大量生産のための *Aspergillus ochraceus* のオクラトキシン 産生条件, 精製法等の検討

(昭和 54 年 8 月 3 日受理)

熊田勝紀^{*1} 天野立爾^{*2}
一戸正勝^{*1} 内山 茂^{*1}

Culture Conditions and Purification Method for Large-scale Production of Ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*

Katsunori KUMATA^{*1}, Ryūji AMANO^{*2}, Masakatsu ICHINOE^{*1}
and Shigeru UCHIYAMA^{*1}

(^{*1} National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo;

^{*2} National Consumer Information Center: 6883-5, Kamimizo, Sagami-hara, Kanagawa)

It was found that three of fifty-one strains of *A. ochraceus* group fungi isolated from green coffee beans produced ochratoxin A (OCT-A). One of these three strains and another isolated from barley produced high levels of OCT-A.

Several of the twenty-seven single-spore isolates derived from these two strains showed stable and high production of OCT-A. A 300 ml Erlenmeyer flask with 30 g of polished rice and 12 ml of water was autoclaved, then inoculated with *A. ochraceus* and incubated for 2 weeks at 25°C. These conditions were optimum for toxin production.

The methods for extraction, column chromatography, crystallization, etc. were examined, and suitable procedures to obtain pure ochratoxins from the moldy rice were established. Large amounts of crystalline OCT-A and B were easily obtained.

Studies on the bioactivity of OCT-A are in progress.

(Received August 3, 1979)

はじめに

Aspergillus ochraceus, *Penicillium viridicatum* などの産生するオクラトキシン (OCT) は, 家畜や実験動物の腎および肝臓に障害を与えることが知られており^{1), 2)}, 近年では, OCT-A の肝および腎腫瘍性が問題とされている³⁾. 一方, 穀類や豆類の OCT 自然汚染例や産生菌株による汚染例もいくつか報告されており^{4)~7)}, 未焙焼コーヒー豆では, 267 検体中 19 例に OCT が検出され, 主な汚染菌として *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. glaucus* が報告されている⁵⁾. このように食品を通じて OCT が人に摂取される可能性を示唆する研究があり, 食品衛生上注目される. したがって, この OCT の生物活性に関する研究が早急になされる必要があると考えられる. そして, その研究には, 本トキシ

ンが多量に必要であり, すでに生産菌株^{8), 9)}, 高生産性培養条件^{10)~12)}, トキシンの抽出・純化の方法^{13)~15)}などについて報告があるが, これら既報の研究も, 十分な量のトキシ供給方法として必ずしも満足すべきものではない. そこで, まず食品・食品原料から分離された *A. ochraceus* 菌株の OCT-A 生産菌株の検索から始め, OCT-A 大量供給を目的として高生産能菌株を求め, さらにその中で安定した生産菌株を得るために, 単孢子分離法による選抜を行った.

このようにして得た菌株を大量に培養し, 産生された大量の OCT-A を単離・精製する方法を検討した.

実験方法

1. 試薬・培地および装置

1-1. 試 薬

トキシン標品: OCT-A は Makor Chemicals 社のものを, OCT-B は筆者らが別の実験で得たものを用いた.

^{*1} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*2} 国民生活センター: 神奈川県相模原市上溝 6883-5

