

- (6) 酢酸(特級)
- (7) 酢酸溶液(pH4)——蒸留水にpHメータで測定しながら酢酸を加え、pH4に調製する。
- (8) LC用溶離液 アセトニトリル(LCグレードまたは同等のもの)/蒸留水(LCグレードまたは同等のもの)を4:96の割合で調製する。
- (9) 標準品および標準溶液の作成  
 パツリン(Hydroxy-4H-furo(3,2-c)pyran-2(6H)-one)98%以上を含む(融点は110~111℃)標準品を購入し、5mgを秤量し5mlの酢酸エチルに溶かす。それを25mlメスフラスコに移し、酢酸エチルでメスアップをする。この液をストック溶液として-20℃で保存する(数カ月は安定)。さらにストック溶液から1,000μLを正確に測り取り窒素を吹き付けて乾固させたのち、直ちに20mlのエタノールまたはアセトニトリルを加え、約10μg/mlパツリン標準溶液を作成す

る。この標準液は4℃で数カ月は安定である。パツリンの正確な濃度は、276nmでの吸光度を測定したのち以下の式から求めることができる。

$$\text{パツリン}(10\mu\text{g}/\text{mL}) = \{276\text{nmでの吸光度} \times \text{分子量}(154\text{ダルトン}) \times 1,000 \times \text{クオーツセルの補正係数}\} / \text{エタノール中でのパツリンの} 276\text{nmでの吸光度}(14,600\text{L}/\text{mol}\cdot\text{cm})$$

- (10) 検量線用標準溶液——パツリン標準溶液から、最終濃度が0.05μg/ml, 0.1μg/ml, 0.25μg/ml, 0.5μg/mlになるように酢酸溶液(pH4)を加え、調整する。

### 3 試験溶液の調製

- (1) 抽出および精製

検体5.0g(希釈して飲用に供する清涼飲料水ではその飲用に際して希釈する倍数の水で、濃縮した原料用果汁にはその濃縮した倍数の水で希釈し

## ◆ ご案内 ◆

正しいデータの扱い方とその意味を知る——統計の総合的復習に最適!

# 「統計的手法マスター講座」通信講習会

一文部科学省認定・厚生労働大臣指定コース  
 教育訓練給付制度により国から講習料の補助あり—

### 〈 概 要 〉

- 文部科学省認定通信教育システムによる、統計通信講習会の受講者を募集中です。
- 統計を体系的に学びたい方、さらに理解を深めて実務に役立たせたい方に最適です。
- とかく難解になりがちな統計理論を、できるだけ平易に、かつ最新の手法を網羅。
- 修了証書を発行。成績優秀者には文部科学大臣賞・研究所賞を授与。なお、認定試験合格者には「統計士」資格証書を授与。

## 統計資料を無料進呈!

◆ 請求先=ハガキかTEL・FAXで下記まで!  
 〒160-0015 東京都新宿区大京町4の408  
 財団法人 実務教育研究所 講習会本部  
 「統計的手法マスター講座」係  
 TEL 03 (3357) 8153 FAX 03 (3358) 7259  
 ※ホームページでも資料請求ができます。

<http://www.jitsumu.or.jp>

### 〈 内 容 〉

- 1 統計とは何か。統計は何を表わすか。統計的規則性。確率の概念と基本定理。他。
- 2 比率。速関表の解析。平均値と分散の計算。分散と標準偏差。中央値とレンジ。度数分布による平均値・分散の計算。相関・回帰の意味。相関係数についての注意。他。
- 3 母集団と標本の例。標本の取り出し方。正規分布。2項分布。ポアソン分布。他。
- 4 検定の考え方と方法。推定の考え方と方法。平均値・分散に関する推定と検定。他。
- 5 回帰式の意味と計算。回帰と相関。重回帰の考え方と分析。曲線回帰と順位相関。他。
- 6 調査の企画と方法。調査票の設計。統計表の作り方。統計図表・グラフの作り方。他。
- 7 標本設計の基本問題。各種の抽出方法。単純無作為抽出法。ゾーンわけ抽出法。他。
- 8 品質管理と抜取検査。実験計画法とは。分散分析法の手順。因子と水準の選び方。他。

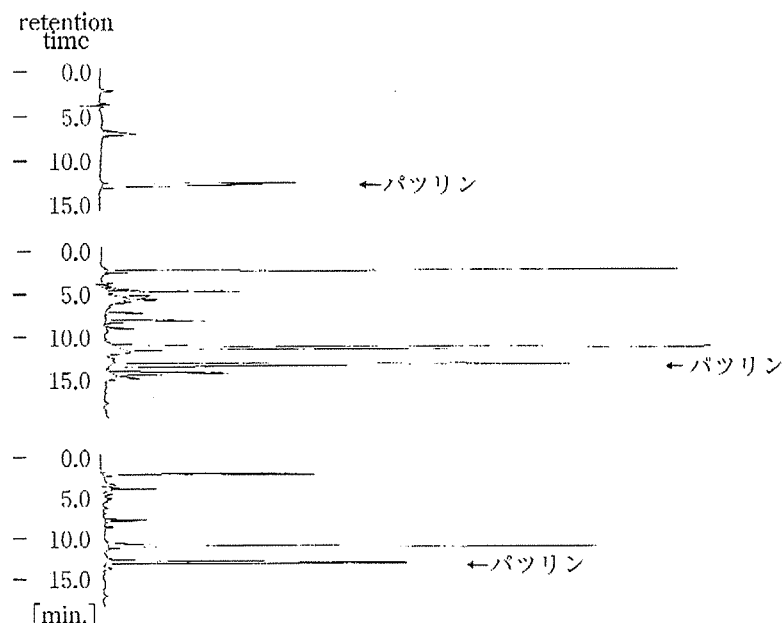


図1 HPLCのクロマトグラム(上図：パツリン標準液の276nmでのクロマトグラム，中図：りんご果汁(パツリン48ng/g自然汚染)の276nmでのクロマトグラム，下図：りんご果汁(パツリン48ng/g自然汚染)の290nmでのクロマトグラム)

測定条件；HPLC：島津LC-10，UV検出器：島津SPD-10Av，カラム：マイトシルRP-18G(4.6mmφ×250mm)，他の条件は告示法と同じ。

たもの)を正確に採り，30～50mlの栓付き試験管に入れ，酢酸エチル10mlを加え1分間激しく攪拌し，酢酸エチル層(上層)を採取し抽出液とする。残った水層(下層)に再度酢酸エチル10mlを加え，1分間激しく攪拌し，酢酸エチル層(上層)を採取し，先の抽出液と合わせる。同様の操作を再度繰り返す。ここで得られた抽出液に，1.5%炭酸ナトリウム溶液2mlを加え30秒間激しく攪拌する。酢酸エチル層(上層)を採取し，漏斗に約5gの硫酸ナトリウムを上積したものに通し，脱水ろ過しながらナス型フラスコにいれる。さらに残りの炭酸ナトリウム層(下層)に再度酢酸エチル5mlを加え激しく攪拌する。酢酸エチル層(上層)を採取し，先の硫酸ナトリウムを洗いながら脱水ろ過する。脱水後の酢酸エチルを40℃以下で，ロータリーエバポレーターによりほとんどの溶媒を除去し，試料溶液とする。

ナス型フラスコ中の試料溶液を少量の酢酸エチルで洗いながら，スピッツガラス試験管またはバ

イアル等に移し，その後窒素吹き付け装置で濃縮乾固する。酢酸溶液(pH4)1.0mlを正確に加え，試験管ミキサー・超音波装置で攪拌し，0.45μmのフィルターでろ過した液を，高速液体クロマトグラフィー用試験溶液とする。

#### (2) 検量線の作成

検量線用標準溶液を用いて検量線を作成する。この検量線を用いて，試験溶液から得られたクロマトグラムについて定量する。

試料中のパツリン量は次式によって算出する。

$$\text{パツリン濃度(ng/g)} = A(\text{測定値, ng/ml}) \times 1 \text{ ml} / (\text{最終溶液量, 上記の条件では1 ml}) / \text{試料(g)}$$

#### 4 操作条件

カラム充てん剤：シラノール基のフルエンドキャップ処理済みオクタデシルシリル化シリカゲル(粒径5μm)を用いる。

カラム管：内径4.0～4.6mm，長さ250mmのステンレス管を用いる。

カラム温度：40℃

検出器：波長276 nmまたは290 nmで操作する。

移動相：アセトニトリルおよび水の混液(4:96)を用いる。

流速：パツリンが約14分で流出する流速に調整する(約1 ml/分)。

なお、パツリン標準品および天然汚染りんごジュースを試料とした場合に得られた高速液体クロマトグラムのクロマトパターンを図1に示した。

## 5 留意点

### (1) 試験対象

りんごジュースには大別すると混濁タイプとクリアタイプがある。混濁タイプでは、抽出過程において、酢酸エチル層との分離がやや悪い場合があるが、遠心分離法(3,000回転, 3分)を用いると分離が速やかに行える。操作において最も留意しなくてはならないことは、アルカリ洗浄に費やす時間である。パツリンはアルカリにより速やかに分解するため、この操作は迅速に行わなくてはならない。また、熱をかけての乾固によって減衰する可能性が高いので、濃縮乾固も迅速にする必要がある。脱水を目的とした硫酸ナトリウムの上積は、液層分離ろ紙でも代用ができる。その一例として、75φのガラスロートに液相分離ろ紙(Whatman 1PS同等品)をなるべく折目をつけないように漏斗台に置き、必要があればクリップなどで固定し、ナス型フラスコをその下にセットして、分液漏斗中の酢酸エチル層を脱水ろ過する方法がある。

