

輸入落花生におけるアフラトキシンBG群汚染とその原因菌類としての  
*Aspergillus* section *Flavi*について

岡野清志, 富田常義, 久米田裕子, 松丸恵子, 一戸正勝

Reprint from MYCOTOXINS

Vol. 58, No. 2

July, 2008

## 輸入落花生におけるアフラトキシン BG 群汚染とその原因菌類としての *Aspergillus section Flavi* について

岡野清志\*<sup>1</sup>, 富田常義\*<sup>1</sup>, 久米田裕子\*<sup>2</sup>, 松丸恵子\*<sup>3</sup>, 一戸正勝\*<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup>財団法人マイコトキシン検査協会 (230-0054 横浜市鶴見区大黒ふ頭 15)

\*<sup>2</sup>大阪府公衆衛生研究所 (537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69)

\*<sup>3</sup>東京家政大学大学院 家政学研究科 (173-8602 東京都板橋区加賀 1-18-1)

### 要 旨

わが国に輸入される生落花生のうち、主要輸入国の試料について、年間、約 2,300-3,000 検体について 2002 年から 2006 年までのアフラトキシン (AF) 検査の結果をとりまとめた。5 年間の調査期間において、中国、南アフリカ、米国およびパラグアイ産の落花生について AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> が検出されるものと AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> が検出されるものと比較するとともに、わが国の AFB<sub>1</sub> 単独 10 µg/kg 規制した場合と、国際的に採用されている B 群, G 群 AF を総量 15 µg/kg で規制した場合を想定して検査試料数に対する規制値を超える試料の比率を集計した。結果として、試料数の多かった中国産落花生では AFB<sub>1</sub> 単独規制では 0.4-0.8 % が規制値を超え、AFBG 総量規制では 0.4-1.1 % が規制値を超えていて、ほとんど同様であった。南アフリカ産落花生でも同様で、AFB<sub>1</sub> 単独規制では 0.3-1.0 %, AFBG 総量規制で 0.3-1.2 % が規制値を超えていた。

輸入落花生由来菌につき、AF 汚染の原因となる *Aspergillus section Flavi* に所属する菌について形態的、AF およびシクロピアゾン酸の産生性、heteroduplex panel analysis (HPA) による識別を検討したところ、中国産 AFBG 検出試料の汚染原因は *A. parasiticus* であったのに対し、南アフリカ産 AFBG 検出試料から分離した菌株には *A. parasiticus* のほかに小型の菌核を多数形成し、AFBG 群を産生する非典型的な *A. flavus* が存在した。この菌種は section *Flavi* に関する HPA において AfF4 に属する菌株であった。

キーワード：輸入生落花生、アフラトキシン規制、アフラトキシン産生菌、  
*Aspergillus section Flavi*

(Received: April 30, 2008, Accepted: June 25, 2008)

### 緒 言

わが国の食品衛生法にもとづく現行の食品におけるアフラトキシン (AF) の規制は、もっとも毒性が強いとされる AFB<sub>1</sub> のみを対象としているが、国際的には、AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> の総量を合わせた、総量規制を行っている国が多い<sup>1,2)</sup>。

日本に輸入される食品・食料のなかで落花生及びナッツ類等は、食品衛生法による検査命令の対象となっており、マイコトキシン検査協会 (以下当協会) をはじめ、諸分析機関が検査を実施している。

輸入落花生の AF 汚染状況については、すでに 1972 年以來の当協会の検査成績にもとづいた報告<sup>3-5)</sup> がなされているが、伊藤ら<sup>4)</sup> は 1972 - 1991 年の 20 年間の検査データの解析から、AFB<sub>1</sub> 単

独規制よりも AFBG 群の総量規制をすることがのぞましいと提案している。

また、1999 年の輸入検査試料調製法の改定、検査法の薄層クロマトグラフィー (TLC) 法から高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法への改定をふまえた検査結果については、著者ら<sup>5)</sup>が 1994 - 2000 年の検査成績を、従来法と改定法による結果を対比させて集計し報告した。

