

<最終年度報告書>

委託プロジェクト研究
「食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト」
平成29年度 最終年度報告書

13406478

カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発

研究実施期間	平成25年度～平成29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
研究開発責任者	長嶋等（H25-27） 久城真代（H28-29）
共同研究機関	学校法人金井学園 福井工業大学
	国立大学法人 東京大学
	国立大学法人 岐阜大学
	地方独立行政法人 北海道立総合研究機構
	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（中央農業研究センター、九州沖縄農業研究センター）
普及・実用化支援組織	
研究開発責任者 連絡先	TEL : 029-838-8037 FAX : 029-838-7996 E-mail : kushirom@affrc.go.jp

<別紙様式3. 最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1-1. 分子生物学的手法を用いた食品中におけるカビ毒産生菌の混入リスクの評価及び検出技術の研究開発	← PCR法の高度化 →					農研機構・食品研究部門	食品醸造微生物ユニット
1-2. アフラトキシン産生菌の簡易検出法の確立と産生菌の動態解明	← DV-AM法の高度化 →					農研機構・食品研究部門 福井工業大学	食品化学ハザードユニット 環境情報学部
2. カビ毒汚染実態把握のための分析法の確立	← ワイン中フモニシンの調査と分析法の確立、カビ毒誘導体の調査 →					農研機構・食品研究部門	食品化学ハザードユニット
3. 蛍光指紋によるカビ毒の簡易・迅速スクリーニング法開発	← 指紋領域の探索 →					農研機構・食品研究部門	非破壊計測ユニット
4. カビ毒汚染防除法の開発に向けたカビ毒産生阻害物質の作用機構の解明	← AF産生阻害剤による産生機構の解析とマーカー分子の探索 →					東京大学	農学生命科学研究科
5. 小麦におけるゼアラレノン蓄積性検定法の開発	← ZEA検定法の開発と栽培条件による各種カビ毒蓄積の調査 →					農研機構・九州沖縄農業研究センター	病害グループ
6. イネにおけるフモニシン産生フザリウム菌の実態と生産管理がフモニシン汚染に与える影響の解明	← 籾米でのフモニシン産生菌着生率の調査と産生条件・要因の解析 →					岐阜大学	生命科学総合研究支援センター 応用生物科学部
7. 北海道の春まき小麦地帯におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態の解明	← 道央・道南でのT2/HT2トキシン産生菌の分布実態の調査 →					道総研	中央農業試験場
8. 北海道の秋まき小麦地帯におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態の解明	← 道東でのT2/HT2トキシン産生菌の分布実態の調査 →					道総研	十勝農業試験場
9. カビ毒の各種調理法による減衰調査ならびに加工調理での汚染低減技術の開発	← DON, NIV, ZEAの調理後残存率調査 →					農研機構・食品研究部門	食品化学ハザードユニット 食品製造工学ユニット

I - 2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	農研機構・食品研	食品化学ハザードユニット	◎長嶋等 (H25-27) 久城真代 (H28-29)
1-1. 分子生物学的手法を用いた食品中におけるカビ毒産生菌の混入リスクの評価及び検出技術の研究開発	農研機構・食品研究部門	食品醸造微生物ユニット	○鈴木忠宏 岩橋由美子 (H25-27)
1-2. アフラトキシン産生菌の簡易検出法の確立と産生菌の動態解明	農研機構・食品研究部門 福井工業大学	食品化学ハザードユニット 環境情報学部	○久代真代 矢部希見子 (H28-29)
2. カビ毒汚染実態把握のための分析法の確立	農研機構・食品研究部門	食品化学ハザードユニット	○中川博之
3. 蛍光指紋によるカビ毒の簡易・迅速スクリーニング法開発	農研機構・食品研究部門	非破壊計測ユニット	○葛瑞樹 杉山純一 (H25-27)
4. カビ毒汚染防除法の開発に向けたカビ毒産生阻害物質の作用機構の解明	東京大学	農学生命科学研究科	○作田庄平
5. 小麦におけるゼアラレノン蓄積性検定法の開発	農研機構・九州沖縄農業研究センター	病害グループ	○宮坂篤 川上顕 (H25-27) 平八重一之 (H25-26)
6. イネにおけるフモニシン産生フザリウム菌の実態と生産管理がフモニシン汚染に与える影響の解明	岐阜大学	生命科学総合研究支援センター 応用生物科学部	○須賀晴久
7. 北海道の春まき小麦地帯におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態の解明	道総研	中央農業試験場	○相馬潤 (H25-26) ○小澤徹 (H27-29) 野津あゆみ
8. 北海道の秋まき小麦地帯におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態の解明	道総研	十勝農業試験場	○小澤徹 (H25-26) 栢森美如 (H27-29) 安岡真二
9. カビ毒の各種調理法による減衰調査ならびに加工調理での汚染低減技術の開発	農研機構・食品研究部門	食品化学ハザードユニット 食品製造工学ユニット	○長嶋等 (H25) ○久代真代 (H26-27) 岡留博司 (H25-27)

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
大課題名	食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト		
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	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 長嶋 等 (H25-27)、久城真代 (H28-29)		

I-1. 研究目的

気象災害の激甚化と温暖化に伴い、カビ毒産生菌による作物汚染リスクは高まっている。カビ毒産生菌の簡便な判別技術、カビ毒産生菌の分布調査、リスクが考えられるカビ毒の作物・食品における分析法の確立、カビ毒汚染制御のための基礎知見、生産管理技術が求められている。このため、本研究では

課題1-1 分子生物学的手法を用いた食品中におけるカビ毒産生菌の混入リスクの評価及び検出技術の研究開発

課題1-2 アフラトキシン産生菌の簡易検出法の確立と産生菌の動態解明

課題2 カビ毒汚染実態把握のための分析法の確立

課題3 蛍光指紋によるカビ毒の簡易・迅速スクリーニング法開発

課題4 カビ毒汚染防除法の開発に向けたカビ毒産生阻害物質の作用機構の解明

課題5 小麦におけるゼアラレノン蓄積性検定法の開発

課題6 イネにおけるフモニシン産生フザリウム菌の実態と生産管理がフモニシン汚染に与える影響の解明

課題7 北海道の春まき小麦地帯におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態の解明

課題8 北海道の秋まき小麦地帯におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態の解明

課題9 カビ毒の各種調理法による減衰調査ならびに加工調理での汚染低減技術の開発により、Codex において農産物中の含有濃度低減手法の確立を求められているカビ毒（フモニシン、ゼアラレノン、T-2/HT-2 トキシン、アフラトキシン等）について、カビ毒産生菌の分離・同定法及びカビ毒の検出・定量技術の開発を目標とする。また、妥当性確認されたワイン中フモニシンの分析法を開発するとともに、農産物やその加工品におけるカビ毒の動態を解明し、それに基づくカビ毒の低減技術の開発を目指す。その結果、カビ毒汚染実態調査に資する技術開発及びカビ毒による作物・食品の汚染低減が期待される。

I-2. 研究結果

(1) 課題1

アフラトキシン (AF) 産生菌検出のための基本技術として、PCR 法を開発した (H25-27)。また、圃場現場や貯蔵施設で利用可能なアフラトキシン産生菌判別技術の開発を目標とし

て、アフラトキシン産生菌可視検出法 DV-AM 法（ジクロロボス-アンモニア法）の改良を行うとともに、同方法をマイナーAF 生産菌に適用し、有効性を確認した(H28-29)。

(2) 課題 2

新たなカビ毒の汚染リスクとして、*Aspergillus niger*に属するカビの一部によるフモニシン B₂ 産生が報告されたことから、ワインやその原料のフモニシン汚染実態把握のための分析法を開発した。

(3) 課題 3

アフラトキシン等、蛍光をもつカビ毒について、煩雑な前処理不要で簡便に閾値識別しうるような、スクリーニングに使える蛍光指紋領域の絞り込みを行った。

(4) 課題 4

カビの生育に影響を与えずカビ毒産生を特異的に阻害する低分子化合物を用いて、カビ毒産生機構を探るとともに、産生菌と非産生菌を区別し汚染防除に活用できるマーカー候補分子を見出した。

(5) 課題 5

小麦におけるゼアラレノン (ZEA) の蓄積性について研究を行い、ZEA 蓄積性検定法を開発し、収穫適期以降の継続した散水により、小麦粒の ZEA 蓄積量が増加することを圃場試験で明らかにした。また、開花期及び開花 20 日後の薬剤散布により、小麦粒の ZEA 蓄積量とデオキシニバレノール (DON) 配糖体の蓄積量が減少することを圃場試験で明らかにした。

(6) 課題 6

イネから分離されるフザリウム属菌にはフモニシン産生能を持つものがあるが、国産イネ種子のフモニシン汚染リスクは明確になっていないため、フモニシン産生フザリウム属菌の着生とフモニシン汚染の調査を行うとともに、管理条件がフモニシン汚染に与える影響を調べた。

(7) 課題 7

T-2/HT-2 トキシンは欧州の冷涼小麦地帯で問題となっているが、北海道における T-2/HT-2 トキシン産生菌の分布状況は不明であることから、北海道の石狩・空知地方を中心とした春まき小麦地帯の小麦及び小豆における T-2/HT-2 トキシン産生菌を特定し、その分布実態を明らかにした。

(8) 課題 8

T-2/HT-2 トキシンは欧州の冷涼小麦地帯で問題となっているが、北海道における T-2/HT-2 トキシン産生菌の分布状況は不明であることから、北海道の十勝・網走地方を中心とした秋まき小麦地帯の小麦及び小豆における T-2/HT-2 トキシン産生菌を特定し、その分布実態を明らかにした。

(9) 課題 9

国産小麦の製粉による DON 及びニバレノールの動態について、農林水産省委託プロジェクト研究「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発」で解析されたが、同時汚染の可能性の高い ZEA については調査事例がほとんど無いことから、調理・製粉工程における ZEA の動態を明らかにした。

I-3. 今後の課題

潜在的な食品中のカビ毒に関する情報収集及び国際的なリスク評価機関の評価から、潜在的

なヒトの健康リスクの要因としてのカビ毒配糖体など誘導体の調査が必要である。

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	1-1	研究期間	平成25～27年度
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
小課題名	分子生物学的手法を用いた食品中におけるカビ毒産生菌の混入リスクの評価及び検出技術の研究開発		
小課題責任者名・研究機関	鈴木忠宏、岩橋由美子・農研機構 食品研究部門		

1) 研究目的

食品の発酵や醸造に用いられるカビは、食品産業の発展と共に安全性の高い株が選抜されている。しかし、由来となったカビの近縁には、しばしばアフラトキシン等のカビ毒産生能を有する種が存在している。両者は極めて近縁であるため、形態学的な判別は困難であり、現在は、特定の遺伝子マーカーを用いた分子生物学的手法とカビ毒の産生能力による判定が採用されている。このうち、カビ毒の産生能力は作物の貯蔵や栽培環境の変化に左右される事があるため、遺伝子マーカーによる判別は特に重要な指標となっている。しかし、食品試料には夾雑物が多く、試料中に含まれる遺伝情報から正確な判別を行う事が困難であり、多様な類縁菌とカビ毒産生菌を明確に判別する遺伝子マーカーも不足している。

そこで、本研究では改良PCR法により、試料中の夾雑物の影響を受けない遺伝子の多重増幅法を開発し、複数の遺伝子プローブを組み合わせたマイクロアレイを作製し、食品中に存在する発酵醸造菌とカビ毒産生菌の判別が可能となる技術を開発する。本研究では、特に食品の発酵や醸造に用いられ、カビ毒産生菌との判別がしばしば困難である麴カビと、類縁のカビ毒産生菌に着目した研究開発を行う。

目標を達成するために本研究で解決すべき課題は、(1) 麴カビ及びカビ毒産生菌を判別するためのプローブ設計に適した遺伝子配列の獲得、(2) 食品等の夾雑物の影響を受けない遺伝子サンプルの獲得法あるいは増幅法の開発、(3) カビ毒産生菌と麴カビの判別が可能となるマイクロアレイの開発、などである。

気象災害の激甚化と温暖化に伴い、カビ毒産生菌による作物汚染リスクは高まっており、本研究の進展は発酵・醸造食品のカビ毒汚染リスク低減に繋がるものと期待される。

2) 研究成果

(1) ガラスビーズとタンパク質分解酵素を用いた簡易的なDNA抽出法と、粗試料からのDNA増幅に効果的な市販試薬を組み合わせることで、有害性の高い試薬を使用せず、簡易にカビのDNA増幅が可能となった。

(2) 試料毎の*Apergillus*属菌の検出精度を調べるために、米や味噌等の食品及び土壌と既知菌株*A. oryzae* RIB40の混合試料を対象としてメタゲノムシーケンスによる菌叢解析を実施したところ、既知菌株を含む生物群の検出率が試料毎に異なっており、カビ毒産生菌の検出効率が混入試料の種類に影響を受けやすいことが明らかとなり、米糠試料において既知菌株

の検出効率が最も低くなった（図1）。

（3）アフラトキシン産生遺伝子クラスター（AFクラスター）上流部の遺伝子コード領域に塩基配列の多様性を確認し、既存情報を収集して遺伝子増幅（PCR）に用いる特異的プライマーセット（af1Fとする）を設計した。AF産生菌株とAF非産生菌株のアスペルギルス属菌、計337株に対してPCRを実施したところ、af1Fによる検出率は85 %前後となり、国内外の論文で報告されている既存のプライマーセットと比較して良好な検出結果を得た（図2）。

