蛍光指紋による小麦粉中のデオキシニバレノールの非破壊計測

藤田かおり, 蔦 瑞樹*, 杉山純一, 久城真代, 柴田真理朗

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

Non-destructive Measurement of Deoxynivalenol in Wheat Flour
Using Fluorescence Fingerprinting

Kaori Fujita, Mizuki Tsuta*, Junichi Sugiyama, Masayo Kushiro and Mario Shibata

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

A method of predicting deoxynivalenol (DON) concentrations in wheat flour was developed using fluorescence fingerprinting (FF), which is also known as excitation-emission matrix. A partial least square (PLS) regression model was built based on FF values at various wavelength conditions and reference values for DON concentrations were measured by chemical analysis. The model showed good fitting to the validation dataset with $R^2=0.983$ and SEP=1.4 ppm. The absolute values of the regression coefficient for the calibration model were significantly high in the wavelength range of Ex 240–400 nm and Em 500–600 nm. To reduce the number of wavelength conditions for shorter measurement time, PLS regression was again applied to the FF values at the above limited wavelength conditions. The fitting values of the acquired model to the validation dataset were $R^2=0.977$, SEP=1.6 ppm, and were not significantly different from those of the first model. The results indicate that rapid and non-destructive prediction of DON concentration in wheat flour is possible using FF.

(Received Feb. 1, 2011 ; Accepted May 11, 2011)

Keywords : Excitation-emission matrix, DON, Mycotoxin, *Fusarium*, PLS**キーワード** : 励起蛍光マトリクス, DON, カビ毒, フザリウム, PLS

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が一般的な植物病原菌である *Fusarium* spp. に罹病した時に蓄積がみられるカビ毒の1種である^{1)~3)}。*Fusarium* spp. への感染は穀類の収量・品質低下を招くばかりでなく、カビ毒蓄積穀粒を摂取したヒトや動物に腹痛、嘔吐、下痢などの有害作用を示すことから¹⁾²⁾⁴⁾、世界規模で重大な問題となっている⁵⁾⁶⁾。またわが国では、1940~1960年に北海道、東北地方をはじめ全国的な赤かび汚染による急性食中毒が多発し¹⁾、倒伏したコメからもDON汚染⁷⁾が報告されるなど、DON汚染の重要性が認識されるようになり、2002年5月に厚生労働省は、小麦玄麦中のDONに関して1.1 ppmの暫定基準値を定めた¹⁾。

DONの検出に関する研究は世界中で数多くの報告があるが¹⁾³⁾、従来のDON検出にはUV検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-UV) や電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフィー (GC-ECD) または酵素免疫測定吸着法 (ELISA) などが採用されており、測定結果を得るまで

に時間を要すること、高価な分析機材や煩雑な前処理を必要とすることなどが克服すべき課題となっている。そこで近年では煩雑な前処理を必要としない近赤外分光法や蛍光分析法などの簡易な計測手法をDON検出に応用する試みがなされている^{8)~12)}。特に近赤外分光を用いた検知^{10)~12)}についての報告は近年増加しており、非破壊・簡易なDON検出に対する要望が伺える。

一方、著者らはこれまでに蛍光分析法の一種である蛍光指紋 (別名: 励起蛍光マトリクス) を応用することで、無色で蛍光も微弱とされるDON³⁾に関して、標準DON試薬を用いた判別分析⁹⁾やその蛍光波長特定⁸⁾などを報告しており、簡易検出の可能性を提示している。蛍光指紋とは連続した特定の励起波長ごとに計測された蛍光スペクトルを励起波長、蛍光波長、蛍光強度の3軸の空間座標に示したものであり^{13)~16)}、蛍光強度の等しい点を結んだ等高線は成分固有の特徴的なパターンを示すため“蛍光指紋”と呼ばれている。このような特徴から、あらかじめ対象成分の蛍光指紋を計測することで様々な物質の混在系における特定物質の同定¹³⁾が可能である。また発光に基づく蛍光分析法は他の吸光に基づく分光法と比較して原理的に感度が高

〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

* 連絡先 (Corresponding author), mizukit@affrc.go.jp

い¹⁴⁾とされており、特に蛍光指紋は 1 波長条件における蛍光強度のみをターゲットとする一般的な蛍光分析と異なり膨大なデータが得られることから、主成分分析を組み合わせることでワインの醸造所や醸造年の判別を行った研究事例¹⁴⁾や穀物の内部構造や成分可視化を行った研究事例¹⁵⁾¹⁶⁾が報告されている。最近では PLS (Partial Least Squares) 回帰分析などの多変量解析手法と組み合わせることで特定物質の定量¹⁷⁾などにも広く応用されている。

これらの知見から、様々な成分が混在する試料中であっても、蛍光指紋に PLS 回帰分析を組み合わせることで DON 汚染濃度の推定が可能なのではないかと考えた。そこで本研究では、これまでの DON 標準試薬の定性的な解析⁹⁾をさらに発展させ、より現実的な汚染小麦粉の蛍光指紋測定と PLS 回帰分析による DON 濃度の定量的推定の可能性を探り、カビ毒の簡便な非破壊計測法開発に資する基礎的な知見を得ることを目的とした。

実 験 方 法

1. 材 料

(1) DON 汚染小麦の栽培

DON 汚染小麦の栽培は小麦産地である北海道で実施し、地方独立行政法人北海道立総合研究機構十勝農業試験場内の試験圃場にて人工的に DON 産生菌を接種し栽培した。小麦品種は北海道主要品種であり麺用小麦のホクシンを用いた。病原菌の接種には、えん麦粒培地に培養した *Fusarium graminearum* s. str (DON 産生菌、菌株番号 TYK101-1) を用い、穂ばらみ期に 30 mL/m² となるように畦間に散布し感染源とし、感染した小麦は赤かび病発生の有無で識別した。赤かび病発生程度の異なる小麦を得るために、試験区には本病に対して防除効果の異なる殺菌剤

を散布した。赤かび病汚染程度は開花期 4 週間後に各区の発病穂率で調査し、各汚染小麦は赤かび病汚染程度の異なる 4 種類の試験区 (A: 病穂率 0-5%, B: 病穂率 6-15%, C: 病穂率 16-30%, D: 病穂率 31% 以上) から成熟期に収穫した (表 1)。収穫は植物体ごと刈り取り、約 3 週間風乾後に脱穀し 2.2 mm の篩を通し調製した後、4℃ で冷蔵保存した。なお、感染程度の評価は病害虫発生予察事業実施手引き¹⁸⁾に則り、赤かび病防除以外の一般管理は十勝農業試験場慣行法に準じた。

(2) 小麦粉の調製

図 1 に小麦粉の調製方法の概略を示す。収穫した小麦粒はゴミや籾などの異物を取り除き、約 100 g を秤量後に汚染度毎に 0.5 mm のフィルターを装着したサイクロンミル (CSM-S1, UDY) を用い粉碎した。粉碎後はユニバックに入れて静置し、20 g ずつ 3 つのサンプルを得た。さらに、20 g のうち 15 g を化学分析用、5 g を蛍光指紋計測用に供試した。以上の作業により化学分析用、蛍光指紋計測用ともに 4 汚染段階について 3 つずつ、計 12 サンプルを作成した。

2. 化学分析方法

小麦粉における DON 濃度の化学分析は、デオキシニバレノール試験法 (平成 15 年 7 月 17 日厚生労働省通知 食安発第 0717001 号)¹¹⁾ に準じた方法にて行った。

