

カビ毒, シトリニンおよびステリグマトシスチンの 菌体内ならびに菌体外分布

高橋 治男, 矢崎 廣久

Distribution of Citrinin and Sterigmatocystin between Fungal Mycelium and Culture Broth by *Penicillium citrinum* and *Aspergillus versicolor*.

Haruo TAKAHASHI and Hirohisa YAZAKI

Summary

The partition of the mycotoxins, citrinin and sterigmatocystin, produced by *Penicillium citrinum* and *Aspergillus versicolor*, respectively, between the fungal mycelium and broth cultured on Czapek's medium, was studied. The optimum temperatures for production of citrinin and fungal growth were also examined. Initially 40% of total citrinin was present in the mycelium, but it decreased to less than about 5% at the 21th day after inoculation. The maximal production of the toxin and growth were found in the range of 29°C–31°C and 28°C–32°C, respectively. In contrast, more than 90% of total sterigmatocystin produced by *A. versicolor* remained in the mycelium at the 30th day.

1. 緒言

菌類, 特に糸状菌の中には食品や食品原料に増殖し, 有毒二次代謝産物であるカビ毒 (mycotoxin) を産生するものが数多く知られている。それらの毒素は, まず菌体内で生合成され, その大部分が菌体内に蓄積される, いわゆる菌体内毒素 (endotype toxin) と, 大部分が菌体外へ分泌される, 菌体外毒素 (exotype toxin) に類別することが出来る。前者の菌体内毒素に属するものとしては, *Aspergillus versicolor* の産生するステリグマトシスチン (sterigmatocystin) や *Penicillium islandicum* の産生するルテオスカイリン (luteoskyrin) があり, 後者の菌体外毒素としては, *A. flavus* の産生するアフラトキシン (aflatoxin) や *P. citrinum* のシトリニン (citrinin), あるいは *A. ochraceus* の産生するオクラトキシン (ochratoxin) など数多く知られている。食品中に産生されたカビ毒が菌体内, あるいは菌体外に存在するかにより, 食品中における分布や運命は質的に異なってくると考えられる。菌体外にある場合は, 食品成分との反応による分解や, 調理加工工程における流失の可能性が生じるが, 菌体内の場合には比較的その

可能性は少ないと言える。たとえば, *A. clavatus* や *P. cyclopium* の産生するパツリン (patulin) あるいはペニシリン酸 (penicilic acid) は, オレンジジュースや小麦粉中のビタミンB₁の様なチオール化合物と反応して分解されることが知られている¹⁾。カビ毒の中で, これまで菌体内外における分布が定量的に知られているのは, アフラトキシン²⁾のみである。

そこで, 著者らは貯蔵米などから比較的高い頻度で検出される, *P. citrinum* と *A. versicolor* を用い, それらの産生カビ毒で, 発癌性を有するシトリニン³⁾ およびステリグマトシスチン⁴⁾ の菌体内外の分布について検討を行ったので報告する。また, *P. citrinum* については, 増殖およびシトリニン産生への最適温度が知られていないので併せて検討を加えた。

2. 実験方法

1) 供試菌株

シトリニン産生 *P. citrinum* NRRL1843, および貯蔵米より分離したステリグマトシスチン産生 *A. versicolor* IB-1 とインドネシアの土壌より分離した IG-8-5 株を用いた。

2) シトリニン産性の温度条件と菌体内および菌体外分布

シトリニン産生の温度条件の検討：ツアベック液体培地15mlを加えたL型試験管に、*P. citrinum*の保存(PDA)斜面培養より菌を接種し、温度勾配培養装置(東洋TN-3)にかけ、8℃-40℃の範囲で培養を行った。培養終了後、試験管3本を1群とし、シトリニンの分析に供した。シトリニンの分析は中里ら⁹⁾の方法に準じて行った。すなわち、濾液を塩酸酸性にした後、等量の酢酸エチルで抽出を行い、さらに2%炭酸水素ナトリウム溶液に転溶し、再び塩酸で酸性としクロロホルムで抽出を行った。この抽出液に、0.5%塩化アルミニウムのメタノール溶液を加え振とう、次いで水を加えて再度振とうした後、メタノール区分を分別し、励基波長380nm、測定波長465nmの条件下で、蛍光分光光度計(日立MP-F-4)により定量を行った。シトリニンの分析後に得られた菌体は、少量の水で洗浄後105℃で一夜風乾し、その菌体重量を求めた。

