励起蛍光マトリクス計測を応用した デオキシニバレノールの新規判別法

藤田かおり, 蔦 瑞樹[§], 杉山純一

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

Detection of Deoxynivalenol in Water Solution by Using Excitation-Emission Matrix

Kaori Fujita, Mizuki Tsuta[§] and Junichi Sugiyama

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research
Organization, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy was used to detect deoxynivalenol (DON), which is a mycotoxin and is the most frequent contaminant occurring in toxicologically relevant concentrations in wheat and other cereal grains. Concentration gradients of DON aqueous solution samples with 7 levels were prepared as follows: 0, 4, 8, 125, 250, 500 and 1000 ppm. EEM was measured using a spectrofluorometer. DON could be characterized by some fluorescence peaks in EEM, especially those with the following specific excitation (Ex) and emission (Em) wavelength ranges: Ex 200~240 nm/Em 300 nm and Ex 250~300 nm/Em 250~350 nm. Through discriminant analysis of EEM, two groups of DON and pure water can be discriminated with the following three wavelength conditions: Ex 210 nm/Em 270 nm, Ex 240 nm/Em 620 nm and Ex 280 nm/Em 330 nm. For these conditions, a linear discriminant model was able to identify DON solutions with a classification accuracy of 100%.

(Received Jun. 12, 2007; Accepted Jan. 29, 2008)

Keywords: deoxynivalenol (DON), excitation-emission matrix (EEM), fluorescence spectroscopy, mycotoxin, discriminant analysis

キーワード: デオキシニバレノール, 励起蛍光マトリクス, 蛍光分光光度計, マイコトキシン, 判別分析

カビ毒汚染はヒトや家畜などに対して急性もしくは慢性の生理的・病理的障害を与えるために、食品の安全性や安定供給の観点から常に重要な問題である^{1)~3)}。また近年では食糧や飼料の輸出入の増加に伴いカビ毒の拡散が懸念されている^{1)~3)}。

中でも、デオキシニバレノール (Deoxynivalenol, DON) は、ムギ・トウモロコシ類などの禾穀類に汚染が見られるカビ毒の1種である^{3)~5)}。DON汚染は、一般土壌細菌である *Fusarium* 属が原因であることから、その被害は世界各地で報告されている^{5)~7)}。また穀類は食料としてだけでなく飼料としても利用価値が高いため、穀類のDON汚染は、農産物の収量・品質低下を招くばかりでなく家畜への深刻な被害を与えている⁸⁾。そのため2001年にはFAO/WHO合同食品添加物専門家会議 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) およびCodex食品添加物・汚染物質部会 (Codex Committee on Food Ad-

ditives and Contaminants, CCFAC) においてDONのリスク管理についての議論が開始され³⁾、わが国でも2002年5月に厚生労働省が、コムギのDONに関しての暫定基準値を1.1 ppmとして定めた。

一方、食品安全性確保の観点から、簡便性、迅速性、判定の容易さ、正確さ、低コスト等の特色を兼ね備えた新たなDON検知法が必要とされており⁹⁾、これまでも精度や感度を高めるために様々な検出法が試みられている^{10)~12)}。またわが国では、食発第0521001号平成14年5月21日付け厚生労働省医薬局食品保健部長通知において、DON定性及び定量試験をUV検出器付き高速液体クロマトグラフィー (High-Performance Liquid Chromatography — UV Detector, HPLC - UV) や電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography-Electron Capture Detector, GC-ECD) で行うこと、また平成15年4月には15食糧第166号食糧庁計画課流通部消費改善課通知により機器分析以外に酵素免疫測定吸着法 (Enzyme — Linked Immunosorbent Assay, ELISA) を活用できるこ

〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

[§] 連絡先 (Corresponding author), mizukit@affrc.go.jp

とが示されている。しかし、同通知にはこれら手法に十分な習熟を必要とする旨が付記されており、複雑な前処理や測定結果を出すまでに時間を要することなどが問題となっている。