### (2) 測定装置および分析法

使用するカラムはシラノール基のフルエンドチップ処理済み25 nmポアサイズおよびエンドチップ処理済み炭素重量12%または12 nmポアサイズおよび炭素重量17%が適当である。

りんごジュースに含まれるHMF(5-Hydroxy-

methyl-furfuralとパツリンとが必ず独立したベースラインを確保できるピークが得られる条件に設定することが重要である。告示法で示した移動相において独立したピークが確保しにくい場合には、移動相の割合を変更することも効果がある。次の移動相も使用できる：①60%過塩素酸を容量当たり0.095%含む水にアセトニトリルを3~10%を加える。②0.05%のTFA含有水に2%アセトニトリルを加える。また、276 nmで検出する場合、パツリンの溶出位置付近に疑似ピークが認められることがあるが、この疑似ピークの多くは290 nmでは検出されないことから、パツリンの定性・定量を290 nmによる検出で行ってもかまわない。この場合、パツリンの検出感度は276 nmにおける検出感度より2割程度低くなる。

高速液体クロマトグラフィーの検出限界は0.01 μg/gであることから、標準溶液は、パツリン標準原液から最終濃度が0.05 μg/ml, 0.1 μg/ml, 0.25 μg/ml, 0.5 μg/mlになるように酢酸溶液(pH4)を加え、調整する。

カラムから妨害ピークが検出された場合はステップグラジエントなどで洗浄する。洗浄のためのグラジエントの一例を示す。

(4.6 mm × 250 mmのカラムの場合)

グラジエント：ステップグラジエント

0 ~ 25 min. アセトニトリル：蒸留水 = 4 : 96

25 ~ 30 min. アセトニトリル：蒸留水 = 80 : 20

30 ~ 35 min. アセトニトリル：蒸留水 = 4 : 96

35 ~ 55 min. アセトニトリル：蒸留水 = 4 : 96

## III 確認試験

### 1 ガスクロマトグラフ・質量分析計を用いて試験を行う場合

試薬として0.25%のトリメチルシリル化剤N,O-ビス(トリメチルシリル)(トリフルオロアセ

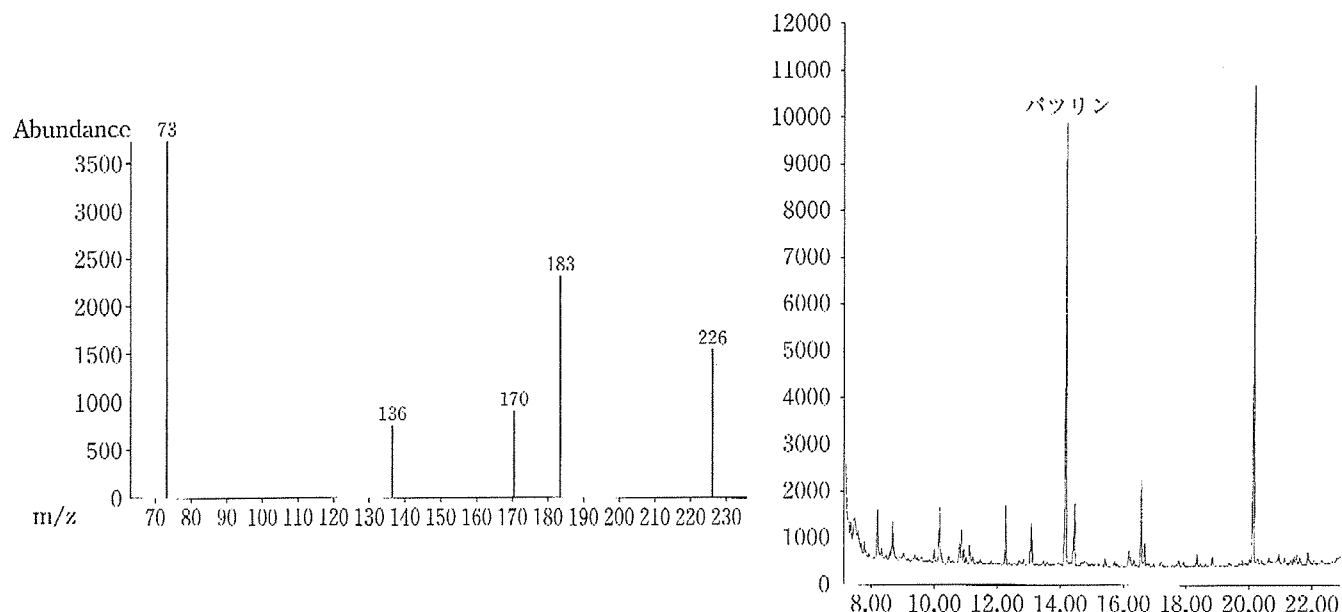


図2 パツリン標準品のGC/MSにおけるマススペクトル(左図)とパツリン添加りんご果汁のSIM(右図)  
 測定条件；GC：Agilent 6890N，カラム：PBX35(0.22mm×2.5m)，カラム温度：80℃(2min.)→150℃  
 (10℃/min.)→230℃(5℃/min.，15min.)，検出：Agilent 5973，キャリアーガス：He(100kPa)

トアミド0.5mlに酢酸エチルを加えて20mlとしたものを用いる。定性・定量試験と同様の方法で抽出精製した残留物にトリメチルシリル化剤0.5mlを加え，栓をして振り混ぜた後，室温で60分間放置し，これを試験溶液とする。試験結果は，同様の方法でシリル化したパツリン標準溶液と一致しなければならない。試験結果はパツリン標準溶液について試験溶液の調製のガスクロマトグラフ・質量分析計用試験溶液と同様に操作をして得られたものと一致しなければならない。また，必要に応じ，ピーク高法またはピーク面積法により定量を行う。

操作条件は次のとおりである。

カラム：内径0.25～0.25mm，長さ25～30mのケイ酸ガラス製の細管に，ガスクロマトグラフィー用35%フェニルポリシルフェニレンシロキサンを0.25～1.5μmの厚さでコーティングしたもの。  
 カラム温度：80℃で2分間保持し，その後毎分10℃で昇温する。150℃に到達後，毎分5℃で昇温し，230℃に到達後15分間保持する。

試験溶液注入口温度：230℃

注入方式：スプリットレス

検出器：230℃で操作する。

ガス流量：キャリアーガスとしてヘリウムを用いる。パツリンが約14分で流出する流速に調整する。

図2にパツリンの標準品を用いた時のGC-MSによるスペクトラルおよびパツリンを添加したりんご果汁のSIMの一例を示した。

## 2 高速液体クロマトグラフ・質量分析計(LC-MS)を用いて試験を行う場合

定性試験と同様の操作条件で液体クロマトグラフィー・質量分析を行うことができる。また，必要に応じてピーク高法またはピーク面積法により定量を行う。

図3にLC-MSで測定した一例を示した。なお告示で示された方法には含まれてはいないが，参考までに高速液体クロマトグラフ・三連四重極質量分析計(LC-MSMS)における分析例を図4に示した。

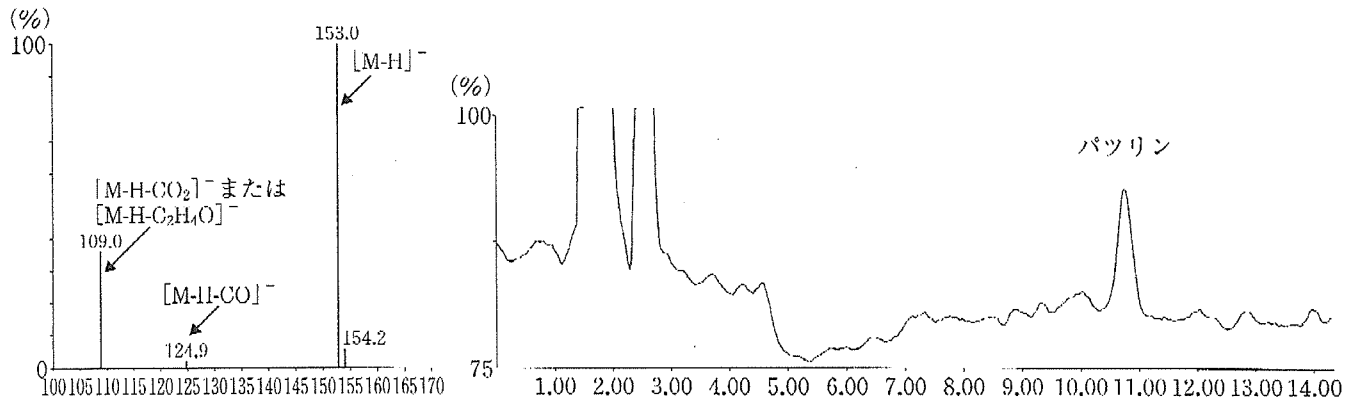


図3 パツリン標準品のLC/MSのマスペクトル(左図)とパツリン添加りんご果汁(8 ng/g パツリン)のSIR(右図)測定条件; HPLC: Waters 2695, MS: ZQ2000, カラム: Atlantis dC18 4.6 mmφ × 150 mm 3 μm, 移動相: H<sub>2</sub>O: CH<sub>3</sub>CN: 10 mM NH<sub>4</sub>Oac (87: 3: 10), 流速: 1.0 ml/min., カラム温度: 40 °C, 注入量: 50 μL, 分析時間: 15 min., イオン化モード: ESI ネガティブ, モニターイオン: SIR m/z 153.0, コーン電圧: 20 V, ソース温度: 120 °C, Dwell: 2 sec.