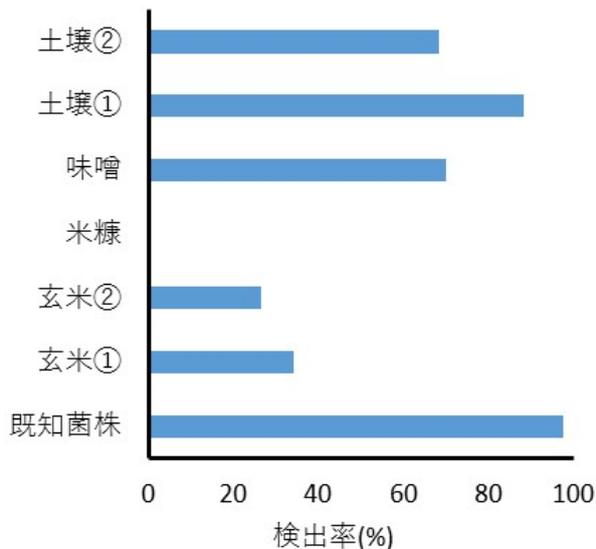


図1 既知菌株添加試料から回収したDNA中の *Aspergillus*属菌検出割合

等量の既知 *Aspergillus* 属菌 (*A. oryzae* RIB40) の胞子を各試料に添加し、DNA抽出を行ってメタゲノム解析による菌叢比較を実施した。試料の種類によって *Aspergillus* 属菌の検出率に違いがあった。対照試験として既知菌胞子を添加しなかった土壌②試料では *Aspergillus* 属菌の検出率が5 %未満であった。（当該データは未掲載）

3) 成果活用における留意点

アスペルギルス属菌におけるAFクラスター遺伝子群の保存性は多様であり、AF非産生菌にも標的領域の塩基配列が保存され得る。そのため、PCRにおける遺伝学的な特性解明と共にAF産生能を改めて確認する必要がある。

4) 今後の課題

AFクラスター上流部の遺伝子を検出対象とした本課題の成果は、当該領域において高精度のプライマー設計が可能であることを明らかにした。一方で、当該領域より上流の未解読配列が検出精度の低下を引き起こしていると考えられたことから、今後はAFクラスター上流のゲノム解読を通じてプライマー設計を改良し、検出精度を向上させる。

	全株数	検出・判別数	
		af1F	norB-cypA
AF産生菌	59	51	31
検出率(%)		86.4	52.5
AF産生菌+ AF非産生菌	337	286	131
検出率(%)		84.8	38.9

図2 PCRプライマーセットの改良によるアフラトキシン産生菌検出率の向上
AFクラスター上流部の検出対象となる遺伝子配列情報より設計したプライマーセット（af1F）と、国外で報告されており、同領域で設計された既存のプライマーセット（norB-cypA）によりAF産生菌の検出率およびAF非産生菌を含めた判別率を示した。

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	1-2	研究期間	平成28～29年度
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
小課題名	アフラトキシン産生菌の簡易検出法の確立と産生菌の動態解明		
小課題責任者名・研究機関	久城真代・農研機構 食品研究部門 矢部希見子・福井工業大学		

1) 研究目的

アフラトキシン(AF)産生菌可視検出法であるDV-AM法(ジクロロボス-アンモニア法)(Appl. Microbiol. Biotechnol. 99:10681-10694 (2015))について、*Aspergillus nomius*や*Aspergillus bombycis*などのマイナーAF産生菌に同方法を適用し、その有効性を確認する。また、同法でどの程度のAF生産量によりAF産生菌と判断できるかの確認を行い、さらに、土壌における特異性の検証を行う。これによって、簡便かつ安価な検出法としてのDV-AM法の確立を目指す。

2) 研究成果

AF産生菌の簡易検出法の確立

- ・ DV-AM法によるAF産生カビの回収率を確認するため、土壌にAF産生菌を添加して、DV-AM法に供試した。その結果、土壌添加により、AF産生菌のコロニー数は顕著に減少した。一方、高圧滅菌土壌を用いた際には、AF産生菌の生育阻害は検出されなかった。以上のことから、土壌中の微生物が共存するとAF産生菌の生育を抑えることが示唆され、選択培地の改良の必要性が確認された。
- ・ DV-AM法で用いる培地の改良を目的として、各種界面活性剤や糖の利用を検討し、さらにそれらの最適濃度条件等の検討を行った(図1)。その結果、AF産生菌を選択的に培養でき、さらにAFを大量に生産させることのできる培地条件が確立できた(以後、この改良培地を用いた方法を「改良DV-AM法」と呼ぶ)。これにより、どのような土壌でも応用できるAF産生菌検出法が完成し、検出法の構築においては目標を達成した。

産生菌の動態解明

- ・ 土壌の用途や種類に関係なく、様々な土壌を採取して改良DV-AM法に供試した結果、非圃場土壌でも赤く色調変化するカビが検出された(図2)。それらのカビを採取・純化後、薄層クロマトグラフィーを用いて代謝産物を解析したところ、AF生産性が確認された(図3)。
- ・ AF産生菌が比較的多く検出された土壌について、採取に適した土壌の深さなど採取条件を検討するとともに、土壌中のカビ形態がどのようなものかを検討した。また、得られた各種AF産生菌についてカルモジュリン遺伝子配列を解析し、主要AF産生菌に加えて、数種のマイナーAF産生菌が検出された。

・改良 DV-AM を用いて日本各地の環境試料から 200 株以上の AF 生産株が得られた。場所により、AF 生産性の違いも検出され、改良 DV-AM 法が様々な AF 生産菌の検出に有効であることが確認された。成果については、論文発表の予定である。

・作物生産現場または穀類貯蔵施設等の調査については、精米所の糠のカビを解析したが、これまでのところ AF 生産カビは検出されていない。また、非圃場土壌の AF 生産菌が何に由来するかは今後の検討が必要である。

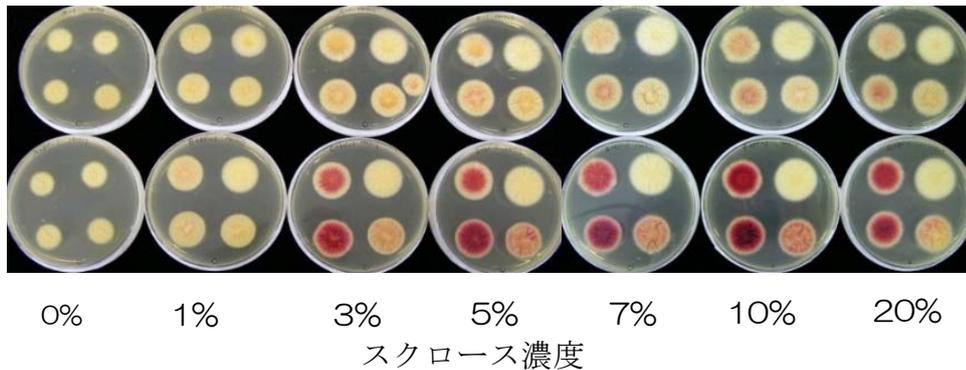


図1 培地中のスクロース濃度による赤色の程度の違い
3種のAF生産カビと1種の非AF生産カビ（右上コロニー）を種々の培地で培養しアンモニア処理を行った。



図2 改良DV-AM法を用いた土壌菌の解析例
赤色コロニーがAF生産株。黒枠で囲ったカビを採取・解析した。

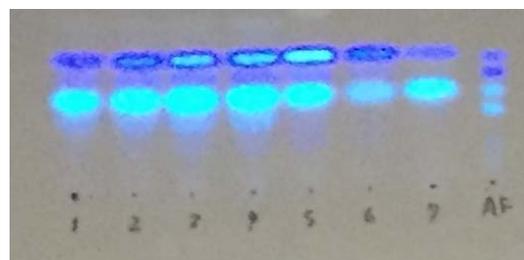


図3 改良DV-AM法における赤色コロニーの薄層クロマトグラフィー
1～7：赤色コロニー AF：アフラトキシン混合標準品

3) 成果活用における留意点

改良DV-AM法の検証は、福井工業大学構内ほか、寒冷地で得られた土壌でも行い、適用性

を確認している。

4) 今後の課題

・わが国には AF 生産菌に重度に汚染された土壌に関する報告はないことから、非圃場土壌から検出された AF 生産菌が何に由来するかを明らかにする必要がある。

・作物生産現場、穀類貯蔵施設等に存在する AF 産生菌が、食品生産工程において食品の AF 汚染に関与する可能性があるのか否かを明らかにする必要がある、その結果に応じては、AF 産生菌の動態に関する基礎的知見を得る必要がある。

・目視による実用的な AF 生産菌検出法が構築できたことから、国内外に周知し、世界的な AF 生産菌の分布状況やその動態について解明して、食品の AF 汚染低減につなげる必要がある。

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	2	研究期間	平成25～29年度
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
小課題名	カビ毒の汚染実態把握のための分析法の確立		
小課題責任者名・研究機関	中川博之・農研機構 食品研究部門		

1) 研究目的

フモニシンはトウモロコシにおける汚染がよく知られるカビ毒で、フモニシンB₁ (FB₁)、フモニシンB₂ (FB₂)、フモニシンB₃ (FB₃) が主要な異性体として存在する。近年、*Aspergillus niger*の一部がFB₂を産生することが報告され、欧州ではワインのFB₂汚染が確認されている。そこで、国内産のワイン原料におけるフモニシン汚染を把握するため、高速液体クロマトグラフトンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) を使用し、ppb (μg/L) 濃度レベルでフモニシンを分析可能な手法を確立する。

また、JECFAは2010年にデオキシニバレノール (DON) の暫定最大耐容一日摂取量 (PMTDI) をアセチル体の量も勘案したトータルDONとして設定した。DON以外のカビ毒に関しても各種誘導体の存在が報告されており、今後、このような各種誘導体を含めたリスク評価が他のカビ毒にも適用されることが予想される。そこで、穀類において存在が知られているカビ毒の誘導体 (モディファイドマイコトキシン) を包括的に検出可能な手法を確立することを目的とする。

2) 研究成果

固相抽出 (SPE) カラム (逆相カラム、イオン交換カラム) を用いたフモニシン精製法を検討し、逆相カラム吸着時に酸を添加し、溶出前にメタノール/水による洗浄操作を追加することで、フモニシンの回収率が安定することを確認した。本精製法は、ワインを汚染することが知られているオクラトキシン類の同時精製にも有効であることが確認された (図1)。

高速液体クロマトグラフ高分解能質量分析装置 (LC-HRMS) を用いて、フモニシン分子のアミノ基 (-NH₂) を介して糖が結合したフモニシン糖誘導体や類縁体 (図2) の探索を行った。カビ毒自然汚染試料由来のトウモロコシ粉末組成標準物質について分析を行ったところ、フモニシンB群 (FB₁、FB₂及びFB₃) のアミノ基に隣接するメチル基を欠く類縁体として、フモニシンC群 (フモニシンC₁ (FC₁)、フモニシンC₂ (FC₂) 及びフモニシンC₃ (FC₃)) を、またフモニシンB群とC群のそれぞれについて、糖誘導体を新たに検出した (図3)。

