

表2 均一性試験の結果
($\mu\text{g/g}$)

	1	2	3	4	5	6	7	平均値	標準偏差	変動係数(%)
汚染無し	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	-	-	-
低濃度	0.21	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.18	0.19	0.01	5.19
中濃度	0.36	0.36	0.36	0.37	0.35	0.36	0.36	0.36	0.01	1.49
高濃度	0.85	0.87	0.88	0.87	0.93	0.86	0.89	0.88	0.03	3.07
超高濃度	1.52	1.52	1.58	1.60	1.52	1.51	1.59	1.55	0.04	2.39
小麦粉	0.53	0.51	0.51	0.50	0.52	0.50	0.51	0.51	0.01	1.67

表 3. Collaborative study参加機関による分析結果

Lab.ID	Deoxynivalenol concentration $\mu\text{g/g}$															
	0.5	0.6	1	1.1	a*	a	b	b	b	c	c	d	d	e	e	f
1	0.54	0.71	1.22	1.06	<0.05	<0.05	0.26	0.31	0.46	0.45	1.1	1.01	1.53	1.8	0.58	0.69
2	0.48	0.58	1.01	1.13	<0.05	<0.05	0.2	0.2	0.33	0.33	0.8	0.84	1.25	1.31	0.43	0.41
3	0.53	0.61	1.03	1.17	<0.05	<0.05	0.26	0.26	0.38	0.37	1.02	1.02	1.56	1.77	0.56	0.46
4	0.55	0.71	1.05	1.15	<0.05	<0.05	0.17	0.23	0.35	0.33	0.9	0.82	1.47	1.41	0.46	0.6
5	0.46	0.56	0.97	1.15	<0.05	<0.05	0.23	0.24	0.37	0.34	0.9	0.94	1.51	1.65	0.49	0.51
6	0.52	0.68	1.07	1.2	<0.05	<0.05	0.27	0.3	0.44	0.47	1.11	1.07	1.81	1.92	0.6	0.61
7	0.58	0.68	1.11	1.24	<0.05	<0.05	0.23	0.24	0.41	0.41	1.06	0.98	1.74	1.74	0.51	0.56
8	0.5	0.63	1.16	1.08	<0.05	<0.05	0.22	0.29	0.47	0.41	0.99	0.96	1.57	1.54	0.53	0.53
9	0.53	0.52	0.93	1.33	<0.05	<0.05	0.22	0.21	0.33	0.32	0.88	0.79	1.35	1.17	0.48	0.39
10	0.51	0.61	1.02	1.1	<0.05	<0.05	0.19	0.2	0.34	0.33	0.89	0.92	1.47	1.53	0.47	0.47
11	0.5	0.63	1.03	1.13	<0.05	<0.05	0.23	0.23	0.37	0.39	0.95	0.93	1.61	1.67	0.56	0.55
12	0.44	0.46	0.99	0.79	<0.05	<0.05	0.1	0.16	0.26	0.18	0.53	0.75	1.55	1.55	0.3	0.51

* a,b,c,d,e=blind duplicate pairs of naturally contaminated wheat

b f=blind duplicate pairs of naturally contaminated flour

表 4 Collaborative studyの結果

Sample ID	No. of labs a(b)	Matrix	X Average (μ)	Sr	RSDr(%)	r	SR	RSDR(%)	R	HORRAT value	Rec., (%)
spiked(1)	12(0)	wheat	0.56 ^b	0.09	15.18	0.24	0.08	14.42	0.23	0.58	102.42
spiked (2)	10(2)	wheat	1.09 ^c	0.12	11.17	0.34	0.09	8.39	0.26	0.53	103.71
a	12(0)	wheat	< 0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
b	12(0)	wheat	0.23	0.03	11.33	0.07	0.05	20.75	0.13	1.01	-
c	12(0)	wheat	0.37	0.02	6.32	0.07	0.07	18.76	0.19	1.00	-
d	12(0)	wheat	0.92	0.06	6.42	0.17	0.13	14.20	0.37	0.87	-
e	12(0)	wheat	1.56	0.09	5.79	0.25	0.19	11.99	0.52	0.80	-
f	12(0)	flour	0.51	0.06	12.47	0.18	0.08	16.36	0.23	0.92	-

^a Number of labs retained after eliminating outliers; (b)=number of labs removed as outliers.

^b Spike level=0.50 μ g/ml and 0.60 μ g/ml (youden pair)

^c Spike level=1.00 μ g/ml and 1.10 μ g/ml (youden pair)

厚生科学研究費補助金（特別研究）

分担研究報告書

デオキシニバレノールの ELISA 法による検出に関する研究

分担研究者 熊谷 進 東京大学大学院

協力研究者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

小麦中のデオキシニバレノールの試験法として UV 検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーを開発し、バリデーションを行いその有用性について報告したが、本研究では初期スクリーニング法としてエライザ法を検討し、14 機関による妥当性試験をおこなった。その結果、充分操作に習熟した場合には小麦玄麦を試料とした初期スクリーニングには有用であることが判明した。