DON 標準試薬にはマイコトキシン試験用試薬 (Wako Pure Chemical Industries, Japan) を用いた。分析には UV 検出器付きの高速液体クロマトグラフ (LC1100, Agilent Technologies, US) を用い、使用カラムは ODS カラム (L-Column ODS, 4.6 mm×250 mm, 5μm, CERI, Japan) であった。また UV 検出器は 220 nm に設定した。なお分析方法の詳細は、先の報文¹⁹⁾のとおりであり、外部

表 1 DON 汚染小麦栽培条件

処理 日程	<i>Fusarium graminearum</i> 接種 2008 年 6 月 11 日	殺菌剤 (赤かび病) 2008 年 6 月 11-19 日*	備考
ホクシン A	<i>Fusarium graminearum</i> 接種 (一部非接種区)	シルバキュアフロアブル散布区 メトコナゾール水和剤散布区 トップジン M 水和剤散布区 ベフトップジンフロアブル散布区	
ホクシン B	<i>Fusarium graminearum</i> 接種	シルバキュアフロアブル散布区 メトコナゾール水和剤散布区 トップジン M 水和剤散布区 ベフトップジンフロアブル散布区	
ホクシン C	<i>Fusarium graminearum</i> 接種	まくぴか添加区 ミックスパワー添加区 アブローチ BI 添加区 ニーズ添加区	展着剤としてイミノクタジン 酢酸塩を使用
ホクシン D	<i>Fusarium graminearum</i> 接種	薬剤無散布	

*) 赤かび病の殺菌剤は、各区 2 回で散布。またホクシン A・B では 2008 年 6 月 11 日と 18 日、ホクシン C では 2008 年 6 月 12 日と 19 日に実施。

図 1 サンプル調製および実験概略図

図 2 データ前処理工程

試験精度管理試験を受け良好な値を得ている。

3. 蛍光指紋計測および解析

(1) 蛍光分光光度計および解析ソフト

蛍光分光光度計として F7000 ((株)日立ハイテクノロジーズ) を用いた。また計測にはデータオペレーションソフト FL Solutions 2.1 ((株)日立ハイテクノロジーズ) を用いた。蛍光指紋データの等高線図作成には FL Solutions 2.1 を使用し、データの解析には、統計解析ソフト JMP 6 (SAS Institute Inc., USA) および表計算ソフト Excel 2007 (日本マイクロソフト) を用いた。

(2) 蛍光分光光度計の測定条件および蛍光指紋計測

分光蛍光光度計の励起波長・蛍光波長側のスリット幅と計測波長間隔はいずれも 10 nm に設定し、計測波長範囲は

励起波長、蛍光波長ともに最大波長範囲である 200–900 nm とした。なお、ホトマル印加電圧は 350 V、波長走査速度は 30 000 nm/min、レスポンスは 0.002 sec に設定した。粉碎したサンプルを 240 mg 秤量し、F7000 専用の粉末計測用セルに充填し、蛍光指紋計測を行った。さらに、4 汚染段階において 3 つずつのサンプルのそれぞれにつき、秤量、充填および蛍光指紋計測を 5 回繰り返し、合計で 60 個のデータを得た。

(3) 蛍光指紋データの前処理

蛍光指紋は、200–900 nm の波長範囲を 10 nm 間隔で計測した場合、励起波長、蛍光波長ともに 71 波長で取得され、計測波長条件の組み合わせ (71 波長×71 波長) は 5041 通りとなる。取得した蛍光指紋データに以下 4 つの前処理

を適用し分析に供した (図 2)。

1) 本実験での解析対象は蛍光波長が励起波長よりも長い波長領域の蛍光指紋データである。そこで、蛍光波長が励起波長よりも短い範囲のデータを除外した。

2) 蛍光指紋データのうち、励起光の散乱光およびその 2 次光, 3 次光, 4 次光²⁰⁾などのデータ処理上の外乱要因が含まれる波長領域のデータを削除した。具体的には、蛍光波長が励起波長の整数倍となる波長領域と、その前後の波長領域に含まれるデータの削除を行った。なお散乱光の波長範囲はサンプルの性状により異なるため²⁰⁾, 削除範囲の決定は蛍光指紋計測後に行った。

