

## オクラトキシン

## ——オクラトキシンの性状と分析方法——

矢崎 廣久, 高橋 治男

Ochratoxins : Production, Isolation, and Analysis of the Ochratoxins

Hirohisa YAZAKI and Haruo TAKAHASHI

## I はじめに

かび毒(マイコトキシン)は、かびの第二次代謝産物で、一般に低分子化合物が多く抗原性は持たないが、タンパク質と特異的に結合するものもあり、ヒト・動物などに種々の障害を起こす。本物質の特徴は、ヒト・家畜等が、かび毒に自然汚染された食物や飼料の摂取を継続した時、主たる急性症状をみないまま、発癌を頂点とする重篤な慢性障害に移行する点にある。発癌性マイコトキシンの代表的なものは、化学発癌物質に多く認められる作用メカニズム、すなわち生体内代謝により活性化され、作用発現に至るが、それ自身直接作用する場合もある。いずれにしろ、大部分のマイコトキシンは一旦食物に混入すると、普通の調理・加熱では分解されない程度の耐熱性を持ち、食品衛生上、難しい問題を含んでいる。したがって、医科学、微生物学、毒性学、天然物化学分野における基礎的な究明もさることながら、食物、飼料などに関するマイコトキシン汚染をいかに防止するかが重要で、有害かびの菌学的同定・分布調査及び化学的分析に基ずく自然汚染状況の実態把握は不可欠である。

数年来、著者らは代表的な発癌性マイコトキシンとして知られるオクラトキシン(OCT)について、産生菌の分離・培養・同定並びに分離・抽出、さらに食品類に含まれるOCTの分析法の研究を通じて、OCT汚染問題の解明に取り組んでいる。本稿では、OCTの由来とその性状、及び分析方法などについて、著者らの調査結果も織込みながら紹介する。

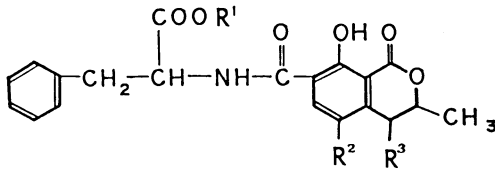
## II オクラトキシンの生産菌及びオクラトキシンの毒性

OCTは、南アフリカ産トウモロコシ由来の分離株

*Aspergillus ochraceus*から産生される有毒代謝産物<sup>1)</sup>として見い出され、その後Brounら<sup>2)</sup>による妊娠ラットの実験で催奇性が、さらに蟹沢ら<sup>3)</sup>のマウス実験で腎臓での発癌性が確認された。このようにOCTの毒性は、当初肝毒性が強調されたが、最近では腎毒性も注目されるようになった<sup>4)</sup>。LD<sub>50</sub>の値<sup>5-9)</sup>を見ると、OCT-Aがラットで20mg/Kg(p.o)、サル32-46mg/Kg、そしてアヒルヒナで150 $\mu$ g/羽、ブタでは8.1-9.1mg/Kgであるが、作用メカニズムの詳細は、今のところ不明である。Purchaseら<sup>7),9)</sup>は、ホスホリラーゼが阻害され、肝グリコーゲンが増加すると結論づけたが鈴木ら<sup>10)</sup>は肝細胞への血糖障害が起り、肝グリコーゲンは減少すると報告した。蟹沢ら<sup>3)</sup>はマウスによる発癌実験について、248~276 $\mu$ g/dayづつ、15週間の投与(OCT-Aの投与量総計は26~29mg)で腎細胞癌の発生を認めた。

現在までに、OCTの生産菌は*Aspergillus*属及び*Penicillium*属で14種が発見されている。<sup>1),6),11-12)</sup>すなわち、*Aspergillus ochraceus Wilhelm*を代表として*A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. eleghans*, *A. sulphureus*, *A. melleus*, *A. sclerotiorum*, 並びに*Penicillium viridicatum*をはじめ*P. commune*, *P. cyclopium*, *P. variable*, *P. purpurrescens*, *P. palitans*などの報告例がある。

OCTの化学構造は<sup>1),5)</sup>、図1に示すように7-carboxy-5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3R-methyl isocoumarin核が、7位でL- $\beta$ -phenylalanineと結合を持つ数種の式で表わされる。OCT-Aの脱クロール体はOCT-B, ethylester体はOCT-Cと命名され、ほかにこれらのmethylester体も存在する。4-hydroxy-Aは<sup>16)</sup>、*P. viridicatum*から得られた化合物であるが、動物にAを投与した時に、尿中から検出される代謝物でもある。これらの化合物のうち、動物への毒性及び自然汚染の頻度などの理由から、とりわけAが問題視される。



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
A	H	Cl	H
B	H	H	H
C	Et	Cl	H
A methylester	Me	Cl	H
B ethylester	Et	H	H
B methylester	Me	H	H
4-hydroxyl	A	H	Cl

図1. オクラトキシンの構造

### III オクラトキシン生産菌の培養並びにオクラトキシンの抽出

OCT生産菌の検索の際、使用される培地としてCzap-ek寒天, Raper and Fennel<sup>19)</sup>, Raper and Thom<sup>14)</sup>の培地、更に変法培地<sup>15)</sup>としてFerreiraの培地にグルタミン酸、酵母エクストラクトを加えたもの及びポリペプトンやL-フェニルアラニン添加培地など知られている。<sup>17-20)</sup> OCTの産生条件<sup>21)</sup>として、*A. ochraceus*はAw値が0.88でもOCTを産生するが、*P. viridicatum*はAw0.90以下では、OCTを産生できない。また温度によOCT産生性をみると、*A. ochraceus*は12°C以下ではOCTを産生しないが、*P. viridicatum*は4~31°Cの温度範囲においてOCTを産生した。普通は、温度25~28°C、高い湿度で1~2週間、暗所にて静置培養を行なうのが良いとされている。