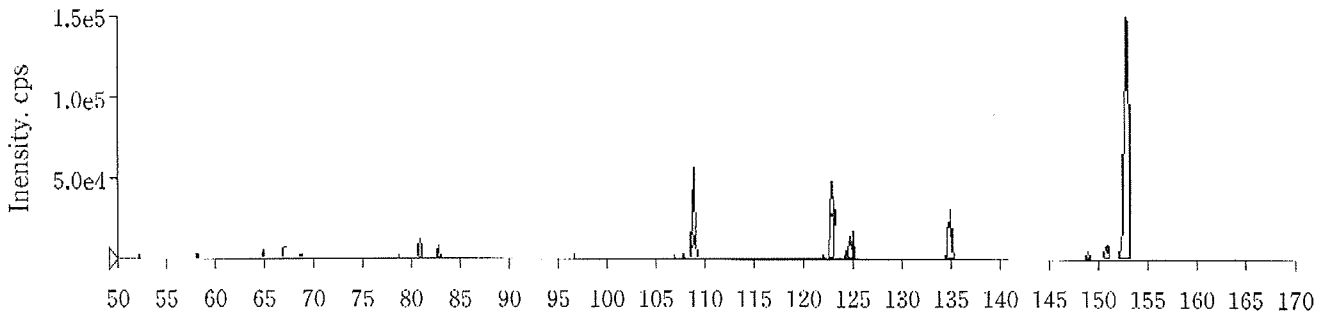


図4 りんご果汁(パツリン7 ng/g 自然汚染)のLC/MSMS スペクトル  
測定条件; HPLC: Agilent 1100 series, MS/MS: API2000 QTRAP, カラム: Atlantis C18 (3 μm, 2.1 mm φ × 150 mm), 移動相およびグラジエント条件: A液 2 mM 酢酸アンモニウム B液 アセトニトリル, A/B: 95/5 (0-9 min.), A/B: 10: 90 (9-15 min.), A/B: 95/5 (15.1-20 min.), 流速: 0.2 ml/min., カラム温度: 室温, 注入量: 25 μL, イオン化モード: EPI ネガティブ, モニターイオン: Q1 153/Q3 109 m/z, 分析時間: 20分, コーン電圧: 20V

#### IV おわりに

本告示法に、「同等以上の性能を有すると認められる試験法」の記載があるが、これは、告示において示されている試験法と比較して、真度、精度、特異性および検出限界において同等または優れて

いる試験法のことを意味する。各試験機関においてこれまで行ってきた試験法が、本試験法と同等かそれ以上であればそのまま使用しても差し支えなく、また、本試験法を各機関で工夫しても問題はない。

#### 参 考 文 献

AOAC official method 995.10 Patulin in Apple juice in AOAC official method of analysis (2000), Natural Toxins, Chapter 49, p51

Short communication

## Placental and milk transmission of trichothecene mycotoxins, nivalenol and fusarenon-X, in mice

Amnart Poapolathep<sup>a</sup>, Yoshiko Sugita-Konishi<sup>c</sup>, Tulayakul Phitsanu<sup>b</sup>,  
Kunio Doi<sup>a</sup>, Susumu Kumagai<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Veterinary Pathology, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>b</sup>Department of Veterinary Public Health, University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>c</sup>Department of Microbiology, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 3 February 2004

### Abstract

In order to investigate the transfer of nivalenol (NIV) and fusarenon-X (FX) from pregnant to fetal mice and from lactating to suckling mice, <sup>3</sup>H-NIV or <sup>3</sup>H-FX was given p.o. to pregnant or lactating mice. Radioactivity was detected in the whole fetal tissues as well as the fetal liver and kidney, the levels being comparable to those of the maternal tissues. Radioactivity was also detected in the milk, and liver and kidney tissues taken from suckling mice of both <sup>3</sup>H-NIV or <sup>3</sup>H-FX administered dams. HPLC analysis of fetal tissue homogenates from non-labeled FX- or NIV-administered pregnant mice revealed transmission of NIV to fetuses after administration of either toxin. In mice given the non-labeled FX, major and minor peaks of NIV and FX on HPLC were noted in suckling pup tissue homogenates. The results demonstrate that NIV transfers in unchanged form to fetal or suckling mice via placenta or milk, respectively, and that FX does so mainly after being metabolized to NIV in maternal body. © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Nivalenol; Fusarenon-X; Milk transmission; Placenta transmission

Nivalenol (NIV; 3,4,7,15-tetrahydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-one) and 4-acetylnivalenol (fusarenon X, FX; 3,7,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-one) are trichothecene mycotoxins mainly produced by *Fusarium nivale* and *F. crookwellense*, which occur naturally in crops such as wheat and barley (IARC, 1993). Previously, we found that FX given orally is rapidly converted to NIV in mice (Poapolathep et al., 2003). The primary targets of these mycotoxins in the animal body are organs containing actively dividing cells such as the small intestine, thymus, spleen, bone marrow and testes (IARC, 1993). Toxic effects have also been observed in fetuses of pregnant animals given FX and other trichothecenes such as T-2 toxin and deoxynivalenol (Ito et al., 1980; Rousseaux and Schiefer, 1987; Lafarge-Frayssinet et al., 1990; Debouck et al., 2001). In the fetuses, impairment of the function of splenic

and thymic T cells (Lafarge-Frayssinet et al., 1990) and apoptosis in these cells (Ishigami et al., 1999) were noted. Such changes resembling typical trichothecene-induced changes might indicate transplacental transfer of the toxins. However, there is no direct evidence of transplacental transfer of NIV and FX, although radioactivity transfer from pregnant mice given radiolabeled T-2 toxin to fetuses has been observed (Lafarge-Frayssinet et al., 1990). Also little is known about the transfer of NIV and FX from lactating to suckling animals via milk. The purpose of this study was to elucidate whether NIV and FX transfer from pregnant mice to fetuses across the placenta, and from lactating to suckling mice via milk.

<sup>3</sup>H-FX (specific activity, 2 Ci/mmol, prepared by tritiation procedure) purchased from SibTech Co., Inc., (CT, USA) or <sup>3</sup>H-NIV prepared by chemical conversion of <sup>3</sup>H-FX (Poapolathep et al., 2003) dissolved in PBS was orally administered to eight pregnant ICR mice (Japan SLC Inc., Japan) at the 17th day of pregnancy at a dose of

\* Corresponding author. Fax: +81-3-5841-5469.

E-mail address: askuma@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp (S. Kumagai).

3,060,000 dpm (900 ng NIV; 40 mg/kg b.w.) and 3,030,000 dpm (815 ng FX; 43 mg/kg b.w.), respectively. At 6 or 24 h after toxin administration, blood specimens were taken by heart puncture, and urine from the urinary bladder, from pregnant mice under chloroform anesthesia. Radioactivity of blood plasma and urine was counted in a liquid scintillation counter (Packard, Instrument Co., Inc., CT, USA) using ACS II (Packard) as the scintillation cocktail. The liver, kidney, uterus and placenta were removed from the pregnant mice, and the liver and kidney from the fetuses. These tissues and the whole fetuses were combusted in an oxidizer (Model 306, Packard), and the  $^3\text{H}$  trapped in water was counted in the liquid scintillation counter using Monophase S (Packard) as the scintillation cocktail.

The radioactivity levels of the placenta, plasma and urine of the dams, and of the whole fetuses, were significantly higher in the mice given  $^3\text{H}$ -FX than those given  $^3\text{H}$ -NIV (Table 1). The difference between FX and NIV may reflect a more efficient intestinal absorption of FX compared to that of NIV, as was found in our previous study (Poapolathep et al., 2003). The levels of the fetal tissues were comparable to those of the maternal tissues except for the liver levels in the  $^3\text{H}$ -NIV treated mice at 6 h (Table 1). The levels of the whole fetus were higher than those of the maternal plasma (Table 1).