今回は、2002 年から 2006 年の 5 年間における輸入落花生の AF 汚染の集計データをもとに、AFB<sub>1</sub> 規制した場合と AFBG 群の総量規制した場合を対比して解析することを試みた。また、落花生に AF 汚染をもたらす *Aspergillus flavus* およびその近縁菌 (section *flavi*) の AFB 群産生性、AFBG 群産生性について輸入試料における分布状況を調査したところ、落花生原産国により AF 産生菌の分布が異なることが明らかになったので報告する。

### 試料および試験法

**試料** 2002 年から 2006 年までに輸入され、当協会が受託検査した落花生のうち、年間検査試料数がまとまった輸入国のものを用いた。また、これらの試料の一部について AF 産生菌の検索のために菌学的な試験の対象とした。

**アフラトキシン試験法** 検査試料調整法<sup>6)</sup>にもとづき採取した粉碎試料 50 g に、厚労省アフラトキシン通知法<sup>7)</sup>に準拠し、アセトニトリル-水 (9:1, v/v) を加え、ホモジナイズした後ろ過し、ろ液を多機能カラムに注入した。その流出液を濃縮乾固したのち、トリフルオロ酢酸で誘導体化してから AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> を HPLC で測定した。検出限界は、AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> について各 0.1 µg/kg とした。

**粉碎落花生試料よりの菌分離法** 混和した試料 10 g を秤量し、スタマッカー処理により 10 倍希釈液、100 倍希釈液を調製して、各希釈液を選択的分離培地の *Aspergillus Flavus Parasiticus Agar* (AFPA, Oxoid) の平板に塗抹培養した。30 °C で 48 ~ 72 時間培養して、特有の集落裏面がオレンジ色を呈する菌株を *A. flavus* 近縁菌 (*Aspergillus section Flavi*) として CFU/g を計測し、必要に応じてポテトデキストロース寒天 (PDA) 斜面培地にとり、AF 産生能などを調べるとともに、同定用の試験菌株とした。

**培養物中の代謝産物の産生試験** 試験菌株を 2 % 酵母エキス (Difco)、15 % ショ糖を組成とする YES broth に接種して斜面の状態での 30 °C、7 日間培養したのち、培養ろ液 10 µL を silicagel 60 プレートに直接塗布して TLC により代謝産物の産生性を検索した。TLC の展開溶媒は AF についてはクロロホルム-アセトン-n ヘキサン (85:15:20, v/v/v)、シクロピアゾン酸 (CPA) はトルエン-酢酸エチル-ギ酸 (5:4:1, v/v/v) およびベンゼン-酢酸エチル-メタノール (90:5:7, v/v/v) を用い、それぞれ標準品と対比して、AF は紫外線 365 nm 下の蛍光を観察、CPA はエールリッヒ試薬および 50 % 硫酸噴霧後の発色により定性的に産生能を調べた。

**分離菌株の同定** 代謝産物の試験を行った菌株は、*Aspergillus* 類の同定用基準培地の 1 つの麦芽エキス寒天 (MEA) 培地の平板に 3 点接種して、集落の色調、菌核の形成の有無、大きさなど培養的性状による識別同定と共に、Kumeda ら<sup>8,9)</sup>の開発した分子生物学的な手法による section *Flavi* の同定を試みた。すなわち、少量の PDA broth に培養した供試株の菌体より DNA を抽出し、ITS1 および ITS4 のプライマーを使用して得た PCR 産物について heteroduplex panel analysis (HPA) 法により *Aspergillus section Flavi* の同定を行った。