著者ら<sup>21-23)</sup>は、OCT産生性の高い検定用培地を選ぶ目的で、数種の穀類及び液体培地の試験を行なった。すなわち、OCT生産菌*A. ochraceus* IFM4443株を米、小麦、大麦など穀類に、また4%シュクローズ、2%イーストエクストラクト含有の液体培地に接種して、OCT産

表1. 培地の違いによるオクラトキシンAの産生量比較

産生量	種類	穀物培地 <sup>※1)</sup>				液体培地 <sup>※2)</sup>
		米	大麦	小麦	割小麦	
オクラトキシンAの産生量 (mg/培地100g)		14.9	47.8	52.9	62.9	0.1

※1) 穀物培地は、穀物30gに水15ml加え、*A. ochraceus*を接種して、28°C、9日間培養後、抽出・

分離し、薄層用自記濃度計で定量した。

※2) 液体培地は、100mlあたり、シュクローズ4gとイーストエクストラクト2gを加え、菌を接種・培養ののち、同様に操作し、定量した。

生量を比較した。表1に示すように、穀物培地のうち割砕小麦が特に良好な結果を与え、このことはSchindlerらの報告<sup>25)</sup>とも良く符合した。培養物からOCTを抽出・精製する仕事は、精力的に検討されている。Scottら<sup>26)</sup>は、トウモロコシ培養物からOCTを抽出するため、まずクロロホルム-メタノール(1+1)で抽出、続いて粗抽出物をクロロホルムに溶解し、水洗、重ソウ溶液へ逆分配ののち、酸性として再抽出する方法によった。Merwe<sup>28)</sup>は、さらにイオン交換クロマト及び分配クロマトを用いて、OCT混合物AとBの分離を行なった。また、Chu<sup>27)</sup>とNesheim<sup>30)</sup>らは、クロロホルム-メタノール抽出物をn-ヘキサンのほかに熱クロロホルム処理し、濃縮した沈澱を重ソウ液で再抽出し、酸性下でクロロホルム転溶ののち、酸性シリカゲルクロマト処理、イオン交換クロマト精製によりAとBの結晶を得た。多くの報告例が操作的に類似しており、溶媒は酢酸エチル、クロロホルム等使用している<sup>31)</sup>。近年、熊田ら<sup>29)</sup>は、かび培養米にクロロホルム-酢酸混液を加え、抽出物を重ソウ液に転溶ののち、酸性でクロロホルム抽出し、シリカゲルカラムによるグラジエント溶出の方法を用いてAとBを単離した。

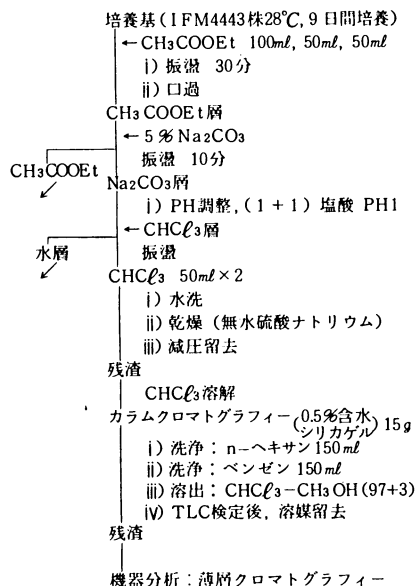


図2 オクラトキシンの分離精製法

著者ら<sup>21),23)</sup>は、図2の操作法を作成し、収量良くOCTを分離した。まず抽出溶媒は、実験室で汎用される各種溶媒について、抽出率を調べた。小麦にOCT-Aを添加して検討したところ、クロロホルム、テトラヒドロフラン、エーテル、酢酸エチル、ベンゼンなどで良好な値をみた。特にクロロホルム、エーテル、酢酸エチルは100%近い回収率であった。しかし、抽出物を有機溶媒からアルカリ溶液層に転溶する際、エマルジョン形成に伴う妨害など考慮して、酢酸エチルを選択した。また転溶に供するアルカリ溶液として、従来から重ソウ液を推奨する傾向が見られたが、表2で明らかな様に5%炭酸ナトリウム液を用いた場合、良い値が得られた。次の液液分配操作、すなわちアルカリ溶液を酸性に変え、有機溶

媒で再抽出する段階では、図3に示すように塩酸酸性でPH1以下とし、クロロホルム抽出を行うのが良いと思われた。得られた抽出物は、0.5%含水シリカゲルカラムで単離・精製するものとし、n-ヘキサン、ベンゼンで洗浄のち、クロロホルム-メタノール混液にて溶離を行なった。

各溶離フラクションは、TLC確認を行なってOCTのAとBに分離した。OCTは、官能基の特性上、活性シリカゲルカラムを用いると、強い吸着作用のため回収率の低下を招く。そこで著者らは、含水カラム及びメタノール等の溶離溶媒の組合せにより操作を行なった。

#### IV 穀類及び食品類のオクラトキシンによる自然汚染

OCT生産性を有するかびの種類は多いが、現在までに報告のあったOCTの自然汚染例は、*A.ochraceus*及び*P.viridicatum*の2菌種によっている。Shotwellら<sup>31)</sup>によりトウモロコシ汚染が、またScottら<sup>32)</sup>により小麦の汚染例が検出され以降、麦類、豆類、飼料など、主として穀物汚染が報告されている。<sup>33-36)</sup>本邦では、内山ら<sup>37)</sup>により長崎の米から50ppbのOCT-Aが初めて検出された。一方、菌検索の例として、山崎ら<sup>38)</sup>は米穀から*A.ochraceus*を得たと報告している。現在ではこのほかに、小麦、大豆、アズキ、ピーナッツ、コショウ、味噌、コーヒー豆、煮干、カツオブシ、ソーセージなどの穀物・食品類について、検出例が知られている。<sup>3),6),38-40),42)</sup>同様にOCT生産菌*P.viridicatum*による汚染例として、杉本ら<sup>41)</sup>は、北海道の穀物倉庫における長期貯蔵米からOCT-A、シトリニン及びステリグマトシスチンの複合汚染を認めたと、それら起因菌の1種として*P.viridicatum*を検出した。森ら<sup>43)</sup>はカツオブシ23検体を調査して、1検体から1.36ppmのOCT-Aを検出した。

