

1 - 2 赤かび病マイコトキシンの検出技術及びリスク評価

神戸市環境保健研究所 食品化学部 田中敏嗣

神戸市環境保健研究所の田中です。こういう機会をいただき、関係者の皆様、ありがとうございます。私の話が皆さんにどれだけお役に立つかわからないのですが、私のやっている仕事の中身を紹介させていただきます。

私は今、地方衛生研究所の中で、食品衛生法にかかわる仕事をしています。厚生労働省が毎年、農薬の基準を作っていますので、その分析法（告示法）開発、作成のお手伝いをしています。農水省についても少し関係して、私の卒論は、昔の食糧研究所（現在の食品総合研究所）の角田先生の下で、北海道の静内地方の馬の変死事件（赤かび中毒）で、その豆殻に付着していた化学物質の分析をやりました。それはT-2トキシン、いまだに高い生産能力を持つ菌株をそこから見つけ出して、それが原因ではないかというのが卒論のテーマでした。十数年前には、JICAのプロジェクトで、タイのトウモロコシ品質向上計画で少しお手伝いをさせていただき、そこで行った先のリーダーが育種の植田先生でした。そういうことで、何らかのかたちで農水関係でもご協力ができたらと思ひまして、来させていただきました。

私の分野につきましては、先程、補佐が言われましたように、簡便な分析法、確実にシンプルな分析法をいかに開発していくかということに、仕事の中身があるかと思ひます。実は昨年も、アフラトキシン分析法の改正に携わりました。そこでのシンプルな精製法として、多機能カラム（Multi functional Column）を用いたクリーンアップで分析する方法に変わりました。今回も暫定基準に合わせて、分析方法を暫定的に提示しているわけですが、そこでも多機能カラムを使っています。ただ、これはローマ社1社が発売しているカラムで、かなり高いカラムです。それを昭和電工と協力して、それに匹敵するカラムを今開発しています。アフラトキシン分析用については現在、少し廉価版で発売しています。デオキシニバレノール分析のカラムについてもほぼ試作が終わり、今はそのバリデーションを行う段階に入っています。近い将来ご提供できる可能性があると思ひます。では今日のテーマについて説明させていただきます。

1. マイコトキシンの暫定基準値の設定

先程、課長補佐がご説明になられたとおり、暫定基準1.1ppmがどう決められたかということで、図1を用意させていただきました。これは、マウスの2年間の慢性毒性試験から出てきたNOAEL 0.1mg/kg bw/dayの量に安全率100分の1を掛けて最大一日耐用摂取量を1 μ g/kg bw/dayに決めたということです。日本人の国民摂取調査からの小麦の摂取量が、1日89.8g、さらに小麦粉等の加工工程での減衰率の50%を掛け、最終的に1.110ppmという数字になり、暫定的な基準値1.1が決められた経過になります。

上の3つの値（NOAEL, PMTDI, Daily Intake of Wheat）は、たくさん小麦を食べられない方においては変動してくる値ですが、減衰率はもう少し検討していく必要があり、50%という数字はこれからの研究でまた変わるファクターになると思ひます。

暫定基準値：1.1 mg/kg

NOAEL : 0.1 mg/kg/day
 PMTDI : 1 µg/kg/day
 Daily Intake of Wheat : 89.8 g/man/day
 Reduction rate in processing : 50%
 $50 \mu\text{g} \div 89.8 \text{ g} \div 50/100 = 1.1 \mu\text{g/g (mg/kg)}$

図1 暫定基準値の算定手順

表1は、テストミリング機で小麦粉にしたときのトキシンの消長を調べたものです。2kgの汚染小麦を使い、いろいろなフラクションで、デオキシニバレノール、ニバレノール、ゼアラレノンの3つのマイコトキシンがどのように減衰していくかを調べています。マイナスのところはそれだけ減っていったということで、ふすまの部分については、かえって濃縮されたかたちで増えてきます。どのレベルで食べるかということで、減衰率が変わってくるわけですが、これをもう少し今後も、実験を通じて確実なデータにしていこうという計画を持っています。

表1 汚染した小麦の製粉フラクションにおける Fusarium マイコトキシン濃度 (ng/g)
 Concentrations (ng/g) of Fusarium Mycotoxins in Naturally Contaminated Wheat and Milling Fractions

Sample No. of milling fractions	Weight (g)	Proportion to whole wheat (%)	Concentrations		
			DON	NIV	ZEN
1. Whole wheat	2000		168	510	8
2. 1st break flour	179.5	9.0	125 (- 26)*	138 (- 73)	0 (-100)
3. 2nd break flour	75.5	3.8	92 (- 45)	148 (- 71)	0 (-100)
4. 3rd break flour	36.7	1.8	79 (- 53)	155 (- 70)	1 (- 87)
5. Bran	235.1	11.8	457 (+272)	1567 (+307)	19 (+238)
6. 1st middling flour	349.2	17.5	108 (- 36)	129 (- 75)	0 (-100)
7. 2nd middling flour	134.4	6.7	114 (- 32)	160 (- 69)	0 (-100)
8. 3rd middling flour	81.2	4.1	115 (- 32)	157 (- 69)	1 (- 87)
9. Shorts	119.8	6.0	557 (+332)	1365 (+268)	23 (+288)

* % change due to milling (-, reduction; +, increase)

TANAKA, T et al. *J. Food Hyg. Soc. Japan* vol. 27 (1986)

表2に加工調理工程においてトキシン減衰をざっとまとめました。例えば小麦粉にした場合は、先程のデータから言いますと、デオキシニバレノールは残存率が63%、ニバレノールが29%、ふすまにはかえって増えますので288%。また、焼く程度ではあまり減らない。炊飯でも減らない。ここにはないのですが、うどんにしたときは、水の中へ移行していく可能性がありますので、もう少し減衰率が上がるのではないかと考えられます。そういう実験は今後、進める必要があるかと思えます。

