

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

矢崎 廣久 高橋 治男 七山 悠三

Studies on Mycotoxins : Production of Ochratoxin A and Citrinin
 by *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* on Stored Meats
 Hirohisa YAZAKI, Haruo TAKAHASHI and Yuuso NANAYAMA

Summary

Ochratoxin A (OC) and citrinin (CI) were detected in molds infected beef during a month storage in a refrigerator. After application of thin layer chromatography (TLC), gas liquid chromatography (GLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), 4 of 11 samples were found to contain OC and CI (0.36 to 1.44ppm). Strains of *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* were isolated as a result of investigation, and 3 of cultures were found to be mycotoxin producers on laboratory media.

I はじめに

貯蔵中の食肉が糸状菌により汚染された場合、単に品質の低下や性状変化の問題にとどまらず、有害なマイコトキシン生産の可能性も危惧される。しかし、我が国では、この分野に関する報告は少なく¹⁾、有害カビに関する防止対策も有効な手段が講ぜられていないのが実情である。

著者らは、食肉加工工場の低温庫に保存されていた牛肉に糸状菌の着生を認めたのを機会に、菌検索を行なった結果、数種類の菌株以外に食品衛生上重要な *penicillium verrucosum* var. *verrucosum* (*P. v.*と略す)が分離された²⁾。すでに *P. v.*については、オクラトキシンA (OA)、シトリニン(CI)、ペニシリン酸(PA)などのマイコトキシンを産生する菌株が含まれることが知られているので、これら汚染試料を化学分析すると共に、分離菌株を培養し、マイコトキシン産生能についても検討した。³⁻⁴⁾

II 実験方法

装置

1) ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) 日立RMU-6MG型

2) ガスクロマトグラフ (GC) 島津GC-7AG型
 3) けい光自記濃度計 島津クロマトスキャナーCS-900型(けい光付属品付)

2. 試薬

1) マイコトキシン標準溶液 オクラトキシンA, シトリニン, ペニシリン酸(和光純薬)を各々1mgずつ精秤し、クロロホルムに溶かし0.1mg/ml溶液とした。

2) ショ糖加酵母エキス液状培地(YES) 酵母エキス20g, 麦芽エキス10g, ショ糖50gを精製水1ℓに溶解して調製した。

3) カラムクロマト用充てん剤 シリカゲル(メルク) 70~325メッシュを110°, 2時間活性化した。

4) 薄層クロマト用プレート (TLC) シリカゲル60プレコート・プレート(メルク) 20×20cmを110°, 1時間活性化のち使用した。

5) 薄層クロマト用発色試薬 (1)塩化アルミニウム試薬 $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 20gをエタノール100mlに溶解した。(2)P-アニスアルデヒド酸性試薬 メタノール・氷酢酸・硫酸(85+10+5)混合溶媒100mlに0.5mlのP-アニスアルデヒドを添加して作成した。

6) Trimethyl silylation(TMS)試薬 Hexamethyl disilazane(HMDS), Trimethylchlorosilane(TMCS) およびクロロホルムを3:1:6に混合して用いた。

7) その他の試薬はいずれも特級品を、また各種溶媒はすべて蒸留したものを使用した。

3. 実験操作

1) 試料 供試料は、食肉加工工場の肉貯蔵低温庫(1~2°)に、と殺後1ヶ月間保存されていた牛肉であり、糸状菌着生部の菌層は白~灰青緑色を呈し、肉眼的には綿毛状であった。試料採取は肩ロース、腰椎、内モモ、アバラなど、糸状菌汚染が認められる個所について行なった。

2) 試料のマイコトキシン分析 (1)糸状菌着生個所の肉を5~7mmの大きさに削り取って、細切・混和した後、50gを分析試料とした。マイコトキシンの抽出およびク

けい光波長500nmの条件のもとで行なった。なお、ペニシリン酸についてはGCおよびGC-MSによる確認も合わせて行ない、TMS化による誘導体作成後に分析用供試々料とした。測定条件は以下の通りである。

測定条件 GC

検出器：水素炎イオン化検出器，検出器温度 200°
 カラム：5%SE-30，5%OV-17，3φ×2000mm，
 カラム温度 160°，N₂流量 50 ml/min

GC-MS 検出器：トータル・イオン・コレクター
 注入口温度 200°，カラム温度 170°，He流量 50 ml/min，イオン源温度 175°，イオン加速電圧 3.2kV，
 イオン化電圧 70eV

3) 糸状菌の分離 試料の各部分から、カビを白金耳でかき取って滅菌水中に入れ、孢子けん濁液とし、採取部位別にWaksman培地(PH4)と混合してシャーレに流し込み、25°、10日間培養後、生育コロニーを分離した。

4) 分離菌によるマイコトキシン産生能試験 使用した菌株は、腰椎から分離の3株、内モモ部の3株で、挽き肉、チーズ、米、小麦、YES液体培地など、各々20gの培養基に接種後、25°、10日間培養を行ない、Fig.1の方法にしたがってオクラトキシン、シトリニン、ペニシリン酸の有無を調べた。

