模菌株調査には、ムギ類赤かび病菌を効率的に分離す

るための培地が必要である。これまでにムギ類赤かび病菌の分離用培地として駒田培地をベースとしたFG培地が用いられてきたが、FG培地は、現在では入手困難な農薬ペンタクロロニトロベンゼン(PCNB)が選択分離の主要成分となっている。そこでPCNBを含まない新たな分離用培地を開発した。市販されている農薬、抗生物質、界面活性剤をジャガイモ煎汁寒天培地(PDA)や、オートミール、コーンミール、サブローブロス、マルトエキスをベースに添加した培地を用意した。そこにムギ類赤かび病菌や、その近縁菌種、また、ムギから分離された菌類を移植して増殖の有無、増殖した際のスピードや赤くなるかを調べた。その結果、最終0.125%(w/v) クロラムフェニコール、0.015%(w/v) リゾレックス水和剤、0.05%(v/v) Tergitol type NP-10、0.1%(w/v) コール酸ナトリウム、0.01%(w/v) トリフミン水和剤を添加したPDAがムギ類赤かび病菌の分離に適していると判断され、FG21培地と命名した(Suga *et al* 2022)。ムギ類赤かび病菌やその近縁菌種、また、ムギから分離された菌類について、新たに開発したFG21培地、駒田培地、FG培地上の増殖を比較したところ、駒田培地ではムギ類赤かび病菌がほとんど増殖せず、FG21培地とFG培地では試験した菌は同じような増殖性が認められた(図2)。

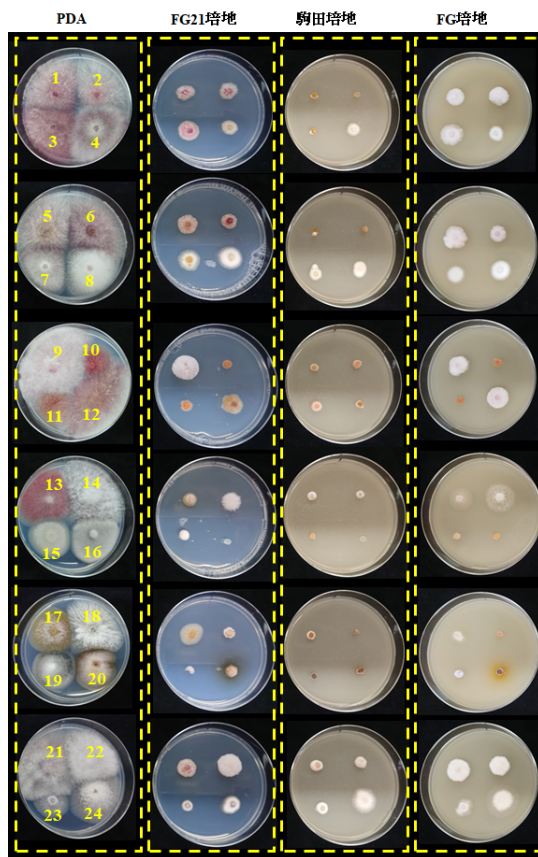


図2. 増殖試験によるムギ類赤かび病菌分離のための培地比較

25°Cで4日間培養した結果。*F. graminearum* s. str. Fg0101020 (1)、Fg0201201 (2)、*F. asiaticum* Fa0244004 (3)、Fa0239005 (4)、*F. vorosii* Fv0301112 (5)、Fv0301831 (6)、*F. avenaceum* MAFF101042 (7)、MAFF235547 (8)、*F. culmorum* MAFF101144 (9)、NRRL3288 (10)、*F. cerealis* NRRL25805 (11)、NRRL13721 (12)、*F. poae* MAFF236500 (13)、MAFF236648 (14)、*Microdochium nivale* MAFF235834 (15)、MAFF236681 (16)、*Fusarium* sp. F1904008 (17)、*Pestalotiopsis* sp. P1904014 (18)、*Alternaria* sp. A1904015 (19)、*Epicothium* sp. E1904019 (20)、*F. sporotrichioides* MAFF236638 (21)、MAFF236639 (22)、*F. fujikuroi* Gfc0801001 (23)、Gfc0825009 (24)