カラム用シリカゲル：シリカゲル 60 (Merck 社製, 70~230 メッシュ) を 120°, 1 時間活性化して用いた。

薄層板：既製シリカゲル 60 プレート (Merck 社製, 20×20 cm) を用いた。

その他の試薬は、市販の特級品を購入し、必要があれば精製して用いた。

1-2. 培 地

PDA 培地：常法に従って調製した。

YES 液体培地：yeast エキス (Difco) 20 g と sucrose 150 g に水を加えて 1 L としたものを用いた (pH 6.4)。

精白米、割砕小麦培地：それぞれ市販の精白米および小麦を粗く割砕したものにその 40% 量の水を加えて用いた。以後培地量を表す場合は、加水前の重量を示した。

なお各培地は 121°, 15 分滅菌後使用した。

1-3. 装 置

デントメーター：Schoeffel 社のスペクトロデントメーター SD-3000 型

クロマト用カラム管：内径 40 mm, 長さ 500 mm のコック付ガラス管

分光光度計：(株)日立製作所製, 556 形二波長自記分光光度計

質量分析計：日本電子(株)製, JMS-01SG-2

2. OCT-A 産生菌株の検索

2-1. スクリーニング

未培焼コーヒー豆由来の *A. ochraceus* 菌群 51 菌株について OCT 生産性のスクリーニングを行った。

PDA 斜面培地上であらかじめ生育させた菌株を, YES 液体培地 7 ml を入れた試験管に 1 白金耳植菌し, 斜面の状態で 25°, 2 週間培養した。これをろ過して得た培養ろ液を直接薄層板に塗布し, トルエン-酢酸エチル-ギ酸 (6:3:1) およびベンゼン-酢酸 (9:1) の展開溶媒で, 標品と共に展開させ, 紫外線灯下で OCT-A のけい光スポットを検した後アンモニア蒸気にさらしてけい光が増すことと色調が変化することにより確認した。

2-2. 高生産性菌株および培養条件

コーヒー豆由来の *A. ochraceus*, NHL-5302, NHL-5303, 5304 およびムギ類由来の NHL-5294, 5297 について精白米培地および割砕小麦培地での OCT 産生量を調べた。

培養条件は以下の通りである。すなわち, 精白米あるいは割砕小麦 30 g を 300 ml の三角フラスコに取り, 水 12 ml を加えてよく振り混ぜ, 均一に吸水させた後紙栓をして滅菌した。これにあらかじめ PDA 斜面培地上で生育した各菌株の種菌を接種し, 25°, 2 週間静置培養した。なお培養 5 日目よりほぼ毎日フラスコを軽くたたいて培地をかく拌した。各菌株とも 3 個のフラスコに

培養し, それぞれ OCT-A 産生量を調べた。

さらに, 一部菌株については培養容器と培地量の比率等に関する実験も行った。

2-2. 単胞子分離

2 株の *A. ochraceus*, 大麦由来の NHL-5294 およびコーヒー豆由来の NHL-5304 株について *Conidia* 分散液を平板培地上に塗布して発芽させ, 実体顕微鏡下で釣菌する方法¹⁰⁾により単胞子分離を行い, それぞれ NHL-5294 株から 9 子株, NHL-5304 株から 18 子株を分離した。得られた子株について精白米培地 (300 ml 三角フラスコに 30 g 入れたもの) を用いて 25°, 2 週間静置培養を各菌株 3 フラスコずつ合計 81 フラスコ行って, それぞれの OCT-A 産生量を調べた。

2-4. 定 量 法

培養後の三角フラスコに抽出溶媒 (150 ml×1, 100 ml×2) を注ぎ入れ, デカンテーション分離により抽出液を得, 濃度調製を行い試験溶液とした。

OCT-A 標準溶液 (20.0 μg/ml クロロホルム中) 2, 3, 4 μl および試験溶液を薄層板に塗布し, ベンゼン-酢酸 (88:12) の展開溶媒で展開させ, 各々のスポットのけい光強度を励起波長 340 nm, けい光波長 475 nm においてデントメーターで測定した。

3. OCT の単離・精製

3-1. 抽出溶媒の検討

クロロホルム, 酢酸エチル, クロロホルム-メタノール (3:1), クロロホルム-酢酸 (99:1) の 4 種溶媒を用いて *A. ochraceus*, NHL-5304 株を 25°, 2 週間静置培養した精白米培地 (500 ml の三角フラスコに 50 g 入れたもの, 各溶媒ごとに 3 フラスコずつ) からの OCT-A 抽出量を調べた。

紙栓とフラスコの間に細管を挿入し, この細管を通して抽出溶媒 150 ml をフラスコに注ぎ入れ, 水浴中で加温, 殺菌した後ときどき振とうし, 1 昼夜暗所に放置した。これをデカンテーションにより抽出液を分離し, フラスコ中の培地を少量の溶媒で洗い, 洗液と抽出液を合し, 1 回目抽出分とした。次に 100 ml の抽出溶媒を再びフラスコに注ぎ入れ, 1 夜放置後, 同様に 2 回目抽出分を得た。さらに 100 ml の抽出溶媒を用いて同様抽出操作を行い 3 回目の抽出分を得た。これらの 1~3 回目それぞれの抽出液を薄層クロマト用試験溶液として, 4 種の溶媒の各回ごとの OCT-A 抽出量を調べた。