In order to find whether the toxins transfer in un-metabolized forms across the placenta, FX or NIV was given orally to pregnant mice at a dose of 0.5 mg/kg b.w., and the fetal liver was removed at 8 h and homogenized with PBS. The tissue homogenates were analyzed for NIV or FX with HPLC after extraction with acetonitril and cleanup with a Sep-pak silica cartridge (Waters Corp., MS, USA) as described previously (Poapolathep et al., 2003). NIV was detected in the fetal tissues in mice given NIV (data not shown). In the mice given FX, NIV was detected as a large

peak on HPLC, while FX was not identified as a clear peak (data not shown). Taken together with the findings of radioactivity levels, these results indicate that NIV distributes in fetal tissues after transferring across the placenta. Detection of only NIV in the fetuses of the mice given FX is consistent with our previous finding that FX is rapidly converted to NIV by the liver (Poapolathep et al., 2003).

Whether FX and NIV transfer from lactating mice to suckling mice via milk was studied by oral administration of  $^3\text{H}$ -FX or  $^3\text{H}$ -NIV in six lactating mice (Japan SLC Inc., Japan) at the third day of lactation in the same manner as in the pregnant mice. At 4, 8 or 24 h after toxin administration, blood specimens were taken by heart puncture from the dams and pups, and the liver and kidney were removed from the pups, under chloroform anesthesia. Milk was also taken from the stomach of the pups, mixed well with equal amount of PBS and then separated to milk whey, fat and casein acid fractions by adding HCl and centrifuging at a speed of 3000 rpm. For the tissues and milk casein, radioactivity was counted after combustion in the oxidizer, and for the other samples, radioactivity was counted directly by the scintillation counter as described above.

In the mice given  $^3\text{H}$ -NIV, radioactivity levels of the plasma in the suckling pups were comparable to those of their dams (Table 2). Radioactivity was also detected in the plasma of the pups of the dams given  $^3\text{H}$ -FX, although the level in the pups was 1/3 of that in the dams (Table 2). A radioactivity level similar to or higher than that of the pup plasma was noted in the milk casein (Table 2). In order to find whether the toxins are secreted in milk in an un-metabolized form, FX was given to lactating mice at a dose of 0.5 mg/kg b.w., and milk taken from their pups at 8 h was analyzed with HPLC in the same manner as for the fetal liver. HPLC revealed major and minor peaks at the location of NIV and FX, respectively (data not shown).

Table 1  
Distribution of radioactivity in maternal and fetal mice after  $^3\text{H}$ -NIV or  $^3\text{H}$ -FX administration

	$^3\text{H}$ -NIV		$^3\text{H}$ -FX	
	6 h	24 h	6 h	24 h
<i>Maternal</i>				
Plasma	7.22 ± 0.10*	3.20 ± 0.37	25.3 ± 7.53	5.46 ± 0.28
Liver	14.9 ± 2.67	2.17 ± 0.06	12.8 ± 1.35	7.34 ± 0.68
Kidney	6.10 ± 0.32	2.35 ± 0.06	12.5 ± 4.62	5.52 ± 0.19
Placenta	5.34 ± 1.16	2.62 ± 0.40	12.6 ± 1.99	5.31 ± 0.68
<i>Fetal</i>				
Whole tissues	11.3 ± 1.28	5.19 ± 0.69	48.4 ± 2.41	18.5 ± 1.20
Liver	4.73 ± 0.54	2.27 ± 0.15	7.57 ± 0.49	6.68 ± 0.09
Kidney	5.92 ± 0.22	5.48 ± 1.76	7.34 ± 0.80	9.69 ± 0.72
<i>Maternal</i>				
Urine	116 ± 7.66	33.4 ± 6.67	780 ± 37.9	16.1 ± 0.58

\*Values are mean ± SD expressed as  $10^{-2}\%$  of administered dose per gram or milliliter of tissues or plasma, respectively.

Table 2  
Distribution of radioactivity in lactating and suckling mice after  $^3\text{H-NIV}$  or  $^3\text{H-FX}$  administration

	$^3\text{H-NIV}$			$^3\text{H-FX}$		
	6 h	8 h	24 h	6 h	8 h	24 h
<i>Maternal</i>						
Plasma	9.68 ± 1.23*	7.86 ± 0.46	6.68 ± 0.45	30.0 ± 0.09	29.0 ± 0.22	20.4 ± 2.20
<i>Suckling</i>						
Plasma	7.65 ± 1.23	6.99 ± 1.26	7.63 ± 1.22	10.4 ± 1.70	12.7 ± 2.24	11.4 ± 0.81
Liver	1.34 ± 0.36	1.51 ± 0.16	1.51 ± 0.23	2.88 ± 0.12	3.56 ± 0.35	4.46 ± 0.06
Kidney	2.20 ± 0.40	4.00 ± 1.73	3.72 ± 0.13	4.03 ± 0.53	3.64 ± 0.03	3.11 ± 0.46
<i>Milk</i>						
Whey	3.93 ± 0.11	3.19 ± 0.58	3.22 ± 0.62	5.14 ± 1.34	4.23 ± 0.59	5.38 ± 0.38
Fat	1.21 ± 0.13	1.01 ± 0.14	1.27 ± 0.20	1.75 ± 0.41	1.28 ± 0.05	1.12 ± 0.06
Casein acid	7.88 ± 0.78	61.2 ± 1.88	2.59 ± 0.29	19.7 ± 0.61	25.0 ± 2.10	14.3 ± 0.59

\*Values are mean ± SD expressed as  $10^{-2}\%$  of administered dose per gram or milliliter of tissues or plasma, respectively.

Thus, the findings in the lactating and suckling mice demonstrate that NIV and FX secreted in milk distribute in the suckling pup body. Although transmission of deoxynivalenol and T-2 toxin to milk has been studied in the toxin-treated lactating sow, cow and sheep (Robison et al., 1979; Yoshizawa et al., 1981; Prelusky et al., 1984, 1987), there are no data for NIV and FX in milk of farm animals. The results of this study indicate the importance of a survey of natural contamination of milk with the toxins from the viewpoint of the safety of milk and milk products as foods.

Viewing that the plasma radioactivity level in the lactating mice decreased slowly from 4 or 8 h to 24 h compared with the level in the pregnant mice (Tables 1 and 2) or the cycling female mice (Poapolathep et al., 2003), metabolism of NIV and FX could change with reproductive stages. Although we found previously no metabolic pathways other than a change of FX to NIV in cycling female mice, detailed features of metabolism of the toxins should be elucidated in the future using animals at different reproductive stages.

## References

- Debouck, C., Haubruge, E., Bollaerts, P., vanBignoot, D., Brostaux, Y., Wery, A., Rooze, M., 2001. Skeletal deformities induced by the intraperitoneal administration of deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. *Int. Orthop.* 25, 194–198.
- IARC, 1993. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenon-X, In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 56. International Agency for Research of Cancer, Lyon, France, pp. 397–444.
- Ishigami, N., Shinozuka, J., Katayama, K., Uetsuka, K., Nakayama, H., Doi, K., 1999. Apoptosis in the developing mouse embryos from T-2 toxin-inoculated dams. *Histol. Histopathol.* 14, 729–733.
- Ito, Y., Ohtsubo, K., Saito, M., 1980. Effects of fusarenon-X, a trichothecene produced by *Fusarium nivale*, on pregnant mice and their fetuses. *Jpn. J. Exp. Med.* 50, 167–172.
- Rousseaux, C.G., Schiefer, H.B., 1987. Maternal toxicity, embryo-olethality and abnormal fetal development in CD-1 mice following one oral dose of T-2 toxin. *J. Appl. Toxicol.* 7, 281–288.
- Lafarge-Frayssinet, C., Chakor, K., Lafont, P., Frayssinet, C., 1990. Transplacental transfer of T-2 toxin: pathological effect. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10, 64–68.
- Poapolathep, A., Sugita-Konishi, Y., Doi, K., Kumagai, S., 2003. The fates of trichothecene mycotoxins, nivalenol and fusarenon-X, in mice. *Toxicol* 41, 1047–1054.
- Prelusky, D.B., Trenholm, H.L., Lawrence, G.A., Scott, P.M., 1984. Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows. *J. Environ. Sci. Health B* 19, 593–609.
- Prelusky, D.B., Veira, D.M., Trenholm, H.L., Foster, B.C., 1987. Metabolic fate and elimination in milk, urine and bile of deoxynivalenol following administration to lactating sheep. *J. Environ. Sci. Health B* 22, 125–148.
- Robison, T.S., Mirocha, C.J., Kurtz, H.J., Behrens, J.C., Chi, M.S., Weaver, G.A., Nystrom, S.D., 1979. Transmission of T-2 toxin into bovine and porcine milk. *J. Dairy Sci.* 62, 637–641.
- Yoshizawa, T., Mirocha, C.J., Behrens, J.C., Swanson, S.P., 1981. Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. *Food Cosmet. Toxicol.* 19, 31–39.



