

かび類を利用した発酵食品とマイコトキシン

— 戸 正 勝* (分子機能研究部門, 活性応答分野)

真菌類に所属する糸状菌類(かび類)や酵母を利用した食品関連工業は古来からの酒類などの醸造製品, 各種の発酵食品をはじめとして, 酵素製造, 有機酸・核酸関連物質の製造など幅広い分野で活発に動いている¹⁾.

一方, かび類のなかにはヒトや家畜、家禽などに対して有害な生理活性を有する代謝産物、すなわちマイコトキシン(かび毒)類を生産するものがあり, 食品衛生, 家畜衛生の面から食品・飼料への有毒代謝産物の混入が懸念されている²⁾.

そこで, 本稿では意識的にかびを利用した発酵食品でスターター(種菌)として使われる菌類が有毒な代謝産物を生産していないか, また, それらの代謝産物が食品としての最終製品で検出される場合にリスクがないかという視点から筆者らがここ数年間検討を行っている青かびチーズ, 白かびチーズなどのナチュラルチーズを例として概説を試みたい。

1. チーズとマイコトキシン汚染

(1) スターター菌に起因する汚染

人為的にかびを着生させたブルーチーズ, 白かびチーズなど, いわゆるかび付け熟成型ナチュラルチーズに使用される菌類の生産するマイコトキシン mycophenolic acid (MPA), roquefortine C (R-C), cyclopiazonic acid (CPA) による最終製品への自然汚染についての調査は表1に示すごとく欧米でさかんに研究が行われているが, わが国では報告が少ない。

これらの報告³⁻⁵⁾によるとMPAの汚染例はデンマーク, フランス, イギリス, イタリア, ドイツなどヨーロッパ産の青かびチーズの中では特定の地域で生産されるチーズに限定して検出され, ロックフォールチーズでは10-15ppmに達するものがみられているという³⁾。

いくつかの報告例では分離菌株のMPA生産性も検討しており, 自然汚染を受けやすい試料から分離した菌株でのMPA生産量はその他の試料由来菌にくらべて多いとしている^{3), 4)}。

表1 かび付け熟成型ナチュラルチーズにおけるマイコトキシン類の自然汚染報告例

マイコトキシン	陽性率*1	検出濃度 (ppm)	調査地域	報告者 (文献)
Mycophenolic acid	38/100	0.01-14.3	フランス	Lafont et al., 1979
	4/34	0.25-5	ドイツ	Engle et al., 1982
	4/12	NS*2	スペイン	Lopez-Diaz et al., 1996
Roquefortine-C	16/16	0.06-6.8	カナダ	Scott Kennedy, 1976
	12/12	0.16-0.65	USA	Ware et al., 1980
	13/13	0.20-2.29	スイス	Schoch et al., 1984
Cyclopiazonic acid	9/21	0.10-1.9	ドイツ	Still et al., 1978
	11/20	0.05-1.5	フランス	Le Bars, 1979
	3/13	0.08-0.37	スイス	Schoch et al., 1984

*1 陽性試料数/検査試料数,

*2 not stated (det. lim. : 0.02)

* 千葉大学, 真菌医学研究センター

1998年度客員教授

連絡先: 〒173-0003 東京都板橋区加賀1-8-1 東京家政大学栄養学科食品衛生研究室

R-Cの検出はヨーロッパ産青かびチーズでは調査対象としたすべての試料に認められ、最高6.8ppmに達するという報告例^{8), 9)}もある。また、アメリカ産青かびチーズ12検体でもすべての試料から平均0.424ppmのR-Cを検出している⁷⁾ところをみると青かびチーズのR-Cの存在は普遍的であるといえよう。

白かびチーズにおけるCPAの汚染例はヨーロッパの研究者^{8), 9), 10)}によって報告されているが、さきのMPAと同様に特定の試料に限定される傾向がある。白かびチーズの場合、菌糸体を含んだ表面層の部分にCPAが多く蓄積されていて、内部まで及んでいないという¹⁰⁾。

(2) チーズに二次的に着生したかび毒生産菌によるマイコトキシン汚染

チーズは栄養分が豊富なのでかびの生えやすい食品であり、またヨーロッパ諸国産のナチュラルチーズのなかには表面に自然のかびを着生させたものも多く存在する¹¹⁾。

チーズに着生するかび類のなかで最も普通にみられるのは *Penicillium* 属の菌類であり、ついで *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Geotrichum* などである^{12), 13), 14)}。

これらの *Penicillium* 類のなかには ochratoxin A, citrinin, patulin, penicillic acid などの生産菌も存在し、*Aspergillus* 類では *A. versicolor* の sterigmatocystin の生産が注目され自然汚染例も報告されている¹⁵⁾。

