

# 耐熱性カビPenicillium oblatumおよびP. sabulosumに関する系統分類学的検証

誌名	日本菌学会会報 = Transactions of the Mycological Society of Japan
ISSN	00290289
著者名	矢内,美幸 前川,幸子 宇田川,俊一
発行元	日本菌学会
巻/号	61巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 91-101
発行年月	2020年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 耐熱性カビ *Penicillium oblatum* および *P. sabulosum* に関する系統分類学的検証

矢内 美幸<sup>1)\*</sup>・前川 幸子<sup>1)</sup>・宇田川 俊一<sup>2)</sup>

1) (一財) 日本食品分析センター多摩研究所, 〒206-0025 東京都多摩市永山 6-11-10

2) 元 (一財) 日本食品分析センター多摩研究所, 〒152-0004 東京都目黒区鷹番 2-12-1

### A phylogenetic revision of *Penicillium oblatum* and *P. sabulosum* as heat resistant molds

Miyuki YANAI<sup>1)\*</sup>, Sachiko MAEKAWA<sup>1)</sup>, Shun-ichi UDAGAWA<sup>2)</sup>

1) Japan Food Research Laboratories, Tama Laboratory, 6-11-10, Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206-0025, Japan

2) Formerly Japan Food Research Laboratories, 2-12-1, Takaban, Meguro-ku, Tokyo 152-0004, Japan

(Accepted for publication: September 14, 2020)

In the course of a mycological survey of spoilage of pasteurized and packaged food products, we have frequently encountered *Penicillium*-like molds in precooked Japanese noodle and pasta products. Six isolates from the noodles and pasta have morphological similarities to two heat-resistant fungi, i.e. *P. oblatum* and *P. sabulosum*, which have been isolated from pasteurized products in Australia and described as the indistinct *Penicillia*. In this paper, with a phylogenetic comparison of the ITS region of rRNA,  $\beta$ -tubulin, and calmodulin genes between the isolates and the type strains of both species, we considered it an opportunity to re-evaluate the taxonomy of *P. oblatum* and *P. sabulosum*. As a result, these fungi were regarded to be distinct members of the genus *Rasamsonia*, Eurotiales. Therefore, we proposed two combinations: *Rasamsonia oblata* (Pitt & Hocking) Yanai & Udagawa and *R. sabulosa* (Pitt & Hocking) Yanai & Udagawa.

(Japanese Journal of Mycology 61: 91–101, 2020)

Key Words—Eurotiales; Food spoilage; Heat-resistant molds; *Rasamsonia*; Taxonomy

#### 諸 言

耐熱性カビによる食品の変敗事故は加熱加工された種々の食品・飲料に発生し、経済的損失とともに食品衛生上その安全性が危惧されている。原因菌は主として子囊菌類で、それらは土壌菌として環境中に生息し、その子嚢胞子は75℃、30分間の加熱にも生残する (Frac et al. 2015)。多くは土壌と接触した農産物に一次汚染を引き起こし、それらを原料とした加熱加工食品や飲料に被害が発生するといわれている (Tournas 1994; 宇田川・矢口 2001; Scholte et al. 2004; 宇田川 2010; 上田 2010)。

加熱加工食品・飲料を対象とした耐熱性カビ研究の一環として、著者らは加熱加工されたゆで麺・パスタの事故品から度々分離されたカビについて同定を試みたところ、いずれも1985年にオーストラリアのPitt and Hoc-

kingによって低温加熱加工された果汁関連製品から分離され、新種として報告された *Penicillium oblatum* と *P. sabulosum* に形態的に類似していることが分かった。両種とも *Penicillium* 属としては非典型的な形質から、2014年に発表された *Penicillium* 属同定と命名ではリストに含まれていない (Visagie et al. 2014)。また、Yilmaz et al. (2014) による *Talaromyces* 属の分類研究では、*P. oblatum* については疑問種にリストされ、Samson et al. (2011) が *T. dendriticus* に関連するとして発表した塩基配列が菌株のコンタミネーションによって誤ったものであることを述べている。Yilmaz et al. の同じ報告で *P. sabulosum* は除外種のリストに入れられ、Samson et al. (2011) によって *Talaromyces* に移された編入が不適切であり、*Penicillium* 属 *Exilicaulis* 節の菌種とされている。このことに関連して、2016年のVisagie et al. による *Exilicaulis* 節に関する系統分類学的改訂では、*P. sabulosum* を *Penicillium smithii* のシノニムとしている (Visagie et

\* 責任著者 (corresponding author) : yanaim@jfrl.or.jp

al. 2016). 以上のように, *P. oblatum* と *P. sabulosum* はともに分類学的な再検討が課題となっていることから, 著者らは *P. oblatum* のタイプ由来株 IMI 288719 および NBRC 33091, ならびに *P. sabulosum* のタイプ由来株 ATCC 56984 を入手し, 形態に基づく表現形質の再確認と, 類似菌としてゆで麺・パスタから分離した6菌株を併せて供試し, ITS,  $\beta$ -tubulin (*BenA*), calmodulin (*CaM*) 遺伝子の部分塩基配列の系統解析を行った. その結果, 供試した両種のタイプ由来株と全ての分離菌株が, Eurotiales 目 Trichocomaceae 科の *Rasamsonia* 属に分類されることが明らかになった.

本報では, 小麦粉を原料として加熱加工されている食品の事故原因となったカビ分離株の菌学的研究を進めるために, 耐熱性菌として記載されていた *P. oblatum* と *P. sabulosum* について改めて分類学的位置を明確にする知見を得たので報告することにした.

## 材料および方法

### 供試菌株

*Penicillium oblatum* (IMI 288719, NBRC 33091) および *P. sabulosum* (ATCC 56984) のタイプ由来株を reference strain として, それぞれ CABI UK Center, Egham, UK (IMI), (独) 製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター, 千葉県木更津市 (NBRC), American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA (ATCC) から入手して供試した. 一方, ゆで麺・パスタ分離株については, 国内で2001–2008年に変敗した製品から分離した6菌株 (JFRL 038.02, 039.02, 004.11, 005.11, 009.11, 011.11) を系統解析に使用した (Table 1).