表3は、各国でのデオキシニバレノールについての基準値はどうなっているか。今回は暫定ですが、日本においては小麦について1100ppbという数字が出ました。アメリカについてはプロダクトで1ppm、カナダについては玄麦で2ppmという数字です。オーストラリアはそれより厳しい値が出ています。暫定基準はアメリカに比べて少し厳しいし、カナダのレベルだときついし、オーストラリアに比

表2 マイコトキシンの加工工程及び調理における残存率

食 品	処理方法	食品を汚染した マイコトキシン	処理後の残存率 (%)
小麦の製粉	小麦粉	デオキシニバレノール	63
		ニバレノール	29
ケーキ	焼く	ふすま デオキシニバレノール	302
		ニバレノール	288
		デオキシニバレノール	100
そば	ゆでる	ニバレノール	100
		ゼアラレノン	97
		アフラトキシン B ₁	84
ポップコーン	炒める	デオキシニバレノール	79
ハトムギ	炊飯	ゼアラレノン	88
押し麦	炊飯	デオキシニバレノール	89

表3 各国のデオキシニバレノール基準値

Tolerances for Deoxynivalenol	
Commodity	Level (ng/g)
<u>Japan</u>	
Wheat	1100
<u>FDA (US)</u>	
Wheat products (flour, bran, germ etc.) for human	1000
Wheat and wheat products for feed ingredients (below 10% of swine and pet diets) (below 50% of ruminants and poultry diets)	4000
<u>Canada</u>	
Uncleaned soft wheat	2000
Swine diets	1000
cattle and poultry diets	5000
<u>Austria</u>	
Wheat, rye	500
Durum wheat	750
<u>JECFA (2001)</u>	
PMTDI	1 μg/kg/day
(provisional maximum tolerable daily intake)	

べると緩いというかたちになります。今後のリスク評価等の研究によって、食品衛生法第7条の規格・基準値として適切な数字が決められていくこととなります。

2. トリコテセン系マイコトキシンの分析法

今日の本題である分析法の紹介になりますが、この分析法については非常にステップが多くて、様々な工程を踏む必要があります。分析法の手順としては、抽出、精製、検出、そして検出限界をどこに持っていくかということと、確認をどのように行うか等があります(表4)。さらに、検討項目の中で

「ソルベント」と書いてあるのは、最近では有害なソルベントを使わないという制限があります。また、最近、特に問題になっているバリデーション、精度管理をきちんとやる必要がある。今回のデオキシニバレノールについていえば、検出レベルが 1ppm でいいのか。実態調査になる場合は、もう少し低いレベルまで測る必要がある。どのレベルまで測定するのかによって分析の方法が変わってきます。この流れの中で、デオキシニバレノールの分析が、従来のアフラトキシンなどに比べて非常に厄介な代物であることをご紹介させていただきます。

Problem on Mycotoxin Methodology in Foodstuffs

Method	Extraction Cleanup Detection and Limits Confirmation Solvents Validation
Regulation	Mycotoxins Level

一般的に汎用されている分析方法を表 4 に示しています。AOAC(Association of Official Agricultural Chemists) というのはアメリカの団体で、これは従来からよく使われる方法です。抽出はクロロホルムやエタノール、クリーンアップはシリカゲル、検出は GC - ECD で行う。デオキシニバレノールを GC で測定する場合は、トキシンを揮発性物質に誘導化して測定する必要があります。

図 2 トリコテセン系マイコトキシン分析の手順と問題点

検出限界が 350ppb レベルであるということです。私が 85 年に報告したものと、一昨年に報告した方法がここにあります。これらは旧来のフロリジルを使った方法です。今年 5 月に出した暫定法については、多機能カラムを使った方法です。測定は LC - UV です。

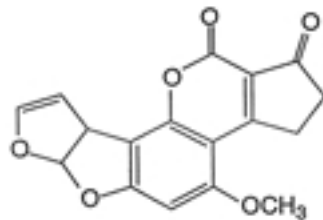
どの方法を使うかということは、求める検出限界、あるいは持っている機械や精度管理がいかにかに帰着します。低いレベルを求めるならば GC - ECD や GC - MS が必要になるし、100ppb レベルであれば LC - UV で測れることとなります。GC や LC のないところでは、TLC や ELISA 法です。ELISA 法は非常に簡便にできますが、安定性に若干問題が出てくるところです。しかし、この方法はシンプルな方法として、すでに報告されていますし、市販のキットもあります。

表 4 穀物における DON 及び NIV の最近の分析方法 (I)
Current methods for analysis of DON or/and NIV in cereals (foods) (I)