そこで本研究では、比較的操作性のよい蛍光分光光度計¹³⁾に着目し、DON の励起蛍光マトリクス (Excitation-Emission Matrix, EEM) 計測を行うこととした。EEM とは任意の励起波長ごとに計測された蛍光スペクトルの変化を励起波長、蛍光波長、蛍光強度の 3 つの直行軸からなる空間座標に示したものである。数百次元に及ぶ膨大な情報をもつ EEM のデータを解析することで、数波長のデータしか得られない通常の蛍光計測で見落とされる情報の収集が可能となる^{14)~17)}。また、EEM は成分固有の蛍光特性によって特徴的なパターンを示すため、あらかじめ目標成分の EEM を計測しておくことで物質の同定も可能となり、様々な混在系における特定物質の同定や食品中の異物検出などに応用されている^{14)~17)}。これらの知見から、EEM 計測を用いることでこれまで無色で蛍光も微弱とされる DON の検出が可能になると考えられた。本研究では、蛍光分光光度計を用いて DON の EEM を計測・解析することで、DON の新規判別方法の検討を行い、カビ毒の簡便な非破壊計測法開発に資する知見を得ることを目的とした。解析では判別関数 (Discriminant Function, *DF*) および判別関数の変数の算出を行い、DON の判別に有効な波長の特定を試みた。

材料および方法

1. 試薬および調整

DON 標準試薬にはマイコトキシン試験用試薬 (和光純薬工業(株)) の製造日の異なる 2 ロット (No. LTL1755, No. WKQ3265) の試薬を用い、純水には Milli-Q システム (MILLIPORE Biocel A10, 日本ミリポア(株)) を用いた。

DON 標準試薬は純水で 0, 4, 8, 125, 250, 500 および 1000 ppm の 7 段階に希釈し、超音波洗浄機 US-4 ((株)エスエヌディ) で 15 分脱気を行い、DON 溶液とした。なお試薬調整には、1.5 mL と 2.0 mL のマイクロチューブ (Cat. No. A. 150, (株)アシスト, Cat. No. 508-GRD, Quality Scientific Plastics Inc.), 15 mL の遠心チューブ (Cat. No. 62. 554. 001, SARSTEDT AG & Co.) および 1000 μ L と 5000 μ L のピペットチップ (Cat. No. 111-Q, Cat. No. 090-Q, Quality Scientific Plastics Inc.) を用いた。

2. 蛍光分光光度計および解析ソフト

(1) 蛍光分光光度計

EEM の計測には、蛍光分光光度計は F-7000 ((株)日立ハイテクノロジーズ) を用い、データオペレーションソフトには FL Solutions 2.1 ((株)日立ハイテクノロジーズ) を用いて計測およびデータ取得を行った。セルには 0.35 mL のマイクロセル (FM20-SQ-1, GL Sciences Inc.) を用いた。

表 1 計測条件

スキャンスピード	30 000 nm/min
励起/蛍光スリット幅	10 nm
励起/蛍光取得間隔	10 nm
励起波長範囲	200~340 nm
蛍光波長範囲	200~900 nm

(2) 解析ソフト

取得データの等高線図作製には計測に用いた FL Solutions 2.1 を用いた。データの前処理には表計算ソフト Excel 2003 (Microsoft Co.) を用い、データの解析およびグラフ作成には、統計解析ソフト JMP 6 (SAS Institute Inc.), Excel 2003 およびエクセル統計 2004 ((株)会社情報サービス) を用いた。

3. 実験方法

(1) EEM 計測

本実験では、励起・蛍光側のスリット幅および計測波長間隔は共に 10 nm に設定した。また、計測波長範囲は励起波長範囲を 200~340 nm、蛍光波長範囲は 200~900 nm とし、ホットマル感度を 900 V に設定し波長走査速度は 30 000 nm/min とした (表 1)。この際の各試料は 300 μ L であり、各濃度 3 反復で EEM データを取得した。得られた各 DON 溶液の EEM の等高線図から純水と DON 標準試薬 (以下、DON とする) の蛍光が見られる波長範囲の特定を行った。

