

## *Aspergillus* section *Flavi* のアフラトキシン産生菌と非産生菌

後藤 哲久

信州大学農学部 応用生命科学科 生物制御化学講座

**要約** アフラトキシンは、*Aspergillus* section *Flavi* に属する一部の菌の産生する発ガン性のマイコトキシンである。このセクションのアフラトキシン産生菌としては、*A. flavus*, *A. parasiticus* が、非産生菌としては *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. tamarii* が知られていたが、1987年に *A. nomius* が産生菌として、1997年に *A. caelatus* が非産生菌として新たに記載された。これに加え、2001年に *A. pseudotamarii*, *A. bombycis* の2種類の新たな産生菌を国内の土壌などの試料から分離して記載した。これらの新しく記載された菌は、菌相互の関係においてこれまで指摘されていた、*A. flavus* と *A. oryzae* あるいは *A. parasiticus* と *A. sojae* のような関係には必ずしも当てはまらないものの、*A. tamarii* と *A. pseudotamarii*, *A. nomius* と *A. bombycis* の間には共通点も多く、菌の進化との関係が興味深い。

**キーワード**：アフラトキシン，産生菌，非産生菌，アスペルギルス・フラブス菌群，家畜化

アフラトキシン B<sub>1</sub> (Aflatoxin B<sub>1</sub>: AFB<sub>1</sub>) (図1) は、1960年に英国でブラジル産のピーナツミールを原因として発生した10万羽にもおよぶ七面鳥の雛とうの大量斃死事故 (Turkey “X” Disease)<sup>1)</sup> を期に見出されたカビ毒の一種である。AFB<sub>1</sub> は実験動物に対して天然物のなかではもっとも強い部類の肝臓癌の発ガン性<sup>2)</sup> を示し、とうもろこし、ピーナツあるいは種々のナツ等の農産物を汚染することが知られている。アフラトキシン (Aflatoxin: A flavus toxin) は、その名が由来するように、*Aspergillus flavus* 及びその近縁菌である *A. parasiticus* が産生することが知られている。この他のアフラトキシン産生菌としては、同じセクションに属する *A. nomius* が1987年に Kurlzman 等によって記載<sup>3)</sup> されているのみであった。またこのセクションには、非アフラトキシン産生菌として、日本の醸造食品製造でなじみの多い *A. oryzae*, *A. sojae*, それと *A. tamarii* の3菌種が古くから知られている。これらのアフラトキシン産生菌、非産生菌の中で、*A. flavus* と *A. oryzae*, *A. parasiticus* と *A. sojae* はそれぞれ遺伝的にも非常に近い関係にあることから、アフラトキシン発見を期に日本の醸造食品の安全性に関して疑問が投げられた。そのため、その菌学的な差異、食品の安全性に関しては多くの研究がなされ、今日まで、日本の醸造食品製造に用いられている菌からはアフラトキシン産生能を持つ菌は見

つからず、市販の醸造食品においてもアフラトキシン汚染は見つけられていない<sup>4)</sup>。また、アフラトキシン産生菌は熱帯、亜熱帯地域を中心に温帯域まで広く分布することから、わが国の土壌中におけるアフラトキシン産生菌の存在とそれによる国内産農産物、醸造食品の汚染が懸念された。この面においても精力的な調査が行われ、本州、四国、九州のごく一部の暖地と奄美諸島以南 (沖縄を含む) を除いて、わが国の土壌からはアフラトキシン産生菌は検出されることが報告<sup>5)</sup> され、国内農産物の安全性はその面からも担保される結果であった。

この *Aspergillus* section *Flavi* に属する菌の産生するマイコトキシンとしては、つい最近まで食品添加物あるいは化粧品で使用されていたコウジ酸 (kojic acid: KA) (図1)、一部のペニシリウム属菌も産生する肝毒性を持つマイコトキシンであるサイクロピアゾン酸 (cyclopiazonic acid: CPA) (図1) がよく知られている。このうち、KA は、このセクションのほぼすべての菌が産生し、CPA は、*A. tamarii* のほとんどの菌株、*A. flavus* と *A. oryzae* 一部の菌株が産生し、*A. parasiticus* と *A. sojae* には産生菌は見つかっていない (表1)。ただこれらのマイコトキシンは、日本の醸造食品の生産においては一般に麴の生育期間 (麴菌を生育させ、必要な酵素等を産生させる時間) が比較的短く、麴中にこれらの産生物があまり蓄積しないこと、また、その後の醸造・熟成工程において酵母等により分化されることもあって製品中への残留は確認されてい