inter-laboratory Validation 協力機関名

神戸市環境保健研究所

国立医薬品食品衛生研究所

財団法人日本穀物検定協会

財団法人日本食品分析センター

財団法人マイコトキシン検査協会

財団法人日本冷凍食品検査協会

食糧庁消費改善課品質管理室

独立行政法人消費技術センター

独立行政法人食品総合研究所

独立行政法人農業技術研究機構中央農業総合研究センター

独立行政法人農業技術研究機構九州沖縄農業研究センター

独立行政法人肥飼料検査所

名古屋市衛生研究所

北海道立中央農業試験場

A. 研究目的

昨年5月に、小麦についてデオキシニバレノールの暫定的な基準値が設定されたところであるが、高速液体クロマトグラフィー等を用いる分析法は、分析機器の整備と高度な分析技術を必要とするため、簡易なスクリーニング手法の開発が望まれているところである。デオキシニバレノールの簡易分析法として、ELISA法による数種の分析キットが市販されており、初期スクリーニング法としての活用が期待されるが、機器分析法との相関等についての確認等が必要である。このため、農林水産省の協力を得てELISA法の妥当性の確認を行い、高速体クロマトグラフィーを用いた機器分析の妥当性試験の結果との相関を検討した。

B. 研究方法

試験実施に先立ち、参加機関分析担当者に対する分析キット操作法に関する講習会を開催し、分析キットの操作法について習熟を図った。分析用試料及びELISA分析キットについては以下のとおりである。

① 分析用試料

デオキシニバレノールの高速液体クロマトグラフィー分析法の妥当性試験のために調整され均一性が確認されている低濃度汚染小麦(0.36 $\mu\text{g/ml}$)、中濃度汚染小麦(0.88 $\mu\text{g/ml}$)、高濃度汚染小麦(1.55 $\mu\text{g/ml}$)およびND小麦(検出限界(0.05ppm)以下の4種類の分析用試料(各50~55g程度)を本試験に供した。カッコ内はHPLC法による測定濃度を表す。

② ELISA分析キット

本妥当性試験でのデオキシニバレノールELISA分析キットは協和メデックス社製分析キットFAシリーズマイコトキシン(DON+NIV)、米国NEOGEN社ベラトクスボミトキシン5/5、ドイツr-Biopharm社RIDAスクリーンFAST DON、米国ROMER社AgraQuant DONの4社の市販品を用いた(メーカー名称のあいうえお順)。各分析キットのマニュアルに従い分析キット毎に必要な検体量を採取し、マニュアルに従い分析を実施した(図1、図2)。分析用試料は3連、標準試料は2連で行った。なお、協和メデックス社分析キットについては、前処理(アセチル化)が必要であること、前処理から分析、データ解析まで一連のシステムとして設計されていること等から、協和メデックス社が供与試料のアセチル化を行い、各試験機関に再配布して同社製のELISAキットにより測定した。各試験機関は同社にデータを送付しデータ解析を行った。

C. 研究結果

表1に示したように、本実験で使用したELISA KITから高速液体クロマトグラフィー法による分析値にほぼ準ずる分析値がえられた。各社の分析キットとも参加機関間の分析値の変動係数は最高でも10%台であり、分析値のばらつきは小さかった。HPLC分析法でELISAの検出限界以上のデオキシニバレノールが含まれると判断された小麦玄麦を用いたELISA分析法による計測で、測定限界以下に計測されることはいずれのKITからも

なかった。また、それぞれのキットから得られた値と高速液体クロマトグラフィー法から得られた平均値との相関係数は本試験で用いたいずれの ELISA キットにおいても 0.996-1.0 であった (図 3)。もっとも高い測定値を示したキットは、デオキシニバレノールおよびその代謝物 (3-アセチル DON, 15-アセチル DON) をすべてアセチル化して同一の物質として測定していることから、試料となる小麦中に含まれている 3-アセチル DON, 15-アセチル DON も合算されてしまうため、やや測定値が高い傾向にあると考えられた。

D. 考察

今回の試験結果からは、分析担当者が操作法を十分習熟して分析キットの操作をマニュアル等に従い適切に行えば、高い精度で DON 分析を行うことが可能であると考えられた。また、生産現場段階において分析キットを用いたスクリーニングを実施する際には、分析担当者が操作法を十分習熟した上で実施する等の留意事項を十分踏まえて行う必要がある。

実際に初期のスクリーニング法として用いる時の分析値の解釈であるが、文献によると ELISA 法による分析値には 20-40% の変動が見られることが報告されていることから¹⁾、一定程度の幅を見込んで分析値を取り扱う必要がある。

なお、適切なサンプリング及び試料調整は正しい値を得るための前提条件である。

E. 結論

デオキシニバレノールの分析試験法としては高速液体クロマトグラフィーと UV 検出器を

用いた方法が、室内再現性、室間再現性とも優れ、分析法として有用であることはすでに報告したが、この分析法は分析機器の整備と高度な分析技術を必要とすることから、初期スクリーニング法として簡便で迅速な ELISA 分析法の適用が望まれている。本研究でその妥当性を検討した結果、現在市販されている 4 社の ELISA キットは小麦玄麦中のデオキシニバレノールの初期スクリーニングに有用であることが判明した。

F. 参考文献

- 1) C.B.Bird, et al., Determination of total fumonisins in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study, J.AOAC International, 85, 404-410, 2002.
- 2) R.D.Josephs et al., International interlaboratory study for the determination of the Fusarium mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol in agricultural commodities, Food Additives and Contaminants, 18, 417-430, 2001
- 3) YI-CHUN XU, et al., Enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in corn and wheat. J. Assoc.Off.Anal.Chem., 71, 945-949, 1988