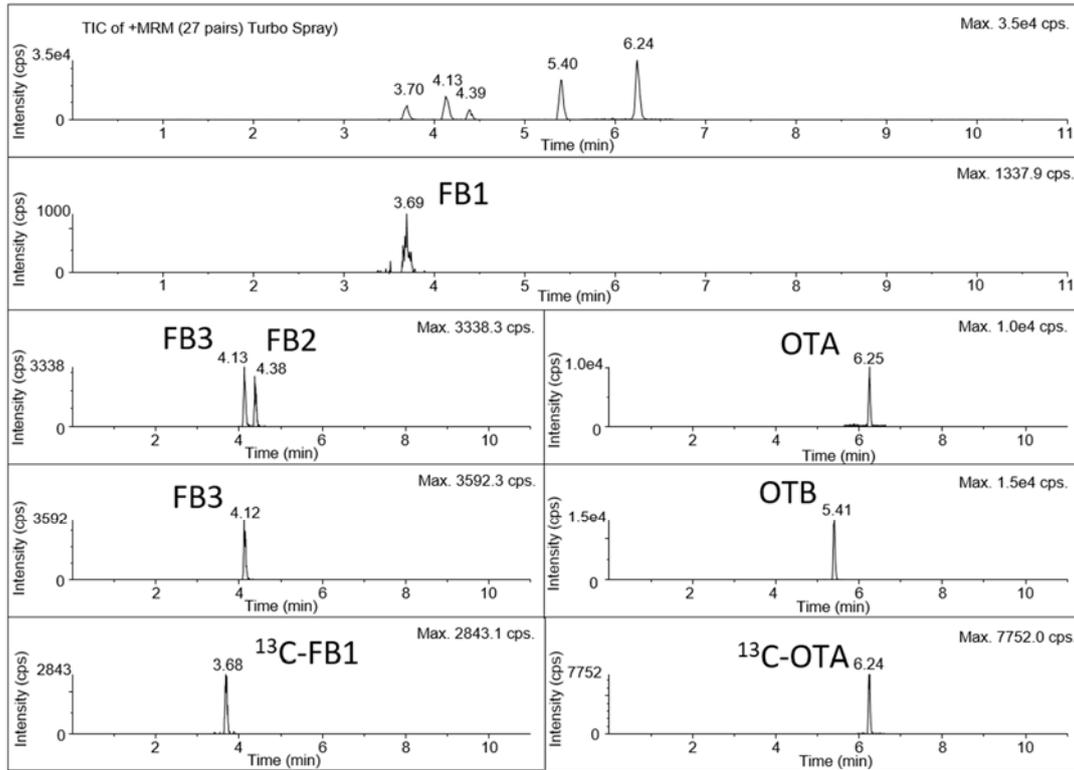
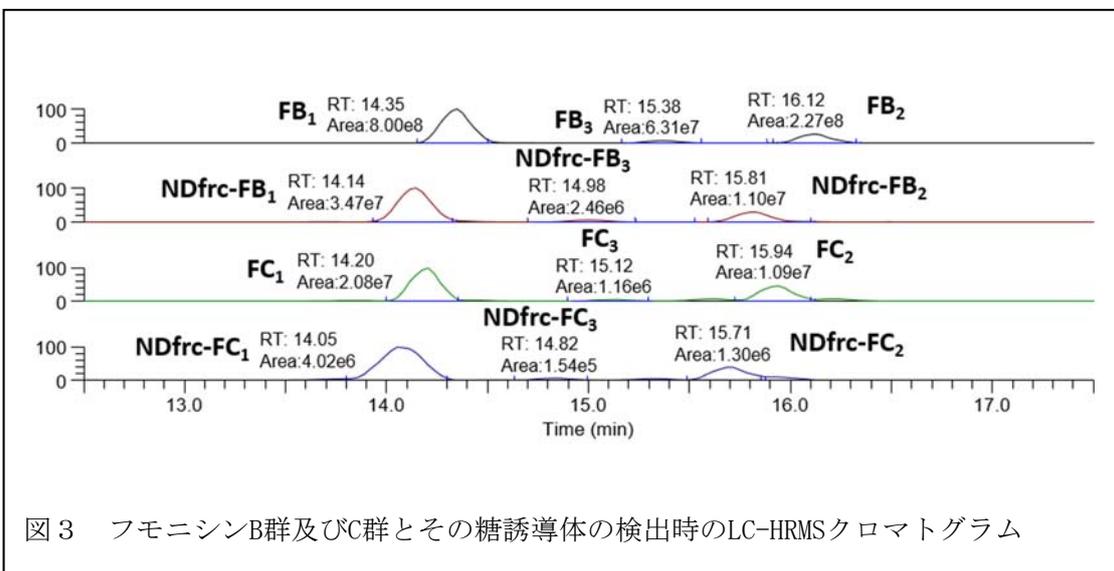
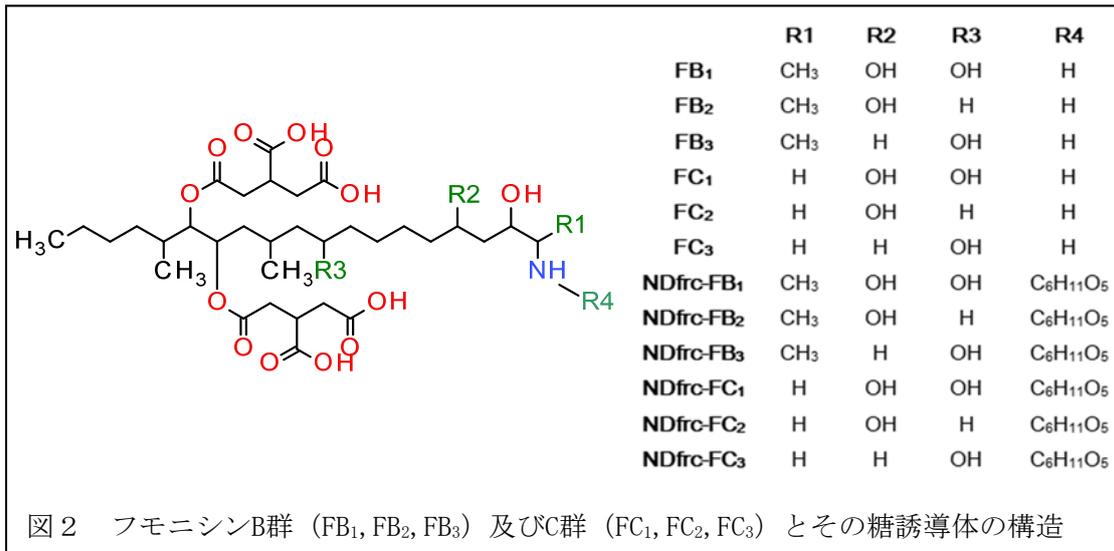


図1. カビ毒添加 (FB₁, FB₂, FB₃を各2 μg/kg, OTAおよびOTBを各 1 μg/kg) した赤ワインとカビ毒標準品のLC-MS/MSクロマトグラム



3) 成果活用における留意点

フモニシンの糖誘導体やフモニシンC群の分析については、LC-HRMSの検出ピーク面積に基づく相対量の比較に留まっている。暴露評価やサーベイランスのための定量分析には、分析用標準試薬（現時点では市販品はない）による定量分析法の開発と妥当性確認が必要である。

4) 今後の課題

フモニシンの糖誘導体やフモニシンC群について、リスク管理の必要性を検討するため、今後、分析用標準試薬を用いた絶対定量法によるサーベイランスや、各カビ毒誘導体の毒性評価データの取得が望まれる。

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	3	研究期間	平成25～27年度
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
小課題名	蛍光指紋によるカビ毒の簡易・迅速スクリーニング法開発		
小課題責任者名・研究機関	葛 瑞樹、杉山純一・農研機構 食品研究部門		

1) 研究目的

蛍光指紋計測とデータマイニングにより、香辛料におけるアフラトキシン汚染を、簡易かつ迅速に検出する技術を開発する。具体的には、深刻なアフラトキシン汚染が報告されている海外産香辛料を対象に、試料の前処理、蛍光指紋の計測波長範囲等、アフラトキシン検出に最適な計測条件を明らかにする。その上で、蛍光指紋を用いて香辛料におけるアフラトキシンB₁、B₂、G₁、G₂の濃度及び総アフラトキシン濃度を簡易に推定する手法を開発する。また、蛍光指紋においてアフラトキシン汚染検出に有効な波長帯を同定し、計測時間の短縮と装置の低コスト化を試みる。

2) 研究成果

(1) 研究用粉砕装置(安井器械製マルチビーズショッカー)によりナツメグ試料を粉砕したところ、油分による「固まり(だま)」が発生した。そこで、試料のロットによらず微粉砕が可能な方法を再度検討した。常温での粉砕では油分が多く分離するため、事前に粉砕容器に試料を封入し、ディープフリーザーで一晩凍結することとした。また、粉砕機(安田器械製マルチビーズショッカー)の回転数や粉砕時間を様々に変え、①同一ロットの試料で蛍光強度の変動係数が5%以下、②主成分分析により試料のロット間差が明確になる、③目視で変色せず粒子が細かくなっていることが分かる、といういずれも満たす条件を探索した。その結果、当該粉砕機におけるナツメグ試料の粉砕には、-80℃で凍結した上で、1500rpm、45秒間粉砕が最適なことが明らかとなった(表1)。なお、ナツメグ試料にはアフラトキシンが高濃度で蓄積し、カビ胞子の付着が疑われる試料もあるため、試料を完全に封入可能で、封入容器を使い捨てにできる方式の粉砕が望ましいと考えられる。

(2) インドネシア産の荒粉砕ナツメグを実験に供試した。現地で人手による目視選別により、アフラトキシン汚染が「あり」、「なし」と判定された試料と、両者を混合した試料合わせて90点を用いた。粉砕機(前述のものと同型)により、(1)で特定した粉砕条件で試料を再粉砕して、粉体試料の蛍光指紋を計測した。分光蛍光光度計には、日立ハイテクノロジー製F-7000を用いた。また、同一試料の総アフラトキシン濃度を、依頼分析により測定した。蛍光指紋を説明変数、依頼分析により測定した総アフトキシン濃度(実測値)を目的変数として、partial least squares (PLS)回帰分析を実施したところ、回帰モデルの作成には用いなかったバリデーション試料における推定精度は決定係数0.52となり、現時点では蛍光指紋に

よる総アフラトキシン濃度の定量推定は困難であることがわかった(図1)。一方、基準値(総アフラトキシンとして10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)未満と基準値以上の試料は、蛍光指紋により明確に識別可能であり、簡易的な汚染・非汚染の判別スクリーニングへの応用の可能性が示唆された。

表1 ナツメグ再粉碎条件の検討

粉碎方法	変動係数での判定	主成分分析での判定	変色なし・粒度小 (目視評価)
1000rpm_60s			
再粉碎なし	○	○	
1500rpm_45s	○	○	○
1000rpm_30s		○	
1500rpm_30s			○
2500rpm_5s	○		○

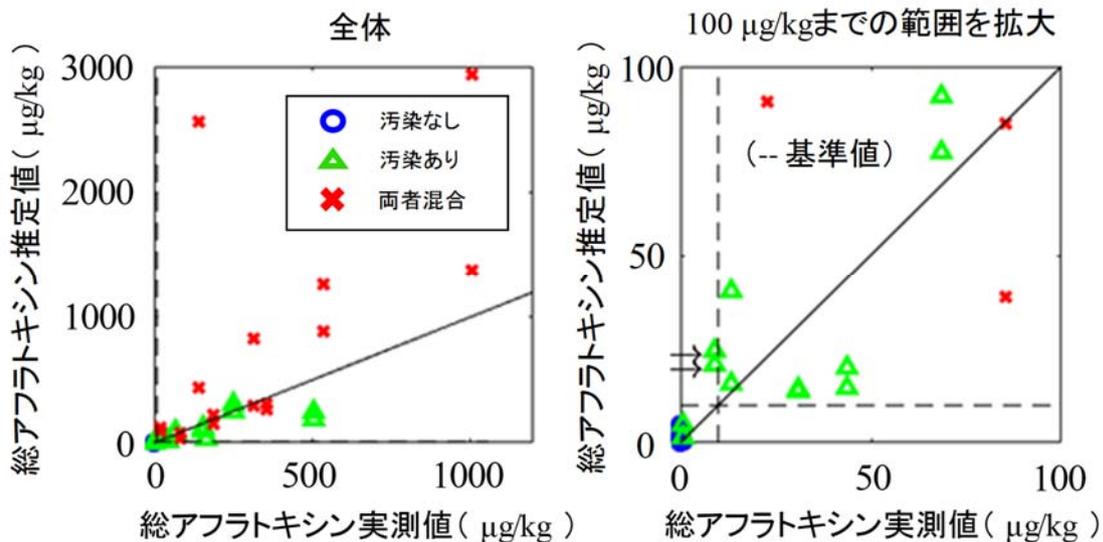


図1 PLS回帰分析による総アフラトキシンの推定結果
(右図矢印は10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であるにも関わらず10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上と推定された試料)

3) 成果活用における留意点

本成果はプロジェクト期間中に収集したインドネシア産の試料について得られたものであり、他の年次や産地の試料について適用可能かどうかについて検証する必要がある。

4) 今後の課題

ナツメグについては行政ニーズが低いため、今後の検討は行わない。行政ニーズが高い他の品目については、自然汚染試料の入手ができれば、ナツメグと同様の手法によるアフラトキシンの簡易・迅速検出について検討することが望ましい。

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	4	研究期間	平成25～29年度
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
小課題名	カビ毒汚染防除法の開発に向けたカビ毒産生阻害物質の作用機構の解明		
小課題責任者名・研究機関	作田庄平・東京大学		

1) 研究目的

農作物のアフラトキシン及びトリコテセン汚染を低減する手法を開発するための基盤研究として、課題担当者が既に取得しているアフラトキシン及びトリコテセン産生阻害物質のターゲット分子を中心とした作用機構を解明する。このことによって、現在不明であるカビ毒産生の分子機構を明らかにし、カビ毒産生条件をモニターするマーカー分子や遺伝子を取得し、カビ毒汚染低減技術を開発するための基礎知見を得る。

2) 研究成果

麦類赤かび病菌 *Fusarium graminearum* のデオキシニバレノール産生を、産生菌の育成には影響を与えずに選択的に阻害する物質であるプレコセンⅡの作用機構解析を行った。プレコセンⅡを結合したアフィニティービーズを用いて、プレコセンⅡに特異的に結合するタンパク質がミトコンドリアに存在する voltage-dependent anion channel (VDAC) であることを明らかにした。さらにプレコセンⅡはVDACに結合して、ミトコンドリアから細胞質へのスーパーオキシドの輸送を阻害し、ミトコンドリア内にスーパーオキシドを蓄積することを見出した。細胞内のスーパーオキシド量はトリコテセン産生と関係しており、スーパーオキシド量が多いときはトリコテセン産生が開始せず、また、スーパーオキシドの代謝酵素であるSODをコードする遺伝子の破壊株では、DON産生の減少が見られた。また、スーパーオキシド発生試薬であるパラコートやメナディオンはトリコテセン産生を阻害し、トコフェロール、ビタミンC等の抗酸化剤は、逆にトリコテセン産生を促進した。プレコセンⅡはトリコテセンだけでなく、*Aspergillus flavus* のアフラトキシン産生も弱く阻害する。アフラトキシン産生においても、パラコートは産生を阻害し、ビタミンCは産生を促進した。以上より、トリコテセン、アフラトキシン産生には、スーパーオキシド等の活性酸素量が強い影響を与えることが示された。