### 形態観察

Czapek 酵母エキス寒天培地 (CYA), 麦芽エキス寒天培地 (MEA, Oxoid 製), オートミール寒天培地 (OA), 5% NaCl 添加 Czapek 酵母エキス寒天培地 (CYAS), 酵母エキス寒天培地 (YES), ジクロラン18%グリセロール寒天培地 (DG18) の平板培地を用い, 供試菌株を接種後, 25 および 37°C, 7日間培養し, コロニーの直径を測定するとともに形態を記載した. コロニーの色調は Kornerup and Wanscher (1978) により示した. 以上の培地処方 は Samson et al. (2019) の方法に従った. さらに MEA を用いて, 20, 25, 28, 30, 33, 35, 37, 40, 42, 45, 47°C で7日間培養後のコロニー直径を測定した.

光学顕微鏡による形態観察に基づく記載には, MEA のほか, Pitt and Hocking (2009) に記載されている麦芽エキス寒天培地 (MEA) を用いて, 25°C, 7–14日間培

養後のコロニーについて行った.

### 遺伝子解析

供試菌株をポテトデキストロース寒天培地 (PDA) で 25°C, 7–14日間培養した後, 得られた菌体について PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (ライフテックノロジーズジャパン株式会社, 東京) で DNA の抽出を行った. rRNA 遺伝子 (rDNA) ITS 領域の PCR 増幅には, ITS1 および ITS4 (White et al. 1990), *BenA* には Bt2a および Bt2b (Glass and Donaldson 1995), *CaM* には CL1 および CL2A (O'Donnell et al. 2000), または cmd5 および cmd6 (Hong et al. 2005) の各プライマーを使用した. 得られた PCR 産物は, BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (ライフテックノロジーズジャパン株式会社, 東京) を用いてシーケンス反応を行い, ABI Prism 310 genetic analyzer (ライフテックノロジーズジャパン株式会社, 東京) を使用して塩基配列を決定した. シーケンス反応には上記の PCR 増幅で使用したプライマーを用いた. 得られた配列は, ATGC (GENETYX, 東京) でアセンブルした後, DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録した. 系統解析には MEGA X (Kumar et al. 2018) を用いた. Clustal W を用いてアライメントを行い, 最尤法により系統樹を作成した. それぞれブートストラップ検定は 1000 回行った. *Rasamsonia* 属の菌種については GenBank に登録されている菌株の塩基配列を利用した (Table 1).

## 結 果

*Penicillium oblatum* (IMI 288719, NBRC 33091), *P. sabulosum* (ATCC 56984) および変敗ゆで麺・パスタから分離した6菌株の得られた塩基配列を NCBI BLAST database を使用して BLASTn で検索した結果, 全ての配列が *Rasamsonia* 属の菌種に最も近縁であった. また, *Rasamsonia* 属菌種のタイプ由来株との相同性は ITS で 94–96%, *BenA* で 88–92% であり, 系統樹では既知の *Rasamsonia* 菌種とは異なる系統であった (Fig. 1).

*Penicillium oblatum* のタイプ由来株である IMI 288719 と NBRC 33091 の塩基配列は全て一致した. *Penicillium sabulosum* ATCC 56984 は NBRC 33092 と同じ来歴であり, ATCC 56984 の ITS 領域の配列は NBRC のホームページ (<https://www.nite.go.jp/nbrc/>) で公開されている NBRC 33092 の配列と一致した.

MEGA X のモデルテストによる最適モデルでは, ITS で Tamura 3-parameter model (+G+I), *BenA* で Kimura 2-parameter model (+G), *CaM* で Kimura 2-param-

Table 1. *Rasamsonia* strains used in this study.

Name	Strain no. <sup>a)</sup>	GenBank accession numbers <sup>b)</sup>		
		ITS	<i>BenA</i>	<i>CaM</i>
<i>R. aegroticola</i>	DTO 137A8 <sup>T</sup>	JX272988	JX273020	JX272956
<i>R. aegroticola</i>	DTO 137B7	JX272980	JX273012	JX272948
<i>R. argillacea</i>	CBS 101.69 <sup>T</sup>	JF417491	JF417456	JF417501
<i>R. argillacea</i>	CBS 907.70	JF417474	JF417458	JF417503
<i>R. brevistipitata</i>	CBS 128785 <sup>T</sup>	JF417488	JF417454	JF417499
<i>R. brevistipitata</i>	CBS 128786	JF417489	JF417455	JF417500
<i>R. byssochlamydoides</i>	CBS 413.71 <sup>T</sup>	JF417476	JF417460	JF417512
<i>R. byssochlamydoides</i>	CBS 533.71	JF417477	JF417461	JF417513
<i>R. columbiensis</i>	CCF 5289 <sup>T</sup>	LT548281	LT548285	
<i>R. composticola</i>	CGMCC 3.13669 <sup>T</sup>	JF970184	JF970183	JQ729688
<i>R. composticola</i>	CGMCC 3.14946	QJ178360	JQ060951	JQ729689
<i>R. cylindrospora</i>	CBS 275.58 <sup>T</sup>	JF417470	JF417448	JF417493
<i>R. cylindrospora</i>	CBS 432.62	JF417471	JF417449	JF417492
<i>R. eburnea</i>	CBS 100538 <sup>T</sup>	JF417483	JF417462	JF417494
<i>R. eburnea</i>	CBS 124447	JF417473	JF417452	JF417497
<i>R. emersonii</i>	CBS 393.64 <sup>T</sup>	JF417478	JF417463	JF417510
<i>R. emersonii</i>	CBS 397.64	JF417480	JF417466	JF417509
<i>R. piperina</i>	CBS 408.73 <sup>T</sup>	JX272968	JX273000	JX272936
<i>R. piperina</i>	CBS 104.69	JX272994	JX273026	JX272962
<i>R. pulvericola</i>	DAOM 242435 <sup>T</sup>	KF242514	KF242520	KF242522
<i>R. pulvericola</i>	DAOM 242436	KF242515	KF242521	KF242523
<i>Penicillium oblatum</i>	IMI 288719 <sup>T</sup>	<b>LC546718</b>	<b>LC546729</b>	<b>LC546740</b>
<i>Penicillium oblatum</i>	NBRC 33091 <sup>T</sup>	<b>LC546717</b>	<b>LC546728</b>	<b>LC546739</b>
<i>Penicillium sabulosum</i>	ATCC 56984 <sup>T</sup>	<b>LC546720</b>	<b>LC546726</b>	<b>LC546742</b>
<i>Rasamsonia</i> sp.	JFRL 038.02	<b>LC546721</b>	<b>LC546730</b>	<b>LC546735</b>
<i>Rasamsonia</i> sp.	JFRL 039.02	<b>LC546722</b>	<b>LC546731</b>	<b>LC546736</b>
<i>Rasamsonia</i> sp.	JFRL 004.11	<b>LC546719</b>	<b>LC546727</b>	<b>LC546741</b>
<i>Rasamsonia</i> sp.	JFRL 005.11	<b>LC546724</b>	<b>LC546733</b>	<b>LC546737</b>
<i>Rasamsonia</i> sp.	JFRL 009.11	<b>LC546723</b>	<b>LC546732</b>	<b>LC546743</b>
<i>Rasamsonia</i> sp.	JFRL 011.11	<b>LC546725</b>	<b>LC546734</b>	<b>LC546738</b>
<i>Trichocoma paradoxa</i>	CBS 103.73	JF417486	JF417469	JF417506