## 結 果

最近5年間における輸入生落花生のAF汚染の現況と各種規制値との対応 Table 1に2002年から2006年のAF汚染検査データのうち、主要落花生輸入国からの試料を対象に、AFB群汚染あるいはAFBG群が認められた試料数およびそれらの検査試料数に対する割合を示した。さらにわが国の規制値AFB<sub>1</sub>10 µg/kgを超える試料数およびそれらの検査試料数に対する割合と、EUにおける食品原材料としての選別前あるいは物理的処理前の落花生のAF総量15 µg/kg<sup>10)</sup>を超える試料数およびそれらの検査試料数に対する割合も合わせて示した。

Table 1. Five years survey of aflatoxin contamination in imported raw peanuts during the years of 2002-2006

Country Imported	Year	No. of Samples	AF-detected samples		Aflatoxin regulation**	
			B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub>	B&G	AFB <sub>1</sub> ≥ 10 µg/kg	TotalAFs ≥ 15 µg/kg
China (V)*	2002	1,328	1 (0.1%)	2 (0.2%)	0	1 (0.1%)
	2003	1,814	8 (0.4%)	7 (0.4%)	7 (0.4%)	8 (0.4%)
	2004	1,683	17 (1.0%)	14 (0.8%)	13 (0.8%)	16 (1.0%)
	2005	1,428	9 (0.6%)	5 (0.4%)	9 (0.6%)	9 (0.6%)
	2006	1,645	15 (0.9%)	12 (0.7%)	13 (0.8%)	18 (1.1%)
China (S)*	2002	386	2 (0.5%)	0	0	0
	2003	550	2 (0.4%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)
	2004	621	1 (0.2%)	2 (0.3%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)
	2005	590	2 (0.3%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)
	2006	576	2 (0.3%)	2 (0.3%)	2 (0.3%)	2 (0.3%)
S. Africa	2002	378	6 (1.6%)	1 (0.3%)	0	0
	2003	449	6 (1.3%)	3 (0.7%)	2 (0.4%)	3 (0.7%)
	2004	207	1 (0.5%)	2 (1.0%)	2 (1.0%)	2 (1.0%)
	2005	298	4 (1.3%)	3 (1.0%)	1 (0.3%)	1 (0.3%)
	2006	252	2 (0.8%)	3 (1.2%)	2 (0.8%)	3 (1.2%)
U.S.A.	2002	298	5 (1.7%)	1 (0.3%)	1 (0.3%)	1 (0.3%)
	2003	262	16 (6.2%)	2 (0.8%)	10 (3.8%)	10 (3.8%)
	2004	170	1 (0.6%)	0	0	0
	2005	137	3 (2.2%)	3 (2.2%)	2 (1.5%)	1 (0.7%)
	2006	138	6 (4.3%)	2 (1.4%)	5 (3.6%)	5 (3.6%)
Paraguay	2002	43	7 (16%)	0	1 (2.3)	1 (2.3%)
	2003	61	12 (21%)	0	2 (3.3%)	2 (3.3%)
	2004	38	8 (21%)	0	4 (10.5%)	4 (10.5%)
	2005	26	2 (7.6%)	0	1 (3.8%)	1 (3.8%)
	2006	34	2 (5.9%)	0	0	0

\* (V): Virginia type variety; (S): Spanish and runner type variety

\*\* regulation of Japan: ≥ 10 µg/kg; regulation of EU, raw peanuts ≥ 15 µg/kg

中国産落花生には、大粒のバージニア種と小粒のスパニッシュ・ランナー種があり区別して集計したが、大粒種のおよそ1,300から1,800点の検査試料のうち、AFB群が検出されるものが0.1～1.0%存在し、AFBG群が検出されるものが0.2～0.8%存在したが、AFB群、AFBG群が検出される試料の比率に大きな差はなかった。