受理日 11月30日

採択日 12月8日

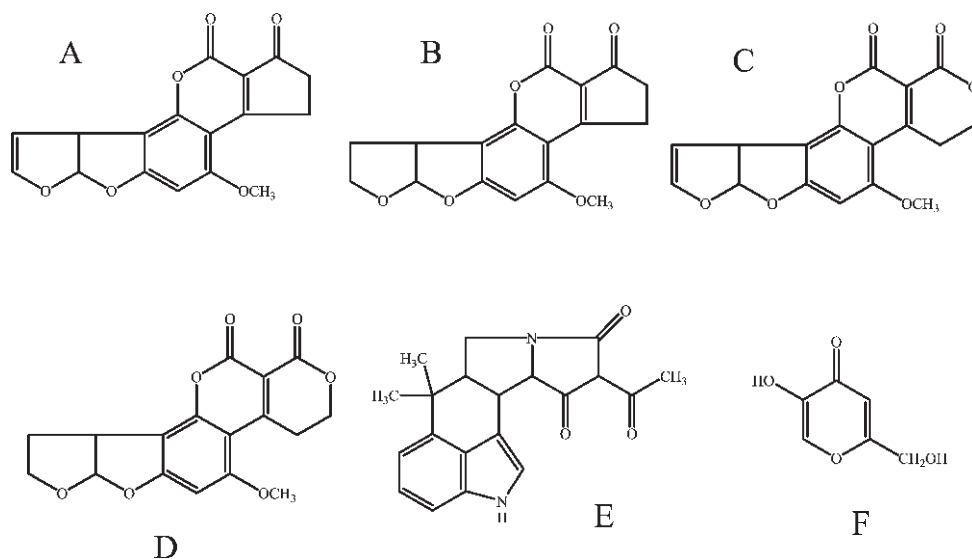


図1. *Aspergillus* section *Flavi* の菌が作るマイコトキシンの例

A : aflatoxin B<sub>1</sub>, B : aflatoxin B<sub>2</sub>, C : aflatoxin G<sub>1</sub>,  
D : aflatoxin G<sub>2</sub>, E : cyclopiazonic acid, F : kojic acid,

表1. 菌の特性(1):マイコトキシシン産生性

菌種名	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	CPA	KA
<i>A. flavus</i>	+/-	+/-	-	-	+/-	+
<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	+/-	+
<i>A. parasiticus</i>	+	+	+	+	-	+
<i>A. sojae</i>	-	-	-	-	-	+
<i>A. tamarii</i>	-	-	-	-	+	+
<i>A. nomius</i>	+	+	+	+	-	+
<i>A. caelatus</i>	-	-	-	-	-	+
<i>A. pseudotamarii</i>	+	+	-	-	+	+
<i>A. bombycis</i>	+	+	+	+	-	+

+:多くの菌株が産生する

+/-:産生する菌株がある

-:産生が見られない

ない<sup>4)</sup>。また菌により産生されるAFは、その骨格構造の違いによりAFB群とAFG群(図1)に分けられるが、*A. flavus*は通常AFB群のみを産生し、*A. parasiticus*と*A. nomius*はAFB、AFGの両群を産生することが知られている(表1)。

#### *Aspergillus* section *Flavi* の新しい菌(1)

記録上は多くのAF産生菌があげられているが、1987年にKurlzman等によって報告された*A. nomius*<sup>3)</sup>を除いては、その確証が得られたものが無く、また非アフラトキシシン産生菌も前記の3菌種のみという状況が続いていた。また、このセクションに属さないアフラトキシシン産生菌については、学

会等での報告はいくつかあるものの2004年初めまでに正式に記載されたものはない。

こうした中で、1997年にHornは*A. tamarii*に比較的類似した非アフラトキシシン産生性の新しい菌を米国南部の土壌から単離し*Aspergillus caelatus*と命名して記載した<sup>5)</sup>。この菌は、*A. tamarii*より胞子が小さく、またその他の形態的特徴も異なっており、新しい菌として認知された。この菌が記載された後、Hornらはさらにこの菌が土壌中に広範囲に分布することを報告し<sup>6)</sup>、我々も日本国内の土壌における存在を確認した<sup>7)</sup>。*Aspergillus caelatus*はKAは産生するが、CPAの産生は認められていない(表1)。