畜肉製品でも、貯蔵肉から*P.viridicatum*が分離された例<sup>44)</sup>もあるが、著者<sup>45-46)</sup>らは食肉工場の低温庫に保存された牛肉から、0.36ppmのOCT-A並びに0.42~1.44ppmのシトリニンを検出した。さらに菌検索の結果、これらのマイコトキシン生産能を持つ*P.viridicatum*を分離した。消費者からの苦情で、かび着生のフランス製クリームチーズが当研究所に持ち込まれ、検索したところ、OCT生産能のある*P.viridicatum*と同定された。<sup>47)</sup>しかし、今までのところ我が国では、食肉・乳肉製品の実態調査は充分になされていない実情にあり、さらに詳細なデータ蓄積が望まれる。

表2. オクラトキシン抽出用アルカリ溶液の比較

抽出溶液%	チャート積分値%	相対比率(%)
3% NH <sub>4</sub> OH	2.2	84.6
1% NaOH	2.3	88.5
5% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.6	100
Sat. NaHCO <sub>3</sub>	2.0	76.9

※ 酢酸エチル層からオクラトキシンAを抽出した場合のアルカリ溶液層

※※ TLCクロマトグラムを薄層デンストメーターにて計測し、ピーク面積より算出

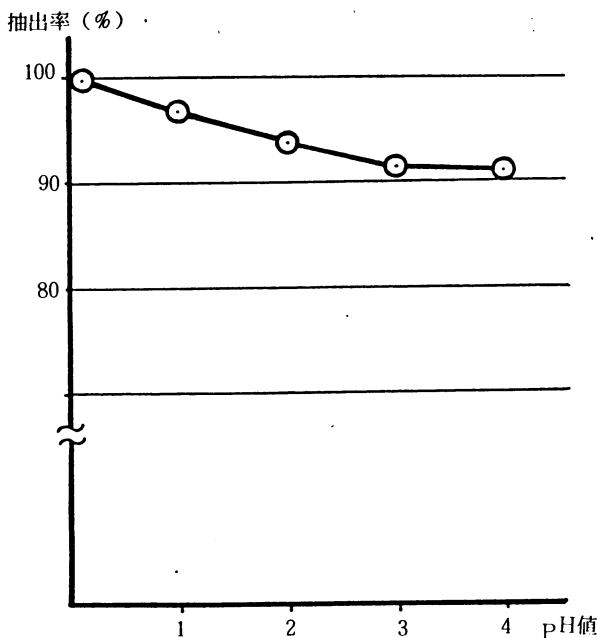


図3. オクラトキシン抽出率に及ぼすPH効果

(註) 抽出溶媒はクロロホルム、溶液は塩酸酸性とした。

V オクラトキシンの分析法

1. オクラトキシンの抽出・クリーンアップ法

既述の通り、OCTの自然汚染は穀物を主体にした例が多く、したがって分析法も穀物を中心に考案された操作法が大部分である。<sup>18)</sup>Steynら<sup>51)</sup>は、トウモロコシ製品を分析する際、クロロホルム-メタノール混液でソックスレー抽出を行ない、これにクロロホルムを加え、炭酸ナトリウム溶液で逆抽出のち、液層を酸性にし、再びクロロホルムへ転溶した。ほかに、クロロホルムによる繰返し抽出、メタノール-水-ヘキサン混液で抽出し、セライト処理する方法、さらにクロロホルム-水で抽出、シリカゲルカラムで製精する方法などもある。<sup>8-10)</sup>内山ら<sup>37)</sup>は、メタノール-3%炭酸水素ナトリウム混液により抽出し、酸性としてクロロホルム抽出、さらにシリカゲルカラムで精製する方法により、米試料のOCT-A添加回収試験で良い結果を得た。いずれの方法においても、カラムクロマトによる最終的なクリーンアップ操作は、シリカゲルに保持させ、n-ヘキサン、エーテル、クロロホルム等で洗浄、続いてベンゼン、アセトン、メタノール、酢酸、辛酸などを適宜組合せて溶出するパターンが多い。

近年、マイコトキシン分析法の傾向として、単一目的物のみを検出する方法以外に、数種類以上の物質の同時分析、すなわちマイコトキシンの複合汚染に適用可能な方法の開発も行なわれている。Eppley<sup>51)</sup>, Golinski<sup>52)</sup>らは、食品中のOCT、アフラトキシン、ツェアラレノンの同時分析について、Kennethら<sup>53)</sup>はフオミトキシンにセカロン酸をもつけ加えて、またStoloffら<sup>54)</sup>はステリグマトシスチン、パツリンも含めて、各種穀類に適用できる方法を報告している。さらに、Roberts<sup>55)</sup>, Gimeno<sup>56)</sup>, 武田<sup>57)</sup>らの報告によると、穀類中の10数種類のマルチマイコトキシンについて分析が可能となった。これらの方法は、すべてアセトニトリル-塩化カリウム混液による抽出を基礎としているが、著者ら<sup>15-16)</sup>,<sup>38-50)</sup>がアセトニトリル、メタノール、アセトン、ホルムアミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどについて検討したところ、同一の結論を得た。すなわち、アセトニトリルはマイコトキシンに対する抽出率も比較的良好いが、ことに食品中の妨害成分の取込みが少なく、液々分配の際、転溶が無駄なく行なわれた。そこで著者らは、アセトニトリルを主体にした溶媒系を用いて、抽出・クリーンアップ等の操作にも改良を加えた(図4)。本法は穀類だけでなく、肉、チーズなど、脂肪、タンパク含量の高い食品へ有効に適用でき、OCT、シトリニン、アフラトキシン、ステリグマトシスチンの同時分析に有

