

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シン(DON+NIV)、米国NEOGEN社ベラトクスボミトキシシン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<sup>1)</sup>、<sup>3)</sup>、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、空間再現性とも優れ、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>		なし
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
インキュベート	抗体に対して、複合体と試料のDONが競合的に結合		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	検量線作成と濃度換算（Logit-Log解析による）		
	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		
	各ウェルの%吸光度値をLogit変換する $\text{Log } n \{ (\text{吸光度}\%) \div (100 - \text{吸光度}\%) \}$		
	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		
	試料吸光度値のLogit値をあてはめ、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：マルチチャンネルピペット（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 $\mu$ L (SP or MP) + 一次抗体液50 $\mu$ L (MP)
インキュベート	45分
洗浄	4 $\times$ 5
2次抗体液	100 $\mu$ L (MP)
インキュベート	30分
洗浄	4 $\times$ 5
発色基質液	発色液100 $\mu$ L (MP)
インキュベート	30分
反応停止液	50 $\mu$ 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	検量線作成と濃度換算 (M $\times$ 独自ソフトによる解析)
	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)

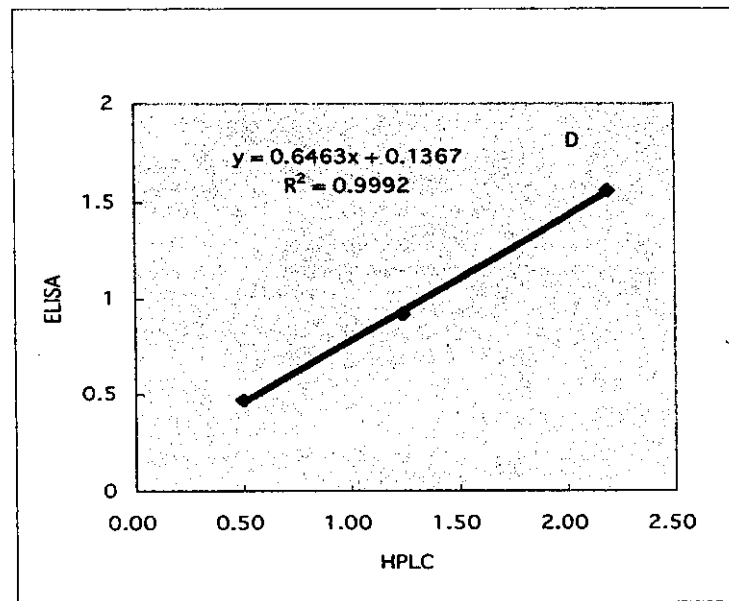
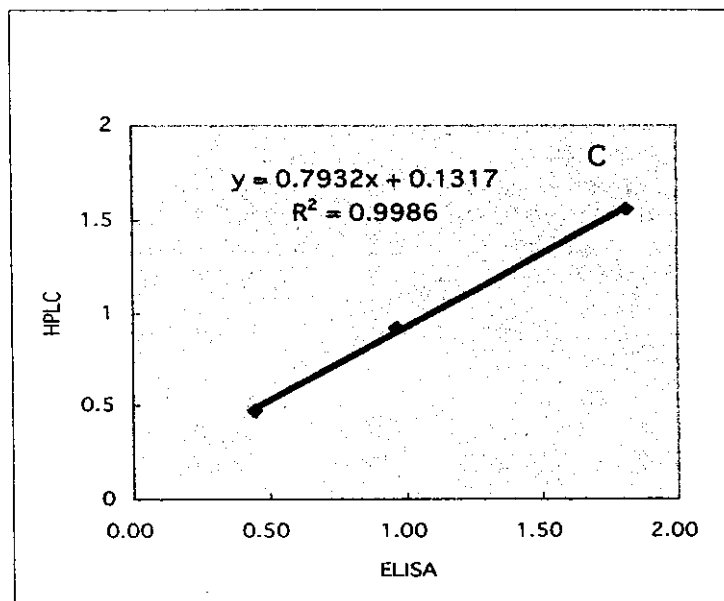
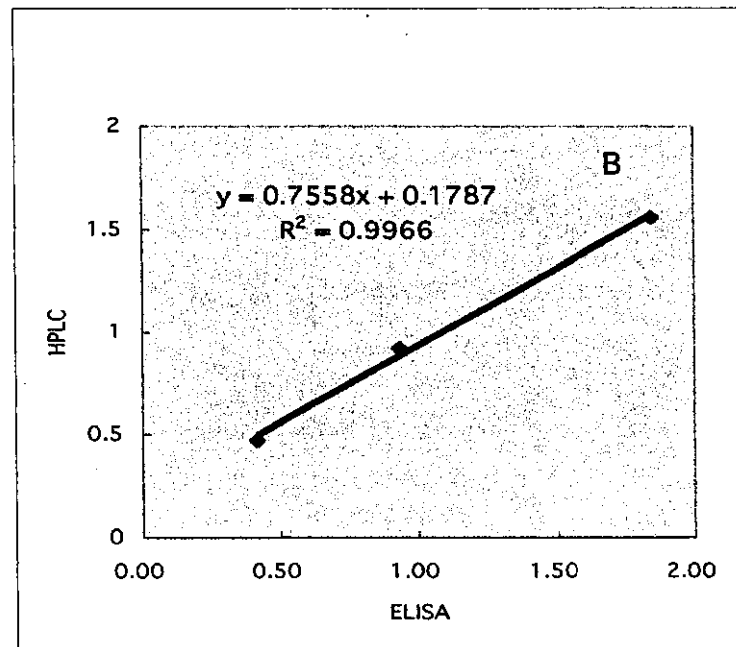
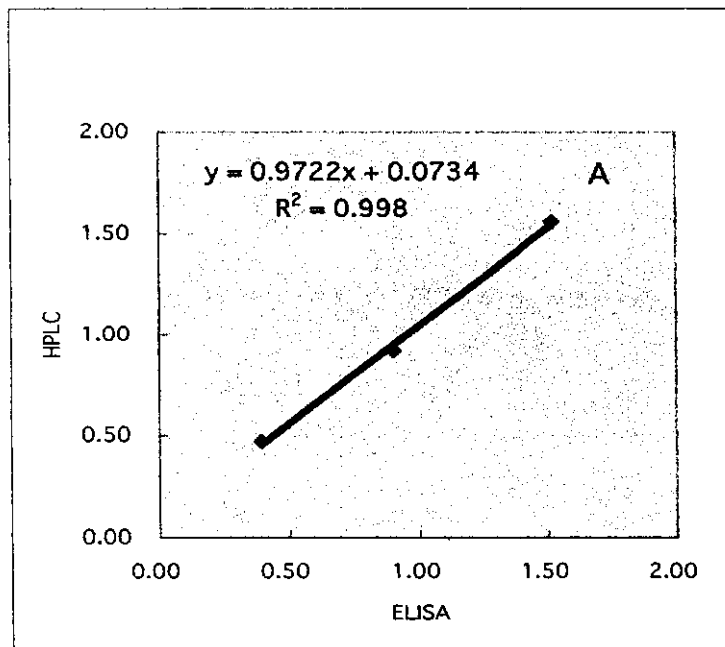


Fig.3 ELISA 分析値とHPLC分析値との相関係数

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					