a) T: Ex-type strain.

b) **Bold**: Newly obtained sequences in this study.

ter model (+G+I), ITS+*BenA* で Kimura 2-parameter model (+G) がそれぞれ選択された (Kimura 1980; Tamura 1992).

#### 種の記載

*Rasamsonia oblata* (Pitt & Hocking) Yanai & Udagawa, comb. nov. MycoBank: MB 836491

(Fig. 2)

Synonym: *Penicillium oblatum* Pitt & Hocking, Mycologia 77: 819 (1985).

Type: Australia: Herb. FRR 2234 ex spoiled baby food, a fruit-based gel, vacuum packed in small jars and pasteurized after sealing, Sydney, 1979, A.D.Hocking -holotype;

IMI 288719 = NBRC 33091- ex-type cultures.

rDNA ITS barcode = LC546717, LC546718. Alternative identification markers: *BenA* = LC546728, LC546729, *CaM* = LC546739, LC546740.

コロニー直径, 25℃, 7日間 (mm): CYA: 2, MEA: 27-29, OA: 12, CYAS: 0, YES: 6-7, DG18: 14; 37℃, 7日間 (mm): CYA: 3, MEA: 18, OA: 7, CYAS: 0, YES: 9-9.5, DG18: 24-24.5.

コロニー直径, MEA, 7日間 (mm): 20℃: 14-15, 25℃: 27-29, 28℃: 34, 30℃: 37 (最適), 33℃: 30-31, 35℃: 24, 37℃: 18, 40℃: 6-7, 42℃: <1, 45℃: 0.

コロニーの特徴: CYA, 25℃, 7日間後の直径は2-6

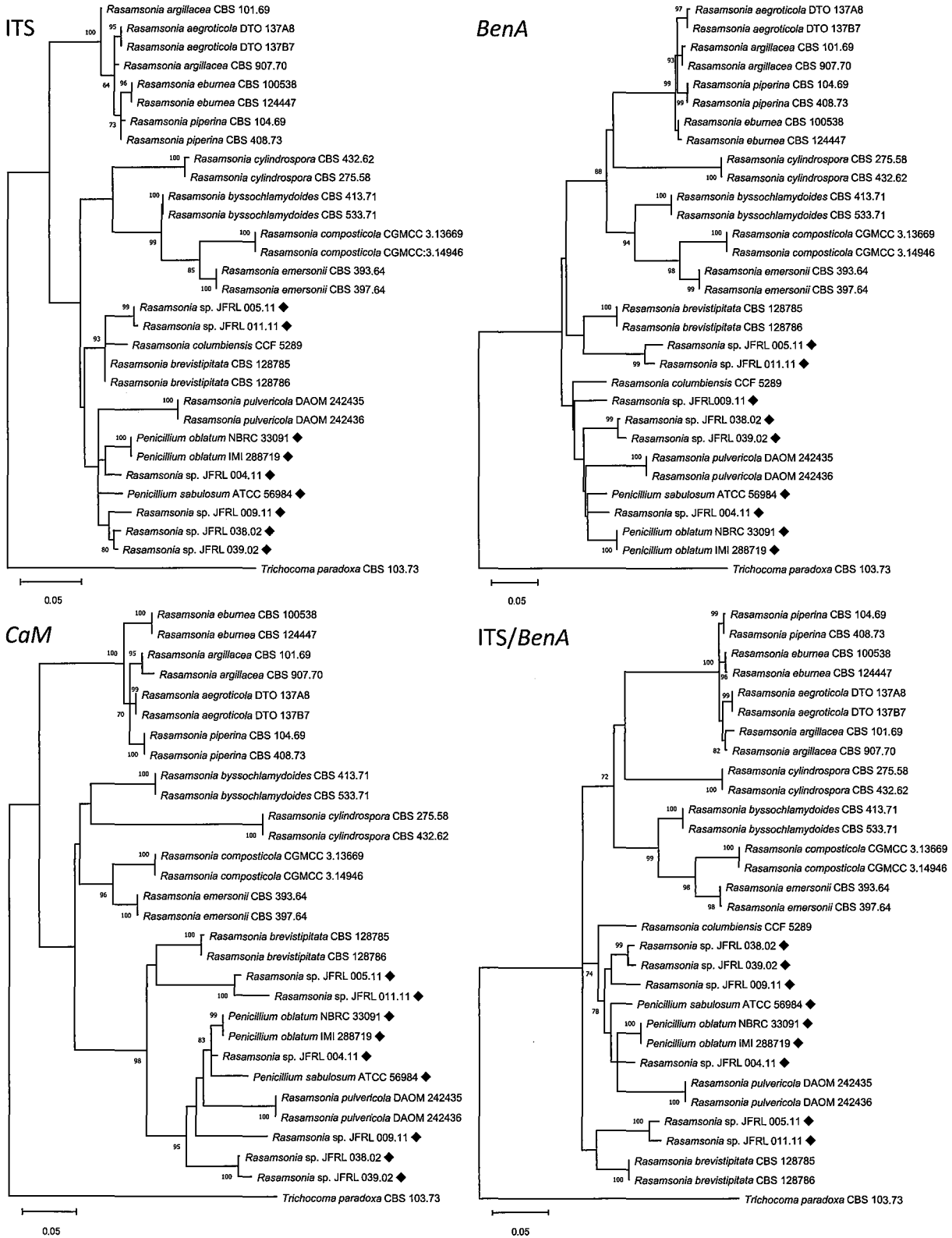


Fig. 1. Phylogenetic tree showing relationships among *Rasamsonia* species using ITS, partial  $\beta$ -tubulin (*BenA*), partial calmodulin (*CaM*), and combined dataset of ITS and partial  $\beta$ -tubulin (ITS/*BenA*) sequences, respectively. Bootstrap values >70% are indicated at each branch. Sequence data newly obtained in this study are indicated with square (◆).