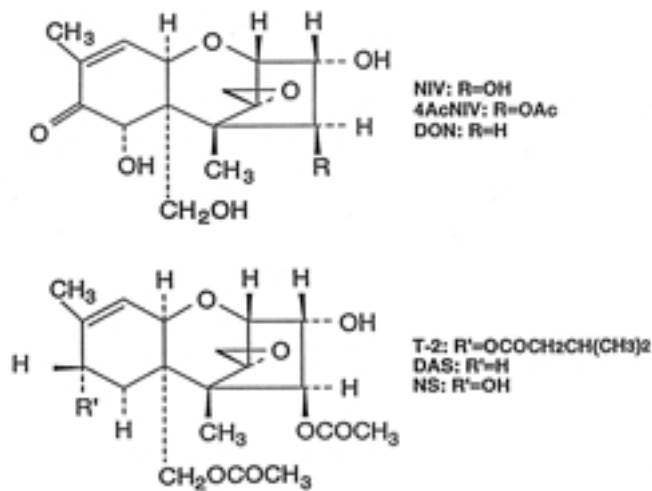
Method	AOAC	T. Tanaka	T. Tanaka	H.L.Chang	M.W.Trucksess	B.R.Malone	Y. Shirai
Repot	AOAC49.4.02	Food Add. Con. 2, 125-137	J. Chromatogr. 882, 23-28	AOAC 67, 52-54	AOAC 79, 883-887	AOAC 81, 448-452	Shiryouken 26, 1-9
Year	1986	1985	2000	1984	1996	1998	2001
Extract	CHC13/EtOH (8 : 2)	CH3CN/water (3 : 1)	CH3CN/water (3 : 1)	CH3CN/water (84 : 16)	CH3CN/water (84 : 16)	CH3CN/water (84 : 16)	CH3CN/water (84 : 16)
Cleanup	Silica	Florisil/Silica	Florisil	Al-Charcol	MycoSep#225	MycoSep#225	MycoSep#227
Separation	GC	GC	GC	LC	LC	LC	LC
Detection	ECD	ECD	MS	UV (229nm)	UV (220nm)	UV (220nm)	UV (220nm)
Deivatives	HFBA	TMS	TMS				
Det. Limits	350ppb	2ppb (D/N)	5ppb (D/N)	30ppb (S/N=2)	500ppb	100ppb	100ppb (D/N)

表5 穀物における DON 及び NIV の最近の分析方法 (II)
Current methods for analysis of DON or/and NIV in cereals (foods) (II)

Method	AOAC	M.M.Abouzied	YI-C, Xu
Repot	AOAC49.4.01	Appl.Env.Microb. 57, 672-677	AOAC 71, 945-949
Year	1986	1991	1988
Extract	CH3CN/water (84 : 16)	MeOH/water (7 : 3)	CH3CN/water (84 : 16)
Cleanup	AI-Charcol (#216)	AI-Charcol	
Separation	TLC		
Detection	UV-FL	ELISA	ELISA
Deivatives	AIC13		
Det. Limits	300ppb	1000ppb	10ppb



Structure of aflatoxin B₁



Structure of trichothecenes

図3 トリコテセン系マイコトキシンの構造

こういう分析法を，シンプルで安定的なデータが得られるように，もう少し今様に改良を加えていく必要があるわけです。図3にマイコトキシンの構造を示します。一番上はアフラトキシン B1 です。この物質については，デオキシニバレノールに比べて測定しやすい。というのは，このトキシン自体蛍光がありますので，そのまま液クロ等で感度よく測れます。極性的にも中極性，農薬を測るのと同じよう

な手法で比較的簡単に測定できるマイコトキシンです。ところが、今回のデオキシニバレノールとニバレノールは、ヒドロキシ基が多くて、アフラトキシンに比べて極性が高い。極性が高い物質は、抽出の段階等で注意をする必要があります。また、測定方法では、この物質はアフラトキシンのように蛍光がありません。UV 吸収も非常に貧弱で、測るとすれば限界の 220 ~ 225nm あたりで測る必要があります。この領域は妨害物質の多くも同時に測定されますので、いろいろな問題が出てきます。

表 6 トリコテセン系マイコトキシンの抽出率
Extraction efficiency for trichothecenes in a artificially molded rice

Extracting solvent	Percentage of trichothecenes extracted	
	Nivalenol	Deoxynivalenol
Methanol ^{*a}	25	26
Methanol/water (9 : 1)	55	48
Methanol/water (3 : 1)	88	75
Methanol/water (3 : 2)	69	63
Acetonitrile	3	3
Acetonitrile/water (9 : 1)	80	67
Acetonitrile/water (3 : 1)	100 ^{*b}	100 ^{*b}
Acetonitrile/water (3 : 2)	85	85
Acetonitrile saturated with n-hexane	3	3

^{*a} : Amounts of trichothecenes extracted with methanol are 1.6 mg/kg for nivalenol and 2.9 mg/kg for deoxynivalenol