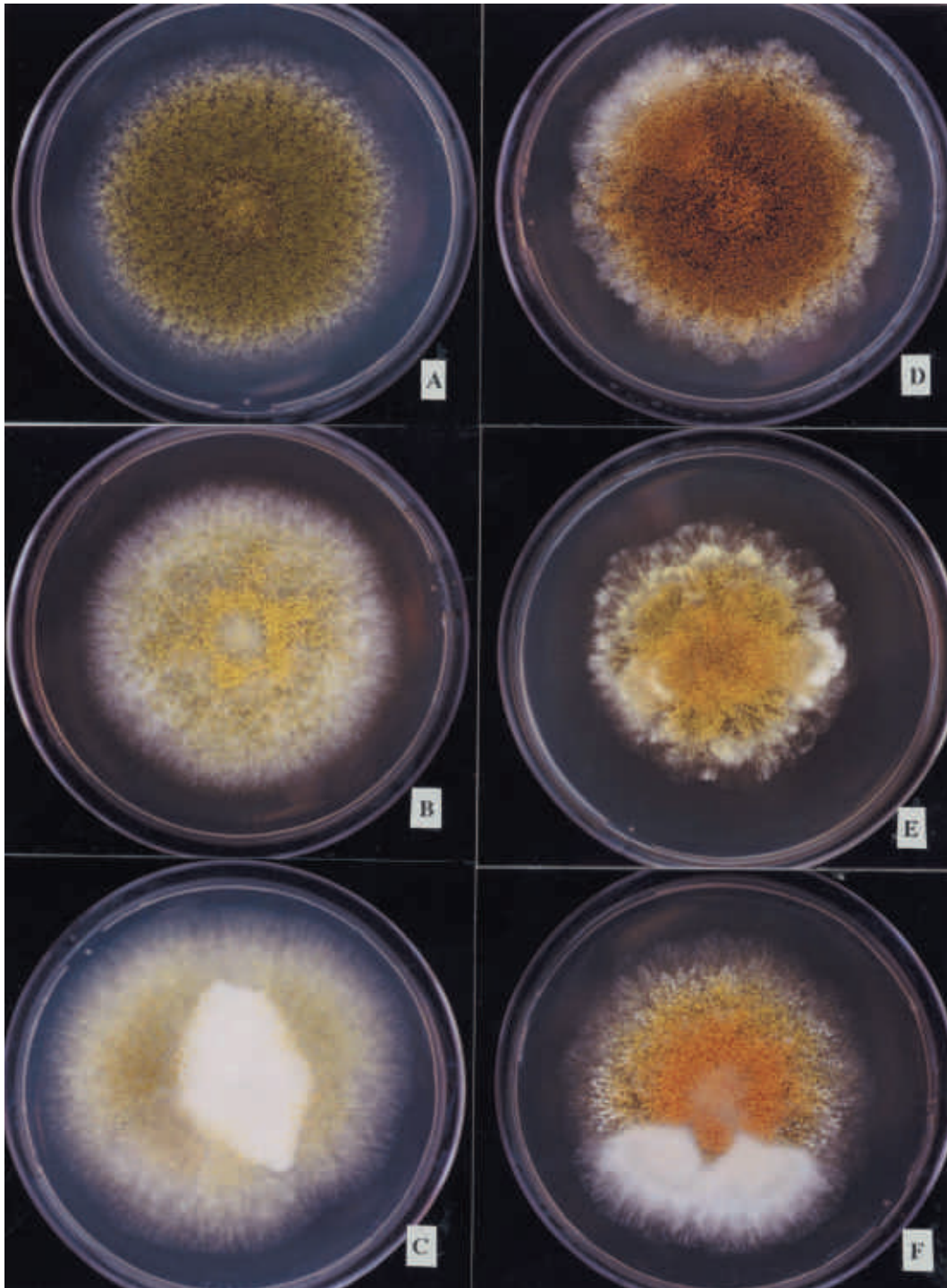


図2. *Aspergillus* section *Flavi* の菌

A : *A. flavus*, B : *A. nomius*, C : *A. bombycis*,  
 D : *A. tamarii*, E : *A. caelatus*, F : *A. pseudotamarii*,