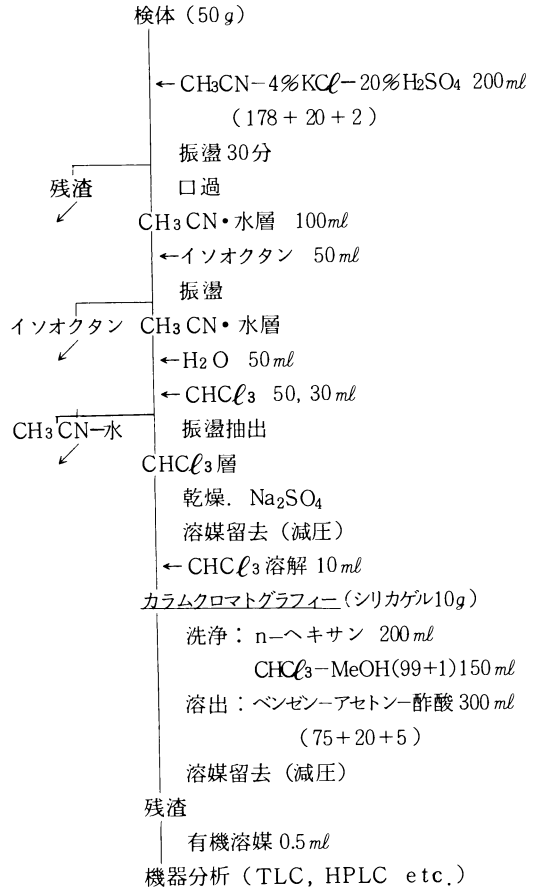


図4 マルチマイコトキシンの分析法

用であった。本法のカラムクロマトによる精製は、シリカゲル担体を用いる方法と、セップパックC<sub>18</sub>カートリッジ(ウォーターズ)によるイオンペアクロマトグラフィーを使用する方法と、二通り検討し、良好な結果を得た。

2. オクラトキシンの検出・定量

従来、有機物検出に多大な威力を発揮したガスクロマトグラフは、検出時に試料を高温でガス化するので、OCTなどの揮発性及び熱安定性を欠く物質を直接測定するのは、不向きであった。しかし、本物質は、紫外線照射により特有のけい光を発するので、この性質は薄層クロマトグラフィー(TLC)による分離・検出時に、良く利用された。換言すれば、TLCはOCT分析において、大部分の報告例を独占していた。ところが近年、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の急速な発達に伴ない、また検出器性能の向上、分離カラムの改良も行なわれ、マイコトキシンの分野でもHPLCの報文が見られている。

(1) 薄層クロマトグラフィー  
薄層プレート上、3650Åの紫外線燈で照射すると、OCT-Aは青緑色、Bは青色、Cは明澄な緑色のけい光スポットとして観察される。OCT-Aの場合、肉眼によ

ても10ng程度の微量確認が可能である。<sup>5-6), 10)</sup>OCTは、カルボキシル基、フェノール性水酸基など有するので、TLCはシリカゲル担体に展開溶媒としてギ酸、酢酸を含む溶剤系が多用される。表3に文献上のTLC条件を、

表3. オクラトキシン分析の薄層展開溶媒

溶 媒 系	種 類	T L C の R f 値 ※	
		ochratoxin A	ochratoxin B
benzene:acetic acid (4+1)		0.50	0.35
benzene:methanol:acetic acid (12+2+1)		0.60	0.52
toluene:ethylacetate:90%formic acid (5+4+1)		0.70	
chloroform:methylisobutyl ketone (4+1)	oxalic acid 混入の silica	0.48	0.20
chloroform:ethylether:acetic acid (17+3+1)	使用 0.55	0.42	

※ Silicagel plate 使用

表4. オクラトキシンおよびシトリニン分析における薄層展開溶媒

溶 媒 系	種 類	T L C の R f 値	
		ochratoxin A	citrinin
acetone:H <sub>2</sub> O:methanol:ethyl acetate (80+10+1+80)		0.15	0.59
acetone:1%phenol:ethyl acetate (16+3+16)		0.41	0.52
1%phenol sat. CHCl <sub>3</sub> :methanol (7+3)		0.28	0.43
acetone:H <sub>2</sub> O:ethyl acetate (4+1+4)		0.45	0.57

プレート: Adsorbosil-1 (0.25mm layer) UV light (3650 Å) 下で検出

表4に著者らがOCT及びシトリニンの同時分析を目的として検討した溶媒を示す。<sup>60-61)</sup>ところで、展開後の薄層プレートを薬剤又は熱処理して、けい光強度を高める方法、すなわちけい光増強操作は、OCTを検出・確認するのに有効な手法と言える。例えば、属開した薄層プレートに水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、トリメチルアミン、塩化アルミニウムなどの溶液を噴霧、加熱し、場合によってさらにアンモニア蒸気に曝露するなどの操作をすると、プレート上のOCTは輝青色～輝青紫色の強いけい光を呈する。プレート上で、目的物質の上に夾雑物が重なり、妨害が生じた場合、あるいは試料スポットが低濃度で不明瞭な場合に便利である。<sup>54-56)</sup>