3) 励起光源であるキセノンランプの輝度値が低い領域 (励起波長 240 nm 以下) と、蛍光と検出するホトマルの感度が低い領域 (蛍光波長 800 nm 以上) のデータは S/N が低いため、当該領域のデータを削除した。

4) 残された蛍光強度値を、最も低い励起波長 240 nm から蛍光波長軸方向に順次、 I_1 , I_2 , I_3 ...と抽出し、それを各励起波長においても繰り返し、最後の励起波長 770 nm, 蛍光波長 800 nm における I_n までの蛍光強度値を一列に並べたベクトルデータを作成し、PLS 回帰分析の説明変数に用いた。

(4) PLS 回帰分析

前処理後の蛍光指紋データはキャリブレーション群とバリデーション群の 2 群に分けた。キャリブレーション群 (30 サンプル) に PLS 回帰分析を実施し、化学分析で算出した DON 濃度を目的変数、各波長条件における蛍光強度値を説明変数とすることで DON の濃度の推定式作成を試みた。また作成した推定式精度を評価するため、バリデーション群 (30 サンプル) を用いて検証を行った。なお推定式作成における潜在変数の決定には leave-one-out 交差検証法を用い、キャリブレーションサンプル群についての予測残差平方和 (Prediction Residual Error of Squares, PRESS) が最小となるように潜在変数を導出した。さらに導出された潜在変数を用いて DON 濃度の推定式を作成し、推定値と分析値の間の決定係数 (R^2), 予測標準誤差 (Standard Error of Calibration, SEC) および推定標準誤差 (Standard Error of Prediction, SEP) を算出し推定式の堅牢さの検証を行った。

実験結果および考察

1. サンプルの性状と化学分析

HPLC-UV 分析の結果、サンプルの DON 濃度は 2.4 ppm から 26.6 ppm の範囲にあり、供試サンプルの DON 汚染濃度が全体として非常に高いことがわかった (表 2)。これらの DON 汚染濃度は農薬散布を適切に行えば起こり得ない値であるが、人為的に DON 産生菌を接種した為に、特に農薬散布を行わなかった試験区 (ホクシン D) の DON 濃度は高い値を示す結果となった。また薬剤防除区におい

表 2 HPLC-UV における DON 分析結果

サンプル名	DON 分析値 (ppm)		
	1	2	3
ホクシン A	2.4	2.6	2.4
ホクシン B	2.6	2.6	2.4
ホクシン C	6.6	7.3	7.7
ホクシン D	26.6	25.9	26.2

ても、各汚染区の相対比較を行うために全ての区に同一菌の接種をしたこと、さらに、各汚染区が隣接していたことから、比較的高濃度の汚染となっており、結果として DON 汚染濃度の低いサンプルを得ることはできなかった。

2. 蛍光指紋計測

各サンプルの蛍光指紋は縦軸を励起波長、横軸を蛍光波長とした蛍光強度を等高線図として示す (図 3)。また、蛍光指紋を構成するスペクトルの一例として、ホクシン A における蛍光波長 330 nm 時の励起スペクトル (a) と励起波長 280 nm 時の蛍光スペクトル (b) を図 3 に示す。なお、図 3 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散乱光の 2 次光, 3 次光, 4 次光であり、それ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る²⁰⁾。

図 3 において、サンプル由来の蛍光が見られた波長域は励起波長 200~340 nm 付近の範囲であった。この結果はこれまでの DON 標準溶液の蛍光が観察された波長帯の一部と一致⁸⁾しており、小麦粉中における DON の蛍光検出が可能であることが推察された。