麦試料を使った実証試験

FG21培地を用いて、7つの都道府県で収穫された、品種や栽培環境などを異にする46種類の麦試料からムギ類赤かび病菌の分離を試みた。その結果、4県、28種類の麦試料でムギ類赤かび病菌特有の赤いコロニーが得られ、それぞれについてDNAストリップで菌種とトリコテセン毒素型を判定した(表3)。これまで国内では*F. graminearum* s. str. のNIV型が分離された例はなく、*F. asiaticum*の15ADON型の分離も極くまれである。今回の試験ではそれらを除く菌種・トリコテセン毒素型が全て検出された。

表3 ムギ類赤かび病菌の分離を試みた麦試料と同定された菌種と毒素型

採集地	品種	試料形態	収穫年	ムギ類赤かび病菌分析結果
北海道	きたほなみ(中央農業試験場)	小麦穂	2022	分離されなかった
	きたほなみ(北見農業試験場)	小麦穂	2022	分離されなかった
	チホクコムギ(中央農業試験場)	小麦穂	2022	分離されなかった
	チホクコムギ(北見農業試験場)	小麦穂	2022	分離されなかった
	ゆめちから(中央農業試験場)	小麦穂	2022	分離されなかった
岩手県	南部小麦	小麦種子	2021	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	ユキチカラ	小麦種子	2021	<i>F. graminearum</i> s.str. 3ADONタイプ
宮城県	ミノリムギ	大麦種子	2020	分離されなかった
	シュンライ	大麦種子	2020	分離されなかった
	ホホワイトファイバー	モチ性大麦種子	2020	分離されなかった
	あおばの恋	小麦種子	2020	分離されなかった
	夏黄金	小麦種子	2020	分離されなかった
茨城県	シラネコムギ	小麦種子	2020	分離されなかった
	シュンライ(つくば市)	大麦種子	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	シュンライ(つくばみらい市)	大麦種子	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	カシマムギ	大麦種子	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	キラリモチ	モチ性大麦種子	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
長野県	ホホワイトファイバー	モチ性大麦種子	2021	分離されなかった
	シュンライ	大麦種子	2021	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	シラネコムギ	小麦種子	2021	<i>F. graminearum</i> s.str. 15ADONタイプ
	ユメセイキ	小麦種子	2021	分離されなかった
	ユメカオリ	小麦種子	2021	分離されなかった
三重県	あやひかり(津市安濃町)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	あやひかり(津市一志町)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	あやひかり(いなべ市)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	あやひかり(松阪市西黒部町)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	あやひかり(松阪市保津町)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	あやひかり(松阪市笠松町)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	あやひかり(松阪市嬉野黒野町)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	あやひかり(松阪市横地町)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	あやひかり(松阪市嬉野川北町)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	あやひかり(津市芸濃町棕本)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	あやひかり(津市芸濃町棕本)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	あやひかり(津市南河路)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	さとのそら(木曽岬町小和泉)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	さとのそら(木曽岬町田代)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	さとのそら(長島町白鷺)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	タマイズミR(伊賀市川西)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	タマイズミR(伊賀市依那具)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	タマイズミR(伊賀市出後)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> 3ADONタイプ
	ファイバースノウ(伊賀市円徳院)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
	タマイズミR(伊賀市西明寺)	小麦穂	2022	<i>F. asiaticum</i> NIVタイプ
熊本県	タマイズミR(伊賀市川東)	小麦穂	2022	分離されなかった
	タマイズミR(伊賀市山畑)	小麦穂	2022	分離されなかった
	ミナミノカオリ	小麦種子	2020	分離されなかった
	はるか二条	大麦種子	2020	分離されなかった

以上により、国内の麦類赤かび病菌について、FG21培地による分離及び、DNAストリップ分析による簡易な菌種とトリコテセン毒素型判定法が開発された。

(エ) 研究成果の活用における留意点

開発したDNAストリップ分析では日本の主要なムギ類赤かび病菌、2菌種の識別が可能である。北海道でごくわずかな分離例がある*Fusarium vorosii*についてはDNAストリッ