3-2. OCT の単離・精製

A. ochraceus, NHL-5294 および 5304 株を多数の精白米培地 (300 ml の三角フラスコに 30 g 入れたもの) で 25°, 2 週間静置培養した。このカビ米から Scheme 1 に示す手順で OCT を単離・精製した。

培地 5 kg 分を 1 単位として, まずクロロホルム-酢酸 (99:1) 35 L を用いてカビ米から OCT の抽出を行い, この抽出溶液を約 100 ml に濃縮後マグネチック

Scheme 1 Isolation and purification of ochratoxins

a) Values are the mean (3 observations)

スターラーを用いてかくはんしながら 4 L のヘキサン中に滴下し、ヘキサン可溶性物質を取り除いた。生じた沈殿物をろ取し、少量のヘキサンで洗浄後、約 500 ml のクロロホルムに溶解した。この溶液を分液漏斗に移し、0.5 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (250 ml×2, 150 ml×1) と振り混ぜて分配抽出を行い、炭酸水素ナトリウム溶液を 4 N 塩酸で pH 2 に調製後クロロホルム (250 ml×2, 150 ml×1) と振り混ぜて抽出した。クロロホルム抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過後減圧下で溶媒を留去し粗毒素とした。次に、シリカゲル 120 g をクロロホルムで充てんしたカラムに、粗毒素 4 g を約 10 ml のクロロホルムに溶解して負荷しクロマトグラフィーを行った。まず 150 ml のベンゼン、続いてベンゼン-酢酸 (95:5-850 ml; 92.5:7.5-200 ml; 90:10-300 ml; 88:12-900 ml) およびベンゼン-酢酸-アセトン (75:15:10-100 ml) を順次 3.5~4 ml/min の速さで流し、溶出液を 100 ml ずつ分取して各々に含まれる OCT-A, B および不純物を TLC でチェック、いくつかの画分にまとめた。

OCT-A を含有する画分について酢酸を除くために水洗し、脱水後減圧下で濃縮した。これに 30~40 ml のベンゼンを加え、わずかに加温して溶解し、ゆっくり冷却して OCT-A を晶出させた。結晶成長後母液を除去し少量の冷ベンゼン-ヘキサン (3:1) で結晶を洗浄した。この結晶化操作をさらに 2 回繰り返した後、その純度を TLC および融点測定で調べ、必要があればさらに再結

晶を繰り返す、最終的にマスペクトル、紫外外部吸収スペクトルから、その同定と純度の確認を行った。

結果および考察

1. 食品由来の *A. ochraceus* 菌株の OCT 生産性

未焙焼コーヒー豆から分離した *A. ochraceus* 菌株 51 菌株について YES 培地上での OCT 生産性を調べた結果、トキシン生産性菌株は、*A. ochraceus* と同定された 5 菌株中の 3 菌株であった。

一戸ら¹⁷⁾は、ムギ類由来の *A. ochraceus* 菌株で実験した結果 *A. ochraceus* で 2/4, *A. sclerotiorum* 2/7, *A. ostianus* 1/4 という率で OCT 生産株が見いだされたと報告している。なお、この実験では、半定量的ながら生産性の高いのは *A. ochraceus* の 2 株で他の菌株の OCT 生産量は少なかったとしている。

このように、食品中から分離された *A. ochraceus* のかなりの菌株が OCT 生産能を有することは注目すべきことと考えられる。

2. OCT-A 高生産株の選定

前記 1. および一戸ら¹⁷⁾のスクリーニングで得られた OCT 生産株のうち高生産能を有すると思われる 5 株を精白米培地で培養し、OCT-A 産生量を調べた。

Table 2 に示すように最高産生量は NHL-5304 株の 3227 µg/g 培地で、続いて NHL-5294 株の 1680 µg/g 培地であり、その他の菌株もかなり良好な生産性を示し

Table 1. Production of Ochratoxins by Members of *Aspergillus ochraceus* Group Fungi Isolated from Green Coffee Beans

Species	No. of examined	Ochratoxins producer
<i>A. elegans</i> Gasperini	27	0
<i>A. melleus</i> Yukawa	9	0
<i>A. ochraceus</i> Wilhelm	5	3
<i>A. ostianus</i> Wehmer	3	0
<i>A. petrakii</i> Vörös	2	0
<i>A. ochraceus</i> group	5	0
Total	51	3