3. PLS 回帰分析による DON 汚染度の推定

前処理前の各サンプルの蛍光指紋は 5 041 波長条件の蛍光強度値である。汚染小麦粉サンプルにおける散乱光およびその n 次光の範囲は、1 次光: 励起波長 $\times 1 \pm 20$ nm, 2 次光: 励起波長 $\times 2 \pm 20$ nm; 3 次光: 励起波長 $\times 3 \pm 20$ nm; 4 次光: 励起波長 $\times 4 \pm 30$ nm であった。これらの波長範囲におけるデータを前処理工程 1), 3) のデータとともに削除した結果、蛍光指紋は 1 345 の波長条件の蛍光強度値となった。そこで、目的変数を DON 濃度の化学分析値、説明変数を 1 345 次元の蛍光強度値として PLS 回帰分析による DON 濃度推定を実施した。

交差検証法では 6 つの潜在変数が選択された。選択された潜在変数を用いた DON 汚染度の推定結果を図 4 に示す。その結果、キャリブレーション群では非常に高い相関 ($R^2=0.990$) が得られ蛍光指紋によって DON 濃度を説明できることが明らかとなった。またキャリブレーション群の推定式における標準誤差は 1.1 ppm となり、高濃度の DON 汚染であれば十分に推定が可能であると考えられた。さらに、バリデーション群においてもキャリブレー

図 3 汚染小麦粉の蛍光指紋

図 4 PLS による汚染小麦粉の汚染度推定

ション群とほぼ同じ当てはまり ($R^2=0.983$) であり、それぞれの推定式における標準誤差は $SEC=1.1$ ppm, $SEP=1.4$ ppm と大きくは異なることから、導出された推定式が堅牢であると考えられた (図 4)。

4. DON 汚染度推定に関わる波長条件の導出

算出された推定式に用いられた波長条件を明確にするために、PLS 回帰推定式の回帰係数を等高線図として示した (図 5)。回帰係数の値は便宜的に絶対値で示した。なお、PLS 回帰推定式における回帰係数は推定式を説明する手法の 1 つであり、係数の大小を検討することで DON 汚染推定に寄与する波長条件を明らかにすることができる。図

5 を検討した結果、励起波長 240-400/蛍光波長 500-600 nm の波長領域の蛍光情報が DON 濃度の推定に強く影響していることが示された。この波長領域は DON 標準試薬の蛍光が観察された領域と近いこと⁸⁾から、算出された推定式が DON の蛍光情報に基づいていると推察された。また係数の高い波長条件が局所的であることから、この限られた波長領域のみの蛍光指紋計測で DON 汚染程度が推測可能であると考えられた。

DON 汚染程度の推定に求められることが迅速性であることから、波長条件を少なくして計測時間を短縮することが望ましい。本実験では、1 回の計測で得られる蛍光指紋

図 5 PLS 回帰における回帰係数の分布

表 3 波長縮減による DON の推定

			推定式作成		推定式検定	
	計測波長条件	計測時間	R ²	SEC (ppm)	R ²	SEP (ppm)
最大波長	Ex200-900 nm/Em200-900 nm	3.7 min				
縮減前	Ex240-800 nm/Em270-800 nm	2.5 min	0.990	1.1	0.983	1.4
縮減後	Ex240-400 nm/Em500-600 nm	23 sec	0.987	1.2	0.977	1.6