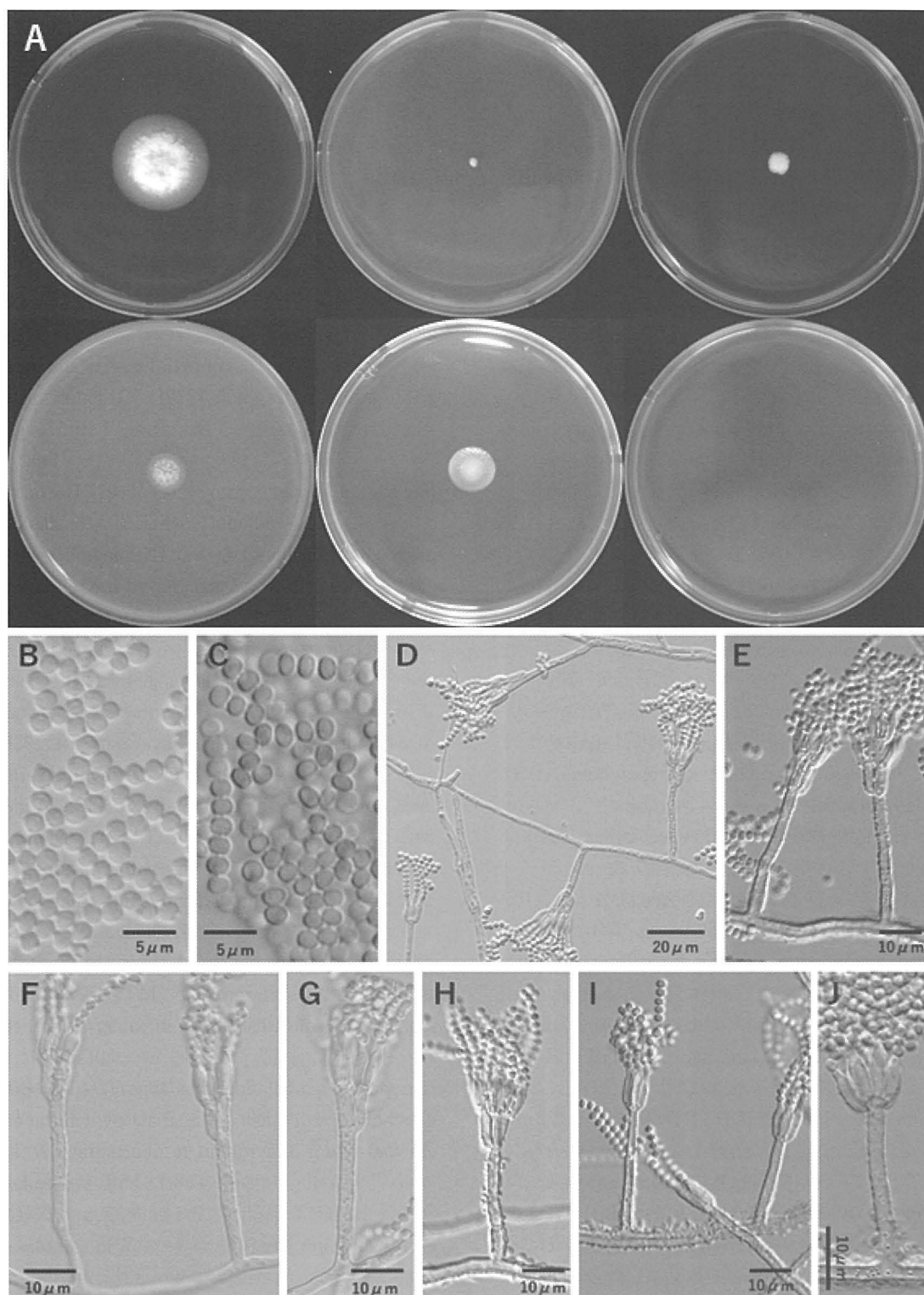


Fig. 2. *Rasamsonia oblatum* (IMI 288719).

A: Colonies at 25°C. 7d. (top row, left to right: MEA, CYA, YES; bottom row, left to right: OA, DG18, CYAS). B, C: Conidia. D–J Conidiophores.

mm, 薄く平坦な白色の菌糸層となる。裏面は淡色。MEA, 25°C, 7日間後の直径は20–30 mm, 平坦, 厚く, 著しい縄状; 周辺部は薄く, 切れ込みがない; 菌糸は白色; 分生子形成は中心部で疎ら~中程度, 暗ブロンズ色(5D4); 水滴および溶出色素はない; 裏面は淡色~淡褐色。

形態的特徴 (MEA): 分生子柄は気生菌糸または縄状菌糸から直生し, 15–40 (–70) × 2.5–3.5 (–4) μm, 先端は膨らまず, 微細または著しい粗壁, 無色, 単輪生のペニシリを生じ, ときに先端近くにメトレがみられ, 1回分岐する; フィアライドは2–6本が密着して輪生, 矛先形, (8–) 10–12 (–15) × 2–3 μm, 滑壁~微粗壁, 先端は短くまたは中程度のカラーになる。分生子は淡色, 球形~円盤型球形, 2–2.5 × 2.5–3 μm, 滑壁, 短く円筒状の連鎖になり, 水マウントではときに粘着し, しばしば極めて細いが明瞭な分離部がみられる。

供試菌株: IMI 288719 は千葉大学真菌医学研究センターに IFM 66412 として寄託されている。

*Rasamsonia sabulosa* (Pitt & Hocking) Yanai & Udagawa, comb. nov. MycoBank: MB 836492

(Fig. 3)

Synonym: *Penicillium sabulosum* Pitt & Hocking, Mycologia 77: 818 (1985).