***Aspergillus* section *Flavi* の新しい菌(2)：4 番目のアフラトキシン産生菌**

こうした中で、我々は1993年に、宮崎県下の茶園土壌から、これまで知られていなかったアフラトキシン産生菌とも違った、非アフラトキシン産生菌

である *A. tamarii* に非常に近い形態的特徴を持つアフラトキシン産生菌 (93MZ2) を単離した (図2)<sup>8)</sup>。この菌は、AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、KA、CPA を産生し、AFG 群は産生せず、マイコトキシン産生のパターンのには *A. flavus* に近い菌であった (表1)。

この当時、茶園、特に優良茶園とよばれるところ

表2. 菌の特徴(2): 形態学的特徴

菌種名	菌株	spore* <sup>1</sup>	vesicle* <sup>2</sup>	5°C* <sup>3</sup>	25°C* <sup>3</sup>	37°C* <sup>3</sup>	42°C* <sup>3</sup>	45°C* <sup>3</sup>	コロニーの色* <sup>4</sup>
<i>A. flavus</i>	93ME1	4.64(0.71)	33.3(7.89)	N* <sup>5</sup>	57.0	69.5	39.0	0.5	green
<i>A. oryzae</i>	NFR11130	5.29(0.90)	40.2(8.90)	N	51.5	65.5	24.0	0.5	light brown
<i>A. parasiticus</i>	NRRL2999	5.21(0.58)	29.5(6.84)	N	54.0	62.5	21.5	N	dark green
<i>A. sojae</i>	NFR11147	5.54(0.80)	30.0(6.79)	N	52.0	53.0	12.0	N	dark green
<i>A. tamarii</i>	NRRL20818	7.09(0.71)DW* <sup>6</sup>	34.5(5.65)	N	66.0	53.0	5.0	N	brown
<i>A. nomius</i>	NRRL13137	4.53(0.49)	39.3(6.80)	N	67.5	54.0	7.0	N	pale green
<i>A. caelatus</i>	NRRL25528	5.55(0.73)DW	27.8(5.17)	N	60.5	46.5	N	N	brown
<i>A. pseudotamarii</i>	93MZ2D	6.96(0.86)DW	30.7(4.48)	N	72.5	33.0	N	N	orange brown
<i>A. bombycis</i>	87T9221	5.87(0.57)	53.1(6.24)	N	70.0	6.0	N	N	pale olive

\*1: 平均の直径 (SD) ( $\mu\text{m}$ )\*2: 平均の直径 (SD) ( $\mu\text{m}$ )

\*3: Cza-PeK 寒天培地上での1週間後のコロニーの直径

\*4: Cza-PeK 寒天培地上2週間25°Cで培養した後のコロニーの色

\*5: 胞子の発芽が見られない

\*6: 胞子の外壁が2重になっている

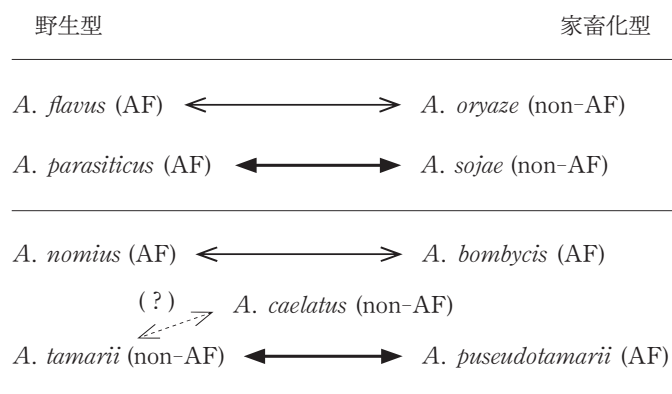
においてはチッソ肥料の過剰施肥傾向が強くなり、土壌が著しく酸性化していることが常であった。この酸性土壌は、土壌中の微生物相を真菌リッチにする効果がある。また宮崎県下は日本の西南暖地に属し、従来考えられていた日本におけるアフラトキシン産生菌の分布とも矛盾をするものではなかった。しかし、この菌の形態は、従来、非アフラトキシン産生菌と考えられてきた *A. tamarii* の形態、なかでも Thom & Raper<sup>9)</sup> によってブロンズシリーズと記載された *A. tamarii* と完全に一致した<sup>10)</sup>。特に、そのコロニーが褐色に近い色となることは、従来のアフラトキシン産生菌 (*A. flavus*, *A. parasiticus*) のコロニーの色は緑色系、非産生菌 (*A. oryzae*, *A. tamarii*) のコロニーの色は茶色系という簡便な判別法からははずれたものであり、コロニーの色が茶色になると *A. oryzae* (安全な菌) という簡便な仕分けに抵触するものであった (表2)。