Stenotrophomonas 属細菌が生産する cyclo(L-Ala-L-Pro) は、アフラトキシン生合成における鍵転写因子である Af1R の発現を抑制することで、選択的なアフラトキシン産生阻害活性を示す。cyclo(L-Ala-L-Pro) を固定化した Sepharose ビーズを用いて、*A. flavus* の cyclo(L-Ala-L-Pro) 結合タンパク質として、glutathione S-transferase (AfGST) を同定した。cyclo(L-Ala-L-Pro) は組換え AfGST に結合し、その GST 活性を阻害した。AfGST は *Aspergillus* 属に特有のアミン酸配列を持つ GST で、*A. flavus* において、AfGST の発現の経

時変化はアフラトキシン産生と平行であった。GST阻害剤として知られるethacrynic acidは、AfGSTのGST活性を阻害し、*A. flavus*の成育を阻害せずにアフラトキシン産生を抑制し、また、Af1RのmRNAレベルを低下させた。以上より、cyclo(L-Ala-L-Pro)は、AfGSTを阻害することによりアフラトキシン産生を抑制し、AfGSTの阻害剤は、アフラトキシン産生阻害剤として有効であることが示された。GSTは、一般に活性酸素量の調節に関与することから、GSTの阻害により活性酸素量が影響を受けて、アフラトキシン産生が減少したと考えられた。

アフラトキシン産生阻害活性を持つシリング酸メチルの誘導体のアフラトキシン産生阻害活性を調べたところ、エステルを形成するアルコールのアルキル側鎖が長い誘導体に、強いアフラトキシン産生阻害活性が見出された。シリング酸オクチル等の強いアフラトキシン産生阻害活性を持った誘導体は、ミトコンドリア呼吸鎖のコンプレックスIIを強く阻害することを明らかにした。また、呼吸阻害剤は、アフラトキシン産生阻害活性を示すことを見出しており、コンプレックスIIの阻害剤であることが知られている、シリング酸アルキルの類縁化合物であるパラベン類や没食子酸アルキルがアフラトキシン産生を阻害することを見出した。

放線菌SA-2581株の生産するジオクタチンA及び誘導体のジオクタチンは、強いアフラトキシン産生阻害活性を持つ。アフィニティービーズによるジオクタチン結合タンパク質の精製の結果、ミトコンドリア局在性のClpプロテアーゼ活性サブユニット (ClpP) が結合タンパク質として同定された。ClpPは、分子シャペロンの制御なしではタンパク質を分解できないが、ジオクタチンは、ClpPに結合することで、シャペロンなしでのタンパク質分解を可能とした。ジオクタチンは、ミトコンドリアタンパク質の異常分解を引き起こすことで、ミトコンドリアの機能に影響を与え、解糖系、エタノール産生を活性化した。ジオクタチンがAf1Rの発現を抑制するメカニズムの解明は、今後の課題であるが、産生菌が非産生菌へと薬剤で変化したときに、培養液中のエタノール量が増加する現象が普遍的である可能性が示唆された。

以上より、図1にまとめたように、トリコテセン産生ではスーパーオキシドが、アフラトキシン産生ではスーパーオキシドとミトコンドリアの機能が鍵となることが明らかになった。そこで、まず、アフラトキシン産生菌と非産生菌との違いを調べるマーカー分子として、スーパーオキシドに注目したが、産生菌と非産生菌の間でスーパーオキシド量に明白な違いは認められなかった。次に、ジオクタチンで見られたエタノール量の増加に着目した。PD液体培地にエタノールを培地容量あたり0.01%、0.1%、及び1.0%の濃度になるよう添加し、*A. flavus* IMF47798株を4日間培養したところ、添加したエタノールの濃度依存的にアフラトキシン産生量が増加した。IMF47798株をPD液体培地で4日間培養したとき、培養液に含まれるエタノール量は0.05%程度であったことより、エタノール量がアフラトキシン産生に大きな影響を与えることが示された。さらに、培養液中のエタノール産生量とアフラトキシン産生量の関係を調べるために、農研機構食品研究部門と共有している*A. flavus*株を用いてエタノール産生量とアフラトキシン産生量を調べたところ有意水準0.001で両者に負の相関があることが示された(図2)。

これらのエタノール産生量とアフラトキシン産生量の相関から、アフラトキシン生合成の原料であるアセチルCoAが、エタノールから生じたアセトアルデヒドが酢酸に変換される経路で供給されることを示唆された。そこで、関連酵素をコードする遺伝子の発現量を調べたところ、アセトアルデヒドを酢酸に変換するアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子(*AldA*)

のmRNAレベルがアフラトキシン産生菌において非産生菌よりも高いことが示された(図3)。また、¹³Cラベルエタノールを培養液に添加して生成したアフラトキシンを質量分析で調べたところ、アフラトキシンに取り込まれるアセチルCoA 8分子が全てラベルエタノール由来である分子も検出され、高い取込み率でラベルエタノールがアフラトキシンに取り込まれていた。これらのことより、エタノールがアフラトキシン産生の鍵物質であることを初めて示した。

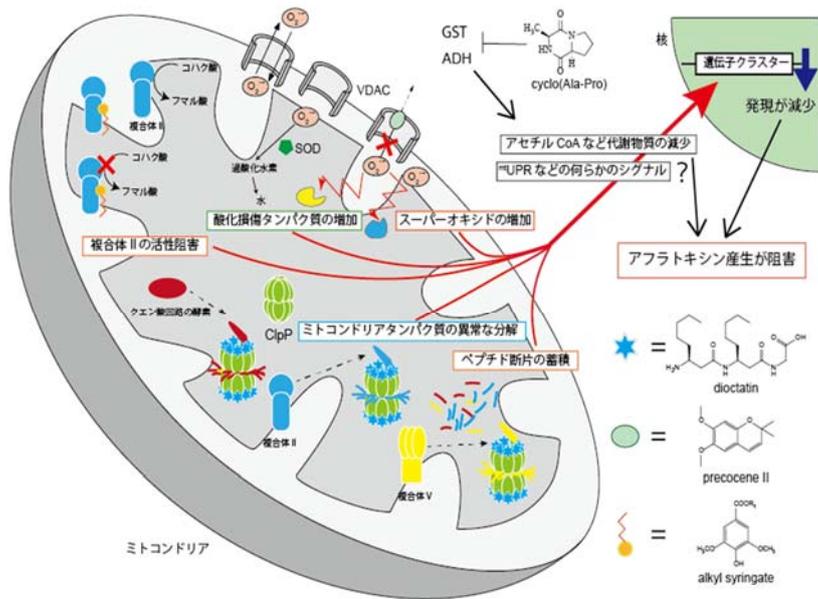


図1 カビ毒産生阻害物質の作用機構

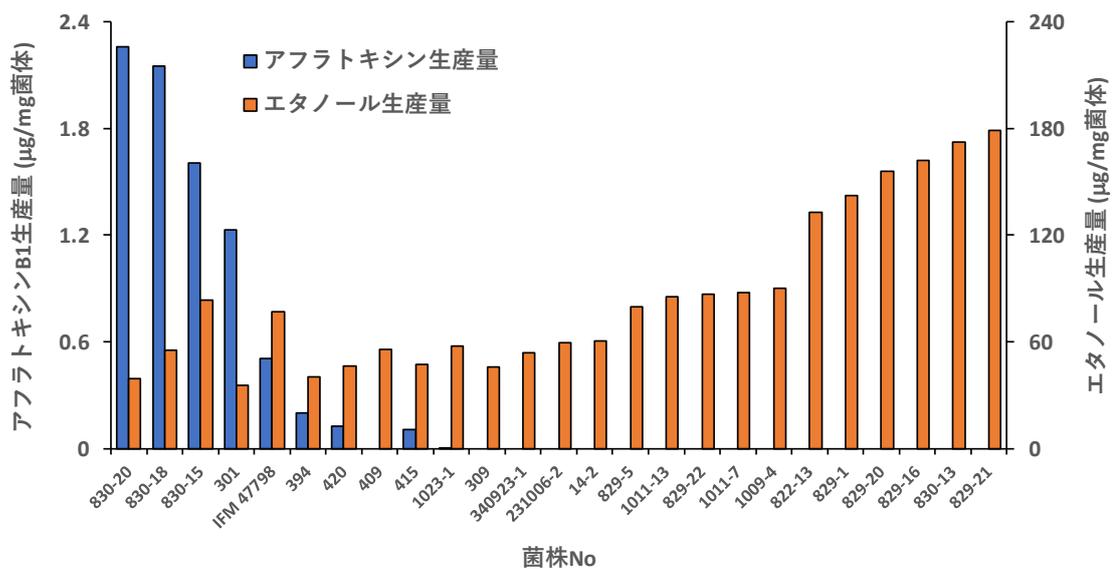


図2 アフラトキシン生産量とエタノール量の関係
スピアマンの順位相関係数 -0.67 有意水準 0.0005 (片側)

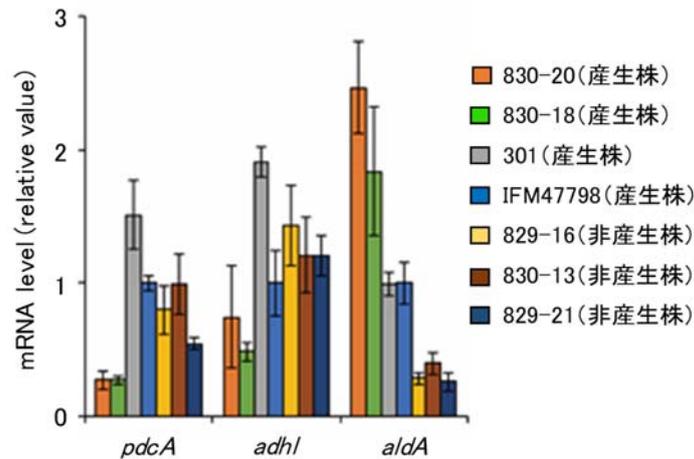


図3 *PdcA*、*ADH1*、*AldA*のmRNAレベル

PdcA: ピルビン酸デカルボキシラーゼ、

ADH1: アルコールデヒドロゲナーゼ、

AldA: アルデヒドデヒドロゲナーゼ

n=3, mean ± SD, IFM47798株のmRNAレベルを1とした相対値

3) 成果活用における留意点

エタノール産生量の違いにより、アフラトキシン産生菌と非産生菌の区別を行う手法では、産生菌と非産生菌が混合した状態での判定を行うことはできないため、対象となる菌を分離することが必要である。

4) 今後の課題

エタノール産生量をアフラトキシン産生菌と非産生菌を区別するためのマーカー分子として用いるためには、さらに多数の *A. flavus* 及び *A. parasiticus* 株についてのデータを取得し、産生菌と非産生菌の間に線引きを行うことが必要である。また、エタノール産生量を簡便に測定する方法を確立することも重要となる。エタノールがアフラトキシンの直接の原料となることの発見は、一次代謝でのアフラトキシン産生調節機構の全体像を解明する上で大きな手掛かりとなり、新たなアフラトキシン汚染防除法の開発にもつながると考えられる。

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	5	研究期間	平成25～29年度
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
小課題名	小麦におけるゼアラレノン蓄積性検定法の開発		
小課題責任者名・研究機関	宮坂 篤、川上 颯 (H25-27)、平八重 一之 (H25-26) ・農研機構 九州沖縄農業研究センター		

1) 研究目的

麦類赤かび病菌が産生するデオキシニバレノール (DON)、ニバレノール (NIV) 及びゼアラレノン (ZEA) によるかび毒汚染は、小麦栽培上重要なリスク要因である。このうちDON及びNIVについては、汚染リスク低減のための生産管理手法が開発されたが、ZEAについては技術開発の前提となる小麦での蓄積性検定法 (小麦粒にZEAが蓄積しやすい栽培法) が開発されていないのが現状である。そこで、本課題では小麦におけるZEAの蓄積性検定法を開発し、それをもとに、ZEA汚染低減のための栽培方法を明らかにすることを目的とする。また、既実施されているDON、NIV汚染低減のための栽培方法がZEA及びDON-3グルコシド (DON配糖体) の蓄積に与える影響を明らかにする。

2) 研究成果

(1) 小麦におけるZEA蓄積性検定法を開発するために、人工気象器内でポット栽培した極矮性小麦を用いて、ポット試験における接種条件を検討した。その結果、開花後20日前後に赤かび病菌分生孢子懸濁液を噴霧接種し、接種後16日間の恒温高湿度処理が小麦粒にZEAを蓄積させることに有効なことが明らかとなった。