F. 発表論文

なし

Fig.1 Veratox 5/5, Agraquant DON, RIDAスクリーン

キットのしくみと操作概要

Veratox 5/5		AgraQuant DON	RIDAスクリーンFAST
プレミックス	酵素複合体と試料 (標準液) を事前に混合 <small>混合用の未加工ウェルを使用</small>		
試料/標準 酵素複合体 (抗体液)	ウェルにミックス液を入れる ウェル: DON抗体固着	試料 (標準)、酵素複合体 DON抗体液を順に入れる ウェル: 二次抗体固着	なし
インキュベート	抗体に対して、複合体と試料のDONが総合的に結合	同左および抗体→二次抗体	
洗浄	ウェルに未結合の余剰物を洗浄除去 (重要)		
発色基質液	ウェルに発色基質液を入れる		
インキュベート	ウェルに酵素複合体が結合していれば、酵素により基質が発色する		
反応停止液	酸を滴下し反応を停止する		
吸光度測定	高濃度→酵素複合体が少ない→発色が少ない (低濃度は逆)		
解析	標準液と試料の全ウェルの吸光度を測定する		
	ゼロ標準液の吸光度を100%とし、各ウェルの%吸光度を算出する $\text{Log } n \{ (\text{吸光度}\%) \div (100 - \text{吸光度}\%) \}$		
	縦軸: Logit変換後の吸光度値、横軸 (対数目盛): 濃度として 標準液データをプロットし、回帰直線を描き、標準検量線とする		
	試料吸光度のLogit値を求め、濃度を算出する		

Fig.2 協和メディックス社
 キットのしくみと操作概要

MP : マルチチャネルピペット (8連) 、 RP : リピーターピペット、 SP : シ

試料/標準 酵素複合体 (抗体液)	サンプル50 μ L (SP or MP) + 一次抗体液50 μ L (MP)
インキュベート	4.5分
洗浄	5×5
2次抗体液	100 μ L (MP)
インキュベート	3.0分
洗浄	5×5
発色基質液	発色液100 μ L (MP)
インキュベート	3.0分
反応停止液	50 μ L (MP) 良く攪拌
吸光度測定	高濃度 \rightarrow 酵素複合体が少ない \rightarrow 発色が少ない (低濃度は逆)
解析	検量線作成と濃度算出 (納入キットのソフトによる解析)
	標準液と試料の全ウェルの吸光度を測定する キット添付のWindowsソフト
	各濃度標準液より検量線作成 (独自フィッティングソフト)