Table 2. Ochratoxin A Production by *Aspergillus ochraceus* Group Fungi on Rice

Strain No.	Source	Ochratoxin A ^{a)} (µg/g)
NHL-5294	Barley	1680 (650) ^{b)}
NHL-5297	Barley	1080 (47.5) ^{b)}
NHL-5302	Green coffee	1587
NHL-5303	Green coffee	1080
NHL-5304	Green coffee	3227

a) Values are the mean (3 flasks)

b) On wheat

Table 3. Ochratoxins Production by 27 Single-Spore Isolates Derived from *Aspergillus ochraceus*

Strain No.	OCT-A ($\mu\text{g/g}$) ^{a)}	OCT-B ($\mu\text{g/g}$) ^{b)}
NHL-5294-1	1710 $\pm$ 230	NE ^{c)}
2	700 $\pm$ 730	NE ^{c)}
3	1320 $\pm$ 380	NE ^{c)}
4	1920 $\pm$ 230	1810
5	2210 $\pm$ 220	2150
6	2310 $\pm$ 100	2080
7	2830 $\pm$ 420	2370
8	2570 $\pm$ 480	1930
9	1190 $\pm$ 290	580
NHL-5304-G ^{d)} -1	1790 $\pm$ 760	NE ^{c)}
2	1380 $\pm$ 230	NE ^{c)}
3	1430 $\pm$ 350	NE ^{c)}
4	2030 $\pm$ 190	730
5	1800 $\pm$ 150	700
6	2070 $\pm$ 100	640
7	260 $\pm$ 310	80
8	1260 $\pm$ 1250	490
9	2830 $\pm$ 180	1010
C ^{e)} -1	550 $\pm$ 30	110
2	1930 $\pm$ 1680	1100
3	1610 $\pm$ 320	710
4	770 $\pm$ 880	310
5	2410 $\pm$ 310	1190
6	2180 $\pm$ 600	1120
7	1530 $\pm$ 240	NE ^{c)}
8	1360 $\pm$ 570	NE ^{c)}
9	1580 $\pm$ 440	NE ^{c)}

^{a)} Values are the mean (3 flasks) $\pm$ S.D.

^{b)} Values are the mean (3 flasks)

^{c)} Not examined

^{d)} Globose head

^{e)} Columner head

た。しかし、上記 2 株は、予試験の結果などから産生量にバラツキが認められたので、さらに生産性が高く、かつ安定した菌株を得るため、この 2 株を親株として単孢子分離を行い、それぞれ 9 および 18 子株を得、精白米培地上で OCT の生産能を見た。

NHL-5294 を親株とする 9 子株 27 培養フラスコの OCT-A 産生量は 170 $\sim$ 3160 $\mu\text{g/g}$ 培地、NHL-5304 を親株とする 18 子株 54 培養フラスコで 20 $\sim$ 3130 $\mu\text{g/g}$ 培地という結果で、Table 3 に示すように各子株内の OCT-A 産生量の標準偏差を求めたところ、NHL-5294-6, NHL-5304-G-6 および NHL-5304-G-9 の 3 子株

が比較的 OCT-A 高生産能をもつ安定株であると考えられたので、以後の大量培養の際はこれらの菌株を用いることとした。

3. 培養条件

Schindler ら¹⁸⁾は、OCT 産生用培地として割砕小麦を推奨しているので、NHL-5294 および 5297 株を用いて米培地との比較を行ったが、Table 2 に示したように米よりその生産性は劣っていた。また同報告では培地に加える水の量についても言及しており、割砕小麦 100 g に 40 $\sim$ 70 ml の水を加えた場合に OCT 生産性が良好であったとしている。米の場合の加水量は OCT 産生量、菌の発育状況、オートクレーブ後の培地の物理的状態等を勘案して、米の 40% 量が良いと判断した。