ブ分析で菌種判定の反応はいずれの菌種に対しても陰性となる。一方、国外ではそれらを含めて少なくとも16菌種のムギ類赤かび病菌が知られ、全ゲノム塩基配列解析によって*F. graminearum* s. str. 以外の一部の菌種がアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を有することが分かった (Kulik *et al* 2022)。従って、現在国外に存在するそれらのムギ類赤かび病菌種が国内に侵入した場合、DNAストリップ分析で*F. graminearum* s. str. と判定される可能性がある。

また、ムギ粒からのムギ類赤かび病菌の分離に比べて、圃場で採集したムギ穂からのムギ類赤かび病菌の分離の場合は、穂を採集してから菌の分離作業までの期間が長くなるほど菌の分離に失敗するようである。採集後すぐに菌の分離を開始できるわけではないので、採集後のムギ穂について適切な保管方法を検討する必要がある。

(オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

なし

<引用文献>

- Kulik, T., Molcan, T., Fiedorowicz, G., van Diepeningen, A., Stakheev, A., Treder, K., Olszewski, J., Bilska, K., Beyer, M., Pasquali, M., et al. Whole-genome single nucleotide polymorphism analysis for typing the pandemic pathogen *Fusarium graminearum* sensu stricto. *Front. Microbiol.* **2022**, 13, 885978.
- Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, H.C., Geiser, D.M., Suga, H., Tóth, B., Varga, J. and O'Donnell, K., Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genet. Biol.* **2007**, 44, 1191-1204.
- Suga, H., Hayashi, M., Kushiro, M., Miyano, N., Inoue, H., Nakajima, K., Kawakami, T., Tonooka, T., Nakajima, T., Shimizu, M. and Kageyama, K., A novel medium for isolating two Japanese species in the *Fusarium graminearum* species complex and a dipstick DNA chromatography assay for species identification and trichothecene typing. *Journal of Fungi* **2022**, 8, 1048.
- Suga, H., Karugia, G.W., Ward, T., Gale, L.R., Tomimura, K., Nakajima, T., Miyasaka, A., Koizumi, S., Kageyama, K. and Hyakumachi, M., Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology* **2008**, 98, 159-166.
- Walkowiak, S., Rowland, O., Rodrigue, N. and Subramaniam, R., Whole genome sequencing and comparative genomics of closely related *Fusarium* head blight fungi: *Fusarium graminearum*, *F. meridionale* and *F. asiaticum*. *BMC Genom.* **2016**, 17, 1014.

4) 小課題3 : AF産生菌の診断方法の高度化と産生菌の分布調査

(ア) 研究目標

近年、温帯地域でもアフラトキシン(AF)産生菌が報告されてきている。AF産生菌の分布や動態を把握し、保存・加工過程における増殖を未然に防ぐ必要がある。研究担当者らが開発した高感度可視AF産生菌検出法であるジクロロボスーアンモニウム法 (DV-AM法)、

並びに生産環境試料及び近傍の試料を適切に採取するサンプリング手法を改良し、改良 DV-AM法によりAF生産菌のスクリーニングを行う。

(イ) 研究内容

1. AF 生産菌の高感度検出法である DV-AM 法の改良とサンプル処理法の改善

①土壌中の多様な微生物の中からAF生産菌を選択的に検出するため、既に構築した準選択培地の更なる改良を検討する。AFの生産に必要な糖などの適正濃度を調べるとともに、Deoxycholate (DOC) やcholateなどの様々な界面活性剤を培地に添加して、AF生産菌と他の微生物の生育速度の差を調べることで、最適条件を検討する。