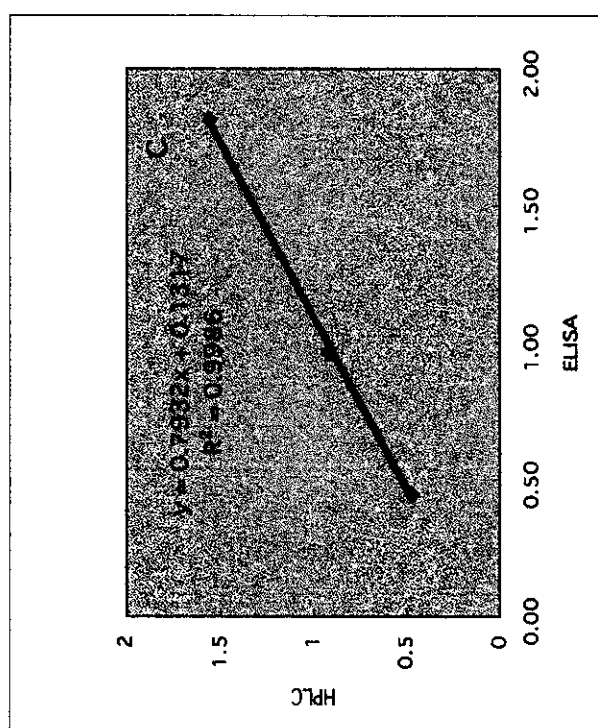
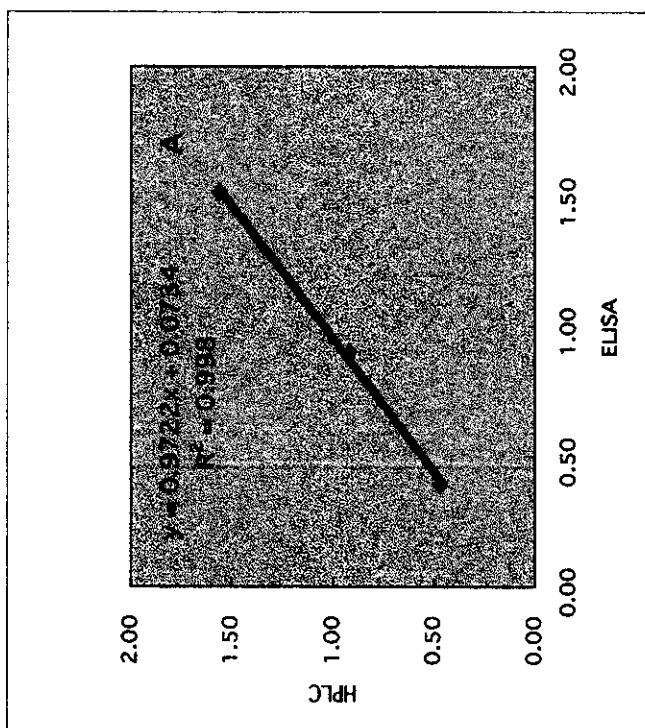
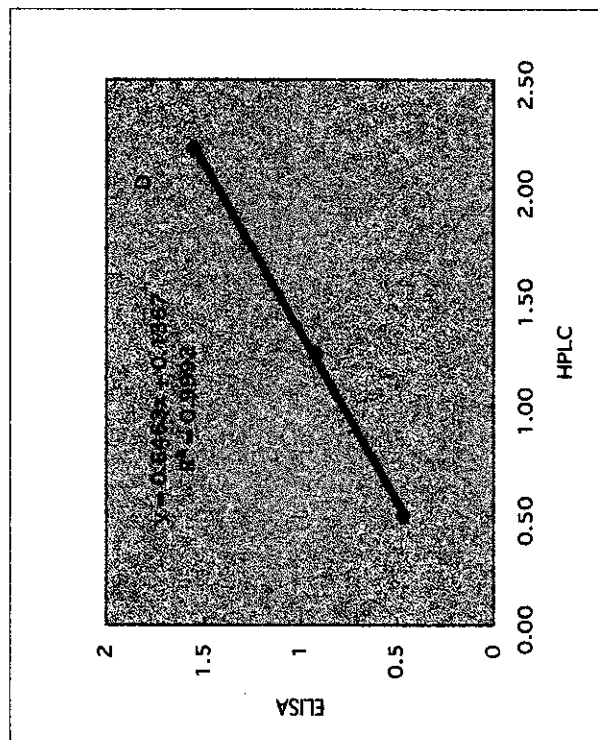
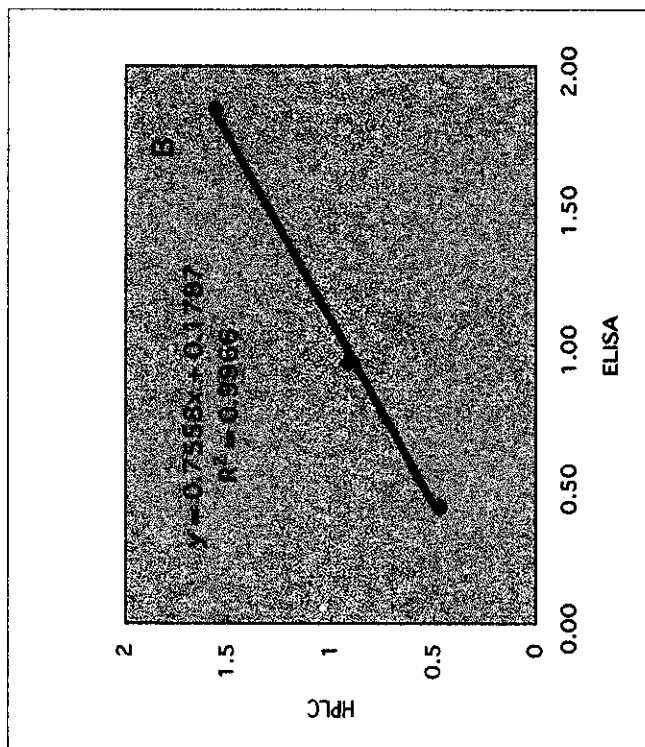


Fig.3 ELISA 分析値とHPLC分析値との相関係数

表1 ELISAの妥当性確認試験の結果

析キットメーカー	サンプル	均値 (μg/ml)	最大値(μg/ml)	最小値(μg/ml)	標準偏差	CV (%)	参加機関数
A	ND	-	-	-	-	-	14
	低濃度	0.39	0.47	0.31	0.041	10.52	
	中濃度	0.90	1.10	0.69	0.097	10.79	
	高濃度	1.52	1.79	1.14	0.187	12.35	
B	ND	-	-	-	-	-	13
	低濃度	0.42	0.55	0.33	0.073	17.59	
	中濃度	0.93	1.17	0.82	0.100	10.68	
	高濃度	1.85	2.12	1.63	0.158	8.58	
C	ND	-	-	-	-	-	14
	低濃度	0.45	0.52	0.29	0.069	15.56	
	中濃度	0.96	1.14	0.75	0.123	12.72	
	高濃度	1.81	2.26	1.48	0.211	11.65	
D	ND	-	-	-	-	-	11
	低濃度	0.50	0.65	0.43	0.060	11.84	
	中濃度	1.24	1.45	1.12	0.105	8.47	
	高濃度	2.19	2.56	1.84	0.221	9.99	
HPLC法による	ND	-	-	-	-	-	
	低濃度	0.36					
	中濃度	0.88					
	高濃度	1.55					

厚生労働科学研究（厚生労働科学特別研究事業）

分担研究報告

研究課題： わが国における玄米中のデオキシニバレノール及びニバレノール汚染の実態

分担研究者： 芳澤宅實（香川大学農学部 教授）

研究協力者： 田中敏嗣（神戸市環境保健研究所 部長）

研究要旨

平成 13 年と 14 年度国内産玄米 124 試料のうち、デオキシニバレノール（DON）汚染は 4 試料（4.6 - 40.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、平均 21.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）、ニバレノール（NIV）汚染は 15 試料（2.0 - 17.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、平均 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）に認められ、DON と NIV の同時汚染は 1 試料であった。今回の調査により DON や NIV による国内産米の汚染の事実が明らかとなった。検出された DON 及び NIV の玄米汚染濃度は極めて低いが、汚染濃度によっては精米後の白米に残存することが示された。また、DON 及び NIV の汚染に地域的な差異の可能性も示唆された。

