

イラン産ピスタチオナッツのカビ毒生産菌の分布

一戸正勝*¹, 斉藤朋子*¹, 岡野清志*²

*¹東京家政大学大学院 家政学研究科 食物栄養学専攻

(173-8602 東京都板橋区加賀1-18-1)

*² (財) マイコトキシン検査協会

(230-0054 横浜市鶴見区大黒ふ頭15)

要 約

イラン産の輸入ピスタチオナッツについてアフラトキシン生産性を有する *Aspergillus flavus* の汚染状況について調査研究を行った。輸入港において、検査対象となった生ピスタチオナッツおよび生産地が特定された生ピスタチオナッツについてアフラトキシン生産菌の分布状況を調査したところ、行政検査でアフラトキシン陽性となった試料では *A. flavus* のアフラトキシン生産菌の比率が高く、陰性試料では *A. flavus* の検出量が多い場合でも生産菌の比率が低かった。種実の内果皮と仁に分けて菌分離を行ったが、個々の検査粒により異なっており、一定の傾向はみられなかった。イラン国内のピスタチオ生産地域により、アフラトキシン生産菌の分布が異なっていた。

キーワード：ピスタチオナッツ, アフラトキシン, *Aspergillus flavus*

(Received, April 30, 2001)

緒 言

我が国に輸入される農作物のなかでは、ピスタチオナッツは落花生とならんでアフラトキシン汚染が認められる種実類であり、特にイラン産のピスタチオナッツについては1996年以来、食品衛生法第15条にもとづく検査命令の対象となり、輸入検査が強化されている。

一般に農作物のカビ毒汚染については、生産国の気候条件、収穫後の管理状況のほか、汚染の原因となるカビ毒の生産性を有する菌類の分布状況などいくつかの要因が関係するが、ピスタチオナッツについての現時点における要因情報は充分ではない。

また、落花生、ピスタチオナッツ等の種実類ではアフラトキシン汚染粒が局在している可能性が大きく、個々の種実粒のアフラトキシン汚染量、汚染原因カビ類の着生状況の如何が問題となる。したがって、化学試験の対象とする分析試料の調製を含めたサンプリング法をいかに設定するかは難しい課題である。

本調査研究においては、行政検査の対象とされた生ピスタチオナッツにつき、化学検査用に調製された試料におけるアフラトキシン生産菌の検出状況、分析用に粉碎調製される前の個々のピスタチオ粒における *Aspergillus flavus* の感染度合、およびそこに含まれるアフラトキシン生産菌の比率を知るために実験を行った。

また、イラン国内における代表的なピスタチオ生産地より入手した生種実粒試料を対象にアフラトキシン生産菌の分布の地域差についても検討を行うことにより、アフラトキシン汚染の多発の要因を解析することを目的とした。

実験材料および方法

試料 対象としたイラン産の生ピスタチオナッツは1995年に輸入検査に用いられた9ロット；15点のほか、最近の行政検査においてアフラトキシン陽性となった1ロット；8点、陰性であった1ロット；8点および、輸入商社が試験用に入手したイラン国内においてピスタチオ生産地が特定されている試料8点である。

菌分離法 化学分析用に粉碎された試料は希釈培養法によって試料1gあたりのcolony forming unit(CFU)を求めた。すなわち粉碎試料約200gをよく混和したのち、10gを秤量しストマッカー用ポリ袋に入れ、希釈液0.1%ペプトン水90mlを加えて、1分間ストマッカー処理した後、10倍段階希釈液を調製、 10^2 希釈、 10^3 希釈液の0.5mlずつをそれぞれ2枚のあらかじめ固化した平板培地に塗抹して30℃、5日間培養した。粒状試料は内果皮(shell)、仁(kernel)に分けて、直接培養法により粒単位の感染率を求めた。検査粒等を0.5%次亜塩素酸ナトリウムにより1分間表面殺菌したのち、滅菌精製水で5回洗浄してから1枚の平板培地あたり5片ずつ並置し、半切した内果皮、仁それぞれ25片ずつを検査対象とし、30℃、3～5日間培養した。

分離用培地にはdichloran-rose bengal-chloramphenicol(DRBC)培地(Oxoid, UK)を用い、出現カビ類は実体顕微鏡下で観察・記録したのち、potato-dextrose agar(栄研)の斜面培地に釣菌した。

分離した*A. flavus*は2% yeast extract-15% sucrose broth(YES)培地に接種し、斜面の状態、30℃、7日間培養し高圧滅菌後、培養ろ液を得て、薄層クロマトグラフィー(TLC)の試験溶液とした。