②種々の共存微生物を含む圃場土壌試料中の、アフラトキシン (AFs) 産生菌の生残を調査するために、培養後に寒天培地全体を抽出する手法を検討する。

2. AF 生産菌の分布調査 (改良 DV-AM 法の産生菌検出への適用性確認)

①日本国内の様々な地域の土壌を採取し、DV-AM法を用いてAF生産菌の分布を調べる。

3. AF 生産菌の動態に係る要因の調査

①国内外で流通する食品へのAF生産菌が付着しているか否かを調べるため、各種生ナッツ、花粉荷、はちみつなどを、インターネット販売を通じて入手して調査する。

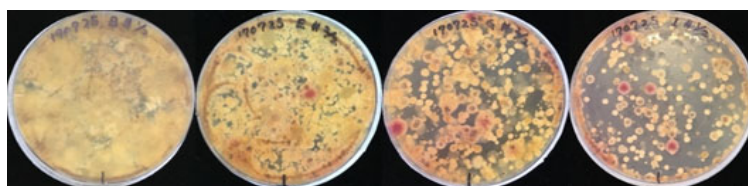
(ウ) 研究結果

1. AF 生産菌の高感度検出法である DV-AM 法の改良とサンプル処理法の改善

①選択培地の検討

土壌などの環境中には多種多様な微生物が存在し、その中から選択的に AF 生産菌を検出することは容易ではない。そこで、デオキシコール酸 (DOC) やコール酸などを種々の濃度寒天培地に添加して、土壌を塗布することにより、AF 生産菌とそれ以外の微生物の増殖の違いを観察した。いずれの界面活性剤もこれら微生物の生育を阻害したが、DOC を 0.1%~0.2%添加した場合に、最も AF 生産菌のコロニーが他の菌のコロニーに比較して顕著に検出され、更に、AM 処理による色調変動も顕著に観察された (図 1)。

このことから、AF 生産菌の選択培地としては DOC が最も有効であり、本研究における基本培地として、DV を塗布した YES-DOC-CP 寒天培地 (2% yeast extract, 10% sucrose, 0.1% DOC, 100 mg/L CP) を用いることとした。



DOC 濃度: 0.01 % , 0.07 % , 0.15 % 0.5 %

図 1. 土壌懸濁液を摂取した際の様々な濃度の DOC を含んだ培地の影響
28 °C、3日間培養、AM処理済) スクリーニングには0.1%DOCを利用(Yabe *et al* 2018)

②培養後のサンプル処理法の検討

前述の通り、土壌には真菌以外に様々な微生物が存在する。DV塗布もしくはDVフリーの寒天培地に、既知のAF産生型の*Aspergillus flavus*菌株を添加したコントロール実験では、土壌からのコロニー回収率に有意差は見られず、一方でDVはAF蓄積を顕著に阻害

した。そこで、DVフリーの培地を用いて培地全体を回収する方法で、異なる温度（4℃、-20℃、-80℃）及び期間（3～12ヶ月）保蔵した土壌サンプル（AF産生型の*A. flavus*の菌密度が高かった試料）培養後のAF蓄積量を3連で分析した。各土壌サンプル懸濁液をDVフリーの培地上で培養後、培地全体を回収してメタノールで抽出し、AFB1蓄積量を分析した。AFB1は、すべての温度において、4ヶ月目以降に有意な減少を示した。5ヶ月目以降、4℃で保存したサブサンプルのAFB1量は、-20℃または-80℃で保存したサブサンプルと比較して有意に減少しており、土壌試料の長期保存には-20℃以下の温度が望ましいことが示唆された（図2）。この培地全体抽出法は、取り扱いが容易であり、様々な土壌試料中のAF生産菌の菌密度推定に応用可能と考えられる。

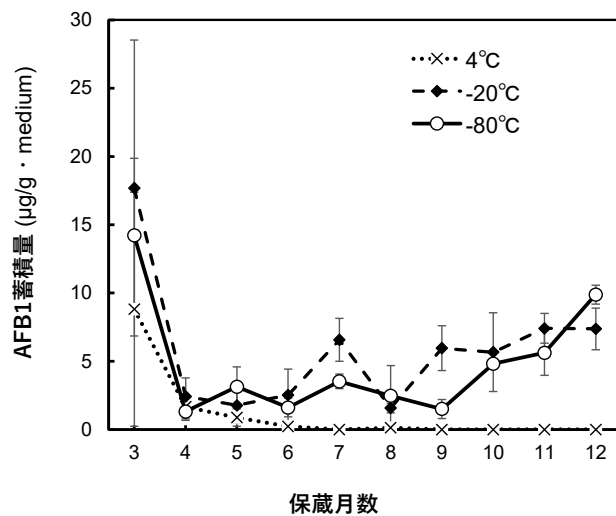


図2．寒天培地全量回収法による
AFB1蓄積量の変動解析
(Kishimoto *et al.*, 2023)