(2) ZEA蓄積性検定法に適した菌株の選定のため、西日本で主な赤かび病菌である *Fusarium asiaticum*、*F. graminearum* のDON産生型16菌株、NIV産生型17菌株をそれぞれコメ培地で培養し、菌株ごとのZEA産生量を明らかにした。その中でZEA産生量が多かった14菌株を供試して、ハウスでポット栽培した「チクゴイズミ」に対する病原性検定を(1)の方法で行い、病原性の強いDON産生型5菌株、NIV産生型3菌株を選定した。さらに、病原性の強かった8菌株を供試して、人工気象器でポット栽培した極矮性小麦に対するZEA蓄積性検定を(1)の方法で行い、強い病原性とZEA高蓄積性を併せ持つ菌株として234-003株 (MAFF 240560株、*F. graminearum*) を選抜した。

(3) 上記(2)で選抜した234-003菌株を用いて、圃場栽培小麦のZEA蓄積と収穫適期前後の散水との関係を検討した。「チクゴイズミ」栽培圃場に234-003菌株を培養したトウモロコシ粒を接種源として散布し、出穂前からスプリンクラー散水により孢子飛散と発病を促した。収穫適期5日前 (開花35日後) までで散水を停止する散水停止区とそれ以降も継続する散水継続区とを設け、各試験区で適期5日前、収穫適期 (開花40日後)、適期5日後、10日後に収穫した。その結果、散水継続区ではZEA蓄積量、菌体量ともに収穫時期が遅くなる

につれて増加し、適期10日後が最も多く、散水停止区では、ZEA蓄積量は各収穫時期とも少なく、菌体量は収穫時期が遅くなるにつれてわずかず増加した。このことから、収穫適期以降の継続した散水によりZEA蓄積量が増加することが明らかとなった。

(4) 上記(2)で選抜した234-003菌株を用いて、圃場栽培小麦のDON、NIVを低減のための薬剤防除がZEA蓄積に与える影響を検討した。「チクゴイズミ」を供試し、(3)と同様の方法で圃場試験を行った。その結果、開花期及び開花20日後の薬剤散布(チオファネートメチル水和剤1,000倍液)により、各収穫時期における小麦粒のZEA蓄積量が無防除の場合と比較して減少することが明らかとなった。

(5) 上記(2)で選抜した234-003菌株を用いて、圃場栽培小麦のDON、NIV低減のための薬剤防除がDON配糖体蓄積に与える影響を検討した。「チクゴイズミ」を供試し、(3)と同様の方法で圃場試験を行った。その結果、開花期及び開花20日後の薬剤散布(チオファネートメチル水和剤1,000倍液)により、各収穫時期における小麦粒のDON配糖体の蓄積量が無防除の場合と比較して減少することが明らかとなった。

3) 成果活用における留意点

本課題の圃場試験の結果は、九州沖縄農業研究センター内の試験圃場で、「チクゴイズミ」と薬剤としてチオファネートメチル水和剤を供試して得られたものである。その他の試験地、小麦品種、薬剤の組合せにおいては、ZEA、DON配糖体の蓄積に与える影響が異なる可能性があることに留意が必要である。

4) 今後の課題

小麦におけるZEA、DON配糖体の蓄積については、品種間差、登熟過程における蓄積特性等の検討が必要である。また、大麦におけるZEA、DON配糖体の蓄積についても、検討が必要である。

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	6	研究期間	平成25～29年度
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
小課題名	イネにおけるフモニシン産生フザリウム菌の実態と生産管理がフモニシン汚染に与える影響の解明		
小課題責任者名・研究機関	須賀晴久・岐阜大学		

1) 研究目的

海外では、赤かび病菌*Fusarium verticillioides*によるトウモロコシのフモニシン汚染が問題となっている。一方、近年、*F. verticillioides*に近縁で、稲穂に感染することが知られたフザリウム属菌(*Fusarium fujikuroi*の一部と*Fusarium proliferatum*)にもフモニシン産生能が認められた。そこで、我が国で収穫された粳米について、フモニシン産生フザリウム属菌の着生及びフモニシン汚染の実態を明らかにするとともに、生産管理がイネのフモニシン汚染に与える影響を明らかにする。

2) 研究成果

フモニシン産生菌とフモニシン汚染の実態調査

2009年から2014年にかけて15県で収穫された種子用の粳米51試料について、フモニシン産生フザリウム属菌(フモニシン産生能を有する*F. fujikuroi*と*F. proliferatum*)の検出率とフモニシン汚染の有無を調査した。それぞれの試料約600粒から菌を分離した結果、食用品種36試料中の12試料(33.3%)、飼料用品種15試料中の8試料(53.3%)からフモニシン産生フザリウム属菌が検出された(表1)。また、菌が検出された場合の検出粒率は、食用が0.2～4.5%(平均1.2%)、飼料用が0.2～13.0%(平均4.3%)であった。菌の分離源である粳米試料のフモニシン汚染については、飼料用の1試料で低濃度のフモニシン(286.1 µg/kgのFB₁と53.7 µg/kgのFB₂)が検出されたのみであった(表1)。(本調査結果の一部を日本マイコトキシン学会 第77回学術講演会にて公表済)

生産管理のフモニシン汚染への影響解明 (室内実験)

実態調査でフモニシン産生フザリウム属菌が検出された試料のうちの食用6試料、飼料用6試料について、何も処理せずに25 gの試料を容器に入れただけのもの(無処理区)、小さな水入りのカップを容器に入れて保湿状態にしたもの(保湿区)、保湿に加え更に貯蔵開始時点で2.25 ml分の水を直接粳米に添加したもの(水分添加区)を用意して、25℃で1か月及び6か月間貯蔵してフモニシン汚染の有無を調べた。6か月間貯蔵における貯蔵途中の相対湿度は、無処理区で21.0～47.2%、保湿区と水分添加区は64.5～81.0%であった。また、貯蔵終了時の粳米の無処理区の水分含量は10.9～15.2%で、目視で分かるほどカビが増殖しているものはなかった。一方、保湿区と水分添加区の水分含量は20%以上で、目視で分かるほどのカビが増殖していた。試料を粉碎後、75%メタノールでフモニシン抽出液を作り、10倍濃縮後、ELISA

キット(RIDA スクリーン FAST フモニシン)で分析したところ、無処理区は24試料中の10試料がフモニシン陽性、保湿区と水分添加区は48試料中35試料がフモニシン陽性であった。ELISAは擬陽性の可能性もあることから、陽性試料については更にLC-MS/MSでフモニシンを分析した。5試料は分析試料が不足したため、それらを除く40試料をLC-MS/MSで分析した結果、定量限界(0.01 mg/kg)未満ながら検出はされたものを含めて、全ての試料からFB₁が検出された(表2)。FB₁が0.10 mg/kg以上の濃度で検出された保湿区又は水分添加区の6か月貯蔵9試料、1か月貯蔵1試料からは、フモニシン糖誘導体も検出された(表2)。

生産管理のフモニシン汚染への影響解明(圃場実験)

圃場実験1年目は、出穂状態のイネ圃場約2.5 m×5 mを4区画に分け、そのうちの1区画分のイネの穂にフモニシン産生菌*Fusarium fujikuroi* Gfc0825007株の6×10² CFU/ml胞子を接種後、人為的にイネを倒伏させ、その状態を維持したまま登熟させて収穫した(接種倒伏区)。比較として、残り3区画については、それぞれ胞子を接種後、倒伏させずに登熟させた区(接種非倒伏区)、胞子を接種せずに倒伏させて登熟させた区(無接種倒伏区)、胞子を接種せずに倒伏させなかった区(無接種非倒伏区)を用意した。1年目の試料は、4区全てについて、ELISAでフモニシンは検出されなかった。圃場実験2年目の試料も、1年目と同様に4区画を用意したが、接種区においては、フモニシン産生菌は3×10⁵ CFU/ml胞子を接種した。また、倒伏区については、接種後約1か月して登熟した後にイネを倒伏させ、約2週間その状態を維持した後に収穫した。2年目の試料については、倒伏区と非倒伏区に関わらず、菌接種区がELISAでフモニシン陽性となり、LC-MS/MSで0.10 mg/kg以上のFB₁が検出された。ただし、いずれの陽性試料からもフモニシンの糖誘導体は検出されなかった。

表1 イネ種子(粳米)からのフモニシン産生フザリウム菌及びフモニシンの検出結果^{a)}

分析試料名	収穫地	収穫年	ELISAによるフモニシン検出	フモニシン産生菌株数			検出率
				<i>F. fujikuroi</i>	<i>F. proliferatum</i>	合計	
H25食用-1	H県	2009年	陰性	27	0	27	4.5
H25食用-5	m県	2009年	陰性	4	5	9	1.5
H25食用-9	y県	2009年	陽性 ^{b)}	4	2	6	1.0
H25食用-12	J県	2009年	陰性	1	0	1	0.2
H25食用-13	K県	2012年	陰性	0	16	16	2.6
H26食用-3	H県	2013年	陰性	2	0	2	0.3
H26食用-5	m県	2013年	陰性	1	0	1	0.2
H26食用-9	y県	2009年	陰性	1	0	1	0.2
H27食用-3	H県	2013年	陰性	1	0	1	0.2
H27食用-4	H県	2013年	陰性	1	0	1	0.2
H27食用-12	b県	2013年	陰性	19	0	19	3.2
H27食用-13	M県	2014年	陰性	0	2	2	0.3
H25飼料用-1 ^{c)}	C県	2013年	陽性 ^{d)}	46	0	46	7.7
H25飼料用-2 ^{c)}	C県	2013年	陰性	78	0	78	13.0
H25飼料用-4	m県	2012年	陰性	2	0	2	0.3
H25飼料用-5	N県	2012年	陰性	2	0	2	0.3
H26飼料用-1 ^{c)}	C県	2013年	陰性	69	0	69	11.5
H26飼料用-2	J県	2012年	陰性	3	0	3	0.5
H26飼料用-3	N県	2012年	陰性	3	0	3	0.5
H26飼料用-7	y県	2013年	陰性	1	0	1	0.2

a) 調査した51試料中、フモニシン産生菌株が検出された試料のみの結果。

b) ELISAでは陽性であったが、LC-MS分析ではフモニシンが検出されなかったもの。

c) 同年、同一試験場で収穫された品種が異なる試料。フモニシン産生菌株数は、菌の分離過程で各試料当たりの調査株数の上限とした40株を超えたため、最終的に検出された実際の株数を600粒当たりに換算した。

d) LC-MS分析で286.1 µg/kgのフモニシンB₁と53.7 µg/kgのフモニシンB₂が検出された。

表2 フモニシン産生フザリウム属菌が検出されたイネ種子(粳米)の貯蔵試験の結果^{a)}

試料	処理区	LC-MS/MSによるFB ₁ 検出 ^{b)}
H25食用-13	無処理1ヶ月	±
	水分添加6ヶ月	+
H26食用-3	無処理6ヶ月	+
	保湿6ヶ月	+
	水分添加1ヶ月	+
	水分添加6ヶ月	+
H26食用-5	無処理1ヶ月	±
	水分添加1ヶ月	±
	水分添加6ヶ月	±
H27食用-3	保湿6ヶ月	++ ^{c)}
	水分添加6ヶ月	±
H27食用-4	保湿1ヶ月	±
	水分添加1ヶ月	+
	水分添加6ヶ月	++ ^{c)}
H27食用-12	無処理1ヶ月	±
	無処理6ヶ月	±
	保湿1ヶ月	±
	保湿6ヶ月	+
	水分添加6ヶ月	++ ^{c)}
H25飼料用-4	保湿6ヶ月	++ ^{c)}
	水分添加6ヶ月	++ ^{c)}
H25飼料用-5	無処理1ヶ月	±
	保湿1ヶ月	+
	保湿6ヶ月	+
	水分添加1ヶ月	±
	水分添加6ヶ月	+
H26飼料用-2	保湿1ヶ月	±
	保湿6ヶ月	+
	水分添加1ヶ月	++ ^{c)}
	水分添加6ヶ月	++ ^{c)}
H26飼料用-3	保湿1ヶ月	+
	保湿6ヶ月	++ ^{c)}
	水分添加1ヶ月	+
	水分添加6ヶ月	++ ^{c)}
H26飼料用-6	無処理1ヶ月	±
	保湿6ヶ月	±
	水分添加6ヶ月	++ ^{c)}
H26飼料用-7	無処理1ヶ月	±
	保湿1ヶ月	±
	水分添加6ヶ月	+

a) 72試料中のELISAでフモニシン陽性であった試料の結果(ただし、LC-MS/MS分析に試料が不足した5試料は除く)。

b) 試料中フモニシン濃度で、検出はされたが、定量限界の0.01mg/kg未満だったものを±、0.01mg/kg以上0.1mg/kg未満を+、0.1mg/kg以上を++で示した。

c) 糖誘導体も検出されたもの。

3) 成果活用における留意点

フモニシン産生菌とフモニシン汚染の実態調査において、使用した粳米51試料については、種子用の粳米を使用した。また、飼料用品種には、販売、播種を目的としていない、同年、同一試験場で収穫された品種が異なる3試料が含まれている。特にそれらの飼料用品種試料は、検出されたフモニシン産生菌株数が高く、試料からフモニシンが検出された唯一の試料もそのうちの1つであった。食用又は飼料用として市場に流通させることを目的に生産された粳米の調査結果ではないことに留意が必要である。

圃場実験では、イネ栽培中の倒伏がフモニシン汚染を助長するとの結果にはならなかったが、1年目は接種したフモニシン産生菌の濃度が低過ぎ、2年目は高過ぎて、倒伏の影響を正確に評価できなかつた可能性がある。