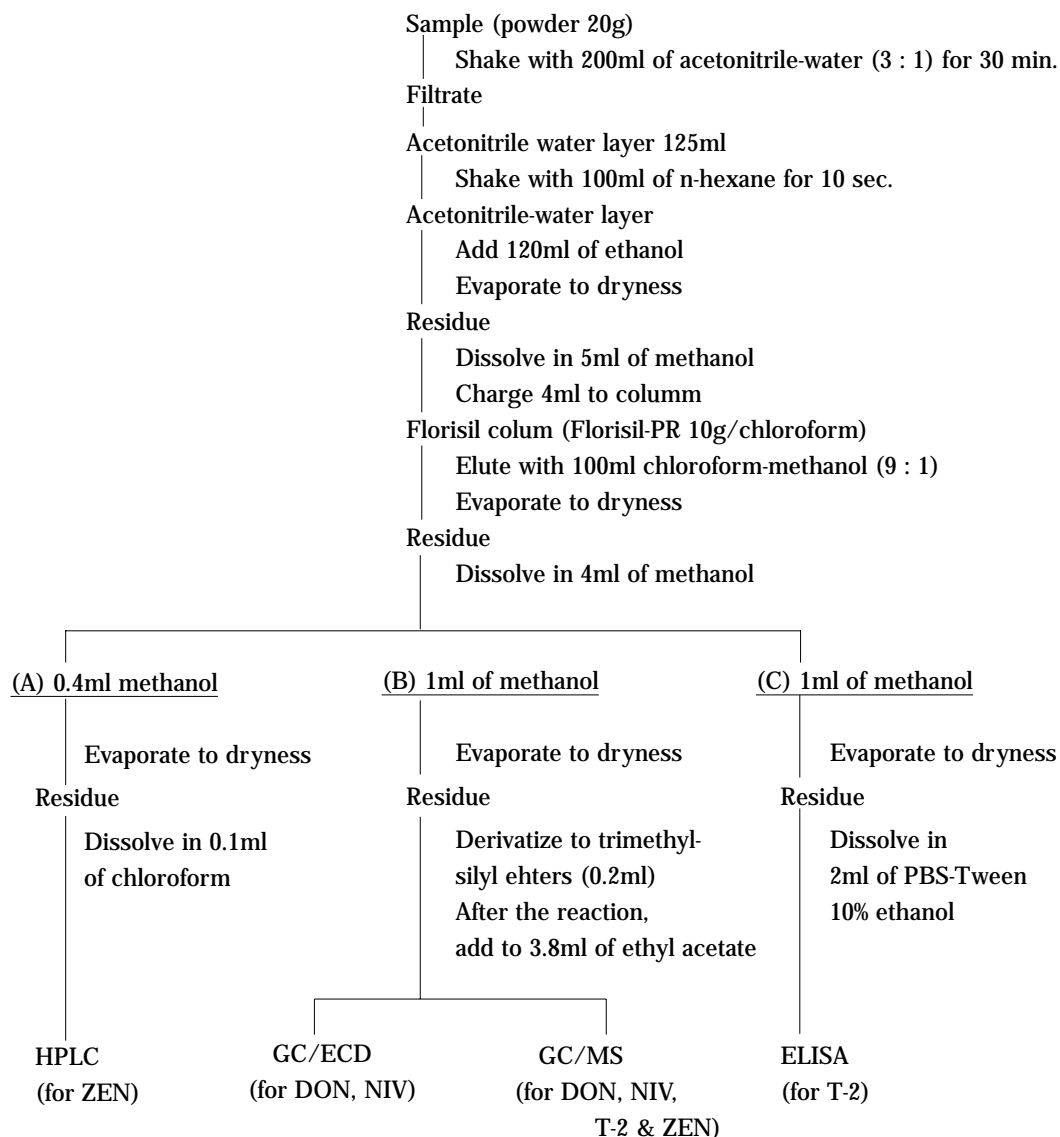
^{*b} : Numbers are percentages, taking the methanol value as 100

例えば抽出の段階で、極性をいろいろ変えた溶媒を使って測ると、デオキシニバレノールの回収率が一番いいものを 100%にした場合、悪い抽出溶媒の場合 3%しか回収されません(表 6)。これが中極性のアフラトキシンのようなものでは、この開きは少ない。抽出溶媒の選択の違いによって、トキシンの回収率にばらつきが出て、選択をまちがえると、分析値が大きく変動する結果になります。

表 7 は 1 つの例で、先程のベストな抽出溶媒を使った場合は、通常 14.3ppm が出てくるものが、ほかの溶媒を使うと一番悪いもので 0.4、ベストに比べて 3%程度しか出てこないということです。例えば、ある抽出法で 1ppm 出たというサンプルでも、抽出溶媒の選択を誤れば、30ppb というデータしか出てこない。

次にいかに測定するのかですが、先に述べたようにデオキシニバレノールは、蛍光もなく、特徴的な UV 吸収もないということで、100ppb 程度の測定レベルです。一番感度よく測れるのは、今のところは揮発性物質に誘導化し、GC - ECD や GC - MS で測る方法です。ゼアラレノンには、アフラトキシンと同じように蛍光がありますので、単純に UV で測ることができます。また、最近、LC - MS の中に ppb レベルまで測定できる機器が発売されてきました。

北海道の赤かび罹病麦に汚染した麦を測った場合の分析データでは、GC - ECD のピークで、デオキシニバレノールはシャープなピークで出てきて、ニバレノールも複合汚染のかたちでわずかですが出てきます。GC - MS でピークを取ると、分析値の確認ができます。ゼアラレノンを LC の蛍光で測った



Analytical procedure of *Fusarium* mycotoxins

図4 *Fusarium* マイコトキシンの分析手順

表7 抽出方法によるトリコテセン系マイコトキシンの回収
 The recovery of trichothenes in moldy rice by various methods

Method	Extracting solvent	Dissolving Solvent	Trichothecenes, mg/kg (%)	
			Nivalenol	Deoxynivalenol
Tanaka	MeCN/H ₂ O (3 : 1)	MeOH	13.3 (100)*a	14.3 (100)
Kamimura	MeOH/H ₂ O (95 : 5)	MeCℓ ₃ /MeOH (9 : 1)	2.7 (20)	4.3 (30)
PSJ	MeCN satu-hexane	MeCℓ ₃ /MeOH (9 : 1)	0.2 (2)	0.4 (3)

*a : Numbers are percentages, taking the Tanaka methanol value as 100

データでは非常にシャープなピークで、アフラトキシン同様、微量に測ることが可能です。そういった方法は、まだ進行中ですが、今年の5月に分析法をつけたかたちで暫定基準を作るということで、とりあえず今の方法としては、抽出溶剤としてアセトニトリルに水を15%加えて抽出し、クリーンアップをできるだけシンプルにするということです。多機能カラムである「マルチステップ²²⁷」、ローマ社から市販されているものを使用しました。また、これの同等品を今試作していますので、近い将来にご提供できると思います。次に測定ですが、目的に応じて選択すればよいのですが、例えば微量10ppbレベルとか、実態を把握するという意味でいけば、GC - ECD, GC - MS という方法を、今のところは一般的に採用されています。MS にする場合、デオキシニバレノール自体が揮発性ではありませんので、それを誘導化させて、揮発物質に変えて測る必要があります。誘導化させたあとに GC - ECD あるいは GC - MS で測定することになります。