(2) EEM データの前処理

取得データに以下 3 つの前処理を適用し、分析に供した (図 1)。

i) 本実験での解析対象は励起光よりも長波長側の EEM データである。取得 EEM データには励起光よりも短波長側のデータも含まれるため、取得データから励起光 (各照射励起光 ± 20 nm) よりも短波長範囲のデータを除外した。

ii) また取得データには、励起光の散乱光および散乱光の 2 次光、3 次光、4 次光などのデータ処理上の外乱となる波長条件が含まれる。そのため、それら範囲のデータ (2 次光: 励起光 $\times 2 \pm 30$ nm; 3 次光: 励起光 $\times 3 \pm 30$ nm; 4 次光: 励起光 $\times 4 \pm 40$ nm) の除去を行った。

iii) 各ロットから濃度毎にランダムに半分に分けたデータを抽出し、キャリブレーション用のデータとバリデーション用のデータ群とした。

(3) 正準判別分析

前処理により得られた 707 条件の EEM データを各 DON 溶液における 707 次元の蛍光強度データとみなし、DON と純水の 2 グループにおける判別分析により、判別関数 (*DF*) を算出した。判別分析には多変量解析の一手法である正準判別分析を用いた。また正準判別分析の変数選択は変数増減法を採用した。

変数増減法での変数選択は *F* 値の大きい順に行い、モデ

図 1 EEM の前処理工程

ルへの組み込みおよび除外は p 値 ($\text{Prob} > F$) を基準に 0.25~0.05 を目安の値とした。ただし、モデル取り込みの際にすでに取り込まれた変数の最大 F 値と新規変数の F 値の比が 1/10 以下の時には、その変数はモデルに組み込まなかった¹⁸⁾。

実験結果および考察

1. 励起蛍光マトリクス計測

各 DON 溶液の EEM は、蛍光の特徴を観察するために等高線図化した。また EEM の等高線図はロット No. LTL1755 のデータを代表として図 2 に示した。等高線は最大値を 3000、等高線間隔を 100 とした蛍光強度を示している。さらに図 2 中において、励起波長 200 nm 時の蛍光波長 200, 400, 600 および 800 nm を基点として長波長側に斜めに走る強度の強い発光は、励起光の散乱光および 2 次光、3 次光、4 次光であり、上記以外で短波長から長波長側に斜めに走る発光はラマン散乱光であった¹³⁾。なお、図 2 の観察では、主に 5 箇所に視覚的に識別可能な蛍光が確認された。これら 5 箇所には補助的な印をつけた (図 2a~e)。

図 2b では、唯一明らかな蛍光ピークが観察できた。しかし、この蛍光ピークは DON 濃度と反比例的に蛍光強度が高まる傾向であったことから、図 2b は純水が関与する

蛍光ピークであると推察された。一方図 2a では、散乱光とそのピーク位置が重なりピークの観察ができず、図 2c, d, e ではそのピークが測定範囲外にあり観察することができなかった。そのため、等高線の裾野の形状から DON 識別および濃度との関係を検討した。

図 2a, c で観察された等高線は、0 ppm の溶液ではほとんど観察されなかった。また図 2a の等高線は DON 濃度が高まるとともに蛍光強度が高まることを示したが、図 2c の等高線では濃度との明確な差異は見出すことができなかった。さらに図 2d, e では、0 ppm を含めた全濃度での差異を識別することは不可能であった。これらから、図 2a, c で確認できた等高線のみが DON 由来の蛍光であることが推察された。加えて、これまでの EEM を応用した事例では、EEM の等高線図に見られるピークの裾野の形状も物質の同定に用いている¹⁴⁾¹⁵⁾。このため、図 2a, c の領域は DON 濃度の識別に有効であると考えられた。

そこで、これらの領域を中心に、等高線図の観察に留まらず、さらに客観的に識別するために、EEM を数値化し判別分析を用いて DON 判別および判別点の算出を試みた。