2. AF生産菌の分布調査（改良DV-AM法の産生菌検出への適用性確認）

①土壌への適用

福井工大が所在する福井県、農研機構食品研が所在する茨城県を含め沖縄から北海道まで、17以上の地域で土壌を採取して、DV-AM法によりAF生産菌のスクリーニングを実施した。その結果、ほとんどの地域で、同法を用いて、AF生産菌が検出された（図3）（Yabe *et al.*, 2018; Kishimoto *et al.*, 2021）。また、土壌研究を通じて、極めて生育が早く、他の微生物の生育を阻害するリゾプス菌は、0.1%DOCが入った改良培地では増殖できないことが確認され、その面でも本培地がAF生産菌のスクリーニングに有効であることが確認された。以上の結果から、リゾプス菌を含めて多様な微生物が存在する様々な土壌についても、AF生産菌のスクリーニングにDV-AM法が有効であることが確認された。

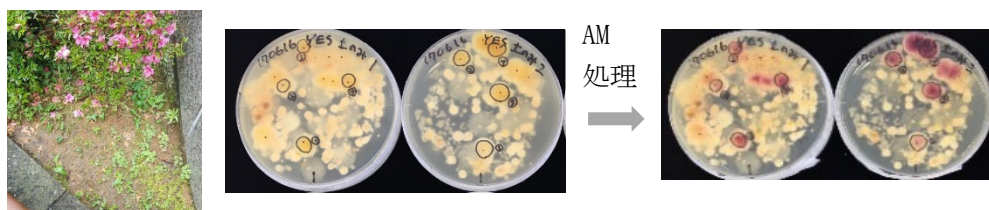


図3：DV添加YES-DOC-CP寒天培地を利用したDV-AM法による土壌サンプルの解析

花壇土壌、28 ℃、3 日間培養（福井県福井市）（Yabe *et al.*, 2018）

3. AF 生産菌の動態に係る要因の調査

①輸入食品の調査

ナッツ類は世界的に AF 汚染が高頻度に検出される農作物である。そこで、9 種類の生ナッツ及び生種子を、ケニヤやアメリカなど様々な国からインターネットを通じて入手して、DV-AM 法に供した。その結果、南アフリカのピーナッツ及びオーストラリアのマカダミアナッツから AF 生産菌が検出された（図 4）。国産農産物では AF 汚染が見出されないのに対し、本研究を通じて国内土壌で AF 産生型の *A. flavus* が検出されている。輸入生ナッツ等を通じて、これらの AF 生産菌が日本に持ち込まれている可能性が示唆された。

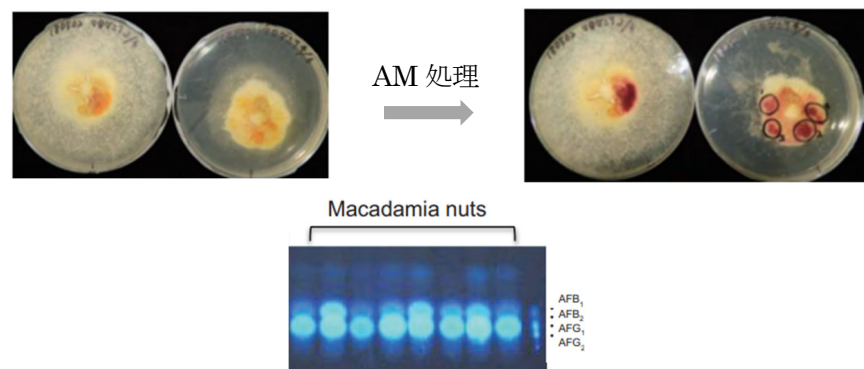


図 4. オーストラリアマカダミアナッツを用いた DV-AM 法（上段）と薄層クロマトグラフィーによる AF 生産性の確認（下段）
（Yabe *et al.*, 2020）