図5は、GC - MS のスキャンモード、いわゆるフルマスの状態で取ったMSの状態です。(B)がデオキシニバレノールのフルスキャンのデータです。これには8種類のトキシンのクロマトを示していますが、フザリウムトキシンとして、デオキシニバレノール、ニバレノール、ネオソラニオール、フザレノンX、3-アセチルデオキシニバレノール、あるいはT-2トキシン、ゼアラレノンなどがあります。このように8種類のトキシンを同時にGC - MS では測ることができるというデータです。

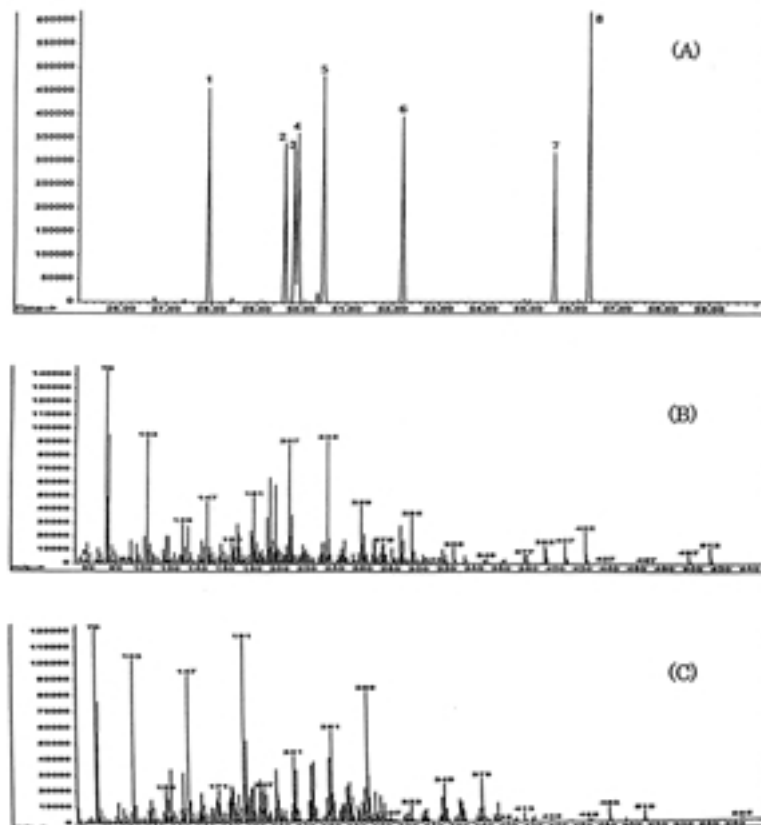


図5 *Fusarium* マイコトキシンのGC - MS分析(スキャンモード)

Total ion chromatogram (A) of TMS derivatives of trichothecenes and zearalenone standard, and mass spectra of deoxynivalenol (B) and nivalenol (C). (1) deoxynivalenol (0.5ng); (2) 3-acetyldeoxynivalenol (0.5ng); (3) diacetoxyscirpenol (0.5ng); (4) fusarenon-X (0.5ng); (5) nivalenol (0.5ng); (6) neosolaniol (1ng); (7) T-2 toxin (1ng); (8) zearalenone (1ng).

感度的にも8種類のトキシンはほぼ同様な感度で測定できます。図5はスキャンモードのデータですが、図6はSIMモードで特徴的なフラグメントを選択した測定方法です。このSIMモードで測りますと、デオキシニバレノール、ニバレノールといったトキシンは5~10ppbレベルのデータを得ることができます。このように目的に応じて測定方法を変える必要があります。

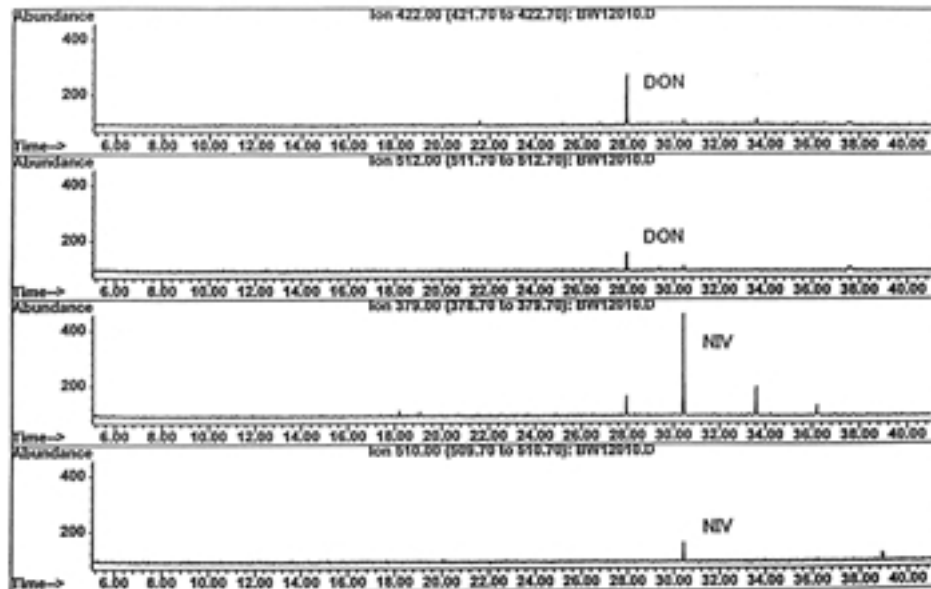


図6 *Fusarium* マイコトキシンのGC - MS分析 (SIMモード)

SIM chromatograms of TMS derivatives of *Fusarium* mycotoxins extracted from wheat, showing contamination with 34 ng/g of deoxynivalenol (DON) and 87 ng/g of nivalenol (NIV). Time scale in minutes.