Type: Australia: Herb. FRR 2743 ex spoiled pasteurized fruit juice, Sydney, 1984, A.D.Hocking -holotype; ATCC 56984 -ex-type culture.

rDNA ITS barcode=LC546720. Alternative identification markers: *BenA*=LC546726, *CaM*=LC546742.

コロニー直径, 25°C, 7日間 (mm): CYA: 1–2, MEA: 8.5–10, OA: 4.5–5, CYAS: 0, YES: 3.5–4, DG 18: 4.5; 37°C, 7日間 (mm): CYA: 2, MEA: 6–7, OA: 4, CYAS: 0, YES: 5.5–6, DG18: 8.

コロニー直径, MEA, 7日間 (mm): 20°C: 4–5, 25°C: 8.5–10, 28°C: 11, 30°C: 12 (最適), 33°C: 11.5–12 (最適), 35°C: 9–9.5, 37°C: 6–7, 40°C: 0.

コロニーの特徴: CYA, 25°C, 7日間後の直径は2–6 mm, 薄く, 緻密な白色の菌糸層となる。裏面は淡色。MEA, 25°C, 7日間後の直径は12–16 mm, 平坦, 緻密な菌糸層の上に小型で明瞭な縄状菌糸が覆う; 周辺部は薄く, 切れ込みがない; 菌糸は白色; 分生子形成は縄状菌糸中で中程度, 低い菌糸層に多くみられ, 暗ブロンズ色(5D4); 溶出液はわずか, ときに生じ, 無色~淡黄色; 溶出色素はない; 裏面は淡色~鈍緑色(29C–D3に近い)。

形態的特徴 (MEA): 分生子柄は表面の菌糸層, 気生菌

糸, 縄状の菌糸から生じ, 縄状菌糸から形成される場合は長さが一定しないが, 菌糸の短い側枝では長さ3–50 μm, 幅(2–) 2.5–3.5 μm, 無色, 壁は先端部分付近が微細から著しい粗面, 下部に向かい著しくなり, 粒状にみえる; ペニシリは多様で簡単な単輪生, ときに膨らみがあり, 複輪生, 不規則なものから完全なものまで, ときに通常の先端型輪生から準先端生のフィアライド形成までである; メトレは長さが不規則で8–20 (–30) × 3 μm, ときに6 μmまで膨らみ, 壁面はしばしば著しく粗面になる; フィアライドは通常アンブル形, ときに矛先形に近くなり, 8–10 (–20) × 2–2.5 μm, 滑壁~微粗壁, 短く, 幅広いカラーになる。分生子は淡色, 球形~亜球形, 直径2–2.5 μm, 滑壁, 乱れた連鎖になる。供試菌株: ATCC 56984 は千葉大学真菌医学研究センターに IFM 66413 として寄託されている。

## 考 察

*Rasamsonia* Houbraken & Frisvad は, *R. argillacea* (Stolk et al.) Houbraken & Frisvad をタイプとして2011年に設立された子囊菌類の属で, 分子系統学的に *RPB2*, *Tsr1*, *Cct8* 遺伝子のシーケンスから *Trichocomma* 属 (マユハキタケ) との同系統であることが立証され, Eurotiales 目 Trichocomaceae 科に分類されている (Houbraken et al. 2011, 2012)。表現形質の特徴は, 好高温性 (最高発育温度 45°C 以上) または耐温性 (発育適温 33–36°C) の発育と *Geosmithia* 型アナモルフ (例外として *Paecilomyces* 型が1種ある) の形成で, しばしば著しく粗面の分生子柄とオリーブ褐色で楕円形, 卵形または円筒形の分生子などが挙げられている。テレオモルフが形成される場合は, 淡黄色, オレンジ褐色から赤褐色, *Talaromyces* 属のように緩くネット状になった黄色菌糸に覆われた子嚢果 (閉子嚢殻) を生じ, 明瞭な殻壁がなく, 子嚢胞子は滑壁, 球形, 亜球形または楕円形になる。設立のときは, *Talaromyces* 属からテレオモルフを形成する3種 (*T. byssochlamydoides*, *T. eburneus*, *T. emersonii*) が, アナモルフのみ形成する種として新種 *R. brevistipitata* と *Geosmithia* 属 (Pitt 1979) から *G. argillacea* と *G. cylindrospora* の2種がそれぞれ編入され, 合計6種が記載された。因みに, 著者らの試験では, *R. oblata* の発育最適温度は30°C, 最高発育温度は42°C, *R. sabulosa* の発育最適温度は30–33°C, 最高発育温度は37°Cとなっている。また両種とも *Geosmithia* 型の分生子形成構造で, 分生子柄は明瞭な粗面, 分生子は褐色 (コロニーでみるとブロンズ褐色) である。