A. 研究目的

昨年度の厚生科学特別研究事業¹⁾において、わが国で流通している小麦等のデオキシニバレノール（DON）汚染の実態調査を行なった結果、国内産小麦の一部に、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）²⁾で設定した暫定耐容摂取量（PMTDI、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日）を越える摂取量を招来すると推定されるレベルの汚染が認められた。このことを受けて、厚生労働省は小麦中の DON の暫定基準値（1,100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を定め、汚染小麦が市場に流通しないよう行政指導³⁾を行った。

一方、小麦と並んで消費量の多い米の汚染については、一部の国において DON 汚染²⁾が認められており、また、わが国における過去の赤カビ中毒事故例の中にも米を原因とする事例⁴⁾（参考資料 I 参照）があることから、DON 等の赤カビ毒による米の汚染が危惧されるところである。わが国の成人（体重 50kg）の 1 日当り米摂取量（国民栄養調査による）を 158.9 g として DON の PMTDI 値に相当する玄米中の DON レベルを仮に算出すると、0.315 mg/kg（315 ppb）となる。しかしながら、わが国における米の汚染データはほとんど見当たらない。米や小麦のような主食の汚染実態を究明することによって、人の暴露実態を包括的に把握し、健康リスクをより精確に明らかにすることが可能となる。そこで、本研究では昨年度の厚生科学特別研究で実施した小麦の DON 汚染調査に引き続いて、平成 13 年及び 14 年度産の国産玄米中の DON 及びニバレノール（NIV）の汚染実態を検討した。

[参考資料]

表. わが国における赤かび汚染食品が原因と考えられるヒトの食中毒事例

年	地域	原因食品	患者数
1946	東京	コムギ粉	60
1949	北海道	コムギ粉	86
1950	北海道	コムギ粉 (うどん、パン)	75
1951	北海道/十勝	コムギ粉 (うどん)	53
1954	東京	米飯	25
1955	東京/保谷	米飯	30
1955	高知、栃木、神奈川、茨城	米飯	4 家族
1955	静岡/磐田	はったい粉	5
1956	北海道/本別	コムギ粉 (うどん)	43
1956	北海道/本別	コムギ粉 (うどん)	60
1957	神奈川/相模原	米飯	6
1957	鹿児島	米飯	記録なし

B. 研究方法

1. 国内産玄米試料

平成 13 年度玄米を 21 道県から 24 試料、平成 14 年度産玄米については前年度の全国米生産量におおむね比例して 33 道府県から 100 試料を、各試料とも 2 kg 収集した。全国のプロック別の内訳を表 1 に示した。それぞれの玄米試料から 300 g を採り、サーモミックスで粉碎して分析試料とした。

表 1. 玄米試料のプロック別集計

生産プロック	分析試料数		
	平成 13 年	平成 14 年	合計
I	6	31	37
II	7	36	43
III	8	22	30
IV	3	11	14
合計	24	100	124

2. 機器

- (ア) 粉碎機：サーモミックス（フォアベルク日本）
- (イ) 精米機：中村式精米機ゆたか号（中村製作所）
- (ウ) 多機能固相抽出カートリッジ：**MultiSep # 227**（Romer 社）
- (エ) ガスクロマトー質量分析計（GC-MS）：**QP-5000**（島津製作所）
- (オ) **ECD** 検出器付ガスクロマトグラフ（GC-ECD）：**GC 5890 II**（Hewlett Packard 社）
- (カ) 液体クロマトー質量分析計（LC-MS）：**Agilent 1000 LC, Agilent 1100MSD SL**（Agilent 社）

3. 試薬

- (ア) 抽出溶媒：アセトニトリル-水（85:15）
- (イ) トリメチルシリル（TMS）化試薬（TBT 試薬）：トリメチルクロロシラン + *N,O*-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド + 1-トリメチルシリルイミダゾール（2 : 3 : 3、v/v/v）

4. 標準物質溶液の調製

DOM 標準溶液（0.1 mg/ml）と **NIV** 標準溶液（0.1 mg/ml）をそれぞれ希釈して 500 ng/ml とした。内標物質スシルペントリオール（SCP）の標準溶液（0.1 mg/ml）をエタノールで希釈して 500 ng/ml とした。

5. 試料溶液の調製

- (ア) 粉碎試料 50 g にアセトニトリル：水（85 : 15）200 ml を加え 30 分間振とうして抽出した。これを遠心チューブに移し、3000 rpm、10 分間で遠心分離した。
- (イ) 上澄み液を多機能固相抽出カートリッジ（MultiSep #227）に負荷してクリーンアップした。最初の 3.0 ml は捨て、次に 4.0 ml、2.0 ml、2.0 ml を順次バイアルに採り、それぞれをブロックバス上で気流下で濃縮乾固した。
- (ウ) 抽出溶液 4.0 ml を乾固した残渣にメタノール 1.0 ml を加えて、2 分間超音波処理して溶解し試料溶液とした。
- (エ) ミクロチューブに SCP 溶液 40 μl、試料液 500 μl を移して、40℃のブロックバス上で気流下で濃縮乾固した。
- (オ) これに TBT 試薬 25 μl を加え、密栓して 50℃で 10 分間反応させた。これにヘキサン 100 μl とリン酸緩衝液 200 μl を加え、ボルテックスで約 30 秒間攪拌してから、ヘキサン層を別のミクロチューブに採り、密栓してこれを分析試料溶液とした。