GS - MS に比べてやりやすいのは、高速液体クロマトグラフ (LC) 方法です。LC の条件ですが、標準品の検量線を描くと感度的には 0.1 から 2ppm まで非常によい直線性が得られます。このような濃度レベルで、非常に安定的な定量ができます。LC の場合は誘導化する必要もなく、直接注入できますので非常にやりやすい。ただ、先程の ECD のような低い ppb オーダーのレベルは、測ることができません。基準が 1ppm のレベルですから、基準値の前後を測るには、この方法が非常に安定的でシンプルな測定方法です。ただ、もう少し感度を必要とするときは、LC - MS です。LC - MS でもいろいろ測り方があって、ESI や APCI という方法があります。普通、ESI で測ると、大体この LC の UV ディテクターと同じような感度しか出ません。ただ、大気圧光イオン化 (APPI: Atmospheric Pressure Photoionization) という特殊なディテクションの方法を採用すると、1ppb レベルまで測定できます。こういったレベルまで測れる手法を現在検討しています。昨年の実態調査にはこの方法を採用しまして、ppb レベルまで測ったデータを出しています。ただ、この機械はまださほど普及していませんし、値段も 3000 万程度しますので、一般的に今すぐ採用ができる方法ではないということで、もう少しいい方法を検討しています。

最後に、分析法が確立したら、今度は出る値のばらつきがどの程度あるのか、何十%も変わりますと、問題となります。データが基準値を越えるか否か、分析法による値のばらつきが問われ、分析法自体のバリデーションをやる必要があます。

図7はウィリアム・ホルツの有名なグラフですが、いわゆるラボラトリー間のばらつきはこういった濃度に依存するというので、ppm レベルで測るものであれば、ばらつき値が16%以内に収まればリーズナブルな方法といえます。ただ、1ppb レベルでやると、もう少し開きが強くなって30～40%になってしまいます。また、「ハラット係数」という理論的な計算式がありますが、これが2を超えるような方法はバラツキが大きく採用できない方法になります(表8)。

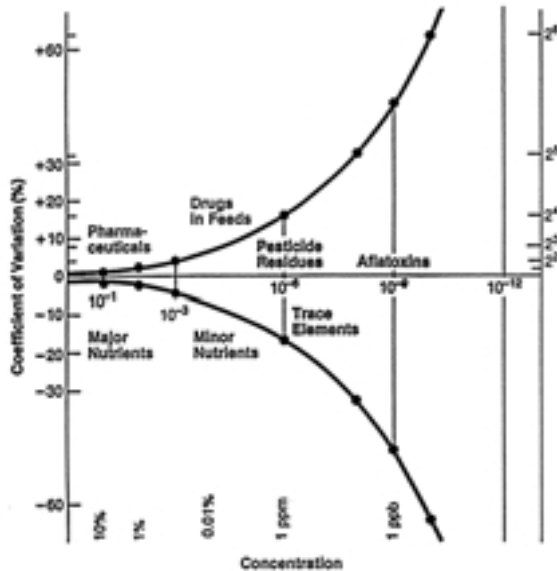


図7 濃度と変動係数との関係

The general curve relating interlaboratory coefficients of variation (expressed as powers of two on the right) with concentration (expressed as powers of 10) along the horizontal center axis

表8 濃度とハラット係数との関係

RSD_R and HORRAT values for typical concentration levels found in commodities contaminated with mycotoxins

Concentration, C				
Exponential fraction	-Log C	Conventional	RSD _R , %	HORRAT
10 ⁻⁶	6	1 ppm	16	1.0
10 ⁻⁷	7	0.1 ppm	23	1.0
10 ⁻⁸	8	10 ppb	32	1.0
10 ⁻⁹	9	1 ppb	45	1.0
10 ⁻¹⁰	10	0.1 ppb	64	1.0

$$RSD_R, \% (\text{predicted}) = 2^{(1-0.5 \log_{10} C)} = 2^{(-0.1505)}$$

$$\text{and HORRAT} = RSD_R (\text{found}) / RSD_R (\text{predicted}),$$

今回のデオキシニバレノール分析方法のバリデーションは現在行っているところです。アフラトキシン分析でのバリデーションデータはたくさんありますので、例としてここで紹介します。分析法の選択で、どれくらいばらつきがあるかということで、表9～11を用意させていただきました。これはアフラトキシンの汚染レベルです。5～30 ぐらいの ppb オーダーのアフラトキシンを LC のテクニックで測った場合は、先程のハラット係数で2の中に収まる必要があります。非常に0点台が多くて、たまにぎりぎりです。1.95 というのがありますが、ばらつきが少ないということで、アフラトキシンに関してはLCを用いた測定法が受け入れられる方法であるということになります。精製法は多機能カラムを使ってLCでディテクションする方法と、シリカゲルを使って精製してLCで測る方法で、両方の方法とも受け入れられる方法であろうというデータが出ています(表9)。

最近開発が進んでいる、抗体を利用したイムノアフィニティ・カラムを使ってLCで測る方法のデータを表10に示します。これは感度よく測れますので、非常に低いレベルでバリデーションをやっています。それでもなおかつ、先程のハラット係数は非常に低い値、1を超えるものはありません。そういう意味で、非常に安定的で、なおかつ微量の測る方法ができる。ですから、デオキシニバレノールについても、こういった非常にいいイムノアフィニティ・カラムが開発されれば、こういったデータが出る可能性があるということです。今のところはまだ安定的な供給ができません。