2. 励起蛍光マトリクスデータの正準判別分析

707 波長条件における蛍光強度を説明変数、DON および純水の 2 グループを基準変数とした判別分析をキャリブ

図 2 DON 溶液の EEM 画像

レーション群で行った。その結果、励起波長 200 nm/蛍光波長 640 nm, 励起波長 200 nm/蛍光波長 860 nm, 励起波長 230 nm/蛍光波長 640 nm, 励起波長 260 nm/蛍光波長 460 nm, 励起波長 320 nm/蛍光波長 830 nm の 5 つの変数が選択された。また各変数に対応して算出された係数から DON の判別関数モデル式 (1) を得た。

$$DF = -0.0112x_1 + 0.0425x_2 - 0.1099x_3 + 0.0349x_4 + 1.8922x_5 \quad (1)$$

x_1 : 励起波長 200 nm/蛍光波長 640 nm 条件時の蛍光強度

x_2 : 励起波長 200 nm/蛍光波長 860 nm 条件時の蛍光強度

x_3 : 励起波長 230 nm/蛍光波長 640 nm 条件時の蛍光強度

x_4 : 励起波長 260 nm/蛍光波長 460 nm 条件時の蛍光強度

x_5 : 励起波長 320 nm/蛍光波長 830 nm 条件時の蛍光強度

上記判別式 (1) では、キャリブレーション群の判別はできたものの、バリデーション群で検証を行ったところ、データ数 21 点のうち 3 つの誤判別がされた。このため、判別式 (1) では、DON と純水グループの明確な判別は不可能であった。また、この時に選択された変数は純水由来の蛍光を示す波長条件を選択しており、DON 特有の条件を選ぶことができなかった。

そこで、2 波長領域 (図 2a, c) からあらかじめ各 1 つず

表 2 DON 判別関数に選択された波長条件および係数

励起波長/蛍光波長	係数
Ex. 210/Em. 270 (nm)	0.0104
Ex. 240/Em. 620 (nm)	-0.0676
Ex. 280/Em. 330 (nm)	0.0052

つ変数を選び、さらに変数増減法で変数を増すことで、DON 由来の蛍光による新たな判別式の算出を試みた。この際に固定した変数は、各領域で DON の蛍光の値が純水の値を上回った励起波長 210 nm/蛍光波長 270 nm, 励起波長 280 nm/蛍光波長 330 nm とした。

上記 2 変数を固定した変数増減法では、判別関数に有効な変数として、新たに励起波長 240 nm/蛍光波長 620 nm が選択された。また、これらの変数に対応して、キャリブレーション群から算出された係数は表 2 にまとめた。さらに表 2 の係数から以下の DON の判別モデル式 (2) を算出した。

$$DF = 0.0104x_1 - 0.0676x_2 + 0.0052x_3 + 0.0349x_4 + 1.8922x_5 \quad (2)$$

x_1 : 励起波長 210 nm/蛍光波長 270 nm 条件時の蛍光強度

x_2 : 励起波長 240 nm/蛍光波長 620 nm 条件時の蛍光強度

x_3 : 励起波長 280 nm/蛍光波長 330 nm 条件時の蛍光強度

判別式 (2) をバリデーション群に適用し、判別関数におけ

図 3 判別関数における DON および純水の判別状況

図 4 各波長条件での純水および DON の蛍光強度

る DON と純水の判別状況および両グループの分散は、箱ひげ図を用いて図 3 に示した。図中における箱ひげ図の長方形の中央の線は中央値、上下の辺がそれぞれ 25%、75% の 4 分位値を表しており、2 つの分位値の差が 4 分位範囲となる¹⁸⁾。また長方形の上下に伸びるひげの長さは上下 4 分位点 $\pm 1.5 \times 4$ 分位範囲として算出され、ひげの外側に位置するデータは外れ値と考えられる。

図 3 では、判別式 (2) を適用することにより、誤判別もなく正判別率が 100% であり、DON と純水の判別が可能となることが示された。また、判別式 (2) ではロット No. LTL 1755 において 125 ppm の DON 溶液に 1 つの外れ値が見られたものの、両グループ内およびロット間のばらつきは少なく、高濃度の DON 溶液だけでなく低濃度の DON 溶液においても純水と完全に判別が可能であることが示された。このことから、判別式 (2) によって、低濃度の DON まで識別できることが示唆された。しかしながら、判別式 (2) により選択された x_2 は、図 2 でピークが観察されない範囲であった (図 2)。そこで、判別式 (2) で選択された各波長条件における各グループおよびロットの分布についてさらに検討を加えた。