Houbraken et al. (2012) は新属の提案に当たり, Pitt

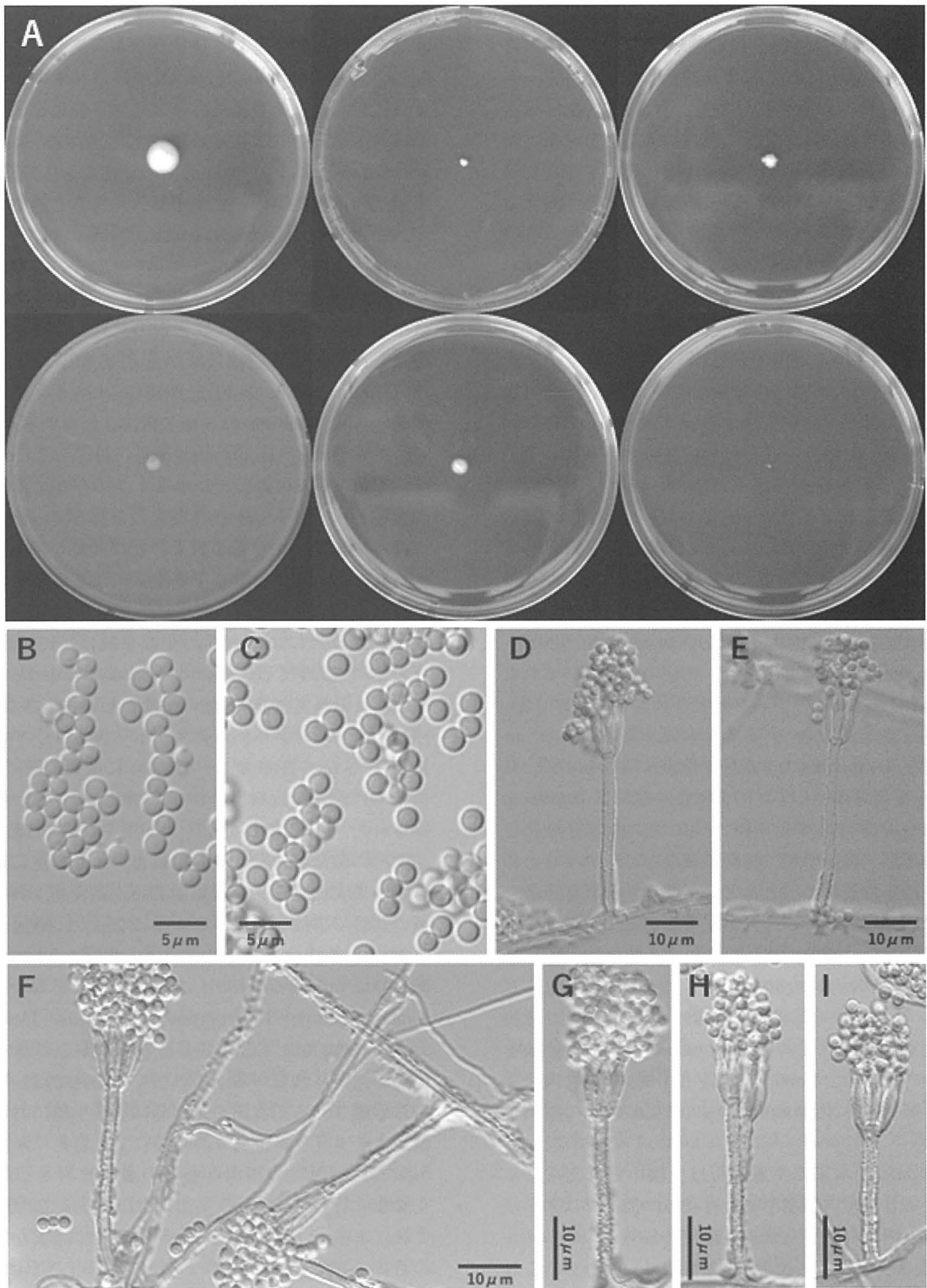


Fig. 3. *Rasamsonia sabulosa* (ATCC 56984).

A: Colonies at 25°C. 7d (top row, left to right: MEA, CYA, YES; bottom row, left to right: OA, DG18, CYAS). B, C: Conidia. D – I: Conidiophores.

が設けた *Geosmithia* 属を継承しなかった理由として、タイプに指定した *G. lavendula* (Raper & Fennell) Pitt を含め *Geosmithia* の菌種について系統分類学的に調べた結果、Hypocreales 目に分類される菌種と Eurotiales 目に残される菌種に分割されたこと、および Hypocreales 目とされた菌種は樹皮下にある昆虫の孔道より分離される生態的特徴を有するものがあるなどの違いを挙げている。また、テレオモルフは *Talaromyces* 属と考えられるが、2012年に改正された国際藻類・菌類・植物命名規約（メルボルン規約）において実施された一菌種一学名に従ったテレオモルフに基づく学名付与の措置がなされなかったようである。

その後、2012年に中国で堆肥から分離されたテレオモルフ形成種として *R. composticola* (Su and Cai 2012) が、2013年にはタイの室内塵から *R. pulvericola* (Tanney and Seifert 2013) が、それぞれ報告された。本属の特徴とされる発育温度をみると、*R. pulvericola* は例外的に中温性で、最適発育温度が30℃、最高発育温度が35℃となっている。また、*Rasamsonia* 属は病原真菌としての重要性も報告されている。症例報告の最初は2009年の Romanelli によるもので、次いで De Ravin et al. (2011), Machouart et al. (2011), Doyon et al. (2013), Giraud et al. (2013) などがあり、初期の報告はいずれも *Geosmithia argillacea* の学名で発表されていた。2013年、Houbraken et al. は、アナモルフのみを形成する *R. aegroticola* と *R. piperina* の2新種を記載するとともに、*R. argillacea* 種複合体としてこの2種ならびに *R. argillacea* と *R. eburnea* を合わせた4種について、臨床分離株を材料に表現型、遺伝子型、抗菌試験などについてまとめていた。臨床分離株のほとんどは、嚢胞性線維症患者、慢性肉芽腫症患者、移植片対宿主疾患患者の材料から検出されている。Hong et al. (2017) は、肺移植後の感染として *Aspergillus fumigatus* とともに新興病原真菌 *R. argillacea* 種複合体の重要性を強調するとともに、嚢胞性線維症患者での致死的な *Rasamsonia* の播種性感染を報告した。同様に、Babiker et al. (2019) も慢性肉芽腫症患者の肺に伴う *Rasamsonia* sp. (未記載種) の症例を報告した。

*Rasamsonia* の本来の生息場所は土壤中と考えられるが、ときとして室内環境中にも存在し、最近ではアメリカでホテル内の会議室空気から新種として *R. columbiensis* が記載されている (Jurjević et al. 2016)。一方、これまでの11種の中で食品からの分離例を調査したところ、日本以外ではほとんど見当たらなかった。日本では、2005年に *R. eburnea* が70℃、20分間加熱処理したパイナップル果汁から変敗原因として分離・報告された事例

(Yaguchi et al. 2005) のほか、レモンティー缶詰、ゼンマイの水煮からも分離されている (宇田川, 2010)。また、食品汚染への関連として、ブラジルの果樹園土壌からも記録されている (未報告)。これらの *R. eburnea* 分離株では、いずれもテレオモルフとして子嚢果と子嚢胞子の形成が認められている。耐熱性試験の結果から、*R. eburnea* の胞子は95℃、1分間の加熱でも生残したので、事故原因は食品への子嚢胞子混入にあると推定されている。また、*R. byssochlamydoides* が冷凍イチゴ・ブルーベリー果実加工品から検出され、子嚢胞子の耐熱性についてブドウ果汁中で  $D_{86^{\circ}\text{C}} = 6.1 - 9.5$  分と計測されている (上田 2014)。アナモルフのみの記録では、オランダで輸入した加熱処理濃縮果汁から *R. argillacea* の分離が1株 (Houbraken et al. 2012, 2016)、スペイン産コショウ種子から *R. piperina* の3株が報告されている (Houbraken et al. 2013)、Houbraken et al. (2014) は、*R. argillacea* について潜在的にテレオモルフの存在を推測し、この菌種がヘテロタリックな交配系を持っているか、もしくはホモタリックでも子嚢果形成に当たり特別な条件があるのか、いずれにせよ子嚢胞子による耐熱性の発現を示唆している。