また、AF陽性率が高い年次ではAFB<sub>1</sub>単独規制した場合とAFBG総量規制した場合とで、規制値

を超える試料の比率が若干異なる年次があった。

一方小粒種においては AFB<sub>1</sub> 単独規制と AFBG 総量規制とで、規制値を超える試料の比率に差異が認められなかった。

南アフリカ産落花生は小粒種で、およそ 200 から 450 点検査した試料のうち、AFB 群が検出されるものが 0.5 ~ 1.6 % 存在し、AFBG 群が検出されるものが 0.3 ~ 1.2 % 存在した。一般に、AFB 群が検出される比率が高い傾向が認められたが調査年次により異なっていた。規制値とのかかわりにおいては、AFB<sub>1</sub> 単独規制した場合より AFBG 総量規制した場合の規制値を超える試料の比率が若干異なる年次があった。

米国産落花生については検査点数の多かった小粒種についてのみ集計したが、およそ 140 から 300 点のうち、AFB 群が検出されるものの比率が、2004 年の試料を除いて高く、1.7 ~ 6.2 % 存在し、とくに 2003 年において 262 点中 16 点に 6.2 % と高率に存在した。AFBG 群が検出されるものは 0.3 ~ 2.2 % 存在した。規制値とのかかわりでは、2005 年の試料のみが AFB<sub>1</sub> 単独規制と AFBG 総量規制との間に差異が認められ、それぞれ 1.5 %、0.7 % が規制値を超えた。

南米パラグアイ産の落花生も小粒種であるが、これまでに示した輸出国とは異なり、AFB 群のみが検出されており、AFBG 群が検出される試料は、この調査年次ではなかった。

以上に示した集計結果から、わが国の AFB<sub>1</sub> 単独規制を AFBG 総量規制に変更した場合、中国産大粒落花生は 2004 年 0.8 % が 1.0 %、2006 年 0.8 % が 1.1 % になり、南アフリカ産落花生は 2003 年 0.4 % が 0.7 %、2006 年 0.8 % が 1.2 % になり規制値を超える試料の比率が若干異なることが示唆された。米国産は、AFB<sub>1</sub> 10 ppb の規制値では 2 検体であったが、AFBG 総量では 1 検体と減少した。ちなみに、今回の集計結果を、米国の食品に対する AFBG 総量規制値 20 ppb を超えるものを適用することも試みたが、その傾向は同様であった。

**輸入落花生にアフラトキシン BG 群汚染をもたらす菌類** 現在、ナッツ（種実）類および穀類など農作物の AF の汚染原因菌としては、*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* などが知られるが、これらの菌は互いに近縁で、菌類分類学では section *Flavi* に所属する *Aspergillus* 属菌とされる。さきに示したように、わが国に輸入される主要落花生生産国のなかで、中国産および南アフリカ産の試料から AFBG 群による汚染試料が認められたので、これらの試料の AFBG 汚染原因菌について調査を行った。

供試試料は Table 2 に示したように、AFBG 群の汚染が認められるものと、AFB 群のみが検出されるものを対象としたが、*A. flavus* 近縁菌の選択的分離培地である AFPA 培地における検出菌数 (CFU/g) と、分離菌株を YES 液体培地に培養したときの AFBG 産生菌株数と AFB 群のみを産生する菌株数を対比して示した。

結果として、検出 AFBG 総量が高い試料から *A. flavus* 近縁菌が多く分離される傾向があったが、No.2 の試料に見られるように、 $2.2 \times 10^3$  CFU/g と分離菌数は多かったが、AF 検出量が低い例や、No.5 や No.8 の試料のように、AF 検出量が高いにもかかわらず分離菌数が少ない例などが存在するなど、明確な相関関係は認められなかった。

分離菌株の AF 産生性に関しては、多くの中国産 AFBG 汚染試料からは AFBG 産生菌が分離されており、培養的性状からみると、PDA 培地、MEA 培地に培養したときに暗緑色の色調の集落となり、AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 産生性を示す *A. parasiticus* と同定された。

AFB 群よりも AFG 群の検出量が多かった、No.2 の試料から分離した 10 菌株中 9 菌株は *A. flavus* と同定されたがいずれも AF 産生性はみられず、1 菌株のみが *A. parasiticus* と同定され、AFBG 産生菌であった。No.3 の試料より分離された AFBG 産生菌はいずれも *A. parasiticus* とされたが、同