5) *P.v*のマイコトキシン産生に関する培養温度試験 内モモ部分より採取した菌株を用いて菌体生育温度範囲、および培養温度とマイコトキシン産生量との関係を調べた。中型試験管に10mlのYES液体培地を入れ、綿栓、殺菌後、*P.v*の孢子けん濁液を分注し、種々の温度において10日間培養を行ない、それぞれの菌体量とマイコトキシンの含有量を求めた。

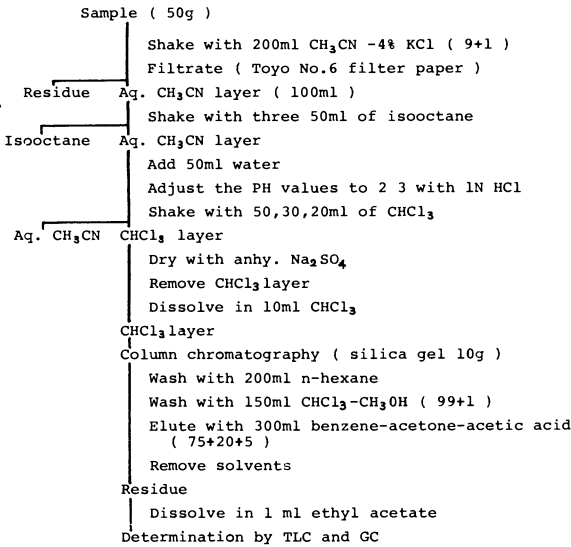


Fig.1 Extraction and determination of ochratoxin, citrinin, and penicillic acid in meats

リン・アップ操作は、Fig.1のフローチャートの通りである。(2)分離および検出 既述の操作法により調製した定量用試験溶液を、シリカゲル薄層プレート(TLC)に10μlスポットし、酢酸エチル-クロロホルム-ギ酸(120+80+2)、ベンゼン-メタノール-酢酸(180+10+10)および、アセトン-酢酸エチル-1%フェノール(90+95+15)などの展開溶媒で約12cm展開したのち、20%塩化アルミニウム試薬を噴霧し、110°、7分間加熱して、365nm紫外線燈下でオクラトキシン(紫青色けい光)およびシトリニン(青色けい光)のスポットを検出した。ペニシリン酸は、これとは別に展開したTLCに、0.5%P-アニスアルデヒド酸性試薬を噴霧し、130°、7分間加熱ののち、再度0.5%P-アニスアルデヒドの噴霧を繰返すことにより緑色のスポットを、また紫外線燈下(365nm)において、紫色けい光スポットが認められた。定量はけい光自記濃度計で、励起波長365nm、

III 結果および考察

1. 試料中のマイコトキシン分析

1) オクラトキシン、シトリニン、ペニシリン酸の同時分析法 マイコトキシンの抽出と分離に関する従来の方法については、Roberts⁵⁾、Gimeno⁶⁾らの手法によると、穀類中10数種のマイコトキシンが分析可能であるが、タンパク、脂肪含量の多い乳肉製品には適当でないことや、また武田⁷⁾の方法ではペニシリン酸の分析が出来ないなど、本研究の目的に合致しない点もあるので、これらの分析法をもとに改良し検討した結果、Fig.1の方法を採用した。検出および確認は、Gimenoらの方法に準じて、塩化アルミニウムによる増けい光やP-アニスアルデヒドの発色操作を応用するTLC分析法を用いた。オクラトキシン、ペニシリン酸については、それぞれ誘導体を

作成して確認した。すなわち、オクラトキシンに1-methyl-3-P-tolyltriazeneを反応させてエステルとしたのち、10% SE-30によるGCを⁸⁾、またペニシリン酸ではシリル化してGC分析を行なった。しかしペニシリン酸の場合、TLCおよびGCのクロマトグラムの結果が共に一致をみる類似性の高い夾雑物質が認められたので、最終確認はGC-MSによった。

2) 供試料の分析結果 糸状菌汚染肉の各部位別に採取した試料11件を検索した結果、内モモから0.36ppmの

オクラトキシンAと0.42ppmのシトリニンが確認されたのははじめ、腰椎1.44ppm、肩ロース0.56ppm、アバラ0.66ppmのシトリニン検出値が得られ、計4検体がマイコトキシン陽性と判明した。

2. 糸状菌の検索とマイコトキシン産生菌

供試料の菌検索により分離された菌株は、*Mucor racemosus*, *Geotrichum* sp., *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* および *P.v* で、*P.v* は内モモと腰椎から各々3株ずつ得られた。そして、これら6菌株を5種類の培地に接種

Table 1. Ochratoxin, citrinin, and penicillic acid productivity of isolates of *penicillium verrucosum* var. *verrucosum* on various substrates

strain	substrate														
	meat			cheese			polished rice			wheat			YES culture medium		
	OC	CI	PA*	OC	CI	PA	OC	CI	PA	OC	CI	PA	OC	CI	PA
CH-lumbal-white	-**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH-lumbal-blue-green	-	0.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH-lumbal-l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH-inner side of thigh-l	-	-	-	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50	-
CH-inner side of thigh-blue-gray	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH-inner side of thigh-green	-	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Mycotoxins production (ug/g), OC:ochratoxin A, CI:citrinin, PA:penicillic acid
 ** - :None detected