の波長条件数は、励起波長 71 条件×蛍光波長 71 条件の計 5 041 条件であり、解析用の前処理により不要データを削除した後も、1 回あたりの蛍光指紋の波長条件数は 1 345 条件に達する。また、全範囲に対して計測を行なうと、計測時間が 1 回あたり 222 秒 (3.7 分) かかり、多数の試料を計測する場合、時間的な制約から処理量が制限される可能性がある。一方、実際に検量線の作成に寄与している励起・蛍光波長は図 5 に示されるように限られており、この縮減した波長範囲のみを計測することによって、同等の精度が得られるのであれば、計測時間の短縮が期待できる。そこで、上述した係数の高い波長条件の蛍光情報のみを抽出し PLS 回帰分析を再度適用した。その結果、交差検証法では PLS 回帰分析に用いる潜在変数は波長条件の縮減前と同じ 6 つが選ばれた。また蛍光指紋データの縮減前と比較すると、キャリブレーション群およびバリデーション群の決定係数は低くなったものの ($R^2=0.983$ と $R^2=0.977$)、SEC は 1.2 ppm、SEP は 1.6 ppm と全ての波長条件を用いた場合とほぼ同等となった (表 3)。つまり、DON 汚染程度の推定は縮減前と同等の精度が期待できることを示唆する結果となった。また、蛍光指紋計測範囲を限定することで、1 回の計測時間を約 1/10 に短縮することができた (表 3)。

5. 結 言

本研究では数波長だけの情報しか得られない従来の蛍光分析とは異なり、数千次元に及ぶ膨大な情報量をもつ蛍光

指紋から得られるデータを解析することで、汚染小麦粉における DON の濃度を推定することが可能となった。また、これまでの蛍光指紋を用いた目的物質の計測に関する報告では、蛍光指紋の等高線図におけるその蛍光ピークを観察すること¹³⁾ や主に目的物質の定性⁸⁾⁹⁾¹²⁾ が多く、既報論文における DON 検出の報告も標準試薬を用いた定性分析に留まっていた⁸⁾⁹⁾。それに対し今回の実験では蛍光指紋の解析に PLS 回帰を用いることで、小麦粉に調製された状態においても DON 定量の可能性を示すことができた。特に今回導出された推定式では、キャリブレーション群とバリデーション群の標準誤差は大きく異ならず、高濃度サンプルにおいては、DON 濃度の推定が可能であることが示された。さらに波長条件の縮減による検討結果より計測時間短縮の可能性が示されたことから、高濃度汚染サンプルを対象とした 1 次スクリーニングとしての活用可能性が示唆された。

しかしながら、今回の実験では人為的に汚染小麦を作成したため、日本における DON の暫定基準値よりも高濃度のサンプルを実験に供試することとなった。今後、より現実的な汚染レベルの DON 汚染試料を実験に供試すると共に、S/N の向上を目指した計測手法の改良を行うことで、基準値付近における DON 濃度の推定精度向上を目指す予定である。また、DON だけでなく他のカビ毒に関しても、本研究と同様に蛍光指紋による定量が可能であると期待さ

れる。

要 約

蛍光指紋を用いて人工的に *Fusarium* 感染させた小麦を粉砕した小麦粉中のデオキシニバレノール (DON) 濃度の推定を行った。DON 濃度の推定式作成には PLS 回帰分析を用い、小麦粉の蛍光指紋から DON 濃度を推定する回帰式を作成した。

(1) キャリブレーション群およびバリデーション群における推定精度は決定係数 $R^2=0.990$ と $R^2=0.983$ であり、残差も $SEC=1.1$ ppm, $SEP=1.4$ ppm と大きくは異ならなかった。

(2) キャリブレーション群における PLS 回帰係数の絶対値は、励起波長 240–400 nm/蛍光波長 500–600 nm の波長範囲において比較的大きいことから、上記波長条件が DON 濃度推定に寄与していると推定された。

(3) DON 検知には迅速性が求められるため、計測時間の短縮を目的に上記波長条件における蛍光指紋のみに PLS 回帰を適用した。その結果バリデーションデータの推定精度は、 $R^2=0.977$, $SEP=1.6$ と全波長条件を用いた場合と大きく変わらず推定可能であることが明らかとなった。