Table 2. Detection of aflatoxin and aflatoxin-producing fungi in imported peanuts

Sample (Origin)	Aflatoxin ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				total	<i>s. flavi</i> on AFPA*	Aflatoxin-producer B&G : B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> /tested
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>			
No. 1 (S.Africa)	11.8	1.2	88.2	15.8	117.0	$2.9 \times 10^2$	4 : 8 / 15
No. 2 (China)	1.7	0.3	10.8	2.8	15.6	$2.2 \times 10^3$	1 : 0 / 10
No. 3 (China)	11.9	1.0	54.0	9.4	76.3	$3.5 \times 10^3$	8 : 0 / 10
No. 4 (China)	1.4	0.4	6.3	1.6	9.7	$2.0 \times 10$	0 : 0 / 2
No. 5 (China)	9.1	1.8	56.9	11.4	79.2	$5.0 \times 10$	5 : 0 / 6
No. 6 (China)	2.8	0.4	11.3	2.7	17.2	$1.0 \times 10$	- : - / 0
No. 7 (China)	0.8	0.2	-	-	1.0	$1.0 \times 10$	0 : 0 / 1
No. 8 (China)	56.4	10.8	277	48.7	392.9	$8.0 \times 10$	8 : 0 / 10
No. 9 (China)	32.7	4.9	148	27.8	213.4	$3.6 \times 10^3$	10 : 0 / 10
No.10 (China)	15.8	6.1	-	-	21.9	$1.2 \times 10^2$	0 : 0 / 10
No.11 (China)	59.8	4.8	-	-	64.6	$1.1 \times 10^2$	0 : 7 / 10
No.12 (China)	100.3	11.3	165	17.3	293.9	$3.6 \times 10^3$	10 : 0 / 10
No.13 (S.Africa)	251.8	21.3	19.3	2.9	295.3	$5.2 \times 10^4$	5 : 4 / 15

\* *s. flavi* on AFPA: section *flavi* on *Aspergillus Flavus Parasiticus Agar*

時に分離した *A. flavus* には AF 産生性が認められなかった。No.9 および No.12 の試料から分離した AFBG 産生菌はすべて *A. parasiticus* であった。AFB 群の高度汚染がみられた No.11 の試料から分離した菌株は AFB 群のみの産生性を有する *A. flavus* と同定された。

中国産落花生と同様に、AFBG 群の検出された 2 点の南アフリカ産の落花生から分離した菌株についての AF 産生性を検討した結果、AFBG 群産生菌と AFB 群産生菌とが共存していた。この南アフリカ産試料からは、PDA 斜面培養上で小型の菌核を多数形成する *A. flavus* 近縁菌が存在した。これらの小型菌核形成菌では AFB 群のみを産生する菌株と、産生量は低いながら AFBG 群を産生が認められた。その他、AFB 群のみを産生する *A. flavus*、AF 非産生性の *A. flavus* や AFBG 群を産生する *A. parasiticus* など、南アフリカ産落花生には多様な AF 産生菌が存在することが明らかとなった。

**輸入落花生由来のアフラトキシン産生菌の性状** 今回の AFBG 汚染の認められる輸入落花生から分離した汚染原因菌には多様な AF 産生菌が存在したので、それらの分離菌のうち、代表的な菌株につき *Aspergillus* 類の同定用基準培地の 1 つとされる MEA 培地上の培養集落の色調、菌核の形成の有無などの形態的性状の他、YES 液体培地における AF 産生性、および *A. flavus* に普遍的に産生性が知られるシクロピアゾン酸 (CPA) など代謝産物の産生性と、Kumeda ら<sup>8,9)</sup> の開発した分子生物学的手法の HPA による section *Flavi* の同定結果を対比して示したのが Table 3 である。なお、菌株番号の P-1 および P-13 は、南アフリカ産落花生由来菌株であり、その他の菌株は中国産落花生由来菌株である。