(3) 乳、乳製品としてのチーズのAflatoxin M₁の汚染

飼料原料としてのトウモロコシ、綿実油粕、落花生油粕にはマイコトキシンとして最も警戒すべき aflatoxin (AF) 類が混入している場合がある。飼料中のAF-B₁が動物に摂取された後、体内で代謝されて乳、尿などにAF-M₁となって排出されることによる乳製品の汚染であるので、かびが直接関与しない、いわば間接的なマイコトキシン汚染である。

乳製品中のAF-M₁については多数の研究報告があり、世界各国で規制値をもうけている。チーズでは0.2-0.5ppbとする国が多いが、わが国でも都立衛生研^{16), 17)}、名古屋市衛生研¹⁸⁾で輸入品のナチュラルチーズを中心にAF-M₁汚染の実態について調査した研究がある。

対策としては市場調査による規制値をこえるものの排除のほか、乳牛の飼料中のAFの規制値の設定が行われている。わが国でも農林水産省の「飼料の有害物質の指導基準」の対象のなかで、乳用牛、哺乳期子牛用配合飼料ではAF-B₁ 0.01ppm以下と定めている。

2. かび付け熟成型チーズから分離される菌類の識別と分類

(1) 青かびチーズ由来菌

よく知られているごとく青かびチーズのスターターの菌は *Penicillium roqueforti* である。かつては青かびチーズ由来菌について多くの異名が知られていたが、Samsonら¹⁹⁾によって再検討・整理されて現在にいたっている。

チーズ由来の *Penicillium* 類について検討を行った Engle and Teuber²⁰⁾は *P. roqueforti* を識別するための簡便な方法として0.5%の酢酸を添加した合成培地での発育、クレアチンを含んだ寒天培地における酸の生産性の有無の検索が有効であることを見出した。

Frisvad and Filtenborg^{21), 22)}は一連の *Penicillium* 類と代謝産物との関連から分類学的再検討を加えた中で、*P. roqueforti* を二分して、同定用培地上での培養裏面の色調が緑色から黒味がかかった緑色を呈し、MPA, PR-toxin, R-Cを生産する菌株をgroup Iとし、培養裏面の色調が淡褐色からローズ色を呈し、MPA, Patulin, R-Cを生産する菌株をgroup IIとした。さらにgroup IIに所属する菌株を新変種 *P. roqueforti* var. *carneum* とする提案²²⁾を行った。

ちなみに *P. roqueforti* は自然界に広く分布し、飼料用サイレーズやライ麦パン等の食品から分離されることがあるが、本菌種の低酸素要求性、耐酸性は *Penicillium* 属のなかでは特異な存在である²³⁾。

筆者らはわが国で市販されている輸入および国産青かびチーズより多数の菌株の分離を行ない、顕微鏡観察、菌核の形成の有無など形態学的な識別の他、培養裏面の色調からみて *P. roqueforti* を5タイプに区分した。イタリア、イギリス、デンマーク、ドイツの各国の輸入品から分離されるタイプIからIIIの菌株は暗色系の培養裏面を示すgroup Iに所属するものであり、主にフランス産および国産試料から分離したタイプIVからVの菌株は培養裏面が明色系のgroup IIに近い菌株であることを報告した²⁴⁾。

その後の培養菌株での代謝産物の生産性の検討により、

MPAの生産性からみて陽性菌株はこの明色系に入れられる菌株に集中していることを確認した²⁵⁾。

ちなみに暗色系の菌株と明色系の菌株は識別培地のクレアチン寒天培地、0.5%酢酸添加合成液体培地では同じ挙動を示した。

(2) 白カビチーズ由来菌

カマンベール、ブリーなどの白かびチーズ製造に用いられている *P. camemberti* は青かび (*Penicillium*) 類のなかでも白色の集落となる特異な存在である。チーズ製造にかかわる環境以外からは分離されない²⁶⁾。元来は野生の *P. commune* から派生した馴化型 (domesticated) と考えられている¹⁹⁾ のは *Aspergillus flavus* - *A. oryzae* や *A. parasiticus* - *A. sojae* の関係に似ていて興味深い。Frisvad and Filtenborg²¹⁾ は *P. camemberti* を分生子形成の多少と菌集落の性状から subgroup I と II に分けたが、その識別は難しく1989年の論文²²⁾ では同一のものとして扱っている。本種の有毒代謝産物としては cyclopiazonic acid のみが知られ、*P. commune* が多彩な代謝産物を生産する点とは異なる。

筆者らの市販の輸入および国産白かびチーズ由来菌株ではほぼ同様の性状を示した²⁴⁾。

3. スターター菌のマイコトキシン生産性

青かびチーズのスターター菌として使われている *P. roqueforti* には有毒代謝産物として自然汚染をもたらす mycophenolic acid, roquefortine C 以外に、isofumigaclavin A, PR-toxin, patulin などの生産性が知られているが²⁶⁾、これらの有毒代謝産物はチーズ中で不安定なものが多く、製品から自然汚染として検出されるのはきわめてまれであるという^{27), 28)}。