耐熱性カビによる食品の変敗事故は、1930年代にイギリスで初めて *Byssochlamys fulva* (= *Paecilomyces fulvus*) による果実缶詰・瓶詰の事故として報告されて以来、EU諸国、アメリカ、カナダ、オーストラリアと世界中に広まった。日本でも、1997年に酸性飲料 (レモンティー) から変敗原因として *B. fulva* の分離が初めて記録された。2000年になり、レトルト食品やPETボトル詰飲料の開発と普及に伴って被害対象も急速に拡大し、野菜・果実加工食品、穀類加工品、乳製品、調味料、各種の飲料で事故が発生するようになった。原因となったカビにも多様化がみられ、*Aspergillus* (テレオモルフ: *Neosartorya*, *Emericella*), *Penicillium* (テレオモルフ: *Eupenicillium*), *Talaromyces*, *Monascus*, *Hamigera*, *Thermoascus* など Eurotiales 目の属を中心に多くの子嚢菌類が同定されている。これまでの知見では、事故検体から分離される子嚢菌の大部分は有性生殖における交配型がホモタリックであり、培養により容易に子嚢胞子を形成し、耐熱性の指標となるD値およびz値の計測も支障なく行われていた (宇田川 2010, 上田 2010)。また、これによって、事故原因の究明と併せて確実な加熱殺菌の目標を把握することができた。しかし、*Paecilomyces variotii* の場合は、日本でも果実・野菜ジュース、ウーロン茶、ブルーベリー、ゼリー、ジャムなどの加工品から度々検出されたが、その耐熱性については十分なデータを示すことが出来ないままであった。Houbraken et

al. (2006, 2008) は、オランダとアメリカで得た変敗果実飲料、紅茶飲料、スポーツドリンク、飲料原料のパケチン、スクロースなどから分離した *P. variotii* 12 株と加熱殺菌された果実飲料から分離し *Talaromyces spectabilis* として報告されたタイプ由来株の遺伝子型が同一であることから、これらの菌株の交配型遺伝子の解明を目的に交配試験を行った。その結果、MAT1-1 と MAT1-2 の交配遺伝子を持つ菌株間の組み合わせで子嚢果形成が観察され、*P. variotii* の場合はヘッテロタリックな *Byssochlamys* の種であり、その耐熱性は子嚢胞子によることを明らかにした。本報で対象とした *R. oblata*, *R. sabulosa* ならびに加熱加工されたゆで麺・パスタなどの分離菌株についても、*P. variotii* と同様にヘテロタリズムの存在が推察される。

*Rasamsonia* 属は、*Aspergillus*, *Penicillium* など *Aspergillaceae* 科とは離れた単系統群として、分子系統学的位置づけが報告された (Houbraken et al. 2011, 2012)。2011 年の新属設立以後、新種の発見に併せて、ITS, *BenA*, *CaM* の塩基配列データに基づく分子系統解析から、その都度系統樹が示されてきた。その中で、医学研究領域では、病原真菌として特に重要な菌種をまとめて *R. argillacea* 種複合体に一括し他の菌種から区別する見解を示した Houbraken et al. (2013) の報告が広く支持されてきた。一方、Tanney and Seifert (2013) は、*R. pulvericola* の報告において、本属の系統関係を A (*R. argillacea* 種複合体), B (*R. byssochlamydoides*, *R. compositicola*, *R. cylindrospora*, *R. emersonii*), C (*R. brevistipitata*, *R. pulvericola*) の 3 系統群に分類している。2019 年に報告された Babiker et al. の最新の分子系統樹では、*R. argillacea* 種複合体に関してこれまでの 4 種に *Rasamsonia* sp. (未記載種) を加えた 5 種にまとめている。

*Rasamsonia oblata*, *R. sabulosa*, *Rasamsonia* spp. を加えた本報の結果では、Fig. 1 の ITS/*BenA* 系統樹に示すように *R. oblata*, *R. sabulosa*, *Rasamsonia* spp. (JFRL 038.02, 039.02, 004.11, 009.11) は *R. columbiensis* に近縁で、*R. pulvericola* を含む系統群を構成した。また、*Rasamsonia* spp. (JFRL 005.11, 011.11) は *R. brevistipitata* に近縁であり、一つの系統群を構成した。

本研究では *R. oblata*, *R. sabulosa* と小麦粉を主原材料として加熱加工されているゆで麺・パスタの変敗原因カビについて系統分類などの菌学的知見が得られた。これらの菌類については、自然界での分布や生態について未だ十分な情報もなく解明すべき課題は多いが、変敗の原因究明を実証する研究を今後も進めていきたい。

## 摘 要

加熱加工食品の耐熱性カビによる変敗が増加する中で、カビの発生した国産麺類・パスタ製品から度々 *Penicillium* 様の菌が検出された。形態を精査したところ、オーストラリアで加熱加工品から報告されている耐熱性菌 *P. oblatum*, *P. sabulosum* に形態が類似していた。そこで麺類・パスタ事故品から分離した 6 菌株と上記の 2 種のタイプ由来株を菌学的に比較するため、rDNA ITS,  $\beta$ -tubulin, calmodulin 遺伝子の部分塩基配列の系統解析を行い、形態と併せ遺伝子型を検討した結果、分離菌株とこの 2 種は Eurotiales 目 *Rasamsonia* 属に分類されることが判明した。よって本報では、新組み合わせとして *Rasamsonia oblata* (Pitt & Hocking) Yanai & Udagawa, *R. sabulosa* (Pitt & Hocking) Yanai & Udagawa を提案した。