Table 3 にみられるように、南アフリカ産の落花生から分離した AF 産生菌には AFB 群のみを産生する典型的な *A. flavus* のほか、小型の菌核を形成する菌株が存在し、それらは AFB 群を産生する菌株と B<sub>1</sub> と G<sub>1</sub> を産生する菌株とに分かれたが、いずれも *A. flavus* と同様に CPA を産生した。これらの小型菌核を形成する菌株は HPA ではいずれも *A. flavus* に近い AfF4 のタイプに分類された。

中国産落花生から分離した菌株は、前述のように *A. parasiticus* が多かったが、HPA による分類ではいずれも ApP1 に所属した。中国産落花生由来の *A. flavus* は、HPA による分類では AfF1 あるいは AfF2 に所属したが、全て AF 産生性があるとはいえなかった。

Table 3. Morphological and metabolic characters of isolates from imported peanuts

Strain No.	Colony color on 2 % MEA	Sclerotia formation	Aflatoxins				CPA*	Identification	HPA** type
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>			
P-1-1	yellow green	small scl.	++	+	-	-	+	<i>A. flavus</i> S strain	(AfF4)
P-1-3	yellow green	large scl.	±	-	±	-	±	<i>A. flavus</i>	(AfF2)
P-1-4	yellow green	none	++	+	-	-	+	<i>A. flavus</i>	(AfF1)
P-1-5	yellow green	large scl.	++	+	-	-	+	<i>A. flavus</i>	(AfF2)
P-1-8	dark green	large scl.	+	±	+	±	-	<i>A. parasiticus</i>	(ApP1)
P-1-15	dark green	none	-	-	-	-	-	<i>A. parasiticus</i>	(ApP1)
P-13-1	yellow green	small scl.	++	+	-	-	++	<i>A. flavus</i> S strain	(AfF4)
P-13-3	yellow green	small scl.	±	-	+	-	++	<i>A. flavus</i> S strain	(AfF4)
P-13-5	yellow green	small scl.	±	-	±	-	+	<i>A. flavus</i> S strain	(AfF4)
P-2-9	dark green	none	++	+	++	+	-	<i>A. parasiticus</i>	(ApP1)
P-3-1	dark green	none	++	+	++	+	-	<i>A. parasiticus</i>	(ApP1)
P-3-7	dark green	none	++	+	++	+	-	<i>A. parasiticus</i>	(ApP1)
P-5-1	dark green	none	++	+	++	+	-	<i>A. parasiticus</i>	(ApP1)
P-5-4	dark green	none	+	-	+	-	-	<i>A. parasiticus</i>	(ApP1)
P-7-1	yellow green	large scl.	-	-	-	-	±	<i>A. flavus</i>	(AfF2)
P-8-1	dark green	none	++	+	++	+	-	<i>A. parasiticus</i>	(ApP1)
P-8-7	yellow green	large scl.	-	-	-	-	±	<i>A. flavus</i>	(AfF1)
P-11-1	yellow green	none	++	+	-	-	++	<i>A. flavus</i>	(AfF1)

\*CPA: Cyclopiazonic acid production; \*\*HPA: heteroduplex panel analysis

## 考 察

**輸入落花生のアフラトキシンBG群汚染について** 輸入落花生のAFBG群汚染については、すでに前田<sup>3)</sup>、伊藤ら<sup>4)</sup>によって指摘されているところであり、1972年から1991年の間に、米国、南アフリカ、スーダン、中国、アルゼンチン、ブラジルなどの諸国から輸入した落花生からAFBG汚染試料が見出されている。これらの報告では、とくに米国産小粒種のAFBG汚染に注目しているが、米国産の落花生のAFBG汚染に関しては、FDAのUranoら<sup>11)</sup>のジョージア大、国立落花生研究所との共同研究の報告がある。