薄層クロマトグラムから定量値を求める場合、肉眼判定による段階希釈法もあるが、一般にはけい光検出器付

薄層用自記濃度計を用いる。<sup>47)</sup>Nesheim,<sup>30)</sup>Chu,<sup>27)</sup>宮木ら<sup>20)</sup>は、同機器による測定で0.01~0.1µg/spot, 0.001~0.01µg/spot並びに0.17~5.0µg/spotの濃度範囲において、OCTの検量線は直線性を示すと報告した。TLCの分離条件が決まれば、簡便で迅速な検出法である。

著者ら<sup>60-62)</sup>が使用した機器の測定条件及び検量線を、図5に示す。測定機器は、けい光装置としてXeランプを使用、励起波長340nm、けい光波長450nm (OCTの実測値はλex340nm, λem475nm) において0.05~5.0µg/spot範囲で直線性があつた。なお検出限界は0.02µg/spotで、これは塩化アルミニウム、トリメチルアミンによる処理ののちも、変化は見られなかった。

(2) 高速液体クロマトグラフィー

HPLCは、TLCに比べ、測定に際していちどきに多

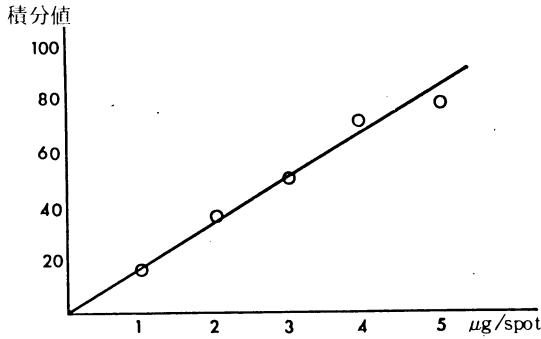


図5. 薄層用自記濃度計によるオクラトキシンAの検量線  
(測定条件)

機器：けい光測定装置付二波長クロマトスキャナーCS-910  
波長： $\lambda_{ex}$  340nm,  $\lambda_{em}$  450nm (干渉フィルター)  
モード：反射式, リニアースキャン

多くの検体処理が困難、コストパフォーマンスが良くないなどの理由から、報告例は余り見られなかった。ところが近年、機器の進歩・普及に伴ない、生理活性物質や高分子生体成分、さらに代謝産物への優れた分離能、感度等が実証されるに及び、揮発性や化学安定性に乏しい

マイコトキシンへの適用が見直されている。Osborne,<sup>63)</sup> Hunt,<sup>64)</sup> Josefsson,<sup>65)</sup> 五十畑<sup>66)</sup>らは、 $C_{18}$  (ODS) 及び $C_{8}$ 系の逆相カラムにけい光検出器を組合せ、OCT-Aの高感度分析を行なった。特に良い最小検出量では、0.05ngとさきわめて低い値も得られた。最近、都立衛研では、ODSカラムにアセトニトリル-1%リン酸の移動相、けい光検出器を用いて定性・定量を試み、OCT-A及びBの分離と、エステル化誘導体による確認を行なった。<sup>67)</sup> 定量の際の検量線は、A, B共に1~10ngで直線性を示した。

著者ら<sup>21), 58)-59)</sup>は、OCTほか数種類のマイコトキシンについて、けい光検出器、紫外部検出器を応用したHPLC測定を検討してきた。カラムは、ポーラス型シリカゲル、日本分光のファインジルと日立ゲル#3030、移動相は、ジクロロメタン-イソプロパノール及び2%酢酸飽和ジクロロメタンを使用し、穀物への添加回収試験を実施したところ、良好な分離ピークが得られた。更に、逆相分配カラム、ゾルバックス $C_{18}$ 、移動相にアセトニトリル-水-酢酸を用い、紫外部検出器327nmのセット