## Toxicity of mycotoxins related with head blight diseases in wheat and establishment of provisional standard for tolerable level of DON in wheat

Yoshiko SUGITA-KONISHI\*<sup>1</sup> and Susumu KUMAGAI\*<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup> Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences  
(1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 156-8501 Japan)

\*<sup>2</sup> Department of Veterinary Public Health, University of Tokyo  
(1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657 Japan)

**Key words** : mycotoxins, head blight diseases, deoxynivalenol, provisional standard

(Received: October 6, 2004)

### Introduction

In Japan there are some pathogens responsible for causing fusarium head blight of wheat. These pathogens belong to *Fusarium* species (*Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. kyushuense*, *Microdochium nivale* (formerly *F. nivale*)). The principal toxins produced by these *Fusarium* species are trichothecenes, such as deoxynivalenol (DON), 3-acetyledoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyledoxynivalenol (15-ADON), Diacetoxyscirpenol (DAS), nivalenol (NIV), fusarenon X (FX), T-2 toxin and Zearalenone (ZEN).

Among these mycotoxins, DON, T-2 toxin and HT-2 toxin were evaluated at the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) in 2001. As for DON, the provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) has been established a level of 1 µg/kg of body weight per day, based on the results of a 2-year feeding study in mice. With the determination of PMTDI for DON, the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan has started the study and surveillance on the risk assessment of DON in cereals to set the standard from 2001 and they have recommended a level of 1.1 mg/kg of DON in wheat as the provisional standard in 2002.

This paper aims to introduce the toxicities of mycotoxins related with fusarium head blight and the ground of setting the provisional standard.

### Toxicities of trichothecene mycotoxins and zearalenone

Trichothecene mycotoxins, especially T-2, HT-2, DON and NIV possess common biochemical and cellular toxicities. These are 1) the strong inhibitory effect on the protein synthesis by binding to the ribosomes. 2) the inhibitory effect on RNA and DNA synthesis. 3) toxic effects on cell membranes (it seems to be anti-oxidation reaction). Also, their capacity to inhibit protein synthesis is thought to induce apoptosis in thymus, lymphatic and haematopoietic tissue via mitogen activated

protein kinases (MAP kinases)<sup>1,2</sup>. The different trichothecenes differ the inhibitory activity.

For T-2 toxin, HT-2, DON and NIV, general toxicity and immunotoxicity of trichothecenes are considered to be critical effects. The crops contaminated with trichothecens resulted in serious food poisoning with nausea, vomiting and diarrhea. After the World war II, the critical food poisoning occurred by millet in Russia. This disease caused the decrease of circulating white blood cell number. It is called alimentary toxic aleukia (ATA) and a major causal toxin was thought to be T-2 toxin produced by *Fusarium sporotrichioides* and *F. poae*. The immunotoxicity, which is chronic effect of trichothecenes mycotoxins results in the decrease of host resistance<sup>3</sup>. Selective upregulates serum IgA caused by dietary expose to DON or NIV induces the IgA nephropathy<sup>4</sup>. The effect as the cancer promoter is seems to be responsible for the immunotoxicity<sup>5</sup>.

Zearalenone, which is produced by *F. graminearum* and *F. culmorum*, interacts with oestrogen receptors. This toxin induces apparent hyperoestrogenism. Even though all of mammalian species are target of zearalenone, female pigs are considered to be most sensitive animal species. Other typical toxicities of zearalenone are not recognizes, but the oral exposure to high dose zearalenone has been reported to cause hepatocellular adeomas in B6C3F1 mice<sup>6</sup> and apoptosis in vitro<sup>7,8</sup>.

### International regulation of trichothecenes and zearalenone

The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and European Commission (EC) had evaluated the risk of trichothecens and zearalenone and established provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) of these toxins (Table 1). JECFA has set PMTDI for deoxynivalenol (DON), T-2 roxin, HT-2 toxin and zearalenone. EC has established a full TDI to DON and temporary TDIs to nivalenol, zearalenon and T-2 toxin and HT-2 toxin.

### Setting provisional standard for tolerable level of DON contamination in wheat

Prior to setting PMTDI by JECFA, some investigators in Japan have pointed out a possibility that DON intake over the PMTDI in Japan if no regulation is set for DON contamination levels in domestic wheat in Japan because high levels of DON were found in Japanese domestic wheat frequently. Therefore the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) organized the reseach group to survey current situation of DON contamination levels in domestic wheat in 2001-2002. As

Table 1. PMTDI of Trichothecenes Mycotoxins and Zearalenone Established by JECFA or EC

mycotoxin	PMTDI ( $\mu\text{g}/\text{person kg}/\text{day}$ )	
	JECFA	EC
DON	1	1
NIV	-	0.7*
T-2 and HT-2	0.06	0.06*
ZEA	0.5	0.2*

\* temporary TDI

Table 2. Tolerable level of DON contamination in wheat and rice satisfying PMTDI established by JECFA (Based on the data obtained in 2002)

Estimated DON concentration	Reduction by processing	DON level in flour (µg/kg)	DON level in unpolished wheat (µg/kg)
only wheat	30 %	557	795
	50 %	557	1110
DON level in rice at 15/39 of that in wheat	30 %	331	473
	50 %	331	662
DON concentration in rice at the same as that of wheat	30 %	201	287
	50 %	201	402

the regulation for DON was urgently needed to prevent adverse health, the Joint Committee of Food Standard and Toxicity Committee under the Food Sanitation Council recommended setting a provisional standard for the tolerable level of DON in wheat. Based on the surveillance data in 2001-2002 and daily average intake of wheat, the research group proposed some simulations about the tolerable level of DON in unpolished wheat (Table 2). On May 21, 2002, the Food Sanitation Council has set the tolerable level of DON in unpolished wheat at 1.1 mg/kg as a provisional standard when the reduction of DON concentration in final products is estimated about 50 %.

#### **The further study on surveillance of DON levels in wheat and rice in 2002-2003 and reduction of DON concentration in processing and cooking**

After the setting of provisional standard for unpolished wheat, MHLW organized further study on surveillance of the current situation and reduction of DON concentration in processing and cooking to assess the exposure level of DON in detail. Further surveillance results of DON levels in unpolished wheat in 2002-2003 revealed that the averages of DON concentration in imported wheat (n=178) and domestic wheat (n=199) were 60 ng/g and 160 ng/g, respectively. Taking into consideration of the weighted average of supply flow, the average of DON contamination was calculated as 71 ng/kg. In domestic rice (n=124), the average was 2.6 ng/g. As the DON level in rice was too low, the contribution to the amount of exposure to DON might be neglected.

The reduction study using the natural contaminant wheat showed that milling process reduced DON level by 55.4 %. The cooking study using the natural contaminant flour found that DON level reduced by 71.1 % in cooked noodle but did not in bread. These studies concluded that the retention level of DON from wheat to final product could be conservatively assessed at 44.2 % in bread and at 12.9 % in noodle.

Based on the results of the study performed in 2002-2003, we recalculated level of DON contamination in wheat and flour. When the reduction of DON in final product was taken into consideration, the concentration of DON in unpolished wheat was allowed until 1,913 µg/kg for all age and 858 µg/kg for 1-6 years old (Table 3). The research group assessed that the mean intake of DON in Japan were 1.94 µg/day/person for all age and 1.31 µg/day/person for 1-6 years old children. The intakes were ranked 3.7 % of PMTDI for all age and 8.3 % of PMTDI for 1-6 years old children (Table 4).

Table 3. Tolerable level of DON contamination in wheat and flour satisfying PMTDI (Based on the research on 2002- 2003)

The contribution of DON contamination in rice	Age (weight) (kg)	Intake of wheat (g)	Intake of rice (g)	not taking into consideration of reduction in noodle and bread ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		taking into consideration of reduction in noodle and bread ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
				in unpolished	in flour	in unpolished	in flour
No	All age (52.6)	94.3		1,251	558	1,913	853
	1-6 years (15.9)	64.1		556	248	850	380
Yes	All age (52.6)	94.3	160.4	1,247	556	1,908	851
	1-6 years (15.9)	64.1	86.0	554	247	846	378

DON level in unpolished wheat ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) =  $\text{PMTDI} / \text{intake of wheat} \times \text{reduction in flour} \times \{(\text{the rate for which noodle consumption} \times \text{the retention in noodle}) + (\text{the rate for which bread consumption} \times \text{the retention in bread}) + (\text{the rate for which others product consumption} \times \text{the retention in others})\}$

Retention in flour; 44.6 %, The rate for which noodle consumption; 46.5 %, The retention in noodle; 28.9 %, The rate for which bread consumption; 45.6%, The retention in bread; 97.1 %, the rate for which others product consumption; 7.6 %, the retention in others; 100 %

Table 4. The percentage to PMTDI of the intake amount (Based on the research on 2002-2003)

Age	the intake of wheat (g)	body weight (kg)	the intake of DON ( $\mu\text{g}/\text{day}/\text{person}$ )	the percentage to PMTDI (%)
All age	94.3	52.6	1.94	3.7
1-6 years old	64.3	15.9	1.31	8.3

The average of domestic wheat; 0.16 mg/kg, The amount of product; 540,000 ton

The average of imported wheat; 0.06 mg/kg, The amount of product; 4,560,000 ton

The weighted average; 0.071 mg/kg

As the exposure level of DON was very low, MHWL decided to continue the regulation of unpolished wheat regarding DON contamination by using the provisional standard. In order to establish the standard of DON, more data on DON contamination are needed.

