

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。

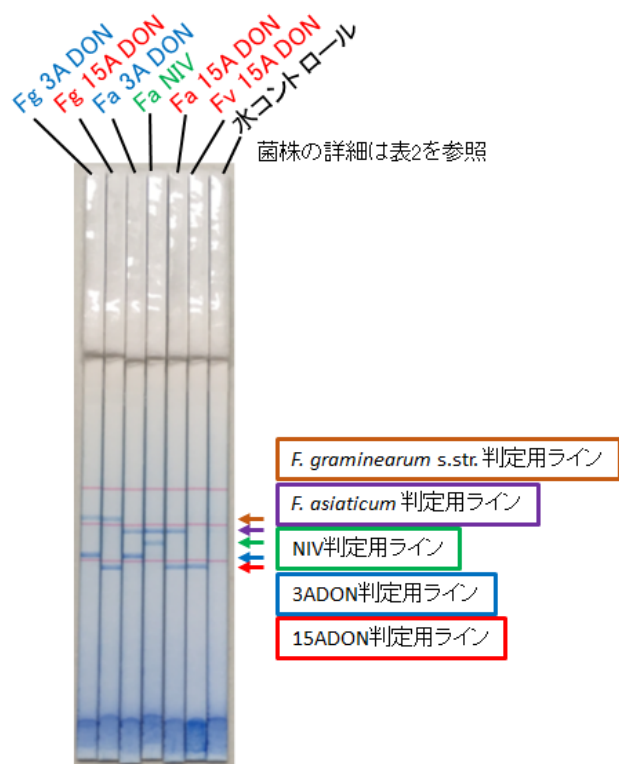


図1 DNAストリップによる菌種とトリコテセン毒素型判定結果

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)。

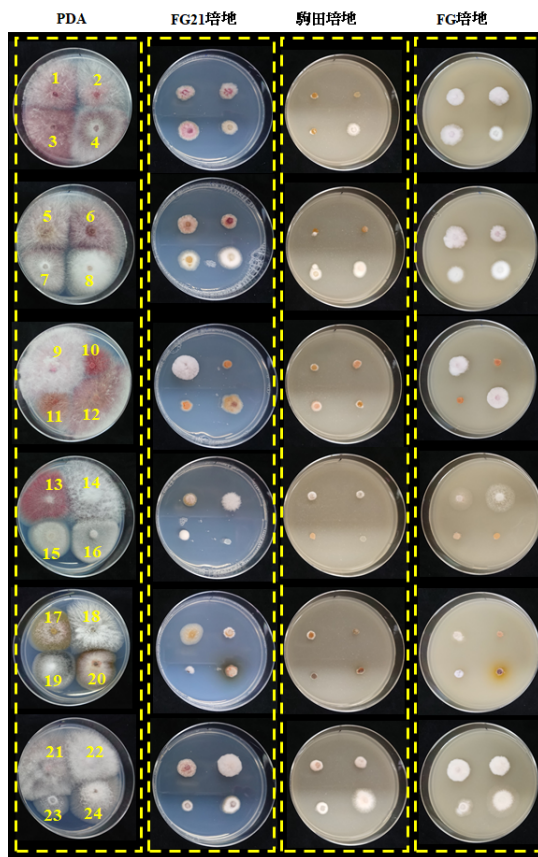


図2. 増殖試験によるムギ類赤かび病菌分離のための培地比較

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)、*Epicoccum* 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(長島町白鷄)	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産生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。

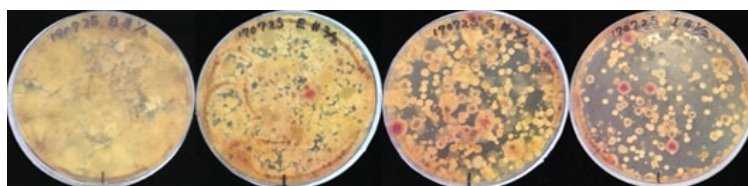
(ウ) 研究結果

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。

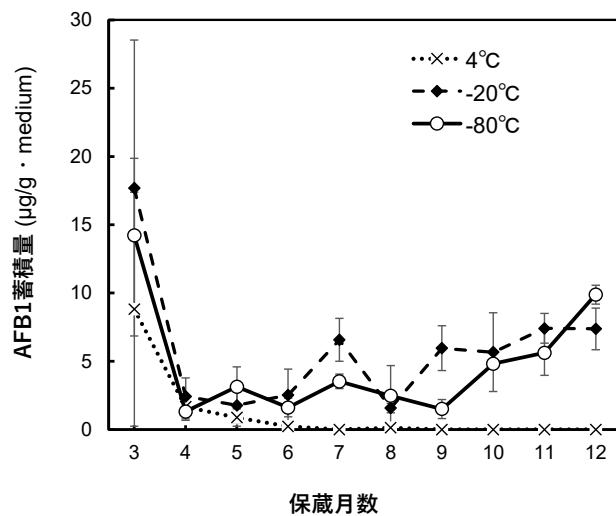


図2．寒天培地全量回収法による
AFB1蓄積量の変動解析
(Kishimoto *et al.*, 2023)

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。

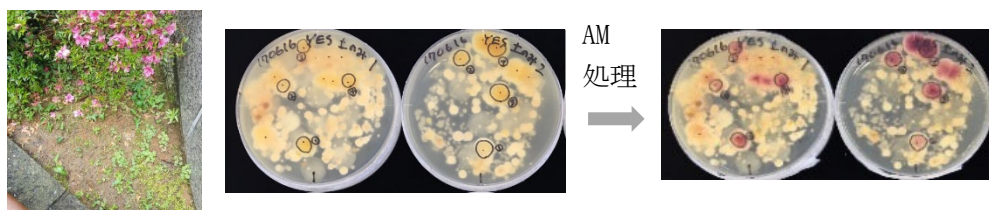


図3：DV添加YES-DOC-CP寒天培地を利用したDV-AM法による土壌サンプルの解析

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。

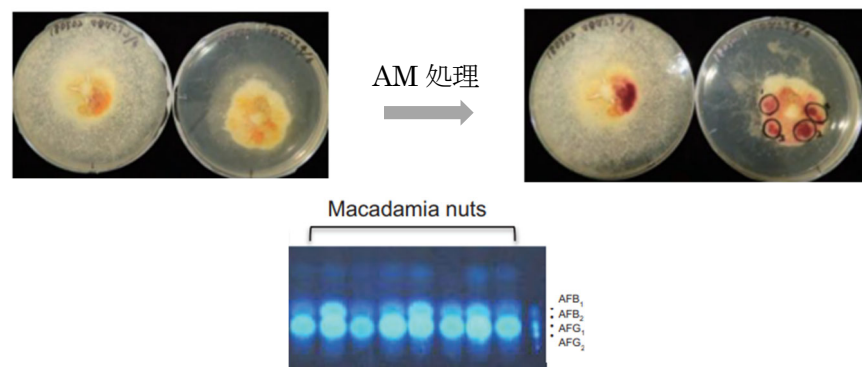


図 4. オーストラリアマカダミアナッツを用いた DV-AM 法（上段）と薄層クロマトグラフィーによる AF 生産性の確認（下段）
（Yabe *et al.*, 2020）

（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。