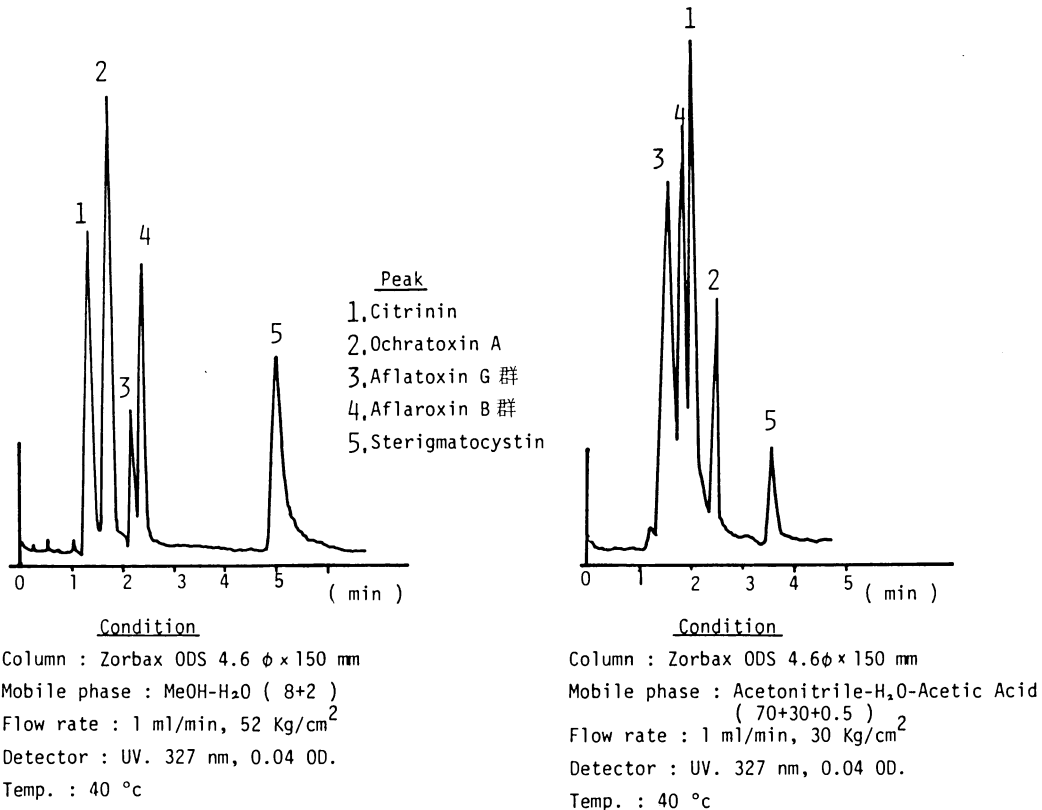


図6 各種マイコトキシンの高速液体クロマトグラム

により、OCT-Aをはじめ、シトリニン、アフラトキシン、ステリグマトシスチンを同時検出した(図6)。

### (3) 酵素免疫測定法

マイコトキシンを特異的に、感度良く測定する方法として、酵素免疫測定法は、最近期待が持たれている。Chu,<sup>68)</sup>Pestka,<sup>69)</sup>Morgan,<sup>70)</sup>Lee<sup>71)</sup>らは、OCT-Aに対するウサギあるいは牛の抗血清を作成し、ラジオイムノアッセイや酵素抗体法(ELISA)を応用して、穀物などのOCT-Aを測定した。また、千葉<sup>72)</sup>は、モノクローナル抗体を作成し、OCT-A及びBの検出・定量を行なった。本法では、OCT-AとBの交差反応が排除できて、Aのみの特異的な定量が可能であると述べられている。

## VI 結び

マイコトキシンの問題は、1947~1954年の我が国における黄変米事件、また世界的には、1960年の英国での七面鳥大量斃死事故などを契機として、国家的な規模で取組が行なわれるようになった。その後、多くの研究者の精力的な調査により、原因の究明、実態調査、更に、その幾つかについては対策もたてられている。マイコトキシンは、分っているものだけでも300数十種以上と言われ、なお現在も追加され続けている。本稿では、その中の代表的な1例としてOCTを取り上げ、分析関係の仕事を中心に、その概略を述べた。しかし、既述の通り、OCTに関して、解明されているのは部分的内容のみである。マイコトキシンの取組は、典型的には、ヒト及び家畜の中毒原因の究明に始まり、徐々にその概要が解明されるパターンの積重ねであった。

植物の枯葉、動物などの排泄物・死骸など、分解・整理にあたる重要な働き手、かびは、土壌中のフローラが何らかの環境変化を受けると、一転して作物に被害を多発させる植物病原菌の異常増殖を誘発させる。さらに収穫物に着生し、増殖するかびは、ほ場で生育するもの、あるいは保存時に生ずるものに大きく分かれながら、食糧をむしばんでいる。また、有害かびによるマイコトキシン産生の問題も加味すると、ヒト及び動物の食餌供給に重大な脅威を与えかねない相手である。したがって、さらに正確に“かび及びかび毒”の全容を解明する必要があり、そのために地道な調査研究成果の集積が期待される。

## 謝辞

おわりに臨み、貴重な文献並びに培養物を賜った国立

衛生試験所衛生微生物部、一戸正勝博士及びゲンゼ(株)、倉田 浩博士に深謝いたします。

## 文献

- 1) Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S. and Faurie, L.: Mycotoxins. Part II. The Constitution of Ochratoxin A, B and C, Metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh., J. Chem. Soc., 7083-7088, 1965.
- 2) Brown, M. H., Sgegech, G. M., Purmalis, B. P.: Teratogenic and toxic effect of ochratoxin A in rats, Toxicol. Appl. Pharmacol., 37, 331-338, 1976.
- 3) Kanisawa, M., Suzuki, S.: Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin, Gann, 69, 599-600, 1978.
- 4) Krogh, P., Hald, B. and Pedersen, E. J.: Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated mycotoxic porcine nephropathy, Acta. Path. microbiol. scand. B, 81, 689-695, 1973.
- 5) Steyn, P. S., 1971: Fungal toxins, Microbial Toxins, Vol. VI, Academic Press (New York), PP563.
- 6) Harwig, J. 1974: Ochratoxin A and related metabolites, Mycotoxins, Elsevier (Amsterdam), PP443.
- 7) Purchase, I. F. H. and Theron, J. J.: The acute toxicity of ochratoxin A to rats, Food Cosmet. Toxicol., 6, 479-483, 1968.
- 8) Kanisawa, M., Suzuki, S., Kozuka, Y., and Yamazaki, M.: Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats, Acute oral toxicity, Toxicol. Appl. Pharmacol., 34, 55-64, 1977.
- 9) Pitout, M. J.: The effect of ochratoxin A on glycogen storage in the rat liver, *ibid.*, 13, 299-306, 1968.
- 10) Suzuki, S., Satoh, T. and Yamazaki, M.: Effect of ochratoxin A on carbohydrate metabolism in rat liver, *ibid.*, 32, 116-122, 1975.
- 11) Hesseltine, C. W., Vandegrift, E. E., Funnell, D. I., Smith, M. L. and Shotwell, O. L.: *Aspergilli* as Ochratoxin Producers, Mycol-