判別式 (2) の変数となる各波長条件における DON および純水グループの蛍光強度の分布について、分散分析によ

る 2 グループの有意差検定を行った (図 4)。図 4 には検定結果として、両グループの平均値および標準偏差を示した。

図 4 から、励起波長 240 nm/蛍光波長 620 nm (変数 x_2) では、純水と DON の値がほぼ同じ値であり、他の 2 波長条件では純水の値を DON が上回ることが明らかになった。すなわち、図 2 のピークを外れた変数 x_2 は、判別式 (2) において DON に影響されない参照値として機能していると推察された。また、励起波長 210 nm/蛍光波長 270 nm の波長条件 (変数 x_1) において、DON グループの蛍光強度は純水グループよりも有意に高く ($p < 0.01$)、さらに、純水の値にバラツキが少なかったことから、この波長条件が特に DON の識別に重要となることが示唆された。

これらより、DON の有無の識別は、本判別分析で選択された 3 波長条件 (DON に帰属する 2 条件と DON に影響されない 1 条件) のみの計測により可能となることが示された。

結 言

本研究では数波長のみの情報しか得られない従来の蛍光分析とは異なり、数百次元に及ぶ膨大な情報をもつ EEM から得られるデータを解析することで、DON の判別が可能となった。また DON 溶液と純水では EEM の等高線図

に十分な差異がみられ、DON が特有の EEM を持つことが明らかとなった。このことは光計測による DON 検知の可能性を示唆する重要な情報であると考えられた。

これまでの EEM を用いた目的物質の定性に関する報告では、EEM の等高線図における蛍光ピークを観察することで識別を行っているが¹⁴⁾¹⁵⁾、本実験では EEM 観察による完全な DON の判別は不可能であった。そこで、多変量解析により EEM データを解析することで、DON の判別に関わる 3 つの波長条件を明らかにし、濃度に影響を受けない判別関数を導き出した。今後は、さらに 1 ppm 以下の濃度の検証も併せ、より堅牢な判別式の開発を試みるとともに、これらの知見を基にコムギ粒やコムギ粉末などの混合試料中の DON 検知について研究を進めていく予定である。

要 約

光計測によるカビ毒検知を試みた。本研究は光計測によるデオキシニバレノール (Deoxynivalenol, DON) の判別を可能にした初の試みであり、1) DON 溶液の励起蛍光マトリクス (Excitation-Emission Matrix, EEM) 計測、2) EEM の数値化、3) 多変量解析による DON の判別関数の算出、の 3 段階で実験を遂行し、以下の知見を得た。

(1) これまで蛍光の検知が不可能とされていた DON において、励起波長 200~340 nm/蛍光波長 200~900 nm の範囲で DON 由来の蛍光が観察された。特に励起波長 200~240 nm/蛍光波長 300 nm、励起波長 250~300 nm/蛍光波長 250~350 nm 付近に観察されたピークは DON 特有の蛍光ピークであると考えられた。

(2) 判別分析により、DON および純水の 2 グループの判別には、励起波長 210 nm/蛍光波長 270 nm、励起波長 240 nm/蛍光波長 620 nm、励起波長 280 nm/蛍光波長 330 nm の 3 つの変数が選択された。またこの変数を用いた DON の判別関数の正判別率は 100% であり、誤判別がなかったことから、2 つの溶液は 3 つの波長条件で十分に判別が可能であった。

(3) さらにこれらのうち 2 波長条件において、DON 溶液の蛍光強度が純水の値を上回っていたことから ($p < 0.01$)、今回算出されたモデル式が他の混合試料中での DON 判別に展開できる可能性が示唆された。