分離菌株のアフラトキシン生産能は、培養ろ液を溶媒抽出することなく直接TLCプレートに塗布する方法を用いた。すなわちろ液の10 μ lをprecoated plate silicagel 60(Merk, Art. 1.05721)に標準アフラトキシンB & G混液(Sigma A-9441)と共に塗布し、展開溶媒chloroform-acetone-hexane(85:15:20)で展開後、紫外線灯下で観察してアフラトキシン生産性を定性的に検索した。

なお、行政検査におけるピスタチオナッツのアフラトキシンの分析定量はナッツ等の公定法の環食128号によって実施した¹⁾。

結果および考察

1995年に輸入検査の対象となったイラン産ピスタチオナッツ15点におけるアフラトキシン類の検出状況と、それに対応する粉碎試料の*A. flavus*の検出量(CFU/g)およびアフラトキシン生産菌の出現状況をTable 1にとりまとめた。なお、試料C, D, H, およびIに示した番号は同一ロットから複数の試料を得たものである。表にみられるように、化学検査でアフラトキシンが陽性となる試料からは*A. flavus*が 10^4 - 10^5 CFU/gのレベルに達したが、試料I-2にみられるような、必ずしも相関しない例もあった。

*A. flavus*はアフラトキシン不検出の試料を含めてすべての試料から分離され、表にみられるごとく、個々の試料からの分離菌株のアフラトキシン生産菌の比率が高く、総試験菌株数101菌株中80菌株(79.2%)となり、アフラトキシンB₁, B₂, あるいはB₁の生産性を示した。

Table 1. Occurrence of aflatoxin and aflatoxin-producing fungi from imported Iranian pistachio nuts

Sample	Aflatoxins (ppb)		<i>A. flavus</i> (CFU/g)	Aflatoxin-producer Positive/Examined
	B ₁	B ₂		
A	ND*	ND	4.0×10 ²	1 / 5
B	ND	ND	2.0×10 ²	2 / 3
C-1	512.0	20.0	2.0×10 ⁵	10 / 10
C-2	3.4	tr**	1.6×10 ⁴	10 / 10
C-3	ND	ND	4.8×10 ³	9 / 10
D-1	ND	ND	1.0×10 ²	1 / 1
D-2	61.0	4.0	9.8×10 ⁴	9 / 10
E	ND	ND	1.0×10 ³	7 / 8
F	ND	ND	4.0×10 ²	5 / 5
G	ND	ND	1.0×10 ²	1 / 3
H-1	10.2	tr	1.4×10 ⁵	8 / 9
H-2	ND	ND	8.5×10 ²	4 / 7
H-3	2.6	2.6	8.5×10 ²	3 / 6
I-1	ND	ND	1.0×10 ³	6 / 9
I-2	230.0	230.0	5.0×10 ²	4 / 5

*ND: not detected; **tr: trace, detection limit 1.0 ppb

輸入イラン産ピスタチオナッツからの分離菌株におけるアフラトキシン生産菌の高率な検出については、すでに田中ら²⁾、長谷川ら³⁾によって報告されているところである。

化学分析用に調製したピスタチオナッツは10メッシュのサイズになるように粉碎されるが、その際、堅い内果皮の一部が混入することはやむを得ない。しかし、アフラトキシン分析は可食部のむき身(仁)が対象となっているのでアフラトキシン生産菌がいずれの部分に多いかを知るために、生種実粒の内果皮と仁とに分けて、直接培養法で菌分離を行って*A. flavus*の感染率を求めた。実験対象としたイラン産ピスタチオナッツは行政検査でアフラトキシン陽性となったロットと、陰性となったロットである。

Table 2及びTable 3にはそれぞれのロットの培養結果と分離菌株のアフラトキシン生産能を示した。

化学検査では分析試料62より、B₁62.2 ppb、B₂7.2 ppbを検出して、このロットは不合格となっ

Table 2. Distribution of *Aspergillus flavus* and aflatoxin-producing fungi on aflatoxin positive lot of imported Iranian pistachio nuts

Sample	Percentage of infection		<i>A. flavus</i> CFU/g	Aflatoxin-producer Positive/Examined
	Shell	Kernel		
60	40 %	36 %	5.0×10 ²	5 / 10 (B ₁ ,B ₂)
61	28	24	7.0×10 ²	4 / 10 (B ₁ ,B ₂)
62*	36	40	1.8×10 ³	5 / 9 (B ₁ ,B ₂)
63	24	48	1.5×10 ³	5 / 10 (B ₁ ,B ₂)
64	8	4	7.0×10 ²	3 / 3 (B ₁ ,B ₂)
65	52	44	7.0×10 ²	8 / 10 (B ₁ ,B ₂)
66	36	48	3.2×10 ³	8 / 10 (B ₁ ,B ₂)
67	12	28	6.0×10 ²	6 / 8 (B ₁ ,B ₂)