- ogia, 64, 539—550, 1972.
- 12) Walbeek, W., Scott, P. M., Harwig, J. and Lawrence, J. W.: *Penicillium viridicatum* Westling: A new source of ochratoxin A, Can. J. Microbiol., 15, 1281—1285.
  - 13) Raper, K. B. and Fennell, D. I., 1965: The Genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins Co. (Baltimore), pp101.
  - 14) Raper, K. B. and Thom, C., 1968: A manual of *Penicillia*, Hafner (New York), pp489.
  - 15) Ferreira, N. P., 1967: Biochemistry of some foodborne microbial toxins, M. I. T. press (Massachusetts), pp168.
  - 16) Hutchison, R. D., Steyn, P. S. and Thompson, D. L.: The isolation and structure of 4-hydroxyochratoxin A and 7-carboxy-3, 4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarin from *Penicillium viridicatum* Tetrahedron Lett., 4033—4036, 1971.
  - 17) Davis, N. D., Searcy, J. W. and Diener, U. L.: Production of ochratoxin A by *Aspergillus* in a semisynthetic medium, Appl. Microbiol., 17, 742—744, 1969.
  - 18) Yamazaki, M., Maebayashi, Y. and Miyaki, K.: Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* isolated in Japan from moldy rice, *ibid.*, 20, 452—454, 1970.
  - 19) 宮木高明, 山崎幹夫, 堀江義一, 宇田川俊一: 米に着生する有害糸状菌の検索と分布について, 食衛誌, 11 (5), 373—380, 1970.
  - 20) 宮木高明, 前林行雄, 山崎幹夫: 米から分離した *Aspergillus ochraceus* の有害代謝産物について, 千葉大腐研報, 23, 41—46, 1970.
  - 21) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三: オクラトキシンの抽出と分析について, 千葉衛研報, 2, 1—6, 1978.
  - 22) 矢崎廣久, 高橋治男: 培養物からのマイコトキシン抽出, カビ毒研究連絡会第二回シンポジウム資料 (名古屋市), 1975.
  - 23) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三: マイコトキシンに関する研究, Ochratoxinの抽出と分離分析について, 第15回千葉県公衆衛生学会講演会要旨, P39, 1977.
  - 24) Northolt, M. D., van Egmond, H. P. and Paulsch, W. E.: Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature, J. Food Prot., 42, 485—490, 1979.
  - 25) Schindler, A. F. and Nesheim, S.: Effect of moisture and incubation time on ochratoxin A production by an isolate of *Aspergillus ochraceus*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 53, 89—91, 1970.
  - 26) Scott, P. M., Kennedy, B. and van Walbeek, W.: Simplified procedure for the purification of ochratoxin A from extracts of *Penicillium viridicatum*, *ibid.*, 54, 1445—1447, 1971.
  - 27) Chu, F. S. and Butz, M. E.: Spectrophotofluorodensitometric measurement of ochratoxin A in cereal products, *ibid.*, 53 (6), 1253—1257, 1970.
  - 28) Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, B. and Theron, J. J.: Ochratoxin A, acute metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh, Nature, 205, 1112—1113, 1965.
  - 29) 熊田勝紀, 天野立爾, 一戸正勝, 内山茂: 大量生産のため *Aspergillus ochraceus* のオクラトキシン産生条件, 精製法等の検討, 食衛誌, 21 (3), 171—176, 1980.
  - 30) Nesheim, S.: Isolation and purification of ochratoxin A and B and preparation of their methyl and ethyl esters, J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 52, 975—979, 1969.
  - 31) Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W. and Goulden, M. L.: Ochratoxin A: Occurrence as natural contaminant of a corn sample, Appl. Microbiol., 17, 765—766, 1969.
  - 32) Scott, P. M., Walbeek, W., Kennedy, B. and Anyeti, D.: Mycotoxins (Ochratoxin A, citrinin and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and agricultural products, Agr. Food Chem., 20, 1103—1109, 1972.
  - 33) Hesseltine, C. W.: Natural occurrence of mycotoxins in cereals, Mycopathol. Appl., 53, 141—153, 1974.
  - 34) Levi, C. P., Trenk, H. L. and Mohr, H. K.: Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans, J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 57 (4), 866—870, 1974.