この発見後、米国農務省の菌株保存機関である NRRL において *A. tamarii* という名称で保存されていた全菌株を入手し、そのマイコトキシン産生性や形態学的特性を再検討した。その結果、1930年代 (AF 発見以前) にブラジルで土壌から分離され、NRRL において保存されていた1菌株 (NRRL443) が AFB 群, CPA, KA を産生し<sup>11)</sup>、そのほかの形態学的特性も前記の菌株 (93MZ2D) と一致し、調べた範囲の DNA のシーケンスも一致した。またほかの *A. tamarii* とは異なった塩基配列を持つことも明らかとなり、形態的特徴も含めて、*Aspergillus pseudotamarii* として新たに記載した<sup>12)</sup>。

### *Aspergillus section Flavi* の新しい菌(3): 5番目のアフラトキシン産生菌

アフラトキシン産生菌は、熱帯あるいは亜熱帯地域の土壌あるいはそれらの地域で生産された穀類からは比較的容易に分離されるが、先に述べたように、わが国の土壌での産生菌の分布は非常に限られたものとなっている。一方、我々は、蚕のフンや蚕室内のゴミなどからしばしば AF 産生菌が検出され、その分布は東北地方にも広がっていることを報告<sup>13)</sup> していた。しかしながらその産生菌の詳細についての検討はなされていなかった。前記の新しい AF 産生菌 (*A. pseudotamarii*) に関する検討を進めて行く中で、以前に養蚕現場から分離した AF 産生菌の一部が、これまで日本での存在が記録されていなかった AF 産生菌である *A. nomius* と同定された<sup>14)</sup>。さらにこれらの AF 産生菌の中に、既知の産生菌である *A. flavus*, *A. parasiticus* はむろんのこと *A. nomius* や *A. pseudotamarii* と形態的特徴が異なる AF 産生菌がいることを見いだした。

この AF 産生菌は、*A. parasiticus* や *A. nomius* と同じく AFB 群, AFG 群の AF と KA を産生するものの CPA の産生は認められなかった (表1)。また、形態的な特徴は *A. nomius* のそれに類似する所が多かったが、その vesicle の大きさにおいて大きな違いがあり、またそのコロニーの色も *A. nomius* のうぐいす色とは異なり薄い茶色を呈した (表2, 図2)。これらの特徴に加え、DNA の解析においても既知の *Aspergillus section Flavi* のいずれの菌とも異なることが確認されたため、この菌はその由来である蚕から名前をとって *Aspergillus*



*bombycis* と命名, 記載した<sup>15)</sup>。

*Aspergillus bombycis* は, その後, 日本国内にとどまらず, インドネシア, マレーシアの養蚕場からも分離されたが, どの国においても蚕室外の土壤などからは分離されていない。このことから, この菌が直接的に農産物を汚染して, 人畜に被害を与える可能性は低いものと考えられる。また同じ *A. bombycis* においてもその DNA のフィンガープリントのパターンは微妙に異なり, 地域性があるように見られる<sup>16)</sup>。このことは, この菌が養蚕 (蚕) と密接な関係を持つように見られること, 図 3 に示すこのセクションの菌における野生型と家畜化型の仮説における菌相互の対応関係とも関連して, 今後非常に興味深い研究領域として残っている。

### ま と め

先にも述べたように, AF は実験動物に強い発ガン性を示すマイコトキシンで, とうもろこし, ピーナツ, ナッツ類を中心に熱帯, 亜熱帯そして一部温帯地域において, 広範な農産物での汚染が認められている。そのため, AF による被害は, 直接的な人畜への健康被害に加え, 生産地の経済的な被害も大きな問題となっている。また, 近年 section *Flavi* 以外のアスペルギルス属菌 (*Aspergillus ochraserosum*), あるいはケトミウム属菌による産生も報告され, その汚染の原因あるいは実態がより明らかとなりつつある。こうした中で, 日本の醗酵食品産業で使われている *A. oryzae* あるいは *A. sojae* といった菌が, AF 産生菌である *A. flavus* や *A. parasiticus* と極近縁の菌でありながら, AF 産生性を示さないこと, また, 現在までのところ, 蚕周辺からのみ分離される特異な AF 産生菌など, 今後, 食