### Further approach

Recently, many cases of co-contamination occurrence with trichothecenes have been reported in wheat, barley and other cereals<sup>9-14</sup>. Regarding the establishment of DON standard, the effects of combined exposure to several trichothecenes and ZEA should be taken into account in risk assessment.

### References

- 1) Shifrin, V.L., Anderson, P.: J. Biol. Chem., **274**, 13985-13992 (1999)
- 2) Yang, G.H., Jarvis, B.B., Chung, Y.J., Pestka, J.J.: Toxicol. Appl. Pharmacol., **164**, 149-160 (2000)
- 3) Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Kasuga, F., Yamamoto, M., Kumagai, S.: Mycotoxins, **44**, 37-40 (1997)
- 4) Hinoshita, F., Suzuki, Y., Yokoyama, K., Hara, S., Yamada, A., Ogura, Y., Hashimoto, H., Tomura, S.,

- Marumo, F., Ueno, Y.: *Nephron*, **75**, 469-478 (1989)
- 5) Hsia, C.H., Wu, Z.Y., Li, Y.S., Zhang, F., Sun, Z.T.: *Oncology reports*, **12**, 449-456 (2004)
  - 6) NTP: US national toxicology program (1982). Technical report series no 235, NIH publ. No 83-1791, Research Triangle Park, North Carolina, USA
  - 7) Abid-Essefi, A., Baudrimont, I., Hassen, W., Quanes, Z., Monlo, T.A., Anane, R., Creppy, E.E., Bacha, H.: *Toxicology*, **192**, 237-248 (2003)
  - 8) Ouanes, Z., Abid, S., Ayed, I., Anane, R.E., Mobio, T., Creppy, E.E., Bacha, H.: *Mut. Res.*, **538**, 63-70 (2003)
  - 9) Tanaka, T., Hasegawa, A., Matsui, Y., Ueno, Y.: *Food Addit. Comtam.*, **2**, 259-265 (1985)
  - 10) Sohn, H.B., Seo, J.A., Lee, Y.W.: *Food Addit. Comtam.*, **16**, 153-158 (1999)
  - 11) Yoshizawa, T., Jin, Y.Z.: *Food Addit. Comtam.*, **12**, 689-694 (1995)
  - 12) Muller, H.M., Reimann, J., Schumacher, U., Schwadorf, K.: *Nat. Toxins*, **5**, 24-30 (1997)
  - 13) Li, F.Q., Li, Y.W., Luo, X.Y., Yoshizawa, T.: *Food Addit. Comtam.*, **19**, 163-167 (2002)
  - 14) Rasmussen, P.M., Ghorbani, F., Berg, T.: *Food Addit. Comtam.*, **20**, 396-404 (2003)

#### 赤カビ病に関わるマイコトキシンの毒性と小麦における DON 汚染レベルの暫定基準について

小西良子：国立医薬品食品衛生研究所（156-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1）

熊谷 進：東京大学大学院農学生命科学研究科（113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1）

赤カビ病に起因する主なカビ毒は、デオキシニバレノール、ニバレノール、T-2 トキシンのトリコテセン系マイコトキシンとゼアラレノンである。トリコテセン系マイコトキシンの共通の毒性には、消化管障害、免疫毒性などがあり、ガンへのプロモーター作用を示唆する報告もある。我が国の赤カビ病において最も頻繁に検出されるカビ毒は、デオキシニバレノール、ニバレノールであるが、デオキシニバレノールに関しては2002年に暫定基準値が設定された。その根拠を2つの厚生科学特別研究（平成13年度および平成14年度）の結果をもとに示した。

キーワード：マイコトキシン，赤カビ病，デオキシニバレノール，暫定基準値

# 市販 ELISA キットによる玄麦中デオキシニバレノールの 迅速簡易スクリーニング法の評価

小西良子\*1,† 高鳥浩介\*1 田中敏嗣\*2 杉浦義紹\*2  
中島正博\*3 田中健治\*4 熊谷進\*5

## Evaluation of Three Commercial ELISA Kits for Rapid Screening of Deoxynivalenol in Unpolished Wheat

Yoshiko SUGITA-KONISHI\*1,†, Kosuke TAKATORI\*1, Toshitsugu TANAKA\*2, Yoshitsugu SUGIURA\*2,  
Masahiro NAKAJIMA\*3, Kenji TANAKA\*4 and Susumu KUMAGAI\*5

(\*1National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

\*2Kobe Institute of Health: 4-6, Minatojima-Nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046, Japan;

\*3Nagoya City Public Health Institute: 1-11, Hagiya, Mizuho-ku, Nagoya 468-7615,  
Japan; \*4National Food Research Institute, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba 305-8642,

Japan; \*5Department of Veterinary Public Health: University of Tokyo, 1-1-1,

Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8501, Japan; † Corresponding author)

(ノート)

食品衛生学雑誌 第45巻 第3号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygienics Society of Japan

Vol. 45, No. 3, June 2004

**J. Food Hyg. Soc. Japan**  
(SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI)

食 衛 誌

## ノート

市販 ELISA キットによる玄麦中デオキシニバレノールの  
迅速簡易スクリーニング法の評価

(平成 15 年 10 月 27 日受理)

小西良子\*<sup>1,†</sup> 高鳥浩介\*<sup>1</sup> 田中敏嗣\*<sup>2</sup> 杉浦義紹\*<sup>2</sup>  
中島正博\*<sup>3</sup> 田中健治\*<sup>4</sup> 熊谷進\*<sup>5</sup>Evaluation of Three Commercial ELISA Kits for Rapid Screening  
of Deoxynivalenol in Unpolished WheatYoshiko SUGITA-KONISHI\*<sup>1,†</sup>, Kosuke TAKATORI\*<sup>1</sup>, Toshitsugu TANAKA\*<sup>2</sup>, Yoshitsugu SUGIURA\*<sup>2</sup>,  
Masahiro NAKAJIMA\*<sup>3</sup>, Kenji TANAKA\*<sup>4</sup> and Susumu KUMAGAI\*<sup>5</sup>(\*<sup>1</sup>National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;  
\*<sup>2</sup>Kobe Institute of Health: 4-6, Minatojima-Nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046, Japan;  
\*<sup>3</sup>Nagoya City Public Health Institute: 1-11, Hagiya, Mizuho-ku, Nagoya 468-7615,  
Japan; \*<sup>4</sup>National Food Research Institute, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba 305-8642,  
Japan; \*<sup>5</sup>Department of Veterinary Public Health: University of Tokyo, 1-1-1,  
Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8501, Japan; † Corresponding author)

Evaluation of commercial ELISA kits for the screening of deoxynivalenol (DON) was carried out. Three kinds of commercial kits supplied by different companies were used. Three lots of naturally contaminated wheat and DON-free wheat ( $<0.05 \mu\text{g/g}$ ) were used as samples. The values obtained from ELISA were compared with those of the HPLC-UV method. In the results obtained from 14 institutions using ELISA, the CV values were less than 17.6% for all the commercial kits. The DON-free sample was not detected as positive with any commercial kits. Also there was no negative finding among the naturally contaminated samples used in this experiment. Coefficients of determination in ELISA and HPLC analysis were 0.979-0.999. These results indicate that ELISA using any of the three commercial kits is efficient for the screening of DON in wheat.