- 35) Stack, M. E., Mislivec, P. B., Denizel, T., Gibson, R. and Pohland, A. E.: Ochratoxin A and B, xanthomelin, viomellein and xanthomycin production by isolates of *Aspergillus ochraceus* from green coffee beans, *J. Food Protection*, 46 (11), 965-968, 1983.
- 36) Walbeek, W., Scott, P. M. and Thatcher, F. S.: Mycotoxins from foodborne fungi, *Can. J. Microbiol.*, 14, 131-137, 1968.
- 37) Uchiyama, M., Isohata, E. and Takeda, Y.: A case report on the detection of ochratoxin A from rice, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 17 (1), 103-104, 1976.
- 38) 宇田川俊一, 鶴田理, 1975: かびと食物, 医歯薬出版(東京), PP379.
- 39) 真鍋勝, 田中健治, 斉藤道彦, 松浦慎治: カツオ節類のマイコトキシンに関する研究, *マイコトキシン*, 10, 1-3, 1980.
- 40) 坪内春夫, 山本勝彦, 久田和夫, 坂部美雄: 輸入生コーヒ豆のマイコトキシン汚染調査と毒素産生菌について, *マイコトキシン*, 19, 16-21, 1984.
- 41) 杉本貞三, 南沢正敏, 高野和子, 笹村靖子, 鶴田理, *Penicillium viridicatum* と *Aspergillus versicolor* による貯蔵米のオクラトキシンA, シトリニン, およびステリグマシスチンの自然汚染について, *食衛誌*, 18 (2), 176-181, 1977.
- 42) 井部明広, 西島基弘, 安田和男, 斉藤和夫, 上村尚, 永山敏廣, 牛山博文, 直井家壽太: 食品中のマイコトキシンに関する研究, オクラトキシン分析法および汚染調査, 日本食品衛生学会第43回学術講演会講演要旨集, P16, 1982 (東京).
- 43) 森悦男, 小川時彦, 山本順昭, 田中幸生, 小野勝美, 頭本藤雄, 一戸正勝, 倉田浩: 市販かつおぶし中のマイコトキシンの分析, 日本食品衛生学会第42回学術講演会講演要旨集, P20, 1981 (大阪).
- 44) 稲垣尚起, 高橋義光: 肉類に発生した糸状菌(第1報), *衛試報*, 79, 293-296, 1961.
- 45) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三: 貯蔵肉の *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* による自然汚染とマイコトキシン生産性について, *マイコトキシン*, 10, 29-31, 1980.
- 46) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三: マイコトキシンに関する研究, *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* による貯蔵食肉のカビ毒汚染について, *千葉衛研報*, 6, 6-9, 1982.
- 47) 矢崎廣久, 高橋治男: オクラトキシンの乳製品汚染について, 第18回マイコトキシン研究会シンポジウム発表, 1983 (横浜).
- 48) Horwitz, W. edit., 1980: Official methods of analysis of the A. O. A. C., Benjamin Franklin Station (Washington), pp1018.
- 49) Stoloff, L.: Report on mycotoxins, *J. Assoc. Anal. Chem.*, 56 (2), 278-282, 1973.
- 50) Nesheim, S., Hardin, N. F., Francis, O. J. and Langham, W. S.: Analysis of ochratoxin A and B and their esters in barley. Using partition and thin layer chromatography. 1. Development of the method, *ibid.*, 56 (4), 817-821, 1973.
- 51) Eppley, R. M.: Screening method for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin, *ibid.*, 51 (1), 74-78, 1968.
- 52) Golinski, P. and Grabarkiewicz-szczesna, J.: Chemical confirmatory tests for ochratoxin A citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates, *ibid.*, 67, 1108-1110, 1984.
- 53) Ehrlich, K. C. and Lee, L. S.: Mycotoxins in grain dust, Method for analysis of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, vomitoxin, and secalonic acid D, *ibid.*, 67 (5), 963-967, 1984.
- 54) Stoloff, L., Nesheim, S., Yin, L., Rodrics, J. V., Stack, M. and Campbell, A. D.: A multimycotoxin detection method for aflatoxins ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin, and patulin, *ibid.*, 54, 91-97, 1971.
- 55) Robert, B. A. and Patterson, D. S. P.: Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs, Using a novel membrane cleanup procedure, *ibid.*, 58 (6), 1178-1181, 1975.
- 56) Gimeno, A.: Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin, and penitrem A, *ibid.*, 62 (3), 579-585, 1979.
- 57) Takeda, Y., Isohata, E., Amano, R. and Uchiyama, M.: Simultaneous extraction and fr-

- actionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains, *ibid.*,62 (3), 573-578, 1979.
- 58) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三: 穀物中における各種マイコトキシンの検出について, 第9回カビ毒研究連絡会シンポジウム資料(神奈川県), 1982.
- 59) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三: 穀物における各種マイコトキシン分析法, 逆相分配クロマトグラフィーによるマイコトキシンの同時分析について, 第44回食品衛生学会講演要旨(福岡市), P45, 1982.
- 60) 矢崎廣久, 安田敏子: マイコトキシンに関する研究(第2報), 穀類中のシトリニンとオクラトキシンAの同時検出について, 日本食品衛生学会第29回講演要旨(東京), P21, 1975.
- 61) 矢崎廣久, 安田敏子: マイコトキシンに関する研究, 高速液体クロマトグラフィーによりシトリニンとオクラトキシンAの同時検出について, 千葉衛研年報, 23, 101-106, 1974.
- 62) 矢崎廣久, 安田敏子: マイコトキシンに関する研究, オクラトキシンAについての化学分析法について, 第14回千葉県公衆衛生学会講演要旨, P42, 1976.
- 63) Osborne, B. G.: Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A in flour and bakery products, *J. Sci. Food Agric.*,30, 1065-1070, 1979.
- 64) Hunt, D. C., Mcconnie, B. R. and Crosby, N. T.: Conformation of ochratoxin A by chemical derivatisation and high performance liquid chromatography, *Analist (London)*, 105, 89-90, 1980.
- 65) Josefsson, E. and Moller, T.: High-pressure liquid chromatographic determination of ochratoxin and zearalenone in cereals, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*,62, 1165-1168, 1979.
- 66) 五十畑悦子: 高速液体クロマトグラフィーによるマイコトキシン類(かび毒)の分析について, 防菌防黴, 4(9), 27-31, 1976.
- 67) 井部明広, 西島基弘, 安田和男, 斉藤和夫, 上村尚, 永山敏廣, 牛山博文, 直井家壽太, 二島太一郎: 高速液体クロマトグラフィーによる食品中のオクラトキシンA及びBの分析法, 食衛誌, 25(4), 334-341, 1984.
- 68) Chu, F. S., Chang, F. C. and Hinsdill, R. F.: Production of antibody against ochratoxin A, *Appl. Environ. Microbiol.*,31, 831-835, 1976.
- 69) Pestka, J. J., Steinert, B. W. and Chu, F. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of ochratoxin A, *ibid.*,41, 1472-1473, 1981.
- 70) Morgan, M. R. A., Mcnerney, R. and Chan, H. W.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in barley, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*,66(6), 1481-1484, 1983.
- 71) Lee, S. C. and Chu, F. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat, *ibid.*,67(1), 45-49, 1984.
- 72) 千葉丈, 梶井浩志, 川村理, 大井圭爾, 諸岡信久, 上野芳夫: モノクロナール抗体を用いたオクラトキシンAの酵素免疫測定法の開発, マイコトキシン, 21, 28-29, 1985.