表9 アフラトキシン定量法の性能 (LC 測定)
Method performance for determinatuion of aflatoxins (1 : LC)

Method (AOAC)	Detection	Commdity	Level ng/g	Rec., %	RSDr %	RSDR %	PRSDR %	HORRAT
994.08A	MycoSep-LC	Corn	T-5	102		22.8	35.5	0.64
			T-10	100		17.7	32.0	0.55
			T-20	98	6.0	22.3	28.8	0.77
			T-30	105		15.4	27.1	0.57
			NC (23)		20.4	20.4	28.23	0.72
		Almond	T-5	90	16.4	26.3	35.5	0.74
			T-10	94		19.6	32.0	0.61
			T-20	93		22	28.8	0.76
			T-30	96		17.2	27.1	0.63
		Peanuts	T-5	74	6.8	69.4	35.5	1.95
			T-10	86		25	32.0	0.78
			T-20	91		26.2	28.8	0.91
			T-30	83		21.7	27.1	0.80
		Pistachio	T-5	92		33.6	35.5	0.95
			T-10	92		27.4	32.0	0.86
			T-20	91	23.2	31.8	28.8	1.10
T-30	92			19.8	27.1	0.73		
990.33	SPE (S)-LC	Corn	B1-5		27.2	32.3	35.5	0.91
			B1-10		12.8	15.8	32.0	0.49
			B1-50		8.3	38.4	24.95	1.54
		Peanuts butter	B1-5		11.2	24.4	35.5	0.69
			B1-10		13.1	27.2	32.0	0.85
			B1-25		19.1	33.4	27.88	1.20

表10 アフラトキシン定量法の性能 (IAC-LC 測定)
Method performance for determinatuion of aflatoxins (2 : IAC-LC)

Method (AOAC)	Detection	Commdity	Level ng/g	Rec., %	RSDr %	RSDR %	PRSDR %	HORRAT
999.07A	IAC-LC	Peanuts butter	B1-0.9		10	19	45.98	0.41
			B1-3.6		3	18	37.32	0.48
			NC (0.8)		6	32	46.8	0.68
			NC (1.5)		6	14	42.58	0.33
			NC (3.4)		4	19	37.64	0.50
		Pistachio past	B1-0.9		14	16	45.98	0.35
			B1-3.3		4	31	37.81	0.82
			NC (0.7)		11	17	47.75	0.36
			NC (1.5)		18	23	42.58	0.54
			NC (2.9)		20	21	38.55	0.54
		Fig pasre	B1-1.1		17	19	44.61	0.43
			B1-3.6		11	13	37.32	0.35
			NC (1.3)		10	23	43.5	0.53
			NC (2.1)		6	15	40.47	0.37
			NC (2.6)		16	29	39.19	0.74
		Paprika powder	B1-0.9		6	10	45.98	0.22
			B1-3.4		5	10	37.32	0.27
			NC (0.8)		14	19	46.8	0.41
NC (1.4)			10	17	43.02	0.40		
NC (3.0)			4	9	38.36	0.23		

表 11 のデータは、先程はディテクションを LC でやったわけですが、今回は TLC、あるいは ELISA でやってはどうかということで、この表を用意してみました。先程のように、シリカゲルのカラムをクリーンアップして、TLC で測ると、先程のハラット係数は大体 1 を超えてきます。2 を超えていませんので、受け入れる方法としては可能となります。ただ、ELISA 法は非常に簡便でいいわけですが、2 を超えるものが出てくるということで、ばらつきが多くなります。ELISA キットによるばらつきもありませんし、クロス・リアクションの問題も出てくるし、サンプルでの精製の問題も出てきますので、ELISA で測る場合は係数がばらつく可能性があるということで、そういったものを抑える必要があります。

表 11 アフラトキシン定量法の性能 (TLC, ELISA 測定)
Method performance for determinatuion of aflatoxins (3 : TLC, ELISA)

Method (AOAC)	Detection	Commdity	Level ng/g	Rec., %	RSDr %	RSDR %	PRSDR %	HORRAT			
993.17	SPE (S)-TLC (densitometer)	Corn	B1-5	88	56.6	56.6	35.5	1.59			
			B1-10	83	41.7	41.7	32.0	1.30			
			B1-50	76	47.5	47.3	24.95	1.90			
		peanuts	B1-5	78	21.3	26.4	35.5	0.74			
			B1-10	83	37.3	37.3	32.0	1.17			
			B1-25	84	26.1	28.9	27.88	1.04			
	SPE (S)-TLC (visual estima.)	Corn	B1-10	100	11.4	56.7	32.0	1.77			
			B1-50	92	34.6	34.6	24.95	1.39			
			B1-10	101	12.6	35.7	32.0	1.12			
		peanuts	B1-25	87	31.8	31.8	27.88	1.14			
			989.06	ELISA (Visual)	Corn	B1-7.5		38.5	60.7	33.42	1.82
						B1-52.3		13.5	59.5	24.19	2.46
B1-4		73.7				73.7	36.73	2.01			
Roasted peanuts	B1-64.1				24.3	57.3	22.99	2.49			
	ELISA (Absorbance measurement)	Corn			B1-7.5		14.9	45.7	33.42	1.37	
					B1-52.3		19.4	52.7	24.19	2.18	
B1-4					41.4	43.5	36.73	1.18			
Roasted peanuts		B1-64.1			23.3	23.3	22.99	1.01			
		991.45		ELISA (Absorbance measurement)	peanuts	B1-9		30.3	37.2	32.51	1.14
					butter	B1-30		14.5	32.8	34.54	0.95
Roasted peanuts	B1-90					21.4	28.5	22.63	1.26		