6. 定量

分析試料溶液 2.0 μl を GC-MS に注入し、試料溶液から得られたクロマトグラムを標準品のピークと比較して定性した。また内標物質（SCP）を用いたピーク面積法により作成した検量線（図 1）を用いて定量した。また、TMS 誘導体を GC-ECD 分析、あるいは誘導体処理せずに LC-MS を用いた定量・確認についても検討した。

7. GC-MS 分析条件

カラム：DB-1（内径 0.25 mm×長さ 30 m、膜厚 0.25 μm、J&W Scientific）、キャリアーガス及び流量：He ガス 2.0 ml/min、カラム温度：120℃（5 min）－6.4℃/min－280℃（30 min）、注入口温度：280℃、インターフェース温度：250℃、注入方式：スプリットレス、選択イオン：DON (m/z 422, 407); NIV (m/z 379, 289); SCP (m/z 277, 212)

8. LC-MS 分析条件

[LC]：カラム：Zorbax Eclipse XDB C18（内径 3 mm×長さ 150 mm、粒径 5 μm）；移動相：A:メタノール；B:10 mM 酢酸アンモニウム、10% A/B – (20 min) – 50% A/B；流速：0.5 ml/min；カラム槽温度：40℃；注入量：10 μl

[MS]：イオン化法：大気圧光イオン化負イオンモード、走査範囲：m/z 100-500、選択イオン：DON (m/z 355)；NIV (m/z 371)、噴霧ガス：N₂ (55 psi)、フラグメンター電圧：100 V、脱溶媒ガス：N₂ (7 L/min, 350℃)、気化温度：300℃

C. 結果

今回用いた抽出・クリーンアップ法は、麦類中の DON 及び NIV に適用する分析法³⁾を準用したものである。両トキシンを 5 μg/kg 及び 10 μg/kg 添加した時の回収結果（繰り返し 3 回）を表 2 に示した。DON に比べて NIV がやや低い回収率であったが、おおむね良好の結果であった。また、今回の分析条件での定量下限は、両トキシンとも 2.0 μg/kg であった。

表 2. 粉末玄米からのデオキシニパレノール (DON) 及びニパレノール (NIV) の添加回収結果

トキシン	添加濃度 (μg/kg)	繰り返し回数	回収率 (%)	標準偏差	変動係数 (%)
DON	5.0	3	104.3	7.1	6.8
	10.0	3	114.5	0.6	0.5
NIV	5.0	3	95.0	4.5	4.7
	10.0	3	81.3	10.5	12.9

平成 13 年度と 14 年度産の玄米のうち、汚染が認められた試料を取りまとめて表 3 に示した。合計 124 試料のうち、DON 汚染は 4 試料 (4.6 - 40.7 μg/kg、平均 21.8 μg/kg)、NIV 汚染は 15 試料 (2.0 - 17.4 μg/kg、平均 5.0 μg/kg) に認められ、DON と NIV の同時汚染は 1 試料 (78.1 μg/kg) であった。汚染試料の平均汚染濃度は DON 4.8 μg/kg、NIV 6.7 μg/kg、DON+NIV

9.0 µg/kg であり、加重平均汚染濃度はそれぞれ 0.7 µg/kg, 0.6 µg/kg, 1.3 µg/kg であった。

汚染が認められた玄米試料の代表的な GC-MS データを図 2 に示した。また、LC-MS を用いて DON 及び NIV を確認した結果を図 3 と図 4 に示した。

表 3. 玄米中のデオキシニパレノール (DON) 及びニパレノール (NIV)

の汚染濃度 (平成13年及び14年国内産玄米合計124試料)				
生産年	試料番号	汚染濃度 (µg/kg)		
		DON	NIV	DON+NIV
平成13年	13-3	5.1	ND	5.1
	13-4	16.8	ND	16.8
	13-12	ND	2.4	2.4
	13-13	ND	2.0	2.0
平成14年	14-14	ND	5.4	5.4
	14-16	ND	5.7	5.7
	14-17	ND	4.0	4.0
	14-18	ND	6.7	6.7
	14-42	ND	5.4	5.4
	14-43	ND	5.6	5.6
	14-61	ND	3.5	3.5
	14-68	ND	2.7	2.7
	14-69	ND	2.3	2.3
	14-70	60.7	17.4	78.1
	14-82	ND	2.5	2.5
	14-86	ND	6.3	6.3
	14-88	ND	3.4	3.4
	14-92	4.6	ND	4.6
	平均	4.8	6.7	9.0
	加重平均	0.7	0.6	1.3

DON 及び NIV による汚染状況をブロック別にまとめ、平成 13 年度を表 4 に、また平成 14 年度を表 5 に示した。DON 汚染は両年度ともブロック I (北東日本) の玄米 (37 試料中 4 試料) から認められた。また、NIV 汚染については、ブロック I が 37 試料中 9 試料 (2.3 - 17.7 µg/kg)、ブロック II (東部日本) が 43 試料中 5 試料 (2.0 - 3.4 µg/kg)、ブロック III (西部日本) が 30 試料中 1 試料 (6.7 µg/kg) であり、ブロック IV (西南日本、14 試料) からは検出されなかった。