(Received October 27, 2003)

**Key words:** デオキシニバレノール deoxynivalenol; 酵素免疫測定法 ELISA; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 小麦 wheat

## 緒言

デオキシニバレノール (DON) は穀物の赤カビ病の原因菌であるフザリウム属に属する *Fusarium graminearum* により主に産生されるトリコテセン系マイコトキシンである<sup>1)</sup>。DON は多くの動物実験から、胃腸障害や神経毒性、免疫抑制などの毒性を示すことが明らかにされており、ヒトでの中毒例も多い。我が国でも赤カビ汚染穀物が原因と

推定されるヒトの中毒例が古くから知られており、1957年に北海道で起きた赤カビ中毒事例では43名の被害を出している。中国やインドでもトリコテセン系マイコトキシンが原因と推定される大規模な食中毒事例が、1960~1991年の間に53件記録されており、その対策が急がれている<sup>2)</sup>。

DON のリスクについては2001年2月に行われたJECFAの会議において評価が行われ、DONの暫定一日耐容量 (PMTDI) として  $1 \mu\text{g/kg}$  体重/day が設定された<sup>3)</sup>。この経緯を受けて我が国においても2002年5月に小麦玄麦中のDONに対する行政上の指導指針としての暫定基準値が1.1 ppm と設定された<sup>4)</sup>。現在その分析法としてUV検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによる方法が (HPLC-UV) 厚生労働省からの通知法として提示されているが<sup>4)</sup>、HPLC-UV は大量の試料を短時間に処理

† 連絡先

\*<sup>1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1\*<sup>2</sup> 神戸市環境保健研究所: 〒650-0046 神戸市中央区港島中町 4-6\*<sup>3</sup> 名古屋市衛生研究所: 〒468-7615 名古屋市瑞穂区萩山 1-11\*<sup>4</sup> 食品総合研究所: 〒305-8642 つくば市観音台 2-1-2\*<sup>5</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科: 〒113-8501 東京都文京区弥生 1-1-1

するには適当ではないため、スクリーニング法として、簡便かつ迅速に分析できる ELISA 法の導入が切望されている。

そこで、本研究では 3 種類の市販 ELISA キットを用いてスクリーニング法としての ELISA 分析法の評価試験を 14 試験機関で行い、使用の妥当性および問題点を検討した。

## 実験方法

### 1. 試料

食糧庁から提供された 2002 年収穫小麦のうち、DON 無汚染小麦 1 試料と自然汚染小麦 3 試料を超遠心粉碎機 (ZM100, Retcth 社製) を用いて 1 mm 以下の粒子に粉碎して分析に供した。なお無汚染小麦および自然汚染小麦はいずれも玄麦を用いた。

### 2. 試薬・器材

- 1) ELISA 分析キットは、米国 NEOGEN 社製ベラトクスポミトキシシン 5/5、ドイツ r-Biopharm 社製 RIDA スクリーン FAST DON、米国 ROMER 社製 Agra Quant DON の 3 社の市販品を用いた。
- 2) 多機能カラム: MultiSep #227 (Romer 社製) を用いた。
- 3) HPLC 用標準原液: DON 標準品 (和光純薬工業(株)製) 1 mg を精ひょうし、アセトニトリルに溶かして 50 mL とした。
- 4) アセトニトリル、メタノール、蒸留水: 液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業(株)製) を用いた。

### 3. ELISA 分析法評価試験の参加機関

3 種類の ELISA 分析キットについて以下の 14 機関による評価を行った。参加機関は、神戸市環境保健研究所、国立医薬品食品衛生研究所、(財)日本穀物検定協会、(財)日本食品分析センター、(財)マイコトキシシン検査協会、(財)日本冷凍食品検査協会、食糧庁消費改善課品質管理室、(独)消費技術センター、(独)食品総合研究所、(独)農

業技術研究機構中央農業総合研究センター、(独)農業技術研究機構九州沖縄農業研究センター、(独)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の 14 機関であり、本試験の開始に当たり ELISA 分析法の講習会を行った。

### 4. 各 ELISA 分析キットの測定法

本研究は、使用した ELISA 分析キットの優劣を評価するものではなく、各キットのバリデーションを目的とすることから、ランダムに A 社、B 社、C 社と表記した。

分析に用いた試料は、それぞれのキットのマニュアルに従って秤量し、蒸留水を加え約 3 分間よく混合した後ろ過して試料液を作製し、ELISA 分析に供した。それぞれのキットの原理と操作手順は Table 1 に示した。

### 5. HPLC-UV による測定

自然汚染小麦 3 試料 (No. 1, No. 2, No. 3) および無汚染小麦 1 試料の DON の濃度を、HPLC-UV により測定した。試験溶液は食安発第 0717001 号<sup>4)</sup>に従って調製した。すなわち、試料 50 g をアセトニトリル-水 (85:15) 混液 200 mL で抽出したのち、多機能カラムで精製し、試験溶液とした。

HPLC 装置は (株)島津製作所製 LC-10A を用いた。カラムは昭和電工(株)製 Shodex C18M 4E、移動相はアセトニトリル-水-メタノール (5:90:5) を用い、流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 40°C、波長は 220 nm に設定した。

### 6. 検量線の作成

ELISA 分析キットによる測定値は、ロジスティック回帰分析法により算出した logit 値を縦軸に、対数で表した濃度を横軸として作成した検量線から求めた。

$$\text{logit 値} = \ln B/B_0 / (1 - B/B_0), (B: \text{標準品または試料の吸光値}, B_0: \text{陰性コントロールの吸光値})$$

HPLC-UV では、HPLC 用標準原液を移動相で 0.1~2.0  $\mu\text{g/mL}$  の濃度に調製し、それぞれで得られたクロマトグ

Table 1. The Principle and Protocol of the ELISA Kits

	A kit	B kit	C kit
Pre-mix	Mix sample or standard and enzyme conjugate in normal well		Nothing
Sample/standard enzyme conjugate (antibody)	Transfer the mixture to a well for immobilization		Add sample or standard, enzyme conjugate and anti-DON antibody to well
Incubation	Compete DON in sample with enzyme conjugate for DON-antibody		Antibody-complex binds to the immobilized second antibody
Washing	Remove any unbound enzyme conjugate		
Substrate	Add substrate		
Incubation	Bound enzyme conjugate becomes into blue		
Stop solution	Stop the reaction and change color from blue to yellow		
Measurement of adsorbance	The absorbance is inversely proportional to DON concentration in the sample		



ラムからピーク面積を求め、検量線を作成して定量値を求めた。

## 結果および考察

### 1. HPLC 分析による測定値

通知法による方法で無汚染小麦試料および自然汚染試料中の DON は 1 試料につき 7 回分析を行った。その結果、DON の定量値は無汚染小麦では定量限界以下 ( $0.05 \mu\text{g/g}$  以下)、自然汚染小麦 No. 1 は  $0.36 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ 、自然汚染小麦 No. 2 は  $0.93 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ 、自然汚染小麦 No. 3 は  $1.55 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$  であった。

### 2. ELISA 分析キットによる測定値の評価

Table 2 に 14 機関において得られた、3 種類の ELISA 分析キットによる無汚染小麦 1 試料および自然汚染小麦 3 試料 (No. 1, No. 2, No. 3) の測定値を示した。

A 社のキットにおいては、自然汚染小麦 No. 1 の最高値は  $0.47 \mu\text{g/g}$ 、最低値は  $0.31 \mu\text{g/g}$ 、平均値は  $0.39 \mu\text{g/g}$ 、標準偏差は 0.04、No. 2 では最高値は  $1.10 \mu\text{g/g}$ 、最低値は  $0.69 \mu\text{g/g}$ 、平均値は  $0.90 \mu\text{g/g}$ 、標準偏差は 0.09、No. 3 では最高値  $1.79 \mu\text{g/g}$ 、最低値は  $1.14 \mu\text{g/g}$ 、平均値は  $1.52 \mu\text{g/g}$ 、標準偏差は 0.19 であった。変動係数はそれぞれ 10.5~12.4% を示した。B 社のキットにおいては、自然汚染小麦 No. 1 の最高値は  $0.55 \mu\text{g/g}$ 、最低値は  $0.33 \mu\text{g/g}$ 、平均値は  $0.42 \mu\text{g/g}$ 、標準偏差は 0.07、No. 2 では最高値は  $1.17 \mu\text{g/g}$ 、最低値は  $0.82 \mu\text{g/g}$ 、平均値は  $0.93 \mu\text{g/g}$ 、標準偏差は 0.10、No. 3 では最高値  $2.12 \mu\text{g/g}$ 、最低値は

$1.63 \mu\text{g/g}$ 、平均値は  $1.85 \mu\text{g/g}$ 、標準偏差は 0.15 であった。変動係数はそれぞれ 8.6~17.6% を示した。C 社のキットにおいては自然汚染小麦 No. 1 の最高値は  $0.52 \mu\text{g/g}$ 、最低値は  $0.29 \mu\text{g/g}$ 、平均値は  $0.45 \mu\text{g/g}$ 、標準偏差は 0.07、No. 2 では、最高値は  $1.14 \mu\text{g/g}$ 、最低値は  $0.75 \mu\text{g/g}$ 、平均値は  $0.96 \mu\text{g/g}$ 、標準偏差は 0.12、No. 3 では最高値  $2.26 \mu\text{g/g}$ 、最低値は  $1.48 \mu\text{g/g}$ 、平均値は  $1.81 \mu\text{g/g}$ 、標準偏差は 0.21 であった。変動係数はそれぞれ 11.7~15.6% であった。HPLC 分析結果において検出限界以下であった無汚染小麦試料は、いずれの ELISA 分析キットにおいても陽性として検出されることはなかった。また逆に、今回用いた自然汚染小麦試料の濃度内では陰性反応となる例も認められなかった。