一方で、前田<sup>3)</sup>の報告では、インド、インドネシア産およびパラグアイ産の落花生からはAFB群のみが規制値を超えて検出されるなど、落花生の生産国による汚染AFの相違を認めているが、今回の集計でもパラグアイ産からはAFB群のみが検出されている。

今回の2002年から2006年にいたる検査成績の解析では、輸入国が1990年代とは異なり数カ国に限定されているものの、わが国のAFB<sub>1</sub>単独規制と国際的な動向をふまえたAFBG総量規制を考慮すると、パラグアイ産等AFB群のみを検出する国と中国、南アフリカ、米国等AFB群、AFBG群を検出国があり輸入国によって対応が異なることを示唆する結果となった。

Girbert and Shephard<sup>12)</sup>のピーナッツバターやナッツ類等のAFB<sub>1</sub>、AFBG汚染の詳細な報告は、EUにおけるAFBG総量規制の根拠の一つになったと想定される。

**輸入落花生のアフラトキシン汚染原因菌について** 今回の南アフリカ産AFBG汚染試料から分離された小型菌核を多数形成する菌株に関しては、Cotty and Cardwell<sup>13)</sup>が西アフリカのベニンや米国の土壌から分離した菌株について、S strainとして注目しており、西アフリカ産菌株ではAFG群を同時に産生するが、米国産菌株ではAFB群のみを産生し、同じ小型菌核形成菌に地理的

分布差を認めている。また、近年 Pildain ら<sup>14)</sup> は、アルゼンチンの落花生由来菌に小型菌核を形成する AFBG 産生菌の存在を認め、わが国の Saito ら<sup>15)</sup> の報告した *A. flavus* var. *parvisclerotigenus* との関連性につき言及し、ごく最近の Pildain らの報告<sup>16)</sup> では *Aspergillus* section *Flavi* について分子系統学的な検討に加えて、分類学的な考察を行うことにより、アルゼンチン産落花生由来の小型菌核形成菌株を *A. minisclerotigenes* sp.nov. として新種の記載をしている。

これら AF 産生能を有する小型菌核形成菌については、Frisvad ら<sup>17)</sup> による、*A. flavus* var. *sclerotigenus* を種のレベルに昇格させ *A. parvisclerotigenus* とした処置を含めて、今回得られた南アフリカ産落花生由来の小型菌核形成菌をどのように菌学的に取り扱うか、今後、同様な性状を示す菌株を多数収集し、形態的、分子生物学的な精査を行う必要があると考えられた。

## 結 論

(1) 近年の主要な落花生生産国からの輸入試料の AF 汚染に関しては、AFB<sub>1</sub> 単独規制を AFBG 群総量規制に変更したとしても、特定の国からの輸入品を除いて、規制値を超える試料の比率に大きな影響は認められない。

(2) 総量規制に関与する AFBG 群汚染の原因菌類の分布には、既知の *Aspergillus parasiticus* の他に、小型の菌核を多数形成する *A. flavus* 近縁菌が存在し、その分布は落花生生産国によって異なることに留意する必要がある、その AFBG 群汚染への関与についてはさらに検討することがのぞまれる。

本報告をとりまとめるにあたり、有益な助言をいただき、さらに最新の情報を提供して下さった、国立医薬品食品衛生研究所の小西良子衛生微生物部長に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の菌学的な検討の遂行に関して、東京家政大学家政学研究科共同研究推進費の助成を受けた。関係各位に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Van Egmond, H.P. and Jonker, M.A.: Current situation on regulations for mycotoxins. "New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety" Proc. Int. Symp. Mycotoxicol. in Kagawa 2003. Yoshizawa, T. Ed. p1-15 (2004)
- 2) 杉山圭一, 小西良子: 月刊フードケミカル, **23** (4), 73-78 (2007)
- 3) 前田協一: マイコトキシン, **31**, 7-17 (1990)
- 4) 伊藤義典, 前田協一, 栗飯原景昭: マイコトキシン, **51**, 13-24 (2001)
- 5) 岡野清志, 富田常義, 長南正貴: マイコトキシン, **53**, 25-29 (2003)
- 6) 厚生省通知: 環食 43 号 (平成 11 年 3 月 12 日)
- 7) 厚生労働省通知: 食監発 0326001 号 (平成 14 年 3 月 26 日)
- 8) Kumeda, Y., Asao, T.: Appl. Environ. Microbiol., **67**, 4084-4090 (2001)
- 9) 久米田裕子: 防菌防黴, **23**, 569-576 (2005)
- 10) Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (2004)
- 11) Urano, T., Trucksess, M.W., Beaver, R.W., Wilson, D.M., Dorner, J.W., Dowell, F.E.: J. AOAC, **75**, 838-841 (1992)