(1) *P. roqueforti* による mycophenolic acid 生産性
培養菌株の代謝産物の生産量は培養条件、抽出・分析法、検出感度などによって変動するので、一概に比較することは難しい。フランス産チーズ由来菌株を中心に MPA 生産を検討した報告例²⁹⁾ では供試16菌株のすべてが陽性で、乾燥菌体あたり0.003-4.060 mg/g の生産量を認め、ロックフォール由来菌株に高生産菌を得ている。

同様に、ヨーロッパ各国の青かびチーズ由来菌株の MPA 生産を調査した報告⁴⁾ によるとデンマーク、フランス、ドイツ、イギリス、イタリアの試料より分離した菌株62菌株の中ではフランス・ロックフォール由来の7菌株に集中して14-64mg/l (YES 培養, det. lim. 0.2 mg/l) の MPA の生産性を確認している。この報告例ではチーズ以外の食品由来菌株についても検索しているが生ソーセージより分離した菌株に600mg/l の MPA 高生産を認めている。

一方、青かびチーズ、白かびチーズ由来菌の代謝産物について検討したスイスの研究者の報告⁸⁾ によると6菌株の *P. roqueforti* には MPA (det. lim. 0.02mg/kg) の生産が認められないとしており、スペイン産 Valdeon チーズ由来 *P. roqueforti* 9 菌株では1菌株のみに MPA (YES agar : det. lim. 20 μg/kg) 生産を認めている⁵⁾。

表2に示すように、MPA 生産菌の地域差は筆者らによるわが国で市販されている青かびチーズ由来菌株の検討²⁵⁾ においても確認されたところであり、ロックフォールチーズ由来菌の他、デンマーク産5菌株中2株にかぎって MPA 生産がみられた。国産青かびチーズ由来菌にも8株中7株に MPA 生産を認めた点はさきの MPA 自然汚染例と分離菌株の生産性の関係からみて、国産チーズにも汚染の可能性のあることを強く示唆する。

表2 輸入および国産青かびチーズ由来 *P. roqueforti* のマイコトキシン生産性

チーズの種類	原産国	供試菌株数	MPA 生産菌	R-C 生産菌
ロックフォール	フランス	5	5	5
ゴルゴンゾーラ	イタリア	5	0	5
スチルトン	イギリス	5	0	5
ダナブルー	デンマーク	5	2	5
カンボゾーラ	ドイツ	5	0	5
国産ブルーチーズ	日本	8	7	8
合計		33	14	33

(2) *P. roqueforti*による roquefortine-C 生産性

前述の青かびチーズの R-C の自然汚染状況からみて、R-C 生産菌の普遍性はうなずけるところであるが、青かびチーズ由来菌およびスターター菌の生理学的性状を調査し、同時に R-C 生産性をみた報告²⁰⁾では供試40菌株32株に R-C 生産を認めている。同様の知見はスイス、スペインの報告例^{5), 8)}でもみられ、筆者らの市販チーズ由来菌の検討結果でも表2に示したように全供試菌株に R-C の生産を認めた²⁵⁾。

(3) *P. camemberti*による cyclopiazonic acid 生産性

フランスのカマンベールチーズ由来の白かび *P. camemberti* 20菌株の CPA 生産を検討した報告¹⁰⁾ではすべての菌株に生産性があったが、培養条件により生産量が著しく異なることを指摘している。スイスの報告例⁶⁾でも18菌株すべてに CPA 生産を0.07-8 mg/kg の範囲で認めているが、筆者らの検討では特定の菌株のみに CPA 生産が認められた点が異なっていた。

4. まとめ

以上に示したごとく、かび付け熟成型ナチュラルチーズにスターターとして利用されている菌株にはいくつかの有毒代謝産物の生産能があり、最終製品にまでそれらが検出されることは明らかであり、国産品でも同様の可能性があることを示唆される。

かび付けチーズから検出されるマイコトキシン類の衛生学的評価はヒトに対するリスクアセスメントを待たねばならないが、すでにヨーロッパ諸国ではそのための研究が進行中である。当面、チーズ製造にかかせないスターター菌の選択にあたっては有毒代謝産物の生産量の少ない菌株の使用がのぞましい。