また、培養容器と培地量との関係についていくつかの実験を行ったところ 300 ml の三角フラスコに 30 g 程度の米という割合が効率が良いことが明らかになったので、以後は 300 ml あるいは 500 ml の三角フラスコに 30 あるいは 50 g の米を入れて培養することとした。なお、何種類かの OCT 産生用液体培地が提案されている^{10), 12), 19)}が、筆者らの行った予備実験では良い結果が得られなかったことと、OCT 抽出時に孢子飛散を能率良く防止する適当な方法が見いだせず、環境汚染の危険があるなどのために今回は採用しなかったが、今後はこの液体培地についても検討する必要があると考えている。

4. OCT-A の単離・精製

カビ米からの抽出溶媒の比較検討の結果を各溶媒系それぞれ 3 回の各回ごと OCT-A 抽出量を各溶媒ごとにその総計を 100 として Table 4 に示した。

OCT-A 抽出量の各回ごとの推移から見て、効率が比較的劣るのはクロロホルムのみを抽出溶媒に用いた場合であり、他の 3 種は同程度と考えられたが、酢酸エチルやクロロホルム—メタノールを用いた場合は培地水分のひきこみによって、後の精製処理が煩雑であるなど操作上の便宜を考えあわせて 1% 酢酸含有クロロホルムが適当であると判断した。また、抽出溶媒を培養フラスコに注ぎ入れる際に紙栓とフラスコの間細管を挿入して、この細管を通して行うという手法が孢子の飛散を防ぐの

Table 4. Effect of Extraction Solvent on Ochratoxin A in Moldy Rice

Solvent	Ochratoxin A ^{a)}			
	1st	2nd	3rd	Total
Chloroform	64	25	11	100
Ethyl acetate	83	14	3	100
Chloroform—Methanol (3 : 1)	81	15	4	100
Chloroform—Acetic acid (99 : 1)	80	15	5	100

^{a)} Values are the mean (3 flasks)

Fig. 1. Chromatography of ochratoxins on a silica gel column

に有効であり、環境の汚染防止と実験者の安全に役立つ。

抽出以後の手順は Scheme 1 に示したとおり行った。ヘキサンによる予精製では、なるべく細かで均一な沈殿物を作るのが、後の精製に良いようであった。各操作はディスポーザブルの手袋を着用して行い、使用器具は次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸してトキシンを分解するなどの配慮をした。

シリカゲルカラムを用いて粗毒素のクロマトグラフィーを行い、その OCT 溶出パターンは Fig. 1 に示すとおりであった。

この方法は Nesheim¹⁵⁾ が行ったベンゼン-酢酸 (0~15%) リニアグラジエントの方法をモディファイして、簡単で大量の粗毒素を短時間に処理できるようにしたものであり、十分良好な結果を得た。すなわち Fig. 1 に示したように OCT-A と OCT-B との分離に比較的良好であり、TLC 検索によって図中に示す 6 画分に抽出液をまどめたところ OCT-A のみを含む F3 および幾分かの不純物を含む F2 については容易にベンゼンから OCT-A 純結晶を得ることができた。さらに、OCT-B と少量の OCT-A を含む F4 は同様に再クロマトを行い OCT-A と B の分離ができ、OCT-B と幾分かの不純物を含む F5 はアセトニトリルから OCT-B を結晶化できた。

実際にはハンデタイプの紫外線灯でカラムのけい光バンドを観察しながら分画することができる。

以上のように、OCT の単離・精製を行って、約 14 kg の精白米培地を用いて約 13 g の OCT-A 結晶を得、副産物として OCT-B 3.5 g を得た。得られた OCT-A 結晶の量は、ひき割小麦培地を用いた Nesheim¹⁵⁾ が得た 846 mg/kg 培地と比べてそん色なく、宮木ら¹²⁾ が合成液体培地で得た 608 mg/L 培地より良好で、満足できる結果と考えられた。なお、OCT-A はベンゼンから結晶化すると OCT-A 1 モルに対しベンゼン 1 モルを含む無色針状晶となるが、減圧下 80° で加熱するとベンゼ

ンを含まない結晶が得られた。

得られた OCT-A は、そのマスペクトル、融点、紫外外部吸収スペクトル、TLC などと同定および純度検定された。

まとめ

OCT の生物活性の研究に必要な大量の本トキシン供給を目的に、安定な OCT-A 高生産能をもつ菌株を求め、さらにこの菌株を大量培養したカビ米から大量の OCT-A を単離・精製する手法を検討した。