以上のことから、蛍光指紋により、迅速かつ非破壊で小麦粉の DON 濃度の推定が可能であることが示された。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発」により実施された。また本研究を遂行するに当たり、地方独立行政法人 北海道立総合研究機構十勝農業試験場、小澤徹氏には、カビ汚染小麦の栽培に多大なるご協力をいただいた。ここに記して厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 宇田川俊一, 食品のカビ I 基礎編「食品のカビ汚染と危害」, (幸書房, 東京), pp. 96–110 (2004).
- 2) 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).
- 3) Wyllie, T.D. and Morehouse, L.G., Mycotoxins, mycotoxins, mycotoxins an Encyclopedic Handbook, Volume 1 Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins, pp. 365–420, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, (1977).
- 4) Cavret, S. and Lecoeur, S., Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 444–453 (2006).
- 5) 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).
- 6) Tritscher, A.M. and Page, S.W., The risk assessment paradigm and its application for trichothecenes. *Toxicology Letters*, **153**, 155–163 (2004).
- 7) Tanaka, K., Kobayashi, H., Nagata, T. and Manabe, M.,

Natural occurrence of trichothecenes on lodged and water - damaged domestic rice in Japan. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **45**, 63–66 (2004).

- 8) Fujita, K., Tsuta, M., Kokawa, M. and Sugiyama, J., Detection of deoxynivalenol using fluorescence excitation-emission matrix. *Food Bioprocess Technol*, **3**, 922–927 (2010).
- 9) 藤田かおり, 蔦 瑞樹, 杉山純一, 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, 日本食品科学工学会誌, **55**, 177–182 (2008).
- 10) Pettersson, H. and Åberg, L., Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control*, **14**, 229–232 (2003).
- 11) Rasch, C., Kumke, M. and Löhmannsröben, H.-G., Sensing of Mycotoxin Producing Fungi in the Processing of Grains. *Food Bioprocess Technol*, **3**, 908–916 (2010).
- 12) Dowell, F.E., Ram, M.S. and Seitz, L.M., Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy. *Cereal Chemistry*, **76**, 573–576 (1999).
- 13) 下山 進, 野田裕子, 三次元蛍光スペクトルにおける古代染織遺物に使用された染料の非破壊的同定法, 分析科学, **41**, 243–250 (1992).
- 14) Yin, C., Li, H., Ding, C. and Wang, H., Preliminary investigation on variety, brewery and vintage of wine using three-dimensional fluorescence spectroscopy. *Food Sci. Technol. Res.*, **15**, 27–38 (2009).
- 15) 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, 日本食品科学工学会誌, **51**, 656–664 (2004).
- 16) Tsuta, M., Miyashita, K., Suzuki, T., Nakauchi, S., Sagara, Y. and Sugiyama, J., Three-dimensional visualization of internal structural changes in soybean seeds during germination by excitation-emission matrix imaging. *Transactions of the ASABE*, **50**, 2127–2136 (2007).
- 17) 杉山武裕, 藤田かおり, 蔦 瑞樹, 杉山純一, 柴田真理朗, 粉川美踏, 荒木徹也, 鍋谷浩志, 相良泰行, 励起蛍光マトリクスによるそば粉と小麦粉の混合割合の推定, 日本食品科学工学会誌, **57**, 238–242 (2010).
- 18) 北海道農政部「病害虫発生予察事業実施手引」, 北海道農政部農業改良課 編, (北海道農政部農業改良課, 北海道), (2001).
- 19) Thammarawong, M., Okabe, M., Kawasaki, T., Nakagawa, H., Nagashima, H., Okadome, H., Nakajima, T. and Kushiro, M., Distribution of deoxynivalenol and nivalenol in milling fractions from fusarium-infected japanese wheat cultivars. *J Food Prot.*, **73**, 1817–1823 (2010).
- 20) 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. 69–75 (1974).

URL cited

- i) http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/html/tsuchi/item_search.html (June 7, 2011)「食発 第521001号」で検索
- ii) http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/html/tsuchi/item_search.html (June 7, 2011)「食安発第717001号」で検索

(平成 23 年 2 月 1 日受付, 平成 23 年 5 月 11 日受理)