表 12 は分析法の評価を最終的にまとめたものですが、TLC, LC, LC - MS, GC, GC - MS, ELISA ということで、私なりに 3 段階に分けさせていただきました。アフラトキシンは蛍光がありますので、TLC という方法は非常に微量に測れてクリアに見られますので「 」か「 」です。しかし、ニバレノールは蛍光もありませんし、UV 吸収もブアーであるということで、TLC でディテクションするためには、塩化アルミニウムで誘導化させて測る必要があります。定量性は非常に悪いので、「 」にしました。LC は簡便ということで「 」。LC - MS は光イオン化 (APPI) というディテクションを用いると、ppb レベルまで測れるし、非常に優秀な機械であるということで「 」。GC について「 」にしたのは、微量まで測れることはいいのですが、誘導化させる必要がある。GC - MS についてもそういうこ

とで、「 」にしました。ELISA については、セーフティ、簡便性、感度というところはいいわけですが、安定性がネックになりますので、「 」にしています。そして、このセンシティブティというところで、ディテクションリミットで、目的に応じて、TLC や LC の場合は ppm オーダーであれば十分可能である。ppb まで求める場合は、こうした下のレベルの機械を使う必要があることになります。あとは、安全性やコスト、オートメーションでいけるかどうか、そのファクターの中に入ってくると思います。

表 12 DON, NIV 定量法の比較
Comparison of various categories of methods for the determination of DON/NIV

Scope of application	Sensitivity Limit	Quantitativity /Identification	Mobile phase	Safety	Cost	Time/Automation
TLC 1st D	ppm	/ derivatives	Organic			/
HPLC Reversed	ppm	/	Water/Or			/
LC/MS	ppb	/	Water/Or			/
GC	ppb	/ derivatives	Gas			/
GC/MS	ppb	/ derivatives	Gas			/
ELISA	ppb	/				/

: very good, : good, : fair

3 . 穀類のマイコトキシン汚染

分析法はこういう問題を抱えながら、さらにシンプルで安定性のある方法を作り上げていこうというところで努力しているわけですが、今までの汚染レベルを示したデータを表 13 に示します。これは日本のサンプルも入っていますが、21 カ国の 527 サンプルを分析した結果です。

表 13 穀類の *Fusarium* マイコトキシン汚染濃度とその頻度
The contents and frequencies of *Fusarium* mycotoxins in cereals from 21 countries

Cereals	No. of sample	Mean in positives, ng/g (% of positives)					
		Nivalenol		Deoxynivalenol		Zearalenone	
Wheat	(222)	118	(50)	438	(43)	25	(32)
Barley	(139)	390	(76)	145	(75)	33	(74)
Corn	(45)	905	(17)	682	(22)	184	(59)
Oat	(26)	301	(35)	113	(31)	22	(50)
Rye	(34)	41	(38)	161	(41)	100	(9)
Sorghum	(11)	91	(9)	0	(0)	8	(11)
Rice	(9)	22	(22)	0	(0)	0	(0)
Soybean	(3)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Others	(18)	3	(6)	135	(44)	6	(34)
Total	(527)	255	(51)	284	(47)	46	(45)
Scabby	(18)*1	205	(38)	3812	(100)	189	(100)
Wheat	(49)*2	41	(91)	2819	(100)	27	(100)
	(10)*3	23	(40)	1257	(90)	9	(90)

*1 : Harvested in Hokkaido, Japan *2 : Harvested in China *3 : Harvested in Canada

デオキシニバレノール，ニバレノールとも，サンプリング方法は全くアトランダムです。しかし，汚染率，汚染平均濃度等も，わりあいと拮抗した値が得られました。しかし，北海道，中国，カナダではニバレノールも検出されますが，デオキシニバレノールがメジャーに出てくるというデータです。そういう意味で，北米はデオキシニバレノールを中心に考えています。しかし，世界全体あるいは日本においても，今後はこのニバレノールについても，少し考慮する必要があると考えます。

先程のデータは 80 年代で，古いデータで申し訳なかったのですが，表 14 は昨年度，実態調査を行ったデータです。検出限界 1ppb で行ったデオキシニバレノールおよびニバレノール汚染状況は，国産小麦ではそれぞれ 92%，94% から検出され，平均汚染濃度は 388ppb，8.2ppb であり，輸入小麦は 75%，45% で濃度は 100ppb，1.3ppb であった。また，国産小麦の 4 試料から ppm オーダーでデオキシニバレノールが検出された。

表 14 麦類中のデオキシニバレノールおよびニバレノール汚染調査結果（2001 年）

麦 類	デオキシニバレノール			ニバレノール		
	試料数 (検出，%)	平均濃度 (ppb)	濃度範囲 (ppb)	試料数 (検出，%)	平均濃度 (ppb)	濃度範囲 (ppb)
国産小麦	36 (33, 92%)	388	0-2248	36 (34, 94%)	8.2	0-27
輸入小麦	20 (15, 75%)	100	0-740	20 (9, 45%)	1.3	0-7
輸入大麦	3 (3, 100%)	9	2-20	3 (2, 67%)	3.7	0-6
国産裸麦	22 (17, 77%)	6	0-46	22 (22, 100%)	15	0-110

今回の試料からはニバレノール汚染はデオキシニバレノールに比べて低い値であったが，デオキシニバレノールおよびニバレノールが複合して汚染していることが，あらためて明らかになった。従って，今後ニバレノールを加えた人へのリスク評価が課題になる。また，汚染の軽減，除去等可能な対策によりこれらトキシンの暴露リスクの低減をはかる必要がある。