* aflatoxin B₁, 62.2 ppb, B₂ 7.2 ppb detected

Table 3. Distribution of *Aspergillus flavus* and aflatoxin-producing fungi on aflatoxin negative lot of imported Iranian pistachio nuts

Sample	Percentage of infection		<i>A. flavus</i> CFU /g	Aflatoxin-producer Positive/Examined
	Shell	Kernel		
68	64 %	100 %	2.0×10^2	3 / 10 (B ₁ , B ₂)
69	92	72	4.0×10^2	6 / 10 (B ₁ , B ₂)
70	76	100	5.0×10^2	2 / 10 (B ₁)
71	72	76	3.0×10^2	0 / 10
72	76	72	4.0×10^2	3 / 10 (B ₁ , B ₂)
73	72	72	5.0×10^2	6 / 10 (B ₁)
74	60	92	2.0×10^2	4 / 10 (B ₁ , B ₂)
75	64	60	3.0×10^2	4 / 10 (B ₁ , B ₂)

ているが、8点の分析試料では内果皮、仁の*A. flavus*の感染率には大きな差異はなかった。希釈培養による検出菌量では 10^3 /gレベルの試料が3点みられ、そのうちの1点からアフラトキシンB₁、B₂を検出しているが、さきのTable 1にみられたような高レベルの菌量を示すものはなかった。分離菌株のアフラトキシン生産能は70菌株中44菌株(62.9%)と高頻度であった。

一方、Table 3に示したアフラトキシン陰性ロットでは、内果皮、仁における*A. flavus*の感染率は高かったが、希釈培養法では 10^2 /gのレベルにとどまり、培養法の違いにより評価が異なることを示した。分離菌株のアフラトキシン生産能は80菌株中28菌株(35%)とやや低頻度であった。

これらの供試試料からはアフラトキシンG群を生産する菌株は分離されなかった。

以上の実験結果から、内果皮、仁の*A. flavus*の感染率には極端な差異はみられず、分析値に影響をおよぼす可能性は低いことが示唆された。供試した生ピスタチオナッツから*A. flavus*以外の菌類として、*A. niger*が高率にみられ、陽性ロットでは内果皮、仁ともに36-63%の感染率で、陰性ロットでは100%の感染率で、その他には*Penicillium*類がみられたが、カビ毒汚染をもたらすような高度な感染試料はなかった。

生産地域が特定された試料における菌分布及びアフラトキシン生産菌を内果皮、仁について調査した結果をTable 4に示した。

いずれもイラン中部の半砂漠地帯に灌漑を施してピスタチオを栽培している代表的産地の試料である。Kerman, Rafsanjanの試料ではアフラトキシン生産菌の比率が低かったのに対し、Yazd, Ardakan, Anarの試料ではアフラトキシン生産菌の比率が高い傾向がみられ、地域差がうかがわれたが、この点については供試試料数が少ないので、さらに試料数を増やしての検討が必要である。

注目すべき点は、Yazd産の試料よりアフラトキシンB₁、G₁生産菌株を分離したことで、これらの菌株は培養上の性状から*A. parasiticus*に相当する菌株であった。これまでの輸入ピスタチオナッツのアフラトキシン汚染例の報告には、B₁、B₂のほかG₁、G₂やaflatoxicolも同時に検出した報告例⁴⁾もあり、*A. parasiticus*のイランにおける分布が示唆されるものである。輸入試料における*A. niger*の常在は従来の報告例²⁾でも認められ、*A. niger*と*A. flavus*の2菌種はピスタチオナッツの代表的な着生菌といえる。これらの菌分布は、イラン国内でのピスタチオナッツの菌分布調査の報告例^{5,6)}と同様であった。

ピスタチオナッツの種実の内果皮と仁(胚乳)とを分けて菌の分布を調査したが、個々の検査

Table 4. Fungal infection and aflatoxin-producing fungi on Iranian pistachio nuts collected at 2000

Sample (origin)	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	Aflatoxin-producer
KK-1S* (Kerman)	88 %	100 %	0 / 5
KK-1K**	64	100	1 / 5 (B ₁)
KK-19S (Kerman)	4	36	0 / 1
KK-19K	16	60	1 / 3 (B ₁)
KK-2S (Rafsanjan)	20	100	0 / 2
KK-2K	16	100	1 / 3 (B ₁)
KK-20S (Rafsanjan)	28	84	2 / 5 (B ₁ , B ₂)
KK-20K	92	100	0 / 5
KK-3S (Yazd)	96	100	1 / 5 (B ₁)
KK-3K	92	100	2 / 5 (B ₁ , G ₁ , B ₁)
KK-21S (Yazd)	20	100	3 / 4 (B ₁ , G ₁ , B ₁ , B ₂)
KK-21K	76	100	3 / 5 (B ₁ , B ₂)
KK-22S (Ardakan)	40	48	2 / 5 (B ₁)
KK-22K	60	64	4 / 5 (B ₁)
KK-23S (Anar)	28	80	3 / 5 (B ₁ , B ₂)
KK-23K	100	100	4 / 5 (B ₁ , B ₂)