4) 今後の課題

粳米からフモニシン産生菌が分離されるものの、例外的な試料を除いてフモニシン汚染は

見られないことがわかった。ただし、これらの試料は流通目的の米ではないことから、今後は、市場に流通している米でのフモニシン含有実態調査が必要である。また、米のフモニシン汚染があった場合には、イネがどの時期にフモニシン産生菌に感染するのか、どのような栽培管理がフモニシン産生菌の感染に影響するのか、解明が必要である。室内実験により粃米が過湿状態になるとフモニシンが産生すると考えられたが、イネ栽培中の倒伏がフモニシン汚染に及ぼす影響を見る上では、年毎の気象条件の違いや試験に使用するフモニシン産生菌株及び接種濃度も結果に影響する可能性がある。倒伏の影響を正確に評価するには、様々な条件による繰り返し試験が必要と考える。

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	7	研究期間	平成25～29年度
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
小課題名	北海道の春まき小麦地帯におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態の解明		
小課題責任者名・研究機関	相馬潤 (H25-26)、小澤 徹 (H27-29)、野津あゆみ ・道総研中央農業試験場		

1) 研究目的

T-2/HT-2トキシンは欧州の冷涼小麦地帯で問題となっているが、北海道におけるT-2/HT-2トキシン産生菌の分布状況やT-2/HT-2トキシンの含有実態は不明である。T-2/HT-2トキシンによる小麦等の農産物の汚染が北海道においても問題となり得る可能性があるのか解明するとともに、汚染の可能性があるとしたらどのような地域か特定するため、北海道の石狩・空知地方を中心とした春まき小麦地帯におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態を解明する。

2) 研究成果

平成25年～27年に道内の春まき小麦地域（道央、道南、道北）から小麦子実を採取し、T-2トキシン（T-2）及びHT-2トキシン（HT-2）濃度を分析した。T-2及びHT-2の検出率（定量限界1.0～4.0 µg/kg）はそれぞれ10.6 %（平均値2.0 µg/kg、最大値2.9 µg/kg）、18.8 %（平均値7.7 µg/kg、最大値15.9 µg/kg）と、汚染が認められたものの、その濃度はEUの指標値と比較すると低かった（表1）。赤かび病無防除圃場では、T-2、HT-2のいずれも汚染濃度が高い傾向を示したことから、小麦ではDMI剤等の赤かび病の殺菌剤による防除がT-2及びHT-2汚染低減に寄与している可能性が示唆された。採取した小麦子実より *Fusarium* 属菌を分離し、各菌種のT-2、HT-2産生能を調査した結果、*F. sporotrichioides* のみが高濃度のT-2、HT-2を産生した（表2）。本菌種は道央、道北から分離され、主要な春小麦地帯に広く分布しているものと考えられる。

平成27年～29年に道内の春まき小麦地域から小豆子実を採取し、T-2及びHT-2濃度を分析した。T-2及びHT-2の検出率はそれぞれ45 %（平均値6.0 µg/kg、最大値18.4 µg/kg）、55 %（平均値7.0 µg/kg、最大値19.9 µg/kg）で小麦に比べ、検出率及び最大濃度が高かった（表3）。また、小麦と異なり、殺菌剤による防除の有無と検出率に一定の傾向が認められず、小豆の防除はT-2、HT-2汚染低減に影響しない可能性が示唆された。採取した小豆子実より *Fusarium* 属菌を分離し、各菌種のT-2、HT-2産生能を調査した結果、小麦と同様に *F. sporotrichioides* のみが高濃度のT-2、HT-2を産生した（表4）。

以上の結果より、北海道の春まき小麦地帯におけるT-2、HT-2汚染の原因菌は *F. sporotrichioides* であり、道央、道南及び道北地域に広く分布していると考えられる。

表1. 小麦子実中のT-2トキシン、HT-2トキシン濃度

採取年次	赤かび病 防除	調査数	T-2 (μg/kg)			HT-2 (μg/kg)		
			検出数(検出率)	平均値	最大値	検出数(検出率)	平均値	最大値
平成25年	防除	40	2	1.6	1.9	8	8.8	15.9
平成26年	防除	28	4	2.3	2.9	2	9.7	12.3
	無防除	2	2	2.7	3.7	2	15.9	16.1
平成27年	防除	14	0			3	3.5	5.5
	無防除	1	1	2.1	2.1	1	15.8	15.8
合計		85	9 (10.6%)	2.0	2.9	16 (18.8%)	7.7	15.9

注) 定量限界は次のとおり。T-2:1 μg/kg、HT-2 H25~26年: 4 μg/kg、H27年: 2 μg/kg
平均値は定量限界以上の数値の平均値

表2. 小麦子実から分離した*Fusarium*属菌とT-2トキシン、HT-2トキシン産生能

Fusarium ID	分離菌株数				カビ毒産生能			
	道央	道南	道北	合計	T-2		HT-2	
					調査数	高濃度 産生菌株数	調査数	高濃度 産生菌株数
<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	8		3	11	10	0	2	0
<i>F. oxysporum</i> species complex	10	3	3	16	11	0	1	0
<i>F. acuminatum</i>			1	1	1	0	0	0
<i>F. boothii</i>	1			1	1	0	0	0
<i>F. cerealis</i>	2			2	2	0	0	0
<i>F. graminearum</i>	143	2	26	171	158	0	18	0
<i>F. negundis</i>	1	1		2				
<i>F. poae</i>	263	25	73	361	335	0	45	0
<i>F. sporotrichioides</i>	34		12	46	43	43	25	25
<i>Fusarium</i> sp	135	4	83	222	163	0	62	0
未同定	20		5	25	25	0	4	0

注) 米培地中に 1 mg/kg 以上産生した菌株を高濃度産生菌とした。

表3.小豆子実中のT-2トキシン、HT-2トキシン濃度

採取年度	地方	防除	粒	T-2(μg/kg)	HT-2(μg/kg)
平成27年	道央	なし	整粒	< 1	6.3
	道央	なし	くず粒	2.1	5.6
	道央	あり	整粒	1.6	3.2
	道南	あり	整粒	< 1	< 2
	道北	あり	整粒	< 1	< 2
平成28年	道央	なし	整粒	< 1	3.3
	道央	なし	くず粒	2.2	5.2
	道央	あり	整粒	4.4	4.4
	道央	あり	整粒	3.3	< 2.0
	道央	あり	整粒	6.9	8.4
	道央	あり	整粒	< 1	< 2
	道央	あり	整粒	< 1	< 2
	道南	あり	整粒	5.7	5.9
	道南	あり	整粒	18.4	19.9
	道南	あり	整粒	9.1	12.2
平成29年	道北	あり	整粒	< 1	2.4
	道央	なし	整粒	< 1	< 2
	道央	なし	くず粒	< 1	< 2
	道央	なし	整粒	< 1	< 2
道央	なし	くず粒	< 1	< 2	
検出数(%)				9(45%)	11(55%)
平均				6.0	7.0
最大値				18.4	19.9

注) 定量限界は次のとおり。T-2 : 1 μg/kg、HT-2 : 2 μg/kg、平均値は検出された数値の平均

表4.小豆子実から分離した *Fusarium* 属菌とT-2トキシン、HT-2トキシン産生能

Fusarium ID	分離菌株数							カビ毒産生能			
	平成27年産			平成28年産			合計	T-2		HT-2	
	道央	道南	道北	道央	道南	道北		調査数	高濃度 産生菌株数	調査数	高濃度 産生菌株数
<i>F. incarnatum-equiseti</i> species complex	48	12		16	7	1	84	24	0	20	0
<i>F. oxysporum</i> species complex	20	14	5	47	46		132	14	0	9	0
<i>F. acuminatum</i>	1			1			2	1	0		0
<i>F. asiaticum</i>				1			1	1	0		
<i>F. boothii</i>			1	2			3	2	0		0
<i>F. graminearum</i>	7	3	1	34	12		57	5	0	5	0
<i>F. poae</i>	1						1	1	0	1	0
<i>F. proliferatum</i>			6	2			8	2	0		0
<i>F. sporotrichioides</i>	18	4	1	21	3	8	55	23	23	7	7
<i>Fusarium</i> sp	11			13	2	2	28	28	0	11	0
未同定	1						1		0	1	0

注) 米培地中に 1 mg/kg 以上産生した菌株を高濃度産生菌とした。

3) 成果活用における留意点

本試験では、農業試験場内または奨励品種決定試験の現地圃場で生産した小麦及び小豆子実を供試した。小麦については2.2 mm篩上の子実を、小豆は目視でくず粒や腐敗粒を除去した子実を整粒とし、生産現場で行われている比重選別や色彩選別等での調製はしていない。実際に流通している生産物より汚染リスクが高い可能性がある試料を用いたことに留意する必要がある。

4) 今後の課題

今後、小麦及び小豆で汚染が問題となり、防除対策を検討する必要がある場合には、*F. sporotrichioides*による病徴の確認と感染時期の解明及び有効薬剤の探索が必要である。

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	8	研究期間	平成25～29年度
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
小課題名	北海道の秋まき小麦地帯におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態の解明		
小課題責任者名・研究機関	小澤 徹 (H25-26)、栢森美如 (H27-29)、安岡眞二 ・道総研十勝農業試験場		

1) 研究目的

T-2/HT-2トキシンは欧州の冷涼小麦地帯で問題となっているが、北海道におけるT-2/HT-2トキシン産生菌の分布状況やT-2/HT-2トキシンの含有実態は不明である。T-2/HT-2トキシンによる小麦等の農産物の汚染が北海道においても問題となり得る可能性があるのか解明するとともに、汚染の可能性があるとしたらどのような地域か特定するため、北海道の十勝・オホーツク地方を中心とした秋まき小麦地帯におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態を解明する。

2) 研究成果

平成25～27年に道内の秋まき小麦地帯（道東）から小麦子実を採取し、T-2トキシン（T-2）、HT-2トキシン（HT-2）濃度を分析した。T-2及びHT-2の検出率（定量限界1.0～4.0 µg/kg）はそれぞれ5.4 %（平均値3.5 µg/kg、最大値8.1 µg/kg）、10 %（平均値7.4 µg/kg、最大値45 µg/kg）と、汚染が認められたものの、その濃度はEUの指標値と比較すると低かった（表1）。採取した小麦子実より*Fusarium*属菌を分離し、各菌種のT-2、HT-2産生能を調査した結果、*F. sporotrichioides*と*F. langsethiae*が高濃度のT-2、HT-2を産生した（表2）。*F. sporotrichioides*は主要な秋まき小麦地帯に広く分布しているものと考えられるが、*F. langsethiae*はオホーツク地方のみから分離された。

平成27年～29年に道内の秋まき小麦地帯（道東）および道北の一部から小豆子実を採取し、T-2及びHT-2濃度を分析した。小麦に比べ、検出率は高かったが最大濃度は低く、それぞれ11.8 %（平均値5.1 µg/kg、最大値7.1 µg/kg）、23.5 %（平均値4.8 µg/kg、最大値11.2 µg/kg）であった（表3）。採取した小豆子実より*Fusarium*属菌を分離し、各菌種のT-2、HT-2産生能を調査した結果、*F. sporotrichioides*のみが高濃度のT-2、HT-2を産生した（表4）。

小課題番号2と連携し、北海道で最も作付されている秋まき小麦「きたほなみ」についてのDON-3グルコシドの蓄積について調査した。開花期に*F. graminearum*を接種した「きたほなみ」において、DON及びDON-3グルコシドは登熟が進むにつれて蓄積量が増加したが、3-アセチルDONは開花40日後をピークにその後減少した。DONの最大値が49.8 mg/kgに対し、DON-3グルコシドの最大値は6.1 mg/kgであった（図1～3）

。

表1. 小麦子実中のT-2トキシン、HT-2トキシン

採取年次	調査数	T-2 (µg/kg)			HT-2 (µg/kg)		
		検出数 (検出率)	平均値	最大値	検出数 (検出率)	平均値	最大値
H25	50	0	-	<1	0	-	<4
H26	54	7	3.5	8.1	10	8.9	45
H27	26	0	-	<1	3	2.6	3.9
合計	130	7 (5.4%)	3.5	8.1	13 (10%)	7.4	45

注) 定量限界は次のとおり。T-2:1µg/kg、HT-2 H25-26:4µg/kg、H27:2µg/kg

平均値は定量限界以上の数値の平均値

表2. 小麦子実から分離したFusarium属菌とT-2トキシン、HT-2トキシン産生能

FusariumID	分離菌株数			カビ毒産生能			
	十勝	オホーツク	合計	T-2		HT-2	
				調査数	高濃度産生菌株数	調査数	高濃度産生菌株数
<i>F. poae</i>	57	140	197	100	0	36	0
<i>F. sporotrichioides</i>	5	22	27	27	27	24	24
<i>F. graminearum</i>	14	2	16	16	0	3	0
<i>F. acuminatum</i>	1	3	4	4	0	1	0
<i>F. langsethiae</i>	0	6	6	6	6	4	4
<i>F. proliferatum</i>	4	0	4	1	0	0	-
<i>F. oxyporum</i>	16	14	30	8	0	3	0
<i>Fusarium</i> sp.	139	62	201	173	0	54	0
未同定	16	5	21	21	0	8	0
合計			506	356	33	133	28