今回の玄米試料を用いて、精米 (9 分搗き) によるトキシンの減衰の程度を検討した (表 6)。DON と NIV のいずれにおいても、低濃度汚染 (4.6-6.7 µg/kg) 玄米では、精米後の白米からはトキシンは検出下限 (2 µg/kg) 以下に減少した。これに対して米糠中のトキシン濃度は、玄米汚染濃度の 5-9 倍に増加した。また、今回の調査で最も高濃度で検出された玄米 (試料番号 70) では、精白米から玄米汚染量の約 40% の残存が認められ、米糠には約 60% のトキシンが移行した。(図 5 に GC-MS 分析結果を比較して示した。) さらに DON

または NIV が不検出であった多くの玄米では、精米後の米糠でもトキシンが検出されなかったが、試料番号 42 に示されるように玄米では検出されなかった DON が米糠から 10 µg/kg 検出された事例も認められた (図 6)。すなわち、今回の検出下限をさらに低くすることにより、玄米のトキシン汚染頻度はさらに高くなる可能性が示唆された。

表 4. 平成13年度産玄米のデオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) による汚染
(ブロック別集計)

ブロック	試料数	DON汚染		NIV汚染		(DON+NIV)汚染	
		汚染試料数	汚染濃度 µg/kg	汚染試料数	汚染濃度 µg/kg	汚染試料数	汚染濃度 µg/kg
I	6	2 (33.3%)	5.1-16.8	0		2 (33.3%)	5.1-16.8
II	7	0		2 (28.6%)	2.0-2.4	2 (28.6%)	2.0-2.4
III	8	0		0		0	
IV	3	0		0		0	
合計	24	2 (8.3%)	5.1-16.8	2 (8.3%)	2.0-2.4	4 (16.7%)	2.0-16.8

表 5. 平成14年度産玄米のデオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) による汚染
(ブロック別集計)

ブロッ ク	試料数	DON汚染		NIV汚染		(DON+NIV)汚染	
		汚染試料数	汚染濃度 µg/kg	汚染試料数	汚染濃度 µg/kg	汚染試料数	汚染濃度 µg/kg
I	31	2 (6.5%)	4.6-60.7	9 (29.0%)	2.3-17.4	10 (32.3%)	2.3-78.1
II	36	0		3 (8.3%)	2.5-3.4	3 (8.3%)	2.5-3.4
III	22	0		1	6.7	1	6.7

				(4.5%)		(4.5%)	
IV	11	0		0		0	
合計	100	2 (2%)	4.6-60.7	13 (13%)	2.3-17.4	14 (14%)	2.3-78.1

表 6. 玄米中のデオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) の精米後の分布

試料 番号	精米 画分	重量 (g)	DON濃度		NIV濃度	
			µg/kg	分布 (%)	µg/kg	分布 (%)
12	玄米	1000.0	ND		ND	
	白米	908.1	ND		ND	
	米糠	91.9	ND		ND	
14	玄米	1000.0	ND		5.4	
	白米	919.0	ND		ND	
	米糠	81.0	ND		27.3	
16	玄米	1000.0	ND		5.7	
	白米	927.5	ND		ND	
	米糠	72.5	ND		41.7	
18	玄米	1000.0	ND		6.7	
	白米	900.2	ND		ND	
	米糠	99.8	ND		47.9	
31	玄米	1000.0	ND		ND	
	白米	912.8	ND		ND	
	米糠	87.2	ND		ND	
42	玄米	1000.0	ND		5.4	
	白米	917.6	ND		ND	
	米糠	82.4	10.0		47.0	
43	玄米	1000.0	ND		5.6	
	白米	911.0	ND		ND	
	米糠	89.0	ND		35.0	
70	玄米	1000.0	60.7		17.4	
	白米	923.4	25.1	36.0	8.3	44.3
	米糠	76.6	538.9	64.0	127.2	55.7
86	玄米	1000.0	ND		6.3	
	白米	920.6	ND		ND	
	米糠	79.4	ND		43.8	
92	玄米	1000.0	4.6		ND	
	白米	912.3	ND		ND	
	米糠	87.7	24.2		ND	

(注) ND : 不検出 (2ng/g 以下)

D. 考察

今回の全国調査により、DON 及び NIV による国産米（玄米）の汚染がはじめて明らかとなった。これらのトキシンの検出頻度は 14.5% (18/124) であり、国産麦類のそれ¹⁾と比較すると低い結果であったが、国産玄米のフザリウムトキシシンによる汚染の潜在的な可能性を示すものとして認識する必要があると考えられる。

DON 及び NIV の汚染濃度については、汚染試料の平均濃度が 10 µg/kg 以下であり、加重平均値は 1.3 µg/kg と極めて低いレベルであった。この結果は、外国で報告されている米の DON 汚染濃度（4カ国、試料数合計 203、加重平均濃度 150 µg/kg）²⁾と比較しても格段に低いことを示している。

しかしながら汚染玄米を精米した場合、玄米中の DON 及び NIV 約 40%は精白米に残存することが示された。また、米糠には残りの約 60%が移行し、濃度は玄米の 5 - 9 倍に濃縮されることから、米糠の利活用の際に安全性の面から考慮すべきであろう。これらの点に関しては、今回は限られた試料について検討したものであり、今後より詳細に検討する必要がある。