シトリニンの菌体内外分布：200ml容分離型フェルンバツハフラスコに100mlのツアベック液体培地を加え、前述の保存菌を接種した後、25℃で21日間培養を行った。その間7日毎にシトリニンの分析などの測定を行った。培養終了後、濾液と菌体に濾別し、濾液はそのままシトリニンの分析に供した。菌体は水洗後、凍結乾燥を行いその重量を求め、ついで濾液同様分析を行った。

3) ステリグマトシステン菌体内および菌体外分布：初田らの⁹⁾方法に準じて培養と抽出を行った。すなわち、ブドウ糖30g、ポリペプトン3g、麦芽抽出物50g、を水道水1ℓに溶解させた培地100mlを、200ml容分離型フェルンバツハフラスコにとり、これに*P. citrinum*の場合同様保存斜面の菌を接種し、25℃で15および30日間培養を行った。培養終了後、菌体と培養濾液とに濾別し、菌体は凍結乾燥後の重量を求めた。乾燥菌体はソックスレー抽出器を用い150mlのアセトンで6時間抽出を行った。培養濾液は等量の酢酸エチルで抽出した。それらの抽出液は、いずれも減圧下で乾固した後既報⁹⁾に従い、ベンゼン：メタノール：酢酸(90：5：5, v/v/v)を展開溶媒とし、薄層クロマトグラフィーにより定量を行った。

3. 実験結果および考察

1) *P. citrinum*の増殖ならびにシトリニン産生への温度の影響

Fig. 1に示した結果から明らかなように、本菌の増殖は15-39℃の間でみとめられた。10℃及び40℃では全く生育せず、また、最適増殖温度は30℃-33℃の間にあ

ると推定された。これらの結果は、37℃では増殖を示すが、5℃では生育が認められないとのこれまでの報告⁹⁾と一致した。*Penicillium*属糸状菌は一般に*Aspergillus*属に比して、生育温度が低いとされ、著者らも以前に分離した*P. verrucosum*や*P. frequentans*が5℃付近から増殖し、その最適温度は15℃-18℃であった⁹⁾。*P. citrinum*は1951年角田ら¹⁰⁾によりタイ国黄変米菌として分離され、また、その後も輸入米より*A. candidas*などと共に高い頻度で検出されている¹¹⁾。これらのことから、*P. citrinum*は、*Penicillium*属の中では比較的増殖温度が高く、*P. paraherquei*などと共に温帯から熱帯地方に分布する、いわゆる南方型の菌であることを示している。一方、シトリニン産生の温度範囲は18℃-38℃で、最適温度は29℃-31℃とみられ、乾燥菌体重量当りでは31℃付近が最もその産生量が多かった。この最適温度は、シトリニンを産生する他菌種、*P. verrucosum* var. *verrucosum*のそれである19℃付近¹²⁾あるいは17℃-25℃¹³⁾よりもかなり高かった。これは、*P. citrinum*の増殖への最適温度が比較的高いためと考えられる。これまで、*P. citrinum*を用いたシトリニン産生の温度条件としては25℃¹⁴⁾が用いられてきたが、今後は29℃-31℃が適当と考えられる。アラトキシンをはじめカビ毒産生の温度範囲は、一般に増殖のそれよりも狭い範囲にあることが知られている¹⁵⁾。今回の*P. citrinum*によるシトリニン産生も同様の傾向にあることを示したが、その温度範囲は増殖のそれに近接しており、シトリニン産生と増殖とが密接に連動していること示唆した。著者ら¹⁶⁾は千葉県内の農家保有米から比較的高い頻度で*P. citrinum*を検出している他、小麦などの食品原料からの検出率も高いことが知られている¹⁷⁾。しかしながら、本菌種による自然汚染例はこれまで本邦では知られていない。この原因としては、本菌種の増殖ならびにシトリニン産生への温度が比較的高いことも、一因を成していると考えられる。むしろ、最近増加傾向にある東南アジア諸国などの南方地域から輸入される食品や生薬原料の、*P. citrinum*およびシトリニン汚染には充分注意を払う必要があると言える。

2) シトリニン産生の培養経過とその菌体内および菌体外分布

25℃における結果をTable 1に示した。供試株は14日以前よりも、それ以降に顕著な増殖を示した。これは、この培養温度が最適温度である29℃-32℃よりも若干低いため、増殖が多少遅延しているものとみられる。培養液のpHは初発の7.0から途中4.2まで一旦低下し、最終的には元の7付近まで上昇した。また、培養液は14日を