注) 米培地中に1mg/kg以上産生した菌株を高濃度産生菌とした

表3. 小豆子実中のT-2トキシン、HT-2トキシン濃度

採取年次	調査数	T-2 (µg/kg)			HT-2 (µg/kg)		
		検出数 (検出率)	平均値	最大値	検出数 (検出率)	平均値	最大値
H27	3	0	-	<1	0	-	<2
H28	12	2	5.1	7.1	4	4.8	11.2
H29	2	0	-	<1	0	-	<2
合計	17	2 (11.8%)	5.1	7.1	4 (23.5%)	4.8	11.2

注) 定量限界は次のとおり。T-2:1µg/kg、HT-2:2µg/kg

平均値は定量限界以上の数値の平均値

表4. 小豆子実から分離したFusarium属菌とT-2トキシン、HT-2トキシン産生能

FusariumID	分離菌株数				カビ毒産生能			
	十勝	オホーツク	道北	合計	T-2		HT-2	
					調査数	高濃度産生菌株数	調査数	高濃度産生菌株数
<i>F. incarnatum-equiseti</i>	30	12	25	67	11	0	10	0
<i>F. oxyporum</i>	322	30	29	381	41	0	5	0
<i>F. graminearum</i>	232	11	10	253	168	0	30	0
<i>Fusarium</i> sp.	75	19	9	103	79	0	13	0
<i>F. sporotrichioides</i>	23	5	25	53	52	52	36	36
<i>F. poae</i>			1	1	1	0	1	0
<i>F. boothii</i>		1		1	1	0	1	0
<i>F. venenatum</i>		1		1	1	0	1	0
未同定	1			1	1	0	0	-
合計	683	79	99	861	355	52	97	36

注) 米培地中に1mg/kg以上産生した菌株を高濃度産生菌とした

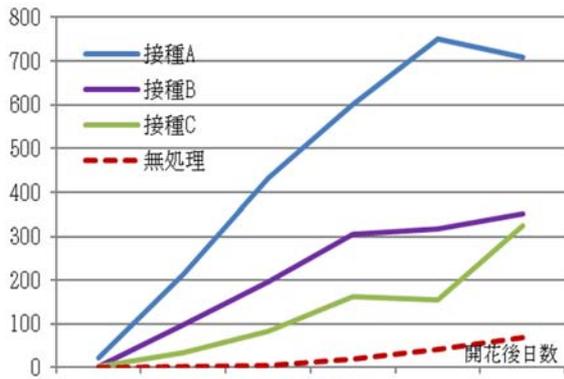


図1. 100万粒あたりのDON蓄積量 (mg)

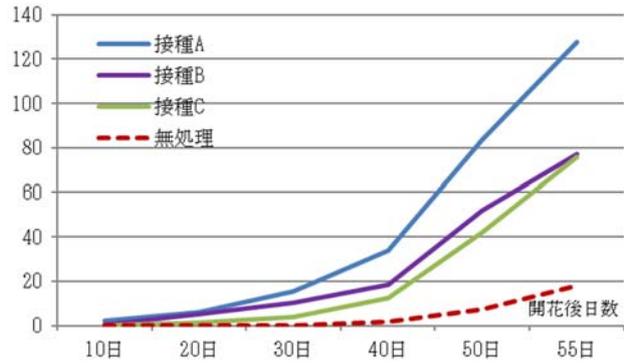


図2. 100万粒あたりのDON-3Glu蓄積量 (mg)

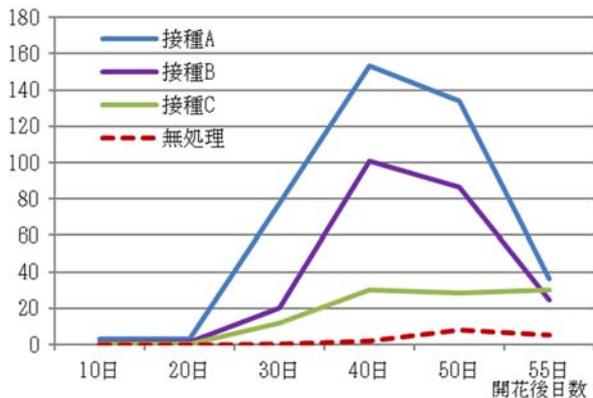


図3. 100万粒あたりの3-AcDON蓄積量 (mg)

図1～3.

接種A：含菌エンバク粒接種+6/12噴霧接種+6/16噴霧接種

接種B：含菌エンバク粒接種+6/16噴霧接種

接種C：含菌エンバク粒接種

※低温と日照不足により成熟期が平年より7日遅れ、開花49日後となった。

3) 成果活用における留意点

本試験では、農業試験場内または奨励品種決定試験の現地圃場で生産した小麦及び小豆子実を供試した。小麦については2.2 mm篩上の子実を、小豆は目視でくず粒や腐敗粒を除去した子実を整粒とし、生産現場で行われている比重選別や色彩選別等での調製はしていない。実際に流通している生産物より汚染リスクが高い可能性がある試料を用いたことに留意する必要がある。

DON配糖化活性の調査はH26に接種条件下で実施し、開花期以降に雨天日が多く赤かび病が甚発生となったため、一般栽培と状況が異なるため留意が必要である。開花10日後から継時的に試料採取したが、開花直後は2.2 mmの篩上に試料が残らないことと、重量当たりのDON濃度だと登熟初期のDON濃度が高くなるため、収穫した小麦子実には篩にかけずDON濃度測定に供試し、100万粒あたりに換算して継時変化を評価した。

4) 今後の課題

今後、小麦及び小豆でT-2/HT-2トキシンの汚染が問題となり、防除対策を検討する必要がある場合には、*F. sporotrichioides*による病徴の確認と感染時期の解明及び有効薬剤の探索が必要である。

DON配糖化活性については、本試験よりも低いDON濃度の現実的な条件下で、DON-3グルコシド濃度を確認する必要がある。また、配糖体が問題となった場合には、北海道の他品種についてもDON配糖化活性を調査する必要がある。

中課題番号	13406478	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	9	研究期間	平成25～27年度
中課題名	カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発		
小課題名	カビ毒の各種調理法による減衰調査ならびに加工調理での汚染低減技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	長嶋 等(H25)、久城真代(H26-27)、岡留博司(H25-27)・農研機構 食品研究部門		

1) 研究目的

国産小麦において、製粉（ふすま除去）によるゼアラレノンの残存率等のデータが不足していることから、収穫年度や汚染レベルの異なる国産小麦子実を入手し、製粉分画でのゼアラレノン等カビ毒の分析法の妥当性確認を行うとともに、一次加工（選別・製粉等）ならびに二次加工（調理）による毒素の残存率を明らかにする。

2) 研究成果

(1) カビ毒汚染小麦のうち、特にゼアラレノン (ZEA) 濃度の異なる国産小麦子実試料（人工的に感染誘発したもの）を入手し、製粉後に種々のモデル調理実験に供し、妥当性確認された分析法を用いて残存濃度を解析した。また、本プロジェクト期間の前半においては汚染度の異なる国産小麦子実試料の入手が困難であったため、過年度収穫した冷蔵保存子実を用いた。製粉分画中のZEA濃度の分析に「飼料分析基準」記載の液体クロマトグラフ法を用いた。なお、国内では食品中のゼアラレノンの規格基準は定められていないが、飼料中の管理基準が1 mg/kgであることから今回、添加回収試験における添加レベルをそれよりも低い0.4 mg/kgとした。その結果、2種類の国産麺用小麦品種における添加レベル0.4 mg/kgにおける回収率（102.8-116.7%）は、「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成9年4月1日衛食第117号）で許容される範囲内（70-120%）であった（表1）。

(2) 九州沖縄農業研究センターより供試された小麦「農林61号」（人工汚染子実）の製粉後の各分画におけるZEAについて、(1)の分析法を用いて分析した。DON残存率（M. Thammawong *et al.*, *J. Food Prot.*, 73(10), 1817-1823, 2010）とZEA残存率を比較した結果、上質粉ではZEAのほうがDONよりも残存率が低かった（表2）（Y. Zheng *et al.*, *Food Control*, 40, 193-197, 2014）。

(3) 過年度産の北海道産小麦「ホクシン」について、(2)と同様の試験を行った結果、上質粉でのZEAの残存率は10%、DONの残存率は68%であった（M. Kushiro *et al.*, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 21(3), 173-178, 2014）。

(4) 九州沖縄農業研究センターより供試された小麦「チクゴイズミ」（人工汚染子実）の製粉後の上質粉を用いて、うどんを製造し、ゆで調理後のZEA残存率を分析した結果、ゆで麺中ZEAの残存率は83%であった（M. Kushiro *et al.*, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 23(2), 107-112, 2016）。

表1 各製粉分画におけるゼアラレノン回収率 (n = 3)

	添加レベル (mg/kg)	回収率 (%)			
		農林61号		チクゴイズミ	
		平均	相対標準偏差	平均	相対標準偏差
玄麦	0.4	112.9	9.4	112.1	2.8
上質粉	0.4	102.8	2.0	103.8	3.1
末粉	0.4	109.3	4.9	105.4	2.1
大ふすま	0.4	116.7	13.1	108.1	3.9
小ふすま	0.4	103.9	2.9	103.8	3.1

表2 農林61号の製粉前後におけるカビ毒濃度

	重量 (%)	濃度 (mg/kg)	
		DON	ZEA
玄麦		1.89	0.76
上質粉	59.4	1.12	0.27
末粉	4.6	0.91	0.39
大ふすま	30.7	3.07	1.03
小ふすま	5.3	3.49	2.82
上質粉での残存率		59%	30%

3) 成果活用における留意点

汚染レベルが限定された国産小麦玄麦(人工汚染子実)を用いた場合の実験結果であり、DONの規格基準より汚染レベルが高いものを用いていることに留意が必要である。品種も「農林61号」、「チクゴイズミ」、「ホクシン」(いずれも麺用)に限られている。

4) 今後の課題

より広範な汚染レベルの国産小麦玄麦(人工汚染子実)を用いた試験データの蓄積が必要である。

成果等の集計数

課題 番号	学術論文		学会等発表(口頭 またはポスター)		出版 図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件 数	普及しう る成果	発表会の 主催(シン ポジウム・ セミナー 等)	アウト リーチ活 動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
13406478	1	19	38	14	1	0	1	0	0	0	1	1	2

(1)学術論文

区分: ①原著論文、②その他論文

整理番 号	区分	機関名	タイトル	著者	掲載誌	巻 (号)	掲載ペ ージ	発行 年	発行 月
1	①	農研機構(食品研究部門)	Detection of masked mycotoxins derived from type A trichothecenes in corn by high-resolution LC-Orbitrap mass spectrometer	H. Nakagawa	Food Additives & Contaminants: Part A	30 (8)	1407-1414	2013	5
2	①	農研機構(食品研究部門)	Detection of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Nutmeg Extract Using Fluorescence Fingerprint	K. Fujita	Food Science and Technology Research	19 (4)	539-545	2013	9
3	①	東京大学	Correlation of ATP citrate lyase and acetyl CoA levels with trichothecene production in <i>Fusarium graminearum</i>	N. Sakamoto	Toxins	5 (11)	2258-2269	2013	11
4	①	農研機構(食品研究部門)	Extraction of a <i>Fusarium</i> mycotoxin zearalenone in edible oils	Y. Zheng	JSM Mycotoxins	64 (1)	23-27	2014	1
5	①	岐阜大学	A single nucleotide polymorphism in the translation elongation factor 1 α gene correlates with the ability to produce fumonisin in Japanese <i>Fusarium fujikuroi</i>	H. Suga	Fungal Biology	118 (4)	402-412	2014	4
6	①	農研機構(食品研究部門)	Effect of milling on the content of deoxynivalenol, nivalenol, and zearalenone in Japanese wheat	Y. Zheng	Food Control	40 (6)	193-197	2014	6
7	①	農研機構(食品研究部門)	Retention of <i>Fusarium</i> mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol during Japanese soft wheat milling	M. Kushiro	Japanese Journal of Food Chemistry and Safety	21 (3)	173-178	2014	12
8	①	東京大学	Precocene II, a Trichothecene Production Inhibitor, Binds to Voltage-Dependent Anion Channel and Increases the Superoxide Level in Mitochondria of <i>Fusarium graminearum</i>	T. Furukawa	PLOS ONE	10 (8)	e0135031-e0135031	2015	8
9	①	農研機構(食品研究部門)	Detection of N-(1-deoxy-d-fructos-1-yl) Fumonisin B2 and B3 in Corn by High-Resolution LC-Orbitrap MS	Y. Matsuo	Toxins (Basel)	7(8)	3700-3714	2015	9
10	①	東京大学	Search for aflatoxin and trichothecene production inhibitors and analysis of their modes of action	S. Sakuda	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	80 (1)	43-54	2016	1
11	①	東京大学	Inhibitory Activities of Alkyl Syringates and Related Compounds on Aflatoxin Production	T. Furukawa	Toxins (Basel)	8(6)	177-177	2016	6
12	①	農研機構(食品研究部門)	Retention of zearalenone during cooking of noodles made from a Japanese soft wheat	M. Kushiro	Japanese Journal of Food Chemistry and Safety	23 (2)	107-112	2016	8