### 3. ELISA 法と HPLC-UV 法の相関

ELISA 法と HPLC-UV の決定係数を Fig. 1 に示したが、A 社、B 社、C 社ともそれぞれ 0.999, 0.979, 0.985 といずれも良好な値が得られた。しかし傾きにおいては、A 社、B 社、C 社のキットではそれぞれ 1.060, 0.819, 0.867 であり、B 社および C 社のキットでは、HPLC-UV の測定値より高めの値が得られる傾向が認められた。

そこでこの傾向が、各社の分析キットに添付された標準品と HPLC-UV で使用した標準品との純度の差によるものかを検証するために以下の実験を行った。すなわち HPLC-UV で使用した標準品を、各社の分析キットに添付された標準品と同じ濃度に調製して各 ELISA キットで測定しそれぞれの分析キットで得られた検量線により、その

Table 2. Results of Collaborative Study on Deoxynivalenol (DON) Using Three Commercial ELISA Kits

Analytical method	Sample No.	Average ( $\mu\text{g/g}$ )	Maximum ( $\mu\text{g/g}$ )	Minimum ( $\mu\text{g/g}$ )	Standard deviation	CV (%)	Laboratory number
ELISA kit A	ND	<0.25	<0.25	<0.25	-	-	14
	1	0.39	0.47	0.31	0.04	10.5	
	2	0.90	1.10	0.69	0.09	10.8	
	3	1.52	1.79	1.14	0.19	12.4	
ELISA kit B	ND	<0.2	<0.2	<0.2	-	-	13
	1	0.42	0.55	0.33	0.07	17.6	
	2	0.93	1.17	0.82	0.10	10.7	
	3	1.85	2.12	1.63	0.16	8.6	
ELISA kit C	ND	<0.25	<0.25	<0.25	-	-	14
	1	0.45	0.52	0.29	0.07	15.6	
	2	0.96	1.14	0.75	0.12	12.7	
	3	1.81	2.26	1.48	0.21	11.7	
HPLC-UV	ND	<0.05			0.01	5.2	
	1	0.36			0.01	1.5	
	2	0.93			0.03	3.1	
	3	1.55			0.04	1.7	

ND: not detected

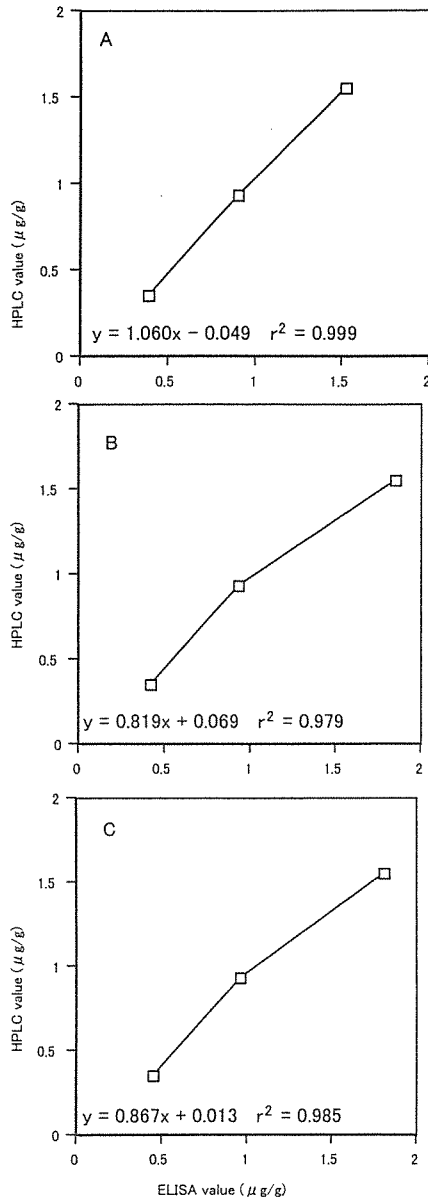


Fig. 1. Correlation of ELISA and HPLC (A) ELISA kit A, (B) ELISA kit B, (C) ELISA kit C

濃度を測定した。Fig. 2 に示したように、それぞれのキットに添付された標準品と HPLC-UV で用いた標準品の間には、有意な差は認められないことが明らかになった。これらの結果から、B 社および C 社のキットに認められた高めの測定値の原因が標準品の純度の違いではないことが明らかとなった。

A 社および B 社のキットは、ウェルに結合した抗 DON 抗体に対して試料中の DON と酵素標識 DON が競合する反応を利用したものであり、C 社のキットは試料中の DON-マウス抗 DON 抗体複合体と酵素標識 DON-マウス抗 DON 抗体複合体がウェルに結合した抗マウス抗体に対して競合する反応を利用したものである。いずれもウェルの固相抗体と結合した酵素標識 DON による発色を測定することから、吸光度は試料中の DON の濃度に反比例する。この原理から考えて、非結合の酵素標識 DON を効率

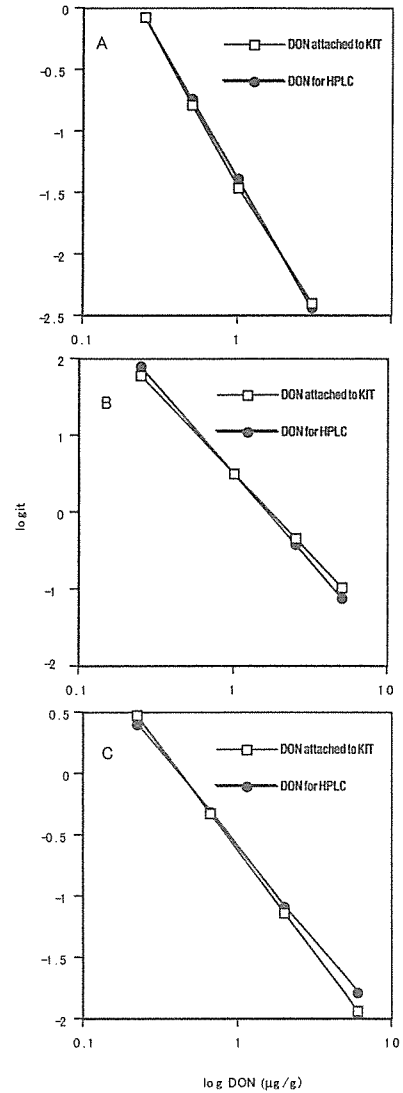


Fig. 2. Comparison of ELISA standard curves obtained by using DON attached to ELISA kit and those by using DON used for HPLC (A) ELISA kit A, (B) ELISA kit B, (C) ELISA kit C

良く洗浄することがこの分析法の重大なポイントである。洗浄に使用する溶液は、A 社のキットでは純水を用い、B 社および C 社のキットでは 0.05% Tween 20 含有リン酸バッファー生理食塩水を用いている。界面活性剤を用いた洗浄法は、小麦のように内在性のパーオキシダーゼを有する試料の非特異的な反応を抑えるために有効とされているが、弱く結合している酵素標識 DON を洗浄してしまう可能性も否定できない。本評価試験において B 社および C 社のキットで分析値が高めに測定された理由の 1 つとして、界面活性剤の影響が考えられる。しかし、いずれの ELISA 分析キットにおいても 0.8 以上の傾きは得られていることから、いずれのキットでも問題なく使用できると思われる。

#### 4. 結 論

14 機関の評価試験の結果、低濃度の DON 汚染小麦では変動係数が大きくなる傾向が 3 社のキットに共通して

見られたが、全体でも変動係数は17.6%以下であったこと、現在の日本の暫定基準値1.1  $\mu\text{g/g}$ 付近ではHPLC-UVの測定値とおおむね合致することから、これらのキットを用いたELISA法はスクリーニング法として有効な分析法であると考えられる。

#### 謝 辞

本研究の遂行に当たり、DON自然汚染小麦を提供していただきました農林水産省に深謝いたします。本研究は平成14年度厚生労働科学研究補助金によって行った。

#### 文 献

- 1) Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U-S., Sugiyama, Y., Ueno, Y., World wide contamination of cereals by the *Fusarium* Mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone 1. Survey of 19 countries, J. Agric. Food Chem., 36, 979-983 (1988).
- 2) Yoshizawa, T., Human and animal intoxication episodes caused by trichothecene mycotoxins. Mycotoxins, 53, 113-118 (2003).
- 3) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 74 session ed., "Safety evaluation of certain mycotoxins in food" Geneva, WHO, 2001, p. 419-680. (ISBN 92-5-104664-6)
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知 "デオキシニバレノールの試験法について" 平成15年7月17日, 食安発第0717001号.

1) Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U-S., Sugiyama, Y., Ueno, Y., World wide contamination of cereals

資料

# 諸外国産輸入食品の放射能濃度 (2000年－2003年)

杉山英男，寺田 宙，平田明日美，櫻井かさね，宮田昌弘，  
後藤成生

Reprinted from  
RADIOISOTOPES, Vol.53, No.5  
May 2004



Japan Radioisotope Association

<http://www.jrias.or.jp/>