*S: Shell; **K: kernel

種実によって異なっており、一定の傾向がみられず、イランにつぐピスタチオ生産国であるトルコでの Heperkan ら⁷⁾ の内果皮のおよそ40%に *A. flavus* が存在するのに対し、仁では6-16%にすぎないという報告とは異なる結果を得た。また、貯蔵中のピスタチオナッツについて、内果皮と仁とに分けて、アフラトキシン蓄積の経過をみた Denizel ら⁸⁾ の報告によると、仁では時間経過と共に蓄積量が増加するが、内果皮ではほとんど変化がみられないとしているので、分析試料の調製時の内果皮の混入は測定値に影響を与えないと考えられた。

結 論

今回、調査研究の対象としたイラン産ピスタチオナッツにおけるアフラトキシン類の生産性を示す *Aspergillus flavus* の分布状況からみて、イラン国内にはアフラトキシン生産菌が広く分布しており、収穫後の管理等、増殖を防ぐ対策をたてる必要がある。

A. flavus の培養による評価は、直接培養法の場合、粒着生菌を増菌して観察しているので感染率のみではカビ毒汚染の可能性を知ることは難しい。一方、希釈培養法での評価は化学試験の結果と比較的よく一致するが、表面殺菌せずに培養を行うので、粒組織内に増殖した菌とともに単なる表面付着菌も評価してしまう。

内果皮と仁の菌分布からみて、アフラトキシン分析の際の測定値に与える影響はほとんど無いとみられるが、これらを分けて解析することは、樹上での成熟と共に開殻するピスタチオの特性からみて、*A. flavus* の侵入がどの時点で発生するかを知るうえで有力な情報源となる可能性があるため、さらに検討を必要とする。

本研究を実施するあたり、多大な協力を得た、東京家政大学栄養学科学生の相良好美、山崎綾子、小金井智子の卒論生諸嬢に厚く感謝いたします。また、貴重なイラン国の生産地が特定され

たピスタチオナッツ試料を提供していただいた, 小林桂株式会社の森本浩一様に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) 前田恭一, 伊藤嘉典, 粟飯原景昭: マイコトキシン, **50**, 65-74 (2000)
- 2) 田中敏嗣, 戸矢崎紀紘, 松田良夫, 松木幸夫: 神戸市環境保健研究所研究報告, **14**, 64-65 (1981)
- 3) 長谷川明彦, 田中敏嗣, 青木伸実, 山本進, 戸矢崎紀紘, 松田良夫, 宇田川俊一: マイコトキシン, **25**, 21-27 (1987)
- 4) 斉藤和夫, 西島基弘, 安田和男, 上村 尚, 井部明弘, 永山敏広, 牛山博文, 直井家寿太: 食衛誌, **25**, 241-245 (1984)
- 5) Mojtahedi, H., Danesh, D., Haghghi, B., Barnett, R.: *Phytopathology*, **68**, 1800-1804 (1978)
- 6) Mojtahedi, H., Rabie, C.J., Luebben, A., Steyn, M., Danesh, D.: *Mycophthologia*, **67**, 123-127 (1979)
- 7) Heperkan, D., Aran, N., Ayfer, M.: *J. Sci. Food Agric.*, **66**, 273-278 (1994)
- 8) Denizel, T., Rolfe, E.J., Jarvis, B.: *J. Sci. Food Agric.*, **27**, 1027-1034 (1976)

The occurrence of aflatoxin-producing strains in the imported Iranian pistachio nuts

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

Kiyoshi OKANO: Mycotoxin Research Association (15, Daikoku-futo, Turumi-ku, Yokohama 230-0054, Japan)

The distribution of *Aspergillus flavus* was determined in imported raw Iranian pistachio nuts. Occurrence of aflatoxin-producing strains in aflatoxin positive samples was markedly higher, whereas ratio of aflatoxin-producing strains of *A. flavus* in aflatoxin negative sample was relatively low. Distribution of *A. flavus* on shells and kernels of the nuts showed as difference among individual samples. Occurrence of aflatoxin-producing strains was examined in pistachio nuts samples collected from different geographical areas in Iran.

Key word: pistachio nuts, aflatoxin, *Aspergillus flavus*