13	①	農研機構(食品研究部門)	Addition of Carbon to the Culture Medium Improves the Detection Efficiency of Aflatoxin Synthetic Fungi	T. Suzuki・Y. Iwahashi	Toxins(Basel)	8 (11)	338-338	2016	11
14	②	東京大学	食品添加物を用いたアフラトキシン汚染防除	作田庄平ら	BIO INDUSTRY	5	1	2017	5
15	①	東京大学	The mode of action of cyclo(L-Ala-L-Pro) in inhibiting aflatoxin production of <i>Aspergillus flavus</i>	K. Iimuraら	Toxins	9(7)	219.	2017	7
16	①	東京大学	Intracellular superoxide level controlled by manganese superoxide dismutases affects trichothecene production in <i>Fusarium graminearum</i>	T. Furukawaら	FEMS Microbiology	364 (21)	213.	2017	11
17	①	農研機構(食品研究部門)・福井工業大学	Isolation of minor aflatoxigenic fungi using dichlorvos-ammonia (DV-AM) method	M. Kushiroら	JSM Mycotoxins	68(1)	13-18	2018	1
18	①	農研機構(食品研究部門)	Detection of N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl) fumonisin C1, C2 and C3 in corn powder by LC-Orbitrap MS	Y. Matsuoら	Journal of Environmental & Analytical Toxicology	7	DOI: 10.4172/ 2161- 0525.100 0536	2018	3
19	①	農研機構(食品研究部門)	Discrimination of aflatoxin contamination level in nutmeg by fluorescence fingerprint measurement	R. Aiyamaら	Food Control	85	113-118	2018	3
20	①	農研機構(食品研究部門)	Development of an LC-MS/MS Determination Method for T-2 Toxin and Its Glucoside and Acetyl Derivatives for Estimating the Contamination of Total T-2 Toxins in Staple Flours	H. Nakagawaら	Journal of AOAC International	101 (3)	658-666	2018	5

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	トリコテセン生産阻害物質precocene II の結合タンパク質の同定	古川智宏ら	東京大学	日本マイコトキシン学会第74回学術講演会	2014	1
2	イネ種子から分離された小型分生孢子連鎖状形成Fusarium属菌の種とフモニシン産生能	須賀晴久ら	岐阜大学	日本菌学会第58回大会	2014	6
3	メタゲノム解析手法を用いた試料中の真菌類検出効率の比較	鈴木忠宏・岩橋由美子	農研機構(食品研究部門)	日本マイコトキシン学会第75回学術講演会	2014	9
4	高分解能LC-MSによるフザリウムトキシン由来新規配糖体の検出	松尾洋輔ら	農研機構(食品研究部門)	日本マイコトキシン学会第75回学術講演会	2014	9
5	2013年に北海道のコムギから分離されたT-2トキシンおよびHT-2トキシン産生菌について	相馬 潤	道総研中央農試	日本マイコトキシン学会第75回学術講演会	2014	9
6	農産物からの効率的な糸状菌検出に向けた研究	鈴木忠宏・岩橋由美子	農研機構(食品研究部門)	日本農芸化学会2015年度大会	2015	3

7	高分解能LC-MSによる二糖結合型フモニシンの検出	松尾洋輔ら	農研機構(食品研究部門)	日本マイコトキシン学会第77回学術講演会	2015	9
8	プレート培養によるアフラトキシン産生菌の検出効率改善に向けた研究	鈴木忠宏・岩橋由美子	農研機構(食品研究部門)	日本マイコトキシン学会第77回学術講演会	2015	9
9	国内収穫イネ種子からのフモニシン産生Fusariumの分離頻度	須賀晴久ら	岐阜大学	日本マイコトキシン学会第77回学術講演会	2015	9
10	食用油およびうどんゆで汁に含まれるゼアラレノンの分析法の検討	久城真代ら	農研機構(食品研究部門)	日本マイコトキシン学会第77回学術講演会	2015	9
11	precocene IIIによるトリコテセン生産阻害とヒストンアセチル化レベルの関係	古川智宏ら	東京大学	日本マイコトキシン学会第77回学術講演会	2015	9
12	マイコトキシンの加工調理での減衰について	久城真代	農研機構(食品研究部門)	マイコトキシン研修会	2015	9
13	コムギにおけるゼアラレノン蓄積検定のための赤かび病菌の選抜	川上顕ら	農研機構(九州沖縄農業研究センター)	九州病害虫研究会第89回研究発表会	2015	11
14	収穫適期前後の散水が圃場栽培コムギのゼアラレノン蓄積に与える影響	宮坂篤ら	農研機構(九州沖縄農業研究センター)	九州病害虫研究会第89回研究発表会	2015	11
15	Detection of novel trichothecene mycotoxin glucosides (masked mycotoxins) by high-resolution liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry	H. Nakagawaら	農研機構(食品研究部門)	2015環太平洋国際化学会議	2015	12
16	アフラトキシン、トリコテセン生産阻害物質の作用機構	作田庄平ら	東京大学	第38回日本分子生物学会年会	2015	12
17	高分解能LC-MSを用いたフモニシンと二糖類の反応物の検出	松尾洋輔ら	農研機構(食品研究部門)	日本農芸化学会2016年度大会	2016	3
18	<i>Aspergillus</i> 属のアフラトキシン生産を阻害するdioctatinの作用機構に関する研究	古川智宏ら	東京大学	日本農芸化学会2016年度大会	2016	3
19	Search for mycotoxin production inhibitors and their modes of action	作田庄平	東京大学	中国マイコトキシン学会	2016	6
20	蛍光指紋によるマイコトキシン汚染の推定	蔦瑞樹	農研機構(食品研究部門)	日本マイコトキシン学会第79回学術講演会	2016	7
21	シリング酸アルキルおよび類縁化合物によるアフラトキシン生産阻害	古川智宏ら	東京大学	日本マイコトキシン学会第79回学術講演会	2016	7
22	アフラトキシン生産阻害物質cyclo(L-Ala-L-Pro)の標的分子の同定	飯村九林ら	東京大学	日本マイコトキシン学会第79回学術講演会	2016	7
23	<i>Fusarium fujikuroi</i> G系統に見られるFUM21遺伝子のフモニシン産生能喪失変異の頻度	須賀晴久ら	岐阜大学	日本マイコトキシン学会第79回学術講演会	2016	7

24	北海道のコムギにおけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態	小澤徹ら	道総研中央農試	日本マイコトキシン学会第79回学術講演会	2016	7
25	G系統に見られるFUM21遺伝子のフモニシン産生能喪失変異の頻度	須賀晴久ら	岐阜大学	日本マイコトキシン学会第79回学術講演会	2016	7
26	北海道の小麦におけるT-2トキシン、HT-2トキシン産生菌の分布実態	小澤徹ら	道総研中央農試	日本マイコトキシン学会第79回学術講演会	2016	7
27	高分解能LC-MSによるトウモロコシ中に含まれるフモニシンC群の検出	松尾洋輔ら	農研機構(食品研究部門)	日本マイコトキシン学会第79回学術講演会	2016	7
28	活性炭添加培地によるアフラトキシン産生菌の検出手法改良	鈴木忠宏	農研機構(食品研究部門)	日本マイコトキシン学会第79回学術講演会	2016	7
29	コムギにおけるゼアラレノンの蓄積と収穫適期前後の散水との関係	宮坂篤ら	農研機構(九州沖縄農業研究センター)	平成28年度日本植物病理学会大会	2016	8
30	Studies on The mode of action of Ddioctatin that inhibits Aflatoxin production fo Aspergillus species	T. Furukawaら	東京大学	International Symposium of Mycotoxicology	2016	12
31	Study on the target molecule of cyclo(L-Ala-L-Pro),a specific aflatoxin produciton inhibitor	K. Iimuraら	東京大学	International Symposium of Mycotoxicology	2016	12
32	Retention of major Fusarium mycotoxins during Japanese soft wheat processing	M. Kushiro	農研機構(食品研究部門)	International Symposium of Mycotoxicology	2016	12
33	Screening for modified mycotoxins by high-resolution LC-MS	H. Nakagawa	農研機構(食品研究部門)	International Symposium of Mycotoxicology	2016	12
34	Multiple detection of sugar derivatives of fumonisins in corn by LC-Orbitrap MS	Y. Matsuoら	農研機構(食品研究部門)	International Symposium of Mycotoxicology	2016	12
35	The gene polymorphisms involving fumonisin producibility in <i>Fusarium fujikuroi</i>	H. Suga	岐阜大学	International Symposium of Mycotoxicology	2016	12
36	Fumonisin production recovery in a <i>Fusarium fujikuroi</i> strain by complementation of three FUM genes	S. Sultanaら	岐阜大学	International Symposium of Mycotoxicology	2016	12
37	diocstatinによるClpプロテアーゼ機能異常を介したアフラトキシン生産阻害機構	古川智宏ら	東京大学	日本農芸化学会2017年度大会	2017	3
38	LC-MSによるフモニシンC群の検出	中川博之	農研機構(食品研究部門)	第51回日米合同部会(UNJR有毒微生物部会)同時開催第12回国際シンポジウム(招待講演)	2017	5

39	話題のカビ毒とカビ毒汚染防除のはなし	作田庄平	東京大学	カビ相談センター創立10周年記念講演(招待講演)	2017	6
40	Mn SODIによる細胞内スーパーオキシドレベルの調節とトリコテセン生産の関係	古川智宏ら	東京大学	日本マイコトキシン学会第30回学術講演会	2017	7
41	カビ毒糖誘導体の生成機構とその体内動態	中川博之	農研機構(食品研究部門)	第44回日本毒性学会学術年会(招待講演)	2017	7
42	Researches on mycotoxins and mycotoxigenic fungi in NFRI	久城真代	農研機構(食品研究部門)	Joint Meeting of Section on Agricultural Science of Russian Academy of Science and NARO	2017	7
43	Analysis of Fusarium mycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)	中川博之	農研機構(食品研究部門)	Joint Meeting of Section on Agricultural Science of Russian Academy of Science and NARO	2017	7
44	Analysis of Fusarium mycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)	中川博之	農研機構(食品研究部門)	タイ農業局(DOA)視察対応	2017	9
45	高速液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)によるフモニシンC群の検出	中川博之	農研機構(食品研究部門)	第11回フザリウム研究会	2017	10
46	ジクロルポス-アンモニア(DV-AM)法によるマイナーなアフラトキシン産生菌の同定	久城真代ら	農研機構(食品研究部門)	日本マイコトキシン学会第31回学術講演会	2018	1
47	T-2トキシンとその誘導体の定量分析法の開発と主要穀類粉末における汚染濃度の推定	中川博之ら	農研機構(食品研究部門)	日本マイコトキシン学会第81回学術講演会	2018	1
48	マイコトキシン生産阻害物質から探る二次代謝の制御機構	古川智宏	東京大学	日本マイコトキシン学会第81回学術講演会	2018	1
49	Analysis of Fusarium mycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry	中川博之	農研機構(食品研究部門)	国際カビ毒学会(ICM 2018)(招待講演)	2018	2
50	アフラトキシン生産阻害物質 diocatin の引き起こす Clp プロテアーゼの異常活性	古川智宏ら	東京大学	2018年度日本農芸化学会大会	2018	3
51	cyclo(L-Ala-L-Pro)のアフラトキシン生産阻害機構の解明	飯村 九林ら	東京大学	2018年度日本農芸化学会大会	2018	3
52	Fumonisin production recovery in a <i>Fusarium fujikuroi</i> strain by complementation of <i>FUM21</i> , <i>FUM6</i> and <i>FUM7</i>	須賀晴久	岐阜大学	International Symposium 2018 on Innovative Crop Protection for Sustainable Agriculture	2018	3

(3) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	②	かび毒の制御技術の開発 - ポストハーベストでのかび毒除去 -	久城真代	農研機構(食品研究部門)	株式会社食品資材研究会	9	2015

(4) 国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日
1	アフラトキシン産生阻害剤、及びアフラトキシン汚染防除方法	作田庄平 高城景子 ジャン フェブリ プラポオ	作田庄平 高城景子 ジャン フェブリ プラポオ	東京大学	登録	特開2016-166131	2013年11月1日	2016年9月1日

(5)普及に移しうる成果

区分:①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

区分	成果の名称	機関名	普及(製品化)年月		主な利用場面	普及状況
			年	月		
①	麦類のかび毒汚染低減のための生産工程管理マニュアル改訂版	農研機構	2016	3	小麦作	ホームページにて公表。

(6)発表会の主催の状況

(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者数	機関名	備考
1	研究成果展示会	2017	11	2	つくば国際会議場	300	農研機構食品研究部門	

(7)アウトリーチ活動の状況

区分: ①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者数	主な参加者	機関名	備考
1	①	東京大学食の安全研究センター創立10周年記念シンポジウム「食科学の現在と近未来」～カビ毒産生阻害物質を用いたカビ毒産生機構の解明と汚染防除への実用化	2017	2	22～23	東京大学農学部弥生講堂	250	社会人、研究者、学生、行政等	東京大学食の安全研究センター	
2	①	ISMYCO 2016 (日本マイコトキシ学会国際シンポジウム)「カビ毒問題の相互理解とアジアネットワークの強化に向けて」	2016	12	1～2	東京大学農学部弥生講堂	240	会社員、研究者、学生、行政等	日本マイコトキシ学会	後援 農林水産省、厚生労働省、食品安全委員会