- 12) Gilbert, J., Shepherd, M.J.: Food Addit. Contam., **2**, 171-183 (1985)
- 13) Cotty, P.J., Cardwell, K.F.: Appl. Environ. Microbiol., **65**, 2264-2266 (1999)
- 14) Pildain, M.B., Vaamonde, G., Cabral, D.: Int. J. Food Microbiol., **93**, 31-40 (2004)
- 15) Saito, M., Tsuruta, O.: Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol., **37**, 31-36 (1993)
- 16) Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R.A.: Int. J. Systematic Evolutionary Microbiol., **58**, 725-735 (2008)
- 17) Frisvad, J.C., Skouboe, P., Samson, R.A.: Systematic Appl. Microbiol., **28**, 442-453 (2005)

### **Aflatoxin B and G contamination in imported peanuts and *Aspergillus* section *Flavi* of the causing fungi**

Kiyoshi OKANO and Tsuneyoshi TOMITA: Mycotoxin Research Association (15, Daikoku-futo, Tsurumi-ku Yokohama 23-0054, Japan)

Yuko KUMEDA: Osaka Prefectural Institute of Public Health (1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan)

Keiko MATSUMARU and Masakatsu ICHINOE: Department of Food and Nutrition, Graduate School, Tokyo Kasai University (1-18-1, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8602, Japan)

We have summarized the results of the examinations for aflatoxins (AFs) conducted from 2002 to 2006 : approximately 2,300 to 3,000 annual samples of raw peanuts imported to Japan from major exporting countries. In peanuts from China, South Africa, the U.S. and Paraguay, a comparison was made between the proportion of products in which AFB<sub>1</sub> and/or B<sub>2</sub> was detected and that of products in which AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and/or G<sub>2</sub> was detected during the five years of survey. We also calculated the proportions of samples showing AF levels above the Japanese regulatory value (10 ppb for AFB<sub>1</sub> only) and those showing levels above the international limit (a total of 15 µg/kg [ppb] for B- and G-group AFs) to all samples examined during the same survey period.

The results showed that, in the Chinese peanuts which had large sample sizes, the proportion of products having AFB<sub>1</sub> levels above the AFB<sub>1</sub>-focused regulatory value (0.4 % to 0.8 %) and that of products having AF levels above the limit of total B- and G-group AFs (0.4 % to 1.1 %) were very similar. Similarly, in South African peanuts, 0.3 % to 1.0 % and 0.3 to 1.2 % of the products showed AF levels above the AFB<sub>1</sub>-focused limit and the AF B- and G-group total limit, respectively.

Isolates of *Aspergillus* section *Flavi* (the cause of AF contamination) from peanuts were identified from morphology and AF and cyclopiazonic acid productivity, and by heteroduplex panel analysis (HPA). It was found that the contamination of Chinese samples by B- and G-group AFs was caused mainly by *A. parasiticus* whereas isolates from South African samples contaminated by B- and G-group AFs included, in addition to *parasiticus*, an atypical *A. flavus* isolate which forms numerous small sclerotia and produces B- and G-group AFs. This isolate was categorized into AfF4 by HPA of section *Flavi*.

**Key words** : imported raw peanuts, aflatoxin regulation, aflatoxin producing fungi, *Aspergillus* section *Flavi*