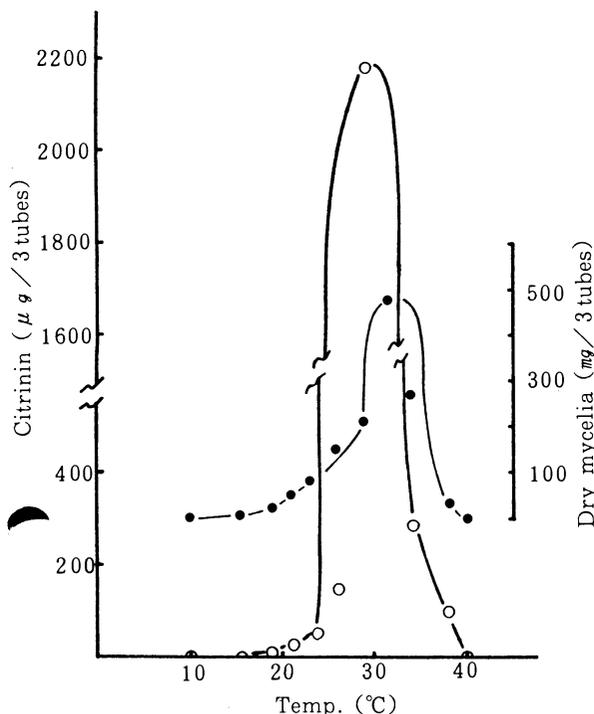


Fig. 1 Effect of temperatures on production of citrinin and fungal growth by penicillium citrinum NRRL 1843 cultured on Czapeck's medium. ○—○, Citrinin, ●—●, Dry mycelia.

越えると黄味を呈した。シトリニンの産生も14日以降に急激に増加し、乾燥菌体重量当りでみると、それ以前の2-3倍であった。産生されたシトリニンの菌体内における分布比率は、7日目の40%から21日目の約4%と、1割程度に激減した。すなわち、*P. citrinum*の産生するシトリニンはその95%以上を菌体外に分泌する典型的

な菌体外毒素であった。

3) *A. versicolor*におけるステリグマトシスチンの菌体内および菌体外分布

結果をTable 2に示した。いずれの供試株においても菌の増殖は15日までにほぼ停止し、15日以降における菌体重量の増加はほとんどみられなかった。これに対して、ステリグマトシスチンの産生量は*P. citrinum*におけるシトリニン産生の場合同様、15日以降急激に増加し、乾燥菌体重量当りでみるとそれ以前の2倍以上に達した。これに対して、*A. flavus*などによるアフラトキシンの産生は比較的速く、5-7日で最高値に達している^{2,18)}。これらは、基本的には*A. flavus*と*A. versicolor*, *P. citrinum*との増殖速度の違いを反映したものと考えられる。菌体内外における分布をみると、いずれの菌株においても、その90%以上が菌体内に存在し、シトリニンとは対照的に典型的な菌体内毒素であることを示した。Shihら²⁾は、産生されたアフラトキシンB₁が最高値の5日目を境として漸減し、15日ではその1/8まで低下すると報告している。これらは、培養液中のB₁の分布比が低下していることから、主としてその分解によるものと考えられる。このことは、産生された毒素が菌体外よりも、菌体内で比較的安定であることを示している。ステリグマトシスチンとアフラトキシンは、菌体内外における分布の比率がこの様に異なったが、いずれもビスフラン環を有する極めて類似した化学構造を持つだけでなく、ステリグマトシスチンはアフラトキシン生合成経路上の前駆体とされ¹⁹⁾、両者は密接な関係にあることが知られている。

Table. 1 Production of citrinin and its partition between fungal mycelia and culture broth by *P. citrinum* NRRL1843 in the course of incubation on the Czapeck's medium at 25°C.

Incubation period (day)	Dry mycelia* (mg/flask)**	Citrinin content (µg/flask)**		Total citrinin : dry mycelia (µg/mg)	Final pH
		mycelia (%)	broth (%)		
7	250	72.0 (40.0)	108.0 (60.0)	0.71	4.3
14	370	39.4 (17.8)	181.6 (82.2)	0.60	4.2
21	650	49.8 (4.2)	1149.4 (94.8)	1.85	6.8

* Lyophilized mycelia

** Mean value of two flasks

Table.2 Production of sterigmatocystin and its partition between fungal mycelium and culture broth by *Aspergillus versicolor* IB-1 and IG-8-5 strains for 15 and 30 days culture on the Czapeck' medium at 28°C.