本研究は、独立行政法人日本学術振興会による若手研究 B の助成により実施された。本研究を遂行するに当たり、カビ毒および DON に関するご指導・ご助言をいただいた (独) 農業環境技術研究所 生物生態機能領域 對馬誠也上席研究員、吉田重信主任研究員、生長陽子氏に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) D'Mello, J.P.F. and Macdonald, A.M.C., Mycotoxins, *Animal Feed Science and Technology*, **69**, 155-166 (1997).
- 2) 宇田川俊一, 食品のカビ汚染とリスクアセスメント, 日本医真菌学会雑誌, **46**, 11-15 (2005).
- 3) FAO, Manual on the application of the HACCP system in mycotoxins prevention and control, FOOD AND NUTRITION PAPER, **73** (2001).
- 4) Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Christensen, C.M., Chemistry of Fusarium and Stachybotrys Mycotoxins. In "MYCOTOXIC FUNGI, MYCOTOXINS, MYCOTOXICOSES", Vol. 1, eds. Wyllie, T.D. and Morehouse, L.G., (Marcel Dekker, Inc., New), pp. 365-420, (1977).
- 5) Larsen, J.C., Hunt, J., Perrin, I. and Ruckebauer, P., Workshop on trichothecenes with a focus on DON : summary report, *Toxicology Letters*, **153**, 1-22 (2004).
- 6) Tritscher, A.M. and Page, S.W., The risk assessment paradigm and its application for trichothecenes, *Toxicology Letters*, **153**, 155-163 (2004).
- 7) Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F. and Macdonald, A.M.C., A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins, *Animal Feed Science and Technology*, **78**, 21-37 (1999).
- 8) Cavret, S. and Lecoeur, S., Fusariotoxin transfer in animal, *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 444-453 (2006).
- 9) 榊 浩行, 1. 麦類の赤かび病防除及びマイコトキシン産生制御技術開発の展開方向, 1-1 マイコトキシン暫定基準値の設定と生産上の対応, 冬作物研究, 第 2 号, 1-5 (2002).
- 10) Josephs, R.D., Derbyshire, M., Stroka, J., Emons, H. and Anklam, E., Trichothecenes : reference materials and method validation, *Toxicology Letters*, **153**, 123-132 (2004).
- 11) Stroka, J., Spanjer, M., Buechler, S., Barel, S., Kos, G. and Anklam, E., Novel sampling methods for the analysis of mycotoxins and the combination with spectroscopic methods for the rapid evaluation of deoxynivalenol contamination, *Toxicology Letter*, **153**, 99-107 (2004).
- 12) Klötzl, M., Schmidt, S., Lauber, U., Thielert, G. and Humpf, H.U., Comparison of different clean - up procedures for the analysis of deoxynivalenol in cereal - based food and validation of a reliable HPLC method, *Chromatographia*, **62** (1/2), 41-48 (2005).
- 13) 田村善蔵, 大幡利一, 保田和雄編, 「けい光分析」第 1 版, (講談社, 東京) pp. 55-84 (1974).
- 14) 下山 進, 野田裕子, 三次元蛍光スペクトルによる古代繊維遺物に使用された染料の非破壊的同定法, 分析化学, **41**, 243-250 (1992).
- 15) Booksh, K.S., Muroski, A.R. and Myrick, M.L., Single - measurement excitation/emission matrix spectrofluorometer for determination of hydrocarbons in ocean water. 2. Calibration and quantitation of naphthalene and styrene, *Anal. Chem.*, **68**, 3539-3544 (1996).
- 16) 宮下一成, 蔦 瑞樹, 鈴木崇之, 都 甲珠, 杉山純一, 中内茂樹, 清水 浩, 3 次元スペクトルイメージングによるダイズ種子の内部構造の可視化, 食科工, **51** (12), 656-664 (2004).
- 17) Park, B., Lawrence, K.C., Windham W.R. and Smith, D.P., Performance of hyperspectral imaging system for poultry surface fecal contaminant detection, *Journal of Food Engineering*, **75**, 340-348 (2006).
- 18) 廣野元久, 林 俊克, 「JMP による多変量データ活用術」, (海文堂, 東京), (2004).

(平成 19 年 6 月 12 日受付, 平成 20 年 1 月 29 日受理)