菌学的には筆者らが分離した菌類はチーズ生産国ごとに系統(タイプ)が異なることや、同じ国でも生産地域により異なった系統の菌株が使用されていることは明らかである。

これらは人為的に管理されたチーズ由来菌の形態学的、生理学的性状、あるいは分子系統学的性状などを指標にヨーロッパの食文化の流れを理解できる可能性を示唆する。

5. 謝 辞

本総説に関連する研究は筆者らが東京家政大学で1996

年より開始し、まだ途上にある。このたび平成10年度に本学真菌医学研究センターに客員教授としてお招き下さり、同学の諸先生方よりご関心とご教唆をいただき、今後の研究の方向について討論する機会を与えられたことは筆者の望外のよろこびであります。これらはひとえに宮治 誠センター長をはじめ、赤尾三太郎教授、竹尾漢治教授、西村和子教授の諸先生方および事務部門の方々のご尽力によるものであり、心から御礼申し上げます。また、真菌類の系統分類・識別に関心をお持ちの横山耕治先生からは共通の課題として発酵食品に利用されている菌類の系統的由来、地域差等につき、ご示唆と将来の共同研究の萌芽をいただけたことに感謝します。

引用文献

- 1) 高田正樹: 日菌報, 36:170-179, 1995.
- 2) J. C. Frisvad and U. Thrane: Mycotoxin production by food-borne fungi. In "Introduction to food-borne fungi" (R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad and O. Filtenborg, eds.): p 251-260. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, 1995.
- 3) P. Lafont, M. G. Siriwardana, I. Combemale and J. Lafont: Food Cosmet. Toxicol., 17: 147-149, 1979.
- 4) G. Engel, K. E. von Milczewski, D. Prokopek and M. Teuber: Appl. Environ. Microbiol., 43: 1034-1040, 1982.
- 5) T. M. Lopez-Diaz, C. Roman-Blanco, M. T. Garcia-Arias, M. C. Garcia-Fernandez and M. L. Garcia-Lopez: Int. J. Food Microbiol., 30: 391-395, 1996.
- 6) P. M. Scott and B. P. C. Kennedy: J. Agric. Food Chem., 24: 865-868, 1976.
- 7) G. M. Ware, C. W. Thorpe and A. E. Pohland: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63: 637-641, 1980.
- 8) Von U. Schoch, J. Luthy and C. Schlatter: Milchwissenschaft, 39: 76-80, 1984.
- 9) P. E. Still, C. Eckardt and L. Leistner: Fleischwirtsch., 5: 876-877, 1978.
- 10) J. Le Bars: Appl. Environ. Microbiol., 38: 1052-1055, 1979.
- 11) 増井和子, 山田友子, 本間るみ子, 丸山洋平: 「チー

- ズ図鑑」(文芸春秋編): 272p. 東京, 1993.
- 12) L. B. Bullerman: *J. Food Safety*, 2 : 47-58, 1980.
 - 13) L. B. Bullerman: *J. Dairy Sci.*, 64 : 2439-2452, 1981.
 - 14) F. Lund, O. Filtenborg and J. C. Frisvad: *Food Microbiol.*, 12 : 173-180, 1995.
 - 15) H. P. Van Egmond, W. E. Paulsch, E. Deijill and P. L. Schuller: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63 : 110-114, 1980.
 - 16) 斎藤和夫, 西島基弘, 安田和男, 上村 尚, 井部明広, 永山敏広, 牛山博文, 直井家寿太: *食衛誌.*, 21 : 472-475, 1980.
 - 17) 田端節子, 上村尚, 田村行弘, 安田和男, 牛山博文, 橋本秀樹, 西島基弘, 三島太一郎: *食衛誌.*, 28 : 395-401, 1987.
 - 18) 久田和夫, 山本勝彦, 坪内春夫, 坂部美雄: *食衛誌.*, 25 : 543-548, 1984.
 - 19) R. A. Samson, C. Eckardt and R. Orth: *Antonie van Leewenhoek*, 43 : 341-350, 1977.
 - 20) G. Engel and M. Teuber: *Europ. J. Appl. Microbiol.*, 6 : 107-111, 1978.
 - 21) J. C. Frisvad and O. Filtenborg: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 : 1301-1310, 1983.
 - 22) J. C. Frisvad and O. Filtenborg: *Mycologia*, 81 : 837-861, 1989.
 - 23) Z. Kozakiewicz: *Mycopathologia*, 117 : 181-182, 1992.
 - 24) 島田つゆじ, 一戸正勝: *食衛誌.*, 39 : 345-351, 1998.
 - 25) M. Ichinoe and T. Shimada: Rept. 33rd Annual Meeting - Joint Panel on Toxic Microorganisms, UJNR, Nov. Hilo, Hawaii, Nov., 1998.
 - 26) Z. Kozakiewicz: *Mycopathologia*, 117 : 169-170, 1992.
 - 27) P. M. Scott and S. R. Kanhere: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62 : 141-147, 1979.
 - 28) W. T. Scott and L. B. Bullerman: *J. Food Sci.*, 41 : 201-203, 1976.
 - 29) P. Lafont, J.-P. Debeaupuis, M. Gaillardin and J. Payen: *Appl. Environ. Microbiol.*, 37 : 365-368, 1979.