今回の汚染結果をもとに日本人の米からの DON と NIV の摂取量を計算すると、以下のようになる。成人（体重 50kg）の米 1 日摂取量 158.9 g とし、DON あるいは DON+NIV の汚染濃度（加重平均それぞれ 0.7 µg/kg, 1.3 µg/kg）から求めた成人 1 人当りの暴露量は DON が 122 ng、DON+NIV が 226 ng となり、体重 1kg 当りのトキシシン摂取量はそれぞれ DON 2.44 ng 及び DON+NIV 4.52 ng となる。これらの値は DON では PMTDI の 0.22%、DON+NIV（NIV が DON と同等の毒性であると仮定して）では 0.41%に相当する。さらに、今回認められた最大汚染濃度をもとに計算しても、PMTDI の 25%程度である。これらの評価結果から見て、今回認められた玄米の汚染レベルでは、人の健康に直ちに影響を及ぼすものではないと判断できる。

今回の調査結果をブロック別に見ると、DON 汚染はブロック I に、また NIV 汚染は主にブロック I と II に認められ、地域によっては約 30%の汚染頻度であった。米の汚染に関し地域的差異の可能性が示唆されることから、今後継続して実態を調査することが必要と考えられる。

[文献]

- 1) 平成 13 年度厚生科学特別研究報告書（主任研究者 熊谷 進）、「食品中のかび毒のリスクアセスメントに関する研究」
- 2) WHO: Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additive Series 47. World Health Organization, Geneva, 2001.

- 3) 厚生労働省 食発第 **0521001** 号、小麦中のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について(平成 **14** 年 **5** 月 **21** 日)
- 4) **Yoshizawa, T.: Red-mold disease and natural occurrence in Japan. In Trichothecenes – chemical, biological and toxicological aspects (ed. Y. Ueno). pp. 195-209, Elsevier. Amsterdam. 1983.**

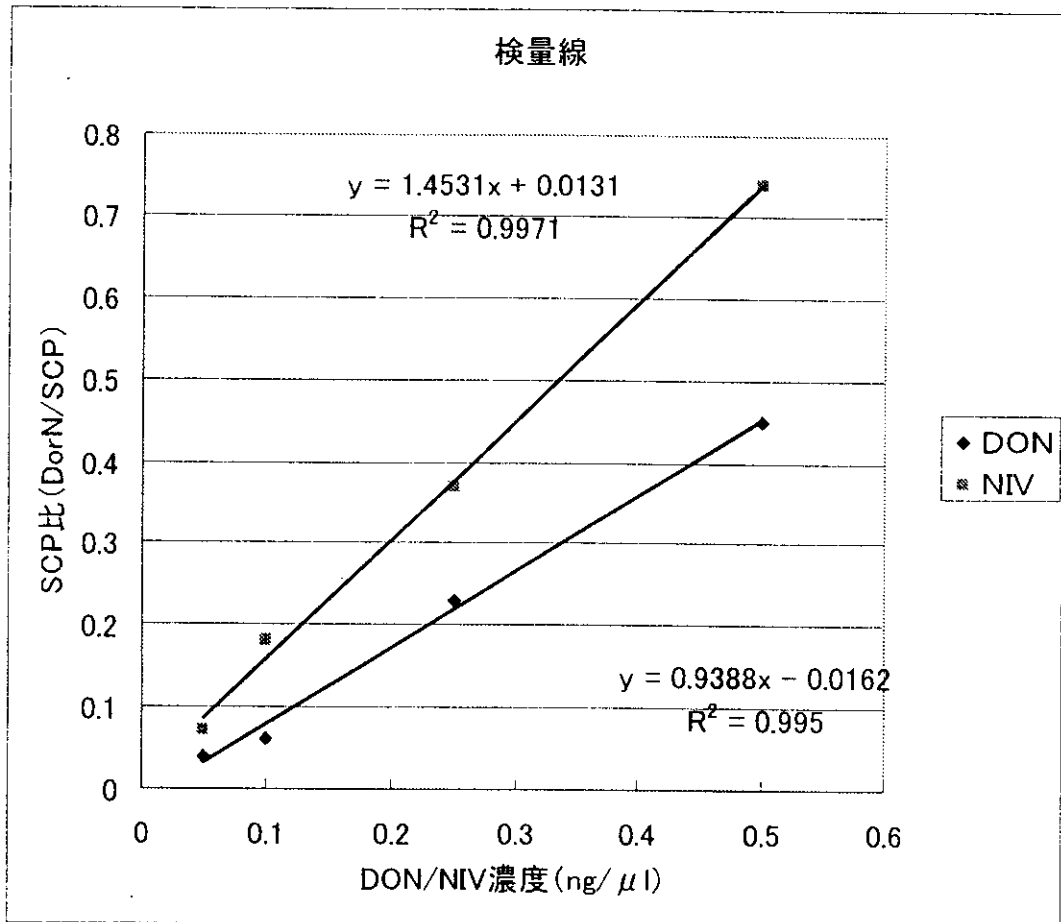


図1. デオキシニバレノール (DON) 及びニバレノール (NIV) の検量線
 TMS誘導体をGC-MS (SIM) で分析 (選択イオンは本文に記載)
 内標物質としてスシルペントリオール (SCP) を使用