Incubation period (day)	Dry mycelia** (mg/flask)	Sterigmatocystin ($\mu\text{g}/\text{flask}$)		Total sterigmatocystin : dry mycelia ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
		mycelia (%)	broth (%)	
<i>IB-1</i>				
15	1420	85.0 (93.9)	5.5 (6.1)	0.06
30	1500	192.5 (100.0)	N.D. (0.0)	0.13
<i>IG-8-5</i>				
15	1350	108.0 (97.7)	2.5 (2.3)	0.08
30	1100	183.5 (94.1)	11.0 (5.9)	0.18

* Not detected.

** Lyophilized mycelia.

引用文献

- 1) Scott, P. M., and Somers, E. (1968): Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *J. Agr. Food Chem.*, 16, 483-485.
- 2) Shih, C., and Marth, E. H. (1975): Production of aflatoxin and its partition between the medium and its fungal mycelium of *Aspergillus parasiticus* during incubation, under various conditions.
- 3) Shionhara, Y., Arai, M., Hirano, K., Sugihara, S., Nakanishi, K., Tsunoda, H., and Ito, N. (1976): Combination effect of citrinin and other chemicals on rat kidney tumorigenesis. *Cann*, 67, 147-155.
- 4) Purchase, I. F. H., and van der Watt, J. J. (1970): Carcinogenicity of sterigmatocystin. *Fd Cosmet. Toxicol.*, 8, 289-295.
- 5) 中里光男, 冠 政光, 中沢久美子, 有賀孝成, 藤沼賢司, 西島基弘, 直井家寿太. (1881): 穀類中のcitrininの蛍光分析法, *食衛誌*, 2, 391-396.
- 6) 初田勇一, 久山真平. (1954): *Aspergillus versicolor*の代謝産物に関する研究(第一報), *Apergillus versicolor*の培養並びに代謝産物の分離精製, *農化誌*, 28, 989-991.
- 7) Takahashi, H., Yazaki, H., Manabe, M., Matsuura, S. (1984): Distribution of sterigmatocystin and fungal mycelium in individual brown rice kernels naturally infected by *Aspergillus versicolor*, *Cereal Chem.*, 61, 48-52.
- 8) Pitt, J. I. (1979): The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, (London), p. 291.
- 9) 高橋治男, 矢崎廣久, 福永 優, 三井良雄. (1983): 食品製造工場におけるカビ汚染(2), 枝肉貯蔵庫の真菌汚染とその防除, *千葉衛研報告*, 7, 12-15.
- 10) 角田 廣. (1953): 微生物による貯蔵穀物の被害に関する研究, *食糧研究所報告*, 8, 41-68, 同, 77-81.
- 11) 倉田 浩, 坂部フミ, 宇田川俊一, 一戸正勝, 鈴木明子, 高橋紀子. (1968): 昭和29-42年における貯蔵米の菌学検査成績, *衛誌報告*, 86, 183-188.
- 12) 杉本貞三, 南沢正敏, 高野和子, 笹村靖子, 鶴田理 (1977): *Penicillium viridicatum*と*Aspergillus versicolor*による貯蔵米のオクラトキシンA, シトリニン, およびステリグマトシステチンの自然汚染について, *食衛誌*, 18, 176-181.
- 13) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三. (1982): マイコトキシンに関する研究, *Penicillium verrucosum var. verrucosum*による貯蔵食肉のカビ毒汚染について, *千葉衛研報*, 6, 6-9.
- 14) 角田 廣, 辰野高司, 上野芳夫. (1979): マイコトキシン図説, 地人書館, (東京), p. 54.
- 15) 宇田川俊一, 松田良夫 (1983): 食品菌類ハンドブック, 矢崎廣久. (1986): 千葉県産農家保有玄米における糸状菌分布, *千葉衛研報*, 10, 6-11.
- 17) 倉田 浩, 一戸正勝. (1967): 食品中における有毒

- 糸状菌に関する研究(1), 粉状食品, 主として穀粉の糸状菌分布, 食衛誌, 8, 237-252.
- 18) Schroeder, H. W. (1968): Aflatoxins in rice in the United States, Proceedings of the first U. S.-Japan Conference on toxic micro-organisms, 56-60.
- 19) Elsworthy, G. C. (1970): The biosynthesis of the aflatoxins, J. Chem. Soc. D, 1069-1070.