品の安全性を考える上で多くの興味深い問題が残っている。

### 謝 辞

この研究の多くの部分は, 現在独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構花き研究所, 伊藤陽子女史, 米国農務省農業利用研究センター, D.T. Wicklow 博士, 同じく S.W. Peterson 博士との共同の下になされた。

### 文 献

- 1) Blount, W. P.: Turkey "X" Disease, Turkeys, **9**, 52-61, 1961.
- 2) WHO: Environmental Health Criteria 11 Mycotoxins, WHO, Geneva, 1979.
- 3) Kurlzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C. W.: *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **53**, 147-158, 1987.
- 4) Tanaka, K., Goto, T., Manabe, M. and Matsuura, S.: Traditional Japanese Fermented Foods Free from Mycotoxins Contamination, *Japan Agricultural Research Quarterly (JARQ)*, **36**, 45-50, 2002.
- 5) Horn, B.W.: *Aspergillus caelatus*, a new species in section *Flavi*, *Mycotaxon*, **61**, 185-191, 1997.
- 6) Horn, B.W. and Dorner, J.W.: Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States, *Mycologia*, **90**, 767-776, 1998.
- 7) Ito, Y., Goto, T. and Peterson, S.W.: Characters of aflatoxigenic fungi isolated from silkworm frass and teafield soil in Japan, *Mycotoxins*, **49**, 35-38,

- 1999.
- 8) Ito, Y. and Goto, T.: *Aspergillus flavus* group fungi isolated from Japanese tea fields, *Mycotoxins*, **40**, 52-55, 1994.
- 9) Thom, C. and Raper, K.B.: A manual of the aspergilli, Williams & Wilkins, Baltimore, 1945.
- 10) Goto, T., Wicklow, D.T. and Ito, Y.: Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamaraii* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4036-4038, 1996.
- 11) Goto, T., Ito, Y., Peterson, S.W. and Wicklow, D. T.: Mycotoxin producing ability of *Aspergillus tamaraii*, *Mycotoxins*, **44**, 17-20, 1997.
- 12) Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T.: *Aspergillus pseudotamaraii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*, *Micol. Res.*, **105**, 233-239, 2001.
- 13) 後藤哲久, 田中健治, 鶴田理, 真鍋勝: 国内養蚕地域におけるマイコトキシン産生性 *Aspergillus flavus* 菌群の分布, *食総研報*, **54**, 10-13, 1990.
- 14) Ito, Y., Peterson, S.W. and Goto, T.: Isolation and characterization of *Aspergillus nomius* from Japanese soil and silkworm excrement, *Mycotoxins*, **46**, 9-15, 1998.
- 15) Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. and Goto, T.: *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*, *Mycologia*, **93**, 689-703, 2001.
- 16) Goto, T., Wicklow, D.T., McAlpin, C.E. and Peterson, S.W.: *Aspergillus bombycis* genotypes (RFLP) from silkworm cultivation, *Mycoscience*, **44**, 209-215, 2003.

## Aflatoxigenic and Non-aflatoxigenic Species in *Aspergillus* Section *Flavi*

Tetsuhisa GOTO

Department of Bioscience and Biotechnology,  
Faculty of Agriculture, Shinshu University

### Summary

Aflatoxins are a group of carcinogenic mycotoxins which are produced by some fungi in *Aspergillus* section *Flavi*. As aflatoxin produces, *A. flavus* and *A. parasiticus* has been known for a long time and *A. nomius* was added as aflatoxin producing fungi at 1987. Also, as non-aflatoxigenic fungi in this section, *A. oryzae*, *A. sojae* and *A. tamaraii* were known until late 1990s. At 1997, a new non-aflatoxigenic fungi in this section, *A. caelatus* was described by Horn. Then in 2001, two aflatoxigenic species, *A. pseudotamaraii* and *A. bombycis* were added to this section. These new species do not fit *A. flavus*-*A. oryzae* or *A. parasiticus*-*A. sojae* type relation, domestication, but have close relation between *A. tamaraii* and *A. pseudotamaraii*, and between *A. nomius* and *A. bombycis*.

**Key word** : aflatoxin, producer, non-producer, *Aspergillus* section *Flavi*, domestication