## 引用文献

- Babiker A, Gupta N, Connie FC, Gibas CFC, Wiederhold NP, Sanders C et al. (2019) *Rasamsonia* sp.: An emerging infection amongst chronic granulomatous disease patients. A case of disseminated infection by a putatively novel *Rasamsonia argillacea* species complex involving the heart. *Med Mycol Case Rep* 24: 54–57
- De Ravin SS, Challipalli M, Anderson V, Shea YR, Marciano B, Hilligoss D et al. (2011) *Geosmithia argillacea*: an emerging cause of invasive mycosis in human chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* 52: e136–e143
- Doyon JB, Sutton DA, Theodore P, Dhillon G, Jones KD, Thompson EH et al. (2013) *Rasamsonia argillacea* pulmonary and aortic graft infection in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol* 51: 719–722
- Frac M, Jezierska-Tys S, Yaguchi T (2015) Occurrence, detection, and molecular and metabolic characterization of heat-resistant fungi in soils and plants and their risk to human health. *Advances in Agronomy* 132: 161–204
- Giraud S, Favennec L, Bougnoux ME, Bouchara JP (2013) *Rasamsonia argillacea* species complex: taxonomy, pathogenesis and clinical relevance. *Future Microbiol* 8: 967–978
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl*

- Environ Microbiol 61: 1323 – 1330
- Hong G, White M, Lechtzin N, West NE, Avery R, Miller H et al. (2017) Fatal disseminated *Rasamsonia* infection in cystic fibrosis post-lung transplantation. J Cyst Fibros 16: e3 – e7
- Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA (2005) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. Mycologia 97: 1316 – 1329
- Houbraken J, Samson RA, Frisvad JC (2006) *Byssochlamys*: Significance of heat resistance and mycotoxin production. In: Hocking AD, Pitt JI, Samson RA, Thrane U (eds) Advances in food mycology. Springer, New York, pp 211 – 224
- Houbraken J, Varga J, Rico-Munoz E, Johnson S, Samson RA (2008) Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssochlamys spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotii*). Appl Environ Microbiol 74: 1613 – 1619
- Houbraken J, Samson RA (2011) Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. Stud Mycol 70: 1 – 51
- Houbraken J, Spierenburg H, Frisvad JC (2012) *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. Antonie van Leeuwenhoek 101: 403 – 421
- Houbraken J, Giraud S, Meijer M, Bertout S, Frisvad JC, Meis JF et al. (2013) Taxonomy and antifungal susceptibility of clinically important *Rasamsonia* species. J Clin Microbiol 51: 22 – 30
- Houbraken J, de Vries RP, Samson RA (2014) Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Adv Appl Microbiol 86: 199 – 249
- Houbraken J, Samson RA, Yilmaz N (2016) Taxonomy of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* and its significance for biotechnology. In: de Vries RP, Gelber IB, Andersen MR (eds) *Aspergillus* and *Penicillium* in the post-genomic era. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp 1 – 15
- Jurjević Z, Hubka V, Peterson SW (2016) *Rasamsonia columbiensis* Jurjević, Hubka & S.W. Peterson, sp. nov. Fungal Planet 443: 404 – 405
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16: 111 – 120
- Kornerup A, Wanscher, JH (1978) Methuen handbook of colour, 3rd edn Eyre Methuen, London
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35: 1547 – 1549
- Machouart M, Garcia-Hermoso D, Rivier A, Hassouni N, Catherinot E, Salmon A et al. (2011) Emergence of disseminated infections due to *Geosmithia argillacea* in patients with chronic granulomatous disease receiving long-term azole antifungal prophylaxis. J Clin Microbiol 49: 1681 – 1683
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E (2000) A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. Mycoscience 41: 61 – 78
- Pitt JI (1979) *Geosmithia*, gen. nov. for *Penicillium lavendulum* and related species. Can J Bot 57: 2021 – 2030
- Pitt JI, Hocking AD (1985) Interfaces among genera related to *Aspergillus* and *Penicillium*. Mycologia 77: 810 – 824
- Pitt JI, Hocking AD (2009) Fungi and food spoilage, 3rd edn Springer, Dordrecht, The Netherlands
- Romanelli AMWB (2009) Disseminated *Geosmithia argillacea* infection in a German shepherd dog. Med Mycol 47: 221 – 226
- Samson RA, Yilmaz N, Houbraken J, Spierenburg H, Seifert KA, Peterson SW et al. (2011) Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. Stud Mycol 70: 159 – 183
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B (2019) Food and indoor fungi, 2nd edn Westerdijk laboratory manual series 2, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands
- Scholte RPM, Samson RA, Dijksterhuis J (2004) Spoilage fungi in the industrial processing of food. In: Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC (eds) Introduction to food- and airborne fungi, 7th edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, pp 339 – 356
- Su Y-Y, Cai L (2012) *Rasamsonia composticola*, a new thermophilic species isolated from compost in Yunnan, China. Mycol Progress 12: 213 – 221
- Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-trans-

- version and G+C-content biases. *Mol Bio Evol* 9: 678–687
- Tanney JB, Seifert KA (2013) *Rasamsonia pulvericola* sp. nov., isolated from house dust. *IMA Fungus* 4: 205–212
- Tournas V (1994) Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. *Crit Rev Microbiol* 20: 243–263
- 宇田川俊一・矢口貴志 (2001) 耐熱性子囊菌類の分類と同定. ソフト・ドリンク技術資料 No 135: 295–323
- 宇田川俊一 (2010) 食品・飲料産業における耐熱性カビの汚染. ソフト・ドリンク技術資料 No 161: 35–48
- 上田成一 (2010) 環境真菌, 耐熱性カビの分離と制御. *日食微誌* 27:137–140
- 上田成一 (2014) 高温菌 *Rasamsonia byssochlamydoides*, *Talaromyces leycettanus* および耐温菌 *T. bacillisporus* の耐熱性. *日本菌学会第58回講演要旨集* p 24
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong S-B, Klaassen CHW, Perrone G, et al. (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol* 78: 343–371
- Visagie CM, Seifert KA, Houbraken J, Samson RA, Jacobs K (2016) A phylogenetic revision of *Penicillium* sect. *Exilicaulis*, including nine new species from fynbos in South Africa. *IMA Fungus* 7: 75–117
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315–322
- Yaguchi T, Udagawa S, Nishimura K (2005) *Geosmithia argillacea* is the anamorph of *Talaromyces eburneus* as a heat resistant fungus. *Cryptogam Mycol* 26: 133–141
- Yilmaz N, Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2014) Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Stud Mycol* 78: 175–341