1) 未焙焼コーヒー豆から分離した 51 株の *A. ochraceus* 菌株を対象に OCT 生産性の検討を行った結果、*A. ochraceus* と同定された 5 菌株中 3 菌株に OCT-A 生産性を認めた。

2) 上記 3 菌株と以前大麦から分離された OCT 生産性既知の *A. ochraceus* 2 菌株とを対象に OCT-A 生産量を調べ、*A. ochraceus*, NHL-5304 および 5294 の 2 株を高生産能菌株として得、さらに単胞子分離法により、これらを親株とする安定な OCT-A 高生産能をもつ子株を数株得た。

3) 培養条件としては、精白米 30 g を 300 ml の三角フラスコに入れ、米の 40% 量の水を加えた場合に OCT 生産性が良好だった。

4) 大量のカビ米からの抽出溶媒としてはクロロホルム-酢酸 (99:1) が良好で、精製の際用いたシリカゲルカラム法はベンゼン-酢酸 (0~12%) の段階的グラジエントが大量の粗毒素から容易に OCT-A を取り出すのに良好だった。

以上のことから、今回筆者らは約 14 kg の精白米培地を用いて約 13 g の OCT-A、副産物として OCT-B 3.5 g を得た。ここに、大量の本トキシンを供給するのに十分な基礎ができたと考える。

なお、この研究の一部は厚生省ガン研究助成金 (53-2) に依った。

本報の概要は、日本食品衛生学会第 37 回学術講演会 (昭和 54 年 5 月、東京) において発表した。

文 献

- 1) Van Walbeek, W., Moodie, C. A., Scott, P. M., Harwit, J., Grice, H. C.: Toxicol. Appl. Pharmacol., **20**, 439~441 (1971).
- 2) Theron, J. J., Van der Merwe, K. J., Leibenberg, N., Joubert, H. J. B., Nel, W.: J. Pathol. Bacteriol., **91**, 521~529 (1966).
- 3) Kanisawa, M., Suzuki, S.: Gann, **69**, 599~600 (1978).
- 4) Scott, P. M., Van Walbeek, W., Kennedy, B., Anyeti, D.: J. Agr. Food Chem., **20**, 1103~1109 (1972).
- 5) Levi, C. P., Trenk, H. L., Mohr, H. K.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **57**, 866~870 (1974).
- 6) 杉本貞三, 南沢正敏, 高野和子, 笹村靖子, 鶴田

- 理: 食衛誌. 18, 176~181 (1977).
- 7) Krough, P., Hald, B., Pedersen, E. J.: *Acta Path. Microbiol. Scand. B*, **81**, 689~695 (1973).
- 8) Hesseltine, C. W., Vandergraff, E. E., Fennel, D. I., Smith, M. L., Shotwell, O. L.: *Mycologia*, **64**, 539~550 (1972).
- 9) Scott, D. B.: *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **25**, 213~222 (1965).
- 10) Lai, M., Semeniuk, G., Hesseltine, C. W.: *Appl. Microbiol.*, **19**, 542~544 (1970).
- 11) Sansing, G. A., Davis, N. D., Diener, U. L.: *Can. J. Microbiol.*, **19**, 1259~1263 (1973).
- 12) 宮木高明, 前林行雄, 山崎幹夫: 千葉大腐研報. **23**, 41~46 (1970).
- 13) Scott, P. M., Kennedy, B., Van Walbeek, W.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **54**, 1445~1447 (1971).
- 14) Davis, N. D., Sansing, G. A., Ellenburg, T. V., Diener, U. L.: *Appl. Microbiol.*, **23**, 433~435 (1972).
- 15) Nesheim, S.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **52**, 975~979 (1969).
- 16) Raper, K. B., Fennell, D. I.: "The Genus *Aspergillus*" p. 51~52 (1965) Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 17) 一戸正勝, 高島浩介, 田中しず子, 熊田広子, 鈴木敏正, 倉田 浩: 食衛誌. **16**, 381~390 (1975).
- 18) Schindler, A. F., Nesheim, S.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **53**, 89~91 (1970).
- 19) Ferreira, N. P.: Mateles, R. I. and Wogan G. N. (ed.), "Biochemistry of some Food-borne Microbial Toxins" p. 157~168 (1967) M. I. T. press, Cambridge Mass.