してオクラトキシン、シトリニン、ペニシリン酸産生能の有無を調べた結果は、Table 1.の通りであった。すなわち内モモの1株からオクラトキシン、シトリニンが、また、内モモと腰椎の2株からシトリニンのみ検出された。培養基別に見ると、チーズ上にオクラトキシンを生

産し、YES液体培地にシトリニン産生能を認めた菌株もあったが、供試株6株中2株までが肉培地上でシトリニンを産生した。このことから、貯蔵牛肉でのオクラトキシン、シトリニン汚染は*P.v*に由来することが考えられる。

3. *P.v*の培養温度とマイコトキシン産生量

Fig.2に示すように、*P.v*の生育温度範囲は6~35°Cの間であり、温度が高くなるに従って菌糸体量は増加する傾向にあるが、20~21°Cをこえると急激な低下をみる。培養温度変化による*P.v*の毒素産生量についても、オクラトキシンとシトリニンは全く同様な傾向を示し、17~25°C範囲でともに最高値を記録した。これら毒素産生能に関する最適培養温度については、貯蔵古米より分離した*P.v*が19.5°Cにおいて最高値を示す杉本らの報告例も⁹⁾あり、今後、本菌に関する厳密なデータを得る為にはさらに詳細な検討が必要である。

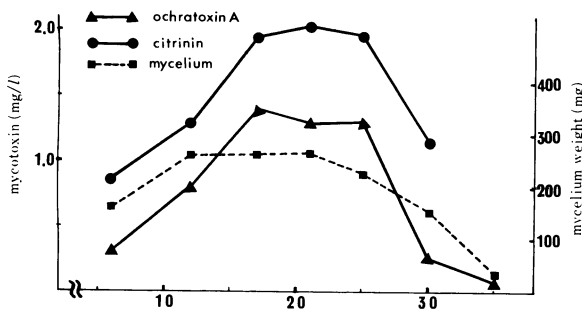


Fig.2 Production of mycelium and mycotoxins by *penicillium verrucosum* var. *verrucosum* cultivated on YES medium

IV まとめ

1. 食肉貯蔵低温庫内の糸状菌着生牛肉について、菌株の検索を行なったところ、*Mucor racemosus*, *Geotrichum* sp., *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* などとともに *P.v* が分離された。

2. 汚染牛肉を採取し、TLC, GC, GC-MS を用いて分析したところ、11検体中4検体から、0.36 ppm のオクラトキシンおよび0.42~1.44 ppmのシトリニンが検出された。

3. 分離された6株の *P.v* を5種類の培地に接種し、オクラトキシン、シトリニン、ペニシリン酸産生能の有無を調べた。この結果、供試株6株中2株までが肉培地上でシトリニンを生産したことから、貯蔵牛肉でのオクラトキシン、シトリニン汚染は *P.v* に起因することが示唆された。

4. 種々の培養温度における条件下で、*P.v* の生育温度範囲と培養温度変化にともなう毒素産生量を調べた。

本研究に際し、有益なご助言と貴重な試料を提供いただいた茂原保健所 福永 優副主査に深謝致します。

V 文献

- 1) 稲垣尚起, 高橋義光: 肉類に発生した糸状菌(第1報), 衛試報, 79, 293-296, 1961.
- 2) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三: 貯蔵肉の *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* による自然汚染とマイコトキシン生産性について, マイコトキシン, 10, 29-31, 1980.
- 3) Walbeek, W., Scott, P. M., Lawrence, J. W.: *Penicillium viridicatum* Westling: a new

source of ochratoxin A, Can. J. Microbiol., 15, 1281-1285, 1969.

- 4) Scott, P. M., Walbeek, W., Kennedy, B., Anyeti, D.: Mycotoxins (Ochratoxin A, Citrinin, and Sterigmatocystin) and Toxigenic Fungi in Grains and Other Agricultural Products, J. Agr. Food. Chem., 20, 1103-1109, 1972.
- 5) Roberts, B. A., Patterson, D. S. P.: Detection of Twelve Mycotoxins in Mixed Animal Feedstuffs, Using a Novel Membrane Cleanup Procedure, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 58, 1178-1181, 1975.
- 6) Gimeno, A.: Thin Layer Chromatographic Determination of Aflatoxins, Ochratoxins, Sterigmatocystin, Zearalenone, Citrinin, T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Penicillic Acid, Patulin, and Penitrem A, *ibid.*, 62, 579-585, 1979.
- 7) Takeda, Y., Isohata, E., Amano, R., Uchiyama, M.: Simultaneous Extraction and Fractionation and Thin Layer Chromatographic Determination of 14 Mycotoxins in Grains, *ibid.*, 62, 573-578, 1979.
- 8) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三: マイコトキシンに関する研究, Ochratoxinの抽出と分離分析について, 千葉県公衆衛生学会講演要旨, 15, 54, 1977.
- 9) 杉本貞三, 南沢正敏, 高野和子, 笹村靖子, 鶴田理: *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チンの自然汚染について, 食衛誌, 18, 176-181, 1977.