（エ）研究成果の活用における留意点

土壌や農産物など様々な試料について DV-AM 法を用いることで、DV-AM 法が AF 生産菌の検出に利用できることが確認された。さらに菌の動態として、様々な輸入食品に付着して国内に入ってきている可能性が示唆された。一方、AF などかび毒生産菌について現状を把握することは食品安全上きわめて重要であるものの、AF 生産菌が検出されることと、食品等で AF 汚染が存在することは全く異なることであることについて、十分な周知が必要である。買い控えに繋がらない慎重な対応が必要と考える。

（オ）研究目標の達成に当たっての問題点

作物生産現場での AF 生産菌のスクリーニングについて、生産者の許可が得られないことが問題である。国産農作物の将来の AF 汚染を未然に防ぐには、それぞれの農産現場における AF 生産菌の存在状況の把握及び食品製造過程における CCP の洗い出しが重要であると考えられ、その視点でのサンプリングを実現することが重要であり、関係各所の協力が必要と考える。

本研究において、DV-AM 法の改良は完了し、実サンプルへの適用も確認できたことから、最終目標は達成できたと考える。

<引用文献>

Yabe, K., et al. Improvement of the Culture Medium for the Dichlorvos-Ammonia (DV-AM) Method to Selectively Detect Aflatoxigenic Fungi in Soil. *Toxins* **2018**, 10, 519.

Kishimoto, M., et al. Whole agar dish culture extraction method to assess the survival of aflatoxigenic fungi in soil samples. *JSM Mycotoxins* **2023**, 73, 1-5.

Kishimoto, M., et al. Isolation of *Aspergillus flavus* strains from field soil by the improved DV-AM method. *JSM Mycotoxins* **2021**, 71, 9-12 (in Japanese) (available Abstract in English).

Yabe, K., et al. Detection of aflatoxigenic fungi in imported raw nuts using the dichlorvos-ammonia (DV-AM) method. *JSM Mycotoxins* **2020**, 70, 7-13.

4 研究成果の発表

別添のとおり。

((R2RS 実施要領) 別紙様式 2 - III : 研究成果一覧を添付)

5 研究期間中に生じた問題、今後の課題等

小課題 1 - 実施課題 1 : 農水省が策定したみどりの食料システム戦略においては、化学農薬の使用量削減が求められる一方で、麦類の赤かび病の防除は、抵抗性品種のみで対応することは難しく、化学農薬を使って発生を抑えることが必要である。今後、みどりの食料システム戦略に従った研究技術開発が進められる中で、抵抗性品種や耕種的防除のみに頼った防除への取組は難しい現状にある。現在、新たな作用機序の剤が出てきており、従来の剤との比較研究も今後の課題である。

小課題 1 - 実施課題 2 : 高頻度で汚染されていることが明らかになってきた DON 配糖体について、本成果の応用により抗体作製が可能と考えられる。一方、免疫測定法に関しては、ELISA と比較して迅速・簡便なイムノセンサやイムノクロマトへの応用が可能である。

小課題 2 : ムギ粒からのムギ類赤かび病菌の分離に比べて、圃場で採集したムギ穂からのムギ類赤かび病菌の分離の場合は、穂を採集してから菌の分離作業までの期間が長くなるほど菌の分離に失敗するようである。ムギ穂からムギ類赤かび病菌を分離するにあたっては圃場から採集後はすみやかに FG21 培地による分離を実施するのがより確実であるが、穂の採集から菌の分離作業開始まで、どのくらいの期間なら問題ないかは明確になっていない。また、採集後すぐに菌の分離を開始できるわけではないので、採集後のムギ穂について適切な保管方法の検討が課題である。

小課題 3 : (オ) に記載した通り、農業利用土壌や食品製造現場におけるサンプリングの許可を得ることが困難であることが大きな課題である。今後、圃場現場や穀類貯蔵施設での土壌や試料採取について、行政部局による支援が得られることを強く希望する。今後、稲におい

て AF 非生産型の *A. flavus* 菌が高頻度で検出される理由や、AF 生産菌の拡散要因などの課題が見つかったほか、DV-AM 法を用いた AF 汚染低減法の開発も途上であり、今後の研究課題である。